

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2022.90191

包埋提高异常威克汉姆酵母醛脱氢酶的稳定性

Preliminary study of encapsulation to improve stability of ALDH of *Wickerhamomyces anomalus*

陈 耕¹ 倪育军² 钟 敏³ 徐莉娜³ 郭薇丹³CHEN Geng¹ NI Yu-jun² ZHONG Min³ XU Li-na³ GUO Wei-dan³

(1. 湖南省产商品评审中心, 湖南 长沙 410111; 2. 湘潭市食品药品检验所,

湖南 湘潭 411101; 3. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南 长沙 410004)

(1. Hunan Provincial Commodity Review Center, Changsha, Hunan 410111, China; 2. Xiangtan Food and Drug Inspection Institute, Xiangtan, Hunan 411101, China; 3. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

摘要:目的:提高威克汉姆酵母醛脱氢酶在冷藏和胃肠道环境中的稳定性,开发消减胃肠道内活性醛的产品。方法:从 6 株异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)中选取醛脱氢酶(ALDH)活性最高的菌株提取 ALDH,采用海藻酸钠-氯化钙法对 ALDH 进行包埋,研究了包埋对 ALDH 在冷藏及模拟胃肠道环境中的稳定性。结果:*W. anomalus* 菌株 J3、J7、J8、J9、J12、J18 产生的 ALDH 比活力在 86.77~482.14 U/mg, 菌株 J9 的 ALDH 的比活力最高,为 482.14 U/mg;最优包埋条件为海藻酸钠 3.0%,氯化钙 3.0%,包埋酶的活力为 480.71 U/g;游离酶在 4 °C 下放置 5 d 酶活下降至 50% 以下,包埋酶酶活维持在 90% 以上;在体外模拟胃肠道环境下,游离酶在模拟胃液中 10 min 内完全失去活性,而包埋酶在胃液环境中 3 h 酶活保留率为 56.39%,肠液中 1 h 酶活保留率为 56.35%。结论:海藻酸钠-氯化钙包埋法可显著提高异常威克汉姆酵母 ALDH 的稳定性。

关键词:异常威克汉姆酵母;醛脱氢酶;包埋;稳定性

Abstract: Objective: This study aimed to improve the stability of *Wickerhamomyces anomalus* aldehyde dehydrogenase in cold storage and gastrointestinal environment, so as to develop products that reduce active aldehydes in gastrointestinal tract. **Methods:** ALDH was extracted from 6 *Wickerhamomyces anomalus* strains with the highest activity of aldehyde dehydrogenase (ALDH), and encapsulated by sodium alginate and calcium chloride method. The stability of ALDH by embedding was studied in cold storage and simulated gastrointestinal environment. **Results:** The specific activity of ALDH produced by *W. anomalus* J3, J7, J8,

J9, J12 and J18 ranged from 86.77 U/mg to 482.14 U/mg, and that of J9 was the highest at 482.14 U/mg. The optimal embedding conditions were sodium alginate 3.0% and calcium chloride 3.0%, and the activity of the enzyme was 480.71 U/g. When the free enzyme was placed at 4 °C for 5 days, the enzyme activity decreased to below 50%, and the enzyme activity of embedding enzyme remained above 90%. In the simulated gastrointestinal tract environment *in vitro*, the free enzyme completely lost its activity in simulated gastric juice within 10 min, while the retention rate of immobilized enzyme in gastric juice for 3 h and intestinal juice for 1 h was 56.39% and 56.35%, respectively. **Conclusion:** Sodium alginate-calcium chloride embedding method can significantly improve the ALDH stability of *W. anomalus*.

Keywords: *Wickerhamomyces anomalus*; aldehyde dehydrogenase; encapsulation; stability

研究^[1-3]表明,食品中的不饱和醛对人体健康有负面影响。例如,食品中的糖基化反应、蛋白质氧化和脂肪氧化所产生的丙酮醛与一些口腔疾病如牙周病有关^[4];二羰基醛类化合物与慢性糖尿病有关^[5];丙烯醛、巴豆醛可诱导基因突变以及抑制 DNA 修复^[6]。醛脱氢酶(ALDH, EC 1.2.1)是一种可催化内源和外源性醛类化合物脱氢的胞内酶^[7],常用于消减食品中的不饱和醛从而减轻因摄入不饱和醛而给机体带来的危害。目前,ALDH 主要来源于动物肝脏,存在稳定性差、成本高、催化效率低等问题^[8],因此其应用受到限制。大量微生物具有较高的 ALDH 活性,如酵母^[8-9]、醋酸菌^[10]、乳酸菌^[11]以及深海细菌^[12],利用微生物提取 ALDH 并采用固定化的方式来稳定酶活是一种有效解决上述问题的方法。付湘晋^[13]研究发现,用葡萄酒酵母细胞处理鱼糜 2 h 后,鱼糜中丙二醛含量下降了 70%, 2,4-庚二烯醛和 2,4-癸二烯醛的含量低于检出限。刘薇

基金项目:湖南省教育厅重点项目(编号:18A155)

作者简介:陈耕(1970—),湖南省市场监督管理局高级工程师。

E-mail: 417150091@qq.com

收稿日期:2022-01-25

丛^[14]从传统发酵食品中筛选出的6株具有耐冷冻特性的异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)菌株J3、J7、J8、J9、J12、J18可消减鱼肉中的脂肪氧化产物丙二醛,是潜在的鱼肉、肉类生物保鲜剂。研究拟测定上述6株(J3、J7、J8、J9、J12、J18)酵母菌株的ALDH活性,并采用海藻酸钠—氯化钙法对ALDH进行包埋,分析游离ALDH及包埋ALDH在冷藏、模拟胃肠道环境中的稳定性,以期开发可用于消减胃肠道内活性醛的产品提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)菌株J3、J7、J8、J9、J12、J18:中南林业科技大学食品科学与工程学院实验室。

1.2 材料与试剂

二硫苏糖醇:分析纯,上海如吉生物科技有限公司;

氯化钙、葡萄糖:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

NAD⁺:上海如吉生物科技有限公司;

海藻酸钠、蛋白胨、酵母浸粉、琼脂:国药集团化学试剂有限公司;

胃蛋白酶:1 200 U/g,国药集团化学试剂有限公司;

胰蛋白酶:500 U/g,国药集团化学试剂有限公司;

液体培养基:2%葡萄糖,2%蛋白胨,1%酵母浸粉;

固体培养基:在液体培养基的基础上加入2%琼脂。

1.3 仪器与设备

微生物培养箱:SPK-150BIII型,北京中兴伟业仪器有限公司;

立式自动压力蒸汽灭菌锅:G154DWS型,厦口致微仪器有限公司;

超净工作台:SW-CJ-IFD型,苏州安泰空气技术有限公司;

紫外可见分光光度计:BluestarB型,北京莱伯泰科仪器股份有限公司;

超声波细胞破碎仪:JY92-IIIN型,宁波新芝有限公司;

离心机:TG25KR型,长沙东旺实验仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 酵母菌活化和扩大培养 参照刘薇丛^[14]的方法并稍作修改,将斜面培养基的酵母接种于液体培养基,在28℃、150 r/min条件下培养24 h进行活化,再以5%的接种量进行扩大培养得到酵母菌悬液。

1.4.2 酵母菌粗酶液制备与检测

(1) 酵母菌粗酶液制备:参照衣海龙^[15]的方法并稍作修改,取1.4.1中培养好的菌液100 mL,在4℃下以8 000 r/min离心15 min,弃上清液,并用0.05 mol/L、pH 8.0的磷酸钾缓冲溶液30 mL洗涤酵母菌细胞泥1次,然后在4℃下以10 000 r/min离心10 min收集得到酵母泥。将湿酵母按 $m_{\text{湿酵母}}:m_{\text{缓冲液}}=1:30$ 重悬溶于0.05 mol/L PBS (pH 8.0)缓冲液中,于冰水浴中超声波

破碎。超声参数:超声功率300 W、超声时间7 s、间歇5 s、全程时间15 min。将细胞破碎物于4℃下以12 000 r/min离心15 min,取上清液进行醛脱氢酶活性和蛋白浓度测定。

(2) 醛脱氢酶活性检测:参照Okibe等^[16]的方法。酶活反应体系组成:2.52 mL Tris-HCl缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.0)、0.1 mL 3 mol/L KCl溶液、0.1 mL 0.02 mol/L NAD⁺溶液、0.1 mL 0.05 mol/L EDTA溶液、0.03 mL 0.05 mol/L 二硫苏糖醇溶液、0.05 mL 0.1 mol/L 乙醛溶液、0.1 mL 粗酶液。酶活性测定体系和待测酶液分别在25℃下恒温水浴5 min,将待测酶液迅速加入酶活反应体系中混匀,立即放入分光光度计中,每隔1 min读取340 nm处的吸光度值,持续5 min。定义每分钟转化1 μmol的底物所需酶量为一个酶活力单位(U)。

(3) 粗蛋白含量检测:参照万茵等^[11]的方法。用缓冲液的吸光度作为空白值,分别测定蛋白溶液在260 nm及280 nm处的吸光度,按式(1)计算蛋白质质量浓度。

$$C=1.45\times A_{280\text{ nm}}-0.74\times A_{260\text{ nm}}, \quad (1)$$

式中:

C——蛋白质质量浓度,mg/mL;

$A_{280\text{ nm}}$ ——蛋白溶液在280 nm处的吸光度;

$A_{260\text{ nm}}$ ——蛋白溶液在260 nm处的吸光度。

1.4.3 比活力计算 按式(2)计算比活力。

$$A=\frac{E}{P}, \quad (2)$$

式中:

A——比活力,U/mg;

E——酶活力,U;

P——蛋白质含量,mg。

1.4.4 酶的包埋 参照刘天龙^[17]的海藻酸钠—氯化钙包埋法,将10 mL海藻酸钠溶液加热溶解,冷却后与5 mL的游离酶液混合均匀,用一次性的注射器将海藻酸钠与酶液混合液匀速滴入氯化钙溶液中,形成大小均一的光滑颗粒,固化1 h后过滤取出,用蒸馏水洗涤,4℃下静置硬化2 h。

1.4.5 包埋酶的活性测定 称取1 g包埋酶的海藻酸钠—氯化钙颗粒,加入0.05 mol/L、pH 8.0的PBS缓冲液4 mL,充分碾磨,于4℃下以12 000 r/min离心15 min,取上清液0.1 mL按1.4.2中方法测定醛脱氢酶活性。

1.4.6 包埋酶冷藏稳定性 分别取包埋酶和游离酶保存于4℃冰箱中,连续5 d内每天定时定量取出测定两者的残余酶活。

1.4.7 包埋酶在模拟胃肠液中的酶活变化 参考万茵等^[11]的方法制备模拟胃液、模拟肠液。

在模拟胃液中加入粗酶液或包埋酶,置于37℃、160 r/min的摇床振180 min,于0、10、20、30、40、50、60、90、180 min时,测定消化液中ALDH酶活。以未经消化的粗酶液和包埋酶活性视作100%酶活,计算酶活性保留率。

在模拟肠液中加入粗酶液或包埋酶,于 0,10,20,30,40,50,60 min 时测定 ALDH 酶活。以未经消化的粗酶液和包埋酶活性视作 100%酶活,计算酶活性保留率。

1.5 数据统计与分析

所有试验均重复 3 次,结果用平均值±标准差表示,采用 Excel 软件进行数据统计、绘图,采用 SPSS 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 异常威克汉姆酵母菌 ALDH 活性

6 株 *W. anomalus* 菌株 J3、J7、J8、J9、J12、J18 的 ALDH 酶测定结果见图 1。J9 的比活力[(482.14±14.62) U/mg]显著高于其他 5 株的,选用酶活最高的 J9 进行后续试验。9 号菌株与干酵母 0.465 U/mg^[8]、酿酒酵母 120 U/mg^[9]、醋酸菌 20.25 U/mg^[10]、醋化醋杆菌 0.893 U/mL^[18]、深海细菌 52.44 U/mg^[12] 相比也具有明显的优势。

2.2 海藻酸钠添加量对 ALDH 酶活性的影响

设定氯化钙的添加量为 3% (质量分数),分别与 2.0%,2.5%,3.0%,3.5%,4.0% 的海藻酸钠对 ALDH 酶进行包埋,得到的酶活见图 2。

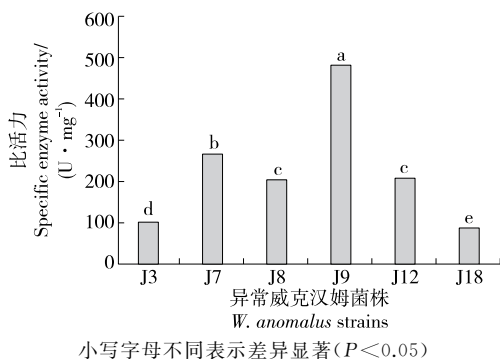


图 1 6 株异常威克汉姆酵母 ALDH 活性

Figure 1 ALDH activity of 6 *Wickerhamomyces anomalus* strains

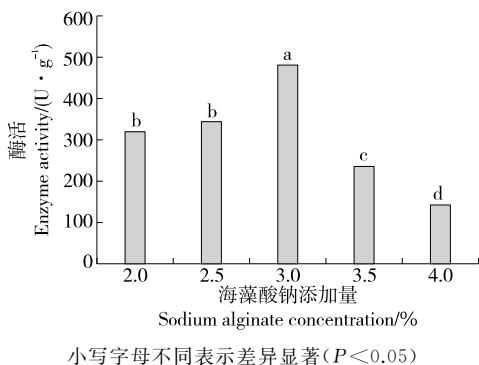


图 2 海藻酸钠添加量对包埋酶酶活的影响

Figure 2 Effect of sodium alginate concentration on enzyme activity

由图 2 可知,当海藻酸钠添加量为 3% 时,包埋效果显著高于其他添加量的。随着海藻酸钠添加量的增加,包埋酶酶活呈上升趋势,当海藻酸钠添加量高于 3.0% 时,随着海藻酸钠添加量的增加,酶活呈下降趋势。可能是因为海藻酸钠含量较低时包埋的凝胶结构不够紧密导致包埋率低,随着海藻酸钠含量的增加,形成的凝胶强度增加,内部结构更加稳定从而提高了包埋率。但是高含量的海藻酸钠形成的凝胶强度过大,硬度上升,导致注射器挤压出的颗粒呈不规则的圆形并有拖尾的现象,影响了酶的包埋和释放效果从而影响酶活^[19]。

2.3 氯化钙添加量对 ALDH 酶活性的影响

设定海藻酸钠添加量为 3.0%,分别与 2.0%,2.5%,3.0%,3.5%,4.0% 的氯化钙对 ALDH 酶进行包埋,得到的酶活见图 3。由图 3 可知,不同氯化钙添加量下的包埋酶酶活差异显著。其中,添加 3.0% 的氯化钙包埋效果显著优于其他添加量的。随着氯化钙添加量的增加,包埋效果提高,当氯化钙添加量高于 3.0% 时,包埋效果下降。可能是低含量的氯化钙与海藻酸钠形成的海藻酸钙凝胶强度较小,会导致酶流失^[12]。氯化钙添加量过高可能使海藻酸钙凝胶的内部网状结构发生变化,从而影响底物分子与酶分子的相互结合与作用,使酶活受到影响^[19]。

2.4 包埋酶的冷藏稳定性

由图 4 可知,未进行包埋的游离酶在 5 d 内相对酶活下降至 44.13%,而包埋酶的相对酶活仅下降了 6.69%,游离酶的酶活下降速率明显快于包埋酶的,说明用海藻酸钠和氯化钙进行包埋对酶起到了较好的保护效果。

2.5 模拟胃肠道环境下酶活变化

未进行包埋的游离酶经胃液消化 10 min 后已检测不出酶活,说明该酶在胃液环境中极不稳定。而利用海藻酸钠与氯化钙进行包埋后的酶在模拟胃液消化环境下表现出较好的稳定性,包埋酶经胃液消化 3 h 后,酶活仍然保留了 56.39% (图 5)。在模拟肠液消化环境下,包埋酶在前 30 min 表现出良好的稳定性,相对酶活保持在 90% 以上,之后酶活下降速度加快,降至 60% 以下 (图 6),与

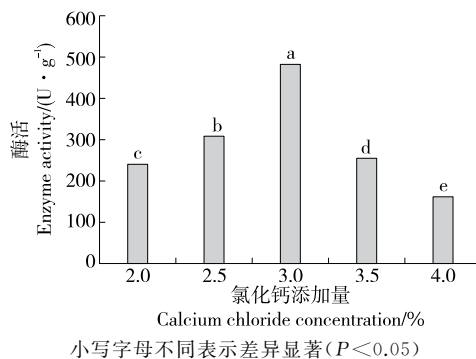


图 3 氯化钙添加量对包埋酶酶活的影响

Figure 3 Effect of calcium chloride concentration on enzyme activity

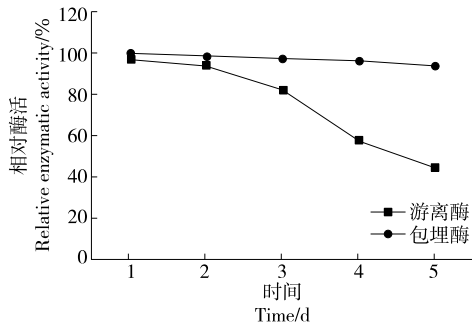


图4 游离酶与包埋酶稳定性的比较

Figure 4 Comparison of the stability of free enzyme and embedding enzyme

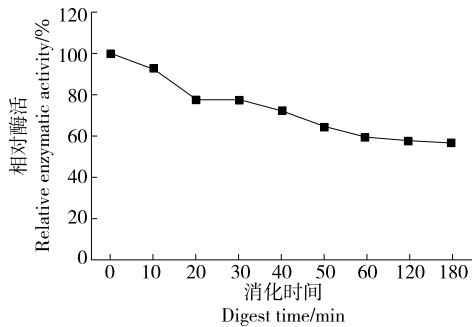


图5 包埋酶在模拟胃液消化环境下的酶活变化

Figure 5 Enzyme activity changes of embedding enzymes in simulated gastric juice digestion

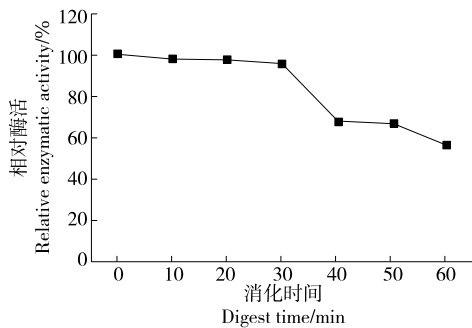


图6 包埋酶在模拟肠液消化环境下的酶活变化

Figure 6 Enzyme activity changes of embedding enzyme in simulated intestinal juice dig

万茵等^[11]的研究结果一致。可能是因为海藻酸钙颗粒的结构受到了破坏,导致内部包埋的酶渗出,但是酶活仍然被较好保留,说明海藻酸钠与氯化钙的包埋起到了较好的保护效果,有效增加了 ALDH 在胃肠道环境下的稳定性。

3 结论

对 6 株 *W. anomalous* 酵母的 ALDH 酶活进行测定,发现 J9 酵母菌株的 ALDH 酶活最高。选取 J9 作为研究对象,优化 ALDH 酶包埋工艺,最终结果显示 3.0% 海藻酸钠与 3.0% 氯化钙的包埋效果最佳,包埋酶在冷藏及在胃肠道环境下有很好的稳定性。可促进酵母菌醛脱氢酶

在食品领域的广泛应用,对于降低加工类食品中的一些有害醛类从而降低食品中的风险具有深远意义。后续可进一步研究 ALDH 酶体内活性及清除活性醛的效果。

参考文献

- [1] XU L, GUO W, LIU W, et al. Metabolites analysis for cold-resistant yeast (*Wickerhamomyces anomalous*) strains own antioxidant activity on cold stored fish mince [J]. *Food Chemistry*, 2020, 303: 125368.
- [2] 李光磊. 美拉德反应中健康危害物的产生规律研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016: 12.
LI Guang-lei. Study on the production of health hazards in maillard reaction[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016: 12.
- [3] 刘学伟, 杨克, 张杰. 丙酮醛对人牙周膜成纤维细胞的毒性作用[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2006(S1): 393-395.
LIU Xue-wei, YANG Ke, ZHANG Jie. Toxic effect of acetone aldehyde on human periodontal ligament fibroblasts[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*, 2006(S1): 393-395.
- [5] 王倩, 江国荣, 王纯庠. 二羰基化合物与糖尿病慢性并发症关系的研究进展[J]. *安徽医药*, 2010, 14(2): 130-133.
WANG Qian, JIANG Guo-rong, WANG Chun-xiang. Research progress of relationship between dicarbonyl compounds and diabetic chronic complications[J]. *Anhui Medical*, 2010, 14(2): 130-133.
- [6] STEIN S, LAO Y, YANG I Y, et al. Genotoxicity of acetaldehyde and crotonaldehyde-induced 1,2-propanodeoxyguanosine DNA adducts in human cells[J]. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2006, 608(1): 1-7.
- [7] 郑连姬, 邓利玲, 罗嘉妮, 等. 魔芋葡甘聚糖抗解酒作用机理研究[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 156-161.
ZHENG Lian-ji, DENG Li-ling, LUO Jia-ni, et al. Study on the mechanism of konjac glucomannan anti-alcoholism[J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(5): 156-161.
- [8] 陈贵伦. 雪峰干酵母中乙醛脱氢酶提取及其酶学性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 21.
CHEN Gui-lun. Extraction and enzymatic properties of acetaldehyde dehydrogenase from Xuefeng dry yeast[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012: 21.
- [9] 吴桂英, 赵玉凤, 吴元欣, 等. 酿酒酵母细胞破碎释放乙醛脱氢酶的研究[J]. *食品工业科技*, 2007(3): 61-63.
WU Gui-ying, ZHAO Yu-feng, WU Yuan-xin, et al. Study on acetaldehyde dehydrogenase released by yeast cell disruption [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007(3): 61-63.
- [10] 张鸣明, 宋勇强, 李素岳, 等. 醋酸菌中乙醛脱氢酶的分离纯化及酶学性质[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(10): 100-104.
ZHANG Ming-ming, SONG Yong-qiang, LI Su-yue, et al. Isolation, purification and enzymatic properties of aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria [J]. *Technology of Food Industry*, 2018, 39(10): 100-104.

(下转第 18 页)

- Current Science, 2010, 98(6): 763-765.
- [18] RAYMUNDO A, FRADINHO P, NUNES M C. Effect of Psyllium fibre content on the textural and rheological characteristics of biscuit and biscuit dough[J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2014, 3(2): 96-105.
- [19] 罗文珊, 谢文佩. 柚皮粉膳食纤维面包的加工工艺及品质影响[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(9): 122-128.
- LUO Wen-san, XIE Wen-pei. Processing technology and quality influence of pomelo powder dietary fiber bread[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(9): 122-128.
- [20] AZEEM M, MU T H, ZHANG M. Influence of particle size distribution of orange-fleshed sweet potato flour on dough rheology and simulated gastrointestinal digestion of sweet potato-wheat bread[J]. *LWT*, 2020, 131: 109690.
- [21] MILLAR C, BARRY R R, et al. Dough properties and baking characteristics of white bread, as affected by addition of raw, germinated and toasted pea flour[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2019, 56: 102189.
- [22] 贾玉华, 钟耀广. 甘薯渣粉对小麦粉面团物化特性及面包品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(21): 81-85.
- JIA Yu-hua, ZHONG Yao-guang. Effect of sweet potato residue flour on the physico-chemical properties of dough and the quality of bread[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(21): 81-85.
- [23] 王玺, 闫晨苗, 李铁梅, 等. 马铃薯粉粒度对面包风味及品质的影响[J]. *食品工业*, 2020, 41(12): 137-141.
- WANG Xi, YAN Chen-miao, LI Tie-mei, et al. Effect of potato flour mesh size on the flavor and quality of bread[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(12): 137-141.
- [24] 李叶贝, 任广跃, 屈展平, 等. 不同粒度马铃薯全粉对复合面条品质的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(19): 55-60.
- LI Ye-bei, REN Guang-yue, QU Zan-ping, et al. Effects of different grain sizes of potato flour on the quality of wheat based composite flour noodles[J]. *Food Science*, 2017, 38(19): 55-60.
- [25] XIE F, HUANG Q, FANG F, et al. Effects of tea polyphenols and gluten addition on in vitro wheat starch digestion properties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 126: 525-530.
- [26] HEGDE P S, RAJASEKARAN N S, CHANDRA T S. Effects of the antioxidant properties of millet species on oxidative stress and glycemic status in alloxan-induced rats [J]. *Nutrition Research*, 2005, 25(12): 1 109-1 120.
- [27] 马艺超, 路飞, 马凤鸣, 等. 体外模拟消化对苦荞面包黄酮及抗氧化的影响[J]. *中国粮油学报*, 2019, 34(9): 20-27.
- MA Yi-chao, LU Fei, MA Feng-ming, et al. Effects of in vitro simulated digestion on flavonoids and antioxidants in tartary buckwheat bread[J]. *Journal of The Chinese Cereals and Oils Association*, 2019, 34(9): 20-27.
-
- (上接第 11 页)
- [11] 万茵, 罗成, 张鸿婷, 等. 海藻酸钠微胶囊对乳酸菌产乙醛脱氢酶在体外胃肠消化环境中保护作用[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(9): 61-65.
- WAN Yin, LUO Cheng, ZHANG Hong-ting, et al. The protective effect of sodium alginate microcapsules on acetaldehyde dehydrogenase produced by lactic acid bacteria in vitro gastrointestinal digestion environment[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2018, 44(9): 61-65.
- [12] 叶军. 深海细菌 *Halomonas axialensis* ACH-L-8 的醛类降解功能分析及应用研究[D]. 厦门: 集美大学, 2016: 30-32.
- YE Jun. Aldehyde degradation function analysis and application of halomonas axialensis ACH-L-8 [D]. Xiamen: Jimei University, 2016: 30-32.
- [13] 付湘晋. 白鲢鱼脱腥及其低盐鱼糜制备的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 92.
- FU Xiang-jin. Study on deodorization of silver carp and preparation of low-salt surimi [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009: 92.
- [14] 刘薇丛. 抗冻酵母的筛选及其代谢物的研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2018: 34.
- LIU Wei-cong. Screening of antifreeze yeasts and their metabolites[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2018: 34.
- [15] 衣海龙. 利用超声波法破碎啤酒酵母细胞壁的工艺研究[J]. *酿酒*, 2015, 42(4): 83-85.
- YI Hai-long. Study on breaking beer yeast cell wall by ultrasonic method[J]. *Winemaking*, 2015, 42(4): 83-85.
- [16] OKIBE N, AMADA K, HIRANO S, et al. Gene cloning and characterization of aldehyde dehydrogenase from a petroleum-degrading bacterium, strain HD-1[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88(1): 7-11.
- [17] 刘天龙. 异丙醇脱氢酶固定化工艺研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018: 27.
- LIU Tian-long. Study on the immobilization process of isopropanol dehydrogenase[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018: 27.
- [18] 李文, 王陶, 李同祥. 醋化醋杆菌产乙醛脱氢酶发酵条件优化及酶学性质[J]. *食品科技*, 2013, 38(11): 24-28.
- LI Wen, WANG Tao, LI Tong-xiang. Optimization of fermentation conditions and enzymatic properties of aldehyde dehydrogenase from acetobacter[J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(11): 24-28.
- [19] 王静, 揣玉多, 汤卫华, 等. 海藻酸钠包埋法固定 L-阿拉伯糖异构酶的研究[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(16): 92-95.
- WANG Jing, CHUAI Yu-duo, TANG Wei-hua, et al. Study on immobilization of L-arabinose isomerase by sodium alginate embedding method[J]. *Food Research & Development*, 2017, 38(16): 92-95.