

郫县豆瓣自然发酵过程中真菌群落的演替及黄曲霉毒素 B₁ 的消长

汪先丁¹, 刘敏¹, 高鹏², 丁文¹, 高强¹, 孙群^{1,*}

(1.四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川成都 610064;

2.四川省原子能研究院, 四川成都 610101)

摘要:以四川省郫县豆瓣为研究对象, 运用 PCR-DGGE 指纹图谱技术研究豆瓣自然发酵过程中真菌群落的演替, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测豆瓣样品中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)含量。结果表明:郫县豆瓣自然发酵过程中的优势真菌有米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、淀粉丝菌(*Amylomyces rouxii*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)的近缘种, 其中米曲霉是制曲阶段和发酵初期的优势真菌, 淀粉丝菌和米根霉是制曲阶段的优势真菌, 异常毕赤酵母和汉逊德巴利酵母是发酵初期的优势真菌。各发酵时间点样品的 AFB₁ 含量均低于国标(5 μg/kg); 在制曲和发酵初期阶段, AFB₁ 的含量均不断增加, 但在第 14 天后趋于稳定。因此, 对 AFB₁ 的含量生物防治可重点集中在制曲阶段。

关键词:郫县豆瓣; PCR-DGGE; 真菌群落; ELISA; AFB₁

Succession of Fungal Microflora and Change of Aflatoxin B₁ during Fermentation of Pixian Horsebean Paste

WANG Xian-ding¹, LIU Min¹, GAO Peng², DING Wen¹, GAO Qiang¹, SUN Qun^{1,*}

(1. Key Laboratory of Bio-resource and Bio-environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Sichuan Institute of Atomic Energy, Chengdu 610101, China)

Abstract: The succession of fungal microflora and the change of aflatoxin B₁ (AFB₁) during natural fermentation of Pixian horsebean paste were investigated using PCR-DGGE and ELISA analysis. The results showed that *Aspergillus oryzae*, *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, *Pichia anomala*, and *Debaryomyces hansenii* were dominant during natural fermentation of Pixian horsebean paste, with *A. oryzae* as the predominant strain at both the starter propagation stage and incipient fermentation stage. *A. rouxii* and *R. oryzae* were the dominant strains during the starter propagation stage, while *P. anomala* and *D. hansenii* were the dominant strains during the incipient fermentation stage. The amount of AFB₁ in all samples was less than the GB standard of 5 μg/kg. During the starter propagation and incipient stages, AFB₁ concentration revealed a gradual increase and then kept stable after the 14th day. Accordingly, more attention should be paid to the starter propagation stage for the biological control of AFB₁.

Key words: Pixian horsebean paste; PCR-DGGE; fungal microflora; ELISA; AFB₁

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0142-05

川菜作为中国四大菜系之一, 以其色香味形俱佳而享誉全国, 这与作为川菜主要调味料的豆瓣的烹调作用是分不开的, 其中具有三百多年的生产历史、独树一帜的酿造工艺和得天独厚的酿造地理环境的郫县豆瓣因味辣香醇、红棕油亮、黏稠绒实、酱香浓郁等优点广

受消费者青睐, 堪称川菜之魂^[1]。

郫县豆瓣以优质的蚕豆和辣椒为主要原料, 经自然发酵而成的半流动黏稠体或半固态调味品。郫县豆瓣自然发酵过程一般包括发酵制曲阶段、发酵初期、发酵后期 3 个阶段, 发酵中有多种微生物参与, 主要有霉

收稿日期: 2011-06-26

基金项目: 国家科技人员服务企业行动项目(2009GJF00039); 四川省科技支撑计划项目(2010NZ0051);

国际原子能机构(IAEA)支持项目(16356/R0)

作者简介: 汪先丁(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全和食品微生物。E-mail: wangxianding@yahoo.cn

* 通信作者: 孙群(1967—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物学和微生物技术。E-mail: qunsun@scu.edu.cn

菌、酵母和乳酸菌,且微生物群落演替主要发生在发酵制曲阶段和发酵初期^[2]。真菌在豆瓣自然发酵中发挥非常重要的作用。在制曲阶段,霉菌能够分泌蛋白酶、肽酶、淀粉酶、糖化酶等多种酶,其中蛋白酶和肽酶将原料中蛋白质分解成多肽及多种氨基酸;淀粉酶系把淀粉转化成葡萄糖、双糖、三糖等;这些氨基酸和糖类不仅是豆瓣风味的来源,而且为后阶段其他微生物的生长创造条件。在发酵初期,酵母将糖发酵成酒精和二氧化碳,酒精既参与酯类的合成,也能被氧化成有机酸类,在豆瓣风味形成中发挥重要作用。自然发酵豆瓣酱醅中也存在一些对豆瓣品质有不良影响的真菌,如毛霉和青霉能产生霉臭味,影响豆酱的风味,产毒黄曲霉和寄生曲霉还可产生黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁),其具有强烈的致癌、致畸和致突变作用,是重大食品安全隐患,因此对豆瓣发酵过程中的 AFB₁ 的检测和监控就显得非常重要。此外,细菌在豆瓣自然发酵中也发挥着重要的作用,在豆瓣发酵过程中乳酸菌产生的有机酸与酵母产生的酒精形成酯类物质,增添豆瓣的风味,同时还能抑制一些杂菌的生长^[3]。张琦等^[4]通过研究发现郫县豆瓣自然发酵过程中细菌群落结构的变化较明显,乳酸菌和 *Staphylococcus xylosus* 是发酵中的优势细菌,其中 *Lactobacillus plantarum* 是制曲阶段和发酵初期的优势细菌, *Weissella confusa* 和 *Leuconostoc lactis* 是发酵初期的优势菌并非常少量地存在于制曲阶段, *Lactobacillus namurensis* 在发酵后期占优势, *S. xylosus* 在整个发酵中占优势,而一些培养细菌克隆却交替出现在不同发酵阶段。

近年来聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术被广泛应用于传统发酵食品微生物区系的研究中。2000年, Omar 等^[5]利用 DGGE 对墨西哥发酵面团(Pozol)发酵过程中的微生物种群动力学进行了研究, Meroth 等^[6]将 DGGE 技术用于研究酸面团发酵过程中酵母群落的动态, Kim 等^[7]使用 DGGE 研究了一种韩国发酵黄豆酱(Doenjang)中的微生物群落。目前对郫县豆瓣中的微生物研究主要还是采用传统分离培养的研究方法,采用现代分子生物学技术对郫县豆瓣中微生物区系的研究报道还是很少。

迄今为止,黄曲霉毒素分析法主要有薄层层析法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、免疫层析(IC)等,ELISA 法是在免疫学和细胞工程学基础上发展起来的一种微量检测技术,该方法快速、灵敏、特异性强、成本较低,特别适合于对 AFB₁ 污染检测控制中大量样品的筛查^[8]。

本研究采用 PCR-DGGE 技术对郫县豆瓣自然发酵过程中真菌群落进行分析,以期揭示郫县豆瓣自然发酵过

程中真菌种群的动态变化,同时采用 ELISA 法检测不同发酵时间点发酵物中 AFB₁ 含量,并探讨豆瓣发酵中 AFB₁ 含量的消长与真菌种群动态变化之间的相关性,为豆瓣发酵中黄曲霉的生物防治提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

郫县豆瓣,由四川郫县豆瓣厂提供。

依据郫县豆瓣的生产工艺,在豆瓣自然发酵过程按发酵进程依次取样,分别取得发酵 1、4、7、14、30d 的豆瓣作为研究材料,其中 1、4、7d 属于制曲阶段;14d 和 30d 属于发酵初期。

氯仿、异戊醇、乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、甲叉双丙稀酰胺、Tris 碱、尿素、甲酰胺 博瑞克生物技术公司;引物 英潍捷基(上海)贸易有限公司;Taq DNA Polymerase、dNTPs 宝生物工程(大连)有限公司;AFB₁ 酶联免疫定量测试盒 江苏省苏微微生物研究有限公司。

1.2 仪器与设备

Dcode™ 通用突变检测体系、S1000™ Thermal Cycler、Bio 凝胶成像系统、PowerPac 基础电泳仪电源、Model 680 酶标仪 美国 Bio-Rad 公司;ST-02A 型多功能粉碎机 永康市帅通工具有限公司。

1.3 方法

1.3.1 生产工艺流程

制曲阶段(约 7d): 胡豆脱壳→漂烫→冷却→拌入面粉→入曲房制曲→豆瓣成曲;加入 30%~40% 盐水后搅拌混匀,进入发酵初期阶段:保温发酵→成熟瓣子;加入腌制辣椒醅,进入发酵后期:混和发酵→成熟豆瓣。

1.3.2 豆瓣样品中真菌总 DNA 的提取

室温解冻后称取 25g 豆瓣样品,浸于 0.1g/100mL 225mL 灭菌蛋白胨水中,于摇床上 180r/min 振摇 30min,制成 10% 菌悬液。采用改良的 CTAB 法^[9]并结合玻璃珠振荡破碎细胞壁提取样品中真菌总 DNA,经 RNase 纯化后作为后续 PCR 反应的模板。

1.3.3 PCR-DGGE 分析

以纯化后的真菌总 DNA 为模板,选用带 GC clamp (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G) 真菌通用引物 GC-FF390 (5'-GC Clamp-CGATAACGAACGAGACCT-3') 和 FR1(5'-AICCATICA ATCGGTAIT-3')^[10] 扩增 18S rDNA 的部分序列。PCR 反应体系为 50μL: 10× Buffer 5μL、2.5mmol/L dNTP 4μL、25mmol/L MgCl₂ 3μL、Taq DNA 聚合酶 0.25μL、上下游引物各 1μL、ddH₂O 31.75μL、模板 DNA 4μL。

反应程序: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30s, 52℃退火 45s, 72℃延伸 30, 35 个循环; 72℃延伸 7min。扩增产物用 2% 琼脂糖电泳检测。

变性梯度凝胶电泳(DGGE): 对真菌 18S rDNA 的 PCR 产物进行 DGGE, PCR 产物上样于 7% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性梯度为 30%~60%(100% 的变性剂含有 7mol/L 尿素和 40% 甲酰胺), 在 1×TAE 缓冲液中, 60℃、80V 恒温、恒压下电泳 14h。电泳结束后, 将 DGGE 胶用 SYBR Green I (1×TAE, 1:10000)染色, 共染 3 次, 每次 15min, 之后将 DGGE 胶片在 Bio 凝胶成像系统下拍照, 图像用 Quantity one (Bio-Rad)软件进行分析。

代表性条带切胶回收、测序: 对 DGGE 图谱中代表性条带切胶回收, 加入 40μL TE 缓冲液 4℃浸泡过夜, 离心后取上清为模板, 用不含 GC clamp 的引物 FF390 和 FR1 再次扩增 18S rDNA 区, 反应体系和程序同上。PCR 产物纯化后送上海 Invitrogen 生命技术有限公司测序, 测序结果提交 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 Blast 相似序列检索, 并于 GenBank 上获得序列登录号。

1.3.4 DGGE 指纹图谱的聚类分析

采用 Quantity one 软件对豆瓣样品中真菌群落的 DGGE 指纹图谱进行聚类分析, 聚类图是基于 DGGE 图谱中各泳道之间的皮尔森相关系数, 采用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类。

1.3.5 AFB₁ 的检测

采用 ELISA 法检测, 具体的提取方法(包括豆瓣样品的前处理)参照 AFB₁ 酶联免疫定量试剂盒中的说明书进行, 每个样品进行 3 次测定, 取浓度的平均值。

1.4 统计分析

使用 Microsoft Office Excel 2003 和 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 基于 18S rDNA 的 PCR-DGGE 技术分析豆瓣发酵过程中真菌群落的动态变化

DGGE 指纹图谱上的一个条带代表一个微生物类群(分类水平可达种), 条带数越多说明微生物多样性越丰富^[11]。条带染色后的荧光强度反映该菌的相对丰富度; 条带信号越亮, 表示该菌数量相对越多。

郫县豆瓣自然发酵过程中的不同时期样品中的真菌 18S rDNA PCR-DGGE 指纹图谱见图 1, 其代表性条带的测序结果见表 1。如图 1 所示, 在制曲阶段(1~7d), 真菌条带较多, 且优势种条带较明显; 在发酵前期, 真菌条带较制曲阶段减少, 部分条带有所变暗, 但在 14~30d 的发酵过程中, 条带强度有增大趋势。代表性条带

的测序结果显示, 发酵中主要真菌有淀粉酶菌(*Amylomyces rouxii*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)的近缘种。条带 1、4 在 1、4、7d 的豆瓣样品中很明亮, 在发酵初期(14、30d)样品中其亮度变小; 条带 1、4 分别为 *A. rouxii* 和 *R. oryzae* 的近缘种。*A. rouxii* 是南亚、中国和印度的传统发酵食品中添加的种曲的主要成分之一^[12]。*R. oryzae* 产淀粉酶活力很强, 除糖化作用外, 可产生少量乙醇、乳酸、反丁烯二酸及大量的丁烯二酸^[13]。条带 2 是整个发酵过程的优势种条带, 在发酵过程中其亮度一直很大, 条带 2 为 *A. oryzae* 的近缘种; 在制曲阶段, *A. oryzae* 在豆瓣子上生长繁殖, 产生蛋白酶、淀粉酶等多种酶, 蛋白酶将蛋白质水解为各类氨基酸, 淀粉酶将淀粉水解为糖类物质, 为其他微生物提供必要的营养^[14]。条带 3 在发酵过程中逐渐变暗, 其为 *Absidia corymbifera* 近缘种。条带 5 在 4d 的样品中存在, 随后消失, 但在 30d 的样品又出现, 条带 5 为 *P. anomala* 近缘种。条带 6 在 4d 样品中最明亮, 在发酵初期, 条带 6 的亮度逐渐变大, 条带 6 为 *D. hansenii* 近缘种。*D. hansenii* 是一种在食品尤其是奶制品中经常出现的酵母, 它能在高盐浓度下产生蛋白酶和脂肪酶^[15]。Kim 等^[7]发现 *D. hansenii* 是韩国黄豆酱(Doenjang)中最普遍的真菌之一。条带 7 和 8 仅存在 1、4、7d 的样品中, 分别为 *Mucor genevensis* 和 *Aspergillus flavus* 近缘种。条带 9 微弱存在发酵 1、7、14d 的样品中, 鉴定为 *Aspergillus sojae* 的近缘种。条带 10、11 较弱地存在于 1、7、14、30d 的样品中, 条带 10 为 *Zygosaccharomyces rouxii* 近缘种。*Z. rouxii* 是一种耐盐酵母, 在发酵大豆酱香气的产生中发挥非常重要的作用, 它能产生异戊醇、戊醇、异丁醇等豆酱中重要风味物质^[16]。条带 11 为 *Metschnikowia pulcherrima* 的近缘种。

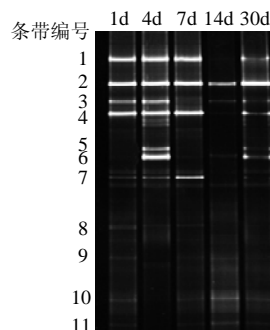


图 1 豆瓣发酵各阶段真菌群落 DGGE 指纹图谱

Fig.1 DGGE fingerprints of fungal community in horsebean paste at different fermentation stages

表1 图1中DGGE条带的鉴定
Table 1 Identification of DGGE bands in Fig. 1

条带编号	序列登录号	最相似菌株(序列登录号)	相似度/%
1	JN092357	<i>Amylomyces rouxii</i> (AY054697)	96
2	JN092358	<i>Aspergillus oryzae</i> (HQ292335)	98
3	JN092359	<i>Absidia corymbifera</i> (AF113408)	99
4	JN092360	<i>Rhizopus oryzae</i> (GU126375)	97
5	JN092361	<i>Pichia anomala</i> (EF550479)	99
6	JN092362	<i>Debaryomyces hansenii</i> (AJ508273)	98
7	JN092363	<i>Mucor genevensis</i> (HM623319)	97
8	JN092364	<i>Aspergillus flavus</i> (HQ393872)	100
9	JN092365	<i>Aspergillus sojae</i> (D63700)	100
10	JN092366	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (AY046251)	100
11	JN092367	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (AB023473)	97

2.2 DGGE 指纹图谱的聚类分析

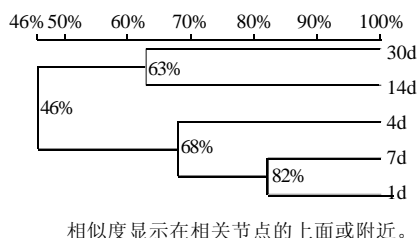
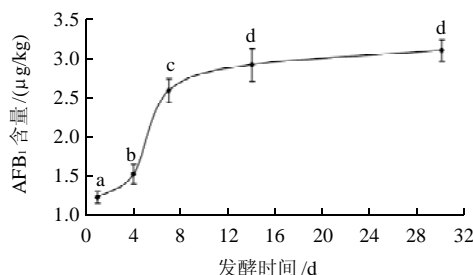


图2 豆瓣真菌群落 DGGE 指纹图谱聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of DGGE fingerprints of fungal community in horsebean paste

UPGMA 聚类分析旨在评估不同发酵时间点豆瓣样品中真菌群落结构的相似性, 采用皮尔森相关系数计算相似度。由图2可知, 5个时间点的样品分成2组: 组1 (1、4、7d样品)和组2 (14、30d样品), 发酵1d和7d样品的相似性为82%, 发酵14d和30d样品的相似性为63%, 制曲阶段样品组1和发酵初期阶段样品组2的相似性只有46%。DGGE 指纹图谱聚类分析结果表明, 不同发酵阶段样品中真菌群落结构相似性较低, 同一发酵阶段样品中真菌群落结构相似性较大。

2.3 AFB₁ 在豆瓣发酵过程中的消长规律



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图3 豆瓣样品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量

Fig.3 AFB₁ concentration of horsebean paste samples

由图3可知, 在整个豆瓣发酵过程中 AFB₁ 含量均未超过国标($5 \mu\text{g/kg}$)。在制曲阶段, AFB₁ 含量迅速增加, 由第1天的(1.235 ± 0.079) $\mu\text{g/kg}$ 增加到第7天的(2.602 ± 0.156) $\mu\text{g/kg}$ ($P < 0.05$); 从第8天开始进入发酵初期阶段后, AFB₁ 含量随发酵时间延长有所增加($P < 0.05$), 但在第14天后趋于稳定($P > 0.05$)。直至检测的第30天。但在实际生产工艺中, 由于在制曲阶段结束时(第8天)一般都要添加30%~40%的盐水后才进入发酵初期, 故按单位质量计的发酵物中 AFB₁ 含量实测值是变低了。

在 DGGE 指纹图谱中, 代表黄曲霉菌(*A. flavus*)的条带8在制曲阶段一直较弱地存在, 但在发酵初期消失了, 表明 *A. flavus* 数量减少了, 这可能是发酵阶段 AFB₁ 含量趋于稳定的原因。自然界中有多种微生物包括乳酸菌、芽孢杆菌、酵母等能抑制黄曲霉的生长和产毒^[17]。Huass 等^[18]研究发现腐生型酵母, 如假丝酵母属(*Candida* sp.)和毕赤酵母属(*Pichia* sp.)的一些种能够在很大程度上抑制黄曲霉生长。对有伤口的阿月浑子坚果喷洒了 *P. anomala* 酵母后, 相比于对照组, *A. flavus* 孢子数减少了77%~99%, *A. flavus* 的定殖减少了3~5倍^[19]。本研究中, 对应 *P. anomala* 的条带5在发酵4d和30d的样品中非常明亮, 表明 *P. anomala* 在这两个时间点样品的数量相对较多, 这与 *A. flavus* 的数量变化和 AFB₁ 含量的变化趋势基本符合。此外, 条带11代表的 *M. pulcherrima* 在发酵初期样品中一直存在, 但其数量在14d样品中相对更大。*M. pulcherrima* 是一种具有高效生物控制能力的酵母。Turkel 等^[20]研究发现 *M. pulcherrima* 的3种分离株对一些人类致病菌 *Proteus vulgaris*、*Escherichia coli* 及 *A. flavus*、*Aspergillus fumigatus* 具有有效的拮抗作用。*P. anomala* 和 *M. pulcherrima* 在豆瓣中的存在可能对 *A. flavus* 的生长有抑制作用。Khanafari 等^[21]发现接种在玉米上的 *L. plantarum* 能很大程度上抑制 *A. flavus* 孢子的生长, 并具有一定降解 AFB₁ 的能力。Lavermicocca 等^[22]研究表明分离自小麦粉水解液中的 *L. plantarum* 的培养液能抑制 *A. flavus* 的生长。先前研究表明 *L. plantarum* 是豆瓣自然发酵过程中制曲阶段和发酵初期的优势细菌, 因此, 认为在豆瓣自然发酵中 *L. plantarum* 可能与 *P. anomala* 和 *M. pulcherrima* 共同抑制了 *A. flavus* 的生长, 进而影响了豆瓣发酵过程中 AFB₁ 含量的变化。

3 结论

郫县豆瓣自然发酵过程中真菌群落发生了一定的演替, 米曲霉在整个发酵制曲和发酵初期均占优势, 其他多数霉菌在发酵制曲阶段占优势, 而酵母多作为优势真菌存在于发酵初期。在豆瓣发酵过程中, AFB₁ 主要产生在制曲阶段, 因此对黄曲霉的生物防治可集中在制曲阶段。

参考文献:

- [1] 李幼筠. “郫县豆瓣”剖析[J]. 中国酿造, 2008(11): 83-86.
- [2] 张森, 何江红, 贾洪锋, 等. 四川豆瓣加工工艺及风味物质研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2011, 47(1): 35-38.
- [3] 刘超兰, 黄著, 彭熙敏, 等. 乳酸菌和酵母共培养技术缩短郫县豆瓣酱陈酿期的应用研究[J]. 中国酿造, 2009(3): 105-108.
- [4] 张琦, 汪先丁, 杨虎, 等. 郫县豆瓣自然发酵过程中细菌群落结构的变化[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(6): 16-18.
- [5] OMAR N B, AMPE F. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 3664-3673.
- [6] MEROTH C B, HAMMES W P, HERTEL C. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(12): 7453-7461.
- [7] KIM T W, LEE J H, KIM S E, et al. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131(2/3): 265-271.
- [8] TRUCKSESS M W, STACK M E, NESHEIM S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxins B₁, B₂ and G₁ in corn, cottonseed, peanuts, peanut butter, and poultry feed: collaborative study[J]. JAOAC Int, 1989, 72(6): 957-962.
- [9] 程志学, 陈清华, 于远, 等. 适合 AFLP 分析用的节瓜基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 420-424.
- [10] VAINIO E J, HANTULA H. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA[J]. Mycol Res, 2000, 104(8): 927-936.
- [11] 朱海霞, 陈林海, 张大伟, 等. 活性污泥微生物菌群研究方法进展[J]. 生态学报, 2007, 27(1): 314-322.
- [12] HESSELTINE C W, ROGERS R, WINARNO F G. Microbiological studies on amylolytic oriental fermentation starters[J]. Mycopathologia, 1988, 101(3): 141-155.
- [13] 张金兰, 鲁绯, 纪凤娣, 等. 大豆发酵食品中根霉的研究进展[J]. 中国酿造, 2010, 222(9): 1-4.
- [14] 阚建全. 食品化学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 256-274.
- [15] DOLCI P, BARMAZ A, ZENATO S, et al. Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106: 278-287.
- [16] JANSEN M, VEURINK J H, VEURINK, et al. Growth of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* in microtiter plates: effects of NaCl, pH and temperature on growth and fusel alcohol production from branched-chain amino acids[J]. FEMS Yeast Research, 2003, 3(3): 313-318.
- [17] 刘付香, 李玲, 梁炫强. 生物防治黄曲霉毒素污染研究进展[J]. 中国生物防治, 2010, 26(1): 96-101.
- [18] HUASS T, BAKER J L, FLORES-ESPIRITU M. Interactions of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus flavus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(6): 2738-2740.
- [19] HUASS T. Application of a yeast, *Pichia anomala* strain WRL-076 to control *Aspergillus flavus* for reducing aflatoxin in pistachio and almond[J]. Management of Plant Diseases and Arthropod Pests by BCAs IOBC/wprs Bulletin, 2004, 27(8): 291-294.
- [20] TURKEL S, ENER B. Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin[J]. Zeitschrift fur Naturforschung, Section C, Biosciences, 2009, 64(5/6): 405-410.
- [21] KHANAFARI A, SOUDI H, MIRABOULFATHI M. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production in corn[J]. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2007, 4(3): 163-168.
- [22] LAVERMICOCCA P, VALERIO F, EVIDENTE A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B[J]. Appl Environ Microb, 2000, 66(9): 4084-4090.