

接种生物胺降解菌对鱼露生物胺含量及品质的影响*

蓝翔¹, 朱翠翠¹, 何晓霞², 王海英¹, 徐莹^{1**}, 汪东风¹

(1.中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2.即墨海关, 山东 青岛 266200)

摘要: 将两株生物胺降解菌 *Millerozyma farinose* A3 和 *Enterococcus faecium* R7(简称降胺菌)接种到发酵鱼露中,探究接种 *M. farinose* A3、*E. faecium* R7 及两者复合菌对发酵鱼露生物胺含量及品质的影响。研究表明:接种降胺菌组鱼露生物胺含量显著低于对照组,且接种复合降胺菌鱼露生物胺含量最低($P<0.05$)。与对照组相比,接种降胺菌能降低发酵过程中鱼露的 pH,促进乳酸菌的生长同时抑制肠杆菌的生长($P<0.05$);抑制挥发性盐基氮的生成,抑制呈鱼腥味的三甲胺和庚醛的生成;促进乙酸乙酯等令人愉悦的风味物质的生成,促进游离氨基酸特别是必需氨基酸的生成。本研究中 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 能降低鱼露生物胺含量,提高食用安全性,同时还能提升鱼露的风味和营养,其有望成为鱼露的新型发酵剂。

关键词: 鱼露;生物胺降解菌;发酵剂;生物胺;品质

中图分类号: TS264.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2021)04-055-10

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20200044

引用格式: 蓝翔, 朱翠翠, 何晓霞, 等. 接种生物胺降解菌对鱼露生物胺含量及品质的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(4): 55-64.

LAN Xiang, ZHU Cui-Cui, HE Xiao-Xia, et al. Effects of inoculated biogenic amines degrading bacteria on biogenic amines concentration and quality of fish sauce[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(4): 55-64.

生物胺是一类低分子含氮有机化合物^[1],广泛存在于鲈鱼(*Scomber japonicus*)、沙丁鱼(*Sardine pilchardus*)等黑皮红肉海水鱼以及某些发酵食品中,如发酵肉香肠、奶酪、酱油和发酵酒等^[2-4]。其中最常见的生物胺有组胺、尸胺、腐胺、酪胺、色胺以及苯乙胺^[5]。生物胺作为生物体多种生化反应的有效介质,在维持正常的神经传递、免疫调节、控制细胞生长和造血功能等方面发挥重要作用^[6]。但是,摄入过量轻则导致头晕、头痛、高血压、心悸、呼吸系统疾病等症状,重则可能会晕厥甚至死亡^[7]。

鱼露又称鱼酱油,是我国沿海地区最常见的发酵鱼类产品之一,以其独特的风味和口感深受消费者喜爱^[8-9]。但传统的鱼露加工仍以自然发酵为主,很容易受外源有害微生物污染从而产生大量生物胺^[10]。降低鱼露中生物胺含量对于保障消费者健康具有重要的意义。研究表明在食品发酵过程中添加葡萄糖、亚硝酸盐、植物提取物等能减少生物胺的产生,气调、高压处理以及辐射也能减少生物胺的产生^[11-12]。但是这些方法会对食品的口感、风味和质构造等成不良影响,而且不能消除已经产生的生物胺^[13]。目前,学者发现并

筛选出多株有胺氧化酶活性的酵母菌和乳酸菌,具有降解生物胺能力,但在降解生物胺的种类和效率方面还不甚理想,如 *Bacillus amyloliquefaciens* FS05^[14] 只能降解 59.9% 组胺、26.4% 尸胺和 7.6% 酪胺, *Lactobacillus casei* 4a^[15] 只能降解 36.2% 组胺和 47.9% 酪胺。本实验室研究人员从发酵酱油中筛选到两株具有生物胺降解活性的菌株:酵母菌 *Millerozyma farinose* A3 和乳酸菌 *Enterococcus faecium* R7 具有同时降解组胺、尸胺、酪胺、腐胺、色胺和苯乙胺的能力,且在培养基条件下对上述 6 种生物胺的降解率均超过 60%。本研究将 *M. farinose* A3、*E. faecium* R7 及两者复合菌作为发酵剂接种在发酵鱼露中,探究它们对鱼露发酵过程中生物胺含量及鱼露品质的影响,为应用发酵剂控制发酵食品中生物胺含量,提高发酵食品品质提供参考。

1 材料与设备

1.1 材料

试验用传统发酵鱼露样品由山东省威海市某鱼露生产企业提供。试验所用菌株 *M. farinose* A3 和 *E.*

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31871786)资助

Supported by the National Science Foundation of China(31871786)

收稿日期:2020-02-15;修订日期:2020-04-24

作者简介:蓝翔(1994-),男,硕士生。E-mail:2533115807@qq.com

** 通讯作者:E-mail:xuy@ouc.edu.cn

faecium R7 由中国海洋大学食品科学与工程学院食品化学与营养研究室分离并保存。

1.2 试剂

组胺、尸胺、腐胺、酪胺、色胺以及苯乙胺标准品、丹磺酰氯,购于美国 Sigma 公司;色谱级甲醇、乙腈购于德国 Merck 公司;其余试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

YPD 培养基:10 g/L 葡萄糖,10 g/L 酵母浸粉,20 g/L 蛋白胨。

MRS 培养基:10 g/L 蛋白胨,10 g/L 牛肉膏,5 g/L 酵母膏,2 g/L 柠檬酸氢二铵,20 g/L 葡萄糖,1 mL/L 吐温 80,5 g/L 乙酸钠,2 g/L 磷酸氢二钾,0.85 g/L 硫酸镁,0.25 g/L 硫酸锰。

1.3 仪器

1260 Infinity II 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;CAPCELL PAK C-18 MG II 分离柱(5 μ m, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm),日本 Shiseido 公司;L-8900 氨基酸全自动分析仪,日本 Hitachi 公司;6890N/5973 气相质谱联用仪、HP-5MS 非极性毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m),美国 Agilent 公司;75 μ m CAR/PDMS 纤维萃取头,美国 Supelco 公司;Kjeltec 8400 型自动凯氏定氮仪,瑞典 FOSS 公司;UV-2550 型紫外分光光度计,苏州岛津仪器公司;PHSJ-3F 型酸度计,上海雷磁仪器公司。

2 方法

2.1 生物胺降解菌的制备

将-80℃冰箱中保存的 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 分别在 YPD 和 MRS 培养基中连续活化 2 次,在 4℃、5 000 r/min 条件下离心 10 min。弃去上清液,将沉淀的细胞团用 0.05 mol/L, pH 为 7.0 磷酸二氢钠和磷酸氢二钠缓冲液洗涤 2 次,然后重悬至菌悬液浓度为 10^7 CFU/mL。取等量上述浓度的 2 种菌悬液混合,制备 1:1 复合降胺菌。将 3 种降胺菌存放于 4℃冰箱备用。

2.2 添加生物胺降解菌的鱼露发酵过程

将盐含量为 19.2% 发酵 0 d 的鱼露分为 4 组($N=3$),每组鱼露质量为 500 g。A3 组:接种 *M. farinose* A3;R7 组:接种 *E. faecium* R7;复合组:接种复合降胺菌;对照组(Control):加入等量无菌水。在发酵 0 d 的时候接种降胺菌,每组接种量按照鱼露质量与发酵剂体积比为 5% 接种,混合均匀,在 30℃、60% 湿度条件下发酵。在发酵 0、5、10、20、40 和 80 d 时取样分析。

2.3 pH、挥发性盐基氮和氨基酸态氮含量的测定

pH 测定:取样品(10.0 g)于 100 mL 煮沸的蒸馏水中,在摇床中 200 r/min 振荡 30 min 后,然后 2 000

r/min 离心 10 min 得到上清液,用电子 pH 计测量上清液 pH;挥发性盐基氮(TVB-N)测定参考 Sun^[16] 前处理方法,使用全自动凯氏定氮仪测定,结果表示为 mg/100 g;氨基酸态氮(AAN)测定参考 GB5009.5-2016 中的测定方法,单位为 g/100 g。

2.4 微生物生物量测定

用平板计数法^[17]测定鱼露的微生物,取 10 g 鱼露置于 90 mL 无菌生理盐水中,制成连续 10 倍稀释液。总需氧微生物:PCA 固体培养基 37℃ 培养 48 h 计数;乳酸菌:MRS 固体培养基 30℃ 培养 48 h 计数;肠杆菌:VRBDA 培养基 37℃ 培养 48 h 计数。

2.5 风味物质含量的测定

鱼露挥发性风味物质测定参考王悦齐等^[18] 的方法,并做部分修改:取 5.00 g 鱼露样品置于 25 mL 顶空进样瓶中,加入 2 μ g 内标 TMP(三甲基吡啶),于 50℃ 条件下磁力搅拌 10 min,然后将 CAR/PDMS 纤维萃取头插入样品瓶,吸附 30 min,随后将萃取头插入 GC/MS 进样口 250℃ 解析 5 min。使用 HP-5MS 非极性毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m);GC/MS 参数设置:氦气为载气,流速为 1.0 mL/min;起始温度 40℃,以 5℃/min 程序升温至 150℃,保持 1 min 后,再以 6℃/min 程序升温至 230℃,保持 5 min;离子源温度为 200℃;电子能量为 70 eV;质量扫描范围为 35~350 m/z。挥发性物质绝对含量的分析参照王悦齐等^[18] 的方法。

2.6 游离氨基酸含量的测定

样品前处理:取鱼露样品 0.5 g,加入 5 mL 5% 的三氯乙酸溶液,用高速组织捣碎机匀浆后,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液于旋蒸仪上浓缩至干,用 0.02 mol/L 的盐酸定容至 10 mL,过 0.22 μ m 滤膜后供上机测定。测定:L-8900 氨基酸全自动分析仪进样,柱后茚三酮衍生,254 nm 紫外检测,含量表示为 mg/100 g。

2.7 生物胺含量的测定

生物胺测定采用高效液相丹磺酰氯柱前衍生紫外检测法测定,CAPCELL PAK C-18 MGII 型分离柱(5 μ m, 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm)。样品前处理以及高效液相参数设置参考于金芝等^[19] 方法,生物胺的单位为 mg/kg。

2.8 数据处理与统计分析

每组试验重复 3 次,分析结果采用平均值 $\pm$ 标准差表示,使用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析,置信区间为 95%($P<0.05$)。使用 Origin 9.0 软件作图。

3 结果

3.1 生物胺降解菌对鱼露微生物的影响

鱼露发酵过程中微生物的变化如表 1 所示,随着发酵时间的增加,对照组和试验组中总好氧微生物、乳

酸菌和肠杆菌数量均呈现增长趋势,且增长速度随发酵时间的延长而下降。试验组鱼露总好氧微生物数量在发酵 0~10 d 期间显著高于对照组($P<0.05$),但是随着发酵时间延长差异减小。R7 组和复合组在发酵 0~40 d 期间,乳酸菌数量显著高于 A3 组和对照组($P<0.05$),在发酵 10~40 d 期间,A3 组乳酸菌数量

显著高于对照组($P<0.05$),但是在发酵 80 d 时,试验组和对照组乳酸菌数量无显著差异($P>0.05$)。在发酵 0~5 d 时,试验组和对照组鱼露肠杆菌数量基本一致,在发酵 10 d 后,肠杆菌数量排序为:对照组>A3,R7>复合组,在发酵 80 d 时,复合组鱼露肠杆菌数量相比对照组减少了 43.54%。

表 1 鱼露发酵期间微生物变化
Table 1 The change of bacteria accounts of fish sauce during fermentation

发酵时间 Fermentation time/d		微生物计数 Bacteria accounts/cfu·g ⁻¹			
		对照组 Batch control	A3 组 Batch A3	R7 组 Batch R7	复合组 Batch mixture
乳酸菌 Lactic acid bacteria	0	2.12±0.09 ^c	2.15±0.04 ^c	4.85±0.11 ^a	3.68±0.09 ^b
	5	3.01±0.11 ^c	3.14±0.07 ^c	5.01±0.15 ^a	4.49±0.12 ^b
	10	4.55±0.12 ^d	5.66±0.15 ^c	7.13±0.09 ^a	6.88±0.21 ^b
	20	5.78±0.08 ^c	7.23±0.13 ^b	7.92±0.21 ^a	7.45±0.09 ^b
	40	7.23±0.15 ^c	7.64±0.11 ^b	8.36±0.23 ^a	7.88±0.14 ^b
	80	7.63±0.18 ^b	7.89±0.14 ^b	8.47±0.21 ^a	8.04±0.12 ^b
肠杆菌 Enterobacteria	0	1.17±0.05 ^a	1.16±0.02 ^a	1.26±0.04 ^a	1.18±0.04 ^a
	5	2.33±0.08 ^b	2.24±0.09 ^b	2.66±0.11 ^a	2.26±0.07 ^b
	10	3.25±0.09 ^a	2.94±0.11 ^b	2.98±0.08 ^b	2.51±0.09 ^c
	20	4.63±0.14 ^a	3.73±0.11 ^b	3.51±0.12 ^b	2.77±0.09 ^c
	40	4.99±0.13 ^a	3.53±0.14 ^b	3.43±0.09 ^b	2.80±0.11 ^c
	80	4.80±0.15 ^a	3.41±0.09 ^b	3.32±0.10 ^b	2.71±0.13 ^c
总好氧微生物 Total aerobic bacteria	0	2.47±0.05 ^c	5.34±0.13 ^b	5.87±0.14 ^a	5.27±0.16 ^b
	5	4.62±0.09 ^c	8.16±0.19 ^b	7.91±0.16 ^b	8.73±0.16 ^a
	10	8.24±0.21 ^b	9.01±0.25 ^a	8.74±0.22 ^b	9.46±0.31 ^a
	20	9.55±0.29 ^b	10.45±0.21 ^a	9.15±0.19 ^b	10.67±0.33 ^a
	40	9.93±0.34 ^c	10.80±0.15 ^b	10.02±0.27 ^c	11.33±0.19 ^a
	80	10.62±0.31 ^b	11.21±0.30 ^{ab}	10.98±0.15 ^b	11.56±0.31 ^a

注:对照组代表的鱼露,A3 组代表接种 *M. farinose* A3 的鱼露,R7 组代表接种 *E. faecium* R7 的鱼露,复合组代表接种复合降胺菌的鱼露,下表同。同一行的不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note:Batch control is fish sauce without starter culture, batch A3 is fish sauce inoculated with *M. farinose* A3, batch R7 is fish sauce inoculated with *E. faecium* R7, batch control is fish sauce inoculated with mixture of *M. farinose* A3 and *E. faecium* R7, and the following tables are the same meaning. Different letters in the same line show significant differences ($P<0.05$).

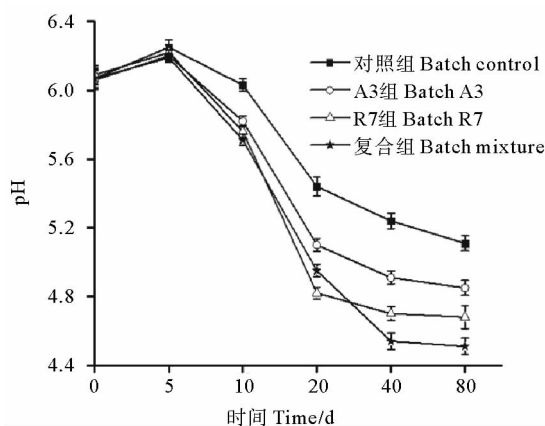
3.2 生物胺降解菌对鱼露 pH 的影响

鱼露发酵过程中试验组和对照组 pH 的变化如图 1 所示。试验组和对照组鱼露 pH 的变化趋势一致,即先上升随后逐渐下降。在发酵 10~80 d 期间,无论是接种 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 还是复合菌的鱼露,pH 都低于对照组。

3.3 生物胺降解菌对鱼露挥发性盐基氮和氨基酸态氮含量的影响

鱼露发酵过程中挥发性盐基氮含量变化如图

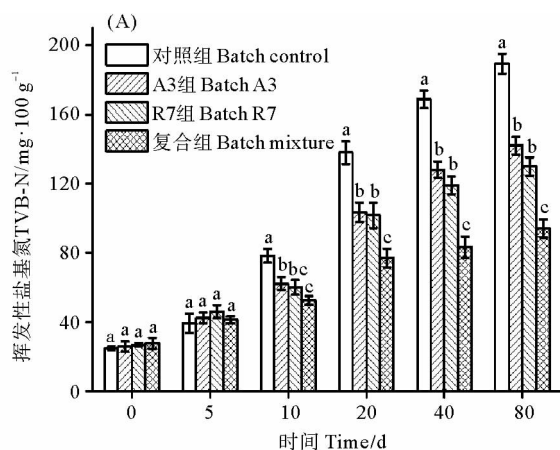
2(A)所示,从图 2 中可知鱼露发酵过程中 TVB-N 含量呈上升趋势,且 0~20 d 增长迅速,随后增长减缓。在发酵 10 d 后,试验组鱼露 TVB-N 含量显著低于对照组($P<0.05$)。在发酵 80 d 时,与对照组相比,A3 组 TVB-N 含量减少 25.06%,R7 组减少 31.35%,复合组减少 50.31%。氨基酸态氮含量的变化如图 2(B)所示,在发酵前 20 d,AAN 含量增长较快,之后趋于平缓。在 0~5 d,试验组和对照组鱼露 AAN 含量基本一致;在 10~40 d,A3、R7 和复合组鱼露 AAN 含量均显著



(对照组代表的鱼露, A3组代表接种 *M. farinose* A3 的鱼露, R7组代表接种 *E. faecium* R7 的鱼露, 复合组代表接种复合降解菌的鱼露, 下同。Batch control is fish sauce without starter culture, batch A3 is fish sauce inoculated with *M. farinose* A3, batch R7 is fish sauce inoculated with *E. faecium* R7, batch control is fish sauce inoculated with mixture of *M. farinose* A3 and *E. faecium* R7, and the following Figures are the same meaning.)

图1 鱼露发酵期间 pH 变化

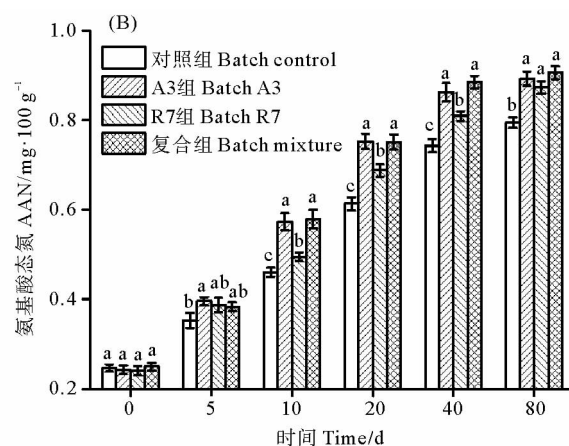
Fig.1 The change of pH of fish sauce during fermentation



高于对照组 ($P < 0.05$), 且 A3 和复合组高于 R7 组; 在发酵 80 d 时, 试验组鱼露 AAN 含量高于对照组, 但试验组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。

3.4 生物胺降解菌对鱼露生物胺含量的影响

鱼露发酵过程中, 试验组和对照组鱼露生物胺含量在 0~20 d 迅速增加, 随后增长减缓; 发酵鱼露生物胺含量高低依次为尸胺、酪胺、腐胺、组胺、色胺和苯乙胺 (见图 3)。从图 3(A) 可知, 试验组鱼露组胺含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 接种 *M. farinose* A3 和复合菌鱼露组胺在 40~80 d 期间含量下降, 在 80 d 时, 复合组鱼露组胺含量最低, 相比对照组下降了 54.75%。尸胺和腐胺可以作为食品卫生的指标, 而且它们的存在能加强组胺的毒性, 它们的含量变化如图 3(B) 和 3(C)。在发酵 10~80 d, 试验组鱼露尸胺和腐胺含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其中 A3 和 R7 组鱼露尸胺含量相似, 复合鱼露尸胺含量最低 ($P < 0.05$)。酪胺、色胺和苯乙胺含量的变化趋势与尸胺腐胺相似 (见图 3(D)、3(E) 和 3(F)), 在发酵 20~80 d 时, 对照组鱼露酪胺、色胺和苯乙胺含量显著高于试验



(同一时间不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters in the same time show significant differences ($P < 0.05$).)

图2 鱼露发酵期间 TVB-N(A) 和 AAN(B) 的变化

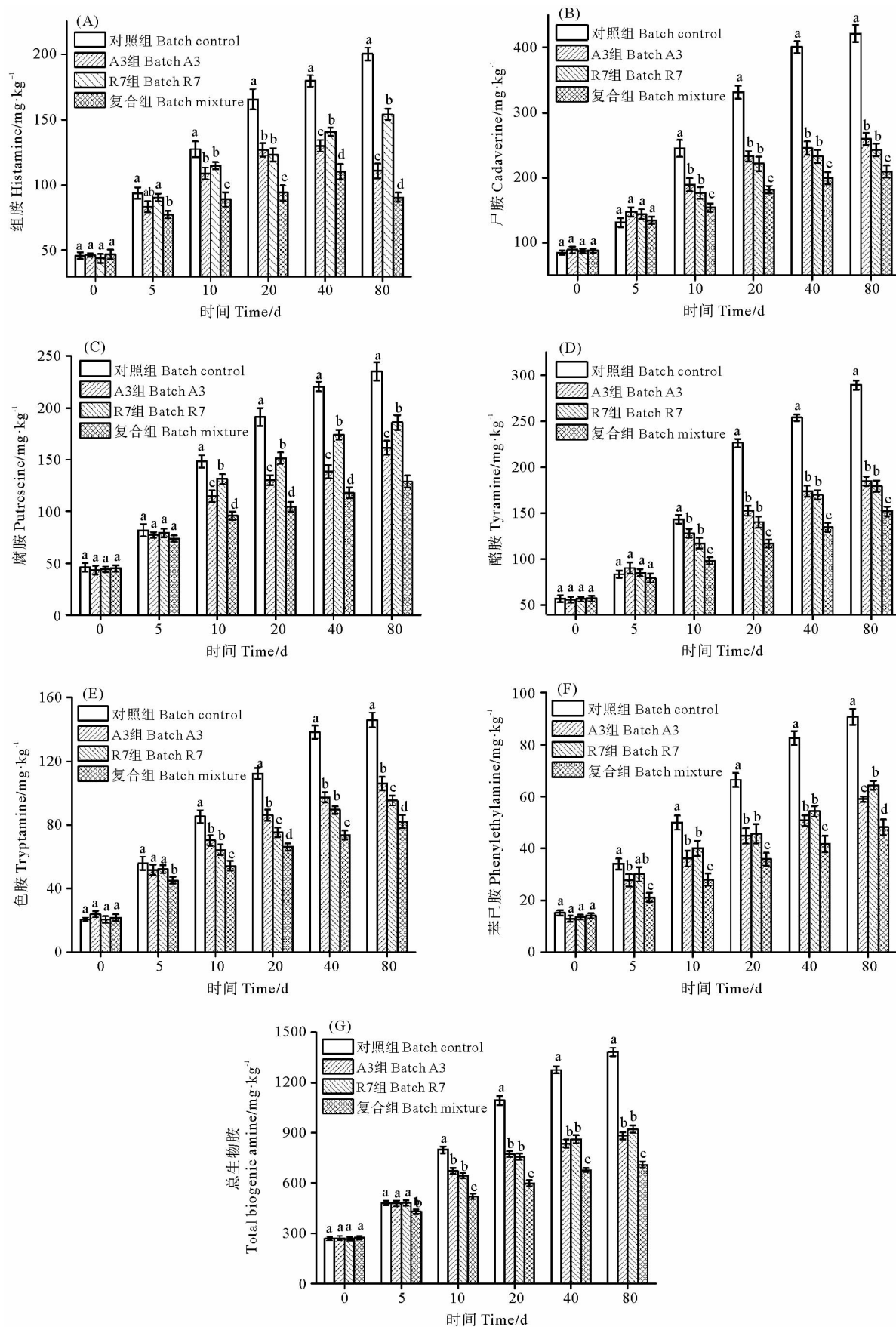
Fig.2 The change of TVB-N (A) and ANN (B) concentrations of fish sauce during fermentation

组 ($P < 0.05$)。从图 3 还可得知, *M. farinose* A3 对酪胺的抑制与 *E. faecium* R7 相似, 对苯乙胺的抑制效果优于 *E. faecium* R7, 对色胺的抑制效果低于 *E. faecium* R7, 复合菌对酪胺、色胺和苯乙胺的抑制效果最好。在发酵 80 d 时, *M. farinose* A3、*E. faecium* R7 以及复合菌对总生物胺的抑制率分别为 36.25%、33.37% 和 48.61%。

3.5 生物胺降解菌对鱼露挥发性风味成分含量的影响

根据王悦齐等^[18]的研究, 选定 11 种主体呈味化合物为对象, 在发酵 80 d 时测定含量, 结果见表 2。相比

于对照组, A3、R7 以及复合组三甲胺含量分别下降了 1.63、1.45 和 2.08 ng/g, 庚醛含量分别下降了 2.41、2.77 和 3.12 ng/g, 可以看出复合菌对三甲胺和庚醛的降低效果更显著 ($P < 0.05$); 在试验组鱼露中, 醛类物质 3-甲硫基丙醛、2-甲基丙醛、3-甲基丁醛、己醛和 2-辛烯醛的含量都高于对照组, 且在复合组中含量最高。但是, 对于醇类物质 1-辛烯-3-醇和 2-甲基-1-丁醇含量, 试验组略低于对照组; 乙酸乙酯在发酵鱼露中含量: 复合组 > R7 组 > A3 组 > 对照组, 复合组比对照组含量高 71.52%。



(同一时间不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。Different letters in the same time show significant differences ($P < 0.05$.)

图3 鱼露发酵期间生物胺的变化

Fig.3 The change of biogenic amine concentration of fish sauce during fermentation

表2 鱼露挥发性风味成分含量

Table 2 The volatile substance concentration of fish sauce

物质 Component	风味特征 Flavor characteristics	浓度 Concentration/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$			
		对照组 Batch control	A3 组 Batch A3	R7 组 Batch R7	复合组 Batch mixture
三甲胺 Trimethylamine	鱼腥味 Fishy smell	7.86 ± 0.07^a	6.23 ± 0.09^b	6.41 ± 0.11^b	5.78 ± 0.09^c
庚醛 Heptaldehyde	鱼腥味 Fishy smell	11.78 ± 0.15^a	9.37 ± 0.11^b	9.01 ± 0.09^c	8.66 ± 0.12^d
1-辛烯-3-醇 1-Octen-3-ol	蘑菇香味 Mushroom scent	49.67 ± 0.31^b	38.50 ± 0.24^c	55.41 ± 0.58^a	51.04 ± 0.49^b
3-甲硫基丙醛 3-methylthiopropional	土豆香味 Potato flavor	145.27 ± 1.21^c	162.61 ± 3.12^b	155.48 ± 2.09^b	173.58 ± 3.82^a
2-甲基-1-丁醇 2-methyl-1-butanol	麦芽香味 Malt fragrance	47.25 ± 1.01^a	40.33 ± 0.98^b	41.28 ± 1.68^b	41.90 ± 1.35^b
2-甲基丙醛 2-methylpropanal	麦芽香味 Malt fragrance	61.46 ± 2.09^c	77.49 ± 2.14^b	68.48 ± 2.54^c	90.75 ± 4.11^a
3-甲基丁醛 3-methylbutyraldehyde	麦芽香味 Malt fragrance	107.31 ± 3.84^c	121.89 ± 3.41^b	114.93 ± 2.95^{bc}	138.99 ± 4.08^a
己醛 Hexanal	青草味 Grassy	8.35 ± 0.12^d	10.42 ± 0.09^b	9.33 ± 0.11^c	13.68 ± 0.19^a
2-辛烯醛 2-octenal	青草味 Grassy	4.68 ± 0.05^c	5.82 ± 0.11^b	5.49 ± 0.13^b	6.21 ± 0.12^a
2-乙基呋喃 2-ethylfuran	青草味 Grassy	8.24 ± 0.09^d	10.33 ± 0.11^c	11.01 ± 0.15^b	13.35 ± 0.19^a
乙酸乙酯 Ethyl acetate	水果香味 Fruit fragrance	40.76 ± 1.88^c	52.41 ± 2.10^b	55.84 ± 2.46^b	69.91 ± 4.21^a

注:同一行不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same line show significant differences ($P < 0.05$).

3.6 生物胺降解菌对鱼露游离氨基酸含量的影响

经 80 d 发酵鱼露游离氨基酸含量如表 3 所示,从表 3 可以看出,试验组鱼露中除天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸以及酪氨酸含量略低于对照组外,其它氨基酸含量均高于对照组。对照组、A3 和 R7 组鱼露的鲜味氨基酸含量接近,复合组鲜味氨基酸含量最高;实验组和对对照组鱼露的甜味氨基酸含量接近;试验组鱼露的芳香味氨基酸含量均高于对照组,且复合组芳香味氨基酸含量最高。对照组、A3、R7 和复合组鱼露必需氨基酸含量分别为 1 037.55、1 159.99、1 224.13 和 1 332.63 mg/100 g,总氨基酸含量分别为 2 446.85、2 556.33、2 649.45 和 2 872.81 mg/100 g,均呈现复合组>A3,R7>对照组的规律。

4 讨论

乳酸菌在鱼露发酵过程中发挥重要作用,可以产生有机酸、活性肽等物质,与鱼露的风味和品质有密切的关系^[20]。肠杆菌数量是衡量鱼露生产过程中卫生程

度的重要指标,且肠杆菌具有氨基酸脱羧酶活性,能促进生物胺的产生^[20]。发酵初期由于环境营养物质丰富、适宜的 pH 和温度,所以微生物生长迅速。但随着发酵时间延长,由于微生物代谢产物积累、pH 降低等原因,部分微生物的生长会受到抑制。R7 组接种的降胺菌为乳酸菌,复合组接种降胺菌也含有乳酸菌,所以在发酵 0~10 d 期间,R7 组和复合组总好氧微生物和乳酸菌数量更多。A3 组接种的降胺菌为酵母菌,在发酵 10~40 d 时,乳酸菌数量明显高于对照组,这可能是由于 *M. farinose* A3 能促进乳酸菌的生长。但是在发酵 80 d 时,试验组和对对照组中总好氧微生物和乳酸菌数量基本一致,这与 Zhang 等^[21]报道的结果相似。接种 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 能抑制肠杆菌的生长,且复合降胺菌抑制作用更显著($P < 0.05$),这一现象可能是因为接种 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 促进了乳酸菌的生长,使 pH 快速下降从而抑制肠杆菌的生长^[20]。

表 3 鱼露游离氨基酸含量
Table 3 The free amino acids concentration of fish sauce

游离氨基酸 Free amino acids	浓度 Concentration/mg • 100 g ⁻¹			
	对照组 Batch control	A3 组 Batch A3	R7 组 Batch R7	复合组 Batch mixture
天门冬氨酸 ^a (Asp)	340.12±10.12 ^A	302.85±9.23 ^B	306.74±10.54 ^B	319.45±8.95 ^{AB}
苏氨酸 [*] (Thr)	160.34±6.78 ^C	141.15±5.92 ^D	216.78±8.14 ^B	240.16±7.09 ^A
丝氨酸 ^b (Ser)	173.88±1.07 ^C	200.19±1.44 ^B	208.13±1.58 ^B	244.92±2.01 ^A
谷氨酸 ^a (Glu)	208.91±1.37 ^C	254.75±2.05 ^A	238.94±0.99 ^B	265.92±1.03 ^A
甘氨酸 ^b (Gly)	218.45±3.14 ^A	169.45±2.79 ^C	187.45±2.64 ^B	179.31±2.93 ^{BC}
丙氨酸 ^b (Ala)	56.87±0.13 ^A	45.88±0.78 ^B	39.48±0.37 ^C	41.77±0.93 ^C
胱氨酸 (Cys)	104.88±1.05 ^C	134.82±1.34 ^B	133.47±1.94 ^B	150.91±2.61 ^A
缬氨酸 [*] (Val)	294.17±2.01 ^{AB}	286.45±2.34 ^B	306.90±1.92 ^A	300.91±4.07 ^A
甲硫氨酸 [*] (Met)	134.27±0.98 ^C	155.92±1.59 ^A	146.97±1.21 ^B	158.64±1.73 ^A
异亮氨酸 [*] (Ile)	83.88±1.14 ^D	101.92±0.97 ^C	118.92±1.27 ^B	130.91±1.06 ^A
亮氨酸 [*] (Leu)	130.90±0.92 ^C	150.95±1.06 ^{AB}	142.33±2.51 ^B	164.95±1.72 ^A
酪氨酸 ^c (Tyr)	88.22±0.61 ^A	62.75±0.66 ^C	73.82±0.57 ^B	69.95±0.91 ^{BC}
苯丙氨酸 ^{c,*} (Phe)	100.23±1.26 ^C	159.85±2.05 ^{AB}	145.34±1.39 ^B	170.12±1.73 ^A
组氨酸 (His)	158.93±2.04 ^B	151.25±2.18 ^B	157.13±1.39 ^B	177.46±1.76 ^A
赖氨酸 [*] (Lys)	133.76±1.07 ^C	163.75±0.91 ^{AB}	146.89±1.21 ^{BC}	166.94±0.99 ^A
精氨酸 (Arg)	59.04±0.78 ^D	74.40±0.91 ^C	80.16±0.82 ^{BC}	90.49±1.01 ^A
总计 (Total)	2 446.85±13.21 ^C	2 556.33±12.09 ^{BC}	2 649.45±10.37 ^B	2 872.81±13.98 ^A
鲜味氨基酸 Umami amino acid	549.03±6.14 ^B	557.60±5.27 ^{AB}	545.68±6.02 ^B	585.37±5.05 ^A
甜味氨基酸 Sweet amino acids	449.20±3.12 ^A	415.52±2.81 ^B	435.06±3.27 ^{AB}	466.00±2.98 ^A
芳香味氨基酸 Aromatic amino acid	188.45±2.01 ^B	222.60±1.75 ^A	219.16±2.21 ^A	240.07±1.98 ^A
总呈味氨基酸 Total taste amino acid	1 186.68±7.08 ^B	1 195.72±6.32 ^{AB}	1 199.90±7.21 ^{AB}	1 291.44±6.09 ^A
必需氨基酸 Essential amino acid	1 037.55±7.09 ^C	1 159.99±8.13 ^B	1 224.13±6.03 ^B	1 332.63±5.46 ^A

注: 标 a 为鲜味氨基酸, b 为甜味氨基酸, c 为芳香味氨基酸, * 为必须氨基酸; 同一行不同大写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: The a represent umami amino acid, the b represent sweet amino acids, the c represent aromatic amino acid, the * represent essential amino acid. Different capital letters on the same line show significant differences ($P<0.05$).

在发酵前 5 d, 鱼露 pH 升高可能是因为鱼肉蛋白在本身含有的蛋白酶及一些腐败菌分泌的蛋白酶作用下, 分解产生大量含氮的碱性化合物^[22]。随后乳酸菌和一些产酸菌快速生长, 代谢产生的乳酸、柠檬酸等有机酸增多, 使 pH 下降。结合上述微生物数量分析可知, 试验组 pH 下降快于对照组是因为接种 *E. faecium* R7 在鱼露发酵初期就增加了乳酸菌的数量, 而 *M. farinose* A3 又能促进乳酸菌的生长, 所以试验组乳酸菌生长速度快于对照组, 乳酸及其他酸类物质积累更

多, 导致 pH 下降更快^[20]。
挥发性盐基氮 (TVB-N) 是衡量水产品腐败变质程度的重要指标^[23]。鱼露发酵方式为自然发酵, 很容易受腐败微生物污染, 鱼肉蛋白质在自身溶解酶和微生物蛋白酶作用下生成氨基酸, 进而被腐败微生物利用生成 TVB-N, 所以 TVB-N 含量在 0~10 d 内快速升高^[24]。但是随着发酵的进行, 乳酸菌数量增多, 代谢产生的乳酸一定程度上抑制腐败菌的生长, 所以 TVB-N 含量在发酵 20~80 d 期间增长速度减缓^[4]。试验组

TVB-N 含量显低于对照组 ($P < 0.05$), 可能是接种的降胺菌能通过产生乳酸或者细菌素来抑制腐败菌的生长, 从而减少 TVB-N 的生成^[4]。本研究还发现复合菌抑制 TVB-N 产生的效果优于单一降胺菌, 说明 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 在抑制腐败微生物生长和 TVB-N 产生方面具有协同作用。氨基酸态氮 (AAN) 是衡量鱼露品质的重要指标^[25], 是由微生物内源性酶对蛋白质分解产生的。接种了降胺菌使酵母菌和乳酸菌更快的成为发酵过程中的优势菌, 它们快速生长分泌更多的蛋白水解酶, 同时能形成一个更低的 pH 环境, 有利于蛋白质的水解, 所以试验组鱼露 AAN 含量更高。蛋白质水解产生的氨基酸在发酵后期会发生复杂的生化反应生成风味物质^[26]。因此, 接种 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 能增加发酵鱼露 AAN 的含量, 进而可能提升鱼露风味。

结合发酵过程中微生物数量、pH 和生物胺含量变化, 推测试验组生物胺含量低于对照组可能原因在于: 发酵过程中, 一方面 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 能通过竞争性抑制, 降低发酵环境 pH 等方式抑制产胺菌如肠杆菌的生长以和脱羧酶活性, 从而减少生物胺的生成, Lee 等^[27] 在研究 *B. polymyxa* D05-1 作为咸鱼发酵剂时, 发现生物胺含量下降了 30.00%, 并证明此变化与 pH 下降有关; 另一方面, *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 具有胺氧化酶活性, 能降解发酵过程中产生的生物胺 (我们已有研究, 数据暂不提供)。接种 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 能抑制 6 种生物胺的生成, 且复合菌的效果更好, 表明 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 在发酵过程中抑制生物胺的生成方面具有协同效应。

三甲胺和庚醛产生与腐败菌有关, 是鱼腥味的主体成分^[28]。接种降胺菌能降低鱼露三甲胺和庚醛的含量, 可能是因为降胺菌在发酵过程中能抑制腐败菌的生长。醛类化合物是脂质氧化的降解产物, 通常具有青草味, 麦芽香味等令人愉悦的气味, 在试验组鱼露中, 3-甲硫基丙醛、2-甲基丙醛、3-甲基丁醛、己醛和 2-辛烯醛的含量都高于对照组, 品质越好的酱油醛类化合物含量越高^[18], 由此可见, 接种 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 可能有利于提升鱼露风味品质, 且复合菌效果更好。乙酸乙酯是鱼露中最主要的脂类, 具有令人愉悦的水果香味。接种降胺菌能促进乙酸乙酯的合成是因为, 降胺菌促进乳酸菌的生长, 鱼露酸类物质如乳酸、乙酸、柠檬酸等含量增加, 酸类物质和醇类发生酯化反应生成酯类。总的来说, 接种 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 能通过降低呈鱼腥味化合物的含量和增加令人愉悦化合物的含量来提高鱼露的风味品质, 且复合降胺菌的效果更好。

游离氨基酸含量特别是必需氨基酸含量在一定程度上能反应发酵食品的营养价值。试验组游离氨基酸含量高于对照组, 可能是接种的降胺菌尤其是复合降胺菌可能具有较高的蛋白酶活性^[21]。但试验组鱼露中天门冬氨酸、甘氨酸、丙氨酸以及酪氨酸含量略低于对照组, 这可能与接种的降胺菌会利用这些氨基酸进行代谢活动有关^[29]。组氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸和苯丙氨酸是组胺、尸胺、腐胺、色胺和苯乙胺的前体氨基酸, 然而, 结合表 3 和图 3 发现, 在接种发酵剂后的鱼露中, 前体氨基酸浓度升高, 但对应的生物胺含量并没有升高, 这可能是因为相比于前体氨基酸含量, 发酵过程中脱羧酶活性是生成生物胺更重要的因素^[21]。发酵鱼露的滋味也是评价鱼露质量的标准之一, 游离氨基酸中的天门冬氨酸和谷氨酸是鲜味特征氨基酸, 酪氨酸和苯丙氨酸是芳香味特征氨基酸, 甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸是甜味特征氨基酸, 食物中呈味氨基酸含量越高, 味道就越鲜美。从表 3 可得知, 接种 *M. farinose* A3 或 *E. faecium* R7 可以提高鱼露鲜味和芳香味氨基酸的含量, 降低甜味氨基酸含量, 但复合菌能促进这三类呈味氨基酸的生成, 能提升鱼露的滋味^[29]。氨基酸能发生多种化学反应, 生成一些风味物质, 如通过 Strecker 反应生成具有杏仁味的苯甲醛、与鱼露中的碳水化合物发生 Maillard 反应生成吡嗪和呋喃等物质, 这可能会对鱼露的整体风味和色泽有一定的影响^[29]。

5 结语

将 *M. farinose* A3 和 *E. faecium* R7 作为发酵剂接种在鱼露中, 能促进发酵鱼露 pH 的降低, 抑制肠杆菌的生长, 减少 TVB-N 的生成, 促进氨基酸态氮的生成, 并且在发酵过程中能抑制组胺、尸胺、腐胺、酪胺、色胺以及苯乙胺的生成, 提高了鱼露的食用安全性; 能有效抑制呈鱼腥味的三甲胺和庚醛的生成, 促进乙酸乙酯等令人愉悦的风味物质的产生, 提升鱼露的风味; 能促进游离氨基酸特别是必需氨基酸的生成, 提升鱼露的营养和滋味; 且复合菌的作用效果优于单一菌。*M. farinose* A3、*E. faecium* R7 二者的复合菌在发酵食品中具有有良好的应用潜力。

参考文献:

- [1] Halász A, Barath A, Simon-Sarkadi L, et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food[J]. Trends in Food Science & Technology, 1994, 5(2): 42-49.
- [2] Combarros-Fuertes P, Fernández D, Arenas R, et al. Biogenic amines in Zamorano cheese: Factors involved in their accumulation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(1): 295-305.
- [3] Guo Y Y, Yang Y P, Peng Q, et al. Biogenic amines in wine: A review[J]. International Journal of Food Science & Technology,

- 2015, 50(7): 1523-1532.
- [4] Hu Y J, Xia W S, Liu X Y. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures[J]. Food Chemistry, 2007, 104(1): 188-195.
- [5] Silva V L, Costa M P, Vieira C P, et al. Biogenic amine formation during fermentation in functional sheep milk yogurts[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(10): 8704-8709.
- [6] Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2007, 85(5): 1185-1196.
- [7] Colombo F M, Cattaneo P, Confalonieri E, et al. Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(7): 1131-1151.
- [8] Gao P, Xia W S, Li X Z, et al. Use of wine and dairy yeasts as single starter cultures for flavor compound modification in fish sauce fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2300.
- [9] 黄紫燕, 晁岱秀, 朱志伟, 等. 鱼露快速发酵工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(11): 1207-1211; 1218.
- Huang Z Y, Chao D X, Zhu Z W, et al. Technology of accelerated fermentation of fish sauce[J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(11): 1207-1211; 1218.
- [10] 姜维. 一株耐盐性高效生物胺降解新菌的筛选、分类鉴定及应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 20-30.
- Jiang W. Study on the Screening, Taxonomic Analysis and Application of One Novel, Salt-tolerant and High Efficient Biogenic Amines Degrading Bacterium[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014: 20-30.
- [11] LU Shiling, JI Hua, WANG Qingqing, et al. The effects of starter cultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages[J]. Food Control, 2015, 50: 869-875.
- [12] 肖洪, 丁晓雯, 梁蒨峪, 等. 发酵食品中的生物胺及其控制研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 346-350.
- Xiao H, Ding X W, Liang H Y, et al. Research progress in the biogenic amines and its control measures in fermented food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(20): 346-350.
- [13] Xu Y, Liu Y, Xu B H, et al. Characterisation and application of *Halomonas shantousis* SWA25, a halotolerant bacterium with multiple biogenic amine degradation activity[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2016, 33(4): 674-682.
- [14] Martuscelli M, Crudele M, Gardini F, et al. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 31(3): 228-232.
- [15] Herrero Fresno A, Martínez N, Sánchez Llana E, et al. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 157(2): 297-304.
- [16] Sun Q X, Sun F D, Zheng D M, et al. Complex starter culture combined with vacuum packaging reduces biogenic amine formation and delays the quality deterioration of dry sausage during storage[J]. Food Control, 2019, 100: 58-66.
- [17] Wang Y, Li F, Zhuang H, et al. Effects of plant polyphenols and α -tocopherol on lipid oxidation, microbiological characteristics, and biogenic amines formation in dry-cured bacons[J]. Journal of Food Science, 80(3): 547-555.
- [18] 王悦齐, 李春生, 李来好, 等. 基于 GC-MS 联用技术分析传统鱼露发酵过程中挥发性风味成分和脂肪酸组分变化[J]. 水产学报, 2018, 42(6): 984-995.
- Wang Y Q, Li C S, Li L H, et al. Analysis of volatile flavor components and fatty acids in fish sauces during fermentation by GC-MS[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(6): 984-995.
- [19] 于金芝, 徐峰, 徐莹. 高盐稀态酱油生产过程中的生物胺变化规律[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(10): 44-49.
- Yu J Z, Xu F, Xu Y. Analysis on the change rule of biogenic amines during the process of high-salt diluted soy sauce[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(10): 44-49.
- [20] Sun Q, Chen Q, Li F, et al. Biogenic amine inhibition and quality protection of Harbin dry sausages by inoculation with *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Control, 2016, 68: 358-366.
- [21] Zhang Q L, Lin S L, Nie X H. Reduction of biogenic amine accumulation in silver carp sausage by an amine-negative *Lactobacillus plantarum* [J]. Food Control, 2013, 32(2): 496-500.
- [22] Özyurt G, Kuley E, Özkütük S, et al. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice[J]. Food Chemistry, 2014, 114(4): 505-510.
- [23] 王晓君, 沈秋霞, 卢朝婷, 等. 南方大口鲶在微冻和冻藏条件下鲜度及品质的变化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 300-304; 311.
- Wang X J, Shen Q X, Lu C T, et al. Changes in the quality and freshness of *silurus meridionalis* chen under partial freezing and frozen conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(23): 300-304; 311.
- [24] Khanipour A A, Jorjani S, Soltani M. Chemical, sensory and microbial quality changes of breaded Kilka (*Clupeonella cultriventris*) with tempura batter in production stage and during frozen storage[J]. International Food Research Journal, 2014, 21(6): 2421-2430.
- [25] 徐云强, 孙卫青, 熊光权, 等. 低盐鲫鱼鱼露发酵过程中的氨基酸分析[J]. 中国调味品, 2018, 43(10): 85-90.
- Xu Y Q, Sun W Q, Xiong G Q, et al. Analysis of amino acid in fermentation process of low-salt crucian carp soy sauce[J]. China Condiment, 2018, 43(10): 85-90.
- [26] Kirimura J, Shimizu A, Kimizuka A, et al. Contribution of peptides and amino acids to the taste of foods[J]. International Food Research Journal, 1969, 17(4): 689-695.
- [27] Lee Y C, Kung H F, Huang C Y, et al. Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24(1): 157-163.
- [28] Fukami K, Ishiyama S, Yaguramaki H, et al. Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(19): 5412-5416.
- [29] Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou M. Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(11): 1556-1562.

Effects of Inoculated Biogenic Amines Degrading Bacteria on Biogenic Amines Concentration and Quality of Fish Sauce

LAN Xiang¹, ZHU Cui-Cui¹, HE Xiao-Xia², WANG Hai-Ying¹, XU Ying¹, WANG Dong-Feng¹

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Jimo Customs, Qingdao 266200, China)

Abstract: In this study, we aimed to evaluate the effects of two bacteria, *Millerozyma farinose* A3 and *Enterococcus faecium* R7, and their mixture as starter culture on the accumulation of biogenic amines and quality properties during the fish sauce fermentation. The results showed that the biogenic amines concentrations in the inoculated fish sauce are significantly lower than those of control. Especially, the mixture inoculated fish sauce had the lowest biogenic amines concentrations ($P < 0.05$). Comparing with the control, inoculation of *M. farinose* A3 and *E. faecium* R7 decreased the pH during fermentation, promoted the growth of lactic acid bacteria while inhibited the growth of Enterobacteriaceae ($P < 0.05$), decreased the concentration of total volatile base nitrogen, inhibited the production of trimethylamine and heptanal and promoted the production of ethyl acetate, and increased the concentrations of free amino acids, especially essential amino acids. These results indicated that *M. farinose* A3 and *E. faecium* R7 can be applied as potential starter cultures in fish sauce production to inhibit the accumulation of biogenic amines, enhance flavor and promote nutrition property.

Key words: fish sauce; biogenic amines degrading bacteria; starter culture; biogenic amine; quality

责任编辑 朱宝象