产香酵母 *Pichia myanmarensis* LX15 的分离纯化及对精酿啤酒风味物质形成的影响

王 伟[1,2]，俞志敏[2]，侯英敏[2]，堵国成[1]，李宪臻[2*]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 大连工业大学 生物工程学院，辽宁 大连 116034）

摘 要 为了适应精酿啤酒对个性化风味的需求，能产生特定风味化合物的产香酵母成为研究者的研究重点。从精酿啤酒原液中分离到1株产香酵母LX15菌，该菌细胞呈圆形或卵圆形、多极芽殖生长；LX15菌在玉米粉培养基上培养7～10 d不形成假菌丝，在酵母膏蛋白胨培养基上培养3 d能够形成子囊孢子。经生理生化特征和系统发育分析，确认该生香酵母为 *Pichia myanmarensis* 菌中的一个菌株，所产主要风味化合物包括乙酸乙酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯和辛酸乙酯。当LX15菌与啤酒酵母C1菌共发酵时，能够产生协同效应，提高酯类化合物和高级醇类的含量，并与LX15菌的接种比例正相关，但并不影响啤酒酿造的整体发酵速率和发酵能力。因此，LX15菌是一株适于提高精酿啤酒风味的产香酵母菌。

关键词 精酿啤酒；产香酵母；筛选；风味物质；*Pichia myanmarensis*

中图分类号 Q93－331 **文献标识码** A **文章编号** 1005－7021(2018)04－0034－07

doi:10.3969/j.issn.1005－7021.2018.04.005

Isolation and Properties of Aroma-Producing *Pichia myanmarensis* and the Effects of the Formation of Aromatic Substances in Craft-Brewed Beer

WANG Wei[1,2], YU Zhi-min[2], HOU Ying-min[2], DU Guo-cheng[1], LI Xian-zhen[2]

(1. *Schl. of Biotech., Jiangnan Uni., Wuxi* 214122; 2. *Schl. of Bio-Engin., Dalian Polytech. Uni., Dalian* 116034)

Abstract In order to meet the demand of individualized-flavors in craft-brewed beer, more attentions have been focused on the yeast producing specific aroma compounds. In this paper, one aroma-producing yeast strain was isolated from the crude craft-brewed beer, LX15. The strain cells are spherical to ovoid and multipolar budding. Pseudohyphae were not formed after LX15 was cultured on cornmeal media for 7～10 days, and ascospores could formed on yeast extract peptone media cultured for 3 days. Phenotypic and phylogenetic analyses suggested that LX15 was confirmed to be a strain of *Pichia myanmrensis*, and the flavors compounds it produced included ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate. When strain LX15 was fermented with beer yeast C1 together, the synergistic effect could produced to increase the content of esters compound and high-grade alcohols, which is positively related with inoculation volume ratio between LX15 and strain C1, however, no effect on the whole beer brewing and fermentation capability. Therefore, LX15 is an aroma-producing strain suitable for increasing the flavor for the craft-brewed beer.

Keywords craft-brewed beer; aroma-producing yeast; screening; flavor compound; *Pichia myanmarensis*

精酿啤酒（Craft Beer）是采用较小容器按传统工艺生产的具有个性化风味的一类啤酒，也称为工坊啤酒。与采用标准化工艺大型生产的工业化啤酒相比，精酿啤酒具有种类多、醇香/酯香浓

基金项目：国家自然科学基金项目(31371742，31401681)；公益性行业(农业)科研专项(201303095)

作者简介：王伟 男，讲师，博士。主要从事啤酒微生物方面研究。E-mail：dlww98@163.com

* 通讯作者。男，教授，博士生导师。主要从事微生物资源与生物催化方面研究。E-mail：xianzhen@dlpu.edu.cn

收稿日期：2017-09-31

万方数据

郁和酒花香味突出等特点[1],因此,精酿啤酒受到越来越多消费者的青睐,正在成为中国啤酒行业新的经济增长点。目前,精酿啤酒生产所使用的酵母多为工业用啤酒酵母,单一使用这种啤酒酵母发酵往往会造成产品风味单调、口味平淡[2],因此,人们试图合并使用能增加啤酒风味的非酿酒酵母和具有高发酵效率的酿酒酵母以生产精酿啤酒,既能增加精酿啤酒中酯香物质的含量,同时又保证了精酿啤酒较高的发酵效率[3-4]。产香酵母是能够代谢产生香气成分的一类酵母的总称,如汉逊酵母(*Hanseniaspora*)、克勒克酵母(*Klaeckera*)、假丝酵母(*Candida*)和毕赤酵母(*Pichia*)等[5]。这些酵母在发酵过程中产生一定量的酯类、高级醇和低级脂肪酸,能够赋予啤酒浓郁的醇、酯香味[6]。因此,生香酵母的开发应用对于精酿啤酒产业的发展具有重要意义,但目前已发现的生香酵母大多由固态酒及调味品酿造中分离而来[7-8],尚未有来源于啤酒酿造中的报道。最近,我们从具有风味优良的精酿啤酒中分离纯化得到1 株产香酵母,当与啤酒酵母共发酵时能够提高挥发性风味物质含量,并降低高级醇浓度,是一株适用于精酿啤酒酿造的产香酵母,本文主要研究了该生香酵母 LX15 菌的分离纯化及其对啤酒风味物质形成的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*菌种来源*　啤酒酵母 C1 菌作为参考菌株由雪花啤酒(大连)公司提供,精酿啤酒原液由金士百纯生啤酒公司提供;全麦汁(12 °P)由雪花啤酒(大连)公司提供;分离纯化菌与啤酒酵母 C1 菌均在 YM 培养基上于 28 C 培养。

1.1.2　*培养基(g/L)*　①酵母膏蛋白胨培养基(YM):蛋白胨 5,酵母浸粉 3,麦芽浸粉 3,琼脂 20,水 1 000 mL,pH 6.2;②玉米粉琼脂培养基:玉米浸粉 5,琼脂 20 ,蒸馏水 1 000 mL,pH 6.0;③史库兹培养基(SDM):麦芽浸膏 3,酵母浸膏 3,葡萄糖 10,蛋白胨 5,琼脂 15,亚硫酸品红混合物(碱性品红 4,无水亚硫酸钠 25,糊精 1)3.5,水 1 000 mL。

1.2　方法

1.2.1　*生香酵母菌分离纯化*　无菌条件下取 10 mL 精酿啤酒原液于灭菌的 10 mL 量筒中静置 10 min 后,取上层菌悬液 1 mL,经生理盐水梯度稀释,涂布于 SDM 培养基平板,28 ℃培养箱中培养过夜。随机挑取单菌落接种于 YM 琼脂平板上,28 ℃培养 2 d 后,在有明显香味散发的平板中选取具有不同菌落特征的菌株用于后续研究。为保证分离菌的纯度,采用平板划线法进一步纯化。

1.2.2　*形态与生理生化表征*　将分离获得的酵母菌接种于 YM 琼脂平板上,28 ℃培养 24 h 后观察菌落特征,并用相差显微镜(Leica,德国)和电子扫描显微镜(JEOL,日本)观察细胞形态[4]。子囊孢子采用 Mikata 等[9]描述的方法制备样品并用电子扫描显微镜观察。假菌丝检测采用 Dalmau 平板培养方法[10],在玉米粉培养基上 28 ℃培养 7 ~ 10 d 后,显微镜下观察菌丝形态。表型特征采用 Kurtzman 等[11]描述的标准方法进行。用于碳源同化和发酵实验的碳水化合物包括葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、半乳糖、乳糖、核糖、D-甘露糖醇、鼠李糖、山梨糖、阿拉伯糖、木糖等,用于氮源同化实验的含氮化合物包括硝酸钾、盐酸乙胺、盐酸尸胺和 L-赖氨酸。脲酶实验、硝酸盐还原实验等按照 Chen 等[12]描述的方法进行。

1.2.3　*系统发育分析*　26S rRNA 基因扩增测序由 TaKaRa 生物公司(大连)进行,为了避免序列错读,PCR 基因片段至少进行两次测序。根据 26S rRNA 基因序列系统发育分析采用先前描述的方法进行[12]。

1.2.4　*啤酒制备工艺*　将斜面活化后的酵母 LX15 和 C1 菌分别接种于全麦汁中,28 ℃摇床培养 24 h,按 5% 接种量接入装有 50 mL 全麦汁的三角瓶中,20 ℃、150 r/min 摇床培养 36 h 后,转入 300 mL 新鲜全麦汁中,16 ℃、100 r/min 摇床培养 72 h,15 ℃、6 000 r/min 下离心 10 min,收集酵母泥。将两种菌的酵母泥按不同比例混合、并按总接种量 0.5% 接种至含有 300 mL 全麦汁的 500 mL 三角瓶中,塞上含有 10% 硫酸的发酵栓,12 ℃静置发酵 7 d 后,6 ℃继续静置培养 7 d。发酵结束后分别测定 CO_2 累积质量损失和风味物质成分。空白对照为单独添加啤酒酵母 C1 菌进行啤酒发酵后形成的产品。

1.2.5　*分析方法*　①CO_2 失重测定:发酵过程中每隔 12 h 轻摇三角瓶以去除发酵液中的 CO_2 后

万方数据

称重一次，当质量损失 <0.1 g 时，表示发酵基本结束。发酵开始前与发酵过程中发酵体系的重量差值为 CO_2 失重值；②挥发性风味化合物分析：将未除气样品于顶空进样瓶中与 0.3% 的 NaCl 溶液混合，采用气相色谱法检测[13]。气相色谱条件：DB-FFAP(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)色谱柱，氢火焰检测器，载气为高纯氮气(10 mL/min)、氢气(30 mL/min)、空气(300 mL/min)，进样分流比 2∶1，样品平衡温度 80 ℃，样品平衡时间 30 min，进样口/检测器温度 250 ℃，升温程序：初始温度 50 ℃ /2 min，以 5 ℃ /min 升至 190 ℃，190 ℃ /1 min，以 10 ℃ /min 升至 230 ℃，230 ℃ /10 min；③乙醇浓度采用气相色谱法检测[14]；④麦汁和啤酒浓度(°P)采用恒温比重瓶法测定[15]，其中，表观发酵度(%) = ((麦汁浓度 啤酒浓度) /麦汁浓度) ×100%；⑤啤酒感官评价依据《ASBC 分析方法》中感官分析方法对啤酒进行评分[14]。

2 结果与分析

2.1 产香酵母菌的分离纯化

在 SDM 培养基上随机挑取 60 个单菌落接种于 YM 琼脂平板上，28 ℃培养 2 d 后，根据平板中的挥发性香气产生和菌落特征，选取 5 株菌落特征各异且酯香浓郁的酵母菌株，分别标记为 LX02、LX04、LX15、LX37 和 LX48，其表型特征如表 1 所示。

将上述 5 株产香酵母分别与啤酒酵母 C1 菌按 1∶19 的比例接种于 12 °P 全麦汁中，12 ℃发酵 7 d 并在 6 ℃继续发酵 7 d，检测啤酒发酵液中风味化合物的含量，以考察 5 株产香酵母对啤酒风味的影响，结果见表 2。

表 1 产香酵母菌株的菌落特征和挥发性香味产生

Table 1 Colony morphology and produced volatile-flavor of 5 strains

菌株编号	形态特征						
	颜色	边缘	质地	表面	厚度	透明度	气味
LX02	乳白	整齐	光滑湿润	微凸	薄	较好	酯香浓郁
LX04	乳白	整齐	光滑湿润	微凸	薄	较好	酯香浓郁
LX15	乳白	整齐	光滑湿润	凸起	厚	较好	酯香浓郁
LX37	灰白	不整齐	干燥粗糙	凸起	厚	一般	酯香浓郁
LX48	灰白	不整齐	干燥粗糙	凸起	厚	一般	酯香浓郁

表 2 产香酵母对啤酒风味形成的影响

Table 2 Influence of aroma-producing yeast on volatile flavors in beer

风味物质	风味化合物的增加量/%				
	LX02	LX04	LX15	LX37	LX48
甲酸乙酯	-40.90	-24.01	-28.04	-35.01	-22.91
乙酸乙酯	35.33	25.12	27.85	15.56	25.30
乙酸异戊酯	10.56	-0.02	18.82	12.18	20.45
己酸乙酯	-8.04	-17.25	17.42	0.60	25.38
辛酸乙酯	-12.05	-15.52	29.49	-16.44	9.91
正丙醇	-0.82	-3.39	-2.31	-0.72	4.45
异丁醇	9.83	3.90	5.26	7.89	8.67
异戊醇	7.07	3.90	3.10	8.34	6.34
总酯	25.02	16.19	24.65	12.07	22.11
总醇	6.99	2.19	2.96	7.43	6.29

高级醇和酯是啤酒中含量最多的两类风味化合物，其生成水平的变化直接影响啤酒的风味特征[16]。当与啤酒酵母 C1 菌共同发酵时，5 株产香酵母分别将总酯和总高级醇含量提高了 16.19% ~25.02% 和 2.19% ~7.43%。一般认为，对啤酒风味影响较大的风味化合物主要包括乙酸乙酯、乙酸异戊酯、异丁醇和异戊醇，它们是构成啤酒香味的主要成分[17]，产香酵母 LX02、LX15、LX37 和 LX48 对这四种风味物质均有显著增加。但是，过量的酯类和高级醇也会赋予啤酒不舒适的苦味和果味等，并引起“上头”等症状[18]。为了获得适于精酿啤酒生产的产香酵母，本本家进一步对产香酵母与 C1 菌共发酵的啤酒进行感官品价，结果见表 3。产香酵母 LX15 菌对

万方数据

啤酒风味影响的感官评分最高,且酯香浓郁、口味协调,因此,选择 LX15 菌为精酿啤酒酿造的产香酵母,并用于后续研究。

表 3　产香酵母与啤酒酵母 C1 菌共发酵酿造啤酒的感官评价

Table 3　Sensory evaluation of beer produced by aroma-producing yeast together with *Saccharomyces cerevisiae* C1

菌株	乙醇(体积分数,%)	感官评分	香味描述
LX02	5.3	72	异香,高级醇味
LX04	5.0	70	酯香淡,双乙酰味
LX15	5.2	85	酯香浓,郁风味协调
LX37	5.0	65	酯香淡
LX48	5.5	76	酯香浓,高级醇味
C1	5.2	75	酯香淡

2.2　产香酵母 LX15 菌的分类鉴定

在 YM 培养基上生长时,LX15 菌的菌落特征为奶油色、质地均匀、光滑有光泽、表面凸起、边缘整齐,细胞形态为圆形或卵圆形((1.9 ~ 3.8) μm × (2.0 ~ 5.7) μm)、无鞭毛、以单个或成对细胞排列、多极芽殖。在玉米粉培养基上培养 7 ~ 10 d 后没有发现有假菌丝形成;在 YM 琼脂培养基上培养 3 d 后,能够观察到孢子形成,可以由营养细胞直接转化为子囊,每个子囊细胞中含有 1 ~ 4 个帽型子囊孢子((1.0 ~ 1.5) μm × (1.5 ~ 2.2) μm)。

LX15 菌的生理生化特征如表 4 所示。通过碳源发酵和同化实验发现,LX15 菌能发酵葡萄糖和蔗糖,不能发酵乳糖,麦芽糖和半乳糖发酵延缓;能够同化葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、蔗糖、核糖、乙醇和 D-甘露糖醇,但不能同化山梨糖、乳糖、鼠李糖和蜜二糖。LX15 菌能够同化的氮源包括硝酸盐、盐酸乙胺、盐酸尸胺和 L-赖氨酸。LX15 菌能够在 37 ℃条件下良好生长,但不能在 0.01% 放线菌酮存在时生长,能够耐 10% 的 NaCl 抗性,脲酶实验为阴性。LX15 菌产生的主要风味化合物包括乙酸乙酯、乙酸异戊酯、己酸乙酯和辛酸乙酯。

表 4　分离菌 LX15 与 *Pichia myanmarensis* M21^T 的生理生化性质比较

Table 4　Difference in properties between the isolate LX15 and *Pichia myanmarensis* M21^T

特征	LX15	*P. myanmarenisis*	特征	LX15	*P. myanmarenisis*
糖发酵			碳源同化		
葡萄糖	+	+	葡萄糖	+	-
蔗糖	+	+	麦芽糖	+	+
麦芽糖	L	L	蔗糖	+	+
乳糖	-	-	甘露醇	+	+
半乳糖	L	L	半乳糖	+	+
硝酸盐同化	+	+	乙醇	W	S
尿素水解	-	-	山梨糖	-	-
生长温度/℃			乳糖	-	-
37	+	+	木糖	S	S
40	+	W	阿拉伯糖	W	W
			核糖	+	+
			鼠李糖	-	-

注:+:阳性;-:阴性;L:滞后;W:弱;S:缓慢

通过对 LX15 菌的 26S rRNA 基因进行测序,获得 552 bp 长度的基因序列,经与 GenBank/EMBL 数据库中的已知序列比对后发现,LX15 菌的 26S rRNA 序列与 *P. myanmaensis* 具有最高的同源性(99.8%)。由系统发育分析(图 1)发现,LX15 菌与 *P. myanmarensis* 落在同一个进化分支中。因此,综合考虑系统发育分析结果与 LX15 菌的表型特征,可以确认所分离纯化的产香酵母 LX15 菌属于 *P. myanmarensis* 中的一个菌株[19]。虽然 *P. myanmarensis* 菌的表型株 M21^T 不具有酒花抗性,而 LX15 菌能够在啤酒中旺盛生长,但目前还无法确定其为 *P. myanmarensis* 菌中的一个亚种,因为还需要更详细的证据以证实 LX15 菌与 M21^T 的分类学差异性[19]。

万方数据

2.3 生香酵母 LX15 菌对啤酒发酵及其风味的影响

为了考察 LX15 菌对啤酒风味化合物形成的影响，将 LX15 菌与啤酒酵母 C1 菌分别按 1∶4、1∶19、1∶99 1∶199 和 1∶999 比例接种于 12 °P 全麦汁中，12 ℃发酵 7 d 后，6 ℃继续发酵 7 d，然后检测啤酒发酵液中的风味化合物含量，结果如表 5 所示。与啤酒酵母 C1 菌单独发酵的啤酒相比，LX15 菌的加入显著影响啤酒风味物质的产生，总酯和总高级醇的增加幅度与 LX15 菌的接种比例成正相关。这与在固态酒发酵中引入生香酵母并延长发酵周期能提高总酯含量是一致的[20]，当 LX15 菌与啤酒酵母 C1 菌共培养时，除了甲酸乙酯外，所有被测定挥发性风味化合物都有较大程度的增加，其中辛酸乙酯在 LX15 菌与 C1 菌接种比例为 1∶4 时增幅最大，比单独培养 C1 菌时提高了 45.5%。与酱油发酵过程中添加鲁氏酵母显著提高多元醇不同[8]，当 LX15 菌的接种比例降为 1∶199 时，总高级醇含量反而会比单独接种 C1 菌时低，而将产香酵母和酿酒酵母共发酵生产液体白酒时也发现高级醇的含量降低[21]。虽然目前还不清楚导致这种结果的真正原因是什么，但这种现象说明生香酵母因为降低啤酒中的杂醇油（主体成分为高级醇）含量而提高了改变啤酒风味特性的能力[22]。

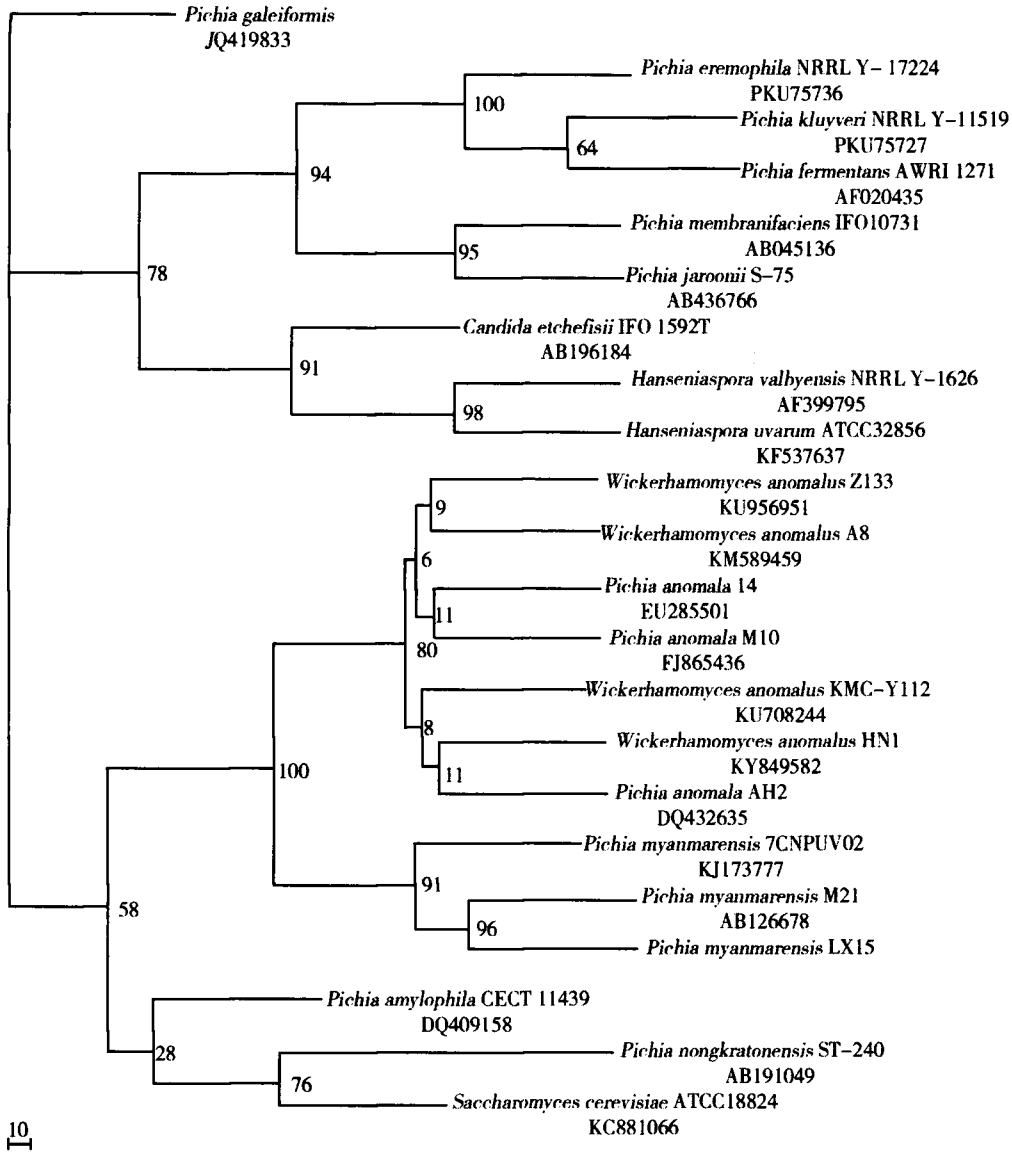


图 1 生香酵母 LX15 菌的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of strain LX15 based on 26S rDNA sequence

万方数据

表 5　生香酵母 LX15 菌与啤酒酵母 C1 菌共发酵对啤酒风味化合物形成的影响

Table 5　Influence of strain LX15 together with *Saccharomyces cerevisiae* C1 on flavors production in beer

风味物质增加量/%	产香酵母 LX15 : 啤酒酵母 C1				
	1 : 4	1 : 19	1 : 99	1 : 199	1 : 999
甲酸乙酯	-37.01	-28.04	-14.28	-4.08	0
乙酸乙酯	33.24	27.85	17.64	4.19	-4.22
乙酸异戊酯	6.31	18.82	15.38	13.76	15.36
己酸乙酯	39.24	17.42	3.87	31.19	34.16
辛酸乙酯	46.58	29.49	9.68	41.17	63.16
总酯	26.62	24.65	15.23	8.27	4.12
正丙醇	-9.81	-2.31	-2.34	-7.31	-5.16
异丁醇	6.06	5.26	1.05	-5.99	-0.33
异戊醇	5.08	3.10	1.22	-2.98	-1.41
总醇	4.20	2.96	0.81	-3.66	-1.15

当采用 CO_2 失重法测定产香酵母 LX15 菌对啤酒酵母 C1 菌发酵的影响时,发现 LX15 菌并没有明显影响啤酒酵母发酵速度(图 2),即使接入不同比例的生香酵母菌,啤酒酵母 C1 菌的整体发酵速度也没有明显变化。进一步对啤酒的发酵度和乙醇浓度研究发现(图 3),除了在 LX15 菌高接种比例(1 : 4)时啤酒发酵度和乙醇浓度被降低外,LX15 菌对啤酒酵母 C1 菌的发酵度和乙醇浓度没有明显影响,这与白酒生产中的生香酵母与酿酒酵母共发酵降低乙醇浓度的结果是相反的[21],推测是由于产香酵母比例过高不能利用麦汁中麦芽三糖,导致发酵度降低,从而使乙醇浓度降低所致。

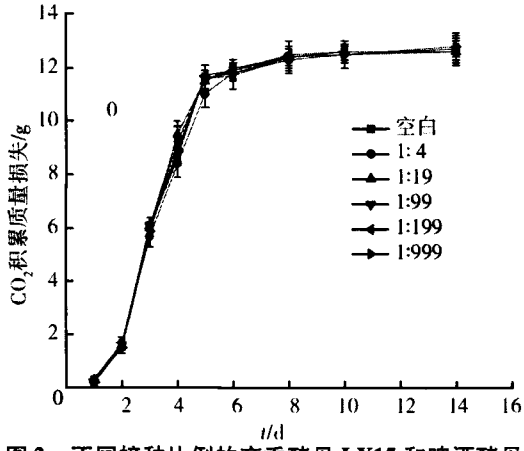


图 2　不同接种比例的产香酵母 LX15 和啤酒酵母 C1 的发酵曲线

Fig. 2　Fermentation curves with different inoculated radio of LX15 and C1

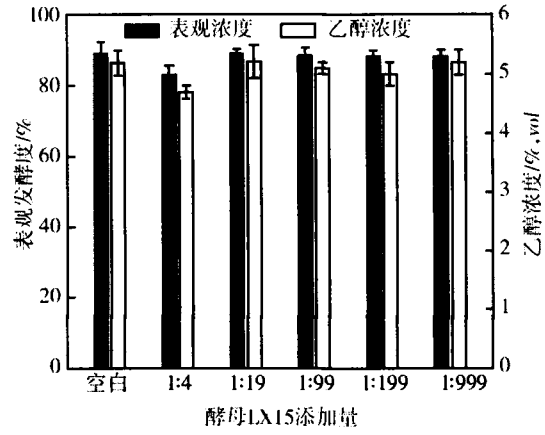


图 3　不同接种比例的产香酵母 LX15 与啤酒酵母 C1 的乙醇浓度和表观发酵度

Fig. 3　Ethanol content and apparent attenuation produced with different radio of LX15 and C1

3　讨　论

精酿啤酒作为一种快消产品,因其具有特殊多变的风味特征而受到市场的青睐。研究认为,啤酒风味化合物生成的重要来源是产香酵母,如汉逊酵母、克勒克酵母、假丝酵母和毕赤酵母等[5],它们在发酵过程中产生酯类、高级醇和低级脂肪酸,而赋予啤酒浓郁的醇、酯香味[6]。生香酵母已经在固态酒及调味品酿造中分离获得[7-8],并已广泛用于白酒、葡萄酒、调味品、香料及其他食品生产中[23],但目前尚未有来源于啤酒

万方数据

中生香酵母的报道。

本研究精酿啤酒原液中分离到一株产香酵母LX15菌，该菌与目前已发现的生香酵母不同[4,7-8,19]，能够在啤酒中旺盛生长而具有酒花抗性能力。LX15菌与*P. myanmarensis*具有完全相同的表型特征和生理生化性质[19]，结合分类学数据和系统发育分析，确认*LX*15菌为*P. myanmarensis*菌中的一个菌株。与白酒生产中的异常毕赤酵母与酿酒酵母共发酵会降低乙醇浓度不同[21]，当与啤酒酵母C1菌共发酵时，LX15菌能够产生协同作用以提高啤酒发酵液中的挥发性风味化合物的含量，但却不影响正常啤酒的发酵度和发酵能力，生香酵母LX15菌的分离不仅有利于满足精酿啤酒对个性化风味的需求，更有意义的是在于该菌具有啤酒花抗性而适合于啤酒酿造特殊生长环境的需要。

参考文献：

[1] Woolverton AE, Parcell JL. Can niche agriculturalists take notes from the craft beer industry? [J]. J Food Dis Res, 2008, 39(2): 50-65.

[2] 于同立，董小雷，周广田. 微型啤酒的酿造与酵母扩培技术[J]. 酿酒，2005，32(3)：97-99.

[3] Bader J, Mast-Gerlach E, Popovic MK, et al. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology[J]. J App Microbiol, 2010, 109: 371-387.

[4] Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking[J]. FEMS Yeast Res, 2010, 10(2): 123-133.

[5] Marisa M, Lucilla L, Marco V, et al. Craft beer microflora identification before and after a cleaning process[J]. J Int Brew, 2011, 117(3): 343-351.

[6] Estela-Escalante W, Rosales-Mendoza S, Moscosa-Santillan M, et al. Evaluation of the fermentative potential of Candida zemplinina yeasts for craft beer fermentation[J]. J Int Brew, 2016, 122: 530-535.

[7] 唐洁，王海燕，徐岩. 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵对白酒液态发酵效率和风味物质影响[J]. 微生物学通报，2012，39(7)：921-930.

[8] 赵丽云. 天然酱醪中生香酵母的分离鉴定及香气特征分析[J]. 食品与机械，2012，28(4)：11-14.

[9] Mikata K, Nakase T. Surface structure of ascospores of genus Nadsonia sydow[J]. Microbiol Cul Coll, 1997, 13: 97-102.

[10] Beech FW, Davenport RR, Goswell RW, et al. Two simplified schemes for identifying yeast cultures. In: Barnett JK (ed) Identification of yeast cultures[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1972: 151-175.

[11] Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, et al. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman C P, Fell J W, Boekhout T (eds), The yeasts, a taxonomic study[M]. 5th ed, vol. 1. Amsterdam, Elsevier, 2011: 87-111.

[12] Chen X, Wang M, Yang F, et al. Isolation and characterization of xanthan-degrading *Enterobacter* sp. nov. LB37 for reducing the viscosity of xanthan in petroleum industry[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30: 1549-1557.

[13] Li H, Li H, Liu X, et al. Analysis of volatile flavor compounds in top fermented wheat beer by headspace sampling-gas chromatography[J]. Inti Ji Agrii Bioli Engineeri, 2012, 5(2): 67-75.

[14] 美国酿造家协会. ASBC分析方法[M]. 北京：中国轻工业出版社，2012：220-226.

[15] Lei H, Zhao H, Yu Z, et al. Effect of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles[J]. App Biochem Biotechnol, 2012, 166: 1562-1572.

[16] Muro M, Izumi K, Imai T, et al. Yeast cell cycle during fermentation and beer quality[J]. Am Soc Brew Chem, 2006, 64(3): 151-154.

[17] 秦耀宗. 啤酒工艺学[M]. 北京：中国轻工业出版社，2008：276-292.

[18] Kunze W. 啤酒工艺实用技术(第8版)[M]. 北京：中国轻工业出版社，2008：306-310.

[19] Nagatsuka Y, Kawasaki H, Seki T. *Pichia myanmarensis* sp. nov., a novel cation-tolerant yeast isolated from palm sugar in Myanmar[J]. Int J Sys Evol Microbiol, 2005, 55: 1379-1382.

[20] 艾金忠，马美荣，聂建光，等. 高酯化酶活性红曲霉及生香酵母在二锅头白酒生产中的应用[J]. 酿酒，2013，40(4)：33-34.

[21] 唐洁，王海燕，徐岩. 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵对白酒液态发酵效率和风味物质影响[J]. 微生物学通报，2012，39(7)：921-930.

[22] 陈良强，吴群，徐岩. 酱香型白酒低产杂醇油栗酒裂殖酵母特性的研究[J]. 工业微生物，2013，43(3)：1-6.

[23] 冯翠娥，刘雅琴，王志恒，等. 生香酵母的应用与展望[J]. 绿色科技，2016，18：190-191.

万方数据