

甜瓣子中生物胺产生菌株和降解菌株的筛选

李恒^{1,2,3}, 王泽亮¹, 邓维琴¹, 范智义¹, 李雄波¹, 王钰潞¹, 李洁芝¹, 张其圣^{1,2*}

¹四川省食品发酵工业研究设计院有限公司 成都 611130

²四川东坡中国泡菜产业技术研究院 四川眉山 620030

³江南大学 江苏无锡 214000)

摘要 甜瓣子发酵是豆瓣酱生产的重要阶段,低盐发酵甜瓣子中生物胺含量极易超标。采用生物胺显色培养基,以生物胺为唯一氮源的培养基(BAs)进行筛选,采用高效液相色谱法定量分析和荧光检测定性分析方法测定生物胺含量,并通过16S rDNA、18S rDNA和ITS测序鉴定菌株。结果表明,甜瓣子中产胺菌株多为芽孢杆菌属、肠杆菌属、短杆菌属,少数小孢根霉等也产生物胺,其中枯草芽孢杆菌 B11 在 9%和 12%盐度下发酵 16 d,分别产苯乙胺 233.9,546.5 mg/kg。降胺菌株以美极梅奇酵母属、片球菌属、乳杆菌属为主,其中香肠乳杆菌 F003 在 6%盐度发酵的甜瓣子中发酵 16 d,可完全降解 100 mg/L 的苯乙胺,对 100 mg/L 的组胺、酪胺和精胺的降解率分别达 57.61%,25.52%和 45.99%。F003 回接至 6%的甜瓣子,发酵得到的甜瓣子酯香味浓,无刺激性气味,甜瓣子品质好。在发酵甜瓣子体系中,枯草芽孢杆菌是产生物胺的主要菌种。本研究筛选到 1 株高效降解生物胺的香肠乳杆菌 F003,可为甜瓣子发酵体系中生物胺的控制提供菌株支持。

关键词 甜瓣子; 生物胺; 产生物胺; 降解生物胺; 菌株

文章编号 1009-7848(2022)10-0190-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.021

甜瓣子发酵将为豆瓣酱提供丰富的游离氨基酸、有机酸、挥发性风味物质及多种发酵微生物,是郫县豆瓣生产的重要阶段之一。目前,甜瓣子多采用高盐度发酵,发酵的盐度通常为 12%~17%,成品豆瓣酱的盐度高达 16%~20%^[1]。研究表明摄入过量的盐分,可能会引起心脑血管、高血压等疾病^[2]。目前我国每人每天平均膳食盐摄入量为(14.53 ± 11.04)g^[3],远超过世界卫生组织(WHO)推荐摄入量 5 g/d。豆瓣酱等高盐调味品为我国膳食盐分摄入的主要来源,低盐化已成为其发展的必然趋势。对甜瓣子发酵低盐化的研究具有重要意义。

低盐发酵甜瓣子因体系盐度较低,其游离氨基酸种类及含量相对较多,且发酵体系 pH 值相对较低,故极易造成生物胺等有害物质积累^[4]。生物胺是氨基酸在氨基酸脱羧酶的作用下脱羧生成的一类碱性次生代谢产物,过量摄入将造成一定的安全风险^[5-6]。使用生物技术控制发酵食品中生物

胺含量已有较广泛的研究,如 Kung 等^[7]、OH 等^[8]、Guo 等^[9]均对发酵食品中降解生物胺微生物进行筛选,并研究相关菌株的降解生物胺能力。然而,针对低盐发酵甜瓣子体系中产生物胺的菌株及降解菌株的研究相对较少。本研究采用荧光检测定性分析和高效液相色谱法定量分析,筛选甜瓣子中产生物胺和降解生物胺的菌株,并进行回接验证,分析含盐量和降胺菌株对甜瓣子产品安全性的影响,以期对低盐甜瓣子生物胺含量的控制提供参考。

1 试验材料

1.1 试剂与仪器

丹磺酰氯、1,7-二氨基庚烷、脯氨酸、鸟氨酸、精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸、5-磷酸吡哆醛、硫酸素均为化学纯,上海源叶生物科技集团股份有限公司;腐胺、尸胺、酪胺、苯乙胺、组胺、色胺、精胺、亚精胺均为色谱纯,上海源叶生物科技集团股份有限公司;氯化钠、乙腈、乙醚、七水合硫酸镁、硫酸锰、硫酸亚铁、磷酸氢二钾均为分析纯,成都科隆化工有限公司;Ezup 柱式真(细)菌基因组 DNA 抽提试剂盒,生工生物工程股份有限公司。

收稿日期: 2021-10-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400505);四川省重点研发项目(2020YFN0041)

作者简介: 李恒(1985—),男,博士,高级工程师

通信作者: 张其圣 E-mail: bigbeastone@163.com

126-II 高效液相色谱,安捷伦科技有限公司;凝胶成像仪,君意电泳有限公司;H2050R-1 离心机,长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司;DZKW-4 恒温水浴锅,北京中兴伟业仪器有限公司;ESJ200-4A 型分析天平,沈阳龙腾电子有限公司;SPX-150B-4 生化培养箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;THZ-82 水浴恒温振荡器,常州市中贝仪器有限公司;GeneAmp®9700 型 PCR 仪,美国 ABI 公司。

1.2 试验所用培养基

生物胺显色培养基:参考 Sara 等^[10]方法略作修改后配制;以生物胺为唯一氮源培养基(BAs):参考赵佳迪^[11]的方法,略作修改后配制。

6%/9%/12%盐度甜瓣子模拟体系(以 100 mL 计):霉瓣子 25 g+盐 4.5,9.4,13 g+5-磷酸吡哆醛 0.005 g+碳酸钙 0.01 g+70 g 水,混匀 121 °C,15 min 灭菌。

6%盐度含生物胺的甜瓣子模拟体系(以 100 mL 计):霉瓣子 25 g+盐 4.5 g+4 mL 生物胺 100 mg/L(8 种)+5-磷酸吡哆醛 0.005 g+碳酸钙 0.01 g+70 g 水,混匀 121 °C,15 min 灭菌。

2 试验方法

2.1 甜瓣子中产生物胺菌株筛选及其不同盐度下产胺能力研究

2.1.1 产胺菌株筛选 称取 200 g 霉瓣子,加入 200 g 饮用水,称取 16 g 食用盐,整个甜瓣子发酵体系的盐度为 4%,37 °C 发酵 30 d。称取 10 g 4% 盐度甜瓣子,用生理盐水逐级稀释。选取适宜梯度的稀释液 100 μL 分别涂布于含有溴甲酚紫的固体显色培养基上,37 °C 培养 12 h。挑取培养后使培养基变紫的菌株至 LB 培养基上分离、纯化即为初筛菌株。将初筛菌株接种至液体显色培养基进行复筛,以不接种菌株的显色培养基为空白对照。37 °C 过夜培养,挑选培养后培养液明显变紫的菌株初步判定为产生物胺的菌株。采用生工生物工程股份有限公司基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后,分别利用 PCR 扩增 16S rDNA、18S rDNA 和 ITS 序列,送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序,通过 BLAST 比对序列,构建系统发育树。

2.1.2 高效液相色谱法测定生物胺含量 参考陈功等^[12]建立的 HPLC 测定不同样品生物胺含量的方法,略作修改,洗脱程序如表 1 所示。

表 1 生物胺检测的洗脱程序

Table 1 Elution procedure for biogenic amine detection

项目	时间/min					
	0	22	25	32	32.01	37
流动相 A/%	60	85	100	100	60	60
流动相 B/%	40	15	0	0	40	40

采用 HPLC 测定样品生物胺含量,建立标准曲线,根据标准曲线计算试样中生物胺的含量,所得含量明显高于空白组的菌株即确定为产生物胺菌株。

2.1.3 高产生物胺菌株回接至不同盐度甜瓣子体系产生物胺能力研究 将筛选得到高产生物胺的菌株回接于液体培养基(1 L)中,扩大培养 24 h,8 000 r/min,4 °C 低温离心 10 min 得到菌体,以 10⁸ CFU/g 回接至不同盐度甜瓣子(6%,9%,12%)模拟体系中;以接种等量无菌水的灭菌甜瓣子模拟体系为空白对照,以该盐度未灭菌甜瓣子接种等量无菌水为正常发酵甜瓣子对照,30 °C 恒温发

酵 16 d 后,测定甜瓣子中生物胺含量。

2.2 生物胺降解菌株筛选及降解能力研究

2.2.1 不产生物胺菌株筛选 选取 46 株课题组前期从甜瓣子中筛出的不同菌属菌株为研究对象,分别活化后接种至生物胺液体显色培养基中,以接种等量无菌水为空白对照。恒温培养 48 h 后,挑选显色培养基不变紫的菌株初步判定为不产生物胺菌株。

2.2.2 降解生物胺菌株筛选及其降解能力测定 根据生物胺在荧光条件发色,生物胺含量与特定波长下荧光强度呈正相关原理,参考 Judite 等^[13]方法略作调整后,建立荧光定性分析样品中生物胺

含量的方法,初步筛选提取液荧光强度弱于空白对照的菌株为可能降解生物胺的菌株。将初筛得到的降解生物胺菌株接种到 BAs 培养液中,以接种等量无菌水的 BAs 培养液为空白对照,37 ℃振荡培养 12 h 后,观察其菌株生长情况并于 620 nm 波长下测定其 OD 值,测定菌株在以生物胺为唯一氮源的培养基中的生长情况。按上述方法对 BAs 培养液提取衍生后,再次测定荧光强度,选取荧光强度弱于空白对照组的菌株为降解生物胺菌株。高效液相色谱测定降解菌株培养液中生物胺含量,并用公式(1)计算其生物胺降解率。

$$X=(C1-C2)\times 100/C1 \quad (1)$$

式中, X ——生物胺降解率(%); $C1$ ——空白组中生物胺浓度(mg/kg); $C2$ ——接种菌株培养后培养液中生物胺浓度(mg/kg)。

2.2.3 降解生物胺菌株回接甜瓣子模拟体系 将筛选菌株回接到 6%盐度甜瓣子模拟体系中,以接种等量无菌水发酵体系为空白对照,30 ℃发酵 30 d。根据表 2 甜瓣子感官评价标准对甜瓣子进行感官评分并采用高效液相色谱测定甜瓣子模拟体系中生物胺含量。

2.3 数据分析

以上数据均做 3 个重复样品,采用 Excel、Origin、MEGA7 对数据统计处理及作图。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

生物胺标准曲线如表 3 所示,其回归系数 R^2 均 ≥ 0.998 ,可满足检测要求。

3.2 产胺菌株筛选结果

3.2.1 产胺菌株初筛结果 由于生物胺显碱性,产胺菌株在显色培养基中呈现紫色,不产生物胺或降解生物胺菌株在显色培养基上不变色。过夜培养后得到培养基变紫的初筛菌株如图 1a 所示,挑取这些菌株进行分离、纯化,如图 1b 所示,得到产胺菌株 46 株。

3.2.2 产胺菌株复筛结果 将初筛菌株接种至生物胺液体显色培养基中,37 ℃培养 12 h,筛选培养后培养液为紫色的菌株为产胺菌株,如图 2 所示,筛选得到 32 株产胺菌。

通过固体显色培养基初筛,液体显色培养基

表 2 甜瓣子感官评价标准^[14]

项目	评分标准	分值
香气	酯香浓郁,无异味	7~10
	有酯香,略有酸味	4~7
	酯香较弱,有刺激性气味	1~4
滋味	味鲜醇厚,咸甜适口,无异味	7~10
	味鲜醇厚,咸味很重/轻,无异味	4~7
	咸味很重/轻,有酸味	1~4
色泽	红棕色/深褐色,有光泽	7~10
	黄棕色,光泽较弱	4~7
	土黄色,无光泽	1~4
体态	瓣子完整,质地适宜,黏稠适度	7~10
	瓣子较完整,质地较软,体态偏稀/稠	4~7
	瓣子软烂,体态过稀/稠	1~4

表 3 生物胺标准曲线

生物胺名称	标准曲线	R^2
色胺	$y=0.016x+0.011$	0.999
苯乙胺	$y=0.021x+0.217$	0.999
腐胺	$y=0.022x+0.030$	0.999
尸胺	$y=0.044x+0.074$	0.999
组胺	$y=0.040x+0.066$	0.999
酪胺	$y=0.031x+0.039$	0.999
亚精胺	$y=0.054x+0.077$	0.999
精胺	$y=0.044x+0.068$	0.998

注: x 为系列混合标准工作液的浓度; y 为目标化合物与内标的峰面积之比。

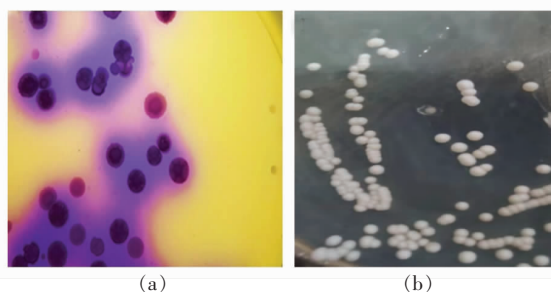


图 1 产胺菌株显色培养基显色形态(a)及 LB 平板培养形态(b)

Fig.1 Colorimetric morphology of amine-producing strains in colorimetric medium (a) and LB plate culture (b)

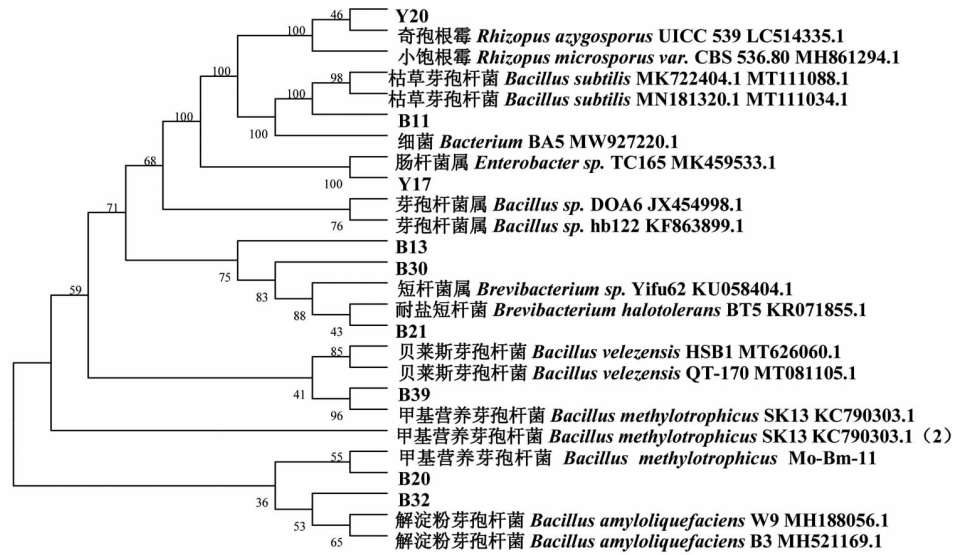


图 2 产胺菌株的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of amine-producing strains

复筛，再经过 16S rDNA、18S rDNA 和 ITS 测序，通过 BLAST 比对序列，采用 MEGA 7.0 构建系统发育树(图 2)。

结果显示甜瓣子中所筛选出代谢生物胺的菌株主要为芽孢杆菌属、短杆菌属、肠杆菌属及少量小孢根霉，这与 Jeon 等^[15]发现韩国传统豆酱 Cheonggukjang 中，主要由肠球菌属和芽孢杆菌属生成生物胺的研究结果一致。

3.2.3 高效液相色谱测定培养液中生物胺含量

经高效液相色谱测定，得到复筛的产胺菌株培养液中生物胺含量如图 3 所示。

结合空白组进行分析可以得出，所筛出菌株培养液中生物胺总量均远高于空白组中生物胺总量，不同菌株之间产生物胺能力存在较大差异，与空白组相比芽孢杆菌属产组胺、酪胺的能力相对较强。其中，B11 菌株产苯乙胺能力相对较强，含量达 78.4 mg/kg；B16 菌株产酪胺能力相对较强，含量达 25.3 mg/kg。Y17 菌株和 Y20 菌株具备较强的产腐胺、尸胺能力，其培养液中含量分别达 257.5 mg/kg 和 92.8 mg/kg，挑选这 4 株菌株回接至甜瓣子发酵体系验证产胺能力。

3.3 高产胺菌株回接至不同盐度甜瓣子模拟体系中产生物胺的能力

高产生物胺菌株回接结果如图 4 所示。可看出，6%盐度体系中生物胺含量远高于 9%和 12%

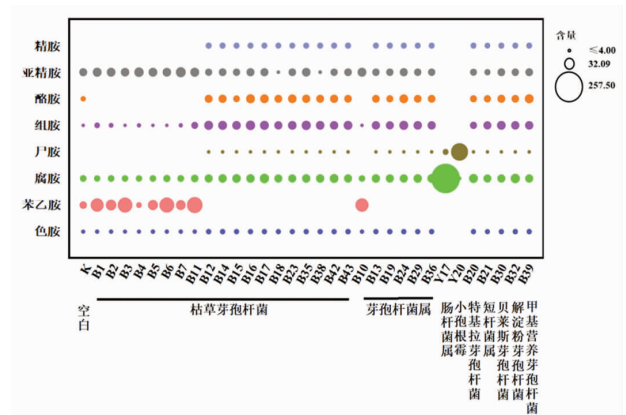
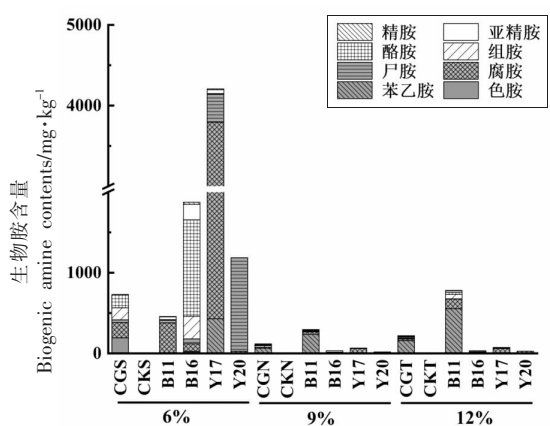


图 3 产胺菌株培养液中生物胺含量(mg/mL)

Fig.3 Bioamine content in culture medium of amine-producing strain (mg/mL)

盐度体系，且 8 种生物胺均有检出，生物胺总量最高达 4 207.6 mg/kg。对照组发酵过程主要产酪胺、腐胺、组胺和色胺，有少量尸胺检出。该盐度下，除 B11 号菌株外其余各菌株体系中生物胺总量均高于食品中生物胺建议总量 1 000 mg/kg^[16]。其中，B16 回接体系中酪胺含量相对较高，含量为 1 194.4 mg/kg，高于 Ten 等^[17]、Nout 等^[18]提出的食品中酪胺为 100~800 mg/kg 的限量标准；Y17 体系中腐胺含量较高，含量为 3 363.9 mg/kg；Y20 回接体系中高产尸胺，为 1 160.4 mg/kg，表明 6%盐度发酵甜瓣子可能存在较大安全风险。



注:CG 表示未灭菌模拟正常发酵的甜瓣子体系,CK 表示灭菌后的空白对照甜瓣子体系。

图4 高产胺菌株回接6%、9%、12%盐度甜瓣子模拟体系后产胺能力

Fig.4 The amine-producing capacity of the amine-producing strain after back connecting with the simulated system of sweet petal with 6%, 9% and 12% salinity

在9%和12%含盐量甜瓣子样品中,生物胺总量最高分别为233.9,781.2 mg/kg,其生物胺组成相似。9%盐度下B11 高产苯乙胺220.06 mg/kg;12%盐度下B11 高产腐胺119.4 mg/kg、苯乙胺546.5 mg/kg,远高于30 mg/kg的推荐量^[17]。B16、Y17、Y20 菌株在9%、12%盐度回接体系中不产色胺,产生物胺种类和含量随盐度增加而减少,与对照组生物胺变化趋势较为一致,可能是盐对其生长起到了一定程度的抑制作用所致。精胺和亚精胺在不同含盐量甜瓣子样品中含量均较低。因此,实现甜瓣子低盐化发酵不能一味的追求降低盐的含量。

3.4 生物胺降解菌株筛选结果

3.4.1 不产胺菌株筛选结果 挑选46株课题组前期从甜瓣子中筛选出的不同种属菌株,活化后接种至生物胺液体显色培养基中,筛选得到39株不产生物胺的菌株,主要为酵母菌、乳酸菌(表4)。

表4 不产胺菌株筛选结果

Table 4 Screening results of non-amine-producing strains

菌株编号	菌株名称	结果	菌株编号	菌株名称	结果
PCCI-PCL33	热带假丝酵母	-	LJY1	酿酒酵母	-
YT-27	奥默柯达酵母	-	MTQ1004	扣囊复膜酵母	-
23J-2	尖孢念珠菌	-	PCCI-MG2	季也蒙毕赤酵母	-
21J-1	鲁氏接合酵母	-	C9-4	醋酸菌	+
24J-2	威克汉姆酵母	-	Q10	短小芽孢杆菌	-
23J-5	美极梅奇酵母	-	K38	枯草芽孢杆菌	-
25J-1	汉逊德巴利酵母	-	C14	解淀粉芽孢杆菌	-
J-21	伯顿丝孢毕赤酵母	-	B20	东京芽孢杆菌	+
J-15	酿酒酵母	-	N7	鸡葡萄球菌	-
J-19-1	库德里阿兹威氏毕赤酵母	-	21B-5	甲基营养杆菌	-
23J-3	美极梅奇酵母	-	28L-C	澄清梭状芽胞杆菌	-
J-19-2	产香酵母	-	BTA-20	龙舌兰芽孢杆菌	-
34L-1	克氏葡萄球菌	-	R012	类肠膜魏斯氏菌	-
13B-3	限制性马拉色菌	-	R023	戊糖片球菌	-
47L-3	瓦氏葡萄球菌	+	R006	短乳杆菌	-
32B-2	短波单胞菌	+	G003	植物乳杆菌	-
13B-8	巴斯德葡萄球菌	+	N002-2	类肠膜魏斯氏菌	-
13B-5	瓦氏葡萄球菌	-	F003	香肠乳杆菌	-
34B-2	克雷白氏杆菌	+	CH12	肠膜明串珠菌	-
39B-3	嗜氨副球菌	-	CH17	酸性片球菌	-
ND-20	嗜盐四联球菌	+	1R8S39	食窦魏斯氏菌	-
MG004-	表皮葡萄球菌	-	FL001	福莱乳杆菌	-
R015	乳酸片球菌	-	62A004	融合魏斯氏菌	-

注:+, 产胺;- 不产胺。

3.4.2 生物胺降解菌株初筛结果 将上述不产胺菌株未变紫培养液衍生后于 300 nm 波长下检测

其荧光强度,初筛出降胺菌株。荧光检测筛选结果如图 5 所示。

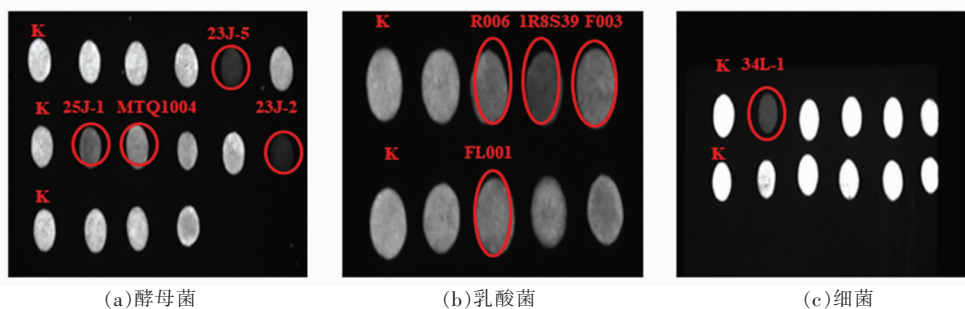


图 5 降胺菌株初筛荧光检测结果

Fig.5 Fluorescence detection results of the initial screening of the aniline strain

选取荧光强度弱于空白组的菌株,初步断定为降解生物胺菌株(图 5),共筛选出降解生物胺菌株 9 株,其中酵母菌 4 株,乳酸菌 4 株,细菌 1 株。

3.4.3 生物胺降解菌株复筛结果 将上述菌株回接至生物胺质量浓度为 100 mg/L 的 BAs 培养液,30 ℃培养 12 h 后,空白组未观察到菌株的生长,其余组菌株均有生长,于 620 nm 波长下测定其吸光度值,从而判定其在以生物胺为唯一氮源的培养基下的生长状况,结果如图 6 所示。

研究表明,初步筛选的 9 株菌均具备降解生物胺的能力。其中,美极梅奇酵母 23J-5、食蜜魏斯氏菌 1R8S39 在 BAs 培养基下生长状况较好,表明其降解生物胺的能力可能较高。荧光检测结果显示,9 株菌株荧光强度均弱于空白组的菌株(图 7),表明其均为生物胺降解菌。

3.4.4 降胺菌株 BAs 培养液降解能力测定 使用高效液相色谱测定各菌株 BAs 培养液生物胺含量并计算其降解率,结果如图 8 所示。所筛选菌株都具有一定生物胺降解能力,然而均无法降解亚精胺,不同菌株降解不同类型生物胺的能力差异较大。9 株菌株对色胺的降解率在 14.10%~21.37%之间;苯乙胺的降解率在 5.94%~20.09%之间;腐胺的降解率在 14.46%~24.94%之间;尸胺的降解率在 23.52%~30.82%之间;组胺的降解率在 5.65%~33.43%之间;酪胺的降解率在 4.75%~15.10%之间;精胺的降解率在 34.67%~65.58%之间;其中,扣囊复膜酵母 MTQ1004 具备较强的降解腐胺、组胺、精胺能力,其降解率分别为 24.94%,33.43%,

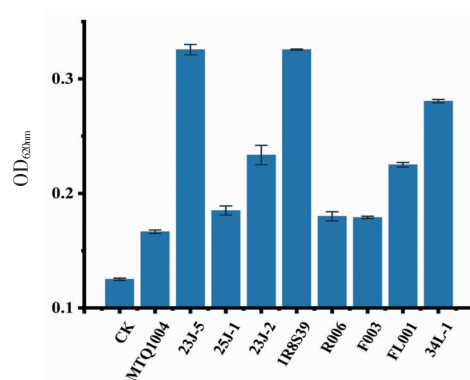


图 6 降解生物胺菌株 BAs 培养液 OD 值

Fig.6 OD value of BAS culture medium of bioamine-degrading strain



图 7 生物胺降解菌株荧光检测结果

Fig.7 Fluorescence detection results of biogenic amine degrading strains

65.58%; 美极梅奇酵母 23J-5 具备较强的降解尸胺、酪胺能力,降解率分别为 30.82%,15.10%; 香肠乳杆菌 F003 具备较强的降解苯乙胺和色胺能力,降解率分别为 20.09%,21.37%,且能降解除亚精胺外的其余 7 种生物胺。通过比较分析可知,扣囊复膜酵母(MTQ1004)和香肠乳杆菌(F003)的生

物胺降解率相对较高,与杨利昆等^[19]、赵佳迪^[11]研究结果较为一致。

3.5 降胺菌株回接甜瓣子模拟体系验证结果

3.5.1 降胺菌株回接甜瓣子模拟体系的降解能力测定 将上述降胺菌株回接至含 100 mg/L 生物胺的甜瓣子模拟体系中培养 16 d, 提取衍生后,通过高效液相色谱法测定生物胺含量,结果如图 9 所示。由于尖包念珠菌为有害菌,因此不考虑回接应用。其中,降胺能力最强的是香肠乳杆菌 F003,与前期筛选结果一致,其对苯乙胺的降解率高达 100%,对危害较大的组胺、酪胺和精胺的降解率分别可达 57.61%、25.52%、45.99%;扣囊复膜酵母 MTQ1004 对苯乙胺和腐胺的降解率达 100%,对组胺降解率为 37.78%;其余菌株对各种生物胺均有一定的降解能力。

在甜瓣子模拟体系下,菌株降解率与对应菌株降解生物胺能力强弱较为一致。而降解生物胺种类数量减少,这与该菌株降解生物胺能力特性有所不同,可能是因为甜瓣子正常发酵时,环境因素对菌株降解生物胺能力造成影响所致^[20]。

3.5.2 降胺菌株回接甜瓣子模拟体系的感官评价 由图 10 可以看出,在回接纯种发酵体系中,所筛选出降胺菌株发酵的甜瓣子感官评价结果存在一定差异。其中,生物胺降解能力较强的扣囊复膜酵母 MTQ1004 具有生物胺降解能力,而强化发酵的甜瓣子霉味较重,以腐臭味、氨味为主,感官品质相对较差;生物胺降解菌株香肠乳杆菌 F003 强化发酵所得的甜瓣子同正常发酵的甜瓣子相比,其酯香、酱香味较浓,所得甜瓣子样品感官品质最佳,可以考虑用作低盐化甜瓣子中的降胺发酵菌株。

4 结论

本研究从 4%盐度甜瓣子中筛出产生生物胺菌株 32 株,其中肠杆菌属 Y17、小孢根霉 Y20、枯草芽孢杆菌 B11 和 B16 产生生物胺能力最强,主要产酪胺、尸胺、腐胺、苯乙胺。盐度对菌株产生生物胺能力有明显抑制作用,将 4 株菌株回接至甜瓣子发酵体系中,其中 6%发酵体系含有大量生物胺,9%和 12%发酵体系中产生生物胺明显得到抑制。

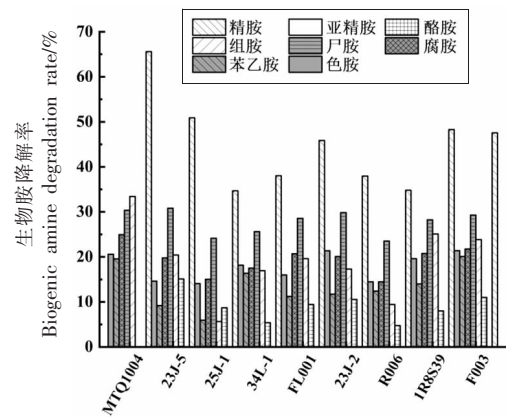


图 8 降胺菌株 BAs 培养液中的生物胺降解率 (%)

Fig.8 Degradation rate of biogenic amines in culture medium of BAS by amine-lowering strain (%)

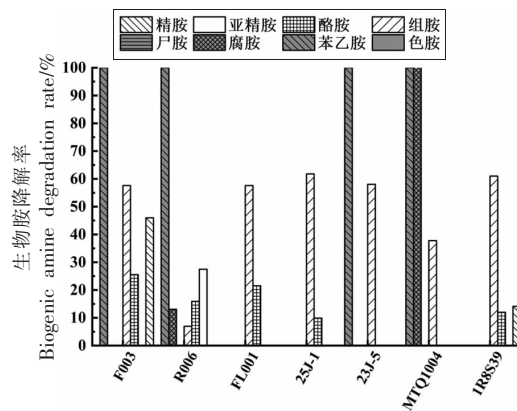


图 9 甜瓣子模拟体系中的生物胺降解率 (%)

Fig.9 Degradation rate of biogenic amines in the sweet petal simulation system (%)

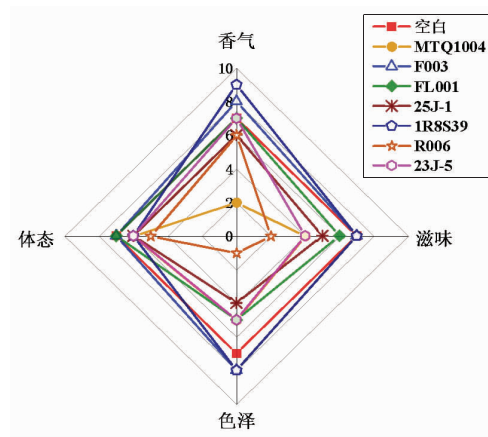


图 10 降胺菌株回接甜瓣子模拟体系的感官评价

Fig.10 Sensory evaluation of aniline strain tieback sweet petal simulation system

筛选出降解生物胺菌株9株;筛选出1株可用于甜瓣子低盐化发酵的降胺菌株香肠乳杆菌F003,它能有效降解苯乙胺、组胺、酪胺和精胺等生物胺,在生物胺含量为100 mg/L时,降解率分别为100%、57.61%、25.52%、45.99%,且回接体系中感官品质最佳,具有较好的生长能力,可考虑为甜瓣子低盐发酵时的降胺菌株。

参 考 文 献

- [1] 马世玲. 郫县豆瓣产品特点、工艺特征、纯种分离及生产应用[J]. 食品与发酵科技, 2009(1): 20–22.
MA S L. Product characteristics, process characteristics, pure breed separation and production application of Pixian Douban[J]. Food and Fermentation Technology, 2009(1): 20–22.
- [2] 刘菲. 低盐饮食干预对高血压患者动态血压的影响[D].大连: 大连医科大学, 2013.
LIU F. Effect of low salt diet intervention on dynamic blood pressure in patients with hypertension [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2013.
- [3] 李婷, 娄培安, 陈培培, 等. 成年居民每日膳食盐摄入量与肥胖关系[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(4): 556–559.
LI T, LOU P A, CHEN P P, et al. Association of dietary salt intake with obesity among adults[J]. China Public Health, 2017, 33(4): 556–559.
- [4] SHUKLA S, PARK H K, LEE J S, et al. Reduction of biogenic amines and aflatoxins in Doenjang samples fermented with various Meju as starter cultures[J]. Food Control, 2014, 42: 181–187.
- [5] XIA X, ZHANG Q, ZHANG B, et al. Insights into the biogenic amine metabolic landscape during industrial semidry Chinese rice wine fermentation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(39): 7385–7393.
- [6] 邹阳. 高盐稀态酱油生产过程中生物胺的形成机制及发酵调控研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
ZOU Y. Study on the formation mechanism and fermentation regulation of biogenic amines in the production of high-salt diluted soy sauce[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [7] KUNG H, LEE Y, HUANG Y, et al. Degradation of histamine by *Lactobacillus plantarum* isolated from MISO products[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(10): 1682–1688.
- [8] OH H H, RYU M S, HEO J, et al. Characterization of biogenic amine-reducing *Pediococcus pentosaceus* isolated from traditionally fermented soybean products[J]. Korean Journal of Microbiology, 2014, 50(4): 319–326.
- [9] GUO J, LUO W, FAN J, et al. Co-inoculation of *Staphylococcus piscifermentans* and salt-tolerant yeasts inhibited biogenic amines formation during soy sauce fermentation[J]. Food Research International, 2020, 137: 109436.
- [10] SARA B C, WILHELM H H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53: 33–41.
- [11] 赵佳迪. 生物胺降解菌的筛选及其在豆酱中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
ZHAO J D. Screening of bioamine-degrading bacteria and its application in soybean sauce[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [12] 陈功, 范智义, 邓维琴, 等. 利用高效液相色谱法测定不同发酵时长郫县豆瓣酱中的8种生物胺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 262–267.
CHEN G, FAN Z Y, DENG W Q, et al. Determination of 8 biogenic amines in Pixian broad bean paste with different fermentation duration by high performance liquid chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(21): 262–267.
- [13] JUDITE L G, JANA P. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1045: 223–232.
- [14] 李雄波, 邓维琴, 李恒, 等. 分段发酵模式对郫县豆瓣甜瓣子发酵过程中微生物及产品品质的影响[J/OL]. 食品科学:1–11[2021-04-30]. <https://www.spkx.net.cn/EN/10.7506/spkx1002-6630-20200108-104>.
LI X B, DENG W Q, LI H, et al. Effects of subsection fermentation mode on microorganism and product quality in the fermentation process of sweet Pixian Watermelon[J/OL]. Food Science:1–11[2021-04-30]. <https://www.spkx.net.cn/EN/10.7506/spkx1002-6630-20200108-104>.
- [15] JEON A R, LEE J H, MAH J H. Biogenic amine formation and bacterial contribution in Cheonggukjang, a Korean traditional fermented soybean food[J].

- LWT, 2018, 92: 282–289.
- [16] YANG J, DING X, QIN Y, et al. Safety assessment of the biogenic amines in fermented soya beans and fermented bean curd[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(31): 7947–7954.
- [17] TEN B B, DAMINK C, JOOSTEN H M, et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1990, 11(1): 73.
- [18] NOUT M J R. Fermented foods and food safety[J]. *Food Research International*, 1994, 27(3): 291–298.
- [19] 杨利昆, 付湘晋, 胡叶碧, 等. 鱼露中生物胺降解菌的筛选及其特性[J]. *食品科学*, 2012, 33(11): 158–162.
- YANG L K, FU X J, HU Y B, et al. Isolation and characterization of biogenic amine-degrading bacteria from fish sauce[J]. *Food Science*, 2012, 33(11): 158–162.
- [20] 张晓蓉. 降生物胺菌株的筛选鉴定及其特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- ZHANG X R. Screening and identification of biogenic amine strains and their characteristics[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.

Screening of Biogenic Amines Producing and Degrading Strains in Broad Bean Past-meju

Li Heng^{1,2,3}, Wang Zeliang¹, Deng Weiqin¹, Fan Zhiyi¹, Li Xiongbo¹, Wang Yulu¹, Li Jiezhil¹, Zhang Qisheng^{1,2*}

¹*Sichuan Academy of Food and Fermentation Industries Co., Ltd., Chengdu 611130*

²*Sichuan Dongpo Chinese Paocai Industrial Technology Research Institute, Meishan 620030, Sichuan*

³*Jiangnan University, Wuxi 214000, Jiangsu*

Abstract Broad bean paste-meju fermentation is an important stage in the production of Pixian broad bean paste. There is risk of high content biogenic amines in broad bean paste-meju, especially in low salt paste. Biological amine chromogenic medium and biogenic amine medium (BAs) were used to culture and screen biological amine producing strains. HPLC and qualitative analysis of fluorescence detection were used to analysis biological amine content. The amine producing and amine reducing strains in different salinities of broad bean paste-meju were screened and identified by 16S rDNA, 18S rDNA and ITS sequencing. The results showed that most of the amine producing strains were *Bacillus*, *Enterobacter*, *Brevibacterium*, and *Rhizopus*. *Bacillus subtilis* B11 can produce 233.9 mg/kg and 546.5 mg/kg of phenylethylamine in 9% and 12% salinity's meju. While the major amine reducing strains were *Metschnikowia*, *Pediococcus* and *Lactobacillus*. *Lactobacillus farciminis* F003 had strong growth ability in meju fermented with 6% salinity. 100 mg/L phenethylamine was degraded totally by F003 in 6% meju fermented 16 d, and while the degrading rates of 100 mg/L histamine, tyramine and spermine were 57.61%, 25.52% and 45.99%, respectively. The bioamine-degrading *Lactobacillus farciminis* F003 strain was re-inoculation to meju fermented system with 6% salinity, the flavor of ester was strong with no pungent smell. *Bacillus subtilis* was the main biogenic amines producing strain in the broad bean paste-meju fermentation system. An efficient bioamine-degrading strain *Lactobacillus farciminis* F003 was screened, it can reduce the biogenic amines content in 6% meju effectively. This study provides a strain support for biogenic amines control in broad bean paste-meju fermentation system.

Keywords broad bean paste-meju; biogenic amines; producing biogenic amines; degradation biogenic amines; strain