

新疆地方特色饅面团优良酵母菌的筛选

玛依古丽·库尔班,米尔班古丽·阿卜杜如苏力,麦合甫再木·阿不都热合曼,艾尔肯·热合曼*

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要 [目的] 筛选饅面团优质酵母菌。[方法] 从新疆乌鲁木齐、阿尔泰、喀什 3 个样品点采集样品,采用 PDA 和 YEPD 培养基分离纯化了饅面团发酵酵母菌,并进行了 26S rDNA D1/D2 区域序列测定和系统发育分析。[结果] 试验得出,29 株菌相互之间的 26S rDNA D1/D2 基因序列同源性比例为 99%。在这 29 株菌 26S rDNA D1/D2 区序列的基础上采用邻近法构建了系统发育进化树,从中选出了 11 株代表菌,它们被认为是该地区特殊而独特的酵母品系,完成了初筛。进一步测定 11 株菌的发酵活力、发酵前后的 pH 与面团醒发时间,完成了复筛并获得了 6 株菌。接着对 6 株酵母菌进行了感官测试,最后获得了一株优质酵母菌 K24(KM454437),饅感官评分为 97.1 分。[结论] 研究筛选出来的一株饅面团酵母菌发酵效率高,为新疆饅加工产业提供技术依据。
关键词 饅面团;酵母菌;26S rDNA D1/D2 区域;筛选
中图分类号 S509.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)17-302-04

Selection of Excellent Yeast for Nang Dough in Xinjiang
Marygul Kurban, Mihribangul Abdurusul, Mehfuzem Abdurahman, Erkin Rahman* (School of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)
Abstract [Objective] To select excellent yeast for Nang dough. [Method] Collecting samples from Urumqi, Altai, Kashi in Xinjiang, the fermentation yeast for Nang dough was separated and purified with PDA and YEPD culture medium, 26S rDNA D1/D2 regional sequence determination and phylogenetic analysis was conducted. [Result] The experiment showed that, the 29 isolates' 26S rDNA D1/D2 sequence homology was 99% each other. The phylogenetic evolution tree was constructed on the basis of 26S rDNA D1/D2 sequence and the 11 strains which were chosen by primary screening to consider as region's special yeast strains. For further study the fermentation activity, pH and awaking time of the 11 strains were detected and the secondary screening was completed. By the sensory test finally got a high-quality yeast strain K24 (KM454437). The Nang dough fermentation yeast obtained in this study has a high quality of fermentation. [Conclusion] The obtained yeast has high fermentation efficiency, which will provide technical basis for processing industry of Xinjiang Nang.
Key words Nang dough; Yeast; 26S rDNA D1/D2 region; Selection

新疆独特的地理与气候环境^[1]决定了以饅为中心的独特的饮食文化。饅是以小麦面、玉米面或高粱面为原料,加少许盐水和酵面烤制而成的一种面饼,是维吾尔族的传统主食之一^[2]。近年来随着我国经济的发展,人民生活水平的不断提高和生活节奏的加快,城镇居民对饅商品的需求量急剧增加,同时对饅的质量也提出了更高的要求,饅的工业化生产已成为现代社会的需求。在饅的制造过程中,饅面团发酵是一个很重要的环节,饅面团发酵最关键的是酵母菌,它与成品的质量有着密切的关系。当前制饅中饅面团发酵大都采用自然发酵或者直接采用外购普通的酵母粉,而熟知制饅工艺或者喜爱饅的人都明白酵母对于饅的口感和风味都具有重要的作用。很多新疆人都非常爱吃用传统的饅面团发酵的饅。饅面团又称老酵、酵头、老肥、面种、面头^[3],发酵是我国的传统面团发酵方法,在新疆广大城乡居民家庭中至今仍被广泛应用。这种方法成本低廉,简便易行,并且可使饅保持原汁原味。但是饅面团中大量杂菌的存在,不但具有传播病原的风险,还会导致面团发酵过酸,需要添加苏打进行中和酸味。目前常见的各种厂家生产的商品酵母粉产品虽然驰名国内外,但尚未见到能被新疆原居民广泛采用和在口

感上认可的饅面团发酵酵母粉;这主要可能是饅发酵酵母是该地区保存的特殊酵母品系,它们与酵母粉制品中的酵母是不同的酵母品种或品系,因而产生的代谢产物有差异;酵母粉发酵饅饼面团导致饅饼口感变味,降低了饅饼应有的食用价值和观赏性。在我国目前对酵母菌资源的开发利用中,李自红从民间采集的馒头老酵头中分离酵母菌 25 株,筛选出制作馒头的优良酵母菌被鉴定为酿酒酵母^[4]。李宝坤等从自然发酵的 5 种哈密瓜汁中分离得到 25 株酵母菌并从中筛选得到 1 株产酒精能力高的酿酒酵母^[5]。但目前为止,国内外研究中还没发现与新疆饅面团优质酵母筛选有关的研究。采用现代微生物技术,从新疆传统的饅面团中筛选出优良的发 酵 酵 母 菌,确 保 饅 制 品 的 原 有 风 味,为 提 高 饅 加 工 品 质 提 供 技 术 依 据,是 实 现 饅 工 业 化 烤 制 进 程 的 必 要 途 径,也 是 一 个 新 产 业 发 展 的 增 长 点,具 有 极 大 的 社 会 经 济 价 值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酵母菌株。2014 年 3 月份从南北疆的 3 个地点采集样品,采样位点分别是:乌鲁木齐、阿尔泰、喀什。将饅面团样品放入灭菌的容器里,置于 4℃ 冰箱内保存备用。

1.1.2 主要仪器。量筒(1 000 ml);和面机(2 kg);环保电子饅坑;PCR 扩增仪,Biometra;PHB-8 型笔式 pH 计,上海虹益仪器仪表有限公司;SW-CJ-IF 超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;HZQ-2 全温振荡器,金坛市医疗仪器厂;冷冻离心机,Thermo LEGEND MICRO 17R;凝胶成像分析仪 ALPHAIMAG-ERTM 2200,AlphaInnotech 公司;数控恒温水浴锅,宁波东胜仪器公司;DYY-III-3A 水平电泳槽,北京六一仪器厂。

基金项目 乌鲁木齐市科技创新种子资金项目(21061710);国家自然科学基金项目(U1203101);国家自然科学基金项目(31060002)。
作者简介 玛依古丽·库尔班(1988-),女,维吾尔族,新疆乌鲁木齐人,硕士研究生,研究方向:资源微生物。* 通讯作者,教授,博士,从事资源微生物研究。
收稿日期 2015-04-20

1.1.3 主要原料试剂。小麦粉、土豆,从市场购买;酵母浸粉、蛋白胨、琼脂粉,北京奥博星生物技术有限责任公司;氯化钠、硝酸钾、硝酸铵、尿素、可溶性淀粉,天津市福晨化学试剂厂;蔗糖、葡萄糖,天津市化学试剂三厂;均为国产分析纯。*Taq* 酶、 $10\times Taq$ Buffer、DNA 聚合酶,dNTP Mixture,北京天根生化科技有限公司;通用引物 NLI (5'-GCATATCAATA-AGCGGAGGAAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-GG-3')^[6]引物对,上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.4 培养基。马铃薯培养基(PDA):马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,链霉素 20 mg,琼脂粉 20 g,水 1 000 ml(pH 自然,121 ℃ 20 min)。YEPD 培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母浸粉 10 g,琼脂粉 20 g,水 1 000 ml(pH 自然,115 ℃,20 min)。

1.2 方法

1.2.1 试验方案。饅面团优质酵母菌筛选工艺流程见图 1。

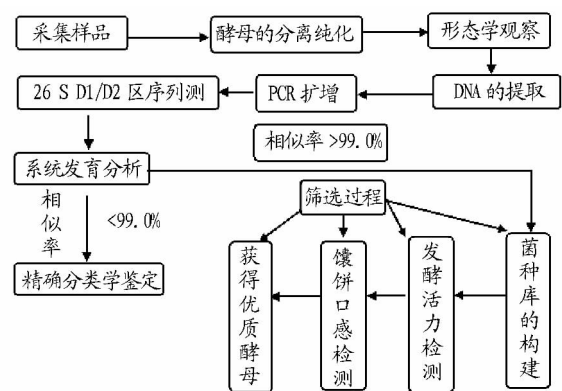


图 1 新疆地方特色饅面团优质酵母菌的筛选工艺流程

1.2.2 目标酵母菌的分离与纯化。采用梯度稀释涂布平板法进行分离,称取饅面团样品 10 g,溶解于 90 ml 含有玻璃珠的灭菌生理盐水中,振荡 30 min。分别取 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 共 5 个梯度浓度,每皿 100 μ l,涂布分离。28 ℃ 培养 48 ~ 120 h,挑取不同形态单菌落,编号,经多次划线纯化,获得纯培养物^[7]。

1.2.3 菌落形态细胞形态的观察。YEPD 固体培养基上 28 ℃ 培养 48 ~ 72 h,观察其菌落形态、边缘、大小、颜色、表面及质地、侧面、透明度等特征。酵母细胞形态观察采用碱性伊红美蓝染色法^[8]。将待测菌株置于 28 ℃,培养 2 d 后挑选单个菌落进行镜检并记录细胞的微观形态(大小、形状等)特征。

1.2.4 菌株基因组 DNA 的提取、PCR 扩增和序列测定。菌株 DNA 的提取采用 CTAB 法^[9-11]。用引物 NLI 和 NL4 扩增所分离菌株的 26S rDNA D1/D2 区域。PCR 扩增程序为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 10 min,最后于 4 ℃ 保存^[12-13]。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增的目标产物。所得产物委托给北京鼎国测序有限公司进行测定。

1.2.5 序列分析及系统发育树的构建。在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索(BLAST search),比较供试菌株与已知酵母菌之间的亲缘关系及 GenBank 核酸序列数据库得到菌株注册号。根据相关模式菌种的 D1/D2 区域序列,与供试

菌的序列一起,用 Clustal X 软件进行序列校准排齐,用 Mega 5.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining)方法,进行 1 000 次 Bootstrap 检验后构建系统发育树^[14-15]。

1.2.6 面团发酵力测定。称量 70 g 揉制好的面团迅速置于 500 ml 的量筒中。用木棒将其填充实于量筒底部并将面团顶部压平,记录初体积。读取体积时,将木棒伸入量筒内,使其低端轻触面团最高部位,并贴于量筒读数一侧以减小读数误差,并每隔 30 min 测体积增长量。记录第 1 小时的排水量(V_1)和第 4 小时的排水量(V_2)。用第 4 小时的排水量减去第 1 小时的排水量即为该酵母的发酵力^[16]。

$$F(\text{发酵力}) = V_2 - V_1$$

1.2.7 面团发酵前后的 pH 的测定。称取 10 g 发酵前的面团,把它放入 100 ml 蒸馏水内,用组织捣碎机把它匀浆,离心并过滤。用 pH 计对其上清液进行 pH 测定。称取 10 g 发酵后的面团,同样的方法测定发酵后的面团 pH。

1.2.8 面团醒发测定。成形后的饅饼在 28 ~ 29 ℃ 温度下静置,观察其醒发情况。一般以达到成品体积的 80% ~ 90% 为准。

1.2.9 感官测试。

1.2.9.1 和面。面粉 800 g,酵母菌 4 g,加碘精制盐 10 g,消毒纯牛奶 100 g,水 250 ml(30 ℃)。将这些材料加入到真空和面机中,定速充分搅拌 20 min。避免和面过程中人为因素造成差异。

1.2.9.2 面团发酵。将和好的面团置于醒发箱中,在 28 ~ 29 ℃ 下进行发酵。避免发酵过程中人为因素造成误差。

1.2.9.3 饅制作按照常见的方式制作。按照成品的重量要求,将面团短时间内分块和称重,搓面和静置手工搓圆要诀是掌心向下,五指握住面团,在面案上顺一方向旋转并向下轻压,将面团搓成圆球形。在 27 ~ 29 ℃ 进行静置亦称醒发。

1.2.9.4 饅饼的烤制。将发酵好的饅面团分割成适量大小,贴入温度为 150 ℃ 的环保电饅坑下进行打饅,烘烤。避免烤制过程中人为因素造成差异。

2 结果与分析

2.1 酵母菌的分离 分别从乌鲁木齐、阿尔泰、喀什 3 个地区采集了传统饅面团样品,分离了 35 株面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

2.2 系统发育进化分析 26S rDNA 的 D1/D2 区序列的基础上,将 35 株面包酵母菌测序结果与 GenBank 数据库中已知菌的 26S rDNA D1/D2 区序列进行同源性比对,针对性地选择了 29 株相互之间序列相似性为 99% 的面包酵母。用邻近法(Neighbor-joining)对 29 株面包酵母进行构建系统发育进化树,自展数(bootstrap)为 1 000^[14-15],得到的系统发育进化树如图 2 所显示。

2.3 初筛 根据 29 株面包酵母菌系统发育进化树上所显示的进化距离的不同获得了 11 个独立的大分支(图 2),并且从每个分支中选出了代表性的一株菌,将它作为此来源饅面团品种的代表。详细结果见表 1。

以下是此试验首次筛选的 11 株酵母菌在基因库的注册

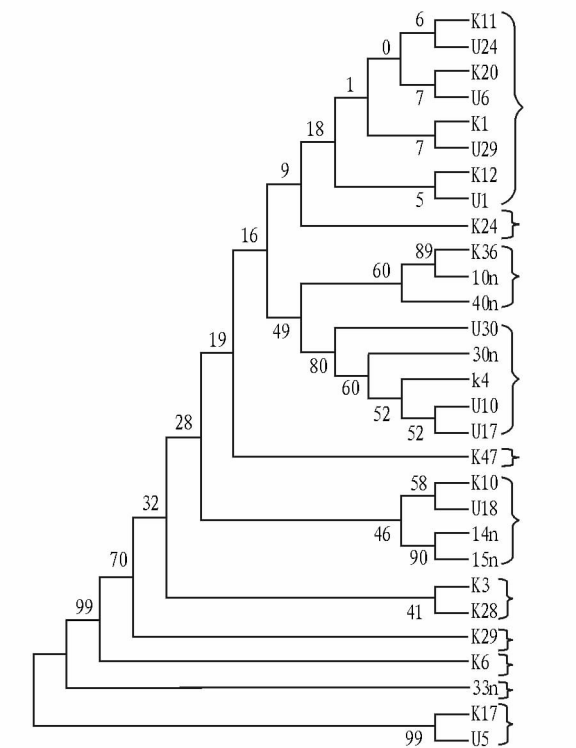
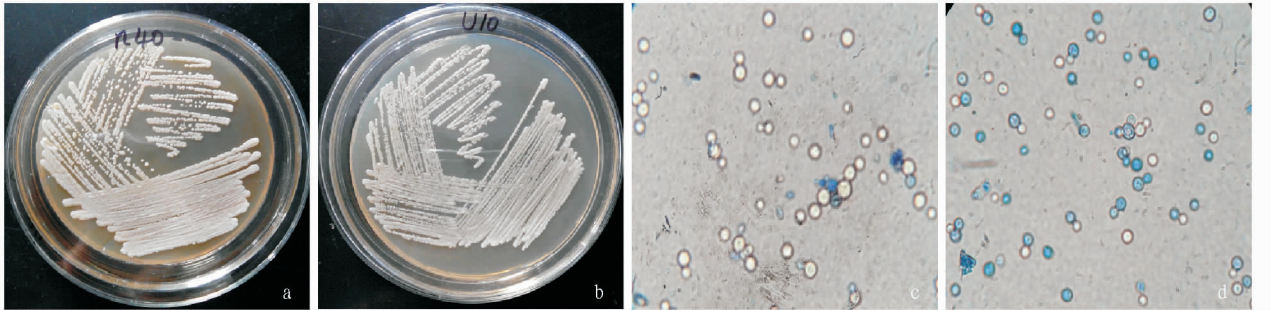


图2 相似性99%的酿酒酵母的26S rDNA D₁/D₂区序列的系统发育分析

号: K1 (KM401544), K24 (KP120534), 40n (KP965903), U10 (KP120525), K47 (KM454443), U18 (KP122529), K28 (KM454439), K29 (KP120537), K6 (KM454427), 33n (KP965907), U5 (KP120522)。

表 1 11 株代表面包酵母的筛选			
分支名称	每个分支包含的菌株编号	代表菌株	序列长度//bp
1	K11, U24, K20, U6, K1, U29, K12, U1	K1	581
2	K24	K24	589
3	K36, 10n, 40n	40n	513
4	U30, K4, U10, U17, 30n	U10	591
5	K47	K47	591
6	K10, U18, 14n, 15n	U18	584
7	K3, K28	K28	580
8	K29	K29	533
9	K6	K6	562
10	33n	33n	479
11	K17, U5	U5	593

2.4 母菌落形态与细胞形态观察 首次筛选的 11 株面包酵母在 YEPD 培养基上 28 ℃ 下培养后其菌落形态基本上相似,颜色均为乳白色,菌落形态为圆形,边缘整齐,光滑,湿润,中部为微凸。细胞形态均为圆形,生殖方式为出芽生殖。部分菌株的菌落形态及细胞显微形态如图 3 所示,图中的无色为活细胞(图 3c),蓝色为死细胞(图 3d)。



注:a. *Saccharomyces cerevisiae* n40(同 40n) 菌落形态;b. *Saccharomyces cerevisiae* U10 菌落形态;c. *Saccharomyces cerevisiae* K28 显微形态;d. *Saccharomyces cerevisiae* U10 细胞显微形态。

图3 部分供试菌株的菌落形态及细胞显微形态

2.5 复筛

2.5.1 面团体积法测定酵母发酵力。采用体积法对 11 株面包酵母菌株进行发酵性能检测。产二氧化碳能力和发酵力成正比,产二氧化碳的能力越高说明该菌株发酵能力越高。从图 4 中可知,菌株 K24、40n、U10、K47、K28、33n 使面团膨发体积相当大,在饅头团中的产气能力高。该试验中获得了发酵力高的 6 株面包酵母。

2.5.2 面团的 pH。表 2 显示的是 11 株菌面团发酵前后的 pH,从以上结果可知它们在面团发酵前后的 pH 范围为 5.20 ~5.78,不会导致饅头团过酸过碱等现象,pH 不会影响饅头的口味。

2.5.3 醒发测定。图 5 显示 11 株酵母菌在面团醒发时间为 17 ~28 min。其中 K24、K47、33n、K28、40n 和 U18 醒发时间较短,非常适合于快速醒发,能够提高饅头生产速率。

2.6 最终筛选

2.6.1 不同酵母对饅头团感官质量的影响。根据上述 2 次筛选,试验获得了发酵速度快、pH 适当、醒发时间短的 5 株菌(K24、K47、33n、K28、40n)。在环保的饅头坑里,175 ℃ 下进

图4 不同酵母的发酵力

表 2 11 菌株在发酵面团前后的 pH

菌株编号	发酵前面团的 pH	发酵后面团的 pH
K1	5.33	5.24
K24	5.22	5.35
40n	5.39	5.65
U10	5.21	5.53
K47	5.33	5.47
U18	5.33	5.38
K28	5.20	5.68
K29	5.49	5.70
K6	5.57	5.75
33n	5.24	5.36
U5	5.72	5.78

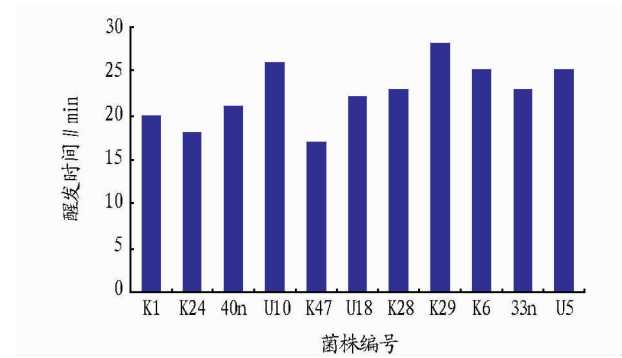


图 5 不同菌株醒发时间

行打饅,并由 5 位评审员对饅进行感官测试。按照表 3 的饅感官质量评分尺度来进行打分。不同面包酵母发酵的饅感官评分结果见表 4。从表 4 中可看出,5 株面包酵母样品发酵的饅,感官评价总分平均值由高到低依次为 K24、K47、K28、40n、33n。其中 K24 的分数最高,因此该研究中 K24 确定为饅面团发酵的优质菌。

表 3 饅感官质量评分标准

项目	满分	等级	质量特征描述	得分
形态	20	1 级	边缘完整,无黑斑或焦斑,形状应与品种造型相符	20~15
		2 级	边缘基本上完整,有少量黑斑,形状与饅的造型基本上一样	15~10
		3 级	边缘不整齐,有大量黑斑,形状与饅的造型不一	10~5
表皮色泽	20	1 级	色泽均匀,表皮光滑,没有起皱	20~15
		2 级	淡黄色,表皮不太光滑,有点起皱	15~10
		3 级	白色,表皮粗糙,表面大量起皱,表皮暗淡	10~5
组织	25	1 级	细腻,香脆,气孔均匀,不发软,不粘手,不粘牙,内部组织均匀	25~20
		2 级	不够细腻,弹性较大	20~10
		3 级	有较大的弹性,粘牙	10~5
滋味与口感	25	1 级	具有酵母特殊气味,无腐败,无异臭,香甜,无酸味,爽口	25~15
		2 级	香甜的味道带着面团味	15~5
		3 级	有酸味,强烈的面团味,烧焦味	5~1
杂质	10	1 级	无肉眼可见的异物	10~5
		2 级	少量的斑点	5~3
		3 级	带着大量的黑斑点	3~1

表 4 不同面包酵母发酵的饅感官评价结果

不同酵母	形态	表面色泽	组织	滋味与口感	杂质	总分
K24	19.8	19.0	23.5	24.8	10.0	97.1
40n	19.6	19.9	20.5	19.5	9.1	88.6
K47	18.0	18.1	21.5	23.5	9.5	90.6
K28	17.6	19.0	22.3	20.8	9.5	90.2
33n	18.3	17.6	21.5	19.9	10.0	87.3

注:酵母添加量 0.8%。

3 结论

该研究首次从新疆饅面团中筛选了优质的发酵酵母菌。根据系统发育进化树上的进化距离,选择了 11 株面包酵母菌。系统发育进化树上的每个大分支能够代表常见面包酵母的突变株。该试验使用体积法对面团发酵力进行检测。此法所需的设备简单、直观且可同时测定多个样品,然而家庭、作坊及工业化生产制作馒头、饅或面包时多凭经验判断,其经验的主要指标便是面团体积的变化。因此,面团体积法测定酵母发酵力的研究显得十分必要。该试验检测了面团发酵前后的 pH。若饅面团对碱不足,打出来的饅会有较浓的酸味,对碱过量,饅表面发黄易开裂,风味也不好^[17]。因此饅面团发酵中一定要控制 pH 不低于 5。该试验中面团培养范围都在 26~29℃,因为在这个温度上酵母的产气能力大,发酵力强,产气量比较均匀,面团的持气能力比较大。当温度超过 30℃时,酵母的量,产气的速度过快,不利于面团的持气和充分膨胀,也容易引起面团中其他杂菌的繁殖而影响面包的质量。

参考文献

[1] 王连方,王生玲,张玲.新疆地理环境与地方性甲状腺肿关系剖析[J].环境科学学报,2003,23(5):669-673.

[2] 何家兴,张全生.释“饅”[J].新疆大学学报,2011,39(5):15-19.

[3] 丁长河,戚光册,侯丽芬,等.传统老酵头馒头的质量特性[J].中国粮油学报,2007,22(3):18-19.

[4] 李自红.传统发酵剂微生物的筛选、鉴定及对馒头品质的影响[D].郑州:河南工业大学,2011:28-29.

[5] 李宝坤,毛晓英,陈俊,等.自然发酵哈密果汁中酵母分离与鉴定[J].酿酒,2009(1):41-43.

[6] KURTIZMAN C P,ROBNELL C J. Identification and phylogeny of Ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek,1998,73(4):331-371.

[7] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].4 版.北京:高等教育出版社,2007:14-35.

[8] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].3 版.北京:高等教育出版社,1999:42-44.

[9] NISIOTOU A A, SPIROPOULOS A S, NYCHAS G J. Yeast community structures and dynamics in healthy and botrytis-affected grape must fermentations [J]. Applied and Environmental Micribiology,2007,73(21):6705-6713.

[10] 张颖慧,魏东盛,邢来君,等.一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J].微生物学通报,2008,35(3):466-469.

[11] 昂莎莎,茱荣,卢伟.白腐真菌总 DNA 提取方法的研究[J].生物学杂志,2009,26(4):82-85.

[12] WANG C X,LIU Y L. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang,China [J]. Food Microbiology,2013,33(2):172-177.

[13] 祝春梅,姚新奎,孟军,等.新疆自然发酵酸马奶中酵母菌的分离鉴定[J].食品与发酵工业,2013,39(4):42-47.

[14] 周新丽,李治滢,杨丽源.云南程海湖酵母菌多样性及应用[J].微生物学报,2011,51(4):547-553.

(下转第 309 页)

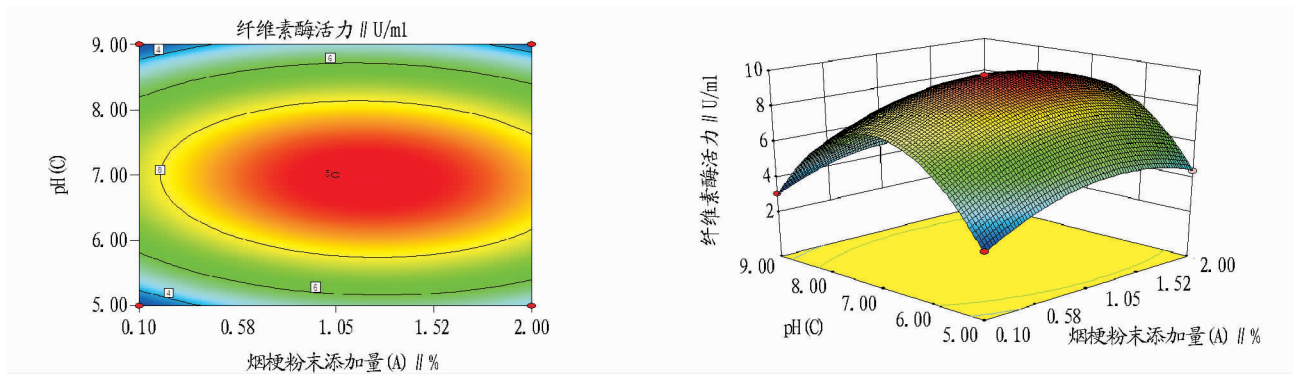


图 6 烟梗粉末与 pH 的交互作用

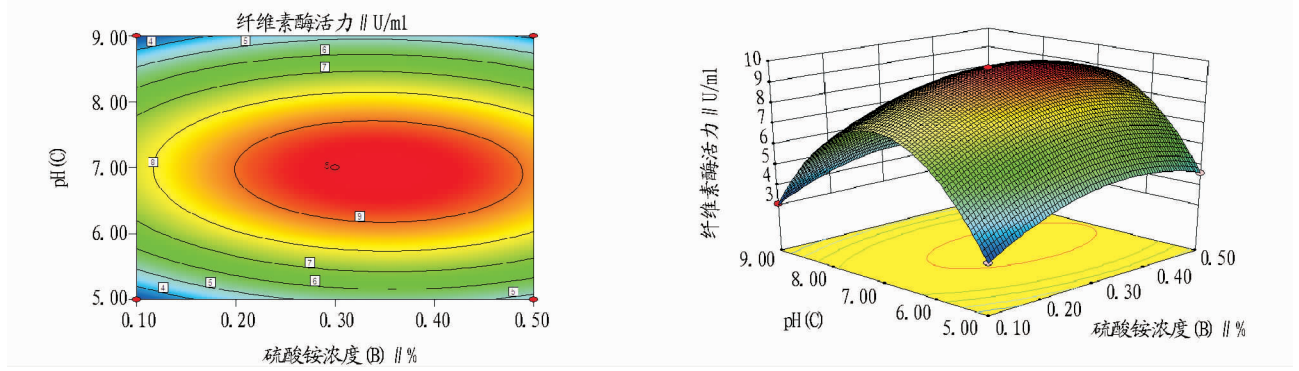


图 7 硫酸铵与 pH 的交互作用

对模型方程进行典型性分析,结果表明,模型具有稳定点,稳定点为其最大值。模型给出的最优组合为烟梗粉末添加量为 1.24%,硫酸铵浓度为 0.35%,pH 6.93,在此条件下预测最大酶活力为 $Y_{\max} = 9.75$ U/ml。为了证明模型预测的准确性,在最优条件下进行 3 次平行的重复验证试验,结果均值为 9.91 U/ml。这说明模型方程可信度较高,试验值与预测值基本相符,能够很好地预测试验结果。

3 结论

从片烟表面分离得到的产纤维素酶菌株 TX3,已测知产酶活力为 7.54 U/ml,由单因子试验可知,烟梗粉末添加量、硫酸铵浓度、pH 等对菌株产纤维素酶有不同程度的影响,较适发酵培养基为烟梗粉末 1.5%,硫酸铵浓度 0.3%,pH 7.0。

在单因子试验基础上,采用 RSM 法进一步优化,研究结果表明,烟梗粉末添加量、硫酸铵浓度、pH 等因素对菌株 TX3 发酵产纤维素酶活力均影响显著,得出最佳发酵产酶培养基为烟梗粉末 1.24%,硫酸铵浓度 0.35%,pH 6.93,利用此发酵培养基发酵产酶活力达到 9.91 U/ml,比优化前高了 31.4%。由于菌株 TX3 来源于片烟表面,优化后的菌株产酶活力较高,应用于烤烟纤维素的降解,符合安全标准,为其在生产实践中的应用提供了理论依据。

参考文献

[1] 李少明,汤利,范茂攀,等. 不同微生物腐熟剂对烟末高温堆肥腐熟进程的影响[J]. 农业环境科学学报,2008,27(2):783-786.

[2] 倪涵,马永凯,林连兵,等. 玉溪醇化烟叶表面细菌酶制剂对烟叶中淀粉和纤维素的降解作用[J]. 农业生物技术学报,2012,20(3):268-274.

[3] 朱尊权. 卷烟工艺[M]. 北京:北京出版社,2000.

[4] 杜文,谭新良,易建华,等. 用烟叶化学成分进行烟叶质量评价[J]. 中国烟草学报,2007,13(3):25-31.

[5] TAMAYO A I,CANCHO F G. Microbiology of the fermentation of Spanish tobacco[J]. International congress of Microbiology,1953,6:48-50.

[6] ENGLISH C F,BELL E J,BERGER A J. Isolation of thermophiles from broadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness[M]. Applied Microbiology,1967,15(1):117-119.

[7] REID J J,GRIBBONS M F,HALEY D E. The fermentation of cigar-leaf tobacco as influenced by the addition of yeast[J]. J Agric Res,1944,69:373-381.

[8] 陈福星,王磊,莫湘涛. 烟叶微生物发酵的探讨[J]. 湖南微生物通讯,1990(2):37-39.

[9] 汪天虹,王春卉,高培基. 纤维素酶纤维素吸附区的结构与功能[J]. 生物工程进展,2000,20(2):37-40.

[10] 王莹,范坚强,包可翔,等. 一株片烟中纤维素降解菌的筛选鉴定及其初步应用研究[J]. 现代农业科技,2011(8):25-28.

[11] 郑亚平,余晓斌. 碳源对绿色木霉 ZC 产中性纤维素酶的影响[J]. 无锡轻工大学学报,2003,22(2):30-33.

[12] 吴艳,李东亮,李刚,等. 蒸汽爆破对烟梗木质纤维素含量和微观结构的影响[J]. 河南农业大学学报,2011,45(4):448-451.

[13] 刘春泉,刘玉花,李建军,等. 响应面法优化速冻紫甘薯的烫漂工艺[J]. 食品科学,2008,28(11):196-200.

[14] 白玉玲,马杰,单延峰,等. 酵母发酵力的简易测定方法及应用[J]. 粮油食品科技,2006,14(4):55-57.

[15] 毛羽扬,朱在勤,纪有华,等. 老酵面团对碱工艺最佳 pH 值的研究[J]. 中国烹饪研究,1999(2):7-10.

(上接第 305 页)

[15] TAMURA K,PETERSON D,PETERSON N,et al. MEGA5:Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution,2011,28(10):2731-2739.