文章编号: 1673-1689(2010)05-0770-07

乳酸乳杆菌胞外多糖的发酵条件优化

陈若雯, 李里, 段家彩, 卢琪, 高丽, 潘思轶*
(华中农业大学 食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 对乳酸乳杆菌发酵生产胞外多糖的发酵条件进行了优化。在确定 Elliker 培养基为最适培养基的基础上, 利用 Plackett-Burman 试验设计, 筛选出对胞外多糖产量有显著影响的因素, 即酵母粉、发酵时间、初始 pH 值, 然后针对这 3 个关键因子, 用单因子试验及中心组合试验优化得到最佳发酵条件。结果表明: 当酵母粉为 17.35 g/L, 初始 pH 5.85, 发酵时间 23.18 h 时, 乳酸乳杆菌胞外多糖实际产量可达 3.910 g/L。

关键词: 乳酸乳杆菌; 胞外多糖; Plackett-Burman 设计; 响应曲面法; 中心组合设计
中图分类号: TQ 920.1 文献标识码: A

Optimization of Fermentation Conditions for Exopolysaccharid Production from *Lactobacillus lactis*

CHEN Ruo-wen, LI Li, DUAN Jia-cai, LU Qi, GAO Li, PAN Si-yi*
(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: This study aims to increase exopolysaccharid production d by optimizing the culture and nutrient conditions of *Lactobacillus lactis*. The results showed that Elliker was the optimum medium. Three statistically significant ingredients, yeast extract, the initial pH and fermentation time, which were determined by Plackett-Burman design. Based on the results of the first phase, the five-level three-factor central composite design was employed to optimize the above critical factors. The exopolysaccharid titer was achieved at 3.910 g/L, with the combination of yeast extract 17.35 g/L, the initial pH 5.85, fermentation time 23.18 h.

Key words: *Lactobacillus lactis*, exopolysaccharid, Plackett-Burman design, response surface methodology, central composite design

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是乳酸菌在生长代谢过程中分泌到细胞壁外常渗于培养基的一类糖类化合物[1], 除了对细菌自身具有生物学意义, 它还赋予发酵乳制品特殊的质构和风味, 因而广泛用于各种食品的增稠、稳定、乳化、胶凝及持水。近年来, 欧美及日本一些学者对 LAB 的大量研究表明, LAB 在抗变异原性、防癌抗癌和增强机体免疫力方面有着不可低估的作用[2], 而它营养保健特性主要是通过其代谢过程中形成的胞外多糖物质来完成

收稿日期: 2009-10-13
基金项目: 湖北省农业科技创新团队项目(2007-620)。
* 通信作者: 潘思轶(1965-), 男, 安徽桐城人, 工学博士, 教授, 主要从事食品生物技术方面的研究。Email: pansiyi@mail.hzau.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的[3]。

乳酸菌胞外多糖是微生物适应环境的产物[4], 但产量低, 菌株稳定性差, 提取成本高, 制约着大规模工业生产[5]。除与菌种的遗传特性有密切关系外, 培养基的成份(碳源和氮源)和生长环境(温度、pH、培养时间)等都会直接影响乳酸菌胞外多糖的分泌积累[1], 且不同营养条件和环境条件下产生的多糖的化学结构和生理功能也有差异[6-8]。所以发酵条件的优化, 主要包括培养基的优化和生长环境变量的优化。

作者在确定乳酸乳杆菌最适目的培养基的基础上, 采用 SAS8.0 中的 Plackett-Burman 设计从发酵条件各变量找出对产量影响最大的因素[9-10], 再以显著因子进行中心组合试验(CCD)[11], 进行进一步的量的优化, 确定稳定点的位置, 得到最佳的发酵条件。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

1.1.1　菌种、试剂及培养基　乳酸乳杆菌(来自酸奶): 由作者所在研究室分离、鉴定并保藏; 透析袋(截留相对分子质量为 10 000); 基础培养基(MRS)、M17 培养基、APT 培养基、SL 培养基、EliKer 培养基、TJA 培养基。

1.1.2　主要仪器与设备　高速冷冻离心机(64RL): 美国 Beckman 公司生产; 紫外分光光度计(UV-6401): 上海光谱仪器厂生产; pH 计 上海安亭电子仪器厂生产; 全温振荡培养箱: 太仓实验设备厂生产。

1.2　实验方法

1.2.1　EPS 的提取和测定　活化菌种按体积分数 1% 接种于 20 mL 发酵培养基中, 于 37 ℃下培养 24 h, 将发酵液在 4 ℃、12 000 r/min 的条件下冷冻离心 15 min, 取上清液并弃去菌体沉淀。上清液和酒精按照 1∶3 的体积比于 4 ℃条件下沉淀 24 h, 再次在 4 ℃、12 000 r/min 的条件下冷冻离心 15 min, 取沉淀利用蒸馏水复溶, 透析过夜, 定容得到粗多糖液[12]。以硫酸-苯酚法在 490 nm 下比色测定质量浓度[13]。

1.2.2　Plackett-Burman 试验设计　采用 $N = 16$ 的 Plackett-Burman 试验设计, 对培养基的成分和菌株生长条件等各变量进行考察[15], 实验设计因素水平及编码见表 1。

表中自变量编码方程为: $x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i$, 式中, X_i 为自变量编码值; X_0 为自变量实验水平中心点实际值; ΔX_i 为单变量增量[16-18]。

表 1　Plackett - Burman 实验设计因素水平及编码

Tab.1　Coded factors and levels in Plackett Burman design

变量	代码		编码水平	
	编码	未编码	-1	+1
胰蛋白胨 质量浓度/(g/L)	x_1	X_1	20	30
酵母粉 质量浓度/(g/L)	x_2	X_2	5	7.5
葡萄糖 质量浓度/(g/L)	x_3	X_3	5	7.5
乳糖 质量浓度/(g/L)	x_4	X_4	5	7.5
蔗糖 质量浓度/(g/L)	x_5	X_5	5	7.5
抗坏血酸 质量浓度/(g/L)	x_6	X_6	0.5	0.75
氯化钠 质量浓度/(g/L)	x_7	X_7	4	6
醋酸钠 质量浓度/(g/L)	x_8	X_8	1.5	2.25
磷酸氢二氨 质量浓度/(g/L)	x_9	X_9	4	6
明胶 质量浓度/(g/L)	x_{10}	X_{10}	2.5	3.75
pH 值	x_{11}	X_{11}	5	6
温度/℃	x_{12}	X_{12}	28	38
时间/h	x_{13}	X_{13}	24h	48h
接种 体积分数/%	x_{14}	X_{14}	2g	3g
金属离子 质量浓度/(g/L)	x_{15}	X_{15}	0	0.15
摇床转速/(r/min)	x_{16}	X_{16}	0	150 r/min

1.2.3　中心组合试验设计　结合显著因子单因素的结果, 选择下一步试验水平的中心点和各水平的步长以及显著因子的水平, 中心组合试验的因素和水平设计[19]见表 2, 试验的设计[20-21]见表 3。

表 2　试验因素与水平

Tab.2　Factors and levels

因素	水平				
	$-r$ (-1.682)	-1	0	+1	r (1.682)
酵母粉 质量浓度/(g/L)	6.69	10	15	20	23.41
初始 pH 值	4.318	5	6	7	7.682
发酵时间/h	21.32	22	23	24	24.682

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表3 中心组合设计矩阵及试验结果

Tab. 3 Design and experimental results of of the central composite design

序号	编码变量			EPS产量/(g/L)
	x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	-1	2.017
2	-1	-1	1	2.494
3	-1	1	-1	1.976
4	-1	1	1	2.219
5	1	-1	-1	3.398
6	1	-1	1	3.595
7	1	1	-1	3.013
8	1	1	1	3.177
9	-1.682	0	0	1.745
10	1.682	0	0	3.782
11	0	-1.682	0	3.012
12	0	1.682	0	2.857
13	0	0	-1.682	2.879
14	0	0	1.682	3.496
15	0	0	0	3.694
16	0	0	0	3.699
17	0	0	0	3.687
18	0	0	0	3.683
19	0	0	0	3.695
20	0	0	0	3.703

2 结果与分析

2.1 产胞外多糖最适发酵培养基的确定

在6种供试培养基中乳酸乳杆菌生长生物量、产酸及EPS产量见表4。结果表明,MRS、APT、Eliker都较适合该菌株生长,MRS、Eliker的产量较高,但从材料易得及组分相对简单考虑,选择Eliker作为发酵培养基。

表4 不同培养基对乳酸乳杆菌生长的影响

Tab. 4 Effect of different media on *Lactobacillus lactis* fermentation

培养基	初始pH值	终点pH值	OD	EPS产量/(g/L)
MRS	6.5	3.83	1.638	1.243
M17	6.5	4.69	0.803	0.922
APT	6.5	3.98	1.444	1.054
SL	6.5	4.68	0.983	0.964
Eliker	6.5	3.95	1.678	1.420
TJA	6.5	3.59	0.827	0.970

2.2 影响胞外多糖产量显著因素的筛选

对Plackett-Burman试验结果进行方差分析,结果见表5。对乳酸乳杆菌产胞外多糖影响显著的因子有酵母粉($P<0.001$)、初始pH值(pH=0.036 0)和时间($P=0.004 7$)。根据Plackett-Burman实验回归方程系数显著性检验(见表6),通过逐步回归分析获得最优多元一次回归方程为:$Y=2.18 77+0.787 1x_2+0.194 5x_{11}-0.407 7x_{14}$式中$Y$为EPS的预测值,由自变量编码方程可知:$x_2=(X_2-25)/5$, $x_{11}=(X_{11}-5.5)/0.5$; $x_{14}=(X_{14}-36)/12$。

表5 回归模型方差分析表

Tab. 5 Analysis of variance for the regression equation

来源	自由度	平方和	均方和	F值	$Pr>F$
模型	16	4.421 6	0.276 4	19.263 7	0.016 2
误差	3	0.043 0	0.014 3		
总离差	19	4.464 7			

$R^2=0.990 4$; $R^2_{Adj}=0.938 6$.

表6 回归方程系数显著性检验

Tab. 6 Significance of the regression coefficients

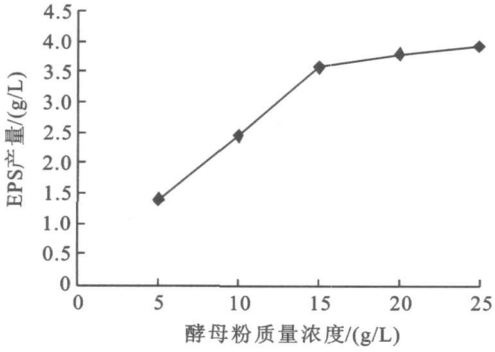
模型项	回归系数	标准误	t值	$P>t$
胰蛋白胨	0.100 7	0.053 5	1.880 0	0.156 7
酵母粉	0.787 1	0.053 5	14.694 4	0.000 7
葡萄糖	0.126 1	0.053 5	2.354 1	0.099 9
乳糖	0.021 7	0.053 5	0.405 1	0.712 5
蔗糖	0.058 7	0.053 5	1.096 0	0.353 2
抗坏血酸	-0.046 9	0.053 5	-0.875 6	0.445 7
氯化钠	-0.069 1	0.053 5	-1.290 0	0.287 5
醋酸钠	0.006 3	0.053 5	0.117 6	0.913 8
磷酸氢二氨	0.006 7	0.053 5	0.125 1	0.908 4
明胶	-0.124 3	0.053 5	-2.320 6	0.103 0
pH值	0.194 5	0.053 5	3.631 1	0.036 0
温度	-0.020 7	0.053 5	-0.386 5	0.725 0
接种体积分数	-0.061 1	0.053 5	-1.140 7	0.336 8
时间	-0.407 7	0.053 5	-7.611 3	0.004 7
金属离子	0.064 1	0.053 5	1.196 7	0.317 4
摇床转速	0.003 9	0.053 5	0.072 8	0.946 5

2.3 显著因子添加水平的研究

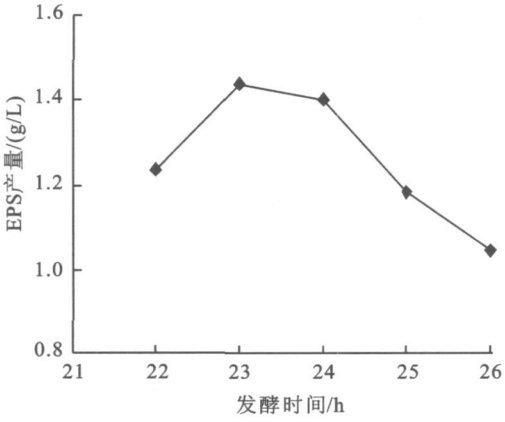
为了寻找合适的中心组合试验的中心点和大幅度减少试验工作量,采用单次单因子试验,对显著因子的添加水平进行研究[22-23]。因此,采用酵母粉0.3 g/L,初始pH值为6,时间为23 h为中心组

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

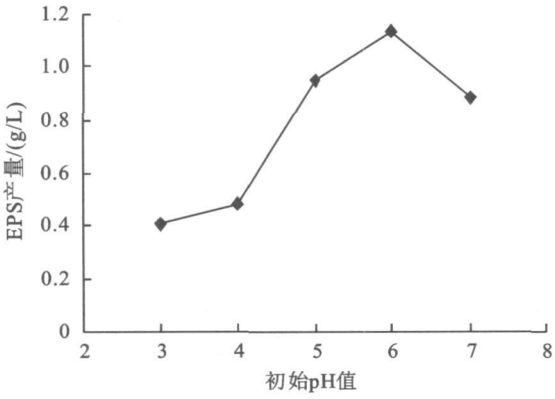
合试验的中心点, 结果见图 1。



(a)



(b)



(c)

图 1　酵母粉、初始 pH 值、时间对胞外多糖生产的影响

Fig. 1　Effect of yeast extract、he initial pH and fermentation time on exopolysaccharide

2.4　中心组合试验结果

2.4.1　多元二次模型的建立以及回归分析检验

确定了酵母粉质量浓度、初始 pH 值、发酵时间的添加水平, 按照中心组合试验设计, 具体试验方案及 EPS 质量浓度 Y 的测定结果见表 7, 得到二次响应面回归方程为: $Y = 3.699\,355 + 0.578\,7A - 0.101\,0B + 0.155\,1C - 0.367\,1A^2 - 0.060\,9AB - 0.044\,9AC - 0.306\,6B^2 - 0.033\,4BC - 0.217\,2C^2$。式中, Y 为 EPS 产量, A 为酵母粉, B 为初始 pH 值, C 为发酵时间。

由方差分析可知, 实验所选用的模型显著($P = 0.0001$), 预测值和实测值之间有高相关性($R^2 = 0.9821$), 能对试验数据进行较好的拟和, 因此该模型可用于预测菌株的实际发酵。从表 8 可以看出, 在试验设计的水平范围内, A、A^2、B^2、C^2 对 EPS 产量的影响达到极显著水平($P < 0.01$), B、C 的影响达显著水平($P < 0.05$), 而 AB、AC、BC 项对 EPS 产量不显著, 从而确定出优化的回归方程: $Y = 3.699\,355 + 0.578\,7A - 0.101\,0B + 0.155\,1C - 0.367\,1A^2 - 0.306\,6B^2 - 0.217\,1C^2$。

表 7　二次多项回归模型方程方差分析结果

Tab. 7　ANOVA results for exopolysaccharide obtained from CCD

来源	自由度 (DF)	平方和 (SS)	均方和 (MS)	F 值	$Pr > F$
模型	9	8.458 5	0.9398	60.940 4	0.000 1
误差	10	0.154 2	0.0154		
总离差	19	8.612 7			

$R^2 = 0.9821$; $R^2_{Adj} = 0.9660$

表 8　模型的系数显著性检验的结果

Tab. 8　Regression coefficients and their significance of the quadratic model

模型项	系数估计	标准误	t 值	$P > t$
A	0.578 7	0.033 6	17.220 0	0.000 1
B	−0.101 0	0.033 6	−3.006 3	0.013 2
C	0.155 1	0.033 6	4.616 5	0.000 9
A^2	−0.367 1	0.032 7	−11.220 9	0.000 1
B^2	−0.306 6	0.032 7	−9.372 7	0.000 1
C^2	−0.217 2	0.032 7	−6.638 4	0.000 1
AB	−0.060 9	0.043 9	−1.386 5	0.195 7
AC	−0.044 9	0.043 9	−1.022 1	0.330 8
BC	−0.033 4	0.043 9	−0.760 1	0.464 7

2.4.2　EPS 响应面分析

响应值 Y 在试验区域中有个稳定点(0.470 7, −0.154 2, 0.175 6), 代入回归方程 $Y = 3.964$ g/L。从图 2~4 可知, 由响应面值的变化和等高线图的趋势, 分析稳定值的性质, 确定该稳定点为极大值点[11], 从而确定最佳发酵条件为: 酵母粉质量浓度 17.35 g/L, 初始 pH 值 5.85, 发酵时间为 23.18 h。在预测发酵条件进行发酵实验, 得到实际产量为 3.910 g/L。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

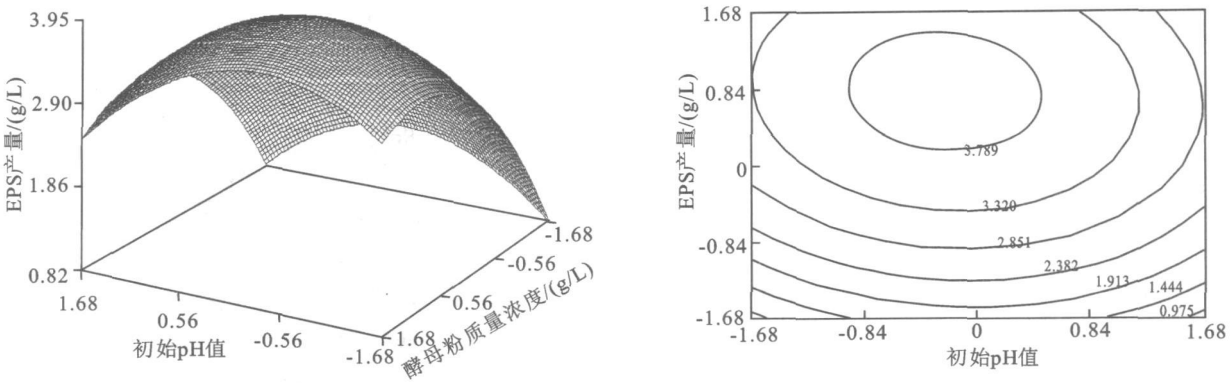


图 2 酵母粉和初始 pH 值交互影响 EPS 产量的曲面图及其等高线图

Fig. 2 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of EPS vs yeast extract and the initial pH

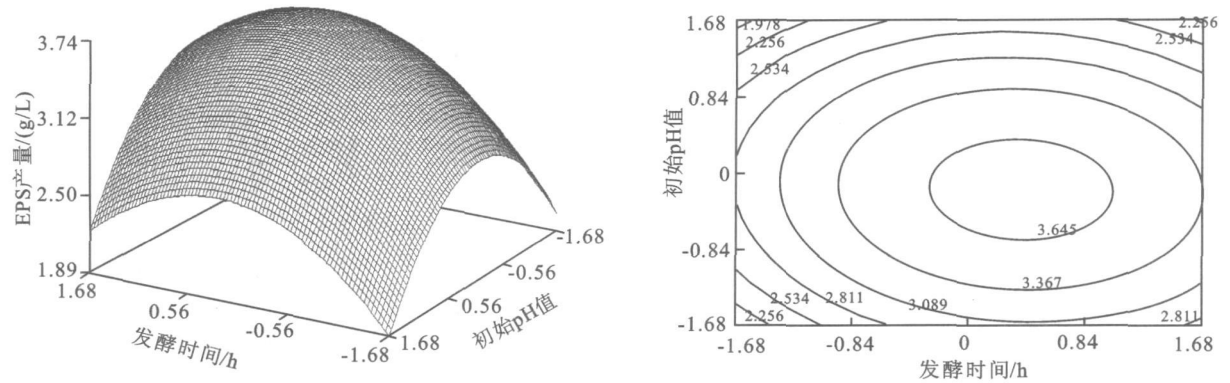


图 3 初始 pH 值和发酵时间交互影响 EPS 产量的曲面图及其等高线图

Fig. 3 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of EPS vs the initial pH and fermentation time

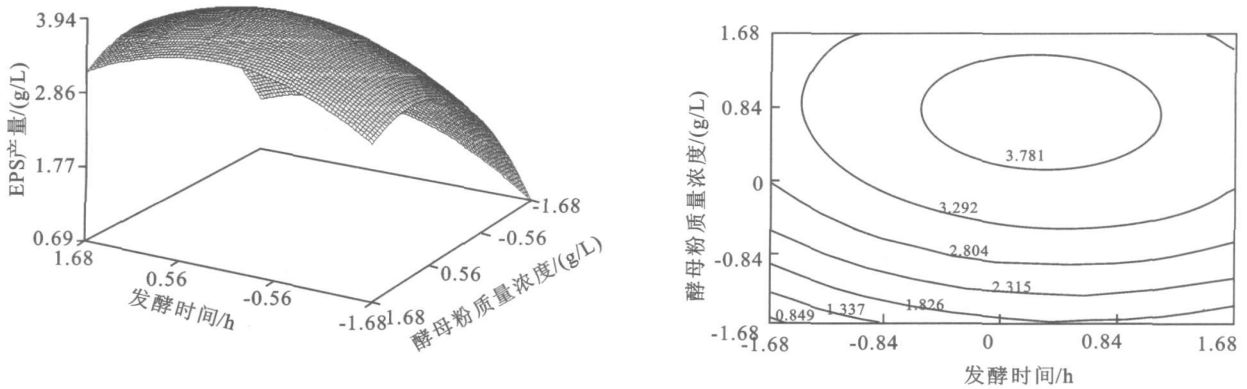


图 4 酵母粉和发酵时间交互影响 EPS 产量的曲面图及其等高线图

Fig. 4 Three-dimensional plot and corresponding contour plot of EPS vs yeast extract and fermentation time

3 结 语

在诸多适合于乳酸菌生长的培养基中, 确定 Eliker 培养基最适合乳酸乳杆菌发酵产胞外多糖。由于乳酸菌代谢中减少乳酸形成, 可能会使更多的碳原子脱离糖酵解反应进入 EPS 的合成, 所以发酵过程 pH 值变化幅度小, 有利于 EPS 的积累。实验中还注意到 EPS 产量在达到最大时, 细菌的生物量也最大。

利用 Plackett-Burman 设计, 评价了培养基各组分和主要工艺参数对胞外多糖合成的影响, 成功筛选出关键因子。其中酵母粉作为菌株生长所需氮源影响最显著[24], 其次是发酵时间, EPS 显著降低可能与酶降解或培养基物理参数的改变有关[25],

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相对较小的是初始 pH 值,可能因为整个发酵过程变化幅度比较缓和。

中心组合设计是响应曲面分析法中用得最为广泛的二阶试验设计,作者通过回归方程的方差分析检验,确定关键因子对胞外多糖合成量影响的显著性程度,从而确定出优化的回归方程: $Y = 3.699355 + 0.5787A - 0.1010B + 0.1551C - 0.3671A^2 - 0.3066B^2 - 0.2171C^2$。根据回归方程的计算,求的最优酵母粉质量浓度 17.35 g/L,初始 pH 5.85,发酵时间 23.18 h。利用最优条件进行试验验证,结果显示回归模型的预测值与试验的实测值较为接近,进一步证明回归模型具有较好的拟合度。

参考文献(References):

[1] 李盛钰,曾宪鹏,杨贞耐.提高乳酸菌胞外多糖产量的途径[J].食品与生物技术学报,2008,28(3):289-293.
LI Sheng-yu, ZENG Xian-peng, YANG Zhen-na. Strategies for increasing of exopolysaccharide production in Lactic acid bacteria[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2008,28(3):289-293.(in Chinese)

[2] Marensson Olof, Oste Rickard, Holst Olle. Lactic acid bacteria in an oat-based non-dairy milk substitute: fermentation characteristics and exopolysaccharide formation[J]. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie,** 2000,33(8):525-530.

[3] 张英春,冯锐,曹维强.乳酸菌胞外多糖的合成及生理功能研究进展[J].中国甜菜糖业,2008,(3):33-36.
ZHANG Ying-chun, FENG Rui, CAO Wei-qian. Research on the biosynthesis and physiological functions of exopolysaccharides produced by Lactic acid bacteria[J]. **China Beet and Sugar,** 2008,(3):33-36.(in Chinese)

[4] LucDe Vuyst, FilipDe Vin, Frederik Vaningelgem, et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria[J]. **International Dariy Journal,** 2001,11(9):687-707.

[5] Emma Arskold, Malin Svensson, Halfdan Grage, et al. Environmental influences on exopolysaccharide formation in Lactobacillus reuteri ATCC 55730[J]. **International Journal of Food Microbiology,** 2007,116:159-167.

[6] Welman A D, Maddox I S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges[J]. **Trends in Biotechnology,** 2003,21(6):269-274.

[7] Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria[J]. **Intern Dairy,** 2002,12(2-3):163-167.

[8] 刘慧,熊利霞,易欣欣,等.藏灵菇中高产胞外多糖乳酸菌的筛选及其发酵性能的研究[J].食品科学,2007,28(5):211-215.
LIU Hui, XIONG Li-xia, YI Xin-xin et al. Study on screening and fermentation capability of lactobacter yielding exopolysaccharide from Kefir Grains[J]. **Food Science,** 2007,28(5):211-215.(in Chinese)

[9] 杨冀艳,胡磊,许杨.Plackett-Burman 设计和响应面法优化荷叶总黄酮的提取工艺[J].食品科学,2009,30(6):29-33.
YANG Ji-yan, HU Lei, XU Yang. Optimization of extraction conditions of total flavonoids from lotus Leaves by Plackett-Burman design and response surface analysis[J]. **Food Science,** 2009,30(6):29-33.(in Chinese)

[10] 周海鸥,汪传高,张益波,等.统计学分析方法应用于桑黄菌发酵培养基的优化[J].食品研究与开发,2009,30(5):44-48.
ZHOU Hai-ou, WANG Chun-gao, ZHANG Yi-bo, et al. Statistical optimization of fermentation medium for mycelia production by phellinus igniarius[J]. **Food Research and Development,** 2009,30(6):29-33.(in Chinese)

[11] 赵凤敏,李树君,方宪法,等.中心组合设计法优化马铃薯薯渣固态发酵工艺[J].农业机械学报,2006,37(8):45-48.
ZHAO Feng-min, LI Shu-jun, FANG Xian-fa, et al. Optimization of potato residues solid substrate fermentation technology using central composite design[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,** 2006,37(8):45-48.(in Chinese)

[12] 孙巍,夏春雨,蔡和晖,等.中心组合设计试验优化毛云芝菌固体发酵培养条件[J].食品与生物技术学报,2009,28(5):688-692.
SUN Wei, XIA Chun-yu, CAI He-Hu, et al. Culture condition optimization of solid substrate fermentation by *Coriolus hirsutus* using central composite design[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009,28(5):688-692.(in Chinese)

[13] K M Desai, S K Akolkar, Y P Badhe, et al. Optimization of fermentation media for exopolysaccharide production from Lactobacillus plantarum using artificial intelligence-based techniques[J]. **Process Biochemistry,** 2006,41:1842-1848.

[14] 乌云达来,陆兆新,吕凤霞,等.嗜酸乳杆菌 NX2-6 液体发酵产细菌素培养基及其主要影响因子筛选[J].食品科学,2009,30(13):187-191.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

WU yun dalai, LU Zhao-xin, LU Feng-xia, et al. Screening of medium components and main fermentation conditions of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 for bactericin production[J]. **Food Science,** 2009, 30(13): 187- 191. (in Chinese)

[15] 王永斌, 王允祥. 雷蘑液态发酵工艺响应面法优化研究[J]. 食品科学, 2006, 22(6): 76- 82.
WANG Yong-bin, WANG Yun-xiang. Optimization of submerged fermentation conditions for extracellular polysaccharide by clitocybe gigantean using response surface methodology[J]. **Food Science,** 2006, 22(6): 76- 82. (in Chinese)

[16] 鞠兴荣, 王立峰, 袁建, 等. 双低菜籽粕分离蛋白提取效果优化研究[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(6): 101- 106.
JU Xing-rong, WANG Li-feng, YUAN Jiao, et al. Optmization of extraction for orotein isolate In double low rape meal[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,** 2005, 20(6): 101- 106. (in Chinese)

[17] 廖春丽, 余晓斌, 刘海丽. 响应面优化β-胡萝卜素液体发酵培养基[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 95- 99.
LIAO Chun-li, YU Xiao-bin, LIU Hai-li. Optimize the submerged fermentation media of β-carotene by using response surface methodology[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2007, 26(3): 95- 99. (in Chinese)

[18] Wu Qiu-li, Chen Tao, Chen Xun, et al. Optimization of nboflavin production by recombinant *Bacilus subtilis* RH44 using statistical design[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2007, 76(4): 783- 794.

[19] 张亚琼, 宁喜斌. 温度、pH 值、盐度交互作用优化福氏志核氏菌 F2b 培养条件[J], 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 408 - 412.
ZHANG Ya-qiong, NING Xi-bi. Optimization of cultivation condition of *Shigella glexneri* 2b by interaction experiments among temperature, pH and sodium chloride concentration[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(3): 408 - 412. (in Chinese)

[20] 王维, 师俊玲, 杨保伟. 茎点菌属产松脂醇二葡萄糖苷的培养条件优化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(6): 287- 290.
WANG Wei, SHI Jun-ling, YANG Bao-wei. Optimization of conditions for production of pinoresinol diglucoside by a strain of *Phoma sp*. [J]. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,** 2008, 24(6): 287- 290. (in Chinese)

[21] 苏俊, 冯新忠, 邝海菊, 等. 响应面法优化灰白翅孢壳发酵产胞外多糖的研究[J]. 食品工业科技, 2008, (08): 100- 102.
SU Jun, FENG Xin-zhong, KUANG Hai-ju, et al. Study on optimal producing condition of extracellular polysaccharide of *Emericellopsis pallida* by response surface method[J]. **Science and Technology of Food Industry,** 2008(08): 100- 102. (in Chinese)

[22] 唐华, 刘同军, 杨海龙, 等. 产红色素海洋细菌 *Loktanella sp*. 发酵培养基的优化[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(1): 30- 34.
TANG Hua, LIU Tong-jun, YANG Hai-long, et al. Optimization of seawater cultivating marine baterium *Loktanella sp*. for red pigment production[J]. **Acta Agriculturae Zhejiangens,** 2009, 21(1): 30- 34. (in Chinese)

[23] Frederique Gancel, Georges Novel. Exopolysaccharide production by streptococcus *Salivarius* ssp *thermophilus* cultures [J]. **J Dairy Sci,** 1994, 77: 685- 688.

[24] Stacy A, Kimmel, Robert F, et al. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* RR[J]. **International Journal of Food Microbiology,** 1998, (40): 87- 92.

[25] R C McKellar, J Van Geest, W Cui. Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by *Agrobacterium radiobacter*[J]. **Food Hydrocolloids,** 2003, (17): 429- 437.

(责任编辑: 李春丽)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net