

定向驯化筛选耐毒酵母

李小娟, 黄 瑞, 张 超, 罗 彬, 龚大春*

(三峡大学新能源研究院, 艾伦麦克德米德再生能源研究所 湖北宜昌 443002)

摘 要:通过向五种驯化培养基中逐渐增加抑制剂, 经过 23d 的连续驯化后, 找到一株适用于纤维素水解液发酵生产乙醇的耐毒酵母。耐毒酵母和原始菌株在含有乙酸 3.2g/L, 糠醛 0.8g/L, 甲酸 0.4g/L 的培养基中生长时, 耐毒酵母的乙醇产率为 0.428g/g, 达到理论值的 85.6%, 而原始菌株产率为 0.246g/g, 仅达到理论值的 52.8%。耐毒酵母经连续传代 5 次, 其产乙醇性能基本保持稳定。与原始菌株相比, 耐毒酵母展现了良好的耐毒性状和高效利用葡萄糖发酵产生乙醇的能力。

关键词:驯化, 耐毒酵母, 酿酒酵母

Adaptation of a *Saccharomyces Cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by domestication

LI Xiao-juan, HUANG Rui, ZHANG Chao, LUO Bin, GONG Da-chun*

(Research Institute for New Energy, Alan G. Macdiarmid Institute of Renewable Energy,
China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: In order to find the strains which could reach high ethanol production as well as tolerate inhibitors on the lignocellulose acid hydrolysates. Through sequentially increasing in the concentration of inhibitory compounds in five different acclimation media and acclimatizing 23 days, the yeast resistant to drug was obtained suitable to produce the ethanol from the lignocellulose acid hydrolysates. When the yeast resistant to drug and the parent strain grew in the same media which contained several inhibitory compounds 3.2g/L acetic acid, 0.8g/L furfural, 0.4g/L formic acid, the drug resistant yeast's maximal ethanol yield could reach 0.428g/g, up to 85.6% of theoretical ethanol yield. Compared with drug resistant yeast, the parent strain's maximal ethanol production yield only could reach 0.246g/g, up to 52.8% of theoretical ethanol yield. After 5 continuous passages, the average ability of producing ethanol was stable. Compared with parent strain, the yeast resistant to drug had good ability to ferment glucose and produce ethanol as well as tolerate inhibitors.

Key words: a cclimation; yeast resistant to drug; *Saccharomyces Cerevisiae*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)07-0163-05

随着化石燃料资源的日益枯竭和使用过程中产生的一系列环境污染问题, 纤维素乙醇以原料来源广泛, 可再生, 被认为是最具有发展前景的新型能源之一^[1]。但是在木质纤维素的预处理的过程中, 会不可避免地产生一些对酿酒酵母生长和发酵有抑制作用的物质^[2], 这些抑制因子主要是甲酸、乙酸^[3]、糠醛^[4], 它们能延长酿酒酵母生长的延滞期, 严重减少乙醇产量^[5], 成为木质纤维素开发为燃料乙醇的关键难题^[6]。

为了促进燃料乙醇的工业化进程, 人们对水解液进行脱毒处理, 但是此方法会增加生产成本, 而且在脱毒处理过程中也会损失部分糖类^[7]。相比较脱毒处理, 耐毒酵母成本低廉, 而且相比较基因重组的

菌种而言, 具有稳定的遗传性^[8], 因此寻找耐毒的高产酒精酵母对燃料乙醇的发展前景具有重要的意义^[9]。

本实验室经过长期的驯化, 筛选出一株耐毒菌株, 能够在含有甲酸、乙酸、糠醛的复合抑制剂中良好生长, 相比较没有经过驯化的原始菌株而言, 具有良好的发酵性能和产乙醇能力的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

斜面培养基: 葡萄糖 10g/L, 蛋白胨 5g/L, 酵母浸粉 3g/L, 麦芽浸粉 3g/L, 琼脂 20g/L。活化培养基: 葡萄糖 10g/L, 蛋白胨 5g/L, 酵母浸粉 3g/L, 麦芽浸粉 3g/L。驯化培养基: 葡萄糖 25g/L, 酵母浸粉 1g/L, KH_2PO_4 1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g/L。高糖培养基: 葡萄糖 200g/L, 酵母浸粉 50g/L, 蛋白胨 3g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, MgSO_4 2g/L, 维生素 B_{12} 0.1g/L, 维生素 C 0.1g/L, 生物素 0.2g/L, 吐温 80 1g/L, 山梨醇 10g/L。

收稿日期: 2013-08-08 * 通讯联系人

作者简介: 李小娟(1988-), 女, 在读研究生, 从事生物能源研究。

基金项目: “湿氧化爆破法处理木质纤维素的降解动力学的研究”(21076114)。

UV-1100 分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;GC-7890F 气相色谱仪 上海无美科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 5.8):准确称取 Na_2HPO_4 7.134g,溶解后用蒸馏水溶解后稀释至 100mL。配制成浓度为 0.2mol/L 溶液备用。准确称取 NaH_2PO_4 46.752g,溶解后用蒸馏水溶解后稀释至 1000mL。配制成浓度为 0.3mol/L 溶液备用。将 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 备用液按 8:92 比例混合即可。

Mg(II) 储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取 0.1660g 氧化镁溶于稀盐酸中,转移到 1000mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀待用。准确移取上述镁储备液 10mL 于 100mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀待用。

刚果红溶液(0.03%):准确称取刚果红 0.03000g 溶于适量水中,转移到 100mL 容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀备用。

水杨酸溶液(1%):准确称取水杨酸 5.0000g 溶于适量无水乙醇溶液中,转移到干燥的 500mL 容量瓶中,用无水乙醇溶液稀释至刻度,摇匀备用。

NaOH 溶液(1mol/L):准确称取 NaOH 40.0000g 溶于适量水中,转移到 1000mL 容量瓶中,待其完全冷却后用水稀释至刻度,摇匀备用。

1.2.2 定向驯化筛选耐毒酵母 取斜面培养基上的一环菌种接种到活化培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,150r/min 培养 24h。取 10mL 活化后的菌液接种到 90mL 驯化培养基 A 中,保证最初的生物量为 0.1g/L,每隔 6~12h 测量样品中的生物量和葡萄糖含量。当培养液中的葡萄糖含量小于起始葡萄糖含量的 90% 时,摇床停止晃动,静止 15min,使培养基中的菌体自然沉淀在摇瓶底部。在无菌的条件下,把摇瓶底部的 10mL 菌液接种到下一个批次 90mL 的驯化培养基中,摇床恢复晃动,此时作为下一个批次驯化的起始位点,重复以上操作,直到完成所有批次的驯化。在驯化菌种的过程中,当培养液中的葡萄糖含量小于起始葡萄糖含量的 10% 时,要迅速的更换培养基,尽量的减少菌体的饥饿时间。为了使菌体能更好的适应抑制剂浓度的变化,每个抑制剂浓度的驯化要重复 8 次以上。

当完成所有批次的驯化后,筛选出来的菌株接种到含有 4g/L 乙酸和 1g/L 糠醛的斜面培养基中^[10],保持菌株的耐毒能力。

表 1 驯化培养基中各个梯度的抑制剂的浓度

Table 1 Concentration of inhibitory compounds in the fermentation media used for adaptation of *Saccharomyces cerevisiae*

抑制剂种类	A	B	C	D	E
乙酸(g/L)	0.8	1.6	2.4	3.2	4.0
甲酸(g/L)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
糠醛(g/L)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0

1.2.3 耐毒酵母和原始菌株发酵性能的比较 取一

环耐毒酵母和没有经过驯化的原始菌株,各自接种到活化培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,150r/min,培养 24h,取 10mL 活化后的菌液接种到 90mL 驯化培养基 D 中,保证最初的生物量为 0.1g/L,每隔 6h 测量样品中的生物量、葡萄糖含量、乙醇含量。把耐毒酵母接种到不含抑制剂的驯化培养基中,作为空白对照。

1.2.4 耐毒酵母与原始菌株细胞膜完成性的比较

取一环耐毒酵母和没有经过驯化的原始菌株,各自接种到活化培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,150r/min,培养 24h,待 OD 值为 6.0(波长为 600nm),离心(5000 $\times g$)收集酒酵母细胞,用 PBS 溶液洗涤三次后,去滤液待用,配制含有 50g/L 葡萄糖的 PBS,分别加入复合抑制剂(乙酸 3.2g/L,糠醛 0.8g/L,甲酸 0.4g/L)加入上述过滤后的菌体,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 分钟后离心(18000 $\times g$) 5min 分离出酿酒酵母,取上清液用紫外分光光度法测定镁离子含量。

1.2.5 耐毒酵母产乙醇性能稳定性的评价 将耐毒酵母按照液体保藏法传代 5 次,比较各代在乙酸 3.2g/L,糠醛 0.8g/L,甲酸 0.4g/L 生长时乙醇产量,每隔 6h 测定产乙醇量,对耐毒酵母产乙醇性能稳定性进行评价。

1.2.6 耐毒酵母拟工业化生产 将耐毒酵母接种到高糖培养基中,加入复合抑制剂(乙酸 3.2g/L,糠醛 0.8g/L,甲酸 0.4g/L),28 $^{\circ}\text{C}$,150r/min,每隔 6h 测量样品中的生物量、葡萄糖含量、乙醇含量。

1.3 测定方法

1.3.1 乙醇含量测定 气相色谱仪测定乙醇含量,检测器:FID,色谱条件:恒定柱温 80 $^{\circ}\text{C}$,注射室温度 160 $^{\circ}\text{C}$,检测室温度 160 $^{\circ}\text{C}$,进样量 2 μL 。根据峰面积算出乙醇含量。

1.3.2 生物量测定 分光光度法测定生物量。取样于比色管中,定容在波长为 600nm 下测定吸光度 A。根据酿酒酵母标准生物量曲线计算酿酒酵母的生物量值。

1.3.3 镁离子测定 分光光度法测定镁离子含量。取样 1mL 于 25mL 的比色管中,分别加入 0.5mL 水杨酸溶液,混匀,再加 3.0mL 刚果红溶液,再混匀,将其置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中 10min 后取出,加 6.0mL 1mol/L 的 NaOH 溶液,混匀于室温下放置 30min。在 555nm 波长处,测量吸光度 A。根据镁离子标准曲线计算样品中镁离子含量。

1.3.4 葡萄糖含量测定 分光光度法测定葡萄糖含量。取样 2mL 于 25mL 的比色管中,加入 1.5mL 的 DNS 溶液,混匀,将其沸水浴 5min 后取出,冷却至室温,用蒸馏水稀释至 25mL,在 540nm 处,测量吸光度 A。葡萄糖标准曲线计算样品中葡萄糖的含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

2.1.1 生物量标准曲线 根据所测结果得到标准曲线 $y = 2.2737x + 0.0209$, $R^2 = 0.9977$

2.1.2 镁离子标准曲线 根据所测结果得到标准曲线 $y = 0.1592x + 0.0367$, $R^2 = 0.9983$

2.1.3 葡萄糖标准曲线 根据所测结果得到标准曲

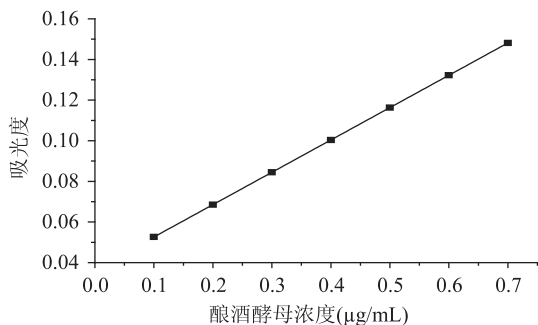


图1 酿酒酵母生物量标准曲线

Fig.1 Standard curve of biomass

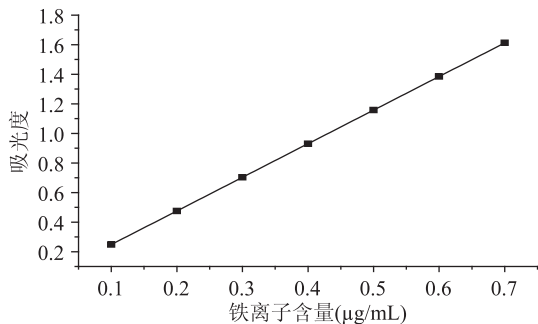


图2 镁离子标准曲线

Fig.2 Standard curve of mg^{2+}

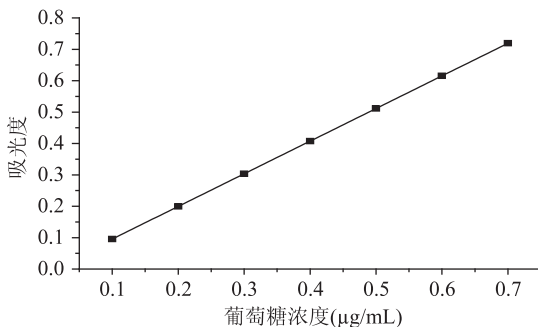


图3 葡萄糖标准曲线

Fig.3 Standard curve of glucose

线 $y = 1.0396x - 0.0084$, $R^2 = 0.9993$

2.2 定向驯化筛选耐毒酵母

2.2.1 定向驯化筛选耐毒酵母的生物量的变化 如图4所示,该酿酒酵母的驯化一共持续了23d,每个浓度梯度重复了12次。在驯化过程中每个批次的培养液中的葡萄糖含量小于起始葡萄糖含量的90%,几乎每个批次驯化结束时,培养液中的葡萄糖含量都小于1g/L,由图可知生物量在驯化培养基A、B、C中持续增长,最大生物量达到5.21g/L,但是当驯化进行到D时,生物量随着抑制剂浓度的增高,生物量在持续的降低,而且该阶段所需的时间也增加到5d,当驯化进行到浓度梯度E时,生物量相比较D而言,生物量下降的比较平缓,但是该阶段所需的时间增加到8d。

2.2.2 定向驯化筛选耐毒酵母的葡萄糖比消耗速率 如图5所示,该酿酒酵母的驯化共分为5个批次(A、B、C、D、E)。A批次平均比葡萄糖消耗速率为1.72g/g·h, B批次平均比葡萄糖消耗速率为1.019g/g·h,

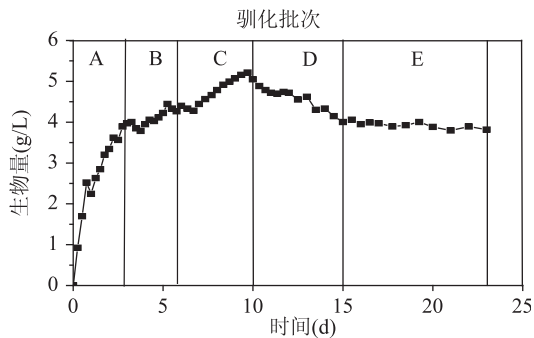


图4 驯化过程中各个批次生物量的变化

Fig.4 Biomass growth during adaptation of *S. cerevisiae*.

Vertical solid lines mark changes in the medium (A-E)

C批次平均比葡萄糖消耗速率为0.637g/g·h, D批次平均比葡萄糖消耗速率为0.556g/g·h, E批次平均比葡萄糖消耗速率为0.499g/g·h, 由于抑制剂对酿酒酵母的生长和发酵具有抑制作用,比葡萄糖消耗速率会随着抑制剂浓度的增加而逐渐减慢。

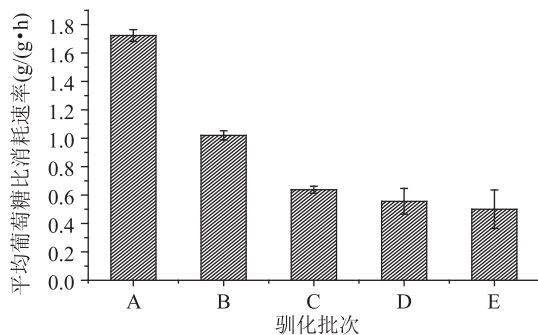


图5 驯化过程中各个批次平均比葡萄糖消耗速率

Fig.5 Specific glucose consumption rate (average values) during the adaptation of *S. cerevisiae*

2.3 耐毒酵母和原始菌株发酵性能的比较

2.3.1 耐毒酵母与原始菌株生物量的比较 如图6所示,抑制剂浓度在乙酸3.2g/L、糠醛0.8g/L、甲酸0.4g/L时,耐毒酵母最大生物量为2.7g/L,而原始菌株的最大生物量为0.089g/L,在18h后,耐毒酵母就进入对数生长期,生物量随着时间的增加而缓慢增长。而且原始菌株一直处于延滞期,生物量一直没有明显的变化。

2.3.2 耐毒酵母与原始菌株葡萄糖含量的变化 如图7所示,耐毒酵母和原始菌株在抑制剂浓度为乙酸3.2g/L、糠醛0.8g/L、甲酸0.4g/L时,原始菌株的葡萄糖含量一直在22g/L左右,随着时间葡萄糖含量一直没有明显的变化。而耐毒酵母0~72h时,耐毒酵母对葡萄糖的利用较为迅速,在78h时葡萄糖含量基本为0。

2.3.3 耐毒酵母与原始菌株乙醇含量的变化 如图8所示,耐毒酵母和原始菌株在抑制剂浓度为乙酸3.2g/L、糠醛0.8g/L、甲酸0.4g/L时。耐毒酵母的最大乙醇产量为10.7g/L,乙醇产率为0.428g/g,达到理论值的85.6%。而原始菌株的最大乙醇产量为0.66g/L,乙醇产率为0.246g/g,达到理论值的52.8%,而且耐毒酵母在72h时达到最大乙醇产量,

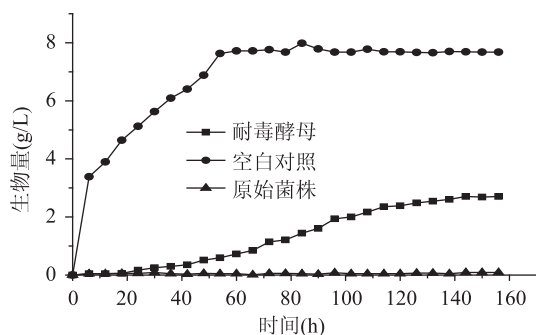


图6 耐药酵母与原始菌株在驯化培养基D中生长时生物量的变化

Fig.6 Biomass growth of non-adapted strain and drug resistant yeast in medium D

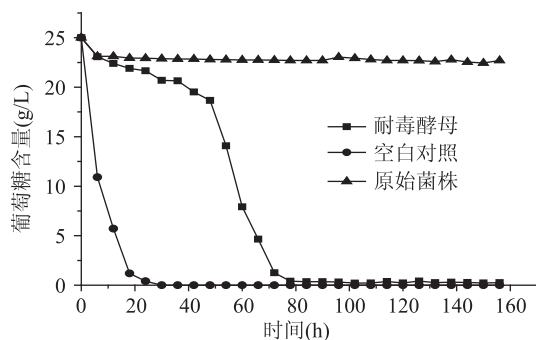


图7 耐药酵母与原始菌株在驯化培养基D中葡萄糖含量的变化

Fig.7 Glucose of non-adapted strain and drug resistant yeast in medium D

但是原始菌株在120h时达到最大乙醇产量,从以上结果可以表明,耐药酵母相比较原始菌株而言,不仅在乙醇产量上具有明显的优势,发酵时间上也具有明显优势。

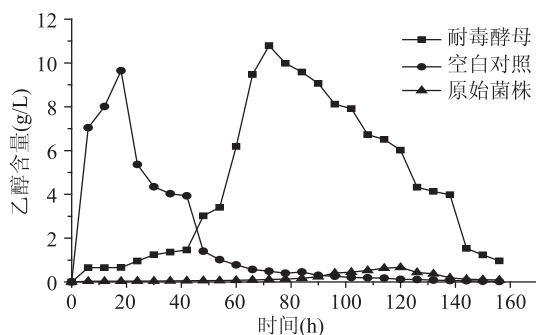


图8 耐药酵母与原始菌株在驯化培养基D中乙醇含量的变化

Fig.8 Ethanol of non-adapted strain and drug resistant yeast in medium D

2.3.4 耐药酵母与原始菌株一些发酵参数的比较

如表2所示,耐药酵母和原始菌株在抑制剂浓度为乙酸3.2g/L,糠醛0.8g/L,甲酸0.4g/L时,耐药酵母相比较原始菌株而言,乙醇产率提高75%,细胞得率提高3.72倍,延滞期明显的缩短,具有明显的优势。

表2 耐药酵母与原始菌株

在驯化培养基D中的发酵参数的比较

Table 2 Culture parameters obtained by cultivation of drug resistant yeast and non-adapted strain in media D

菌株	耐药酵母	原始菌株
乙醇生产能力(g/L·h)	0.149	0.0055
乙醇产率(g/g)	0.431	0.246
生长得率(g/g)	0.108	0.029

注:乙醇生产能力 = $(\text{Ethanol})_{\max}/(\text{Time})_{\text{cons}}$ 注释: $(\text{Ethanol})_{\max}$ 代表整个发酵过程中乙醇最大浓度, $(\text{Time})_{\text{cons}}$ 代表在最高乙醇浓度时所消耗的时间。乙醇产率 = $(\text{Ethanol})_{\max}/(\text{Fermentable Sugar})_{\text{cons}}$ 注释: $(\text{Ethanol})_{\max}$ 代表整个发酵过程中乙醇最大浓度, $(\text{Fermentable Sugar})_{\text{cons}}$ 代表在最高乙醇浓度时所消耗的葡萄糖的量。生长得率 = 生成细胞的质量/消耗基质的质量。

2.4 耐药酵母与原始菌株的细胞完整性的比较

如图9所示,耐药酵母外泄的镁离子含量为0.3976μg/mL,原始菌株在相同的条件下,外泄的镁离子含量为1.0257μg/mL,耐药酵母与原始菌株相比较而言,并没有明显的优势。在以前的研究中,10~60g/L甲酸成了9%~12%的镁外泄,17~102g/L乙酸造成了9.3%~28.5%的镁外泄^[11],3.5~21g/L糠醛造成了0.1~2%的镁外泄,表明抑制剂对细胞膜完整性没有明显的影响^[12]。可能是本次实验中所用的复合抑制剂,乙酸3.2g/L,糠醛0.8g/L,甲酸0.4g/L,相比较而言,抑制剂所用的剂量很小,对细胞膜完整性没有明显的影响。

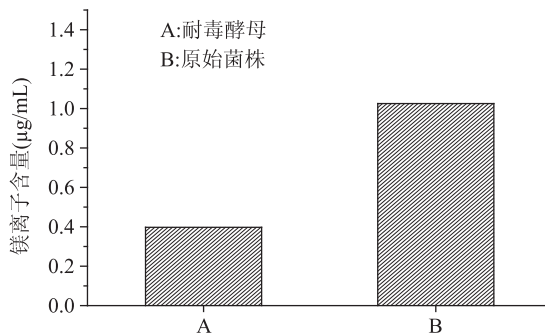


图9 耐药酵母与原始菌株的细胞完整性的比较

Fig.9 Cytomembrane Integrity of non-adapted strain and drug resistant yeast in medium D

2.5 耐药酵母产乙醇性能稳定性的评价

如表3所示,耐药酵母经连续传代5次,其产乙醇性能基本维持在10.68g/L,其产乙醇性能基本保持稳定。

表3 耐药酵母产乙醇性能稳定性测试

Table 3 The adapted strain's ability of producing ethanol evaluation

传代次数	1	2	3	4	5
乙醇含量(g/L)	10.79	10.70	10.54	10.68	10.62

2.6 耐药酵母拟工业化生产

如图10所示,耐药酵母在60h时,最大乙醇含量为84.4g/L,乙醇产率为0.42g/L,达到理论值的

84.31%，目前生产工业酒精，发酵终浓度为 10% ~ 13% (v/v)，耐毒酵母乙醇最大发酵浓度为 8.4% (w/v)，和工业化生产酒精的产量比较接近，在工业化生产上具有一定的意义。

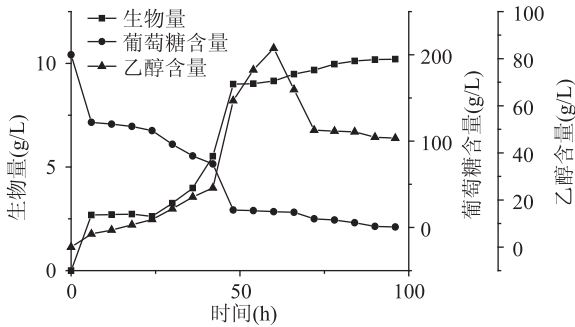


图 10 耐毒酵母在高糖培养的生长情况

Fig.10 Growth of drug resistant yeast in high glucose medium

3 结论

3.1 耐毒酵母和原始菌株在抑制剂浓度为乙酸 3.2g/L、糠醛 0.8g/L、甲酸 0.4g/L 时，耐毒酵母相比较原始菌株而言，最大生物量提高 30 倍，最大乙醇产量提高 1.6 倍，延滞期明显的缩短，具有明显的优势。

3.2 耐毒酵母相比较原始菌株而言，在细胞膜完整性上没有明显优势。

3.3 耐毒酵母经连续传代 5 次，其产乙醇性能基本维持在 10.68g/L，其产乙醇性能基本保持稳定。

参考文献

[1] 王璞,田沈,王丹,等.高耐毒性酿酒酵母的紫外诱变选育[J].可再生能源,2007,25(3):31-34.
[2] 李洪兴,张笑然,沈煜,等.纤维素乙醇生物加工过程中的抑制剂对酿酒酵母的影响及应对措施[J].生物工程学报,2009,25(9):1321-1328.

(上接第 162 页)

isomalto-oligosaccharide syrup from rice starch using an one-step conversion method[J].International Journal of Food Science and Technology,2011,46:1194-1200.

[11] Lee HS, Auh JH, Yoon HG, et al. Cooperative Action of α -Glucanotransferase and Maltogenic Amylase for an Improved Process of Isomalto-oligosaccharide[J].Journal of Agriculture and Food Chemistry,2002,50:2812-2817.

[12] 李芄,曾凡骏,柳玲,等.大米制取低聚异麦芽糖工艺研究[J].粮食与饲料工业,2007,6:21-23.

[13] GB 8275-2009 食品添加剂 α -淀粉酶制剂[S]

[14] 张力田,高群玉.淀粉糖[M].第三版,北京:中国轻工业出版社,2011:234-235.

[15] 李玉萍,白冰,叶军,等. α -葡萄糖苷酶抑制剂的制备和活性研究进展[J].食品科学,2008,29(9):617-620.

[16] 赵凯,许鹏举,谷广烨.3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J].食品科学,2008,29(8):534-536.

[17] 刘桂香,诸葛斌,方慧英,等.双酶法芭蕉芋糖化工艺研究[J].食品与发酵工业,2002,29(9):104-106.

[3] 宋晓川,储秋露,朱均均,等.碳水化合物降解产物对酿酒酵母乙醇发酵的影响[J].林产化学与工业,2001,27(1):9-14.

[4] 曾凡洲,卫民,陈育如,等.生物质酸水解副产物对糖液酵母发酵制备燃料乙醇的影响[J].林产化学与工业,2011,31(1):115-119.

[5] 丁明珠.酵母对纤维素水解液中复合抑制剂耐受的系统分析与解耦[D].天津:天津大学化工学院,2011.

[6] 王丹,闫飞,白罚利,等.高效代谢木质纤维素稀酸水解物产乙醇菌种的耐毒驯化研究[C].2007 中国生物质能科学技术论坛.

[7] 田沈,周桂雄,张兰波,等.两株高效代谢木质纤维素稀酸水解物产乙醇的酵母特性及耐毒研究[J].太阳能学报,2010,31(1):1-4.

[8] 郝学才,门珣,张宜,等.酿酒酵母在纤维素乙醇生产中对毒性化合物的耐受机理研究进展[J].微生物学通报,2012,39(2):254-263.

[9] Martín C, Marcet M, Almaza O, et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors[J].Bioresource Technology,2007,98:1767-1773.

[10] Landaeta R, Acevedo F, Mussatto SI, et al. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosin inhibitors by cell recycle batch fermentation[J].Applied Energy,2013,102:124-130.

[11] Zaldivar J, Ingram L O. Effect of Organic Acids on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli* LY01 [J].Institute of Food and Agricultural Sciences,1999,66(4):172-179.

[12] Zaldivar J, Martinez A, Ingram L O. Effect of Selected Aldehydes on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli* [J].Institute of Food and Agricultural Sciences, Department of Microbiology and Cell Science,1999,92(6):24-33.

[18] Takaku H. Anomalous linked oligosaccharides mixture ("Alo mixture") [M].In The Amylase Research Society of Japan (ed.), Handbook of amylase and related enzymes. Pergamon Press, Oxford.1988, p.215-217.

[19] Kuriki T, Yanase M, Takata H, et al. A New Way of Producing Isomalto - Oligosaccharide Syrup by Using the Transglycosylation Reaction of Neopullulanase [J].Applied and Environmental Microbiology,1993,59(4):953-959.

[20] Yoo SH, Kweon MR, Kim MJ, et al. Branched Oligosaccharides Concentrated by Yeast Fermentation and Effectiveness as a Low Sweetness Humectant [J].Journal of Food Science,1995,60(3):516-519.

[21] 李黎,邹雨佳,唐华澄,等.高效液相色谱法测定食品功能性低聚异麦芽糖[J].食品工业与科技,2006,27(4):179-181.

[22] Duan G, Li F, Shetty J K. Grain compositions containing pre-biotic isomalto-oligosaccharides and methods of making and using same[P].US 7638151B2,2009.