

浓香型白酒窖池细菌与古菌随窖龄变化的特征

何翠容¹, 吴冬梅⁴, 郑佳¹, 吴重德¹, 周荣清^{1,2,3}

(1.四川大学轻纺与食品学院, 四川 成都 610065; 2.四川大学制革清洁技术国家工程实验室, 四川 成都 610065;
3.国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000; 4.泸州职业技术学院, 四川 泸州 646005)

摘要: 窖龄是影响浓香型白酒品质和风格的关键因素,在优化 FISH (Fluorescence in situ hybridization)技术预处理条件的基础上,结合荧光显微镜的可视化信息,探究了不同窖龄浓香型白酒窖池中窖泥的细菌、古菌数量随窖龄变化的特征。结果表明,不同窖龄窖泥中细菌与古菌的数量存在显著差异($p < 0.05$),随着窖龄的增长有不同程度的增加。试验窖池窖泥中细菌和古菌数量最低,分别为 0.82×10^9 cells/g 和 0.78×10^9 cells/g, 300 年窖池窖泥中细菌数量最高,为 11.19×10^9 cells/g, 100 年窖池窖泥中古菌数量最高,为 12.61×10^9 cells/g。FISH 技术能较真实地反映出窖池中细菌与古菌的生长信息,为浓香型白酒窖池微生物群落结构的研究提供了一种快速、有效的检测手段。同时,窖池中微生物群落结构组成的研究,对新窖老熟工艺及名优白酒的生产均有着积极的指导意义。

关键词: FISH; 窖龄; 细菌; 古菌

中图分类号: Q815; TS262.31; Q93-3; TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2013)01-0027-04

Investigation on Bacteria and Archaea Communities in the Fermentation Pits of Nong-flavor Liquor As Pit Age Goes by

HE Cuirong¹, WU Dongmei⁴, ZHENG Jia¹, WU Chongde¹ and ZHOU Rongqing^{1,2,3}

(1.College of Light Industry, Textile & Food Engineering, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065; 2.National Engineering Lab for Clean Technology of Leather Manufacture, Chengdu, Sichuan 610065; 3.National Research Center of Solid-state Fermentation Engineering, Luzhou, Sichuan 646000; 4.Luzhou Vocational Technology Institute, Luzhou, Sichuan 646005, China)

Abstract: Pit age is a key factor influencing the quality and style of Nong-flavor liquor. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis combined with visual information of fluorescence microscope were employed to investigate the quantity change of bacteria and archaea communities in pit mud of different age based on the optimized pretreatment conditions for FISH. The results showed that there was significant difference in the amount of bacteria and archaea in pit mud of different pit age ($p < 0.05$) and both of them increased along with pit age. The lowest bacteria and archaea amount existed in new pit mud, 0.82×10^9 cells/g and 0.78×10^9 cells/g respectively. The highest bacteria amount reached up to 11.19×10^9 cells/g in 300-year pit mud and the highest archaea amount was 12.61×10^9 cells/g in 100-year pit mud. FISH could accurately reflect in situ information of bacteria and archaea in pit mud. Therefore, it is a rapid and effective method to study microbial communities in fermentation pits of Nong-flavor liquor. At the same time, the research on microbial community structures in the fermentation pits is of positive significance in guiding the aging of new pits and the production of high-quality liquor.

Key words: FISH; pit age; bacteria; archaea

窖池作为浓香型白酒酿造过程的关键设施之一,是气、液、固三相间进行物质交换及维持生化反应平衡的必需环境,同时也是酿酒特殊微生物菌群栖息繁衍的温床。“百年老窖”蕴藏的微生物群落结构特征及其变迁规律与酒质的关系一直吸引着众多学者的高度关注。20 世纪 50 年代后期,原中央人民政府食品工业部组织中国科学院等数家研究机构对泸州老窖生产工艺的研究初步揭示了

浓香型白酒的窖泥微生物是以嫌气细菌,尤其是嫌气芽孢杆菌为优势菌群^[1]。进一步研究揭示了产甲烷菌、甲烷氧化菌等菌群因窖龄不同而差异显著,在分离培养己酸菌、丁酸菌的基础上开发的己酸菌与产甲烷菌二元发酵人工培养技术^[2]促进了酿酒微生物学的快速发展。自 20 世纪 90 年代以来,采用可培法对窖泥中功能菌的量化研究进行了初步尝试^[3],随着分子生物学技术在微生物生

基金项目 国家自然科学基金项目(31171742) 国家固态酿造工程技术研究中心开发基金(GCKF201119)。

收稿日期: 2012-08-29; 修回日期: 2012-11-15

作者简介: 何翠容(1987-),四川绵阳人,硕士研究生。

通讯作者: 周荣清(1960-),男,教授,研究方向: 现代发酵技术及酶应用技术, E-mail: rqzhou@163.com。

优先数字出版时间: 2012-12-25; 地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20121225.1040.001.html>。

态学研究中的拓展,促进了免培技术在窖泥微生物研究中的应用。施思^[4]等应用 PCR-DGGE 技术研究浓香型白酒不同窖泥的微生物群落特征,结果表明,*Clostridium* 中一些不可培养的 *bacillus* 是泸州老窖窖泥中的优势菌群;罗惠波^[6]等和黄治国^[7]等采用 PCR-SSCP 技术研究窖泥中细菌、古菌多样性与窖龄的关系也得到了类似结果。

FISH 是以荧光素标记的寡核苷酸探针来探测生态系统中微生物细胞的一种技术。该技术结合了分子生物学的精确性和显微镜的可视性信息^[7],是快速、实时定量监测环境微生物的有效手段之一,已被广泛应用于水体^[8]、沉积物^[9]、活性污泥^[10]、土壤^[11]等微生物群落结构特征的评价。然而,该技术在窖泥方面的应用鲜见报道。

腐植酸(humic acid, HA)是干扰核酸延伸与杂交的重要因素^[12],其对 FISH 图谱存在严重影响。本实验针对浓香型白酒窖池窖泥中腐植酸对 FISH 产生自发荧光干扰的技术难题,比较了不同预处理方法对 FISH 的影响,并采用优化后的预处理条件,较真实地获得了窖泥中的微生物群落信息,揭示了不同窖龄窖池中细菌、古菌数量随窖龄的变化规律,为浓香型白酒窖池微生物群落结构的研究开辟了新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

窖泥样品:选取泸州老窖集团有限公司窖龄分别为试验窖(1年)、50年、100年、300年的窖池。取样方法:对窖池池壁作对角线,取对角线上的4个顶点及交叉点共5个点的窖泥各100.00g,混合均匀取100.00g窖泥待测。

试剂:HA (Sigma, 美国),多聚赖氨酸 (>15 000 D, Sigma, 美国),寡核苷酸探针 EUB338、ARCH915,由上海生工生物有限公司合成,详见表1。

仪器:FD-1A-50 冷冻干燥机(博医康,北京);Lambda 25 UV-vis 紫外分光光度计 (Perkin Elmer, 美国);JSM-7 500F 扫描电子显微镜 (JEOL, 日本);BX-51 荧光显微镜 (Olympus, 日本);CCD 为 Progress MFcool (Jenoptik, 德国);分析软件采用 FISH 3.0(Imstar, 法国)。

1.2 实验方法

1.2.1 窖泥中 HA 的提取及其含量的测定

参考文献[13]所述 HA 提取方法并稍加改进,具体操作如下:准确称取 25.00 g 样品置于 500 mL 三角瓶中,加入 250 mL 二氯甲烷/甲醇(V/V=2:1)混合液,混匀,静

置 24 h 后 4℃ 离心分离 (6000 r/min, 10 min), 弃上清液,沉淀再次加入 250 mL 二氯甲烷/甲醇(V/V=2:1)混合液,重复上述操作步骤 1 次,取沉淀;向沉淀中加入 100 mL 0.1 mol/L NaOH 与 0.1 mol/L Na₄P₂O₇ (V/V=1:1)的混合液,充氮后振荡 12 h;4℃ 离心分离(10000 r/min, 10 min),取上清液,沉淀用蒸馏水洗至 pH 7.0,收集洗涤液;合并洗涤液与上清液,石英过滤器过滤,加盐酸酸化至 pH 值为 1.0,4℃ 离心分离(10000 r/min, 10 min),弃上清液;沉淀溶解于 0.1 mol/L HCl 与 0.3 mol/L HF (W/V=1:50),振荡提纯 48 h 后去离子水透析 5 d,冻干,于 340 nm 处测定其吸光度^[14]。

1.2.2 样品预处理

方式一:准确称取 1.00 g 样品于无菌离心管中,加入 10 mL pH 7.2 的 1×PBS (7.605 g/L NaCl, 0.994/2.506 g/L Na₂HPO₄, 0.360/0.468 g/L NaH₂PO₄), 混匀,4℃ 离心分离 (10000 r/min, 10 min), 弃上清液,沉淀重复洗涤 3 次。

方式二:准确称取 1.00 g 样品于无菌离心管中,加入 10 mL pH 7.2 的 1×PBS, 混匀,4℃ 离心分离(800 r/min, 10 min),收集上清液,沉淀重复洗涤 3 次,得沉淀(1),合并上清液与洗涤液,经 4℃ 离心分离(10000 r/min, 10 min)后收集菌团。

方式三:准确称取 1.00 g 样品于无菌离心管中,加入 10 mL pH 7.2 的 1×PBS, 混匀,加入 0.2 mL 0.1 mol/L 的 Al₂(SO₄)₃ 溶液,4℃ 离心分离(800 r/min, 10 min),收集上清液,重复以上操作 3 次,得沉淀(2);合并上清液与洗涤液,4℃ 离心分离(10000 r/min, 10 min)后收集菌团。

1.2.3 扫描电镜(SEM)

向 1.2.2 的沉淀(1)与沉淀(2)中加入 4% 戊二醛 10 mL,混匀,静置过夜;次日以 1×PBS 清洗 2~3 次,沉淀中加入 2% 戊二醛 10 mL,混匀,静置 1 h;4℃ 离心分离(10000 r/min, 10 min),弃上清液,沉淀用 1×PBS 洗涤 2~3 次;点样至 4 mm×6 mm 多聚赖氨酸包被的玻片,以 30%、50%、80% 及 100% 乙醇依次梯度脱水 10 min, 100% 乙酸异戊酯置换 10 min;CO₂ 临界点干燥,离子溅射镀金,JSM-7 500F 观察。

1.2.4 荧光原位杂交

参考张伟^[15]等所述方法,选择绿光激发(WG534-558 nm),计数发红色荧光的菌体为目的菌数,随机拍摄 15 个视野。以不添加探针的样品作为阴性对照,按下式计算样品菌体数:

$$N = n \times \frac{S_1}{S_2} \times \frac{V_1}{V_2} \times D$$

式中:N——菌体总数,个/g;

n——每个视野中的平均菌数;

S₁——涂布面积,μm²;

表1 寡核苷酸探针

探针	序列(5'-3')	目标微生物	参考文献
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Bacteria	Eickhorst & Tippkötter, 2008
ARCH915	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Archaea	Jupraputtasria <i>et al</i> , 2005

S_2 ——每个视野的面积, μm^2 ;

V_1 ——样品总体积, μL ;

V_2 ——涂布体积, μL ;

D ——稀释倍数。

1.2.5 数据处理

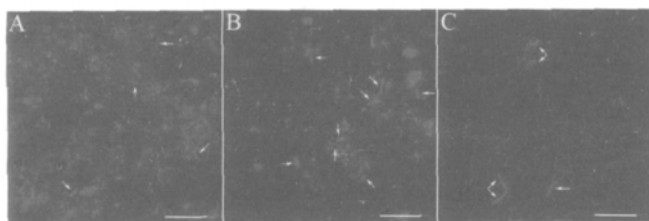
本文采用 SPSS17.0 进行方差分析。

2 结果和讨论

2.1 窖泥中 HA 含量及不同预处理方式下的 FISH 图像

研究表明,待检样品中的某些微生物、有机质及矿物质等^[16]是影响 FISH 图像质量的重要因素,HA 便是其中之一。Bachoon^[17]等认为其含量高于 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 便会干扰 DNA 分子的杂交,需进一步纯化。浓香型白酒窖池中窖泥样品具有特殊性与复杂性,HA 及其类似物等干扰组分含量较高^[18]。因此,本实验研究了 HA 含量对 FISH 图谱的影响。经测定,试验窖和窖龄为 50 年、100 年、300 年窖池的窖泥中 HA 含量分别为 $3.63 \pm 0.23 \text{ mg/g}$ 、 $0.92 \pm 0.14 \text{ mg/g}$ 、 $1.92 \pm 0.23 \text{ mg/g}$ 、 $2.95 \pm 0.16 \text{ mg/g}$, 均远高于核酸杂交的阈值。因此,必要的前处理是保障 FISH 图谱真实、可辨的重要基础。

对窖泥的不同处理方式的研究结果表明,样品不经任何预处理直接固定,菌体包埋于窖泥中,FISH 图像质量差、自发荧光强、计数误差大(图 1A);样品经低速离心提取菌悬液,根据 HA 的含量不同,稀释至适当浓度,其 FISH 图片成像质量高,自发荧光少,菌体形态清晰,减少了计数结果的误差(图 1B);添加 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 絮凝与低速离心结合降低窖泥 HA 含量^[19],其 FISH 图像清晰,自发荧光干扰减弱。然而,检出的菌体数量明显降低(图 1C),难以较真实地反映窖泥中微生物群落的原位信息。



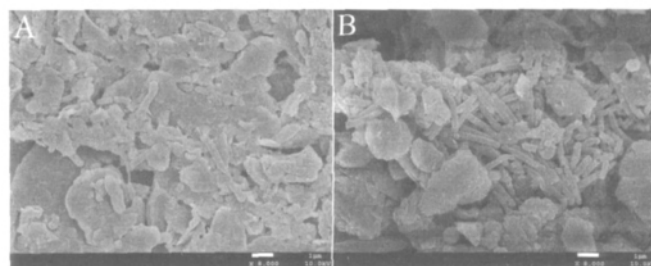
注:箭头所指为目标微生物,横线代表 $10 \mu\text{m}$

图 1 3 种不同预处理方式下的窖泥 FISH 图像

2.2 不同预处理方式下的 SEM 图像

取方式二和方式三的离心沉淀物,通过 SEM 观察的结果显示,样品经 800 r/min 离心洗涤后,沉淀中吸附、包埋着部分菌体,难以提取完全,可观察到少量菌体(图 2A);样品加入 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 絮凝后, 800 r/min 离心,其沉淀表面堆积了较多菌体,借助 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 絮凝和改变其电荷的作用^[20],虽然能有效去除 HA,但包埋和吸附作用导致

菌体损失较多,其 FISH 定量结果误差大(图 2B)。



A. 预处理方式二; B. 预处理方式三

图 2 不同预处理方式下的 SEM 图像

2.3 不同窖龄窖泥中的细菌与古菌数量及其变化特征

选取细菌与古菌通用探针 EUB338 和 ARCH915 检测经方式二处理的不同窖龄窖泥样品,均有荧光信号检出(图 3),菌体数量及其变化规律见图 4。

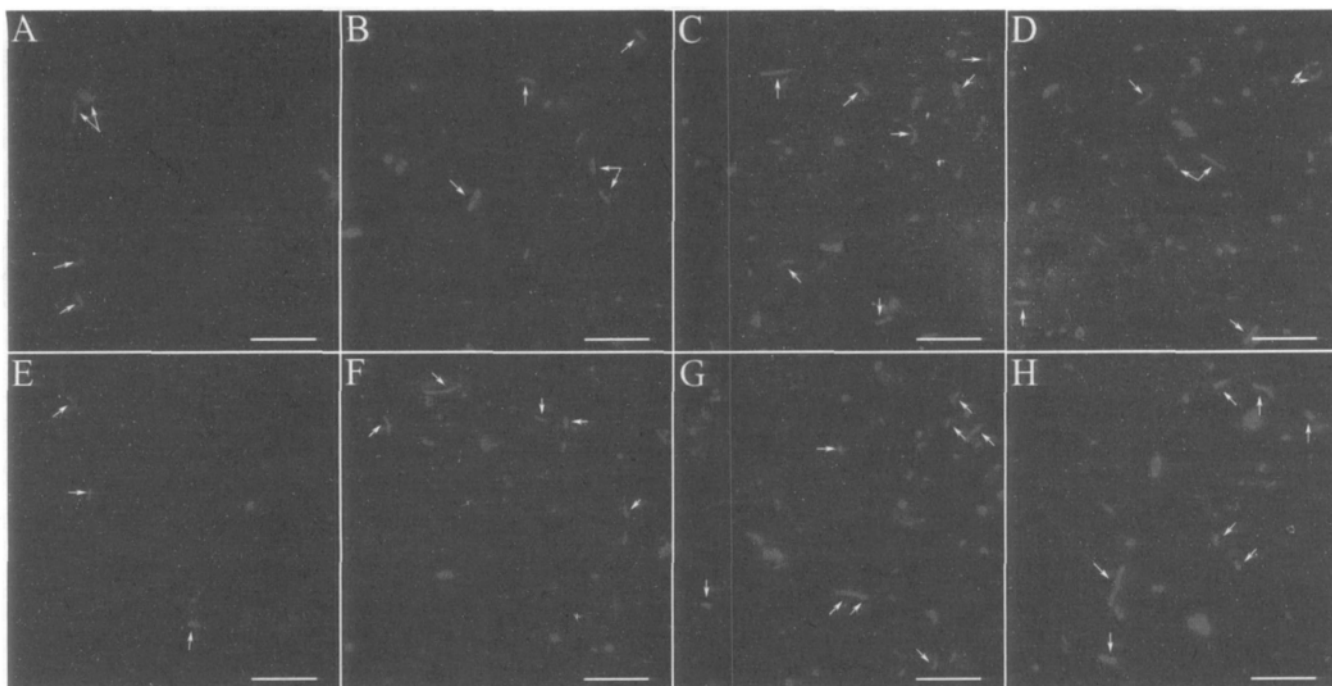
基于 FISH 技术的检测结果表明,窖泥中的细菌与古菌数量随窖龄不同而呈现较显著差异($p < 0.05$),相同窖龄窖泥中的细菌、古菌数量差异性不明显。试验窖中细菌和古菌数最低,分别为 $0.82 \times 10^9 \text{ cells/g}$ 和 $0.78 \times 10^9 \text{ cells/g}$,300 年窖池中细菌数最高,为 $11.19 \times 10^9 \text{ cells/g}$,100 年窖池中古菌数最高,为 $12.61 \times 10^9 \text{ cells/g}$ 。

鉴于浓香型白酒混蒸续糟、不间断发酵的工艺特点,酿酒过程中微生物生长代谢产生的有机酸类和醇类等物质在滴窖过程中随黄水下渗至窖池底部,形成高酸度、高乙醇及微氧的环境,窖泥微生物得以不断驯化和变异,从而使得耐酸菌、醇耐受菌及厌氧菌滋生^[21]。因此,随窖龄的增加,窖池微生物的数量与种类不断丰富,此结论与黄治国^[6]等采用 PCR-SSCP 技术研究不同窖龄浓香型白酒窖池古菌群落的变化规律的研究结果相吻合。

试验窖池中的细菌、古菌数量远低于百年老窖。新窖泥较大地保留了窖泥原材料的性质和特色,其微生物群落结构较单一。随着发酵次数的增多及使用时间的延长,相关菌群在糟醅、窖泥、黄水间不断地进行着物质交换与能量传递,最终趋于动态平衡^[21]。同一窖池中细菌菌群与相应古菌菌群关系十分密切,二者间的迁徙、演替特征较为相似。文献^[3-4,22]报道了产甲烷菌与梭状芽孢杆菌属的己酸菌间存在着“种间氢转移”的互营共生关系,共培时有利于浓香型白酒主体香味物质己酸乙酯的生成,且在新窖老熟及提高酒质方面起到促进作用,此结论与本研究中细菌与古菌的数量变化特征相互佐证。

3 结论

浓香型白酒窖池中的窖泥样品因其所处高酸度、高乙醇和微氧环境而具有特殊性与复杂性,目前采用的可培法因难以较全貌地表征窖池微生物群落结构特征而具有局限性。本实验在优化 FISH 技术预处理条件的基



注:A~D:细菌;E~H:古菌(A:试验窖;B:50年;C:100年;D:300年;E:1年;F:50年;G:100年;H:300年)

图3 不同窖龄窖泥样品中细菌及古菌的 FISH 图像

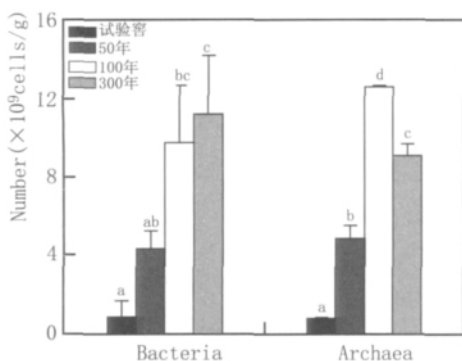


图4 窖池中细菌与古菌随窖龄的变化规律

基础上揭示了浓香型白酒窖池中细菌、古菌数量随窖龄的特征性变化规律。结果表明,窖泥中的细菌、古菌数量随窖龄的延长而增加,相同窖龄窖池中细菌菌群与相应古菌菌群关系密切,随窖龄增长而不断变化,最终趋于动态平衡。

致谢:感谢四川省人民医院皮肤病防治实验室在实验仪器使用方面提供的支持和帮助。

参考文献:

[1] 李大和.泸州老窖国之瑰宝[J].酿酒科技,2004(3):91-92.
 [2] 赖高淮,李恒昌.科技进步与名白酒的发展[J].酿酒科技,1992(2):58-61.
 [3] 吴衍庸,薛堂荣,陈绍蓉,等.五粮液老窖厌氧菌群的分布及其作用的研究[J].微生物学报,1991,31(4):299-307.
 [4] 岳元媛,张文学,刘霞,等.浓香型白酒窖泥中兼性厌氧细菌的分离鉴定[J].微生物学通报,2007,34(2):251-255.

[5] 施思,王海英,张文学,等.浓香型白酒不同窖泥的微生物群落特征分析[J].酿酒科技,2011(5):38-41.
 [6] 罗惠波,甄攀,黄治国.浓香型白酒窖池细菌群落[J].微生物学通报,2010,37(11):1621-1627.
 [7] 黄治国,甄攀,罗惠波.浓香型白酒窖池古菌群落研究[J].西南大学学报:自然科学版,2010,32(12):91-96.
 [8] Moter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms[J].Journal of Microbiological Methods, 2000,41:85-112.
 [9] Garcia-Armisen T, Servais P. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by Fluorescent in situ hybridization[J]. Journal of Microbiological Methods,2004,58:269-279.
 [10] Fazi S, Amalfitano S, Pizzetti I, et al. Efficiency of fluorescence in situ hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content[J]. Systematic and Applied Microbiology,2007,30:463-470.
 [11] Wilén BM, Onuki M, Hermansson M, et al. Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability[J]. Water Research,2008,42:2300-2308.
 [12] Puglisia E, Fragoulis G, Ricciuti P, et al. Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.)[J]. Chemosphere, 2009,77:829-837.
 [13] Barot NS, Bagla HK. Extraction of humic acid from biological matrix-dry cow dung powder[J].Green Chemistry Letters and Reviews, 2009,4(2):217-221.

(下转第 38 页)

- [J].酿酒科技,2012(7):22-26.
- [12] 王道平,杨小生.习酒香气成分 GC-MS 分析[J].酿酒科技,2009(11):111-112.
- [13] 肖世政.试论浓香型习酒的质量与风格[J].中国酿造,2009,213(12):100-102.
- [14] 聂庆庆.洋河绵柔型白酒风味研究[D].无锡:江南大学,2012.
- [15] 吴兆征,范志勇,左国营,王汉臣. GC-MS 直接进样定性定量分析白酒的探讨[J].酿酒,2009,36(6):88-89.
- [16] 王然,李蕊,宋焕禄.GC-O-MS 对比两种浓香型白酒中的挥发性成分[J].北京工商大学学报(自然科学版),2012,30(1):41-45.
- [17] 聂庆庆,范文来,徐岩.洋河系列绵柔型白酒香气成分研究[J].食品工业科技,2012,33(12):68-74.
- [18] 柳军.口子窖和剑南春白酒香气物质研究[D].无锡:江南大学,2008.
- [19] 靳争京.贵州省白酒中糠醛含量初探[J].广东微量元素科学,2001,8(2):68-69.
- [20] 许汉英.白酒中糠醛含量与香型之间关系的研究[J].酿酒,2002,29(5):37-39.
- [21] 李维青.试论浓香型白酒的流派[J].酿酒,2011,38(4):3-8.
- [22] 范文来,徐岩.白酒 79 个风味化合物嗅觉阈值测定[J].酿酒,2011,38(4):80-84.
- [23] Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M., Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*) [J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,1990,38(2):471-477.
- [24] 段亮亮,田兰兰,郭玉蓉,邓红,李卓,王晓宇.采用主成分分析法对六个苹果品种果实香气分析及分类[J].食品工业科技,2012,33(3):85-88.
- [25] Salo, P.; Nykänen, L.,Suomalainen, H., Odor thresholds and relative intensities of volatile aroma components in an artificial beverage imitating whiskey[J].Journal of Food Science,1972,37(3):394-398.
- [26] ASTM, Compilation of Odor and Taste Threshold Values Data [M].American Society For Test Mate,1978.
- [27] Guth, H., Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,1997,45(8):3027-3032.
- [28] Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G.; Ling, L. C., Contribution of volatiles to rice aroma [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1988,36(5):1006-1009.
- [29] Ohloff, G., Perfumer and Flavorist ,1978,1(3):11-22.
- [30] Ruth, J. H., Odor thresholds and irritation levels of several chemical substances: a review[J]. American Industrial Hygiene Association Journal,1986,47(3):A142-151.
- [31] Fan, W. Qian, M. C., Identification of aroma compounds in Chinese 'Yanghe Daqu' liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry[J]. Flavour and Fragrance Journal,2006,21(2):333-342.
- [32] Tressl, R.;Drawert, F..Biogenesis of banana volatiles[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry ,1973,21:560.
- [33] 赵书圣,范文来,徐岩,张国强,徐钦祥,李志强.酱香型白酒生产酒醅中呋喃类物质研究[J].中国酿造,2008,198(21):10-13.
- [34] Steinke, R. D.,Paulson, M. C.,Phenols from grain.The production of steam-volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry ,1964,12:381-387.
- [35] Spinnler, H. E.; Martin, N.; Bonnarne, P., Generation of sulfur flavor compounds by microbial pathway. In Heteroatomic Aroma Compounds[M].Reineccius, G. A.;Reineccius, T. A., Eds. Washington:American Chemical Society,D.C.,2002,826:54-72.

(上接第 30 页)

- [14] Howeler M, Ghiorse WC, Walker LPA. Quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost[J].Journal of Microbiological Methods, 2003,54:37-45.
- [15] 张伟,刘丛强,刘涛泽,等.荧光原位杂交在喀斯特山地土壤硫酸盐还原菌检测中的应用[J].微生物学通报,2008,35(8):1273-1277.
- [16] Li Y, Dick WA, Tuovinen OH. Evaluation of fluorochromes for imaging bacteria in soil[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2003,35:737-744.
- [17] Bachoon DS, Otero E, Hodson RE. Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization[J]. Journal of Microbiological Methods,2001,47:73-82.
- [18] 苏慧玉,钟雨,沈勇.窖泥中的水分、腐植酸对窖泥质量的影响[J].酿酒,1996(5):11.
- [19] 杨忠莲,高宝玉,岳钦艳,等.铝盐混凝剂的混凝效果与残留铝含量和组分之间的关系研究[J].环境科学,2010,31(6):1542-1547.
- [20] 周勤,肖锦,朱云.硫酸铝去除给水中腐植酸机理研究[J].工业水处理,2000,20(5):18-20.
- [21] 余有贵,李侦,熊翔,等.窖泥微生态的主要特征研究[J].食品科学,2009,30(31):258-261.
- [22] 吴衍庸,卢世晰,刘光桦,等.利用窖泥甲烷菌与己酸菌二元发酵技术提高泸型曲酒质量的研究[J].食品工业与发酵,1990(6):2-6.