

王 豪,徐致远,刘振民,等. 不同发酵温度对开菲尔产氨基酸及理化性质的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):236-239.

# 不同发酵温度对开菲尔产氨基酸及理化性质的影响

王 豪<sup>1</sup>, 徐致远<sup>1</sup>, 刘振民<sup>1</sup>, 章 慧<sup>2</sup>

(1. 乳业生物技术国家重点实验室/光明乳业股份有限公司研究院, 上海 200436; 2. 上海德诺产品检测有限公司, 上海 200436)

**摘要:**开菲尔中除含有多种益生菌外,在发酵过程中还可代谢产生多种功能性物质。试验研究了开菲尔在不同发酵温度下游离氨基酸变化、活性益生菌增殖及对乳酸合成水平的影响,结果表明,30 ℃发酵至终点,pH 值为 4.60,开菲尔中游离氨基酸水平高达 576.2 mg/kg,活菌数达  $1.6 \times 10^{11}$  CFU/g,乳酸合成量为 8.0 g/L,表现出极好的功能性成分产生水平、菌体细胞生长活性和酸化能力。

**关键词:**开菲尔;氨基酸;发酵温度;活菌数;乳酸

**中图分类号:** TS252.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0236-03

发酵乳是通过乳酸菌等菌种,代谢利用乳中乳糖和蛋白质等成分,产生多种生物活性物质,赋予机体极好的营养价值及益生特效的一种产品<sup>[1]</sup>。乳酸菌是一类对营养物质选择较为挑剔的微生物,在多数情况下此类菌群的生物合成能力有限,需要外源的氨基酸或肽来支持其生长代谢。由于生乳中缺乏此类小分子物质,因此,乳酸菌的生长取决于对酪蛋白的水解能力<sup>[2]</sup>。酪蛋白是氨基酸的主要来源,其水解与乳酸菌所分泌的蛋白酶密切相关,细胞膜上的蛋白酶是唯一能够催化酪蛋白降解为低聚肽的关键酶,然后,低聚肽才能被转入膜内,再经由内肽酶及氨肽酶等进一步降解。发酵乳中由乳酸菌代谢释放积累的氨基酸会显著影响发酵乳制品的营养功能,而游离氨基酸的种类及产生水平取决于乳的品类、乳酸菌的组成、发酵参数和贮存条件等因素。发酵乳中氨基酸总量反映蛋白水解及菌体细胞同化之间的平衡关系,例如,保加利亚乳杆菌的蛋白水解活性要强于嗜热链球菌,前者产生的氨基酸为后者同化利用,从而建立了一种菌群共生平衡关系。

开菲尔是一种由混合菌群发酵制成的乳制品,目前少有文献报道开菲尔发酵过程中体系内游离氨基酸的变化。本试验研究开菲尔菌群在不同发酵温度下氨基酸释放利用、细胞生长及乳酸产生的特性,以揭示开菲尔菌株间的互生关系,从而在未来工业化生产中可以设计出具有高活菌数、高含量游离氨基酸的发酵乳,提升产品的营养价值和益生功效。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

生鲜牛乳,光明乳品八厂生产;白砂糖,广西上上糖业有限公司生产;开菲尔复合发酵剂,含保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌、嗜酸乳杆菌、乳酸乳球菌乳酸亚种、乳酸乳球菌乳脂亚种、乳酸乳球菌双乙酰亚种,丹尼斯克公司生产;氨基酸化学分析试剂包,美国 Waters 公司生产;Pico Tag 衍生化试剂盒,

美国 Waters 公司生产;超滤膜,美国 Millipore 公司生产;MRS 培养基、M17 培养基,德国 Merck 公司生产;其他均为国产分析纯试剂。

### 1.2 仪器与设备

超净工作台,美国 Labconco 公司生产;厌氧培养箱,英国 Ruskin 公司生产;电热恒温水槽,上海精宏实验设备公司生产;高压灭菌锅,日本 Hirayama 公司生产;高速冷冻离心机,美国 BECKMAN COULTER 公司生产;HPLC 色谱仪,美国 Waters 公司生产;pH 计,美国奥立龙公司生产。

### 1.3 试验方法

1.3.1 开菲尔制备 生牛乳验收→净化→混料(白砂糖,40~45 ℃)→均质(60~65 ℃,19~21 MPa)→杀菌(90 ℃,5 min)→冷却→接种发酵至 pH 值  $4.6 \pm 0.02$ →搅拌破乳→冷却至 16~22 ℃→灌装封口。

1.3.2 氨基酸测定 样品用 4% 磺基水杨酸沉淀,4 ℃、10 000 g 离心 20 min;取上清液,用 10 000 NMWL 的膜超滤,等分为 50 L,采用 Pico Tag 衍生化试剂盒进行衍生反应,用于 HPLC 上样分析;采用氨基酸化学分析试剂包对游离氨基酸的异硫氰酸苯酯衍生物进行定量。色谱分析条件:Pico Tag 柱(3.9 mm×30 cm),温度 46 ℃,进样量 10 L(取自 100 L 稀释的衍生化样品);标准品为额外添加了色氨酸和天冬酰胺的 H 级氨基酸,进样量为 25 pmol。

1.3.3 乳酸测定 参考 Boehringer 描述的酶法检测流程<sup>[3]</sup>。

1.3.4 微生物计数 采用无菌去离子水进行梯度系列稀释,平行试验 3 次。乳球菌及链球菌计数使用 M17 琼脂培养基,乳杆菌计数使用 MRS 琼脂培养基,均采用倾注平板法,分别在 30、37、42 ℃环境温度下培养至形成明显菌落后进行计数。活菌数以 1 g 中的菌落集成单位(CFU/g)来表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发酵温度下开菲尔的活菌数含量及乳酸合成量

由图 1 可见,开菲尔菌群中无论是杆菌还是球菌,在 30 ℃培养时前 6 h 内均呈指数级态势生长,此发酵温度处于乳酸乳球菌最适的生长温度范围,低于保加利亚乳杆菌和嗜酸乳杆菌的最适生长温度,促使整个发酵过程中球菌数均高于杆菌数;发酵 17 h 后,pH 值降至酪蛋白等电点 4.61 时,球

收稿日期:2013-11-21

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划(编号:2012BAD28B07、2013BAD18B01)。

作者简介:王 豪(1984—),男,上海人,硕士,工程师,主要从事乳品生物技术研究。E-mail:wanghao840818@126.com。

菌数较杆菌数高出约 1 个数量级,总菌数达  $1.6 \times 10^{11}$  CFU/g,所合成的乳酸总量达 8.0 g/L。在发酵过程中,虽然球菌和杆菌均表现出很好的细胞生长趋势及酸化活性,但是均未到达典型的稳定期。

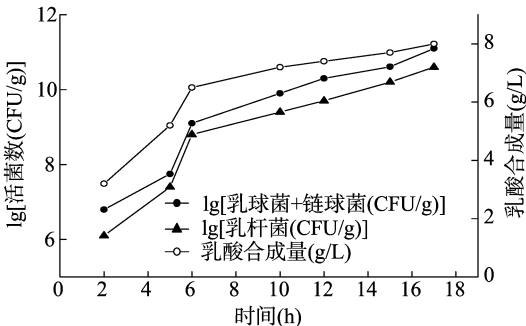


图1 30 °C 发酵下开菲尔活菌数及乳酸合成量

由图 2 可见,在 37 °C 发酵温度下,菌群的生长代谢有所加强,发酵 10 h 时菌体生长进入稳定期;整个发酵过程中,球菌和杆菌的活菌数相差不大,这可能是发酵温度偏离了乳球菌的最适温度范围,而有利于开菲尔发酵剂中嗜酸乳杆菌的生长;37 °C 发酵时乳杆菌数较 30 °C 时平均提高了 2 个数量级;37 °C 发酵过程中,虽然菌体细胞数有一定上升,发酵 12 h 至终点 pH 值 4.60,总菌数为  $6.6 \times 10^{11}$  CFU/g,但是乳酸合成量同 30 °C 时接近,乳酸总量为 8.2 g/L。

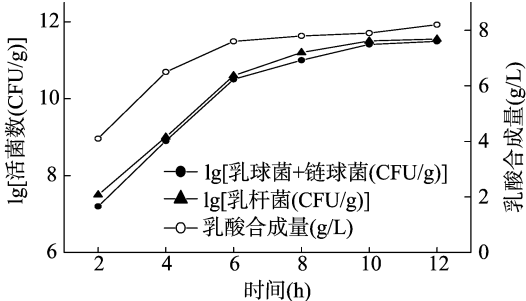


图2 37 °C 发酵下开菲尔活菌数及乳酸合成量

由图 3 可见,当发酵温度上升至 42 °C 时,在发酵的前 3 h 内,杆菌呈优势生长,且产酸能力在整个发酵过程中最强;当发酵 4 h 时,球菌成了优势菌群,活菌数超过杆菌,而产酸速率逐渐下降;42 °C 时菌群在对数生长期内的细胞增殖速度强于 30 °C 和 37 °C;从发酵 5 h 起,杆菌和球菌都进入了稳定期,发酵 7 h 至终点 pH 值 4.59 时,总菌数达  $3.6 \times 10^{12}$  CFU/g,乳酸合成量略高于 30 °C 和 37 °C,乳酸总量为 8.4 g/L。42 °C 有利于嗜热型乳酸菌如保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的生长产酸,而乳酸乳球菌及嗜酸乳杆菌的生长则受到一定限制。

综合图 1 至图 3 发现,不同的发酵温度对乳酸合成量无显著影响,但是对细胞生长活性及菌群中的菌相变化有较明显的影响,发酵温度的提高有利于提升发酵速度及终产品中的活菌数,但是不利于产品后发酵过程中的酸度控制,且过早进入稳定期会加剧贮藏过程中活菌数的衰减。

2.2 不同发酵温度下开菲尔的氨基酸产生种类及合成量

乳酸乳球菌在 30 °C 培养下作为开菲尔菌群中的优势群体,以酪蛋白作为氨基酸合成的主要来源,依靠于细胞膜上由蛋白酶和三肽转运系统组成蛋白水解体系,降解酪蛋白并形

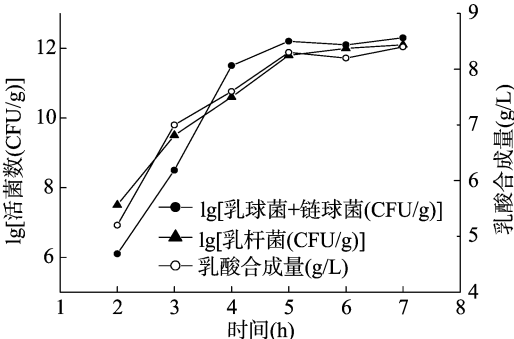


图3 42 °C 发酵下开菲尔活菌数及乳酸合成量

成大量的低聚肽,穿透细胞膜后在胞内肽酶的作用下供给刺激细胞生长所必需的氨基酸<sup>[4]</sup>。由表 1 可见,开菲尔菌群在 30 °C 培养发酵过程中,19 种氨基酸均有检出;发酵 17 h 后,氨基酸显现出最大积累,达 576.2 mg/kg;自发酵 2 h 起至发酵 12 h,体系中氨基酸含量上升明显,氨基酸浓度由 23.9 mg/kg 上升至 488.7 mg/kg,尤其在发酵 2 h 至发酵 6 h 菌群处于对数生长期时,氨基酸的积累非常活跃,这与 Simova 等的研究结果<sup>[5]</sup> 相符;从发酵 12 h 至发酵 17 h,游离氨基酸的积累虽然呈小幅上升,但菌群的生长速度放缓,这可能是由于处于对数生长末期的酪蛋白水解利用度虽然仍较强,但肽转运活性受限,从而引起细胞生长速度降低<sup>[6]</sup>;在 30 °C 培养温度下,开菲尔中谷氨酸、脯氨酸和亮氨酸的水平较高;在发酵起始时,赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸和酪氨酸并未检出,但随着发酵时间的延长开始逐渐积累,这可能是因为生长过程中,不同时间段内菌株的蛋白水解转运活性发生了改变<sup>[7]</sup>。

表 1 30 °C 发酵下开菲尔中释放的游离氨基酸变化

氨基酸	不同发酵时间游离氨基酸浓度 (mg/kg)						
	2 h	5 h	6 h	10 h	12 h	15 h	17 h
赖氨酸	0	5.1	7.8	9.6	18.9	19.5	20.1
组氨酸	0.8	7.1	13.5	17.8	23.1	26.3	25.5
精氨酸	0.1	1.5	4.8	6.1	7.6	7.1	6.6
天冬氨酸	1.2	5.6	16.2	17.1	20.1	20.3	20.5
苏氨酸	0	0	0.8	1.1	1.7	1.9	2.2
半胱氨酸	0.2	0.5	1.0	2.3	2.8	2.2	2.0
丝氨酸	2.5	2.8	6.1	9.5	12.3	12.2	13.8
谷氨酸	5.8	43.1	125.6	157.7	190.8	210.6	228.9
脯氨酸	6.2	18.6	42.3	56.3	84.4	99.8	104.1
甘氨酸	0.5	1.5	2.3	2.6	5.7	5.0	6.8
丙氨酸	2.4	9.8	18.9	26.1	31.2	34.2	37.1
缬氨酸	1.2	3.5	6.3	8.1	15.0	15.9	19.5
蛋氨酸	0	0	0.6	0.7	1.2	0.8	0.7
异亮氨酸	0.6	4.7	8.2	12.2	22.6	18.8	27.4
亮氨酸	0.7	11.2	18.0	23.5	35.8	38.4	46.1
酪氨酸	0	0.4	0.7	1.2	1.2	1.0	0.6
苯丙氨酸	0.8	1.8	4.5	7.8	8.5	8.1	9.1
天冬酰胺	0.4	0.7	1.7	2.2	2.6	2.4	2.2
色氨酸	0.5	1.5	2.8	3.3	3.2	3.1	3.0
总量	23.9	119.4	282.1	365.2	488.7	527.6	576.2

注:生牛乳中氨基酸本底含量 (mg/kg): 赖氨酸 4.7, 精氨酸 2.5, 天冬氨酸 5.2, 苏氨酸 1.5, 丝氨酸 2.5, 谷氨酸 48.5, 甘氨酸 10.8, 丙氨酸 3.1, 缬氨酸 5.8, 异亮氨酸 0.4, 亮氨酸 0.7, 酪氨酸 1.2, 组氨酸、脯氨酸及蛋氨酸未检出。

由表 2 可见,37 ℃培养与 30 ℃相比,开菲尔游离氨基酸的积累呈显著下降,发酵 10 h 时为最高检出量,仅达到 149.6 mg/kg;发酵 4 h 至发酵 8 h 氨基酸积累速度最大,自发酵 10 h 至发酵 12 h 体系内氨基酸含量出现下降;整个发酵过程中未检出苏氨酸、半胱氨酸和异亮氨酸,且仅有痕量的赖氨酸、精氨酸和蛋氨酸检出。虽然体系内游离氨基酸水平过低,但活菌数含量却略微高出 30 ℃发酵时的活菌数,这可能是由于虽然菌体代谢产生的游离氨基酸未呈现出爆发式积累,但是 37 ℃发酵期间所合成的氨基酸种类和产量可能已足够满足开菲尔菌群在此温度下的生长所需。

表 2 37 ℃发酵下开菲尔中释放的游离氨基酸变化

氨基酸	不同发酵时间游离氨基酸浓度 (mg/kg)					
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
赖氨酸	0	0	0.2	0.4	0.6	0.5
组氨酸	0.5	1.2	2.6	3.7	5.1	4.8
精氨酸	0	0	0	0.2	0.6	0.7
天冬氨酸	0.3	0.8	1.2	2.3	3.1	2.9
苏氨酸	0	0	0	0	0	0
半胱氨酸	0	0	0	0	0	0
丝氨酸	0.6	1.1	2.8	4.5	5.7	6.3
谷氨酸	5.8	12.3	35.9	53.6	67.9	66.8
脯氨酸	2.1	8.8	15.6	18.9	21.1	20.3
甘氨酸	0.5	1.5	2.2	3.1	3.2	2.9
丙氨酸	0.7	2.5	3.9	7.5	8.2	9.4
缬氨酸	0.8	2.8	4.5	8.9	9.7	9.5
蛋氨酸	0	0	0	0.5	0.4	0.4
异亮氨酸	0	0	0	0	0	0
亮氨酸	0.6	1.4	2.9	4.1	3.8	30.6
酪氨酸	0.4	0.7	1.8	2.4	3.0	2.5
苯丙氨酸	0.9	2.1	5.3	8.5	9.2	9.0
天冬酰胺	0.3	0.5	1.2	1.9	2.5	1.5
色氨酸	0.6	1.8	2.9	3.8	5.5	5.4
总量	14.1	37.5	83.0	124.3	149.6	146.5

42 ℃培养温度有利于保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌协同发酵,嗜热链球菌前期可利用生乳中天然存在的游离氨基酸,在较短时间内实现大量细胞增殖,但后期由于产细胞蛋白酶活性极低、自身氨基酸合成功能较弱,需依靠体系中保加利亚乳杆菌所产生的游离氨基酸才能持续生长<sup>[8]</sup>。由表 3 可见,42 ℃发酵过程中,开菲尔菌群的氨基酸积累比 37 ℃发酵明显加强,最高检出量达 486.5 mg/kg;发酵 2~5 h 对数生长期内,氨基酸合成速度较快;发酵 5 h 步入稳定期后,氨基酸的合成速度有所降低;氨基酸产生种类较为欠缺,19 种氨基酸中半胱氨酸、蛋氨酸和天冬酰胺均未检出,在检出的氨基酸中谷氨酸的检出水平最高。42 ℃发酵至终点时虽然活菌数最高,但是在不同发酵阶段内游离氨基酸的浓度却均不及 30 ℃发酵时的氨基酸产生水平。研究发现,在所有氨基酸中,谷氨酸对嗜热链球菌的生长尤为重要,当乳中额外添加谷氨酸 2.6 g/L 后,嗜热链球菌的生长情况会发生极大改变<sup>[9]</sup>。

开菲尔中氨基酸产生水平及种类一定程度上与发酵温度有关,这是由于温度会明显加速菌体细胞的生长代谢活动,从而影响菌株所分泌的蛋白酶活性及酶切位点,进一步可能改

表 3 42 ℃发酵下开菲尔中释放的游离氨基酸变化

氨基酸	不同发酵时间游离氨基酸浓度 (mg/kg)					
	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
赖氨酸	1.6	3.1	5.9	8.5	7.6	7.1
组氨酸	2.3	6.5	9.7	13.8	17.1	16.4
精氨酸	1.2	4.6	7.7	9.5	9.1	9.0
天冬氨酸	0.3	0.8	1.2	2.3	3.1	2.9
苏氨酸	0.5	1.7	3.7	5.4	6.6	5.9
半胱氨酸	0	0	0	0	0	0
丝氨酸	3.2	4.1	6.3	17.7	21.5	21.7
谷氨酸	12.4	48.5	109.0	150.3	172.0	186.2
脯氨酸	3.2	18.3	57.8	80.1	97.6	100.8
甘氨酸	0.6	2.9	4.6	6.8	5.9	5.2
丙氨酸	8.1	16.5	22.9	30.1	38.1	43.3
缬氨酸	0.7	2.1	5.5	7.6	9.2	12.9
蛋氨酸	0	0	0.5	1.2	2.3	1.7
异亮氨酸	6.6	8.9	13.7	18.1	23.7	22.2
亮氨酸	7.3	10.8	14.9	20.1	23.3	25.4
酪氨酸	0	0	0	0	0	0
苯丙氨酸	3.8	6.7	11.5	15.3	14.9	14.2
天冬酰胺	0	0	0	0	0	0
色氨酸	0.6	2.1	6.5	9.8	12.3	11.6
总量	52.4	137.6	281.4	396.6	464.3	486.5

变由内肽酶主导的酪蛋白代谢途径<sup>[10]</sup>。由表 1 至表 3 可见,30 ℃发酵有利于开菲尔中游离氨基酸的积累,游离氨基酸水平不断上升,且产生的氨基酸种类也丰富多样,这可能源于嗜温型乳酸菌-乳酸乳球菌强有效的蛋白水解系统。

3 结论

在多数情况下,酸奶发酵剂由保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌 2 种共生菌种组成,而开菲尔发酵剂中菌种间的代谢互动关系复杂多变,这种共生体系有利于维持菌种间的相互稳定及菌株的生理功能<sup>[11]</sup>。一般情况下,菌株的发酵温度低于其最适生长温度,其活菌数的增殖会受到限制<sup>[12]</sup>。在本试验中,由于开菲尔菌群中存在具备高效蛋白水解系统的乳酸乳球菌菌株,可合成足够量的游离氨基酸,作为供给其他菌株生长所必需的营养因子,因此,在较大程度上降低了温度敏感型菌株嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌对增殖的不利影响。

试验采用从开菲尔中分离出的乳酸菌制备开菲尔发酵剂,具有独特的发酵特性,共生菌群协同发酵可有效克服乳中的营养素限制,改善活菌数的增殖和氨基酸的积累。通过对比不同发酵温度下开菲尔中的活性益生菌数量和氨基酸产生水平可以看出,在 30 ℃发酵过程中,游离氨基酸积累水平最高,合成的氨基酸种类最为齐全,可有效弥补各菌株生长中所缺失的氨基酸,这对于开菲尔菌群的协同发酵是非常重要的。以 30 ℃作为发酵温度,虽然终点活菌数并不是最高,但氨基酸的足量积累有利于在保质期内提高活菌数的稳定性。通过对比 Beshkova 等研究<sup>[13]</sup>发现,本试验开菲尔在 30 ℃发酵时所产的游离氨基酸种类更为丰富,且必需氨基酸的含量高于普通酸奶。因此,从产品实际营养价值及益生功效角度出发,30 ℃作为开菲尔的发酵温度无疑是最优选择。

柳 荫,吴凤智,王晓丹,等. 响应面法优化胰蛋白酶酶解核桃蛋白的工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):239-242.

# 响应面法优化胰蛋白酶酶解核桃蛋白的工艺

柳 荫,吴凤智,王晓丹,邱树毅,周鸿翔

(贵州大学/发酵工程与生物制药省级重点实验室,贵州贵阳 550025)

**摘要:**以液压冷榨油后的核桃饼粕为原料,综合单因素试验分析,并利用响应面分析方法获得胰蛋白酶酶解核桃蛋白的优化条件:酶解温度 37 ℃、底物质量浓度 31 g/L、反应时间 125 min、加酶量 $[E]:[S]=3.2:100$ ,各因素对核桃蛋白酶解的影响顺序为酶解时间>加酶量>底物质量浓度。通过验证试验表明,利用优化的酶解条件,核桃蛋白利用指数可达 47.25%,效果较好。

**关键词:**胰蛋白酶;酶解条件;蛋白利用指数;工艺优化

**中图分类号:** TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0239-04

核桃别称羌桃、胡桃,隶属胡桃科胡桃属。核桃蛋白含有人体所必需的 8 种氨基酸,且含量接近世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)规定的标准<sup>[1-2]</sup>,是一种氨基酸齐全的植物蛋白资源。目前,国内外对核桃的研究偏重于对核桃油的提取与精炼,而对核桃蛋白质的开发利用研究很少。生物活性肽是指能够调节生物机体生命活动或某些生理活性的一类肽的总称<sup>[3-4]</sup>。某些低肽不仅能提供人体生长、发育所需的营养物质,而且还能调节人体机能<sup>[5-8]</sup>。经酶解后的蛋白质主要以低肽的形式存在并被吸收。采用现代酶解技术

对核桃蛋白进行酶解,不仅可改变其物理化学性质和功能特性,还能产生营养丰富、供人体生长发育所需要的物质。因此,对核桃蛋白的开发利用具有十分重要的意义。本试验在前期筛选出胰蛋白酶为酶解核桃蛋白最佳用酶的基础上,利用胰蛋白酶酶解核桃饼粕,对其酶解条件进一步优化,为核桃功能多肽开发的利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验原料为实验室液压冷榨油后的核桃饼粕;胰蛋白酶,由北京索来宝公司生产; $K_2SO_4$ 、 $CuSO_4$ 、 $H_2SO_4$ 、HCl、NaOH、 $H_3BO_3$  及混合指示剂等均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

FW-100 高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司生产;集热式恒温加热磁力搅拌器,郑州长城科工贸有限公司

收稿日期:2013-10-11

基金项目:贵州省农业攻关(编号:黔科合 NZ[2013]3016 号)。

作者简介:柳 荫(1987—),女,满族,硕士研究生,主要从事食品生物技术研究。E-mail:liuyin0130@163.com。

通信作者:周鸿翔(1975—),男,副教授,主要从事油脂加工和食品生物技术研究工作。E-mail:zhou-hx@163.com。

## 参考文献:

- [1] 泰米迈 A Y,罗宾逊 R K. 酸乳科学与技术[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [2] Beganovic J, Kos B, Lebos P A, et al. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92[J]. *Anaerobe*, 2013, 20: 58-64.
- [3] Boehringer M. Methods of enzymatic food analysis using test-combination[M]. Germany: Boehringer Mannheim GmbH, 1984.
- [4] Flambard B, Helinck S, Richard J, et al. The contribution of caseins to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(6): 1991-1996.
- [5] Simova E, Simov Z, Beshkova D, et al. Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(2): 112-123.
- [6] Zhang Q L, Ren J Y, Zhao M M, et al. Isolation and characterization of three novel peptides from casein hydrolysates that stimulate the growth of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7045-7053.

- [7] Stuknyte M, De Noni I, Guglielmetti S, et al. Potential immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteinases of lactic acid bacteria[J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(10): 763-769.
- [8] Horiuchi H, Sasaki Y. Short communication: effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(6): 2904-2909.
- [9] Neviani E, Giraffa G, Brizzi A, et al. Amino acid requirements and peptidase activities of *Streptococcus thermophilus* [J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79(3): 302-307.
- [10] El-Ghaish S, Dalgalarondo M, Choiset Y A, et al. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 230(4): 635-643.
- [11] 毛 健,王 豪,苏米亚,等. 开菲尔中生物活性物质的益生作用[J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(12): 30-35.
- [12] 王 豪,于 鹏,刘振民,等. 贮藏温度对开菲尔发酵乳理化性质及菌相的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(7): 226-228.
- [13] Beshkova D M, Simova E D, Frengova G I, et al. Production of amino acids by yogurt bacteria[J]. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(6): 963-965.