

豆豉发酵常用毛霉和米曲霉菌株产生物胺能力的评价

张仁凤^{1,2,3}, 陈光静^{1,2,3}, 杨万明⁴, 黄远辉⁴, 成学东⁴, 曾凡玉⁵, 阚建全^{1,2,3*}

1(西南大学 食品科学学院, 重庆, 400715) 2(重庆市农产品加工及贮藏重点实验室, 重庆, 400715)

3(农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(重庆), 重庆, 400715) 4(重庆出入境检验检疫局永川办事处, 重庆, 400715)

5(永川豆豉食品有限公司, 重庆, 400715)

摘要 采用微生物学、高效液相色谱、分子生物学技术(PCR)和酶学技术,系统检测和评价了豆豉发酵中常用的6株毛霉和米曲霉菌株产生物胺的情况。研究表明,采用微生物学、高效液相色谱、分子生物学技术(PCR)和酶学4种评价方法所得评价结果基本一致,总状毛霉、雅致放射毛霉、五通桥毛霉、米曲霉2339、米曲霉41380、米曲霉40188这6株试验菌株均产生酪胺,雅致放射毛霉和3株米曲霉能产生色胺,3株米曲霉能产生腐胺,而仅总状毛霉具有组氨酸脱羧酶活性。霉菌代谢产生生物胺及产生生物胺的种类和含量无种属特异性,但有菌株个体特异性。

关键词 豆豉;生物胺;毛霉;米曲霉;氨基酸脱羧酶

生物胺是一类含氮低分子量有机化合物^[1],广泛存在于多类食品中,对人体细胞发挥正常生理功能起着重要作用,但摄入的浓度过高会对人体产生毒害作用,造成人体心血管和神经系统的损伤^[2]。其中,组胺毒性最大,酪胺次之^[3]。腐胺和尸胺虽然本身的毒性很低,但是它们的存在会使组胺和酪胺的毒性增强^[4]。豆豉是以黄豆或大豆为主要原料,利用曲霉、毛霉或者细菌制曲产生的复杂酶系,分解大豆中营养物质发酵而成的一种传统豆制品^[5],可以分为细菌型、米曲霉型、毛霉型和根霉型豆豉等^[6]。生物胺的形成通常需要满足以下3个条件^[7-8]:含游离氨基酸、存在产氨基酸脱羧酶的微生物和微生物生长的有利环境。豆豉发酵过程中微生物代谢产生的氨基酸脱羧酶能催化相应的游离氨基酸脱羧生成相应的生物胺。此外,游离氨基酸大量存在于豆豉中,所以控制豆豉中生物胺含量的关键在于控制豆豉发酵过程中能够产生生物胺的微生物的种类和数量。

本研究采用微生物学、高效液相色谱及分子生物学技术,同时结合测定菌株氨基酸脱羧酶活性,以评价发酵豆豉常用的6株霉菌产生物胺的情况,重点评

价其产组胺、酪胺和腐胺的能力。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

总状毛霉(*Mucor racemosus*)、雅致放射毛霉(*Actinomyces elegans*)、五通桥毛霉(*Mucor wutungkiao*)、米曲霉2339(沪酿3.042)(*Aspergillus oryzae* 2339)、米曲霉41380(*Aspergillus oryzae* 41380)、米曲霉40188(*Aspergillus oryzae* 40188)6株霉菌,购自中国工业微生物菌株保藏管理中心(CICC)。

1.2 培养基

麦芽浸粉肉汤(MEB)培养基(g/L):麦芽浸粉20,pH 6.9±0.2,121℃高压灭菌15 min。

麦芽浸粉琼脂(MEA)培养基(g/L):麦芽浸粉30,大豆蛋白胨3,琼脂15,蒸馏水,pH 5.6±0.2,121℃高压灭菌15 min。

液体生物胺检测培养基^[9](g/L):MEB培养基中添加5-磷酸吡多醛0.05,溴甲酚紫0.06,前体氨基酸(L-组氨酸、L-酪氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、L-色氨酸、L-精氨酸和L-苯丙氨酸)各1.0,pH 5.3,121℃高压灭菌15 min。

1.3 主要试剂

生物胺标准品:腐胺(≥98%)、尸胺(≥98%)、色胺(≥98%)、2-苯乙胺(≥98%)、精胺(≥98%)、亚精胺(≥98%)、组胺(≥99%)、酪胺(≥99%);5'-磷酸吡哆醛、苯甲酰氯(≥99%)、酪氨酸脱羧酶标准品,美国Sigma公司;甲醇(色谱纯),成都科龙化工试

第一作者:硕士研究生(阚建全教授为通讯作者,E-mail:gan-jq1965@163.com)。

基金项目:重庆市永川区科技计划项目(Ycstc,2015ac1015)“永川毛霉型豆豉中生物胺控制的关键技术研究与应用(2015)”资助;重庆市现代特色效益农业技术体系创新团队建设调味品产业技术体系项目(2017[7]号)

收稿日期:2017-05-05,改回日期:2017-06-06

剂厂;L-组氨酸、L-酪氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、L-色氨酸、L-精氨酸、L-苯丙氨酸(分析纯), BIOSHARP 公司;Tris、PEP 单环己胺盐(>98%), 生工生物工程(上海)股份有限公司;磷酸稀醇式丙酮酸(PEP)羧化酶(5 U/mg)、固紫 B(≥60%), 上海宝曼生物科技有限公司;总蛋白定量测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所;DNA 提取试剂盒, Omega 公司;2 × Tap master-mi, 天根生化科技有限公司;琼脂糖, Biowest Agarose。其他试剂均为分析纯。

1.4 主要仪器与设备

SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司;不锈钢手提式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业医疗设备厂;DHP-9272 型恒温培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司;Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司;5810 型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司;PGC-21D 型可调式氮吹仪, 北京中诺远东公司;UV-2450S(E)型紫外分光光度计, 日本岛津公司;温度梯度 PCR 仪、凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司;琼脂糖凝胶电泳装置, 北京东方仪器厂。

2 试验方法

2.1 菌种的活化

购买菌种为冻干管, 打管后用无菌滴管吸取 0.5 mL 左右 MEB 培养基于冻干管中溶解全部冻干菌粉, 然后将溶解后的菌悬液转移至盛有 4~5 mL MEB 培养基的试管中混匀, 并取 100 μL 转接到 MEA 培养基上。28 ℃ 静置培养 5~7 d, 连续传代 3 次, 进行活化。

2.2 试验菌株产胺能力的微生物学显色法

将活化后的试验菌株, 分别接种于装有一定量液体生物胺检测培养基的试管中进行检测, 做 3 组平行, 将不接种菌株的空白试管作为对照试验。28 ℃ 培养 5 d 后, 观察培养基颜色变化。

2.3 试验菌株产胺能力的 HPLC 测定法

2.3.1 生物胺标准曲线的绘制

准确称取腐胺、尸胺、色胺、2-苯乙胺、亚精胺、精胺、组胺和酪胺标准品各 50 mg 于 50 mL 的容量瓶中, 用 0.1 mol/L 的 HCl 定容, 制成标准储备液, 于 4 ℃ 保存备用。

分别吸取上述标准储备液, 用 0.1 mol/L 的 HCl 稀释, 配制成终质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、40、60 和 80 μg/mL 的混合标准溶液。然后按 2.3.2 进行柱前衍生处理并上机分析, 绘制出生物胺标准曲线。

2.3.2 生物胺测定的柱前衍生

吸取 2 mL 上述各浓度的生物胺混合标准溶液, 分别加入 2 mol/L NaOH 溶液 1 mL 和苯甲酰氯 10 μL, 旋涡振荡混匀后, 在 30 ℃ 下避光反应 40 min, 期间每 10 min 振荡混匀 1 次。反应完成后, 加入饱和 NaCl 溶液 2 mL 中断反应。然后加入无水乙醚 3 mL 进行萃取, 1 200 r/min 离心 10 min 后, 小心移取乙醚层于 10 mL 离心管中, 再重复萃取 1 次, 合并乙醚层。用氮吹仪 35 ℃ 下吹干, 最后用 1 mL 甲醇(色谱级)溶解, 过有机相 0.45 μm 滤膜后进行 HPLC 分析^[10]。

2.3.3 样品的预处理^[11]

将活化后的试验菌株接种于麦芽浸粉肉汤(MEB)培养基中培养 24 h 后, 吸取 1 mL 菌悬液加入 9 mL 添加了 0.1% 前体氨基酸(L-组氨酸、L-酪氨酸、L-赖氨酸、L-鸟氨酸、L-色氨酸、L-精氨酸和 L-苯丙氨酸)的 MEB 培养基中。28 ℃ 静置培养 5 d 后, 吸取培养液 2 mL, 加入 0.1 mol/L HCl 溶液 2 mL, 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 小心吸取上清液 2 mL 按照 2.3.2 中的方法进行衍生处理。

2.3.4 液相色谱分析条件

色谱柱: Agilent XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 和 B: 超纯水和甲醇;流速: 1.0 mL/min, 进样量: 20 μL, 紫外检测波长: 254 nm, 柱温: 30 ℃^[12-13]。进行梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

洗脱时间/min	0	5	10	15	20	21	26
流动相 A/%	40.0	40.0	30.0	25.0	20.0	40.0	40.0
流动相 B/%	60.0	60.0	70.0	75.0	80.0	60.0	60.0

2.4 试验菌株产胺能力的分子生物学检测法

2.4.1 试验菌株 DNA 的提取

按照 DNA 提取试剂盒(Omega Fungal DNA Kit)的操作要求分别提取试验菌株的 DNA, 分装后于 -20 ℃ 冰箱待用。

2.4.2 引物的设计与选择

目前, 用于扩增毛霉中氨基酸脱羧酶基因片段的特异性引物尚未有文献报道, 本试验选用了文献[14-20]中报道最多的 10 对用于扩增乳酸菌氨基酸脱羧酶片段的引物, 以及根据 NCBI 数据库中查出已报道的米曲霉中鸟氨酸和酪氨酸脱羧酶序列设计的 2 对引物 Tdc-F/Tdc-R 和 Odc-F/Odc-R, 它们分别可以特异扩增出组氨酸脱羧酶基因片段、酪氨

酸脱羧酶基因片断和鸟氨酸脱羧酶基因片断。本试验所用引物的设计与合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。引物序列及扩增片段长度见表2。

表2 试验所用引物
Table 2 Primers for test

目标基因	引物	序列(5'-3')	扩增片断长度/(bp)
hdc	JV16HC	AGATGGTATTGTTCTTATG	367
	JV17HC	AGACCATAACCCATAACCTTG	
	PHDC1	CCAAACACCAGCATCTTCA	497
	PHDC2	CCGTCCGGAACAAAGAAT	
	Zu-F	CCTTGATGGTATTGTTTGG	327
	Zu-R	ATTCTTTGGACCTTCTGC	
	CL1	CCWGGWAAWATWGGWAATGGWTA	150
	CL2	GAWGCWGTWGTTCATATTWATTGWC	
	CL1	CCWGGWAAWATWGGWAATGGWTA	447
	JV17HC	AGACCATAACCCATAACCTTG	
tdc	Pt3	TACACGTAGATGCTGCATATG	560
	Pt4	ATGGTIGACTATGTTTTAAAGAA	
	TDC-F	TGGYTNGTNCNCARACNAARCAYTA	825
	TDC-R	ACRTARTCNACCATRTTAAARTCNGG	
	TD2	ACATAGTCAACCATRTTGAA	1 100
	TD5	CAAAATGGAAGAAGAAGTAGG	
	Lao-F	CGGGCATAGTCTTGGAG	156
	Lao-R	GCCGCATAGACTTCTGGTTT	
	Tdc-F	GAATCGGTCCGAGCAATGTT	304
	Tdc-R	GAATCGGTCCGAGCAATGTT	
Odc	3	GTNTTYAAYGCNGAYAAACNTAYTTYGT	1 446
	16	TACRCARAATACTCCNGGNGRTANGG	
	Odc-F	ACGAAGTGCACACCTTGGAT	442
	Odc-R	AAGAACAGCCAGTCACCGAC	

2.4.3 PCR扩增氨基酸脱羧酶基因片段

①25 μ L 扩增体系:2 \times Tap mastermix 12.5 μ L, 引物(10 μ mol/L)各1 μ L,模板DNA 1 μ L,加双蒸水补足至25 μ L。充分混匀后,进行PCR扩增。

②PCR扩增条件^[17]:95 $^{\circ}$ C预变性,5 min;循环30次;95 $^{\circ}$ C变性,45s;50 $^{\circ}$ C退火,1 min;72 $^{\circ}$ C延伸,1 min;72 $^{\circ}$ C终延伸,10 min。最后将PCR扩增产物在1.4%琼脂糖凝胶上进行电泳验证。

2.4.4 PCR扩增产物的测序及同源性分析

将所得的PCR扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测定结果在NCBI的Blast进行同源性分析。

2.5 试验菌株氨基酸脱羧酶活力的测定

采用邓欢^[21]的一种快速定量检测氨基酸脱羧酶活力的比色方法测定,稍作如下修改。

2.5.1 氨基酸脱羧酶标准曲线的绘制

准确称取酪氨酸脱羧酶标准品,用匀浆介质(pH 7.4,0.01 mol/L Tris-HCl,0.000 1 mol/L EDTA-2Na,0.8% NaCl溶液,0.01 mol/L 蔗糖)配制成终浓度分别为0、0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007 U/ μ L的标准溶液备用。

吸取反应液450 μ L(pH 7.5,50 mmol/L Tris,2 mmol/L PEP单环己胺盐,10 mmol/L MgCl₂,1 U/mL 磷酸稀醇式丙酮酸羧化酶,5 mmol/L 酪氨酸,现配现用)于已编号的1.5 mL离心管中,对应加入上述不同浓度的酪氨酸脱羧酶标准溶液50 μ L,旋涡振荡混匀后,于37 $^{\circ}$ C下反应1 h,每隔10 min振荡混匀1次。反应完成后,加入显色液25 μ L(50 mg/mL 固紫B,1%吐温80溶液,以上所配溶液均采用无CO₂蒸馏水配置),旋涡振荡混匀。静置5 min后用光径1 cm的比色皿,蒸馏水调零,空白管用匀浆介质代替标准品,于520 nm处测定各管吸光值。以吸光值为纵坐标,以标准品酪氨酸脱羧酶活力单位(U)为横坐标,绘制标准曲线,获得线性方程: $y = 0.527 4x + 0.098 5$, $R^2 = 0.998 5$ 。

因本氨基酸脱羧酶活力测定的原理是通过捕捉氨基酸脱羧酶催化前体氨基酸脱羧形成胺而释放的CO₂显色,故不同种类的氨基酸脱羧酶的活力均可按上述线性方程来计算(同时做空白对照来排除试剂与样品造成的颜色误差,用绝对OD值进行计算)。

2.5.2 试验菌株样品的前处理

将试验菌丝放入干净的研钵中,在液氮条件下充分研磨至白色粉末后,立即转移至预冷的2 mL离心管中,加入适量预冷的无菌生理盐水。用超声波细胞粉碎机冰浴处理3 min,每超声3 s间隔7 s,功率为300 W。破碎液于4 $^{\circ}$ C、16 000 r/min离心15 min。最后小心移取上清液至预冷的无菌1.5 mL离心管中,置于冰上待测。

2.5.3 试验菌株样品的测定

将预处理后的菌丝样品按照2.5.1中的方法测定吸光值,代入所得标准曲线的线性方程中算出对应的氨基酸脱羧酶活力 $E_{\text{实际}}$ (U)。样品氨基酸脱羧酶比活力(U/mg pro) $E_{\text{样品}} = E_{\text{实际}} \times \text{稀释倍数} / \text{总蛋白浓度}$,其中样品的总蛋白浓度采用总蛋白定量测定试剂盒(考马斯亮蓝法)测定。

2.6 试验数据处理

做3组平行试验,数据采用Excel 2010与Vector

NTI 11 软件进行统计分析和处理,其中以 $p < 0.05$ 说明差异显著,采用 SPSS 两两比较进行显著性分析。

3 结果与分析

3.1 试验菌株产胺能力的微生物学法显色结果

利用液体生物胺检测培养基显色法,对 6 株试验菌株产生物胺的情况进行初步检测。由图 1 可以看出,相较于未接菌株的空白对照管,氨基酸脱羧酶阴性管表面有菌丝生长且培养基呈现黄色,因为其没有催化游离氨基酸脱羧产生碱性生物胺的能力,培养基酸碱度没有发生改变。而氨基酸脱羧酶阳性管同样有菌丝生长,其可以催化游离的前体氨基酸脱羧产生生物胺,使培养基偏碱性,而最终呈现紫红色或紫色。



图 1 液体生物胺检测培养基的检测结果

Fig. 1 Test result of liquid biogenic amine detection medium

微生物显色法检测结果见表 3。除五通桥毛霉外,其余 5 株试验霉菌均能够产生不同种类的生物胺,其中 5 株霉菌产生酪胺,4 株霉菌产生色胺,3 株霉菌产生腐胺,但只有 1 株霉菌(总状毛霉)具有组氨酸脱羧酶活性。但是,由于微生物学显色法自身存在一定的局限性,容易出现假阳性或假阴性结果,故需要进一步与其他方法结合验证。

表 3 试验菌株氨基酸脱羧酶活性的的培养基检测结果

Table 3 The activity of amino acid decarboxylase of test strains

菌株名称	腐胺	尸胺	色胺	2-苯乙胺	亚/精胺	组胺	酪胺
雅致放射毛霉	-	-	+	-	+	-	+
总状毛霉	-	-	-	-	+	+	+
五通桥毛霉	-	-	-	-	-	-	-
2339 米曲霉	+	-	+	-	-	-	+
41380 米曲霉	+	-	+	-	-	-	+
40188 米曲霉	+	-	+	-	-	-	+

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

3.2 试验菌株产生物胺能力的 HPLC 法测定结果

3.2.1 标准曲线的绘制

由图 2 可知,在液相图谱上各种生物胺的苯甲酰

氯衍生物分离效果较好,在 18 min 内 8 种生物胺苯甲酰氯衍生物全部出峰,速度较快。各生物胺的回归方程及相关系数,见表 4。结果表明,该 HPLC 法测定的 8 种生物胺标品,在 0.50 ~ 80.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好 ($R > 0.995$),说明用该方法来测定 8 种生物胺具有良好的可靠性。

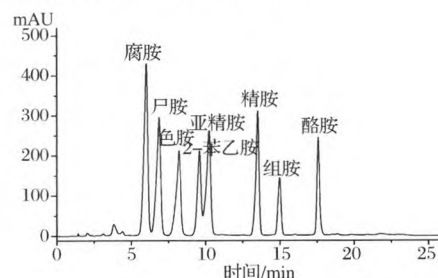


图 2 生物胺混合标准品溶液的液相色谱图

Fig. 2 Chromatogram of biogenic amines standards

表 4 标准曲线的线性方程与相关系数

Table 4 Regression equations and correlation coefficients

生物胺	回归方程	相关系数 R^2	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	保留时间/ min
腐胺	$y = 101.45x + 114.93$	0.997 4	0.50 ~ 80.0	6.018
尸胺	$y = 70.003x + 61.311$	0.998 5	0.50 ~ 80.0	6.875
色胺	$y = 52.319x + 139.9$	0.998 9	0.50 ~ 80.0	8.221
2-苯乙胺	$y = 51.88x + 43.724$	0.999 3	0.50 ~ 80.0	9.601
亚精胺	$y = 69.215x + 73.783$	0.996 1	0.50 ~ 80.0	10.249
精胺	$y = 72.624x + 45.621$	0.998 4	0.50 ~ 80.0	13.523
组胺	$y = 24.692x - 20.664$	0.997 3	0.50 ~ 80.0	14.990
酪胺	$y = 40.771x + 92.062$	0.997 9	0.50 ~ 80.0	17.592

3.2.2 HPLC 测定试验菌株培养液中生物胺含量的结果

由表 5 可知,6 株菌均产酪胺,含量在 1.19 ~ 6.57 $\mu\text{g/mL}$ 之间;3 株菌产腐胺、色胺和精胺,其含量分别在 1.02 ~ 3.57 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 ~ 23.91 $\mu\text{g/mL}$ 和 23.96 ~ 72.81 $\mu\text{g/mL}$ 之间;仅 1 株菌产组胺,含量为 1.42 $\mu\text{g/mL}$ 。与表 3 得出的结果大致相同。

3.3 试验菌株氨基酸脱羧酶活力的测定结果

由表 6 可以看出,6 株菌均具有酪氨酸脱羧酶活力,且活力大小在 1.45 ~ 6.34 U/mg(pro);4 株菌具有色氨酸脱羧酶活力,活力大小在 1.26 ~ 8.00 U/mg(pro);3 株菌具有鸟氨酸脱羧酶活力,活力大小在 1.35 ~ 6.37 U/mg(pro);仅有 1 株菌检测出具有组氨酸脱羧酶活力。结合表 5 各试验菌株的产生物胺能力大小可看出其对应氨基酸脱羧酶活力均与产各生物胺含量成正相关。

表5 试验菌株培养液中生物胺的 HPLC 测定结果

Table 5 The results of HPLC determination of biogenic amines in the culture medium of the test strain

菌株名称	生物胺质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)							
	腐胺	尸胺	色胺	2-苯乙胺	亚精胺	精胺	组胺	酪胺
雅致放射毛霉	ND	ND	23.91 ± 0.57^a	ND	ND	ND	ND	3.11 ± 0.16^b
总状毛霉	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.42 ± 0.63^a	1.20 ± 0.22^c
五通桥毛霉	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.41 ± 0.16^d
2339 米曲霉	1.02 ± 0.13^c	ND	ND	ND	ND	43.13 ± 0.97^b	ND	2.22 ± 0.38^c
41380 米曲霉	3.57 ± 0.68^a	ND	1.92 ± 0.31^b	ND	ND	23.96 ± 0.67^c	ND	6.57 ± 0.46^a
40188 米曲霉	2.46 ± 0.11^b	ND	0.60 ± 0.21^c	ND	ND	72.81 ± 0.93^a	ND	1.19 ± 0.31^c

注:ND 表示未检出,同一列相同字母表示差异不具有显著性($p > 0.05$)。

表6 试验菌株氨基酸脱羧酶活力的测定结果

Table 6 Test results of amino acid decarboxylase activity of test strains

菌株名称	氨基酸脱羧酶活力 / [$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{pro})$]					
	鸟氨酸脱羧酶	赖氨酸脱羧酶	色氨酸脱羧酶	苯丙氨酸脱羧酶	组氨酸脱羧酶	酪氨酸脱羧酶
雅致放射毛霉	—	—	8.00 ± 0.21^b	—	—	2.68 ± 0.10^c
总状毛霉	—	—	—	—	1.10 ± 0.21^a	1.45 ± 0.06^f
五通桥毛霉	—	—	—	—	—	2.06 ± 0.25^e
2339 米曲霉	1.35 ± 0.08^b	—	2.22 ± 0.42^c	—	—	4.65 ± 0.04^b
41380 米曲霉	6.37 ± 0.18^a	—	3.35 ± 0.12^a	—	—	6.34 ± 0.31^a
40188 米曲霉	3.73 ± 0.32^c	—	1.26 ± 0.47^d	—	—	2.54 ± 0.16^d

注:“—”表示未检测出氨基酸脱羧酶活力。

3.4 试验菌株产生物胺能力的分子生物学法检测结果

3.4.1 鸟氨酸、组氨酸和酪氨酸脱羧酶基因的 PCR 扩增结果

使用 12 对不同试验引物分别进行 PCR 扩增,结果表明:以 6 株试验菌株 DNA 为模板,以 Odc-F/Odc-R 和 Tdc-F/Tdc-R 为引物,检测到 3 株米曲霉均携带有鸟氨酸脱羧酶基因和酪氨酸脱羧酶基因。其 PCR 扩增条带的琼脂糖凝胶电泳图如图 3。

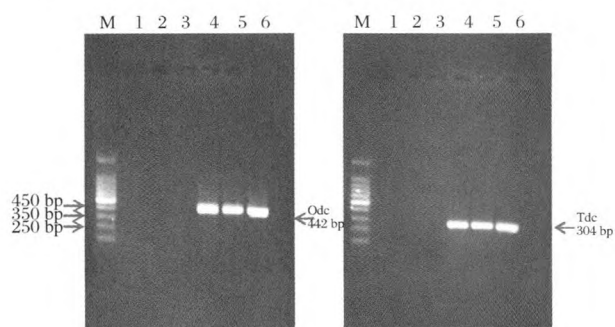


图3 PCR 法检测鸟氨酸脱羧酶和酪氨酸脱羧酶基因

Fig. 3 PCR detecting for ODC and TDC gene

可以看出扩增条带清晰,且与目标条带大小相符。而其他 10 对试验引物 PCR 均扩增不出相应的

目标条带,说明用于扩增乳酸菌和米曲霉中氨基酸脱羧酶基因片段的引物不适用于扩增霉菌中氨基酸脱羧酶基因片段,故毛霉中氨基酸脱羧酶基因序列还有待进一步研究。

3.4.2 鸟氨酸和酪氨酸脱羧酶基因序列同源性分析

将 3 株米曲霉鸟氨酸脱羧酶和酪氨酸脱羧酶的 PCR 扩增产物进行测序,测序结果在 NCBI 的 Blast 上进行同源性比对。分析结果表明 *Aspergillus oryzae* 2339, *Aspergillus oryzae* 41380, *Aspergillus oryzae* 40188 的 PCR 扩增序列均与 *Aspergillus oryzae* R1B40 的鸟氨酸脱羧酶基因和酪氨酸脱羧酶基因序列具有高度同源性(99%),可初步证明该 PCR 扩增产物分别是鸟氨酸脱羧酶基因片段和酪氨酸脱羧酶基因片段。

然后使用 Vector NTI 11 软件进行比对,黄色部分表示碱基完全一致,蓝色和空白区域表示个别碱基略有差异。由比对结果可明显看出,3 株试验米曲霉鸟氨酸脱羧酶和酪氨酸脱羧酶的 PCR 扩增产物测序结果与 NCBI 已报道的鸟氨酸脱羧酶和酪氨酸脱羧酶的序列具有高度同源性。由此可以证明采用 PCR 法扩增得到的基因序列确定为鸟氨酸脱羧酶基因序列和酪氨酸脱羧酶序列。

4 结论

结合微生物学、高效液相色谱(HPLC)、分子生物学技术(PCR)和酶学技术4种方法,检测出总状毛霉、雅致放射毛霉、五通桥毛霉、米曲霉2339、米曲霉41380、米曲霉40188这6株试验菌株均产生酪胺,雅致放射毛霉和3株米曲霉能产生色胺,3株米曲霉能产生腐胺,而仅总状毛霉具有组氨酸脱羧酶活性。可见,霉菌产生生物胺的种类和含量无种属特异性,但有菌株特异性,即同一种属不同菌株产生生物胺的能力各不相同,但还需要通过实际生产来进一步验证说明。

参 考 文 献

- [1] DE M E, DRABIKMARKIEWICZ G, DE M H, et al. Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. Food Chemistry, 2012, 130(4): 1 017 - 1 023.
- [2] 刘景, 任婧, 孙克杰. 食品中生物胺的安全性研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 322 - 326.
- [3] 李志军, 吴永宁, 薛长湖. 生物胺与食品安全[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(10): 84 - 91.
- [4] LONVAUD-FUNEL A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria[J]. Fems Microbiology Letters, 2001, 199(1): 9 - 13.
- [5] 蒋立文. 发酵豆豉的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 8(3): 1 803 - 1 809.
- [6] 卢露, 郑晓莹. 豆豉发酵中微生物及其功能研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2011, 18(1): 42 - 45.
- [7] KORAL S, TUFAN B, ŠČAVNIČAR A, et al. Investigation of the contents of biogenic amines and some food safety parameters of various commercially salted fish products[J]. Food Control, 2013, 32(2): 597 - 606.
- [8] R. Ertan Anlı, Mustafa Bayram. Biogenic amines in wines[J]. Food Reviews International, 2008, 25(1): 86 - 102.
- [9] 张凤杰, 王德良, 薛洁, 等. 黄酒酿造过程中优势细菌产生生物胺的检测与评价[J]. 酿酒科技, 2016(4): 17 - 20; 24.
- [10] LIU Zhen-feng, WEI Yun-xiao, ZHANG Jin-jie, et al. Changes in biogenic amines during the conventional production of stinky tofu[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(4): 687 - 694.
- [11] 钱茜茜, 吴燕燕, 魏涯等. 海鲈鱼腌制过程中产胺菌的分离筛选与生物学特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 70 - 75.
- [12] 胡鹏, 索化夷, 阚建全, 等. 中国传统发酵豆豉中生物胺含量[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 108 - 112.
- [13] 李志军. 食品中生物胺及其产生菌株检测方法研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007: 5 - 8.
- [14] LE J C, LONVAUD-FUNEL A, TEN B B, et al. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test[J]. Journal of Applied Microbiology, 1995, 78(3): 316 - 326.
- [15] ALVES R T, ATDOS S, MARTINS M F. Detection of histamine-producing bacteria using polymerase chain reaction and DNA probes[J]. European Food Research and Technology, 2002, 214(2): 178 - 180.
- [16] MARCOBAL A, DE I R B, MORENO-ARRIBAS M V, et al. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(4): 874 - 878.
- [17] 孟甜. 乳酸菌产生生物胺的鉴定及食品中生物胺的检测[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [18] COSTANTINI A, CERSOSIMO M, DEL P V, et al. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(2): 391 - 396.
- [19] COTON M, COTON E, LUCAS P, et al. Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of Carnobacterium divergens, 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria[J]. Food Microbiology, 2004, 21(2): 125 - 130.
- [20] MARCOBAL A, DE I R B, MORENO-ARRIBAS M V, et al. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83[J]. Fems Microbiology Letters, 2004, 239(2): 213 - 220.
- [21] 邓欢. 日粮蛋白水平对断奶仔猪肠道微生物氮代谢及其相关酶活性影响研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.

Evaluation of biogenic amines produced by *Mucor* and *Aspergillus oryzae* in Douchi fermentation process

ZHANG Ren-feng^{1,2,3}, CHEN Guang-jing^{1,2,3}, YANG Wan-ming⁴, HUANG Yuan-hui⁴,
CHENG Xue-dong⁴, ZENG Fan-yu⁵, KAN Jian-quan^{1,2,3*}

1 (College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

2 (Key Laboratory of Products Processing and Storage of Chongqing, Chongqing 400715, China)

3 (Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products on Storage and Preservation (Chongqing),
Ministry of Agriculture, Chongqing 400715, China)

4 (Chongqing Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau Yongchuan Office, Chongqing 400715, China)

5 (Yongchuan Douchi Food company limited, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT The change of biogenic amines content produced by 6 strains of *Mucor* and *Aspergillus oryzae* in Douchi fermentation process was analyzed using four methods including microbial method, high performance liquid chromatography (HPLC), molecular biology technology (PCR) and the enzyme technology. The results showed that similar results were obtained using these four methods. Six strains of *Mucor racemosus*, *Actinomucor elegans*, *Mucor wutungkiao*, *Aspergillus oryzae* 2339, *Aspergillus oryzae* 41380 and *Aspergillus oryzae* 40188 could produce tyramine. *Actinomucor elegans* and 3 strains of *Aspergillus oryzae* could produce tryptamine. Three strains of *Aspergillus oryzae* could produce putrescine. Only *Mucor racemosus* had histidine decarboxylase activity. Whether mold metabolism produced biogenic amines was not species-specific, but strains-specific.

Key words douchi; biogenic amines; *Mucor*; *Aspergillus oryzae*; amino acid decarboxylase