糯米发酵炸糕酵母菌的分离鉴定及优势菌株筛选

邵冰洁 1,2, 陶永清 1,2, 王素英 1,2, 毕连克 3, 朱晓昊 3, 陈瑾 1,2

(1. 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300400)(2. 天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300400) (3. 天津耳朵眼炸糕餐饮有限责任公司, 天津 300400)

摘要: 为探究天津耳朵眼炸糕工业化纯种或混种发酵中的优势酵母菌株,以耳朵眼炸糕的沥水米浆和发酵面团为原料,首先采用米浆固体培养基划线分离纯化的方法,获得 6 株酵母菌。其次对其进行 WL 培养基菌落形态观察、个体形态显微镜观察、生理生化特征测定和 18S rRNA 基因序列分析,发现 Y2、Y3 菌株为酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae),Y4 为西文毕赤酵母(Pichia occidentalis),Y7-1、Y7-2 为矮小假丝酵母(Candida humilis),Y8 为溶磷白地霉(Galactomyces geotrichum)。最后测定各菌株的产气量、碳源利用率和菌体生长速度,结果显示 Y2 发酵产气快且产气量最大,发酵结束时发酵液中的残糖含量最低为 16.33 mg,快速生长期的 OD600 为 0.149。由此认为 Y2 菌株为糯米炸糕发酵生产的优势酵母菌,具有作为纯种发酵菌剂生产的潜力,为耳朵眼炸糕的品质控制和工业化生产提供了理论依据。

关键词: 糯米炸糕; 酵母菌; 分离鉴定; 优势菌株

文章篇号: 1673-9078(2016)07-91-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.015

Isolation, Identification, and Screening of Dominant Yeast Strains

in Fried Cake Made from Natural Fermented Glutinous Rice

SHAO Bing-jie^{1,2}, TAO Yong-qing^{1,2}, WANG Su-ying^{1,2}, BI Lian-ke³, ZHU Xiao-hao³, CHEN Jin^{1,2}

(1.Tianjin Key Laboratory of Food and Biotechnology, Tianjin 300400, China) (2.College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300400, China) (3.Tianjin erduoyan Food Co., Ltd, Tianjin 300400, China)

Abstract: To explore the dominant yeast strain in industrial pure or mixed fermentation during the preparation of Tianjin erduoyan fried cake, the rice slurry and fermented dough were used as experiment material, and six yeast strains were separated and purified by the streak plate method using slurry solid culture medium. Based on observations of colony morphology in Wallerstein Laboratory (WL) medium and individual cell morphology, determination of physiological and biochemical characteristics, and 18S rRNA gene sequence analysis, strains Y2 and Y3 were identified as *Saccharomyces cerevisiae* and strain Y4 was identified as *Pichia occidentalis*. Besides, Y7-1 and Y7-2 were identified as *Candida humilis*, and Y8 was identified as *Galactomyces geotrichum*. Gas production, carbon source utilization rate, and cell growth rate of each strain were determined. Results showed that Y2 had a fast gas production rate and the highest gas production. At the end of fermentation, the content of residual sugar in the fermentation broth was the lowest (16.33 mg), and the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) during exponential growth phase was 0.149. Thus, strain Y2 is the dominant yeast in the production of fried fermented glutinous rice cake, and has the potential to be a pure fermentation agent. This study provides a theoretical basis for the quality control and industrial production of erduoyan fried cake.

Key words: fried glutinous rice cake; yeast; isolation and identification; dominant strain

糯米发酵炸糕是我国传统风味食品,其生产流程 是将糯米磨浆后,经过数天的沥水和自然发酵,加馅 包制,最后油炸得成品。在沥水环节由于生米和环境 中存在微生物,导致产酸发酵,米浆 pH 持续下降,

收稿日期: 2015-09-16

基金项目: 天津市科技型中小企业与产业发展计划项目(14ZXNZNC00031); 天津市高等学校创新团队(TD-5049); 国家科技支撑计划(2012BAD37B06-07) 作者简介: 邵冰洁(1989-), 女,硕士,研究方向: 发酵食品研究

通讯作者: 王素英(1964-),女,教授,硕士生导师,主要从事微生物资源 及前期开发利用研究 形成酸面团,此时接入老酵进行自然发酵,乳酸菌和酵母菌是参与糯米炸糕自然发酵的主要微生物。研究表明,自然发酵面团含有 20 余种的常见酵母菌,其中酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)的存在最广泛。假丝酵母(Candida humilis)和东方伊萨酵母(Issatchenkia orientalis)等也常存在于酸面团中^[1]。通过发酵作用,阻碍支链淀粉发生重结晶作用,减缓老化速度^[2];直链淀粉含量增加,淀粉分子聚合作用增强,形成了更好的凝胶网络^[3],使炸糕劲道不粘牙。发酵过程中,微生物降解葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽

糖等糖类物质产生的 CO_2 能够抑制杂菌生长,不仅可增加面团的体积,而且形成面团的疏松多孔结构,使炸糕柔软蓬松,同时生成乙醇、乳酸、醋酸等物质以及少量的风味辅助物质[A],形成糯米炸糕独特的风味和口感[A]。

目前糯米炸糕采用作坊式生产,发酵依靠生米和老酵携带的微生物在自然条件下完成,微生物的活性和菌相易受环境的影响,沥水和发酵时间的长短随室温的变化而存在较大差异,产品工艺参数未实现标准化,质量控制依赖于车间老艺人肉眼观察和经验判断,因此生产过程缺乏规范性,且产品质量不稳定。为了实现发酵环节的合理控制,推进炸糕生产从作坊式生产向工业化生产转型,提高产品质量并保证品质稳定,本实验拟分离鉴定存在于沥水和发酵环节的酵母菌,以了解糯米炸糕自然发酵微生物区系的菌种组成,对菌种进行分离鉴定,在此基础上筛选最适合糯米发酵的酵母菌菌株,为制备纯种发酵菌剂奠定基础,推动耳朵眼炸糕工业化生产进程。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料

沥水环节的新鲜米浆和发酵环节的湿米粉,采自 糯米炸糕生产车间。

1.1.2 培养基及主要试剂

米浆培养基:新鲜米浆 100 g,琼脂 15 g,加水至 1000 mL,于 121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

PDA 培养基、YPD 培养基、WL 营养琼脂培养基、 生孢子培养基、碳源基础培养基、氮源基础培养基、 蛋白胨水培养基、水解尿素培养基的配方参见相关的 微生物实验指导书。

酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)、蛋白酶 K、TaqDNA 等购自索莱宝生物科技有限公司。1.1.3 主要仪器

MLS-3780 高压灭菌锅, 日本 SANYO 电器集团; FJ200-SH 数显高速分散均质机,上海标本模型厂; 754 型紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司; Neofuge 18R 台式高速冷冻离心机,力康发展有限公司; TGL-16 台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; iCycler-BIO-RAD PCR 扩增仪,美国 Bio-Rad 公司; UV-1 型紫外投射分析仪,珠海黑马医学仪器有限公司; CHEMIDOC XRS 凝胶成像分析系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离纯化

无菌条件下,取新鲜米浆或湿米粉 10.0 g 置于装有 90 mL 无菌生理盐水的锥形瓶中。用均质机充分混匀后 4 \mathbb{C} 条件下静置 1 h。取上层悬液梯度稀释至适宜浓度,取 1 μ L 悬液均匀涂布于米浆培养基,28 \mathbb{C} 培养 4~5 d。

挑取菌落形态不同的单菌落,划线接种于 PDA 培养基。反复纯化并镜检,直至得到单一菌落。将疑似酵母菌转移至 PDA 斜面培养基,4 ℃保藏。

1.2.2 菌种的鉴定

WL 培养基鉴定: 将活化后的待测菌株划线接种于 WL 营养培养基, 28 ℃培养 4~5 d。观察并记录菌落形态和颜色。

形态观察: 观察酵母菌的菌落形态、细胞形态、 子囊孢子、假菌丝、出芽方式及液体培养特征。

生理生化特征测定:对酵母菌进行碳源同化、氮源同化、糖发酵和尿素酶试验。

18S rRNA 基因序列分析: 选用索莱宝公司的酵母基因组 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)提取酵母菌基因组 DNA。并进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 2×Premix 25 μ L,正向引物 2 μ L,反向引物 2 μ L,模板 DNA2 μ L,去离子水 19 μ L,总计 50 μ L。选用 18S rRNA 通用扩增引物: 5'-ATTGGAGGGCAAGTCTG GTG-3',5'-CCGATCCCTAGTCGGCATAG-3'; PCR 反应条件: 94 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 1 min, 55 ℃ 复性 1 min, 72 ℃延伸 1 min, 28 个循环; 72 ℃补齐 10 min。

扩增产物由上海生工生物工程股份有限公司进行纯化并测序。测得的序列与 NCBI 中的相关序列进行比对。并用 Mega6 软件采用 NJ 法构建系统进化树。1.2.3 优势菌种的筛选^[6,7]

一级筛选:取 1 μ L OD₆₀₀为 0.5 的菌悬液接入放有杜氏小管的 0.5 mLYPD 液体培养基中,28 \mathbb{C} 培养,记录各菌株的开始产气时间与产气量,筛选出产气较快较多的菌株。

二级筛选:取 2 mL OD₆₀₀为 0.5(\pm 0.05)的各菌株菌悬液分别接入 100 mLYPD 液体培养基中,定时测定失重情况。发酵结束后,测定发酵液 pH、还原糖含量,选出发酵性能较优的菌株。

三级筛选:将各菌株菌悬液 OD_{600} 调整至 0.5 (± 0.05),按 2%接种量接入 YPD 液体培养基中,72 h 跟踪测定培养基 OD_{600} 并绘制生长曲线,根据生长速

率确定最优菌株。

结果与讨论

2.1 菌株的分离纯化

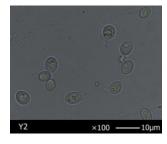
从新鲜米浆或湿米粉中分离获得6株酵母菌,编 号为 Y2, Y3, Y4, Y7-1, Y7-2 和 Y8, 各菌株的菌 落形态、个体形态和大小如表1和图1所示。

2.2 菌种的鉴定

表 1 酵母菌菌落、细胞形态

Table 1 Morphology of yeast colonies and cells

编号	菌落形态	细胞形态	细胞大小/μm
Y2	白色、不透明、半球形、高凸、表面光滑	卵圆形	(5-6)×(7-8)
Y3	白色、不透明、扁平中间凸起、表面光滑	卵圆形	(5-6)×(7-8)
Y4	白色、低隆起、边缘毛糙成粉状、不透明、干燥	椭圆形	(3-5)×(8-10)
Y7-1	白色、扁平、光滑、湿润、圆形、不透明	卵圆形	(4-5.5)×(7-8)
Y7-2	白色、扁平、光滑、湿润、形状不规则、不透明	长筒形	(5-7)×(8-10)
Y8	白色、干燥、高凸起、毛糙成丝状	长筒形	(5-7)×(8-10)



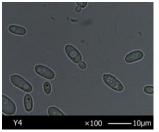


图 1 部分酵母菌菌体形态

Fig.1 Morphology of yeast cells

2.2.1 基于 WL 培养基菌落形态的分类

纯化酵母菌在 WL 培养基上的菌落形态见图 2, 依照 Cavazza^[8],杨莹^[9]文章中对酵母菌 WL 分类描述 结果见表 2。

根据酵母菌在 WL 培养基的菌落形态, 对其进行 了初步分类,在此基础上,根据《酵母菌的特征与鉴 定手册》[10]、《真菌鉴定手册》[11],选择相应的个体 形态、液体生长情况和相关生理生化指标进行了测定, 结果见表3和表4

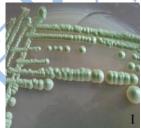




图 2 Ⅰ类和Ⅲ类酵母在 WL 培养基上的菌落形态

Fig.2 Colony morphology on WL medium with class I and III yeast strains

2.2.2 基于形态及生理生化特征的鉴定

表 2 WL 培养基菌落形态及分类结果

Table 2 Colony morphology on WL medium and classification result

编号	菌落形态	所属类群	备注
Y2,Y3	泛绿奶油色,5 d 后绿色变深,球形凸起,表面光滑,不透明	I类	酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)
Y4	奶油色,球形凸起,干燥,边缘粉状,不透明	II 类	未提及
Y7-1,Y7-2	泛绿奶油色,扁平中间凸起,表面光滑,湿润,不透明	III 类	未提及
Y8	泛绿奶油色,中间有凸起,干燥,粉状,不透明	IV 类	未提及

表 3 酵母菌形态及液体培养特征

Table 3 Morphologies of yeast strains and characteristics of liquid culture

		8 .		1
编号	子囊孢子	假菌丝	出芽方式	液体培养特征
Y2	有	无	芽殖	无醭膜,形成致密沉淀
Y3	有	无	芽殖	无醭膜,形成致密沉淀
Y4	有	无	芽殖	有醭膜,有沉淀,培养液浑浊
Y7-1	无	有	芽殖	无醭膜,有沉淀
Y7-2	无	有	芽殖	无醭膜,有沉淀
Y8	有	有	芽殖	有醭膜,沉淀较少,培养液澄清

根据表 3、表 4 的测定结果,查阅相应的鉴定手 册,可以认为 Y2、Y3 为酿酒酵母(Saccharomyces

cerevisiae), Y7-1、Y7-2 为矮小假丝酵母(Candida humilis), 其它菌株未鉴定到种属。

表 4 酵母菌的生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of yeast

strains							
		Y2	Y3	Y4	Y7-1	Y7-2	Y8
	D-半乳糖	+	+	-	+	+	+
	L-山梨糖	-	-	V	-	-	+
	蔗糖	+	+	-	-	-	-
	麦芽糖	V	V	-	-	-	-
	乳糖	-	-	-	-	-	-
碳氮源	棉子糖	+	+	-	-	-	-
同化	淀粉	V	V	-	-	-	-
1,110	柠檬酸	-	-	-	-	-	V
	甘油	+	+	V	+	+	+
	纤维二糖	V	V	-	-	-	-
	鼠李糖	-	-	-	-	-	-
	甘露醇	V	V	-	-	-	+
	硝酸钾	-	-	-	-	-	_
	葡萄糖	+	+	+	+	+	V
	D-半乳糖	V	V	-	+	+	V
糖发酵	麦芽糖	-	-	-	-	-	-
佑及时	蔗糖	V	V	-	-	-	-
	乳糖	-	-	-	-		A
	棉子糖	V	V	-	-	7	
水解尿素试验							
	25℃	+	+ _	+	+/	+	+
温度生长	30℃	+	+	+	+	+	+
温 /又工 [入	37℃	-	-	+	-	-	-
	42℃	+	4	V	-		-

注:+表示阳性结果,-表示阴性结果,V表示结果可变。

2.2.3 基于 18S rRNA 基因序列的鉴定

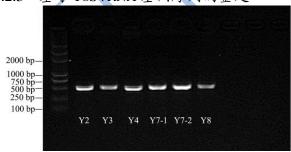


图 3 酵母菌 18S rRNA 基因的 PCR 扩增产物

Fig.3 PCR amplification products of 18S rRNA gene in yeast strains

以酵母菌基因组 DNA 为模板,采用通用引物对 *18S rRNA* 基因进行 PCR 特异性扩增,获得大小在 500 bp 左右的 PCR 产物(图3)。将测序获得的序列与 NCBI

数据库中的相关序列进行比对并建立系统发育树^[12],结果如图 4 所示。

从图 4 可知, Y2、Y3 与 Saccharomyces cerevisiae (KC969085.1)、Y4 与 Pichia occidentalis (EF550374.1)、Y7-1、Y7-2 与 Candida humilis (KM516765.1)、Y8 与 Galactomyces geotrichum (JN256015.1)位于同一主枝,相似性均为 99%以上,说明同一主枝不同菌株之间的发育关系密切,该鉴定结果得到 99%以上的 Bootstrap 检验支持率。据此,确定 Y2、Y3 为酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae),Y4 为西文毕赤酵母(Pichia occidentalis),Y7-1、Y7-2 为矮小假丝酵母(Candida humilis),Y8 为溶磷自地霉(Galactomyces geotrichum)。

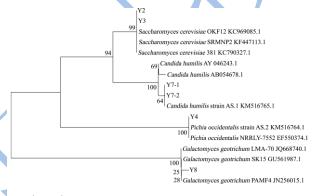


图 4 基于 18S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequences

2.3 沥水、发酵环节酵母菌菌相组成的变化

在沥水和发酵环节定时取样,制备菌悬液并涂布于米浆固体平板培养基,28℃培养4~5 d进行计数,结果如图 5 所示。

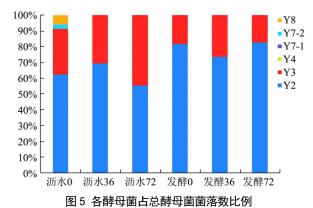


Fig.5 Proportion of each yeast strain based on total number of colonies

从图 5 可知,在沥水及发酵环节 Saccharomyces cerevisiae Y2 菌株一直占绝对优势,尤其在发酵 72 h时所占比例达到 80%。Saccharomyces cerevisiae Y3 菌

株为次优菌株,尤其在沥水 72 h 时,所占比例达到 47%。另外,沥水开始时米浆中含有少量 Galactomyces geotrichumY8 和 Candida humilis Y7-2 菌株,沥水 36 h 后 Y7-2 菌株不再检出。发酵开始时湿米粉含有少量的 Pichia occidentalis Y4 和 Candida humilis Y7-1 和 Y7-2 菌株,发酵结束时 Y7-2 菌株不再检出。可见沥水和发酵后期菌种组成趋于简单。

2.4 优势菌株筛选

通过对 6 株酵母菌的产气情况测定进行一级筛 选,结果见表 5。

表 5 酵母菌产气情况

Table 5 Gas production in yeast strains

	12 h	24 h	48 h	60 h
Y2	+++	+++++	+++++	+++++
Y3	++	+++++	+++++	+++++
Y4	-	++	++++	+++++
Y7-1	+	++++	+++++	+++++
Y7-2	+++	+++++	+++++	+++++
Y8	-	-	+	+

注: -表示杜氏小管中无气体、+表示气体占小管体积的 1/5、+++++表示气体充满小管。

从表 5 可以看出,Y8 菌株产气最慢且产气量最小,生长 48 h 时产生极少量气体,Y4 菌株 24 h 时观察有气体产生,但与其它菌株相比产气速度较慢。其它菌株在 12 h 时均出现产气情况,且 Y2 和 Y7-2 菌株初期产气量较大,Y3 和 Y7-1 次之,但 48 h 时气体均已充满杜氏小管。因此,根据产气速度和产气量的多少将 Y2、Y3、Y7-1 和 Y7-2 菌株接种于 YPD 液体培养基中培养,定时记录培养体系的失重情况,并测定发酵液最终 pH 和残糖量。结果见图 6 和表 6。

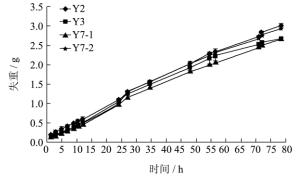


图 6 发酵液失重情况

Fig.6 Weight loss of fermented liquid

从上述结果可以看出,Y7-1 菌株生长过程中,发酵液质量损失最低,依次从低到高分别是 Y3,Y7-2和 Y2 菌株,且后三株菌发酵液中残余还原糖含量较

少,即底物葡萄糖利用率较高,因此选取 Y2, Y3, Y7-2 进行生长速度测定,结果如图 7。

对三株酵母菌最大生物量进行统计分析,发现不存在无显著差异,且达到最大生物量的时间基本一致,均为48 h。但 Y2 菌株在快速生长前期,OD₆₀₀为0.149,高于 Y3(0.141)和 Y7-2(0.135)菌株,同时考虑 Y2 菌株发酵液的 pH 值变化幅度较小,且与湿米粉实际发酵过程的 pH 值基本相当,因此选取 Y2 为最优菌株。

表 6 发酵液 pH 值和还原糖残糖含量

Table 6 Residual content of reducing sugars and pH value of

fermentation liquid					
菌株	残余还原糖	pН	值		
国 体	含量/mg	始	终		
Y2	16.33±0.11	5.23±0.03	5.07 ±0.04		
Y3	17.17±0.07	5.22±0.03	4.54±0.02		
Y7-1	18.24±0.04	5.23 ±0.05	4.74±0.04		
Y7-2	16.63±0.03	5.24±0.02	4.63 ±0.02		

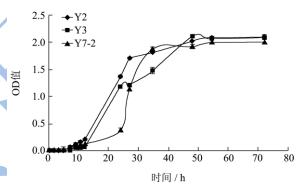


图 7 酵母菌生长曲线

Fig.7 Growth curve of yeast strains

3 结论

本研究从糯米炸糕传统工艺的沥水米浆和发酵湿米粉中分离获得 6 株酵母菌。经 WL 培养基菌落形态观察、菌体形态及生理生化特征测定和 18S rRNA基因序列分析,确定 Y2、Y3 为酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae),Y4 为西文毕赤酵母(Pichia occidentalis),Y7-1、Y7-2 为矮小假丝酵母(Candida humilis),Y8 为溶磷白地霉(Galactomyces geotrichum)。 其中,酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)繁殖速度快,葡萄糖利用率最高,发酵产气量最大,是沥水和发酵环节的优势菌株,该结论与他人的研究结果一致^[13]。另外存在于新鲜米浆的矮小假丝酵母(Candida humilis)Y7-2 菌株也具有较优的发酵性能,且其快速生长滞后于酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae),说明可以发酵更低浓度的残糖。

参考文献

- [1] 杨雪娟,潘向辉,李姗姗,等.酸面团酵母菌 Sy22 的分离与发酵性能评价[J].河北农业大学学报,2012,35(5):84-87
 YANG Xue-juan, PAN Xiang-hui, LI Shan-shan, et al.
 Fermentation performance of yeast Sy22 isolated from
 - Fermentation performance of yeast Sy22 isolated from sourdough [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2012, 35(5): 84-87
- [2] Yung-Ho Chang, Cheng-Hua Lin. Effect of molecular size and structure of amylopectin on the retro gradation thermal properties of waxy rice and waxy cornstarches [J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21: 645-653
- [3] 熊柳,邢燕,孙庆杰.面团发酵过程中小麦淀粉理化性质的变化[J].中国粮油学报,2012,27(6):9-13
 - XIONG Liu, XING Yan, SUN Qing-jie. Changes of the physical chemical properties of the wheat starch during fermentation of the dough [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2012, 27(6): 9-13
- [4] 李慧东,刘冠勇.用乳酸菌和酵母共同发酵法生产面包的研究[J].食品工业,2007,6:5-26
 - LI Hui-dong, LIU Guan-yong. Research on producing bread by collective fermentation process using *Lactobacillus* and Yeast [J]. The Food Industry, 2007, 6: 5-26
- [5] Daniel H M, Moons M C, Huret S, et al. Wickerhamomyces anomalus in the sourdough microbial ecosystem [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2011, 99: 63-73
- [6] 刘贞,刘小翠,赵思明,等.发酵米浆中高发酵性能酵母菌和 乳酸菌的筛选和鉴定[J].食品科学,2010,31(7):232-235 LIU Zhen, LIU Xiao-cui, ZHAO Si-ming, et al. Screening and identification of strains of yeast and *Lactobacillus* with high fermentation performance from fermented rice slurry [J]. Food Science, 2010, 31(7): 232-235

- [7] 毛志群,张伟,檀建新,等.高产酒精酵母的筛选及鉴定[J].食品与发酵工业,2003,29(3):50-53

 MAO Zhi-qun, ZHANG Wei, TAN Jian-xin, et al. Selection and identification of high alcohol yield producing strain [J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(3): 50-53
- [8] Cavazza A, Grando M S, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini [J]. Vigevini 9, 1992: 17-20
- [9] 杨莹,徐艳文,薛军侠,等.WL 营养琼脂对葡萄酒相关酵母的鉴定效果验证[J].微生物学杂志,2007,27(5):75-78 YANG Ying, XU Yan-wen, XUE Jun-xia, et al. Validate the identification effect of WL nutrient agar on wine yeast [J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 75-78
- [10] 巴尼特 J A.胡瑞卿译.酵母菌的特征与鉴定手册[M].青岛: 青岛海洋大学出版社,1990 Barnett J A. HU Rui-qing translation. Characteristics and identification of yeast manual [M]. Qing Dao: Qingdao Ocean University Press, 1990
- [11] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979 WEI Jing-chao. Fungal identification manual [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979
- [12] 魏冉冉.内蒙古优质传统酸牛奶中乳酸菌分离鉴定及其模拟制作研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2013
 - WEI Ran-ran. Isolation and identification of *Lactic acid bacteria* from the high quality traditional yogurt of inner mongolia and imitating its producing [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013
- [13] 杨浣漪,张国华,何国庆.传统面食发酵剂中菌群多样性的研究[J].现代食品科技,2013,29(9):2115-2119
 - YANG Huan-yi, ZHANG Guo-hua, HE Guo-qing. Biodiversity of microorganisms in Chinese traditional starter cuitures ecosystem [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2115-2119