

一株具有降生物胺能力葡萄球菌的筛选及其降解特性

段雨帆¹, 钟媛媛¹, 肖愈¹, 王传花¹, 江日初², 王远亮^{1*}

(1. 湖南农业大学食品科学技术学院, 湖南长沙 410128) (2. 湘潭市市场监督管理局, 湖南湘潭 411100)

摘要: 近年来, 发酵肉制品因其营养丰富、风味独特等优势而在市场中具备一定优势, 但发酵肉中常存在生物胺含量超标等卫生问题, 易引发了人们对其安全性的恐慌。该研究通过双层显色培养基初筛、高效液相色谱复筛的方法, 再结合菌株的生物胺氧化酶活力大小与生长特性, 从传统发酵肉中筛选出一株针对 8 种常见的生物胺均有一定降解作用的菌株 aM, 经 16S rDNA 与糖酵解试验鉴定为沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*)。该菌株在 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中 37 °C 培养 24 h 后, 对生物胺总降解率为 18.78%, 对苯乙胺、色胺及酪胺的降解率分别为 28.56%、23.16% 和 22.45%。此外, 还探究了 aM 不同环境条件下生物胺降解率的影响, 发现其在温度 30~40 °C, pH 值 7 及盐质量浓度为 0%~6% 时降解率最高, 这为之后菌株的实际生产应用中优化发酵条件提供了思路。

关键词: 葡萄球菌; 生物胺; 高效液相色谱; 生物胺氧化酶

文章编号: 1673-9078(2023)10-104-112

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.10.1384

Selection of a Biogenic Amine-degrading *Staphylococcus* Strain and Evaluation of Its Degradation Properties

DUAN Yufan¹, ZHONG Aiai¹, XIAO Yu¹, WANG Chuanhua¹, JIANG Richu², WANG Yuanliang^{1*}

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(2. Xiangtan Market Supervision Administration, Xiangtan 411100, China)

Abstract: Recently, fermented meat products have become increasingly popular owing their rich nutrient profile and unique flavor. However, hygiene issues, such as excessive biogenic amine content, frequently occur in fermented meat products. Elevated biogenic amine content has raised public concerns about product safety. Herein, a strain aM, capable of degrading eight common types of biogenic amines was isolated from traditional fermented meat via culturing on a double-layered chromogenic medium and performing high-performance liquid chromatography (HPLC). The biogenic amine oxidase activity and growth characteristics of different strains were considered in the selection process. The strain was identified as *Staphylococcus warneri* according to the 16S rDNA and glycolysis analysis. Following incubation in Luria-Bertani (LB) liquid medium at 37 °C for 24 h, the total degradation rate of biogenic amines was 18.78%, whereas the degradation rates of phenylethylamine, tryptamine, and tyramine were 28.56%, 23.16%, and 22.45%, respectively. In addition, the effects of different environmental conditions on the degradation rate of biogenic amines by aM were investigated. The highest degradation rate was observed at 30~40 °C, pH value 7, and under a salt mass concentration of 0%~6%. These findings provide a foundation for optimizing the fermentation conditions in the future application of the strain.

Key words: *Staphylococcus*; biogenic amines; high-performance liquid chromatography; biogenic amine oxidase

引文格式:

段雨帆, 钟媛媛, 肖愈, 等. 一株具有降生物胺能力葡萄球菌的筛选及其降解特性[J]. 现代食品科技, 2023, 39(10): 104-112

DUAN Yufan, ZHONG Aiai, XIAO Yu, et al. Selection of a biogenic amine-degrading *Staphylococcus* strain and evaluation of its degradation properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(10): 104-112

收稿日期: 2022-11-01

基金项目: 湖南省重点研发计划 (2022NK2027); 湘潭市科技计划项目 (NY-ZD20211001)

作者简介: 段雨帆 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1357468265@qq.com

通讯作者: 王远亮 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: wangyuanliang@hunau.edu.cn

生物胺(Biogenic Amine, BAs)是由氨基酸脱羧或醛酮转化而形成的一种低分子量的含氮有机碱^[1],广泛存在于奶酪、泡菜、鱼露等发酵类产品中^[2]。由于发酵肉制品中适宜的生物、化学和物理条件,生物胺的形成既无法避免,一旦形成又难以抑制或彻底消除^[3]。但生物胺对人体 also 具有重要意义,合理范围的生物胺含量有益于机体控制血压、神经传递、细胞生长调节^[4];过量则会导致产生过敏乃至死亡等不良生理反应^[5]。目前,对鱼类产品与豆制品及其衍生食品中生物胺的研究较多,针对发酵肉制品中生物胺的研究相对较少,对发酵肉产品中各类生物胺含量暂无限标准规范。

发酵肉制品在中国乃至全世界有着悠久的历史。发酵工艺的运用赋予产品风味独特、肉质紧实、颜色鲜亮、货架期长、易于运输等特点,广泛受到生产商及消费者喜爱^[6]。目前,国内大多数传统发酵肉为家庭传统手工制作或工厂利用当地地理条件小规模自然发酵生产,存在易受季节性的限制以及发酵过程中外部条件难以控制等缺陷,导致发酵肉品质差异明显、质量不稳定、以及可能存在一定安全隐患的问题^[7]。此外,由于传统发酵肉中富含游离氨基酸及各种具备氨基酸脱羧功能的微生物,且在发酵后期 pH 值通常在 5~6 左右,有着符合生物胺生成的良好条件^[8],这也使得发酵肉中的生物胺含量在生产过程中不可忽视。

葡萄球菌是一种在显微镜下呈不规则葡萄串状的革兰氏阳性菌,常用作发酵产品的发酵剂,其代谢异质性及内源酶的活性^[9]赋予它们在硝酸盐还原、精氨酸转化和风味改善方面及生物胺降解等方面具有至关重要功效^[10]。Wang 等^[11]通过分子对接发现肉葡萄球菌蛋白酶可以通过氢键和疏水作用力与肌球蛋白重链相互作用,从而改善哈尔滨干香肠的品质特征和风味特征。随着后续研究的开展,发酵肉制品中的某些葡萄球菌还存在着减少生物胺浓度的功能,其降解途径大致有以下3种:(1)葡萄球菌中的生物胺氧化酶(Amine Oxidase, AOs),能够把生物胺氧化成醛、氨和 H₂O₂ 等小分子化学物质,进而达到降胺的功效^[12];(2)少数葡萄球菌可产生葡萄球菌素,其具有抑菌或杀菌功能,从而有助于从根本上阻止生物胺的形成^[13];(3)葡萄球菌还能够和其他菌种形成协同效应,从而更好地发挥降胺效果^[14]。

本研究利用选择性培养基从传统发酵肉中筛选葡萄球菌,后续通过双层显色培养基初筛、高效液相色谱复筛获得具有一定降胺性能的菌株,结合菌株展开的生物胺氧化酶酶活力研究,以及不同环境自然条件下菌株的生长性能与降胺能力,确定最佳降胺菌株,

对其进行形态学、糖发酵实验和分子生物学鉴定,以期获得菌株在后续食品加工生产中的理论指导依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

新鲜生猪肉(后腿肉)、食盐、白糖均购于湖南长沙滨湖小区东之源超市。

1.1.2 主要试剂

乙腈(色谱级),美国天地试剂公司;色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、精胺、亚精胺标准品,均购自于 CATO 佳途科技股份有限公司;二胺氧化酶试剂盒,北京索莱宝科技有限公司。LB 培养基,青岛海博生物技术有限公司

MSA 培养基:蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 1 g/L、D-甘露醇 10 g/L、NaCl 75 g/L、酚红 0.025 g/L、琼脂 13 g/L,115 °C 高压灭菌 20 min。

双层显色培养基:参照牛天娇等^[15]的方法配制;诱导产酶培养基:参照李彬彬等^[16]的方法配制;生物胺液体培养基:参照邹月^[17]的方法配制。

1.1.3 仪器与设备

OLYMPUS CX23 光学显微镜,尼康仪器(上海)有限公司;Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司产品;SpectraMax ABS Plus 酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵肉的制备

将猪后腿肉切成 1 cm×1 cm×1 cm 的均匀小块,按质量分数(食盐 3%、白糖 1.5%、亚硝酸钠 0.008%)加入配料,混匀后,置于发酵坛中(25±1)°C 发酵 0、5、10、15、20 d。

1.2.2 降生物胺(以下简称为降胺)葡萄球菌的筛选及鉴定

1.2.2.1 葡萄球菌的分离、筛选、纯化

称取 25 g 样品,置于 200 mL 无菌生理盐水中,37 °C 振荡培养 30 min。吸取混合均匀的稀释液 1 mL 加入到 9 mL 无菌生理盐水中,逐级梯度稀释至 10⁻⁷,吸取 100 μL 稀释液,均匀涂布于 MSA 培养基上,37 °C 培养 72 h。挑取光滑饱满的单菌落,分离纯化至三代。

1.2.2.2 降胺葡萄球菌的筛选

双层显色实验:参照刘蕾等^[18]方法,将筛得阴性菌株在 MSA 固体培养基上划线分离纯化 3 次,然后于 4 °C 冰箱斜面保藏备用。

1.2.2.3 生物胺含量及降胺率的测定

将 1.2.2.2 筛得菌株接种于 LB 液体培养基中, 活化 2~3 次, 并调整菌液浓度为 10^8 CFU/mL。再以 2% 的接种量接种至含 8 种生物胺的 LB 液体培养基中, 不接种菌株的含生物胺 LB 液体培养基为空白组, 两组生物胺质量浓度均为 100 mg/L。将培养液置于 37 °C 摇床中培养 24 h。将培养液中生物胺的含量与空白组进行对照, 将生物胺降解能力强的菌株作为后续实验菌株, 于 4 °C 冰箱保藏备用。

(1) 标准曲线的制作

称取生物胺标准品各 50 mg, 以 0.4 mol/L 高氯酸为溶剂, 将标准品定容至 50 mL 容量瓶中, 再分别稀释为 1、0.5、0.4、0.25、0.125、0.1 mg/mL 标准混合液。分别取 1 mL 标准混合液于 5 mL 容量瓶中, 再加入 2 mol/L 的 NaOH 溶液 200 μ L、饱和 NaHCO_3 溶液 300 μ L、含 10 mg/mL 丙酮的 DNS-Cl 溶液 2 mL, 40 °C 水浴暗反应 45 min 后加入 100 μ L 氨水终止反应, 去除残留的 DNS-Cl 溶液, 最后用乙腈定容。在上机检测之前过 0.22 μ m 有机滤膜。

(2) 高效液相色谱条件

色谱柱: SHIMADZU C18-AQ (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm); 流动相 A: 水; 流动相 B: 乙腈; 进样量 20 μ L; 流速 0.9 mL/min; 柱温 35 °C; 紫外检测波长 254 nm。具体梯度洗脱程序如下表 1 所示。

表 1 HPLC 测定生物胺梯度洗脱程序

Table 1 Determination of biogenic amines gradient elution procedure by HPLC

时间/min	A/%	B/%
0	35	65
5	25	75
20	0	100
24	0	100
25	35	65
30	35	65

(3) 生物胺降解率的测定

取 1 mL 含生物胺 LB 液体培养基, 之后按照徐智虎等^[19]方法操作。生物胺降解率计算公式如下:

$$X = \left(\frac{A_1 - A_2}{A_1} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

X——生物胺降解率, %;

A_1 ——未接种菌株的空白组样品生物胺质量浓度, mg/L;

A_2 ——接种菌株的实验组样品生物胺质量浓度, mg/L。

1.2.3 生物胺氧化酶活力测定

1.2.3.1 胺氧化酶试验

对高效液相色谱复筛结果中胺降解率较高的菌株胺氧化酶试验。具体方法为: 取白色洁净滤纸沾取单菌落, 加质量分数 1% 的盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴, 阳性呈现粉红色, 并逐渐加深, 后再加一滴 1% 质量分数 α -萘酚乙醇溶液, 阳性于半分钟内呈现显蓝色, 阴性于 2 min 内不变^[20]。选取阳性菌进行下一步实验。

1.2.3.2 生物胺氧化酶的粗提

将胺氧化酶结果呈阳性的菌株在 MSA 液体培养基中充分活化两次, 再吸取 200 μ L 于诱导产酶培养基中, 置于摇床 37 °C 培养 72 h。吸取 1 mL 于离心管, 4 °C 冷冻离心机 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液得到细胞外部分胺氧化酶; 破碎葡萄球菌, 以释放位于菌体内的生物胺氧化酶。破碎条件为: 功率 500 W; 破碎 3 s, 间隔 7 s; 破碎 10 min。破碎后, 将其置于冷冻离心机中, 离心温度 4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液得到菌内部分胺氧化酶。将两部分上清液均置于冰上待测。

1.2.3.3 粗酶活性的测定

按照北京索莱宝科技有限公司的二胺氧化酶活性检测试剂盒说明书要求配制反应体系, 最后用酶标仪测定 500 nm 处吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。

1.2.3.4 粗酶活性的计算

单位的定义: 每 10^4 个细胞在反应体系中每催化产生 1 μ mol 氧化型邻联茴香胺定义为一个酶活力单位。

$$F = \frac{\frac{\Delta A}{d \times \epsilon} \times V_{\text{反应}}}{\frac{500 \times V_{\text{样本}}}{V_{\text{提取}}} \times T} = 0.06 \times \Delta A \quad (2)$$

式中:

F——DAO 活性;

ϵ ——氧化型邻联茴香胺消光系数, 7.5×10^{-3} mL/(μ mol $\cdot$ cm);

d——96 孔板光径, 0.6 cm;

$V_{\text{反应}}$ ——反应总体积, 0.2 mL;

$V_{\text{样本}}$ ——加入粗酶液体积, 0.05 mL;

$V_{\text{提取}}$ ——加入提取液体积, 1 mL;

T——反应时间, 30 min;

500——细胞数量, 500 万。

1.2.4 降胺菌的鉴定

1.2.4.1 16S rDNA 鉴定

将菌株接种于液体 LB 培养基中, 37 °C, 150 r/min 培养 24 h, 之后取 1 mL 菌液于 1.5 mL 无菌离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 备用。利用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rDNA 扩增。PCR 扩增产物经纯化后送至上海生工测序, 将序列结果与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 基因序列进行比对。

1.2.4.2 糖酵解试验

挑取少量菌株分别接种于新型微生物微量生化鉴定管，放入恒温培养箱 37 ℃培养 48 h，如糖发酵管由紫色变为黄色，则说明可以利用该糖源。根据《常见细菌系统鉴定手册》对菌株进行生理生化特征分析。

1.2.5 环境因素对菌降胺特性的影响

菌株活化及生长曲线绘制：接种环挑取少量菌株于 LB 液体培养基中，37 ℃条件下培养 24 h。按体积分数 2%的接种量将菌液接种于 LB 液体培养基及含生物胺 LB 液体培养基中，37 ℃条件下静置培养 24 h。600 nm 下吸光度值作为生物量，以此绘制生长曲线。

参照上述步骤，分别在 LB 液体培养基及含生物胺 LB 液体培养基中。依据吴彩叶等^[21]的实验设计，在初始 pH 值 6.0 和 NaCl 质量分数 3%的条件下，依次检测温度（20、25、30、35、40、45 ℃）、初始 pH 值（4、5、6、7、8、9、10）、NaCl 质量分数（0、3%、6%、9%、12%、15%、18%）对菌株生长及生物胺降解能力的影响。

1.2.6 数据处理

各组实验数据均为三次平行所得结果。采用 Excel 2019、SPSS 软件处理数据，采用 Origin 2018、MEGA 绘制图表，结果用“平均值±标准偏差”表示，显著性界值为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 葡萄球菌的分离纯化

通过选择性富集、分离和纯化以及光学显微镜观察革兰氏染色结果，从 5 次取样的传统发酵肉样品中共分离得到 84 株葡萄球菌菌株。由表 2 可知，在发酵 20 d 分离到的葡萄球菌菌株数量相对较多，说明葡萄球菌在发酵肉发酵后期逐渐成为优势菌株。

表 2 传统发酵肉样品中分离到的葡萄球菌菌株

Table 2 *Staphylococcus* strains isolated from traditionally fermented meat samples

传统发酵肉样品	获得菌株数
发酵 0 d	5
发酵 5 d	12
发酵 10 d	19
发酵 15 d	21
发酵 20 d	27

2.2 降胺葡萄球菌的筛选

2.2.1 生物胺标准曲线的绘制

根据图 1 可知，8 种生物胺标准品在 30 min 内得到分离，并可确定各生物胺标准品的保留时间，说明此方法具有良好的分离检测生物胺的效果。

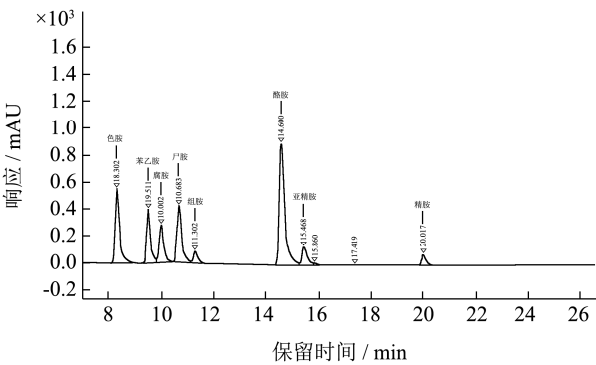


图 1 生物胺混合标品 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatogram of bio-amine mixed standards.

8 种不同浓度生物胺混合标品经 HPLC 测定后，将峰面积（y）设置为纵坐标，生物胺质量浓度（x）设置为横坐标，绘制标准曲线，出峰时间、线性回归方程及相关系数 R^2 如表 3 所示。在质量浓度 0.1~1 mg/L 的范围内，8 种生物胺的线性关系较好， $R^2>0.99$ ，说明采用 HPLC 测定样品中生物胺结果可信度较好。

表 3 生物胺的回归方程和相关系数

Table 3 Regression equations and correlation coefficients of the eight biogenic amines

生物胺	出峰时间	线性方程	相关系数 R^2
色胺	8.30	$y=20\ 881x-234.5$	0.998 8
苯乙胺	9.51	$y=28\ 172x+57.118$	0.998 3
腐胺	10.00	$y=71\ 158x+511.57$	0.997 6
尸胺	10.68	$y=101\ 051x-2\ 933.7$	0.995 8
组胺	11.30	$y=95\ 046x-2\ 283.1$	0.992 9
酪胺	14.60	$y=4\ 152x-121.92$	0.999 6
精胺	15.47	$y=48\ 823x-254.25$	0.998 6
亚精胺	20.02	$y=51\ 625x-314.89$	0.998 9

2.2.2 降胺菌的筛选

利用双层显色培养基的颜色变化筛选出能利用生物胺且不产生物胺的微生物^[22]。通过培养基所呈现的颜色变化可筛选出 29 株不产生物胺菌，显色结果见图 2。

将 29 株双层显色结果呈阴性的菌株在含生物胺的 LB 液体培养基中培养 24 h 后，这 29 株菌的生物胺降解率如表 4 所示：共 12 株菌株对生物胺总量有一定的降解作用，说明双层显色结果存在假阴性的现象。其中 aM 的总胺降解率最高，能达到 18.78%，对苯乙胺与色胺的降解效果最佳，分别为 28.56%、23.16%。aG 菌株对总生物胺降解率为 13.65%，针对精胺与亚精胺的降解效果最为明显。

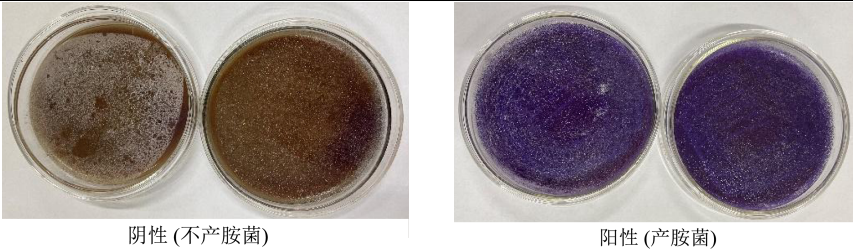


图 2 生物胺的显色反应

Fig.2 Color development reaction of biogenic amine
表 4 29 株潜在降胺葡萄球菌对生物胺的降解率 (%)

Table 4 Degradation rate of biogenic amines by 29 potential *Staphylococci* (%)

菌株	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总胺
aV	-6.17±0.36	13.26±0.28	-15.52±0.36	-10.43±0.37	-34.76±0.48	-7.55±0.34	-37.45±0.46	-51.88±0.46	-18.17±0.38
aG	7.40±0.77	14.13±0.39	13.56±1.40	14.43±0.30	15.32±0.08	7.73±5.16	17.56±1.06	19.09±0.14	13.65±0.91
cg	-1.13±0.69	9.26±0.70	-0.91±0.80	-0.92±0.79	5.90±0.70	-2.24±0.82	-0.86±0.72	2.52±0.80	1.45±0.74
cb	-6.11±0.34	-4.84±0.32	-7.44±0.39	-7.15±0.35	-4.44±0.17	-5.62±0.32	-14.16±0.43	-19.49±0.47	-8.66±0.35
aL	0.34±0.57	34.55±0.07	-3.85±0.02	-1.99±0.11	-7.55±0.42	-1.23±0.10	-12.70±0.08	-17.84±0.08	-1.29±0.12
R1	-8.23±0.26	-8.35±0.28	-13.01±0.30	-10.84±0.29	-20.60±0.33	-7.83±0.26	-23.87±0.28	-33.33±0.57	-15.76±0.30
R2	2.22±0.31	15.76±0.28	-1.60±0.24	3.19±0.29	-14.30±0.55	-0.03±0.13	-16.70±0.43	-23.89±0.55	-4.42±0.16
cH	9.08±0.25	11.53±0.23	2.54±0.31	5.22±0.26	8.01±0.25	8.92±0.22	0.98±0.26	1.90±0.41	6.02±0.27
Be	11.33±2.56	12.86±2.41	5.96±2.43	8.14±2.47	-0.06±2.82	11.34±2.45	3.32±2.56	2.79±2.07	6.96±2.47
aN	9.76±0.52	9.50±0.45	3.03±0.54	5.74±0.48	-14.33±0.50	9.64±0.48	-1.09±0.51	-3.14±0.50	2.39±0.49
MSA ₁	8.06±0.19	10.24±0.24	10.34±0.17	9.31±0.25	-20.26±0.31	11.76±0.26	-17.16±0.19	-22.42±0.39	-1.27±0.24
Cd	-36.03±0.08	-37.56±0.04	-61.23±0.14	-56.62±0.27	-75.97±0.85	-39.21±0.23	-19.58±0.35	-97.74±0.30	-52.99±0.11
aO	-23.83±0.39	-23.84±0.38	-34.30±0.43	-34.30±0.41	-34.53±0.54	-26.16±0.42	13.51±0.31	-34.31±0.21	-24.72±0.37
aS	-31.01±0.65	-31.88±0.73	-47.97±0.70	-46.06±0.66	-50.10±1.51	-32.13±0.45	-1.05±0.51	-67.50±0.85	-38.46±0.63
aM	23.16±0.28	28.56±0.26	18.86±0.29	22.04±0.27	6.51±0.33	22.45±0.29	14.71±0.31	13.96±0.16	18.78±0.27
aH	7.03±0.45	12.62±0.44	8.63±0.48	9.82±0.43	4.00±0.51	6.30±0.47	13.48±0.45	15.69±0.30	9.70±0.44
MSA ₂	1.70±0.31	1.92±0.36	-4.67±0.34	-1.91±0.36	-15.83±0.50	2.26±0.37	-8.37±0.43	-10.75±0.26	-4.46±0.16
MSA ₃	-2.54±0.30	-1.02±0.27	-4.47±0.29	-3.83±0.28	0.29±0.18	0.31±0.28	-2.23±0.31	0.09±0.52	-1.67±0.30
Fj	2.96±0.51	2.76±1.07	3.56±0.62	3.20±0.56	8.07±0.63	3.42±0.20	5.38±0.65	5.99±0.67	4.42±0.59
aF	1.95±0.19	4.07±0.18	-2.16±0.14	0.01±0.19	-13.40±0.27	-0.18±0.47	-8.49±0.15	-12.81±0.23	-3.88±0.22
cN	-0.58±0.31	2.32±0.34	-2.94±0.31	-1.52±0.32	-6.38±0.35	-1.95±0.50	-6.92±0.32	-9.34±0.29	-3.41±0.34
cE	0.77±0.48	5.74±0.42	2.10±0.48	1.22±0.46	8.51±0.45	1.19±0.23	4.94±0.46	7.15±0.56	3.95±0.43
Ca	5.39±0.41	12.13±0.37	4.69±0.42	6.06±0.39	2.87±0.39	4.41±0.35	1.48±0.37	-0.03±0.50	4.62±0.43
aA	1.49±0.68	7.08±0.59	4.51±0.65	3.41±0.64	13.81±0.40	1.75±0.64	9.19±1.78	11.90±0.57	6.64±0.70
Ea	2.92±0.29	9.81±0.31	0.78±0.30	3.15±0.30	-8.68±0.33	1.33±0.57	-5.54±0.33	-8.89±0.26	-0.64±0.34
Rq	-1.79±2.93	-1.00±2.89	1.95±2.78	0.14±2.91	22.87±13.16	-0.28±3.15	7.30±2.64	12.00±2.62	5.15±3.65
Ci	-28.03±0.39	-32.11±0.32	-64.59±0.51	-56.14±0.42	-72.29±0.29	-33.46±0.41	-33.76±0.31	-73.33±0.86	-49.22±0.39
Eg	-26.95±3.31	-25.41±3.03	-45.52±3.99	-42.25±4.24	-59.36±6.19	-28.3±6.19	-2.72±3.59	-77.07±5.07	-38.45±3.96
aS	-31.01±0.65	-31.88±0.73	-47.97±0.70	-46.06±0.66	-50.10±1.51	-32.13±0.45	-1.05±0.51	-67.50±0.85	-38.46±0.63

注：“-”表示添加菌株后生物胺含量增加；表格中数据均为三次平行结果。

2.3 菌株的酶活力大小比较

有研究表明，可通过在发酵过程中控制 pH 值、发酵时间和温度等微生物的发酵条件实现抑制生物胺的含

量^[23]。因此在诸多降胺方法中，利用葡萄球菌产生的 AOs 来催化降解生物胺也被认为是最有发展空间的方法之一^[24]。因此，本文选取降胺能力强且胺氧化酶试验阳性的菌株 aM、aG、aH 与 Be，测定其 AOs 酶活力大小。

由图 3 可知, 经 72 h 后细胞内外总酶活力大小为 $aM > aG > aH > Be$ 。通过对比图 3a、3b 可知, aM 、 aG 、 aH 与 Be 未经破碎与经过破碎处理的酶活分别为: 2.16、2.36、1.24、1.44 与 4.14、3.72、1.64、1.54 $U/10^5$ cell, 四株菌株经过破碎后测得的胺氧化酶活性均高于未经破碎处理。这与 Hyun-Il 等^[25]发现 AOs 主要分布在细胞膜上或在细胞质空间, 在微生物生长期间也有少量分泌至细胞外说法符合。随着菌株生长时间的延长, 四株菌株的酶活力大小都逐渐增大, 其中菌株 aM 与 aG 的胺氧化酶活力显著高于 aH 与 Be , 72 h 后总酶活大小分别为 $6.30 U/10^5$ cell、 $6.10 U/10^5$ cell。因此, 选取 aM 与 aG 继续后续的研究。

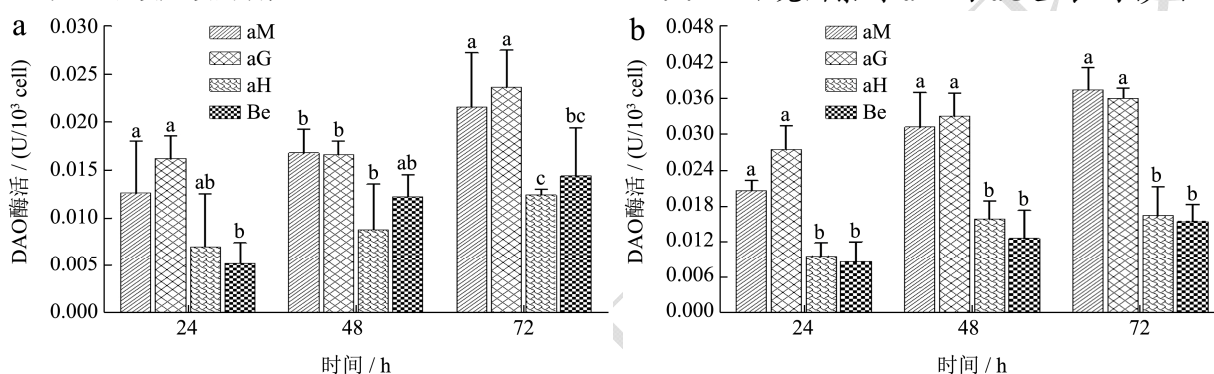


图 3 未破碎条件下 (a) 和破碎条件下 (b) 不同菌株不同时间酶活大小

Fig.3 Enzyme activity of different strains at different time under unbroken condition (a) and crushing condition (b)

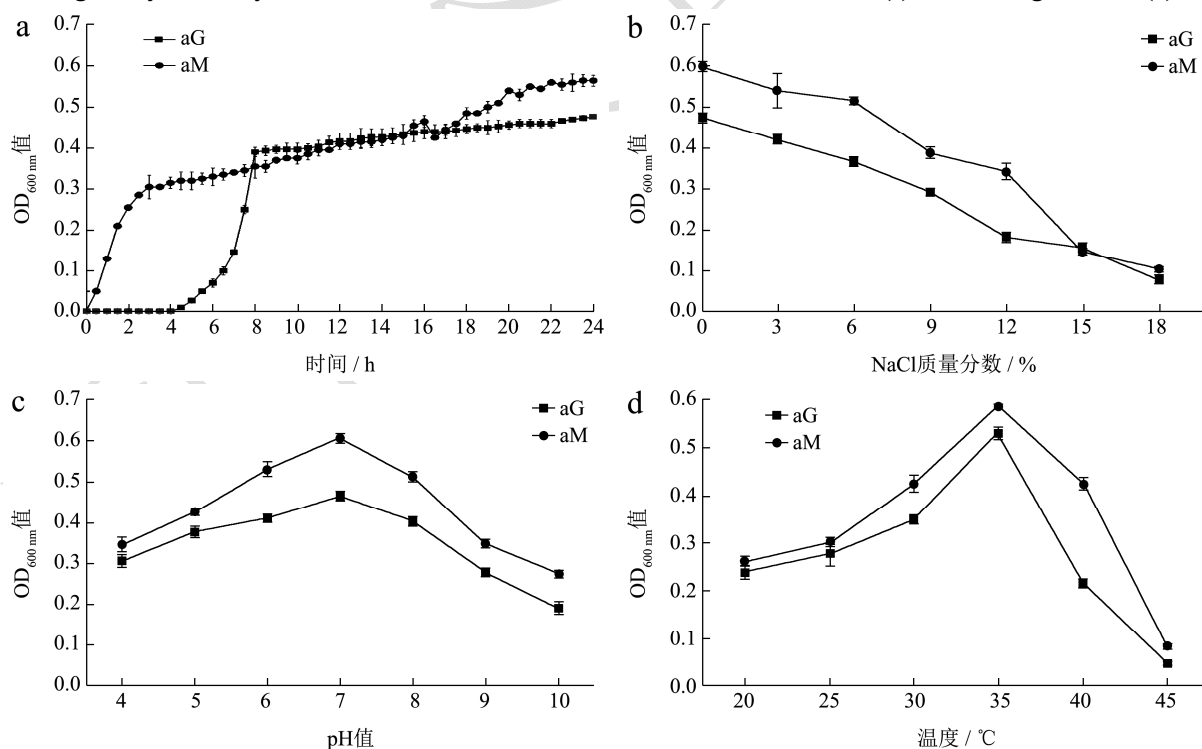


图 4 菌株 aM 、 aG 的生长曲线 (a), 盐质量分数 (b)、pH (c)、温度 (d) 对菌株 aM 、 aG 生长的影响

Fig.4 The growth curve of aM and aG strains (a); Effect of salt concentration (b), pH (c) and temperature (d) on the growth of strains aM and aG

2.4 环境因素对降胺菌生长特性的影响

2.4.1 菌株 aM 、 aG 的生长曲线

将 2 株菌分别接种于 LB 培养基中, $37^{\circ}C$ 下培养。每隔 30 min 测定其 $OD_{600\text{ nm}}$ 值, 以生长时间点为横坐标, $OD_{600\text{ nm}}$ 值为纵坐标, 绘成生长曲线图。由图 4a 可知, aM 延滞期较短, 从 2 h 开始, aM 即进入生长对数期; 而 aG 的延滞期较长, 在 4.5 h 后进入对数期, 8 h 以后开始进入稳定生长期; 并且在稳定期, 菌株 aM 的 $OD_{600\text{ nm}}$ 值一直保持较高水平, 培养 24 h 后仍未进入衰亡期。由此可见, 菌株 aM 生长活力更高。

2.4.2 环境因素对 aM 与 aG 生长的影响

由图 4b 可知,随着 NaCl 质量分数的升高,aM 与 aG 的生长逐渐降低。当 NaCl 质量分数达到 18%时,aM、aG 仍可以存活。当 NaCl 质量分数处于 0%~6% 范围内时,菌株 aM 生物量较高。传统发酵肉中盐添加量一般在 2%~4%,因此从适应盐浓度方面而言,aM 更适于作为发酵剂。

适宜的 pH 值是葡萄球菌的正常生长代谢以及降解生物胺的必备条件。由图 4c 可知,两株菌株生长都随 pH 值增加呈先增加后减小的趋势。菌株 aM 和 aG 的最适 pH 值为 7。当 pH 值 4 和 pH 值 10 的条件下,

两菌株仍有一定程度的生长,说明两株菌株对酸性或碱性环境有一定的耐受能力,但总体而言,菌株 aM 耐受能力更强,更适合后续发酵。

由图 4d 可知,两株菌株在 20~40 ℃均可生长,温度为 35 ℃的时候,aM 和 aG 菌株 OD_{600 nm} 值达到最高,分别为 0.586 和 0.529。当温度达到 45 ℃时,aM 和 aG 几乎不生长,这也说明高温对两株菌的影响较大。

综合以上结果,选择 aM 作为后续研究的菌株。

2.5 aM 菌株的鉴定

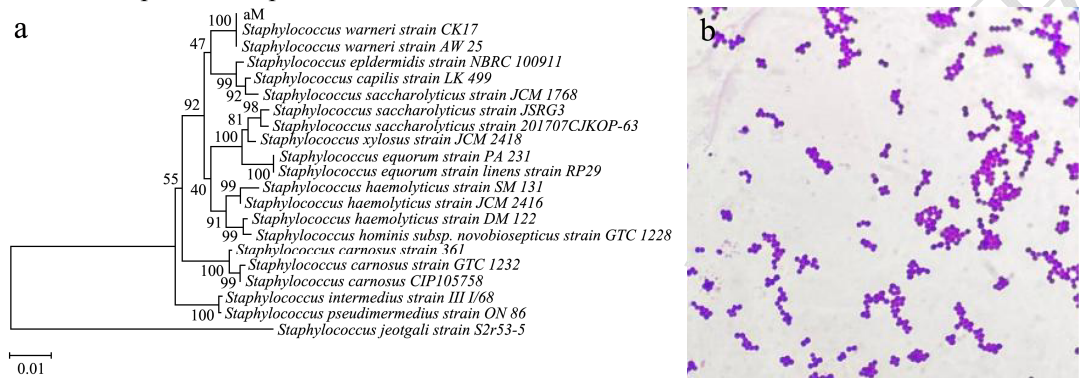


图 5 16S rDNA 序列系统发育树(a)和革兰氏染色镜检(b, 1 000×)

Fig.5 Phylogenetic tree based on 16S r DNA sequence (a) and Gram staining microscopic examination (b, 1 000×) of the isolated strain

将菌株 aM 的 16S rRNA 基因测序结果上传至 NCBI 数据库,与已知菌株的序列进行 BLAST 比对分析,发现 aM 菌株与模式菌株沃氏葡萄球菌 CK13 的相似度达到 100%。根据分子鉴定(图 5a)、形态特征(图 5b)与糖发酵管(表 5)鉴定结果可知,该菌为沃氏葡萄球菌。沃氏葡萄球菌是发酵肉中的常见菌,这与王曼等^[26]在传统发酵鲜肉粉中发现相一致。

吴燕燕等^[27]在腌制咸鱼中筛选到的降胺菌最适降解温度为 35 ℃结论一致,这可能与菌株的最适生长温度均在 35 ℃左右有关。同时温度对 aM 降解精胺的影响最小,降解范围在 9.69%至 14.03%,其中降解作用较为显著的尸胺和苯乙胺,其降解率分别为 20.58%和 19.12%。但与其在 30 ℃及 40 ℃时的绝大部分生物胺降解率无显著性差异,仍保持着较高的水平。当温度处于 20 ℃及 45 ℃时,降胺能力大大降低,有研究表明胺氧化酶活性在 30 ℃时最高,在 25 ℃时活性开始降低,在 45 ℃时酶活几乎为零^[28]。因此,这可能与过低或过高的温度抑制了 aM 中胺氧化酶的分泌,胺氧化酶作为生物胺降解反应中的重要催化剂,温度可影响其本身某些基团的解离、与底物的结合等^[29]。欧昌荣等^[30]对组胺降解酶进行基本酶学性质,也得出不同温度、pH 和食盐质量分数会对酶活性造成很大影响。

表 5 糖发酵试验结果

Table 5 The results of sugar fermentation test

糖源	结果	糖源	结果
甘露醇 Mannitol	-	纤维二糖 Cellose	+
果糖 Fructose	+	棉子糖 Raffinose	-
木糖 Xylose	-	蔗糖 Saccharose	-
甘露糖 Mannose	+	麦芽糖 Maltose	+
乳糖 Lactose	-	木糖醇 Xylitol	-
蜜二糖 Melibiose	-	鼠李糖 Rhamnose	-
山梨醇 Sorbitol	-	蕈糖 Mushroom sugar	-
海藻糖 Mycose	+	松二糖 Turanose	+

2.6 环境因素对 S.warneri-aM 降胺作用的影响

从图 6a 可以看到,aM 在 20 ℃到 45 ℃温度范围内对生物胺都有一定程度的降解,总体呈现先升高后降低的趋势。除精胺的最佳降胺温度为 30 ℃外,其他 7 种生物胺均在 35 ℃时降解效率最好,这也与

根据图 6b 发现,生物胺的降解在不同 pH 下分别表现出显著差异。总体而言,aM 的最适降解 pH 值在 7 左右,在其他 pH 降解会受到一定程度的抑制,导致这一结果的原因可能是 aM 主要通过体内的胺氧化酶分解代谢生物胺。相对于偏碱性条件下的降胺率,菌株 aM 在偏酸环境中对生物胺的降解效率较高,这可能与菌株 aM 来源于发酵肉后期,其生长适应了酸性环境。

由图 6c 可以看出,aM 在 NaCl 质量分数为 18%的高盐环境中仍具有生物胺降解能力,结合图 4b 也可知,

在此条件下 aM 也显示出一定的生长能力。这可能与从菌株来源于发酵肉发酵后期,从而具备一定的耐盐性有关。先前也有研究发现从高盐浓度的发酵产品中分离出的葡萄球菌可以耐受 15% 的盐,甚至可以在 NaCl 质量分数为 20% 的培养基中生长^[31]。总体而言,胺降解率随 NaCl 质量分数增高而逐渐降低。在 NaCl 质量分数为 0%~6% 时,都得到较好的降解,绝大部分的生物胺降解率都在 10% 以上。当 NaCl 质量浓度达到 15% 时, aM 对各种生物胺的降解能力大大降低,但仍可表现出降解特性,这也是它相对于其他如乳酸菌、粪肠球菌等降胺菌的优势所在^[32]。而这一性质的维持,主要与葡萄球菌中在高渗环境中与谷氨酸(谷氨酸是细菌耐盐的重要分子)表达的相关基因增加有关^[33]。基于这一认识,本研究筛选出的沃氏葡萄球菌对之后高盐发酵食品工业发酵剂菌种的开发具有重要价值。

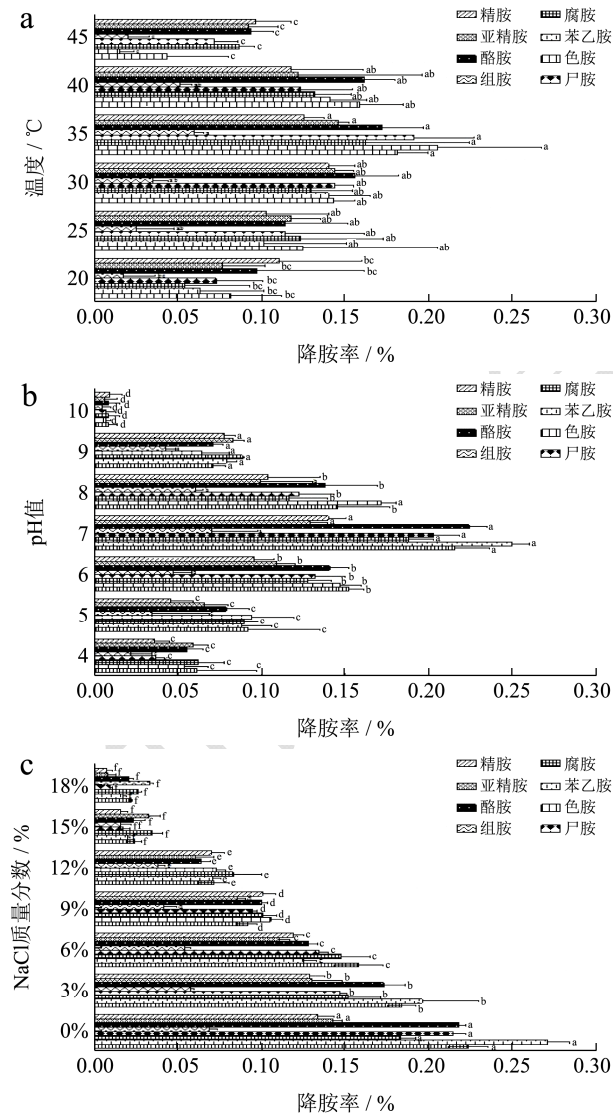


图 6 不同环境条件对 *S. saprophyticus*-aM 降解生物胺的影响
Fig.6 Effects of different environmental conditions on biodegradation of biogenic amine by *S.saprophyticus*-aM

3 结论

本研究通过双层显色实验、HPLC 法从传统发酵肉中筛选出 12 株对生物胺具有一定降解作用的葡萄球菌。以菌株降解生物胺的能力、胺氧化酶活力大小、生长特性为评判标准,进一步筛选得到 1 株降解生物胺能力最佳的菌株 aM,经形态学观察、分子生物学及糖发酵实验鉴定该菌为沃氏葡萄球菌(*Staphylococcus warneri*)。沃氏葡萄球菌广泛存在于自然界中,具有丰富的生物学功能,目前已从发酵鱼类、奶酪、腌肉制品、人体等分离鉴定。文章通过对其生长特性及不同环境条件下降解生物胺能力的研究,结果表明,该菌株在温度为 30~40 °C, pH 值为 7 及 NaCl 质量分数为 0%~6% 条件下降解效果最佳,对发酵肉中最常见的腐胺与尸胺降解效果突出。同时,该菌株具有耐盐性,这对高盐发酵产品发酵过程中生物胺含量的控制具有一定的参考价值;前期也有研究表明,沃氏葡萄球菌能够降解蛋白质和脂肪,形成独特的香气和风味。这对后续将其作为发酵剂提升产品口感提供了可能。

利用含 AOs 的微生物来防止食品中生物胺的合成和累积并对食品中已存在的生物胺进行降解,对发酵食品的加工工艺以及营养和风味影响甚微,是控制发酵食品中生物胺含量最有效的方法之一。*S.warneri*-aM 中的总 AOs 为 6.20 U/10⁵ cell,相对于其他含量较低。后续可探究不同环境对菌株产酶的影响来确定其最佳产酶条件,或通过转基因技术改造提高酶产值后再运用于食品生产加工中。目前对菌株中产生的 AOs 研究还处于初级探索阶段,还应深入研究编码蛋白质序列、酶活性和基因表达调控的基因,在获得这些酶的必需信息基础上,利用基因层面的技术手段挖掘出具有高效催化功效的 AOs。

参考文献

- [1] Mohammed G I. A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in food stuffs [J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2016, 47: 84-94.
- [2] 张立飞,孙明浩,华成黎,等.发酵食品中生物胺的形成、检测及其防控策略的研究进展[J].食品与发酵工业,2023,49(3): 329-339.
- [3] Alvarez M A, Ma M A. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution [J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 39(2): 146-55.
- [4] Schirone M, Visciano P, Caconte F, et al. Formation of

- biogenic amines in the cheese production chain: Favouring and hindering factors [J]. International Dairy Journal, 2022, 133: 105420.
- [5] 段雨帆,钟媛媛,朱霄,等.葡萄球菌对发酵肉制品中生物胺降解机制研究进展[J].肉类研究,2022,36(1):49-55.
- [6] 田星,赵邯,王浩东,等.传统发酵肉成熟过程中微生物菌群和理化性质变化[J].肉类研究,2020,34(1):9-14.
- [7] 李廷任,赵金山,臧金红,等.传统发酵与接种发酵酸肉安全品质特性的分析[J].食品工业科技,2022,43(15):257-264.
- [8] 王维亚,刘玉婷,万汉坤,等.腐乳中细菌群落结构与生物胺的相关性分析[J].食品工业科技,2022,43(22):181-188.
- [9] Liao R, Xia Q, Zhou C, et al. LC-MS/MS-based metabolomics and sensory evaluation characterize metabolites and texture of normal and spoiled dry-cured hams [J]. Food Chemistry, 2022, 5(1): 131156-131189.
- [10] Khusro A, Aarti C, Salem A Z M, et al. Techno-functional traits and safety aspects of coagulase-negative *Staphylococcus saprophyticus* isolated from traditional fermented food [J]. Food Biotechnology, 2020, 34(1): 77-99.
- [11] Wang H, Xu J, Liu Q, et al. Effect of the protease from *Staphylococcus carnosus* on the proteolysis, quality characteristics, and flavor development of Harbin dry sausage [J]. Meat Science, 2022, 189: 108827-108855.
- [12] Yamada H, Adachi O, Ogata K. Amine oxidases of microorganisms [J]. Agricultural Biological Chemistry, 2002, 29: 864-869.
- [13] Bastos M D C D F, Farias F M D, Patricia Carlin Fagundes, et al. Staphylococci: An update on antimicrobial peptides produced by *Staphylococci* and their diverse potential applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(24): 1-30.
- [14] 张立飞,孙明浩,华成黎,等.发酵食品中生物胺的形成、检测及其防控策略的研究进展[J].食品与发酵工业,2023,49(3): 329-339.
- [15] 牛天娇,陈历水,孔杭如,等.传统发酵肉制品中降解生物胺菌株的筛选鉴定与应用研究[J].中国酿造,2019,38(9):43-48.
- [16] 李彬彬,宋桂森,全鑫杰,等.屎肠球菌 Ef2 的安全性评估及其产生物胺氧化酶培养和诱导条件的优化[J].食品与发酵工业,2019,45(9):41-48.
- [17] 邹月.蔬菜酶解多糖的制备及其在酸奶中的应用研究[D].成都:西华大学,2021.
- [18] 刘蕾,杨海莹,沈雪梅,等.发酵肉制品中细菌群落结构及其表皮葡萄球菌生物胺相关基因分析[J].中国酿造,2020,39(1):39-44.
- [19] 徐智虎,王雪邨,刘雪婷,等.贵州镇远道菜中生物胺降解菌的筛选及鉴定[J].食品与发酵工业,2022,48(7):126-133.
- [20] 刘玉晗,卢士玲,陆静,等.乳酸菌中生物胺氧化酶菌株的筛选[J].现代食品科技,2016,32(4):106-113.
- [21] 吴彩叶,汤海青,欧昌荣.发酵鲭鱼中一株组胺降解菌的系统发育分析及特性研究[J].核农学报,2022,36(4):795-803.
- [22] 朱翠翠,王海英,赵玉莹,等.鱼露中组胺降解菌的分离筛选及耐受性[J].食品与生物技术学报,2022,41(3):8-15.
- [23] Ruiz-capillas C, Herrero A M. Impact of biogenic amines on food quality and safety [J]. Foods, 2019, 8(2):62-77.
- [24] Pistekova H. Detection and relative quantification of amine oxidase gene (yobN) in *Bacillus subtilis*: Application of real-time quantitative PCR [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 59(3): 909-916.
- [25] Hyun-Il Lee, Young Min Kim, Young Tae. Purification and characterization of a copper-containing amine oxidase from *Mycobacterium* sp. strain JC1 DSM 3803 grown on benzylamine [J]. Journal of Biochemistry, 2008, 144(1): 107-114.
- [26] 王曼,杨琛,覃晓玉,等.鲜肉粉中乳酸菌和葡萄球菌的筛选及鉴定[J].食品与发酵工业,2021,47(5):22-27.
- [27] 吴燕燕,钱茜茜,陈玉峰,等.咸鱼中生物胺降解菌的筛选与降解特性研究[J].食品工业科技,2016,37(18):173-179.
- [28] Kung H F, Lee Y C, Huang Y L, et al. Degradation of histamine by *Lactobacillus plantarum* isolated from miso products [J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(10): 1682-1688.
- [29] Varejao N, De-andrade R A, Almeida R V, et al. Structural mechanism for the temperature-dependent activation of the hyperthermophilic Pf2001 esterase [J]. Structure, 2018, 26(2): 114-132.
- [30] 欧昌荣,汤海青,张宇琼,等.鲭鱼中组胺降解酶产生菌的分离筛选和基本酶学性质研究[J].宁波大学学报(理工版), 2012,25(3):1-6.
- [31] Probst A J, Hertel, Richterl, et al. *Staphylococcus condimenti* sp. Nov, from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. Nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(3): 651-658.
- [32] 杜雪.东北传统大酱中生物胺含量测定及生物胺降解菌的筛选应用[D].大连:大连工业大学,2020.
- [33] Jo E, Hwang S, Cha J. Transcriptome analysis of halotolerant *Staphylococcus saprophyticus* isolated from Korean fermented shrimp [J]. Foods, 2022, 11(4): 282-288.