

# 微生物转化蔗糖制备新科思糖的 分离纯化研究

别晓颖, 朱明军\*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

**摘要:**对通过微生物转化蔗糖制备的含新科思糖的糖浆进行分离纯化以制备新科思糖进行了研究。首先以巴斯德毕赤酵母去除糖浆中的果糖和葡萄糖,研究了酵母添加量和发酵时间对新科思糖纯度的影响;然后利用Bio-Gel P-2对初步纯化的糖浆进行进一步分离纯化,研究了上样量和洗脱液流速对新科思糖纯度和回收率的影响。结果表明:当巴斯德毕赤酵母的细胞添加量为60 g/L,处理时间为10 h时,新科思糖的纯度由10.92%提高到19.39%;当进样量为0.5 mL,流速为0.1 mL/min时,新科思糖的纯度由19.39%提高到76.68%。结论:此方法可用于制备新科思糖。

**关键词:**微生物转化,新科思糖,分离纯化,巴斯德毕赤酵母,聚丙烯酰胺凝胶

## Separation and purification of neokestose produced by sucrose biotransformation

BIE Xiao-ying, ZHU Ming-jun\*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou Higher Education Mega Center, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** This study aims to investigate the separation and purification of neokestose produced by sucrose biotransformation for producing neokestose. First, *Pichia pastoris* was used to remove the fructose and glucose of the syrup and the effects of cell concentration of *Pichia pastoris* and fermentation time on the purity of neokestose were investigated. Then, the neokestose syrup was further purified using Bio-Gel P-2 and the effects of sampling amount and flow rate on the purity and recovery of neokestose were researched. The results showed that the purity of neokestose increased from 10.92% to 19.39% when the cell concentration and reaction time were 60 g/L and 10 h, respectively. Under the optimized conditions of a flow rate of 0.1 mL/min and a sampling amount of 0.5 mL, the purity of neokestose improved from 19.39% to 76.68%. This method could be used for the preparation of neokestose.

**Key words:** biotransformation; neokestose; separation and purification; *Pichia pastoris*; polyacrylamide gel

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)24-0292-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.055

甜味剂是指能赋予食品饮料甜味的食品添加剂,目前市场上常用的甜味剂是葡萄糖、果糖、蔗糖、木糖、果葡糖浆等营养型甜味剂<sup>[1]</sup>。当今社会,肥胖、糖尿病、高血脂、少儿龋齿等健康问题日益突出<sup>[2-4]</sup>。迫于当前严峻的健康问题,以及当今社会人们对功能性食品的高度关注,甜味剂的生产逐步朝低热值、高安全性、具有特定功能、适宜特殊人群的方向发展。功能性甜味剂的研发正是在这种发展趋势下成为食品配料领域研究的重点之一。

新科思糖作为功能性甜味剂的一种,是由 $\beta$ -呋喃果糖苷酶作用于蔗糖,将果糖基通过 $\beta$ -(2,6)糖苷

键与蔗糖中的葡萄糖基结合而形成的 $\beta$ -2,6型蔗果三糖<sup>[5-9]</sup>。新科思糖具有与蔗糖相近的甜味特性,同时由于新科思糖能降低肠道pH、促进肠道有益菌的增殖、改善脂质的代谢情况、降低血脂和血压、促进维生素的合成以提高免疫力,促进人体对钙离子的吸收,预防龋齿<sup>[7-9]</sup>等一系列特点,深受人们的喜爱。

提高新科思糖产品的纯度是新科思糖生产、应用中的关键问题之一。基于巴斯德毕赤酵母可以发酵单糖但不能发酵二糖和低聚糖的特性<sup>[10]</sup>以及聚丙烯酰胺凝胶分离度高、以水为洗脱液、操作方便等优点,本文利用巴斯德毕赤酵母和Bio-Gel P-2聚丙烯

收稿日期: 2015-03-31

作者简介: 别晓颖(1990-),女,硕士研究生,研究方向:发酵工程,E-mail: 872633483@qq.com。

\* 通讯作者: 朱明军(1969-),男,博士,教授,研究方向:发酵工程,E-mail: mjzhu@scut.edu.cn。

基金项目: 广州市科技计划项目和广东省自然科学基金重点项目(2014A030311014)。

酰胺凝胶依次对微生物转化制备的新科思糖进行分离纯化,以期获得较纯的新科思糖产品。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

糖浆 糖分组成为果糖53.5 g/L,葡萄糖68.9 g/L,蔗糖100.4 g/L,蔗果三糖33.5 g/L(其中新科思糖28.0 g/L,1-科思糖5.5 g/L),由400 g/L蔗糖以0.24 mL/min的流速流经填充固定化红发夫酵母细胞的填充床反应器连续催化,稀释两倍后得上述糖浆;巴斯德毕赤酵母 华南理工大学生物科学与工程学院发酵工程实验室保存;葡萄糖、果糖、蔗糖 分析纯,天津市大茂化学试剂厂;新科思糖 纯度96%,委托苏州汇通色谱分离纯化有限公司制备;氯化钠 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;酵母抽提物 分析纯,英国Oxoid公司;乙腈 安徽时联特种溶剂股份有限公司;Bio-Gel P-2聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Rad公司;硫酸 分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

CP114型电子天平 奥豪斯仪器有限公司;MLS-3750型灭菌锅 Sanyo Electric公司;超净工作台 苏净安泰公司;恒温振荡摇床 New Brunswick Scientific公司;PB-10酸度计 德国赛多利斯科学仪器公司;5804R型离心机 Eppendorf公司;恒温干燥箱 广州星宏电子科技有限公司;Waters2695型高效液相色谱、RI2414示差检测器 美国Waters公司;ZORBAX Carbohydrate分析柱 Agilent科技;Aminex HPX-87H分析柱 美国Bio-rad公司; $\phi$ 1.6 $\times$ 60 cm简易层析柱 上海沪西分析仪器厂有限公司;GE AKTA purifier 10蛋白纯化系统 通用电气公司;冻干机美国 美国Labconco公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 巴斯德毕赤酵母菌悬液的制备 从本实验室保藏的巴斯德毕赤酵母斜面挑取1~2环菌苔接种于装有25 mL种子培养基的250 mL锥形瓶中,于30  $^{\circ}$ C, 250 r/min条件下振荡培养20~24 h,得到处于对数生长期的种子液。按10%的接种量转接到装有50 mL发酵培养基的500 mL锥形瓶中,于30  $^{\circ}$ C, 250 r/min条件下振荡培养18 h后转移到无菌离心管中于4  $^{\circ}$ C条件下5000 $\times$ g离心5 min,用无菌水清洗三次后收集细胞,用0.9%的NaCl配成20 g/L(干重)的菌体悬液,于4  $^{\circ}$ C保存,用于新科思糖的纯化。

1.2.2 巴斯德毕赤酵母对新科思糖的纯化 在10 mL的离心管中分别加入1、3、5 mL上述巴斯德毕赤酵母菌悬液于4  $^{\circ}$ C条件下5000 $\times$ g离心5 min去掉上清液后,各加入1 mL糖浆,使得巴斯德毕赤酵母浓度分别为20、60、100 g/L(干重),于30  $^{\circ}$ C, 250 r/min条件下振荡培养,在5、10、24、32 h取样100  $\mu$ L,稀释一定倍数后利用高效液相色谱检测糖以及副产物含量的变化。

#### 1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶Bio-Gel P-2的准备

1.2.3.1 凝胶的准备 在500 mL的烧杯中装入240 mL超纯水,将50 g干凝胶逐渐倒入烧杯中。Bio-Gel P-2于室温条件下润胀4 h后,倾掉一半的上清液,将剩余凝胶悬液转移到抽滤瓶中,脱气20~30 min,期间轻轻晃动抽滤瓶以使脱气充分。加入240 mL脱气超纯

水,轻轻晃动抽滤瓶后静置使得90%~95%的颗粒自然沉降。使用50 mL注射器将上层悬浮细小颗粒去除。上述操作重复四次以去除90%以上的细小颗粒。

1.2.3.2 装柱 在层析柱顶端接上漏斗,关闭下端出口,沿漏斗壁缓慢流加脱气超纯水使得超纯水的体积为柱床体积的20%。将凝胶悬浮液沿漏斗壁缓慢匀速的倒入层析柱中以形成均匀的堆积床。当层析柱中形成2~5 cm的床层后,开启底端阀门,使得水溶液流出。继续装柱,得柱床体积为110 cm<sup>3</sup>,柱长为55 cm。

1.2.3.3 系统准备 将层析柱与AKTA蛋白纯化系统相连,用至少2倍于柱床体积的脱气超纯水平衡层析柱,流速与洗脱流速一致。

1.2.3.4 上样 通过1 mL的定量环上样。将样品吸入注射器,推掉气泡,注入定量环中。利用AKTA蛋白纯化仪injected键自动上样,分离新科思糖。系统软件为Unicorn 5.31,柱子温度为室温,紫外检测波长为190、200、210 nm,使用自动收集器收集洗脱液,每管收集1 mL。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶Bio-Gel P-2分离纯化新科思糖的典型图谱 使用Bio-Gel P-2聚丙烯酰胺凝胶(润胀尺寸:45~90  $\mu$ m)为介质,在洗脱液流速为0.2 mL/min,上样量为0.5 mL条件下,使用AKTA purifier 10样品自动收集器每1 mL收集1管,利用高效液相色谱检测每管中糖含量的变化。

1.2.5 进样量对聚丙烯酰胺凝胶Bio Gel P-2分离新科思糖的影响 在洗脱液流速为0.2 mL/min条件下,分别调节进样量为0.5、0.75、1 mL、使用AKTA purifier 10样品自动收集器每1 mL收集1管,将新科思糖对应的收集管合并后利用高效液相色谱研究进样量对新科思糖纯度和回收率的影响。

1.2.6 流速对聚丙烯酰胺凝胶Bio Gel P-2分离新科思糖的影响 在进样量为0.5 mL条件下,分别调节流速为0.1、0.2、0.3、0.4 mL/min,使用AKTA purifier 10样品自动收集器每1 mL收集1管,将新科思糖对应的收集管合并后利用高效液相色谱研究进样量对新科思糖纯度和回收率的影响。

#### 1.2.7 糖含量的测定

1.2.7.1 标准曲线的制备 分别称取烘干至恒重的果糖、葡萄糖、蔗糖、新科思糖(精确到0.1 mg),用超纯水定容后标样母液的浓度分别为:30、30、30、15 g/L、用超纯水稀释成五个浓度梯度后用0.22  $\mu$ m微孔水相滤膜过滤,用ZORBAX Carbohydrate分析柱检测<sup>[1]</sup>。

1.2.7.2 酵母转化液组分的测定 将毕赤酵母转化液在12000 r/min条件下离心5 min,取上清液。根据糖浓度对上清液进行适当的稀释,使得稀释后各组分的浓度落于标准曲线的浓度范围内。0.22  $\mu$ m微孔水相滤膜过滤后利用高效液相色谱测定各组分的含量。

1.2.7.3 洗脱液组分的鉴定 将每管收集的洗脱液用0.22  $\mu$ m微孔水相滤膜过滤,高效液相色谱检测后与标样出峰时间进行比对,准确定量每管的糖分组成与含量,确定每一种组分对应的洗脱管数。

1.2.7.4 回收率的测定 将新科思糖对应的若干管数的洗脱液合并,0.22  $\mu$ m微孔水相滤膜过滤,利用

高效液相色谱准确定量新科思糖含量。

1.2.7.5 纯度的测定 将新科思糖对应的若干管数的洗脱液合并,利用冻干机冻干后加少量超纯水溶解,使得浓度提高20倍左右,0.22  $\mu\text{m}$ 微孔水相滤膜过滤后利用高效液相色谱测定新科思糖的纯度。

1.2.8 乙醇含量的测定 将样品用10%的硫酸酸化(pH1~3),0.22  $\mu\text{m}$ 微孔水相滤膜过滤后,利用高效液相色谱检测乙醇的含量。Aminex HPX-87H分析柱检测<sup>[2]</sup>。

1.2.9 数据处理 所有的实验数据均为两次重复实验结果的平均值。采用Excel和Origin 9.0软件进行数据处理,数据以均值 $\pm$ 标准偏差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 巴斯德毕赤酵母对糖浆的预处理

2.1.1 巴斯德毕赤酵母细胞浓度和转化时间对转化液糖含量的影响 巴斯德毕赤酵母的添加量和转化时间对转化液中糖含量影响的实验结果见表1。

由表1可知,当毕赤酵母的细胞浓度为20 g/L时,随着转化时间的增加,转化液中单糖的含量逐渐减少,当转化时间达到32 h时,转化液中的单糖基本耗尽;而在整个转化过程中,蔗糖和新科思糖的量基本维持在恒定水平,这与报道的巴斯德毕赤酵母不能利用蔗糖的结果一致<sup>[13]</sup>。在5~10 h,葡萄糖的浓度由33.02 g/L下降到17.34 g/L,而果糖仅由41.58 g/L下降到35.09 g/L,表明在含有葡萄糖和果糖的溶液中,巴斯德毕赤酵母优先利用葡萄糖<sup>[14]</sup>。

由表1可知,增加反应液中巴斯德毕赤酵母的细胞量会显著增加单糖的利用速率。当细胞浓度达到60 g/L时,反应10 h,单糖就被消耗尽;当细胞浓度达到100 g/L时,反应5 h单糖仅剩9.68 g/L,但此时由于细胞浓度过大,难以混合均匀,因此综合考虑,选择60 g/L的细胞浓度反应10 h作为后续转化液初步纯化条件。图1A和B展示的是初始糖浆以及经过60 g/L的毕赤酵母反应10 h后的糖浆的高效液相色谱图。图1B中,单糖被利用掉,同时产生微量的副产物,出峰时间约为5.8 min,此结果与Lu的研究结果基本一致<sup>[15]</sup>。

2.1.2 单糖的去向 经60 g/L巴斯德毕赤酵母处理10 h,糖浆中新科思糖的纯度由10.92%提高到19.39%。利用Bio-Rad HPX-87H柱对不同时间的糖浆进行分析,实验结果见图2。

由图2可知,随着巴斯德毕赤酵母处理时间的延长,转化液中乙醇的含量显著增加,当反应10 h时,乙醇的含量达到最高值,继续延长反应时间,反应液中乙醇的含量略有下降。Sheu利用固定化日本曲霉

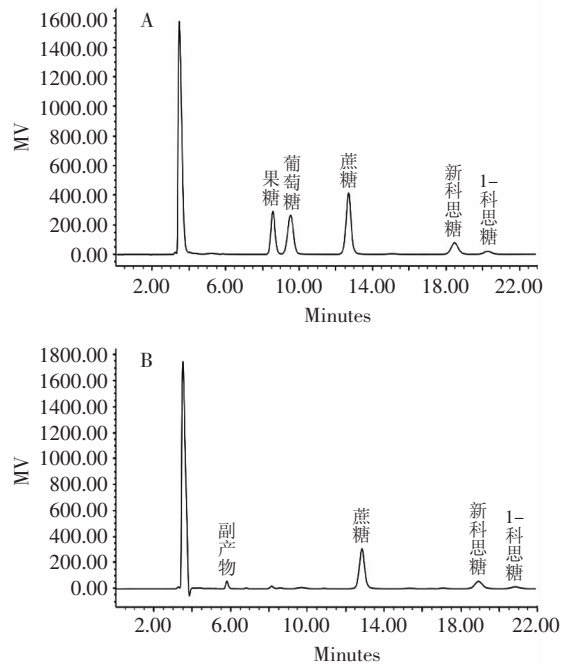


图1 糖溶液的高效液相色谱分析

Fig.1 HPLC analysis of the sugar solution

注:A:初始糖浆;B:60 g/L巴斯德毕赤酵母10 h反应后的糖溶液。

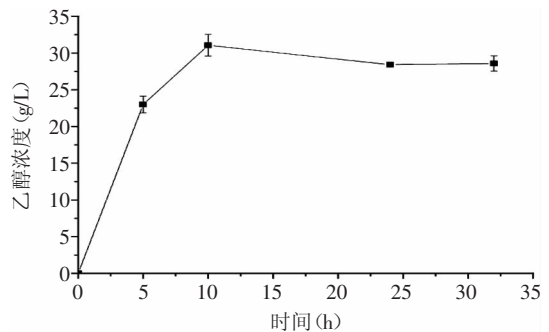


图2 毕赤酵母浓度为60 g/L条件下转化时间对样品中乙醇含量的影响

Fig.2 The effect of conversion time on the alcohol content in the sample at the concentration of *Pichia pastoris* 60 g/L

和毕赤酵母连续生产高纯度低聚糖,产物中也含有大量的副产物乙醇,这与本实验结果一致<sup>[13]</sup>。

### 2.2 Bio-Gel P-2聚丙烯酰胺凝胶对初步分离纯化糖浆的进一步处理

2.2.1 Bio-Gel P-2聚丙烯酰胺凝胶分离纯化新科思糖的典型图谱 由图3可知,聚丙烯酰胺凝胶Bio-Gel

表1 毕赤酵母浓度分别为20、60、100 g/L条件下转化时间对样品中糖含量的影响

Table 1 The effect of conversion time on the sugar content in the sample at the concentration of *Pichia pastoris* 20, 60, 100 g/L

反应时间(h)	5			10			24			32		
	20	60	100	20	60	100	20	60	100	20	60	100
成分(g/L)												
果糖	41.58 $\pm$ 0.89	23.01 $\pm$ 1.41	9.68 $\pm$ 0.51	35.09 $\pm$ 1.89	0	0	10.94 $\pm$ 0.68	0	0	0.43 $\pm$ 0.21	0	0
葡萄糖	33.02 $\pm$ 1.03	1.72 $\pm$ 0.03	0	17.34 $\pm$ 2.05	0	0	0	0	0	0	0	0
蔗糖	89.81 $\pm$ 5.89	84.29 $\pm$ 0.54	75.58 $\pm$ 2.40	90.73 $\pm$ 1.40	81.45 $\pm$ 3.25	77.02 $\pm$ 5.10	90.75 $\pm$ 2.19	80.79 $\pm$ 2.49	73.53 $\pm$ 1.29	86.90 $\pm$ 3.05	82.67 $\pm$ 2.11	74.70 $\pm$ 4.99
新科思糖	24.38 $\pm$ 1.07	22.01 $\pm$ 0.75	20.01 $\pm$ 0.08	24.19 $\pm$ 0.54	20.44 $\pm$ 0.80	20.50 $\pm$ 1.16	24.30 $\pm$ 1.07	22.05 $\pm$ 0.77	19.49 $\pm$ 0.32	22.57 $\pm$ 1.13	21.56 $\pm$ 0.95	20.47 $\pm$ 0.72
1-科思糖	4.30 $\pm$ 0.13	3.66 $\pm$ 0.25	3.34 $\pm$ 0.13	4.53 $\pm$ 0.10	3.54 $\pm$ 0.09	3.79 $\pm$ 0.20	4.54 $\pm$ 0.06	3.92 $\pm$ 0.16	3.15 $\pm$ 0.19	4.21 $\pm$ 0.11	3.59 $\pm$ 0.13	3.59 $\pm$ 0.13

P-2将糖分分为两个组分,洗脱体积位于66~71 mL之间的峰为蔗果三糖,洗脱体积位于72~80 mL之间的峰为蔗糖,这与分子筛进行分离纯化时大分子量的物质先出,小分子量的物质后出的规律相符合。

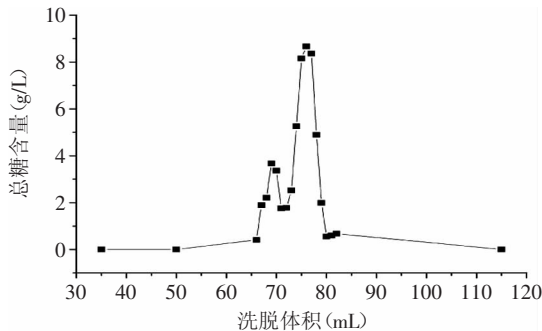


图3 Bio-Gel P-2对初步分离纯化糖溶液分离纯化的典型谱图  
Fig.3 The typical chromatogram of sugar solution by Bio-Gel P-2

分离度(R)是衡量两物质分离程度的指标,是评价色谱柱分离效能的重要参数,一般来说,R越大,说明两物质分离的越好。当R<1时,表明色谱峰有部分重叠;当R=1时,此时的分离度可达98%,当R=1.5时,色谱峰的分离度可达99.7%。通常把R=1.5作为两物质完全分离的指标。由图3计算可知,蔗果三糖峰与蔗糖峰的分离度为1.08,说明三糖和二糖达到了98%的分度。分离度是由填料,柱长,流动相流速,上样量等因素决定的,若进一步提高分离度可提高柱长。Li通过100 cm的层析柱使得菊粉低聚果糖中的二糖和三糖达到完全分离<sup>[6]</sup>。

2.2.2 上样量对Bio-Gel P-2分离新科思糖的影响  
上样量会显著影响分离效果和分离效率。上样量过小,凝胶柱的分离效率较低。上样量较大,大量样品进入凝胶柱,使得凝胶柱分离度、容量因子降低<sup>[9]</sup>。

由表2可知,随着上样量的增加,新科思糖的回收率逐渐降低,当上样量增加到1 mL时,新科思糖的回收率与0.5 mL的上样量相比,降低10.39%。在此范围内,上样量对新科思糖和三糖的纯度影响不大。综合考虑纯度和回收率,选择进样量为0.5 mL进行后续的研究。

由于聚丙烯酰胺凝胶是按照物质的分子量来进行分离纯化,因此,新科思糖和1-科思糖作为同分异构体在分子筛中分不开。当进样量为0.5 mL时,新科思糖的纯度为74.66%,而蔗果三糖的纯度为97.48%,为高纯度的蔗果三糖混合物。

2.2.3 流速对Bio-Gel P-2分离新科思糖的影响

表2 上样量对新科思糖纯度和回收率的影响

Table 2 The effect of sampling amount on purity and recovery of neokestose

上样量 (mL)	新科思糖回收率 (%)	新科思糖纯度 (%)	蔗果三糖纯度 (%)
0.5	76.70±0.75	74.66±2.07	97.48±0.03
0.75	73.40±0.57	75.80±0.79	98.72±0.19
1	68.73±1.70	75.39±5.16	99.56±0.03

速对分离纯化具有显著的影响,当流速过高时,可能会造成理论塔板数降低而影响分离效果,而流速过低,分子因为扩散作用也会导致分离效果变差<sup>[17]</sup>。

表3 流速对新科思糖纯度和回收率的影响

Table 3 The effect of flow rate on purity and recovery of neokestose

流速 (mL/min)	新科思糖回收率 (%)	新科思糖纯度 (%)	蔗果三糖纯度 (%)
0.1	97.83±2.42	76.68±0.65	99.22±0.03
0.2	76.70±1.98	74.66±0.65	97.48±0.03
0.3	71.50±2.19	76.14±2.22	99.52±0.02
0.4	69.57±3.16	73.60±0.33	97.53±0.27

由表3可知,在进样量为0.5 mL的条件下,流速为0.1 mL/min时,新科思糖的回收率达97.83%,新科思糖和蔗果三糖的纯度分别为76.68%和99.22%,当流速增加到0.2 mL/min时,新科思糖回收率由97.83%降低至76.70%。进一步增加流速回收率进一步下降,而新科思糖的纯度变化不大。综合考虑纯度和回收率,选择洗脱液流速为0.1 mL/min。

### 3 结论

巴斯德毕赤酵母可利用转化液中的单糖从而提高新科思糖和低聚糖的纯度,其最优添加量为60 g/L,处理时间为10 h,处理后的新科思糖纯度由10.92%提高到19.39%。Bio-Gel P-2可用于新科思糖的分离纯化,在最优条件下(进样量为0.5 mL,流速为0.1 mL/min),新科思糖的回收率达97.83%,新科思糖的纯度为76.68%。

### 参考文献

- [1] 鲁琳,杭义萍,高燕红,等. 食品甜味剂分类及其检测技术现状[J]. 现代预防医学,2009(11):2033-2035.
- [2] 马冠生,李艳平,武阳丰,等. 1992至2002年间中国居民超重率和肥胖率的变化[J]. 中华预防医学杂志,2005(5):17-21.
- [3] 《求医问药》编辑部. 我国糖尿病人数激增,令人担忧[J]. 求医问药,2010(6):1.
- [4] Organization World Health. The world health report 1998: Life in the 21st century a vision for all[J]. Organization World Health, 1998:241.
- [5] Kilian S G, Sutherland F C W, Meyer P S, et al. Transport-limited sucrose utilization and neokestose production by *Phaffia rhodozyma*[J]. Biotechnology Letters, 1996, 18(8):975-980.
- [6] 苏丁,陈晓明,徐学明. 法夫酵母低聚糖的结构分析[J]. 食品与生物技术学报,2009(2):197-200.
- [7] 陈亚非,罗琦珊,葛亚中. 低聚果糖调节机体免疫功能作用的研究进展[J]. 现代食品科技,2005(4):83-87.
- [8] Kilian S, Kritzinger S, Rycroft C, et al. The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(7):637-644.
- [9] 张南南. 功能性低聚糖的分离纯化和生理功能的研究[D].

(下转第300页)

- proteins and gellan gum in acidified gels[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(5):502-511.
- [12] KORUS J, WITCZAK T, ZIOBRO R. Linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage as a novel structure forming agent in gluten-free bread[J]. LWT-Food Science and Technology(2015), doi: 10.1016/j.lwt.2015.01.040.
- [13] GIBSON G R, PROBERT H M, VAN LOO J, et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics[J]. Nutrition Research Reviews, 2004, 17(2):259-275.
- [14] DEV D K, QUENSEL E. Functional properties of linseed protein products containing different levels of mucilage in selected food systems[J]. Journal of Food Science, 1989, 54(1):183-186.
- [15] 陈海华, 许时婴, 王璋. 亚麻籽胶与肉蛋白的相互作用的研究[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(7):62-65.
- [16] 孙健. 亚麻籽胶对肉制品保水性、乳化性、淀粉糊化和老化特性影响及其应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [17] 孙晓冬, 史峰山, 杜平. 亚麻籽胶在斩拌型肉肠中的应用研究[J]. 食品科学, 2003, 24(11):88-90.
- [18] HONG Geun-Pyo, KO Se-Hee, CHOI Mi-Jung, et al. Effect of glucono- $\delta$ -lactone and  $\kappa$ -carrageenan combined with high pressure treatment on the physico-chemical properties of restructured pork[J]. Meat Science, 2008, 79(2):236-243.
- [19] 侯晓荣, 米红波, 茅林春. 解冻方式对中国对虾物理性质和化学性质的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(4):243-247.
- [20] 夏秀芳, 孔保华, 郭园园, 等. 反复冷冻-解冻对猪肉品质特性和微观结构的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3):982-988.
- [21] 吴润锋, 袁美兰, 赵利, 等. 不同辅料对草鱼鱼糜品质的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(7):53-57.
- [22] 常海军, 唐翠, 唐春红. 不同解冻方式对猪肉品质特性的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(10):1-5.
- [23] 陈立德. 肌原纤维蛋白凝胶作用力影响因素的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [24] DICKINSON E, MCCLEMENTS D J. Advances in food colloids [M]. Blackie Academic & Professional, 1996:91-99.
- [25] ZHAO QIANGZHONG, ZHAO LONGA, JING KONG, et al. Sodium caseinate/flaxseed gum interactions at oil/water interface: Effect on protein adsorption and functions in oil-in-water emulsion[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43:137-145.
- [26] 张慧旻. 结冷胶与海藻酸钠对低脂猪肉糜凝胶性质的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.

(上接第291页)

- bioenergy production from distillers grains using mixed microflora [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 20:15547-15555.
- [27] Liu Y Z, Yuan Y C, Chen Z H. On the combustion mechanism and development of the distillers' grain-fired boiler [J]. Applied Thermal Engineering, 2002, 22:349-353.
- [28] GB13022-1991. 塑料薄膜拉伸性能实验方法[S].
- [29] GB1037-1988. 塑料薄膜和片材透水蒸气实验方法-杯试法[S].
- [30] GB/T 5009.44-2003. 肉与肉制品卫生标准的分析方法[S].
- [31] Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 117:350-360.
- [32] Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Structural, morphological and thermal behavior characterizations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 41:33-43.
- [33] Hoque M S, Benjakul S, Prodpran T. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5):1085-1097.
- [34] Ma M H, Liu Q L, Zhang F K. Study on the fresh-keeping technology of cooling meat production, the fresh-keeping effect of lysozyme, nisin and Gna solution[J]. Food Science, 2002, 23:235-241.

(上接第295页)

- 南京: 南京农林大学, 2012:27-51.
- [10] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeasts: Characteristics and Identification[M]. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2000:554.
- [11] Xu W X, Liang L, Zhu M J. Determination of sugars in molasses by HPLC following solid-phase extraction[J]. International Journal of Food Properties, 2014, 18(3):547-557.
- [12] Cheng J R, Zhu M J. A novel anaerobic co-culture system for bio-hydrogen production from sugarcane bagasse[J]. Bioresource Technology, 2013, 144:623-631.
- [13] Sheu D C, Chang J Y, Wang C Y, et al. Continuous production of high-purity fructooligosaccharides and ethanol by immobilized *Aspergillus japonicus* and *Pichia heimi*[J]. Bioprocess and Biosystem Engineering, 2013, 36(11):1745-1751.
- [14] Yang Y L, Wang J H, Teng D, et al. Preparation of high-purity fructo-oligosaccharides by *Aspergillus japonicus*  $\beta$ -fructofuranosidase and successive cultivation with yeast[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(8):2805-2809.
- [15] Lu L L, Wu J, Song D Y, et al. Purification of fructooligosaccharides by immobilized yeast cells and identification of ethyl  $\beta$ -D-fructofuranoside as a novel glycoside formed during the process[J]. Bioresource Technology, 2013, 132:365-369.
- [16] Li J, Cheong K L, Zhao J, et al. Preparation of inulin-type fructooligosaccharides using fast protein liquid chromatography coupled with refractive index detection[J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1308:52-57.
- [17] 周先婉, 胡晓倩. 生物化学仪器分析与实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003:55-64.