

新疆熏马肠中产氨基酸脱羧酶优势细菌的分离及鉴定

李蕊婷, 卢士玲, 李开雄, 马宇霞, 张惠超
(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要: 本研究从新疆熏马肠中分离鉴定得到 32 株产氨基酸脱羧酶的优势细菌, 并确定了各菌株的产胺能力。试验从新疆多产熏马肠的四个地区采集 44 个熏马肠样品, 利用双层培养基显色法初步分离其中的产胺优势菌。再采用 PCR-DGGE 技术, 剔除重复菌株并通过同源性比对, 确认 32 株产胺菌。最后利用高效液相色谱检测菌液产物, 验证其产生物胺的能力。此次研究中, 得到的菌株主要高产腐胺、色胺、组胺及苯乙胺, 其中 4 号菌株(气味沙雷氏菌, *Serratia odorifera*) 产生物胺总量(平均值)最高 985.14 $\mu\text{g/mL}$, 且组胺生成量最高 7259.64 $\mu\text{g/mL}$; 17 号菌株(阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 产生物胺总量(平均值)次高 737.78 $\mu\text{g/mL}$, 且色胺生成量最高 4507.81 $\mu\text{g/mL}$; 11 号菌株(克雷伯氏菌, *Klebsiella sp.*) 产腐胺量最高 2550.54 $\mu\text{g/mL}$; 8 号菌株(木糖葡萄球菌, *Staphylococcus xylosus*) 产苯乙胺量最高 3831.50 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词: 新疆熏马肠; 生物胺; 氨基酸脱羧酶; 高效液相色谱

文章编号: 1673-9078(2014)9-85-91

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.015

Separation and Identification of Dominant Bacterial Strains Producing Amino Acid Decarboxylase in Xinjiang Smoked Horsemeat Sausage

LI Rui-ting, LU Shi-ling, LI Kai-xiong, MA Yu-xia, ZHANG Hui-chao
(Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: In this study, 32 dominant bacterial strains producing amino acid decarboxylase were isolated from 44 samples of Xinjiang smoked horsemeat sausage, collected from four districts in Xinjiang where producing smoked horsemeat sausage. The ability of the isolates to produce biogenic amines was determined and dominant biogenic amine-producing strains were distinguished by a chromogenic reaction in double-layered media. Subsequently, polymerase chain reaction/denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was used to reject repetitive strains and 32 biogenic amine-producing strains were identified via homology comparison. Finally, high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to examine bacterial broth to confirm the production of biogenic amine. The strains thus obtained had strong ability to produce putrescine, tryptamine, histamine, and phenylethylamine. Strain number 4 (*Serratia odorifera*) showed the highest average production of total biogenic amines (985.14 $\mu\text{g/mL}$) and the highest production of histamine (7259.64 $\mu\text{g/mL}$). Strain number 17 (*Enterobacter cloacae*) showed the second-highest production of total biogenic amines (737.78 $\mu\text{g/mL}$) and the highest production of tryptamine (4507.81 $\mu\text{g/mL}$). Strain number 11 (*Klebsiella sp.*) showed the highest production of putrescine (2550.54 $\mu\text{g/mL}$), whereas Strain number 8 (*Staphylococcus xylosus*) showed the highest production of phenylethylamine (3831.50 $\mu\text{g/mL}$).

Key words: Xinjiang smoked horsemeat sausage; biogenic amines; amino acid decarboxylase; high-performance liquid chromatography

生物胺 (biogenic amines, Bas) 是世界范围内公认的对人体健康有影响的物质, 是一类含氮的脂肪族、

收稿日期: 2014-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360392); 国家自然科学基金资助项目 (31160329); 新疆生产建设兵团博士基金项目 (2013BB012)

作者简介: 李蕊婷 (1987-), 女, 在读硕士, 研究方向: 畜产品加工

通讯作者: 卢士玲 (1976-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向:

畜产品加工与质量安全; 李开雄 (1956-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究

方向: 畜产品加工

芳香族或杂环类有机化合物的总称。食品中的生物胺是世界范围内潜在的食品安全问题, 世界各地均有生物胺导致人类致病的报道。如果胺的正常代谢受阻, 在有抑制单胺氧化酶的药物、酒精和胃肠道疾病等增效因素存在情况下食用含生物胺量高的食品, 就会引发多种生理症状, 其中毒性最大的生物胺是组胺和酪胺, 除了它们本身的毒副作用, 其它生物胺的存在还会增加它们的毒副作用。如: 外部血管膨胀导致高血压和头痛, 以及肠道平滑肌的收缩造成腹部痉挛、腹

泻和呕吐等,严重的还会危及生命^[1]。

生物胺主要存在于蛋白质含量丰富的发酵食品中,食品中的BAs主要是由于游离氨基酸被微生物产生的脱羧酶脱羧形成^[2]。发酵肉制品中BAs含量已受到广泛关注,国外学研究认为BAs在发酵肉制品中普遍存在,特别是在发酵香肠中^[3]。据相关资料报道,新疆伊犁地区哈萨克族群众每年食用大量的熏马肠,其食管癌的发病率是全国平均水平的2.3倍,其中生物胺含量过高可能是引食管癌的一个重要原因;同时,生物胺的含量可以作为食品受污染程度及新鲜度的重要指标。本研究从新疆维吾尔自治区多产熏马肠的4个地区(昌吉、乌鲁木齐、石河子、伊犁)取样,采集44个样品,首先采用传统微生物方法结合双层显色培养基法初步分离产生物胺的细菌,再利用PCR-DGGE方法剔除重复菌种及测序比对得到32株产胺菌,最后应用高效液相色谱法检测菌液中生物胺含量,最终确定了新疆熏马肠中产生物胺优势细菌的种类及产量。

1 材料与试剂

1.1 材料

新疆维吾尔自治区采集的44个熏马肠样品,其中昌吉:编号1~20;乌鲁木齐:编号21~27;石河子:编号28~32;伊犁:编号33~44。

1.2 仪器

立式自动电热压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂 LDZX-40 型;超净工作台,上海博迅实业有限公司,洁净等级:100级;恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司 DNP-9272 型;掌上离心机(LX-100);小型离心机(Anke TLG-16G);扩增仪(TC-512 PCR,UK);DGGE电泳仪,美国Bio-Rad公司;凝胶成像仪(GelDoc 2000 system Bio-Rad,美国);高效液相色谱仪(Agilent Technologies 1200 series);色谱柱(Eclipse XDB-C18 4.6 mm×250 mm, 5 μm);超声波清洗器(KQ-250B型);移液枪(Eppendorf 2.5 μL、1~10 μL、20~200 μL、100~1000 μL);电子天平(BS2000S)。

1.3 试剂

微生物培养基:改良MSA(NaCl减少一半);VRBGA;MRS;产生物胺葡萄球菌及微球菌分离下层培养基;产生物胺肠道菌分离下层培养基;产生物胺乳酸菌分离下层培养基及产生物胺菌分离上层培养基^[4]。

PCR-DGGE试剂:细菌基因组DNA提取试剂盒,天根;PCR Mix预混液,东盛;Tris, Biotopped;Na₂EDTA·2H₂O, Sigma;去离子甲酰胺, Biotopped;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺, Sigma;过硫酸铵, Sigma;TEMED, SYBR Green I, 致善生物;TE, Sigma。

HPLC试剂:丹磺酰氯, Sigma;甲醇、乙腈为色谱纯,天津福晨化学试剂厂;氨水、高氯酸、氢氧化钠、碳酸氢钠等为分析纯,上海试剂有限公司;自制超纯水(Milli-Q), Millipore公司;生物胺标准品:色胺、酪胺、腐胺、苯乙胺、尸胺、组胺、精胺、亚精胺, Sigma。

2 试验方法

2.1 微生物法初筛菌种

2.1.1 优势菌的富集

将每个熏马肠样品在无菌条件下剪取20g,并在无菌条件下剪碎后装入盛有180 mL的灭菌生理盐水的三角瓶中,室温230 r/min摇床摇1 h,各取1 mL分别用改良MSA(NaCl减少一半)、VRBGA及MRS对葡萄球菌(及微球菌)、肠杆菌及乳酸菌,37℃条件下培养24 h。

2.1.2 产生物胺优势菌的分离

用双层显色培养基进行优势菌的分离,分别从富集培养液中取出1 mL培养液,逐级稀释后,涂布于对应的产胺菌下层分离培养基上,30℃培养72 h后,在无菌条件下,在下层培养基上倒一层对应的上层培养基(50℃)显色,并在5 min内记录实验结果,显紫色的为阳性,不变色的为阴性(黄色)。

2.1.3 目标菌种的保藏

从显色培养基上将紫色菌落挑出,在其对应的培养基上分离纯化5次,即得到纯菌。然后于4℃对应的斜面保藏,并用20%的甘油于-70℃保藏。

2.2 PCR-DGGE 剔除重复菌种

2.2.1 细菌总DNA的提取

取纯菌菌液5 mL,10000 r/min离心1 min,尽量吸净上清,然后按DNA提取试剂盒的步骤进行全基因组的提取。提取的细菌总DNA溶于100 μL的TE缓冲液。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后,-20℃冰箱保存待用。

2.2.2 PCR反应

扩增上游引物为U968-GC:5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC-3';下游引物为

L1401: 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3' (华大基因合成引物)。对细菌的 16SrDNA 的 V6-V8 区片段进行 PCR 扩增。

反应体系为 25 μ L 包含: 上下游引物各 0.5 μ L, 模板 1 μ L, PCR Mix 预混液 (东盛) 12.5 μ L, dd H₂O 10.5 μ L。

扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 35 个循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s), 最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2.3 DGGE (变性梯度凝胶电泳)

DGGE 采用 Bio-Rad 电泳仪, 使用聚丙烯酰胺凝胶的浓度为 8% (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺为 37.5:1), 变性梯度为 40%~60%, 配比如下:

低浓度胶 (40%): 100% 贮存液 9.6 mL+0% 贮存液 14.4 mL

高浓度胶 (60%): 100% 贮存液 14.4 mL+0% 贮存液 9.6 mL

在此基础上加入 20% 过硫酸铵 (APS) 50 μ L 和 5 μ L TEMED。

浓缩胶: 0% 贮存液 6 mL+20% APS 60 μ L+6 μ L TEMED。

在 1 \times TAE 缓冲液中, pH 为 7.4, 在点样孔中加入 PCR 产物, 200 V 预跑 10 min, 然后 85 V 电泳 16 h。

DGGE 电泳结束后, 将胶放入 SYBR Green I :TAE (1 \times) 为 1:10000 的染色液中, 脱色摇床放置 30 min 后, 用超纯水漂洗几次后, 用凝胶成像系统分析。

2.2.4 DNA 测序

将 DEEG 选定出的单一的各不相同的纯菌 DNA, 对其 16SrDNA V6-V8 区域片段的进行 PCR 扩增, 扩增上游引物为 U968: 5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'; 下游引物为 L1401: 5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3', 扩增程序同 2.2.2。后送华大基因测序。登陆 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 将所得序列与数据库中的已知序列进行相似性比对^[5]。

2.2.5 同源性比对

将比对后的基因用软件 MAGE 5 做系统发育树, 分析各菌株之间的亲缘关系。

2.3 HPLC 测定菌液中生物胺含量

2.3.1 生物胺标准溶液的配制与柱前衍生

准确称取色胺、酪胺、腐胺、苯乙胺、尸胺、组胺、精胺、亚精胺各 50 mg, 用 0.4 mol/L 的高氯酸定容至 50 mL, 并分别稀释成终浓度分别为: 0.5、1.0、2.5、5.0、10、20 μ g/mL 的混合标准溶液。取 1 mL 的

标准品混合溶液, 加入 200 μ L 2 mol/L NaOH 使之呈碱性, 再加入 300 μ L 饱和的 NaHCO₃ 溶液进行缓冲, 然后再加入 2 mL 的丹磺酰氯溶液 (Dns-Cl), Dns-Cl 溶液在 40 $^{\circ}$ C 下处于黑暗中反应 45 min 后加入 100 μ L 的 NH₄OH 终止反应, 去除残留的 Dns-Cl 溶液。加入乙腈使终体积为 5 mL。衍生处理后用 0.22 μ m 滤膜过滤, 用于分析检测。

2.3.2 样品的衍生化

将纯化好的菌株接入加 0.05% 的六种氨基酸 (色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸) 和 0.005% 磷酸吡哆醛的液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 12000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 1 mL 加入 0.4 mol/L 的高氯酸 1 mL 制备成菌液样品处理液备用。

取上述菌液样品处理液 1 mL 于 5 mL 容量瓶中, 加入 200 μ L 2 mol/L NaOH 使之呈碱性, 再加入 300 μ L 饱和的 NaHCO₃ 溶液进行缓冲, 然后再加入 2 mL 的 Dns-Cl 溶液, Dns-Cl 溶液在 40 $^{\circ}$ C 下处于黑暗中反应 45 min 后加入 100 μ L 的 NH₄OH 终止反应, 去除残留的 Dns-Cl 溶液。加入乙腈使终体积为 5 mL。衍生处理后用 0.22 μ m 滤膜过滤, 用于分析检测。

2.3.3 色谱条件

Agilent C18 柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈; 流速为 0.8 mL/min; 进样量为 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm。梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	35.0	65.0
5.0	25.0	75.0
20.0	0.0	100.0
24.0	0.0	100.0
25.0	35.0	65.0
30.0	35.0	65.0

2.3.4 数据处理方法

所有数据均用 Excel 建立数据库, 并用 SPSS 进行方差分析。

3 结果与分析

3.1 微生物试验初步分离的结果

在葡萄球菌 (及微球菌)、肠杆菌及乳酸菌的分离培养基上, 通过对这三大类微生物中产胺种的初步分离, 得到的菌株有: 葡萄球菌 (及微球菌) 111 株, 肠细菌 176 株, 乳酸菌 145 株, 共 432 株。

3.2 PCR-DGGE 剔除重复菌株

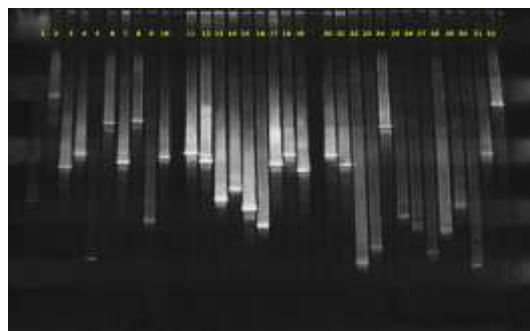


图1 新疆熏马肠中产氨基酸脱羧酶菌株的 PCR-DGGE 图谱

Fig.1 DGGE fingerprinting of PCR products of the amino acid decarboxylase productive strains in Xinjiang smoked horsemeat sausage

注：图中32组条带分别用1~32代表。

这 432 株菌株分别提取全 DNA 组，然后对细菌

表 2 通过 16SrDNA 序列鉴定产氨基酸脱羧酶优势菌

Table 2 Amino acid decarboxylase productive strains identified by means of 16S rDNA sequencing fragments

NO.	Closest relatives	菌名	Max ident/%	Accession no.
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	阴沟肠杆菌	99	KC887965
2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	表皮葡萄球菌	99	KC887966
3	<i>Serratia sp.</i>	沙雷氏菌	100	KC887967
4	<i>Serratia odorifera</i>	气味沙雷氏菌	99	KC887968
5	<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	99	KC887969
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	表皮葡萄球菌	100	KC887970
7	<i>Citrobacter freundii</i>	弗氏枸橼酸杆菌	99	KC887971
8	<i>Staphylococcus xylosus</i>	木糖葡萄球菌	100	KC887972
9	<i>Bacillus cereus</i>	蜡样芽孢杆菌	99	KC887973
10	<i>Serratia odorifera</i>	气味沙雷氏菌	99	KC887974
11	<i>Klebsiella sp.</i>	克雷伯氏菌	100	KC887975
12	<i>Serratia marcescens</i>	粘质沙雷氏菌	100	KC887976
13	<i>Enterobacter cloacae</i>	阴沟肠杆菌	99	KC887977
14	<i>Enterobacter sp.</i>	肠杆菌	99	KC887978
15	<i>Pantoea sp.</i>	成团泛菌	99	KC887979
16	<i>Pseudomonas sp.</i>	假单胞菌	100	KC887980
17	<i>Enterobacter cloacae</i>	阴沟肠杆菌	99	KC887981
18	<i>Rahnella sp.</i>	拉恩氏菌	100	KC887982
19	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	肠杆菌	99	KC887983
20	<i>Citrobacter sp.</i>	柠檬酸杆菌	100	KC887984
21	<i>Pantoea agglomerans</i>	成团泛菌	99	KC887985
22	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌	99	KC887986
23	<i>Enterococcus faecium</i>	屎肠球菌	99	KC887987
24	<i>Staphylococcus xylosus</i>	木糖葡萄球菌	100	KC887988
25	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	戊糖片球菌	99	KC887989

转下页

接上页

26	<i>Enterococcus durans</i>	粪肠球菌	99	KC887990
27	<i>Enterococcus faecium</i>	屎肠球菌	99	KC887991
28	<i>Weissella viridescens</i>	魏斯氏菌	99	KC887992
29	<i>Lactobacillus sakei</i>	清酒乳杆菌	99	KC887993
30	<i>Bacillus</i> sp.	芽孢杆菌	99	KC887994
31	<i>Citrobacter</i> sp.	柠檬酸杆菌	99	KC887995
32	<i>Staphylococcus</i> sp.	葡萄球菌	100	KC887996

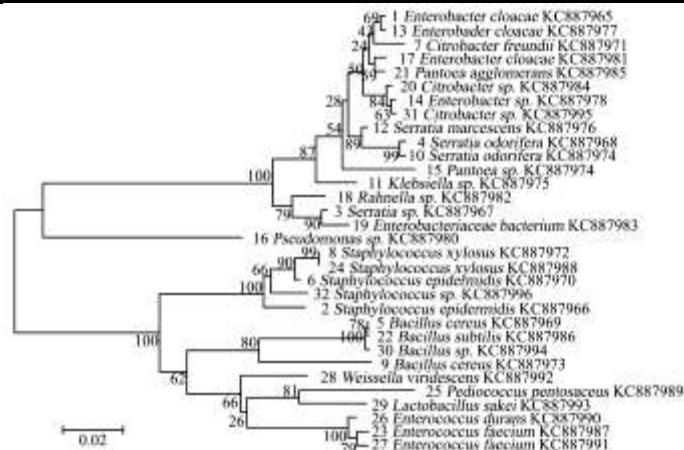


图2 系统发育树分析菌株之间的亲缘关系

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of genetic relationships between strains

3.3 HPLC 测定菌液中生物胺含量

3.3.3 菌液生物胺含量

3.3.1 标准曲线

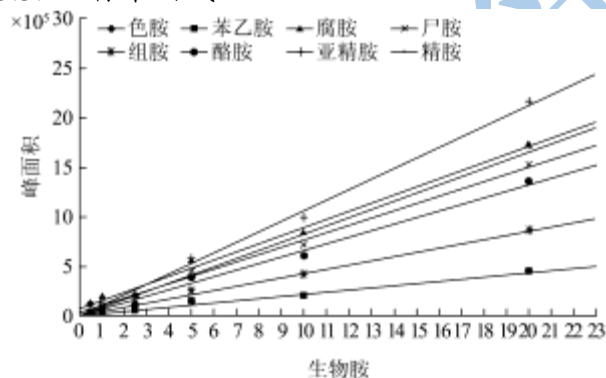


图3 不同生物胺含量的标准曲线

Fig.3 Standard curve of eight biogenic amines

将标准溶液依次从0.5、1.0、2.5、5.0、10、20 μg/mL 进样，以所得峰面积对相应的标准溶液浓度做标准曲线。从图3生物胺的标准曲线可以看出，8种生物胺的峰面积与其相应浓度分别呈良好的线性关系，相关系数均大于0.99。通过该方法可准确测出样品中生物胺的含量。

3.3.2 分离效果

从图4可以看出，8种BAs在25 min内得到有效分离，没有拖尾等现象且峰形对称，此洗脱程序可以满足检测要求。

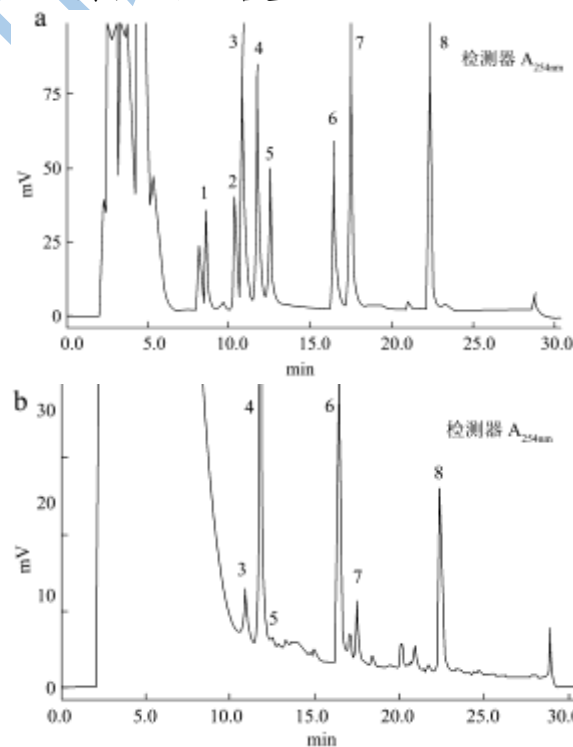


图4 生物胺 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC chromatographic profiles of the dns-cl chloride-derivatives of a biogenic amine standard solution (a) and biogenic amines in sample (b)

注：1-色胺 (TRY)，2-苯乙胺 (FHE)，3-腐胺 (PUT)，

4-尸胺 (CAD), 5-组胺 (HIS), 6-酪胺 (TYR), 7-亚精胺 (SPD), 8-精胺 (SPM)。

表3 熏马肠中产氨基酸脱羧酶菌种产生生物胺的含量 (μg/mL)

Table 3 The content of biogenic amines from amino acid decarboxylase productive strains in Xinjiang smoked horsemeat sausage

	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总胺含量
1	268.35	149.26	43.46	86.56	1986.03	146.93	26.75	77.92	348.16 ^{abcAB} ±666.19
2	100.45	-	-	12.71	71.72	48.53	58.65	64.12	44.52 ^{bcAB} ±36.73
3	199.03	26.51	42.64	77.45	220.24	84.01	88.22	112.69	106.35 ^{bcAB} ±69.38
4	184.49	103.3	22.81	23.13	7259.64	84.32	94.93	108.49	985.14 ^{aA} ±2535.8
5	198.69	145.23	756.92	307.21	73.79	49.58	50.99	67.09	206.19 ^{bcAB} ±239.87
6	109.5	33.7	0.18	19.3	14.11	20.52	26.84	37.84	32.75 ^{bcAB} ±33.15
7	-	83.74	1361.28	1226.86	1031.73	121.32	839.44	57.01	590.17 ^{abcAB} ±581.37
8	262.2	3831.5	422.27	72.63	195.05	28.77	83.87	48.22	618.06 ^{abcAB} ±1305.21
9	179.16	119.77	4.63	465.13	1186.62	35.14	40.12	24.6	256.90 ^{bcAB} ±404.68
10	124.11	11.85	2358.09	1132.73	201.15	-	92	44.19	495.51 ^a bcAB±840.56
11	70.7	1327.75	2550.54	100.73	60.04	93.25	61.96	22.62	535.95 ^{abcAB} ±925.98
12	78.28	209.45	1549.21	699.22	168.12	25.04	65.61	23.89	352.35 ^{abcAB} ±531.78
13	137.7	200.36	497.35	70.29	31.72	48.08	32.17	44.1	132.72 ^{bcAB} ±158.92
14	420.22	168.59	1248.07	180.88	178.97	108.19	178.42	28.54	313.99 ^{abcAB} ±393.35
15	118.21	1575.4	1898.97	8.94	22.56	19.93	10.89	20.92	459.48 ^{abcAB} ±794.13
16	748.11	218.21	1126.73	76.97	70.98	93.84	60.52	52.8	306.02 ^{abcAB} ±406.00
17	4507.81	391.37	664.17	66.14	66.03	106.11	54.77	45.85	737.78 ^{abAB} ±1539.26
18	1488.9	1104.96	1619.47	97.86	53.64	224.56	138.41	382.48	638.79 ^{abcAB} ±657.31
19	1250.55	272.57	1451.35	67.93	23.3	192	73.15	19.23	418.76 ^{abcAB} ±584.25
20	114.95	57.78	1611.08	890.52	843.21	27.89	90.85	48.07	460.54 ^{abcAB} ±589.27
21	542.44	125.57	5.15	16.38	-	992.36	19.65	16.59	214.77 ^{bcAB} ±363.86
22	5.28	32.81	-	0.94	10.4	48.21	24.67	77.24	24.94 ^{bcAB} ±27.08
23	1538.71	65.31	-	0.96	-	1269.39	10.9	10.71	362.00 ^{abcAB} ±647.54
24	361.45	45.67	-	4.68	5.87	11.49	10.36	17.83	57.17 ^{bcAB} ±123.75
25	-	7.24	-	1.12	-	12.97	10.39	12.79	5.56 ^{cB} ±5.93
26	1846.12	97.17	1.68	12.52	16.36	13.65	10.75	12.23	251.31 ^{bcAB} ±645.12
27	29.4	70.77	3.94	4.89	9.98	15.21	-	14.1	18.54 ^{cB} ±22.97
28	284.15	241.3	19.59	15.76	18.75	22.73	15.66	12.85	78.85 ^{bcAB} ±114.11
29	2160.54	-	-	9.86	-	-	37.51	-	275.99 ^{abcAB} ±761.58
30	13.01	-	-	3.45	-	9.94	-	12.06	4.81 ^{cB} ±5.86
31	-	-	-	6.13	24.56	-	-	12.09	5.35 ^{cB} ±8.93
32	94.07	-	-	17.9	16.77	-	10.3	21.08	20.02 ^{bcAB} ±31.16
各胺含量	544.89 ^{aAB} ±927.64	334.91 ^{abcABC} ±743.16	601.86 ^{aA} ±801.81	180.56 ^{bcABC} ±332.69	433.17 ^{abABC} ±1320.36	123.56 ^{bcBC} ±272.44	72.46 ^{cC} ±146.11	48.45 ^{cC} ±67.16	

注: 同列数据肩注小写字母不同表示差异显著 (P<0.05), 相同表示差异不显著 (P>0.05); 大写字母不同表示差异显著 (P<0.01), 相同表示差异不显著 (P>0.01)。

高效液相色谱法测定纯菌液中的生物胺的种类和含量, 如表3所示, 横向比对分析可见, 生物胺总含量 (平均值) 最高的前三位依次是4号菌株 (气味沙雷氏菌, *Serratia odorifera*) 985.14 μg/mL, 17号菌株 (阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 737.78 μg/mL,

18号菌株 (拉恩氏菌, *Rahnella sp.*) 638.79 μg/mL。纵向比对分析可见, 单种生物胺含量 (平均值) 最高的前三位依次是腐胺 601.86 μg/mL, 色胺 544.89 μg/mL, 组胺 433.17 μg/mL。其中17号菌株 (阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 色胺含量最高 4507.81

μg/mL, 8号菌株(木糖葡萄球菌, *Staphylococcus xylosus*) 苯乙胺含量最高 3831.50 μg/mL, 11号菌株(克雷伯氏菌, *Klebsiella sp.*) 腐胺含量最高 2550.54 μg/mL, 7号菌株(弗氏枸橼酸杆菌, *Citrobacter freundii*) 尸胺含量最高 1226.86 μg/mL, 4号菌株(气味沙雷氏菌, *Serratia odorifera*) 组胺含量最高 7259.64 μg/mL, 23号菌株(屎肠球菌, *Enterococcus faecium*) 酪胺含量最高 1269.39 μg/mL, 7号菌株(弗氏枸橼酸杆菌, *Citrobacter freundii*) 亚精胺含量最高 839.44 μg/mL, 18号菌株(拉恩氏菌, *Rahnella sp.*) 精胺含量最高 382.48 μg/mL。

4 讨论与结论

4.1 讨论

与发酵香肠中生物胺形成有关的细菌主要有肠杆菌、微球菌、乳酸菌、芽孢杆菌、假单胞菌、发光杆菌等中的一些种类及某些酵母菌^[6]。

Enterobacteriaceae 通常被认为是具有高脱羧酶活性的微生物,特别是被认为与尸胺、腐胺的生成有关。体外研究表明 *Citrobacter freundii* 和 *Porteus vulgaris* 是脱羧能力较弱的种属,而 *Enterobacter cloacae* 和 *Serratia* 等种属可产生大量的尸胺、腐胺^[7]。相反的,报道说 *C. freundii* 和 *Enterobacter aerogenes* 的菌株在体外分别会产生大量的尸胺、腐胺。许多 *Enterobacteriaceae* 也能产生相当数量的组胺^[8]。Rice 等人认为氨基酸脱羧酶活性在酸性环境下会增强^[9]。

组胺毒性较大,在调查的样品中组胺也是几种生物胺中主要的生物胺,这与国外的报道一致^[10-11]。虽然国际上对苯乙胺没有严格的限定,但是 3 mg 的苯乙胺就会让人产生偏头痛。表达组氨酸脱羧酶的乳酸杆菌 w53 可产生组胺,表达酪氨酸脱羧酶的短乳酸杆菌 ATCC367 能产生酪胺,而表达组氨酸、赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶的乳酸杆菌 30a 则能产生组胺、尸胺和腐胺^[12]。现已在乳酸杆菌、明串珠菌、片球菌等种属微生物中检测到编码氨基酸脱羧酶的基因,提示其能将氨基酸脱羧生成生物胺。但这种代谢能力并无种属特异性。选用不表达氨基酸脱羧酶的菌株作为发酵剂被认为是控制生物胺含量的最有效手段。Pessione 等^[13]对乳酸杆菌 30a 和 w53 的蛋白组分析表明,静止期组氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶表达上调,产生大量组胺和腐胺,而且高浓度氨基酸也能刺激氨基酸脱羧酶上调表达从而增加生物胺产量。

4.2 结论

在此次研究,从新疆四个地区采集的 44 个熏马肠样品中共分离出 32 株产氨基酸脱羧酶的菌株,它们产生物胺的种类和数量各不相同。综合来看,分离出的菌株主要高产(平均值)腐胺 601.86 μg/mL,色胺 544.89 μg/mL,组胺 433.17 μg/mL,苯乙胺 334.91 μg/mL。从产生物胺的总量(平均值)分析,前三位依次是 4 号菌株(气味沙雷氏菌, *Serratia odorifera*) 985.14 μg/mL, 17 号菌株(阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 737.78 μg/mL, 18 号菌株(拉恩氏菌, *Rahnella sp.*) 638.79 μg/mL。高产腐胺的菌株有 11 号菌株(克雷伯氏菌, *Klebsiella sp.*) 2550.54 μg/mL, 10 号菌株(气味沙雷氏菌, *Serratia odorifera*) 2358.09 μg/mL, 15 号菌株(成团泛菌, *Pantoea sp.*) 1898.97 μg/mL; 高产色胺的菌株有 17 号菌株(阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 4507.81 μg/mL, 29 号菌株(清酒乳杆菌, *Lactobacillus sakei*) 2160.54 μg/mL, 26 号菌株(粪肠球菌, *Enterococcus durans*) 1864.12 μg/mL; 高产组胺的菌株有 4 号菌株(气味沙雷氏菌, *Serratia odorifera*) 7259.64 μg/mL, 1 号菌株(阴沟肠杆菌, *Enterobacter cloacae*) 1986.03 μg/mL, 9 号菌株(蜡样芽孢杆菌, *Bacillus cereus*) 1186.62 μg/mL; 高产苯乙胺的菌株有 8 号菌株(木糖葡萄球菌, *Staphylococcus xylosus*) 3831.50 μg/mL, 15 号菌株(成团泛菌, *Pantoea sp.*) 1575.40 μg/mL, 11 号菌株(克雷伯氏菌, *Klebsiella sp.*) 1327.75 μg/mL。综上所述,从熏马肠分离出的产氨基酸脱羧酶的部分菌株能够高产一种到四种生物胺,为熏马肠及产生物胺的菌株研究提供理论依据。

参考文献

- [1] 李志军,吴永宁,薛长湖等.生物胺与食品安全[J].食品与发酵工业,2004,30(10):84-91
LI Zhi-jun, WU Yong-ning, XUE Chang-hu, et al. Effects of biogenic amines on food safety and human health [J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(10): 84-91
- [2] Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Research International, 1996, 29: 675-690
- [3] 张海萍,李开雄,卢士玲等.新疆熏马肠中生物胺含量的调查[J].食品与发酵工业,2012,38(11):152-156
ZHANG Hai-ping, LI Kai-xiong, LU Shi-ling, et al. An investigation on biogenic amines contents in Xinjiang smoked horse intestines [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(11): 152-156
- [4] Zouhaier Ben Belgacem, Hikmate Abriouel, Nabil Ben Omar, et al. Antimicrobial activity, safety aspects, and some

- technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal tunisian fermented meat [J]. Food Control, 2010, 21: 462-470
- [5] Lorenzo Favaro, Marina Basaglia, Sergio Casella, et al. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese [J]. Food Microbiology, 2014, 38: 228-239
- [6] 王焱,刘书亮.发酵香肠中生物胺的研究进展[J].肉类研究,2006,10:34-38
WANG Yi, LIU Shu-liang. The research progress of biogenic amines in fermented sausages [J]. Meat Research, 2006, 10: 34-38
- [7] Roig-Sagués A X, Hernández-Herrero, et al. Microbiological events during the elaboration of “fuet”, a spanish ripened sausage. relationship between the development of histidine and tyrosine decarboxilase containing bacteria and pH and water activity [J]. European Food Research and Technology, 2009, 12: 108-112
- [8] Giovanna Suzzi, Fausto Gardini. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 88: 41-54
- [9] Ganna Vashchenko, Mark R Bleackley. Oxidation of organic and biogenic amines by recombinant human hephaestin expressed in pichia pastoris [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 514: 50-56
- [10] G Landeta, J A Curiel, A V Carrascosa, et al. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from spanish dry cured meat products [J]. Meat Science, 2013, 93: 387-396
- [11] G Landeta, J A Curiel, A V Carrascosa, et al. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from spanish dry-cured sausages [J]. Meat Science, 2013, 95: 272-280
- [12] Lonvaud Funela. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 199(1): 9-13
- [13] Pessione E, Mazzoli R, Giuffrida M G, et al. A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria [J]. Proteomics, 2005, 5: 687-698