

一株具有嗜杀性能的柠檬形克勒克酵母 KY-13c的应用特性研究

武晋海^{1,2}, 张列转³, 杨文晶¹, 董福⁴, 冯叙桥^{1,*}

(1.渤海大学食品科学研究院, 辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁锦州 121013;

2.山西师范大学食品科学学院, 山西临汾 041004;

3.山西省临汾市人民医院, 山西临汾 041000;

4.沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要:对一株从柿果园分离的具有嗜杀性能的柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata*)KY-13c进行了发酵特性研究,包括在不同pH、温度、酒精度、糖度下的生长规律和嗜杀能力分析,并对其发酵能力及对敏感菌株汉逊异常酵母TJ09(*Hanseniospora uvarum*)在发酵液中的抑制作用进行了研究。结果表明,KY-13c最适生长条件为pH5.5,温度30℃,发酵液还原糖10%,最适嗜杀能力条件为pH6.0,温度35℃,发酵液还原糖10%;发酵过程中酒精的积累会对KY-13c的生长及嗜杀能力产生抑制作用;经活化KY-13c液体培养物,以10%接种于敏感菌株汉逊异常酵母TJ09对数期发酵液,KY-13c能在5 d内形成新的生长优势,数量达到 10^{10} CFU/mL;发酵第8 d,残糖和二氧化碳失重达稳定值,分别为3.1 g/L和5.6 g/L,表现出了较强的发酵性能。

关键词:柿果酒,嗜杀酵母,应用特性,发酵能力

Study on application of a strain of *Kloeckera apiculata* KY-13c with killer performance

WU Jin-hai^{1,2}, ZHANG Lie-zhuan³, YANG Wen-jing¹, DONG Fu⁴, FENG Xu-qiao^{1,*}

(1.Food Science Research Institute of Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China;

2.School of Food Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China;

3.Linfen People's Hospital, Linfen 041000, China;

4.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Fermentation characteristics of killer yeast KY-13c (*Kloeckera apiculata*) isolated from a persimmon orchard were investigated for possible use in persimmon wine production. The growth and killer ability of KY-13c were analyzed under different pH, temperatures, alcohol contents and sugar degrees. Furthermore, its fermentation ability and inhibition function on sensitive yeast TJ09 (*Hanseniospora uvarum*) in fermentation liquid were also studied. The results showed that the optimal growth condition for KY-13c was pH5.5, temperature 30 °C, and 10% reducing sugar in the fermentation liquid and its optimal killer ability was observed under conditions of pH6.0, temperature 35 °C, and 10% reducing sugar in the fermentation liquid. Alcohol accumulation during fermentation process resulted in inhibition on both growth and killer ability of KY-13c. Nevertheless, KY-13c reformed new dominated growth as indicated by its number reached 10^{10} CFU/mL within 5 days after its activated culture being inoculated by 10% to the end-of-logarithmic fermentation liquid of sensitive yeast strain TJ09. And on the 8th day after the inoculation, KY-13c showed strong fermentation capacity with residual sugar and carbon dioxide loss values stable at 3.1 g/L and 5.6 g/L, respectively.

Key words: persimmon wine; killer yeast; application characteristics; fermentation capacity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0151-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.024

嗜杀酵母(Killer yeast)能通过产生嗜杀因子(Killer toxins)而导致发酵体系中敏感细胞代谢阻滞

或死亡^[1-2],从而抑制发酵体系中的敏感菌株和敏感的有害微生物,为自身成为发酵优势菌株创造条件。

收稿日期: 2015-03-31

作者简介: 武晋海(1975-),男,博士,副教授,研究方向:食品生物技术, E-mail: jinhaiwu@aliyun.com。

* 通讯作者: 冯叙桥(1961-),男,博士,教授,研究方向:农产品贮藏与加工工程, E-mail: feng_xq@hotmail.com。

基金项目: 山西省科技厅攻关计划(农业)项目(20130311029-1)。

发酵工业中嗜杀酵母的合理利用,可以净化发酵体系,防止非生产酵母菌污染,从而为发酵产品质量提供保障^[3]。嗜杀酵母可以从多种途径分离,有研究者已对葡萄酒液^[4]、绿色橄榄^[5]、酒厂环境^[6]中存在的嗜杀菌株进行了分离鉴定。研究表明,嗜杀酵母菌株涵盖了所有酵母属^[5],并且各类嗜杀酵母在环境中以一定比例存在^[6]。已有研究中没有发现酿酒酵母发酵环境中分离出的嗜杀酵母对酿酒酵母具有抑制作用,相反,研究发现嗜杀酵母对发酵中存在的有害酵母却有明显的杀灭作用^[6-8]。这一特性为更有效利用嗜杀酵母的嗜杀功能提供了可能。有研究者利用原生质体融合构建了具有嗜杀特性的酿酒酵母菌株,应用于啤酒发酵工业及焙烤前发酵工艺^[3,9-10];而有的研究者则从另一个角度对嗜杀酵母利用进行研究,即对嗜杀因子进行纯化,但提纯程序复杂且产量较低,只对纯化嗜杀因子的广谱性、高效抗真菌特性进行了研究^[11-13],所以从目前的情况来看,直接使用嗜杀酵母是现在应用的主要方式。另外,嗜杀酵母还可作为生物防治剂用于控制有害微生物的生长。在实际应用研究中,已经对海产品有害酵母^[14]、橙子青霉菌感染^[15]和奶酪发酵中有害酵母^[16]的控制,都起到了有效的防治作用。

本文对从柿果园分离到的嗜杀菌株KY-13c (*Kloeckera apiculata*) 在柿果酒发酵过程中的作用,特别是对嗜杀菌株生长及嗜杀因子产生的条件以及嗜杀菌株的发酵力情况等,进行了系统研究,以期嗜杀菌株在柿果酒发酵中的生产应用提供参考。

1.1 材料与仪器

新鲜成熟色泽一致的牛心柿 (*Diospyros kaki* Thunb.) 2014年9月22日采于山西华莲柿业合作社柿果园,采用硬质塑料水果包装箱托运直实验室;嗜杀菌株 分离于山西华莲柿业合作社柿果园,经形态学特征观察、碳源同化、糖发酵实验^[9],以及Biolog微生物自动分析系统,鉴定为*Kloeckera apiculata*,采用固体酵母培养基YPD (1%酵母膏,2%蛋白胨,2%葡萄糖,2%琼脂粉,121 ℃,20 min灭菌) 冰箱贮藏;敏感菌株汉逊异常酵母TJ09 (*Hanseniospora uvarum*) 天津科技大学教育部食品营养与安全重点实验室提供,由山西师范大学食品科学学院微生物实验室超低温冰箱(-90 ℃) 保藏;实验过程中所有菌株 使用前平板培养挑取单个菌落至柿果汁培养液,200 r/min摇床培养过夜进行活化。

JYL-A100型打浆机 九阳股份有限公司;非织滤布 莱芜市力达土工材料有限公司;抗坏血酸 食品添加剂,天津胜同鑫化工贸易有限公司;果胶酶 食品添加剂,南宁庞博生物工程有限公司;焦亚硫酸钾 食品添加剂,武汉万荣科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 柿果汁培养液的制备 将柿果洗净、去皮、打浆机打浆,然后采用200目非织滤布过滤。打浆过程中添加0.4%抗坏血酸,防止原料氧化。过滤前加入0.2%果胶酶,以促进过滤;加入0.1 g/L焦亚硫酸钾抑制有害细菌的生长。

1.2.2 KY-13c最适生长条件的确定

1.2.2.1 最适pH的测定 起始还原糖浓度10%,酒精度为0,发酵温度为25 ℃条件下,在不同pH4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,每个条件3个重复,摇床培养5~7 d。

1.2.2.2 最适生长温度的确定 取250 mL三角瓶,每支加150 mL柿果汁培养液,起始pH5.5,酒精度为0,还原糖浓度10%条件下,设定不同温度20、25、30、35、40 ℃,每个温度3个重复,摇床培养5~7 d。

1.2.2.3 最适酒精浓度的确定 起始pH5.5,还原糖浓度10%,发酵温度为30 ℃,不同酒精浓度5%、7%、9%、11%、13%、15%,每个浓度3个重复,摇床培养5~7 d。

1.2.2.4 最适还原糖浓度的测定 发酵温度为30 ℃,起始pH5.5,酒精度为0,在不同还原糖浓度5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%,每个浓度3个重复,摇床培养5~7 d。

1.2.3 嗜杀能力测定 取一定量发酵液,用浊度计550 nm测光密度,即OD值,作为待测菌株生长指标。取5 mm直径无菌滤纸,编号,充分浸润于上述不同发酵液培养1 min后取出,在超净工作台晾干,备用。敏感菌株活化后,取1 mL均匀涂布于固体平板表面。一个固体平板表面放置5片待测滤纸片,30 ℃静置培养2 d,用游标尺测量抑菌圈直径,并取平均值^[9]。

1.2.4 菌株发酵能力测定 取3个250 mL三角瓶,每支加150 mL柿果汁培养液,调起始pH5.5,还原糖浓度10%,115 ℃,灭菌15 min,冷却备用。三角瓶接种经活化待测嗜杀菌株培养液10%,30 ℃振荡培养,每隔8 h测量三角瓶重量,相对减少值作为二氧化碳失重值。培养方法同上,每隔8 h取10 mL发酵液采用斐林试剂滴定法测定还原糖含量作为残糖量值。

1.2.5 柿果汁发酵液中嗜杀菌株数量变化测定 取3个250 mL三角瓶,每支加150 mL柿果汁培养液,调起始pH5.5,还原糖浓度10%,115 ℃,灭菌15 min,冷却备用。三个三角瓶接入经活化的敏感菌株培养液10%,30 ℃振荡培养24 h,然后,接入经活化嗜杀菌株培养液10%。定时取上述培养液,适度稀释,涂平板于均匀涂布敏感菌株培养液(1 mL)的固体平板表面,30 ℃培养,2 d,记录抑菌圈数量,即为嗜杀酵母数量。

1.2.6 数理统计方法 采用Win7 Office Excel系统进行数据方差分析及作图。

2 结果与讨论

2.1 pH对菌株生长及嗜杀能力的影响

图1结果表明,KY-13c适宜偏酸环境生长,最适pH为5.5;发酵液嗜杀能力在pH6达到最大值16 mm。在相同pH条件下,微生物生长与嗜杀因子产生表现出趋势的一致性,随着pH升高,生长代谢及嗜杀因子产生先是加强,分别在pH达到5.5和6.0时,两都开始减弱。所以,从有利于产生嗜杀因子来说,KY-13c生长代谢更适宜于在一定的酸性环境下进行。适宜酸性环境是酵母生长的共性^[4,10],因此,在偏酸性条件下,有利于嗜杀因子的产生,从而对酵母KY-13c的发酵应用也是有利的。因此以后的实验都在pH5.5的条件下进行。在柿果酒发酵过程,可通过调整发酵体系酸度强弱

的方式,来调节嗜杀酵母的生长或嗜杀因子的产生。

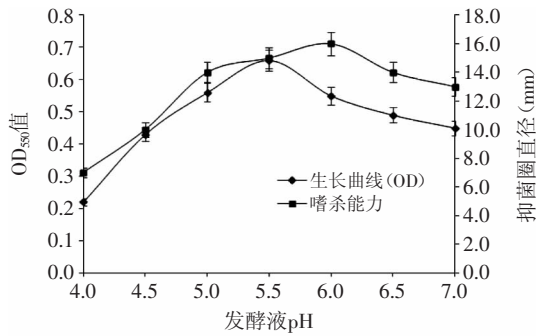


图1 发酵液pH对KY-13c生长曲线及嗜杀能力的影响

Fig.1 Effect of fermentation liquid pH on growth curve and killing ability of KY-13c

2.2 温度对菌株生长及嗜杀能力的影响

对嗜杀酵母KY-13c在pH5.5柿果培养液中、不同温度下进行培养的生长规律及发酵液嗜杀能力的研究结果见图2,表明KY-13c最适生长温度为30℃,此时抑菌圈直径达17 mm,但发酵温度为35℃时嗜杀能力最佳,为兼顾KY-13c生物量最佳,同时有一定的嗜杀能力,所以后续实验中采用30℃进行。不同温度下培养,KY-13c的生长表现出由低到高再到低的变化趋势,但嗜杀能力却随着温度变化幅度突出,从20~25℃产嗜杀因子能力加强,从25~30℃保持恒定值,而30~35℃又开始急速增强,35℃后再减弱,表现一定的突变效应。建议在KY-13c的实践应用中,可以快速升温,增加嗜杀因子的产量,使发酵体系有害酵母减少,或抵制有害酵母的生长,然后再降温回到正常酵母生长温度。

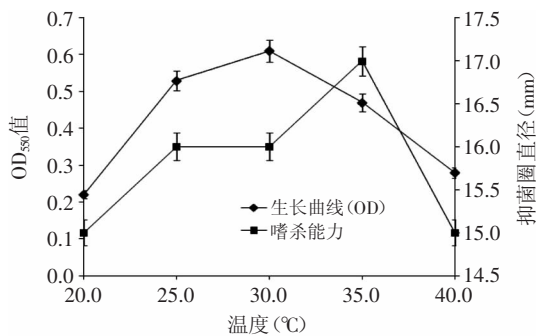


图2 发酵温度对KY-13c生长曲线及嗜杀能力的影响

Fig.2 Effect of fermentation liquid temperature on growth curve and killing ability of KY-13c

2.3 酒精浓度对菌株生长及嗜杀能力的影响

嗜杀酵母KY-13c在不同起始酒精度的柿果培养液中pH5.5、温度30℃培养条件下,生长规律及发酵液嗜杀能力结果见图3。由图3可知,随着培养液中起始酒精量的增加,对KY-13c的生长及嗜杀因子的产量起到了明显的抑制作用($p < 0.05$),并呈现出直线趋势。可以预见,在不添加酒精的培养液中,由于在发酵前期酒精含量较少,会有一定量的嗜杀因子代谢积累。在发酵后期,随着酒精产量的增加,微生物的生长和嗜杀因子的产生也在减少。因此,在生产

实践中,如果在发酵后期出现杂酵母的感染,可以采用减少发酵底料酒精浓度的方法,消除酒精的产物反馈抑制作用^[17],减少酒精对嗜杀酵母的抑制作用,使嗜杀因子产量提高,从而抑制其他酵母的生长。

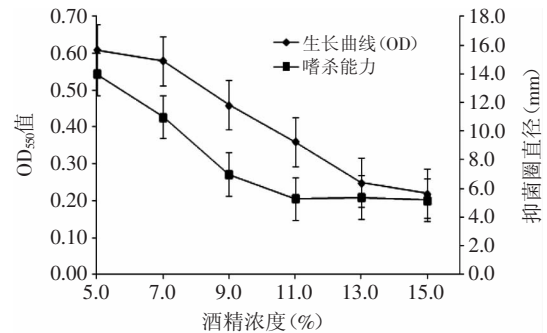


图3 发酵液酒精浓度对KY-13c生长曲线及嗜杀能力的影响

Fig.3 Effect of alcohol concentration of fermented liquid on growth curve and murderous ability of KY-13c

2.4 还原糖浓度对菌株生长及嗜杀能力的影响

在pH5.5、30℃的不同起始还原糖浓度的柿果培养液中,嗜杀酵母KY-13c的生长规律及发酵液嗜杀能力的变化情况(图4)说明,KY-13c生长及嗜杀能力在还原糖浓度为10%时都达到最佳状况,分别达到0.62、16.8 mm。还原糖浓度为15%时,KY-13c生长及嗜杀能力分别为0.52、14.0 mm,随着还原糖浓度增加对其生长和嗜杀因子的产生会造成抑制。柿果原料的含糖量一般在15%左右^[18],根据本实验结果要求的10%最适糖度来推测,会对KY-13c的生长和产嗜杀因子能力形成抑制作用。在生产实际中,建议在柿果打浆过程中加入适量的水来稀释糖度,使嗜杀酵母达到最佳生长代谢及嗜杀因子产生条件,这样不仅能克服后续环节中高糖度带来的不良作用,同时也方便打浆操作的顺利进行,这样操作是否对产品风味有影响有待进一步研究。

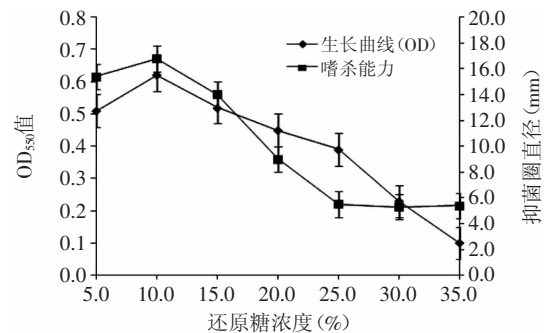


图4 发酵液还原糖浓度对KY-13c生长曲线及嗜杀能力的影响

Fig.4 Effect of reducing sugar concentration in fermentation liquid on growth curve and killing ability of KY-13c

2.5 KY-13c菌株发酵能力

为了进一步提高KY-13c生长代谢及产嗜杀因子能力,探究其发酵规律,对嗜杀酵母KY-13c在pH5.5、30℃和起始还原糖浓度10%柿果培养液中的生长规

律及发酵液嗜杀能力进行了研究(图5)。结果表明,在第4~6 d,残糖量直线下降,达到糖代谢的最旺盛时期,而二氧化碳失重相对平缓;发酵第8 d,二氧化碳失重达5.6 g/L,失重率达0.7 g/L·d,同时,残糖为3.1 g/L,降糖效率达0.39 g/L·d。在柿果酒发酵中可建立嗜杀酵母生长代谢动力模型,直观观察嗜杀酵母代谢情况。

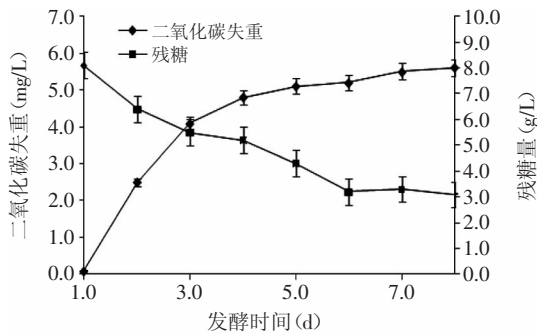


图5 KY-13c发酵能力(二氧化碳失重、残糖)测定
Fig.5 Determination of fermentation ability of KY-13c by CO₂ weight and amount of residual sugar

2.6 柿果汁发酵液中嗜杀菌株数量变化测定结果

为了研究KY-13c作为生物防治剂的有效性,将10%嗜杀酵母KY-13c菌液接入对数期生长(10¹⁰ CUF/mL)敏感菌株TJ09(*Hanseniospora uvarum*)发酵液中,KY-13c生长规律见图6。结果表明,KY-13c随着发酵时间延长,其数量变化近似直线增加,到第5 d检测为10个lg值。可以看出,KY-13c能在敏感菌株大量存在时(10¹⁰ CUF/mL),不受到抑制甚至死亡,并能5 d内完全形成生长优势,10¹⁰ CUF/mL。在实际应用中,如果非酒精发酵体系受到杂酵母严重感染,在不影响发酵体系中有益菌株的情况下,可以采用添加KY-13c,以抑制和杀灭杂酵母,作为生物防治剂使用。

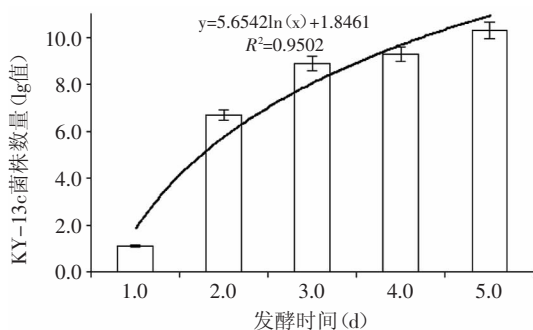


图6 在对数期敏感菌株TJ09(*Hanseniospora uvarum*)发酵液中嗜杀菌株KY-13c活菌数变化曲线

Fig.6 CFU (lg) curve of KY-13c in lg-phase in sensitive strain TJ09(*Hanseniospora uvarum*) fermentation liquid

3 结论

综上所述,选育的柿果酒嗜杀酵母KY-13c最适生物生长pH与最适产嗜杀因子趋势相同,但其生物生长更适宜偏酸环境。KY-13c最适生长温度与最适产嗜杀因子温度不同,并且嗜杀因子高于酵母菌生长适宜范围。KY-13c生物生长和嗜杀因子的产生都

明显受到酒精的抑制。KY-13c最适生长和产嗜杀因子的最适糖浓度为10%,低于柿果含糖量。KY-13c二氧化碳失重与残糖量测定表明,其有较高发酵能力。KY-13c能在敏感菌株汉逊异常酵母TJ09(*Hanseniospora uvarum*)对数期发酵液中从非优势菌变为优势菌。

参考文献

- [1] Santos A, Alonso A, Belda I, et al. Cell cycle arrest and apoptosis, two alternative mechanisms for PMKT2 killer activity [J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 50:44-54.
- [2] Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEBS Letters, 1993, 333(1):169-174.
- [3] 鲍晓明,秦玉静,高东. 电融合构建嗜杀啤酒酵母及其发酵性能的研究[J]. 工业微生物, 1995, 25(4):25-31.
- [4] 杨东升,刘伟,谢晓红,等. 野生嗜杀酿酒酵母的分离筛选[J]. 中国酿造, 2010, 218(5):136-138.
- [5] Hernández A, Martín A, Córdoba M G, et al. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives[J]. International journal of food microbiology, 2008, 121(2):178-188.
- [6] Sangorrín M P, Lopes C A, Giraud M R, et al. Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries[J]. International journal of food microbiology, 2007, 119(3):351-357.
- [7] Buzzin P, Berardinell S, Turchetti B, et al. Fingerprinting of yeasts at the strain level by differential sensitivity responses to a panel of selected killer toxins[J]. Systematic and applied microbiology, 2003, 26(3):466-470.
- [8] Carreiro S C, Pagnocca F C, Bacci M, et al. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests[J]. Folia microbiologica, 2002, 47(3):259-262.
- [9] İzgü F, Altınbay D, Derinel Y. Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*[J]. Food microbiology, 2004, 21(6):635-640.
- [10] Bortol A, Nudel C, Fraile E, et al. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion[J]. Applied microbiology and Biotechnology, 1986, 24(5):414-416.
- [11] Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, et al. Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts[J]. FEMS microbiology letters, 2004, 238(2):359-365.
- [12] Goretti M, Turchetti B, Buratta M, et al. *In vitro* antimycotic activity of a *Williopsis saturnus* killer protein against food spoilage yeasts[J]. International journal of food microbiology, 2009, 131(2):178-182.
- [13] Liu G L, Wang K, Hua M X, et al. Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(5):822-827.

(下转第158页)

培养温度是影响大曲蛋白酶活的重要因素,它与米曲霉孢子的萌发,菌丝体的生长,酶系的分泌及大曲酶活高低关系密切。研究表明,30~35℃是米曲霉的最适生长温度^[13]。培养温度对蛋白酶活的影响如图6所示。不同的培养温度下的成曲酶活存在显著差异($p < 0.05$),随着培养温度的提高,成曲中性和酸性蛋白酶活呈不断上升的趋势,其中32℃的成曲其蛋白酶活最高。温度较低时,米曲霉孢子的萌发速度较慢,菌体生长繁殖受阻,大曲容易感染杂菌,故成曲酶活较低;但是培养温度较高也会对成曲酶活造成不利影响。一方面,制曲过程中菌株的生长发育会产生大量的热,导致成曲品温上升,通风条件不好的情况下容易出现烧曲现象;另一方面,制曲培养温度过高,耐高温的微生物例如根霉等会在曲料上生长,导致大曲出现浓重的氨味。此外,在实验过程中发现当培养温度超过32℃,随着温度的升高,曲中营养物质被微生物生长繁殖大量消耗,成曲质量不断下降。因此,综合考虑蛋白酶活、出曲量和杂菌感染情况,选择制曲温度为32℃为最优条件,此时大曲的中性蛋白酶活为1583 U/g干重,酸性蛋白酶活为497 U/g干重,比黄婵媛^[6]的最优条件下的中性和酸性蛋白酶活分别提高了12.75%和4.63%。

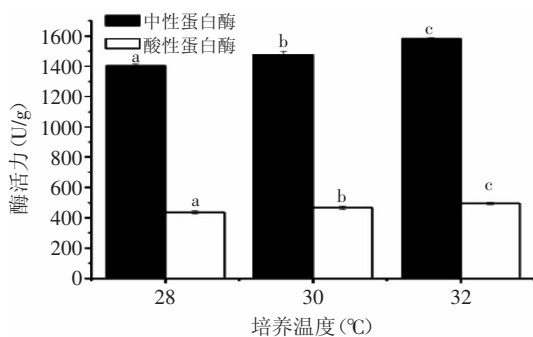


图6 培养温度对成曲酶活力的影响

Fig.6 Effect of culture temperature on the enzyme activity of koji

3 结论

不同品牌曲精成曲的酶活存在显著差异,这是因为不同品牌曲精的微生物状态不同,孢子的活力和种曲水分含量也不相同;光明牌曲精具有良好的孢子活力,可作为曲精来源。控湿制曲(0~24h RH 95%, 24~36h RH 90%, 36~40h RH 80%, 40~44h RH 70%)可有效提高小麦曲的蛋白酶活,与恒定湿度RH

90%制曲相比,其中性蛋白酶和酸性蛋白酶活分别提高了11.29%和28.90%。通过单因素实验确定全小麦制曲的最优工艺为:焙炒小麦粉碎过20目筛、曲料初始水分含量为51%、培养时间48 h、培养温度32℃,控湿制曲(即0~24 h湿度95%, 24~36 h湿度90%, 36~40 h湿度80%, 40~44 h湿度70%)。此时大曲的中性和酸性蛋白酶活分别高达1583 U/g干重和497 U/g干重。

参考文献

- [1] Chou C C, Ling M Y. Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials[J]. Food research international, 1998, 31(6):487-492.
- [2] Gao X, Zhao H, Feng Y, et al. A comparative study on physicochemical properties of Chinese-type soy sauces prepared using pure koji and mixed kojis[J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 9(40):6740-6747.
- [3] 夏克胜,赵谋明,崔春,等. 马氏珍珠贝制曲过程中酶活与氮源营养代谢的关系[C]. 管产学研助推食品安全重庆高峰论坛——2011年中国农业工程学会农产品加工及贮藏工程分会学术年会暨全国食品科学与工程博士学术论坛论文集[C]. 2011.
- [4] 蔺立杰,赵媛,王建中,等. 核桃酱油制曲条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(5):96-100.
- [5] 汪建国. 小麦制曲在传统黄酒酿造中的工艺探讨[J]. 中国酿造, 2003, 22(5):20-22.
- [6] 黄婵媛. 小麦面筋蛋白控制酶解制备呈味基料的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2011.
- [7] 杨惠芬. 食品卫生理化检验标准手册[M]. 北京:中国标准出版社, 1998.
- [8] 中华人民共和国国家国内贸易局中华人民共和国行业标准SB/T 10317-1999. 蛋白酶活力测定法[S]. 上海:上海市酿造科学研究所, 1999.
- [9] 沈祖耀,冯关祥. 应用“曲精”进行通风制曲的实践与体会[J]. 上海调味品, 1996(1):14-16.
- [10] 纪凤娣,鲁绯,张建,等. 商用酱油曲精中微生物分布研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(6):80-82.
- [11] 黄达明,吴其飞,陆建明,等. 固态发酵技术及其设备的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(6):87-91.
- [12] Quist E E, Phillips R D, Saalia F K. The effect of enzyme systems and processing on the hydrolysis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(10):1717-1721.
- [13] 冷云伟. 酱油曲中米曲霉及制曲工艺的研究[D]. 无锡:江南大学, 2004.
- [14] Wang X, Chi Z, Yue L, et al. A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production[J]. Microbiological research, 2007, 162(1):77-85.
- [15] Platania C, Restuccia C, Muccilli S, et al. Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*) [J]. Food microbiology, 2012, 30(1):219-225.
- [16] Liu S Q, Tsao M. Inhibition of spoilage yeasts in cheese by killer yeast *Williopsis saturnus* var. *saturnus* [J]. International journal of food microbiology, 2009, 131(2):280-282.
- [17] Brethauer S, Wyman C E. Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13):4862-4874.
- [18] 夏红,曹卫华,张志兰. 氯化钙对柿果贮期变化的影响[J]. 中国食物与营养, 2005, 12:35-37.

(上接第154页)