

doi:10.12301/spxb202300129

文章编号:2095-6002(2024)02-0131-11

引用格式:隋雨萌,王家旺,马子涵,等.东北自然发酵酸菜细菌多样性及其与生物胺的关系[J].食品科学技术学报,2024,42(2):131-141.



SUI Yumeng, WANG Jiawang, MA Zihan, et al. Bacterial diversity of naturally fermented Northeast sauerkraut and its relationship with biogenic amines[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024,42(2):131-141.

东北自然发酵酸菜细菌多样性及其与生物胺的关系

隋雨萌, 王家旺, 马子涵, 王慧平, 孔保华, 刘鑫, 任皓威*, 陈倩*
(东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:酸菜是我国东北地区独具特色的传统发酵食品。酸菜发酵过程中复杂的微生物代谢过程会产生潜在的危害物——生物胺。以东北不同地区自然发酵酸菜为对象,研究酸菜细菌多样性及其与生物胺的关系。研究表明,6个地区的酸菜样品总酸、亚硝酸盐、食盐、还原糖、游离氨基酸、生物胺含量,菌落总数及乳酸菌总数存在显著差异,其中菌落总数、乳酸菌总数及生物胺含量分别为5.11~5.81 lg(CFU/g)、4.09~5.12 lg(CFU/g)、59.22~131.34 mg/kg。采用高通量测序分析技术对东北自然发酵酸菜样品中细菌群落结构组成进行对比分析。结果表明,酸菜样品中的优势细菌属主要包括乳杆菌属和节杆菌属。Spearman相关性分析表明,在相对丰度排名前10位的细菌属中,不溶螺杆菌属与尸胺含量呈显著正相关($P < 0.05$),与组胺含量呈极显著负相关($P < 0.01$);弓形杆菌属与精胺含量呈显著负相关($P < 0.05$);丛毛单胞菌属与亚精胺含量呈显著正相关($P < 0.05$);小球菌属与酪胺含量呈极显著正相关($P < 0.01$);不溶螺杆菌属和节杆菌属与酪胺含量呈显著负相关($P < 0.05$);普雷沃氏菌属与精胺含量呈极显著负相关($P < 0.01$)。因此,在后续研究中可以通过分离纯化与生物胺呈负相关的菌株作为功能性发酵剂,抑制发酵蔬菜中生物胺的产生及积累。研究旨在为了解生物胺形成规律及机制,有效控制酸菜生物胺生成,提升自然发酵酸菜品质及安全性提供理论依据。

关键词:东北酸菜;细菌多样性;化学成分;生物胺;相关性分析

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

东北酸菜是一种传统发酵蔬菜制品,因其独特的风味和质地在我国东北地区深受欢迎。东北酸菜是将大白菜去除外层坏叶后洗净,浸泡在盐水(质量分数1.0%~1.5%)中,然后置于10~20℃自然发酵30~55 d制成的。在整个发酵过程中,乳杆菌属(*Lactobacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、片球菌属(*Pediococcus*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)是主要的优势菌,其中乳杆菌在整个发酵过程中占主导地位,在促进独特发酵风味形成的同时能够产酸抑制

大多数腐败菌生长^[1]。随着发酵的进行,酸菜体系中有机酸不断积累,其中的微生物为抵御酸环境胁迫,产生相应的碱性物质(生物胺等)改变环境pH值,以维持自身的生长繁殖。

生物胺是一类具有生物活性的低分子含氮化合物,主要由氨基酸脱羧或醛酮的转氨作用形成,过量摄入会产生恶心、过敏和心率过快等症状。生物胺根据氮含量多少,可分为单胺(组胺、酪胺和色胺)、二胺(尸胺和腐胺)和多胺(精胺和亚精胺)。发酵蔬菜中常见

收稿日期:2023-03-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(U22A20547)。

Foundation: National Natural Science Foundation of China(U22A20547)。

第一作者:隋雨萌,女,硕士研究生,研究方向为微生物发酵。

*通信作者:任皓威,男,助理研究员,博士,主要从事食品加工方面的研究;

陈倩,女,教授,博士,主要从事畜产品加工和微生物发酵方面的研究。

的生物胺包括腐胺、组胺、尸胺和酪胺,总质量比在 40~1 200 mg/kg^[2],这些生物胺主要是由微生物分泌的脱羧酶催化游离氨基酸脱羧形成^[3]。乳球菌(*Lactococcus lactis*)、假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)是发酵酸菜中主要产胺微生物^[4]。通常摄入少量的生物胺不会影响人体健康,但是摄入高浓度生物胺会导致高血压、头痛、心悸和呕吐,严重时会引起人体中毒。目前关于发酵蔬菜中生物胺的限量没有明确规定。因此,研究发酵酸菜中生物胺种类和含量对于科学控制生物胺具有一定的指导作用。

由于东北酸菜发酵的地域性和季节性,不同的加工环境、发酵环境和原材料均会导致酸菜中微生物和代谢产物的差异。然而,对东北自然发酵酸菜的细菌群落结构、生物胺种类和含量的研究相对较

少,它们之间的相关性尚未得到进一步研究。因此,本研究拟以东北地区自然发酵酸菜为研究对象,测定不同地区酸菜样品的总酸、亚硝酸盐、食盐、还原糖、游离氨基酸含量;同时,采用高效液相色谱法测定酸菜样品中生物胺含量,采用高通量测序技术分析酸菜中细菌多样性,并分析相关性,以期为自然发酵酸菜的绿色安全生产及品质提升提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸菜样品采自黑龙江省大兴安岭地区、齐齐哈尔市、哈尔滨市、鸡西市、鹤岗市和伊春市 6 个地区,每个地区同一农户采集 2 颗自然发酵成熟的酸菜样品,采样时间为 2021 年 10~11 月,样品采集信息见表 1。

表 1 东北酸菜样品信息

Tab. 1 Information of Northeast sauerkraut samples

样品名称	取样地点	生产条件		
		发酵时间/d	发酵温度/℃	w(食盐)/%
DXAL	大兴安岭地区加格达奇区	30	12	2.0
QQHR	齐齐哈尔市建华区	40	17	2.0
HRB	哈尔滨市南岗区	40	18	1.5
JX	鸡西市鸡东县	40	16	1.8
HG	鹤岗市向阳区	30	14	1.0
YC	伊春市伊美区	40	18	1.5

亚硝酸盐、还原糖含量检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;9种生物胺混合标准品,上海安谱实验科技股份有限公司;乙腈(质量分数 99.8%)、盐酸(质量分数 37.0%)、氢氧化钠(质量分数 96.0%)、乙酸(质量分数 99.8%)、乙酸铵(质量分数 99.8%),天津天力化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

T6 型可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司; iCE3500 型原子吸收分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 1260 II Prime 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酸菜样品的采集

酸菜的制作工艺大体相似,主要分为 4 步: 1) 白菜的晾晒和修整; 2) 白菜的清洗; 3) 将白菜浸入盛有盐水(质量分数 1.0%~2.0%)的发酵缸; 4) 于 15~18℃条件下发酵(大棵白菜腌渍 40 d, 小棵白菜腌渍 30 d)。将发酵后的酸菜样品及腌渍液

装入无菌采样袋后密封,然后放入装有干冰的保温箱中,运送至东北农业大学食品学院畜产品加工实验室,于 -20℃ 冷冻贮藏备用。实验时剥去第 1 层酸菜样品,使用第 2、3 层样品。

1.3.2 酸菜样品中化学成分的测定

根据 GB 12456—2021^[5] 测定酸菜样品中总酸的含量(以乳酸计);根据 GB 5009.91—2017^[6] 测定酸菜样品中盐含量;采用亚硝酸盐检测试剂盒和还原糖检测试剂盒测定酸菜样品中亚硝酸盐和还原糖的含量。

1.3.3 酸菜样品中生物胺的测定

参考文献[7]并稍加修改,测定酸菜样品中生物胺含量。采用二元梯度洗脱法,流动相 A 为 100 mL 含体积分数 1% 乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液加入 900 mL 乙腈,流动相 B 为 900 mL 含体积分数 1% 乙酸的 0.01 mol/L 乙酸铵溶液加入 100 mL 乙腈。洗脱程序为 0~26 min, 75% 流动相 A, 25% 流动相 B; 27~30 min, 85% 流动相 A, 15%

流动相 B;31 ~ 40 min,100% 流动相 A。检测波长 254 nm。

1.3.4 酸菜样品中氨基酸的测定

参考 GB/T 30987—2020^[8]并稍加修改,测定酸菜样品中氨基酸含量。采用二元梯度洗脱法,色谱柱 5 μm \times 4.6 mm \times 250 mm。0.1 mol/L 醋酸钠溶液 (pH 值为 6.50) 乙腈溶液 (体积比 93:7) 为流动相 A,乙腈水溶液 (体积比 80:20) 为流动相 B。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,流速 0.8 mL/min,进样量 20 μL 。检测波长 254 nm。

1.3.5 酸菜样品中微生物的测定

取 10.0 g 酸菜样品,加入 90.0 mL 无菌生理盐水后,高速均质 3 min,吸取 1 mL 上清液进行梯度稀释。参考 GB 4789.2—2022^[9]测定酸菜样品中菌落总数;参考 GB 4789.35—2016^[10]测定酸菜样品中乳酸菌总数。

1.3.6 酸菜样品中细菌多样性分析

1.3.6.1 DNA 提取和 PCR 扩增、纯化

参考贾晶晶等^[11]方法,分别取酸菜样液 10 mL 于 20 mL 离心管中,离心后收集底部菌体置于 2 mL 的 EP 管送至诺禾致源有限公司,进行 DNA 提取及 PCR 扩增。将 PCR 产物进行电泳检测后,对目标条

带进行纯化回收。

1.3.6.2 Illumina Miseq 测序

文库构建和 QUBIT、Q-PCR 定量使用 NEBNext[®] Ultra_II DNA Library Prep Kit 建库试剂盒。根据 PCR 扩增引物序列拆分出各样本数据,进行样本的 reads 拼接,对得到的 raw tags 进行质控,最后将 clean tags 与数据库进行比对,从而得到有效数据^[12]。

1.4 数据处理

实验数据采用 Statistix 8 进行处理,每个指标进行 3 次平行实验,结果以平均值 \pm 标准偏差表示;高通量测序数据的统计分析和差异显著性分析均使用 IBM SPSS statistic 23 软件进行;使用 Origin 2022 软件绘图;利用 LEfSe 进行物种差异分析;利用 PICRUSTs 软件进行功能基因的预测分析。

2 结果与分析

2.1 东北不同地区自然发酵酸菜化学成分分析

东北不同地区自然发酵酸菜的化学成分含量见表 2。总酸是衡量酸菜成熟度的重要指标,总酸含量对酸菜的质量、风味和稳定性有很大的影响。6 个样品中 HRB 酸菜样品的总酸质量比最高,约为 11.75 g/kg;而 JX 酸菜样品总酸质量比最低,约为 5.43 g/kg。

表 2 东北自然发酵酸菜的化学成分

Tab. 2 Chemical components in naturally fermented Northeast sauerkraut

样品	w																			mg/kg		
	总酸/ (g·kg ⁻¹)	亚硝 酸盐	食盐	还原糖	天冬 氨酸	谷氨酸	丝氨酸	甘氨酸	组氨酸	苏氨酸	丙氨酸	精氨酸	脯氨酸	酪氨酸	缬氨酸	甲硫 氨酸	半胱 氨酸	异亮 氨酸	亮氨酸		苯丙 氨酸	赖氨酸
DXAL	5.99 \pm 0.13 ^a	4.59 \pm 0.00 ^b	0.54 \pm 0.01 ^a	0.31 \pm 0.01 ^c	0.22 \pm 0.00 ^a	0.24 \pm 0.00 ^a	0.24 \pm 0.00 ^a	0.32 \pm 0.07 ^a	0.80 \pm 0.00 ^a	0.92 \pm 0.00 ^a	0.10 \pm 0.00 ^{ab}	0.12 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^a	0.15 \pm 0.00 ^a	0.06 \pm 0.00 ^a	0.04 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	0.03 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.01 ^a	0.05 \pm 0.00 ^b	3.41 \pm 0.08 ^a
QQHR	6.34 \pm 0.51 ^b	4.32 \pm 0.06 ^c	0.50 \pm 0.01 ^b	0.15 \pm 0.03 ^d	0.05 \pm 0.00 ^d	0.12 \pm 0.00 ^b	0.22 \pm 0.03 ^a	0.13 \pm 0.01 ^b	0.39 \pm 0.01 ^b	0.40 \pm 0.01 ^d	0.06 \pm 0.01 ^{cd}	0.08 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^b	0.11 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^a	0.03 \pm 0.01 ^a	0.03 \pm 0.00 ^b	0.03 \pm 0.00 ^a	0.06 \pm 0.00 ^a	1.76 \pm 0.07 ^b
HRB	11.75 \pm 0.13 ^a	0.92 \pm 0.02 ^d	0.33 \pm 0.01 ^c	0.06 \pm 0.00 ^e	0.08 \pm 0.00 ^b	0.07 \pm 0.00 ^c	0.08 \pm 0.00 ^b	0.04 \pm 0.01 ^c	0.42 \pm 0.02 ^b	0.54 \pm 0.01 ^c	0.09 \pm 0.01 ^{bc}	0.07 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^b	0.08 \pm 0.00 ^c	0.01 \pm 0.00 ^c	0.01 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.01 ^{ab}	0.02 \pm 0.00 ^c	0.03 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.00 ^c	1.64 \pm 0.03 ^b
JX	5.43 \pm 0.10 ^c	4.62 \pm 0.00 ^b	0.47 \pm 0.01 ^c	0.41 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^e	0.08 \pm 0.01 ^c	0.09 \pm 0.00 ^b	0.13 \pm 0.02 ^b	0.28 \pm 0.01 ^c	0.36 \pm 0.02 ^d	0.08 \pm 0.02 ^{bc}	0.09 \pm 0.01 ^b	0.01 \pm 0.00 ^b	0.04 \pm 0.00 ^d	0.01 \pm 0.00 ^c	0.02 \pm 0.01 ^b	0.01 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^d	0.04 \pm 0.01 ^a	0.05 \pm 0.00 ^b	1.33 \pm 0.09 ^c
HG	5.76 \pm 0.13 ^c	4.51 \pm 0.08 ^{bc}	0.18 \pm 0.01 ^f	0.72 \pm 0.04 ^a	0.09 \pm 0.00 ^b	0.09 \pm 0.01 ^c	0.08 \pm 0.01 ^b	0.04 \pm 0.01 ^c	0.20 \pm 0.01 ^d	0.22 \pm 0.02 ^e	0.04 \pm 0.01 ^d	0.02 \pm 0.00 ^c	0.02 \pm 0.00 ^b	0.12 \pm 0.02 ^b	0.01 \pm 0.00 ^c	0.02 \pm 0.01 ^b	0.01 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	0.03 \pm 0.00 ^b	0.04 \pm 0.01 ^a	0.05 \pm 0.01 ^b	1.09 \pm 0.09 ^d
YC	5.97 \pm 0.16 ^c	6.24 \pm 0.02 ^a	0.40 \pm 0.01 ^d	0.38 \pm 0.00 ^b	0.06 \pm 0.00 ^c	0.04 \pm 0.00 ^d	0.09 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^c	0.43 \pm 0.01 ^b	0.68 \pm 0.03 ^b	0.13 \pm 0.02 ^a	0.07 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^b	0.05 \pm 0.01 ^d	0.02 \pm 0.01 ^b	0.02 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^c	0.03 \pm 0.00 ^a	0.04 \pm 0.00 ^c	1.72 \pm 0.05 ^b

不同字母表示同列数据差异显著 ($P < 0.05$)。

食品中亚硝酸盐含量备受人们关注,过多摄入会导致乏力、胸闷、心率快、中毒等症状;此外,亚硝酸盐会与样品中的生物胺(腐胺、尸胺等)经亚硝基化作用生成潜在致癌物亚硝胺,增加发酵产品的安全隐患。6 个样品中亚硝酸盐质量比在 0.92 ~

6.24 mg/kg,所有样品中的亚硝酸盐含量都符合 GB 2762—2022^[13],其中 YC 组亚硝酸盐质量比最高 [(6.24 \pm 0.02) mg/kg]。总酸含量较高的酸菜样品 (HRB、QQHR、DXAL),亚硝酸盐含量相对较低,这可能是因为较高的酸度抑制了硝酸盐还原酶

活性,从而降低亚硝酸盐含量^[14]。6个样品中的食盐质量比均较低,在0.18~0.54 mg/kg,还原糖质量比在0.06~0.72 mg/kg,其中HRB酸菜样品中还原糖含量最低。还原糖是酸菜发酵过程中微生物生长繁殖的主要碳源,因此,在微生物含量较高的样品中,还原糖含量相对较低。

在东北酸菜发酵过程中,乳酸菌会分解蔬菜原料中的蛋白质,产生肽类或氨基酸。游离氨基酸作为生物胺的前体物质,与生物胺的形成密切相关。苯丙氨酸在微生物脱羧酶的作用下合成苯乙胺;赖氨酸在微生物脱羧酶的作用下合成组胺;酪氨酸可以在微生物脱羧酶的作用下合成尸胺^[15]。6种酸菜样品中均检测出17种游离氨基酸,总氨基酸质量比在1.09~3.41 mg/kg,这与朱翔等^[16]报道的东北酸菜菜叶中游离氨基酸含量基本一致。苏氨酸质量

比(0.22~0.92 mg/kg)最高,组氨酸质量比(0.20~0.80 mg/kg)次之,其余氨基酸质量比都较低。这主要是因为白菜中蛋白质含量较低,且大部分氨基酸在微生物脱羧酶的脱羧作用下形成了生物胺。

2.2 东北不同地区自然发酵酸菜中生物胺含量分析

发酵食品中的生物胺主要是由氨基酸在微生物脱羧酶的作用下产生的,这些脱羧酶在发酵过程中受微生物、pH值、温度和食盐含量等诸多因素影响。酸菜样品中常见的8种生物胺含量见表3。总胺质量比为59.22~131.34 mg/kg,其中腐胺质量比最高(14.77~68.70 mg/kg),组胺(3.10~24.94 mg/kg)和色胺(0.98~37.66 mg/kg)次之,苯乙胺(0~4.08 mg/kg)、尸胺(0~22.34 mg/kg)、酪胺(0~12.06 mg/kg)、亚精胺(0.26~6.17 mg/kg)和精胺(1.15~8.30 mg/kg)的质量比较低。

表3 东北自然发酵酸菜中生物胺含量

Tab. 3 Biogenic amine contents in naturally fermented northeast sauerkraut

mg/kg

样品	w								
	色胺	苯乙胺	腐胺	尸胺	组胺	酪胺	亚精胺	精胺	总胺
DXAL	9.53 ± 2.50 ^c	ND ^c	29.02 ± 3.56 ^c	ND ^c	3.10 ± 0.61 ^e	9.01 ± 0.15 ^b	0.26 ± 0.13 ^d	8.30 ± 1.17 ^a	59.22 ± 2.82 ^d
QQHR	19.02 ± 0.89 ^b	4.08 ± 0.56 ^a	28.87 ± 1.78 ^c	6.02 ± 0.37 ^d	8.50 ± 1.01 ^e	12.06 ± 1.69 ^a	3.19 ± 0.71 ^{bc}	5.92 ± 1.77 ^{ab}	87.79 ± 5.28 ^b
HRB	3.91 ± 0.91 ^d	3.61 ± 1.82 ^a	68.70 ± 2.33 ^a	22.34 ± 2.09 ^a	24.94 ± 1.70 ^a	0.57 ± 0.80 ^c	2.90 ± 0.45 ^c	4.24 ± 0.91 ^b	131.34 ± 8.51 ^a
JX	0.98 ± 0.28 ^e	0.74 ± 0.43 ^b	54.26 ± 5.14 ^b	10.39 ± 1.35 ^c	18.24 ± 1.58 ^b	2.36 ± 1.63 ^c	2.62 ± 0.75 ^c	5.17 ± 0.08 ^{ab}	94.77 ± 7.95 ^b
HG	8.45 ± 1.58 ^c	ND ^c	23.10 ± 1.74 ^d	13.40 ± 0.66 ^b	8.53 ± 0.86 ^c	ND ^d	4.25 ± 0.57 ^b	8.01 ± 1.81 ^a	65.72 ± 4.38 ^d
YC	37.66 ± 2.14 ^a	0.98 ± 0.08 ^b	14.77 ± 1.15 ^e	5.18 ± 1.33 ^d	6.23 ± 0.11 ^d	7.35 ± 2.02 ^b	6.17 ± 0.13 ^a	1.15 ± 0.83 ^c	79.80 ± 1.36 ^c

ND表示未检出,不同字母表示同列数据差异显著($P < 0.05$)。

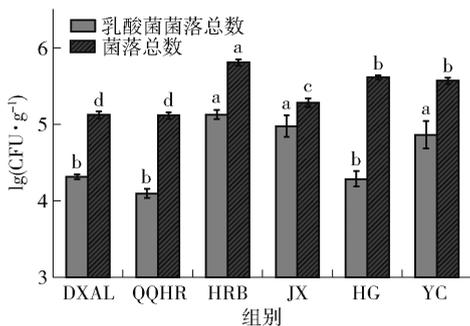
腐胺主要通过精氨酸脱羧酶途径和鸟氨酸脱羧酶途径形成^[17]。DXAL、QQHR、HRB、JX和HG酸菜样品的8种生物胺中腐胺含量最高,这与Ye等^[4]报道的东北酸菜中生物胺含量相近。其中,HRB酸菜样品中腐胺达68.70 mg/kg,这可能是样品中总酸含量高,微生物通过积累腐胺以抵抗外界环境的酸胁迫并维持自身生长。6个样品中的腐胺含量与其他发酵食品(葡萄酒^[18]、牦牛乳干酪^[19]、发酵香肠^[7]等)中腐胺含量相近。尽管腐胺毒性活性不如组胺强,但它仍被认为是有毒的生物胺,因为它可以通过抑制单胺氧化酶的活性或促进组胺和酪胺在肠道中的吸收而加剧组胺和酪胺的毒性作用,因此,对于酸菜中腐胺过量的风险不容忽视。组胺是组氨酸在组氨酸脱羧酶作用下产生的,其广泛存在于鱼类、香肠、腐乳和酒类等发酵产品中,欧洲食品安全局认为健康个体每天摄入组胺不得超过50 mg^[20]。HRB和JX酸菜样品组胺质量比较高,分

别约为24.94、18.24 mg/kg,这可能是因为这两个样品中存在较多含有组胺酸脱羧酶的微生物。尽管所有样品中的组胺水平都在安全限度内,但即使在安全阈值下,组胺也会增加酪胺的毒性。尸胺和色胺也是发酵蔬菜中常见的生物胺,蔬菜的品种、蔬菜表面附着的微生物以及加工环境的卫生情况是影响尸胺和色胺生成的主要原因^[21]。YC酸菜样品中色胺质量比最高,约为37.66 mg/kg,与一些关于东北酸菜生物胺含量的报道并不相符^[4],这可能与酸菜加工前原材料的新鲜程度及自然发酵过程中复杂的微生物菌群有关。Del Rio等^[22]证明,色胺可能会导致细胞坏死,与其他生物胺相比,发酵食品中色胺更容易积累并达到其对健康构成风险的毒性含量。HRB、JX和HG酸菜样品尸胺质量比较高,分别约为22.34、10.39、13.40 mg/kg,这可能是由于白菜腌制前处理及加工过程中造成了污染。6种酸菜样品中酪胺质量比为0~12.06 mg/kg。欧洲食品安全局

认为,健康人每天不应摄入超过 600 mg 的酪胺,因此,6 个样品中的酪胺含量都被认为是安全的。同时亚精胺和精胺质量比也呈现一个较低的水平,为 0.26 ~ 8.30 mg/kg。尽管许多报告声称,食品中的亚精胺和精胺含量不会对健康构成风险,但即使低于毒性阈值,其对慢性肾衰竭或癌症患者的风险也不容忽视^[7]。可见,酸菜样品中的生物胺种类较多,且不同地区酸菜样品中生物胺含量差异较大。其中,腐胺、组胺和色胺是酸菜样品中主要的生物胺。

2.3 东北不同地区自然发酵酸菜中微生物分析

微生物生长代谢为酸菜独特风味的形成、贮藏品质的提升提供了保障。东北自然发酵酸菜中菌落总数和乳酸菌菌落总数见图 1。酸菜样品中菌落总数和乳酸菌菌落总数均在 $10^4 \sim 10^6$ CFU/g, 其中, HRB 酸菜样品的菌落总数最高[5.81 lg(CFU/g)]。乳酸菌是酸菜中主要的微生物^[4], 具有较强的产酸能力,可抑制有害微生物生长和发酵异味的形成,保证产品安全性。HRB 酸菜样品中乳酸菌菌落总数最高[5.12 lg(CFU/g)], 这可解释该样品总酸含量最高。



不同小写字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

图 1 东北自然发酵酸菜中菌落总数和乳酸菌菌落总数

Fig. 1 Counts of total bacteria and lactic acid bacteria in naturally fermented Northeast sauerkraut

2.4 东北不同地区自然发酵酸菜细菌多样性分析

2.4.1 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性可以反映样品微生物群落的丰富度和多样性,6 种酸菜样品细菌 Alpha 多样性分析见表 4。运算分类单元(operational taxonomic unit, OTU)指数能直观观测物种数目,指数越大观测到的物种越多;覆盖率常用于表征覆盖度,测序覆盖度越高,指数越大;Chao1 指数用来表征物种的丰富度^[23]。由表 4 可知,样品的 OTUs 指数在 297.00 ~ 410.67, Chao1 指数在 300.17 ~ 410.91, 覆盖率均大于 0.99, 表明测序结果可以完整地反映样品信息。通过计算

样品的多样性指数发现, JX 酸菜样品的 Chao1 指数(410.91)和 Shannon 指数(6.15)最高,说明 JX 酸菜样品的物种丰度最高,细菌菌群结构更复杂;相反, DXAL 酸菜样品的细菌丰度最低(Chao1 指数为 300.17)。其余样品的丰度指数表现出不同的差异,说明样品在细菌种类和数量分布上也有所不同。

表 4 东北自然发酵酸菜细菌 Alpha 多样性分析
Tab. 4 Alpha diversity analysis of bacteria in naturally fermented Northeast sauerkraut

样品	OTUs	Chao1	覆盖率
DXAL	297.00	300.17	1.00
QQHR	347.33	347.43	1.00
HRB	354.00	354.88	1.00
JX	410.67	410.91	1.00
HG	354.67	355.89	1.00
YC	345.33	345.78	1.00

2.4.2 菌群组成分析

东北不同地区自然发酵酸菜在细菌属水平上菌群组成及 LEfSe 分析见图 2。不同样品属水平组成具有显著差异[图 2(a)], 相对丰度前 10 的菌属包括乳杆菌属(*Lactobacillus*) 15.34% ~ 53.40%、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 2.00% ~ 14.83%、节杆菌属(*Pseudarcobacter*) 0.00% ~ 17.19%、弓形杆菌属(*Arcobacter*) 0.21% ~ 16.20%、小球菌属(*Pediococcus*) 0.20% ~ 10.02%、普雷沃氏菌属(*Prevotella*) 0.0032% ~ 6.99%、乳球菌属(*Lactococcus*) 0.53% ~ 7.49%、丛毛单胞菌属(*Comamonas*) 0.01% ~ 8.62%、产碱杆菌属(*Alcaligenes*) 0.01% ~ 4.83% 和不溶螺菌属(*Insolitispirillum*) 0.00% ~ 5.03%。DXAL、QQHR、HRB、JX 和 HG 酸菜样品中优势菌属均为乳杆菌属,与 Xiao 等^[23]关于东北酸菜细菌多样性的报道相同。YC 酸菜样品的优势菌属为乳杆菌属和弓形杆菌属。这可能是由于自然发酵酸菜的地域性、发酵环境和原材料的不同,导致酸菜中优势菌属不完全相同。相关研究表明,乳杆菌属能促进发酵蔬菜在发酵过程中的风味形成,还能通过产酸或细菌素来抑制有害微生物生长,保证发酵蔬菜品质及安全性^[24]。

采用线性判别分析[linear discriminant analysis (LDA) effect size, LEfSe]对东北不同地区酸菜中 LDA 得分大于 4 的菌属进行比较[图 2(b)]。其中,乳杆菌为 DXAL 发酵酸菜样品中的特征细菌,研

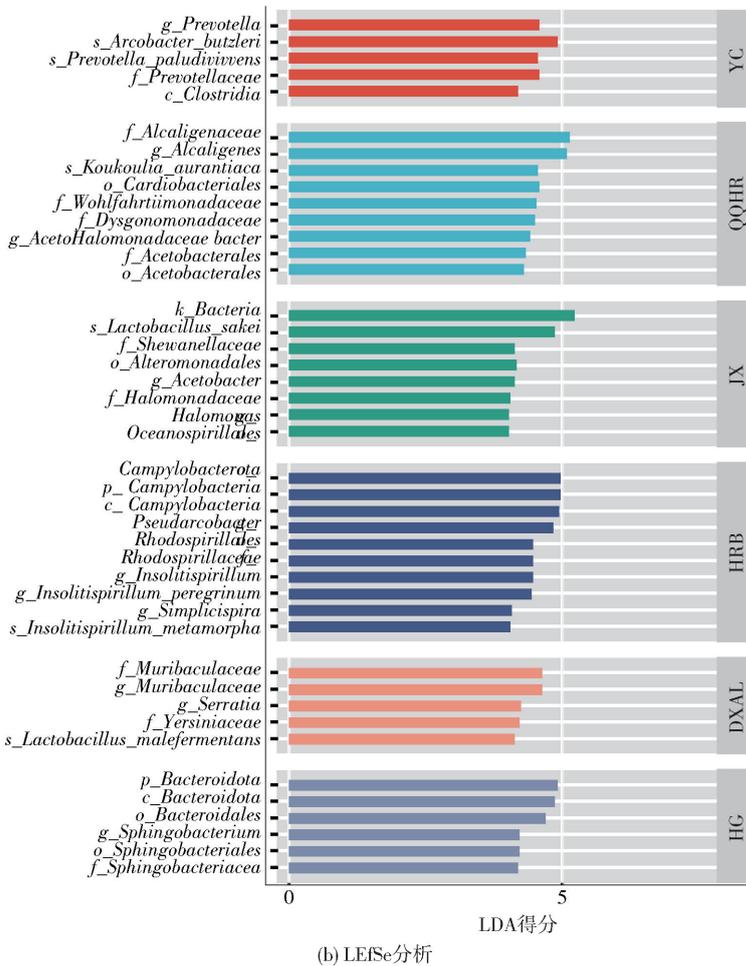
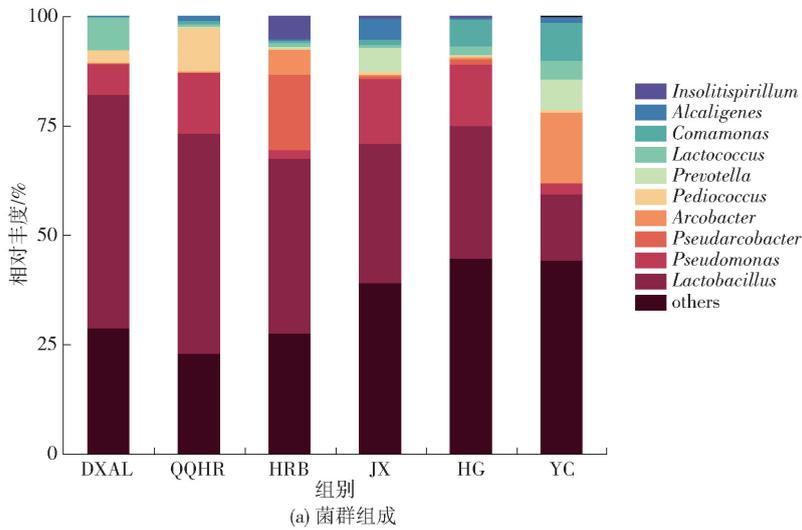


图2 东北自然发酵酸菜细菌属水平菌群组成和 LEfSe 分析

Fig. 2 Bacterial community composition and LEfSe analysis at genus level of naturally fermented northeast sauerkraut

究表明,接种乳杆菌能够降低发酵体系中生物胺含量^[4]。产碱杆菌、肠杆菌和醋酸菌为 QQHR 发酵酸菜样品中的特征细菌,其中肠杆菌属与腐胺、尸胺的代谢相关。弯曲杆菌和不溶螺杆菌为 HRB 发酵酸

菜样品中的特征细菌。芽孢杆菌、交替假单胞菌、乳酸杆菌和嗜盐假单胞菌为 JX 发酵酸菜样品中的特征细菌,芽孢杆菌不仅降解色胺、苯乙胺和酪胺,还能合成腐胺;交替假单胞菌不仅能降解尸胺和腐胺,

同时能合成亚精胺^[25]。拟杆菌和鞘脂杆菌为HG发酵酸菜样品中的特征细菌。弓形杆菌、普雷沃氏菌和梭菌为YC发酵酸菜样品中的特征细菌。弯曲杆菌、拟杆菌和弓形杆菌是发酵食品中常见特征细菌,探究特征细菌与生物胺形成之间的联系,可为后续深入挖掘发酵酸菜中微生物对生物胺的影响提供理论基础。

2.4.3 细菌功能预测

基于16S rRNA基因的测序结果汇总后进行菌群基因或功能单元的组成预测,根据OTU水平的丰度信息,利用软件PICRUSt进行细菌功能基因的KEGG预测,见图3。结果表明,酸菜样品中的细菌主要参与了细胞膜转运(电子传递、糖酵解、糖酵解

超级途径和去氧酮糖酸途径、TCA循环等)、信号蛋白分子交互作用、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、酶促反应、多糖的合成与代谢、核酸代谢等途径,其中部分细菌具有调节氨基酸代谢及胺和多胺的生物合成及代谢的能力,这说明6个酸菜样品中的部分细菌可能含有脱羧酶基因或胺降解酶基因,能够通过代谢游离氨基酸产生生物胺或通过胺降解酶降解体系中的生物胺。因此,在后续研究中,通过相关技术对产胺菌株进行靶向抑制,以达到抑制生物胺产生的目的;通过基因过表达技术来调控降胺菌株降胺基因的表达,使其更高效地发挥降解生物胺的作用。细菌的功能预测为后续发酵酸菜中降胺发酵剂的筛选提供理论基础。

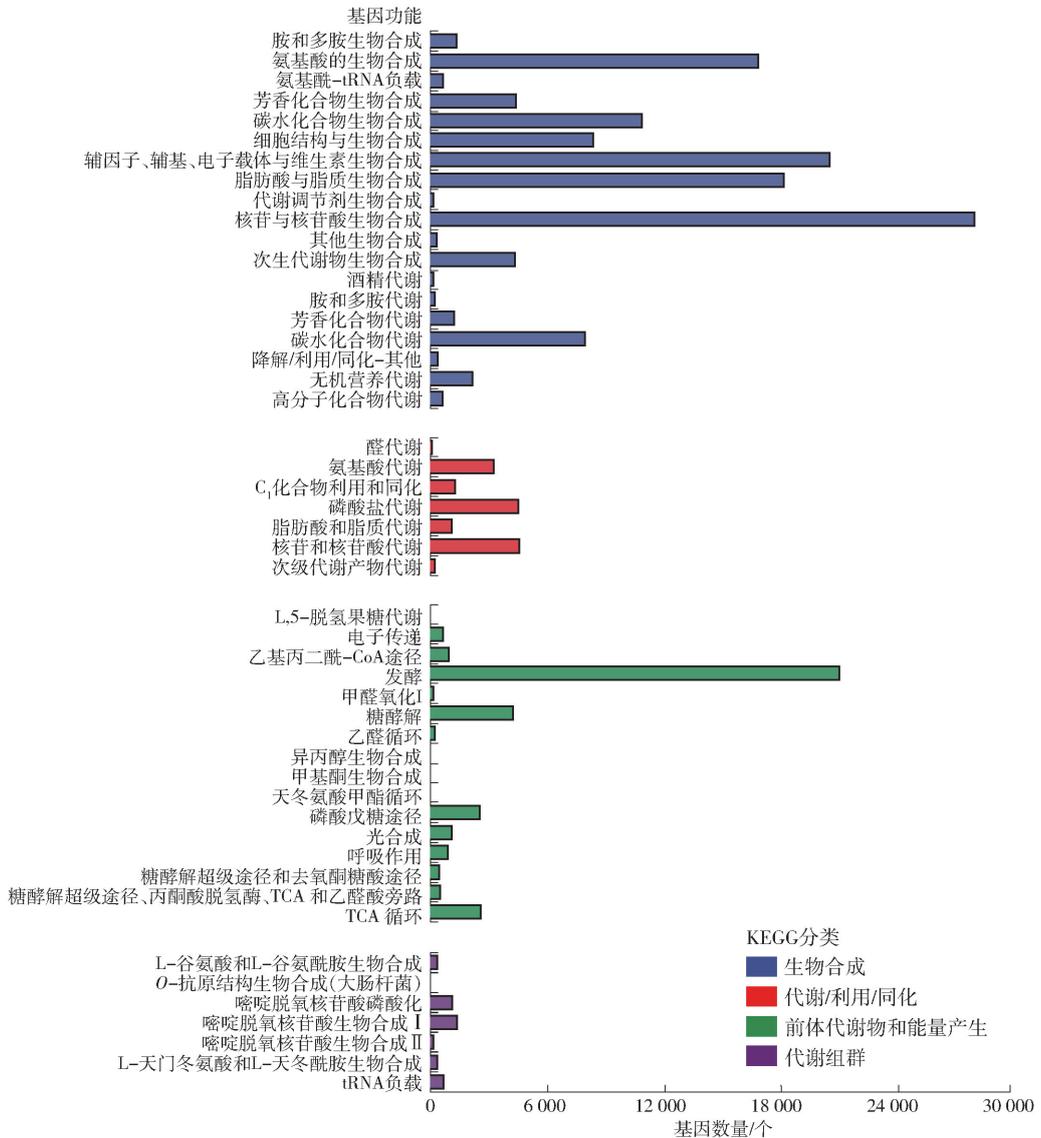


图3 东北自然发酵酸菜中细菌功能预测

Fig. 3 Bacterial function prediction of naturally fermented Northeast sauerkraut

2.5 冗余分析

通过冗余分析(redundancy analysis, RDA)阐明酸菜样品中相对丰度前 10 的细菌属与环境变量之间的相关性,见图 4。冗余分析两轴分别解释了 66.11% 和 20.20% 的变化。图 4 中两线之间的夹角可表明其相关性:锐角($<90^\circ$)表示正相关;钝角($>90^\circ$)表示负相关;直角(90°)表示无相关性。结果表明,总酸、游离氨基酸与生物胺之间的夹角较小,表明了总酸与生物胺之间具有极大的正相关性,这是因为随着体系中酸度的增加微生物会产生碱性物质(如生物胺)来抵御酸胁迫机制,维持自身生长繁殖;游离氨基酸与生物胺之间具有极大的正相关性是因为游离氨基酸作为生物胺形成的前体物质,在生物胺形成过程中发挥重要作用^[4]。此外,细菌主要集中在第一和第四象限,其中,假单胞菌属、节杆菌属、小球菌属、乳球菌属、产碱杆菌属和不溶螺杆菌属与总酸和食盐含量呈正相关,在后续研究中需考虑食盐添加量和总酸含量对酸菜发酵过程中生物胺形成的影响,以此指导实际生产。由此可见,发酵体系中的微生物会受到环境变量的影响,进而影响生物胺的生成与代谢。因此,对生物胺控制方面的研究可从环境-生物胺-微生物关系入手。

2.6 细菌多样性与生物胺相关性分析

基于 Spearman 相关性检验,评估东北不同地区自然发酵酸菜中细菌群落结构与生物胺之间的相关性,见图 5。图 5 显示了相对丰度排名前 10 位的细菌属与 8 种生物胺的相关性,热图中越接近红色表明正相关性越强,越接近蓝色表明负相关性越高。结果表明,有 6 个细菌属至少与 1 种生物胺显著相

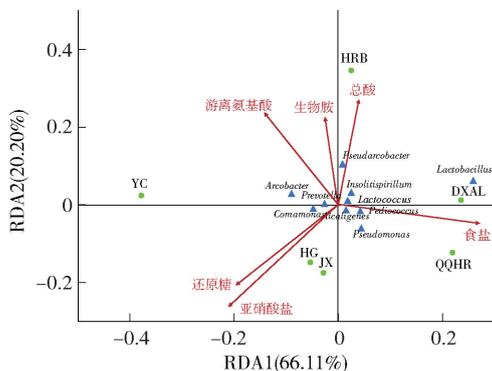
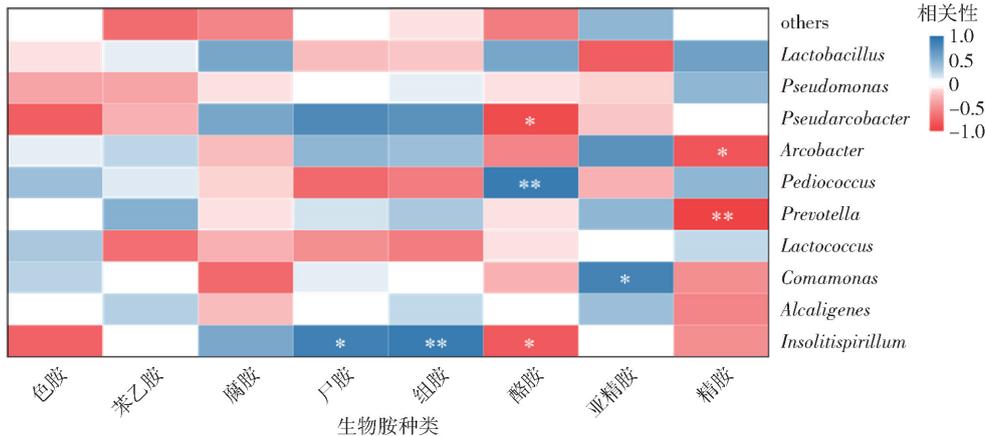


图 4 东北自然发酵酸菜中优势细菌属、化学成分和生物胺的冗余分析

Fig. 4 Redundancy analysis of dominant bacteria, chemical components, and biogenic amines in naturally fermented Northeast sauerkraut

关($P < 0.05$)。不溶螺杆菌属与尸胺呈显著正相关($P < 0.05$),与组胺呈极显著负相关($P < 0.01$)。丛毛单胞菌属与亚精胺呈显著正相关($P < 0.05$),王维亚等^[26]在发酵腐乳中也发现丛毛单胞菌属与尸胺有显著正相关关系。小球菌属与酪胺呈极显著正相关($P < 0.01$),它是发酵食品中常见的产胺菌属,Landete 等^[27]同样证实了小球菌属能产生高浓度生物胺。不溶螺杆菌属和节杆菌属与酪胺呈显著负相关($P < 0.05$)。弓形杆菌属与精胺呈显著负相关($P < 0.05$),普雷沃氏菌属与精胺呈极显著负相关($P < 0.01$),吴双慧等^[28]同样证实了弓形杆菌属和普雷沃氏菌属与精胺呈显著负相关。弓形杆菌属、节杆菌属和普雷沃氏菌属是发酵酸菜中常见的细菌属,它们可能是降解生物胺的潜在菌属。因此,在今后的研究中可对自然发酵酸菜中具有降解生物



*、** 分别表示酸菜样品中生物胺与菌属存在显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)相关性;红色表示正相关,蓝色表示负相关。

图 5 东北自然发酵酸菜中优势细菌菌属与生物胺的相关性

Fig. 5 Correlation of dominant bacteria and biogenic amines in naturally fermented Northeast sauerkraut

胺潜力的微生物进行分离纯化,并通过转录组学技术探究其降解生物胺的关键通路及基因,采用基因过表达技术调控降胺基因的表达,提升其降解生物胺的能力,为筛选具有降胺潜力的微生物发酵剂及对发酵蔬菜中生物胺控制提供了一些新思路。

本研究的酸菜样品中不溶螺杆菌属和小球菌属是主要的产胺微生物,节杆菌属、弓形杆菌属和普雷沃氏菌属与生物胺的产生呈负相关关系;而相对丰度最高的乳杆菌属与生物胺之间并无相关性,相关研究表明乳杆菌属与生物胺呈正相关^[29],这主要是因为不同来源的菌株具有特异性,本研究的酸菜样品中乳杆菌可能没有相应的产胺基因,并未造成酸菜样品中生物胺的大量积累。因此,进一步研究可从本研究中的酸菜样品分离乳杆菌,探究乳杆菌中生物胺合成和代谢相关通路和基因,验证该菌株是否能够作为抑制生物胺形成的潜在功能发酵剂。

3 结 论

利用高效液相色谱法测定东北自然发酵酸菜样品中生物胺含量,发现腐胺、组胺和色胺是6个自然发酵酸菜样品中的主要生物胺。利用高通量测序分析技术对东北自然发酵酸菜样品中细菌多样性进行分析,发现样品中细菌结构组成具有一定的差异性,乳杆菌属和节杆菌属是酸菜中的优势细菌属。Spearman 相关性分析表明,在相对丰度排名前10位的细菌属中,不溶螺杆菌属与尸胺含量呈显著正相关,与组胺含量呈极显著负相关;弓形杆菌属与精胺含量呈显著负相关;丛毛单胞菌属与亚精胺含量呈显著正相关;小球菌属与酪胺含量呈极显著正相关;不溶螺杆菌属和节杆菌属与酪胺含量呈显著负相关;普雷沃氏菌属与精胺含量呈极显著负相关。此外,细菌功能预测结果表明,东北自然发酵酸菜样品中部分细菌具有调节氨基酸代谢及胺和多胺的生物合成及代谢的能力。冗余分析表明,自然发酵酸菜的样品中总酸和游离氨基酸与生物胺呈极大正相关,食盐和亚硝酸盐可能通过影响菌群的多样性进而影响酸菜中生物胺的含量。目前关于自然发酵酸菜中生物胺形成机制尚不明确。在今后的研究中,可以利用基因组学、代谢组学和转录组学以及多组学联用手段探究微生物的产胺及降胺机制;同时,挖掘自然发酵酸菜中潜在的降胺菌株,为发酵酸菜中生物胺控制及品质提升提供科学依据。

参考文献:

- [1] 孙庆申,王钰涵,韩德权,等. 酸菜中具有抑菌活性乳酸菌的分离鉴定及其产细菌素特性[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(4): 64-73.
SUN Q S, WANG Y H, HAN D Q, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria with antibacterial activity in pickles and their bacteriocin production characteristics[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(4): 64-73.
- [2] DOEUN D, DAVAATSEREN M, CHUNG M S. Biogenic amines in foods[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(6): 1463-1474.
- [3] 赵丹,罗俏俏,王欣,等. 汤汁辅料对腐乳发酵过程中单胺氧化酶活性及生物胺积累的影响[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(2): 91-97.
ZHAO D, LUO Q Q, WANG X, et al. Influence of soup accessories on activity of monoamine oxidase and accumulation of biogenic amines during sufu fermentation[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(2): 91-97.
- [4] YE H Q, LANG X S, JI Y Y, et al. The interaction between *Lactobacillus plantarum* SC-5 and its biogenic amine formation with different salt concentrations in Chinese Dongbei Suancai[J]. Food Research International, 2021, 150: 110813.
- [5] 国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中总酸的测定: GB 12456—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中钾、钠的测定: GB 5009.91—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [7] WANG H P, ZHANG H W, LIU S T, et al. Analysis of biogenic amine in dry sausages collected from northeast China: from the perspective of free amino acid profile and bacterial community composition[J]. Food Research International, 2022, 162, 112084.
- [8] 国家市场监督管理总局,国家标准化管理委员会. 植物中游离氨基酸的测定: GB/T 30987—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [9] 国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB GB 4789.2—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验: GB 4789.35—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [11] 贾晶晶,魏爱丽,赵虎威,等. 基于高通量测序分析

- 不同食盐浓度的酸菜中微生物多样性[J]. 中国调味品, 2022, 47(8): 167-170.
- JIA J J, WEI A L, ZHAO H W, et al. Analysis of microbial diversity of Chinese sauerkraut with different salt concentrations by high-throughput sequencing [J]. China Condiment, 2022, 47(8): 167-170.
- [12] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons [J]. Genome Research, 2011, 21(3): 494-504.
- [13] 国家市场监督管理总局, 国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [14] AN F Y, SUN H J, WU J R, et al. Investigating the core microbiota and its influencing factors in traditional Chinese pickles [J]. Food Research International, 2021, 147: 110543.
- [15] DE LAS RIVAS B, MARCOBAL A, CARRASCOSA A V, et al. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(10): 2509-2514.
- [16] 朱翔, 汪冬冬, 明建英, 等. 四川泡菜和东北酸菜在发酵过程中的物质成分变化[J]. 中国调味品, 2021, 46(4): 78-81.
- ZHU X, WANG D D, MING J Y, et al. Changes of substance composition of Sichuan pickle and northeast pickled cabbage during fermentation[J]. China Condiment, 2021, 46(4): 78-81.
- [17] 李美娜, 邹宇, 马堃, 等. 食品中腐胺的产生途径及其检测方法和防控技术研究进展[J]. 食品工业, 2021, 42(8): 242-245.
- LI M N, ZOU Y, MA K, et al. Review of production, detection and control technology of putrescine in food [J]. The Food Industry, 2021, 42(8): 242-245.
- [18] 李志军, 李晓瑜, 元晓梅. 国产葡萄酒中生物胺组成与含量分析[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(2): 46-50.
- LI Zhijun, LI Xiaoyu, YUAN Xiaomei. Analysis of profile of biogenic amines in commercial wines made in China[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 34(2): 46-50.
- [19] 袁润泽, 梁琪, 宋雪梅. 原料乳热处理对牦牛乳硬脂干酪中生物胺含量的影响[J]. 食品与发酵科技, 2022, 58(5): 1-7.
- YUAN R Z, LIANG Q, SONG X M. Influence of heat treatment of raw milk on biogenic amines in yak milk hard cheese [J]. Food and Fermentation Technology, 2022, 58(5): 1-7.
- [20] EMER C D, MARQUES S, COLLA L M, et al. Biogenic amines and the importance of starter cultures for malolactic fermentation[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2021, 27(1): 26-33.
- [21] 李梅, 汪冬冬, 唐焱, 等. 中国市售酱腌菜中生物胺含量分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 271-278.
- LI M, WANG D D, TANG Y, et al. Analysis of the biogenic amines content in Chinese pickles[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(14): 271-278.
- [22] DEL RIO B, REDRUELLO B, FERNANDEZ M, et al. The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows *in vitro* cytotoxicity at concentrations that have been found in foods[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127303.
- [23] XIAO M Y, HUANG T, HUANG C, et al. The microbial communities and flavour compounds of Jiangxi Yancai, Sichuan Paocai and Dongbei Suancai: three major types of traditional Chinese fermented vegetables [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 121: 108865.
- [24] KÖLJALG U, NILSSON R H, ABARENKOV K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi[J]. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271-5277.
- [25] HU M, DONG J, TAN G L, et al. Metagenomic insights into the bacteria responsible for producing biogenic amines in sufu [J]. Food Microbiology, 2021, 98: 103762.
- [26] 王维亚, 刘玉婷, 万汉坤, 等. 腐乳中细菌群落结构与生物胺的相关性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(22): 181-188.
- WANG W Y, LIU Y T, WAN H K, et al. Correlation analysis of bacterial community structure and biogenic amines in sufu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(22): 181-188.
- [27] LANDETE J M, DE LAS RIVAS B, MARCOBAL A, et al. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(3): 258-269.
- [28] 吴双慧, 牛茵, 何济坤, 等. 基于宏基因组技术分析自然发酵羊肉香肠中微生物多样性及生物胺的代谢[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 133-140.
- WU S H, NIU Y, HE J K, et al. Analysis of microbial diversity and biogenic amines metabolism in naturally

fermented mutton sausages based on metagenome technology [J]. Food Science, 2023, 44(18): 133–140.

Biogenic amines in fermented foods[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2010, 64(3): 95–100.

[29] SPANO G, RUSSO P, LONVAUD-FUNEL A, et al.

Bacterial Diversity of Naturally Fermented Northeast Sauerkraut and Its Relationship with Biogenic Amines

SUI Yumeng, WANG Jiawang, MA Zihan, WANG Huiping, KONG Baohua, LIU Xin, REN Haowei*, CHEN Qian*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Sauerkraut is a unique traditional fermented food in Northeast China and it produces biogenic amines, a potential hazard compound, due to its complex microbial metabolic process during fermentation. Therefore, the relationship between bacterial diversity and biogenic amines in naturally fermented sauerkraut collected from different regions in Northeast China was investigated. There were significant differences in content of total acid, nitrite, salt, reducing sugar, free amino acid, and biogenic amine, total number of colonies and total number of lactic acid bacteria in sauerkraut samples from 6 regions. The total number of colonies, total number of lactic acid bacteria and biogenic amine content ranged from 5.11 ~ 5.81 lg CFU/g, 4.09 ~ 5.12 lg CFU/g, 59.22 ~ 131.34 mg/kg, respectively. The composition of bacterial community structure in natural fermented Northeast sauerkraut was analyzed by high-throughput sequencing analysis technology. The results showed that the dominant bacteria in sauerkraut mainly included *Lactobacillus* and *Pseudarcobacter*. Spearman correlation analysis showed that, among the top ten bacterial genera of relative abundance, there was a significant positive correlation between *Insolitispirillum* and the content of cadaverine ($P < 0.05$) and a significant negative correlation between *Insolitispirillum* and the content of histamine ($P < 0.01$). *Arcobacter* was significantly negatively correlated with the content of spermine ($P < 0.05$). *Comamonas* was significantly positive correlated with the content of spermine ($P < 0.05$). *Pediococcus* was significantly positive correlated with the content of tyramine ($P < 0.01$). *Insolitispirillum* and *Pseudarcobacter* were significantly negatively correlated with the content of tyramine ($P < 0.05$). *Prevotella* was significantly negatively correlated with the content of spermine ($P < 0.01$). Therefore, in subsequent research, strains that are negatively correlated with biogenic amines could be isolated and purified as functional fermentation agents to inhibit the production and accumulation of biogenic amines in fermented vegetables. This study aimed to provide a theoretical basis for understanding the formation rule and mechanism of biogenic amines production, effectively controlling biogenic amines, and improving the quality and safety of naturally fermented sauerkraut.

Keywords: Northeast sauerkraut; bacterial diversity; chemical composition; biogenic amine; correlation analysis