

混合菌种发酵对草鱼肉微生物和生物胺变化的影响

谢 诚,刘忠义,周宇峰,任康梓,咎婷婷

(湘潭大学 化工学院 食品与生物工程系,湖南 湘潭 411105)

【摘要】【目的】研究发酵草鱼的 pH 值、微生物菌群以及生物胺等特性的变化,为发酵草鱼的加工及其卫生品质的控制提供参考。【方法】新鲜草鱼宰杀后,切取宽度 3 cm 的草鱼鱼块,加入 30 g/kg 食盐腌制 6 h 后,混合接种酵母、红曲和乳酸菌,于 30 ℃ 发酵 12 h,然后进行微生物检测,并用高效液相色谱检测生物胺的变化。【结果】经过 12 h 的发酵,鱼肉中的组胺、酪胺、腐胺、亚精胺和精胺的含量分别为 (0.29 ± 0.10) 、 (1.31 ± 0.10) 、 (16.53 ± 0.20) 、 (3.86 ± 0.15) 和 (5.18 ± 0.2) mg/kg,明显低于对照组的 (1.31 ± 0.10) 、 (1.96 ± 0.10) 、 (21.62 ± 0.30) 、 (10.93 ± 0.20) 和 (12.69 ± 0.25) mg/kg;发酵鱼肉 pH 值从起始的 6.4 下降到 5.2;大肠菌群最近似数 < 300 CFU/kg,没有检出芽孢菌。【结论】接种混合菌种于 30 ℃ 发酵 12 h,可以控制发酵草鱼制品中组胺、酪胺、腐胺、亚精胺及精胺的含量,抑制大肠菌群的生长,保证发酵草鱼制品的卫生品质。

【关键词】 草鱼;发酵;生物胺;高效液相色谱

【中图分类号】 TS254.405.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)03-0167-06

Effects of fermentation with mixed starter cultures on changes of biogenic amines and microorganisms in grass carp muscles

XIE Cheng, LIU Zhong-yi, ZHOU Yu-feng, REN Kang-zi, ZAN Ting-ting

(Department of Food and Biological Technology, Chemical Industry Engineering, Xiangtan University, Xiangtan, Hunan 411105, China)

Abstract: 【Objective】 Characteristics, such as pH value, microorganisms and biogenic amines, of fermented grass carp muscles were investigated during fermentation with mixed starter cultures, in order to provide a reference for the processing and control of hygienic quality of fermented grass carp. 【Method】 The grass carp minces of 3 cm width were salted with 30 g/kg salt for 6 h at room temperature, and then inoculated with mixed starter cultures and fermented for 12 h at 30 ℃. Microorganisms of samples were detected, and biogenic amines in the samples were monitored by high performance liquid chromatographic method (HPLC). 【Result】 Results showed that the content of histamine, tyramine, putrescine, spermidine and spermine of fish muscles after the fermentation was respectively (0.29 ± 0.10) 、 (1.31 ± 0.10) 、 (16.53 ± 0.20) 、 (3.86 ± 0.15) and (5.18 ± 0.2) mg/kg lower than (1.31 ± 0.10) 、 (1.96 ± 0.10) 、 (21.62 ± 0.30) 、 (10.93 ± 0.20) and (12.69 ± 0.25) mg/kg of the control. pH value of fermented fish muscles decreased from initial pH value of 6.4 to 5.2. In finish fermented fish muscles, maximum probable number of coliform group (MPN) was lower than 300 CFU/kg, and no spore was detected. 【Conclusion】 Content of histamine, tyramine, putrescine, spermidine and spermine and the growth of *Enterobacteria* can be suppressed, and hygienic quality of fermented fish products can be controlled by fermentation inoculated with mixed starter cultures for 12 h at 30 ℃.

* [收稿日期] 2009-09-01

[基金项目] 湘潭大学大学生第4批创新基金项目(2008CX052);湘潭大学博士启动基金项目(08Q17Z02)

[作者简介] 谢 诚(1987—),男,湖南益阳人,在读本科,主要从事食品加工研究。E-mail: henson1202@126.com

[通信作者] 刘忠义(1964—),男,湖南涟源人,教授,博士,主要从事食品生物技术以及淡水鱼加工研究。

E-mail: lzyly@xtu.edu.cn

Key words: grass carp; fermentation; Biogenic amine; high performance liquid chromatographic method (HPLC)

我国是世界上淡水鱼产量最大的国家,淡水鱼的产量约占世界总产量的 $2/3$ ^[1]。可是,我国淡水鱼的加工量不足其产量的 7%。因此,大力开发淡水鱼加工技术乃是当务之急。

世界各地人们都很喜爱熏鱼制品和发酵肉制品^[1-3]。传统鱼制品加工中的腌制过程存在自然的微生物发酵作用^[4]。如果原料鱼足够新鲜,经过腌制和熏制可以延长鱼的贮藏期,改善鱼的风味,提高原料鱼的利用率,并提高鱼肉蛋白在人体内的可消化性^[5]。可是人们十分关注传统加工鱼产品中的生物胺(尤其是组胺和酪胺),以及熏烟中的某些成分(如苯并芘等)所引起的食用安全性问题^[6-8]。有研究表明,某些微生物(如乳酸菌、酵母等)能在鱼、肉的发酵过程中抑制生物胺的产生,并且可以改善鱼、肉制品的风味、质地、外观和色泽等感官品质^[7-10]。混合菌种发酵的香肠^[7-10]、鲢鱼^[9]和鲭鱼^[10]中的生物胺都得到了很好的控制。草鱼是我国著名的四大养殖淡水鱼种之一,年产量 300 万 t 以上,加工产品主要以传统加工为主^[1],缺乏人工接种有益菌种发酵草鱼的研究,只有 Hu 等^[9]和卢晓莉等^[11]研究过发酵鲢鱼制品,以及邓孝平等^[12]研究过发酵鳊鱼制品,而涉及发酵鱼制品生物胺变化的研究更少。本研究采用酵母、红曲和乳酸菌混合发酵草鱼,分析检测了发酵草鱼的酸度、微生物菌群以及生物胺含量的变化,探讨混合菌种发酵对草鱼制品生物胺和卫生品质的影响,以期对草鱼的加工提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 新鲜草鱼 购自湘潭大学菜市场,平均质量 $(2\ 000 \pm 182)$ g。

1.1.2 菌种 乳酸链球菌、乳酪乳杆菌、酿酒酵母、红曲霉 6.019,均购自湖南省轻工研究所。

1.1.3 仪器 恒温生化培养箱 SPX-250B-Z,上海博讯实业有限公司;手提灭菌锅,上海医用仪器公司;数显恒温水浴箱 HH-4,国华电器有限公司;精密酸度计 PHS-2,上海雷磁仪器厂;电子分析天平 FA/JA,上海精密科学仪器有限公司;电热鼓风干燥箱 FN101-2,长沙仪器仪表厂;高效液相色谱仪 P680A,美国 DIONE 公司;高速台式离心机 TG18G,湖南凯达科学仪器公司;恒温培养箱 PYX-

DHS. 350-S,上海跃进医疗器械厂;水平净化工作台 SP-DJ,上海浦东物理光学仪器厂;暗箱,自制。

1.1.4 试剂 组胺、腐胺、酪胺标准品,购自 sigma 化学试剂公司;精胺、亚精胺标准品,购自金测分析技术(天津)有限公司;1-7 二氨基庚烷、丹磺酰氯,购自 AppliChem 公司;醋酸胺、甲醇、丙酮和乙腈,均为色谱纯。色谱用水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 发酵菌种的培养 将乳酸链球菌和乳酪乳杆菌分别用 20 g/L 的脱脂乳粉溶液作培养基进行 3 级扩大培养,酿酒酵母用麦芽汁培养基进行 3 级扩大培养,培养结束后分别进行平板计数。用马铃薯麦芽汁培养基,对红曲霉 6.019 通过固体试管、液体试管、三角饼摇床培养及大米固体培养等进行逐级培养,最后对红曲米进行孢子计数。

1.2.2 草鱼肉的发酵 新鲜草鱼清洗、宰杀,去鳞、内脏和头后,切成约 3 cm 宽的鱼块,加入 30 g/kg 的精制食盐,腌制 6 h 后,接种乳酸链球菌、乳酪乳杆菌、酿酒酵母、红曲霉 6.019(每种微生物的接种量为 10^6 个/g),30 ℃ 发酵约 12 h,待鱼肉 pH 值降低到 5.2 时,结束发酵。对照组不接种任何菌种,直接加 30 g/kg 的盐腌制 18 h。

1.2.3 pH 值的测定 取 5 g 样品加入 20 mL 去离子水(pH 7.0)匀浆,然后用 Mettler-Toledo 320s 数显酸度计测定 pH。

1.2.4 生物胺的测定 采用高效液相色谱法^[13-14]。取 2.0 g 样品,加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液,用研钵捣碎混匀,萃取,取出上层清液。残余物再加入 10 mL 0.4 mol/L 高氯酸溶液萃取 1 次,合并萃取液,充分混匀,在 3 000 r/min 的条件下离心 10 min;取上层清液置于 25 mL 棕色容量瓶中,加入一定量内标混匀,用 0.4 mol/L 高氯酸定容到 25 mL,过滤。标准品和样品的衍生以及标准曲线的制作参见文献[13]和[14]。色谱柱为 C_{18} 反相色谱柱;流动相 A 为 0.1 mol/L 乙酸铵;流动相 B 为乙腈;梯度洗脱(洗脱条件见表 1);流动相在使用前进行脱气;流速 1.0 mL/min;进样量 20 μ L;紫外检测波长 254 nm;柱温 40 ℃。色谱柱用丙酮、甲醇和乙腈进行交替清洗。

表 1 高效液相色谱柱洗脱液的体积分数
Table 1 Elution condition of the HPLC column %

洗脱液 Elution	洗脱时间/min Elution time				
	0	7	25	35	45
0.1 mol/L 乙酸铵 0.1 mol/L Ammonium acetate	45	50	10	45	45
乙腈 Acetonitrile	55	50	90	55	55

1.2.5 细菌总数和芽孢的检测 采用平板计数法^[15],选用 MRS 培养基。取样品(新鲜草鱼肉和发酵好的草鱼肉)10 g,无菌箱中研碎,加无菌蒸馏水 90 mL,经无菌净化工作台过滤,取滤液用于细菌总数检测。

取一半上述滤液,在 80 ℃ 恒温水浴中保温 20 min,用平板记数法测定芽孢。

1.2.6 大肠菌群的测定 采用大肠菌群快速测定

法^[16]进行。

2 结果与分析

2.1 发酵对草鱼肉酸度和微生物变化的影响

由表 2 可见,发酵 12 h 时,接种混合菌种发酵鱼肉的 pH 值从 6.4 下降到 5.2,未接菌对照的 pH 值为 6.2。发酵草鱼肉酸度的下降是产酸微生物(即乳酸细菌)的生长所致^[6-10]。

表 2 发酵对草鱼肉品质的影响

Table 2 Effects of fermentation on characteristics of grass carp muscles

样品 Sample	pH		总菌落数/(CFU · g ⁻¹) Total number of microbial colonies		终了大肠菌群最近似 数/(CFU · kg ⁻¹) End maximum probable number of coliform group	终了芽孢数/ (CFU · g ⁻¹) Spore number
	起始 Initial	终了 End	起始 Initial	终了 End		
发酵鱼肉(接菌) Fermented grass carp muscles	6.4±0.0 a	5.2±0.0 a	4.0×10 ⁶ ±1.2×10 ⁶ a	5.0×10 ⁷ ±6.0×10 ⁶ a	<300	无 No
对照组(未种菌) Control	6.4±0.0 a	6.2±0.1 b	2.2×10 ⁴ ±1.6×10 ³ b	1.6×10 ⁷ ±7.0×10 ⁶ b	>600	28

注:数据来自 3 个平行试验的平均值。同一列数据后标不同小写字母表示数值之间差异显著。表 4 同。

Note:Data in the table are “mean±SD” from triplicates. Values with different superscript letters in the same column are significantly different at 0.05 levels. The same at table 4.

由表 2 可知,接种混合菌种的发酵鱼肉,其总菌落数由试验起始的(4.0×10⁶±1.2×10⁶) CFU/g 增加到(5.0×10⁷±6.0×10⁶) CFU/g,大肠菌群最近似数(MPN)<300 CFU/kg,没有检出芽孢菌落。而未接种任何菌种的对照组,其总菌落数由试验起始的(2.2×10⁴±1.6×10³) CFU/g 增加到(1.6×10⁷±7.0×10⁶) CFU/g,大肠菌群最近似数(MPN)>600 CFU/kg,有芽孢菌落检出。上述结果表明,接种了优势菌种的发酵过程显著抑制了杂菌(大多数是腐败和有害微生物)的生长,明显抑制了大肠菌群的繁殖,这一试验结果与其他研究者的试验结果是一致的^[7-10]。芽孢菌是一种重要的食品腐败菌,尤其在低酸性食品中,肉毒杆菌会导致食物中毒,只有高温高压灭菌、酸化以及干制可以消灭芽孢菌或者抑制芽孢菌的生长。鉴于芽孢菌生长条件的某些特殊性,本试验虽然设计了 80 ℃ 恒温处理杀死营养细胞的方案,并不能保证平板计数能检出所有芽孢菌,尤其是厌氧芽孢细菌。但是在同样的平

板计数试验中,接菌发酵鱼肉中未检出芽孢菌落,而对照组却明显能检测到芽孢菌落生长,该结果基本上可以说明,接种混合菌种发酵能抑制芽孢细菌的生长。

2.2 发酵对草鱼肉部分生物胺变化的影响

在梯度洗脱条件下,几种被测生物胺的出峰图谱见图 1。由图 1 可知,无论标准品还是样品,分离效果均较好,被测生物胺的保留时间在标准品以及样品中基本保持一致,在质量浓度为 0.2~15 mg/L 时,标准品峰面积(y)与质量浓度(x)呈较好的线性关系(表 3),可以用于定量测定。

由表 4 可见,在腌制 6 h 后,发酵组所有 5 种生物胺的含量均有所增加,但发酵过程中,草鱼肉中生物胺含量的变化却不尽相同。腐胺含量随发酵的进行一直呈增加趋势,而酪胺、组胺、亚精胺和精胺的含量随着发酵的进行呈先增加后降低的变化趋势。发酵结束时,组胺和酪胺的含量接近于新鲜鱼肉。

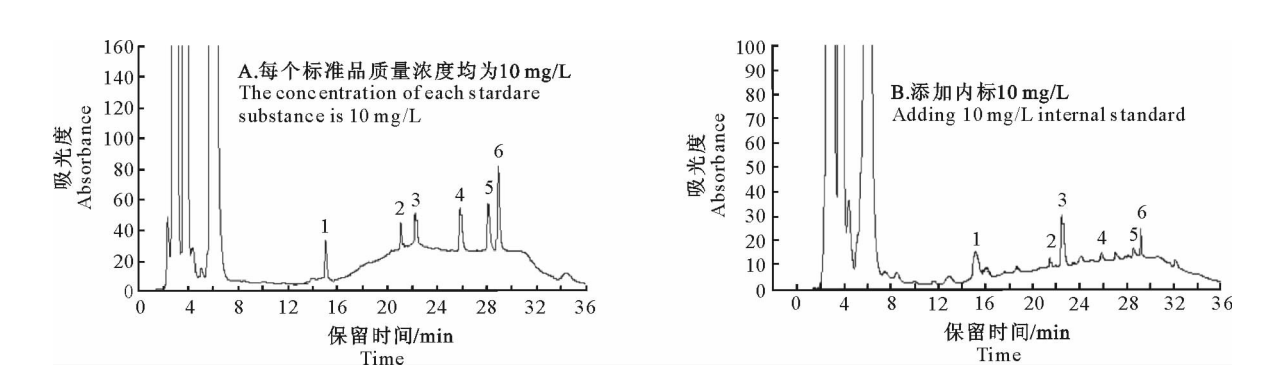


图 1 标准生物胺和发酵结束时草鱼肉中生物胺的 HPLC 图谱

1. 腐胺;2. 组胺;3. 内标;4. 酪胺;5. 亚精胺;6. 精胺

Fig. 1 Chromatogram of the mixture of five biogenic amines standards and fresh grass carp extracts

1. Putrescine;2. Histamine;3. Internal standard;4. Tyramine;5. Spermidine;6. Spermine

表 3 生物胺质量浓度与峰面积的回归曲线及相关系数

生物胺 Biogenic amine		回归曲线 Regression curve	相关系数 Correlation coefficient	检测限/(mg·kg ⁻¹) Detectability
腐胺	Putrescine	$y=0.119\ 8\ x+0.003\ 2$	0.999 8	0.8
组胺	Histamine	$y=0.016\ 9\ x-0.006\ 3$	0.999 9	1.2
酪胺	Tyramine	$y=0.029\ 2\ x+0.015\ 6$	1	1.0
亚精胺	Spermidine	$y=0.151\ 3\ x+0.003\ 9$	0.991 8	0.8
精胺	Spermine	$y=0.163\ 6\ x+0.001\ 8$	0.992 3	1.0

在对照组中,5 种被检生物胺含量一直在增加。到腌制结束时,对照组中的腐胺、亚精胺和精胺的含量明显高于发酵组,而组胺和酪胺只较发酵组高出少许,这可能是因为草鱼蛋白质中的组胺酸和酪胺酸含量本身比较低所致^[17]。

表 4 发酵过程中草鱼肉生物胺含量的变化

		with/without mixture cultures					mg/kg
组别 Group	处理 Treatment	腐胺 Putrescine	组胺 Histamine	酪胺 Tyramine	亚精胺 Spermidine	精胺 Spermine	
新鲜草鱼 Fresh grass carp	—	4.19±0.15 a	0.28±0.10 a	1.25±0.15 a	2.11±0.10 a	4.06±0.20 a	
发酵组 Fermentation group	腌制 6 h Salted for 6 h	7.16±0.20 b	0.39±0.10 ab	1.45±0.10 ab	5.15±0.20 b	6.32±0.30 b	
	接菌发酵 6 h Fermented for 6 h	13.62±0.25 c	0.51±0.10 b	1.55±0.15 b	6.12±0.25 c	7.59±0.25 c	
	接菌发酵 12 h Fermented for 12 h	16.53±0.20 d	0.29±0.10 a	1.31±0.10 a	3.86±0.15 e	5.18±0.20 d	
对照组 Control	腌制 6 h Salted for 6 h	7.16±0.20 b	0.39±0.10 ab	1.45±0.10 a	5.15±0.20 b	6.32±0.30 b	
	腌制 12 h Salted for 12 h	14.62±0.25 e	0.91±0.15 d	1.65±0.05 bd	8.67±0.20 e	9.82±0.35 e	
	腌制 18 h Salted for 18 h	21.62±0.30 f	1.31±0.10 e	1.96±0.10 f	10.93±0.20 f	12.69±0.25 f	

3 讨 论

有研究表明,接种乳酸菌和小球菌可以在鱼、肉类制品发酵过程中显著抑制腐败细菌和有害微生物的生长^[5-9]。本研究结果证实,接种混合乳酸菌发酵可以抑制大肠菌群和芽孢细菌的生长,平板计数表明,混合乳酸菌发酵可以抑制杂菌生长,明显降低组胺和酪胺的含量,并可抑制腐胺、精胺和亚精胺的生

成,能很好地控制发酵草鱼的卫生品质。

生物胺广泛存在于动物、植物和发酵食品中。在生物体内,最重要的生物胺合成途径是氨基酸的脱羧反应,也有部分生物胺是通过醛的胺化作用形成的。因此,生物体内因为代谢的原因,总是存在少量的在正常生理含量水平的生物胺,故其危害极小。在食品腐烂或发酵过程中,由于酶和微生物(尤其是大肠细菌^[6-10])的作用,往往会大量积累各种生物

胺,在这种情况下,生物胺的危害必然倍受关注。水产品中最具毒性的生物胺是组胺,其次是酪胺,这 2 种生物胺可以产生明显的人体中毒症状。

发酵终了时,鱼肉中多数生物胺含量下降,说明发酵过程中可能产生了可以氧化降解生物胺的酶或者酶体系。此外,也可能有一些生物胺部分转化为腐胺,促使腐胺含量增加,因为精胺、亚精胺和腐胺均是鸟氨酸脱羧基后产生的,他们之间可以互相转化。

有研究报道,乳酸菌和氨基酸脱羧酶阴性的小球菌,其单菌种或者混合菌种培养物可以在肉类发酵过程中减少生物胺的积累,并且改善肉类制品的风味、香味和耐贮藏性^[6,8-10,18]。而 Bover-Cid 等^[7]及 Buncic 等^[19]的研究表明,接种小球菌和乳酸菌混合培养物虽然不能明显降低肉类发酵过程中生物胺的生成和积累,但是可以明显改善发酵香肠的风味和贮藏性能。本研究表明,接种了优势混合菌种的发酵过程,确实能够抑制部分生物胺的积累。

4 结 论

新鲜鱼肉接种混合菌种于 30 ℃ 发酵 12 h,可以有效抑制芽孢菌及大肠细菌等有害微生物的繁殖,降低发酵草鱼肉的 pH 值,减少发酵草鱼肉中组胺、酪胺、腐胺、亚精胺和精胺等生物胺的积累,有利于保证和改善发酵草鱼肉的卫生品质。

【参考文献】

[1] 王锡昌. 中国水产品加工的当代思考 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(增刊): 169-174.
Wang X C. Thinking of China aquatic product processing and utilization [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(suppl): 169-174. (in Chinese)

[2] 罗相忠, 邹桂伟, 潘光碧, 等. 我国淡水渔业现状与发展趋势 [J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2005, 2(5): 98-102.
Luo X Z, Zou G W, Pan G B, et al. Current status and prospects of freshwater fishery in china [J]. Journal of Yangtze University: Natural Science Edition, 2005, 2(5): 98-102. (in Chinese)

[3] 李明华. 2001 年上半年日本鱼类产品的进口总量 [J]. 水产科技, 2002(4): 45-46.
Li M H. The total imports of fish products of Japan in the first half of 2001 [J]. Fisheries Science & Technology, 2002(4): 45-46. (in Chinese)

[4] Anihouvi V B, Sakyi-Dawson E, Ayernor G S, et al. Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for *lanhouin* production [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(2): 287-291.

[5] Hansen L T, Gill T, Huss H H. Effect of salt and storage tem-

perature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon [J]. Food Research International, 1995, 28(2): 123-130.

[6] Veciana-Nogués M T, Mariné-Font A, Vidal-Carou M C. Biogenic amines in fresh and canned tuna, effects of canning on biogenic amines contents [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 4324-4328.

[7] Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou M C. Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages [J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(11): 1556-1562.

[8] Fanco I, Prieto B, Cruz J M, et al. Study of the biochemical changes during the processing of Androlla, a Spanish dry-cured pork sausage [J]. Food Chemistry, 2002, 78: 339-345.

[9] 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: 188-195.

[10] Yin L, Pan C, Jiang S. Effect of lactic acid bacterial fermentation on the characteristics of minced mackerel [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(2): 786-792.

[11] 卢晓莉, 曾令彬, 熊善柏. 鲑鱼制品固态发酵工艺条件的优化 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 157-169.
Lu X L, Zeng L B, Xiong S B. Optimization of solid-state fermentation conditions about fermented fish [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(8): 157-169. (in Chinese)

[12] 邓孝平, 贺 莉, 侯 芳, 等. 发酵鳙鱼糕的研制 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(11): 195-197.
Deng X P, He L, Hou F, et al. Development of fermented big-head carp surimi cakes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(11): 195-197. (in Chinese)

[13] 李志军, 薛长湖, 封锦芳, 等. 柱前衍生-RP-HPLC 方法测定水产品中生物胺 [J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(3): 427-431.
Li Z J, Xue C H, Feng J F, et al. Determination of biogenic amines in aquatic products by pre-column dansy lalition reversed phase high performance liquid chromatography with fluorescence detector [J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(3): 427-431. (in Chinese)

[14] 刘辰麒, 王锡昌, 丁卓平. 水产品中生物胺的测定方法 [J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(4): 257-261.
Liu C Q, Wang X C, Ding Z P. Determination of biogenic amines in aquatic products [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(4): 257-261. (in Chinese)

[15] GB/T 4789. 2—2003 食品卫生微生物学检验: 菌落总数测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
GB/T 4789. 2—2003, Food microbiology inspection; Determination of the total number of colonies [S]. Beijing: Chinese Standard Press, 2004. (in Chinese)

[16] 陈金春, 陈国强. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2005: 11-54.
Chen J C, Chen G Q. Microbiology experimental guide [M]. Beijing: Qinghua University Press, 2005: 11-54. (in Chinese)

[17] 李正友,黄 辉,周 路,等. 岩原鲤肌肉营养成分分析 [J]. 水生生态学杂志,2009,2(1):126-127.
Li Z Y,Huang H,Zhou L,et al. Nutritive composition of muscle of *Procypris raaudi* [J]. Journal of Hydroecology,2009,2(1):126-127.

[18] Hernández-Jover T,Izquierdo-Pulido M,Veciana-Nogués M T,et al. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1997,45:2098-2102.

[19] Buncic S,Paunovic L,Radisic D,et al. Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages [J]. International Journal of Food Microbiology,1993,17:307-309.

(上接第 166 页)

[12] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术 [M]. 西安:世界图书出版公司,2000:80-83.
Cheng L J,Xue Q H. Microbiology Laboratory Technicians [M]. Xi'an: World Publishing Corporation,2000:80-83. (in Chinese)

[13] 王 华. 葡萄酒分析检测 [M]. 陕西杨凌:西北农林科技大学出版社,2000.
Wang H. Wine Analysis and Testing [M]. Yangling,Shaanxi: Northwest A&F University Publishing House,2000. (in Chinese)

[14] 宋建强,王 华,胡劲光,等. 黑莓起泡酒香气成分的 GC/MS 分析研究 [J]. 分析与检测,2008,34(8):145-149.
Song J Q,Wang H,Hu J G,et al. Study on the volatile compounds in the Blackberry Sparkling Wine by GC/MS [J]. Analysis and Testing,2008,34(8):145-149. (in Chinese)

[15] Butzke C. Survey of yeast assimilable nitrogen status in musts from California,Oregon,and Washington [J]. Am J Enol Vitic,1998,49:220-224.

[16] Bell S J,Henschke P A. Implications of nitrogen nutrition for grapes,fermentation and wine [J]. Aust J Grape Wine Res,2005,11:242-295.

[17] Henschke P A,Jiranek V. Yeasts-matabolism of nitrogen compounds [G]//Fleet G H,Ed. Wine Microbiology and Biotechnology. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers,1993:77-164.

[18] Blateyron L,Ortiz-Julien A,Sablayrolles J M. Stuck fermentations;oxygen and nitrogen requirements-importance of optimising their addition [J]. Aust N Z Grapegrowner Winemaker,2003,478:73-79.

[19] Oshita K,Kubota M,Uchida M,et al. Clarification of the relationship between fusel alcohol formation and amino acid assimilation by brewing yeast using ¹³C-labeled amino acid [G]//Proceedings of the 25th European Brewery Convention Congress. Bruxelles;Oxford University Press,1995:387-394.

[20] Yoshimoto H,Fukushige T,Yozezawa T,et al. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2002,9:501-508.