

# 中国传统虾酱中产香酵母的分离鉴定及其耐盐性分析

连鑫, 杨锡洪, 解万翠, 杨亚东, 吴帅, 吉宏武, 刘书成, 毛伟杰

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088)

**摘要:** 虾酱是中国传统发酵水产调味品, 营养丰富, 并具有独特的风味。传统生产工艺周期长, 产品盐度高, 工艺不稳定, 且存在安全性问题。为了实现传统食品的产业化需求, 筛选可用于虾酱发酵的产香酵母, 以提高虾酱的香气品质。本文以中国传统虾酱为原料, 采用平板稀释法以马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)对虾酱中的酵母种群进行分离, 经产香试验筛选得到一株产香酵母, 对其进行形态观察及生理生化鉴定, 结合 ITS 序列分析, 经 NCBI 中数据库比对, 构建菌株系统发育树明确其分类地位, 确定该菌株为季氏毕赤氏酵母(*Pichia gilliermondii*)。对该菌株进行耐盐性分析, 发现该菌株耐盐性能较好, 在 10% 的盐度下仍有菌体存活。研究表明, 从中国传统虾酱中分离得到的一株季氏毕赤氏酵母(*Pichia gilliermondii*), 不仅产香能力较强, 并且具有一定的耐盐性, 可对其进行耐盐驯化, 作为虾酱复合发酵剂的菌株之一, 用于低盐虾酱的发酵, 提高虾酱发酵香气, 控制产品质量。从传统虾酱中分离的产香酵母, 为虾酱快速生产用复合发酵剂的制备提供了理论基础。

**关键词:** 中国传统虾酱; 酵母; 分离; 鉴定

文章篇号: 1673-9078(2014)7-92-97

## Isolation, Identification and Salt-tolerance Analysis of Aroma-producing Yeasts from the Chinese Traditional Shrimp Paste

LIAN Xin, YANG Xi-hong, XIE Wan-cui, YANG Ya-dong, WU Shuai, JI Hong-wu, LIU Shu-cheng, MAO Wei-jie

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** Because of the distinct flavor and rich nutrition, shrimp paste was generally consumed as a traditional Chinese aquatic seasoning. But its difficult in industrialization development was hampered because of long production cycle, high salinity, technology instability and insecurity. In order to obtain the aroma producing yeasts for shrimp paste fermentation and improve the fragrance of the shrimp paste for meeting industrialization requirement of traditional food, an aroma producing yeast was isolated from traditional Chinese shrimp paste with the method of dilution plating on the medium of potato dextrose agar (PDA) and aroma sensory analysis. The morphological identification, physiological and biochemical identification, ITS rDNA analysis and phylogenetic tree were used to identify species in this paper. By Sequence alignment from database of NCBI showed that it belonged to *Pichia gilliermondii*. The salt-tolerance analysis indicated that the strain could survive in 10% NaCl solution. The results showed that the aroma producing ability and salt tolerance of strain were good, and the salt-tolerance of strain could be domesticated for low-salt shrimp paste fermentation as one of shrimp paste composite starter cultures. The aroma producing yeast isolated from the traditional shrimp paste can improve the aroma and quality of fermented shrimp paste.

**Key words:** Chinese traditional shrimp paste; yeasts; isolation; identification

收稿日期: 2014-03-09

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (GARS-47)

作者简介: 连鑫(1988-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 水产品加工及贮藏工程

通讯作者: 解万翠(1969-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味和食品质量与安全

产香酵母是一类能够产生挥发性香味物质的酵母菌<sup>[1]</sup>, 在发酵过程中通过代谢产生醇类、酯类等香味物质<sup>[2]</sup>。香气成分的种类和感官阈值共同作用决定了食品的风味特征, 赋予发酵食品特有的香气<sup>[3]</sup>。产香酵母的类群十分广泛, 可以应用于如酒类、果汁、调味品等食品, 目前广泛应用的有数十种<sup>[4-5]</sup>。

虾酱以其丰富的营养和独特的风味,自古以来受到世界很多国家消费者的喜爱。其独特风味的形成是在发酵过程,由于多种微生物和酶的作用,形成风味物质而产生的。研究表明,虾酱特有的酱香味,可能是由于虾酱中微生物菌群多样性,特别是产香酵母发酵产生的<sup>[6]</sup>。

在日本,多菌种发酵工艺和多菌种固定化生物反应器等新型生物反应已广泛在发酵过程中使用<sup>[7]</sup>;国内学者杜云建等<sup>[8]</sup>人用米曲霉发酵制备虾酱,建立了最佳工艺及发酵条件。刘树青等<sup>[9]</sup>利用酵母菌并结合酶解发酵虾酱,不仅增加了虾酱产品的浓香度,更提高了产品的营养成分。虽然我国制酱历史悠久,经过学者的不断研究和发展,现在已研制出通风制曲法、酶制剂法等新工艺,提高了生产效率,但仍存在产品风味不足、质量不稳定等工业化的瓶颈。如何改良虾酱的传统发酵工艺,达到低盐、保健,又能获得理想的风味,是现代发酵技术面临的难题。本研究旨在通过对传统虾酱内部酵母的分离鉴定,获得产香菌株,为传统发酵食品复合发酵剂的制备提供优良的微生物菌株,以达到提高产品风味、稳定生产的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

广东传统发酵虾酱,由李锦记(新会)食品有限公司提供,为传统发酵虾酱,发酵过程中未添加菌种;马铃薯葡萄糖琼脂培养基,购自北京陆桥技术有限责任公司;糖发酵鉴定管、碳同化鉴定管,购自杭州天和微生物试剂有限公司;氯化钠(分析纯),购自天津市科密欧化学试剂有限公司;琼脂糖(分析纯),购自北京鼎国生物技术有限公司;DNA Marker、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2,购自宝生物工程(大连)有限责任公司;Gold View II,购自北京索莱宝科技有限公司;引物ITS1、ITS4,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

马铃薯葡萄糖培养基:取去皮马铃薯 200 g,切成小块,加水 1000 mL 煮沸 30 min,滤去马铃薯块,将滤液补足至 1000 mL,加葡萄糖 20 g,溶化后分装,121 °C 灭菌 20 min。

YPD 培养基:葡萄糖 2.0%,蛋白胨 2.0%,酵母粉 1.0%。

发酵培养基:将小虾打浆与水按 1:5 的比例混合,过滤、分装于 50 mL 三角瓶中,每瓶 20 mL,115 °C 灭菌 30 min。

#### 1.1.2 主要仪器设备

超净工作台 SW-CJ-2F,博讯实业有限公司医疗设备厂;立式压力蒸汽灭菌锅 LS-B50L,上海华线医用核子仪器有限公司;生化培养箱 SPX-150B-Z,博讯实业有限公司医疗设备厂;紫外可见分光光度计 UV-3200PC,上海美谱达仪器有限公司;电子天平 AY-120,深圳巨杰科技有限公司;PCR 仪 S-1000,美国伯乐公司;电泳仪 DYY-4C,北京市六一仪器厂;凝胶成像系统 WD-9403D,北京市六一仪器厂。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 酵母菌的分离<sup>[10]</sup>

无菌操作条件,取虾酱样品 10 g,于 90 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基中震荡摇匀(180 r/min, 30 min),转移到 28 °C 培养箱培养 24 h。将培养液稀释成适当的浓度( $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$ ),取 0.2~0.3 mL 稀释液涂布于 PDA 平板上,28 °C 培养 48 h。挑取单菌落,在 PDA 平板上划线纯化,直至得到纯种单菌落,观察并记录菌落形态,4 °C 保存备用。

### 1.2.2 产香酵母菌的筛选

将筛选出来的酵母分别接种在发酵培养基中进行产香比较试验,28 °C 培养 2~4 d。以虾味、氨味、酵母味、甜味、酸味和异味几个风味特点进行感官评价,筛选出风味柔和、虾味浓郁及发酵味明显的产香菌株,并对其进行菌株鉴定。

### 1.2.3 形态学鉴定方法

将分离纯化后的菌株接种于 PDA 固体培养基上,28 °C 下培养 48 h,观察记录培养基上菌落的形态,取典型菌落进行镜检,并 40 倍物镜下观察菌体形态。参考《真菌鉴定手册》,判断菌株的种属。

### 1.2.4 酵母菌的生理生化鉴定

依据《The Yeast, A Taxonomic Study》对分离菌株进行糖发酵试验、碳源同化试验、生理生化试验。

酵母菌糖发酵实验:将分离纯化后的菌株做糖发酵实验,检验菌株对各种糖醇类碳源的利用情况,将菌株制成菌悬液,以每管 100  $\mu$ L 的量接种于糖发酵鉴定管内摇匀,28 °C 下培养 2 周,每次观察时注意杜氏小管的产气情况,以杜氏小管中有气泡为阳性,无气泡为阴性<sup>[11]</sup>。发酵用糖类包括葡萄糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖和棉子糖。

酵母菌碳源同化实验:将菌种用无菌水制成菌悬液,调整细胞浓度使悬液至半透光,然后用移液枪吸取 80  $\mu$ L 接入同化管中,25 °C 下静置培养 3 周后记录结果。同化实验用碳源包括葡萄糖、蜜二糖、木糖、乳糖、L-阿拉伯糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖、纤维二

糖、棉子糖、海藻糖。

同化结果的观察方法：取一白色卡片，用黑色墨水划约 3~4 mm 宽的直线，将培养 3 周后的同化管充分摇匀，透过培养液观察卡片上的黑线，并根据下述原则记录：“透过试管完全看不见黑线”或者“可见黑线但线条模糊”为阳性；“黑线可看清但边缘模糊”或“黑线清晰可见”为阴性<sup>[11]</sup>。

### 1.2.5 ITS rDNA 序列分析及系统发育树构建的方法

采用改良的 CTAB 法提取菌株的基因组，参照 Guo<sup>[12]</sup> 的方法扩增真菌的 ITS(内转录间隔区)序列，选择 ITS rDNA 序列通用引物 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTC GCTTATTGATATGC-3') 进行基因扩增并测序。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 98 °C 10 sec, 58 °C 15 sec, 68 °C 90 sec, 40 个循环; 72 °C 10 min。取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物的测序工作由上海英骏生物技术有限公司 (广州分公司) 完成。将测序结果登录 NCBI 网站用 BLAST 程序进行序列比对，用 ClustalX 2 软件进行多序列比对 (Multiple alignments)，用软件 MEGA5.2 进行分析获得系统进化树。

### 1.2.6 菌株 Y8 的耐盐性分析

菌株 Y8 经活化后，调整菌液浓度为  $10^8$  cfu/mL，取菌悬液 0.5 mL，分别接入含 0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、8%、10%、12%、16%、20%、24%、28% 和 32% 的 NaCl 液体 YPD 培养基中，于 28 °C、150 r/min 摇床培养 24 h，测定 OD<sub>660nm</sub> 值。

### 1.2.7 菌株 Y8 的生长曲线

菌株 Y8 经活化后，调整菌液浓度为  $10^8$  cfu/mL，取菌悬液 0.5 mL，分别接入液体 YPD 培养基中，于 28 °C、150 r/min 摇床培养 48 h，每隔 4 h 取样，测定 OD<sub>560 nm</sub> 值。

## 1.3 数据分析

采用 ClustalX 2 对菌株 Y8 及模式菌株序列进行比对，MEGA5.2 构建系统发育树。采用 Excel 软件作图，结果由三个平行样的平均值±标准偏差表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酵母的分离纯化及产香能力

以 PDA 培养基从传统虾酱中分离微生物，共分离出 8 株酵母菌，分别编号为 Y1~Y8，对其进一步进

行气味感官分析，选择适合发酵的具有产香能力的菌株，菌株的筛选结果如表 1 所示。

表 1 酵母菌的气味感官分析

Table 1 Aroma sensory analysis of strains

编号	虾味	氨味	酵母味	甜味	酸味	异味
Y1	-	-	+	-	+	+
Y2	++	-	+	-	-	-
Y3	-	-	+++	-	-	+
Y4	-	++	++	-	-	+++
Y5	-	-	+	-	-	+
Y6	-	-	++	-	-	++
Y7	-	+	+	-	-	++
Y8	+++	-	+	++	-	-

注：“-”：无该种特征风味；“+”：有明显该种特征风味；“++”：风味较浓；“+++”：风味很浓。

酵母菌发酵糖类产生小分子醛、酸、酯等风味物质，赋予了虾酱独特的发酵味，但酵母味过重，会影响虾酱风味。如表 1 所示，接入酵母的发酵培养基，大多数都虾味消失，酵母味明显，异味较重，酵母味掩盖虾味，使虾酱发酵液的虾味特征不明显。菌株 Y2、Y8 既有虾味又有发酵味，而且菌株 Y8 甜味突出，香气柔和，虾味更突出，故选择菌株 Y8 作为发酵菌株，对菌株 Y8 进行分离纯化，并保存于 4 °C 冰箱。

### 2.2 菌株 Y8 的形态学初步鉴定

从 PDA 培养基中，挑取经过三代以上分离纯化的 Y8 菌株，利用摄影光学显微镜观察菌株的形态特征(图 1)，并对照《真菌鉴定手册》，对分离的 Y8 菌株进行形态学鉴定。

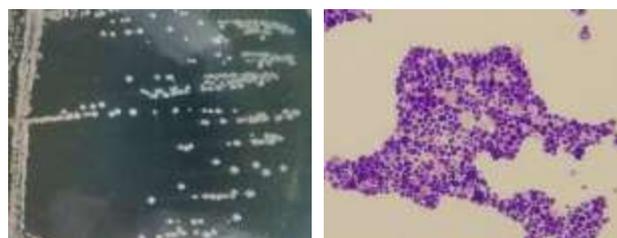


图 1 菌株 Y8 的菌落形态及菌体形态(×40)

Fig.1 Colony and thallus morphology of strain Y8(×40)

根据菌落形态观察，菌落直径为 0.5~1 mm，菌落为乳白色，奶油状，表面光滑。对菌体进行镜检，发现其细胞形态呈卵圆形，多边芽殖，无假菌丝。

### 2.3 菌株 Y8 的生理生化鉴定

依据《The Yeast, A Taxonomic Study》对菌株 Y8 进行糖发酵实验和碳源同化实验，实验结果如下。

表 2 菌株 Y8 的糖发酵实验及碳同化实验

**Table 2 Sugar fermentation experiments and carbon assimilation experiments of strain Y8**

糖	葡萄糖	蜜二糖	木糖	乳糖	L-阿拉伯糖	麦芽糖	蔗糖	半乳糖	纤维二糖	棉籽糖	海藻糖
糖发酵实验	+	ND	ND	-	ND	-	+	-	ND	+	ND
碳同化实验	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”：阳性，“-”：阴性，“ND”：未检测。

菌株 Y8 的糖发酵实验及碳同化实验结果见表 2。将菌株 Y8 的糖发酵谱和碳源同化谱与《The Yeast, A Taxonomic Study》书中的酵母的生理生化结果进行比较，发现菌株 Y8 与季氏毕赤氏酵母 (*Pichia guilliermondii*) 基本一致。

### 2.4 菌株 Y8 ITS rDNA 基因片段的扩增

利用 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增所得的单一 DNA 片段，经琼脂糖凝胶电泳得到一条长度 600 bp 左右范围内的扩增条带，PCR 扩增图谱见图 2。

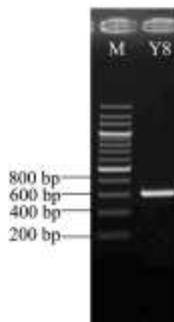


图 2 菌株 Y8 的 ITS rDNA 扩增片段凝胶电泳图

Fig.2 Gel electrophoretogram of ITS rDNA amplification of strain Y8

结果表明，菌株 Y8 的 ITS rDNA 基因片段扩增成功，可将扩增产物纯化后送检直接测序。

### 2.5 基于 ITS rDNA 序列分析的菌株 Y8 系统发育树构建及分子鉴定

将测序获得的 DNA 核苷酸序列与 NCBI 中的数据库进行 BLASTn 比对，结果表明，该片段与 GenBank 中的季氏毕赤氏酵母 ATCC 6260 的 ITS rDNA 序列的相似率为 100%，确定菌株 Y8 为 *Pichia guilliermondii* (季氏毕赤氏酵母) (图 3)。

提交序列与对比序列之间的分值为 1094 bits，而 Score 值越高说明越相似；Expect 比对的期望值为 0.0，说明比对效果较好；相似性 100%；Gaps 为 0，无碱基空位；Strand：链的方向，Plus/Plus 表示提交序列和参比序列皆为正向。结合形态学及生理生化鉴定，确定其为季氏毕赤氏酵母 (*Pichia guilliermondii*)。

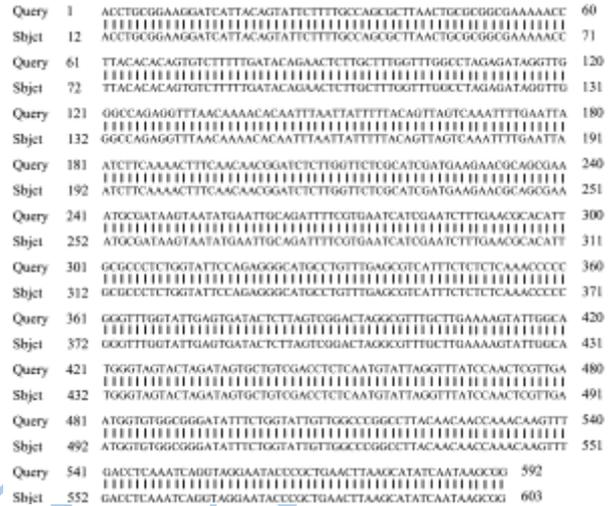


图 3 菌株 Y8 的 ITS 序列中 592bp 测序片段与 GenBank 数据库中季氏毕赤氏酵母 (*Pichia guilliermondii* strain ATCC 6260) 的序列比对

Fig.3 Sequence alignment of strain Y8 592 bp sequence fragment with *Pichia guilliermondii* (*Pichia guilliermondii* strain ATCC 6260) from GenBank database

注：季氏毕赤氏酵母 ATCC 6260 序列包括 18S rRNA 部分序列，ITS1、5.8S rRNA 和 ITS2 完整序列，及 28S rRNA 部分序列。其中，Length=607，Score=10941bits(592)，xpeet 0.0，Identities=592/592(100%)，Gaps=0/569(0%)，Strand=Plus/Plus。

选取同源性较高的模式菌株，采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树，将相关菌株按亲缘关系远近顺序进行排列，从系统发育树方面确定菌株的分类地位。构建的系统进化树如图 4 所示。

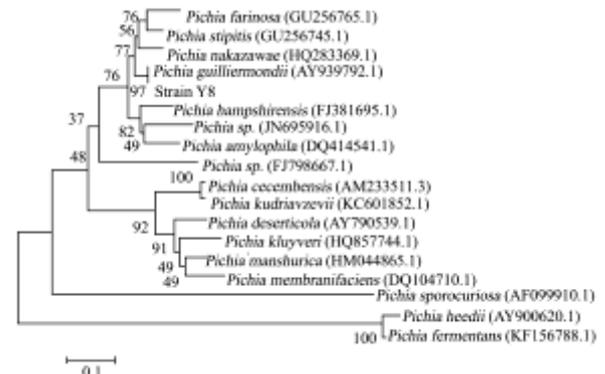


图 4 菌株 Y8 的 ITS rDNA 序列分析 Neighbor-joining 树 Fig.4 Neighbor-joining phylogenetic tree of strain Y8

由图 4 可知菌株 Y8 与其它毕赤氏酵母的亲缘关系, 其中, 菌株 Y8 与菌株 *Pichia guilliermondii* (AY939792.1) 处于同一分支上, 遗传距离相同, bootstrap 值为 97, 说明菌株 Y8 与其同源性高, 且置信度高。

## 2.6 菌株 Y8 的耐盐性分析

将菌株分别接入含不同浓度 NaCl 的液体培养基中, 28 °C 培养 24 h, 在 650 nm 处测定 OD 值, 结果见图 5。

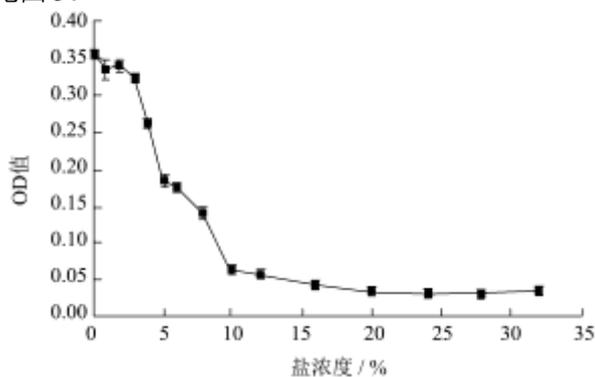


图 5 菌株 Y8 的耐盐特性

Fig.5 Salt tolerance of strain Y8

由图 5 可以看出菌株 Y8 对 NaCl 具有一定耐受性, NaCl 浓度为 1%~3% 时, 酵母的生长基本不受影响, 对于菌株 Y8 在含 2% NaCl 的 YPD 培养基上生长量明显高于 1% 的培养基, 说明 2% NaCl 可以促进菌株的生长, NaCl 浓度为 6% 时, 菌株的生长受到一定的抑制, NaCl 浓度高于 10% 时, 菌株 Y8 的生长受到了明显的抑制, 但仍有菌株存活。这一结果与柳志强<sup>[3]</sup>等人从海洋中分离出一株季氏毕赤氏酵母的耐盐性分析结果相近, 可能是由于该种酵母为虾酱原料虾中存在的对虾内源微生物, 参与虾酱缓慢的发酵过程, 对酱香味的产生有一定影响。耐盐性分析表明, 菌株 Y8 在 NaCl 浓度低于 10% 时, 生长良好, 而高于 10% 时虽受到一定的抑制作用, 但仍有菌体存在, 故可对菌株 Y8 进行驯化改良<sup>[4]</sup>, 作为低盐虾酱的发酵剂。

## 2.7 菌株 Y8 的生长曲线

对菌株 Y8 的生长曲线进行测定, 得到菌株 Y8 的 48 小时生长曲线, 见图 6。

如图 6 所示, 菌株 Y8 的生长曲线, 从 2h 起, 菌株逐渐进入对数期, 生长旺盛, 20 h 后进入稳定期, 菌株生长速率逐渐平稳, 且代谢产物积累。由生长曲线可知发酵时间与 OD 值之间的关系, 在实践生产中, 便于选择合适的生长时期进行接种发酵, 提高发酵速

率。

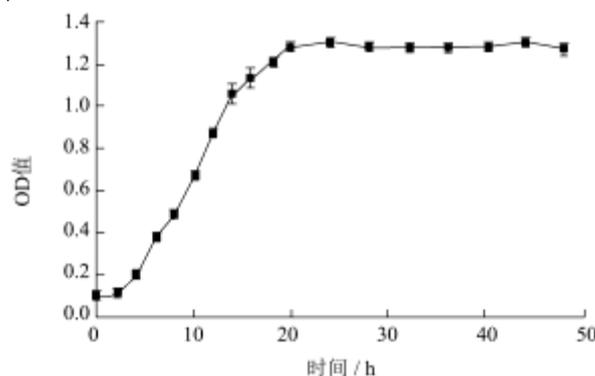


图 6 菌株 Y8 的生长曲线

Fig.6 Growth curve of strain Y8

## 3 结论

3.1 从传统虾酱中分离出一株产香酵母, 对菌株进行形态学、生理生化鉴定和 ITS rDNA 基因序列分析, 经测序、BLASTn 序列比对后, 发现 Y8 与季氏毕赤氏酵母 (*Pichia guilliermondii*) 序列的同源相似性为 100%, 鉴定该菌株为季氏毕赤氏酵母 (*Pichia guilliermondii*)。

3.2 菌株 Y8 的耐盐特性初步研究结果表明, 菌株 Y8 对 NaCl 具有一定耐受性, NaCl 浓度低于 10% 时, 菌株 Y8 仍能保持一定的生长, 而高于 10% 时则受到一定的抑制作用。

3.3 在传统虾酱发酵过程中, 生产周期长, 微生物和酶组成复杂, 受环境影响很大, 导致虾酱生产质量不稳定, 风味难以控制, 不能满足工业化的生产需要。因此如何提升虾酱风味成为一个关键。虾酱呈味的主要途径是通过酵母菌发酵糖类产生小分子醛、酸、酯等风味物质。毕赤类酵母是主要的产香酵母, 对虾酱的风味有重要贡献。

3.4 产香酵母在食品行业应用广泛, 已制备出多种发酵剂<sup>[5]</sup>。本文从传统虾酱中分离出一株产香酵母, 将与工业化发酵剂比较, 以进一步研究其在虾酱生产中对风味的影响, 并期望对菌株进行定向改造, 为传统发酵制品的复合发酵剂提供优良菌株, 发展快速发酵技术, 促进虾酱生产工业化。

## 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, 2(4): 16-18  
WANG Guo-liang, SONG Jun-mei, QU Jing-ran. Aroma-producing yeasts and its application [J]. Food Industry, 2004, 2(4): 16-18
- [2] 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  
FU Jun-shu, ZHUANG Shi-wen, XU Dan-dan, et al. Free volatile compounds analysis and molecular identification of different yeast *ssolares* [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(2): 44-48
- [3] 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  
LIAO Yong-hong, SHEN Han, SHI Wen-juan, et al. Study on carbon source utilization and fermentation features of eater-producing yeasts [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(2): 1-7
- [4] 周世水,熊建春.酒曲中生香酵母的分离鉴定与产酯工艺优化[J].现代食品科技,2010,26(1):98-108  
ZHOU Shi-shui, XIONG Jian-chun. Isolation and identification of ester-producing yeast in wine starter and its application in ester production [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(1): 98-108
- [5] Callejón R M, Tesfaye W, Torija M J, et al. Volatile compounds red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1252-1259
- [6] 石敏,袁玮.贵州黔东南地区侗族传统食品—虾酱的研究与开发[J].食品科学,2008,(8):718-720  
SHI Min, YUAN Wei. Research and development of dong's traditional shrimp sauce in southeast region of Guizhou province [J]. Food Science, 2008, (8): 718-720
- [7] Wakayama M, Yamagata T, Kamemura A, et al. Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation [J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2005, 32(9): 383-390
- [8] 杜云建,唐喜国,陈鸣.发酵调味虾酱的研究[J].中国酿造,2006,10:68-70  
DU Yun-jian, TANG Xi-guo, CHEN Ming. Study on fermented shrimp sauce [J]. China Brewing, 2006, 10: 68-70
- [9] 刘树青.酶法制备低盐高蛋白质酵母虾酱及其生产方法[P].中国:CN1582741A,2004-05-28  
LIU Shu-qing. Enzymatic preparation of low salt, high protein yeast shrimp paste and its production method [P]. China: CN1582741A, 2004-05-28
- [10] 王小红,徐康,赵山,等.孝感凤窝酒曲中酵母菌的分离及特性研究[J].现代食品科技,2008,24(2):134-137  
WANG Xiao-hong, XU Kang, ZHAO Shan, et al. Solation and characteristics of yeasts from Xiaogan Fengwo rice wine starter [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2): 134-137
- [11] 黄永.黑龙江地区自然发酵黄豆酱中酵母菌的分离鉴定及筛选[D].哈尔滨:东北农业大学,2003  
HUANG Yong. Isolation, Identification and selection of yeast from traditional fermentation soybean paste in Heilongjiang province [D]. Haerbin:Northeast Agricultural University, 2003
- [12] Guo L D, Hyde K D, Liew E C Y. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001(20): 1-13
- [13] 柳志强.5株海洋酵母的鉴定及耐盐性分析[J].热带农业科学,2010,30(12):13-16  
LIU Zhi-qiang. Identification and salt-tolerance analysis of five marine yeasts [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2010, 30(12): 13-16
- [14] 柴洋洋,葛菁萍,宋刚,等.传统发酵豆酱中酵母菌的分离、筛选及功能酵母的鉴定[J].中国食品学报,2013,13(3):183-188  
CHAI Yang-yang, GE Jing-ping, SONG Gang, et al. Isolation, screening of yeast and identification of functional yeast from the traditional fermented soybean paste [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(3): 183-188
- [15] Lee P R, Saputra A, Yu B, et al. Effects of pure and mixed-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus* on the volatile profiles of grape wine [J]. Food Biotechnology, 2012, 26(4): 307-325