

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241127002

引用格式: 苏莉娅, 岑婧, 王洁, 等. 控制屎肠球菌生物胺产量的发酵条件优化研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(6): 1-9.

SU LY, CEN J, WANG J, *et al.* Optimization of fermentation condition for controlling the production of biogenic amines of *Enterococcus faecium* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(6): 1-9. (in Chinese with English abstract).

控制屎肠球菌生物胺产量的发酵条件优化研究

苏莉娅, 岑婧, 王洁, 蔡自建, 陈娟*

(西南民族大学药学与食品学院, 成都 610225)

摘要: **目的** 利用响应面设计优化控制屎肠球菌生物胺产量的发酵条件。**方法** 在前期单因素试验的基础上, 采用响应面法探究培养温度(10、15、20 °C)、初始 pH (5.0、5.5、6.0)和氯化钠添加量(4.5%、5.5%、6.5%) 3 个影响因素 3 个不同水平下两两互作对屎肠球菌产生物胺的影响, 优化控制屎肠球菌酪胺和苯乙胺产量的发酵条件。**结果** 通过响应面试验分别得到屎肠球菌 48 h 时酪胺和苯乙胺产量的回归方程, 模型中酪胺 $R^2=0.9866$, 校正 $R^2=0.9693$, 模型中苯乙胺 $R^2=0.9875$, 校正 $R^2=0.9714$, 影响酪胺和苯乙胺产量的顺序均为培养温度>NaCl 添加量>初始 pH。经模型预测和验证试验得到控制屎肠球菌酪胺产量的优化条件为初始 pH 6.0、培养温度 10.9 °C、NaCl 添加量 4.5%, 控制屎肠球菌苯乙胺产量的优化条件为初始 pH 5.34、培养温度 13.8 °C、NaCl 添加量 5.8%。**结论** 研究结果为有效控制发酵肉制品等发酵食品中屎肠球菌产生物胺提供一定的参考依据。

关键词: 屎肠球菌; 酪胺; 苯乙胺; 发酵条件; 响应面优化法

Optimization of fermentation condition for controlling the production of biogenic amines of *Enterococcus faecium*

SU Li-Ya, CEN Jing, WANG Jie, CAI Zi-Jian, CHEN Juan*

(College of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the fermentation condition of *Enterococcus faecium* with the capability of high-yield biogenic amine production by response surface design. **Methods** Based on the previous single factor experiment results, response surface methodology was used to investigate the interaction among 3 factors with different levels, namely culture temperature (10, 15, 20 °C), initial pH (5.0, 5.5, 6.0), and sodium chloride addition (4.5%, 5.5%, 6.5%), on the production of biogenic amines by *Enterococcus faecium*. The fermentation condition for controlling the production of tyramine and phenethylamine by *Enterococcus faecium* were optimized. **Results** The results showed that the regression equations for the production of tyramine and phenethylamine at 48 h were obtained with $R^2=0.9866$, adjusted $R^2=0.9693$ for tyramine and $R^2=0.9875$, adjusted $R^2=0.9714$ for phenethylamine, the order of affecting the production of casein and phenethylamine was culture temperature>NaCl addition>initial pH.. The

收稿日期: 2024-11-27

基金项目: 四川省自然科学基金面上项目(2025ZNSFSC0226); 研究生创新型科研项目(YCYB2024088)

第一作者: 苏莉娅(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: 1418640955@qq.com

*通信作者: 陈娟(1980—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品微生物与食品安全。E-mail: chenjl221@126.com

optimal fermentation condition to control the tyramine production of *Enterococcus faecium* was initial pH of 6.0, incubation temperature of 10.9 °C, and NaCl addition level of 4.5%. The optimal fermentation condition to control the phenylethylamine production was initial pH of 5.34, incubation temperature of 13.8 °C, NaCl addition level of 5.8%. **Conclusion** The results provide references for the effective control of the biogenic amine production of *Enterococcus faecium* growing in fermented food such as fermented meat products.

KEY WORDS: *Enterococcus faecium*; tyramine; phenethylamine; fermentation condition; response surface optimization design

0 引言

生物胺是一类具有生物活性、含氨基的低分子质量有机化合物的总称^[1],包括脂肪族胺、芳香族胺、杂环类低分子有机化合物,普遍存在于各种发酵食品中^[2-3]。适量的生物胺对健康有好处^[4],但是过量的生物胺可能导致中毒^[5],甚至危及生命^[6]。相关研究表明食品中总生物胺含量不应该超过 900 mg/kg^[7],当总生物胺含量超过 1000 mg/kg 则会对人体健康产生危害^[8]。目前,欧盟对于食品中酪胺和苯乙胺的规定限量范围为酪胺含量在 100~800 mg/kg 之间,β-苯乙胺含量应低于 30 mg/kg。大量的酪胺进入体内会引起偏头痛和高血压等健康问题^[9]。酪胺的体外细胞毒性比组胺更强更迅速^[10]。苯乙胺可消除神经系统中的去甲肾上腺素,增加血压,引起偏头疼等毒副作用^[11]。

由于肉制品含有丰富的蛋白质和游离氨基酸,能够为生物胺的产生提供有利的基础条件,在乳酸菌等产胺微生物的作用下,增加了发酵肉制品中生物胺的含量。发酵肉制品中主要产生组胺、酪胺和苯乙胺^[12-13]。乳酸菌产生物胺机制分为两种:其一,乳酸菌在发酵食品中通过降低 pH 来促进食物中的蛋白质水解,而低 pH 又增加了内源性蛋白酶,即组织蛋白酶的活性,因此增加了生物胺前体物质的生成。其二,乳酸菌在处于相对低酸或营养匮乏的条件时,可以通过产生碱性生物胺来维持环境的酸碱平衡和自身的正常生长。乳酸菌可以产生多种氨基酸脱羧酶,其中酪氨酸脱羧酶在乳酸菌中常被检出^[14],尤其是肠球菌属的乳酸菌被认为是最主要的酪胺生产者^[15-17],此外还有研究表明 β-苯乙胺浓度与肠球菌数量呈显著正相关^[18]。李亚倬^[19]从 24 个新疆熏马肠样品中分离到 89 株产胺菌株,有 16 株菌产酪胺含量高于 150 mg/L,其中屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)有 4 株,粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)有 2 株。LADERO 等^[20]从肉、乳等食品中分离出的屎肠球菌大多数都检测出有酪氨酸脱羧酶基因,并且其培养物中能检测到酪胺。

由此可见,屎肠球菌不仅是发酵香肠等发酵肉制品中的优势菌^[21],还常常能够产生大量的酪胺和苯乙胺。因此,控制屎肠球菌酪胺和苯乙胺产量显得十分重要。LADERO 等^[20]采用聚合酶链式反应(polymerase chain

reaction, PCR)技术检测了不同来源的屎肠球菌、粪肠球菌和耐久肠球菌等肠球菌产酪胺和腐胺的脱羧酶编码基因及其侧翼区域,结果发现产酪胺是屎肠球菌、粪肠球菌和耐久肠球菌的种水平特征。近年来,国内外已经有很多学者对影响食品中生物胺含量的因素进行了研究,发现高发酵温度环境促进生物胺的产生^[22],较高的温度使部分产胺微生物生长代谢活跃从而导致生物胺含量的增加^[23-24]。环境系统的 pH 降低时,屎肠球菌的生物胺产量增高^[25];含盐量高的发酵肉的生物胺含量比含盐量低的发酵肉低^[26]。MARCOBAL 等^[27]通过多因素试验设计分析了改良 MRS 培养基中不同理化因素对屎肠球菌产酪胺的影响,发现 pH 对屎肠球菌产胺能力的影响最大,低 pH 条件下屎肠球菌酪胺含量往往更高。卢士玲等^[28]利用响应面法揭示了 MRS 培养基中环境因素对屎肠球菌产苯乙胺和酪胺的影响,结果表明 pH、盐和温度等对屎肠球菌生长有显著的影响,其中受 pH 和温度的影响较大,并且 pH 和温度对苯乙胺和酪胺产生有显著的交互影响。张云鹤等^[29]通过响应面优化法确定了控制粪肠球菌产酪胺量最低的发酵条件。可见,发酵工艺条件对食品中细菌产生物胺的影响十分重要,通过调节发酵条件从而控制产胺量是控制肉制品中生物胺的可行方式。

本研究以试验室前期从传统发酵肉制品中分离与鉴定得到的一株高产生生物胺的屎肠球菌为研究对象,基于试验室前期单因素试验的结果,采用 Box-Behnken 响应面法试验设计,探究培养温度、初始 pH 和氯化钠添加量 3 因素 3 水平下两两互作对目标菌株产生物胺的影响,确定控制生物胺产量的最优发酵条件。为有效控制发酵肉制品中菌株生物胺产量提供一定的理论基础,在发酵肉制品的传统生产路径上具有一定的实际应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

屎肠球菌 151,分离于传统发酵肉制品,保藏于西南民族大学食品科学与技术学院菌种库。

甲醇、乙腈(纯度≥98%,美国赛默飞世尔科技公司);丙酮、乙醚、碳酸氢钠、氢氧化钠、盐酸、三氯乙酸、蔗糖(分析纯,成都科隆化工试剂厂);谷氨酸钠(分析纯)、丹

磺酰氯、1,7-二氨基庚烷、酪胺、组胺、腐胺、色胺、精胺和亚精胺等标准品(纯度 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); *L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸(色谱纯, 北京索莱宝科技有限公司); MRS 肉汤培养基(青岛海博生物技术有限公司); 苯乙胺和尸胺标准品(色谱纯, 德国 Dr.Ehenstorfer 有限公司); 氯化钠(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); Kromasil C₁₈ 液相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)(瑞典 AKZO NOBEL 公司); MOF-4086S 低温冰箱、MLS-3020 高压蒸汽灭菌锅(日本三洋公司); SW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); DHG-9203A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); GHP-9280 隔水式恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司); HZQ-F160 恒温振荡培养箱(太仓市实验设备厂); Sorvall ST 16 Thermo Scientific 离心机(美国赛默飞世尔科技公司); BSA124S-CW 电子天平(精度 0.001 g, 北京赛多利斯科学仪器有限公司); N-20 干式氮吹仪(山东云网数据科技有限公司); SP-153 涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂有限公司); 318CF 酶标仪(上海沛欧分析仪器有限公司); PHS-3E pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.3 试验方法

在前期单因素试验结果的基础上, 探究培养温度、初始 pH 和氯化钠添加量 3 因素 3 水平两两互作对目标菌株产酪胺和苯乙胺的影响。

1.3.1 屎肠球菌的活化

取屎肠球菌(试验编号 151)的 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻藏菌液 100 μL 加入 5 mL MRS 肉汤培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 150 r/min 培养 24 h 后, 各取 2 mL 活化后的菌液加入 50 mL MRS 肉汤培养基中, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 24 h, 进行扩大培养。

1.3.2 发酵条件响应面试验

取扩大培养后的菌液, 按照 10% (*V:V*)比例分别加入 17 组不同因素水平的 MRS 肉汤培养基中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 24 h, 培养基中添加磷酸吡哆醛 0.05 g/L、苯丙氨酸 1 g/L、酪氨酸 1 g/L。响应面试验设计如表 1 所示。结合张云鹤等^[29]试验方法和试验室前期单因素试验结果, 设置培养温度水平为 10、15、 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 初始 pH 水平为 5.0、5.5、6.0, NaCl 添加量水平为 4.5%、5.5%、6.5%, 将响应面试验设计为 3 因素 3 水平, 以酪胺和苯乙胺含量作为响应值。在 17 组条件下培养, 于 0、24、48 h 3 个时间点取样, 测定苯乙胺和酪胺的产量, 每次试验中指标平行测定 3 次。

1.3.3 生物胺产量的测定

(1) 样品前处理

待测样品的衍生: 依次将 1 mL 饱和碳酸氢钠溶液、100 μL 氢氧化钠溶液(1 mol/L)、1 mL 丹磺酰氯(10 mg/L)

加入待衍生的试样溶液中, 涡旋混匀 1 min 后置于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中衍生 15 min, 取出, 将 100 μL 谷氨酸钠溶液加入其中, 振荡混匀, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 15 min。取出, 冷却至室温, 于每个离心管中加入 1 mL 水, 涡旋混合 1 min, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮吹除去丙酮(约 1 mL), 加入 0.5 g NaCl 涡旋振荡至氯化钠完全溶解后加入 5 mL 乙醚萃取, 涡旋振荡 2 min, 静置分层后, 转移上层有机相(乙醚层)于 15 mL 离心管中, 下层(水相)再萃取一次, 合并两次乙醚萃取液, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干。加入 1 mL 乙腈涡旋振荡使残留物完全溶解, 0.22 μm 滤膜针头滤器过滤于进样小瓶, 待测定。

表 1 响应曲面法试验设计
Table 1 Design of response surface experiment

试验号	因素		
	A 初始 pH	B 培养温度/ $^{\circ}\text{C}$	C NaCl 添加量/%
1	5.0	10	5.5
2	5.0	20	5.5
3	6.0	10	5.5
4	6.0	20	5.5
5	5.5	15	5.5
6	5.5	10	4.5
7	5.5	20	4.5
8	5.5	10	6.5
9	5.5	20	6.5
10	5.5	15	5.5
11	5.5	15	5.5
12	5.5	15	5.5
13	5.5	15	5.5
14	5.0	15	4.5
15	6.0	15	4.5
16	5.0	15	6.5
17	6.0	15	6.5

标准样品的衍生: 分别移取 1 mL 生物胺标准系列溶液(1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100.0 mg/L 的生物胺标准系列溶液), 置于 10 mL 具塞试管中, 依次加入 250 μL 内标使用液(100 mg/L), 以下操作同待测样品的衍生步骤。

(2) 生物胺标准品溶液配制

准确称量酪胺、 β -苯乙胺 2 种生物胺标品 10 mg, 在烧杯内使用 0.1 mol/L 盐酸溶液将标品溶解后转移至容量瓶定容至 10 mL, 将其混匀, 配制成质量浓度为 1000 mg/L 的 2 种生物胺单标准储备液。

使用移液枪吸取 2 种单组分标准储备溶液各 1.0 mL, 用 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至 10 mL, 将其混匀, 制得 100 mg/L 生物胺标准混合使用液。

使用移液枪分别吸取 0、0.10、0.25、0.50、1.00、1.50、2.50、5.00、10.00 mL 上述制得的 100 mg/L 的生物胺标准混合使用液, 然后用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释定容至容量瓶 10 mL 刻度线, 充分混匀, 制得质量浓度为 0.0、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100.0 mg/L 的标准系列溶液。

正确称取 1,7-二氨基庚烷内标标准品 100 mg, 使用 0.1 mol/L 盐酸溶液将其溶解, 定容到 10 mL, 混匀, 配制质量浓度为 10 mg/mL 的内标标准储备溶液。

使用移液枪吸取 1.0 mL 内标标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L 盐酸定容至刻度, 将其充分混匀, 制成 1.0 mg/mL 内标中间使用液。

吸取 2.5 mL 内标标准中间使用液, 用 0.1 mol/L 盐酸稀释定容到 10 mL, 混匀, 制成 25 mg/L 内标使用液。

(3) 色谱条件

色谱柱为 C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 紫外检测波长 254 nm, 进样量 20 μ L, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 流动相 A 为 90%乙腈+10% 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸), 流动相 B 为 10%乙腈+90% 0.01 mol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%乙酸), 流速 0.8 mL/min。梯度洗脱程序见表 2。

(4) 生物胺标准曲线的绘制

将 20 μ L 系列混合标准工作液的衍生液分别注入高效液相色谱仪, 测得目标化合物的峰面积, 以系列混合标准工作液的质量浓度为横坐标(X , mg/L), 以目标化合物的峰面

积与内标的峰面积的比值为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。

表 2 流动相梯度洗脱程序
Table 2 Elution program of mobile phases

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	60	40
22.00	85	15
25.00	100	0
32.00	100	0
32.01	60	40
37.00	60	40

1.4 数据分析

运用 Excel 2010 软件对试验数据进行统计, 数据结果以“平均值 \pm 标准偏差”表示, 采用软件 Origin 2019 绘制条形图, 采用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行显著性分析, 采用 Design Expert 13.0.7 软件进行生物胺响应面分析。

2 结果与分析

2.1 发酵条件响应面试验结果

2.1.1 酪胺与苯乙胺的产量分析

根据单因素试验结果, 选择初始 pH (A)、培养温度 (B)、NaCl 添加量 (C) 作为考察因素, 采用 Design Expert 13.0.7 设计了 3 因素 3 水平试验, 研究其对酪胺与苯乙胺产量的互作影响。试验设计及结果见表 3。

表 3 屎肠球菌响应曲面法试验设计及结果

Table 3 Test design and results of *Enterococcus faecalis* through response surface method

试验号	因素			24 h		48 h	
	A 初始 pH	B 培养温度/ $^{\circ}$ C	C NaCl 添加量/%	酪胺产量/(mg/L)	苯乙胺产量/(mg/L)	酪胺产量/(mg/L)	苯乙胺产量/(mg/L)
1	5.0	10	5.5	203.1221	11.6424	314.0212	11.0682
2	5.0	20	5.5	272.6585	10.9515	407.3583	14.2629
3	6.0	10	5.5	176.9636	11.0069	259.8470	12.0462
4	6.0	20	5.5	255.7729	10.2066	468.8841	15.5029
5	5.5	15	5.5	148.3387	8.7631	308.0252	9.3246
6	5.5	10	4.5	191.3149	9.3760	268.4762	12.3454
7	5.5	20	4.5	275.2225	10.9478	537.1636	17.3127
8	5.5	10	6.5	169.7434	10.2599	287.3320	11.3796
9	5.5	20	6.5	251.5836	10.6003	372.9779	13.0965
10	5.5	15	5.5	143.9798	8.7912	279.6460	9.2564
11	5.5	15	5.5	187.7581	9.5685	305.6625	8.5655
12	5.5	15	5.5	167.6772	8.6161	279.5787	8.6316
13	5.5	15	5.5	172.4688	8.2286	287.6031	9.2039
14	5.0	15	4.5	174.3230	10.1641	284.2143	12.5996
15	6.0	15	4.5	163.6069	9.8748	271.5877	12.5477
16	5.0	15	6.5	153.4980	10.7771	226.2893	9.9556
17	6.0	15	6.5	149.5395	11.7356	238.9066	12.3475

2.1.2 模型方程的建立及显著性分析

(1) 屎肠球菌酪胺产量模型方程的建立及显著性分析

通过 Design-Expert 13.0.7 对表 3 结果进行回归分析, 24 h 酪胺产量分析失拟项显著($P < 0.05$), 无法建立回归方程对酪胺产量进行拟合。48 h 酪胺产量分析失拟项不显著($P > 0.05$), 因此得到屎肠球菌 48 h 酪胺(T_{151})产量的回归方程为:

$$T_{151} = 292.10 + 0.9178 \times A + 82.09 \times B - 29.49 \times C + 28.92 \times AB + 6.31 \times AC - 45.76 \times BC - 20.41 \times A^2 + 90.83 \times B^2 - 16.45 \times C^2$$

对二次回归方程进行方差分析, 显著性分析如表 4 和表 5 所示。

表 4 屎肠球菌 48 h 酪胺产量响应面拟合模型方差分析

Table 4 Variance analysis of a fitted model for the production of tyramine from *Enterococcus faecalis* at 48 h through response surface method

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	
模型	1.092E+05	9	12132.18	57.0600	<0.0001	显著
A	6.74	1	6.74	0.0317	0.8637	
B	53908.11	1	53908.11	253.5600	<0.0001	**
C	6958.23	1	6958.23	32.7300	0.0007	**
AB	3346.62	1	3346.62	15.7400	0.0054	**
AC	8376.04	1	8376.04	39.4000	0.0004	**
BC	159.31	1	159.31	0.7493	0.4154	
A ²	34738.17	1	34738.17	163.3900	<0.0001	**
B ²	1753.41	1	1753.41	8.2500	0.0239	*
C ²	1138.95	1	1138.95	5.3600	0.0538	
残差	1488.24	7	212.61			
失拟值	718.58	3	239.53	1.2400	0.4042	不显著
纯误差	769.66	4	192.42			
总差	1.107E+05	16				

注: *代表差异显著($P < 0.05$); **代表差异极显著($P < 0.01$), 表 6 同。

表 5 酪胺产量模型的适配度统计值

Table 5 Fit statistics of the production of tyramine

标准差	14.58	R ²	0.9866
误差	317.50	校正 R ²	0.9693
变异系数/%	4.59	预测 R ²	0.8853
		信噪比	27.3000

(2) 屎肠球菌苯乙胺产量模型方程的建立及显著性分析

通过 Design-Expert 13.0.7 对表 3 结果进行回归分析, 24 h 苯乙胺产量显著性分析失拟项显著($P < 0.05$), 无法建立回归方程对生物胺产量进行拟合。48 h 苯乙胺产量分析失拟项不显著($P > 0.05$), 得到屎肠球菌 48 h 苯乙胺(P_{151})产量的回归方程为:

$$P_{151} = 9 + 0.5698 \times A + 1.67 \times BC + 0.0655 \times AB + 0.6109 \times AC - 0.8126 \times BC + 1.28 \times A^2 + 2.95 \times B^2 + 1.59 \times C^2$$

对二次回归方程进行方差分析, 显著性分析如表 6 和表 7 所示。

表 6 屎肠球菌 48 h 苯乙胺产量响应面拟合模型方差分析

Table 6 Variance analysis of a fitted model for the production of phenylethylamine from *Enterococcus faecalis* at 48 h through response surface method

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	
模型	96.36	9	10.71	61.3200	<0.0001	显著
A	2.60	1	2.60	14.8700	0.0062	**
B	22.23	1	22.23	127.3200	<0.0001	**
C	8.05	1	8.05	46.1200	0.0003	**
AB	0.0172	1	0.02	0.0983	0.7630	
AC	2.64	1	2.64	15.1300	0.0060	**
BC	1.49	1	1.49	8.5500	0.0222	*
A ²	36.57	1	36.57	209.4800	<0.0001	**
B ²	6.86	1	6.86	39.2900	0.0004	**
C ²	10.64	1	10.64	60.9500	0.0001	**
残差	1.22	7	0.17			
失拟值	0.6851	3	0.23	1.7000	0.3037	不显著
纯误差	0.5371	4	0.13			
总差	97.58	16				

表 7 苯乙胺产量模型的适配度统计值

Table 7 Fit statistics of the production of phenylethylamine

标准差	0.4178	R ²	0.9875
误差	11.73	校正 R ²	0.9714
变异系数/%	3.56	预测 R ²	0.8791
		信噪比	25.0252

从表 4~7 可以看出, 屎肠球菌培养 48 h 后酪胺和苯乙胺产量模型都是 $P < 0.0001$, 说明模型各因素关系极显著; 失拟项 $P > 0.05$, 表现为不显著, 说明模型回归方程能够反映酪胺和苯乙胺的产量与各因素的关系。在影响屎肠球菌产酪胺的因素中, 通过观察 P 可知, 影响从大到小分别是培养温度 > NaCl 添加量 > 初始 pH, AB、AC 的交互影响显著 ($P < 0.01$), BC 两因素交互不显著 ($P > 0.05$), 因素 A²、B² 对响应值的曲面效果全部显著 ($P < 0.05$), C² 对响应值的曲面效果不显著 ($P > 0.05$)。在影响屎肠球菌产苯乙胺的因素中, 影响从大到小分别是培养温度 > NaCl 添加量 > 初始 pH, AC、BC 的交互影响显著 ($P < 0.05$), AB 两因素交互不显著 ($P > 0.05$), 因素 A²、B²、C² 对响应值的曲面效果全部极显著 ($P < 0.01$)。模型中酪胺 R²=0.9866, 校正 R²=0.9693, 模型中苯乙胺 R²=0.9875, 校正 R²=0.9714, 说明有 96.93% 和 97.14% 试验数据可变性可用此模型来解释, 表明两个回归方程的拟合度良好。

2.1.3 两因素交互作用的响应面分析

通过 Design-Expert 13.0.7 软件处理, 得到 48 h 屎肠球

菌生物胺产量的等高线及响应曲面图，见图 1~2。通过方差分析对具有显著交互作用因素的等高线和响应面图进行

分析，可直观、深入地探讨相关变量之间交互作用的影响，找到最佳交互点^[30]。

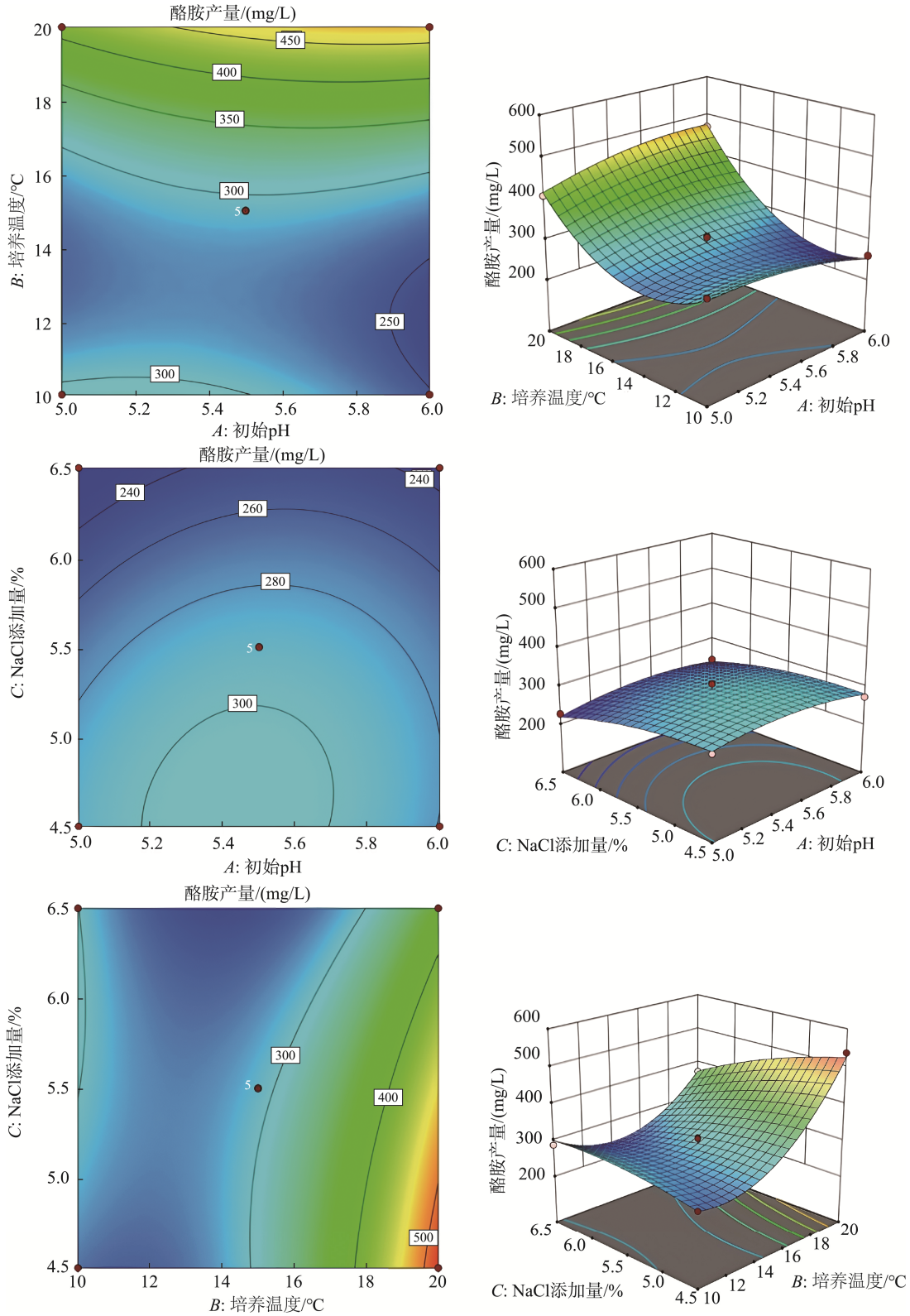


图 1 酪胺产量响应面优化等高线图和 3D 图
Fig.1 Contour plot and 3D plot of response surface optimization of tyramine production

(1)酪胺产量响应面优化分析

从图 1 可以看出, 培养温度的影响比初始 pH 高, NaCl 添加量的影响比初始 pH 高, 培养温度的影响比 NaCl 添加量高。各因素对屎肠球菌产酪胺影响大小为培养温度>NaCl 添加量>初始 pH, 与方差分析结果相符。

从表 4 和图 1 可以看出, 交互项 AB 和 AC 极显著

($P < 0.01$), BC 不显著($P > 0.05$), 说明它们之间交互作用对酪胺产量影响均较大, 各因素间交互作用对屎肠球菌产酪胺影响大小为 $AC > AB > BC$ 。

(2)苯乙胺产量响应面优化分析

从图 2 可以看出, 培养温度的影响比初始 pH 高; NaCl 添加量的影响比初始 pH 高; 培养温度的影响比 NaCl 添

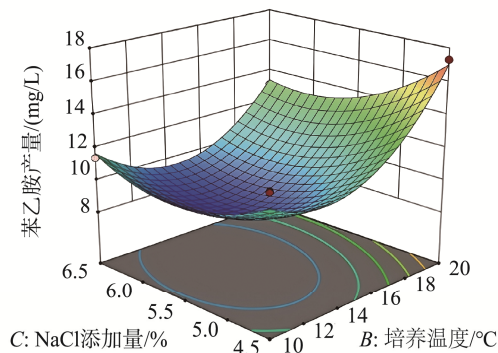
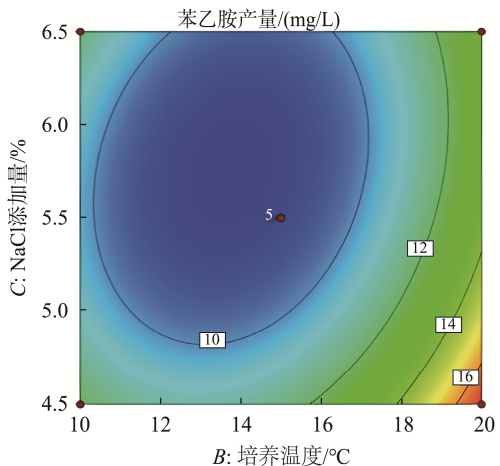
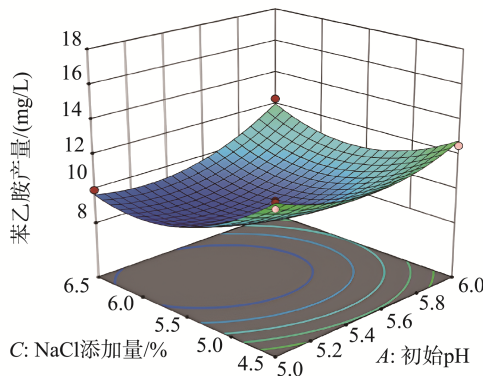
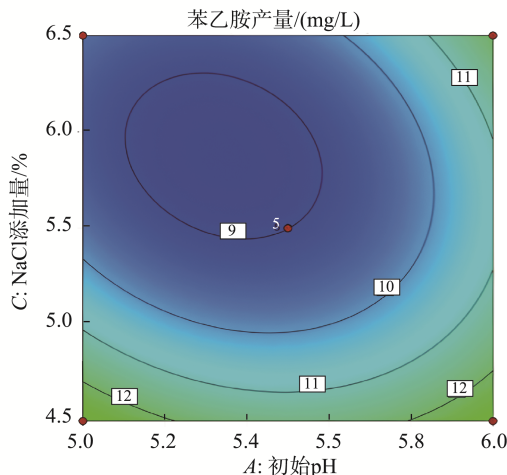
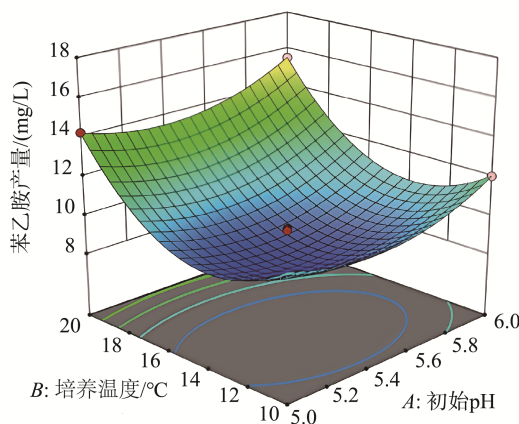
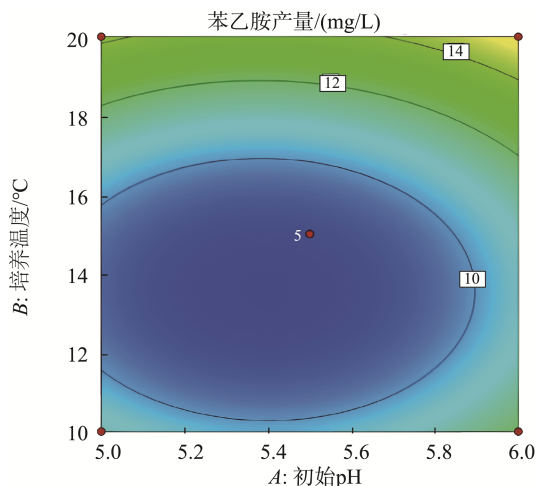


图 2 苯乙胺产量响应面优化等高线图和 3D 图

Fig.2 Contour plots and 3D plots of response surface optimization of phenylethylamine production

加量高。各因素对屎肠球菌产苯乙胺影响大小为培养温度>NaCl 添加量>初始 pH, 与方差分析结果相符。

从表 6 和图 2 可以看出, 交互项 AC 极显著($P<0.01$), BC 显著($P<0.05$), AB 不显著($P>0.05$), 说明它们之间交互作用对苯乙胺产量影响均较大, 各因素间交互作用对屎肠球菌产苯乙胺影响大小为 $AC>BC>AB$ 。

2.1.4 响应面优化参数验证结果

通过 Design-Expert 13.0.7 设计和试验得到控制屎肠球菌酪胺产量的优化条件为: 初始 pH 6.0、培养温度 10.9 °C、NaCl 添加量 4.5%, 在此条件下酪胺产量为 211.961 mg/L。控制屎肠球菌苯乙胺产量的优化条件为: 初始 pH 5.34、培养温度 13.8 °C、NaCl 添加量 5.8%, 在此条件下, 苯乙胺产量为 8.560 mg/L。考虑到试验的可行性, 将参数数值保留在 1 位小数, 在最优条件下进行验证试验, 重复试验 3 次, 3 次酪胺实测值的平均值为 198.900 mg/L, 3 次苯乙胺实测值的平均值为 7.297 mg/L, 与预测值偏差小, 说明该模型能较好地预测屎肠球菌产酪胺和苯乙胺的情况, 具有一定的实际应用价值。

近年来, 国内外已经有很多学者对影响食品中生物胺含量的因素进行了研究, 发现高发酵温度环境促进生物胺的产生^[22], 环境系统的 pH 降低时, 屎肠球菌的生物胺产量增高^[27], 含盐量高的发酵肉的生物胺含量比含盐量低的发酵肉低^[28], 可见, 在低温、高盐和弱酸环境下, 能有效控制屎肠球菌生物胺产量。本研究结果也表明初始 pH、培养温度和 NaCl 添加量在影响生物胺产量中起着重要的作用, 经过条件优化后, 得到了控制屎肠球菌产酪胺和苯乙胺的优化发酵条件, 即培养温度低于 15 °C、NaCl 添加量高于 4.5%, 初始 pH 在 5.3~6.0 范围内。发酵香肠在实际制作中, 温度一般控制在 10~20 °C, 初始 pH 在 5.3~6.0 的范围内, NaCl 的添加量在 2.5% 左右^[31-32]。本研究所得屎肠球菌的发酵条件基本满足实际情况, pH 和温度能够灵活调控在需要范围内, 但 NaCl 添加量对于实际生产偏高。对于屎肠球菌, NaCl 添加量越高, 屎肠球菌脱水死亡, 产胺量也随之降低, 然而在发酵香肠实际生产中, NaCl 含量不宜过高, 后期还可以进一步优化 NaCl 使用量。

3 结论

本研究在添加磷酸吡哆醛、苯丙氨酸和酪氨酸的 MRS 肉汤培养基中, 探究培养温度、初始 pH 和 NaCl 添加量对屎肠球菌产生物胺的影响。在前期单因素试验的基础上, 设计 3 因素 3 水平 Box-Behnken 响应面试验, 结果分别得到屎肠球菌 48 h 时酪胺和苯乙胺产量的回归方程, 模型中酪胺 $R^2=0.9866$, 校正 $R^2=0.9693$, 模型中苯乙胺 $R^2=0.9875$, 校正 $R^2=0.9714$, 影响酪胺和苯乙胺产量的顺序均为培养温度>NaCl 添加量>初始 pH。经模型预测和验证试验得到控制屎肠球菌酪胺产量的优化条件为初始 pH

6.0、培养温度 10.9 °C、NaCl 添加量 4.5%, 控制屎肠球菌苯乙胺产量的优化条件为初始 pH 5.34、培养温度 13.8 °C、NaCl 添加量 5.8%。试验结果为生物胺的有效控制提供了参考依据, 在发酵肉制品等发酵食品的生产工艺上具有一定的实际应用价值。

参考文献

- [1] 李晓宏. 发酵香肠中生物胺的形成、抑制以及微生物多样性分析[D]. 太原: 山西农业大学, 2018.
LI XH. Formation, inhibition and microbial diversity analysis of biogenic amines in fermented sausage [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2018.
- [2] 杨姗姗, 张凤艳, 蒋万枫, 等. 发酵酒中生物胺的研究进展[J]. 中国酿造, 2022, 41(3): 18-23.
YANG SS, ZHANG FY, JIANG WF, *et al.* Research progress of biogenic amines in fermented alcoholic drink [J]. China Brewing, 2022, 41(3): 18-23.
- [3] LUO QQ, SHI RY, GONG PF, *et al.* Biogenic amines in Huangjiu (Chinese rice wine): Formation, hazard, detection, and reduction [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 168: 113952
- [4] 冯雅蓉, 马俪珍. 生物胺对食品安全和人类健康的重要性[J]. 肉类研究, 2005(12): 25-28.
FENG YR, MA LZ. The importance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Meat Research, 2005(12): 25-28.
- [5] RUIZ-CAPILLAS C, HERRERO AM. Impact of biogenic amines on food quality and safety [J]. Foods, 2019, 8(2): 62.
- [6] KE RH, WEI ZS, BOGDAL C, *et al.* Profiling wines in China for the biogenic amines: A nationwide survey and pharmacokinetic fate modelling [J]. Food Chemistry, 2018, 250: 268-275.
- [7] BRINK BT, DAMINK C, JOOSTEN HM, *et al.* Occurrence and formation of biologically active amines in foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 1990, 11(1): 73-84.
- [8] 蒙菊. 酸鱼典型产胺微生物菌株产胺效应研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
MENG J. Amine-producing effects of typical amine-producing microorganism strains of Suanyu [D]. Guiyang: Guizhou University, 2020.
- [9] ALVES SP, ALFAIA CM, ŠKRBIĆ BD, *et al.* Screening chemical hazards of dry fermented sausages from distinct origins: Biogenic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy elements [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 59: 124-131.
- [10] LINARES DM, DEL RB, REDRUELLO B, *et al.* Comparative analysis of the *in vitro* cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine [J]. Food Chemistry, 2016, 197(Pt A): 658-663.
- [11] 卢士玲. 传统中式香肠中生物胺产生及其控制技术的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
LU SL. Study on biogenic amine production and control technology in traditional Chinese sausage [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [12] WU YY, CHEN YF, LI LH, *et al.* Study on biogenic amines in various dry salted fish consumed in China [J]. Journal of Ocean University of China, 2016, 15(4): 681-689.

- [13] LATORRE-MORATALLA ML, COMAS-BASTÉ O, BOVER-CID S, *et al.* Tyramine and histamine risk assessment related to consumption of dry fermented sausages by the Spanish population [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 99: 78–85.
- [14] MARCOBAL A, BLANCA D, LANDETE JM, *et al.* Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria [J]. *Food Science and Nutrition*, 2012, 52(5): 448–467.
- [15] SUZZI G, GARDINI F. Biogenic amines in dry fermented sausages: A review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88(1): 41–54.
- [16] ÖZOGUL F, ÖZOGUL Y. The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures [J]. *European Food Research and Technology*, 2007, 225: 385–394.
- [17] KULEY E, ZOGUL F. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1163–1168.
- [18] DABADE DS, JACXSENS L, MICLOTTE L, *et al.* Survey of multiple biogenic amines and correlation to microbiological quality and free amino acids in foods [J]. *Food Control*, 2021, 120(2): 107497.
- [19] 李亚伟. 雪菊精油微胶囊对熏马肠中产苯乙胺TDC基因表达及产苯乙胺影响[D]. 石河子: 石河子大学, 2021.
- LI YZ. Effect of microcapsules of snow chrysanthemum essential oil on the expression of phenylethylamine TDC gene and the production of phenylethylamine in smoked horse sausage [D]. Shihezi: Shihezi University, 2021.
- [20] LADERO V, FERNÁNDEZ M, CALLES-ENRÍQUEZ M, *et al.* Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci [J]. *Food Microbiology*, 2012, 30(1): 132–138.
- [21] 舒蕊华, 卢士玲, 徐幸莲. 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)产生物胺交互作用研究[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(6): 16.
- SHU RH, LU SL, XU XL. Interaction of biogenic amine between *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2011, 37(6): 16.
- [22] 王蒙蒙, 张莉, 李慧, 等. 粪肠球菌生长曲线的测定及其对小鼠脑组织的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(4): 1041.
- WANG MM, ZHANG L, LI H, *et al.* Determination of growth curve of *Enterococcus faecalis* and its effect on brain tissue of mice [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018, 45(4): 1041.
- [23] JIA TT, YU Z. Effect of temperature and fermentation time on fermentation characteristics and biogenic amine formation of oat silage [J]. *Fermentation*, 2022, 8(8): 352.
- [24] LORENZO C, BORDIGA M, PEREZ-ALVAREZ EP, *et al.* The impacts of temperature, alcoholic degree and amino acids content on biogenic amines and their precursor amino acids content in red wine [J]. *Food Research International*, 2017, 99(1): 328–335.
- [25] 刘海燕, 李应彪, 周海珍, 等. 发酵肉制品中生物胺的影响因素及控制技术[J]. *肉类工业*, 2009(1): 13.
- LIU HY, LI YB, ZHOU HZ, *et al.* Influencing factors and control techniques of biogenic amines in fermented meat products [J]. *Meat Industry*, 2009(1): 13.
- [26] 李冉冉. 低钠盐腊肉中生物胺的动态变化与控制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- LI RR. Study on dynamic change and control of biogenic amines in low-sodium cured meat [D]. Chongqing: Southwest University, 2020.
- [27] MARCOBAL A, BLANCA D, LANDETE JM, *et al.* Tyramine and phenylethylamine biosynthesis by food bacteria [J]. *Food Science and Nutrition*, 2012, 52(5): 448–467.
- [28] 卢士玲, 李开雄, 徐幸莲, 等. 环境因素对屎肠球菌产苯乙胺和酪胺的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(10): 57–62.
- LU SL, LI KX, XU XL, *et al.* Effects of environmental factors on production of phenethylamine and tyramine by *Enterococcus faecium* [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2012, 38(10): 57–62.
- [29] 张云鹤, 角攀伟, 胡永金, 等. 响应面法优化控制粪肠球菌发酵产酪胺的研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2021, 36(5): 872–879.
- ZHANG YH, JIAO PW, HU YJ, *et al.* Study on the optimal control of tyramine production by *Enterococcus faecalis* fermentation by response surface method [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2021, 36(5): 872–879.
- [30] 王丹. 发酵型牡蛎饮料的研制[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- WANG D. Development of fermented oyster beverage [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [31] 吴双慧, 杨梓垚, 牛茵, 等. 复配发酵剂对发酵香肠的品质及挥发性风味的影响[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(5): 126–133.
- WU SH, YANG ZY, NIU Y, *et al.* Effects of mixed starter culture on quality and volatile flavor of fermented sausages [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(5): 126–133.
- [32] QIAN C, BAO HK, QI H. The role of bacterial fermentation in lipolysis and lipid oxidation in Harbin dry sausages and its flavour development [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 77: 389–396.

(责任编辑: 安香玉 于梦娇)