

腊鱼产香酵母菌的筛选 及其发酵产香特性初步研究

梁 慧^{1,2}, 马海霞¹, 李来好^{1,*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 国家水产品加工技术研发中心 农业部华南水产品加工与质量安全研究中心, 广东广州 510300; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要: 从传统腊鱼中分离筛选得到了两株产香酵母。结合形态学和酵母菌 26S rDNA1/D2 区序列分析, 初步鉴定一株为季也蒙毕赤酵母(*Pichia guilliermondii* H9), 另一株为近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis* J11)。采用固相微萃取(SPME)和气质联用(GC-MS)技术分析两株酵母麦芽汁发酵液的挥发性成分。结果表明, 两株酵母的麦芽汁发酵液中的挥发性成分主要为醇类和酯类, 但种类和组成差异较大。最后, 对两株酵母进行耐盐性、亚硝酸盐耐受性、耐酸性等发酵适应性实验。结果表明, 近平滑假丝酵母的发酵适应性强于季也蒙毕赤酵母, 有望将其开发成为新型肉品发酵剂。

关键词: 腊鱼, 产香, 酵母菌, 26S rDNA, 发酵特性

Screening of aroma-producing yeast strains from dry-cured fish and initial study on their aroma-production and fermentation characteristics

LIANG Hui^{1,2}, MA Hai-xia¹, LI Lai-hao^{1,*}

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, National Research and Development Center for Aquatic Product Processing, South China Research Center for Aquatic Product Processing and Quality Safety, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China;
2. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Two yeast strains were isolated from dry-cured fish, and initially identified as *Pichia guilliermondii* (H9) and *Candida parapsilosis* (J11) by morphological characteristics and 26S rDNA1/D2 domain sequence analysis. Volatile compounds from malt wort fermentation broth of yeast H9 and J11 were analyzed by headspace solid-phase micro extraction (SPME) coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results showed that volatile compounds from malt wort fermentation broth of two species yeast strains were mainly alcohols and esters, but of great difference in kind and composition. Finally, *Candida parapsilosis* was considered to have the potential to be developed as a new starter culture for meat because of its better fermentation adaptability such as salt tolerance, nitrite tolerance and acid resistance.

Key words: dry-cured fish; aroma production; yeast; 26S rDNA; fermentation characteristics

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)12-0213-05

产香酵母, 是一类能产生香味物质的酵母菌, 目前主要分离筛选产香酵母并将其应用于白酒、葡萄

酒、果汁、酱油、香精香料中^[1]。产香酵母在代谢过程中主要产生醇类和酯类等香味物质, 从而赋予食品特有的香气^[2]。微生物作用下醇类和酸类的酯化反应产生具有各种芳香气味的酯类, 对提高产品的风味品质有重要作用。目前, 酵母菌对发酵肉制品风味的形成特点尚未有定论^[3]。Olesen 等^[4]发现产肮假丝酵母(*Candida utilis*)能产生多种挥发性成分, 特别是酯类和醇类, 而汉逊氏德巴利酵母对挥发性成分的形成几乎没有作用; 而另一些研究则表明德巴利酵母影响蛋白质水解和挥发性成分产生, 适量的德巴利酵母可以通过抑制脂肪氧化和促进乙酯类的形成来影响挥发性产物, 但德巴利酵母过量将会产

收稿日期: 2011-08-26 * 通讯联系人

作者简介: 梁慧(1986-), 女, 硕士研究生, 从事水产品加工与质量安全研究。

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-49); 国家农业科技成果转化资金项目(2010GB23260577, 2009GB2E200303, 2010GB2E000335); 广东省科技计划项目(2009A020700004, 2008A020100006, 2009B020201003); 广东省海洋渔业科技推广项目(A200899B02, A200901C01); 农业部中央级公益性科研院所基本科研项目(2010YD07)。

生大量的酸对风味产生负面影响^[5-6]。目前,已有很多关于肉制品中优势细菌(乳酸菌、葡萄球菌和微球菌等)筛选及应用的研究,国外也早已将酵母菌应用于发酵肉制品的生产中,常选用的是汉逊氏德巴利酵母(*Dabaryomyces hansenii*)和法玛塔假丝酵母(*Candida famata*),但直接从传统肉制品中筛选优势自然酵母菌株的研究甚少。国内传统肉制品(如火腿、香肠、腊鱼、腊肉等)中广泛存在着优良的自然菌株,是分离筛选优良野生菌株的重要来源。该研究从传统腊鱼中筛选产香酵母菌,结合酵母菌的培养形态及26S rDNAD1/D2区序列分析进行快速分类鉴定^[7],并研究其产香特性及其耐盐性、亚硝酸盐耐受性和耐酸性等相关发酵特性,旨在分离得到能够应用于肉制品加工的产香酵母,为开发新的肉制品发酵剂提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

腊鱼 湖北荆州自制腊鱼; **麦芽汁琼脂培养基、麦芽汁液体培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基** 广东环凯微生物科技有限公司; **YEPD 液体培养基配方** 酵母粉 10g,蛋白胨 20g,葡萄糖 20g,蒸馏水 1000mL, pH 6.0, 115℃ 湿热灭菌 20min; **麦氏培养基** 葡萄糖 1.0g, KCl 1.8g, 酵母粉 2.5g, 醋酸钠 8.2g, 琼脂 15g, 蒸馏水 1000mL, 121℃ 湿热灭菌 20min; **Biospin 真菌基因组提取试剂盒** 杭州博日科技有限公司; **破壁酶** 广州东盛生物科技有限公司; **山梨醇缓冲液** 广州东盛生物科技有限公司; **PCR master mix 2 × Fermentas**; **琼脂糖** 西班牙 Biowest; **NaCl (分析纯)**。

明鉴 SPX 型智能生化培养箱 宁波江南仪器厂; **全自动高压蒸汽灭菌锅** 日本 YAMATO 公司; **超净工作台** 苏州净化设备有限公司; **冷冻离心机** Sigma; **Eppendorf 梯度 PCR 仪** 德国艾本德公司; **Tanon1600 型全自动数码凝胶图像处理系统** 上海天能科技有限公司; **紫外-可见分光光度计 Spectronic genesys™ 5** 赛默飞世尔科技公司; **手动 SPME 进样器、15mL 进样瓶、65μm PDMS/DVB 纤维萃取头** 美国 Supleco 公司; **岛津 GC-MS 2010plus** 日本 Shimadzu 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母菌分离纯化 无菌条件下称取 25g 剪碎鱼肉置于 225mL 生理盐水中,充分振荡,菌悬液经适当稀释后涂布在麦芽汁琼脂平板上,28℃ 培养 3d。选择具有典型酵母菌菌落特征的单菌落进一步划线分离纯化,直至得到纯菌株。

1.2.2 产香酵母菌的筛选 将分离纯化得到的菌株分别接入麦芽汁液体培养基中,于 28℃ 摇床培养 1d, 28℃ 静置培养 2d。感官评定筛选出发酵液产生醇香、酯香的菌株。

1.2.3 酵母菌耐盐性 以 2% 的接种量将酵母菌接种于氯化钠含量分别为 0、2%、4%、6%、8%、10% 的 YEPD 液体培养基中,28℃ 摇床培养 24h,于 600nm 处测定 OD 值。

1.2.4 酵母菌亚硝酸盐耐受性 以 2% 的接种量将酵母菌接种于亚硝酸盐含量分别为 0、5、100、150mg/kg 的 YEPD 液体培养基中,28℃ 摇床培养 24h,于 600nm 处测定 OD 值。

1.2.5 酵母菌耐酸性 以 2% 的接种量接种酵母菌于用乳酸调节 pH 为 4.0、5.0、6.0 和 7.0 的 YEPD 液体培养基中,28℃ 摇床培养 24h,于 600nm 处测 OD 值。

1.2.6 酵母的形态培养特征观察 固体培养特征观察:将分离纯化后的酵母菌株涂布到麦芽汁琼脂培养基平板上,28℃ 培养 72h,观察菌落大小、色泽、表面形态、边缘情况等特征。液体培养特征观察:将分离纯化后的酵母接种于麦芽汁液体培养基中,28℃ 培养 72h 后观察有无醭以及有无沉淀物。在油镜下观察酵母的菌体形态及出芽方式,同时观察酵母菌的子囊孢子、掷孢子和假菌丝产生情况^[8-9]。

1.2.7 产香酵母菌的鉴定 按照 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取酵母菌的 DNA,根据 KURTZMAN 等^[10]的方法扩增分离菌株 26S rDNA 的 D1/D2 区域,引物为 NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') 和 NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'),由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应体系(25μL): PCR master mix 2 × (Fermentas) 12.5μL,引物 NL1/NL4(10μmol/L) 各 1μL,模板 DNA 2μL。PCR 扩增条件:95℃ 预变性 5min,94℃ 变性 40s,55℃ 退火 40s,72℃ 延伸 30s,40 个循环后,72℃ 延伸 10min。PCR 产物由华大基因测序完成。应用 BLAST 程序将所获得的 26S rDNAD1/D2 区序列与 NCBI-GenBank 数据库中已知酵母菌相应序列进行同源性分析,以确定菌种归属。

1.2.8 SPME 法提取发酵液中的挥发性风味物质 取菌株麦芽汁液体培养基发酵液(28℃ 摇床培养 1d, 28℃ 静置培养 2d) 8mL 置于 15mL 的样品瓶内,加入 2g NaCl 加盖封口,将样品瓶置于 50℃ 平衡 10min,用固相微萃取手柄将探头插入萃取瓶中,退出探头,使探头置于样品瓶的顶空部分(分析前萃取头在 GC 进样口处 250℃ 解析 5min),于 50℃ 的磁力搅拌器上 1000r/min 萃取 30min,萃取完成后在进样口解析 7min^[11-12],用于气相色谱检测酵母菌麦芽汁液体培养基发酵液挥发性风味成分。

1.2.9 菌株发酵液挥发性风味成分 GC/MS 分析条件 色谱条件: DB-5MS 型色谱柱(30m × 0.25mm × 0.25μm)。不分流进样;进样口温度 250℃;升温程序:35℃,保留 2min,以 1℃/min 升到 65℃,再以 6℃/min 升到 220℃,保持 3min;载气为高纯氦气,流速为 1mL/min。质谱条件:电离方式为 EI,电离电压 70eV;离子源温度为 230℃;扫描范围 33~450m/z,扫描方式为 scan。

各组分经过计算机 NIST05.LIB 谱库检索并与相关文献比较,报道匹配度最大的结果,并通过面积归一化法计算挥发性成分的相对百分含量。

2 结果与分析

2.1 两株产香酵母的培养特征观察

分离得到两株产香酵母菌 H9 和 J11,发酵液的

表2 分离酵母菌株 26S rDNA 序列相似性分析

菌株	序列长度 (bp)	比较酵母菌登录号	同源性 (%)	鉴定结果	GenBank 登录号
H9	595	AAFM01000051	99.66	<i>Pichia guilliermondii</i> (季也蒙毕赤酵母)	JN181254
J11	617	CABE01000013	98.37	<i>Candida parapsilosis</i> (近平滑假丝酵母)	JN181253

感官香气分别为醇香和酯香,其培养特征如表1所示。

表1 酵母菌的菌落及菌体形态和液体培养特征

菌株	H9	J11
形状	圆形	圆形
色泽	白色、略有光泽	乳白色、略有光泽
表面形态	丘状突起	隆起
边缘状况	整齐	整齐
菌体形态	球形或卵球形	球形或卵球形
芽殖	有	有
假菌丝	无	有
子囊孢子	有	无
掷孢子	无	无
液体培养	浑浊有沉淀、无醭	浑浊有沉淀、无醭

2.2 两株产香酵母分离株的 PCR 结果

以 NL1 和 NL4 为引物对筛选所得的菌株 DNA 进行酵母菌特异性 PCR 扩增得到 26S rDNA 中 D1/D2 区域序列,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段长度均为 600bp 左右,且无明显非特异性条带,如图1所示。

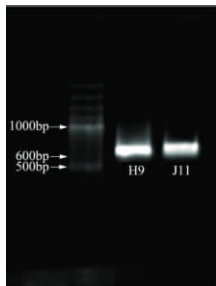


图1 酵母 H9 和 J11 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.3 26S rDNA 序列分析

经测定, H9 和 J11 两株产香酵母菌 26S rDNA D1/D2 区序列扩增片段长度分别为 595bp 和 617bp,将两组序列应用 BLAST 程序与 NCBI - GenBank 数据库中的已知酵母菌序列进行相似性比较分析,结果发现,菌株 H9 的 26S rDNA D1/D2 区序列与 GenBank 数据库中 *Meyerozyma guilliermondii* (*Pichia guilliermondii* ATCC 6260) 登录号为 AAFM01000051 的序列相比,仅有 2bp 的差异,同源性达到 99.66%;菌株 J11 与 Gen - Bank 数据库中 *Candida parapsilosis* CDC317 登录号为 CABE01000013 的序列相比,除多了 3 个核苷酸,还有 10bp 的差异,同源性为 98.37%,鉴定结果如表2所示。

2.4 产香酵母发酵液挥发性风味成分分析

H9 和 J11 两株产香酵母发酵液的挥发性成分气相色谱图如图2、图3所示,各组分质谱经计算机 NIST05.LIB 谱库检索及相关资料分析,用峰面积归一化法,计算各组分相对百分含量,并分析各组分的气味,将挥发性成分按照保留时间先后顺序统计,见

表3。

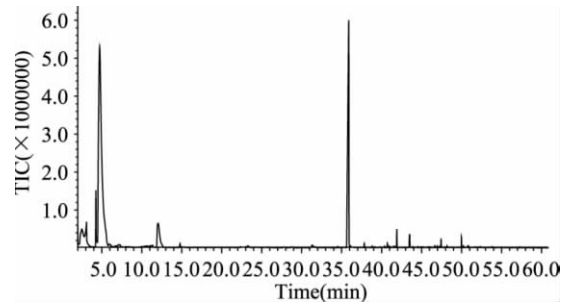


图2 酵母 H9 麦芽汁发酵液挥发性成分总离子流色谱图

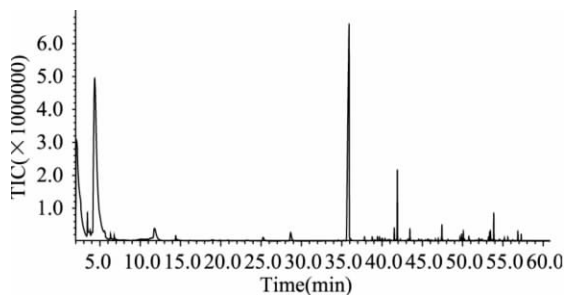


图3 酵母 J11 麦芽汁发酵液挥发性成分总离子流色谱图

从表3可以看出,酵母 J11 比酵母 H9 出峰率高,产生的挥发性成分较多,酵母 H9 麦芽汁发酵液共分离出 11 种挥发性风味成分,酵母 J11 麦芽汁发酵液共分离出 17 种挥发性成分,两株产香酵母的麦芽汁发酵液挥发性成分主要是醇类和酯类,但醇和酯的含量以及组成各异。酵母 H9 麦芽汁发酵液的主体风味物质是醇类,异戊醇和苯乙醇的相对百分含量分别达到 57.39% 和 23.20%,和酵母 J11 发酵液相比酯类的种类相对较少,这与感官评定其发酵液的主体香味为醇香一致,同时酵母 H9 发酵液中产生一种特有的具有香辛料、丁香和发酵似香气和炒花生气息的酚类挥发性成分 4-乙炔基-2-甲氧基苯酚。酵母 J11 的挥发性成分中含有大量不同的酯类,且大多数具有令人愉悦的香气,因而赋予该菌株发酵液浓郁的酯香。有研究表明,酵母是具有很大产油潜力的微生物^[13],高媛^[14]等也筛选到高产油的假丝酵母。该研究发现酵母 J11 发酵液中存在大量的高级脂肪酸酯类,包括饱和脂肪酸酯(十二酸乙酯、十四酸乙酯和十六酸乙酯等)和不饱和脂肪酸酯(3,6-十二碳二烯酸甲酯、反式-4-癸烯酸乙酯和 9-十六碳烯酸乙酯等),由此可以推测,酵母 J11 可能是一株产油脂的酵母菌,其细胞裂解后将代谢产生的脂肪酸释放到发酵液中,并与发酵液中的低级醇形成脂肪酸酯。

2.5 两株产香酵母的发酵特性实验

2.5.1 耐盐性 食盐是肉制品加工中必不可少的添加调味料,添加量一般在 2%~6% 左右,适宜于发酵肉制品的菌株必须有良好的食盐耐受性,一般要求能够在至少 6% 食盐浓度下能够正常生长^[15]。由图

表3 菌株 H9、J11 麦芽汁发酵液挥发性成分相对峰面积及气味

物质名称	保留时间(min)			相对峰面积(%)			气味
	H9	J11	麦芽汁	H9	J11	麦芽汁	
乙酸乙酯	2.433	2.099		1.59	24.16		强烈的醚似的气味, 清灵、微带果香的酒香
乙酸	3.089			3.24			
异戊醇	4.731	4.356	4.358	57.39	42.94	32.18	苹果白兰地香气和辛辣味 花香气味
庚醇			5.066			2.72	
异丁酸		5.575			0.20		有成熟水果香味
乙酸异丁酯	5.968			0.27			
醋酸叔丁酯		6.310			0.14		杏仁样的气味
2,3-丁二醇		6.766			0.16		
糠醛			6.929			2.16	有类似香蕉的气味 浓郁的玉簪花香气
己酸	7.133			0.20			
乙酸异戊酯	12.049	11.753	10.919	5.55	1.77	19.58	强烈的香蕉、洋梨芳香气味 新鲜面包香、清甜的玫瑰样花香
苯乙醛		28.666	27.249		0.86	7.66	
丁酸异戊酯	31.33			0.21			稍有果香, 略似依兰油香气 浓烈而甜的蜂蜜香气
苯乙醇	35.882	35.916	34.21	23.20	23.12	0.53	
苯甲酸乙酯		38.786			0.12		甜的, 玫瑰花香, 带有粉香的 蜂蜜样香气, 类似苹果样的果香, 并带有可可和威士忌样的香韵
苯乙酸乙酯	41.531	41.523		0.06	0.32		
乙酸苯乙酯	41.91	41.905		0.58	1.78		呈强烈香辛料、丁香和发酵似 香气, 有炒花生气息
4-乙炔基-2-甲氧基苯酚	43.511			0.65			
3,6-十二碳二烯酸甲酯		47.435			0.43		轻微的果香或花香, 带花生香
十二酸乙酯(月桂酸乙酯)		50.096			0.21		
反式-4-癸烯酸乙酯		53.358			0.19		极温和的鸢尾香气
十四酸乙酯(肉豆蔻酸乙酯)		53.869			0.59		
9-十六碳烯酸乙酯 (棕榈油酸乙酯)		56.855			0.24		微弱蜡香、果爵和奶油香气
十六酸乙酯(棕榈酸乙酯)		57.274			0.15		

4 可以看出, 当食盐添加量小于 4% 时, 酵母 H9 和 J11 的生长状况良好, 但当食盐的添加量超过 4% 时, 随着食盐添加量的增加, 两株酵母的生长开始受到不同程度的抑制, 其中食盐对酵母 H9 的抑制作用非常明显。当食盐添加量达到 8%~10% 时, 酵母 H9 生长几乎停滞, 而酵母 J11 的生长略有下降。酵母 J11 的耐盐性要明显好于酵母 H9。

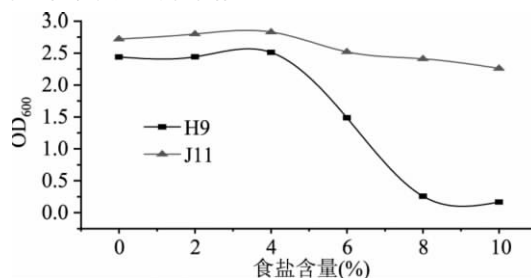


图4 不同食盐含量对酵母 H9 和 J11 生长的影响

2.5.2 亚硝酸盐耐受性 在肉制品的加工中通常通过添加 NaNO_2 对肉制品进行发色, 并且 NaNO_2 还有抑制腐败菌的作用。国家标准规定腌腊肉制品中的亚硝酸盐的最大使用量为 $150\text{mg}/\text{kg}$ ^[16], 因此要求用于肉制品发酵的菌种应具有较好的亚硝酸盐耐受性, 一般要求菌种至少能耐受 $100\text{mg}/\text{kg}$ 的亚硝酸盐。由图 5 可知, NaNO_2 添加量在 $0\sim 150\text{mg}/\text{kg}$ 范围内, 酵母 H9 和 J11 的生长均几乎不受亚硝酸盐添加量的影响, 具有很好的亚硝酸盐耐受性。

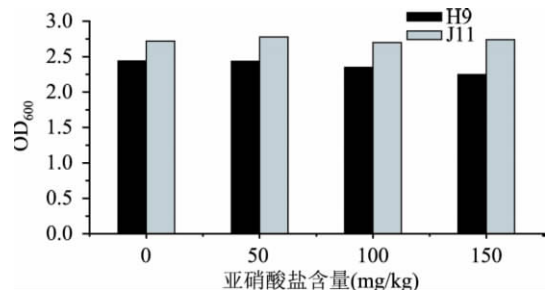


图5 不同亚硝酸盐含量对酵母 H9 和 J11 生长的影响

2.5.3 耐酸性 酵母菌通常与乳酸菌复配应用于肉制品发酵, 很少单独使用, 因此, 酵母菌必须能够适应乳酸菌所造成的酸性环境^[17]。从图 6 可以看出, 酵母菌 H9 和 J11 在 pH4.0~7.0 范围内均生长良好, 但 pH 为 4.0 时, 酵母 H9 的生长受到了些许抑制, 但仍能正常生长。

3 结论

从湖北腊鱼中分离筛选得到 H9 和 J11 两株产香酵母, 分别初步鉴定为季也蒙毕赤酵母 (*Pichia guilliermondii*) 和近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)。其中, 酵母 H9 (*Pichia guilliermondii*) 麦芽汁液体培养基的主体挥发性风味物质为醇类, 还产生一种特有的呈香辛料、丁香和发酵似香气和炒花生气息的 4-乙炔基-2-甲氧基苯酚; 酵母 J11 (*Candida parapsilosis*) 的麦芽汁液体培养基发酵液酯

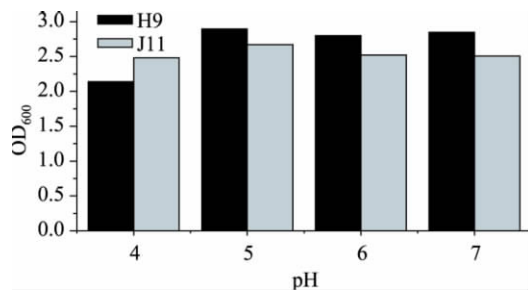


图6 不同 pH 对酵母 H9 和 J11 生长的影响

香浓郁,产酯更为丰富,能产生多种高级脂肪酸酯,这可能与其脂肪酸代谢有关。另外酵母 J11 与酵母 H9 相比具有更优良的耐盐性、亚硝酸盐耐受性、耐酸性等发酵特性。因此酵母 J11 有望开发为新型的肉品发酵剂。酵母 H9 的耐盐性较差,有待进一步的驯化和研究。

参考文献

[1] 王国良, 宋俊梅, 曲静然. 生香酵母及其应用 [J]. 食品工业 2004 (3): 16-17.
 [2] 廖永红, 沈晗, 石文娟, 等. 产香酵母碳源利用及发酵产香特性初步研究 [J]. 食品与发酵工业 2010, 36 (2): 1-7.
 [3] Frédéric Leroy, Jürgen Verluuyten, Luc De Vuyst. Functionnal meat starter culture for improved sausage fermentation [J]. Food Microbiology 2006, 106: 270-285.
 [4] Olesen PT, Stahnke, et al. The influence of Debaryomyces hansenii and Candida utilis on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces [J]. Meat Science, 2000, 56: 357-368.
 [5] Durú MA, Flores M, Toldrá F. Effect of Debaryomyces spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages [J]. Meat Science, 2004, 68: 319-328.

(上接第 212 页)

10⁹ cfu/g。冷冻干燥后微生态制剂的益生菌存活率为 72.7%。

3 小结

实验从 32 株原始纳豆菌株中筛选出 23 株对沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌有明显抑制作用的纳豆菌株。实验针对 4 种致病菌确定了复合纳豆菌剂组合为 H1、H5、H8、H9、R6、C5、C8。采用真空冷冻干燥技术制备了纳豆菌的微生态制剂,复合纳豆菌剂中活菌数达 1.05 × 10⁹ cfu/g。冷冻干燥过程中采用 20% 的脱脂乳作为保护剂,纳豆菌存活率为 72.7%,与王发祥等^[13]报导的存活率 86.8% 相比偏低,因此本研究有待于对真空冷冻干燥工艺的参数和保护剂配方做进一步深入探讨。

参考文献

[1] 杨薇. 纳豆及其保健功能 [J]. 吉林农业 2011 (2): 27.
 [2] 欧阳涟, 李曼, 徐尔尼, 等. 纳豆食品的研制 [J]. 大豆科学, 2007, 26 (1): 115-117.
 [3] 张进荣, 李飞, 田军德, 等. 微生态制剂促生长机理及其在畜牧生产上的应用 [J]. 畜牧兽医杂志 2009, 28 (6): 21-23.
 [4] 郑蕾. 纳豆菌微生态制剂的研究现状 [J]. 芜湖职业技术学院学报 2006, 8 (4): 71-72.

[6] Flores M, Durú MA, Marco A, et al. Effect of Debaryomyces spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages [J]. Meat Science 2004, 68: 439-446.
 [7] 赵丽丽, 陈存社, 郭凤莲. 26S rDNA 序列分析法鉴定酵母菌 [J]. 中国酿造 2008, 15: 49-51.
 [8] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验 [M]. 高等教育出版社 2004.
 [9] 张鹏. 四川泡菜中酵母菌的分离筛选及其应用研究 [D]. 东北农业大学食品学院 2007.
 [10] Kurtzmanc, Robnetc J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequence [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1998, 73 (4): 331-371.
 [11] 付俊淑, 庄世文, 徐丹丹, 等. 酵母分离株分子鉴定及其挥发性香气成分检测分析 [J]. 食品与发酵工业 2010, 36 (2): 44-48.
 [12] Pamela Vernocchi, Maurice Ndagijimana, et al. Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli [J]. Food Chemistry, 2008, 108: 1217-1225.
 [13] 罗玉萍, 杨荣英, 陈英, 等. 酵母油脂的脂肪酸组成的研究 [J]. 中国粮油学报, 1994, 9 (3): 44-47.
 [14] 高媛, 李元媛, 王常高, 等. 高产油脂酵母的筛选及发酵条件的研究 [J]. 化学与生物工程 2010, 27 (1): 55-58.
 [15] 葛钰瑛, 李焕荣, 傅力, 等. 发酵肉制品中乳酸菌的分离鉴定及菌种性能的研究 [J]. 食品研究与开发 2008, 29 (12): 23-26.
 [16] GB 2760-2011, 食品添加剂使用标准 [S]. 中华人民共和国卫生部 2011.
 [17] 赵俊仁, 孔保华. 自然发酵风干肠中酵母菌生产性能的研究 [J]. 食品科技 2010, 35 (10): 27-31.

[5] 孔繁东, 鲁玉. 蚕蛹纳豆菌发酵物抗菌性研究 [J]. 食品工业科技 2010, 31 (11): 213-215.
 [6] 布瑞德. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 第八版. 科学出版社, 1984.
 [7] 孙森, 宋俊梅, 张长山. 豆豉、纳豆及天培的研究进展 [J]. 中国调味品 2008 (3): 29-33.
 [8] 王发祥, 钟青萍, 钟士清. 纳豆菌液体发酵条件的优化 [J]. 微生物学杂志 2004, 24 (3): 64.
 [9] 钟青萍, 余世望, 梁胜媛. 纳豆菌的抗菌作用及其培养基的优化 [J]. 食品工业科技 2001, 22 (5): 20-22.
 [10] 曹峰, 董贝磊, 陆晓滨, 等. 保护剂及冷休克处理对纳豆菌冻干后存活率的影响 [J]. 食品工业科技, 2008, 29 (2): 123-125.
 [11] Jeffery R B, Chan L. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of lactococcus lact is to freezing and lyophilization [J]. Cryobiology, 1999, 39: 87-123.
 [12] Shih I L, Van Y T, Yeh L C, et al. Production of a biopolymer flocculant from Bacillus licheniformis and its flocculation properties [J]. Bioresource Technology 2001, 78: 267-272.
 [13] 王发祥, 王青云, 钟青萍, 等. 纳豆菌微生态制剂加工中两种干燥方法的比较 [J]. 食品科学 2006, 27 (11): 294-296.