

豆渣酶解工艺及其水解液发酵抗性菌株筛选

孙传伯,赵群,张陈,韩邦兴,陈存武

(皖西学院 生物与制药工程学院,安徽 六安 237012)

摘要:从工业化生产实际出发,探讨了豆渣的高效水解技术、酵母菌株的选育及其培养工艺。不同工艺条件下,采用纤维素酶和普鲁兰酶水解豆渣,以葡萄糖为标准测量水解后料液中糖含量,得出水解豆渣的最佳工艺条件:温度55℃,料液比为1:24,先用普鲁兰酶水解,调至pH5.0,再用纤维素酶水解,调至pH5.5,普鲁兰酶3 h,纤维素酶1 h,时间比为3:1,加酶总量为3%,普鲁兰酶:纤维素酶为3:1。用此条件对豆渣进行水解得到水解液,料液中含糖量最高位为160.7 mg·kg⁻¹。用含量为35%的水解液去培养抗性菌株,筛选的抗性菌株C发酵效果较好,酵母含量达18.49 g·L⁻¹。

关键词:豆渣;酶解;纤维素酶;普鲁兰酶

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.04.0620

Hydrolysis Technology of Bean Dregs and the Hydrolysis Resistant Strains Screening

SUN Chuan-bo, ZHAO Qun, ZHANG Chen, HAN Bang-xing, CHEN Cun-wu

(College of Biological and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Liuan 237012, China)

Abstract: Based on industrial production practice, this study discussed the efficient hydrolysis technology of bean dregs, breeding of yeast strains and high density cultivation process. Cellulase and prandlase hydrolyzed soybean residue were used in different technological conditions, the amount of sugar in the liquid was measured with glucose as the standard. The optimum technological conditions of hydrolyzed soybean residue were obtained as follows: 55℃, solid to liquid ratio 1:24, hydrolysis firstly with pullulanase, adjusted to pH5.0, hydrolysis followed with cellulase, adjusted to pH5.5, hydrolysis 3 h with pullulanase and 1 h with cellulase, the time ratio was 3:1, enzyme amount was 3%, enzyme ratio 1:1, pullulanase: cellulase = 3:1. This condition was used to hydrolyze soybean residue, the content of the material liquid contained the highest content of 160.7 mg·kg⁻¹. Material liquid amount of 35% were used to culture resistant strain, the content of C yeast showed high resistance, contented yeast of 18 g·L⁻¹.

Keywords: Soybean residue; Enzymolysis; Cellulase; Prandlase

豆渣是豆制品如豆腐、豆奶等生产加工过程中的副产物,虽是副产物,但仍具有丰富的营养元素^[1-4]。目前豆渣主要用作饲料、肥料,利用效率较低,有些甚至被作为垃圾被抛弃,直接污染环境。因此,如何对豆渣进行综合利用,提高产品的附加值,是值得研究的课题之一^[5-7]。研究显示,豆渣中约含有50%的碳水化合物、20%的蛋白质和10%的油脂,这些有机物质具有多种用途,有待于开发利用^[8]。有研究表明利用酶水解豆渣可用于提取可溶性膳食纤维、水解蛋白、多糖和制备不溶性纤维^[9-11],某些寡肽还具有特殊的生理功能^[12]。豆渣水解的研究主要集中在纤维素酶和蛋白酶的水解工艺上^[8-12],而本研究利用普鲁兰酶参与豆渣深度水解,依据现代酶工程技术原理和辅助物理与化学处理技术,采用有针对性的高效酶制剂生物活性物

质材料,高效地降解豆渣营养成分为五碳糖、氨基酸等,研究降解的最适酶解工艺,为豆渣的高值化利用奠定基础。同时本研究利用豆渣水解液选择性筛选抗性功能菌株,并优化其高密度发酵工艺,以期对豆渣高效利用及后期微生物发酵研究提供理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

酿酒酵母 S04 由皖西学院啤酒工艺室提供,豆渣和澳洲六棱麦芽均为市售。

纤维素酶(25 000 U·g⁻¹)、普鲁兰酶(10 000 U·g⁻¹)、氯化钠、葱酮、牛肉膏、硫酸、蛋白胨、氢氧化钠、琼脂、磷酸氢二钠、盐酸、葡萄糖、氢氧化钠、碘液、95%乙醇、生理盐水等其它试剂均为分析纯。

收稿日期:2017-03-28
基金项目:安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2017A403);安徽高校自然科学研究重大项目(KJ2016SD61);省级质量工程卓越人才项目(2016zjjh072);皖西学院质量工程项目(wxy2017110,2016wxy35,2016wxy64)。
第一作者简介:孙传伯(1978-),男,硕士,讲师,主要从事微生物工程研究。E-mail:scb19781979@126.com。
通讯作者:韩邦兴(1978-),男,博士,教授,主要从事药理学领域研究。E-mail:584048891@qq.com。

1.2 仪器设备

752 型紫外可见分光光度计:上海谱元仪器有限公司;电子天平:上海越平科学仪器有限公司;恒温鼓风干燥箱:上海琅玕实验设备有限公司;恒温水浴锅:金坛市杰瑞尔电器有限公司;PHS-25 型 pH 计:上海盛磁仪器有限公司;双功能气浴恒温振荡器:金坛市杰瑞尔电器有限公司;SW-CJ-2D 型单人单面净化工作台:江苏净化设备有限公司;LS 型立式压力蒸汽灭菌器:江阴滨江医疗设备有限公司;高温电炉自动恒温控制台:上海锦屏仪器有限公司;显微镜 GY-5000 型(500 彩色数字 CCD):南京广友光电仪器有限公司。

1.3 方法

酵母分离纯化采用基本的稀释涂布与平板划线相结合。豆渣成分分析方法参照国标:水分含量 GB/T5009. 3-2003《食品中水分的测定》;灰分含量 GB/T5009. 4-2003《食品中灰水分的测定》;蛋白质含量 GB/T5009. 5-2003《食品中蛋白质的测定》;脂肪的测定 GB/T5009. 6-2003《食品中脂肪的测定》;淀粉含量 GB/T5009. 7-2003《食品中淀粉的测定》;水解液中多糖含量测定方法采用苯酚硫酸法;氨基酸含量测定采用茚三酮法^[13-16]。

1.3.1 豆渣水解工艺流程 豆渣水解工艺流程如图 1,预处理采用 1% 硫酸以料液比 1:5(质量比)处理 24 h,然后中和至 pH7. 0,利用高压灭菌锅 110℃ 消煮 5 min,得豆渣初步预处理液。

1.3.2 葡萄糖标准曲线的测定 葡萄糖标准曲线的测定参照 GB/T 22428. 3-2008^[6,17],按照试验标准配置蒽酮试剂(当日配置,当日使用)和葡萄糖标准液。

葡萄糖标准曲线制作:取 10 mL 标准试管标记为 A、B、C、D、E、F,共 6 支,根据表 1 数据配置,每个

浓度做 3 组平行;用移液管将 4 mL 蒽酮试剂分别加入各个试管里,每支试管都加完后,要轻微震荡混匀,之后放入冰水浴中 3 min,然后放入沸水中加热 11 min(沸水浴时试管口需用棉花塞住),取出后用流水冷却。在 620 nm 处以 A 号试管为空白,测量其余各管的 OD 值。将 OD 值设为纵坐标,标准葡萄糖的含量(μg)为横坐标,绘制标准曲线。

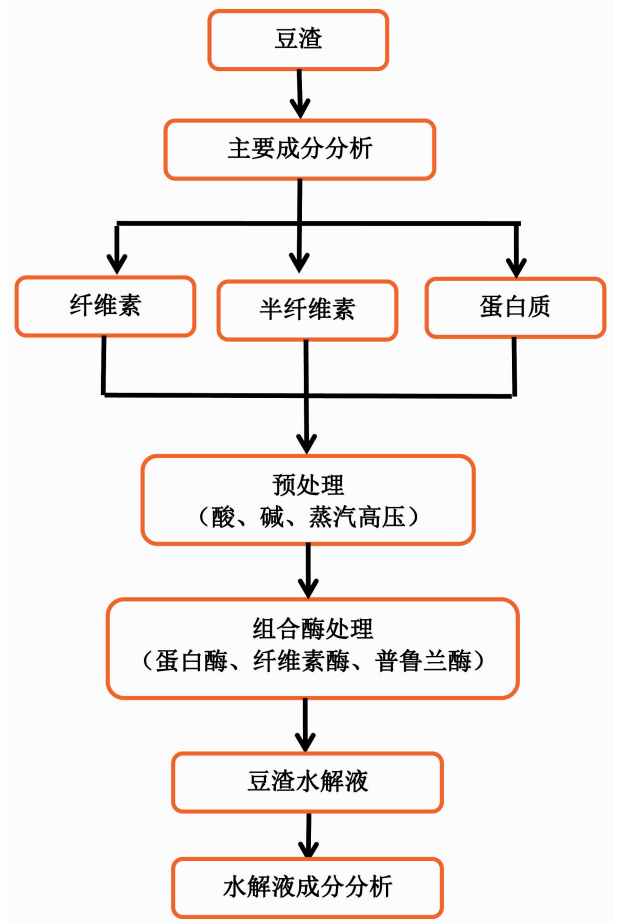


图 1 豆渣水解工艺路线图
Fig. 1 The route of hydrolysis of bean dregs

表 1 不同浓度的葡萄糖溶液

Table 1 Different concentrations of glucose solution (mL)						
试管号 No.	A	B	C	D	E	F
标准葡萄糖溶 Standard glucose solution	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 Distilled water	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0

1.3.3 水解液中的糖分含量测定 稀释:用移液枪吸取水解液 1 mL,加入到 50 mL 锥形瓶中,加入蒸馏水稀释定容。测定:用移液枪吸取 1 mL 稀释过的水解液放在 10 mL 的试管里,加入蒽酮试剂 4.0 mL,空白对照的试管用等量的蒸馏水代替水解液。下面的操作和制作葡萄糖标准曲线时的操作相同。

设置分光光度计波长为 620 nm,预热 30 min,取 24 h 后的发酵液用设置好的分光光度计测其 OD 值,再根据已经制得标准曲线,得到相应的水解液的糖含量(μg),具体见下面计算公式:豆渣中总糖量(以葡萄糖为标准) = C × 稀释的倍数 × 10⁻⁴ × 100%,式中 C 是从标准曲线上算出的糖浓度(μg·mL⁻¹)。

1.3.4 正交试验 普鲁兰酶与纤维素酶作用因素水平不同^[18-19],所以推测用两种酶同时水解豆渣效果要好于一种酶水解豆渣。故本研究设置了酶解温度、料液比、pH、酶解时间、酶量比值 5 种因素进行正交试验。

在正交试验中,添加酶时先加普鲁兰酶(pH4.5~6.0)后加纤维素酶(pH5.0~6.5),进行统一处理,用纤维素酶辅助普鲁兰酶对豆渣进行水解,加酶总量为3%,处理总时间为4 h(表2)。

表2 正交试验因素表
Table 2 Orthogonal experimental factors

水平 Level	A	B	C		D	E
	温度 Temperature/℃	料液比 Solid-liquid ratio	pH		时间比 (普鲁兰酶: 纤维素酶) Time ratio (Pullulanase: Cellulase)	酶量比 (普鲁兰酶: 纤维素酶) Enzyme ratio (Pullulanase: Cellulase)
			普鲁兰酶 Pullulanase	纤维素酶 Cellulase		
1	45	1:12	4.50	5.00	3:1	3:1
2	50	1:16	5.00	5.50	2:1	2:1
3	55	1:20	5.50	6.00	1:1	1:1
4	60	1:24	6.00	6.50	1:2	2:2

1.3.5 中性蛋白酶水解豆渣条件的优化 在兼顾各种酶的活性及水解条件后确定中性蛋白酶的水解条件。经1%酸和高温消煮预处理后的豆渣调节至pH7.0,通过双酶最佳条件组合作用后水解液添加一定量的中性蛋白酶,温度55℃下水解一定时间,高温灭酶,4 000 r·min⁻¹离心10 min,得豆渣酶解液,然后测定酶解液中氨基酸含量。

1.3.6 水解液抗性功能菌株的筛选与培养

(1)培养基配制

酵母筛选固体培养基:水解液200~700 mL·L⁻¹、硫酸铵5 g·L⁻¹、尿素5 g·L⁻¹、酵母膏2 g·L⁻¹、牛肉膏2 g·L⁻¹、磷酸二氢钾2 g·L⁻¹、硫酸镁1 g·L⁻¹、琼脂20 g·L⁻¹。

种子液培养基:水解液200 mL、蛋白胨20 g·L⁻¹、酵母膏10 g·L⁻¹。

发酵培养基:水解液200~700 mL·L⁻¹、硫酸铵10 g·L⁻¹、酵母膏2 g·L⁻¹、牛肉膏2 g·L⁻¹、磷酸二氢钾2 g·L⁻¹、硫酸镁1 g·L⁻¹。

(2)富集培养及生长曲线测定

操作流程:酵母菌株→富集培养→五碳糖利用功能检测→抗性功能菌株初筛→特异性筛选→功能性抗性菌株→水解液驯化→抗性目标菌株。

①种子培养:筛选培养前经2次传代培养后用微量移液枪移取3 mL的菌液接种于装有300 mL种子培养基的500 mL三角瓶中,用封口膜封口,28℃

恒温振荡培养。

②生长曲线的测定:取一环C菌株于种子液培养基中,培养12 h,检测其菌数为1×10⁶ cfu·mL⁻¹;取其发酵液5 mL于的发酵培养基500 mL中,分别于接种后4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,28,30 h取样,测定培养基的OD值,绘制菌株生长曲线,确定菌株生长的稳定期。

③目标菌株的筛选:选取200,300,400,500,600和700 mL·L⁻¹6个水解液浓度梯度配制成浓度不同的液体培养基,用微量移液枪逐个接种3 mL处于生长期的种子培养菌液于一系列浓度梯度的培养基中,28℃振荡培养18~24 h后取菌液稀释平板涂布培养,进一步纯化,重复操作直至筛选出单个菌落,最后即可制备斜面固体培养基保藏菌种,以备后续试验使用。

④抗性菌株高密度培养:设置不同水解液梯度的发酵培养基,用18 h的抗性菌株C菌液进行接种发酵,48 h后通过OD数据测定后转换为菌体C的生物量。

2 结果与分析

2.1 豆渣主要成分测定结果

从表3可以看出其主要有效成分为蛋白质和膳食纤维。

表 3 豆渣主要成分测定

Table 3 Determination of the major composition of bean dregs (g)

成分 Composition	水分 Moisture	灰分 Ash	蛋白质 Protein	脂肪 Fat	膳食纤维 Dietary fiber	淀粉 Starch
含量 Content	810.6	18.1	8.2	8.9	47.1	7.1

2.2 葡萄糖的标准曲线

根据测定的 OD 值做出葡萄糖标准曲线(图 2)。可以看出,在葡萄糖含量为 0~0.1 mg·mL⁻¹时有比较好的线性关系。得到标准曲线回归方程为: $y=0.016x-0.0002$, 回归系数 $R^2=0.9989$ 。

2.3 纤维素酶、普鲁兰酶复合酶解条件研究

正交试验中水解豆渣的最好条件为: 温度 55℃, 料液比为 1:24, 先用普鲁兰酶水解, 调至 pH5.0, 在恒温水浴锅中放置 4 h, 再用纤维素酶水解, 调至 pH5.5, 在恒温水浴锅中放置 1 h, 水解时加入纤维素酶和普鲁兰酶, 比值为 1:1, 加酶的总量是 3%。水解液中的含糖量最高为 160.7 mg·kg⁻¹。

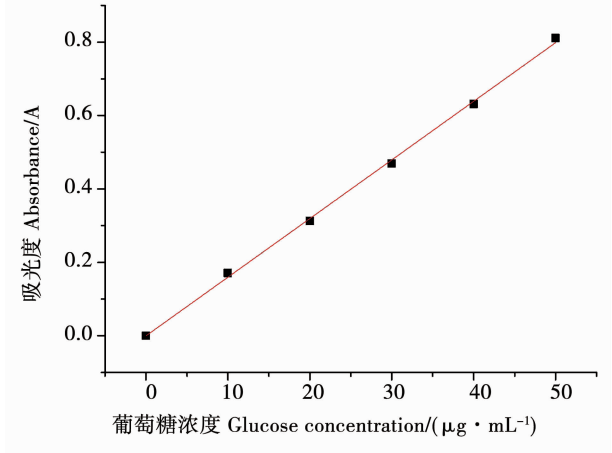


图 2 葡萄糖标准曲线

Fig. 2 Glucose standard curvu

表 5 正交试验结果与分析

Table 5 Orthogonal experiment results and analysis

试管号	温度	料液比	pH	时间比	酶比	总糖含量
No.	Temperature/℃	Solid-liquid ratio		Time ratio	Enzyme ratio	Total sugar content /(mg·kg ⁻¹)
1	1	1	1	1	1	141.0
2	1	2	2	2	2	144.8
3	1	3	3	3	3	117.9
4	1	4	4	4	4	119.1
5	2	1	2	3	4	137.6
6	2	2	1	4	3	124.8
7	2	3	4	1	2	147.3
8	2	4	3	2	1	155.4
9	3	1	3	4	2	111.9
10	3	2	4	3	1	104.8
11	3	3	1	2	4	133.8
12	3	4	2	1	3	160.7
13	4	1	4	2	3	99.8
14	4	2	3	1	4	129.1
15	4	3	2	4	1	98.8
16	4	4	1	3	2	152.3
极差 Range	2.155	2.402	2.047	3.088	1.432	

2.4 中性蛋白酶水解豆渣条件的研究

在上述双酶最佳组合条件作用后的水解液中添加中性蛋白酶,作用后测定水解液的氨基酸含量(图 3),结果显示随着酶量的增加水解度也会有相应的增加,但当量到达一定值时效果就不再明显,兼顾工业生产需求与成本,选择7 000 U·g⁻¹为最佳酶加量。

2.5 利用水解液产高密度酵母工艺研究

2.5.1 抗性菌株筛选 通过添加不同水解液选择性平板针对酿酒酵母 SO4 菌株筛选可知,在添加 400 mL·L⁻¹的发酵液中筛选出菌株 C 和添加 300 mL·L⁻¹的发酵液中筛选出菌株 B(图 4、图 5)。本研究选择 C 菌株做进一步水解液发酵培养试验。

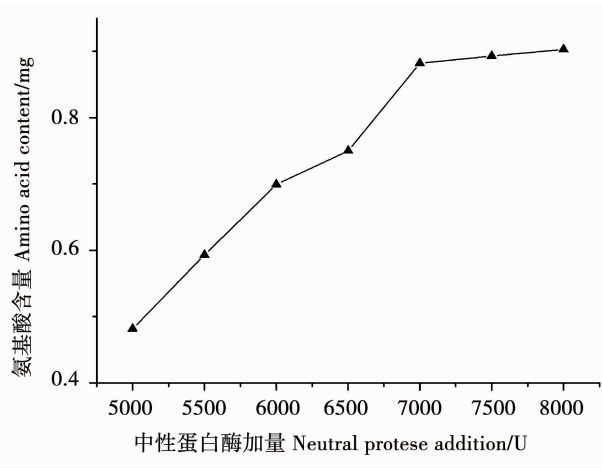


图 3 中性蛋白酶不同酶加量的氨基酸含量
Fig. 3 Neutral protease the amount of amino acids in different enzymes

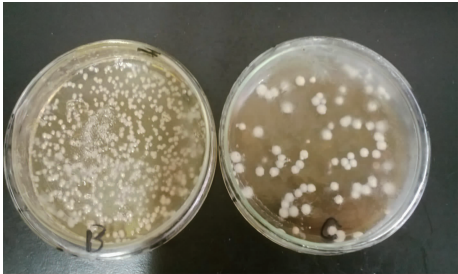


图 4 选择性平板菌落
Fig. 4 Selective plate colonies

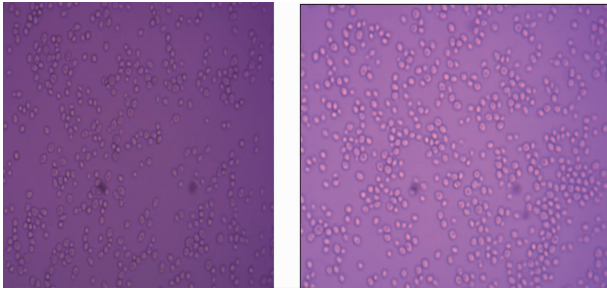


图 5 抗性菌株 B(左)/C(右)显微镜图片
Fig. 5 Resistant strain B(left) / C(right) under the microscope

2.5.2 抗性菌株 C 生长曲线测定 接种后每隔 2 h 取样测定培养基的 OD 值(图 6),结果显示:前 8 h OD 值没有明显的变化,此时的酵母菌处于延迟期,细胞正在适应新环境以及合成分裂所需要的物质为下一步分裂活动做准备。在 8~18 h 吸光度成近似直线的方式增长,说明此时的酵母在迅速增殖,菌种生长进入对数期,18~24 h 吸光度基本保持不变,即菌种进入稳定期。工业生产中为了使菌种转入发酵培养基中快速发酵,减短菌种在液体培养基中的适应时间,选择处在生长期的菌液作为菌种接入液,即 18 h 左右的菌液。

2.5.3 抗性菌株 C 高密度培养 不同水解液梯度的发酵培养基进行 C 菌液接种发酵,48 h 后测定菌体 C 的生物量(图 7)。发酵培养基中随着水解液加

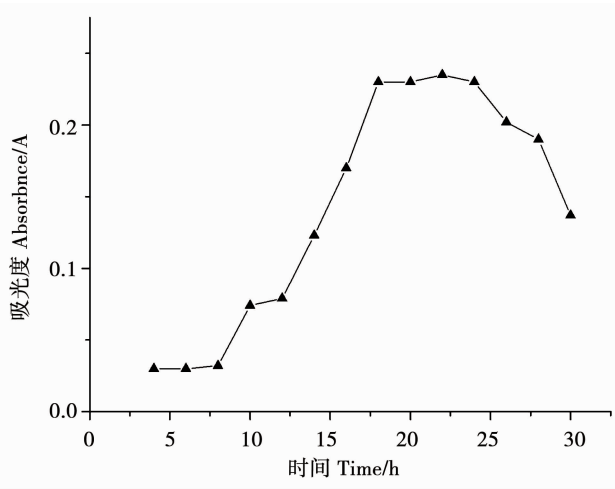


图 6 酵母菌生长曲线
Fig. 6 Yeast growth curve

入量增加,菌株 C 的菌体生物量也上升,当水解液加入量为 35% 时,高密度培养效果最好,抗性菌株 C 含量最高,达到 $18.49\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;当加入量超过 35% 时,菌体量迅速下降,可能是水解液的高浓度对菌株 C 产生了抑制。

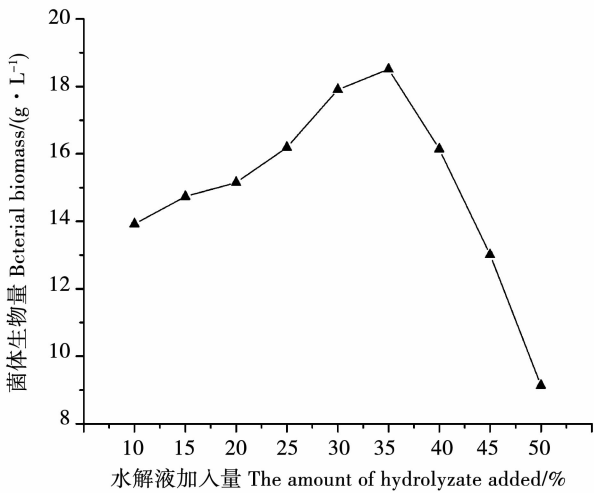


图 7 水解液加入量与抗性菌株 C 生物量关系
Fig. 7 The relationship between the amount of hydrolyzate and the biomass C of resistant

3 结论与讨论

将豆渣采用 1% 硫酸以料液比 1:5(质量比)处理 24 h,然后中和至 pH7.0,再利用高压灭菌锅进行 110℃ 消煮 5 min,常温下调节至 pH7.0,采用纤维素酶和普鲁兰酶水解豆渣,测水解后料液中糖(以葡萄糖为标准)含量得出水解豆渣的最佳工艺条件。通过单因素试验和正交试验得出水解豆渣的最佳工艺条件:温度 55℃,料液比为 1:24,先用普鲁兰酶水解,调至 pH5.0,恒温水浴锅中放置 4 h,再用纤维素酶水解,调至 pH5.5,在恒温水浴锅中放置 1 h,水解时加入纤维素酶和普鲁兰酶的比值是 3:1,加酶的总量是 3%。水解液中含糖量最高为 $160.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

将豆渣水解液按照一定的比例添加到培养基中,在一定条件下经过选择性培养筛选出抗性菌株 B 和 C;当水解液的加入量为 35% 时抗性菌株 C 在发酵液中生物量最高,其含量达 $18.49\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本试验中筛选的抗性菌株 B 未做发酵培养研究,有待下一步试验研究。

豆渣水解研究的文章很多,主要研究集中在纤维素酶和蛋白酶的水解工艺上^[8-12],主要针对膳食纤维的提取工艺和蛋白水解进行问题探讨;而本论文首次利用了普鲁兰酶参与豆渣深度水解,并利用其水解液进行抗性功能菌株筛选和高密度发酵工作,取得了阶段性成果,对豆渣全价值利用有了进一步的推进;同时豆渣水解物含有一定量的五碳糖,正常的酵母菌株无法利用,而本试验中筛选出的抗性功能菌株 C 能快速利用五碳糖进行高密度增值,是本研究一亮点,后期试验将重点对其抗性功能菌株 C 进行鉴定并深入研究其对五碳糖利用机理,以期豆渣工业化高价值全价利用提供有力支撑。

参考文献

[1] 孙麟,高慧俊,宝力德.不同的预处理方式对甜高粱秸秆纤维素酶降解效率的影响[J].中国农学学报,2010,26(9):346-351. (Sun L, Gao H J, Bao L D. The influence of the different pretreatment on the efficiency of the enzymatic degradation of the sweet sorghum straw cellulose[J]. Journal of Agricultural, 2010, 26(9): 346-351.)

[2] 文新亚,李燕松,张志鹏.酶解木质纤维素的预处理技术研究进展[J].酿酒科技,2006(8):97-100. (Wen X Y, Li Y S, Zhang Z P. Research progress in pretreatment of lignocellulose by enzymolysis[M]. Liquor-making Science & Technolosey, 2006(8): 97-100.)

[3] 胡滨,冯蕾,吴兆亮,等.预处理方法对城市落叶生物降解影响的研究[J].应用基础与工程科学学报,2011,19(3):354-359. (Hu B, Fen L, Wu Z L, et al. Effects of different pretreatment methods on the biodegradation of city foliage[J]. Journal of Basic Science and Engineering, 2011, 19(3): 354-359.)

[4] 孙云霞.豆渣中水溶性膳食纤维提取方法的研究[J].食品研究与开发,2003,24(3):34-35. (Sun Y X. Study on extraction method of water-soluble dietary fiber[J]. Food Research and Development, 2003, 24(3): 34-35.)

[5] 王文霞,张慧君,杨勇,等.纤维素酶法制备高活性大豆膳食纤维工艺的研究[J].食品与机械,2010,26(2):118-122. (Wang W X, Zhang H J, Yang Y, et al. Study on soluble dietary fiber of soybean dregs produced by enzymatic hydrolysis[J]. Food and Machinery, 2010, 26(2): 118-122.)

[6] 王贤,张苗,木泰华.甘薯渣同步糖化发酵生产酒精的工艺优化[J].农业工程学报,2012,28(14):256-261. (Wang X, Zhang M, Mu T H. Process optimization on alcohol production using sweet potato residue by simultaneous saccharification and fermentation method[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(14): 256-261.)

[7] 刘欢,贺连斌,魏静,等.纤维素酶和半纤维素酶改性胡萝卜

纤维的研究[J].食品与发酵工业,2011,37(2):78-81. (Liu H, He L B, Wei J, et al. Study on carrot fiber modification with cellulase and hemicellulase[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(2): 78-81.)

[8] 张毅,华欲飞,孔祥珍,等.酶解制备高得率大豆肽工艺条件优化[J].粮食与饲料工业,2009(11):16-19. (Zhang Y, Hua Y F, Kong X Z, et al. Optimization of enzymatic hysis conditions for preparation of high-yield soy peptides[J]. Cereal and Feed Industry, 2009(11):16-19.)

[9] 王景会,曹龙奎,马毓霞.豆渣制取高活性膳食纤维的研究[J].吉林农业科学,2004,29(3):53-57. (Wang J H, Cao L K, Ma Y X. Study on producing high active dietary from soybean residue[J]. Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, 2004, 29(3): 53-57.)

[10] 姜竹茂,陈新美.从豆渣中制取可溶性膳食纤维的研究[J].中国粮油学报,2001,16(6):52-55. (Jiang Z M, Chen X M. Producing soluble dietary fibre from bean dregs[J]. Journal of Chinese Cereals and Oils Association, 2001,16(6): 52-55.)

[11] 马毓霞,王勇,高阳,等.大豆膳食纤维多功能活化研究[J].粮油食品科技,2005(5):35-36. (Ma Y X, Wang Y, Gao Y, et al. Study on the multi-functional activation of soybean dietary Fiber[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2005(5): 35-36.)

[12] 李磊,陈均志.中性蛋白酶与碱性蛋白酶双酶法水解大豆蛋白的研究[J].西北轻工业学报,2002(1):35-38. (Li L, Chen J Z. Study on the technical conditions of soya-bean protein hydralizen with two kinds of protease[J]. Journal of Northwest University of Light Industry, 2002(1): 35-38.)

[13] 张龙翔,张庭芳,李令媛,等.生化实验方法和技术[M].北京:北京高等教育出版社,1997:1-3. (Zhang L X, Zhang T F, Li L Y, et al. Biochemical experimental methods and techniques [M]. Beijing: Beijing Higher Education Press, 1997: 1-3.)

[14] 叶勤.发酵过程原理[M].北京:北京化学工业出版社,2005:84-85. (Ye Q. Principle of fermentation process[M]. Beijing: Beijing Chemical Industry Press, 2005: 84-85.)

[15] 吴有炜.实验设计与数据处理[M].苏州:苏州大学出版社,2002:103-105. (Wu Y W. Experimental design and data processing[M]. Suzhou: Suzhou University Press, 2002: 103-105.)

[16] 陈思如,萧熙佩.酵母生物化学[M].济南:山东科学技术出版社,1990:88-92. (Chen S R, Xiao X P. Yeast biochemistry [M]. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1990: 88-92.)

[17] 翁霞,辛广,李云霞.蒽酮比色法测定马铃薯淀粉总糖的条件研究[J].食品研究与开发,2013,34(17):86-88. (Wen X, Xin G, Li Y X. Study on determination conditions of total sugar from potato starch by anthrone colorimetry[J]. Food Research and Development, 2013,34(17): 86-88.)

[18] 刘玲玲,田云波,唐楚楚,等.酸酶法制备纳米豆渣纤维素[J].食品与发酵工业,2011,37(9):124-128. (Liu L L, Tian Y B, Tang C C, et al. The preparation of nanocrystalline cellulose by acid and enzymatic method[J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(9): 124-128.)

[19] 聂尧,严伟,徐岩.工业属性普鲁兰酶的开发及其催化性能改善的研究进展[J].生物加工过程,2013,11(1):104-112. (Lie Y, Yan W, Xu Y. Research advances on discovery and development of pullulanase with industrial properties[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2013, 11(1): 104-112.)