

嗜热链球菌937增殖培养基及发酵条件的优化

彭奎耀¹, 关成冉¹, 王伟军², 胡雅倩², 顾瑞霞^{1*}

(1. 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏扬州 225000)

(2. 南京卫岗乳业有限公司, 江苏南京 211100)

摘要: 该研究以化学限定培养基为基础, 通过单因素实验、响应面实验和正交优化实验对嗜热链球菌 937 的培养基、培养条件进行优化。通过实验确定嗜热链球菌 937 最适培养基: 乳糖 20 g/L, 酶解脱脂乳 16.60%, 大豆低聚肽 18.88 g/L, 乳清蛋白粉 1.69%, 10 mmol/L 组氨酸、10 mmol/L 异亮氨酸、5 mmol/L 酪氨酸、1 mmol/L 半胱氨酸和 1 mmol/L 谷氨酸、2 mg/L 烟酸、0.5 g/L 抗坏血酸、40 mg/L 氯化镁、2 mg/L 泛酸钙、4 mg/L 盐酸硫胺素、0.4 g/L 氯化钙。初始 pH 值 6.5, 接种量 2%, 39 °C 发酵, 嗜热链球菌 937 活菌数高达 1.75×10^9 CFU/mL。由此可见, 该研究实现嗜热链球菌 937 低成本、高效率的培养技术, 为高活菌数的嗜热链球菌商业产品的开发生产奠定基础。

关键词: 嗜热链球菌; 增殖培养基; 发酵条件

文章编号: 1673-9078(2024)05-24-33

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0618

Optimization of Enrichment Culture Medium and Fermentation Conditions for *Streptococcus thermophilus* 937

PENG Kuiyao¹, GUAN Chengran¹, WANG Weijun², HU Yaqian², GU Ruixia^{1*}

(1. Jiangsu Key Lab of Dairy Biotechnology and Safety Control, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

(2. Nanjing Weigang Dairy Co. Ltd., Nanjing 211100, China)

Abstract: The optimization process for *Streptococcus thermophilus* 937 involved starting from a chemically defined medium, followed by single-factor experiments, response surface experiments, and orthogonal optimization experiments to refine the culture medium and growth conditions. The experimentally determined optimal culture medium for *Streptococcus thermophilus* 937 is 20 g/L lactose, 16.60% enzymatic skim milk, 18.88 g/L soybean oligopeptide, 1.69% whey protein powder, 10 mmol/L histidine, 10 mmol/L isoleucine, 5 mmol/L tyrosine, 1 mmol/L cysteine, 1 mmol/L glutamic acid, 2 mg/L nicotinic acid, 0.5 g/L ascorbic acid, 40 mg/L magnesium chloride, 2 mg/L calcium pantothenate, 4 mg/L thiamine hydrochloride, and 0.4 g/L calcium chloride. The viable cell density of *Streptococcus thermophilus* 937 reached 1.75×10^9 CFU/mL when the initial pH was 6.5, with a 2% inoculum and a fermentation temperature of 39 °C. This work achieved low-cost, high-efficiency culture methods for *Streptococcus thermophilus* 937, and these findings lay a foundation for the development and production of commercial products via *Streptococcus thermophilus* cultures with high viable cell counts.

Key words: *Streptococcus thermophilus*; enrichment culture medium; fermentation conditions

引文格式:

彭奎耀, 关成冉, 王伟军, 等. 嗜热链球菌937增殖培养基及发酵条件的优化[J]. 现代食品科技, 2024, 40(5): 24-33.

PENG Kuiyao, GUAN Chengran, WANG Weijun, et al. Optimization of enrichment culture medium and fermentation conditions for *Streptococcus thermophilus* 937 [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 24-33.

收稿日期: 2023-05-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2101503); 国家自然科学基金面上项目(31972094); 市校合作共建科技创新平台项目(YZ2020265)

作者简介: 彭奎耀(1997-), 男, 硕士, 研究方向: 乳品加工, E-mail: p1019527517@163.com

通讯作者: 顾瑞霞(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 乳品加工, E-mail: rxgu@yzu.edu.cn

嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 是世界公认的食品安全级 (Generally Recognized as Safe, GRAS) 链球菌种, 因其优良的发酵特性, 广泛的应用于发酵乳制品^[1]。除了具有良好的发酵特性, 它还具备许多益生功能, 如缓解炎症性肠病^[2]、降胆固醇^[3]、保护肝脏损伤^[4]、抗氧化^[5]、增强人体免疫力^[6]等。随着嗜热链球菌的应用越来越广泛, 但国内缺乏自主知识产权的乳酸菌发酵剂, 因此提高嗜热链球菌的活菌数及生产效率, 对打破国外垄断, 推进嗜热链球菌的应用具有重要的现实意义。

但目前嗜热链球菌的培养水平较低, 限制了其进一步扩大应用, 因此优化培养基的营养成分是实现嗜热链球菌低成本、高效率培养的核心^[7]。调研发现, 目前培养嗜热链球菌多采用 MRS、M17 等商业培养基, 如李康宁等^[8]对 TYP 培养基的营养成分进行响应面优化, 使得嗜热链球菌活菌数提高了 2~3 倍。刘继业^[9]在 MRS 培养基的基础上进行营养成分的优化, 嗜热链球菌 L10 活菌数达到 2.39×10^9 CFU/mL。而商业培养基来源不同, 培养效果重复性差, 价格昂贵。此外, 商用培养基中含有蛋白胨、牛肉膏和酵母提取物等, 成分未知且复杂, 不仅会干扰菌株生长必需营养成分的确定, 还会造成潜在的食品安全性问题, 限制嗜热链球菌的应用^[10]。化学限定培养基 (Chemically Defined Medium, CDM) 是一种营养均衡且化学成分已知的培养基, 具有良好的培养重复性^[11,12]。CDM 可以排除未知成分的干扰, 更准确有效的用于分析嗜热链球菌的营养需求^[13]。

本研究拟在 CDM 的基础上, 分析嗜热链球菌 937 的营养需求, 进一步对培养基成分及培养条件进行筛选和优化, 实现嗜热链球菌 937 低成本、高效率的培养方式, 并为高活菌数的嗜热链球菌商业产品的开发生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株

嗜热链球菌 937 由江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室提供。

1.1.2 试剂

中性蛋白酶、牛骨胶原肽、大豆低聚肽, 浙江一诺生物有限公司; 脱脂乳、乳清蛋白粉, 新西兰

恒天然; 乳糖, 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖、硫酸铁、氯化镁、蔗糖等, 国药集团化学试剂有限公司; 谷氨酸、丙氨酸、天冬氨酸等氨基酸, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 仪器与设备

SX-700 型全自动高压蒸汽灭菌锅, 日本 TOMY 公司; DNP-9272 型恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; FP-110-C 型 Bioscreen CTM 系统, Lab-systems 公司; SW22 型恒温水浴锅, 优莱博技术 (北京) 有限公司; BIOTECH-5BG 型离位灭菌玻璃发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司; 1200 型高效液相色谱仪, Agilent Technologies 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化

一级种子液: 将嗜热链球菌 937 冻干菌种 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存), 接种到 10 mL M17 培养基中, 接种量 2%, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

二级种子液: 将一级种子液按 2% 接种量接种到 80 mL M17 培养基中, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.3.2 活菌数的测定

采用平板计数法测定菌株活菌数。

1.3.3 生长曲线的测定

使用全自动生长曲线测定仪 Bioscreen CTM 系统进行测定并记录菌体生长情况。将 2 代菌液进行离心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 000 r/min, 3 min) 收集菌体并用无菌水重悬清洗菌体, 重复两次, 最后调节菌体重悬液 OD₆₀₀ 值为 1.00 ± 0.05 , 接种于单一缺失营养成分的 CDM 培养基中, 接种量 2%, 混匀后吸取 300 μL 培养基加入生长板的加样孔, 每组样品设置 3 个平行, 将生长板放入培养箱内, 培养 24 h 后记录数据。设置培养参数: 培养温度 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 培养时间 24 h, 测量间隔 30 min, 吸收光波长 600 nm。

1.3.4 发酵液乳酸根含量的测定

乳酸根含量的测定参照国标 GB 1886.173-2016^[14]的方法。

1.3.5 发酵液中乳糖含量的测定

乳糖含量的测定参照国标 GB 5009.8-2016^[15]的方法。

表 1 完整化学限定培养基 (CDM) 成分

成分	浓度	成分	浓度 (质量浓度)
乳糖	1.00%	苏氨酸	1.00 mmol/L
尿素	0.24 g/L	半胱氨酸	1.00 mmol/L
组氨酸	1.00 mmol/L	丙氨酸	1.00 mmol/L
异亮氨酸	1.00 mmol/L	甘氨酸	1.00 mmol/L
亮氨酸	1.00 mmol/L	抗坏血酸钠	0.25 g/L
蛋氨酸	1.00 mmol/L	叶酸	1.00 mg/L
缬氨酸	1.00 mmol/L	盐酸吡哆醛	5.00 mg/L
赖氨酸	1.00 mmol/L	盐酸硫胺素	1.00 mg/L
谷氨酸	1.00 mmol/L	核黄素	1.00 mg/L
谷氨酰胺	1.00 mmol/L	烟酸	1.00 mg/L
色氨酸	1.00 mmol/L	泛酸钙	1.00 mg/L
酪氨酸	1.00 mmol/L	硫酸锰	28.00 mg/L
天冬氨酸	1.00 mmol/L	氯化镁	25.00 mg/L
天冬酰胺	1.00 mmol/L	氯化钙	0.10 g/L
苯丙氨酸	1.00 mmol/L	硫酸锌	5.00 mg/L
脯氨酸	1.00 mmol/L	氯化铁	5.00 mg/L
丝氨酸	1.00 mmol/L	乙酸钠	0.50 g/L

1.3.6 发酵液 pH 值测定

使用梅特勒 pH 值玻璃电极进行在线 pH 值测定。

1.3.7 基础培养基的确定

在完整化学限定培养基 (CDM) (见表 1) 中, 采用单一扣除法, 逐个缺失培养基中的营养成分, 使用 Bioscreen C™ 系统检测嗜热链球菌 937 在培养过程中的生物量 (OD_{600}), 绘制生长曲线, 评价菌株生长情况, 确定基础培养基的成分组成。

1.3.8 酶解脱脂乳的制备

将 120 g 脱脂乳溶于 880 g 去离子水, 用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 7.0。50 °C 水浴保温, 加入中性蛋白酶至溶液浓度为 200 U/mL 进行酶解, 酶解过程中用 0.5 mol/L NaOH 调节酶解液 pH 值在 7.0 左右, 用 pH-stat 法测定酶解脱脂乳的水解度, 当脱脂乳酶解液水解度达到 15% 时, 结束酶解, 灭菌 (105 °C, 15 min)。水解度计算公式:

$$D = \frac{A \times B}{a \times C \times E} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D —水解度, %;

A —NaOH 体积, mL;

B —NaOH 浓度, mol/L;

a —氨基的平均解高度, 酪蛋白的 $1/a$ 为 2.26;

C —蛋白质的质量, g;

E —htot 值, 对于酪蛋白, 取值为 8.2 mmol/L。

1.3.9 碳源的优化

在基础培养基的基础上, 分别添加乳糖、葡萄糖和蔗糖, 分别添加质量分数为 1%、2%、3%、4%、5%, 2% 接种量, 42 °C 培养至稳定期测定活菌数。

1.3.10 氮源的优化

分别向培养基中添加脱脂乳酶解液 (质量分数: 5%、10%、15%、20%)、大豆低聚肽 (质量浓度: 5、10、15、20 g/L)、牛骨胶原肽 (质量浓度: 5、10、15、20 g/L)、乳清蛋白粉 (质量分数: 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%)、尿素 (质量浓度: 0.2、0.4、0.8 g/L), 接种量 2%, 42 °C 培养至稳定期测定活菌数。

1.3.11 氮源响应面实验设计

根据氮源优化实验结果, 选取脱脂乳酶解液、大豆低聚肽、乳清蛋白粉三种因素进行中心组设计和响应面分析, 采用 Design Expert 软件进行 Box-Behnken 设计 (见表 2), 以菌体稳定期活菌数为响应值, 进行响应面设计及数据处理, 根据优化结果确定嗜热链球菌 937 培养基中复合氮源的最优配比。

表 2 响应面实验因素和水平

Table 2 Response surface experimental factors and levels

水平	因素		
	A 大豆低聚肽/(g/L)	B 脱脂乳酶解液含量/%	C 乳清蛋白粉/%
-1	5	5	0.5
0	12.5	17.5	1.75
1	20	30	3

1.3.12 氨基酸的优化

在氮源优化的基础上, 分别在培养基中添加亮氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸、组氨酸、谷氨酸, 浓度分别为: 0、5、10、15、20、30 mmol/L, 接种量 2%, 42 °C 培养至稳定期测定活菌数。

1.3.13 生长因子优化

向优化培养基中分别添加质量浓度为 0、2、4、6、8 mg/L 的核黄素、盐酸硫胺素、盐酸吡哆醛、烟酸和泛酸钙, 添加质量浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 的抗坏血酸, 质量浓度为 0、20、40、60、80 mg/L 的氯化镁和质量浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 g/L 的氯化钙, 接种量 2%, 42 °C 培养至稳定期测定活菌数。

1.3.14 培养条件的优化

基于上述实验, 对嗜热链球菌 937 的培养条件 (温度、初始 pH 值、接种量) 进行 3 因素 3

水平的正交实验优化,以活菌数为评价指标,确定最佳培养条件。

1.3.15 数据处理与分析

实验数据使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$, 差异显著。采用 GraphPad Prism 软件处理作图。

2 结果与分析

2.1 嗜热链球菌937基础培养基的确定

本实验以 1% 乳糖为碳源,分别逐一缺失化学限定培养基中的营养成分,完整的培养基作为实验对照组,确定嗜热链球菌 937 生长需要的营养成分,以构成基础培养基(图 1)。

与对照组相比,单一缺失泛酸钙、烟酸、盐酸硫胺素、氯化镁、谷氨酸(Glu)、色氨酸(Trp)、半胱氨酸(Cys)时,嗜热链球菌 937 几乎不生长($OD_{600} < 0.2$),说明这些营养成分是嗜热链球菌 937 生长必需营养物质;当从培养基中扣除盐酸吡哆醇、核黄素、抗坏血酸、氯化钙、异亮氨酸(Ile)、组氨酸(His)、蛋氨酸(Met)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)时,嗜热链球菌 937 的生物量显著低于对照组($P < 0.05$),说明缺乏这类营养成分会抑制嗜热链球菌 937 的生长,其是嗜热链球菌 937 生长需求的营养物质。而叶酸、硫酸锰、硫酸亚铁、硫酸锌、乙酸钠、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸(Phe)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、谷氨酰胺(Gln)等营养成分单一缺失时,嗜热链球菌 937 的生物量无显著变化,说明嗜热链球菌 937 在生长过程中不需要这些营养物质。Letort 等^[16]研究发现核黄素是 6 株嗜热链球菌的生长必需营养成分,烟酸和泛酸钙对其中的 4 株嗜热链球菌(ST1、ST8、ST18 和 ST21)必需营养成分,同时对另外 2 株菌(ST7 和 ST11)具有促生长作用。Liu 等^[17]在研究控制 pH 值分批发酵中嗜热链球菌 MN-ZLW-002 营养需求时发现 Ca^{2+} 能够促进嗜热链球菌 MN-ZLW-002 生长,本实验也得到类似结论。

因此,通过单一扣除实验,分析了嗜热链球菌 937 的营养需求,从而获得嗜热链球菌基础培养基为:乳糖 1%、尿素 0.24 g/L、烟酸 1 mg/L、抗坏血酸 0.25 g/L、核黄素 1 mg/L、盐酸硫胺素 1 mg/L、盐酸吡哆醇 1 mg/L、烟酸 1 mg/L、泛

酸钙 1 mg/L、亮氨酸 1 mmol/L、蛋氨酸 1 mmol/L、异亮氨酸 1 mmol/L、酪氨酸 1 mmol/L、色氨酸 1 mmol/L、半胱氨酸 1 mmol/L、组氨酸 1 mmol/L、谷氨酸 1 mmol/L、氯化镁 25 mg/L、氯化钙 0.1 g/L。

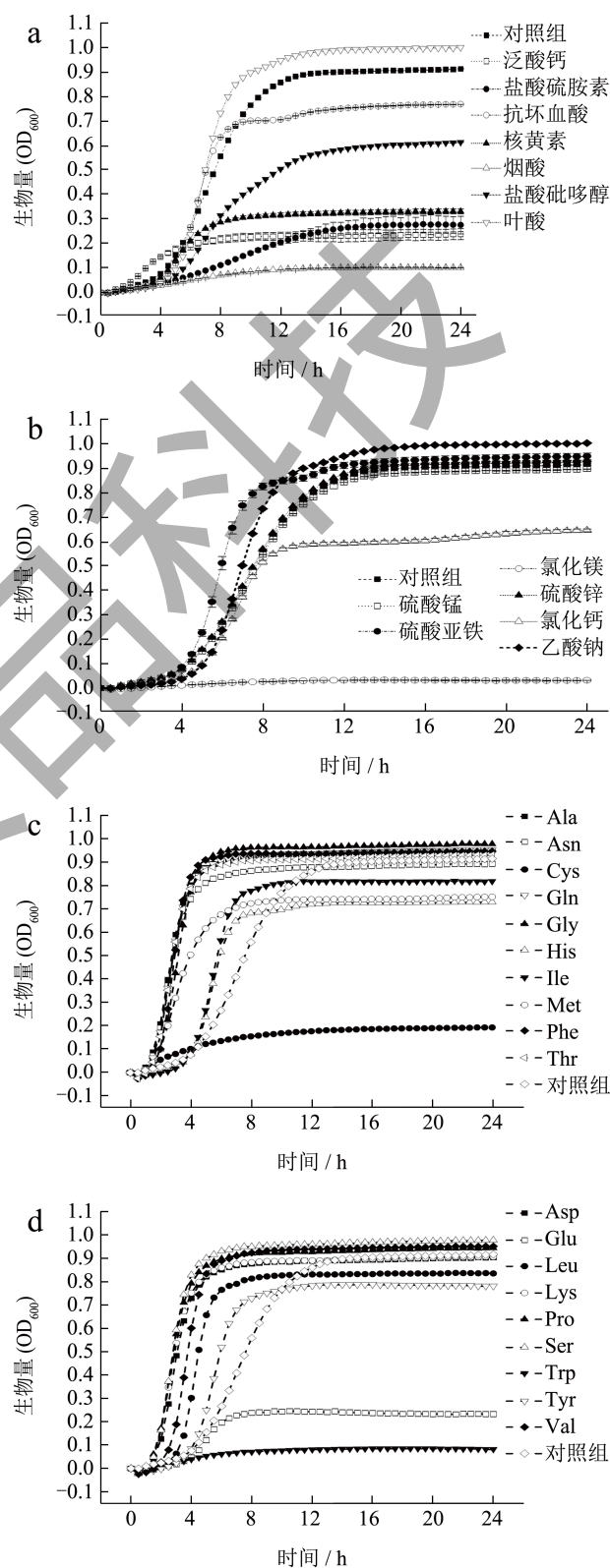


图 1 嗜热链球菌 937 基本营养需求

Fig.1 Basic nutritional requirements of *S. thermophilus* 937

2.2 碳源对嗜热链球菌937生长的影响

碳源是嗜热链球菌生长代谢必需的营养物质,对促进嗜热链球菌的增殖至关重要^[18]。本实验在基础培养基中,分别以质量分数为1%~5%的乳糖、葡萄糖、蔗糖作为嗜热链球菌937的碳源,筛选出促进嗜热链球菌937生长的碳源及其浓度(图2)。

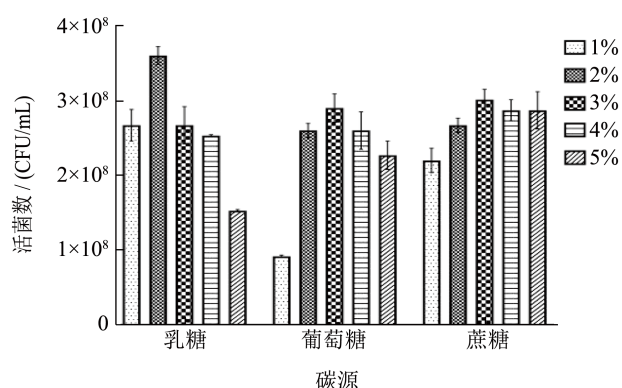


图2 碳源及其浓度对嗜热链球菌937的影响

Fig.2 Effect of the carbon source and its concentration on the growth of *S. thermophilus* 937

由图2可知,随着碳源浓度上升,实验组嗜热链球菌937的活菌数均呈先上升后下降的趋势,在乳糖质量分数2%时,嗜热链球菌937活菌数最高为 3.6×10^8 CFU/mL;当碳源为葡萄糖、蔗糖时,都在质量分数为3%活菌数最高,分别为 2.9×10^8 CFU/mL和 3.01×10^8 CFU/mL,都显著低于以2%乳糖作为碳源的培养基。因此选择2%乳糖作为嗜热链球菌937的碳源。Bogaard等^[19]也得到相似的结论,当嗜热链球菌分别以葡萄糖、蔗糖、果糖作为碳源时,其在乳糖中的生长速率比其在其它糖类中高数倍。

2.3 氮源对嗜热链球菌937生长的影响

嗜热链球菌的营养物质的需求及其复杂苛刻,其可利用的氮源可分为铵基氮、尿素等无机氮,蛋白胨、大豆肽等有机氮,两者均可被菌体吸收利用^[20]。本实验分别以尿素、脱脂乳酶解液、牛骨胶原肽、大豆低聚肽和乳清蛋白粉作为嗜热链球菌937的氮源,筛选出促进嗜热链球菌937生长的氮源(图3)。

由图3可知,首先,不同的氮源对嗜热链球菌

937增殖效果差异较大,其中尿素的代谢利用明显低于另外4种氮源,即使提高尿素的浓度,嗜热链球菌937的活菌数也没有明显的增加,说明尿素不适合作为嗜热链球菌937的氮源。其次,与对照组相比,另外4种氮源都能够有效的促进嗜热链球菌937的生长。脱脂乳酶解液、牛骨胶原肽和大豆低聚肽表现出相同的趋势,即随着浓度的提升,活菌数均呈先上升,达到峰值后下降的趋势;乳清蛋白粉是随着浓度的增加,活菌数是先上升,后就基本不变的趋势。进一步分析发现,当氮源为10%脱脂乳酶解液、10 g/L大豆低聚肽或2%乳清蛋白粉时,嗜热链球菌937的增殖效果最显著,活菌数分别达到 5.87×10^8 、 5.73×10^8 、 5.91×10^8 CFU/mL,而这三者之间无明显差异。此外有研究发现,复合氮源对乳酸菌的增殖效果显著优于单一氮源的增殖效果,因此综合分析后,选择脱脂乳酶解液、大豆低聚肽、乳清蛋白粉作为嗜热链球菌937的氮源,并进行复配。

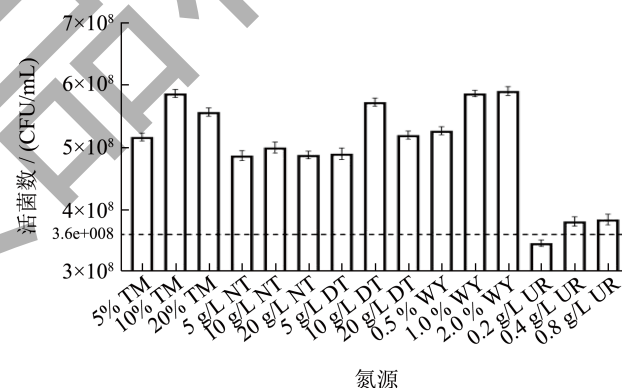


图3 氮源对嗜热链球菌937生长的影响

Fig.3 Effect of the nitrogen source on the growth of *S. thermophilus* 937

注:UR代表尿素, TM代表脱脂乳酶解液, NT代表牛骨胶原肽, DT代表大豆低聚肽, WY代表乳清蛋白粉, 虚线代表对照组。

2.4 氮源响应面优化实验

在实验2.3的基础上,以嗜热链球菌937的活菌数为测评指标,对培养基的脱脂乳酶解液、大豆低聚肽、乳清蛋白粉的添加量进行三因素三水平的响应面实验设计,零点试验重复5次估计误差(表3)。

表 3 嗜热链球菌937响应面实验设计结果

Table 3 Results of response surface experimental design of *S. thermophilus* 937

编号	A 大豆低聚肽含量/(g/L)	B 脱脂乳酶解液含量/%	C 乳清蛋白粉/%	活菌数/(10 ⁹ CFU/mL)
1	12.50	5.00	3.00	0.84
2	12.50	17.50	1.75	1.22
3	12.50	17.50	1.75	1.29
4	12.50	30.00	0.50	0.73
5	20.00	17.50	3.00	0.81
6	20.00	17.50	0.50	0.84
7	20.00	30.00	1.75	0.83
8	12.50	30.00	3.00	0.81
9	5.00	17.50	3.00	1.08
10	12.50	17.50	1.75	1.10
11	20.00	5.00	1.75	0.87
12	12.50	17.50	1.75	1.25
13	12.50	17.50	1.75	1.11
14	5.00	30.00	1.75	0.90
15	12.50	5.00	0.50	0.70
16	5.00	5.00	1.75	0.68
17	5.00	17.50	0.50	0.65

表 4 二次多项式模型的系数及其方差分析

Table 4 Coefficients and their analysis of variance for the quadratic polynomial model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	0.65	9	0.072	12.04	0.001 7*	significant
A	0.000 2	1	0.000 2	0.033	0.860 3	
B	0.004 05	1	0.004 05	0.67	0.438 5	
C	0.048	1	0.048	8.00	0.025 4*	significant
AB	0.017	1	0.017	2.82	0.137 3	
AC	0.053	1	0.053	8.81	0.020 8*	significant
BC	0.000 9	1	0.000 9	0.15	0.710 1	
A ²	0.094	1	0.094	15.68	0.005 5	
B ²	0.21	1	0.21	35.35	0.000 6	
C ²	0.17	1	0.17	27.92	0.001 1	
残差项	0.042	7	0.006 003			
失拟项	0.013	3	0.004 367	0.60	0.646 2	not significant
误差	0.029	4	0.007 23			
和	0.69	16				
			$R^2=0.939 3$	$R_{adj}^2=0.861 3$		

注: * 显著性差异分析在 $P < 0.05$ 水平。

使用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面二次多项回归拟合, 获得 3 种氮源与活菌数的二次多项式回归模型方程为:

活菌数 = $1.196 + 0.005A + 0.024 17B + 0.079 17C - 0.063 33AB - 0.116 7AC - 0.015BC - 0.150 5A^2 - 0.225 5B^2 - 0.798 8C^2$, 各项方差分析结果如表 4 所示。

对嗜热链球菌 937 的活菌数进行方差分析, 结果显示二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 , 交叉项 AC 及一次项 A 对嗜热链球菌 937 活菌数均有显著影响 ($P < 0.05$)。整体模型呈极显著差异 ($P < 0.01$), 表明该回归模型达到极显著水平。失拟项的 $P = 0.646 2 > 0.05$, 失拟项不显著, 表明试验设计误差小。方程模型系数 $R^2 = 0.939 3$, $R_{adj}^2 = 0.861 3$, 说明方程与试验拟合度良好, 可用于嗜热链球菌 937 生长情况的预测。本试验得到响应面三维图和等高线图如图 4 所示。

分析图 4 可知, 大豆低聚肽和乳清蛋白粉的江湖影响对嗜热链球菌 937 活菌数具有显著影响 ($P > 0.05$)。当大豆低聚肽含量一定时, 随着增加乳清蛋白粉添加量, 活菌数呈先上升后下降的趋势, 当乳清蛋白粉含量较低时, 嗜热链球菌 937 活菌数随大豆低聚肽添加量的增加而上升, 当乳清蛋白粉含量较高时, 活菌数随大豆低聚肽添加量的增加而下降。

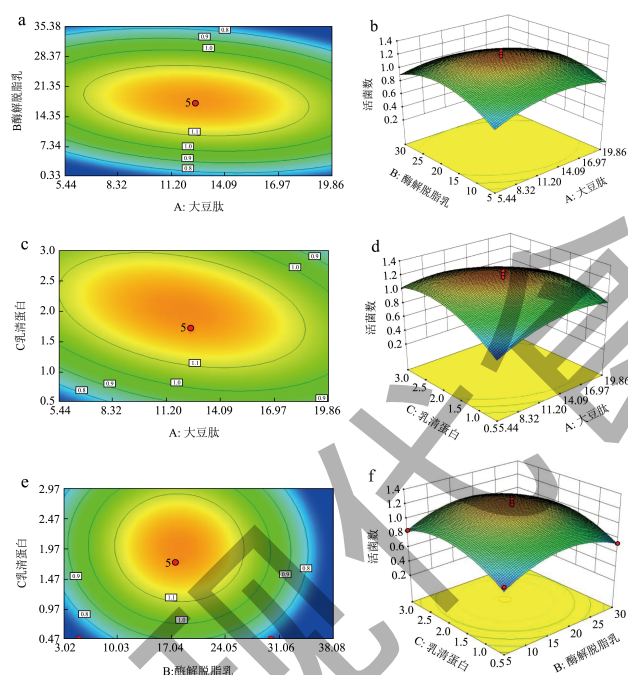


图 4 因素交叉作用响应面图及相应等高线图

Fig.4 Factor cross-action response surface plots and the corresponding contour plots

经响应面分析法得到的最佳大豆低聚糖质量分数为 18.88 g/L, 脱脂乳酶解液和乳清蛋白粉的质量浓度为 16.60%、1.69%, 模型预测的活菌数为 1.09×10^9 CFU/mL, 为验证预测结果的可靠性, 利用上述优化好的复合氮源进行试验, 测定的最终活菌数为 1.06×10^9 CFU/mL, 与预测值无显著差异。所以认为该方法进行嗜热链球菌 937 复合氮源的优化准确度较好。

2.5 氨基酸对嗜热链球菌 937 生长的影响

微生物中, 乳酸菌对于营养物质的要求尤其严格, 嗜热链球菌更甚。有些氨基酸并不能在嗜热链球菌生长代谢中合成, 需要从外界获取^[21]。本实验在实验 2.4 的基础上, 将氮源优化后的培养基设为对照组, 进一步研究不同浓度的半胱氨酸、组氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、酪氨酸、谷氨酸对嗜热链球菌生长的影响 (图 5)。

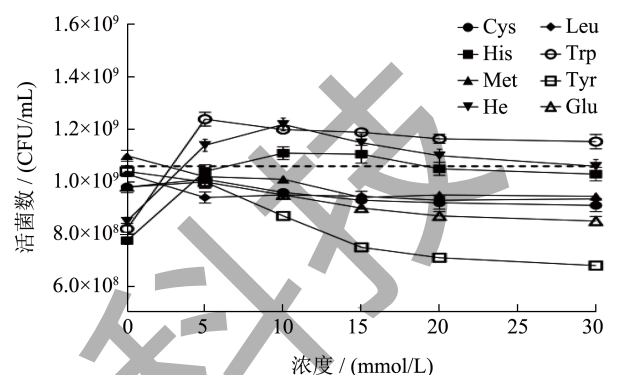


图 5 氨基酸对嗜热链球菌 937 生长的影响

Fig.5 Effect of amino acids on the growth of *S. thermophilus* 937

注: 虚线为对照组。

分析图 5 可知, 不同的氨基酸对嗜热链球菌 937 生长的影响均不同。首先, 可以发现适合浓度的异亮氨酸、组氨酸和酪氨酸能够促进嗜热链球菌 937 的增殖, 而随着这三种浓度的增加, 嗜热链球菌 937 的活菌数逐渐下降, 其中添加 10 mmol/L 组氨酸、10 mmol/L 异亮氨酸和 5 mmol/L 酪氨酸相比于其他浓度显著提高了菌体的活菌数, 并且明显高于对照组。当未添加蛋氨酸、色氨酸和亮氨酸, 嗜热链球菌 937 活菌数高于对照组, 但随着添加浓度增加, 活菌数下降。说明培养基中不需要添加蛋氨酸、色氨酸、亮氨酸。此外, 未添加半胱氨酸和谷氨酸时, 嗜热链球菌活菌数显著低于对照组, 当随着浓度的增加, 菌体活菌数先增加后下降, 但最高峰的活菌数仍未明显高于对照组, 说明在嗜热链球菌 937 生长过程中不能缺少半胱氨酸和谷氨酸, 但高浓度的半胱氨酸和谷氨酸会抑制菌体的生长。陈合等^[22]选取 19 种氨基酸与牛乳复合培养嗜热链球菌, 发现添加 10 mg/L 谷氨酸时, 嗜热链球菌活菌数最高达到 4.80×10^9 CFU/mL, 本研究也得到相似结果。

因此, 嗜热链球菌 937 最适的氨基酸及其添加浓度为: 10 mmol/L 组氨酸、10 mmol/L 异亮氨酸、5 mmol/L 酪氨酸、1 mmol/L 半胱氨酸和 1 mmol/L 谷氨酸。

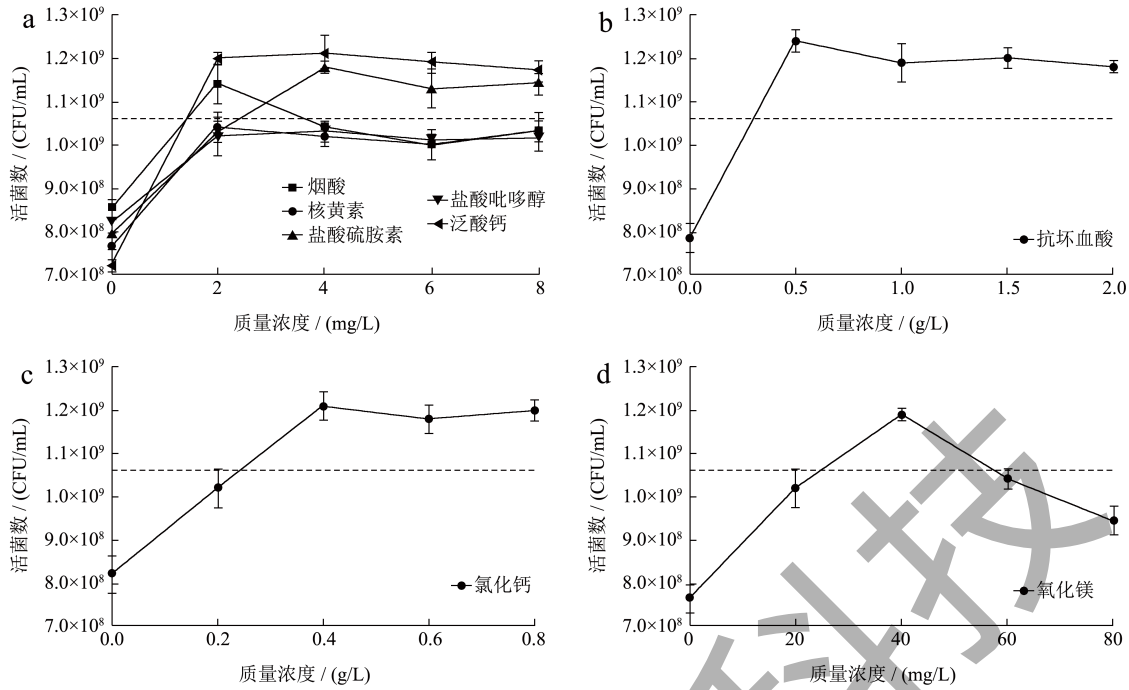


图 6 生长因子对嗜热链球菌 937 生长的影响

Fig.6 Effect of growth factors on the growth of *S. thermophilus* 937

注：虚线为对照组。

表 5 培养条件 $L_{16}(3^4)$ 正交试验

Table 5 Culture condition $L_{16}(3^4)$ by an orthogonal assay

编号	A pH 值	B 温度/°C	C 接种量	活菌数 / (10 ⁹ CFU/mL)
1	1 (5.5)	1(35)	1(1%)	0.12
2	1	2(37)	2(2%)	0.21
3	1	3(39)	3(4%)	0.24
4	1	4(42)	4(6%)	0.39
5	2(6.0)	1	2	0.54
6	2	2	1	0.61
7	2	3	4	0.66
8	2	4	3	0.72
9	3(6.5)	1	3	0.84
10	3	2	4	0.97
11	3	3	1	1.64
12	3	4	2	1.51
13	4 (7.0)	1	4	0.68
14	4	2	3	0.62
15	4	3	2	0.84
16	4	4	1	0.71
K_1	0.97	2.18	3.08	
K_2	2.53	2.41	3.10	
K_3	4.96	3.36	2.42	
K_4	2.86	3.33	2.7	
R	3.99	1.15	0.66	
因素排列	ABC			
水平排列	$K_3 > K_4 > K_2 > K_1$	$K_3 > K_4 > K_2 > K_1$	$K_2 > K_1 > K_4 > K_3$	
优组合	A ₃	B ₃	C ₂	
优水平	A ₃ B ₃ C ₂			

2.6 生长因子对嗜热链球菌937生长的影响

在嗜热链球菌的代谢繁殖过程中,除了需要碳源、氮源作为营养物质外,一些微量物质也对其代谢繁殖具有重要作用。如维生素、矿物质等生长因子,适度微量添加既能够增长嗜热链球菌活菌数,同时可提高其酸碱耐受性、抑菌作用以及缓解氧气毒害作用等^[23-25]。本实验在实验2.4的基础上,将氮源优化后的培养基设为对照组,研究不同浓度的生长因子对嗜热链球菌937生长的影响(图6)。

分析图6可知,在培养基中未添加这些生长因子,嗜热链球菌937的活菌数均低于对照组,说明基于对照组培养基,这些生长因子是嗜热链球菌937的生长必需营养物质。其中核黄素和磷酸吡哆醇组的活菌数随着相应浓度的增加,曲线呈平稳趋势,但仍低于对照组,说明核黄素和磷酸吡哆醇浓度的增高抑制了嗜热链球菌937的生长。而添加烟酸、泛酸钙、盐酸硫胺素、抗坏血酸、氯化钙和氯化镁均对嗜热链球菌937的生长增殖具有显著作用。烟酸、抗坏血酸和氯化镁随着浓度的增加,嗜热链球菌937的活菌数呈先升高后降低的趋势。当添加质量分数为2 mg/L烟酸、0.5 g/L抗坏血酸和40 mg/L氯化镁时,嗜热链球菌937活菌数达到最大值。泛酸钙、盐酸硫胺素和氯化钙随着浓度的增加呈先上升后逐渐平缓下降的趋势,当添加质量分数为2 mg/L泛酸钙、4 mg/L盐酸硫胺素和0.4 g/L氯化钙时,嗜热链球菌937活菌数达到最大值。

2.7 培养条件对嗜热链球菌937生长的影响

利用正交试验方法优化嗜热链球菌937的培养条件,正交试验结果如表5所示。

分析表5可知,培养条件对嗜热链球菌937活菌数的影响顺序为pH值>温度>接种量,最优的培养条件是:pH值为6.5,温度为39℃,接种量为2%,嗜热链球菌937活菌数高达 1.75×10^9 CFU/mL。

2.8 不同培养基对嗜热链球菌937生长的影响

将嗜热链球菌937接种于不同培养基,培养至稳定期测活菌数(表6)。

分析表6可知,与商业培养基相比,嗜热链球菌937在增殖培养基中的活菌数达到 1.75×10^9 CFU/mL,显著高于MRS培养基($P < 0.05$),与M17培养基中的活菌数没有明显差距($P > 0.05$)。刘冬梅等^[26]在MRS培养基的基础上优化培养基及培养条

件,使嗜热链球菌H2活菌数达 4.20×10^9 CFU/mL;同样刘继业^[9]也在MRS培养基的基础上进行营养成分的优化,嗜热链球菌L10活菌数达到 2.39×10^9 CFU/mL。虽然两人的研究中活菌数高于本研究结果,但其使用的培养基成本远高于本研究中增殖培养基。此外,冷一非^[27]在M17培养基的基础上优化营养成分,嗜热链球菌KS23的活菌数仅达到 1.16×10^9 CFU/mL,低于本研究结果。说明本研究优化的增殖培养基能够有效促进嗜热链球菌937的生长繁殖,增殖效果媲美商业增殖培养基。同时,本研究的增殖培养基的成本远低于商业培养基的成本。

表6 不同培养基对嗜热链球菌生长的影响及其成本

Table 6 Effects of different media on the growth of *S. thermophilus* and its cost

培养基	活菌数/(10^9 CFU/mL)	成本/(yuan/L)
M17	1.56 ± 0.12^b	59.22
MRS	0.95 ± 0.11^a	50.51
增殖培养基	1.75 ± 0.08^b	4.87

注:表中具有不同的字母表示差异显著, $P < 0.05$;相同的字母表示差异不显著, $P > 0.05$ 。

3 结论

本研究以江苏省乳品生物技术安全控制重点实验室保藏的嗜热链球菌937作为研究对象。通过分析嗜热链球菌937的营养物质需求,确定基础培养基,基础培养基由乳糖、尿素、泛酸钙、乙酸钠、烟酸、抗坏血酸、核黄素、盐酸硫胺素、烟酸、亮氨酸、盐酸吡哆醛、蛋氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、精氨酸、色氨酸、组氨酸、谷氨酸、氯化镁和氯化钙组成。在基础培养基的基础上,对培养基的碳源、氮源、氨基酸、维生素及矿物质进行种类、浓度的筛选优化,最终得到嗜热链球菌937增殖培养基:乳糖20 g/L,酶解脱脂乳16.60%,大豆低聚肽18.88 g/L,乳清蛋白粉1.69%,10 mmol/L组氨酸、10 mmol/L异亮氨酸、5 mmol/L酪氨酸、1 mmol/L半胱氨酸、1 mmol/L谷氨酸、2 mg/L烟酸、0.5 g/L抗坏血酸、40 mg/L氯化镁、2 mg/L泛酸钙、4 mg/L盐酸硫胺素、0.4 g/L氯化钙,培养至稳定期活菌数可达到 1.38×10^9 CFU/mL;进一步优化嗜热链球菌937的培养条件,当初始pH值为6.5,温度为39℃,接种量为2%,活菌数可达到 1.75×10^9 CFU/mL,较优化前提高了6.5倍。

参考文献

- [1] YANG S J, LI W C, BAI M, et al. Analysis of cofermentation characteristics of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* based on microrheology [J]. Food Bioengineering, 2022, 1(3-4): 233-240.
- [2] 张艳杰. 发酵乳改善胃肠道功能作用的研究进展[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 352-357.
- [3] 肖丽霞, 王慧晶, 顾瑞霞, 等. 乳酸菌对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2008, 29(4): 37-41.
- [4] 索超. 嗜热链球菌CS6产EPS条件优化及抗氧化性能初步评价[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- [5] GEORGE K R, PATRA J K, GOUDA S, et al. Benefaction of probiotics for human health: a review [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26(3): 927-939.
- [6] DEL C R, BRAVO D, CANTON R, et al. Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 547.
- [7] 张艳娇. *Lactobacillus Casei* Shirota的营养需求模式及其在发酵乳中的应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
- [8] 李康宁, 程超, 王春颖, 等. 响应面法优化嗜热链球菌增殖培养基[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(4): 4.
- [9] 刘继业. 直投式乳酸菌发酵剂制备技术的研究及其应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [10] ROCELLE M, CLAVERO S, BEUCHAT L R. Suitability of selective plating media for recovering heat or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3268-3273.
- [11] JARVIS N A, OBRYAN C A, RICHE S C, et al. A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Control, 2016, 66: 256-269.
- [12] 周正, 林汉发, 冯军燕, 等. 沙门氏菌选择性化学限定培养基的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 703-708.
- [13] LIU W, ZHANG L, YI H. Development of a chemically defined medium for better yield and purification of *Enterocin* Y31 from *Enterococcus faecium* Y31 [J]. Journal of Food Quality, 2017, 7: 1-8.
- [14] 食品安全国家标准GB1886.173-2016. 食品添加剂乳酸[S].
- [15] 食品安全国家标准GB5009.8-2016. 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定[S].
- [16] LETORT C, JUILLARD V. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(6): 1023-1029.
- [17] LIU G, QIAO Y, ZHANG Y, et al. Profiles of *Streptococcus thermophilus* MN-ZLW-002 nutrient requirements in controlled pH batch fermentations [J]. Microbiologyopen, 2018, 8(2): e00633.
- [18] PETRUT S, RUSU E, TUDORACHE I S, et al. Influence of various carbon sources on growth and biomass accumulation of some lactic acid bacteria strains [J]. Revista de Chimie, 2019, 70(7): 2434-2438.
- [19] BOGAARD P, HOLS P, KUIPERS O P, et al. Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus* [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(1): 10-17.
- [20] ASPMO S I, HORN S J, EIJNSINK V. Hydrolysates from atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(12): 3714-3722.
- [21] HUANG S, AI Z W, SUN X M, et al. Influence of arginine on the growth, arginine metabolism and amino acid consumption profiles of *Streptococcus thermophilus* T1C2 in controlled Ph batch fermentations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 121(3): 746-756.
- [22] 陈合, 彭丹, 杨君. 十九种氨基酸对嗜热链球菌生长的影响[J]. 食品工业科技, 2009, 30(4): 65-66, 69.
- [23] GOEL A, SANTOS F, VOS W D, et al. Standardized assay medium to measure *Lactococcus lactis* enzyme activities while mimicking intracellular conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(1): 134-143.
- [24] LEBLANC J, LAINO J, DELVALLE M J, et al. B-group vitamin production by lactic acid bacteria-current knowledge and potential applications [J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(6): 1297-1309.
- [25] QIU H Q, XU G Q, ZHUANG Y P, et al. Effect of vitamins on the viability of *L. paracasei* and specific activities of key enzymes of lactic acid biosynthesis pathway [J]. Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2007(3): 330-335.
- [26] 刘冬梅, 胡金双, 黄泳尧, 等. 中国传统发酵乳中嗜热链球菌H2的培养及益生特性评价[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2020, 48(9): 136-140.
- [27] 冷一非. 嗜热链球菌抗噬菌体菌株的选育、培养及冻干发酵剂的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.