

发酵豆制品理化性质与微生物群落对生物胺形成的影响

罗璇^{1,2}, 程成¹, 张琦^{1,2}, 王允圃^{1,2}, 宋萧萧¹, 解鸿蕾³, 刘玉环^{1,2}, 崔宪^{1,2,*}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.南昌大学生物质转化教育部工程研究中心, 江西 南昌 330047; 3.哈尔滨市疾病预防控制中心, 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:以7种液态发酵豆制品和7种固态发酵豆制品为研究对象,对常见生物胺的含量、微生物群落多样性以及相关理化指标进行测定。结果表明,脱脂大豆酱油,蒸鱼豉油,牡蛎减盐酱油中的生物胺总量均高于8 000 mg/L,并显著高于其他样品($P < 0.05$)。样品的pH值和凯氏氮含量与生物胺总量呈负相关,水分活度(因子载荷0.413)、总酸含量(因子载荷0.399)和盐度(因子载荷0.330)对生物胺生成的正面效应较大。假单胞菌属和芽孢杆菌属分别与生物胺含量呈正相关和负相关。本研究为相关标准制定提供一定理论基础。

关键词:生物胺;发酵豆制品;盐度;总酸;水分活度;微生物群落多样性

Effects of Physicochemical Properties and Microbial Communities of Fermented Soybean Products on the Formation of Biogenic Amines

LUO Xuan^{1,2}, CHENG Cheng¹, ZHANG Qi^{1,2}, WANG Yunpu^{1,2}, SONG Xiaoxiao¹, XIE Honglei³, LIU Yuhuan^{1,2}, CUI Xian^{1,2,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Engineering Research Center for Biomass Conversion, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

3. Harbin Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150000, China)

Abstract: The study was carried out to evaluate the contents of common biogenic amines, microbial community diversity and physicochemical indicators of seven samples of fermented liquid soybean products and seven samples of fermented solid soybean products. The results showed that the total amount of biogenic amines in defatted soy sauce, steamed fish soy sauce and oyster reduced salt soy sauce were all higher than 8 000 mg/L and significantly higher than those in the other samples ($P < 0.05$). The pH and Kjeldahl nitrogen contents of the samples were negatively correlated with the total content of biogenic amines, while water activity (factor loading 0.413), total acid content (factor loading 0.399) and salinity (factor loading 0.330) had a greater positive effect on the production of biogenic amines. *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. were positively and negatively correlated with the content of biogenic amines, respectively. The results of the study provide a theoretical basis for the development of relevant standards.

Keywords: biogenic amines; fermented soybean products; salinity; total acidity; water activity; microbial community diversity

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221020-197

中图分类号: TS255.53

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)14-0072-07

引文格式:

罗璇,程成,张琦,等.发酵豆制品理化性质与微生物群落对生物胺形成的影响[J].食品科学,2023,44(14):72-78.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221020-197. <http://www.spkx.net.cn>

LUO Xuan, CHENG Cheng, ZHANG Qi, et al. Effects of physicochemical properties and microbial communities of fermented soybean products on the formation of biogenic amines[J]. Food Science, 2023, 44(14): 72-78. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221020-197. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2022-10-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21878139); 江西省自然科学基金项目(2020BAB203012);

南昌大学国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZB-201915)

第一作者简介: 罗璇(1999—)(ORCID: 0000-0001-6842-8191),女,硕士研究生,研究方向为农产品加工。

E-mail: ncuspyluoxuan@163.com

*通信作者简介: 崔宪(1989—)(ORCID: 0000-0002-6911-9128),男,助理研究员,博士,研究方向为农产品加工。

E-mail: cuixian@ncu.edu.cn

生物胺是一类具有生物活性、含氮碱性低分子质量有机化合物的总称。其广泛分布于动植物及食品中,尤其在发酵食品中含量较高。生物胺具有“低促高毒”的特点,适量摄入能够起到促进生长、增强代谢活力、清除自由基等作用,而过量摄入则会导致人体中毒等不良反应。有研究表明,食品中的组胺、酪胺和苯乙胺分别超过100、100 mg/kg和30 mg/kg会造成人体中毒^[1]。此外,尸胺、腐胺等二胺还能够与亚硝酸盐反应生成亚硝胺等杂环类致癌物质。因此,考虑到生物胺对于人体的危害,Taylor等^[2]建议把生物胺总量作为衡量食品安全的重要指标。目前,我国仅针对部分食品(如鱼类、酒类等)中生物胺含量制定了相关标准,而传统发酵食品中生物胺的限量问题并未引起足够重视。我国传统发酵豆制品主要分为固态类发酵豆制品(豆豉、腐乳等)与液态类发酵豆制品(酱油等),因其风味独特、营养价值高等特点在日常生活中被广泛食用,其中生物胺的含量也逐渐受到关注。Gong Xiao等^[3]研究发现豆豉中存在大量腐胺(108.9 mg/kg)、尸胺(121.4 mg/kg)、组胺(202.4 mg/kg)、酪胺(94.1 mg/kg)等。Jeon等^[4]在韩国传统豆类发酵食品清国酱中发现 β -苯乙胺、组胺和酪胺含量分别超过了推荐的毒性限度的19、4倍和3倍。因此,研究发酵豆制品中生物胺含量对保障其食品安全具有重要意义。

发酵食品中微生物代谢产生的生物胺的种类和含量受到多种因素的影响。Guan Rongfa等^[5]报道,黄酒中的白苏和红苏含量直接影响生物胺产生菌的数量。Fong等^[6]研究表明,腌肉、发酵鱼、酱菜等发酵制品中较高的氨基酸含量能够增加生物胺含量和积累程度。Zaman等^[7]发现*Bacillus amyloliquefaciens*和*Staphylococcus carnosus*的分离株能够减少鱼露发酵过程中组胺的积累程度。目前,多数研究集中于发酵豆制品发酵过程以及贮藏过程中生物胺含量的监测^[8],针对发酵豆制品中生物胺含量与原料理化性质、微生物群落的相关性分析鲜有报道。

本研究以7种液态类发酵豆制品和7种固态类发酵产品为研究对象,对8种常见生物胺含量、理化性质、微生物群落进行检测,并通过Pearson相关性、结构方程模型、冗余分析等统计学方法进行相关性分析,以探究发酵豆制品中生物胺的产生机制,为完善发酵豆制品的标准法规提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

从江西南昌某超市购买的14种保质期内发酵豆制品作为实验材料,分为4类产品,如表1所示。

表1 实验样品信息

Table 1 Sample information

样品类型	产品分类	样品名称	主要原料	产地	样品代号
液态类	酱油类产品	黑豆老抽	黑豆	山东	1-1
		黄豆老抽	黄豆	山东	1-2
		黑豆生抽	黑豆	山东	1-3
		黄豆生抽	黄豆	山东	1-4
		脱脂大豆酱油	脱脂大豆	上海	1-5
		蒸鱼豉油	黄豆	上海	1-6
		牡蛎减盐酱油	黄豆	山东	1-7
固态类	豆腐乳类产品	腐乳	黄豆	江西	2-1
		臭豆腐	高蛋白黄豆	江西	2-2
		毛豆腐	黄豆	安徽	2-3
	豆豉类产品	豆豉	黄豆	南昌	2-4
		纳豆	黄豆	上海	2-5
		水豆豉	黄豆	贵州	2-6
非传统发酵豆制品	巧克力	纯可可脂	南京	2-7	

组胺盐酸盐、酪胺盐酸盐、腐胺盐酸盐(纯度均 $\geq 99\%$),色胺盐酸盐、亚精胺盐酸盐标准品(纯度均 $\geq 98\%$),1,7-二氨基庚烷内标标准品(纯度 $\geq 98\%$)上海源叶生物科技有限公司; β -苯乙胺盐酸盐、尸胺盐酸盐标准品(纯度 $\geq 98\%$)上海麦克林生化科技有限公司;精胺盐酸盐标准品(纯度 $\geq 98\%$)北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

K9860型全自动凯氏定氮仪 山东海能科学仪器有限公司;PHS-3G型pH计 梅特勒-托利多科技(中国)有限公司;HD-4型智能水分活度测试仪 无锡市华科仪器仪表有限公司;1260 Infinity型高效液相色谱仪 安捷伦科技(德国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 理化指标检测

pH值测定根据GB 5009.237—2016《食品pH值的测定》^[9];总酸及氨基酸态氮测定根据GB 5009.235—2016《食品中氨基酸态氮的测定》^[10];食盐含量测定根据GB/T 12457—2008《食品中氯化钠的测定》^[11],采用直接沉淀滴定法;水分活度测定根据GB 5009.238—2016《食品水分活度的测定》^[12],采用水分活度仪扩散法测定;凯氏氮测定利用K9860全自动凯氏定氮仪进行测定。上述指标取样平行测定3次。

1.3.2 生物胺含量检测

1.3.2.1 标准曲线的建立

分别取100 mg/L生物胺标准混合使用液,用0.1 mol/L盐酸溶液稀释,配制成质量浓度为2.0、3.0、4.0、5.0、12.0、20.0、40.0 mg/L的生物胺标准系列溶液,临用现配。

1.3.2.2 色谱条件及标准曲线建立

参考GB 5009.208—2016《食品中生物胺的测定》^[13]。采用HPX-87 C₁₈色谱柱(300 mm \times 7.8 mm),紫外检测

波长254 nm, 柱温35 ℃, 进样量20 μL。流动相A为90%乙腈、10%含0.1%乙酸的0.01 mol/L乙酸铵溶液, 流动相B为10%乙腈、90%含0.1%乙酸的0.01 mol/L乙酸铵溶液, 流速为0.8 mL/min。梯度洗脱程序如表2所示。

表2 衍生后样品的分离洗脱梯度
Table 2 Gradient elution program

保留时间/min	0	22	25	32	32.01
流动相A体积分数/%	60	85	100	100	60
流动相B体积分数/%	40	15	0	0	40

注: 流动相A为90%乙腈、10%含0.1%乙酸的0.01 mol/L乙酸铵溶液, 流动相B为10%乙腈、90%含0.1%乙酸的0.01 mol/L乙酸铵溶液。

1.3.3 样品预处理

酱油样品与固态发酵豆制品的预处理分别参考Qi Qi^[14]和Hu Min^[15]等, 处理后样品按1.3.2.2节色谱条件进行进样分析。

1.3.4 微生物群落多样性分析

样品由上海美吉生物医药科技有限公司进行16S rDNA高通量测序, 并在美吉生信云平台进行分析。

1.4 数据处理与分析

1.4.1 绘图及单因素方差分析、Pearson相关性分析

使用Origin 2022软件进行数据处理并绘图。使用SPSS 25.0软件进行单因素方差分析、Pearson相关性分析。 $P < 0.05$, 差异显著。

1.4.2 结构方程模型

使用SPSS AMOS软件进行结构方程模型分析^[16], 其路径方程如式(1)、(2)所示:

$$y_i = \alpha + By_i + \Gamma x_i + \zeta_i \quad (1)$$

$$\text{var}(\zeta_i) = \Psi \quad (2)$$

式中: p 为内生变量个数; q 为外生变量个数; y_i 为 $p \times 1$ 观察到内生变量个数的向量; x_i 为 $q \times 1$ 观察到外生变量个数的向量; α 为 $p \times 1$ 回归方程截距的向量; B 为 $p \times p$ 回归方程斜率的矩阵; Γ 为 $p \times q$ 回归方程斜率的矩阵; ζ_i 为 $p \times 1$ 干扰因素即残差的向量; Ψ 为 $p \times p$ 干扰因素的协方差矩阵。

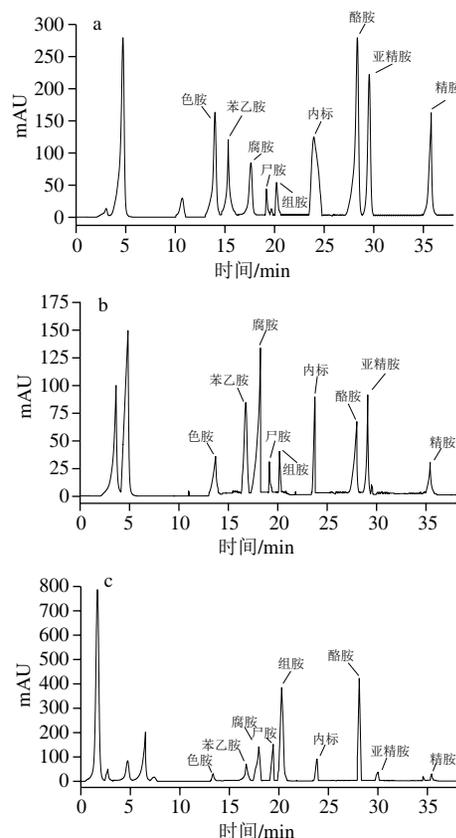
根据目前已有的研究结果, 氨基酸态氮含量与体系的盐度、pH值具有一定关系, 生物胺总量受到盐度、pH值、总酸、水分活度、氨基酸态氮以及凯氏氮等指标的影响^[3,6,8]。因此, 该模型下的两条路径模型构建为: 1) pH值和盐度对氨基酸态氮的影响; 2) 盐度、pH值、总酸、水分活度、氨基酸态氮以及凯氏氮对生物胺总量的影响。根据上述条件, 利用结构方程模型对生物胺及各类理化指标之间的关系进行分析。

2 结果与分析

2.1 生物胺含量分析

取生物胺标准混合使用液, 根据上述色谱条件进行分析, 重复测定3次, 得到8种生物胺的出峰时间及标准

品色谱图, 如图1a所示。以生物胺质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标得到线性回归方程, 其线性范围内相关系数(R^2)均大于0.99, 表明8种生物胺质量浓度与峰面积之间存在良好线性关系。液体类代表性样品黑豆老抽(1-1)色谱图如图1b所示, 固体类样品豆豉(2-4)色谱图如图1c所示。



a.生物胺标准品; b.液体类代表性样品黑豆老抽; c.固体类代表性样品豆豉。

图1 生物胺标准品与代表性样品的高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of biogenic amine standards and representative samples

如表3、4所示, 不同发酵豆制品的生物胺含量存在一定差异, 但所有样品中均能检出组胺。色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺、精胺质量浓度和生物胺总量在14种样品中范围分别是0~1 274、0~1 867、0~7 908、0~715、15.3~2 637、0~947、0~115、0~498、112~11 209 mg/L。

在液态类产品中8种生物胺均能检出, 但因制作工艺不同, 不同样品的生物胺总量存在差异。老抽类和生抽类酱油(1-1~1-4)中生物胺总量低于250 mg/L, 各类生物胺含量均低于限制值, 在生物胺安全方面表现良好。在同类型产品中, 黑豆类酱油(1-1、1-3)生物胺含量明显高于黄豆类酱油(1-2、1-4), 可能是由于黑豆中蛋白质含量较高, 为生物胺产生菌提供了更多可利用底物^[17]。脱脂大豆酱油(1-5)、蒸鱼豉油(1-6)、牡蛎减盐酱油(1-7)中生物胺总量分别为11 209.7、10 266.7、

8 262.5 mg/L, 并显著高于其他样品 ($P < 0.05$), 远超过 1 000 mg/kg 的限量标准, 对人体健康具有负面影响^[18]。其中, 脱脂大豆酱油 (1-5) 样品中腐胺含量最高, 达到 7 908 mg/L; 蒸鱼豉油 (1-6) 样品中组胺含量最高, 达到 2 637 mg/L; 牡蛎减盐酱油 (1-7) 中样品苯乙胺含量最高, 达到 1 867 mg/L。近年来, 已开展了市售酱油中生物胺含量的相关研究。于金芝等^[19]报道表明, 市售酱油中生物胺总量范围为 102.87~760.28 mg/kg, 以酪胺、组胺为主。陆永梅^[20]对市售酱油生物胺含量进行分析, 结果表明酪胺、组胺、尸胺、亚精胺、精胺含量分别为 0~672.7 mg/kg、0~591.9 mg/kg、0~550.3 mg/L、0~485.9 mg/L、0~145.2 mg/L。曹忠娜^[21]发现, 部分市售酱油中的生物胺总量已超出美国食品药品监督管理局建议食品中生物胺总量不大于 1 000 mg/L 的标准。由此可见, 目前部分市售酱油类产品中的生物胺含量存在潜在健康安全风险, 有必要研究影响其中生物胺形成的因素。

表 3 液体发酵豆制品中生物胺含量

Table 3 Biogenic amine contents in fermented liquid soybean products

样品	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总量
1-1	29.5±0.8 ^d	6.8±0.6 ^d	46.9±5.3 ^d	6.1±1.0 ^d	33.7±5.9 ^d	23.9±13.5 ^d	23.0±7.1 ^d	27.8±7.3 ^d	197.7±41.5 ^d
1-2	12.4±1.4 ^d	7.2±1.1 ^d	16.1±3.4 ^d	16.0±3.2 ^d	15.3±9.6 ^d	13.0±5.4 ^d	5.4±1.1 ^d	9.4±3.9 ^d	94.8±29.1 ^d
1-3	6.2±0.5 ^d	19.2±1.3 ^d	59.8±6.9 ^d	8.4±2.1 ^d	35.5±4.0 ^d	38.8±8.4 ^d	32.3±11.6 ^d	34.6±2.7 ^{def}	234.8±37.5 ^d
1-4	5.4±0.1 ^d	14.1±2.2 ^d	23.9±3.8 ^d	27.8±5.9 ^d	27.4±7.4 ^d	11.2±2.1 ^d	8.4±1.8 ^d	11.5±12.4 ^d	129.7±35.7 ^d
1-5	1274.0±8.0 ^d	140.7±13.9 ^d	7908.0±80.5 ^d	177.0±18.1 ^d	456.0±15.0 ^d	947.0±67.6 ^d	115.0±7.6 ^d	192.0±30.5 ^d	11209.7±241.2 ^d
1-6	842.0±7.2 ^d	728.0±42.2 ^d	4590.0±131.0 ^d	715.0±39.8 ^d	2637±127 ^d	2090±11.5 ^d	47.7±10.5 ^d	498.0±21.8 ^d	10266.7±390.8 ^d
1-7	526.0±7.2 ^d	1867.0±117.0 ^d	3310.0±68.2 ^d	375.0±15.6 ^d	1421.0±208.0 ^d	645.0±21.0 ^d	62.7±4.5 ^d	55.8±34.6 ^d	8262.5±476.1 ^d

注: 同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 表 4 同。

表 4 固体发酵豆制品中生物胺含量

Table 4 Biogenic amine contents in fermented solid soybean products

样品	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总量
2-1	25.2±4.8 ^d	ND	20.9±5.3 ^d	62.9±4.6 ^d	43.6±4.4 ^d	42.9±41.8 ^d	29.3±10.7 ^d	24.4±6.6 ^{def}	249.2±78.2 ^d
2-2	ND	28.8±8.2 ^d	ND	27.5±5.0 ^d	154.0±17.4 ^d	176.0±81.8 ^d	ND	ND	386.3±112.4 ^d
2-3	ND	39.2±2.4 ^d	ND	32.1±4.3 ^d	39.9±4.5 ^d	196.0±6.7 ^d	ND	ND	307.2±17.9 ^d
2-4	26.6±1.3 ^d	35.7±2.0 ^d	47.4±5.4 ^d	28.3±11.3 ^d	459.0±112.0 ^d	220.0±31.8 ^d	25.5±1.7 ^d	24.8±4.0 ^{def}	867.3±169.5 ^d
2-5	ND	50.1±9.7 ^d	ND	42.1±5.6 ^d	373.0±19.1 ^d	42.2±4.1 ^d	64.4±2.0 ^d	67.7±36.0 ^d	639.5±76.5 ^d
2-6	ND	86.3±16.3 ^d	39.7±1.3 ^d	30.5±2.9 ^d	86.3±27.9 ^d	136.0±40.0 ^d	ND	ND	378.8±88.4 ^d
2-7	ND	43.8±5.0 ^d	ND	ND	338.0±64.2 ^d	ND	ND	30.8±15.6 ^{def}	412.6±84.8 ^d

注: ND.未检出。

如表 4 所示, 检测的固态类产品生物胺总量均低于 1 000 mg/kg。相比于豆腐乳类产品 (2-1~2-3), 豆豉类产品 (2-4~2-6) 生物胺总量较高。在豆豉 (2-4) 中 8 种生物胺均有检出, 生物胺总量达到 867.3 mg/L, 以组胺 (459.0 mg/kg) 和酪胺 (220.0 mg/kg) 为主。根据 Gong Xiao 等^[3]的研究, 豆豉样品中存在着大量腐胺、尸胺和组胺。这可能是由于豆豉在发酵过程中产生大量氨基酸, 为生物胺的生成提供了更多前体物质, 在氨基酸脱羧酶的作用下, 氨基酸脱羧生成生物胺^[8,22]。虽然非传统发

酵豆制品巧克力 (2-7) 生物胺总量 (412.6 mg/kg) 相比于豆豉类产品较低, 但其组胺含量高达 338.0 mg/kg, 超过了 100 mg/kg 限定值^[2], 也存在一定潜在安全风险。

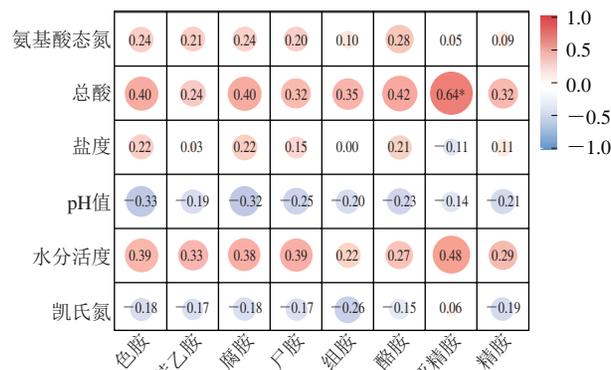
2.2 生物胺含量与理化指标的相关性分析

如表 5 所示, 14 种样品的 pH 值、水分活度、盐度、氨基酸态氮、总酸、凯氏氮含量分别为 4.83~6.83、0.653~0.999、0.29~37.92 g/100 g、0.52~1.28 g/100 g、10.82~83.67 g/kg、1.31%~6.04%。在液态类产品中, 酱油类产品 1-5~1-7 总酸含量显著高于 1-1~1-4 样品 ($P < 0.05$), 其他指标无明显差异。同时, 酱油类产品 1-5~1-7 生物胺总量显著高于 1-1~1-4 样品 ($P < 0.05$) (表 3)。固态类产品中, 豆豉类产品 (2-4、2-5) 的总酸含量显著高于其他样品 ($P < 0.05$), 盐度显著低于大部分其他样品 ($P < 0.05$)。同时, 豆豉类产品 (2-4、2-5) 的生物胺总量高于大部分固体 (表 3、4)。此外, 巧克力的盐度显著低于酱油类产品及豆腐乳类产品 ($P < 0.05$)。而具有较低盐度的巧克力生物胺总量也显著低于 1-5~1-7 样品 ($P < 0.05$) (表 3、4)。

表 5 不同发酵豆制品理化性质

Table 5 Physicochemical properties of different fermented soybean products

样品	氨基酸态氮含量/(g/100 g)	总酸含量/(g/kg)	盐度/(g/100 g)	pH	水分活度	凯氏氮含量/%
1-1	1.19±0.13 ^{bd}	28.25±0.07 ^b	30.90±0.55 ^{bd}	5.23±0.03 ^c	0.955±0.008 ^d	1.67±0.06 ^f
1-2	1.06±0.01 ^d	25.99±0.04 ^f	29.41±1.01 ^{de}	5.09±0.02 ^e	0.948±0.006 ^d	1.55±0.02 ^{de}
1-3	1.18±0.01 ^{bd}	28.08±0.03 ^b	29.20±1.19 ^f	5.15±0.03 ^c	0.878±0.003 ^f	2.15±0.19 ^c
1-4	1.28±0.01 ^d	26.23±0.12 ^f	28.78±0.36 ^f	5.11±0.01 ^e	0.928±0.002 ^e	1.96±0.21 ^{de}
1-5	1.15±0.02 ^{bd}	69.11±1.05 ^a	31.10±0.48 ^{bd}	5.04±0.04 ^e	0.969±0.002 ^e	1.92±0.01 ^e
1-6	1.13±0.01 ^{de}	57.22±0.20 ^b	30.20±0.18 ^{bd}	5.11±0.06 ^e	0.967±0.001 ^f	1.33±0.01 ^b
1-7	1.20±0.01 ^{bc}	57.06±0.19 ^b	22.44±1.31 ^f	5.16±0.03 ^e	0.990±0.001 ^b	1.83±0.03 ^c
2-1	1.01±0.01 ^{de}	44.92±1.44 ^a	17.33±0.55 ^f	5.13±0.2 ^e	0.999±0.000 ^a	6.04±0.05 ^a
2-2	0.97±0.01 ^f	25.93±0.15 ^f	31.72±0.66 ^b	6.09±0.05 ^c	0.849±0.001 ^f	2.61±0.01 ^b
2-3	0.97±0.01 ^f	11.32±0.14 ^g	31.03±0.41 ^{bc}	6.30±0.13 ^b	0.867±0.001 ^f	2.08±0.01 ^{cd}
2-4	1.25±0.01 ^{ab}	77.86±1.36 ^a	13.76±0.18 ^g	4.83±0.08 ^f	0.725±0.010 ^g	1.57±0.03 ^{fg}
2-5	0.52±0.01 ⁱ	83.67±1.04 ^a	0.29±0.66 ^g	6.83±0.27 ^a	0.952±0.001 ^d	2.73±0.05 ^b
2-6	1.18±0.03 ^{bd}	64.62±0.71 ^a	37.92±0.79 ^f	5.51±0.09 ^d	0.865±0.001 ^f	1.31±0.01 ^b
2-7	0.56±0.01 ⁱ	10.82±0.28 ^g	0.84±1.19 ^g	5.67±0.12 ^d	0.653±0.005 ^h	1.46±0.05 ^{gh}

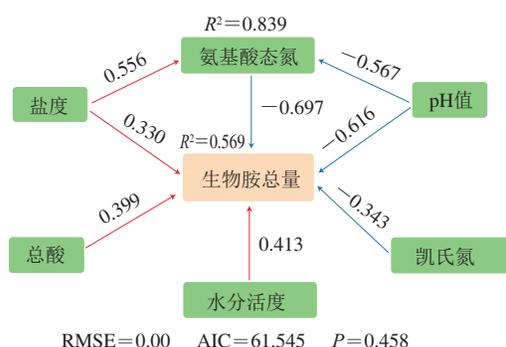


数字代表相关系数。*显著相关 ($P < 0.05$)。

图 2 生物胺与理化指标的相关性热图

Fig. 2 Heatmap of the correlation between biogenic amines and physicochemical indices

如图2所示,水分活度、总酸、盐度和氨基酸态氮与大部分生物胺含量呈正相关,而pH值和凯氏氮与大部分生物胺含量呈负相关。总酸和水分活度与亚精胺的生成呈显著正相关。较高的水分活度可能促进产胺微生物生长繁殖,导致生物胺积累^[23]。李东蕊等^[24]的研究表明,环境因素如pH值与总生物胺、腐胺呈高度相关,而其他环境因素如NaCl浓度、总酸、含水量和氨基酸态氮则对亚精胺的生成有一定积极影响,这与本研究结果一致。总酸在生物胺的生成过程中起到重要作用,这是由于微生物通过脱羧作用产生碱性生物胺提高细胞内外的pH值抵御酸性环境^[25]。因此,如表5所示,本研究中14个样品均呈轻微酸性,符合微生物产生生物胺的pH值条件^[6]。通常,总酸含量越高,pH值越低,越有利于生物胺的产生。当pH值较低时,对微生物的脱羧作用促进越明显^[25],因此pH值与大部分生物胺含量呈负相关。凯氏氮含量越高,其中氨氮含量也越高,可能会对pH值的上升具有促进作用,从而不利于生物胺产生。此外,高浓度NaCl会使食品体系的渗透压升高,从而影响微生物的生长和氨基酸脱羧酶的活性。Qi Qi等^[26]研究发现耐盐性酵母*Zygosaccharomyces rouxii*和*Candida versatilis*在含17% NaCl的高盐环境下能产生大量的生物胺。然而,高浓度的NaCl也可能导致某些嗜盐微生物的氨基酸脱羧酶活性下降。Chander等^[27]通过研究不同盐含量(0%~6%)对*Lactobacillus bulgaricus*产生物胺能力的影响,发现较高含量的NaCl对该种微生物产胺能力有一定抑制作用。综上所述,食品中微生物的生理活动与生物胺的产生和积累具有密切联系。



红色箭头代表具有正面效应,蓝色箭头代表具有负面效应;箭头上标注的数字为因子载荷,代表两个变量之间的相关系数。AIC:赤池信息准则。

图3 6种环境因素影响生物胺总量的结构方程模型

Fig. 3 Structural equation modeling of six environmental factors affecting the total amount of biogenic amines

如图3所示,近似均方根误差(the root mean square error of approximation, RMSE)为0.00,表明为最佳

拟合。pH值(因子载荷-0.616)、凯氏氮(因子载荷-0.343)对生物胺的产生具有负面效应;水分活度(因子载荷0.413)、盐度(因子载荷0.330)和总酸(因子载荷0.399)对生物胺的产生具有正面效应。相关性分析表明水分活度、总酸、盐度和氨基酸态氮与大部分生物胺含量呈正相关(图2)。结构方程模型分析的结果进一步验证了本研究中发酵豆制品的水分活度、总酸、盐度与生物胺含量呈正相关。

2.3 生物胺含量与微生物群落的相关性分析

选取具有代表性的6种样品:黑豆老抽(1-1)、黄豆老抽(1-2)、脱脂大豆酱油(1-5)、豆豉(2-4)、纳豆(2-5)、水豆豉(2-6)进行微生物群落分析,如图4所示。

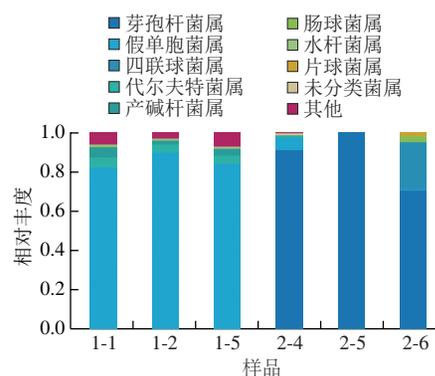


图4 6种样品属水平微生物群落相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of microbial communities in six samples at the genus level

体系中微生物群落组成在一定程度上影响着生物胺种类与含量。如图4、5所示,假单胞菌属是黑豆老抽酱油(1-1)、黄豆老抽酱油(1-2)、脱脂大豆酱油(1-5)样品中的优势菌属,芽孢杆菌属是豆豉(2-4)、纳豆(2-5)、水豆豉(2-6)的优势菌属。研究表明,假单胞菌能够分泌热稳定的脂肪酶水解乳脂,释放游离脂肪酸增加总酸含量,从而促进生物胺的产生和积累^[28]。除此之外,假单胞菌还具有产生腐胺、酪胺、尸胺的能力^[29]。这可能是脱脂大豆酱油(1-5)的生物胺含量显著高于其他样品($P<0.05$)的原因。芽孢杆菌产生的细菌素已被证明能够抑制产胺菌的活性^[30]。因此,在芽孢杆菌的抑制作用下,样品豆豉(2-4)、纳豆(2-5)、水豆豉(2-6)中生物胺总量显著低于样品脱脂大豆酱油(1-5)($P<0.05$)。此外,粪肠球菌具有合成酪胺的能力^[18],其在水豆豉(2-6)中的相对丰度较高,水豆豉(2-6)中酪胺占总生物胺含量比例也最高(35.90%)(表3)。

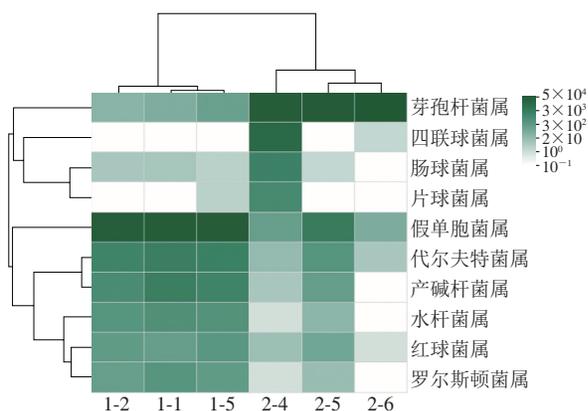
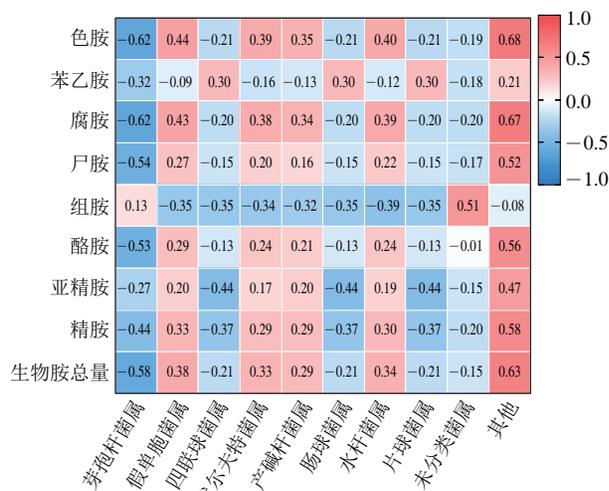


图5 6种样品微生物属水平群落热图

Fig. 5 Heatmap of the microbial communities in six samples at the genus level

此外, 有研究表明, 生物胺的形成还受到基质和环境条件的影响^[18]。为进一步探究微生物与理化指标、生物胺含量之间的关系, 对上述样品的生物胺含量以及微生物相对丰度进行相关性分析, 如图6所示。对这些样品的生物胺含量、理化性质以及微生物相对丰度进行冗余分析, 如图7所示。



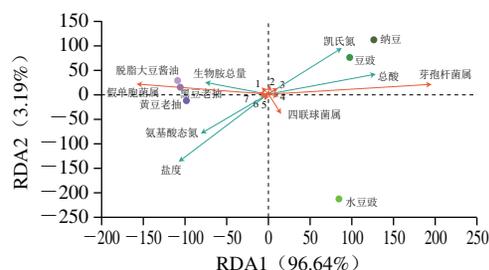
方框中的数字代表相关系数。

图6 6种样品生物胺含量与微生物相对丰度相关热图

Fig. 6 Heatmap of the correlation between biogenic amine contents and relative abundance of microbial communities in six samples

如图6所示, 假单胞菌属、代尔夫特菌属、产碱杆菌属、水杆菌属与生物胺总量、精胺、亚精胺、酪胺、尸胺、腐胺、色胺的产生呈正相关。而芽孢杆菌属与7种生物胺含量及生物胺总量呈负相关, 四联球菌属、肠球菌属、片球菌属与生物胺总量呈负相关。如图7所示, 纳豆(2-5)、豆豉(2-4)、水豆豉(2-6)3种固体样品的凯氏氮含量、总酸含量与芽孢杆菌属的相对丰度呈正相关。这可能是由于芽孢杆菌属更适合在总酸含量较

高的条件下生长, 这与邹俊杰等^[31]的研究结果一致。而黄豆老抽酱油、黑豆老抽酱油、脱脂大豆酱油的假单胞菌属相对丰度与盐度和氨基酸态氮呈正相关。其中黑豆老抽(1-1)、黄豆老抽(1-2)、脱脂大豆酱油(1-5)中假单胞菌属的相对丰度最高(图4), 其盐度范围为29.41~31.10 g/100 g(表5)。谷新晰等^[32]也证明假单胞菌属受氨基酸态氮的影响较显著(0.001<P≤0.01)。生物胺总量与假单胞菌属相对丰度呈正相关, 与芽孢杆菌属、四联球菌属相对丰度呈负相关, 这与相关性分析结果一致。



1.片球菌属; 2.肠球菌属; 3.罗尔斯顿菌属; 4.红球菌属; 5.水杆菌属; 6.产碱杆菌属; 7.代尔夫特菌属。

图7 6种样品微生物菌属与基础理化指标冗余分析结果

Fig. 7 Redundancy analysis of microbial genera versus basic physicochemical indices in six samples

综上所述, 假单胞菌属可能是增加了体系中脂肪酸含量进而促进了生物胺的累积, 而芽孢杆菌属则可能是产生细菌素抑制产胺菌活性进而抑制了生物胺的产生。此外, 总酸含量较高的条件能促进芽孢杆菌属生长, 较高的盐度(29.41~30.90 g/100 g)和氨基酸态氮能够促进假单胞菌属的生长。样品的理化性质通过影响微生物的生理活动从而最终影响食品中生物胺的水平。因此, 理化性质和微生物群落均对生物胺生成具有一定影响。为进一步保障发酵豆制品潜在健康安全风险, 建议控制发酵豆制品的制作工艺与发酵菌种等。

3 结论

以7种液态发酵豆制品和7种固态发酵豆制品为研究对象, 对8种常见生物胺含量、微生物群落多样性以及相关理化指标进行测定。脱脂大豆酱油、蒸鱼豉油、牡蛎减盐酱油中的生物胺总量分别为11 209.7、10 266.7、8 262.5 mg/L, 显著高于其他样品(P<0.05)。大部分液体样品中生物胺含量高于固体。样品中pH值和凯氏氮含量与生物胺总量呈负相关, 水分活度(因子载荷0.413)、总酸含量(因子载荷0.399)和盐度(因子载荷0.330)对生物胺总量的正面效应最大, 对生物胺的产

生和积累起到积极作用。假单胞菌是黑豆老抽、黄豆老抽、脱脂大豆酱油中的优势菌种，与发酵豆制品中生物胺含量呈正相关。芽孢杆菌属是豆豉、纳豆、水豆豉中的优势菌种，与发酵豆制品中生物胺含量呈负相关。

参考文献:

- [1] BRINK B T, DAMINK C, JOOSTEN H M L J, et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1990, 11: 73-84. DOI:10.1016/0168-1605(90)90040-C.
- [2] TAYLOR S L, EITENMILLER R R. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 1986, 17(2): 91-128. DOI:10.3109/10408448609023767.
- [3] GONG X, WANG X X, QI N L, et al. Determination of biogenic amines in traditional Chinese fermented foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)[J]. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2014, 31(8): 1431-1437. DOI:10.1080/19440049.2014.926402.
- [4] 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-Food Science and Technology*, 2018, 92: 282-289. DOI:10.1016/j.lwt.2018.02.047.
- [5] GUAN R F, LIU Z F, ZHANG J J, et al. Investigation of biogenic amines in sufu (*furu*): a Chinese traditional fermented soybean food product[J]. *Food Control*, 2013, 31: 345-352. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.10.033.
- [6] FONG F L Y, EL-NEZAMI H, SZE E T P. Biogenic amines-precursors of carcinogens in traditional Chinese fermented food[J]. *NFS Journal*, 2021, 23: 52-57.
- [7] ZAMAN M Z, ABU BAKAR F, JINAP S, et al. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145: 84-91. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031.
- [8] DABADÉ D S, JACXSENS L, MICLOTTE L, et al. Survey of multiple biogenic amines and correlation to microbiological quality and free amino acids in foods[J]. *Food Control*, 2021, 120: 107497. DOI:10.1016/j.foodcont.2020.107497.
- [9] 国家卫生和计划生育委员会. 食品pH值的测定: GB 5009.237—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-4.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会. 食品中氨基酸态氮的测定: GB 5009.235—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-5.
- [11] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 食品中氯化钠的测定: GB/T 12457—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-6.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 食品水分活度的测定: GB 5009.238—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-7.
- [13] 国家卫生和计划生育委员会. 国家食品药品监督管理总局. 食品中生物胺的测定: GB 5009.208—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 1-9.
- [14] QI Q, HUANG J, ZHOU R Q, et al. Exploring a degradation strategy for biogenic amines based on the Cantonese soy sauce production method[J]. *Food Control*, 2021, 130: 108281. DOI:10.1016/J.FOODCONT.2021.108281.
- [15] HU M, DONG J, TAN G L, et al. Metagenomic insights into the bacteria responsible for producing biogenic amines in sufu[J]. *Food Microbiology*, 2021, 98: 103762. DOI:10.1016/J.FM.2021.103762.
- [16] JOEL E C. Applied structural equation modeling using AMOS: basic to advanced techniques[M]. New York: Taylor & Francis, 2020: 17-323. DOI:10.4324/9781003018414.
- [17] 罗诗茹, 蔡玉莲, 朱冠琳, 等. 黑豆、黄豆、红豆、绿豆中的蛋白质含量比较[J]. *科技世界*, 2014(20): 69. DOI:10.19694/j.cnki.issn2095-2457.2014.20.048.
- [18] HALÁSZ A, BARÁTH Á, SIMON-SARKADI L, et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5: 42-49. DOI:10.1016/0924-2244(94)90070-1.
- [19] 于金芝, 徐莹. 市售酱油及其生产过程中的生物胺含量分析[C]//中国食品科学技术学会第十一届年会论文摘要集. 杭州: 中国食品科学技术学会, 2014: 93-94.
- [20] 陆永梅. 发酵食品中生物胺的检测与控制[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [21] 曹忠娜. 不同工艺酱油发酵过程中生物胺的调控研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
- [22] LI L, WEN X X, WEN Z Y, et al. Evaluation of the biogenic amines formation and degradation abilities of *Lactobacillus curvatus* from Chinese bacon[J]. *Front in Microbiology*, 2018, 9: 1-9. DOI:10.3389/fmicb.2018.01015.
- [23] 黄晓燕, 刘铨珺, 李长城, 等. 低水分活度食品微生物控制技术研究现状[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(23): 286-292. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.024436.
- [24] 李东蕊, 刘红霞, 吴剑荣, 等. 豆瓣酱工业发酵过程中生物胺的生成规律[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(9): 78-82. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.023174.
- [25] 朱天傲, 刘春风, 王金晶, 等. 国产酱类产品中的生物胺[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(10): 220-227. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.013852.
- [26] QI Q, HUANG J, ZHOU R Q, et al. Characterising the mechanism of abating biogenic amines accumulation by cocultures of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Tetragenococcus halophilus*[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 164: 113672. DOI:10.1016/J.LWT.2022.113672.
- [27] CHANDER H, BATISH V K, BABU S, et al. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*[J]. *Journal of Food Science*, 1989, 54: 940-942. DOI:10.1111/j.1365-2621.1989.tb07917.x.
- [28] CAPODIFOGGIO E, VIDAL A M C, LIMA J A S, et al. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99: 5214-5223. DOI:10.3168/jds.2015-10453.
- [29] TREVIÑO E, BEIL D, STEINHART H. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage[J]. *Food Chemistry*, 1997, 60: 521-526. DOI:10.1016/S0308-8146(97)00021-6.
- [30] LIM E S. Influence of bacteriocin-producing *Bacillus* strains on quality characteristics of fermented soybean product with biogenic amine-forming lactic acid bacteria[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2022, 65: 5. DOI:10.1186/S13765-021-00664-9.
- [31] 邹俊杰, 张宾, 孙继鹏, 等. 一株高产金属硫蛋白枯草芽孢杆菌的诱导发酵条件优化[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(17): 130-134. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.025.
- [32] 谷新晰, 王晨笑, 于宏伟, 等. 壳寡糖对泡菜品质、微生物多样及演替规律的影响[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(10): 125-132. DOI:10.16429/j.1009-7848.2021.10.014.