



闫洪洋,黄启蒙,蔡兴华,等.产香菌株的分离鉴定及其发酵产物在卷烟加香中的应用[J].轻工学报,2021,36(6):47-54.

YAN H Y, HUANG Q M, CAI X H, et al. Isolation and identification of aroma-producing strains and application of fermentation products in cigarette flavoring[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(6): 47-54.

DOI:10.12187/2021.06.006

中图分类号:TS41 文献标识码:A 文章编号:2096-1553(2021)06-0047-08

产香菌株的分离鉴定及其发酵产物在卷烟加香中的应用

Isolation and identification of aroma-producing strains and application of fermentation products in cigarette flavoring

闫洪洋¹,黄启蒙²,蔡兴华³,张立立³,徐志强³,马林²,李萌²
YAN Hongyang¹, HUANG Qimeng², CAI Xinghua³, ZHANG Lili³, XU Zhiqiang³,
MA Lin², LI Meng²

1. 中国烟草总公司职工进修学院,河南 郑州 450008;
 2. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
 3. 浙江中烟工业有限责任公司 技术中心,浙江 杭州 310024
1. Staff Development Institute of CNTC, Zhengzhou 450008, China;
2. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
3. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd., Hangzhou 310024, China

关键词:

产香菌株;分离;
鉴定;香气成分;
烟用香料

Key words:

aroma-producing
strain; isolation;
identification;
aroma component;
tobacco flavor

摘要:以阳光玫瑰葡萄表皮为微生物分离源,筛选分离得到一株产香菌株 MG6,对该菌株进行鉴定并分析其发酵液的特征香气成分,进而利用该菌株制备烟用香料并进行卷烟加香评价。结果表明:该菌株为陆生毕赤酵母(*Pichia terricola*);与对照组相比,该菌株发酵液中酮类、醇类、酯类、酚类、烯炔类等烟叶主要特征香气成分均明显提高,其中巨豆三烯-3-酮、二氢猕猴桃内酯、新植二烯的总体含量均有不同程度的提高,这些物质对于提升烟草的香气质量非常重要;当烟用香料添加量为 0.05 % 时,卷烟香气质和香气量均有所提高,刺激性明显降低,整体感官品质提升。

收稿日期:2021-01-31

基金项目:中国烟草总公司重点实验室项目(110201503003)

作者简介:闫洪洋(1975—),男,河南省郑州市人,中国烟草总公司职工进修学院高级讲师,硕士,主要研究方向为卷烟工艺与烟草质量评价。

通信作者:李萌(1982—),男,河南省长葛市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为烟草生物技术。

Abstract: An aroma-producing strain MG6 with aroma production was isolated from the surface of sunny rose grape. The strain was identified and the characteristic aroma components of its fermentation broth were analyzed. Then the tobacco flavor was prepared by the strain and the aroma evaluation of cigarette was carried out. The results showed that the strain was *Pichia terricola*. Compared with the control group, the main characteristic aroma components such as ketones, alcohols, esters, phenols and olefins in the fermentation broth of the strain were significantly increased, and the total contents of megastigmatrien-3-one, dihydrokiwifruit lactone and neophytadiene were increased in different degrees, which were particularly important for improving the aroma quality of tobacco. When the added amount of tobacco flavoring was 0.05%, the quality and amount of aroma were improved, the irritation was reduced, and the overall sensory quality was improved.

0 引言

烟用香料是卷烟生产中必不可少的物质,对卷烟的风格和品质形成有重要影响。烟用香料主要包括烟草源香料、非烟草来源的天然香料和人工合成香料^[1-2]。然而,天然香料资源有限,难以满足市场需求;合成香料香气单一,受合成方法或条件的制约,很多优质香气成分尚不能人工合成,或合成成本太高^[3-5]。

随着微生物发酵技术的不断发展,利用微生物发酵技术制备烟用香料成为行业内的研究热点。该方法制备的烟用香料具有不受气候条件限制、生产周期短、对环境友好等特点^[6]。但是,目前将微生物发酵技术应用于烟用香精香料开发的报道主要集中于陈化后烟叶表面微生物的利用与开发^[7-8]。吕品等^[9]利用由自然陈化的白肋烟叶分离筛选的产香菌发酵咖啡,定向生产了具有独特香气特征的烟用香料,卷烟加香实验结果表明:发酵香料具有提高卷烟烟香气香气质、增大香气量、降低干燥感和刺激性、柔和烟气等作用。庾有朋等^[10]应用高通量测序分析了陈化烟叶表面微生物种类并从中筛选出优势菌株应用于烟叶发酵,发酵后烟叶的香气质和香气量增加,刺激性、杂气减少,烟叶品质明显提升。

目前,果类微生物在烟用香料制备中的应用也有相关报道,周丽娟等^[11]从荔枝中分离得到的内生酵母菌能够发酵产生苯乙醇、糠醛、

2,3-丁二醇等香气物质;朱宇等^[12]从西瓜中分离的一株内生酵母菌能够将苯、胺、酚等物质转化生成酸、醇等香气物质,将由其发酵干果提取液制备的香料加入卷烟中,具有柔和烟气、提高烟气细腻性和甜润感的作用。郭林青等^[13]从巨峰葡萄表皮分离筛选得到一株能够使烟末发酵液产生明显花香韵和甜香韵且区别于对照组的汉逊酵母菌株 YG-4,利用该菌株发酵制备得到的烟末发酵液与空白对照组对比,虽然有部分香气成分含量降低,但是苯乙醇、苯甲醛苯乙酯、2-戊烯酸、1-苯基-3-氨基吡唑含量均有所增加,对于发酵液香味有所改善,产生不同于空白对照组的特征香气。

为开发与以往研究不同的微生物资源,本研究拟从阳光玫瑰葡萄中分离筛选出产香菌株,并对其形态学、分子生物学鉴定;利用所得菌株发酵烟末,制备出能够赋予卷烟独特风格特征的烟用香料,以改善卷烟的吸食品质,为生物发酵技术在烟用香料开发中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料与试剂

原料:临沧 C3F 复烤烟叶,河南中烟工业有限责任公司技术中心提供;阳光玫瑰葡萄,摘自郑州大学葡萄园,采集 3 个样品用于 3 次重复实验,分别标记 ZD₁、ZD₂、ZD₃,在无菌条件下收集 3 个新鲜样品的葡萄表皮用于实验。

试剂: Ezup 柱式酵母基因组 DNA 提取试剂

盒,生工生物工程(上海)股份有限公司产。

1.2 主要仪器与设备

EL204 型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司产;HZQ-211C 型落地恒温振荡器、HWS-12 型电热恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司产;LX-C35L 型压力蒸汽灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司产;SW-CJ-2D 型无菌操作台,苏州净化设备有限公司产;SHL-D(Ⅲ)型循环水式真空泵,郑州凯鹏实验仪器有限公司产;SHSL 型调温电热套,天津泰斯特仪器有限公司产;GC6890-5973MSN 型气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦科技公司产;RE-52AA 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂产。

1.3 培养基的配制

YEPD 培养基:蛋白胨 2 g,酵母浸粉 1 g,葡萄糖 2 g,琼脂粉 2 g,蒸馏水定容至 100 mL,于 115 °C 下高温高压灭菌 30 min。

WL 鉴定培养基:酵母浸粉 4 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 5 g、磷酸二氢钾 0.55 g、氯化钾 0.425 g、氯化钙 0.125 g、硫酸镁 0.125 g、氯化铁 0.002 5 g、硫酸锰 0.025 g、溴甲酚绿 0.022 g、琼脂 20 g,蒸馏水定容至 1000 mL,于 115 °C 下高温高压灭菌 30 min。

发酵培养基:烟末(C_3F 复烤烟叶经粉碎打末)10 g,蒸馏水 100 mL,于 115 °C 下高温高压灭菌 30 min。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株的富集、分离及纯化 参考张俊杰等^[14]的研究方法,简述如下:在无菌条件下,分别取 1 g 葡萄果皮样品加入到 99 mL 无菌液体 YEPD 培养基中,于 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 48 h,取出静置,将富集液进行梯度稀释至 10^{-5} 。分别选取稀释度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的稀释液均匀涂布至固体 YEPD 培养基,在 30 °C 恒温箱内培养 2~3 d 至长出单菌落。采用平板划线法纯化菌株,编号保存。

1.4.2 产香菌株的筛选 将保存的菌株接种至液体 YEPD 培养基,振荡培养,培养过程中观察并记录发酵液香味变化,通过嗅辨分析将产生令人愉悦香气的菌株培养液取出、标记,并编号保存^[15]。方法简述如下:按 1:10(体积比)接种量将保存菌株接入液体发酵培养基中,于 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 1~2 d,制得发酵液。同时,同比例接种无菌水到液体发酵培养基,作为空白对照组,并设置 3 组平行实验。根据感官嗅辨结果,选出产香效果较好的菌株,将明显区别于对照组香味的发酵液取出、标记。对筛选得到的最优菌株,重复上述步骤制备发酵液,并设置空白对照组,进行菌株的鉴定及发酵液致香成分分析。

1.4.3 产香菌株的鉴定 1)形态学鉴定。将筛选得到的菌株接入 WL 鉴定培养基进行菌落形态观察:从菌落的颜色、质地、表面、菌落形态等特征进行描述,对酵母菌进行形态学方面的初步分类。细胞显微形态观察:从细胞形状、细胞生殖方式和细胞为单生、对生或群生 3 个方面对筛选菌株进行描述^[13,16]。

2)分子生物学鉴定。用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,使用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3')进行 5.8 S-ITS 区基因扩增^[17-18]。对扩增后的 PCR 产物进行测序分析,测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,并用 MEGA7 软件进行分析,确定该酵母菌株的分类地位^[19-22]。

1.4.4 发酵液致香成分的测定 样品前处理:将供试菌株种子液按 1:10 的体积比接种至发酵培养基,于 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 3 d,将烟末发酵液置于同时蒸馏萃取装置一端的圆底烧瓶中,加入 25 g 氯化钠,溶解于 100 mL 蒸馏水,用电热套加热;装置的另一端为盛有 60 mL 二氯甲烷。二氯甲烷萃取液加入

适量的无水硫酸钠进行干燥,置于4℃过夜的500 mL圆底烧瓶,在60℃下水浴加热,同时蒸馏萃取3 h. 过滤,加入1 mL乙酸苯乙酯作为定量分析的内标物质,将滤液减压浓缩至1 mL,待测. 每个样品做3次重复实验.

GC测试条件:毛细管柱HP-5 MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样温度240℃;载气He,流速1.0 mL/min;分流比5:1;进样量1 μL;升温程序50℃,保持2 min,以4℃/min速度上升到280℃,保持10 min,结束. MS测试条件:传输线温度280℃;EI电子能量70 eV;倍增器电压1450 V;质量扫描范围35~550 amu;离子源温度230℃;四级杆温度150℃.

采用NIST14.L质谱数据库进行检索,将检测出的化合物的结构特征与图谱进行比对,并采用峰面积归一化法定量计算烟末发酵液中主要特征香气成分的含量. 实验设置3次重复.

1.4.5 烟用香料的制备 将供试菌株种子液按1:10的体积比接入发酵培养基,于30℃、180 r/min条件下置于摇床发酵2 d,制备发酵液. 同时,同比例接种无菌水到发酵培养基,作为空白对照组. 发酵结束后,在发酵液中加入2倍量体积分数为75%的乙醇加热回流提取,重复操作,收集两次的提取液,过滤,滤液静置后取上清液,用旋转蒸发仪(60℃)蒸馏除去乙醇,制得烟用香料.

1.4.6 卷烟加香评价 按烟丝质量分数分别为0.01%、0.05%、0.10%、0.15%称取烟用香料,用5 mL纯净水溶解后用微量喷雾器均匀地喷加于100 g烟丝上,以纯净水为空白对照,均置于温度(22±1)℃和相对湿度(60±2)%环境中平衡48 h,制成卷烟. 采用整体循环法,经专业评吸小组对上述卷烟进行感官综合描述,感官评吸按照卷烟感官品质评判标准,以香气质、香气量、杂气、刺激性、劲头、余味为主要指标进行判断^[23].

2 结果与分析

2.1 菌株分离筛选结果

本研究从阳光玫瑰葡萄果皮表面共分离得到23株酵母菌,通过嗅辨评定,所得发酵液与空白组进行对照,仅菌株MG6发酵液具有浓郁的果香味,并略带酒香气息.

2.2 产香菌株鉴定结果

2.2.1 形态学鉴定 MG6在WL培养基上的菌落形态特征和显微形态特征如图1和图2所示. 由图1可知,产香菌株MG6在WL培养基上,菌落颜色呈白色边、浅绿色顶,菌落形态均为中部凸起、表面褶皱、无光泽、干燥、不透明、边缘不规则. 由图2可知,在显微镜下,MG6菌株细胞形态呈椭圆形,单生,单端芽殖.

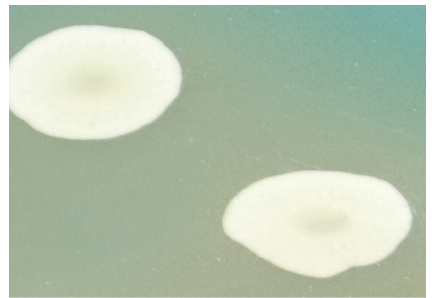


图1 MG6在WL培养基上的菌落形态特征
Fig. 1 Colony morphology of MG6 on WL medium

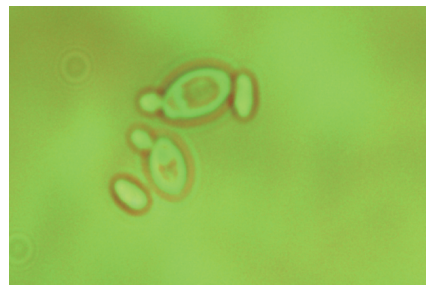


图2 MG6的显微形态特征
Fig. 2 Micromorphological characteristics of MG6

2.2.2 分子生物学鉴定 菌株MG6的5.8S-ITS扩增电泳图如图3所示. 由图3可知,MG6菌株的5.8S-ITS序列PCR产物电泳条带明亮清晰且无拖带现象,序列长度在400 bp左右,符合测序要求.

将测序得到的基因序列经过修正后提交到

Genebank, 并利用 NCBI 数据库中的 BLAST 工具进行序列比对. 利用 Mega 7.0 软件, 用 K2+G 模型进行 Maximum Likelihood (ML) 聚树及系统发育分析, 基于 5.8S-ITS 序列的系统发育树如图 4 所示. 由图 4 可知, 菌株 MG6 与 *Pichia terricola*、*Issatchenkia terricola* 聚为同一分支, 遗传相似性为 100%. 多重序列分析已将伊萨酵母属 (*Issatchenkia*) 归入毕赤酵母属 (*Pichia*)^[24-26], 可将 *Pichia terricola* 和 *Issatchenkia terricola* 认定为同一种菌, 即陆生毕赤酵母 (*Pichia terricola*)^[27]. 因此, 确定菌株 MG6 为 *Pichia terricola*.

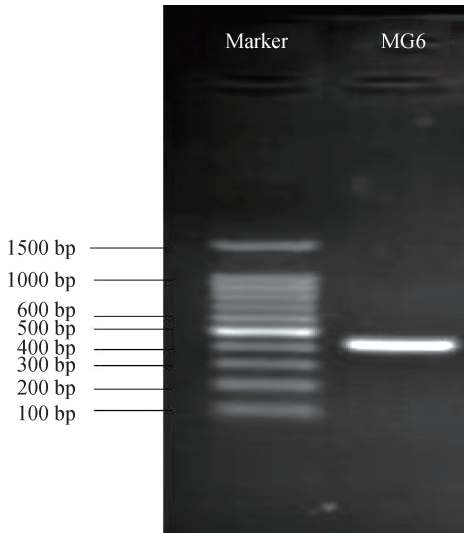


图 3 菌株 MG6 的 5.8S-ITS 扩增电泳图
Fig. 3 PCR product of 5.8S-ITS of strain MG6

2.3 发酵液致香成分分析结果

发酵液致香成分分析结果见表 1. 由表 1 可知, 发酵组与对照组共检测出致香成分 48 种, 主要由酮类、醇类、酯类、酚类、烯炔类、杂环类组成. 其中对照组共检测出 32 种致香成分, 发酵组检测出 38 种致香成分. 对比分析可得, 发酵组酮类、醇类、酯类、酚类、烯炔类、杂环类致香成分含量相比对照组均有所增加, 其中酮类致香成分增加了 63.59%, 醇类致香成分增加了 102.28%, 酯类致香成分增加了 125.50%, 酚类致香成分增加了 77.05%, 烯炔类致香成分增加了 35.25%, 杂环类致香成分增加了 59.71%. 其中, 大马士酮、巨豆三烯-3-酮、法尼基丙酮、苯甲醇、苯乙醇、二氢猕猴桃内酯、苯酚、愈创木酚、2-甲氧基-4-乙炔苯酚、新植二烯、吡啶等致香成分均有不同程度的提高.

烟叶中常见的致香成分有巨豆三烯-3-酮、二氢猕猴桃内酯、新植二烯等. 其中, 巨豆三烯-3-酮可有效改善烟气, 增加舒适度, 其增加了 25.60%; 二氢猕猴桃内酯具有猕猴桃样的青香果香, 赋予卷烟烟气清甜味, 其增加了 33.07%; 新植二烯能明显降低烟草刺激性、提高烤烟丰满度, 其增加了 32.33%. 综上所述,

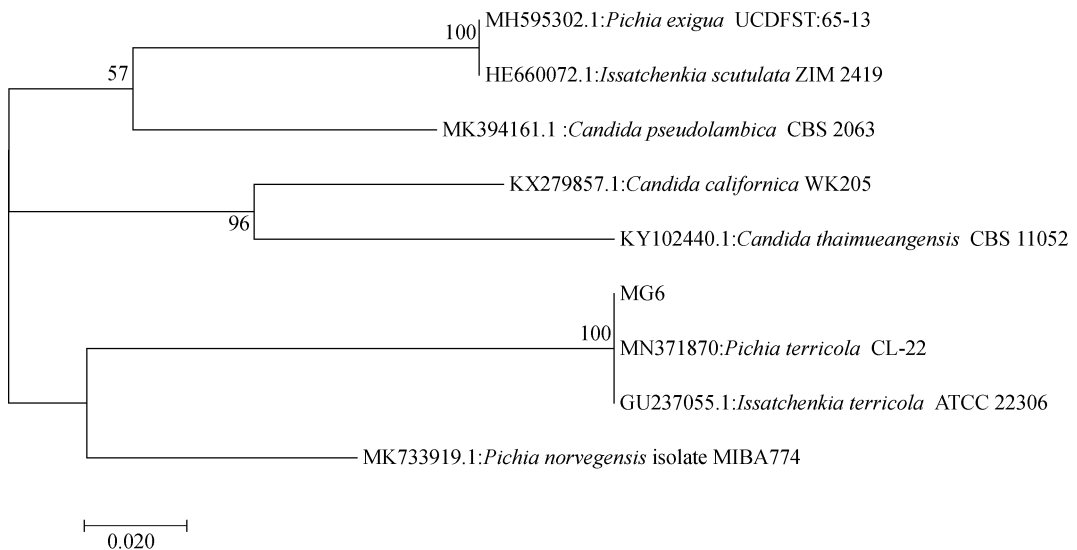


图 4 基于 5.8S-ITS 序列的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree based on 5.8S-ITS sequences

表1 发酵液致香成分分析
Table 1 Analysis of aroma components of fermentation broth

类别	成分名称	CAS	含量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
			对照组	发酵组
酮类(12)	2,2,6-三甲基-1,4-环己二酮	020547-99-3	0.458	—
	茄酮	054868-48-3	—	17.357
	大马土酮	023726-93-4	2.745	7.733
	ALPHA-大马酮	035044-68-9	1.150	1.592
	4-叔丁基苯丙酮	081561-77-5	1.709	—
	香叶基丙酮	003796-70-1	6.358	7.573
	巨豆三烯-3-酮	038818-55-2	46.549	58.466
	2-十五烷酮	002345-28-0	0.272	—
	(6R,7E,9R)-9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮	052210-15-8	—	1.923
	4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮	036151-02-7	0.718	3.927
	6,10,14-三甲基-2-十五烷酮	000502-69-2	3.536	5.070
	法尼基丙酮	001117-52-8	9.481	15.738
	总量		72.976	119.379
醇类(10)	苯甲醇	000100-51-6	12.740	21.787
	苯乙醇	000060-12-8	71.602	140.930
	香叶醇	000106-24-1	—	2.880
	香茅醇	000106-22-9	0.719	—
	S-(Z)-3,7,11-三甲基-1,6,10-十二烷三烯-3-醇	000142-50-7	—	0.807
	金合欢醇	004602-84-0	—	7.083
	(1S,2E,4R,7E,11E)-2,7,11-西柏三烯-4-醇	025269-17-4	2.487	5.086
	(2E,6E,11Z)-3,7,13-三甲基-10-(2-丙基)-2,6,11-环十四碳三烯-1,13-二醇	007220-78-2	—	9.110
	植物醇	000150-86-7	4.977	8.316
	香叶基香叶醇	024034-73-9	4.372	—
	总量		96.897	195.999
酯类(8)	辛酸乙酯	000106-32-1	—	1.199
	壬酸乙酯	000123-29-5	—	0.501
	二氢猕猴桃内酯	017092-92-1	4.886	6.502
	邻苯二甲酸二异丁酯	000084-69-5	—	2.005
	邻苯二甲酸二正丁酯	000084-74-2	3.086	—
	邻苯二甲酸-1-丁酯-2-异丁酯	017851-53-5	—	6.171
	十六酸乙酯	000628-97-7	0.503	1.624
	硬脂酸乙酯	000111-61-5	—	1.108
	总量		8.475	19.110
酚类(8)	苯酚	000108-95-2	7.421	12.815
	间甲酚	000108-39-4	0.347	—
	愈创木酚	000090-05-1	2.047	7.263
	对甲酚	000106-44-5	0.506	—
	2-甲氧基-4-乙烯苯酚	007786-61-0	2.775	5.106
	2,4-二叔丁基酚	000096-76-4	—	0.411
	2,5-二叔丁基酚	005875-45-6	0.477	—
	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	000119-47-1	2.931	3.626
	总量		16.504	29.221
烯烃类(7)	苯乙烯	000100-42-5	0.959	0.961
	长叶烯	000475-20-7	2.089	—
	B-瑟林烯	017066-67-0	—	1.439
	香树烯	025246-27-9	—	2.342
	大根香叶烯 B	015423-57-1	—	3.688
	新植二烯	000504-96-1	173.103	229.061
	(+)-香橙烯	000489-39-4	—	0.746
	总量		176.151	238.237
杂环类(3)	吡啶	000110-86-1	2.136	2.763
	2,3-二氢苯并咪唑	000496-16-2	16.260	27.223
	吡啶	000120-72-9	0.890	0.816
	总量		19.286	30.802

注:—表示未检测到。

经产香菌株 MG6 发酵后,各类特征香气成分含量均明显增加,这对提高烟叶整体感官品质起到了重要作用。

2.4 卷烟加香评价结果

卷烟加香评价结果如表 2 所示。由表 2 可知,加入适量的烟用香料,可以提高卷烟的香气质、香气量,降低刺激性,减少杂气,并使烟气柔和,改善余味。但是,香料添加量过大会使卷烟的整体感官品质降低。综合考虑,香料最佳添加量为 0.05%。

表 2 卷烟加香评价结果

添加量/%	综合描述
0	香气质差,香气量少,杂气重,刺激性大,劲头强,余味微苦辣
0.01	香气质较差,香气量略有,杂气较重,刺激性较大,劲头略强,余味微苦辣
0.05	香气质较好,香气量尚充足,杂气减少,刺激性明显降低,劲头适中,余味尚干净
0.10	香气质较好,香气量尚充足,杂气明显减少,刺激性降低,劲头适中,余味尚干净
0.15	香气质适中,香气量尚充足,杂气减少,刺激性降低,劲头适中,余味微苦

3 结论

本研究从阳光玫瑰葡萄表皮中分离出一株能够对烟叶产香的菌株 MG6,通过形态学、分子生物学鉴定,确定该菌株为 *Pichia terricola*。利用 GC-MS 技术对其发酵液进行分析,结果表明发酵后酮类、醇类、酯类等烟叶特征香气成分含量均有不同程度的增加。利用该菌株发酵液制备烟用香料,适量添加(添加量为 0.05%)可使卷烟香气质、香气量得到提升,刺激性、杂气降低,烟气柔和,改善了卷烟的吸食品质。

本文开发出与以往研究不同的一种新的微生物资源,并将其运用到烟叶发酵中,这对提高烟叶工业可用性具有重要意义;同时可为烟用香精香料产品的开发,以及生产特色的烟用加香原料提供一种新的思路和方法。

参考文献:

- [1] 高海有,刘秀明,高莉,等. 烟用香精香料研究现状与发展趋势[J]. 香料香精化妆品,2019(2):70.
- [2] 喻阑清. 微生物发酵烟用香料液研究[D]. 贵阳:贵州大学,2018.
- [3] 薛云,白家峰,严俊,等. 烟用天然香料的研究进展[J]. 轻工科技,2015,31(10):11.
- [4] 张峰,操晓亮,伊勇涛,等. 茶树花纯露的制备及其在卷烟中的应用[J]. 中国烟草学报,2020,26(5):18.
- [5] MALDONADO-ROBLEDO G, RODRIGUEZ-BUSTAMANTE E, SANCHEZ-CONTRERAS A, et al. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003,62(5/6):484.
- [6] 高锐,杨威,宋鹏飞,等. 微生物制备烟用香料的研究进展[J]. 安徽农业科学,2017,45(2):92.
- [7] ETSCHMANN M M W, SELL D, SCHRADER J. Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2004,29(6):187.
- [8] LIU H G, HE H L, CHENG C H, et al. Diversity analysis of the bacterial community in tobacco waste extract during reconstituted tobacco process [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015,99(1):469.
- [9] 吕品,李丹,黄龙,等. 烟叶产香菌的分离及其在烟用香料制备中的应用[J]. 烟草科技,2009(1):37.
- [10] 虞有朋,王刚,段旺军,等. 利用生物技术对烤烟发酵的研究[J]. 食品与发酵科技,2020,56(1):69.
- [11] 周丽娟,郑琳,刘煜宇,等. 荔枝产香内生菌的

- 挥发性成分分析及其在卷烟中的应用研究[J]. 精细化工, 2010, 27(10): 1013.
- [12] 朱宇, 郑琳, 刘煜宇, 等. 西瓜内生菌的挥发性成分分析及其发酵香料在卷烟中的应用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(4): 2093.
- [13] 郭林青, 朴永革, 朱春阳, 等. 烟草产香酵母 YG-4 的筛选鉴定及香气成分分析[J]. 轻工学报, 2019, 34(5): 27.
- [14] 张俊杰, 尚益民, 程大伟, 等. 河南安阳赤霞珠葡萄果表酵母菌的分离与鉴定[J]. 轻工学报, 2018, 33(3): 39.
- [15] 温雅骄. 干红葡萄酒酿酒酵母的优选与鉴定及其酿酒品质评价[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [16] 张俊杰, 杨旭, 郭晨, 等. 不同葡萄品种栽培土壤中酵母菌的组成及差异分析[J]. 酿酒, 2017, 44(1): 76.
- [17] 管庆林, 周笑犁, 赵姗, 等. 番茄自然发酵液中酵母菌的分离鉴定及其特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(3): 96.
- [18] 陈丽花, 任丽霞, 李东娜, 等. 甜酒曲中优质酵母菌的分离鉴定及其产香特性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 142.
- [19] 张俊杰, 尚益民, 彭姗姗, 等. 产香酵母的筛选及其苹果酒发酵特性[J]. 中国酿造, 2019, 38(8): 31.
- [20] MONTROCHER R, VERNER M C, BRIOLAY J, et al. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(1): 295.
- [21] FELL J W, BOEKHOUT T, FONSECA A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(3): 1351.
- [22] FERNÁNDEZ-ESPINAR M T, ESTEVE-ZARZOSO B, QUEROL A, et al. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000, 78(1): 87.
- [23] 国家烟草专卖局. 烟草在制品感官评价方法: YC/T 415—2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [24] 卿蔓君, 白梅, 张勇, 等. 西藏曲拉和云南乳饼中酵母菌的鉴定及其生物多样性[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1141.
- [25] LORLIAM W, AKARACHARANYA A, JINDAMORAKOT S, et al. Characterization of xylose-utilizing yeasts isolated from herbivore faeces in Thailand [J]. Scienceasia, 2013, 39(1): 26.
- [26] KURTZMAN C P, ROBNETT C J, BASEHOAR-POWERS E. Phylogenetic relationship among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. [J]. FEMS Yeast Research, 2008(6): 939.
- [27] 陈思睿, 唐琳琳, 冯建文, 等. 高效降解柠檬酸酵母菌的筛选鉴定及其在红树莓果汁中降酸特性[J]. 食品科学, 2020, 635(22): 142.