

枯草芽胞杆菌多铜氧化酶对市售豆豉生物胺、活性物质和风味品质的影响

卢小倩^{1,2}, 卢杨子安¹, 余元善¹, 吴继军¹, 彭健¹, 徐玉娟^{1,2*}, 李璐^{1*}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (2. 华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631)

摘要: 酶降解法因其特异性强、副作用小的特点成为控制发酵食品生物胺最具前景的方法, 然而目前尚未有酶法降解豆豉生物胺的研究。因此, 本研究系统解析了枯草芽胞杆菌 T2 的多铜氧化酶 (CotA) 对市售豆豉生物胺、活性物质和风味品质的影响。经 CotA 处理后, 重庆豆豉 (CQ) 和湖北恩施豆豉 (HBES) 的总生物胺含量分别下降了 22.43% 和 45.35%, 而四川宜宾豆豉 (SCYB) 的总生物胺含量未呈现显著变化。与此同时, CotA 处理对这 3 种豆豉的总酚和总黄酮无负面影响。然而, CotA 处理对 3 种豆豉的风味品质有显著影响。与对照组相比, CotA 处理使 CQ 和 SCYB 中多种游离氨基酸含量升高, 而 HBES 中多数游离氨基酸含量在 CotA 处理后呈下降趋势。此外, CotA 处理不影响对 3 种豆豉的游离脂肪酸和挥发性风味物质的种类, 但其特征物质 (1-辛烯-3-醇、四甲基吡嗪、2,3-丁二醇) 的相对含量在 CotA 处理后普遍升高, 表明 CotA 处理可丰富豆豉风味特征。本研究结果表明, CotA 在降低豆豉生物胺含量的同时能够提升其风味品质, 为酶法控制豆豉生物胺提供了理论依据。

关键词: 枯草芽胞杆菌; 多铜氧化酶; 豆豉; 生物胺降解; 品质

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0737

Effects of Multicopper Oxidase of *Bacillus Subtilis* on Biogenic Amines, Bioactive Compounds and Flavor Quality of Commercially Available Douchi

LU Xiaoqian^{1,2}, LU Yangzian¹, YU Yuanshan¹, WU Jijun¹, PENG Jian¹, XU Yujuan^{1,2*}, LI Lu^{1*}

(1. Sericulture and Agricultural Products Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

(2. School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Enzyme degradation has emerged as the most promising method for controlling biogenic amines (BAs) in fermented foods due to its high specificity and minimal side effects. However, no studies have been reported on the enzymatic degradation of BAs in Douchi. Therefore, this study systematically investigated the effects of the *Bacillus subtilis* T2 multicopper oxidase (CotA) on the BAs, active substances, and flavor quality of commercially available Douchi. After CotA treatment, the BA contents of Chongqing Douchi (CQ) and Hubei Enshi Douchi (HBES) were decreased by 22.43% and 45.35%, respectively, while the total BA concentration of Sichuan Yibin Douchi (SCYB) was not significantly changed. Meanwhile, CotA treatment had no negative impact on the total phenolics and total flavonoids of these three Douchi. However, the CotA treatment had a significant effect on the flavor quality of these Douchi samples. Compared with the control group, CotA treatment increased the levels of multiple free amino acids in CQ and SCYB, while most free amino acids in HBES showed a downward trend

收稿日期: 2026-05-14; 修回日期: 2026-07-27; 接受日期: 2026-07-28

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2025A1515011036); 广东省现代农业产业共性关键技术创新科研团队建设项目 (农产品加工与保鲜共性) (2026CXTD16); 广东省农业科学院现代种业创新能力提升工程 (2026ZYT0703); 广东省重点实验室项目 (2023B1212060041); 广东省农业科学院人才工程项目 (2023PY-QY010); 广东省科学技术协会青年人才培养计划 (SKXRC2025475)

作者简介: 卢小倩 (2002-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物, E-mail: 17777680021@163.com

通讯作者: 徐玉娟 (1974-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品加工, E-mail: guoshuxuyujuan@163.com; 共同通讯作者: 李璐 (1990-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品微生物, E-mail: lilu045@163.com

after CotA treatment. Furthermore, CotA treatment had no influence on the types of free fatty acids and volatile flavor compounds of three Douchi samples, while the relative contents of characteristic substances (1-octen-3-ol, tetramethylpyrazine, 2,3-butanediol) generally increased after CotA treatment, indicating that CotA treatment could enrich the flavor profile of Douchi. The findings of this study demonstrated that CotA could reduce the BAs content of Douchi coupled with improve its flavor quality, providing a theoretical basis for enzyme-based control of BAs in Douchi.

Key words: *Bacillus subtilis*; multicopper oxidases; douchi; biogenic amines; quality

豆豉是以黄豆或黑豆为原料,经微生物发酵和调味制成的发酵豆制品^[1],根据主导发酵微生物的不同,豆豉主要分为细菌型、毛霉型和曲霉型三大类^[2]。豆豉兼具调味和药用价值,可缓解疲劳、失眠、食欲不振等症状^[3,4]。其中,以枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)为核心发酵菌种的细菌型豆豉最为常见^[5],其发酵产生的丝氨酸蛋白酶具有溶栓作用,可预防和治疗血栓^[6]。

然而,市售豆豉多为自然发酵,易产生不良代谢物,威胁食用安全^[7]。生物胺(Biogenic amines, BAs)是一类主要通过氨基酸脱羧或转氨反应形成的低分子量碱性含氮化合物^[8],广泛存在于腊肉、香肠、乳酪等发酵食品^[9,10],常见BAs主要有酪胺、组胺、色胺、尸胺、腐胺和 β -苯乙胺^[11],它们在生物体的代谢过程和生理活动中起着至关重要的作用,是神经递质、激素的前体^[12]。然而,消费者过量摄入可导致呕吐、呼吸不畅、恶心、偏头痛等健康问题^[13,14]。组胺和酪胺被认为是毒性最大的生物胺,能够直接危害人体健康,可引发过敏、高血压甚至休克^[15]。虽然腐胺和尸胺的毒性较低,但会抑制体内组胺和酪胺降解酶的活性,导致二者在体内蓄积^[16]。此外,酪胺在酸性介质中会与亚硝酸盐反应,生成N-亚硝基化合物和C-亚硝基化合物等致癌物^[17]。欧洲食品安全局(EFSA)建议健康人群对组胺和酪胺的每人每餐摄入量分别不应超过50 mg和600 mg^[18]。前期研究发现市售豆豉普遍含有生物胺,部分样品含量过高,影响食用安全性^[19,20]。因此控制豆豉生物胺含量势在必行。

目前控制食品生物胺的策略主要有两类:减少生物胺的形成和降解已生成生物胺^[21],前者通过控制生物胺的前体物、抑制产胺微生物或使用无产胺能力微生物来实现的^[21-23];后者依赖具有生物胺降解能力的微生物或酶^[24]。然而,生物胺前体物的控制和微生物的使用容易对食品品质产生负面影响^[24]。研究表明,从生物胺降解菌株中分离的酶能有效降解发酵食品中的生物胺,且对其质量无负面影响^[25,26]。而酶法降解因其专一性强、副作用小已成为控制食品生物胺最具前景的方法^[27]。

生物胺降解酶分为胺脱氢酶(Amine Dehydrogenase, ADEs)、胺氧化酶(Amine Oxidase, AOs)和多铜氧化酶(Multicopper Oxidase, MCOs)三类^[28],MCOs底物谱广、耐受性强,能同时降解多种生物胺且不产生过氧化氢等有害副产物,因而备受关注^[29]。发酵食品的风味品质是影响消费者接受度的重要因素^[30],但目前关于MCOs对发酵食品风味的研究甚少^[25],尚未有MCOs对豆豉风味品质影响的报道。因此,本研究分析了枯草芽胞杆菌多铜氧化酶(CotA)对三种市售豆豉的生物胺、总酚、总黄酮、抗氧化活性、游离氨基酸、游离脂肪酸和挥发性风味物质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本研究所用的豆豉样品采购于广州市天河区永旺超市,根据产地的其首字母命名,重庆(CQ)、四川宜宾(SCYB)和湖北恩施(HBES)。本研究主要使用了LB(10 g L^{-1} 蛋白胨、 5 g L^{-1} 酵母粉、 10 g L^{-1} 氯化钠, pH 7.2)和TB培养基(12 g L^{-1} 蛋白胨、 5 g L^{-1} 甘油、 0.9 g L^{-1} 磷酸二氢钾、 16.4 g L^{-1} 三水磷酸氢二钾、 5 g L^{-1} 甘油)。PBS缓冲液(0.05 mol L^{-1} 磷酸二氢钠, 0.05 mol L^{-1} 磷酸氢二钠, pH 6.5)。

盐酸、5-磺基水杨酸、石油醚、无水甲醇,天津大茂化学试剂公司;环己酮,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;碳粉,天津华盛化学试剂有限公司;正己烷,国药集团化学试剂有限公司。氯化钠、甘油、磷酸二氢钾、三水磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,福晨(天津)化学试剂有限公司;所有化学试剂均为分析纯。

ZQZY-88BV 恒温培养振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;D3024R 台式高速冷冻离心机,美国赛洛捷SCIOLOGEX公司;P9PC 双光束紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;LC-20AT 高效液相色谱仪,日本岛津公司;多功能酶标仪,帝肯奥地利有限公司;L-8900 氨基酸自动分析仪,日本Hitachi公司;SPME装置和

DVB/CAR/PDMS 萃取头, 美国 Supelco 公司; 7890-5977B-ODP 气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS), 美国 Agilent 公司; PEN3 便携式电子鼻系统电子鼻 (包含 10 个传感器阵列), 德国 AIRSENSE 公司。

1.2 方法

1.2.1 CotA 粗酶液的制备

将实验室保存的含 pET28a 质粒的 *Escherichia coli*-BL21-pET28a 和含重组质粒 pET28a-cotA 的 *E. coli*-BL21-pET28a-cotA (cotA 是编码枯草芽胞杆菌 T2 多铜氧化酶的基因) 分别接种到含卡那霉素的 LB 液体培养基, 37 °C、200 r min⁻¹。培养至 OD₆₀₀=4.0, 按 2% (V/V) 的接种量转接到含有卡那霉素的 TB 培养基中, 37 °C、200 r min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀=0.8。加入 0.1 mmol L⁻¹ IPTG 和 1 mmol L⁻¹ 氯化铜进行诱导, 20 °C 180 r min⁻¹ 培养 12 h。诱导表达结束后菌液 4 °C, 8 000 r min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体, 用 15 mL PBS 缓冲液 (pH 6.5) 洗涤菌体两遍后重悬。菌体在冰上进行超声破碎, 破碎条件为输出功率 75%, 工作 3 s 暂停 5 s, 超声破碎后 12 000 r min⁻¹ 离心 15 min 收集上清液。

1.2.2 CotA 酶活测定

根据 Pei 等^[28]的酶活力测定方法, 略作修改。以 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 (ABTS) 为底物, 通过分光光度法在 420 nm 处检测粗酶液酶活。反应体系包括 100 μL 粗酶液、1 mL 含 0.5 mmol L⁻¹ ABTS 和 1 mmol L⁻¹ CuCl₂ 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液。反应温度和时间分别为 37 °C 和 2 min。酶活力单位 (U) 计为每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量。依据算公式 (1) 计算酶活力。

$$A = \frac{\Delta OD \times V_1}{\Delta t \times V_2 \times \varepsilon} \times 10^6 \quad (1)$$

式中:

A—CotA 酶活力, U·L⁻¹;

ΔOD—420 nm 处吸光度的变化值;

V₁—反应总体积;

V₂—酶液的体积;

ε—ABTS 在 420 nm 下的摩尔吸光系数, ε=3.6×10⁴ M⁻¹cm⁻¹;

Δt—反应时间, min。

1.2.3 样品制备

称取 3 g 豆豉到 15 mL 玻璃瓶中, 加入 3 mL CotA 酶粗酶液和 3 mL PBS 缓冲液的豆豉设置为样品组, 加入 3 mL 的 *E. coli*-BL21-pET28a (实验室保存) 破碎上清液和 3 mL PBS 缓冲液的豆豉设置为对照组; 加入 6 mL PBS 缓冲液的豆豉设置为空白组, 混匀后静置在 37 °C 培养, 每隔 6 h 摇匀。培养 24 h 后收集样品, 储藏在 -20 °C 以供后续分析。添加 CotA 粗酶液的豆豉分别命名为 CQ-CotA、SCYB-CotA 和 HBES-CotA。添加 *E. coli*-BL21-pET28a 破碎上清液的豆豉分别命名为 CQ-pET28a、SCYB-pET28a 和 HBES-pET28a。

1.2.4 生物胺的测定

豆豉生物胺含量的测定参照 Chen 等^[20]的方法进行。取 0.5 g 样品与 1.5 mL 0.4 mol L⁻¹ 的高氯酸震荡混合, 振荡提取 1 h。12 000 r min⁻¹ 离心后, 将 250 μL 提取上清液分别与 100 μL 的 1,7-二氨基庚烷 (1 g L⁻¹)、75 μL 的饱和碳酸氢钠、50 μL 的氢氧化钠 (2 mol L⁻¹) 与 500 μL 的丹磺酰氯 (5 g L⁻¹) 混合, 50 °C 水浴 45 min。加入 25 μL 的 25% 氨水后 50 °C 水浴 15 min, 加入 625 μL 的乙腈 (色谱级) 和 30 μL 盐酸 (6 mol L⁻¹)。12 000 r min⁻¹ 离心 5 min 后获得上清液, 经 0.22 μm 有机相膜过滤后的样品基于高效液相色谱 (岛津 LC-20A) 进行分析。

色谱条件: 柱温、流速和检测波长分别设置为 30 °C、1 mL min⁻¹ 和 254 nm。使用流动相 A (H₂O) 和 B (乙腈) 进行梯度洗脱程序, 溶剂线性梯度程序设置为 50% A~50% B (0~3 min)、10% A~90% B (3~20 min)、10% A~90% B (20~29 min)、50% A~50% B (29~32 min)、50% A~50% B (32~35 min)。

1.2.5 总酚、总黄酮含量和抗氧化能力的测定

总酚含量的测定: 将 1 g 豆豉样品与 25 mL 80% MeOH 进行混合, 对混合物超声处理 30 min, 12 000 r min⁻¹ 离心 5 min, 取 1 mL 上清液与 2 mL 50% Folin-Ciocalteu 试剂和 2 mL 10% Na₂CO₃ 避光反应 2 h, 使用分光光度计

在 765 nm 处测定吸光度值。样品的总酚含量以没食子酸当量 (mg GAE g⁻¹) 表示。

总黄酮含量的测定: 取 1 mL 甲醇提取上清液与 1 mL 5% NaNO₂ 反应 6 min, 随后将 1 mL 10% Al(NO₃)₃ 和 4 mL 1 mol L⁻¹ NaOH 加入至混合物, 混匀静置 15 min 后在 510 nm 处测定吸光度。样品的总黄酮含量以芦丁含量 (mg RE g⁻¹) 表示。

抗氧化能力的测定: 通过评价样品的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力测定样品的抗氧化能力^[20]。使用 Trolox 作为标准物来表示样品的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力 (μMTE·g⁻¹)。

1.2.6 风味品质的测定

1.2.6.1 游离氨基酸分析

样品游离氨基酸的测定参考 Zhang 等^[31]的方法。将 1 g 豆豉样品与 2 mL 0.02 mol L⁻¹ 的盐酸溶液振荡混合, 10 000 r min⁻¹ 离心 10 min。使用石油醚对上清液进行脱脂, 取下层溶液与 15% 的 5-磺基水杨酸溶液混合, 10 000 r min⁻¹ 离心 10 min, 将碳粉进入到上清液中进行脱色, 12 000 r min⁻¹ 离心 15 min, 上清液经 0.22 μm 滤膜处理后使用全自动氨基酸分析仪进行分析。

1.2.6.2 游离脂肪酸分析

样品游离脂肪酸的测定参考谢艳华等^[32]的方法。将 5 g 豆豉样品与正己烷在 50 °C 反应 2 h, 随后将氢氧化钾-无水甲醇溶液加入到混合物中继续反应 2 h, 反应后混合物经 0.22 μm 滤膜处理后使用气相色谱质谱联用仪进行分析。

色谱条件: DB-WAX 色谱柱 (30 m×0.25 μm×0.25 μm), 进样口温度、分流比、载气和流速分别为 260 °C、20:1、氦气和 1 mL min⁻¹。升温程序: 起始温度为 80 °C, 保持 1 min, 以 5 °C min⁻¹ 升至 200 °C, 保持 1 min, 最后以 10 °C min⁻¹ 升至 230 °C, 保持 18 min。

质谱条件: EI 离子源, 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C, 质量扫描范围为 *m/z* 40~400, 间隔为 0.4 s, 阈值为 100。

1.2.6.3 电子鼻分析

称取 5 g 样品置于 50 mL 密封进样瓶中, 40 °C 水浴加热 40 min 后开始检测。PEN3 电子鼻运行参数: 气体流量为 0.4 mL min⁻¹; 分析采样时间、时间间隔、清洗时间、传感器归零时间和样品准备时间分别为 120、1、120、10 和 5 s; 操作环境温度 26 °C。

1.2.6.4 GC-MS 分析

样品挥发性风味物质的测定参考 Lan 等^[33]的方法。采用固相微萃取提取豆豉样品的挥发性化合物, 内标物为 1 mg mL⁻¹ 的环己酮。将 4 g 样品置于顶空瓶中, 在 60 °C 平衡 15 min, 然后将在 250 °C 老化 15 min 的萃取针插入顶空瓶中进行萃取, 萃取温度和时间分别为 60 °C 和 30 min, 随后萃取针在 250 °C 下解析 5 min。

色谱条件: DB-5MS 气相色谱柱 (30 m×0.25 μm×0.25 μm)。采用非分流进样方式, 进样口温度为 250 °C, 载气为氦气, 流速为 1.5 mL min⁻¹。升温程序如下: 40 °C 维持 3 min, 以 3 °C min⁻¹ 升至 105 °C, 以 5 °C min⁻¹ 升至 150 °C, 最后以 10 °C min⁻¹ 升至 250 °C 并维持 15 min。

质谱条件: 电离方式为 EI, 电离能量为 70 eV, 离子源温度为 230 °C, 四极杆温度为 150 °C, 质量扫描范围为 *m/z* 40~400。

1.2.7 感官评价

选取 15 名 (7 男 8 女, 年龄 22~35 岁) 具有食品感官评价经验的人员组成评价小组。评价前对小组成员进行豆豉产品特性专项培训, 使其熟悉豆豉的基本感官属性及评分标尺的使用方法。评价人员从外观与色泽 (30 分)、香气 (30 分)、滋味与口感 (40 分) 三个维度对样品进行评分, 总分 100 分。

1.3 统计分析

所有实验处理和分析均重复 3 次, 结果以平均值±标准差表示; 由 SPSS 31.0 统计软件 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) 对数据进行分析, *P*<0.05 表示显著差异, *P*<0.01 表示极显著差异。采用 OriginPro 2025b、SIMCA 14.1 与在线工具 OmicShare Tools 绘图。

2 结果与讨论

2.1 CotA 对市售豆豉生物胺组成的影响

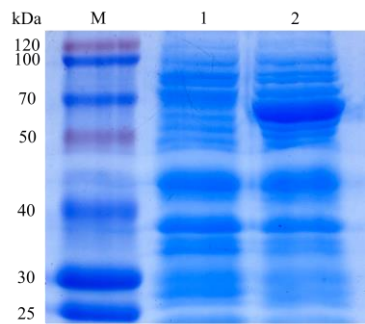


图1 *E. coli*-BL21-pET28a 和 *E. coli*-BL21-pET28a-*cotA* 诱导破碎后上清液的 SDS-PAGE 蛋白胶图

Fig.1 SDS-PAGE protein gel diagram of *E. coli*-BL21-pET28a and *E. coli*-BL21-pET28a-*cotA* supernatant after induction of fragmentation

注: M: 蛋白 Marker, 泳道 1: 诱导破碎后的 *E. coli*-BL21-pET28a 上清液, 泳道 2: 诱导破碎后的 *E. coli*-BL21-pET28a-*cotA* 上清液。

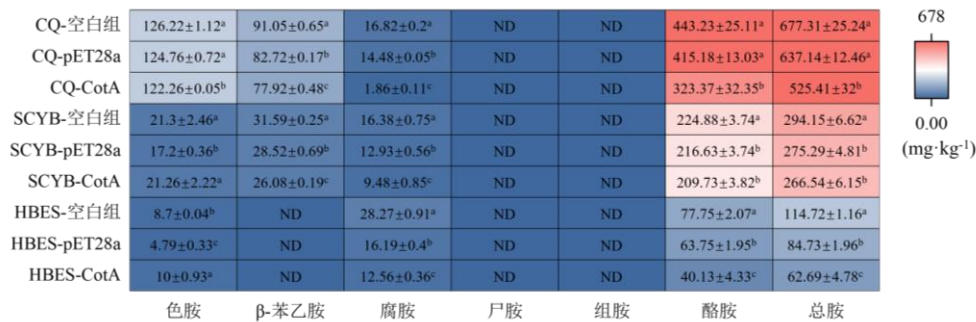


图2 CotA 对市售豆豉生物胺组成的影响

Fig.2 Effects of CotA treatment on BAs composition of commercially available douchi.

注: 数据以三次重复的平均值±标准差表示; ND表示“未检出”。不同字母(a、b、c等)表示在P<0.05水平上均值差异显著。

CQ、SCYB 和 HBES 是中国市面上常见的 3 种细菌型豆豉, 拥有一定的消费群体, 因此选择这 3 种豆豉作为本研究的研究对象。虽然目前已有多种来源的多铜氧化酶表现出生物胺降解能力^[25], 但尚未有适用于豆豉生物胺降解的酶。因此基于 *E. coli* BL21 重组表达了豆豉生物胺降解菌株枯草芽胞杆菌 T2^[20]的多铜氧化酶 (CotA)。由图 1 所示, 重组表达菌株 *E. coli*-BL21-pET28a-*cotA* 的破碎上清液在 70 kDa 附近有明显条带, 而 *E. coli*-BL21-pET28a 的破碎上清液在此处无明显条带; *E. coli*-BL21-pET28a-*cotA* 粗酶液经镍柱纯化后在 70 kDa 附近出现明显单一的蛋白条带, 其大小与 BL21-pET28a-*cotA* 粗酶液一致, 且无其他杂带, 表明 BL21-pET28a-*cotA* 纯化成功。有研究表明, 枯草芽胞杆菌的 CotA 大小约为 67.5 kDa^[34], 这与本研究的结果类似, 表明枯草芽胞杆菌 T2 的 CotA 被成功表达。进一步对 *E. coli*-BL21-pET28a-*cotA* 的破碎上清液进行酶活测定, 结果显示 CotA 酶活力为 376.78 U L⁻¹, 表明重组表达的 CotA 具有一定的活性。

为了研究 CotA 对 3 种市售豆豉生物胺组成的影响, 将 CotA 粗酶液分别添加至 CQ、SCYB 和 HBES, 37 °C 孵育 24 h 后分析豆豉的生物胺组成。由图 2 可知 3 种豆豉样品的生物胺类型有较大差异, 3 种豆豉样品中均可检测到色胺、腐胺和酪胺, 而尸胺和组胺在所有样品中均未检出。此外, 仅在 CQ 和 SCYB 样品中检测出 β-苯乙胺。这 3 种豆豉的生物胺含量也存在显著差异。3 种豆豉样品中 CQ 的色胺、β-苯乙胺和酪胺含量最高, 因此 CQ 的总生物胺含量 (677.31 mg kg⁻¹) 也是 3 种豆豉样品中最高的。经 CotA 处理后, CQ、SCYB 和 HBES 的总生物胺含量分别下降了 22.43%、9.39%和 45.35%。然而, SCYB-CotA 与 SCYB-pET28a 组的总生物胺含量无显著性差异, 表明 CotA 对 SCYB 生物胺的降解能力较弱。这主要是因为 CotA 对 SCYB 的色胺、β-苯乙胺、腐胺和酪胺的降解能力均较差。与之不同的是, CotA 对 CQ 和 HBES 的腐胺和酪胺均有较好的降解效果。CQ、SCYB 和 HBES 的盐含量差异性不大, 因此可排除盐含量对 CotA 活性的抑制。有研究表明, 食品发酵体系中的酚类物质、酸性环

境等因素均可抑制多铜氧化酶的活性^[35]。因此,可以合理推测 SCYB 中可能存在抑制 CotA 活性的因子,导致其对 SCYB 生物胺的降解能力较差。以上结果表明 CotA 降解豆豉生物胺的能力与豆豉类型有紧密联系,因此在未来的研究中还需进一步解析豆豉中影响 CotA 生物胺降解能力的因素。

2.2 CotA 对市售豆豉活性物质和抗氧化活性的影响

发酵豆制品含有多种黄酮类和酚类活性化合物^[36],它们具有抗癌和抗氧化特性,对发酵豆制品的品质有重要影响^[37]。因此,分析了 CotA 对 3 中豆豉总酚和总黄酮含量的影响。与空白组相比, pET28a 处理组和 CotA 处理组的总酚含量无显著性变化(图 3a),表明 CotA 处理不会影响 3 种豆豉的总酚含量。与此同时, pET28a 处理组的总黄酮含量均低于空白组,但 CotA 处理组与 pET28a 处理组的总黄酮含量无显著性差异(图 3b),说明 CotA 对这 3 种豆豉的总黄酮含量无负面影响。pET28a 处理组总黄酮含量的下降可能是因为 *E. coli*-BL21-pET28a 破碎上清液中存在一些可影响豆豉黄酮的物质。

分析样品的特定自由基清除能力是评估样品抗氧化活性的常用方法^[38]。为了解析 CotA 对 CQ、SCYB 和 HBES 抗氧化活性的影响规律,分析了不同豆豉处理组的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力。由图 3c 所示, CotA 处理后 CQ 和 SCYB 的 DPPH 自由基清除能力较对应的空白组出现显著下降,但 CQ-pET28a 组与 CQ-CotA 组的 DPPH 自由基清除能力无显著性差异,表明 CotA 处理仅会影响 SCYB 的 DPPH 自由基清除能力。与之不同的是,这 3 种豆豉经 CotA 处理后其 ABTS 自由基清除能力则与空白组无显著性差异(图 3d),但均高于与其对应的 pET28a 处理组,说明 CotA 处理对 3 种豆豉清除 ABTS 自由基的能力没有负面影响。总体来说, CotA 对 CQ、SCYB 和 HBES 的抗氧化活性影响并不大。

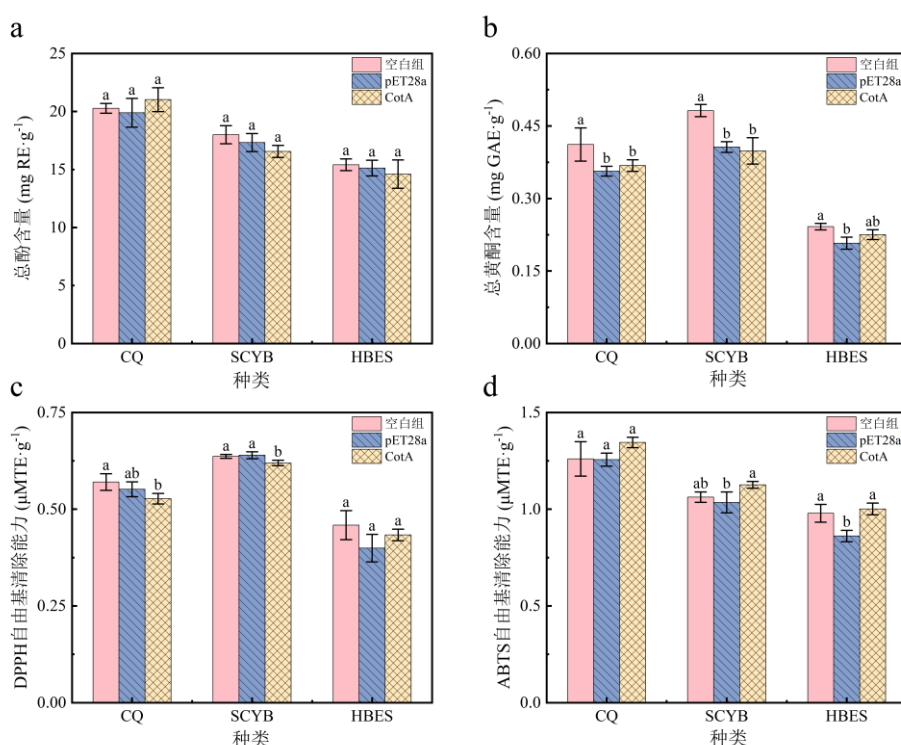


图 3 CotA 对市售豆豉总酚 (a)、总黄酮 (b) 含量和 DPPH (c)、ABTS (d) 自由基清除能力的影响

Fig.3 Effects of CotA treatment on total phenolics (a), total flavonoids (b), DPPH radical scavenging ability (c) and ABTS (d) radical scavenging capacity of commercially available Douchi.

注: 数据以三次重复的平均值±标准差表示; ND 表示“未检出”。不同字母 (a、b、c 等) 表示在 $P < 0.05$ 水平上均值差异显著。

2.3 CotA 对市售豆豉游离氨基酸组成的影响

游离氨基酸 (Free Amino Acids, FAAs) 是微生物生长和代谢的主要氮源, 豆豉发酵过程中部分蛋白质被枯草芽孢杆菌肽酶和蛋白酶水解形成各种 FAAs^[27], 它们对豆豉风味特征的形成至关重要。因此, 评价了 CotA 对 3

种豆豉游离氨基酸组成的影响。由图4可知, pET28a处理组和CotA处理组不会影响CQ、SCYB和HBES的FAAs类型, 但对这3种豆豉FAAs的含量有所影响。

与CQ-空白组相比, CQ经*E. coli*-BL21-pET28a破碎上清液处理后仅有4种FAAs的含量上升, 而CotA处理过的CQ有11种FAAs的含量升高, 且CQ-CotA组的FAAs升高幅度远高于CQ-pET28a组(图4a), 表明CotA有助于CQ的FAAs释放。在这11种含量增加的FAAs中, 蛋氨酸(Met)的含量升高最多, CQ-CotA组的Met含量较CQ-空白组和CQ-pET28a组分别升高了257.08和124.21 $\mu\text{g g}^{-1}$ 。Met作为含硫氨基酸, 可被降解为甲硫醇等物质赋予豆豉独特的肉香味, 有效中和豆腥味^[39]。CQ的谷氨酸(Glu)和苯丙氨酸(Phe)含量仅次于Met, 经CotA处理后CQ的Glu和Phe含量较CQ-空白组也呈现大幅度提升。Glu作为鲜味氨基酸, 含量较高的Glu可增强豆豉的鲜味并抑制苦味^[40]。Phe作为多种风味物质的前体物, 可转化为具有花果香气的苯乙醛等物质^[41]。与CQ类似, *E. coli*-BL21-pET28a破碎上清液处理和CotA处理分别能够提升SCYB中12种和10种FAAs的含量(图4b)。与SCYB-空白组和SCYB-pET28a组相比, SCYB-CotA组的Glu、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、Met和Phe含量大幅度升高。这些结果表明CotA有助于SCYB FAAs的释放, 提升SCYB豆豉的风味品质。

然而, 不同于CQ和SCYB, HBES经CotA处理后7种FAAs的含量较HBES-空白组出现下降, 仅HBES-CotA组的Glu含量高于HBES-空白组和HBES-pET28a组(图4c)。与CotA处理效果不同的是, HBES经*E. coli*-BL21-pET28a破碎上清液处理后9种FAAs的含量升高, 其中Phe的升高幅度最大, 较HBES-空白组提高了23.08%。这可能是*E. coli*-BL21-pET28a破碎上清液中含有能够高效降解HBES中蛋白的酶, 导致HBES-pET28a组的多种FAAs含量高于HBES-空白组。CotA作为一种漆酶, 具有广泛的底物谱, 能够催化酚类、芳香胺类等多种底物^[42]。研究表明, 漆酶可以催化氨基酸, 能够氧化Tyr和半胱氨酸(Cys)等氨基酸^[43]。因此, CotA可能直接催化HBES中的某些游离氨基酸, 导致HBES-CotA组的FAAs含量低于HBES-空白组和HBES-pET28a组。以上结果表明CotA能够促进CQ和SCYB FAAs的释放, 但会抑制HBES FAAs的释放。

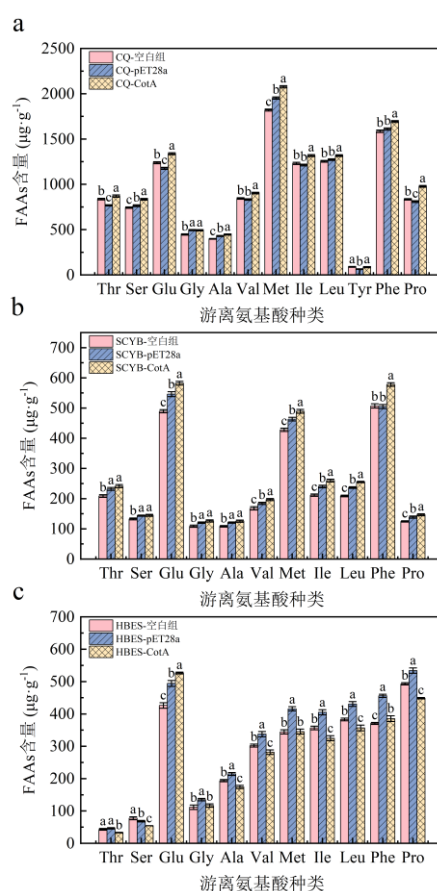


图4 CotA对市售豆豉游离氨基酸含量的影响

Fig.4 Effects of CotA treatment on the free amino acid content of commercially available Douchi

注: 数据以三次重复的平均值±标准差表示; ND表示“未检出”。不同字母(a、b、c等)表示在 $P<0.05$ 水平上均值差异显著。

2.4 CotA 对市售豆豉游离脂肪酸组成的影响

游离脂肪酸 (Free Fatty Acids, FFAs) 也是豆豉风味的重要组分, 它们主要在豆豉发酵过程中产生。豆豉发酵过程中, 大豆中的游离脂肪被微生物分泌的脂肪酶催化, 生成短链脂肪酸和长链脂肪酸。脂肪酸不仅是豆豉风味的重要组分, 还是醛、酮等其他豆豉风味物质的前体物^[44]。因此, 分析了 CotA 对 CQ、SCYB 和 HBES FFAs 组成的影响。由图 5 可知, 棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸是 3 种豆豉的主要 FFAs 类型, 且 CotA 对 CQ、SCYB 和 HBES 的 FFAs 种类无影响。根据碳链中双键的数量和位置, FFAs 可分为饱和脂肪酸 (Saturated fatty acid, SFA)、单不饱和脂肪酸 (Monounsaturated fatty acid, MUFA) 和多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFA)^[45]。其中, 棕榈酸和硬脂酸是 SFA, 油酸是 MUFA, 亚麻酸和亚油酸是 PUFA。3 种豆豉样品的 PUFA 相对含量均超过 50%, 说明其是 3 种豆豉样品中的主要 FFAs。

CotA 对 3 种豆豉 SFA 含量的影响有所不同。CQ-CotA 组的棕榈酸含量显著高于 CQ-空白组和 CQ-pET28a 组, 而 CQ-CotA 组和 CQ-pET28a 组的硬脂酸含量则显著低于 CQ-空白组, 表明 CotA 能够促进 CQ 棕榈酸的释放。然而, CotA 对 SCYB 和 HBES 的 SFA 含量影响较小, SCYB-CotA 组和 HBES-CotA 组与其空白组之间无显著性差异。3 种豆豉的 MUFA 主要是油酸, 油酸作为单不饱和脂肪酸, 可降低血清总胆固醇、低密度脂蛋白, 从而起到预防高血脂和心血管疾病的作用^[46]。CQ 经 CotA 处理后, 其油酸相对含量较 CQ-空白组和 CQ-pET28a 组分别增加了 14.90%和 19.53%。然而, SCYB-CotA 组和 HBES-CotA 组的油酸相对含量则较空白组无明显变化。3 种豆豉的 PUFA 中亚油酸相对含量最高, 也是 3 种豆豉中单体 FFA 相对含量最高的。亚油酸是人体必需的 ω -6 多不饱和脂肪酸, 具有调节胆固醇代谢、维持细胞膜完整性的功能^[47]。亚麻酸是 3 种豆豉的另一种 PUFA, 是一种重要的 ω -3 必需脂肪酸, 具有抗炎、护脑等健康益处^[48]。豆豉较高含量的不饱和脂肪酸是其发挥健康功能的基础^[49]。CQ 经 CotA 处理后, 其亚油酸相对含量较 CQ-空白组和 CQ-pET28a 分别降低了 14.10%和 18.68%。然而, CotA 处理则不会影响 SCYB 和 HBES 的亚油酸相对含量。与此同时, CotA 处理会提升 SCYB 的亚麻酸相对含量, 但会降低 HBES 的亚油酸相对含量。以上结果表明 CotA 不会影响 3 种豆豉的 FFAs 类型, 但会影响 FFAs 的相对含量。

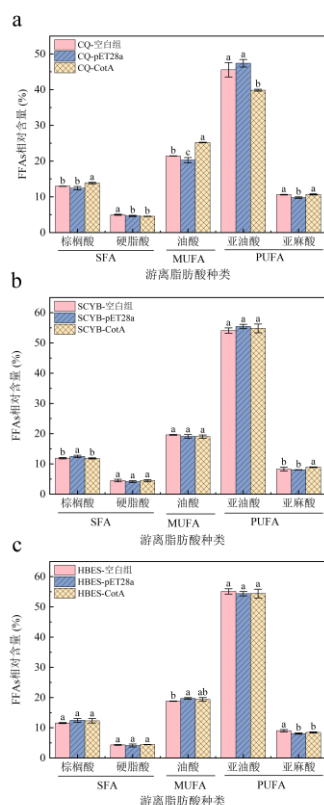


图 5 CotA 对豆豉的游离脂肪酸相对含量的影响

Fig.5 Effects of CotA treatment on free fatty acid relative content of commercially available Douchi.

注: 数据以三次重复的平均值±标准差表示; ND 表示“未检出”。不同字母 (a、b、c 等) 表示在 $P < 0.05$ 水平上均值差异显著。

2.5 CotA 对市售豆豉挥发性风味化合物的影响

2.5.1 电子鼻分析

电子鼻作为一种常见的风味分析仪器,常用于检测食品中的挥发性物质^[50]。因此,本研究基于 PEN3 电子鼻初步研究了 CotA 处理对 3 种市售豆豉挥发性风味物质的影响。与空白组和 pET28a 处理组相比, CotA 处理组在 W1W 和 W5S 传感器上的响应值较高(图 6a/c/e),表明 CotA 通过催化氧化或转氨等反应促进了豆豉硫化物、含氮化合物和芳香类物质的生成。PCA 分析也证实了 CotA 处理对豆豉的挥发性物质有较大影响(图 6b/d/f)。此外, CotA 处理对不同豆豉挥发性风味物质的影响也具有差异性。经 CotA 处理后, CQ、SCYB 和 HBES 分别对 W6S、W2W 和 W2W 传感器的响应值增加,而 CQ 和 HBES 分别对 W2W 和 W6S 传感器的响应值降低。以上结果表明, CotA 处理能够促进硫化物、氮氧化物、芳香类物质、萜烯类物质等豆豉特征风味物质的生成,从而提升了豆豉的特征香气。

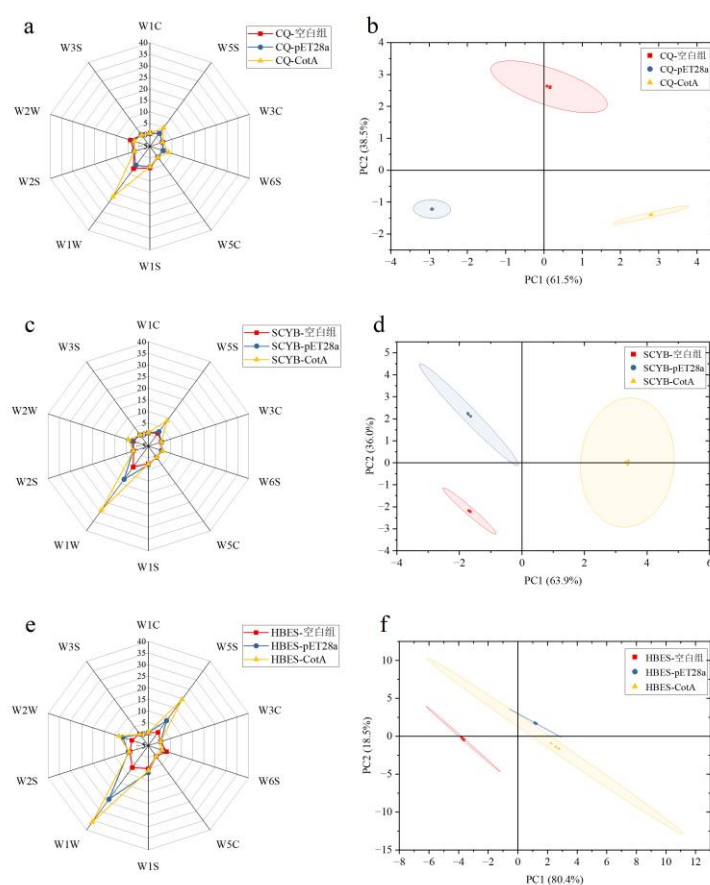


图 6 豆豉电子鼻的雷达图和 PCA 得分图

Fig.6 The radar and PCA score chart of Douchi with different treatment

2.5.2 GC-MS 分析

为了深入揭示 CotA 对 CQ、SCYB 和 HBES 挥发性风味物质的影响规律,基于 GC-MS 分析了 CotA 处理后 3 种豆豉挥发性风味物质组成。根据挥发性物质的出峰时间和峰面积建立了 3 种豆豉样品挥发性物质的总离子流图(图 7a)。3 种豆豉样品中检测到的挥发性物质出峰时间主要集中在 5~35 min。同一样品三个处理组的挥发性物质峰组成较为类似,但峰面积却有较大差异,表明 CotA 对这 3 种豆豉挥发性物质的种类影响较小,但对其相对含量影响较大。

随后,对 3 种豆豉的挥发性风味物质进行定性和相对定量分析。3 种豆豉样品中共鉴定出 63 种挥发性风味化合物,分别是醇类 10 种,醛类 6 种,酸类 5 种,酮类 6 种,吡嗪类 14 种,酯类 2 种,酚类 4 种,萜烯类 12 种,杂环类 1 种,硫化物 1 种,呋喃类 1 种,胺类 1 种(图 7b)。不同种类豆豉的挥发性物质类型有较大差异(图 7c)。CQ 呈现出以醇类、吡嗪类和酸类为主的复合风味结构,其中 1-辛烯-3-醇的含量最高,是 CQ 的标志性挥发性物

2.5.3 OPLS-DA 分析

本研究采用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)对不同处理组豆豉的挥发性风味物质组成进行模式识别。各处理组在得分空间中呈现明显分离,且组内重复样本聚集程度较高,表明模型拟合效果理想。模型参数方面,CQ组自变量拟合指数(R^2_x)为0.997,因变量拟合指数(R^2_y)为1,预测指数(Q^2)为0.997;SCYB组 R^2_x 为0.997, R^2_y 为0.999, Q^2 为0.997;HBES组 R^2_x 为0.995, R^2_y 为0.998, Q^2 为0.993,各组模型均表现出较强的解释能力与预测能力,且组间区分显著。为了验证模型的可靠性并避免过拟合,进一步进行200次随机置换检验。结果显示,CQ组置换检验的 R^2 和 Q^2 的截距分别为0.497和-1.46,SCYB组 R^2 和 Q^2 分别为0.432和-1.89,HBES组 R^2 和 Q^2 分别为0.238和-0.873,所有模型的 R^2 截距均趋近于0且 Q^2 截距均小于0,符合模型随机性较低、未过度拟合的判定标准,证实所建OPLS-DA模型稳健可靠。以变量投影重要性(Variable importance in projection, VIP)值大于1且单变量分析P值小于0.05为标准,筛选对组间区分具有显著贡献的特征挥发性化合物。CQ豆豉中共获得10种关键差异挥发性物质,包括茴香脑、2-甲基丁酸、苯甲醇、2,4-癸二烯醛、4-乙基-2-甲氧基苯酚、1-壬醇、3-甲基-2-丁烯酸、2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪、2,5-二甲基-3-(2-甲基丙基)吡嗪和2-异戊基-6-甲基吡嗪;SCYB豆豉中鉴定出11种关键差异挥发性物质,分别为1-辛烯-3-醇、三甲基吡嗪、邻伞花烃、壬醛、苯酚、苯乙醛、2-乙基-6-甲基吡嗪、2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪、四甲基吡嗪、 γ -松油烯和乙酸;HBES豆豉中鉴定出12种关键差异挥发性物质,分别为三甲基吡嗪、苯乙醇、3-甲基丁酸、乙酸、麦芽酚、茴香脑、 γ -松油烯、反式- β -罗勒烯、3-辛醇、邻伞花烃、 β -月桂烯和香树烯。综上,OPLS-DA模型可有效区分不同处理组豆豉的挥发性风味,并筛选出对组间区分贡献显著的特征化合物。

2.6 感官评价分析

在空白组中,CQ、SCYB、HBES 3种豆豉的感官评价总分分别为73.0、68.5、71.0,表明3种市售豆豉感的官品质存在一定差异,其中SCYB总分相对略低,可能与不同产地豆豉的原料及发酵工艺差异有关。与空白组相比,3种豆豉pET28a组的各感官评价指标得分及总分未呈现显著性差异,表明*E. coli*-BL21-pET28a诱导破碎上清液中不含有引起豆豉感官品质显著变化的成分。然而,需要注意的是,CotA处理后3种豆豉的感官品质均得到显著提升。CQ-CotA、SCYB-CotA和HBES-CotA组的感官评价总分分别为80.5、77.5和77.5,均显著高于其对应空白组和pET28a组。这主要归功于CotA处理组的各感官评价指标得分均高于空白组和pET28a组。其中,CotA处理对豆豉的香气和滋味与口感的提升尤为明显,说明CotA能够促进豆豉中风味前体物的转化,增强豆豉特有的酱香和鲜味。3种豆豉经CotA处理后感官品质的变化趋势一致,表明CotA对不同来源的豆豉均具有良好适用性。

2.7 相关性分析

为了更加直观地揭示CotA处理与3种豆豉生物胺和风味品质之间的关联性,基于Pearson相关系数解析了CotA处理与3种豆豉生物胺和风味品质之间的相关性(图8)。CotA处理普遍与豆豉中腐胺、酪胺及总生物胺的含量呈负相关($P<0.05$),但与SCYB豆豉中的酪胺和总生物胺负相关($P<0.05$)程度不如其它2种。CotA处理与不同豆豉中游离氨基酸和风味物质的相关性存在明显差异。在CQ豆豉中,CotA处理与8种游离氨基酸(Val、Ile、Leu、Pro、Ser、Met、Phe和Glu)呈极强正相关($P<0.01$),并与9种关键挥发性风味物质(四甲基吡嗪、1-辛烯-3-醇、苯乙醛、三甲基吡嗪、油酸、癸醛、D-柠檬烯、2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪和壬醛)的积累呈极强正相关($P<0.01$),仅与亚油酸呈负相关($P<0.05$)。在SCYB豆豉中,CotA处理与10种游离氨基酸(Thr、Ala、Val、Ile、Leu、Pro、Ser、Met、Phe和Glu)和6种挥发性风味物质(2-甲基丁酸、2-乙基-6-甲基吡嗪、四甲基吡嗪、1-辛烯-3-醇、苯乙醛和茴香脑)呈正相关($P<0.05$),而与三甲基吡嗪、桉叶油素、萜品烯-4-醇、 α -松油醇、棕榈酸、油酸、癸醛、D-柠檬烯、2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪和壬醛呈负相关($P<0.05$)。在HBES豆豉中,CotA处理与9种游离氨基酸(Thr、Ala、Val、Ile、Leu、Pro、Ser、Met和Phe)呈负相关($P<0.05$),仅与Glu呈正相关($P<0.05$);在风味物质方面,与四甲基吡嗪、1-辛烯-3-醇、苯乙醛、茴香脑、3-辛酮、桉叶油素、萜品烯-4-醇、 α -松油醇、棕榈酸、油酸、D-柠檬烯、2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪和壬醛呈正相关($P<0.05$),而与2-甲基丁酸和三甲基吡嗪呈负相关($P<0.05$)。这些结果与上述检测到的数据一致。

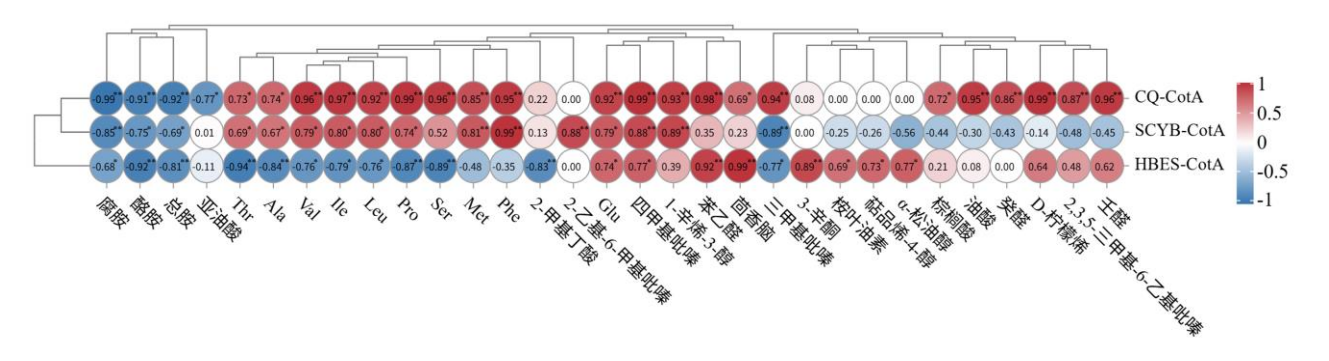


图 8 CotA 处理与 3 种豆豉生物胺和风味品质之间的相关性聚类热图

Fig.8 Correlation clustering heatmap between CotA treatment and biogenic amines and flavor quality in three types of douchi

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。红色代表正相关, 蓝色代表负相关, 颜色深浅度强弱。

3 结论

本研究解析了 CotA 对 3 种豆豉生物胺、活性物质和风味品质的影响。结果表明, CotA 处理可显著降低 CQ 和 HBES 的总生物胺含量, 而对 SCYB 的总生物胺含量无显著影响。与此同时, CotA 处理对 3 种豆豉的总酚、总黄酮含量及 ABTS 自由基清除能力均无显著影响, 表明其未对这 3 种豆豉的主要活性物质产生负面作用。在风味方面, CotA 处理能够有效提升豆豉的风味品质。经 CotA 处理后, CQ 中 1-辛烯-3-醇、四甲基吡嗪、苯乙醇、D-柠檬烯等等关键挥发性风味物质, SCYB 中四甲基吡嗪、1-辛烯-3-醇、2-乙基-6-甲基吡嗪等等关键挥发性风味物质, 以及 HBES 中乙酸、D-柠檬烯、桉叶油素、四甲基吡嗪等关键挥发性风味物质的含量均显著升高, 表明 CotA 处理能够提升 3 种豆豉关键挥发性物质的含量。此外, CotA 处理还能够提升 CQ 和 SCYB 中的多种氨基酸含量。研究结果表明, CotA 处理不仅能够降低豆豉的生物胺含量, 还能改善其风味品质, 在豆豉生物胺控制中具有良好的应用潜力。

参考文献

[1] ZHAO H Y, CHEN H W, WU G X, et al. Integrative metabolomics – GC-IMS approach to assess metabolic and flavour substance shifts during fermentation of Yangjiang douchi [J]. Food Chemistry, 2025, 466(28): 142199.

[2] PARK Y K, LEE J H, MAH J H. Occurrence and reduction of biogenic amines in traditional Asian fermented soybean foods: A review [J]. Food Chemistry, 2019, 278(25): 1-9

[3] CHEN J, CHENG Y Q, YAMAKI K, et al. Anti- α -glucosidase activity of Chinese traditionally fermented soybean (douchi) [J]. Food Chemistry, 2007, 103(4): 1091-1096.

[4] MONIENTE M, GARCÍA-GONZALO D, ONTAÑÓN I, et al. Histamine accumulation in dairy products: Microbial causes, techniques for the detection of histamine-producing microbiota, and potential solutions [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(2): 1481-1523.

[5] LIU S, ZHAO L, LI M, et al. Probiotic Bacillus as fermentation agents: Status, potential insights, and future perspectives [J]. Food Chemistry: X, 2024, 22: 101465.

[6] WENG M Z, ZHENG Z L, BAO W, et al. Enhancement of oxidative stability of the subtilisin nattokinase by site-directed mutagenesis expressed in *Escherichia coli* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2009, 1794(11): 1566-1572.

[7] LI A J, YANG G, WANG Z R, et al. Comparative evaluation of commercial Douchi by different molds: Biogenic amines, non-volatile and volatile compounds [J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(1): 434-443.

[8] SCHIRONE M, ESPOSITO L, D'ONOFRIO F, et al. Biogenic Amines in Meat and Meat Products: A Review of the Science and Future Perspectives [J]. Foods, 2022, 11(6): 788.

[9] DEL RIO B, REDRUELLO B, LINARES D M, et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 120.

[10] LORENZO J M, MARTÍNEZ S, FRANCO I, et al. Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish

- traditional meat product: Effect of some additives [J]. Meat Science, 2007, 77(2): 287-293.
- [11] LEE S, YOO M, SHIN D. The identification and quantification of biogenic amines in Korean turbid rice wine, Makgeolli by HPLC with mass spectrometry detection [J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 62(1): 350-356.
- [12] ASHOK RAJ PATEL, ISHWAR PATEL, SUBHASH BANERJEE. Importance and Green Synthesis of Amines: A Review [J]. Current Organic Chemistry, 2024, 28(5): 375-389.
- [13] DANCHUK A I, KOMOVA N S, MOBAREZ S N, et al. Optical sensors for determination of biogenic amines in food [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(17): 4023-4036.
- [14] LIU Y N, CHEN J, LI H, et al. Nanocomplexes film composed of gallic acid loaded ovalbumin/chitosan nanoparticles and pectin with excellent antibacterial activity: Preparation, characterization and application in coating preservation of salmon fillets [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259(1): 128934.
- [15] SAHA TURNA N, CHUNG R, MCINTYRE L. A review of biogenic amines in fermented foods: Occurrence and health effects [J]. Heliyon, 2024, 10(2): e24501.
- [16] HERNÁNDEZ-ORTE P, LAPEÑA A C, PEÑA-GALLEGO A, et al. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation [J]. Food Research International, 2008, 41(7): 697-706.
- [17] GONZÁLEZ-JIMÉNEZ M, ARENAS-VALGAÑÓN J, GARCÍA-SANTOS M DEL P, et al. Mutagenic products are promoted in the nitrosation of tyramine [J]. Food Chemistry, 2017, 216(1): 60-65.
- [18] HAZARDS (BIOHAZ) E P ON B. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods [J]. EFSA Journal, 2011, 9(10): 2393.
- [19] LI L, RUAN L Y, JI A Y, et al. Biogenic amines analysis and microbial contribution in traditional fermented food of Douchi [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12567.
- [20] CHEN Y T, LUO W S, FU M Q, et al. Effects of selected *Bacillus strains* on the biogenic amines, bioactive ingredients and antioxidant capacity of shuidouchi [J]. International Journal of Food Microbiology, 2023, 388(2): 110084.
- [21] LATORRE-MORATALLA M L, BOVER-CID S, AYMERICH T, et al. Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture [J]. Meat Science, 2007, 75(3): 460-469.
- [22] CAPOZZI V, RUSSO P, LADERO V, et al. Biogenic Amines Degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a Potential Application in Wine [J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3: 122.
- [23] GARDINI F, MARTUSCELLI M, CRUDELE M A, et al. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content [J]. Meat Science, 2002, 61(3): 275-283.
- [24] WEI L Y, XIA X X, FANG F. Identification of an alcohol tolerant multicopper oxidase for reduction of biogenic amines in fermented foods [J]. Systems Microbiology and Biomanufacturing, 2024, 4(2): 699-707.
- [25] HAN J, LIN X P, LIANG H P, et al. Improving the safety and quality of Roucha using amine-degrading lactic acid bacteria starters [J]. Food Research International, 2022, 161: 111918.
- [26] NIU T J, LI X, GUO Y J, et al. Identification of a Lactic Acid Bacteria to Degrade Biogenic Amines in Chinese Rice Wine and Its Enzymatic Mechanism [J]. Foods, 2019, 8(8): 312.
- [27] GUO M Y, YANG H, ZHANG H P, et al. Impact of *Pediococcus pentosaceus* containing multicopper oxidase gene on biogenic amine accumulation and quality of Xinjiang sausage during ripening [J]. LWT - Food Science and Technology, 2024, 203: 116335.
- [28] PEI H, WANG Y L, HE W, et al. Research of Multicopper Oxidase and Its Degradation of Histamine in *Lactiplantibacillus plantarum* LPZN19 [J]. Microorganisms, 2023, 11(11): 2724.
- [29] LI B B, LU S L. The Importance of Amine-degrading Enzymes on the Biogenic Amine Degradation in Fermented Foods: A review [J]. Process Biochemistry, 2020, 99: 331-339.
- [30] WANG D B, HU G H, WANG H T, et al. Effect of Mixed Starters on Proteolysis and Formation of Biogenic Amines in Dry Fermented Mutton Sausages [J]. Foods, 2021, 10(12): 2939.
- [31] ZHANG L, CHE Z M, XU W Z, et al. Dynamics of physicochemical factors and microbial communities during ripening fermentation of Pixian Doubanjiang, a typical condiment in Chinese cuisine [J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103342.
- [32] 谢艳华,陈力力,谢靓,等.不同菌种发酵对豆豉游离脂肪酸构成的影响[J].中国酿造,2017,36(3):80-84.

- [33] LAN L, WANG J, WANG S, et al. Correlation between microbial community succession and flavor substances during fermentation of Yongchuan Douchi [J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103192.
- [34] WANG C L, CUI D Z, LU L, et al. Cloning and characterization of CotA laccase from *Bacillus subtilis* WD23 decoloring dyes [J]. Annals of Microbiology, 2015, 66(1): 461-467.
- [35] WANG H P, LI M T, KONG B H, et al. Microorganism-derived biogenic amine degrading enzymes: mechanisms, molecular modifications, and applications in fermented foods [J]. Food Chemistry, 2025, 493: 146048.
- [36] SHAHZAD R, SHEHZAD A, BILAL S, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* RWL⁻¹ as a New Potential Strain for Augmenting Biochemical and Nutritional Composition of Fermented Soybean [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(10): 2346.
- [37] RICE-EVANS C, MILLER N, PAGANGA G. Antioxidant properties of phenolic compounds [J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(4): 152-159.
- [38] SCHMALHAUSEN E V, SHUMKOV M S, MURONETZ V I, et al. Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *M. tuberculosis* in *E. coli*. Purification and characteristics of the untagged recombinant enzyme [J]. Protein Expression and Purification, 2019, 157: 28-35.
- [39] BROSNAN J T, BROSNAN M E, BERTOLO R F P, et al. Methionine: A metabolically unique amino acid [J]. Livestock Science, 2007, 112(1): 2-7.
- [40] XIE C Z, ZENG H Y, WANG C X, et al. Volatile flavour components, microbiota and their correlations in different sufu, a Chinese fermented soybean food [J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 125(6): 1761-1773.
- [41] CHEN Q H, YANG X B, HONG P Z, et al. GC-MS, GC-IMS, and E-Nose Analysis of Volatile Aroma Compounds in Wet-Marinated Fermented Golden Pomfret Prepared Using Different Cooking Methods [J]. Foods, 2024, 13(3): 390.
- [42] LI J K, LIU Z C, ZHAO J, et al. Molecular insights into substrate promiscuity of CotA laccase catalyzing lignin-phenol derivatives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 256(2): 128487.
- [43] YI J, CHEN X T, WEN Z, et al. Improving the functionality of pea protein with laccase-catalyzed crosslinking mediated by chlorogenic acid [J]. Food Chemistry, 2024, 433: 137344.
- [44] DEL RIO B, FERNANDEZ M, REDRUELLO B, et al. New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines [J]. Food Chemistry, 2024, 435: 137558.
- [45] YANG P P, WANG Q, YANG Y R, et al. Effects of enhanced fermentation with high-yielding strains of Tetramethylpyrazine on flavor quality of Douchiba [J]. Food Chemistry: X, 2025, 25: 102037.
- [46] ADJONU R, PRENZLER P D, AYTUN J. The Performance of the Super-High-Oleic Acid Safflower (*Carthamus tinctorius*) Oil During Intermittent Frying [J]. Foods, 2025, 14(5): 729.
- [47] JIANG J J, SHI Q Q, LI X, et al. Biological Characteristics and Functional Analysis of the Linoleic Acid Synthase Gene ZjFAD2 in Jujube [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(20): 15479.
- [48] PAULS S D, RODWAY L A, WINTER T, et al. Anti-inflammatory effects of α -linolenic acid in M1-like macrophages are associated with enhanced production of oxylipins from α -linolenic and linoleic acid [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2018, 57: 121-129.
- [49] MITITELU M, LUPULIASA D, NEACȘU S M, et al. Polyunsaturated Fatty Acids and Human Health: A Key to Modern Nutritional Balance in Association with Polyphenolic Compounds from Food Sources [J]. Foods, 2024, 14(1): 46.
- [50] MOHD ALI M, HASHIM N, ABD AZIZ S, et al. Principles and recent advances in electronic nose for quality inspection of agricultural and food products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 1-10.
- [51] LIU Y, SONG H L, LUO H Z. Correlation between the key aroma compounds and gDNA copies of *Bacillus* during fermentation and maturation of natto [J]. Food Research International, 2018, 112: 175-183.
- [52] CHEN Q C, XU Y X, WU P, et al. Aroma impact compounds in Liuyang douchi, a Chinese traditional fermented soya bean product [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(9): 1823-1829.
- [53] KŁOSOWSKI G, MIKULSKI D, PIELECH-PRZYBYLSKA K. Pyrazines Biosynthesis by *Bacillus* Strains Isolated from Natto Fermented Soybean [J]. Biomolecules, 2021, 11(11): 1736.
- [54] VENKATARAMAN B, ALMARZOOQI S, RAJ V, et al. Molecular Docking Identifies 1,8-Cineole (Eucalyptol) as A Novel PPAR γ Agonist That Alleviates Colon Inflammation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(7): 6160.

- [55] FERRAZ C A, LEFERINK N G H, KOSOV I, et al. Isopentenol Utilization Pathway for the Production of Linalool in Escherichia coli Using an Improved Bacterial Linalool/Nerolidol Synthase [J]. Chembiochem, 2021, 22(13): 2325-2334.
- [56] LU Y, WANG Y, ZHAO G, et al. Identification of aroma compounds in Zhuhoujiang, a fermented soybean paste in Guangdong China [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 142: 111057.
- [57] YUAN C, LU Z F, JIN Z Y. Characterization of an inclusion complex of ethyl benzoate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. Food Chemistry, 2014, 152: 140-145.
- [58] ACHIRA H, WASHIYA H. Reduction of 2,6-dimethoxyphenol odor emitted from Ribbed Smoked Sheet by Co(II)-salen complex [J]. Air Quality, Atmosphere & Health, 2024, 17(9): 1997-2004.