

干酪乳杆菌LC2W发酵脱脂乳营养因子优化

杜昭平¹, 马成杰¹, 孙克杰¹, 龚广予¹, 刘鑫², 马爱民^{2,*}

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 光明乳业股份有限公司技术中心, 上海 200436;

2. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 通过向还原脱脂乳中添加碳源、氮源及金属离子, 对干酪乳杆菌(*L. casei*)LC2W发酵脱脂乳营养因子进行优化。在单因素试验基础上, 以脱脂乳中葡萄糖、大豆多肽和MnSO₄添加量为自变量, 以发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数对数值为响应值, 通过三因素三水平的Box-Behnken响应面分析法, 分析各自变量及交互作用对*L. casei* LC2W菌落总数的影响, 并对营养因子进行优化。结果表明: 各营养因子对*L. casei* LC2W菌落总数的影响顺序为: MnSO₄添加量>大豆多肽添加量>葡萄糖添加量, 且MnSO₄添加量与大豆多肽添加量的交互作用影响显著。各营养因子的优化参数为: 葡萄糖添加量65.90g/L、大豆多肽添加量7.68g/L、MnSO₄添加量13.88mg/L。在此优化条件下发酵24h后, 干酪乳杆菌LC2W菌落总数可达 2.6×10^9 CFU/mL, 比优化前(2.1×10^8 CFU/mL)提高了11.38倍。

关键词: 干酪乳杆菌; 脱脂乳; 营养因子; 响应面法

Optimization of Nutritional Factors for Skim Milk Fermentation by *Lactobacillus casei* LC2W

DU Zhao-ping¹, MA Cheng-jie¹, SUN Ke-jie¹, GONG Guang-yu¹, LIU Xin², MA Ai-min^{2,*}

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Technology Center of Bright Dairy and Food Co. Ltd., Shanghai 200436, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The effects of different types of added nitrogen source, carbon source and metal ion on the growth of *L. casei* LC2W in skim milk were evaluated to identify glucose, soybean polypeptide and MnSO₄ as the best nutritional factors for *L. casei* LC2W. In addition, the logarithmic count of *L. casei* LC2W was investigated with respect to the concentrations of the selected nutritional factors. Response surface analysis based on a three-variable, three-level Box-Behnken design was employed to optimize these nutritional factors. MnSO₄ concentration had the most important influence on the logarithmic count of *L. casei* LC2W followed by soybean polypeptide concentration; the effect of glucose concentration was the weakest. Moreover, a significant interaction between MnSO₄ concentration and soybean polypeptide concentration was observed. The optimal concentrations of glucose, soybean polypeptide and MnSO₄ were determined to be 65.90, 7.68 mg/L and 13.88 mg/L, respectively, yielding a *L. casei* LC2W count of 2.6×10^9 CFU/mL in 24 h of fermentation, which was 11.38 fold higher than before the optimization (2.1×10^8 CFU/mL).

Key words: *Lactobacillus casei*; skim milk; nutritional factor; response surface methodology

中图分类号: TS252.54

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)19-0205-06

作为我国卫生部2010年公布的可用于食品的益生菌菌种之一, 干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)能够有效耐受口腔中的酶、胃液中低pH值的胃酸和小肠中的胆汁酸, 通过人体消化系统并以活菌形式到达肠道定植^[1], 发挥调节肠内菌群平衡、促进人体消化吸收以及增强机体免疫力^[2]、抑制肠内病原性微生物的生长和肿瘤细胞形成等益

生功能^[3], 是人体肠道内的重要微生物。以干酪乳杆菌为代表的新型益生菌及益生菌制品日益受到国内外的重视, 成为研究开发的热点^[4-5]。

由于干酪乳杆菌在牛乳中的生长速度缓慢, 前期发酵产酸较低^[3,6], 发酵周期过长, 对生产企业的发酵工艺设计和发酵设备条件要求苛刻, 按照普通乳酸菌发酵乳

收稿日期: 2011-08-16

基金项目: 国家“973”计划项目(2010CB735705)

作者简介: 杜昭平(1983—), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: duzhaoping@brightdairy.com

*通信作者: 马爱民(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: aiminma@mail.hzau.edu.cn

制品工艺进行生产的质量风险很高。这一因素限制了干酪乳杆菌在发酵乳制品工业中的规模化生产和应用,市场上少见国内生产企业研制开发的以干酪乳杆菌为主体微生物的发酵乳制品。

L. casei LC2W(CGMCC No.0828)在模拟人体消化环境中具有较强的耐受性和优异的存活性能^[7],降高血压等益生功能明显^[8-9],益生功效成分明确^[10],具备较强的应用开发潜力。艾连中^[6]、刘翠平^[11-12]等对影响*L. casei* LC2W合成胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)的营养因子进行了优化研究,但乳酸菌的EPS产量与菌体的生长繁殖水平没有直接相关性^[13],目前国内外少有优化干酪乳杆菌在脱脂乳中生长发酵条件的研究报道。

本研究通过向还原脱脂乳中添加适量的营养因子,比较不同条件下发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数对数值,并通过响应面分析法对影响*L. casei* LC2W发酵脱脂乳体系的营养因子进行优化,对*L. casei* LC2W在发酵乳中快速生长繁殖产酸的条件进行初步探索,以期今后为*L. casei* LC2W发酵乳制品的规模化生产提供一定的技术基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

脱脂乳粉(蛋白质含量33.4%) 新西兰恒天然公司; Hinute-DA大豆多肽 不二富吉科技有限公司; 酵母抽提物 英国Oxiod公司; 胰蛋白胨 北京奥博星生物技术有限公司; 其余试剂均为分析纯 上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌种与培养基

L. casei LC2W冷冻干燥菌粉,由光明乳业股份有限公司提供。

MRS培养基 德国Merck公司。

1.3 仪器与设备

SA-300VF高压蒸汽灭菌器 德国Sturdy Industrial公司; Bactron-1厌氧培养箱 美国Shellab公司; GFL1002恒温水浴锅 德国GFL公司; 868型pH计 美国Thermo Orion公司; J-E型高效冷冻离心机 美国Beckman公司。

1.4 方法

1.4.1 菌种活化与菌悬液制备

将适量*L. casei* LC2W冷冻干燥菌粉接种于MRS液体培养基中,转接活化2~3次后,经4000r/min离心15min,收集菌体沉淀,经灭菌生理盐水洗涤2次后制成菌悬液,于4℃条件下保存备用^[14]。

1.4.2 *L. casei* LC2W的生长与酸化曲线测定

将100g脱脂乳粉溶于900g蒸馏水中,充分搅拌溶解后,经95℃水浴杀菌10min,冷却至37℃后,以 3.0×10^6

CFU/mL的接种量接种制备的*L. casei* LC2W菌悬液,于37℃静置发酵24h,每隔2h测定一次发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数和pH值。分别以菌落总数对数值和pH值对发酵时间作图,得到菌株的生长和酸化曲线^[6]。

1.4.3 脱脂乳营养因子优化

1.4.3.1 单因素试验优化

在100g/L还原脱脂乳基础上,分别添加不同的营养因子,采用单因素试验法筛选最适的碳源、氮源及金属离子等营养因子,并通过梯度试验确定各营养因子的添加梯度。

1.4.3.2 响应面法优化

在单因素试验优化基础上,每个因素取3个水平,以(-1, 0, 1)编码,进行三因素三水平的响应面分析,并对数据进行二次回归拟合,得到多元二次回归方程,在一定水平范围内求取最佳值,对脱脂乳营养因子添加条件进行优化^[15]。

1.4.4 数据检测与分析

采用食品安全国家标准GB 4789.35—2010《食品微生物学检验 乳酸菌检验》的方法测定发酵乳中活性干酪乳杆菌落总数^[16],使用Orion868 pH计测定发酵乳的pH值,所有数据均测定3次后取平均值;利用Design Expert 7.1.3软件进行响应面设计与统计分析,Origin 8.0软件进行数据作图。

2 结果与分析

2.1 *L. casei* LC2W的生长与酸化曲线

发酵期间,*L. casei* LC2W菌落总数和发酵乳pH值变化如图1所示。*L. casei* LC2W在脱脂乳中生长初期(0~8h),菌体数量增加缓慢,发酵乳pH值和滴定酸度变化较小;10h后,*L. casei* LC2W进入对数生长期,发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数迅速增加,与之对应的是发酵乳pH值迅速下降;*L. casei* LC2W菌落总数在22h时达到最大值后趋于平稳。发酵24h时,发酵乳中菌落总数为 2.1×10^8 CFU/mL(对数值为8.16lg(CFU/mL)),发酵乳pH值为4.25。发酵乳pH值在不同生长期的下降变化趋势与*L. casei* LC2W菌落总数的增长变化趋势基本一致,因此以*L. casei* LC2W菌落总数作为脱脂乳体系优化水平的衡量指标。

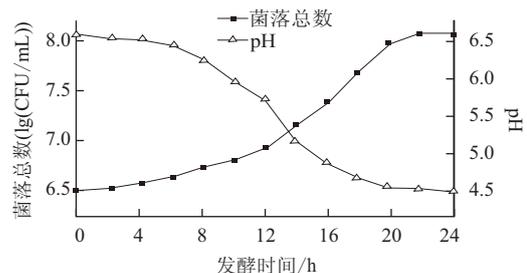


图1 *L. casei* LC2W的生长与酸化曲线

Fig.1 Growth curve of *L. casei* LC2W and acidification curve of skim milk

2.2 单因素试验结果

2.2.1 碳源筛选与优化

向脱脂乳中分别添加50g/L的葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖和麦芽糖,接种*L. casei* LC2W后发酵24h,发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数如图2所示。在发酵初期,*L. casei* LC2W菌体细胞内的酶系统需要适应环境而合成必要的酶、辅酶及中间代谢产物^[17],因此其利用胞内 β -半乳糖苷酶将牛乳中的乳糖分解为葡萄糖和半乳糖的能力较弱,对脱脂乳中的主要碳源——乳糖的利用效率不高。向脱脂乳中添加的葡萄糖可以被菌体直接吸收利用,从而显著促进*L. casei* LC2W的生长。不同微生物由于其生化特性不同,对不同碳源的利用能力差别很大,与最终代谢产物的合成密切相关^[18]。半乳糖和果糖对*L. casei* LC2W的促进作用次之,而麦芽糖和蔗糖基本不能促进*L. casei* LC2W的生长。向脱脂乳中添加葡萄糖后,对*L. casei* LC2W的促进作用明显优于其他碳源,因此葡萄糖是进行脱脂乳优化发酵的最优碳源。

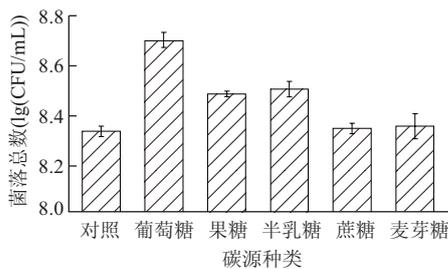


图2 碳源种类对*L. casei* LC2W菌落总数的影响

Fig.2 Effect of carbon source type on living cell count of *L. casei* LC2W

分别向脱脂乳中添加质量浓度为10、20、50、75、100g/L的葡萄糖,接种*L. casei* LC2W后发酵24h,发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数如图3所示。发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数随葡萄糖添加量增加而升高,当葡萄糖添加量为75g/L时,发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数达到最大值,而当葡萄糖添加量为100g/L时,*L. casei* LC2W菌落总数反而下降,可能是由于葡萄糖添加量过高造成脱脂乳体系渗透压变大,从而部分地抑制了*L. casei* LC2W在脱脂乳中的生长,这一结果与Sentisiran等^[19]报道的结果基本一致。

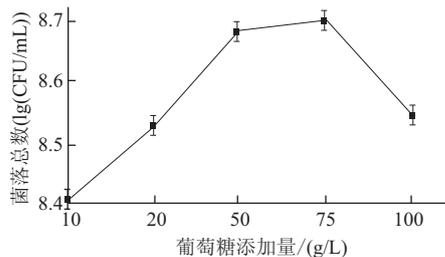


图3 葡萄糖添加量对*L. casei* LC2W菌落总数的影响

Fig.3 Effect of glucose concentration on living cell count of *L. casei* LC2W

2.2.2 氮源筛选与优化

向脱脂乳中添加5种不同的氮源(添加量6g/L),发酵24h后发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数如图4所示。无机氮源(硝酸钠、硫酸铵)对*L. casei* LC2W的生长基本无促进作用,有机氮源(胰蛋白胨、酵母提取物和大豆多肽)均可促进*L. casei* LC2W的生长繁殖,但大豆多肽的促进作用最明显,因此大豆多肽是进行脱脂乳优化发酵的最佳氮源。牛乳中的蛋白质以大分子形式存在的酪蛋白为主,干酪乳杆菌在生长初期,其降解酪蛋白的细胞壁蛋白酶活力相对较弱^[20],对酪蛋白的分解能力不足,所以无法快速利用牛乳中的酪蛋白进行生长代谢。另外,乳酸菌普遍缺乏利用无机氮源合成氨基酸的能力^[21],因此,向脱脂乳中添加硝态氮和铵态氮均不能促进*L. casei* LC2W的生长;胰蛋白胨和酵母提取物中富含肽、氨基酸等有机氮源,因此添加此类物质可以使干酪乳杆菌直接利用小分子的多肽或氨基酸进行生长代谢,从而弥补生长初期对酪蛋白降解能力的不足,促进菌体的生长和产酸。大豆多肽是大豆蛋白经酶解制得的主要成分为3~6肽的短肽类混合物^[22],大豆多肽对*L. casei* LC2W的促进作用明显优于酵母提取物和胰蛋白胨,说明*L. casei* LC2W对氮源的利用具有明显的偏好性。

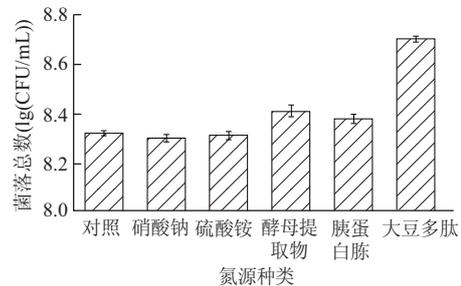


图4 氮源种类对*L. casei* LC2W菌落总数的影响

Fig.4 Effect of nitrogen source type on living cell count of *L. casei* LC2W

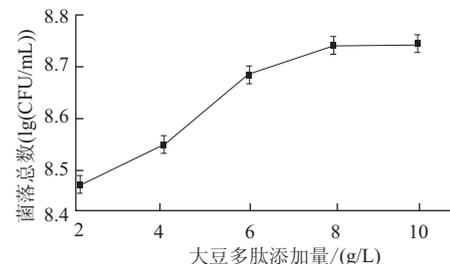


图5 大豆多肽添加量对*L. casei* LC2W菌落总数的影响

Fig.5 Effect of soybean polypeptide concentration on living cell count of *L. casei* LC2W

分别向脱脂乳中添加质量浓度为2、4、6、8、10g/L的Hinute-DA大豆多肽,接种*L. casei* LC2W后发酵24h,测定发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数,结果如图5所示。

大豆多肽添加量低于8g/L时, *L. casei* LC2W菌落总数与大豆多肽添加量呈正相关, 而当大豆多肽添加量继续增加时, 发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数基本维持不变, 这可能是由于*L. casei* LC2W对大豆多肽的利用已经达到饱和状态所致。

2.2.3 金属离子的筛选与优化

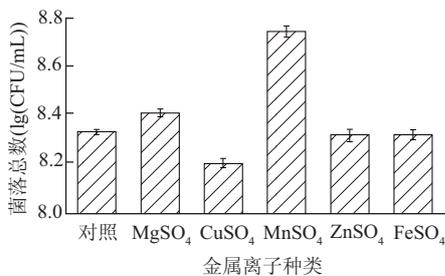


图6 金属离子源种类对*L. casei* LC2W菌落总数的影响

Fig.6 Effect of metal ion type on living cell count of *L. casei* LC2W

分别向脱脂乳中添加5种不同的金属硫酸盐, 添加量10mg/L(以无水硫酸盐计), 用以验证不同金属离子对*L. casei* LC2W在脱脂乳中生长繁殖的影响, 结果如图6所示。CuSO₄对*L. casei* LC2W的生长具有一定程度的抑制效应, 发酵24h后活菌数低于对照组; ZnSO₄和FeSO₄对*L. casei* LC2W的生长基本无影响, MgSO₄对*L. casei* LC2W的生长具有一定程度的促进作用, 而10mg/L的MnSO₄可以显著促进*L. casei* LC2W的生长繁殖, 因此选取MnSO₄进行金属离子优化。

王俊等^[23]研究了不同金属离子对干酪乳杆菌蛋白酶活力的影响, 结果显示, Cu²⁺对蛋白酶活性具有明显抑制作用, Mg²⁺有轻微促进作用, 而Mn²⁺能显著增强酶液活力, 这与本研究结果基本一致。由此可见, 金属离子主要通过影响干酪乳杆菌活性蛋白酶的活力, 从而影响*L. casei* LC2W在脱脂乳中的生长繁殖。研究显示, Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺均为清除胞内O₂⁻和的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的辅酶金属离子^[24], 而干酪乳杆菌体内不含SOD等具有解除O₂⁻造成的氧化胁迫功能的酶类, 因此Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺的添加对*L. casei* LC2W的生长没有促进作用。Mn²⁺作为乳酸脱氢酶的组成成分, 是*L. casei*生长的关键的生长因子之一^[25]; 另外, 添加的Mn²⁺能以整合金属离子的形式发挥清除胞内氧毒性阴离子以及维持高酸性环境中的细胞活性的功能^[26-27], 因此Mn²⁺对*L. casei* LC2W的生长促进作用显著。

如图7所示, 当MnSO₄添加量低于15mg/L时, 随着MnSO₄添加量的增加, 发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数也随之增加, 最高达6.1×10⁸CFU/mL; 而MnSO₄添加量继续增加时, *L. casei* LC2W菌落总数基本不变。高艳玲等^[28]利用*L. casei* ATCC 334发酵乳清渗透液, 当

MnSO₄·H₂O的添加量在10~50mg/L的范围内, 乳酸的生产效率随添加量的增加而增加。Fitzpatrick等^[25]则认为, 添加量低于1mg/L时, 乳酸产量随MnSO₄·H₂O添加量降低而降低; 添加量在5~30mg/L时, 乳酸产量并不发生明显变化。

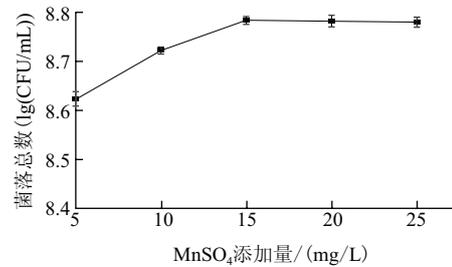


图7 MnSO₄添加量对*L. casei* LC2W菌落总数的影响

Fig.7 Effect of MnSO₄ concentration on living cell count of *L. casei* LC2W

2.3 响应面分析法优化脱脂乳营养因子

2.3.1 Box-Behnken试验设计

分别以葡萄糖添加量、大豆多肽添加量及MnSO₄添加量为自变量X₁、X₂和X₃, 以发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数对数值为响应值Y, 采用响应面分析法在三因素三水平上进一步优化脱脂乳营养因子。试验因素及水平设计表如表1所示。

表1 响应面分析的因素和水平表

Table 1 Factors and their coded levels tested in the response surface analysis

因素	编码及水平		
	-1	0	1
X ₁ 葡萄糖添加量/(g/L)	5.0	7.5	10.0
X ₂ 大豆多肽添加量/(g/L)	6	8	10
X ₃ MnSO ₄ 添加量/(mg/L)	10	15	20

2.3.2 多元二次回归方程的建立及显著性检验

按照Box-Behnken试验方案进行三因素三水平的响应面试验, 结果如表2所示。利用Design Expert 7.1.3软件对试验数据进行多元回归拟合, 得到LC2W菌落总数对数值(Y)对葡萄糖添加量(X₁)、大豆多肽添加量(X₂)和MnSO₄添加量(X₃)的二次多项回归方程:

$$Y = -4.944 + 0.0547X_1 + 1.781X_2 + 0.709X_3 - 0.0021X_1X_2 + 0.006X_1X_3 - 0.017X_2X_3 - 0.0035X_1^2 - 0.080X_2^2 - 0.022X_3^2$$

对该模型进行显著性检验和方差分析(表3)可知, 该模型P值为0.0017, 证明此模型极显著; 其决定系数(R²)为0.9752, 说明该模型能够解释97.52%的变化, 因此可以利用此模型对优化脱脂乳体系中的*L. casei* LC2W菌落总数进行分析和预测。

表2 Box-Behnken试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken design and corresponding results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	菌落总数 (lg(CFU/mL))
1	-1	-1	0	8.723
2	1	-1	0	8.600
3	-1	1	0	9.228
4	1	1	0	8.683
5	-1	0	-1	9.061
6	1	0	-1	8.683
7	-1	0	1	8.330
8	1	0	1	8.240
9	0	-1	-1	8.263
10	0	1	-1	8.984
11	0	-1	1	8.300
12	0	1	1	8.350
13	0	0	0	9.415
14	0	0	0	9.264
15	0	0	0	9.364

表3 回归方程方差分析及显著性检验

Table 3 Analysis of variance and significance tests for the fitted regression equation

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	2.466	9	0.274	21.886	0.0017**
X_1	0.161	1	0.161	12.871	0.0157*
X_2	0.231	1	0.231	18.436	0.0078**
X_3	0.392	1	0.392	31.351	0.0025**
X_1X_2	0.044	1	0.044	3.536	0.1188 ^{NS}
X_1X_3	0.021	1	0.021	1.644	0.2560 ^{NS}
X_2X_3	0.113	1	0.113	9.016	0.0300*
X_1^2	0.174	1	0.174	13.934	0.0135*
X_2^2	0.382	1	0.382	30.517	0.0027**
X_3^2	1.125	1	1.125	89.827	0.0002**
残差	0.063	5	0.013		
失拟项	0.051	3	0.017	2.895	0.2672 ^{NS}
纯误差	0.012	2	0.006		
总和	2.529	14			

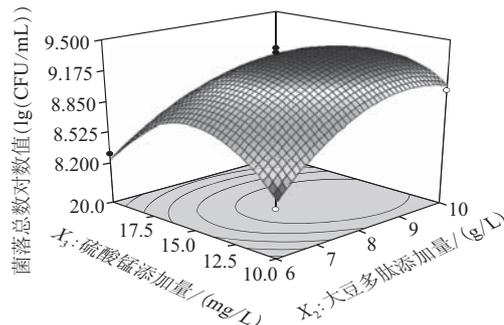
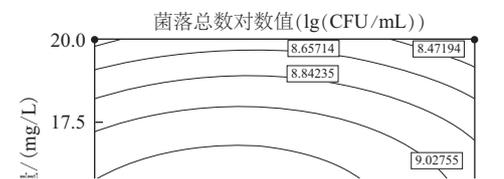
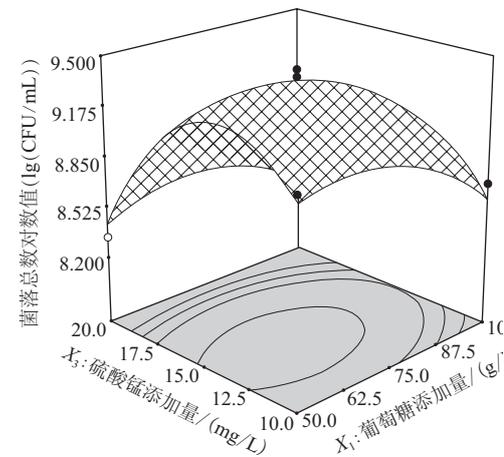
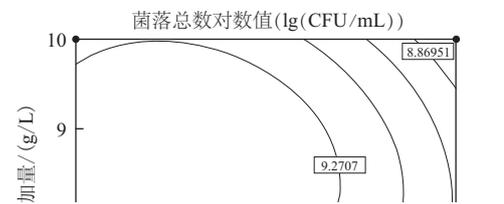
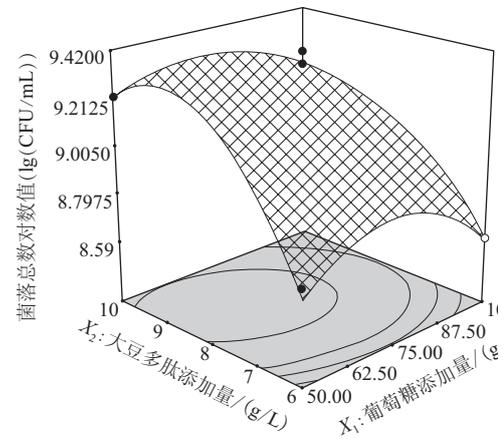
注: NS. 不显著; *, 差异显著 ($P < 0.05$); **, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

由表3可知, 一次项中 X_2 和 X_3 影响极显著($P < 0.01$), 其中, X_3 影响最显著, 其次是 X_2 ; X_1 影响显著($P < 0.05$)。交互项 X_2X_3 影响显著, 二次项中 X_2^2 、 X_3^2 影响极显著, X_1^2 影响显著, 其他因素影响不显著。

2.3.3 响应面分析及优化条件的确定

根据回归分析结果绘制相应的三维响应面图及等高线如图8所示。通过该组动态图即可对任何两因素交互影响发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数的效应进行分析与评价, 并从中确定最佳因素水平范围。大豆多肽添加量与 $MnSO_4$ 添加量的交互作用对*L. casei* LC2W菌落总数的变化影响较大, 表现为曲线较陡; 葡萄糖添加量与大豆多

肽添加量的影响次之; 而葡萄糖添加量与 $MnSO_4$ 添加量的影响最弱, 表现为曲线较平滑^[29]。



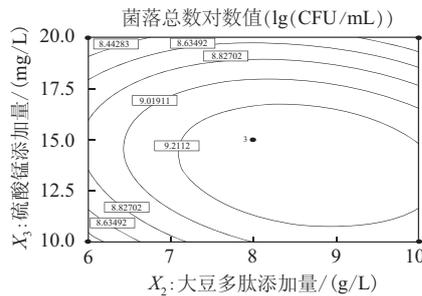


图8 各因素交互作用影响*L. casei* LC2W菌落总数的曲面图及等高线图

Fig.8 Response surface and contour plots for the effects of soybean polypeptide and $MnSO_4$ concentrations on living cell count of *L. casei* LC2W

利用Design-Expert 7.1.3软件分析优化各营养因子的最佳添加量为:葡萄糖添加量65.90g/L、大豆多肽添加量7.68g/L、 $MnSO_4$ 添加量13.88mg/L,在此优化条件下,发酵乳中*L. casei* LC2W菌落总数预测值为 2.7×10^9 CFU/mL(对数值为9.431(lg(CFU/mL)))。

2.3.4 回归方程的验证

为了验证模型预测结果的准确性,采用最佳营养因子优化条件,进行3次重复实验,发酵乳中LC2W的菌落总数对数值达到 (9.420 ± 0.012) (lg(CFU/mL))(实际值 2.6×10^9 CFU/mL),实际值与理论预测值十分接近,可见该模型较好地预测了实际优化条件,说明响应面法适用于脱脂乳营养因子的优化。

3 结论

通过对各种营养因子进行筛选和添加量优化,本研究确定了*L. casei* LC2W脱脂乳营养因子的优化体系为:葡萄糖添加量65.90g/L、大豆多肽添加量7.68g/L、 $MnSO_4$ 添加量13.88mg/L。在此优化条件下接种*L. casei* LC2W进行发酵,24h后发酵乳中*L. casei* LC2W的菌落总数高达 2.6×10^9 CFU/mL,比优化前(2.1×10^8 CFU/mL)提高了11.38倍,优化效果显著。同时,在此优化条件下,发酵乳凝乳时间缩短为7.5h,凝乳时发酵乳中*L. casei* LC2W的菌落总数可达 1.9×10^8 CFU/mL。

随着“健康饮食”观念的不断深入,具有优异益生功能的干酪乳杆菌越来越受到普通消费者的认同与欢迎,但其生长特性成为制约以普通牛乳为载体进行干酪乳杆菌发酵乳的规模化生产的瓶颈。本研究通过单因素试验筛选了添加促进还原脱脂乳中*L. casei* LC2W繁殖产酸的营养因子,并利用响应面法对营养因子的添加量进行了优化。该优化体系具备一定的应用可行性,可为干酪乳杆菌发酵乳制品的规模化生产提供相关的技术参考。

参考文献:

- [1] 张丽萍,杨晨,王成强,等.干酪乳杆菌在酸奶生产中的应用研究[J].中国乳品工业,2007,35(2):23-26.
- [2] 胡会萍.益生菌及其在功能食品中的应用[J].食品研究与开发,2007,28(2):173-175.
- [3] 黄文利,陈卫,陆英,等.益生菌干酪乳杆菌LC-15生长及发酵特性研究[J].乳品科学与技术,2007,30(6):282-295.
- [4] 张丽芳,田洪涛,苑社强,等.干酪乳杆菌发酵大豆乳产品的质量分析及稳定性的研究[J].现代食品科技,2009,25(5):519-522.
- [5] 董成,张和平,赵树平,等.利用*Lactobacillus casei* Zhang开发益生菌新鲜干酪[J].食品与发酵工业,2008,34(6):140-145.
- [6] 艾连中,郭本恒,张灏,等.干酪乳杆菌LC2W合成胞外多糖培养基成分的优化[J].中国乳品工业,2007,35(2):16-19.
- [7] 辛玲,郭本恒,吴正钧.3株乳杆菌在模拟消化环境中存活性能的研究[J].中国乳品工业,2005,33(5):15-17.
- [8] 吴正钧,郭本恒,叶锦.干酪乳杆菌LC2W菌株及其在抗高血压方面的应用:中国,ZL03129450.2[P].2003-06-20.
- [9] 吴正钧.干酪乳杆菌LC2W菌株的抗高血压作用[J].天然产物研究与开发,2011,23(2):228-231.
- [10] 吴正钧,郭本恒,叶锦,等.干酪乳杆菌胞外多糖及其粗品、制备方法和应用:中国,ZL200510028970.3[P].2009-05-06.
- [11] 刘翠平,吴正钧,王荫榆,等.响应面法优化干酪乳杆菌LC2W合成胞外多糖的培养条件[J].食品与发酵工业,2008,34(12):85-89.
- [12] 刘翠平,郭本恒,吴正钧,等.营养因子对干酪乳杆菌LC2W胞外多糖合成的影响[J].工业微生物,2008,38(2):11-14.
- [13] 陈晓红.乳酸菌胞外多糖的生物合成及其组成和体外抑瘤活性研究[D].南京:南京农业大学,2003.
- [14] 李程程,陈晓红,姜梅,等.一株产黏物质乳杆菌发酵豆乳条件优化[J].食品科学,2010,31(17):201-205.
- [15] 王淑霞,李爱梅,张俊杰,等.响应面分析法优化龙眼核中多酚物质提取工艺[J].食品科学,2011,32(10):35-39.
- [16] 中华人民共和国卫生部.GB 4789.35—2010 食品微生物学检验 乳酸菌检验[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [17] 郭本恒.乳品微生物学[M].北京:中国轻工业出版社,2001:77.
- [18] WANG Jicheng, GUO Zhuang, ZHANG Qing, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on fermentation characteristics of set yogurt[J]. International Journal of Dairy Technology, 2009, 63(1): 105-112.
- [19] SENTISIRAN A, ARASARATNAM V, BALASUBRAMANIAM K. Neutralising lactic acid produced by *Lactobacillus casei* with calcium carbonate[J]. Journal of the National Science Council of Sri Lanka, 1999, 27(2): 107-117.
- [20] 陈中,鲍志宁,林伟锋,等.干酪乳杆菌发酵过程的研究[J].中国乳品工业,2007,35(7):8-10.
- [21] 张刚.乳酸细菌:基础、技术和应用[M].北京:化学工业出版社,2007:97.
- [22] 李善仁,陈济琛,胡开辉,等.大豆肽的研究进展[J].中国粮油学报,2009,24(7):142-147.
- [23] 王俊,黄明,徐幸莲,等.干酪乳杆菌蛋白酶的性质研究[J].食品工业科技,2003,24(7):56-58.
- [24] ABREU I A, CABELLI D E. Superoxide dismutases: a review of the metal-associated mechanistic variations[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1804(2): 263-274.
- [25] FITZPATRICK J J, AHRENS M, SMITH S. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(7): 671-675.
- [26] ARCHIBALD F S, FRIDOVICH I. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1981, 146(3): 928-936.
- [27] LEE J, HWANG K T, CHUNG M Y, et al. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(8): 388-391.
- [28] 高艳玲,郭明若.利用*L. casei*及*L. lactis*发酵乳清渗透液生产高纯度L-乳酸[J].中国乳品工业,2008,36(3):4-9.
- [29] de LIMA C J B, COELHO L F, CONTIERO J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control[J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(2): 175-181.