

# 双歧杆菌培养及冻干菌粉制备工艺研究

张帆, 胡铁锋, 郑李彬, 李红强, 张瑾\* (河北科技师范学院, 河北秦皇岛 066000)

**摘要** [目的]优化双歧杆菌培养及冻干菌粉制备工艺。[方法]通过测定生长曲线、酸度曲线、冻干菌粉含水量,筛选冻干保护剂等研究双歧杆菌培养体系及真空冷冻干燥过程。[结果]试验得出,双歧杆菌在牛奶还原培养基中培养 30 h, pH 约为 4.5 时,发酵液活菌数含量最高。真空冷冻干燥过程中加入单一保护剂 100 g/L 葡萄糖处理后,活菌率达到 35.01%;加入复合保护剂(甘油+葡萄糖+海藻糖)后,活菌率可达 72.09%。双歧杆菌真空冷冻干燥后,菌粉含水量约为 3% (质量分数),冻干效果良好,易于保藏。[结论]试验可为深入研究双歧杆菌活菌粉制剂提供理论依据。

**关键词** 双歧杆菌;真空冷冻干燥;冻干保护剂

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)35-13752-04

## Culture of *Bifidobacterium* and Its Freeze-drying Bacterial Powder Production Technology

ZHANG Fan et al (Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao, Hebei 066000)

**Abstract** [Objective] To optimize culture of *Bifidobacterium* and production technology of its freeze-drying bacterial powder. [Method] Test growth curve, acidity curve, water content of freeze-drying bacterial powder, and screen freeze-drying protective agent, to study culture system of *Bifidobacterium* and the process of its vacuum freeze drying. [Result] After being cultured for 30 h in milk reducing medium, pH 4.5, quantity of viable bacteria in zymotic fluid achieves the highest level. After adding 100 g/L glucose in the process of vacuum freeze drying, the rate of viable bacteria achieves 35.01%; after adding compound protective agent (glycerol + glucose + mycose), the rate of viable bacteria achieves 72.09%. After vacuum freeze drying, water content of the bacterial powder is 3% (mass fraction), so it is suitable for being preserved. [Conclusion] The study provides a theoretical basis of producing bacterial powder of *Bifidobacterium*.

**Key words** *Bifidobacterium*; Vacuum freeze drying; Freeze-drying protective agent

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是1899年由法国巴斯德研究所的 Tissier 首次从母乳喂养婴儿的粪便中分离出来的,是健康个体肠道中的优势菌<sup>[1]</sup>。目前,应用双歧杆菌的各种药物和食品相继推出并日渐普及,各种双歧杆菌制品不断涌现<sup>[2]</sup>。

双歧杆菌是一种专性厌氧菌,对营养条件要求高,对氧极为敏感,保持其活性较困难。目前市场上销售的双歧杆菌产品以液态居多,这些液体产品中的活菌数是沿指数曲线下降的<sup>[3]</sup>。活菌粉剂则要比液体制剂耐贮存,在相同温度下的活菌数下降趋势远小于液体制剂,在冻干过程中加入合适的保护剂,会提高菌体的成活率,而且菌粉易于包装运输,是今后双歧杆菌制品的发展方向<sup>[4]</sup>。笔者对双歧杆菌的培养条件、对数生长期、真空冷冻速率、冻干保护剂、冻干菌粉水分残留状态进行初步研究,以期为进一步研究双歧杆菌活菌粉制剂提供理论依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 菌种:两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium. bifidum*),菌种编号 1.1825,来源于中国科学院微生物所冻干保藏菌种。牛奶还原培养基:10 g 脱脂乳粉,1 L 水,108 ℃ 灭菌 10 min。PTYG 培养基<sup>[5]</sup>:胰蛋白胨 5 g,大豆蛋白胨 5 g,酵母提取物 10 g,葡萄糖 10 g,0.1% 刃天青 1 ml,琼脂 15 g,吐温 80 1 ml,水 1 L,半胱氨酸·HCl(培养基煮沸后,分装前加入)

0.5 g,盐溶液 40 ml,pH 6.8~7.0,113 ℃ 灭菌 30 min。主要设备:YQX-1X 型厌氧培养箱,FLC-3CLEAN BENCH 超净工作台,DGX-9423B-1 电热鼓风干燥箱,LABOAUTOCLAVE 湿热灭菌箱,海尔 BCD-237F 电冰箱。

**1.2 双歧杆菌培养** 双歧杆菌菌种用 PTYG 液体培养基活化后,将培养液 1 ml 接种于预先配制的 30 ml 牛奶还原培养基底部,混匀,厌氧培养箱中 37 ℃ 厌氧培养。

**1.2.1 活菌计数及生长曲线测定。**

**1.2.1.1 双歧杆菌活菌计数**<sup>[6]</sup>。采用 PTYG 培养基及牛奶还原培养基进行双歧杆菌培养,按东北林业大学微生物及免疫学实验室发明的双歧杆菌双层平板计数法进行计数:即将待测的双歧杆菌培养液稀释为原菌浓度的  $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$  倍,将稀释好的菌液 1 ml 加入到灭菌培养皿中;把加热融化后温度降至 40~50 ℃ 的 PTYG 培养基快速倒入培养皿中,用量为 10~20 ml/平皿,混匀,铺成平板;培养基凝固后,再倒入以隔离氧气为目的的保护性覆盖物(溶化后的 PTYG 固体培养基),用量为 10~20 ml/平皿,铺平,静置片刻,待上层培养基凝固,培养 24 h 后开始计数。

**1.2.1.2 双歧杆菌生长曲线的测定**<sup>[7]</sup>。采用每 6 h 计数 1 次,总时长为 60 h。

**1.2.2 双歧杆菌发酵液酸度曲线的测定。**双歧杆菌在不同的生长期其产酸程度不同,用酸度计每 6 h 测定双歧杆菌培养液 pH,绘制曲线。

**1.3 双歧杆菌冻干菌粉的制备** 在冻干工艺中,低温和水分蒸发会对双歧杆菌造成很大伤害。如果直接冷冻双歧杆菌菌液,会使双歧杆菌的活菌数目大幅度下降<sup>[8]</sup>。冻干过程中,加入保护剂对提高活菌数十分重要,筛选出优良的冻干保护剂是制备双歧杆菌冻干菌粉的重要一环。

**1.3.1 单一保护剂的研究。**该试验选用乳糖、可溶性淀粉、

**基金项目** 河北省杰出青年基金项目;河北省高等学校科学研究计划项目(QN20131019);秦皇岛市科学技术研究与发展计划项目(2012022A009);河北科技师范学院科研创新团队项目(CXTD2012-06)。

**作者简介** 张帆(1983-),女,黑龙江齐齐哈尔人,讲师,硕士,从事应用微生物研究。\*通讯作者,副教授,博士,从事生物化学与分子生物学研究。

**收稿日期** 2013-11-20

甘油、谷氨酸、蔗糖、葡萄糖和海藻糖 7 种保护剂作为单一保护剂研究,将其按图 1 所示配制成一定质量浓度的母液<sup>[9]</sup>,见图 1。

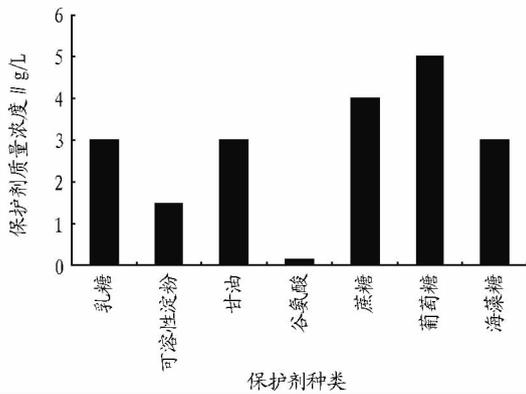


图 1 保护剂母液质量浓度

分别将配制好的各单一保护剂母液加入到 30 ml 双歧杆菌培养液中,作为双歧杆菌冻干菌粉真空冷冻干燥过程中的保护剂,各单一保护剂加入体积及保护剂在菌液中的最终质量浓度见表 1。

表 1 单一保护剂加入体积及最终质量浓度

保护剂种类	双歧杆菌菌液	保护剂加入量	保护剂最终质量
	体积//ml	ml	浓度//g/L
乳糖	30	1	10
		2	20
可溶性淀粉	30	10	50
		20	100
甘油	30	1	10
		3	30
谷氨酸	30	5	2.5
		10	5
蔗糖	30	3	40
		6	80
葡萄糖	30	3	50
		6	100
海藻糖	30	1	10
		2	20
对照	30	0	

**1.3.2 复合保护剂的研究。**根据“1.3.1”选用保护剂得出试验效果较好的 4 种单一保护剂:葡萄糖、海藻糖、甘油和谷氨酸来配制 10 种复合保护剂,提高菌粉的存活率。1~10 号复合保护剂各单一保护剂加入体积及各单一保护剂最终质量浓度见表 2。

**1.3.3 冻干菌粉制备方法<sup>[10]</sup>。**

**1.3.3.1 菌液的培养。**1 ml 双歧杆菌菌液无菌操作接种到 30 ml 牛奶还原培养基中,厌氧培养,37℃,培养 32 h。

**1.3.3.2 加入保护剂。**预先配制的保护剂母液灭菌后,按表 1 所示保护剂体积加入到已培养 32 h 的双歧杆菌牛奶还原培养基培养液中,复合保护剂研究按表 2 所示单一保护剂种类和体积向双歧杆菌培养液中加入复合保护剂。

**1.3.3.3 预冻。**将 2 ml 加入保护剂的双歧杆菌菌液注入到

无菌安瓿瓶中,在 -40℃ 冰箱中预冻。

**1.3.3.4 冻干。**将预冻好的菌液放入超低温真空冷冻干燥机,冷冻干燥 24~32 h 直到成为干粉状。

表 2 复合保护剂质量浓度的选择情况

复合保护剂编号	谷氨酸 (5 g/L) 10 ml	甘油 (10 g/L) 1 ml	葡萄糖 (100 g/L) 6 ml	海藻糖 (10 g/L) 1 ml
1 号	√	√	-	-
2 号	√	-	√	-
3 号	√	-	-	√
4 号	-	√	√	-
5 号	-	√	-	√
6 号	-	-	√	√
7 号	√	√	√	-
8 号	√	√	-	√
9 号	-	√	√	√
10 号	√	-	√	√
11 号(对照)	-	-	-	-

注:表中“√”表示加入该种保护剂及相应体积,“-”表示该试剂未加入。

**1.3.3.5 封口。**无菌操作酒精喷灯把安瓿瓶瓶口的玻璃烧化封口。

**1.3.3.6 冷藏。**装有冻干菌粉的安瓿瓶封口后,-50℃ 冰箱中冷藏,待测。

**1.3.4 双歧杆菌冻干菌粉含水率的测定。**含水率是鉴定冻干菌粉质量的重要指标之一,良好的冻干产品含水率质量分数在 3% 左右。测定该试验双歧杆菌冻干菌粉的含水率:取 10 个安瓿瓶,编号为 1~10,洗净并放置电热鼓风干燥箱中 105℃ 烘至恒重后称其质量为  $m_0$ ;双歧杆菌冻干菌粉真空冷冻干燥后,称其总质量为  $m_1$  (包括安瓿瓶及其内部菌粉的质量);再次烘干装有冻干菌粉的安瓿瓶及其内部菌粉,至恒重,称其质量为  $m_2$ ,则有:

$$\text{冻干菌粉含水率(质量分数)} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0)$$

## 2 结果与分析

**2.1 双歧杆菌培养过程生长曲线分析** 按“1.3.3”所述方法将双歧杆菌培养 32 h 后,采用“1.2.1”中双歧杆菌活菌计数方法每隔 6 h 测定双歧杆菌在培养基中的活菌数,测定时长为 60 h。计数过程中,分别将培养后的双歧杆菌培养液稀释为原浓度的  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  倍,分别取稀释后的菌液浇注平板,每个稀释度浇注 2 个平板,做 3 个平行,分别取平均值记为“第 1 个”、“第 2 个”,根据标准活菌计数法对每 6 h 间隔的双歧杆菌培养液进行计数,得出最终活菌数。根据预试验结果,菌液稀释度选取为合理的 30~300 个可见菌落区间,故 6~18 h 区间选取稀释度为原菌液的  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  倍,24~60 h 选取稀释度为  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  倍。双歧杆菌培养液各生长时间段活菌计数见表 3。

根据表 3 所示数据,以双歧杆菌在牛奶还原培养基中的生长时间为横轴,以双歧杆菌活菌总数为纵轴,绘制生长曲线如图 2 所示。

由图 2 可见,双歧杆菌在牛奶还原培养基中,接入后 6 h

就开始进入对数生长期;在 24 h 后开始进入稳定期;在 30 h 时达到最高;维持一段时间后,在 54 h 后开始大幅度下降。

表 3 双歧杆菌在牛奶还原培养基中培养过程活菌计数

时间 h	序号	菌落数//个					活菌数 CFU/ml
		稀释 10 <sup>-3</sup> 倍	稀释 10 <sup>-4</sup> 倍	稀释 10 <sup>-5</sup> 倍	稀释 10 <sup>-6</sup> 倍	稀释 10 <sup>-7</sup> 倍	
6	1	不可计	203	36	-	-	4.60 × 10 <sup>6</sup>
	2	不可计	10	56	-	-	
12	1	不可计	380	122	-	-	1.30 × 10 <sup>7</sup>
	2	不可计	430	140	-	-	
18	1	不可计	12	232	-	-	1.81 × 10 <sup>7</sup>
	2	不可计	17	131	-	-	
24	1	-	-	不可计	276	25	2.70 × 10 <sup>8</sup>
	2	-	-	不可计	159	29	
30	1	-	-	不可计	不可计	227	2.60 × 10 <sup>9</sup>
	2	-	-	不可计	不可计	287	
36	1	-	-	340	172	15	1.60 × 10 <sup>8</sup>
	2	-	-	390	113	21	
42	1	-	-	250	16	2	1.50 × 10 <sup>8</sup>
	2	-	-	308	15	8	
48	1	-	-	不可计	117	19	1.10 × 10 <sup>8</sup>
	2	-	-	不可计	105	16	
54	1	-	-	不可计	141	14	1.30 × 10 <sup>8</sup>
	2	-	-	不可计	124	24	
60	1	-	-	3	0	0	1.50 × 10 <sup>5</sup>
	2	-	-	0	0	0	

注:表中“-”表示未选取此稀释度,“不可计”表示菌落数目大于 500 个/皿,无法具体计数。

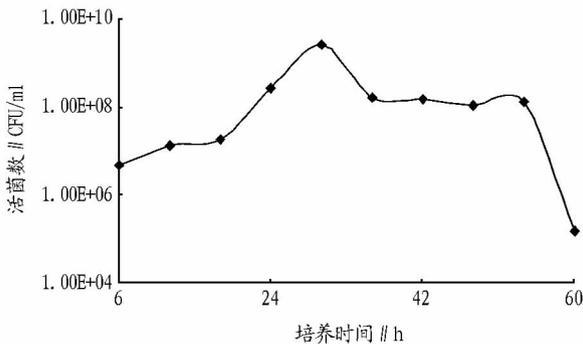


图 2 双歧杆菌生长曲线

2.2 双歧杆菌培养液酸度曲线的分析 双歧杆菌在牛奶还原培养基培养过程中,每隔 6 h 测定发酵液 pH,总测定时间为 72 h,以时间为横轴,以测定双歧杆菌培养液的 pH 为纵轴,绘制双歧杆菌在牛奶还原培养基中的酸度曲线,见图 3。

由图 3 可见,双歧杆菌牛奶培养液酸度曲线在菌体培养 30 h 后趋于平缓,pH 在 4.5 左右,可以推测双歧杆菌正处于稳定生长期的末期。结合表 3 可知,双歧杆菌培养 30 h 后为活菌数最多时期,此时即可获得含双歧杆菌活菌数较多的培养液,故可在双歧杆菌培养 30 h 后终止发酵。

2.3 保护剂对冻干菌粉制备过程的保护作用

2.3.1 单一保护剂对活菌存活率的影响。按“1.2.1”所述双歧杆菌活菌计数法测定双歧杆菌在真空冷冻干燥前后活菌数目的变化,来鉴定单一保护剂对双歧杆菌的保护作用。

由表 4 可见,采用 7 种保护剂,共 14 种处理方法,与不加

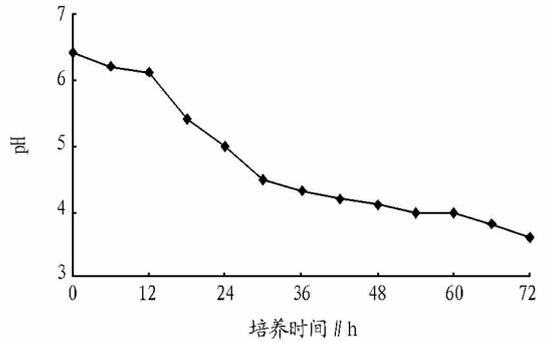


图 3 双歧杆菌发酵液酸度曲线

入保护剂的对照试验相比,每一种保护剂对双歧杆菌的冻干过程均有一定的保护作用,对菌粉存活率的提高都有一定影响。

表 4 真空冷冻干燥前后双歧杆菌活菌数目对照

保护剂种类	保护剂质量	冻干前活	冻干后活	活菌存
	浓度//g/L	菌数//CFU/ml	菌数//CFU/ml	活率//%
乳糖	10	2.2 × 10 <sup>8</sup>	4.9 × 10 <sup>7</sup>	22.27
	20		2.5 × 10 <sup>7</sup>	11.36
可溶性淀粉	50	2.2 × 10 <sup>8</sup>	2.9 × 10 <sup>7</sup>	13.18
	100		3.7 × 10 <sup>7</sup>	16.82
甘油	10	2.2 × 10 <sup>8</sup>	6.2 × 10 <sup>7</sup>	28.18
	30		3.4 × 10 <sup>7</sup>	15.45
谷氨酸	2.5	2.2 × 10 <sup>8</sup>	3.0 × 10 <sup>7</sup>	13.64
	5		7.1 × 10 <sup>7</sup>	32.27
蔗糖	40	2.2 × 10 <sup>8</sup>	1.1 × 10 <sup>7</sup>	5.00
	80		3.6 × 10 <sup>6</sup>	16.36
葡萄糖	50	2.2 × 10 <sup>8</sup>	4.1 × 10 <sup>7</sup>	18.64
	100		7.7 × 10 <sup>7</sup>	35.01
海藻糖	10	2.2 × 10 <sup>8</sup>	5.7 × 10 <sup>7</sup>	25.91
	20		5.1 × 10 <sup>7</sup>	23.18
对照	0	2.2 × 10 <sup>8</sup>	6.1 × 10 <sup>6</sup>	2.70

在所有的保护剂及各种处理中,以 100 g/L 葡萄糖作为保护剂时,活菌存活率最高,为 35.01%;其余按活菌存活率大小依次为 5 g/L 谷氨酸、10 g/L 甘油、10 g/L 海藻糖、20 g/L 海藻糖、10 g/L 乳糖等。

14 种处理中,活菌存活率最低的为加入蔗糖 40 g/L,其活菌存活率是 5.00%,但也要比对照(不加入任何保护剂)的活菌存活率(2.70%)高 1 倍左右;活菌存活率最高的处理比对照高近 13 倍。

2.3.2 复合保护剂对活菌存活率的影响。根据“2.3.1”单一保护剂对双歧杆菌冻干菌粉冻干过程保护作用的比较,选取葡萄糖、海藻糖、甘油和蔗糖来配制 10 种复合保护剂,提高菌粉的存活率,分别命名为 1~10 号复合保护剂。1~10 号复合保护剂各单一保护剂加入体积及各单一保护剂最终质量浓度见表 2。按表 2 加入复合保护剂后,对双歧杆菌培养液进行真空冷冻干燥,并对冻干前后双歧杆菌进行活菌计数,计算其活菌存活率,结果见表 5。

由表 5 可见,复合保护剂与单一保护剂相比,活菌率有明显的提高。10 种复合保护剂的处理中,以 9 号(甘油 + 葡萄糖 + 海藻糖)处理的活菌存活率最高,为 72.09%,比单一

保护剂处理时最好的保护效果 35.01% 提高近 40 个百分点;其次为 10 号(谷氨酸+葡萄糖+海藻糖)65.12%;效果最低的 2 号(12.56%)也比单一保护剂的效果最低的蔗糖(5.00%)提高 1 倍多。

表 5 复合保护剂对活菌率的影响

复合保护剂 编号	冻干前活菌数 CFU/ml	冻干后活菌数 CFU/ml	活菌存活 率//%
1	$4.3 \times 10^7$	$5.9 \times 10^6$	13.72
2	$4.3 \times 10^7$	$5.4 \times 10^6$	12.56
3	$4.3 \times 10^7$	$8.4 \times 10^6$	19.53
4	$4.3 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	30.23
5	$4.3 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$	44.19
6	$4.3 \times 10^7$	$8.7 \times 10^6$	20.23
7	$4.3 \times 10^7$	$8.3 \times 10^6$	19.30
8	$4.3 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	27.91
9	$4.3 \times 10^7$	$3.1 \times 10^7$	72.09
10	$4.3 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$	65.12
对照	$4.3 \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$	3.49

2.3.3 菌粉冻干前后含水量的比较。按照“1.3.4”所示方法对双歧杆菌冻干菌粉冻干前后含水量进行测定,计算出冻干菌粉含水率,结果见表 6。

表 6 双歧杆菌冻干菌粉含水量测量数据

复合保护 剂编号	冻干后烘干前 菌粉质量//g	烘干后菌 粉质量//g	安瓿瓶 质量//g	含水量 g	含水 率//%
1	2.300 1	2.297 3	2.213 1	0.002 8	3.22
2	2.303 5	2.300 4	2.221 6	0.003 1	3.79
3	2.325 8	2.321 9	2.210 8	0.003 9	3.40
4	2.310 7	2.306 7	2.180 1	0.004 0	3.06
5	2.325 2	2.318 5	2.227 5	0.006 7	6.86
6	2.314 9	2.311 2	2.220 7	0.003 7	3.93
7	2.317 5	2.314 0	2.220 4	0.003 5	3.60
8	2.331 6	2.327 9	2.218 5	0.003 7	3.27
9	2.342 0	2.337 1	2.235 3	0.004 9	4.59
10	2.325 7	2.321 2	2.140 6	0.004 5	2.43

由表 6 可见,双歧杆菌冻干菌粉冻干前后含水量发生变化:真空冷冻干燥使菌粉含水量减少,含水率比冻干前有明显降低,冻干 32 h 后,冻干菌粉含水率约为 3% (质量分数)。

### 3 结论与讨论

3.1 双歧杆菌培养的体系 该研究培养双歧杆菌时应用牛奶还原培养基经过 108 °C、10 min 灭菌后,改善了双歧杆菌在其中的生长条件,如杀灭乳中病原菌、排除乳中溶解的氧而降低系统氧化还原电位、产生一些促进生长成分(如甲

酸),以及蛋白质热变性产生更多可利用肽、氨基酸及少量氢硫基化合物等,这些都能促进双歧杆菌的生长繁殖。

双歧杆菌计数时采用 PTYG 培养基,其中含有双歧杆菌生长过程中必需的营养物质,氧化还原电位较低,十分适合双歧杆菌生长,并且在培养皿中用 PTYG 培养基培养双歧杆菌十分便于培养后的计数工作。

双歧杆菌的初生长 pH 接近中性,pH 降低到 4 时,生长缓慢或停止生长。

3.2 双歧杆菌冻干菌粉制备工艺 该试验摸索出双歧杆菌冻干菌粉的生产工艺:活化菌种→接种到牛奶还原培养基→恒温厌氧箱培养→加入保护剂→预冻→真空冷冻干燥→低温冷藏。

双歧杆菌单一保护剂效果试验中,7 种保护剂 14 个处理中,以葡萄糖浓度为 100 g/L 时处理的活菌数最高,活菌百分率可以达到 35.01%,谷氨酸浓度为 5 g/L、甘油浓度为 10 g/L、海藻糖浓度为 10 g/L 时有较好的效果。

9 号复合保护剂(甘油+葡萄糖+海藻糖)可以提高双歧杆菌的活菌数,使活菌百分率由不加保护剂的 3.49%,提高到 72.09%。10 号复合保护剂(谷氨酸+葡萄糖+海藻糖)活菌百分率是 65.12%,比较理想。

预冻温度为 -40 °C,时间 1 h 左右就可以达到预冻的效果。真空冷冻干燥:温度控制在 -60 °C 左右,冷冻干燥 32 h 后,菌粉含水率比冻干前有明显降低,约为 3% (质量分数),对双歧杆菌的妥善保藏十分有益。

### 参考文献

- 丁可,余倩. 双歧杆菌检测方法进展研究[J]. 现代预防医学,2004,31(5):723-727.
- 邵伟,乐超银,熊译,等. 双歧杆菌冻干菌粉制备工艺的研究[J]. 现代食品科技,2008,21(4):54-56.
- COLLINS E B. *Bifidobacteria* in dairy products[J]. *Cultured Dairy Products Journal*,1993,28(4):1620-1627.
- PICOT A, LACROIX C. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures[J]. *International Dairy Journal*,2003,13(6):455-462.
- 杜连祥,赵征. 乳酸菌及其发酵制品生产技术[M]. 天津:天津科学技术出版社,1999.
- 张秋实.“威特四联”中需气菌活菌计数用培养基的改进[J]. 中国现代应用药学杂志,2000(1):54-55.
- 李妍,赵文静,高鹏飞,等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 增殖培养基的优化[J]. 微生物学通报,2009,36(2):181-186.
- 叶晴. 用真空冷冻干燥法保存微生物菌株[J]. 现代科学仪器,2000(4):19-20.
- 刘丽凤,孟祥晨. 双歧杆菌的冻干损伤及保护[J]. 中国乳品工业,2006,34(1):39-43.
- 谭海运. 高活性双歧杆菌菌粉的研制[J]. 西藏农业科技,2005,27(3):32-37.
- 关新强. 鲜切果蔬的微生物控制[J]. 新疆化工,2004(3):51-53.
- 范梅华,张建华,窦新红. 食品安全不只是为了奥运[J]. 中国乳业导刊,2008,25(16):2-5.
- 张超英,鲁晓晴,腾洪松. 食醋杀灭细菌的性能及效果观察[J]. 齐鲁医学杂志,2007,22(3):196-198.
- DB31195-2007. 上海市地方标准. 色拉卫生标准[S]. 2007.
- 黄新章. 部分蔬菜的冷藏条件和贮藏期[J]. 北方园艺,1991(9):32.
- 王立斌,戴昌芳,辜少虹,等. HACCP 在无酱料蔬菜色拉微生物控制中的应用[J]. 华南预防医学,2004,30(3):47-50.
- 郭永昌. 浅析加热杀菌与肉制品质量[J]. 肉类工业,1996(9):30-31.
- 宋曼丹,何冬梅,杨冰,等. 广东省色拉类食品微生物污染情况调查分析[J]. 华南预防医学,2006,32(4):65-67.

(上接第 13751 页)