

不同初始 pH 对枯草芽孢杆菌发酵虾副产物的影响

汪 诚¹, 邹小雨¹, 王家星², 宋 茹^{1*}

(1. 浙江海洋大学食品与药学学院, 舟山 316022; 2. 浙江省海洋开发研究院, 舟山 316021)

摘 要: 目的 探讨初始发酵 pH 对枯草芽孢杆菌发酵虾副产物的组胺含量和发酵液抗氧化活性调节作用。

方法 中华管鞭虾加工副产物灭菌后接种枯草芽孢杆菌, 在 37℃ 下进行发酵, 添加适量葡萄糖, 调节初始发酵 pH 7.0~10.0, 测定发酵 1~7 d 时组胺含量、pH、肽浓度和氨基酸态氮(amino acid nitrogen, AA-N)含量动态变化和发酵液的抗氧化活性, 分析各指标间相关性。**结果** 添加 5%葡萄糖液可显著抑制组胺生成, 初始发酵 pH 影响发酵液组胺和 AA-N 含量, 其中初始发酵 pH 10.0 发酵 6 d 时组胺的含量低至(17.54±2.64) mg/100 mL, 而 AA-N 含量则提高到(0.81±0.02) g/100 mL。而且, 初始发酵 pH 10.0 的发酵液具有很强的清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基、总抗氧化能力及清除羟基自由基能力。Pearson 相关分析得出发酵液的组胺含量与肽浓度呈极显著正相关($P<0.01$), 与 AA-N 含量、羟自由基清除能力和总抗氧化能力呈显著负相关($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** 中华管鞭虾加工副产物接种枯草芽孢杆菌后调节初始发酵 pH 10.0, 有效降低了发酵液的组胺含量, 提高了发酵液的 AA-N 含量和抗氧化活性, 为高品质虾加工副产物发酵制品的开发提供了技术依据。

关键词: 虾加工副产物; 枯草芽孢杆菌; 发酵初始 pH; 组胺; 氨基酸氮; 抗氧化性

Effects of different initial pH on shrimp by-products fermentation incubated with *Bacillus subtilis*

WANG Cheng¹, ZOU Xiao-Yu¹, WANG Jia-Xing², SONG Ru^{1*}

(1. School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;
2. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316021, China)

ABSTRACT: Objective To explore the regulatory effects of initial pH on histamine production and antioxidant activity of shrimp by-products fermentation incubated with *Bacillus subtilis*. **Methods** After sterilization, the by-products of *Penaeus sinensis* processing were inoculated with *Bacillus subtilis* and added with appropriate amount of glucose under 37℃ for fermentation. Then, the initial pH of fermentation was adjusted to 7.0–10.0, and the dynamic changes of histamine content, pH, peptide concentration and amino acid nitrogen (AA-N) content were investigated during 1–7 days of fermentation, as well as the antioxidant activity was determined. Furthermore, the associations between various indicators were analyzed. **Results** The addition of 5% glucose solution significantly inhibited the production of histamine. The initial fermentation pH affected the content of histamine and AA-N. When the initial fermentation pH was controlled at 10.0, the histamine content of fermentation was as low as (17.54±2.64) mg/100 mL

基金项目: 舟山市科技局项目(2021C21004)

Fund: Supported by the Project of Zhoushan Science and Technology Bureau (2021C21004)

*通信作者: 宋茹, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: rusong@zjou.edu.cn

*Corresponding author: SONG Ru, Ph.D, Professor, School of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, No.1, Haida South Road, Lincheng District, Zhoushan 316022, China. E-mail: rusong@zjou.edu.cn

after 6 days fermenting, while the AA-N content was increased to (0.81 ± 0.02) g/100 mL. Moreover, the fermentation with initial fermentation pH of 10.0 demonstrated strong 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging rate, total antioxidant capacity and hydroxyl radical scavenging capacity. Pearson correlation analysis showed that the histamine content of fermentation was significantly positively correlated with the peptide concentration ($P < 0.01$), while negatively associated with AA-N content, hydroxyl radical scavenging capacity and total antioxidant capacity ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** In the fermentation of *Penaeus sinensis* processing by-products incubated with *Bacillus subtilis*, adjusting the initial fermentation pH 10.0 can reduce the histamine content and increase the AA-N content and the antioxidant activity. These results can provide a technical basis for the development of high quality fermented products derived from shrimp processing by-products.

KEY WORDS: shrimp processing by-products; *Bacillus subtilis*; initial fermentation pH; histamine; amino acid nitrogen; antioxidant activity

0 引言

中华管鞭虾(*Solenocera crassicornis*)营养丰富、味甜鲜美,是我国一种重要的海捕虾和经济虾,大部分被加工成虾仁出口^[1]。中华管鞭虾在加工和食用过程中会产生虾头、虾壳等大量副产物,重量约占自重的 40%~60%,目前主要被用作低值饲料原料^[2]。但是,虾加工副产物富含甲壳素、蛋白质、磷脂和虾青素等营养物质^[3],应进一步精深加工充分挖掘其经济价值。如徐坤华^[4]报道了中华管鞭虾的虾头不仅蛋白质含量高,而且氨基酸组成全面,其中必需氨基酸指数高达 86.72,且富含甜味、鲜味氨基酸,利用虾头制备了海鲜调味基料。

发酵是我国的一种传统食品加工技术,通过微生物发酵作用可将营养物质降解为易消化吸收小分子,同时产生不同类型发酵香味等^[5-7]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)属于芽孢杆菌属,能分泌蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等酶系,具有很强的环境适应能力、广谱抗菌性,且不具有致病性,因此被广泛用于食品发酵行业^[8-11]。近年来,采用枯草芽孢杆菌发酵水产品加工副产物的研究受到广泛关注,如刘杨柳等^[12]利用枯草芽孢杆菌发酵蟹壳粉制备蛋白酶;梁宝东等^[13]采用枯草芽孢杆菌发酵鱼鳞提取胶原蛋白;ZHANG 等^[14]采用枯草芽孢杆菌和植物乳杆菌连续共发酵一步法提取虾壳甲壳素。但是,水产品发酵过程中易产生组胺等有毒物质,严重影响水产食品安全性^[15]。选用组氨酸含量低的水产原料用于发酵产品制备,合理控制发酵条件,如发酵温度和时间等,可有效降低发酵水产品的组胺含量^[16]。水产品发酵 pH 不仅影响组胺产生菌的生长繁殖速度,而且与组胺生成密切相关的组胺酸脱羧酶活性也受环境 pH 影响^[17]。因此,合理控制 pH 有利于降低发酵水产品的组胺含量。但是,通过调控初始发酵 pH 改变枯草芽孢杆菌发酵水产品加工副产物组胺含量和发酵液抗氧化活性的研究还少见报道。

本研究以中华管鞭虾加工副产物为底物,在研究发酵中摇床转速、发酵时间和葡萄糖添加量对枯草芽孢杆菌生长影响基础上,系统检测不同初始发酵 pH 下,发酵液的组胺含量、肽浓度、氨基酸态(amino acid nitrogen, AA-N)含量及发酵液的抗氧化性动态变化情况,通过指标间关联性分析揭示肽浓度、AA-N 含量和抗氧化性对组胺含量影响,以期为枯草芽孢杆菌发酵中华管鞭虾加工副产物的应用奠定理论基础,同时为其他水产品加工副产物降组胺研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

中华管鞭虾,购自舟山水产市场,手工剥掉虾头和虾壳,将上述副产物混合后打碎成浆,分装, -20°C 冻藏;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*) (CICC 10023),购于中国工业微生物保藏管理中心。

总抗氧化能力检测试剂盒(比色法)、羟自由基检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司);三氯乙酸、亚硝酸钠、盐酸、一水合硫酸锰、氯化钠、四硼酸钠、冰乙酸、氢氧化钠、无水乙醇、硫酸铵(分析纯)、蛋白胨、牛肉浸膏(生化试剂)、谷胱甘肽(纯度 $\geq 99\%$)(国药集团化学试剂有限公司);无水乙酸钠、邻苯二甲醛(ortho-phthalaldehyde, OPA)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、十二烷基硫酸钠、 β -巯基乙醇、对氨基苯磺酸钠(分析纯)、盐酸组胺(纯度 99%)(上海阿拉丁生化科技有限公司)。

1.2 主要仪器与设备

ZQZY-78CN 型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);H1850 型高速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);HZK-FA210 型电子天平(精度 0.1 mg, 华志电子科技有限公司);PHB-4 型便携式 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);Synergy H1 多功能微孔板检测仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种活化

取 100 μL 菌悬液(保存在液体石蜡中)至 10 mL 灭菌营养肉汤培养基中(含牛肉浸膏 0.75 g、蛋白胨 1.25 g、氯化钠 1.25 g、一水合硫酸锰 1.10 mg、纯水 250 mL, 调节 pH 7.0, 121 $^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 15 min), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱复苏 24 h, 然后取 100 μL 复苏菌液在 10 mL 营养肉汤培养基中继续活化 12 h, 达到 OD_{600} 值 0.17~0.20 后作为种子液, 备用。

1.3.2 枯草芽孢杆菌发酵条件研究

在 250 mL 锥形瓶中加入 15 g 中华管鞭虾加工副产物(破碎成糜状)和 35 mL 纯水, 经 121 $^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 15 min, 按照 5%接种量加入枯草芽孢杆菌种子液, 固定发酵温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 考察摇床转速(140、160、180、200 和 220 r/min)和发酵天数(1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 d)对枯草芽孢杆菌生长繁殖影响, 确定合适的摇床转速和发酵天数。然后, 固定摇床转速和发酵天数, 研究无菌葡萄糖液(质量浓度 50%)添加量(0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%)对枯草芽孢杆菌生长繁殖及发酵液组胺含量影响, 确定发酵底物中葡萄糖液适宜添加量。

在上述实验结果基础上, 固定摇床转速 180 r/min 和葡萄糖液添加量 5%, 进一步研究发酵不同初始 pH(未调节、pH 7.0、8.0、9.0、10.0)和不同发酵时间(0、1、2、3、4、5、6 和 7 d)下发酵液组胺含量、pH、肽浓度和 AA-N 含量变化。同时, 测定发酵液的 DPPH 自由基清除率、总抗氧化能力和羟自由基清除能力。同条件下, 未接种枯草芽孢杆菌的中华管鞭虾加工副产物各指标测定值作为对照。

1.3.3 发酵液 pH 测定

采用 pH 计测定。

1.3.4 发酵液组胺含量测定

参照赵宇明^[15]方法适当改进, 具体如下: 取 0.5 mL 发酵上清液, 加入 2 mL 三氯乙酸溶液(100 g/L), 涡旋振荡约 5 min 后用 250 g/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 5.00 $\pm$ 0.05, 再用纯水定容到 10 mL (V_1), 备用。准确吸取 0.5 mL (V_2) 备用液于 10 mL 离心管中, 用去离子水补至 2.5 mL, 加入 2.5 mL 对氨基苯磺酸钠稀碱溶液和 0.15 mL 亚硝酸钠盐酸溶液, 涡旋振荡 5 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 15 min 后测定 450 nm 下吸光值, 组胺含量按照公式(1)计算:

$$\text{组胺含量}/(\text{mg}/100 \text{ mL}) = \frac{100 m}{1000 M \times V_2 / V_1} \quad (1)$$

其中, m 为发酵液组胺质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); M 为发酵液体积(0.5 mL); V_1 为发酵液定容体积(10 mL); V_2 为定容后测定用体积(0.5 mL)。

取组胺标准溶液(0~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.5 mL, 经上述相同条件处理后, 测定 450 nm 吸光值, 以组胺标准品质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标, 吸光值(Y)为纵坐标, 得到组胺标准曲线方程为 $Y=0.0082X+0.0011$, $r^2=0.9993$ 。

1.3.5 肽浓度测定

参考课题组冀雪莉^[18]方法, 结果以 mg/mL 计。

1.3.6 AA-N 含量测定

按照 GB 5009.235—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》中比色法测定, 结果以 $\text{g}/100 \text{ mL}$ 计。

1.3.7 发酵液抗氧化活性研究

DPPH 自由基清除: 参照 BERSUDER 等^[19]方法略加修改: 发酵上清液、无水乙醇和 0.02% DPPH 无水乙醇液, 按体积比 1:4:1 混合, 室温下避光放置 60 min, 无水乙醇调零, 测定 517 nm 处吸光值($A_{\text{样品}}$)。等体积无水乙醇代替样品、等体积无水乙醇代替 0.02% DPPH 无水乙醇液在同样条件下测定的吸光值分别记作 $A_{\text{对照}}$ 和 $A_{\text{样品空白}}$, DPPH 自由基清除率计算如公式(2)。

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (2)$$

总抗氧化能力: 采用总抗氧化能力检测试剂盒测定, 结果用 U/mL 表示。

羟自由基清除能力: 采用羟自由基检测试剂盒测定, 结果用 U/mL 表示。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS 19.0 软件分析, 应用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)和邓肯法(Duncan's)对实验数据进行统计分析。使用 Origin 2018 软件绘制图形, 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示($n=3$)。采用 Pearson 相关系数表示各指标间相关性, *和**分别表示 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 发酵条件对枯草芽孢杆菌繁殖影响

不同摇床转速、发酵时间和葡萄糖液添加量下, 枯草芽孢杆菌的生长繁殖情况如图 1 所示。

通常采用测定吸光值的方式来反映菌体生长繁殖情况, 吸光度值越高代表菌液浓度越大, 即: 菌体生长繁殖得快^[20]。图 1A 结果显示, 当摇床转速达到 180 r/min 时, 菌液吸光值达到 0.334, 显著高于低转速下的吸光值($P<0.05$), 而当转速高于 180 r/min 时, 菌体生长趋于平稳($P>0.05$)。上述结果表明适当提高摇床转速, 有助于增加发酵体系的溶氧量, 从而促进枯草芽孢杆菌的生长繁殖, 实验选择 180 r/min 用于后续发酵实验。图 1B 结果显示, 枯草芽孢杆菌无延滞期, 说明种子液活力强, 在前 6 d 处于对数期, 而后 6~8 d 时处于稳定期, 从第 9 d 开始进入衰亡期, 为了最大化利用枯草芽孢杆菌发酵分解能力, 后续发酵时间不宜超过 8 d。从图 1C 可以看出, 在发酵底物中添加葡萄糖有助于枯草芽孢杆菌的快速生长繁殖, 与添加的葡萄糖为菌体生长提供充足碳源有关。当葡萄糖液添加量为 5%时, 枯草芽孢杆菌生长繁殖效果最好, 之后加大葡萄糖液添加量并未进一步提高菌体繁殖速度($P>0.05$)。

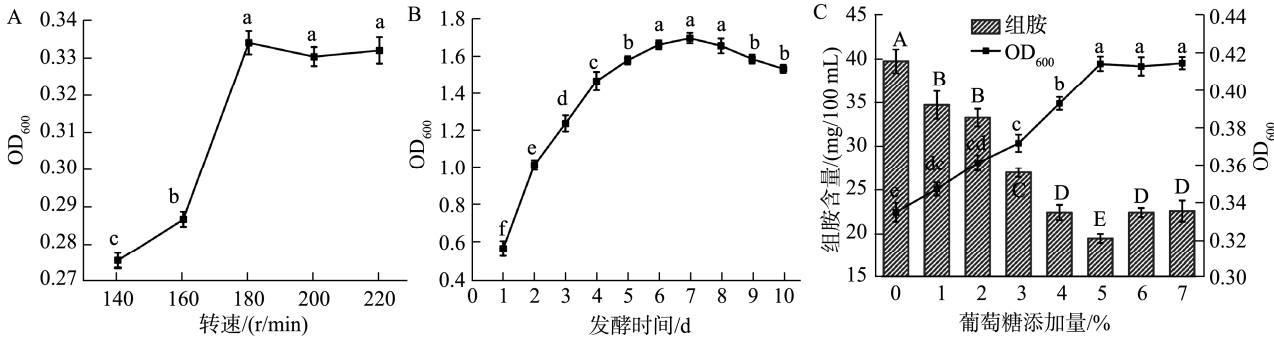


图 1 不同发酵条件下枯草芽孢杆菌的生长情况($n=3$)
Fig.1 Growth of *Bacillus subtilis* under different fermentation conditions ($n=3$)

发酵水产品常常含有生物胺等有害物质，特别是组氨酸本底值高的水产品，在组氨酸脱羧酶的作用下生成组胺，严重影响发酵水产品的质量及安全性^[21-22]。发酵中添加葡萄糖，除了供给菌体生长繁殖所需碳源外，还能改变微生物群落组成或产胺氧化酶菌的生长繁殖，实现降低发酵液组胺含量作用^[23-24]。本研究采用枯草芽孢杆菌纯种发酵中华管鞭虾加工副产物，考察了葡萄糖添加量对发酵液中组胺含量影响。从图 1C 可以看出，添加葡萄糖能显著降低发酵液的组胺含量，且随着葡萄糖添加量的增加组胺含量降低显著。当葡萄糖液添加量为 5% 时，发酵液组胺含量降至 (19.41 ± 0.51) mg/100 mL，比空白组(未添加葡萄糖)组胺 $[(39.73\pm1.36)$ mg/100 mL]降低了 51.15%，降组胺效果显著高于其他葡萄糖添加组($P<0.05$)。本研究结果与莫星忱等^[23]报道的发酵虾头酱添加 2%~6% 葡萄糖降低 43%~58% 组胺结果一致，MAH 等^[25]也报道在发酵鲢鱼

时添加 5% 葡萄糖组胺比空白对照组降低了 41.71%。值得注意的是，在葡萄糖液添加量为 5% 时，枯草芽孢杆菌的生长繁殖处于高水平，推测枯草芽孢杆菌纯种发酵降低中华管鞭虾加工副产物发酵液的组胺含量，可能与枯草芽孢杆菌分泌胺氧化酶有关，具体原因有待于后续实验进一步深入探究。

2.2 不同初始发酵 pH 下发酵液的组胺含量及相关指标动态变化

pH 会影响发酵微生物的生长繁殖速度，进而会影响发酵微生物酶系的分泌和发酵程度，而且组胺的生成也与 pH 有关^[23,26]。本研究在固定摇床转速 180 r/min 和葡萄糖液添加量 5% 条件下，探究不同初始发酵 pH 下枯草芽孢杆菌发酵中华管鞭虾加工副产物的组胺含量变化，以及 pH、肽浓度和 AA-N 含量动态变化情况，结果见图 2。

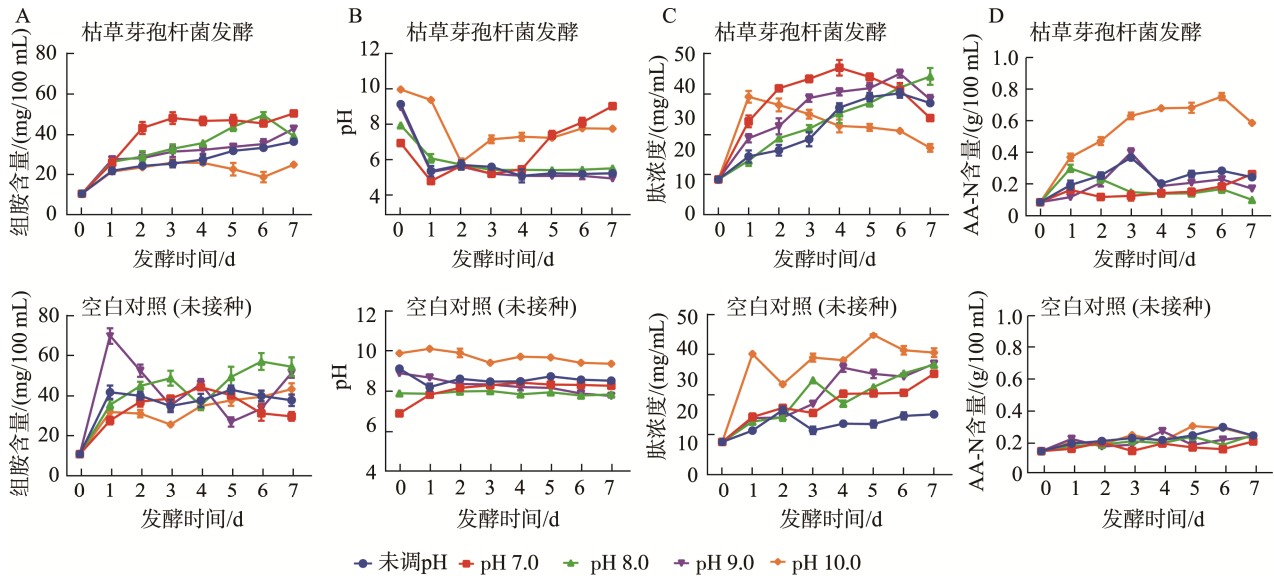


图 2 不同初始发酵 pH 下发酵液的组胺含量及相关指标动态变化($n=3$)

Fig.2 Dynamic changes in histamine content and related indicators of fermentation broth under different initial fermentation pH ($n=3$)

2.2.1 不同初始发酵 pH 下发酵液的组胺含量动态变化

发酵初始 pH 7.0~10.0 下,中华管鞭虾加工副产物发酵液中组胺的含量均呈上升趋势(图 2A),其中初始发酵 pH 7.0 时,发酵液组胺含量从 0 d 的(9.32±0.86) mg/100 mL 增加到第 3 d 的(46.97±2.94) mg/100 mL,之后发酵时间对发酵液组胺含量影响平缓,组胺含量维持 45 mg/100 mL 左右。相比之下,初始发酵 pH 10.0 条件下,在发酵前 4 d 发酵液中组胺含量增加缓慢,当发酵进行到第 5 d 时组胺含量低于其他初始 pH 组和未调初始 pH 组,并在发酵 6 d 时降至(17.54±2.64) mg/mL。在相同初始 pH 和保温时间下,空白对照组(未接种)的组胺含量变化趋势不同,其中初始 pH 9.0 组在第 1 d 时组胺含量高达(68.51±4.16) mg/100 mL,而后又急剧降到(33.63±2.44) mg/100 mL(保温 3 d)。第 7 d 时,空白对照组中初始 pH 8.0、9.0 和 10.0 组及未调节 pH 组的组胺含量在 36~53 mg/100 mL 之间,初始 pH 7.0 组的组胺含量也接近 30 mg/100 mL。综合图 2A 可知,中华管鞭虾加工副产物接种枯草芽孢杆菌后,通过调节初始发酵 pH 可实现降低发酵液组胺含量作用,其中初始发酵 pH 10.0 时发酵 6 d 的发酵液组胺含量最低。

2.2.2 不同初始发酵 pH 下发酵液的 pH 动态变化

发酵过程中 pH 的变化与发酵底物中游离氨基酸、有机酸类和含氮化合物分解共同作用有关。如图 2B 所示,发酵初期(0~2 d),接种枯草芽孢杆菌发酵液的 pH 均开始下降,并且在发酵 2 d 时各组 pH 基本保持在 5.7~5.9。发酵 3~7 d 时,初始发酵 pH 8.0、9.0 和未调节 pH 组的 pH 也保持在酸性范围,上述结果与葡萄糖在微生物作用下发生糖酵解引起乳酸积累,从而导致 pH 降低有关^[26]。与接种枯草芽孢杆菌组相比较,空白对照组(包括调节初始 pH 和未调节初始 pH 组)孵育 7 d 过程中 pH 均未出现剧烈波动,进一步证实中华管鞭虾加工副产物接种枯草芽孢杆菌导致了发酵液的 pH 变化。此外,从图 2B 还可以看出初始发酵 pH 10.0 发酵 2 d 后,发酵液的 pH 开始缓慢上升,第 3 d 时 pH 达到 7.2,之后随着发酵进行 pH 始终保持在 7.3~7.8。相比之下,初始发酵 pH 7.0 组发酵液的 pH 则在发酵 4 d 后急剧升到碱性范围,其中 7 d 发酵液的 pH 达到 9.1。蛋白质在枯草芽孢杆菌分泌的蛋白酶作用下,分解生成一些碱性物质,如氨、三甲胺等^[27],不仅会导致发酵液 pH 上升,而且生物胺等含量也随之增加。中华管鞭虾加工副产物接种枯草芽孢杆菌后调节初始发酵 pH 10.0 条件下,虽然经过 3 d 发酵后 pH 接近碱性,但是其组胺含量反而是逐渐降低(见图 2A 结果),这与氨基酸脱羧酶在酸性条件下(一般 pH 4.0~5.5)才发挥作用有关^[20]。另外,与酸性环境相比较,美拉德反应在偏碱性条件下更容易发生。综合图 2A 和 2B,初始发酵 pH 10.0 接种枯草芽孢杆菌组的发酵液组胺含量随着发酵进行而逐渐降低,推测可能与发酵液中葡萄糖和氮类化合物,如组氨酸,发生美拉德反应减少组胺生成前体物质有关。

2.2.3 不同初始发酵 pH 下发酵液的肽浓度动态变化

随着发酵时间的延长,除了初始发酵 pH 8.0 外,其他接种枯草芽孢杆菌组发酵液的肽浓度均是先增加,而后逐渐降低(图 2C),这与蛋白酶水解蛋白质释放肽段导致肽浓度增加,而后部分肽用于微生物生长繁殖或被进一步水解成游离氨基酸有关。其中接种枯草芽孢杆菌初始发酵 pH 10.0 组,肽浓度在发酵 2 d 后开始逐渐下降,而初始发酵 pH 7.0 组则是在发酵 4 d 后肽浓度开始下降。空白对照组(未接种枯草芽孢杆菌)在保温 1 d 后肽浓度均出现不同程度增加,以 pH 10.0 组的肽浓度增加最为明显,说明中华管鞭虾加工副产物中蛋白质在碱性环境下发生了一定程度水解,释放部分肽段导致空白对照组肽浓度增加。

2.2.4 不同初始发酵 pH 下发酵液的 AA-N 含量动态变化

在发酵过程中 AA-N 含量越高,表明蛋白质水解成游离氨基酸的程度越高^[23],意味着枯草芽孢杆菌对虾加工副产物的蛋白质利用率就越高。如图 2D 所示,接种枯草芽孢杆菌组发酵液在发酵 1 d 后 AA-N 含量均有所增加,说明枯草芽孢杆菌分泌的酶开始分解蛋白质,且在不同初始发酵 pH 条件下均有很好活性。但随着发酵进行,只有 pH 10.0 组的 AA-N 含量呈上升趋势,在发酵 6 d 时达到最大值[(0.81±0.02) g/100 mL],比初始 AA-N 含量增长了 440%,表明初始发酵 pH 10.0 有利于枯草芽孢杆菌蛋白酶快速分泌,且代谢旺盛。但是,初始 pH 10.0 组的 AA-N 含量在发酵 7 d 时开始下降,这应与微生物生长繁殖利用 AA-N 有关^[28]。枯草芽孢杆菌分泌的蛋白酶一般在 pH 8.0 附近活力高^[29],本研究中与初始发酵 pH 10.0 组相比较,其他发酵组的 AA-N 含量均较低,可能与发酵环境 pH 偏弱酸性(见图 2B)不利于枯草芽孢杆菌蛋白酶活性发挥,导致肽段不能快速水解成游离氨基酸有关。空白对照组(未接种枯草芽孢杆菌)的 AA-N 含量变化很小,说明在偏碱性环境下(见图 2B)蛋白质的水解程度并不高,虽然在空白对照组有部分肽段释放出来(图 2C),但是未能进一步被降解为游离型氨基酸。

组胺含量与水产发酵制品质量安全性有关,而 AA-N 含量又密切关系到发酵液呈味性^[23]。综合图 2 结果可知,中华管鞭虾加工副产物接种枯草芽孢杆菌,调节初始发酵 pH 10.0 所得发酵液不仅组胺含量低,而且有利于 AA-N 的大幅度增加。

2.3 不同初始发酵 pH 下发酵液的抗氧化活性动态变化

清除 DPPH 自由基能力已被广泛用于评价食品的抗氧化性,总抗氧化能力反映了样品中所有抗氧化物质的抗氧化能力总和,而羟自由基作为一种最为活跃的自由基,易损伤机体细胞、引发 DNA 损伤,严重危害人体健康^[30-31]。在 37℃下,接种枯草芽孢杆菌组发酵液的 DPPH

自由基清除率、总抗氧化能力和羟自由基清除能力均强于空白对照组(图 3), 说明枯草芽孢杆菌发酵有提高发酵液抗氧化活性作用。其中, 调节初始发酵 pH 7.0 发酵 1 d 的 DPPH 自由基清除率从初始的 $(12.23 \pm 0.89)\%$ 提高到 $(48.23 \pm 2.64)\%$ (图 3A)。对于总抗氧化能力, 未调节初始发酵 pH 组发酵 1 d、初始发酵 pH 8.0 在发酵 2 d、初始发酵 pH 9.0 在发酵 3 d 和初始发酵 pH 10.0 在发酵 6 d 分别出现强总抗氧化能力(图 3B)。接种枯草芽孢杆菌发酵 1 d 后, 各组羟自由基清除能力均显著高于初始时(0 d)的清除能力(图 3C)。综合考虑发酵液组胺和 AA-N 含量, 可以看出在发酵末期(6~7 d)初始发酵 pH 10.0 组的 DPPH 自由基清除能力处于高水平, 而且总抗氧化能力和清除羟自由基能力均高于其他组。枯草芽孢杆菌在发酵过程会分泌出大量蛋

白酶系, 水解蛋白质释放出肽段及游离氨基酸^[29,32]。据报道, 肽的 C 端或 N 端疏水性氨基酸残基以及序列中组氨酸、色氨酸、蛋氨酸、赖氨酸等残基, 通过与脂质分子相互作用并向脂质衍生自由基提供质子来增强肽的抗氧化活性。而一些游离氨基酸, 如组氨酸的咪唑基团和蛋氨酸的亚砷基团均有清除 DPPH 自由基作用^[33-34]。中华管鞭虾加工副产物接种枯草芽孢杆菌, 调节初始发酵 pH 10.0 提高了发酵液的抗氧化活性, 该发酵液有进一步应用前景。

2.4 接种枯草芽孢杆菌发酵液指标相关性分析

为进一步揭示不同初始发酵 pH 下所得发酵液的组胺含量、AA-N 含量及抗氧化活性指标间是否有内在联系, 本研究对发酵液测定指标间进行两两相关性分析, 结果如图 4 所示。

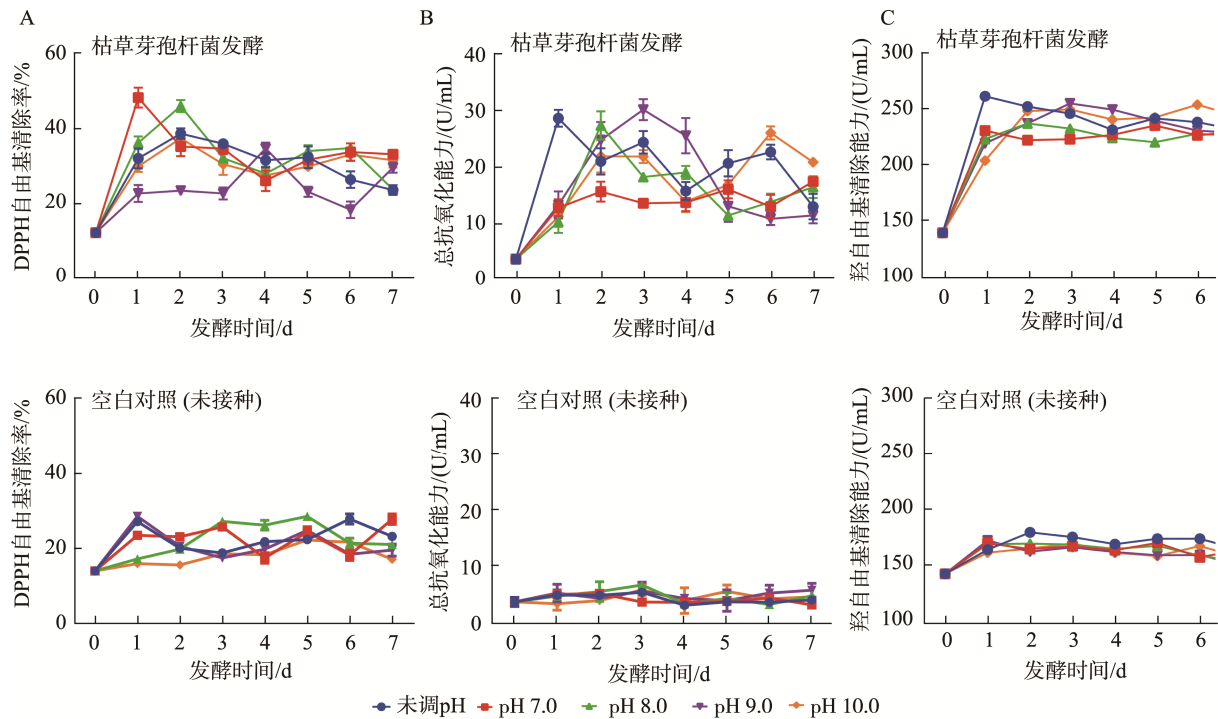
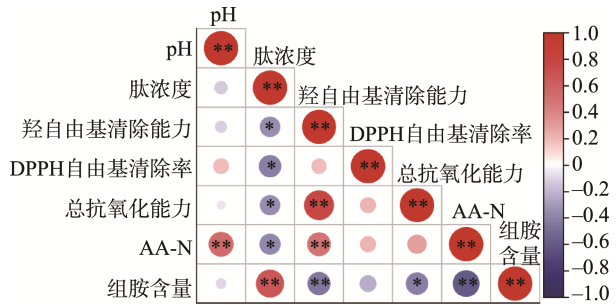


图 3 不同初始发酵 pH 下发酵液的抗氧化活性动态变化(n=3)
Fig.3 Dynamic changes in antioxidant activity of fermentation broth under different initial fermentation pH (n=3)



注: *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

图 4 接种枯草芽孢杆菌发酵液指标间相关性分析

Fig.4 Correlation analysis between indicators of *Bacillus subtilis* fermentation broth after inoculation

发酵液 pH 和 AA-N 呈极显著的正相关性($P < 0.01$), 与其他指标无关联性, 说明发酵液的 AA-N 只随 pH 的升高而升高, 这主要是由于发酵过程中枯草芽孢杆菌代谢分泌的蛋白酶以碱性蛋白酶居多^[28], 在偏碱性环境下酶活性高, 水解蛋白质生成大量 AA-N。组胺被认为是发酵食品中毒性最大的生物胺, 可引起头痛、血压异常等不适症状, 甚至会引起神经毒性^[35-37]。而在本研究中组胺含量只与肽浓度呈极显著的正相关性($P < 0.01$), 与羟自由基清除力、总抗氧化能力以及 AA-N 均呈现显著的负相关性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。推测可能是蛋白质水解产生带有组氨酸残基肽段, 而这些肽段被进一步水解后释放出大量游离组氨酸, 在组

氨酸脱羧酶作用下生成组胺。而组胺含量越高,发酵液的羟自由基清除力和总抗氧化能力越低,也说明高组胺含量发酵液对人体存在潜在生理危害。一般组胺含量高的发酵食品风味性差,图 4 结果也证实了组胺含量与呈味 AA-N 含量具有极显著负相关性。

3 结 论

本研究采用枯草芽孢杆菌纯种发酵中华管鞭虾加工副产物,在发酵温度 37℃下,通过调节初始发酵 pH 方法实现了降低发酵液组胺含量和提高 AA-N 含量目的。发酵 6 d 时,初始发酵 pH 10.0 发酵液的组胺含量最低为(17.54±2.64) mg/mL,AA-N 含量高达(0.81±0.02) g/100 mL,肽含量为(25.17±0.63) mg/L。同时,该发酵液在清除 DPPH 自由基、羟自由基和总抗氧化能力方面表现突出。综之,接种枯草芽孢杆菌的中华管鞭虾加工副产物在初始发酵 pH 10.0 时可制备出安全性高、抗氧化活性强的发酵液,本研究可为新型虾味调味料的开发提供技术依据。

参考文献

- [1] 贾喆,张肖瑕,刘欣妍,等.皂化处理对中华管鞭虾青素提取物的青素组成和体外抗氧化性的影响[J].食品工业科技,2021,42(13): 80-87.
- [2] JIA Z, ZHANG XX, LIU XY, *et al.* Effect of saponification treatment on the astaxanthin composition and *in vitro* antioxidant properties of astaxanthin extracts from the Chinese whip shrimp, *Phyllostachys sinensis* [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(13): 80-87.
- [3] 王茵,胡婷婷,吴成业.虾壳中虾青素提取工艺条件的确定及优化[J].福建农业学报,2013,28(10): 1045-1049.
- [4] WANG Y, HU TT, WU CY. Determination and optimization of the extraction conditions of astaxanthin from shrimp shells [J]. Fujian J Agric Sci, 2013, 28(10): 1045-1049.
- [5] 张样刚,周爱梅,林晓霞,等.南美白对虾虾头、虾壳化学成分的对比研究[J].现代食品科技,2009,25(3): 224-227.
- [6] ZHANG YG, ZHOU AIM, LIN XX, *et al.* Comparative study on the chemical composition of shrimp heads and shells of South American white shrimp [J]. Mod Food Sci Technol, 2009, 25(3): 224-227.
- [7] 徐坤华.利用中华管鞭虾虾头制备海鲜调味基料的研究[D].杭州:浙江工商大学,2011.
- [8] XU KH. Study on the preparation of seafood seasoning base material from the head of *Solenocera crassicornis* [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2011.
- [9] 潘朝阳,王永臻,黄文灿,等.枯草芽孢杆菌固态发酵虾头制剂对小鼠生长与肠道菌群影响研究[J].食品研究与开发,2022,43(7): 191-198.
- [10] PAN CY, WANG YZ, HUANG WC, *et al.* Study on the effects of solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* shrimp head preparation on growth and intestinal flora of mice [J]. Food Res Dev, 2022, 43(7): 191-198.
- [11] WANG Q, LI XF, BEI XB, *et al.* Low-salt fermentation improves flavor and quality of sour meat: Microbiology and metabolomics [J]. LWT, 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.114157
- [12] PENG XH, LIAO Y, REN KY, *et al.* Fermentation performance, nutrient composition, and flavor volatiles in soy milk after mixed culture fermentation [J]. Process Biochem, 2022, 212: 286-297.
- [13] PATRICK JP, DAVID WH. Sporulation of *Bacillus subtilis* [J]. Curr Opin Microbiol, 2004, 7(6): 579-586.
- [14] CHOI Y, KIM DS, LEE MC, *et al.* Effects of *Bacillus subtilis*-fermented white sword bean extract on adipogenesis and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes [J]. Foods, 2021(10): 14-23.
- [15] ZOU YK, ZHONG YX, ZHOU Q, *et al.* Effects of solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* Y4 on the quality of Yibin Yacai [J]. Food Biosci, 2023, 51: 102258.
- [16] ZHANG LL, WU JL, XU P, *et al.* Soy protein degradation drives diversity of amino-containing compounds via *Bacillus subtilis* natto fermentation [J]. Food Chem, 2022, 388: 133034.
- [17] 刘杨柳,魏东东,刘燕,等.枯草芽孢杆菌发酵蟹壳粉产蛋白酶的研究[J].食品研究与开发,2017,38(24): 174-180.
- [18] LIU YL, WEI DD, LIU Y, *et al.* Study on protease production by fermentation of crab shell powder by *Bacillus subtilis* [J]. Food Res Dev, 2017, 38(24): 174-180.
- [19] 梁宝东,魏海香,胡彦营,等.枯草芽孢杆菌发酵鱼鳞制备胶原蛋白的工艺研究[J].食品工业,2014,35(11): 99-102.
- [20] LIANG BD, WEI HX, HU YY, *et al.* Process study on the preparation of collagen by fermentation of fish scales with *Bacillus subtilis* [J]. Food Ind, 2014, 35(11): 99-102.
- [21] ZHANG Q, XIANG Q, LI YC. One-step bio-extraction of chitin from shrimp shells by successive co-fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* [J]. Innov Food Sci Emerg, 2022, 80: 103057.
- [22] 赵宇明.分光光度法快速测定水产品中组胺的含量[J].食品研究与开发,2014,35(8): 94-96.
- [23] ZHAO YM. Rapid determination of histamine in aquatic products by spectrophotometric method [J]. Food Res Dev, 2014, 35(8): 94-96.
- [24] 戴萍,李展锐,潘裕,等.温度对传统虾酱发酵过程中安全性品质影响[J].食品科技,2013,38(4): 286-290.
- [25] DAI P, LI ZR, PAN Y, *et al.* Effect of temperature on the quality of safety during fermentation of traditional shrimp paste [J]. Food Sci Technol, 2013, 38(4): 286-290.
- [26] 谢超,王阳光,邓尚贵.水产品中组胺产生机制及影响因素研究概述[J].肉类研究,2009,(4): 74-78.
- [27] XIE C, WANG YG, DENG SG. Overview of histamine production mechanism and influencing factors in aquatic products [J]. Meat Res, 2009, (4): 74-78.
- [28] 冀雪莉.黄鲷蛋白抗菌肽的消化性及富集研究[D].舟山:浙江海洋大学,2019.
- [29] JI XL. Digestibility and enrichment study of antimicrobial peptides of yellow carp protein [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.
- [30] BERSUDER P, HOLE M, SMITH G. Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I. Investigation of the antioxidant role of

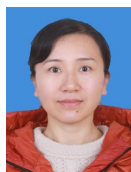
- histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography [J]. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(3): 181–187.
- [20] 董自艳, 戴翠, 马仕洪, 等. 紫外-可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度[J]. 中国药品标准, 2014, (2): 2.
- DONG ZY, DAI Z, MA SH, *et al.* Rapid determination of bacteriophage concentration by UV-Vis spectrophotometry [J]. Drug Stand Chin, 2014, (2): 2.
- [21] 李志军, 吴永宁, 薛长湖. 生物胺与食品安全[J]. 食品与发酵工业, 2004, (10): 84–91.
- LI ZJ, WU YN, XUE CH. Biogenic amines and food safety [J]. Food Ferment Ind, 2004, (10): 84–91.
- [22] AMORIM CG, SOUZA RC, ARAUJO AN, *et al.* SI lab-on-valve analysis of histamine using potentiometric detection for food quality control [J]. Food Chem, 2010, 122(3): 871–876.
- [23] 莫星忱, 杨锡洪, 解万翠, 等. 葡萄糖对快速发酵虾头酱中组胺抑制的作用[J]. 现代食品科技, 2017, 33(5): 207–212.
- MO XX, YANG XH, XIE WC, *et al.* Effect of glucose on histamine inhibition in rapidly fermented shrimp head sauce [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(5): 207–212.
- [24] LATORRE-MORATALLA ML, BOVER-CID S, TALON R, *et al.* Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing [J]. LWT-Food Sci Technol, 2010, 43(1): 20–25.
- [25] MAH JH, HWANG HJ. Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*) [J]. Food Chem, 2009, 114(1): 168–173.
- [26] WANAPORN T, SOMBOON T, KIRK LP, *et al.* Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products [J]. Enzyme Microb Technol, 2010, 46: 92–99.
- [27] 励建荣, 李婷婷, 丁婷. 水产品新鲜度综合评价与货架期预测模型的构建研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2016, 34(1): 1–8.
- LI JR, LI TT, DING T. Research progress in the construction of a comprehensive evaluation and shelf-life prediction model for aquatic products freshness [J]. J Food Sci Technol, 2016, 34(1): 1–8.
- [28] 白兴达, 何媛媛, 陈善峰. 以酱油氨基酸态氮含量为考察指标的发酵工艺参数优化[J]. 食品科技, 2015, (6): 312–316.
- BAI XD, HE YY, CHEN SF. Optimization of fermentation process parameters with amino acid nitrogen content of soy sauce as the index of investigation [J]. Food Sci Technol, 2015, (6): 312–316.
- [29] YANG JK, SHIH IL, TZENG YM, *et al.* Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes [J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 26: 406–413.
- [30] 邓超, 付海田, 尚金银, 等. 金耳发酵液多糖的制备、分析及生物活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(1): 67–73.
- DENG C, FU HT, SHANG JY, *et al.* Preparation, analysis and biological activity of polysaccharides from golden ear fermentation broth [J]. J Food Sci Biotechnol, 2017, 36(1): 67–73.
- [31] CACCIUTTOLO MA, TRINH L, LUMPKIN JA, *et al.* Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells [J]. Free Radical Bio Med, 1993, 14(3): 267–276.
- [32] XU Y, SONG R, JIA Z, *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* subsp.) inoculation on the fermentation characteristics of *Penaeus sinensis* by-products: Protease activity and volatile property [J]. LWT, 2023, 177: 114584.
- [33] SONG R, WEI RB, RUAN GQ, *et al.* Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) [J]. LWT Food Sci Technol, 2015, 60(1): 221–229.
- [34] SAMARANAYAKA AGP, LI-CHAN ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications [J]. J Funct Food, 2011, 3(4): 229–254.
- [35] LI C, ZHAO Y, WANG Y, *et al.* Microbial community changes induced by *Pediococcus pentosaceus* improve the physicochemical properties and safety in fermented tilapia sausage [J]. Food Res Int, 2021, 147: 110476.
- [36] 邵宏宏, 周秀锦, 相兴伟, 等. 4种海产品冷藏期间挥发性盐基氮和生物胺含量变化[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(9): 2794–2801.
- SHAO HH, ZHOU JX, XIANG XW, *et al.* Changes in volatile salt nitrogen and biogenic amines in 4 kinds of seafood species during refrigeration [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(9): 2794–2801.
- [37] 焦广睿, 王柯, 刘畅. 水产品中生物胺的检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2611–2616.
- JIAO GR, WANG K, LIU C. Research progress on determination methods of biogenic amines in aquatic products [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2611–2616.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



汪 诚, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与安全。
E-mail: wangcheng2278@163.com



宋 茹, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。
E-mail: rusong@zjou.edu.cn