

一株产乙醇细菌的分离筛选与鉴定

Isolation, screening and identification of an ethanol-producing bacterium

陈梦娟¹ 周红丽² 蒋立文² 邓青青¹ 朱韵奕¹

CHEN Meng-juan¹ ZHOU Hong-li² JIANG Li-wen² DENG Qing-qing¹ ZHU Yun-yi¹
(1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128; 2. 食品科学与生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)
(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China;
2. Hunan Key Laboratory of Food Biotechnology, Changsha, Hunan 410128, China)

摘要:以湖南省盛产的 4 种刺葡萄为原料, 经过分离筛选与鉴定, 从米刺葡萄表面获得编号为 MUY3 的一株产乙醇的细菌。MUY3 在 28 ℃ 发酵 48 h 后, 其发酵液中乙醇体积分数可达到 10.67%。通过绘制生长曲线、同化试验、甲基红试验、耐高渗透压试验等对其生理生化特征进行研究。同时采用 16S rDNA 序列鉴定及进化树分析对该细菌进行鉴定。结果表明, MUY3 与 *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17 最为接近, 相似度达 100%, 所以该菌种为 *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17。

关键词: 刺葡萄; 乙醇; 16S rDNA; *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17; 生理生化特征

Abstract: From four kinds of *Vitis davidii*, widely planted in Hunan Province, an ethanol-producing bacterium named MUY3 was obtained from the surface of the rice grape by separation screening and identification. Its physiological and biochemical characteristics were investigated, including the cultivation of growth curve, assimilation test, methyl red test and high osmotic pressure test. Moreover, its 16S rDNA sequence was analyzed, and the phylogenetic tree analysis were used to identify this bacterium. The results showed that MUY3 was close to *Enterobacter xiangfangensis* and the similarity was 100%. Therefore, the strain was identified as *Enterobacter xiangfangensis* 10-17.

Keywords: *Vitis davidii*; ethanol; 16S rDNA; *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17; Physiological and biochemical characteristics

随着中国人均 GDP 的不断增长以及中西方文化的深入交流, 葡萄酒文化越来越受到国人的重视, 中国的葡萄酒产业取得了长足发展^[1], 葡萄酒的年均消费量也在不断的增

加^[2]。近几十年, 许多葡萄酒生产商采用国外进口酵母进行纯种发酵, 以提高生产效率并且使酿造过程便于控制, 保证安全高效生产^[3], 但这也导致葡萄酒生产出现较为严重的“同质化”现象^[4], 对中国的葡萄酒产业的发展带来冲击。因此, 为了酿造出风格独特又具有典型性^[5]的葡萄酒已经成为了一个世界性的课题。

刺葡萄在湖南凤凰、吉首等地已有较大的种植基地, 果实产量较高, 品质优良并含丰富的营养物质^[6-7], 是酿造葡萄酒的优质原料。用刺葡萄酿制的葡萄酒, 颜色深红艳丽, 并且风味品质极佳^[8]。目前, 刺葡萄的酿造中多采用已有活性干酵母^[9]进行纯种发酵, 虽然提高了产品的稳定性和可预测性^[10], 但产品缺乏特色。本研究拟从成熟葡萄果实的果皮和果肉^[11]、葡萄酒的自然发酵^[12]、葡萄种植园的土壤^[13-14]等相关环境中筛选适合本土葡萄酿造的葡萄酒酿造菌种, 为刺葡萄酒酿造做好菌种储备。目前已有学者^[15]从上述环境中分离得到酵母菌并应用于葡萄酒的酿造中, 然而从葡萄果皮上筛选具有优良发酵性能的细菌菌种则暂未有报道。

本研究从湖南怀化刺葡萄的表面分离得到的一株产乙醇能力较强的细菌, 通过对该细菌进行菌种鉴定及碳源同化、氮源同化、耐高渗透压试验^[16]等生理生化研究, 以期将其运用于葡萄酒酿造领域中。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

刺葡萄: 米刺葡萄, 湖南省怀化市;
氯化钠、无水乙醇: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基

(1) TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)上层培养基: 胰蛋白胨 17.0 g, 大豆胨 3.0 g, 葡萄糖 6.0 g, 氯化钠 2.5 g, 硫代硫酸钠 0.5 g, 琼脂 15 g, L-盐酸胱氨酸 0.25 g, 维生素 K 1 g, 亚

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(编号: 14A072)
作者简介: 陈梦娟, 女, 湖南农业大学在读硕士研究生。
通信作者: 周红丽(1972—), 女, 湖南农业大学食品科技学院教授, 博士, 硕士生导师。E-mail: xuanxuan310@126.com
收稿日期: 2017-01-28

硫酸钠 0.1 g,TTC 0.5 g,蒸馏水 1 000 mL。

(2) TTC 底层培养基(即 PDA 培养基):马铃薯浸出粉 300 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,氯霉素 0.1 g,蒸馏水 1 000 mL,最终 pH 为(6.0±0.2)。

(3) 发酵培养基:酵母膏 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL。

(4) 12.5%豆芽汁培养基:称取 125 g 黄豆芽放入 1 L 水中,煮沸 0.5 h 后过滤,并补充蒸馏水至 1 L,即成 12.5%豆芽汁培养基,在 121 ℃灭菌 20 min。

(5) 无氮培养基:葡萄糖 10 g,磷酸二氢钾 0.2 g,七水合硫酸镁 0.2 g,二水合硫酸钙 0.2 g,琼脂 20 g,碳酸钙 0.2 g,蒸馏水 1 000 mL。

(6) 缓冲葡萄糖蛋白水:磷酸二氢钾 5 g,多胨 7 g,葡萄糖 5 g,蒸馏水 1 000 mL,矫正 pH 为 7.0。

1.1.1.3 主要仪器设备

- 分光光度计:722N 型,上海菁华科技仪器有限公司;
- 电子天平:TP-620A 型,湘仪天平仪器设备有限公司;
- 智能生化培养箱:LRH-250 型,上海飞越实验仪器有限公司;
- 低温高速离心机:Centrifuge 5424R 型,德国 Eppendorf 公司;
- 数显三用恒温水箱:HH-420 型,上海浦东物理光学仪器厂;
- PCR 仪:T100 型,美国 BIO-RAD 公司。

1.2 菌种分离与筛选

1.2.1 分离培养 取 25 g 新鲜成熟的米刺葡萄果实放入 225 mL 的已灭菌生理盐水中,在 24 ℃ 40 KHz 的超声清洗器中超声 2 min 制成混浊液。经过梯度稀释后,选取适当的稀释倍数取 100 μL 均匀涂布在 PDA 培养基上,于(28±1) ℃倒置培养 2~3 d。挑取具有典型特征的菌落进行染色镜检,并进行平板反复划线纯化后,将其接到斜面培养基上于 4 ℃保藏备用。

1.2.2 TTC 平板初筛 TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)是一种显色剂,当 TTC 接受细菌脱氢酶作用而释放出游离氢后会产生显色反应使菌落显出红色,此过程中释放的氢越多,红色越深,反之,则红色越浅^[17-18]。

将斜面培养基上保藏的菌株接入 TTC 底层培养基上,在 28 ℃恒温条件下倒置培养 48 h,待菌落充分长成后,倒入一层较薄的 TTC 上层培养基将底层培养基完全覆盖,然后在(28±1) ℃条件下培养 24 h,挑取颜色较深的菌落将其保藏备用。

1.2.3 摇瓶复筛 将 TTC 平板初筛得到的菌株分别接入装有 100 mL 发酵培养基的三角瓶中,在(28±1) ℃条件下发酵 48 h 后,测定发酵液中是否有乙醇产生,及发酵液中乙醇的含量,挑选出乙醇产量高的菌株做进一步的鉴定。试验设置 3 个平行。

1.3 生长曲线的绘制

首先将低温保藏的菌种接入 100 mL 的发酵培养基中,(28±1) ℃恒温培养 24 h 进行活化。然后按照 5%的接种量

接入到装有 300 mL 发酵培养基的三角瓶中,于(28±1) ℃培养,每 2 h 取一次样,用可见光光度计测定 OD₆₀₀ 值,根据测定得到的光密度值绘制该菌种的生长曲线^[19]。

1.4 菌种的鉴定

使用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取待测菌株的 DNA,对提取的 DNA 进行 PCR 扩增 16S rDNA,通用引物为(27-F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG;1492-R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT)。PCR 反应体系为 50 μL(DNA 模板 2 μL、上下游引物各为 1 μL、缓冲液 5 μL、dNTPs 4 μL、Tap 酶 0.25 μL、MgCl₂ 4 μL、dd H₂O 32.75 μL)。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 30 次,最后 72 ℃延伸 10 min。将 PCR 扩增产物送至测序公司进行测序,将测序得到的基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,从中选取同源性高的菌株,再使用 MEGA 7.0 软件,NJ 方法,构建系统进化树。

1.5 生理生化鉴定

1.5.1 碳源同化试验 采用的碳源有:葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、半乳糖、鼠李糖、D-木糖、D-阿拉伯糖、柠檬酸、可溶性淀粉、甘露醇、纤维二糖、山梨醇、棉子糖。将 12.5%的豆芽汁培养基进行分装,每只试管中装入 10 mL 培养基,并于 121 ℃灭菌 20 min,待培养基冷却至 40~50 ℃时,加入 10%的无菌糖溶液 625 μL。然后将待测试菌种进行活化后,按照 5%的接种量接入到已准备好的培养基中,(28±1) ℃培养 3~5 d,观察是否出现浑浊,如果培养基出现浑浊则为阳性,反之则为阴性。以不含糖的试管为阴性对照管,每种碳源试验设置 3 个平行。

1.5.2 氮源同化试验 采用的氮源有:L-赖氨酸、硝酸钾、亚硝酸钠、硝酸铵、天门冬素。在无氮培养基上分别加入以上氮源作为培养基的唯一氮源,加入量为 0.078%,并于 115 ℃灭菌 20 min。按 5%的接种量将已活化的菌种接入制备好的培养基中,于(28±1) ℃培养 48 h。试验设置 3 个平行,以不加氮源的无氮培养基作为阴性对照。根据菌种在不同氮源培养基上生长情况,判断氮源是否能够被菌株同化。

1.5.3 甲基红试验 挑取少量新鲜的待测试培养物接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水中,于(28±1) ℃恒温培养 3~5 d,48 h 后每 24 h 取培养液加入甲基红试剂 1~2 滴,立即观察现象。直至发现阳性或第 5 天仍为阴性即可判定结果。滴入指示剂,呈鲜红色或橘红色为阳性;橘黄色或黄色为阴性。

1.5.4 耐乙醇试验 向带有杜氏小管且已灭菌的培养基中添加乙醇,使发酵培养基中的乙醇体积分数达到 10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,混匀后接入已活化好的菌种,(28±1) ℃培养 2~3 d,观察菌体生长情况和产气情况。通过试验结果缩小耐受限值范围,并再进行试验确定。

1.5.5 耐高渗透压试验 将经过隔夜活化的菌种划线接种于葡萄糖浓度为 25%,30%,35%,40%,45%的 PDA 培养基上,放置于(28±1) ℃恒温培养箱中培养 4 周,进行检查。试验过程中需采取蜡纸封口等措施预防培养基干燥。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

从米刺葡萄表面筛选出一株产乙醇能力较强的细菌，编号为 MUY3，在(28±1)℃的恒温条件下静置发酵 48 h 后，其发酵液中的乙醇浓度可达到 10.67%。

2.2 MUY3 的形态特征

MUY3 在 PDA 培养基上培养 3 d 后，菌落呈规则的圆形，白色，表面光滑且凸起，直径达 1.5~2.0 mm，见图 1。经过革兰氏染色后在油镜下观察，细胞为直杆状、无芽孢的革兰氏阴性细菌，见图 2。图 3 为 MUY3 在 TTC 平板上生长 48 h 的菌落特征。

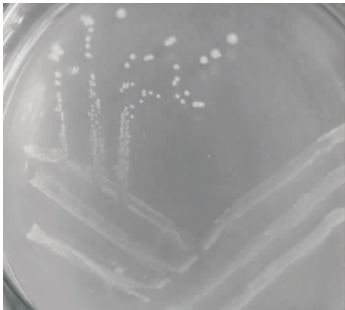


图 1 菌落形态
Figure 1 Colony morphology

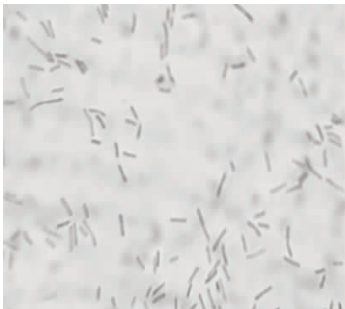


图 2 革兰氏染色结果(1 000×)
Figure 2 Gram stain results (1 000×)



图 3 TTC 平板结果
Figure 3 TTC flat results

2.3 MUY3 的鉴定

采用细菌通用引物对 MUY3 的高度保守序列区域进行 PCR 扩增，得到了大约 1 500 bp 的扩增片段，其扩增产物较纯，见图 4。在 NCBI 上对比后选择同源性较高的菌株并构

建系统进化树，见图 5。从进化树可知 MUY3 与 *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17 的亲缘关系最近，同源性可信度为 100%。因此，MUY3 可以初步判定为 *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17。

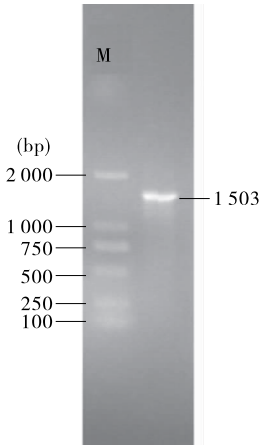


图 4 MUY3 16S rDNA PCR 扩增结果
Figure 4 MUY3 16S rDNA PCR amplification results

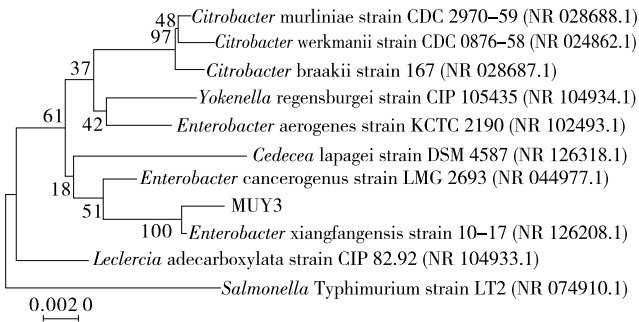


图 5 菌株 MUY3 的系统进化树
Figure 5 Systemic phylogenetic tree of strain MUY3

2.4 菌株的生长曲线

由图 6 可知，当菌种接种入培养基 8 h 后进入对数期，18 h 后进入稳定期。如果在试验或生产中为获得生理特性稳定、代谢旺盛^[20]的细菌则可活化 10~18 h。

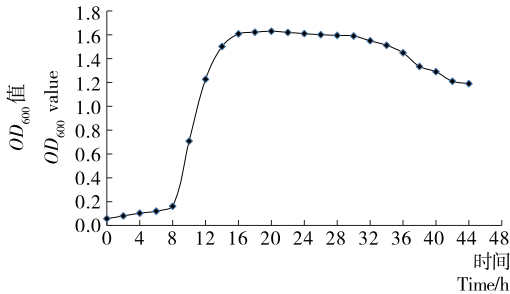


图 6 MUY3 的生长曲线
Figure 6 MUY3 growth curve

2.5 生理生化试验

2.5.1 同化试验 MUY3 可以利用的碳源、氮源范围较广，并且该菌种利用葡萄糖和蔗糖作为碳源时，其发酵液中浑浊度和产气量明显高于其他碳源，试验结果见表 1、2。

表 1 碳源同化试验[†]

Table 1 Carbon source assimilation test

碳源	结果	碳源	结果
葡萄糖	+	D-阿拉伯糖	—
蔗糖	+	柠檬酸	—
麦芽糖	+	可溶性淀粉	—
乳糖	+	甘露醇	+
半乳糖	—	纤维二糖	—
鼠李糖	+	山梨醇	+
D-木糖	+	棉子糖	+

† “+”表示培养基中出现浑浊;“—”表示培养基中无浑浊。

表 2 氮源同化试验[†]

Table 2 Nitrogen source assimilation test

菌种编号	氮源				
	L-赖氨酸	硝酸钾	亚硝酸钠	硝酸铵	天门冬素
MUY3	+	—	—	+	+

† “+”表示培养基上有菌落长成;“—”表示培养基上无菌落长成。

2.5.2 甲基红试验 培养 48 h 后,每 24 h 取培养液滴入少量甲基红试剂观察培养液颜色的变化。结果显示,培养 48, 72,96 h 时培养液为淡黄色,培养 120 h 时(即第 5 天)培养液变为黄色,记为 MR 试验为“—”,表明 MUY3 产酸能力较弱,见图 7。

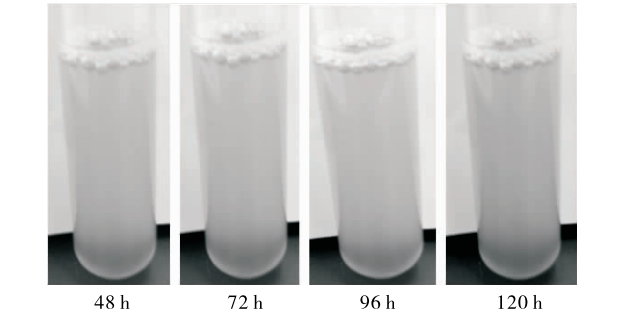


图 7 甲基红试验

Figure 7 Methyl red test

2.5.3 耐乙醇试验 一般葡萄酒含乙醇的体积分数在 10%~15%^[21]。由表 3 可知,MUY3 对乙醇有较高的耐受性,当体积分数为 10%~15%时,对该菌种的发酵无明显影响,并且其最大耐受限度范围为 30%~35%。因此,使发酵液中的乙醇体积分数达到 30%,31%,32%,33%,34%, 35%,以同样的方法再进行试验,得到结果见表 4。所以得出菌种 MUY3 对乙醇的最大耐受限度为 30%(体积分数)。

2.5.4 耐高渗透压试验 本试验采用葡萄糖进行培养基中糖浓度的调节,见表 5,其耐渗透压的极限值为 40%,且在该浓度下 MUY3 存活率偏低。

3 结论

本研究从湖南怀化米刺葡萄表面筛选出一株能产乙醇的细菌,编号为 MUY3,被初步鉴定为 *Enterobacter xiang-*

表 3 MUY3 在不同体积分数乙醇中的产气情况[†]

Table 3 MUY3 in different volume fraction of ethanol with gas production situation

10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%
++++	++++	+++	+	+	—	—

† “—”表示不产气;“+”表示产气量为杜氏小管的 1/5;“++”表示产气量为杜氏小管的 2/5;“+++”表示产气量为杜氏小管的 3/5;“++++”表示产气量为杜氏小管的 4/5;“+++++”表示气体量充满杜氏小管。

表 4 MUY3 的乙醇耐受限度[†]

Table 4 Ethanol Tolerance of MUY3

30%	31%	32%	33%	34%	35%
+	—	—	—	—	—

† “—”表示不产气;“+”表示产气量为杜氏小管的 1/5。

表 5 高渗透压试验[†]

Table 5 High osmotic pressure test

试验组号	25%	30%	35%	40%	45%
1	+	+	+	+	—
2	+	+	+	+	—
3	+	+	+	—	—

† “—”表示无菌落长成;“+”表示有菌落长成。

fangensis strain 10-17,并对其部分发酵特性进行了研究。菌株 MUY3 能耐高渗透压,具有较强的发酵性能,在 28 ℃ 恒温培养条件下发酵 48 h 后,其发酵液中产乙醇量为 10.67%,而耐受乙醇体积分数可达到 30%,并且该菌种能利用多种碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、鼠李糖、D-木糖、甘露醇、山梨醇、棉子糖)和氮源(L-赖氨酸、硝酸铵、天门冬素)。

目前菌种 *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17 的相关研究较少,暂时无法取代酵母菌在葡萄酒酿造中的应用,主要的原因是无法确定发酵过程中有哪些副产物的产生,同时也无法确定副产物对葡萄酒品质是否有影响。为解决上述问题,对 *Enterobacter xiangfangensis* strain 10-17 进行菌种改良及发酵副产物的研究将成为今后科研工作者的研究方向。

参考文献

[1] 李甲贵. 我国葡萄酒消费者行为研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 5-7.
[2] 朱艳. 中国葡萄酒产业竞争力及其影响因素研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014: 8-9.
[3] 朱力, SIECZKOWSKI N, BELANCIC A, 等. 更完美的展现葡萄品种的个性: “品种酵母”的筛选和应用[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2007(1): 58-61.
[4] 易新萍, 许东滨, 周文革. 西北地区葡萄酒国家监督抽查检测结果与分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 848-849.
[5] 程超, 韩北忠, 陈晶瑜, 等. 本土葡萄酒酿酒酵母发酵性性能的比较[J]. 中国酿造, 2008, 27(17): 8-10.

(下转第 46 页)

(2) BSC 酶的酶解作用使牛骨胶原蛋白的三股螺旋结构遭到破坏,生色基团分布发生改变,使胶原蛋白肽的肽链上—NH₂⁺—相互排斥减弱,疏水氨基酸残基作用增强,分子内与分子间的氢键作用增加,N—H 伸缩振动与氢键形成了缔合体,并且酶解作用促进 β -转角的产生,同时破坏了牛骨胶原蛋白的表面分子结构,使其变得疏松。本研究为今后牛骨资源的深加工提供了理论指导。

参考文献

[1] 孙蓓,王龙刚. 禽禽骨的综合利用现状及发展前景[J]. 中国调味品, 2011, 36(4): 1-4.

[2] 刁静静,孔保华,陈洪生. 骨蛋白水解物的功能特性及抗氧化性的研究进展[J]. 肉类研究, 2007(6): 26-29.

[3] BANERJEE P, MEHTA A, SHANTHI C. Investigation into the cyto-protective and wound healing properties of cryptic peptides from bovine Achilles tendon collagen [J]. Chemico-Biological Interactions, 2014, 211(229): 1-10.

[4] GÓMEZGUILLÉN M C, GIMÉNEZ B, LÓPEZCABALLERO M E, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1 813-1 827.

[5] TOOPCHAM T, MES J J, WICHERS H J, et al. Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle proteins[J]. Food Chemistry, 2017, 220: 190-197.

[6] 张宇,邹应龙,黄祎萌. 单菌和双菌固态发酵猪骨素的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 179-182.

[7] 彭慧莉. 酶解和乳酸菌发酵猪骨的工艺研究[D]. 成都: 西华大

学, 2013: 100-120.

[8] 蔡丽华. 牛骨酶解制备血管紧张素转换酶抑制肽的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 112-135.

[9] 赵妍娟,胡林林,方芳,等. 骨胶原蛋白的酶解工艺条件[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 153-155.

[10] ZHANG Yu-hao, MA Liang, CAI Lu-yun, et al. Effect of combined ultrasonic and alkali pretreatment on enzymatic preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from native collagenous materials [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 36: 88-94.

[11] 刘丽莉,马美湖,杨协力. 牛骨 I 型胶原蛋白提取及结构表征[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 87-91.

[12] 肖岚,李诚,付刚,等. 5 种蛋白酶对猪皮胶原蛋白水解效果的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(17): 10-14.

[13] 李燕,徐静,吴祥庭,等. 卤鸡腿废弃液酶解工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 153-157.

[14] 张小燕. 胶原蛋白肽生物功能材料的研究与开发[D]. 西安: 西北工业大学, 2006: 80-96.

[15] 吴雷,郑娟,刘文涛,等. 鸡关节软骨 II 型胶原蛋白结构及性能表征[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(11): 86-90.

[16] 朱瀛,赵改名,柳艳霞,等. 中性蛋白酶水解鸡骨泥制备短肽工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(12): 309-314.

[17] 石岭,赵利,袁美兰,等. 响应面法优化碱性蛋白酶酶解草鱼蛋白质[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 26-29.

[18] 张丽红,谢三都,徐芳,等. 紫苏叶多糖活性炭脱色工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 224-230.

[19] 杨露,丁利君,蓝德安. 马面鱼骨胶原多肽的理化特性及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 109-112.

[20] 据海燕,刘新华,但卫华,等. 牛跟腱 I 型胶原纤维的微观结构与理化性能分析[J]. 功能材料, 2015(15): 15 031-15 034.

(上接第 34 页)

[6] 郭蓉. 低高级醇刺葡萄酒酵母菌的筛选及应用研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013: 8-11.

[7] 欧阳建文,熊兴耀,刘东波,等. 刺葡萄综合开发利用研究[J]. 广西园艺, 2007, 18(2): 29-31.

[8] 鲍端峰,秦丹,唐明,等. 刺葡萄酒香气成分的研究[J]. 酿酒科技, 2010(2): 53-56.

[9] 翁连海,逯家富,王军,等. 进口葡萄酒酿造用活性干酵母在我国山葡萄酒生产中的应用研究[J]. 酿酒, 2006, 33(2): 61-62.

[10] MARO E D, ERCOLINI D, COPPOLA S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(2): 201-210.

[11] BECHER P G, FLICK G, ROZP DOWSKA E, et al. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development[J]. Functional Ecology, 2012, 26(4): 822-828.

[12] 时月. 玫瑰香葡萄酒自然酿造过程和酵母的分离鉴定与特性分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2015: 38-40.

[13] 王国平,宋育阳,裴颖芳,等. 宁夏御马葡萄酒厂野生酵母菌株的分离筛选及分子鉴定[J]. 中国酿造, 2009, 28(8): 38-41.

[14] ILIEVA F, KOSTADINOVI V S, DIMOVSKA V, et al. Se-

lection of 80 newly isolated autochthonous yeast strains from the Tikves region of Macedonia and their impact on the quality of red wines produced from Vranec and Cabernet Sauvignon grape varieties.[J]. Food Chemistry, 2017, 216: 309-315.

[15] 杨莹,管敬喜,谢林君,等. 广西毛葡萄产区野生葡萄酒酵母种群分布与系统进化分析[J]. 南方农业学报, 2016, 47(7): 1 123-1 128.

[16] 巴尼特 J A. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿,译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991: 20-27.

[17] 龚国利,史政豪,张甜,等. 运动发酵单胞菌的筛选与鉴定[J]. 陕西科技大学学报, 2015(6): 138-141.

[18] GUNASEKARAN P, RAJ K C. Ethanol fermentation technology-*Zymomonas mobilis*[J]. Currentence, 1999, 77(1): 56-68.

[19] 祁国振,毛志泉,胡秀娜,等. 苹果根际自毒物质降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 330-342.

[20] 杰伊,罗西里尼,戈尔登,等. 现代食品微生物学: 食品微生物学[M]. 何国庆,丁立孝,宫春波,译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 36-39.

[21] 王染霖,董新平,刘怀锋. 新疆天山北麓赤霞珠干红葡萄酒品质分析[J]. 新疆农垦科技, 2015(6): 66-69.