

耐温型酒精浓醪发酵酵母菌的选育

赵 华¹ 韩晓东²

(1.天津科技大学食品科学与生物工程学院,天津 300222;2.天津津酒集团有限公司,天津 300131)

摘要: 通过 UVB 照射培养和热冲击处理,成功地选育到一株 36℃下在含 16%(v/v)酒精的培养基中生长良好,三角瓶发酵酒精度达到 14.3%(v/v)的耐酒精和耐温的酵母菌株 UV-7-36-12-17 菌。其最佳发酵条件:原料加水比 1:2.2,糖化酶用量 125 u/g 原料,60℃糖化 30~60 min,接种量 8%~10%,摇床转速 70~96 r/min,发酵顶温 34~36℃,发酵周期 72 h。

关键词: 微生物; UVB 照射培养; 热冲击处理; 浓醪; 酒精发酵

中图分类号:TS262.2;TQ920;TS261.1 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)08-0035-04

Breeding of Thermotolerant Yeast in High Gravity Ethanol Fermentation

ZHAO Hua¹ and HAN Xiao-dong²

(1.Bioengineering College of Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222;

2. Tianjin Jin Wine Group Co. Ltd., Tianjin 300131, China)

Abstract: An ethanol-resistant and heat-resistant mutant (UV-7-36-12-17) of *Saccharomyces cerevisiae* was successfully bred by the techniques of UVB radiation culture and heat-shock treatment, which could grow well in the triangular flask under the conditions of 16%(v/v) ethanol content, temperature at 36℃, and alcohol content reached 14.3%(v/v). The optimal fermentation conditions of UV-7-36-12-17 were as follows: the ratio of raw material and water as 1:2.2; use level of saccharifying enzyme as 125 u/g raw materials; 30~60 min saccharification at 60℃; 8%~10% inoculation quantity; shaker rotate speed as 70~96 r/min; the top temperature in fermentation at 34~36℃; and fermentation cycle as 72 h. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; UVB radiation culture; heat-shock treatment; high gravity mash; ethanol fermentation

酒精浓醪发酵是酒精发酵工业的发展目标和方向,这一研究的技术关键在于获得耐高渗透压且酒精发酵速率快、对自身产生乙醇的耐受力强的酵母菌种^[1-7]。临界乙醇浓度导致质膜磷脂裂解,如果菌株质膜本身或发酵时具备相当营养及环境条件适宜等,酵母就对乙醇毒性有所适应和抵抗,特别是温度尤为明显^[8]。随着温度的提高,酵母质膜的磷脂量很快降低,以维持质膜的流动性和保护胞内活性^[9]。目前,耐高酒精酵母的选育主要是从自然界中直接分离,利用自然驯化连续培养技术、诱变选育和杂交技术、热冲击处理和原生质体融合及基因重组^[10-15]等技术选育出具有较强的耐渗透压能力,不产或少产副产物,解除底物和产物对菌种抑制作用的酵母菌株。

紫外线分 UVA(320~400 nm)、UVB(280~320 nm)和 UVC(200~280 nm)。在菌种诱变选育过程中,常采用人工

制作的能发出 253.7 nm 杀菌力强且稳定的紫外灯^[16]。在自然界中,波长小于 280 nm 的短波紫外线(UVC)基本被大气吸收,对生物体造成伤害的多为 UVA 和 UVB,尤其是 UVB 占紫外线辐射量的 80%~90%^[17]。研究发现,UVB 辐射不但会对生物体造成伤害,如果控制适宜的辐射量,还能诱导生物体产生新的功能及多种生理活性的物质^[18,19],同时,通过 UVB 诱导培养可提高酵母菌的耐酒精能力^[20]。因此,本章探讨利用 UVB 长时间诱导培养并结合热冲击技术,筛选耐温型酒精浓醪发酵酵母菌的可能性。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

玉米粉 购自天津市场。

耐高温 α-淀粉酶:无锡星达酶制剂厂。

收稿日期 2005-03-01

作者简介 赵华(1963-),男,工学博士,副教授,主要从事微生物发酵工程和酿酒技术研究。

糖化酶 :10 万 u/mL,无锡星达酶制剂厂。

耐高温酒精活性干酵母(AADY):湖北安琪酵母股份有限公司。

酒用酸性蛋白酶:金潮实业有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 UVB 照射培养试验^[20]

酒精活性干酵母经适当活化后,配成初始菌体浓度为 2%(质量分数)的菌悬液,摇床转速 144 r/min,温度 28~30℃,pH4.0~6.0 条件下,用 30 W 紫外灯(297 nm)在 0.5 m 处进行照射培养。培养过程中定期补充葡萄糖液和调整培养液的 pH 值。

1.2.2 热冲击处理试验^[10]

在麦芽汁中培养酵母至对数生长期,收集细胞用生理盐水洗涤,用缓冲液制成 2×10^7 个/mL 细胞悬液,先将酵母细胞放在 28~30℃ 下保温 10 min,再放在 50℃ 下继续保温,将酵母细胞在乙醇浓度为 10%(v/v)的培养基中 28~30℃ 下培养,然后在乙醇浓度为 20%(v/v)条件下于 38~40℃ 保温,稀释后涂布平板,30~32℃ 培养 2~3 d,挑取单菌落。

1.2.3 酒精发酵试验

准确称取 50 g 或 100 g 玉米粉置于三角瓶中,按比例 1:2.2 加入 70℃ 自来水,滴加耐高温 α -淀粉酶 1~2 滴,水浴加热至 100℃,维持 90~120 min,冷却至 60℃,按 150 u/g 原料加入糖化酶,糖化 60 min。糖化酶冷却至 30℃,加入 14 u/g 原料的酸性蛋白酶后接种酵母菌,置 32℃ 培养箱或摇床(转数 70 r/min)中发酵 12 h,加发酵栓,再升温至 34~36℃ 发酵至 72 h。发酵过程中每 24 h 称重,计算 CO₂ 生成量;发酵结束后测醪液的酒精浓度及 pH、挥发酸、总酸、还原糖和总糖。

1.2.4 酵母菌耐酒精试验

艾氏发酵管灭菌以后,装入已灭菌麦芽汁中,然后添加 95%(v/v)的乙醇和无菌水,使各管的乙醇浓度分别为 8%、10%、12%、14% 等,各管的糖度保持一致,然后接种基本相同的菌种浓度,置 32℃ 培养,观察菌种生长和产气情况。

1.3 分析方法

1.3.1 发酵醪酒精含量、挥发酸、总酸、还原糖与残总糖的测定参考文献^[22]。

1.3.2 原料出酒率的测定参考文献^[21]。

将成熟发酵醪全部移入 1000 mL 蒸馏瓶中,再用 100 mL 蒸馏水冲洗三角瓶,洗液倒入蒸馏瓶一起蒸馏。接馏出液 100 mL,用酒精计和温度计同时测定其酒精度与温度,并查表换算成 20℃ 时的酒精度。

$$95\%(\text{v/v})\text{酒精} = \frac{D \times 0.81144}{95} \times \frac{100}{50} \times 100 = 1.7083D$$

式中 D——试样在 20℃ 时的酒精度, (% v/v);

0.81144——95%(v/v)酒精(20℃)的比重;

50——原料重量 g。

1.3.3 酵母菌细胞数测定参考文献^[16]。

2 结果与讨论

2.1 UVB 照射酵母菌酒精发酵试验

UVB 照射对酵母菌酒精发酵能力影响不大,而采用经过一定时间 UVB 照射培养的酵母菌进行酒精发酵时,原料出酒率有提高的趋势^[20]。因此,选取 UVB 照射培养 36 h 的菌液进行单菌分离发现,分离培养基上长出的菌落大小相差很大,菌落个体大小最大相差约 3 倍,而大小菌落数的比例约为 1:1。将某分离平板上的大菌落(15 珠)分别转接试管斜面,32℃ 培养 48 h 后,分别接入含有一定酒精浓度的玉米粉糖化液中,32℃ 培养 48 h,挑选产气量较大的 2[#]、6[#]、7[#]、9[#] 和 14[#] 等 5 株菌进行酒精发酵试验,结果见表 1。

表 1 UVB 照射对酵母菌酒精发酵的影响 (g/100mL)

项目	菌株					
	2 [#]	6 [#]	7 [#]	9 [#]	14 [#]	对照
CO ₂ 失重(g)	19.9	20.1	20.0	20.1	20.2	19.7
pH	3.8	3.8	3.8	4.0	3.8	3.8
挥发酸	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
总酸	0.45	0.49	0.42	0.51	0.49	0.46
残还原糖	0.05	0.05	0.04	0.06	0.09	0.15
残总糖	0.75	0.73	0.67	0.73	0.78	0.82
酒度(20℃)	21.1	21.2	21.3	21.1	21.1	20.8
出酒率(%)	36.04	36.21	36.39	36.04	36.04	35.53

注:玉米粉用量为 50 g,加水比为 1:4。

由表 1 可知,从 UVB 照射培养 36 h 的菌液中分离,并经过发酵产气试验得到的 5 株酵母菌的酒精发酵(静置)能力都大于对照试验,其中 7[#] 菌的原料出酒率最高为 36.39%,比对照提高 0.86%。

2.2 UVB 照射对酵母菌株耐酒精性能的影响

将 7[#] 菌接种在 7[#]Bx 的麦芽汁培养基中,30℃ 振荡培养 24 h 离心收集菌体,然后再进行 UVB 照射培养,分别取照射培养 12 h、36 h 和 60 h 的菌液进行单菌分离。在分离平板上分别挑选菌落大的菌落各 15 珠,转接试管斜面,32℃ 培养 48 h 后,将分离得到的酵母菌分别接入 16%(v/v)的酒精液体试管中,32℃ 培养 48 h,分别从 3 个照射时间中各挑选出 3 株产气量较大的菌 12-6[#]、12-12[#]、12-14[#] 和 36-8[#]、36-12[#]、36-13[#] 及 60-2[#]、60-7[#]、60-14[#] 进行酒精发酵(摇床振荡)试验,结果见图 1。

由图 1 可知,经两次 UVB 照射后,酵母菌产酒精能力提高,其中以照射 36 h 效果最好,36-12[#] 菌酒精发酵成熟醪的酒精浓度比对照 7[#] 菌提高 0.4%。

2.3 热冲击处理对酵母菌耐酒精性能的影响

采用这种方法对 36-12[#] 菌进行多次热冲击处理后,在麦芽汁平板上挑选出 50 株较大的菌落,转接试管斜面,30℃ 培养 48 h 后,进行耐酒精性能测定,其中 12 株菌在酒精浓度为 16%(v/v)的培养基中的产气量高

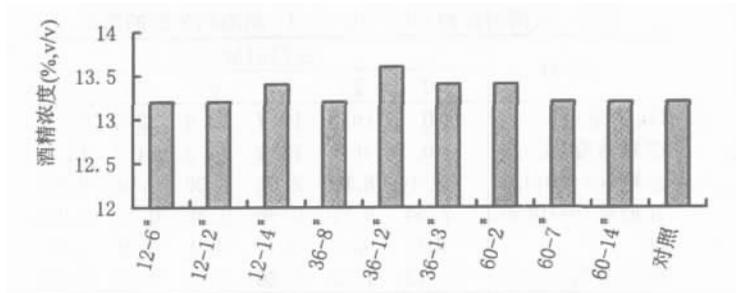


图1 酵母菌发酵产酒精复筛试验结果

于36-12#菌。挑选在含16%(v/v)酒精的培养基中产气量高的12株菌进行酒精发酵(摇床振荡)试验,结果见图2。

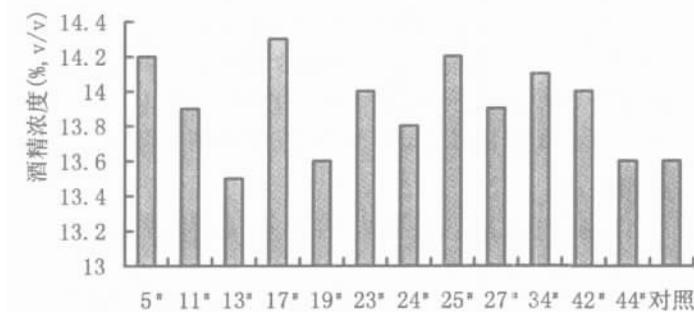


图2 热冲击处理对酵母菌酒精发酵的影响

由图2可知,经热冲击处理得到酵母菌株酒精发酵能力高于对照菌株的有9株,占测试菌株数的75%。将产酒精能力较高的5#、17#、25#和34#菌进行复筛,其结果见表2。

表2 热冲击处理酵母菌酒精发酵复筛结果 (g/100mL)

菌株	CO ₂ 失重 (g)	pH	挥发酸	总酸	残还原糖	残总糖	酒精浓度 (% v/v)
5#	22.7	3.8	0.05	0.48	0.24	0.94	14.1
17#	22.4	3.8	0.05	0.51	0.24	0.87	14.4
25#	22.4	3.8	0.05	0.51	0.28	0.92	14.2
34#	22.4	4.0	0.05	0.48	0.26	0.98	14.1
36-12#	22.0	3.8	0.05	0.49	0.46	1.19	13.6

注:①玉米粉用量为50g,加水比为1:2.2;②数据为3次平均值。

由表2可知,17#菌酒精发酵能力最强,经多次传代培养和酒精发酵试验证明,该菌株酒精发酵性能稳定,淀粉出酒率稳定在52.86%~53.15%之间,有推广应用价值。根据菌种选育过程,暂时将该菌株命名为UV-7-36-12-17。

2.4 温度对UV-7-36-12-17菌生长的影响

接一环UV-7-36-12-17菌于麦芽汁培养基中,于30℃振荡培养24h,按10%转接到新鲜的麦芽汁培养基中,在28℃、30℃、32℃、34℃、36℃、38℃和40℃下继续振荡培养24h后计数,其结果见图3。

由图3可知,UV-7-36-12-17菌在28~36℃范围内均能正常生长,培养温度高于38℃时,菌体生长受到一定的抑制。38℃和40℃培养时,菌体数分别为正常生长

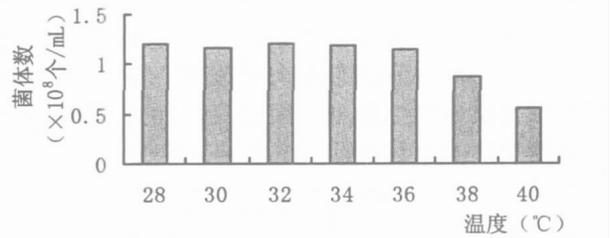


图3 温度对UV-7-36-12-17菌生长的影响

的73.10%和47.05%。也就是说,UV-7-36-12-17菌具有一定抗高温能力。

2.5 UV-7-36-12-17菌酒精发酵工艺研究

2.5.1 加水比对酒精发酵的影响

从发酵生产角度考虑,底物浓度越高越好,这样既可以提高设备利用,同时还可以节约能耗。由图4试验结果可知,原料加量越大,醪液中酒精浓度也越大,但当原料加量达到1:1.8时,醪液中酒精浓度又降低。这主要是由于基质太浓,严重影响了CO₂的释放,导致淀粉利用率下降。因此确定采用1:2.2的加水比。

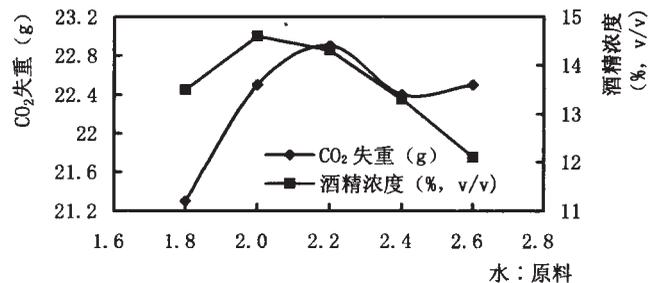


图4 加水比对UV-7-36-12-17菌酒精发酵的影响

2.5.2 糖化剂添加量对酒精发酵的影响

酒精酵母不能发酵淀粉,因此采用淀粉原料进行酒精发酵时必须添加糖化剂,将糊化淀粉水解成酒精酵母能快速发酵的单糖和双糖。因此,糖化剂添加量对酒精发酵有一定的影响,试验结果见图5。

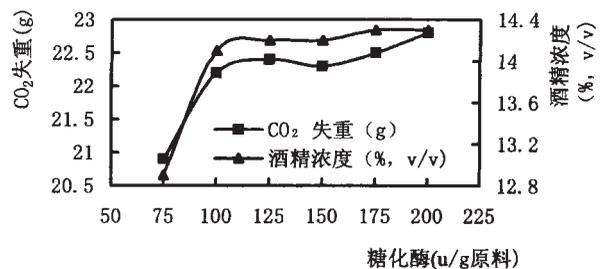


图5 糖化剂添加量对UV-7-36-12-17菌酒精发酵的影响

由图5可知,随着糖化酶添加量的增加,酒精浓度呈上升趋势,但糖化酶添加量超过125 u/g原料后,发酵成熟醪的酒精浓度基本一致。故确定糖化酶添加量为125 u/g原料。

2.5.3 摇床转数对酒精发酵的影响

一般认为,为了提高酒精发酵产率,应采取厌氧静

止发酵工艺。但在酒精浓醪发酵研究过程中发现,随着醪液浓度的增大,其黏度和渗透压也急剧增加,造成CO₂的溢出困难,从而抑制酵母菌发酵。另外,黏度的增加使醪液传质也发生困难。因此,适当的振荡有利于酵母菌酒精发酵的顺利进行。试验结果见图6。

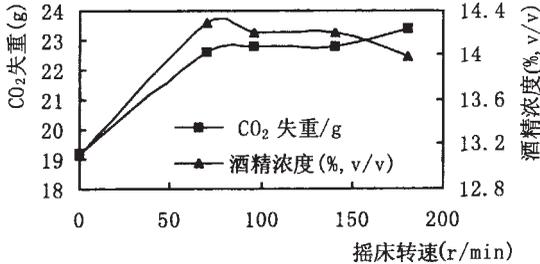


图6 摇床转速对UV-7-36-12-17菌酒精发酵的影响

由图6结果可知,静止发酵时发酵成熟醪中的酒精浓度比振荡发酵低1.2%,但摇床转速太快,酒精也会被CO₂夹带溢出,造成损失。因此,确定酒精发酵时摇床转速为70~96 r/min。

2.5.4 发酵温度对酒精发酵的影响

温度是影响酒精浓醪发酵的关键因素之一。随着温度的提高,为了维持质膜的流动性和保护胞内酶活性,酵母质膜的磷脂量急速降低,从而影响了酵母菌的酒精发酵性能。但经过两次UVB辐射和多次热冲击处理选育得到的UV-7-36-12-17菌,具有较高的耐温性能,其酒精发酵结果见图7。

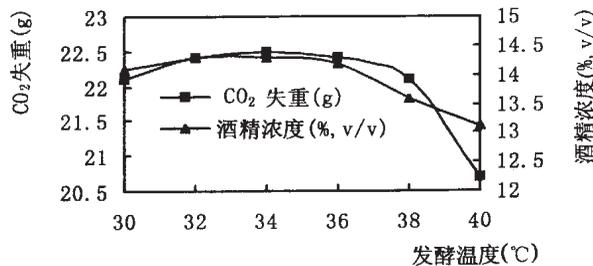


图7 发酵温度对UV-7-36-12-17菌酒精发酵的影响

由图7可知,UV-7-36-12-17菌最适发酵温度为32~34 °C,但在36 °C时也可以获得很好的发酵结果,超过38 °C则发酵醪酒精含量下降。因此,控制适宜的发酵温度是发挥UV-7-36-12-17菌发酵能力的重要措施。

2.5.5 发酵时间对酒精发酵的影响

根据上述实验确定的最佳发酵工艺条件,用UV-7-36-12-17菌进行酒精发酵,在发酵的不同阶段取样,其检测结果见表3。由表3可知,UV-7-36-12-17菌酒精发酵时间宜控制在72 h左右。

3 结论

通过两次UVB辐射和热冲击处理,成功地选育到一株在含16%(v/v)酒精的培养基中和36 °C条件下均生长良好,发酵酒精度达14.3%(v/v)的耐酒精和耐温

表3 发酵时间对UV-7-36-12-17菌酒精发酵的影响

项目	发酵时间(h)					
	0	24	48	60	72	84
CO ₂ 失重(g)	0	15.8	19.7	22.5	22.9	22.9
酒精浓度(% v/v)	0	9.6	13.2	14.2	14.3	14.3
总糖(g/100 mL)	23.44	8.02	2.64	1.06	0.98	0.86
还原糖(g/100 mL)	7.64	4.32	0.86	0.38	0.13	0.12
pH	4.6	4.5	4.3	4.0	4.0	4.0
酵母菌数(×10 ⁸)	0.12	1.22	1.20	1.05	0.95	0.87

酵母菌株UV-7-36-12-17菌。该菌株的细胞呈圆形或椭圆形,芽殖生。在麦芽汁琼脂培养基上菌落颜色为乳白色,有凸起,表面光滑。在麦芽汁液体培养基中,无菌膜,培养后期菌体会沉于试管底部,其最佳发酵条件:原料加水比为1:2.2;液化温度和液化时间分别为95 °C和90~120 min;添加125 u/g原料的糖化酶,在60 °C糖化时间30~60 min;接种量为8%~10%;摇床转速为70~96 r/min;发酵顶温为34~36 °C,发酵周期为72 h。

参考文献:

- [1] 池振明.高浓度酒精发酵技术的研究进展[J].食品与发酵工业,1995(4):80-85.
- [2] 赵华,赵树欣,才向东,等.玉米原料酒精浓醪发酵技术的研究[J].酿酒科技,1998(4):38-39.
- [3] Jones A M, Ingledew W M. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very high gravity fermentation[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1994,60:1048-1051.
- [4] Thomas K C, Ingledew W M. Production of 21%(v/v) ethanol by fermentation of very high gravity wheat mashes[J]. J. Ind. Microbiol.,1992,10:61-68.
- [5] Abdel-Fattah W. R, Fadil,M, Nigam. P etc. Isolation of thermotolerant thanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an egyptian distillery[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000,68(5):531-535.
- [6] Banat I M, Marchant R. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative yeasts strains[J].W J Microbiol Biotechnol,1995(11):304-306.
- [7] Banat IM, Nigam P, Marchant R.. Isolation of thermotolerant,fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C[J]. W J Microbiol Biotechnol 1992,(8): 259-263.
- [8] 池振明,高峻.酵母菌耐酒精机制的研究进展[J].微生物学通报,1999,26(5):373-376.
- [9] Piper W P, Talreja K, Panaretou B, etc. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above critical threshold[J]. Microbiol. UK (1994)140:3031-3038.
- [10] 刘建军,姜鲁燕,赵祥颖,等.高产酒精酵母菌种的选育[J].酿酒,2003,30(1):57-59.
- [11] 池振明.提高酵母菌耐酒精能力的方法[J].微生物学通报,

(下转第41页)

表3 产酒色谱分析数据 (g/L)

项目	拌沙窖	粮食窖	一年窖
己酸乙酯	3.857	1.547	4.510
乳酸乙酯	2.867	1.961	3.058
乙酸乙酯	1.586	0.589	2.322
丁酸乙酯	0.281	0.087	0.495
乙醛	0.516	0.687	0.712
丙醇	0.102	0.081	0.113
仲丁醇	0.059	0.048	0.625
乙缩醛	0.464	0.150	0.641
异丁醇	0.415	0.172	0.524
丁醇	0.152	0.073	0.186
异戊醇	0.409	0.330	0.674

平均己酸乙酯含量(2.775 g/L)高得多,说明拌沙窖生酯能力比粮食糟醅和回沙分开发酵要大得多。拌沙窖和一年窖产酒各种微量成分均比较协调,粮食窖和二者相差甚远。乙缩醛由乙醇和乙醛缩合而成,是衡量白酒老熟程度的重要指标,可以看出拌沙窖产酒乙缩醛含量(0.464 g/L)与一年窖产酒乙缩醛含量(0.641 g/L)相差不大,比一年窖和粮食窖乙缩醛含量的平均值(0.354 g/L)高得多,说明拌沙窖的老熟比粮糟和回沙分开发酵要快得多。酒体口感上,拌沙窖浓香、醇甜、爽净、协调、陈味适中,一年窖陈味略重,窖香突出,后味协调感略差;粮食窖要单薄得多,欠协调,与前二者相差甚远。

表4 产量和消耗对比

类别	60度酒产量 (kg/甑)	粮 耗 (t 粮/t 酒)	曲 耗 (t 曲/t 酒)	糠 耗 (t 糠/t 酒)
拌沙窖	48.98	3.00	0.60	0.79
粮食窖	53.19	2.82	0.56	0.66
一年窖	37.65	3.98	0.80	0.99

从表4可知,拌沙窖产量(48.98 kg/甑)略低于粮食窖产量(53.19 kg/甑),显著优于一年窖的产量(37.65

kg/甑),且显著高于粮食窖和一年窖产量的平均值(45.42 kg/甑),说明拌沙酿造工艺对酒的产量影响并不大,而拌沙窖的产量却比质量相近的一年窖的产量高出10 kg左右,各种消耗都要比一年窖低得多。

综上所述,拌沙酿造工艺能克服泸型酒传统酿造工艺的一些不利之处,能显著改善糟醅风格,提高产品质量。所产酒质量接近一年窖产品质量,而且产量比粮食糟醅和回沙分开发酵要好得多。与一年窖相比,拌沙窖的生产成本要低得多,综合发酵期仅为4个半月,产量要高10 kg左右。也就是说,在相同时间内优质酒的产量提高了约300%,经济效益得以极大提高。

5 实施拌沙酿造工艺的重点事项及应对措施

在进行拌沙酿造工艺时应注意:①入窖糟醅酸度大而温度低(尤其在冬季),导致升温太慢,可能造成发酵不完全,应采取粮食糟醅收温高于传统酿造工艺收温。②入窖糟醅酸度大;因此得加强母糟和回沙滴窖降酸、粮食糟醅蒸馏降酸。③入窖糟醅水分大,所以要减少新入窖粮食糟醅量水用量。④回沙中的酒精分和香味物质会挥发损失,因此要在粮食糟醅出甑摊凉后才挖出回沙与之拌和,拌和时要均匀且迅速。⑤入窖糟醅易感染杂菌(尤其在天气较热的情况下),所以得加强环境清洁卫生管理,避免回沙感染杂菌。

6 结束语

拌沙试验达到了预期分析效果,能改善泸型酒传统生产发酵产香过程中的不利条件,在窖内体系中形成了“边糖化、边发酵、边产酸、边酯化”的多边发酵模式,显著缩短了优质酒的酿造周期。为优质酒的快速生产找到了一条切实可行的有效途径,在不扩大现有规模的条件下,保证了公司中高档产品销量急剧增长的需求。●

(上接第38页)

- 1993,20(3):180-183.
- [12] Lin N,Charpentier C and Rose A H. Production and tolerance in relation to phospholipid fatty-acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae* NCYC431[J]. J. Gen.Microbio. 1982,128:1447-1455.
- [13] Ernandes L F, Kunkee R E. Microbial interactions during wine production[M], New York:McGraw-Hill, 1991:37-68.
- [14] Cassey M, Leveau J K. Electrophoresis study of the macromolecular compound excreted by yeasts: Application to differentiation between strains of the same species[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1983,25:531-535.
- [15] Suutari M, Liukkonen K, Laakso S. Temperature adaptation in yeasts: The role of fatty acids[J]. J Gen Microbiol 1990, (136):1469-1474.
- [16] 杜连祥. 工业微生物学实验技术[M]. 天津:天津科学技术出版社.1992.137-170.
- [17] 余多慰,柯惟中,张晓飞,等. UV-A 区段紫外线照射对 DNA 影响的拉曼光谱分析[J].激光生物学报,2001,10(4):306-311.
- [18] 缪锦来,李光友,侯旭光,等. UV-B 辐射对南极冰藻中抗辐射物质的诱导作用[J]. 高新技术通讯,2002(4):92-96.
- [19] 赵华,靳胜英,代彦. 活酵母细胞衍生物的研究[M].北京:中国轻工业出版社.2002.716-719.
- [20] 赵华.UVB 照射对酵母菌生长及酒精发酵的影响[J].酿酒,2004(2):26-28.
- [21] 肖冬光,赵华,赵树欣,等. 酒用酸性蛋白酶在酒精生产中应用技术的研究[J]. 酿酒科技,2000(2):35-38.
- [22] 蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1988.293-294.