

适于益生菌发酵的青稞酶解液制备工艺优化

Optimization on preparation technology of highland barley enzymolysis liquid suitable for probiotic fermentation

万萍¹ 易晓成² 邓娟¹ 黄丽华¹

WAN Ping¹ YI Xiao-cheng² DENG Juan¹ HUANG Li-hua¹

(1. 成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106; 2. 四川工商职业技术学院酒类与食品工程系, 四川 都江堰 611830)

(1. College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu, Sichuan 610106, China;

2. Department of Wine and Food Engineering Sichuan Technology Business College, Dujiangyan, Sichuan 611830, China)

摘要:采用程序升温法对青稞进行酶解,以还原糖含量为响应值,采用响应面法对青稞酶解液制备工艺进行了优化。结果表明:按料水比 1:15(g/mL)溶解青稞粉,经糊化后冷却至 45℃,加入 8.9 U/g·青稞的 α -淀粉酶和原料质量 2.0%,3.5% 的糖化酶、菠萝蛋白酶,保温 20 min 后升温到 60℃酶解,直至碘试液体呈无色,过滤得到青稞酶解液,其还原糖、氨基酸态氮含量分别为 5.68%、0.47 g/L,可作为制备益生菌发酵青稞饮料的良好基质。

关键词:青稞;酶解液;还原糖;程序升温法;益生菌发酵液

Abstract: The program warming method was applied to carry out the enzymatic hydrolysis of highland barley. The response surface methodology was used to optimize the enzymatic hydrolysis process of probiotic fermented barley with the reducing sugar content as the response value. The result indicated that the optimal conditions could be gotten: with the ratio of solid to liquid 1:15(g/mL) to dissolve highland barley powder, pasting and cooling to 45℃, addition of 8.9 U/g α -amylase, 2.0% glucoamylase, 3.5% bromelain, incubating for 20 min and then heating to 60℃, incubating for saccharification to the iodine test showing colorless, getting highland barley enzyme saccharification liquid by filtration. Under the condition, the content of reducing sugar was up to 5.68% and the content of amino acid nitrogen was 0.47 g/L, which could be used to produce probiotic fermented highland barley beverage.

Keywords: highland barley; enzymatic hydrolysate; reducing sugar; program warming method; probiotic fermentation liquid

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.)属于禾本科植物,主要产自中国的青藏高原,青藏高原也是世界

基金项目:四川省教育厅科研项目(编号:12ZA205)

作者简介:万萍,女,成都大学副教授。

通信作者:易晓成(1962—),男,四川工商职业技术学院讲师。

E-mail:562248038@qq.com

收稿日期:2016-12-22

上最早(公元前 1100 年)栽培青稞的地区^[1]。青稞仅含少量的脂和糖,却含有较高的蛋白质、纤维素以及维生素等,其中蛋白质含量平均可达 11.31%、脂肪 1.80%~3.09%、淀粉含量 70%以上^[2],除含有包括 8 种人体必需氨基酸在内的 18 种氨基酸外,还含有 12 种微量元素如钙、镁、硒、铜、锌、铬、锰、铁、磷等^[3],其 β -葡聚糖含量在 3.66%~8.62%,平均值为 5.25%。现代医学^[2]已经证明青稞不仅营养价值高,而且在降血脂、预防糖尿病、促进胃动力等方面具有独特的保健作用。青稞既可以作为粮食,也可用于加工各类食品,如饼干、蛋糕、麦片粥、米花、青稞酒、青稞汁饮料等。

研究证明益生菌对肠道功能紊乱、呼吸感染以及过敏性症状有治疗作用^[4],同时具有调节人体免疫系统、提高乳糖的利用率、防癌、降低胆固醇等功能^[5]。国外研究者如 Martensson 等^[6]的研究证明了:在燕麦这样的非乳基质上益生菌能很好地存活和生长,并在冷藏条件下存活率较高。益生菌是定殖于宿主肠道内、当达到一定量就能对宿主产生积极作用的一类活菌。利用青稞淀粉生产益生菌发酵食品,是青稞产业化创新发展的一条新途径。益生菌不能直接利用青稞淀粉进行发酵,在生产益生菌发酵青稞饮料时,首先要将青稞淀粉进行酶解糖化,以提供能被益生菌利用的还原糖类^[7]。同时,如果能先将结合于淀粉颗粒上的蛋白质降解,生成一定量的氨基酸,使酶解液有更适宜的碳氮比,则更有利于淀粉酶解,进而有效地增进益生菌的生长。

本研究拟利用由 α -淀粉酶、糖化酶、菠萝蛋白酶组成的复合酶的协同作用,采用程序升温法对青稞进行酶解。采用程序升温是基于 45℃为菠萝蛋白酶最适作用温度,而 60℃则为兼顾 α -淀粉酶和糖化酶的最适作用温度,可使液化和糖化同时进行,在产生足够还原糖的同时确保淀粉最大限度水解成可溶性低聚糊精和低聚糖,以构成益生菌发酵所需的益生元;研究不同料水比、 α -淀粉酶用量、糖化酶用量和菠萝蛋白酶用量对青稞酶解液还原糖含量的影响;并以还原糖含量

为响应值,采用响应面法对青稞酶解液制备工艺进行优化,以期制备出能适合益生菌发酵的青稞酶解液,并为益生菌发酵青稞饮料的进一步工业化大生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

中温 α -淀粉酶: $\geq 3\,700\text{ U/g}$,北京奥博星生物技术有限责任公司;

糖化酶(固体型 10 万 U/g)、菠萝蛋白酶(50 万 U/g):锐阳生物科技有限公司;

柠檬酸:食品级,市售。

1.1.2 仪器

高速万能粉碎机:FW-100型,北京中兴伟业仪器有限公司;

水浴振荡器:HZS-H型,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;

电子天平:LD型,沈阳龙腾电子有限公司;

电热恒温干燥箱:DHG-9141型,上海宏精实验设备有限公司;

分析天平:BS110S型,北京赛多利斯天平有限公司;

恒温水浴锅:HH-4型,金坛市金城国胜实验仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 工艺流程

青稞 $\rightarrow$ 粉碎、过筛 $\rightarrow$ 加水混匀 $\rightarrow$ 加热糊化 $\rightarrow$ 冷却 $\rightarrow$ 调节pH $\rightarrow$ 加入 α -淀粉酶、糖化酶、菠萝蛋白酶 $\rightarrow$ 搅拌均匀 $\rightarrow$ 保温酶解 $\rightarrow$ 灭酶 $\rightarrow$ 过滤 $\rightarrow$ 青稞酶解液

1.2.2 理化指标检验方法

(1) 还原糖的测定:直接滴定法^{[8]138-140},以葡萄糖计。

(2) 氨基酸态氮的测定:电位滴定法^{[8]198}。

1.2.3 试验设计 选取影响青稞酶解的关键因素:料水比、 α -淀粉酶用量、糖化酶用量、菠萝蛋白酶用量进行单因素试验,在单因素试验的基础上,以还原糖含量为响应值,采用响应曲面法对益生菌发酵青稞饮料酶解液制备工艺进行优化。试验结果为每组2个平行样的平均值。

(1) 料水比对还原糖含量的影响:准确称取10份过80目筛的青稞粉,每份5 g,盛于10个250 mL的三角瓶中,分为5组,每组2份做平行样,分别按料水比1:10,1:12.5,1:15,1:17.5,1:20(g/mL)加入35℃的水,搅拌使其充分吸水,糊化20 min后冷却至50℃左右,用10%的柠檬酸调节pH至5.0左右,然后分别加入原料质量的8 U/g的 α -淀粉酶,1.9%的糖化酶和3.5%的菠萝蛋白酶,放入水浴振荡器中45℃保温20 min,继续升温至60℃酶解直至碘试液体呈无色,然后在沸水浴中灭酶10 min后进行过滤,得到青稞酶解液,测定其还原糖含量,确定最适料水比。

(2) α -淀粉酶用量对还原糖含量的影响:按1.2.3(1)确定的最适料水比溶解青稞粉,除加入青稞质量1.9%的糖化酶和3.5%的菠萝蛋白酶外,分别按4,6,8,10,12 U/g·青稞的比例加入 α -淀粉酶,其它同1.2.3(1),测定其还原糖含量,

以确定最适 α -淀粉酶用量。

(3) 糖化酶用量对还原糖含量的影响:按1.2.3(1)确定的最适料水比溶解青稞粉,除加入8 U/g·青稞的 α -淀粉酶和3.5%的菠萝蛋白酶外,分别加入青稞质量的1.3%,1.6%,1.9%,2.2%,2.5%的糖化酶,其它同1.2.3(1),测定其还原糖含量,以确定最适的糖化酶用量。

(4) 菠萝蛋白酶用量对还原糖和氨基酸态氮含量的影响:按1.2.3(1)确定的最适料水比溶解青稞粉,除加入8 U/g·青稞的 α -淀粉酶和1.9%的糖化酶外,每组分别加入青稞质量2.0%,2.5%,3.0%,3.5%,4.0%的菠萝蛋白酶,其它同1.2.3(1),测定还原糖和氨基酸态氮的含量,以确定最适菠萝蛋白酶用量。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 料水比对还原糖含量的影响 水是物料和酶的溶剂,生化酶促反应都须在水中进行,料水比影响酶促反应底物浓度进而影响青稞中蛋白质和淀粉的酶解,以及最终制得的酶解液中还原糖和氨基酸态氮的含量。本研究考察了料水比对青稞酶解液中还原糖含量的影响,结果见图1。

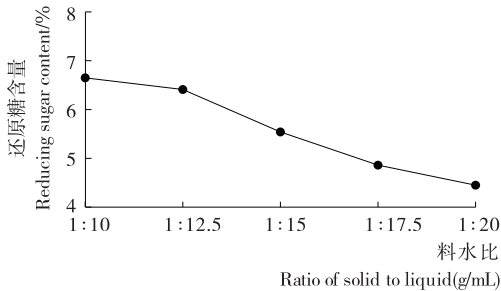


图1 料水比对还原糖含量的影响
Figure 1 Effects of ratio of solid to liquid on the reducing sugar content

由图1可知,酶解液中的还原糖含量随料水比的增加而减少。还原糖含量直接影响益生菌的生长以及发酵后产品的酸度,在一定范围内还原糖含量越高经发酵后生成的酸也越多,酸度也就越高,反之亦然。酸度过高影响口感和稳定性,过低又达不到要求;通常可通过料水比控制酶解液中还原糖含量以达到设计产品的要求。在料水比为1:15(g/mL)时,还原糖含量为5.54%,能符合设计产品的要求,因此,确定最适料水比为1:15(g/mL)。

2.1.2 α -淀粉酶用量对还原糖含量的影响 α -淀粉酶又称液化酶,作用于淀粉后其主要产物是糊精,糊精在 α -淀粉酶和糖化酶的协同作用下生成还原糖和少量低聚糖^[9]。本研究考察了 α -淀粉酶用量对还原糖含量的影响,结果见图2。

由图2可知,当 α -淀粉酶用量小于8 U/g·青稞时,还原糖含量随 α -淀粉酶用量的增加呈上升趋势; α -淀粉酶的用量为8 U/g·青稞时,还原糖含量达到了最高值(5.57%); α -淀粉酶用量高于8 U/g·青稞后,还原糖含量随着 α -淀粉酶用量的增加趋于稳定且略有下降,说明 α -淀粉酶用量过多会抑制其酶活。所以,确定 α -淀粉酶的最适用量为8 U/g·青稞。

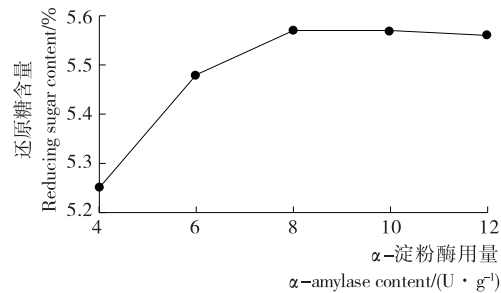


图 2 α -淀粉酶用量对还原糖含量的影响
Figure 2 Effects of α -amylase content on the reducing sugar content

2.1.3 糖化酶用量对还原糖含量的影响 糖化酶可使淀粉的 α -1,4-和 α -1,6-糖苷键水解而生成葡萄糖,同时还能水解糊精、糖原的非还原末端释放 β -D-葡萄糖^[10]。本研究考察了糖化酶用量对还原糖含量的影响,结果见图 3。

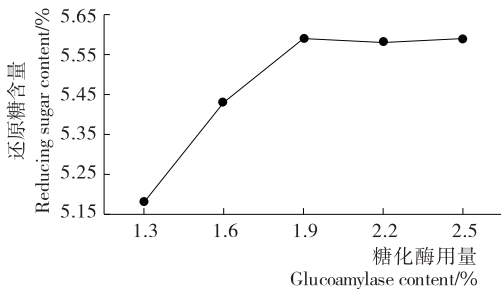


图 3 糖化酶用量对还原糖含量的影响
Figure 3 Effects of glucoamylase content on the reducing sugar content

由图 3 可知,当糖化酶用量小于 1.9% 时,还原糖含量随糖化酶用量的增加呈上升趋势;糖化酶用量为 1.9% 时,还原糖含量达到了最大值(5.59%);糖化酶用量高于 1.9% 后,随着糖化酶用量的增加,其还原糖含量趋于稳定。所以,确定糖化酶的最适用量为 1.9%。

2.1.4 菠萝蛋白酶用量对还原糖和氨基酸态氮含量的影响

青稞中含有淀粉颗粒结合蛋白,利用菠萝蛋白酶水解蛋白质为氨基酸,不仅为酶解液提供了菌体生长所需的速效氮源,同时也有利于淀粉的酶解,提高酶解液中还原糖含量,使酶解液含有适宜的碳源和氮源,更有利于益生菌的生长和发酵,并提高益生菌青稞发酵饮料的营养价值^[10]。本研究考察了菠萝蛋白酶用量对还原糖和氨基酸态氮含量的影响,其结果见图 4。

由图 4 可知,菠萝蛋白酶可以明显提高酶解液中氨基酸态氮和还原糖的含量,当菠萝蛋白酶用量小于 3.0% 时,随着酶用量的增加,氨基酸态氮和还原糖含量均呈增长的趋势;当菠萝蛋白酶用量为 3.0% 时,氨基酸态氮和还原糖的含量均达到最高值,分别为 0.45 g/L 和 5.65%;当菠萝蛋白酶用量大于 3.0% 时,随着酶用量的增加,还原糖含量趋于稳定,而氨基酸态氮含量则略有降低。因此,最适菠萝蛋白酶用量确定为 3.0%。

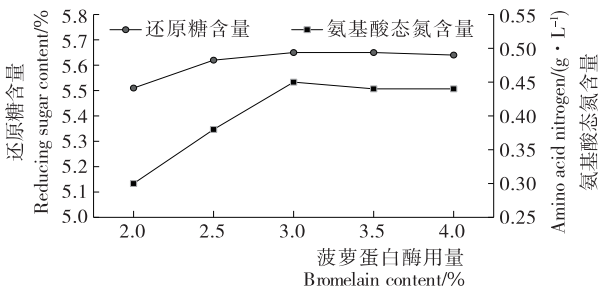


图 4 菠萝蛋白酶用量对还原糖和氨基酸态氮含量的影响
Figure 4 Effects of bromelain content on the reducing sugar content and amino acid nitrogen content

2.2 响应面优化酶解工艺试验

2.2.1 响应面法试验设计及结果 依据 Box-Behnken 试验设计的统计学要求,以 α -淀粉酶用量、糖化酶用量、菠萝蛋白酶用量 3 个因素为自变量,以还原糖含量为响应值,设计了三因素三水平的响应面试验组^[11-12],试验因素水平见表 1。

根据试验因素和水平的相关要求,设计了 17 次试验,其试验结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平表
Table 1 Factors and levelstable of Box-Behnken experiment design

编码水平	A α -淀粉酶用量/ (U · g ⁻¹)	B 糖化酶 用量/%	C 菠萝蛋白酶 用量/%
—1	6	1.6	2.5
0	8	1.9	3.0
1	10	2.2	3.5

表 2 响应面试验设计与结果

Table 2 Results of experiment of combination rotational design

试验组别	A	B	C	还原糖含量/%
1	0	—1	1	5.62
2	0	0	0	5.65
3	—1	0	1	5.62
4	0	0	0	5.64
5	1	0	1	5.67
6	0	—1	—1	5.51
7	0	0	0	5.64
8	0	0	0	5.65
9	1	0	—1	5.63
10	—1	—1	0	5.53
11	0	1	—1	5.62
12	—1	0	—1	5.53
13	1	1	0	5.66
14	1	—1	0	5.55
15	0	1	1	5.67
16	0	0	0	5.64
17	—1	1	0	5.58

2.2.2 响应面试验结果与分析 应用 Design-Expert 8.0.5.0 统计软件,对表 2 中的试验数据进行二次回归分析,得到 α -淀粉酶用量 A、糖化酶用量 B、菠萝蛋白酶用量 C 3 个因素与还原糖百分含量 Y 之间的多元二次回归方程为:

$$Y=5.65+0.031A+0.040B+0.036C+0.015AB-0.012AC-0.015BC-0.029A^2-0.037B^2-0.00425C^2。$$
(1)

表 3 为 Design-Expert 8.0.5.0 统计软件分析得出的多元二次回归模型系数显著性检验结果。

由表 3 可知,此模型的 F 值 62.23, $P<0.0001$,回归模型高度显著。模型一次项 A、B、C 和二次项 A^2 、 B^2 极显著,交互项 AB、BC、AC 显著, C^2 对还原糖含量的影响不显著。3 个因素均对还原糖含量产生了不同程度的影响,说明本试验设计的因素选择是成功的。回归模型的决定系数 $R^2=0.9875$,调整后的回归模型决定系数 $R^2_{Adj}=0.9714$,说明模

型的拟合程度好。失拟项 $P=0.0839$ 为不显著($P>0.05$),说明该模型无需再引入其他因素,试验条件合适。各因素对还原糖含量的影响序次是:B(糖化酶用量) $>$ C(菠萝蛋白酶用量) $>$ A(α -淀粉酶用量)。

运用 Design-Expert 8.0.5.0 软件对表 2 的数据进行分析,得出二次回归方程的响应面及等高线图见图 5~7。

由图 5 可知, α -淀粉酶用量和糖化酶用量对还原糖含量均有较大影响,且糖化酶用量对还原糖含量的影响大于 α -淀粉酶用量的影响;等高线图椭圆度较大,说明 α -淀粉酶用量和糖化酶用量两因素间交互作用显著。

由图 6 可知,菠萝蛋白酶用量对还原糖含量的影响大于 α -淀粉酶用量的影响;等高线图椭圆度较大,说明 α -淀粉酶用量与菠萝蛋白酶用量两因素间交互作用显著。

由图 7 可知,糖化酶用量和菠萝蛋白酶用量对还原糖含

表 3 回归方程系数显著性检验结果
Table 3 Results of significant test for regression coefficient

来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值	显著性
模型	0.044	9	4.845E-003	62.23	<0.000 1	* *
A	7.813E-003	1	7.813E-003	100.34	<0.000 1	* *
B	0.013	1	0.013	164.40	<0.000 1	* *
C	0.011	1	0.011	135.02	<0.000 1	* *
AB	9.000E-004	1	9.000E-004	11.56	0.011 4	*
AC	6.250E-004	1	6.250E-004	8.03	0.025 3	*
BC	9.000E-004	1	9.000E-004	11.56	0.011 4	*
A ²	3.602E-003	1	3.602E-003	46.27	0.000 3	* *
B ²	5.686E-003	1	5.686E-003	73.03	<0.000 1	* *
C ²	7.605E-005	1	7.605E-005	0.98	0.355 9	—
残差	5.450E-004	7	7.850E-004			
失拟项	4.250E-004	3	1.417E-004	4.72	0.083 9	—
纯误差	1.200E-004	4	3.000E-005			
总量	0.044	16				
变异系数	0.160					
平均值	5.610					

† $P<0.01$,极显著“* *”; $0.01<P<0.05$,显著“*”; $P>0.05$,不显著“—”; $R^2=0.9875$, $R^2_{Adj}=0.9714$ 。

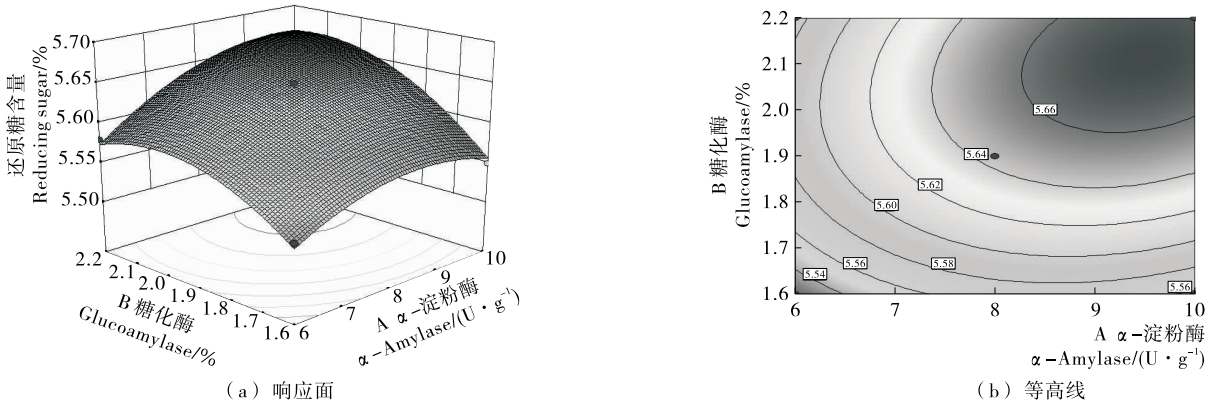


图 5 α -淀粉酶用量与糖化酶用量对还原糖含量影响的响应面及等高线
Figure 5 Response surface layer and contour plot of the mutual-affection of the use level of α -amylase content and of the use level of glucoamylase content on the Reducing sugar content

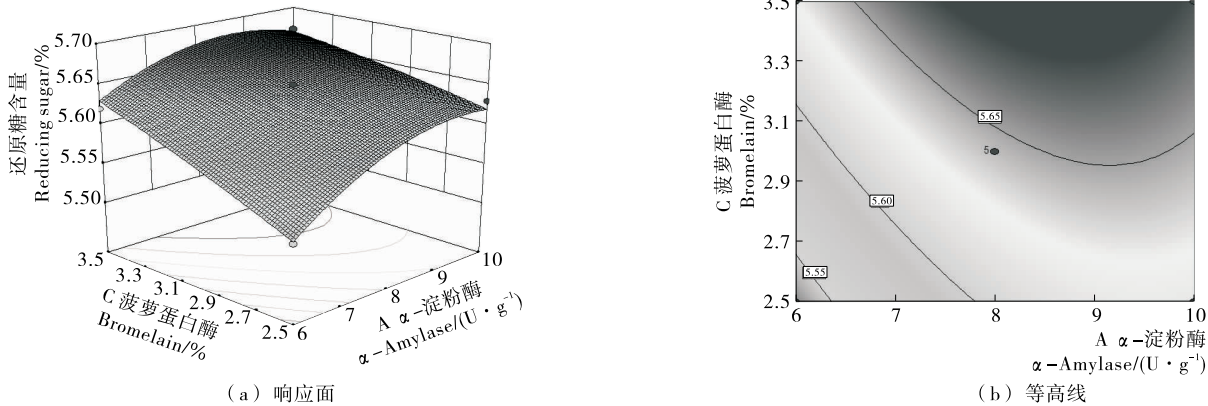


图 6 α -淀粉酶用量与菠萝蛋白酶用量对还原糖含量影响的响应面及等高线

Figure 6 Response surface layer and contour plot of the mutual-affect of the use level of α -amylase content and of the use level of bromelain content on the Reducing sugar content

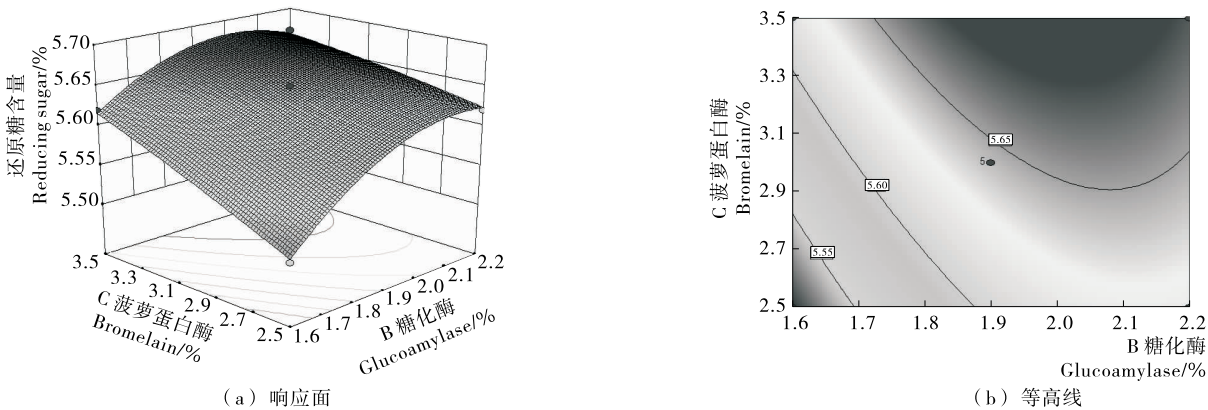


图 7 糖化酶用量与菠萝蛋白酶用量对还原糖含量影响的响应面及等高线

Figure 7 Response surface layer and contour plot of the mutual-affect of the use level of glucoamylase content content and of the use level of bromelain content on the Reducing sugar content

量均有较大影响,且糖化酶用量对还原糖含量的影响大于菠萝蛋白酶用量的影响;等高线图的椭圆度较大,说明糖化酶用量和菠萝蛋白酶用量两因素间交互作用显著。

2.2.3 最佳工艺条件的验证

由 Design-Expert 8.0.5.0 软件得到优化后的青稞酶解液制备工艺,确定最佳工艺参数为:料水比 1 : 15(g/mL),糖化酶用量 2.03%, α -淀粉酶用量 8.90 U/g · 青稞,菠萝蛋白酶用量 3.50%,预测的还原糖含量为 5.69%。根据最佳酶解工艺参数,考虑实验的可操作性,以料水比 1 : 15(g/mL),糖化酶用量 2.0%, α -淀粉酶用量 8.9 U/g · 青稞,菠萝蛋白酶用量 3.5%,进行 3 组平行实验,实验测得值还原糖含量为 5.68%,与理论值的相对误差为 0.17%;其氨基酸含量为 0.47 g/L。采用响应面法优化法得到的青稞酶解液制备的最佳工艺条件与实际相符合。

3 结论

(1) 本研究采用程序升温法对青稞进行酶解,运用响应面法对青稞酶解液制备工艺进行了优化,结果表明 α -淀粉酶用量、糖化酶用量、菠萝蛋白酶用量 3 个因素对青稞酶解液的还原糖含量均有极显著影响,3 个因素两两间的交互作用

对还原糖含量也有显著影响。益生菌发酵青稞酶解液的最佳工艺条件为:按料水比 1 : 15(g/mL)溶解青稞粉,经糊化后冷却至 45 ℃,加入 8.9 U/g · 青稞的 α -淀粉酶和原料质量 2.0%,3.5%的糖化酶、菠萝蛋白酶,保温 20 min 后,再升温到 60 ℃保温酶解直至碘试液体呈无色,过滤得到青稞酶解液,此条件下制备的青稞酶解液的还原糖、氨基酸态氮含量分别为 5.68%、0.47 g/L。

(2) 本研究利用由 α -淀粉酶、糖化酶、菠萝蛋白酶组成的复合酶协同作用和程序升温法对青稞进行酶解,使所制得的酶解液中同时含有碳源、氮源和益生元,可作为制备益生菌发酵青稞饮料的良好基质。

参考文献

[1] 臧靖巍, 阚建全, 陈宗道, 等. 青稞的成分研究及其应用现状[J]. 中国食品添加剂, 2004(4): 43-46.
[2] 党斌, 杨希娟, 刘海棠. 青稞加工利用现状分析[J]. 粮食加工, 2009, 34(9): 69-71.
[3] 王鹏珍, 牛忠海, 张世满, 等. 青稞原料营养成分浅析[J]. 酿酒科技, 1997, 81(3): 30-31.

(下转第 215 页)

age[J]. Journal of Food Process Engineering, 2008, 34(4): 1 156-1 171.

[41] SILVA-PEREIRA M C, TEIXEIRA J A, PEREIRA-JÚNIOR V A, et al. Chitosan/corn starch blend films with extract from Brassica oleraceae, (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 61(1): 258-262.

[42] LIU Bin, HAN Xu, ZHAO Hui-ying, et al. Preparation and characterization of intelligent starch/PVA films for simultaneous colorimetric indication and antimicrobial activity for food packaging applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 842-849.

[43] ABREU A S, OLIVEIRA M, DE S A, et al. Antimicrobial nanostructured starch based films for packaging[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 129: 127-134.

[44] MORRO A, CATALINA F, CORRALES T, et al. New blends of ethylene-butyl acrylate copolymers with thermoplastic starch Characterization and bacterial biodegradation[J]. Carbohydrate Polymers, 2016(10): 149-168.

[45] 庄海宁, 金征宇, 张燕萍. 微孔淀粉在食品微胶囊化中的应用[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 129-132.

[46] ZHANG Li, WANG Ying, LIU Hua, et al. Developing hydroxypropyl methylcellulose/hydroxypropyl starch blends for use as capsule materials[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 73-79.

[47] 曹余, 何绍凯, 刘全亮, 等. 空心胶囊用马铃薯复合改性淀粉的制备[J]. 绿色科技, 2016(4): 196-199.

[48] NAZILA Oladzadabbasabadi, SHOKOUFEH Ebadi, ABDORREZA Mohammadi Nafchi, et al. Functional properties of dually modified sago starch/ κ -carrageenan films; An alternative to gelatin in pharmaceutical capsules[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 160: 43-51.

[49] 周雨佳, 肖茜, 邓放明. 纳米淀粉的制备及其在可食性薄膜中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 229-232.

(上接第 178 页)

[4] 廖文艳, 周凌华, 王荫榆, 等. 近年来益生菌肠道功能作用机制及研究方法的进展[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(2): 184-189.

[5] 李琴, 张世春, 曾晓燕, 等. 益生菌营养及保健作用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(2): 106-108.

[6] MARTENSSON O, OSTEBO R, HOLST O. The effect of yoshurt culture on the survival of probiotic bacteria in oat-based, non-dairy products[J]. Food Research International, 2002(35): 775-784.

[7] 纵伟, 盛欣昕, 谭洪卓, 等. 益生菌发酵苦荞粉酶解液制备工艺研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(3): 14-17.

[8] 万萍. 食品分析与实验[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2015.

[9] 顾国贤. 酿酒工艺学[M]. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2012: 113.

[10] 王春萍, 高丽鹃, 潘志芬, 等. 青藏高原青稞农家品种淀粉颗粒结合蛋白组成及 GBSSI 基因 5 前导序列的多态性[J]. 作物学报, 2012, 38(7): 1 148-1 154.

[11] 万萍, 张宇, 杨兰, 等. 响应面法优化苦荞干黄酒主发酵工艺[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(11): 1 185-1 191.

[12] 李秀霞, 王珍, 李娇, 等. 响应面法优化盐藻油的超声波辅助提取工艺[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 203-207.

(上接第 194 页)

[27] 孙伟峰. 利用酶法和外加香料法对下部烟叶的增香提质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 14-21.

[28] 邱晔, 卢伟, 王建, 等. 造纸法烟草薄片对卷烟一氧化碳碳排放量影响研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2010(S1): 130-133.

[29] 葛少林. 造纸法再造烟叶热解过程与烟气组分调控技术研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2014: 33-43.

[30] 梅秦源. 造纸法重组烟叶品质提升及保香性能研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2014: 27-28.

[31] 黄强, 李楠, 蒋元力. 固定化酶反应器制备新型烟草保润剂的研究[J]. 郑州大学学报: 工学版, 1999, 20(4): 50-52.

[32] 蒋次清, 王岚, 廖臻, 等. 微波马弗炉测定烟草中灰分的研究[J]. 安徽农业科学, 2012(7): 3 980-3 980.

[33] 王非凡. 碳酸钙加入量对造纸法再造烟叶的影响[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(24): 162-163.

[34] 曾健, 陈克复, 谢剑平, 等. 碳酸钙对造纸法再造烟叶片基的影响[J]. 烟草科技, 2013(10): 5-16.

[35] 罗冲, 胡惠仁, 温洋兵. 填料在造纸法烟草薄片生产中的应用研究[J]. 中华纸业, 2012, 33(16): 22-25.

[36] 王浩雅, 殷艳飞, 杨帅, 等. 碳酸钙添加量对再造烟叶物理性能与烟气指标的影响[J]. 中华纸业, 2015, 36(12): 22-26.

[37] 高文花. 特种植物废弃物高效利用技术的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013: 68-71.

(上接第 210 页)

[45] STREIT W R, SCHMITZ R A. Metagenomics-the key to the uncultured microbes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(5): 492-498.

[46] CHUNG E J, LIM H K, KIM J C, et al. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in Escherichia coli[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(3): 723-730.

[47] KAKIRDE K S, PARSLEY L C, LILES M R. Size Does Matter: Application-driven Approaches for Soil Metagenomics[J]. Soil Biol Biochem, 2010, 42(11): 1 911-1 923.

[48] 蒋云霞, 郑天凌. 天然红树林土壤微生物大片段宏基因组文库的构建[J]. 环境科学, 2007, 28(11): 2 609-2 614.

[49] KIM U J, BIRREN B W, SLEPAK T, et al. Construction and Characterization of a Human Bacterial Artificial Chromosome Library[J]. Genomics, 1996, 34(2): 213-218.

[50] 苟敏, 曲媛媛, 周集体, 等. 活性污泥宏基因组 Fosmid 文库的构建[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2012, 40(1): 120-124.