

乳酸菌发酵对鸡骨泥钙释放及代谢物的影响

王明, 夏强, 孙杨赢, 何俊, 潘道东, 曹锦轩, 周昌瑜

Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Calcium Release and Metabolites in Chicken Bone Paste

WANG Ming, XIA Qiang, SUN Yangying, HE Jun, PAN Daodong, CAO Jinxuan, and ZHOU Changyu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050133>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

不同乳酸菌对葡萄醇素发酵特性及代谢产物的影响

Effects of Different Lactic Acid Bacteria on Fermentation Characteristics and Metabolites of Grape Jiaosu

食品工业科技. 2021, 42(17): 120-128 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110244>

富集钙乳酸菌的筛选及培养条件对富集效果的影响

Screening of Calcium-enriched Lactic Acid Bacteria and the Effect of Culture Conditions on Calcium-enriched

食品工业科技. 2021, 42(8): 125-132 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070123>

基于代谢组学分析工夫红茶发酵过程中代谢物的变化

Metabolomics Analysis of Changes in Metabolites During the Fermentation Process of Congou Black Tea

食品工业科技. 2021, 42(21): 8-16 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030361>

定量代谢物组学研究硫酸铵添加对高产红色糖多孢菌生理代谢的影响

Impacts of Ammonium Sulfate Addition on Physiological Metabolism of High-yielding *Saccharopolyspora erythraea* Based on Quantitative Metabonomics

食品工业科技. 2020, 41(23): 91-98 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020269>

海藻乳酸菌发酵的研究进展

Research Progress of Seaweed Fermentation with Lactic Acid Bacteria

食品工业科技. 2021, 42(16): 381-387 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020080144>

8种乳酸菌发酵荔枝汁-大豆蛋白的氨基酸代谢特征研究

Study on Amino Acid Metabolism Characteristics of Litchi Juice-Soybean Protein Fermented by Eight Lactic Acid Bacteria

食品工业科技. 2020, 41(23): 106-113 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030015>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王明, 夏强, 孙杨赢, 等. 乳酸菌发酵对鸡骨泥钙释放及代谢物的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 67-75. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050133

WANG Ming, XIA Qiang, SUN Yangying, et al. Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Calcium Release and Metabolites in Chicken Bone Paste[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 67-75. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050133

· 研究与探讨 ·

乳酸菌发酵对鸡骨泥钙释放及代谢物的影响

王明, 夏强, 孙杨赢, 何俊, 潘道东, 曹锦轩*, 周昌瑜*

(宁波大学食品与药学学院, 浙江省动物蛋白精深加工重点实验室, 浙江宁波 315211)

摘要: 本研究以鸡骨为原料, 研究了嗜酸乳杆菌 (LA)、罗伊氏乳杆菌 (LR) 和植物乳杆菌 (LP) 作为发酵剂对鸡骨泥中钙释放及代谢物的影响, 通过监测菌株的生长状态、发酵液的 pH、总酸变化、钙分布和钙磷比、代谢物种类及含量揭示乳酸菌的生长特性变化及其对钙释放的影响, 并借助主成分分析、相关性分析以及 KEGG 代谢通路分析挖掘乳酸菌发酵骨泥的关键代谢通路。结果表明, LA、LR 和 LP 均能较好的利用鸡骨泥进行生长繁殖, 且在发酵 30 h 时活菌数达最大值, LA、LP 和 LR 发酵组的总酸含量分别为 5.60、3.76 和 3.75 g/L, LA 发酵组的总酸含量显著高于其他处理组 ($P < 0.05$)。钙释放分析表明, LR 组、LP 组和 LA 组总钙含量分别从 181.33 mg/kg (对照组) 上升至 1176.67、1310.00 和 1916.67 mg/kg; 游离钙含量分别是对照组的 40.60、50.19 和 74.62 倍, 且 LA 发酵组的游离钙含量显著高于 LP 和 LR 发酵组 ($P < 0.05$)。X 射线衍射和红外光谱结果表明, 发酵骨泥中羟基磷灰石主要以无定型形态存在, 与对照组相比, LR 组、LP 组和 LA 组中羟基磷灰石的特征峰在 2926 和 1050 cm^{-1} 处的强度明显降低。LC-MS/MS 结果显示, 乳酸菌发酵后骨泥中共鉴定出 37 种代谢物, PCA 和相关性分析代谢物的特征发现, 乳酸、丙酮酸、蔗糖、丝氨酸、5'-CMP 等是其关键代谢物。KEGG 代谢物通路分析表明, 嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、糖酵解、丙酮酸代谢、牛磺酸代谢和 TCA 循环是其主要代谢通路, 这些代谢通路主要与乳酸菌的生长以及骨泥中钙释放密切相关。

关键词: 鸡骨泥, 乳酸菌, 钙释放, 代谢组学, 代谢物

中图分类号: TS251.94

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)06-0067-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050133



本文网刊:

Effects of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Calcium Release and Metabolites in Chicken Bone Paste

WANG Ming, XIA Qiang, SUN Yangying, HE Jun, PAN Daodong, CAO Jinxuan*, ZHOU Changyu*

(College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Key Laboratory of Animal Products Food Deep Processing Technology of Zhejiang Province, Ningbo 315211, China)

Abstract: The effects of *Lactobacillus acidophilus* CICC6074 (LA), *Limosilactobacillus reuteri* WQ-Y1 (LR) and *Lactiplantibacillus plantarum* A3 (LP) on calcium release and metabolite composition during the fermentation of chicken bone paste were studied using chicken bone as raw materials. The growth characteristics of lactic acid bacteria (LAB) strains, pH changes, total acidity variations, calcium distribution and calcium-to-phosphorus ratio, composition and content of metabolites were investigated to reveal the effect of the growth of LAB on calcium release during the fermentation of chicken bone paste. Principal component analysis (PCA), correlation analysis, and KEGG metabolic pathway analysis were further employed to identify the key metabolic pathways during the fermentation of chicken bone paste. The results showed that, LA, LR and LP strains were able to effectively utilize chicken bone paste for growth and proliferation, and the maximum viable cell count was observed at 30 h during the fermentation processing. The total acidity contents of LA, LP and LR

收稿日期: 2023-05-12

基金项目: 国家自然科学基金 (32101975); 浙江省自然科学基金 (LQ22C200017)。

作者简介: 王明 (1995-) (ORCID: 0009-0000-5783-0468), 男, 硕士, 研究方向: 畜产品加工与质量控制, E-mail: wangming_nbedu@163.com。

* 通信作者: 曹锦轩 (1982-) (ORCID: 0000-0002-6811-7796), 男, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工与质量控制, E-mail: caojinxuan@nbu.edu.cn。

周昌瑜 (1990-) (ORCID: 0000-0002-7638-8609), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 畜产品加工与质量控制, E-mail: zhouchangyu@nbu.edu.cn。

groups were 5.60, 3.76, and 3.75 g/L respectively, significantly higher total acidity content was shown in LA group compared to other treatment groups ($P < 0.05$). Calcium release analysis revealed that the total calcium content increased from 181.33 mg/kg of control group to 1176.67 mg/kg of LR, 1310.00 mg/kg of LP, and 1916.67 mg/kg of LA, respectively. The free calcium content of LA, LP and LR groups was 40.60, 50.19, and 74.62 fold-time higher than that of control group, and the free calcium content of LA group was significantly higher compared to LP and LR groups ($P < 0.05$). X-ray diffraction and infrared spectroscopy results indicated that hydroxyapatite of bone paste mainly existed in an amorphous form. The intensity of characteristic peaks of hydroxyapatite at 2926 and 1050 cm^{-1} significantly decreased among LR, LP and LA groups compared to control group. LC-MS/MS analysis demonstrated that 37 metabolites were identified in the fermented bone paste. Principal Component Analysis (PCA) and correlation analysis revealed that lactic acid, pyruvate, sucrose, L-serine, and 5'-CMP were the key metabolites of fermented bone paste. KEGG metabolic pathway analysis indicated that pyrimidine metabolism, arginine and proline metabolism, glycolysis, pyruvate metabolism, taurine and hypotaurine metabolism, and tricarboxylic acid (TCA) cycle were the main metabolic pathways associated with lactic acid bacteria growth and calcium release during the fermentation of bone paste.

Key words: chicken bone paste; lactic acid bacteria; calcium release; metabolomics; metabolites

中国是畜禽产品生产大国,2022年全国猪牛羊禽屠宰产量达9227万吨,且呈逐年增长趋势^[1]。骨架是屠宰畜禽后的主要副产物之一,含有人体所需的氨基酸、维生素以及矿物质等。骨架中钙磷比约为2:1^[2],与人体最佳吸收比例相当,可作为天然钙源。猪牛羊骨架有80%以上用于生产煲汤类食品原料^[3],而禽类骨架则被视为废弃物大量丢弃^[4]。这不仅造成资源的浪费,而且对环境造成严重污染。因此,开发高值化利用禽骨的有效技术十分必要。

尽管生物兼容性与人体骨骼中钙形态非常类似,但动物骨中的钙以羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAP)形式存在,无法被人体直接利用^[5]。目前,通常采用酸解法和酶解法等方法溶出骨骼中的可溶性钙,实现动物骨架回收。酸解法是利用强酸破坏骨胶原中的三螺旋结构,使HAP裸露出来。然后,酸进一步与羟基磷灰石作用,将骨钙转化为可溶性钙^[6]。但酸解法通过破坏骨胶原高级结构进一步释放磷酸钙在中性或碱性条件下溶解度不高,而人体对钙的吸收主要发生酸碱环境呈中性的小肠中,不利于人体的吸收。酶解法则是利用蛋白酶对骨胶原纤维的分解作用释放骨钙。然而,酶解法仅能作用于动物骨中的胶原纤维,骨钙的转化效果十分有限,仅为1/6^[7],仍有大量骨胶原蛋白和以骨矿形式的钙磷存在于骨渣中,且酶解易使酶解液产生苦味肽,使酶解液呈苦味,不利于后期的开发利用^[8]。

生物发酵法可通过微生物发酵作用促使骨泥中钙的释放^[9]。乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是一类能够利用碳水化合物发酵产生乳酸的细菌微生物,已有研究表明乳酸菌发酵得到的钙离子含量显著高于蛋白酶酶解得到的,并且发酵后的胶原蛋白可以被降解成小分子肽,更加有利于人体的吸收。闫凜等^[8]利用植物乳杆菌发酵羊骨液发现钙离子的释放与植物乳杆菌的活菌数呈极显著正相关。唐勇等^[10]利用乳酸菌发酵猪骨显著提升了骨架HAP中游离钙释放。鸡骨中蛋白质与脂肪的含量高于猪牛羊骨而灰分更低,具有更高的营养价值^[11]。然而当前研究中,

乳酸菌发酵鸡骨泥释放钙的代谢机理尚未被研究。

因此,本研究构建了乳酸菌与鸡骨泥的发酵体系,定量分析发酵产物中钙释放量及其形态分布、代谢产物组成及其含量变化,并通过多元统计和KEGG分析乳酸菌代谢通路,旨在揭示骨泥发酵过程中乳酸菌的代谢与钙释放的关联途径。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

新鲜鸡骨架(骨上附少量鸡肉) 冷冻运输至实验室,河南大用实业有限公司;木瓜蛋白酶(2000 U/mg)、六偏磷酸钠、溴化钾、盐酸、氢氧化钠、蔗糖均为分析级,生工生物工程有限公司;甲酸、乙腈均为色谱级,美国Fisher Chemical公司;MRS培养基 青岛海博生物技术有限公司;RIPA细胞裂解液(强) 碧云天生物技术有限公司;其他试剂均为分析纯;实验用水均为超纯水;植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum* A3, LP)、罗伊氏乳杆菌(*Limosilactobacillus reuteri* WQ-Y1, LR)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus* CICC6074, LA)均由浙江省动物蛋白食品加工技术重点实验室菌种库保存。

QM-3SP2 双行星球磨机 南京南大仪器有限公司;Five Easy Plus 20 酸碱 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SCIENTZ-IIID 超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司;Allegra 64R 高速冷冻台式离心机 美国贝克曼库尔特有限公司;喷雾干燥机 上海派勒克仪器设备有限公司;ACQUITY UHPLC 系统 美国沃特世公司;三重TOF 5600 MS Xevo G2-XSQ-TOF 美国沃特世公司;ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 美国沃特世公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鸡骨粉的制备 参考Zuo等^[12]的方法并稍做修改:去除鸡骨架上的肉、血、脂肪和骨膜后,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 15 min,冷却后重新洗净骨头以去除脂肪和

肉。然后将磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH=7)以质量比 3:1 的比例加入骨块中制备骨液。在骨液中加入木瓜蛋白酶(5000 U/g), 50 °C 恒温水浴中酶解 4 h, 煮沸 10 min 使酶失活, 再次清洗以去除鸡骨表面的蛋白油脂等。将骨块放入 60 °C 烘箱中干燥 12 h 后, 使用粉碎机粉碎再过 200 目筛, 用双行星球磨机研磨 2.5 h, 其中镉珠、骨粉与水的质量比为 10:1:3。研磨后的骨颗粒在喷雾干燥机中干燥, 得到鸡骨粉。

1.2.2 发酵鸡骨泥及冻干样品的制备 鸡骨泥培养基的制备: 将鸡骨粉、蔗糖与水按质量比 5:7:88 混合, pH 调至 6.5, 121 °C 灭菌 20 min 后, 冷却至室温制备成骨泥培养基。

鸡骨泥发酵液的制备: 取活化后的 LP、LR、LA 菌液 3 mL 分别接种到 100 mL 鸡骨泥培养基中, 空白组加 3 mL 灭菌后的 MRS 培养基记为 CK, 38 °C 下发酵。

发酵骨泥冻干样品制备: 取发酵完成的骨泥发酵液离心(300×g, 4 °C, 5 min)后收集沉淀物, 用去离子水反复洗涤三次, 冻干后制成发酵骨泥样品, -40 °C 保存备用。

1.2.3 生长曲线的测定 分别取发酵 0、12、24、30、36、42、46、50 和 54 h 的鸡骨泥发酵液, 用无菌生理盐水梯度稀释, 选取适宜的梯度, 在 MRS 固体培养基上进行涂布, 38 °C 恒温恒湿培养 24 h, 记录活菌菌落数, 单位为 CFU/mL, 并绘制生长曲线。

1.2.4 乳酸菌发酵骨泥液 pH 和总酸度的测定 取 5 mL 发酵过程中的鸡骨泥液, 使用酸碱 pH 计测定 pH; 参考 Xu 等^[13]的方法对发酵液的总酸度进行测定。

1.2.5 钙的分布和含量的测定 取发酵完成的鸡骨泥发酵液, 离心(300×g, 4 °C, 5 min)后保留上清液, 得到发酵液 A, -4 °C 冷藏备用。取发酵液 A 经离心(4000×g, 4 °C, 20 min)后, 将上清液通过 0.22 μm 的水相滤膜以去除菌体及其他难溶性物质得到去菌体发酵液 B。取 10 mL 发酵液 A 于试管中, 加入细胞裂解液 500 μL, 混匀后在冰浴中超声波(350 W, 20 min, 5 pulse)破碎, 使细胞内容物释放到发酵液中, 离心(10000×g, 4 °C, 20 min)后经过 0.22 μm 水相滤膜过滤得到发酵液 C, 使用火焰原子吸收光谱法^[14]分别测定发酵液 A 中的总钙含量 ω , mg/kg; 发酵液 B 为乳酸菌胞外钙含量 ω_1 , mg/kg; 发酵液 C 游离态钙含量 ω_2 , mg/kg; 计算化合态钙含量 $\omega_3 = \omega - \omega_2$ ^[15]。

1.2.6 发酵骨泥的能量色散光谱(Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)表征 利用能量色散光谱仪对发酵骨泥冻干样品进行点扫。取每个样品的不同位置测量钙和磷含量, 计算平均钙磷比率和标准偏差。

1.2.7 发酵骨泥的傅里叶变换红外光谱(Fourier Transform infrared spectroscopy, FT-IR)表征 取发

酵骨泥冻干样品与 KBr 按 1:50 的比例混合研磨, 压成薄膜, 并在波长为 4000~400 cm^{-1} 范围之间进行傅里叶红外光谱扫描。

1.2.8 发酵骨泥的 X-射线衍射(X-ray diffractometer, XRD)表征 采用 X 射线衍射仪测定发酵骨泥冻干样品的相对结晶度。测试条件为电压 40 kV, 管流 20 mA, 扫描区域 20°~36°, 扫描速度为 2°/min。

1.2.9 发酵骨泥产物质谱分析 样品的前处理^[16]: 取 10 mL 骨泥发酵液, 离心(4000×g, 4 °C, 5 min)后收集上清液并通过 0.22 μm 滤膜。取 5 mL 上述滤液于 EP 管中, 加入 20 μL 内标(1000 ng/mL 水杨酸溶液)混匀后, 转移至 LC 进样小瓶, 进行 LC-MS/MS 分析。

液相色谱和质谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱; 柱温为 45 °C; 流速为 0.4 mL/min; 流动相为 0.1% 甲酸(A)和含 0.1% 甲酸的乙腈(B)的混合物。色谱梯度程序: 0~2 min (A:B=98:2)、2~4 min(A:B=75:25)、4~7.5 min (A:B=40:60)、7.5~9.5 min(A:B=10:90)、9.5~12.7 min(A:B=1:99)、12.7~16 min(A:B=98:2); 扫描范围为 50~1000 m/z。

1.3 数据处理

使用 IBM SPSS 软件包(Version 25.0)对实验数据进行统计分析, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著。质谱原始数据使用 Progenesis QI(Version 2.3)处理并对比代谢组学数据库(HMDB, <https://www.hmdb.ca/>)和 Chemspider 数据库(<https://www.chemspider.com/>)进行匹配获得代谢物信息。通过聚类分析和 PCA 分析确定差异代谢物。查找通路数据库(<https://www.metaboanalyst.ca/>)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.kegg.jp/>)数据库确定差异代谢富集的代谢通路。

2 结果与分析

2.1 骨泥中菌落生长曲线、pH 及总酸变化

生长曲线反映了细菌数量、生长状况和代谢情况。如图 1A 所示, LP、LR 和 LA 的活菌数在 0~12 h 呈对数型增长, 12 h 后趋于平稳, 生长速度放缓, 进入稳定期; LA 组和 LR 组的活菌数在 12~30 h 保持相对稳定, 发酵 30 h 后逐渐下降, 而 LP 组的活菌数在 12~50 h 保持相对稳定, 发酵 50 h 后逐渐下降。在三个接菌处理组中, LA 处理组在发酵 24、30、36 h 时活菌数量极显著高于 LP 和 LR 处理组 ($P < 0.01$), 在发酵 30 h 时, LP、LR 和 LA 活菌数均达到最大值, 分别为 22.7、28.5 和 33.2×10⁷ CFU/mL; 而在整个发酵过程中 LP 处理组的活菌数极显著低于 LA 和 LR 处理组 ($P < 0.01$)。发酵过程的 pH 和总酸能反映乳酸菌的产酸能力以及菌体耐受能力变化。如图 1B 所示, 鸡骨泥发酵液初始 pH 约为 6.1,

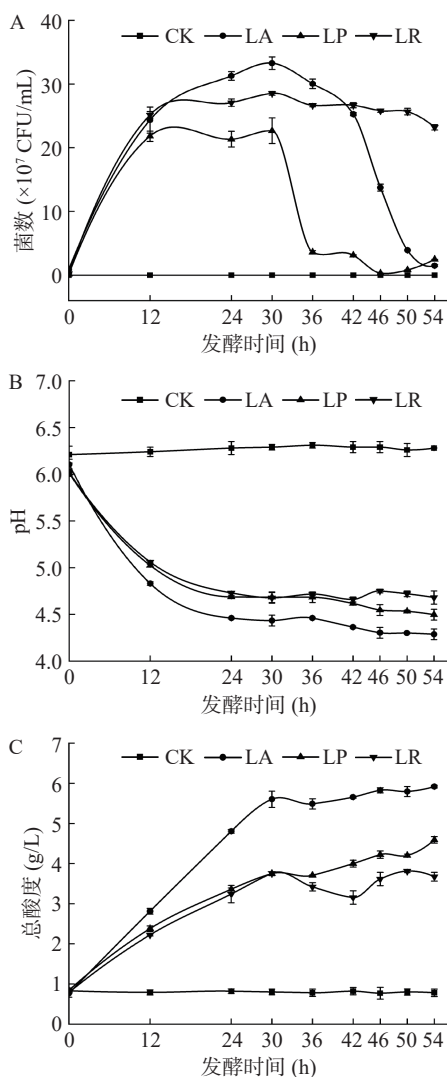


图1 乳酸菌的生长曲线(A)以及发酵过程中pH(B)和总酸(C)的变化

Fig.1 Growth curve of lactic acid bacteria (A), and the changes in pH (B) and total acid (C) during bone paste fermentation

在0~30 h的发酵期间,3个接菌处理组在发酵过程中pH均下降,30 h后逐渐稳定;在发酵第30 h时LA组、LP组、LR组的pH分别为4.43、4.68和4.67,LA组pH最低说明LA产酸能力最强。如图1C所示,3个接菌处理组的发酵液初始总酸含量为0.81 g/L,在0~30 h内,随着发酵的进行,总酸含量迅速增加,30 h后逐渐稳定;发酵30 h时,LA、LP和LR处理组的总酸含量分别为5.60、3.76和3.75 g/L,其中LA组的总酸含量显著高于LP组和LR组($P < 0.05$)。以上结果说明三株乳酸菌均能较好的利用骨泥进行生长繁殖并产生酸类物质,且嗜酸乳杆菌在骨泥中的生长繁殖能力和产酸能力优于罗伊氏乳杆菌和植物乳杆菌。

骨中含有丰富的矿物质和胶原蛋白,为乳酸菌的生长和繁殖提供了必要的营养物质^[17];而蔗糖可为乳酸菌提供能量^[18]。在本研究中,三株乳酸菌的最大活菌数均超过了 10^8 CFU/mL,说明乳酸菌能够利用骨泥中的营养物质进行生长繁殖并呈现良好的产酸

能力和耐酸性。在发酵过程中,乳酸菌发酵产生的代谢物也会影响乳酸菌的活力;随着发酵的进行,底物逐渐消耗、代谢产物不断积累、总酸含量升高、pH下降,从而使得乳酸菌的生长繁殖受到抑制,发酵逐渐进入后期阶段^[19]。在发酵期间,三个处理组的pH逐渐降低、总酸含量不断上升;在30 h时,pH和总酸含量趋于稳定,且活菌数达到最大值,因此,以30 h作为发酵终点,进行后续理化指标分析。

2.2 骨泥液中钙分布、钙形态以及钙磷比分析

三株乳酸菌发酵骨泥的钙分布如图2A所示,发酵完成时(30 h),LP、LR和LA处理组的总钙含量都显著高于CK组($P < 0.05$)。与CK组相比,LR组、LP组和LA组总钙含量分别从CK组中181.33 mg/kg

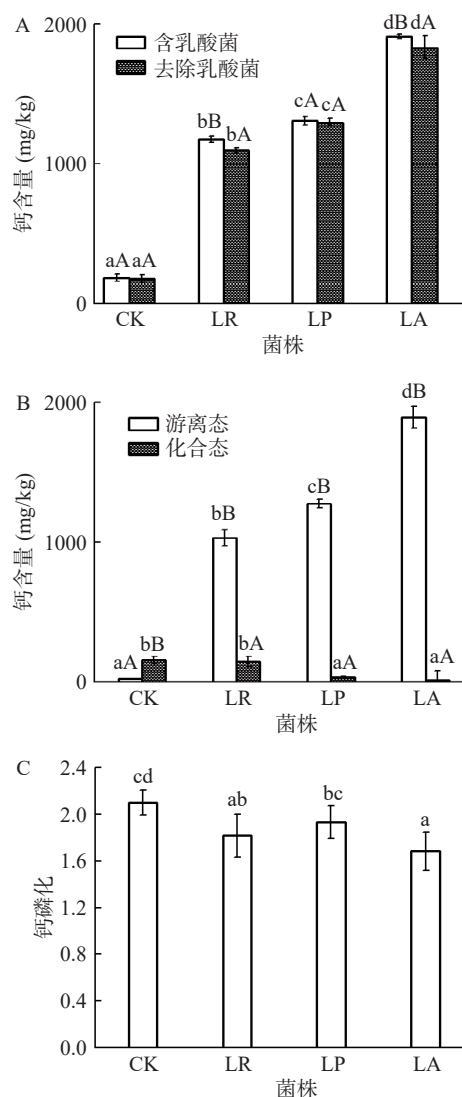


图2 乳酸菌发酵骨泥液中的钙分布(A)、钙形态(B)及发酵骨泥钙磷比(C)

Fig.2 Calcium distribution (A), calcium morphology (B) and calcium-phosphorus ratio (C) of fermented bone paste

注:图2A与图2B中不同小写字母表示相同处理下不同乳酸菌发酵后钙含量差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示相同乳酸菌发酵下不同形态的钙含量间差异显著($P < 0.05$);图2C中不同小写字母表示不同实验组间的钙磷比显著差异($P < 0.05$)。

上升至 1176.67、1310.00 和 1916.67 mg/kg。在 LA 组和 LR 组中, 去除骨泥中乳酸菌菌体后, 总钙含量显著下降 ($P < 0.05$), 说明这两株乳酸菌具有一定的富集钙的能力。骨泥发酵液中不同形态的钙含量如图 2B 所示, 三个处理组的游离钙含量均显著高于 CK 组 ($P < 0.05$); CK 组中游离钙含量为 25.37 mg/kg, LR 组、LP 组和 LA 组游离钙含量分别是 CK 组的 40.60 倍、50.19 倍和 74.62 倍。相比较于 CK 组, LR 组中化合态的钙含量无显著差异, 而 LA 组和 LP 组的化合态钙含量低于 CK 组 ($P < 0.05$)。在 3 个处理组中, 游离钙含量均显著高于化合态钙含量 ($P < 0.05$), 说明游离钙是骨泥发酵液中主要存在形态, 其中 LA 组中游离钙含量 (1893.33 mg/kg) 显著高于其他处理组。发酵骨泥钙磷比如图 2C 所示, 相比于 CK 组 (2.10 ± 0.11), LA (1.68 ± 0.17) 和 LR (1.82 ± 0.19) 组的钙磷比值显著降低 ($P < 0.05$), 这可能是由于乳酸菌的发酵使得骨泥中化合态的钙转变为游离钙。这些结果表明, 经过乳酸菌的发酵, 溶液中的游离钙浓度显著升高, 且嗜酸乳杆菌钙释放能力最强。

乳酸菌可通过发酵作用分解骨泥来释放游离钙^[20]。本研究中, 各处理组的总钙含量和游离钙含量在发酵完成时均显著高于 CK 组 ($P < 0.05$), 其中 LA 组总钙含量和游离钙含量最高, 分别为对照组的 10.57 倍和 74.62 倍, 其主要原因可能是 LA 产酸能力最强, 能分解更多 HAP^[21]。此外, 相比于 CK 组, LP 组和 LA 组在发酵完成时的化合态的钙显著下降 ($P < 0.05$), 可能是因为骨泥中化合态的钙等经过发酵转化为游离钙^[9]。钙磷比结果表明, LP、LR 和 LA 组骨泥样品表面的 Ca/P 比值由 CK 组的 2.10 分别下降至 1.93、1.82 和 1.68, 这进一步表明了发酵使得骨粉中的磷酸钙转变为游离钙。综上所述, 鸡骨泥液中钙的相对含量降低, 而游离钙含量增高, 说明乳酸菌通过产酸使鸡骨中的 HAP 分解, 使得钙释放到骨泥发酵液中。

2.3 傅里叶红外光谱与 X 射线衍射图谱分析

傅里叶红外光谱可以作为识别鸡骨泥中化学键和官能团特征变化的工具^[22]。红外光谱如图 3A 所示, 与 CK 组相比, LA 组、LR 组和 LP 组在 3379、2926 和 1050 cm^{-1} 波段处的特征带峰强度减弱, 在 1109 cm^{-1} 波段出现新吸收峰, 其中 LA 组在 1645 cm^{-1} 特征峰红移至 1593 cm^{-1} 处, 这可能是由于发酵使得鸡骨泥的官能团发生了改变^[23]。图 3B 为处理组和对照组骨泥样品的 X 射线衍射图谱, 对比 JCPDS 卡号 09-0432 可知, 所有的样品中 HAP 都以无定型态形式存在。相比于 CK 组, 在衍射角 $2\theta = 23.8^\circ$ (米勒指数 111), LA 组衍射峰度降低, LP 组与 LR 组特征峰分别蓝移至 23.4° 和 23.2° 处; LA 组在衍射角 $2\theta = 25.8^\circ$ (002) 和 $2\theta = 32.0^\circ$ (211) 处较 CK 组的衍射峰变小、变宽。这些结果表明乳酸菌发酵使得鸡骨泥发生了化学结构变化。

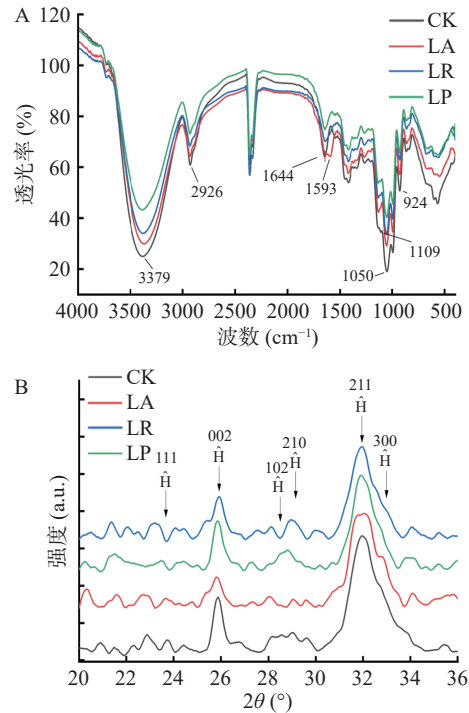


图 3 发酵骨泥的红外光谱(A)及 X 射线衍射图(B)

Fig.3 FT-IR (A) and XRD patterns (B) of fermented bone paste

红外光谱中, 在 3379、2926 和 1050 cm^{-1} 波段处的吸收峰分别与 O-H、P-O 和 PO_4^{3-} 有关。本研究中, 相比于 CK 组, 处理组位于 3379 cm^{-1} 峰强度减弱可能归因于乳酸菌发酵使得骨中结合水减少^[24]; 2926 和 1050 cm^{-1} 波段吸收强度减弱可能由于乳酸菌发酵作用使得 HAP 分解从而促进钙的释放; 位于 1109 cm^{-1} 处的特征峰与 P=O 有关, 三组实验组在此处产生新的峰值, 可能是由于 HAP 在分解过程中产生了新的含磷化合物。位于 1600~1700 cm^{-1} 处的特征峰主要由 C=O (酰胺 I 带) 的拉伸振动产生, 这与蛋白质的二级结构变化有关^[25], 与 LR 和 LP 相比, LA 组在 1645 cm^{-1} 发生红移现象, 这可能是发酵酶解作用使得鸡骨胶原蛋白分解, 促进了羟基磷灰石进一步分解, 从而释放更多离子钙。X 射线衍射中, 峰型的尖锐程度可反映 HAP 结晶度大小^[26]。图 3B 中, 整个光谱较粗糙, 未出现完整的晶形结构, 说明发酵底物呈无定形态^[27]。衍射角 $2\theta = 23.8^\circ$ 处, 相比于 CK 组, LA 组峰度值降低, LP 组和 LR 组在衍射峰发生蓝移, 说明由于乳酸菌发酵使 HAP 分解, 晶相纯度降低, 即发酵产生的酸中大量质子置换出了钙, 衍射峰减弱; 与其他三组相比, LA 组在 $2\theta = 25.8^\circ$ 与 $2\theta = 32.0^\circ$ 处的衍射峰降低, 说明 LA 组骨钙中 HAP 晶相变化最大, 推测 LA 组发酵作用释放出更多可溶性钙。Sharma 等^[28] 将二氧化钛掺杂纯度较高的 HAP 后发现, HAP 中的钙被钛取代纯度降低, 其 XRD 图谱也发生衍射峰偏移, 峰值变低。以上结果表明, 经乳酸菌发酵后, 骨泥中化合物的官能团发生改变, HAP 晶相结晶度降低, 钙的化学形态发生改变, 发酵

体系中游离钙含量增大。

2.4 主成分分析 (PCA)、聚类热图分析以及代谢通路分析

采用 LC-MS/MS 对发酵骨泥中的小分子物质进行分析,共鉴定到 37 种发酵代谢物。主成分 (PCA)分析这些代谢物在不同处理间的特征发现,如图 4A 可知 PCA 共产生三个有效主成分,其中第一主成分 (PC1)、第二主成分 (PC2)和第三主成分 (PC3)特征值分别为 25.61、7.65 和 1.93,方差贡献率分别为 69.2%、20.7% 和 5.2%,累计贡献率为 95.13%,表明前 3 个主成分有效区分了不同处理组间发酵骨泥代谢物的特征;PCA 图显示,LP、LA、LR 组与 CK 组完全分开,说明各处理组中代谢物的组成或含量与 CK 组存在显著差异。分析贡献 PCA 模型前三个主成分的贡献因子发现丙酮酸 (Pyruvate)、CDP、核糖核酸(Riboxin)、5'-CMP 和木酮糖 (L-Xylulose)是 PC1 的重要贡献因子;胸苷 (Thymidine)、瓜氨酸 (Citrulline)、脱氧肌苷 (Deoxyinosine)、丝氨酸(L-Serine)、天冬氨酸(L-Aspartic Acid)、5-羟基-L-色氨酸 (5-Hydroxy-L-tryptophan)、精氨酸(L-Arginine)、精氨酸磷酸盐(L-Arginine phosphate)、胞苷(Cytidine)和乳酸(Lactic acid)是 PC2 的重要贡献因子;甲酰基-5-羟基犬尿胺 (Formyl-5-hydroxykynurenine)、L-甲酰基犬尿氨酸(L-Formylkynurenine)、蔗糖(Sucrose)、dTMP 和乳清酸核苷(Orotidine)是 PC3 的重要贡献因子。为了更清楚地呈现这些贡献因子在不同处理组间的差异变化,贡献主成分分析中前三个主成分的代谢物的聚类热图如图 4B 所示,CK 组的样本聚集为一大类,三个处理组的样本聚集为另一大类,这与主成分分析的结果一致。相比于 CK 组,三个处理组中木酮糖和蔗糖的含量显著下降($P<0.05$),而丙酮酸和乳酸的含量显著增加($P<0.05$);相比于 CK 组,三个处理组中游离氨基酸及衍生物如丝氨酸和 5-羟基-L-色氨酸显著增加,而精氨酸、精氨酸磷酸盐、5'-CMP、dTMP

和乳清酸核苷等显著下降($P<0.05$)。PCA 分析和聚类热图分析共同表明,有机酸、游离氨基酸、糖类物质和核苷类物质是影响乳酸菌发酵骨泥重要代谢物。

为了进一步了解发酵骨泥中关键代谢物与乳酸菌的生物活性和发酵性能的关系,将关键代谢产物与乳酸菌的活菌数、pH、总酸度值以及游离钙含量进行相关性分析($r>0.5$ 或 <-0.5 , $P<0.05$)。如图 5 所示,有机酸(丙酮酸和乳酸)、核苷类物质(核糖核酸、脱氧肌苷、CDP 和胞苷)和氨基酸(丝氨酸、瓜氨酸)等与活菌数呈显著正相关($P<0.05$),糖类(蔗糖和木酮糖)、核苷类物质(5'-CMP、dTMP 和乳清酸核苷)和氨基酸(精氨酸)等与活菌数呈显著负相关 $P<0.05$);有机酸(乳酸和丙酮酸)、核苷类物质(核糖核酸、脱氧肌苷、CDP 和胞苷)和氨基酸(丝氨酸、瓜氨酸)等与游离钙含量呈显著正相关 $P<0.05$),糖类(乳酸和丙酮酸)、核苷类物质(5'-CMP 和乳清酸核苷)和氨基酸(精氨酸)等与钙释放量呈显著负相关 $P<0.05$)。这表明三株菌可以利用糖类物质发酵骨泥促进酸类物质的产生,从而促进游离钙的释放。

将上述差异代谢物导入至 KEGG 数据库进行匹配,获取发酵过程中关键代谢物参与的代谢通路信息,进而评估关键代谢物的来源及其对钙释放的影响。如图 6 所示,通过通路影响因子 >0.08 和 $P<0.05$ 对代谢通路进行筛选发现,三个处理组(LA、LR、LP)的差异代谢物所富集到的代谢通路相似,主要有嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、糖酵解、丙酮酸代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢和 TCA 循环。这些富集的代谢通路表明,三个处理组的差异代谢物主要与菌体生长代谢有关。

乳酸菌利用蔗糖转化为葡萄糖和果糖,再通过糖酵解将葡萄糖转化为丙酮酸,继而通过丙酮酸途径合成乳酸^[29],乳酸菌也可将木酮糖通过丙酮酸等途径转化为乳酸^[30]。蔗糖和木酮糖含量与活菌数呈负相关,而丙酮酸和乳酸含量与活菌数呈正相关,说明

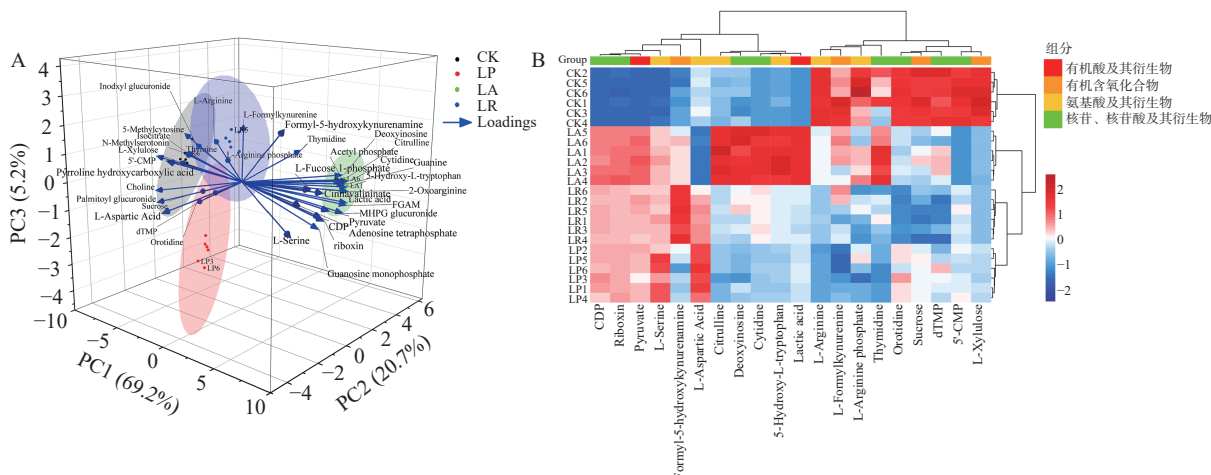


图 4 发酵鸡骨泥的代谢产物主成分分析(A)和聚类热图分析(B)

Fig.4 Principle component analysis (A) and cluster analysis (B) of metabolites of fermented bone paste

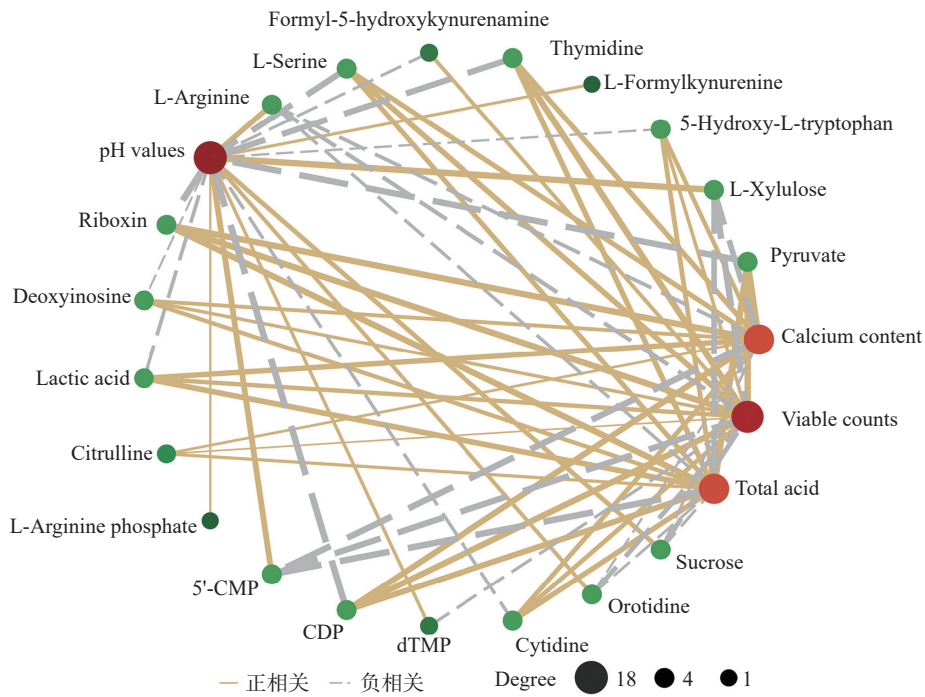


图 5 差异代谢物与主要生理指标关系网络图

Fig.5 Network diagram of the relationship between differential metabolites and key physiological indicators

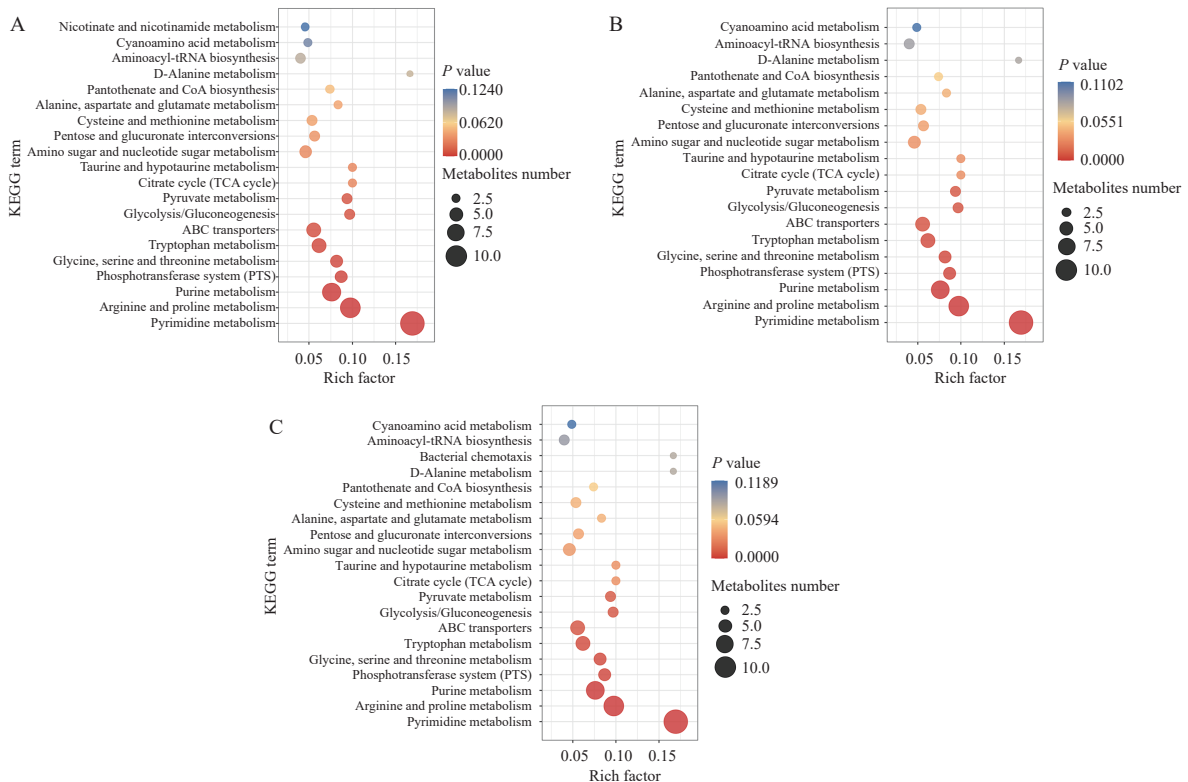


图 6 植物乳杆菌组(A)、罗伊氏乳杆菌组(B)、嗜酸乳杆菌组(C)发酵鸡骨泥代谢通路

Fig.6 Metabolic pathways of fermented chicken bone paste by *Lactobacillus plantarum* group (A), *Lactobacillus reuteri* group (B), *Lactobacillus acidophilus* group (C)

乳酸菌利用蔗糖和木酮糖作为碳源, 通过糖酵解途径和丙酮酸途径等代谢途径产生丙酮酸和乳酸等有机酸。熊涛等^[31]在发酵泡菜时发现乳酸菌可通过异型乳酸发酵将蔗糖转化为乳酸。刘洋^[32]发现利用木酮糖代替蔗糖作为碳源发酵牛乳后产生大量乳酸。因此, 乳酸菌可以将糖类物质经过糖酵解和丙酮酸途径

转化为乳酸。

有机酸对动物骨骼中 HAP 分解的机制主要包括: 氢离子促进溶解(酸解); 配体控制的溶解(通过有机酸与磷灰石复合, 从而打破金属氧键)^[33-35]。代谢物中, 丙酮酸作为乳酸的前体物质, 可通过糖酵解途径和 TCA 循环经乳酸脱氢酶(LDH)转化为乳酸。

在发酵完成时,乳酸菌代谢产生乳酸和丙酮酸与活菌数和钙释放量呈正相关,说明有机酸可能是钙离子含量增高的关键性物质。其中三组乳酸菌发酵前后乳酸含量发生显著变化,LP、LA和LR组中的乳酸含量分别是CK组中的16.18、45.27、16.50倍,说明乳酸是影响钙离子释放最重要的酸性物质。唐勇等^[9]利用乳酸菌发酵猪骨后发现,猪骨发酵液中乳酸含量与游离钙呈正相关。陈黎洪等^[35]利用干酪乳杆菌CICC20296菌株产生的乳酸可使骨泥中Ca²⁺浓度由0.10 mg/g增加至10.12 mg/g。这说明乳酸菌在发酵鸡骨泥过程中,通过糖酵解、TCA等途径产生乳酸,从而促进骨中HAP分解并释放出游离钙。

核苷类物质和氨基酸在维持生物细胞正常生命活动中不可或缺。核苷类物质广泛存在于乳酸菌中,如5'-CMP、dTMP和胞苷主要通过参与嘧啶代谢和嘌呤代谢途径影响DNA和RNA的合成^[36]。氨基酸不仅作为蛋白质的组成单位,可以维持乳酸菌生命活动,也可通过酶转化为乳酸。乳酸菌可利用脱氨酶、脱羧酶将丝氨酸和瓜氨酸等转化为丙酮酸,丙酮酸继而进入TCA循环产生乳酸,促进钙的释放^[37]。因此,核苷类物质和氨基酸类物质不仅可以维持菌株正常的生长繁殖过程,也可以为有机酸的产生提供前体物质。综上,三株乳酸菌通过糖酵解途径降解发酵骨泥中的糖类,并通过TCA循环产生有机酸,从而提升鸡骨泥液中游离钙的含量。这可能是LA组游离钙和有机酸含量最高的重要原因。

3 结论

嗜酸乳杆菌、罗伊氏乳杆菌和植物乳杆菌均能较好的利用骨泥进行生长繁殖并产生大量的酸类物质,发酵结束时,嗜酸乳杆菌发酵组的总酸含量显著高于其他处理组($P<0.05$)。与对照组相比,罗伊氏乳杆菌发酵组、植物乳杆菌发酵组和嗜酸乳杆菌发酵组总钙含量分别从对照组的181.33 mg/kg增加至1176.67、1310.00和1916.67 mg/kg;游离钙含量分别是对照组的40.60倍、50.19倍和74.62倍,且嗜酸乳杆菌发酵组的游离钙含量显著高于罗伊氏乳杆菌和植物乳杆菌发酵组($P<0.05$),这表明乳酸菌发酵显著增加了骨泥中钙的释放。红外光谱和X衍射结果表明,发酵骨泥中HAP主要以无定型形态存在,与对照组相比,罗伊氏乳杆菌发酵组、植物乳杆菌发酵组和嗜酸乳杆菌发酵组中HAP的特征峰在2926和1050 cm⁻¹处的强度明显降低。经乳酸菌发酵后,骨泥中共鉴定出37种代谢物,乳酸、丙酮酸、蔗糖等是其关键代谢物。嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、糖酵解、丙酮酸代谢、牛磺酸代谢和TCA循环是影响乳酸菌生长代谢及参与钙释放的关键通路。本文探究了乳酸菌发酵影响钙释放的关键代谢途径,为利用生物发酵法制备补钙剂进一步研究提供理论依据。

参考文献

- [1] 中国国家统计局. 中华人民共和国2021年国民经济和社会发展统计公报[EB/OL]. (2022-02-28)[2022-02-28]. http://www.stats.gov.cn/xxgk/sjfb/zxfb2020/202202/t20220228_1827971.html. [China National Bureau of Statistics. Statistical Bulletin of the People's Republic of China on National Economic and Social Development 2021[EB/OL]. (2022-02-28)[2022-02-28]. http://www.stats.gov.cn/xxgk/sjfb/zxfb2020/202202/t20220228_1827971.html.]
- [2] 翟璐, 杨加成, 陈康, 等. 金枪鱼纳米鱼骨钙对鱼糜制品凝胶特性的影响[J]. 中国食品学报, 2022, 22(5): 180-188. [ZHAI L, YANG J C, CHEN K, et al. Effect of tuna nanoscale fish bone calcium on gelation characteristic of surimi products[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(5): 180-188.]
- [3] 李婉君. 畜禽骨副产物高值化加工关键技术与装备-中国农业科学院农产品加工所张春晖研究员专访[J]. 肉类研究, 2018, 32(4): 15-18, 12-14. [LI W J. Key technology and equipment for high-value processing of livestock and poultry bone byproducts-Interview with researcher Chunhui Zhang, institute of agricultural product processing, chinese academy of agricultural sciences (CAAS)[J]. Meat Research, 2018, 32(4): 15-18, 12-14.]
- [4] 姚玉梅, 袁湘汝, 韩鲁佳, 等. 畜禽骨蛋白质材料化利用的研究现状与发展趋势分析[J]. 材料导报, 2021, 35(17): 17136-17142. [YAO Y M, YUAN X R, HAN L J, et al. Progress and prospect of materializing utilization in bone waste protein from animal by-products[J]. Materials Reports, 2021, 35(17): 17136-17142.]
- [5] 秦斌钰, 诸葛斌, 方慧英, 等. 猪骨泥功能性双菌发酵[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(3): 94-97. [QIN B Y, ZHU G B, FANG H Y, et al. Study on the functional double bacterium fermentation pork bone pastes[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(3): 94-97.]
- [6] 刘忠霞, 翁佩芳. 酸解法提取牛骨中可溶性钙的研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2013, 26(2): 17-21. [LIU Z X, WENG P F. Extraction of soluble calcium from bovine bone by acidolysis[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition), 2013, 26(2): 17-21.]
- [7] 庞丰平. 羊骨酶解液的乳酸菌发酵研究[D]. 太原: 山西农业大学, 2017. [PANG F P. Fermentation of sheep bone hydrolysate with lactic acid bacteria[D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2017.]
- [8] 闫凜, 朱苏迪, 樊晓霞. 掺杂离子的羟基磷灰石及其复合材料在骨修复领域的最新研究进展[J]. 中国陶瓷, 2022, 58(9): 1-8. [YAN L, ZHU S D, FAN X X, et al. The latest research progress of ion doped hydroxyapatite and its composites in the field of bone repair[J]. China Ceramics, 2022, 58(9): 1-8.]
- [9] 韩克光, 庞丰平, 曹靖, 等. 羊骨酶解液的植物乳杆菌发酵[J]. 生物工程学报, 2018, 34(6): 945-955. [HAN K G, PANG F P, CAO J, et al. Fermentation of sheep bone enzymatic hydrolysates by *Lactobacillus plantarum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2018, 34(6): 945-955.]
- [10] 唐勇, 李洪军, 睢道惠. 乳酸菌发酵对超微猪骨粉营养及理化特性的影响[J]. 农业工程学报, 2002, 18(2): 118-122. [TANG Y, LI H J, SUI D H, et al. Effect of fermentation by *Lactobacillus* on nutrition and physicochemical property of super-micro-mashing hog-bonepowder[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2002, 18(2): 118-122.]
- [11] 李睿, 王海燕, 尚永彪. 鸡骨的综合利用研究进展[J]. 肉类工业, 2010(11): 54-57. [LI R, WANG H Y, SHANG Y B, et al.

- Research progress on comprehensive utilization of chicken bones [J]. *Meat Industry*, 2010(11): 54–57.]
- [12] ZUO Y, XIE H, LI Y, et al. Study of fermentation conditions for bone meal with the lactobacillus [C]. 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, 2012: 539–542.]
- [13] XU A H, XIAO Y W, HE Z W, et al. Use of non-saccharomyces yeast co-fermentation with saccharomyces cerevisiae to improve the polyphenol and volatile aroma compound contents in nan-feng tangerine wines [J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(2): 128.]
- [14] 李玉娟, 肖楠, 刘珊, 等. 酶解骨粉对低钙大鼠的补钙功效研究 [J]. *北京理工大学学报*, 2022, 42(1): 105–110. [LI Y J, XIAO N, LIU S, et al. Effect of enzymatic hydrolyzed bone powder on calcium supplement for low calcium rats [J]. *Transactions of Beijing Institute of Technology*, 2022, 42(1): 105–110.]
- [15] SONG M Y, DANG L P, WEI H Y. Evaluation of calcium binding capacity of chelating agents in calcium carbonate suspension and effects on calcium distribution of calcium chelating agents [J]. *Australian Journal of Chemistry*, 2021, 74(7): 557–563.]
- [16] GUAN H, SHUAI Y, RAN Q F, et al. The microbiome and metabolome of Napier grass silages prepared with screened lactic acid bacteria during ensiling and aerobic exposure [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 269: 114673.]
- [17] QIN X J, SHEN Q S, GUO Y J, et al. An advanced strategy for efficient recycling of bovine bone: Preparing high-valued bone powder via instant catapult steam-explosion [J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131614.]
- [18] ROOJ A K, KIMURA Y, BUDDINGTON R K. Metabolites produced by probiotic *Lactobacilli* rapidly increase glucose uptake by Caco-2 cells [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10(1): 16.]
- [19] WIDYASTUTI Y, FEBRISANTOSA A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation [J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5: 435–442.]
- [20] LI J L, YIN T, XIONG S B, et al. Mechanism on releasing and solubilizing of fish bone calcium during nano-milling [J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2020, 43(4).]
- [21] 廖洪波. 乳酸菌发酵超微骨泥生物特性与增强骨密度功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2008. [LIAO H B. Study on the bio-characteristics of micro-smashed meat and bone meal fermented by *Lactobacillus* and its function of improving bone density [D]. Chongqing: Southwest University, 2008.]
- [22] VENKATESAN J, LOWE B, MANIVASAGAN P, et al. Isolation and characterization of nano-hydroxyapatite from salmon fish bone [J]. *Materials (Basel)*, 2015, 8(8): 5426–5439.]
- [23] CAO C, WANG H, ZHANG J, et al. Effects of extraction methods on the characteristics, physicochemical properties and sensory quality of collagen from spent-hens bones [J]. *Foods*, 2023, 12(1): 202.]
- [24] PANDA N N, PRAMANIK K, SUKLA L B. Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite from fresh water fish scales for tissue engineering scaffold [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014, 37(3): 433–440.]
- [25] GÜLER G, VOROBEV M M, VOGEL V, et al. Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 161: 8–18.]
- [26] 胡剑涛, 黄月霞, 王德强. 不同工艺处理的牛骨粉对废水中铅离子的吸附性能 [J]. *材料科学与工程学报*, 2021, 39(4): 659–665, 685. [HU J T, HUANG Y X, WANG D Q, et al. Theoretical study of Pb²⁺ adsorption properties of adsorbent calcined from bovine bone powder [J]. *Journal of Materials Science and Engineering*, 2021, 39(4): 659–665, 685.]
- [27] MANALU J, SOEGIJONO B, INDRANI D J. Characterization of hydroxyapatite derived from bovine bone [J]. *Asian Journal of Applied Sciences*, 2015, 3(4): 758–765.]
- [28] SHARMA P, TRIVEDI A, BEGAM H. Synthesis and characterization of pure and titania doped hydroxyapatite [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2019, 16: 302–307.]
- [29] 周文丽, 缪明永. 乳酸脱氢酶与肿瘤免疫代谢研究进展 [J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2020, 7(4): 396–401. [ZHOU W L, MIAO M Y. Research progress on lactatedehydrogenase and immunometabolism in cancer [J]. *Electronic Journal of Metabolism and Nutrition of Cancer*, 2020, 7(4): 396–401.]
- [30] 付晓芬, 江均平, 张杰, 等. 微生物利用木糖发酵 L-乳酸代谢途径的研究 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30(8): 359–362. [FU X F, JIANG J P, ZHANG J, et al. Study on metabolic pathway of L-lactic acid fermentation from xylose by microorganism [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, 30(8): 359–362.]
- [31] 熊涛, 彭飞, 李啸, 等. 传统发酵泡菜优势微生物及其代谢特性 [J]. *食品科学*, 2015, 36(3): 158–161. [XIONG T, PENG F, LI X, et al. Changes and metabolic characteristics of main microorganisms during chinese sauerkraut fermentation [J]. *Food Science*, 2015, 36(3): 158–161.]
- [32] 刘洋. 低糖复合发酵乳工艺优化研究 [J]. *中国酿造*, 2020, 39(10): 188–192. [LIU Y. Optimization of fermentation process of low sugar compound fermented milk [J]. *China Brewing*, 2020, 39(10): 188–192.]
- [33] SONG O R, LEE S J, LEE Y S, et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil [J]. *Braz J Microbiol*, 2008, 39(1): 151–156.]
- [34] WANG D, XIE Y, JAISI D P, et al. Effects of low-molecular-weight organic acids on the dissolution of hydroxyapatite nanoparticles [J]. *Environmental Science: Nano*, 2016, 3(4): 768–779.]
- [35] 陈黎洪, 杨颖, 任发政, 等. 乳酸菌发酵法生产高钙鸡骨泥的工艺研究 [J]. *中国食品学报*, 2011, 11(2): 104–109. [CHEN L H, YANG Y, REN F Z, et al. Study on lactic acid bacteria fermentation technology for the producing of high calcium ion content chicken bone paste [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2011, 11(2): 104–109.]
- [36] KILSTRUP M, HAMMER K, RUHDAL JENSEN P, et al. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(3): 555–590.]
- [37] 巨晓芝, 袁倩倩, 马春玲, 等. 体外苏氨酸循环固碳途径的构建 [J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(6): 56–62. [JU X Z, YUAN Q Q, MA C L, et al. In vitro construction of the threonine cycle pathway for carbon fixation [J]. *China Biotechnology*, 2017, 37(6): 56–62.]