浙东腌冬瓜产组胺微生物的分离及产组胺特性研究

徐赛男，吴祖芳，张鑫，翁佩芳

（宁波大学海洋学院，应用海洋生物技术教育部重点实验室，浙江宁波 315211）

摘要：为了解浙东地区传统腌冬瓜发酵体系中产组胺细菌及其组胺产生规律，本研究通过鉴别培养基结合 HPLC 筛选并确认了菌株的产组胺能力，并利用 16S rDNA 分子鉴定产组胺菌株；研究培养温度、pH 和盐度对菌株生长和产组胺的影响。结果表明，从腌冬瓜发酵前、中期筛选出的 5 株菌属于 2 个菌种，命为 M1 和 M3，均是肠杆菌属，且分别与 *Enterobacter aerogenes*（产气肠杆菌）和 *Enterobacter xiangfangensis* 的亲缘关系最近。这两种菌的最适生长温度均为 30 ℃，最适生长 pH 均为 7，在小于 5%盐度时生长均稳定；在组胺发酵培养基中，产组胺的最适 pH 均为 4，在 20~35 ℃的适宜生长温度内，最适产组胺温度均为 35 ℃，随盐度的升高，产组胺量均降低。适宜的实验条件下，M1 和 M3 的最大生长量分别为 11.65 lgCFU/mL 和 14.30 lgCFU/mL，最大产组胺量分别为 35.66 mg/L 和 39.54 mg/L。研究结果可为浙东特色腌冬瓜的加工工艺及质量安全控制等提供参考依据。

关键词：腌冬瓜；产组胺菌；高效液相色谱；16S rDNA；发酵条件

文章篇号：1673-9078(2015)10-115-121 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.020

Isolation and Characteristics of Histamine-producing Bacteria from Pickled Wax Gourd in East Zhejiang

XU Sai-nan, WU Zu-fang, ZHANG Xin, WENG Pei-fang

（Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China）

Abstract: Selective culture and high-performance liquid chromatography (HPLC) screening were performed to study histamine production by bacteria in the traditional fermentation system of pickled wax gourd from Eastern Zhejiang. Histamine-producing strains were identified by 16S ribosomal DNA (rDNA), and histamine production capacity of each strain was determined. Additionally, the effects of temperature, pH, and salinity on bacterial growth and histamine production were investigated. The results showed that all five strains obtained from the early- and mid-fermentation stages belonged to two species, designated as M1 and M3, from the genus *Enterobacter* and showed close genetic relationships with *E. aerogenes* and *E. xiangfangensis*, respectively. The optimum growth temperature and pH for the two strains were 30 ℃and 7, respectively. The growth of the strains was stable at salinity below 5%. In the histamine fermentation medium, pH 4 was found to be optimum for histamine production by both strains. In the temperature range (20 ℃~35 ℃) suitable for bacterial growth, the optimum temperature for histamine production was 35 ℃. The yield of histamine decreased with increasing salinity. Under optimal conditions, values for maximum bacterial growth shown by M1 and M3 were 11.65 and 14.30 log CFU/mL, while values for maximum histamine production were 35.66 and 39.54 mg/L, respectively. Thus, these results provide a reference for processing and quality control of pickled wax gourd from Eastern Zhejiang.

Key words: pickled wax gourd; histamine-producing bacteria; high-performance liquid chromatography; 16S ribosomal DNA; fermentation conditions

腌冬瓜，也称“臭冬瓜”，是闻名于江浙一带的“宁波三臭”之一，因具有独特的风味和口感而作为日常的佐餐佳品，产品富含乳酸菌[1]，对人体健康和促进肠道消化十分有益[2]，但传统的自然发酵方式由于微生物的多样性可能会产生有害的代谢产物，如 Shalaby 报道了蔬菜发酵过程中几类微生物包括肠杆菌属、假单胞菌属、霉菌和乳酸菌都涉及到了产生物胺[3]；赵永威等[4]通过克隆文库法检测到冬瓜腌制过程中的微生物优势菌群有不动杆菌属、魏斯氏菌属、芽孢杆菌属、肠杆菌属、乳杆菌属和葡萄球菌属，这些菌属的存在给腌冬瓜发酵过程中产生物胺带来可能性。

收稿日期：2015-01-20

基金项目：国家自然科学基金（31171735）；宁波市农业择优委托项目（2012C10016）

作者简介：徐赛男（1989-），女，食品工程硕士研究生，主要从事食品安全检测与控制研究

通讯作者：吴祖芳（1963-），男，博士，教授，博士生导师，主要从事食品生物技术研究

生物胺，一类含氮低分子量化合物的总称，由一些具有氨基酸脱羧酶活性的菌株在适宜的条件下代谢相应的氨基酸产生，过量的生物胺对机体健康会造成不良影响[5]，其中组胺的毒性最大。Tsai 等[6]曾报道在超市包装和零售的泡菜中检测出组胺含量为 50~5350 mg/kg。Moret 等[7]在灌装德国泡菜中检测到酪胺的水平含量为 49 mg/kg。国内对于生物胺的研究主要集中在富含蛋白质的发酵产品（如香肠[8~10]、干酪[11]、酒[12~13]、酱油[14]和腐乳[15]等）和水产品[16~18]方面，对于发酵蔬菜中生物胺的研究很少。为了探究浙东特色腌冬瓜在生物胺，特别是组胺方面存在的可能性而引起的安全隐患，本实验利用鉴别培养基结合 HPLC 检测从冬瓜腌制发酵过程中筛选产组胺微生物，并经 16S rDNA 序列分析鉴定种属；同时研究了 pH、温度和盐度因素对其生长和产组胺的影响，为浙东特色腌冬瓜中避免组胺的产生提供参考依据，也为浙东腌制蔬菜加工工艺的确定及质量安全控制等提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料

新鲜黑皮冬瓜购于宁波市区农贸市场；*EasyPure* Genomic DNA Kit 试剂盒；扩增用 PCR 体系(10×Buffer、dNTPs、*TransStartTopTaq* DNA polymerase)（北京全式金生物技术有限公司）；引物由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成。

1.1.2 主要试剂

组胺标准品（纯度>98%，Sigma 公司）；L-组氨酸（阿拉丁试剂公司）；5’-磷酸吡哆醛（国药公司）；乙腈（色谱纯，迪马公司）；苯甲酰氯、高氯酸、乙醚（分析纯，国药公司）；其他试剂：均为化学纯和分析纯。

1.1.3 培养基

产组胺菌鉴别培养基：蛋白胨 5.00 g，牛肉浸膏 5.00 g，L-组氨酸 5.00 g，NaCl 2.50 g，5’-磷酸吡哆醛 0.05 g，琼脂 15.00 g，溴甲酚紫 0.06 g，蒸馏水 1000 mL，加热溶解，调 pH 5.5。组胺发酵培养基[15]：L-组氨酸 10.00 g，大豆蛋白胨 17.00 g，葡萄糖 2.50 g，丙酮酸钠 10.00 g，NaCl 3.00 g，磷酸氢二钾 2.50 g，蒸馏水 1000 mL，调 pH 6.0，分装试管。PCA 培养基、MRS 培养基（杭州微生物试剂有限公司）。以上培养基均于 1.01×10^5 高压下，121 ℃蒸汽灭菌 15 min。

1.1.4 设备

LC1200 液相色谱仪(美国 Aglient 公司)；Mastercycler pro 梯度 PCR 仪（德国 Eppendorf 公司）；LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；SPX 智能型生化培养箱（宁波江南仪器厂）；L-550 离心机（湖南长沙湘仪离心机仪器有限公司）；DK-S24 型电热恒温水浴锅（上海精宏实验设备有限公司）；HGC-12D 氮吹仪（上海启威电子有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 冬瓜腌制

将新鲜冬瓜清洗干净后，去籽囊，切成边长 8.0 cm 左右的方块，放入沸水中煮至七分熟左右，捞出放置冷凉开水中浸泡，冷却后取出，稍晾干表面水分，称重。然后按照 1.0 kg 冬瓜加 50.0 g 食盐的比例加入食盐，加盐时将冬瓜块的六个面均匀涂抹上食盐，以面对面、背对背的方式放入坛中。盐水封口后放于阴凉处腌制发酵，20 d 左右即可腌制成熟。

1.2.2 冬瓜腌制不同时期优势菌株的分离纯化

取冬瓜腌制 0、5、10、15、20 d 卤水，用无菌生理盐水稀释到 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} 和 10^{-7} 后，分别取 1.0 mL 稀释液，通过混合培养法培养于 PCA 与 MRS 培养基中，37 ℃培养 2 d，挑取各时期形态不同的优势单菌落进行分离纯化，4 ℃斜面保藏。

1.2.3 产组胺微生物初步筛选

将分离纯化的斜面保藏菌株连续转接斜面 2 次，活化后用点种法接种于产组胺菌鉴别培养基上，30 ℃培养 2 d，菌落生长良好且周围出现紫色晕环的为产组胺可疑菌株，再经划线法接种于产组胺菌鉴别培养基上培养，进行复筛。

1.2.4 可疑菌株产组胺能力的确认

取 1.0 mL 产组胺可疑菌株的菌悬液(10^5 CFU/mL)接种于 9.0 mL 组胺发酵培养基中，同时设置空白对照组，30 ℃培养 36 h，HPLC 法检测发酵液样品中是否有组胺产生。

1.2.5 组胺含量的测定

标准曲线制备：将已配制的 100.0 μg/mL(0.1 M HCl 溶液配制)组胺标准工作液用 0.1 M HCl 溶液稀释至 80.0、50.0、20.0、10.0、5.0、2.0、1.0 μg/mL。衍生过程参考刘振锋[14]等人的方法，并稍作修改：分别取不同浓度的 2.0 mL 稀释液，依次加入 1.0 mL 2 M NaOH，10.0 μL 苯甲酰氯，漩涡震荡 30 s，放置 30 ℃恒温水浴中避光衍生 40 min，反应 20 min 时取出并漩涡震荡 30 s。反应结束后加入 2.0 mL 饱和 NaCl 置于 60 ℃水浴中 5 min 以终止衍生。然后加入 3.0 mL 乙醚，震荡萃取，移取上层有机相，重复一次上述萃取。合并有机相于 10 mL 离心管中，氮气吹干，1.0 mL 乙

腈溶解定容，0.45 μm 滤膜过滤，4 ℃避光保存，24 h 之内待测。每个样品做 3 个平行。

发酵液预处理：准确量取 5.0 mL 发酵液，置于 15.0 mL 离心管中，加入 10.0 mL 0.4 M 高氯酸，震荡提取 5 min，5000 r/min 的条件下离心 30 min，取出上层清液；重复上述提取一次，合并两次清液，再用 0.4 M 高氯酸定容到 25.0 mL，取 2.0 mL 酸提取液，待衍生检测。衍生方法同标准品。

色谱条件：色谱柱：TC C-18 色谱柱（15.0 cm×4.6 mm×5.0μm）；柱温：30 ℃；流动相 A：水；流动相 B：乙腈；流动相梯度洗脱程序：V_A:V_B=60:40，保持 2 min，然后 38:62，保持 8 min，20:80，保持 10 min，最后 0:100，保持 3 min；流速 1.0 mL/min；紫外检测波长：254 nm；进样量：20 μL。

1.2.6 产组胺菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增与序列分析及系统发育树的构建

以试剂盒提取的产组胺菌株 DNA 为模板，引物为细菌 16S rDNA 通用引物，27F：5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’；1492R：5’- TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3’扩增菌株 16S rDNA 全长。50 μL 反应体系：1 μL DNA 模板，1 μL 10 μM 引物 27F，1 μL 10 μM 引物 1492R，5 μL 10×Buffer，4 μL 2.5 mM dNTPs，1 μL DNA polymerase，37 μL ddH_2O。PCR 程序：95 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 50 s，52 ℃复性 50 s，72 ℃延伸 90 s，总计 30 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物直接送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.7 温度对产组胺菌株生长和产组胺的影响

取 1.0 mL 产组胺菌株的菌悬液（10^5 CFU/mL）接种于 9.0 mL 组胺发酵培养基中，设置温度分别为 4 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃，静置培养 36 h，每个温度的样品平行 3 个，并设置空白对照。培养完成后，通过平板计数法测定菌株生长情况；通过 HPLC 法测定培养液中组胺产生情况。

1.2.8 pH 对产组胺菌株生长和产组胺的影响

取 1.0 mL 产组胺菌株的菌悬液（10^5 CFU/mL）接种于 9.0 mL 组胺发酵培养基中，培养基的 pH 已分别调至 3、4、5、6、7、8，30 ℃静置培养 36 h，每个 pH 的样品平行 3 个，并设置空白对照。采用 1.2.8 中的方法测定发酵液中的细菌总数和组胺含量。

1.2.9 盐度对产组胺菌株生长和产组胺的影响

取 1.0 mL 产组胺菌株的菌悬液（10^5 CFU/mL）接种于 9.0 mL 组胺发酵培养基中，用 NaCl 调节培养基盐度分别为 1%、3%、5%、7%、9%，30℃静置培养 36 h，每个盐度的样品平行 3 个，并设置空白对照。采用 1.2.8 中的方法测定发酵液中的细菌总数和组胺含量。

1.2.10 数据分析

实验中分子测序结果通过 BioEdit、MEGA5.0 软件以及 EzBioCloud 数据库进行分析；其余实验数据采用 Excel 2013 分析。

2 结果与分析

2.1 线性方程和回收率

将不同浓度梯度的组胺标准品溶液经 1.2.6 节衍生处理后，通过 HPLC 检测，得到分离良好，峰形对称的谱图，且组胺峰出现在 10 min 左右，如图 1，同时，以组胺标品浓度为横坐标 X（mg/L），峰面积为纵坐标 Y（mAU）作图，得到标准曲线回归方程为 Y=12.392X-32.006，相关系数为 0.9998。以空白对照发酵培养基为底加标回收试验得出该方法回收率达 95%以上，RSD 均小于 6%。根据标准曲线回归方程 Y 轴截距的标准差与斜率平均值比值的 3 倍，得该方法的组胺检出限为 0.5 mg/L。该方法总体线性良好，回收率高，检测限低，可以准确测定组胺的含量。

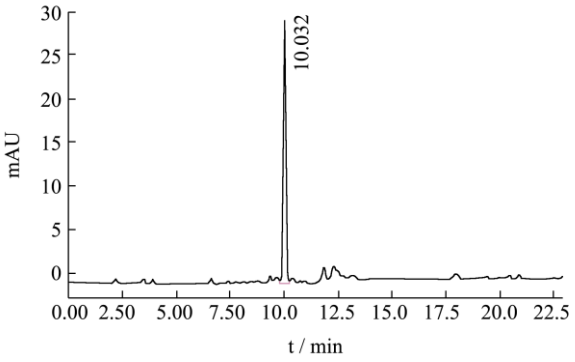


图 1 组胺的液相色谱图

Fig.1 Chromatogram of histamine

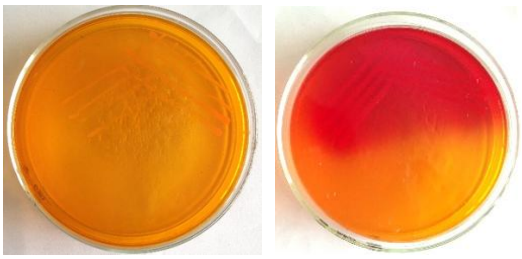
2.2 冬瓜腌制体系中优势菌株的分离纯化

对细菌和乳酸菌培养基中不同形态的优势菌落进行分离纯化，得到 14 株 MRS 培养基中生长的优势菌株（0 d 时数量级达到 10^3 和 5~20 d 时数量级达到 10^5 以上的菌株）以及 13 株 PCA 培养基中生长的优势菌株。

2.3 产组胺菌株的筛选

通过产组胺菌鉴别培养基筛选，有 6 株 MRS 培养基中生长的优势菌株能使培养基变紫色，如图 2。再经 HPLC 检测确证后，如图 3，共有 5 株菌发酵产组胺。将 5 株菌株分别命名为 M1~M5，其中 M1 为 0

d，M2 和 M3 为 5 d，M4 和 M5 为 10 d 的冬瓜腌制优势菌株。



a b

图 2 产组胺菌株初步分离结果

Fig.2 Preliminary isolation of histamine-producing bacteria

注：a：不变色培养基，b：变红色培养基。

2.4 产组胺菌株的 16S rDNA 基因序列分析

菌株的 16S rDNA 经测序后发现 M1、M2 和 M5 以及 M3 和 M4 的碱基序列分别完全相同，因此归属 5 株菌株为 2 个菌种。将 16S rDNA 序列在 EzBioCloud 数据库中进行同源性比对，同种菌中各取菌株 M1 和 M3 构建系统发育树，如图 4。M1 和 M3 均为肠杆菌属，并且 M1 和 *Enterobacter aerogenes*（产气肠杆菌）、M3 和 *Enterobacter xiangfangensis* 其亲缘关系最近。

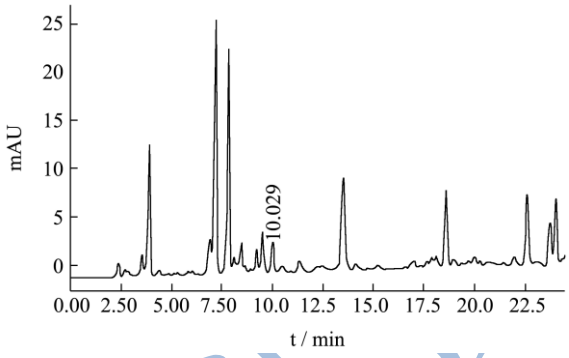


图 3 发酵液中组胺的液相色谱图

Fig.3 Chromatogram of histamine in fermentation broth

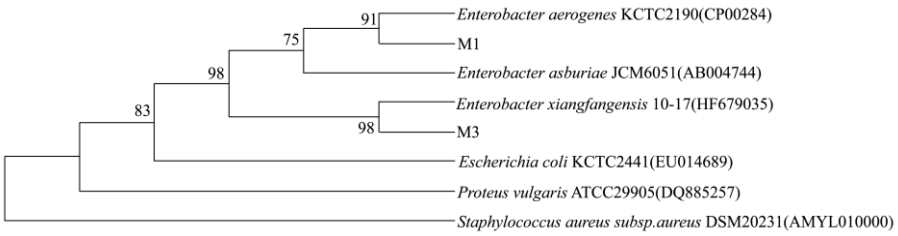


图 4 腌冬瓜体系中产组胺菌株系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of histamine-producing bacteria from pickled wax gourd

2.5 温度对产组胺菌株生长和产组胺的影响

不同温度培养条件下测得菌株生长情况和组胺的含量如图 5 所示。由图 5a 可知，M1 和 M3 的生长受温度影响差异不大，4 ℃时，两者数量均为 10^4~10^5 CFU/mL 之间，表明菌株不仅没有生长，同时还存在缓慢衰亡。在 20~35 ℃之间，M1 和 M3 生长量均先增后减，且最适生长温度均为 30 ℃，分别达到 9.90 lgCFU/mL 和 9.36 lgCFU/mL。由图 5b 表明，菌株在 4 ℃时无组胺产生且产组胺的最 适温度均在 35 ℃，分别达到 35.66 mg/L 和 35.29 mg/L，而在 20~30 ℃之间，组胺含量的变化并不大，相对稳定。

2.6 pH 对产组胺菌株生长和产组胺的影响

不同 pH 培养条件下测得菌株生长情况和产组胺量如图 6 所示。由图 6a 可知，M1 和 M3 的生长受 pH 影响有明显差异，随着 pH 值增大，两者生长量均先增后减，但 M3 的生长量明显大于 M1，pH 为 7 时两者达到最大生长量分别为 10.75 lgCFU/mL 和 14.30 lgCFU/mL。由图 6b 表明，两者产组胺的最适 pH 均为 4，分别达到 35.03 mg/L 和 39.54 mg/L。总之，酸性较强或者偏碱性条件下，M1 和 M3 的生长均会受到抑制，但偏酸性的条件更有利于两者产组胺，这与微生物自身的防御机制密切相关。

2.7 盐度对产组胺菌株生长和产组胺的影响

不同盐度培养条件下测得菌株生长情况和产组胺量如图 7 所示。由图 7a 可知，M1 和 M3 的生长受盐度影响有较明显差异，M3 的生长量总体低于 M1，但 M3 的生长几乎不受盐度影响，而 M1 的生长被大于 5%的盐度抑制明显。在 1%盐度时，两者最大生长量分别为 11.65 lg CFU/mL 和 9.40 lg CFU/mL。由图 7b 表明，在 1%盐度时，两者产组胺最大值分别为 34.45 mg/L 和 25.58 mg/L。

3 讨论

通过氨基酸脱羧酶鉴别培养基筛选产生物胺菌株是传统微生物学方法，容易出现假阳性和假阴性是其主要缺陷[19~21]。甲酚红、氯酚红和溴甲酚绿均比溴甲酚紫容易出现假阳性[19~20]。因此，选择合适的指示剂十分关键，本文采用的是溴甲酚紫指示剂，筛选出的 6 株产组胺可疑菌经 HPLC 检测后证明有 5 株均为

产组胺菌。

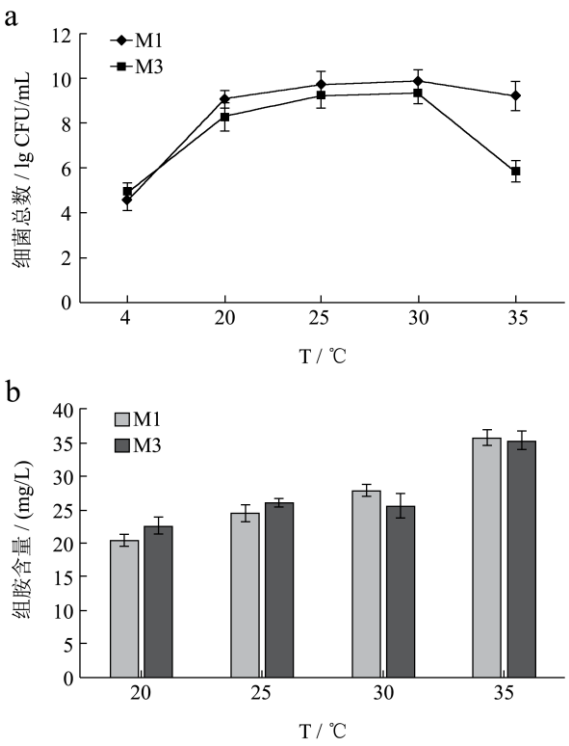


图 5 温度对 M1 和 M3 生长（a）和产组胺（b）的影响

Fig.5 Effect of temperature on the growth (a) and histamine production (b) of histamine-producing bacteria

注：a: 温度对生长的影响，b: 温度对产组胺的影响。

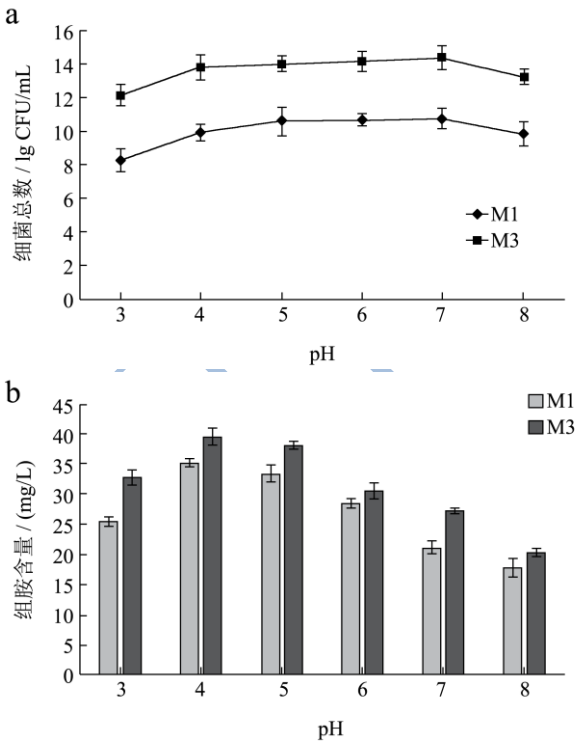


图 6 pH 对 M1 和 M3 生长(a)和产组胺(b)的影响

Fig.6 Effect of the pH on the growth (a) and histamine production (b) of histamine-producing bacteria

注：a: pH 对生长的影响，b: pH 对产组胺的影响。

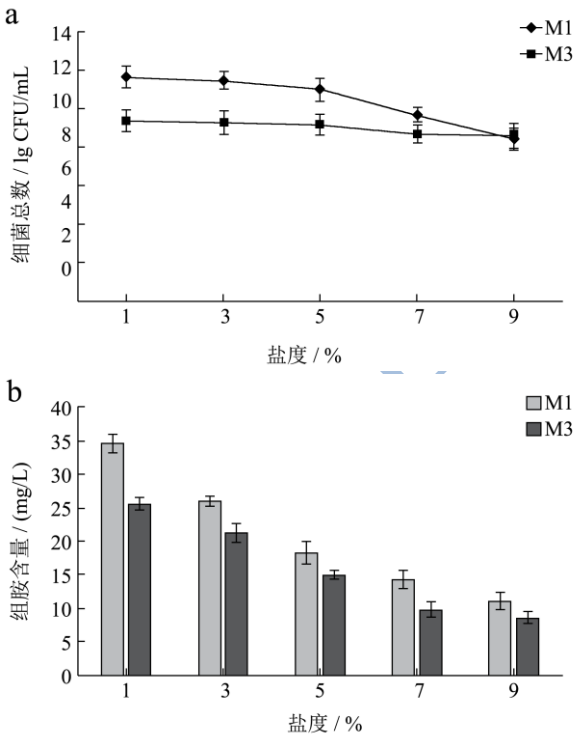


图 7 盐度对 M1 和 M3 生长（a）和产组胺（b）的影响

Fig.7 Effect of salinity on the growth (a) and histamine production (b) of histamine-producing bacteria

注：a: 盐度对生长的影响，b: 盐度对产组胺的影响。

本研究通过稀释法分离产组胺微生物可较好地确定得到的对象菌株为优势微生物，从浙东特色腌冬瓜中定向筛选得到的产组胺菌为肠杆菌属中的 *Enterobacter aerogenes*（产气肠杆菌）和 *Enterobacter xiangfangensis*，这与先前报道的蔬菜中产组胺菌株种类不同，如 Tsai 等[6]从朝鲜泡菜中分离到副干酪乳杆菌、短乳杆菌和短芽孢杆菌产组胺微生物，它们在加 0.25%组氨酸的 MRS 培养基中能产生 13.6~43.1 mg/L 组胺；Kung 等[22]从芥菜泡菜中分离到头葡萄球菌、巴氏葡萄球菌、阴沟肠杆菌、光滑假丝酵母和皱褶假丝酵母，它们在 TSBH 中能产生 8.7~1260.0 mg/L 组胺；田丰伟等[23]检测了 60 余株拟准备用于蔬菜发酵的乳酸菌，结果发现有 3 株组氨酸脱羧酶阳性菌，且与 MRS 培养基和模式蔬菜发酵体系中产组胺结果相一致，这可能的原因是用于腌制的蔬菜种类不同，冬瓜作为腌菜对象在江浙一带以及台湾[22]比较常见。另外，根据前期研究[4]报道，肠杆菌属是冬瓜腌制前期的优势菌群之一，这可能对腌冬瓜中组胺的产生带来影响。

根据实验得到的产组胺菌株生物学特性结果可知，一定范围内的低酸、低盐浓度和较高温度更有利于菌株产组胺，这与文献报道的基本相同。Santos 等[25]认为降低培养温度和 NaCl 含量可以降低生物胺的

生成量；当 NaCl 浓度达到 10%的时候，产组胺菌几乎没有生长现象，从而抑制了组胺的产生[26]。pH 降低，组胺产生量反而增加，这是微生物机体的一种应激机制。在相对低酸和营养贫瘠的条件下，微生物为了维持自身的生长会代谢氨基酸产生碱性生物胺[27]。

本实验得到的 5 株产组胺菌来自于冬瓜腌制的前、中期，它们的生长并没有受到乳酸菌发酵产生的酸性环境和 5%腌制盐度的完全抑制，具有较好的耐酸性和耐盐性，但笔者用 HPLC 法检测腌冬瓜各个时期的样品时并没有检测出组胺，这可能是腌冬瓜体系环境还不足以诱导产组胺菌株调节氨基酸脱羧酶代谢组氨酸产组胺。但根据生物学特性研究中得出的结论，仍应注意避免放置在 30 ℃以上的环境和过酸的条件下腌制和后期保存“臭冬瓜”。

4 结论

从浙东腌冬瓜发酵液体系中分离筛选出 2 种具有产组胺特性的微生物，分别为 M1 和 M3，经 16S rDNA 基因序列的分子鉴定，发现 M1 和 M3 均属于肠杆菌属细菌，分别与 Enterobacter aerogenes（产气肠杆菌）和 Enterobacter xiangfangensis 的亲缘关系最近。M1 和 M3 生长最适温度均为 30 ℃，最适 pH 均为 7，在小于 5%盐度时生长量均稳定。在组胺发酵培养基中，M1 和 M3 产组胺的最适 pH 值均为 4，在 20~35 ℃的适宜生长温度内，最适产组胺温度均为 35 ℃，随盐度的升高，产组胺量均降低。适宜的实验条件下，M1 和 M3 的最大生长量分别为 11.65 lg CFU/mL 和 14.30 lgCFU/mL，最大产组胺量分别为 35.66 mg/L 和 39.54 mg/L。

参考文献

[1] Zhao Y W, Wu Z F, Shen X Q, et al. Bacteria community analysis by quantitative real‐time PCR of fermenting wax gourd and its changes of organic acids [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2013, 38(4): 1399-2055

[2] Giraffa G, Chanishvili N, Widyastuti Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology [J]. Research in Microbiology, 2010, 161(6): 480-487

[3] Shalaby A R. Significance of biogenic amines to food safety and human health [J]. Food Research International，1996, 29(7): 675-690

[4] 赵永威,吴祖芳,沈锡权,等.冬瓜腌制过程中微生物多样性的分析[J].中国食品学报,2014,14(6):208-213
ZHAO Yong-wei, WU Zu-fang, SHEN Xi-quan, et al. Microbial community diversity analysis during the pickled processing of wax gourd [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(6): 208-203

[5] Til H P, Falke H E, Prinsen M K, et al. Acute and subacutetoxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 1997, 35(3-4): 337-348

[6] Tsai Y H, Kung H F, Lin Q L, et al. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan [J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 635-641

[7] Moret S, Smela D, Populin T, et al. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 355-361

[8] 周薇.发酵香肠中生物胺的研究[J].饮料工业,2014,17(8): 27-31
ZHOU Wei. Research of biogenic amines in fermented sausages [J]. Beverage Industry, 2014, 17(8): 27-31

[9] 陈颖,卢士玲,李开雄.传统中式香肠成熟过程中生物胺的生物控制[J].食品与发酵工业,2011,37(1):158-161
Chen Ying, LU Shi-ling, LI Kai-xiong. The biogenic inhibition on the biogenic amines during the ripening of traditional chinese sausage [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(1): 158-161

[10] 李蕊婷,卢士玲,李开雄,等.新疆熏马肠中产氨基酸脱羧酶优势细菌的分离及鉴定[J].现代食品科技,2014,30(9): 85-91
LI Rui-ting, LU Shi-ling, LI Kai-xiong, et al. Separation and Identification of Dominant Bacterial Strains Producing Amino Acid Decarboxylase in Xinjiang Smoked Horsemeat Sausage [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(9): 85-91

[11] 张国梁,郑冬梅,李晓东,等.柱前 DCI 衍生-固相萃取-高效液相色谱法快速测定干酪中的 6 种生物胺[J].中国乳品工业,2013,41(2):41-44
ZHANG Guo-liang, ZHENG Dong-mei, LI Xiao-dong, et al. Using pre-column DCI derivatization, sold phase extraction and HPLC technique to detect guickly of biogenic amines in cheese [J]. Dairy Industry, 2013, 41(2): 41-44

[12] 陆永梅,董明盛,吕欣,等.高效液相色谱法测定黄酒中生物胺的含量[J].食品科学,2006,27(1):196-199
LU Yong-mei, DONG Ming-sheng, LV Xin, et al. Biogenic Amines Contents in Rice Wine by HPLC [J]. Food Science, 2006, 27(1): 196-199

[13] 张春晖,夏双梅.葡萄酒中的生物胺的生产与工艺控制 [J].食品科学, 2002, 23(10): 128-130
ZHANG Chun-hui, XIA Shuang-mei. Production and

Technological Control of Biogenic Amines in Wine [J]. Food Science, 2002, 23(10): 128-130

[14] 邹阳,赵谋明,赵海锋.高效液相色谱法同时测定酱油中的8 种生物胺[J].现代食品科技,2012,28(5):570-573
ZOU Yang, ZHAO Mou-ming, ZHAO Hai-feng. Simultaneous Determination of 8 Kinds of Biogenic Amines in Soy Sauce by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(5): 570-573

[15] 刘振锋,魏云潇,张进杰,等.高效液相色谱法检测中国传统发酵豆腐制品中的生物胺[J].中国食品学报,2010,4: 253-259
LIU Zhen-feng, WEI Yun-xiao, ZHANG Jin-jie, et al. Determination of biogenic amines in chinese traditional fermented tofu by a high performance liquid chromatography method [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 4: 253-259

[16] 杨健,吴祖芳,周秀锦,等.冷冻鲣鱼中产组胺菌的分离筛选及其生物学特性研究[J].中国食品学报,2012,12(8):25-31
YANG Jian, WU Zu-fang, ZHOU Xiu-jin, et al. Study on isolation and biological characteristic of histamine-forming bacteria in frozen storage of raw skipiack tuna [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(8): 25-31.

[17] 杨健,吴祖芳,周秀锦,等.鲐鱼中产组胺菌的分离筛选与生物学特性初步研究[J].食品工业科技,2012,33(9):190-193
YANG Jian, WU Zu-fang, ZHOU Xiu-jin, et al. Study on isolation and biological characteristic of histamine-forming bacteria from mackerel [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(9): 190-193

[18] 赵中辉,林洪,徐杰.高效液相色谱法检测牙鲆体内的生物胺[J].现代食品科技,2011,27(2):228-231
ZHAO Zhong-hui, LIN Hong, XU Jie. Determination of biogenic amines in *paralichthys olivaceus* by high performance liquid chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(2): 228-231

[19] Bover-Cid S, Holzapfel W H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53(1): 33-41

[20] Chen C M, Wei C I, Koburger J A, et al. Comparison of four agar media for detection of histamine producing bacteria in tuna [J]. Journal of Food Protection, 1989, 54(11): 808-813

[21] 李超,董明盛.一种改进的产生物胺乳酸菌的检测方法[J].食品科学,2005,26(6):193-196
LI Chao, DONG Ming-sheng. An improved detection method of lactic acid bacteria producing biogenic amine [J]. Food Science, 2005, 26(6): 193-196

[22] Kung H, Lee Y, Teng D, et al. Histamine formation by histamine-forming bacteria and yeast in mustard pickle products in Taiwan [J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 579-585

[23] 田丰伟,孟甜,丁俊荣,等.蔬菜发酵剂乳酸菌产生物胺的检测与评价[J].食品科学,2010,31(24):241-245
TIAN Feng-wei, MENG Tian, DING Jun-rong, et al. Detection and evaluation of biological amine produced by lactic acid bacteria for vegetable fermentation [J]. Food Science, 2010, 31(24): 241-245.

[24] Lan W T, Chen Y, Yanagida F. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Yan-dong-gua*(fermented wax gourd), a traditional fermented food in Taiwan [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(6): 484-487.

[25] Santos W C, Souza M R, Cerqueira M M O P, et al. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 ℃ [J]. Food Chemistry, 2003, 81(4): 595-606

[26] Paramasivam S, Thangaradjou T, Kannan L. Effect of natural preservatives on the growth of histamine producing bacteria [J]. Journal of Environmental Biology, 2007, 28(2): 271

[27] De Llano D G. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains [J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 26(4): 270-274