

## 嗜热链球菌半乳糖突变株的选育及其发酵特性

何彬彬<sup>1,2,3</sup>, 邵佳慧<sup>1,2,3</sup>, 卢纹慧<sup>1,2,3</sup>, 崔欣蕊<sup>1,2,3</sup>, 丹彤<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 呼和浩特 010018

<sup>2</sup> 内蒙古农业大学 农业农村部奶制品加工重点实验室 呼和浩特 010018

<sup>3</sup> 内蒙古农业大学 内蒙古乳业生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

**摘要** 以分离自传统发酵乳制品中的嗜热链球菌 IMAU80809 为研究对象,利用亚硝基胍对菌株进行诱变处理。通过对与半乳糖代谢相关酶活性的测定、基因序列比对分析,筛选得到 1 株可代谢半乳糖的突变株——嗜热链球菌 IMAU80809Y。在此基础上,制备嗜热链球菌 IMAU80809 和突变株发酵乳,分析发酵乳中 pH 值、滴定酸度、黏度、持水力、活菌数以及关键代谢产物的变化情况。研究表明,与原始株相比,突变株发酵乳的凝乳时间缩短至 7 h, $\beta$ -半乳糖苷酶和半乳糖激酶的活性分别提升了 76.16%和 21.13%,而丙酮酸激酶和葡萄糖激酶的活性分别下降了 46.89%和 18.83%。此外,与原始株相比,突变株发酵乳中乳糖和半乳糖的含量分别降低了 0.599 g/100 g 和 0.208 g/100 g,说明其代谢乳糖/半乳糖的能力高于原始株。本研究的顺利进行为低半乳糖发酵乳制品的生产提供了理论依据。

**关键词** 嗜热链球菌; 亚硝基胍; 诱变; 半乳糖

**文章编号** 1009-7848(2025)01-0026-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.01.003

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是发酵乳制品加工中常用的发酵剂,通常与德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)复配制作酸奶<sup>[1]</sup>。在发酵过程中,乳糖通过乳糖渗透酶(Lactose permease, LacS)转运到细胞膜内,在 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -GAL)的催化作用下,进一步水解为葡萄糖和半乳糖<sup>[2]</sup>。葡萄糖经糖酵解途径被利用,然而,在大多数嗜热链球菌中,半乳糖激酶的活力较低,不能代谢半乳糖,而是通过 LacS 反向转运将半乳糖分泌到牛乳中<sup>[3-5]</sup>。这种代谢缺陷导致酸奶中游离半乳糖的积累,不仅降低产品品质(如降低酸奶质量,引发奶酪褐变、微生物腐败等),还可能对人体健康产生不利影响,如对半乳糖血症患者产生毒性影响<sup>[6]</sup>。

化学诱变主要是使用化学诱变剂对菌株进行诱变,这些诱变剂与 DNA 发生化学反应,从而改变微生物的结构,引起遗传物质的变异<sup>[7]</sup>。亚硝基胍(Nitrosoguanidin, NTG)有超级诱变剂之称,因诱

变效率高且不易回复突变而被广泛使用<sup>[8-9]</sup>。NTG 主要将 DNA 分子的碱基或磷酸盐部分烷基化,并在 DNA 复制过程中因碱基配对错误而导致突变<sup>[10]</sup>。Benateya 等<sup>[11]</sup>以嗜热链球菌为出发菌株,采用 NTG 诱变技术,得到 1 株能够提高嗜热链球菌代谢半乳糖能力的突变体。Ge 等<sup>[12]</sup>利用 NTG 对干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)进行诱变,筛选得到 1 株能够促进葡萄糖生产的突变体。

本研究选择 1 株具有良好发酵性能的嗜热链球菌 IMAU80809 为试验菌株<sup>[13]</sup>,使用适当浓度的 NTG 对该菌株进行诱变,通过分析诱变株中与半乳糖代谢相关基因序列和酶的活性,筛选出可代谢半乳糖的突变株。在此基础上,进一步分析原始株和突变株制备的发酵乳在发酵和贮藏期间 pH 值、滴定酸度(Titration acidity, TA)、黏度、持水力(Water holding capacity, WHC)以及乳酸、乳糖、半乳糖、葡萄糖等关键代谢产物的含量,分析突变株对半乳糖的代谢能力。以期为低半乳糖发酵乳的制备提供理论支持。

**收稿日期:** 2024-01-22

**基金项目:** 内蒙古自然科学基金面上项目(2022MS03013);  
国家自然科学基金项目(32072235)

**第一作者:** 何彬彬,女,硕士生

**通信作者:** 丹彤 E-mail: dantong813218@aliyun.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 试验菌株 嗜热链球菌 IMAU80809 由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实

实验室乳酸菌菌种资源库(LABCC)提供。

1.1.2 培养基 M17 肉汤、M17 琼脂培养基,赛默飞世尔科技(北京)有限公司。

1%半乳糖-M17 培养基:以半乳糖为唯一碳源,添加 1%的半乳糖制备。

脱脂乳培养基:10%脱脂乳粉,0.1%酵母粉,蒸馏水定容,121 °C灭菌 7 min,急冷,置于 4 °C 冰箱备用。

1.1.3 主要试剂 NTG,上海艺恩化工科技有限公司;乙腈,ASC 公司;乳糖、半乳糖、葡萄糖、乳酸标准品,北京化学试剂公司; $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase, $\beta$ -GAL)、半乳糖激酶(Galactokinase,

GalK)、丙酮酸激酶(Pyruvate kinase,PK)、葡萄糖激酶(Glucokinase,GK)活性检测试剂盒,北京 Solarbio 科技有限公司;全脂乳粉,新西兰恒天然有限公司。

1.1.4 其它试剂 复原全脂乳:取适量蒸馏水预热至 60 °C,加入 11.5%全脂乳粉和 0.1%蔗糖充分搅拌至完全溶解,水合 30 min 后,在 65 °C,低压 15 MPa 和高压 35 MPa 条件下连续均质 2 次,95 °C,5 min 的条件下杀菌,于 4 °C 冰箱备用。

## 1.2 仪器与设备

本研究所用的主要试验仪器信息如表 1 所示。

表 1 仪器与设备

Table 1 Instruments and equipment

名称	型号	厂家
高压灭菌锅	MLS-3750	日本三洋公司
光学显微镜	CX33	日本 OLYMPUS 公司
超净工作台	ZHJH-C1214C	上海智城仪器制造有限公司
恒温水浴锅	HWS28	上海一恒科技有限公司
PCR 仪	PTC-200 型	美国 Life Technologies 公司
电子天平	AR2202CN	奥豪斯仪器上海有限公司
电泳仪	DYY-12 型	北京六一仪器厂
凝胶成像分析仪	CDS8000 型	美国 UVP 公司
干热灭菌箱	SP-650	日本 YAMATO 公司
恒温培养箱	DHP-9272	上海一恒科技有限公司
pH 计	雷磁 PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
黏度计	BROOKFIELD DV-1	上海君翼仪器设备有限公司
高压均质机	SRH 60-70	上海申鹿均质机有限公司
高效液相色谱仪	Agilent 1260	美国 Aglient 公司
多功能酶标仪	MULTISKAN ASCENT	赛默飞世尔上海仪器有限公司

## 1.3 方法

1.3.1 菌株活化培养 将于-80 °C冷冻保藏的嗜热链球菌 IMAU80809 接种于脱脂乳培养基中,42 °C培养 18 h,然后以 2%的接种量接种于 M17 液体培养基中,连续传代培养 3 次,使其活力达到最大备用。

1.3.2 菌悬液的制备 将活化后的菌液离心(8 000 $\times$ g,4 °C,5 min),弃上清液,获得的菌泥用 PBS 清洗 2 遍后,重悬于 pH 值为 6.0 的磷酸盐缓冲溶液中,即为制备好的菌悬液。

1.3.3 NTG 诱变 在菌悬液中分别添加质量浓度为 1 mg/mL 的 NTG 母液,使其终质量浓度为 0,

100,300,500,700,900  $\mu$ g/mL,于摇床中以 42 °C,150 r/min 条件下暗室摇晃 60 min。反应结束后,用 PBS 缓冲液洗去诱变剂,重悬于 M17 培养基 42 °C培养 3 h,利用稀释平板计数法计算不同 NTG 终质量浓度菌液的致死率,选择致死率为 80%~90%的菌液在 1%半乳糖-M17 培养基上划线培养,分离出单个菌落。

致死率(%) =

$$\frac{\text{未处理平板菌落数} - \text{处理平板菌落数}}{\text{未处理平板菌落数}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 突变株的筛选 在培养皿中共挑取大小、形态不一的 65 株突变株纯化培养,将菌株保藏后

进行下一步筛选。

1) 生长密度 将嗜热链球菌 IMAU80809 与分离、纯化后的 65 个突变株接种于 M17 培养基中,测定其 OD<sub>600nm</sub> 下的吸光度。

2) 发酵时间 将嗜热链球菌 IMAU80809 与分离、纯化后的 65 个突变株接入全脂乳中,置于 42 °C 发酵至终点 (即 pH 值为 4.5), 记录凝乳时间。

3) 酶活力测定及基因序列比对 使用酶活性测试试剂盒检测嗜热链球菌 IMAU80809 和由试验(1)与(2)筛选出的突变株的  $\beta$ -GAL、GK、PK

和 GalK 活力,筛选出可能代谢半乳糖的突变株。

提取嗜热链球菌 IMAU80809 及其突变株的 DNA,利用聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR)进行扩增,再以琼脂糖凝胶电泳进行验证,将得到的清晰、明亮、单一条带进行克隆、测序。

根据 Genbank 中已公布的嗜热链球菌全基因组中 *lacZ*,*glck*,*pyk* 和 *galK* 的基因序列,利用 Primer 5.0 设计特异性引物,具体信息如表 2 所示,引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

表 2 PCR 扩增引物

Table 2 The primers for PCR analysis

基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
<i>lacZ</i>	<i>lacZ-F</i>	CTATTATGGATACGGTGC	18
	<i>lacZ-R</i>	ATGCTTTATTAAGTCCGG	18
<i>glck</i>	<i>glck-F</i>	TCGGTGGTGGTGTCTG	18
	<i>glck-R</i>	GAGGCATTGTCCCTTCAT	18
<i>pyk</i>	<i>pyk-F</i>	CATGCTAACACGCTGAG	18
	<i>pyk-R</i>	AGCATTGTCCGATCAGTA	18
<i>galK</i>	<i>GalK-F</i>	CCGGAAGGACGTTACCTC	18
	<i>GalK-R</i>	CCGATGTCTAGTATCCTC	18

1.3.5 遗传稳定性 将突变株于 M17 液体培养基中培养,接种量为培养基体积的 2%,连续传代培养 10 代,每代在 42 °C 培养 18 h,测定  $\beta$ -GAL、GK、PK 和 GalK 活性。

1.3.6 发酵乳的制备 将嗜热链球菌 IMAU80809 与突变株以  $5 \times 10^7$  CFU/mL 的接种量接入复原全脂乳中,于 42 °C 发酵,在发酵 0,3,6 h 和贮藏(初始 pH 4.5)0,1,3,7,14 d 时取样,检测发酵乳的 pH 值、TA、黏度、WHC、活菌数以及乳酸、乳糖、葡萄糖和半乳糖含量的变化。

1.3.7 嗜热链球菌 IMAU80809 及其突变株发酵乳中 pH 值、TA、黏度、WHC、活菌数的变化

1) pH 值的测定 使用 pH 计测定在发酵和贮藏期间嗜热链球菌 IMAU80809 和突变株发酵乳的 pH 值。

2) TA 的测定 根据国家标准《食品酸度的测定》(GB 5009.239-2016)<sup>[14]</sup>测定各发酵乳样品的 TA。

3) 黏度的测定 将待测的发酵乳样品使用 BROOKFIELD DV-1 型黏度仪测定黏度,测定条件为:转速 100 r/min,扭矩 20%~100%。

4) WHC 的测定 将发酵乳样品摇匀后,准确称取 10 g 置于离心管中,4 000 r/min 离心 20 min,静置平稳后,去除上清液,准确称量沉淀物质量。计算持水力公式为:

$$\text{WHC}(\%) = \frac{\text{滤液质量}(\text{g})}{\text{样品质量}(\text{g})} \times 100 \quad (2)$$

5) 活菌计数 采用稀释平皿倾注法检测嗜热链球菌 IMAU80809 及其突变株发酵乳中活菌数的变化。取 1 mL 发酵乳样品于 9 mL 灭菌生理盐水中,振荡摇匀,进行梯度稀释,采用 M17 固体培养基倾注法,42 °C 培养 48 h 后,记录菌落总数。

1.3.8 嗜热链球菌 IMAU80809 及其突变株发酵乳中关键代谢产物分析

1) 乳糖、半乳糖及葡萄糖含量的测定 前处理方法:准确称取 1 g 样品于 25 mL 容量瓶中,加入三蒸水定容,振荡 30 s,超声 30 min,8 000×g 离

心 10 min 取上清液, 使用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后, 置于样品瓶中待测。

HPLC 设定: 色谱柱为 Agilent 氨基柱 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm); 柱温为 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测器为示差检测器; 进样量为 10  $\mu\text{L}$ ; 流动相为乙腈: 水=70:30, 按照体积比混匀; 流速为 0.5 mL/min。

2) 乳酸含量的测定 样品前处理: 准确称取 0.5 g 样品于 10 mL 容量瓶中, 加入 0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  定容, 振荡 30 s, 8 000 $\times g$  离心 10 min, 取上清液, 使用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后, 置于样品瓶中待测。

HPLC 设定: 色谱柱为 ZorbaxSB-Aq 色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 150 mm); 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测器为紫外检测器; 进样量为 10  $\mu\text{L}$ ; 检测波长为 210 nm; 流动相为甲醇: 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 2.0)=3:97, 流速为 0.5 mL/min。

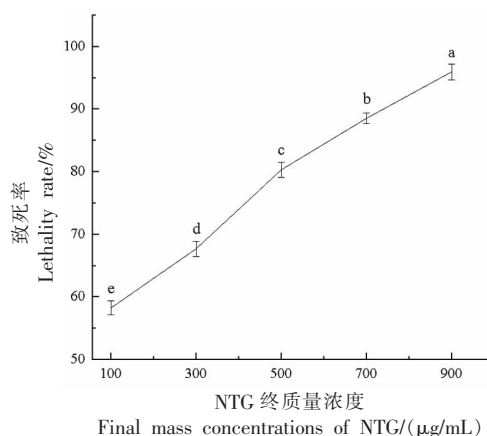
## 2 结果与分析

### 2.1 菌株诱变致死率的确定

采用不同质量浓度的 NTG 对嗜热链球菌 IMAU80809 进行诱变, 得到 NTG 对嗜热链球菌 IMAU80809 的致死率如图 1 所示。当 NTG 质量浓度为 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 致死率达到 88.5%。据报道, 当菌株致死率为 80%~90% 时, 筛选到的突变株正突变率较高<sup>[15-16]</sup>。因此确定 NTG 对嗜热链球菌 IMAU80809 的诱变质量浓度为 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.2 突变株的筛选

将嗜热链球菌 IMAU80809 经 NTG 诱变后, 在 1% 半乳糖-M17 培养基上划线, 培养 48 h 后, 从平皿上挑出形态不一、大小不同的 65 株突变



注: 不同小写字母表示不同质量浓度下致死率具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 1 不同 NTG 终质量浓度与嗜热链球菌 IMAU80809 致死率的关系

Fig.1 Relationship between different final concentrations of NTG and lethality of *S. thermophilus* IMAU80809

株, 依次编号为嗜热链球菌 IMAU80809-1, 2, 3, 4, …… , 64, 65。

2.2.1 生长密度与发酵时间 嗜热链球菌 IMAU80809 与 65 株突变株在 M17 培养基中的  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  值和全脂乳中的发酵时间如表 3 所示。与嗜热链球菌 IMAU80809 相比, 突变株嗜热链球菌 IMAU80809-5, 15, 20, 40, 42, 45, 47~50, 55~60, 63 的  $\text{OD}$  值较高, 发酵时间较短, 说明这些突变株在 M17 培养基和全脂乳中生长较快, 能代谢更多的乳糖。因此选择突变株嗜热链球菌 IMAU80809-5, 15, 20, 40, 42, 45, 47~50, 55~60, 63 检测与半乳糖代谢相关酶的活性。

表 3 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株的发酵时间及  $\text{OD}$  值

Table 3 The fermentation time and  $\text{OD}$  value of *S. thermophilus* IMAU80809 and mutant strains

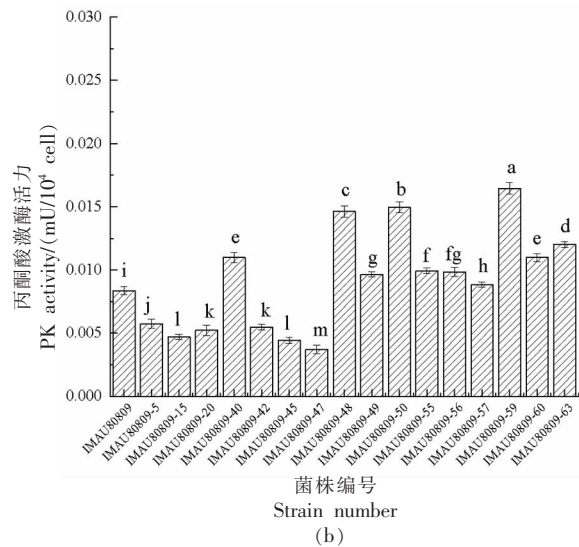
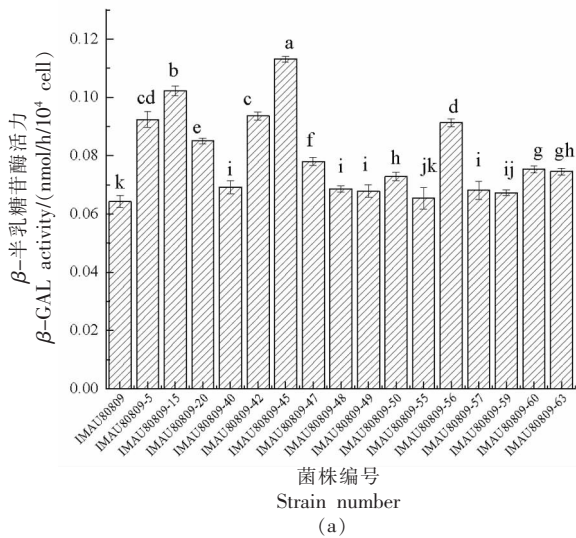
菌株编号	$\text{OD}_{600\text{nm}}$	发酵时间/h	菌株编号	$\text{OD}_{600\text{nm}}$	发酵时间/h	菌株编号	$\text{OD}_{600\text{nm}}$	发酵时间/h
IMAU80809	1.006 $\pm$ 0.008	8	IMAU80809-22	1.039 $\pm$ 0.010	7.5	IMAU80809-44	1.013 $\pm$ 0.018	8
IMAU80809-1	0.977 $\pm$ 0.012	8.5	IMAU80809-23	1.017 $\pm$ 0.015	7.5	IMAU80809-45	1.252 $\pm$ 0.029	7
IMAU80809-2	1.113 $\pm$ 0.016	8	IMAU80809-24	1.027 $\pm$ 0.021	7.5	IMAU80809-46	1.062 $\pm$ 0.018	8.5
IMAU80809-3	0.967 $\pm$ 0.017	8.5	IMAU80809-25	1.045 $\pm$ 0.008	7.5	IMAU80809-47	1.112 $\pm$ 0.009	7
IMAU80809-4	0.991 $\pm$ 0.009	8	IMAU80809-26	1.053 $\pm$ 0.017	7.5	IMAU80809-48	1.125 $\pm$ 0.020	7
IMAU80809-5	1.132 $\pm$ 0.039	7	IMAU80809-27	1.034 $\pm$ 0.013	8.5	IMAU80809-49	1.128 $\pm$ 0.025	7.2

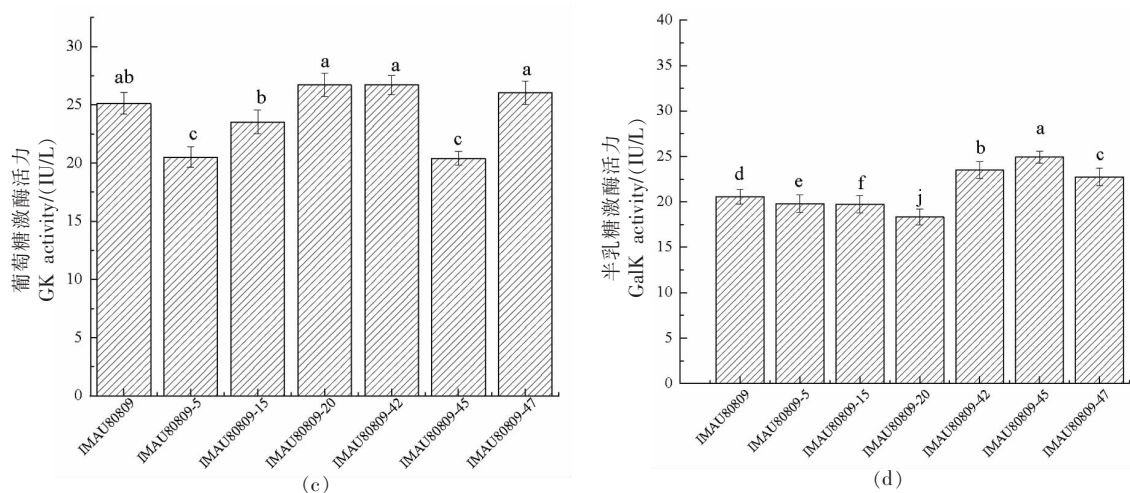
(续表 3)

菌株编号	OD <sub>600nm</sub>	发酵时间/h	菌株编号	OD <sub>600nm</sub>	发酵时间/h	菌株编号	OD <sub>600nm</sub>	发酵时间/h
IMAU80809-6	1.006 ± 0.012	9	IMAU80809-28	1.054 ± 0.012	7.5	IMAU80809-50	1.127 ± 0.030	7
IMAU80809-7	1.021 ± 0.010	8	IMAU80809-29	1.049 ± 0.012	7.5	IMAU80809-51	1.056 ± 0.016	8
IMAU80809-8	1.016 ± 0.017	8.5	IMAU80809-30	1.036 ± 0.013	8	IMAU80809-52	0.988 ± 0.006	8.5
IMAU80809-9	1.036 ± 0.010	8	IMAU80809-31	0.982 ± 0.013	8	IMAU80809-53	1.027 ± 0.022	7.5
IMAU80809-10	0.940 ± 0.018	8.5	IMAU80809-32	1.032 ± 0.010	8	IMAU80809-54	1.015 ± 0.021	7.5
IMAU80809-11	1.043 ± 0.013	8	IMAU80809-33	0.974 ± 0.012	8.5	IMAU80809-55	1.165 ± 0.025	7
IMAU80809-12	0.973 ± 0.021	8.5	IMAU80809-34	0.932 ± 0.017	8.5	IMAU80809-56	1.131 ± 0.022	7
IMAU80809-13	1.013 ± 0.016	8	IMAU80809-35	1.000 ± 0.010	8.5	IMAU80809-57	1.190 ± 0.017	7
IMAU80809-14	1.033 ± 0.015	8	IMAU80809-36	0.938 ± 0.017	8	IMAU80809-58	1.279 ± 0.022	7
IMAU80809-15	1.112 ± 0.005	7	IMAU80809-37	0.902 ± 0.010	9	IMAU80809-59	1.284 ± 0.023	7
IMAU80809-16	1.047 ± 0.017	7.5	IMAU80809-38	1.045 ± 0.013	7.5	IMAU80809-60	1.181 ± 0.020	7
IMAU80809-17	1.016 ± 0.015	8	IMAU80809-39	1.027 ± 0.025	8	IMAU80809-61	1.029 ± 0.021	8
IMAU80809-18	1.044 ± 0.016	7.5	IMAU80809-40	1.128 ± 0.034	7	IMAU80809-62	1.045 ± 0.022	7.5
IMAU80809-19	1.042 ± 0.013	8	IMAU80809-41	1.052 ± 0.016	7.5	IMAU80809-63	1.186 ± 0.019	7
IMAU80809-20	1.127 ± 0.034	7	IMAU80809-42	1.122 ± 0.033	7	IMAU80809-64	1.054 ± 0.022	8
IMAU80809-21	1.028 ± 0.017	8	IMAU80809-43	1.063 ± 0.010	7.5	IMAU80809-65	1.072 ± 0.021	7.5

2.2.2 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株与半乳糖代谢相关的酶活性测定 嗜热链球菌 I-MAU80809 及上述 17 株突变株的  $\beta$ -GAL、GK、PK 和 GalK 的活力检测结果如图 2 所示。 $\beta$ -GAL 能够水解乳糖, 酶的活性越高培养基中乳糖含量越低。PK 和 GK 是糖酵解途径中的关键酶, PK 可以将磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸, GK 催化葡萄糖磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖, 较低的活性能够减少葡萄糖的代谢量。GalK 能够催化半乳糖生成半乳糖-1-磷酸<sup>[17]</sup>。根据酶活性测定结果, 发现嗜热

链球菌 IMAU80809-45 中  $\beta$ -GAL 的活力为 0.11 nmol/h/10<sup>4</sup> cell、PK 的活力为 4.44 mU/10<sup>4</sup> cell、GK 的活力为 20.39 IU/L、GalK 的活力为 24.92 IU/L, 与嗜热链球菌 IMAU80809 的  $\beta$ -GAL、PK、GK、GalK 相比, IMAU80809-45 的  $\beta$ -GAL 与 GalK 活性更高, 能代谢更多的乳糖和半乳糖, GK 和 PK 活性偏低, 延缓了糖酵解速率, 因此选择突变株嗜热链球菌 IMAU80809-45 并更名为嗜热链球菌 IMAU80809Y。





注:不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

图 2 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株 β-GAL(a)、PK(b)、GK(c)、GalK(d)的活性

Fig.2 The activities of *S. thermophilus* IMAU80285 and its mutants β-GAL (a), PK (b), GK (c), GalK (d)

通过设计特异引物扩增嗜热链球菌 I-MAU80809 及其突变株 *lacZ*、*glck*、*pyk*、*galK* 的基因序列,结果如图 3 所示。与嗜热链球菌 I-MAU80809 相比,突变株的 4 种酶的基因序列均发生了不同程度的碱基替换。*lacZ* 基因在 18 位点上“C”突变为“T”;*pyk* 基因在 93 位点上“C”突变为“T”;

*glck* 基因在 625 位点上“C”突变为“T”;*galK* 基因在 168,180,220 位点上分别由“G、C、A”依次突变为“T、A、G”,说明经 NTG 诱变后,嗜热链球菌 IMAU80809 的 *lacZ*、*glck*、*pyk*、*galK* 的基因序列均发生了点突变,与原始菌株的基因序列相似性分别为 99.5%、98%、98.22%、94.34%。

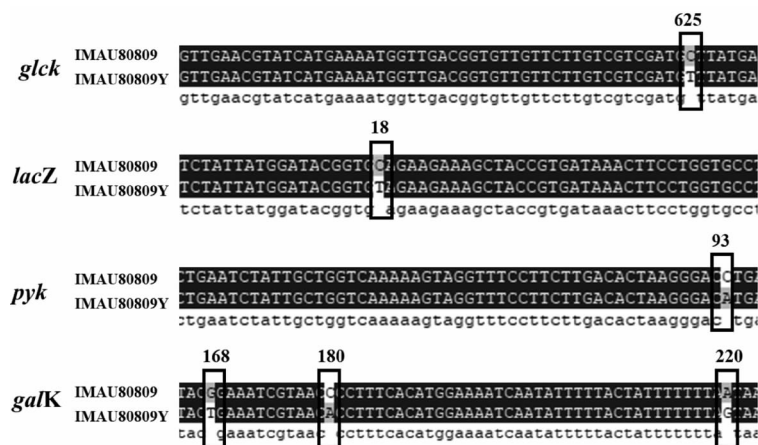


图 3 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株的 *glck*、*lacZ*、*pyk* 和 *galK* 基因序列比对结果

Fig.3 Sequence comparison results of *glck*, *lacZ*, *pyk* and *galK* genes between *S. thermophilus* IMAU80809 and mutant strain

### 2.3 嗜热链球菌 IMAU80809Y 遗传稳定性

经过诱变处理得到具有优良性状的菌株在连续传代和培养过程中容易发生退化,导致菌株丧失已获得的优良性状<sup>[18-20]</sup>。嗜热链球菌 IMAU80809Y 在 M17 培养基中连续传代 10 代,每一代的 β-GAL、GK、PK 和 GalK 活性检测结果如表 4 所示。

结果表明在连续传代过程中,β-GAL、GK、PK 和 GalK 活性基本稳定,变化无显著差异(P < 0.05),说明嗜热链球菌 IMAU80809Y 经 NTG 诱变后具有良好的遗传稳定性,可用于发酵乳制品的工业化生产。

表4 嗜热链球菌 IMAU80809Y 和半乳糖代谢相关酶的遗传稳定性

Table 4 Genetic stability of enzymes associated with galactose metabolism in *S. thermophilus* IMAU80809Y

传代数	$\beta$ -GAL/(nmol/h/10 <sup>4</sup> cell)	GK/(IU/L)	PK/(mU/10 <sup>4</sup> cell)	GalK/(IU/L)
1	0.11 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.28 ± 0.47 <sup>b</sup>	4.44 ± 0.23 <sup>c</sup>	24.96 ± 0.42 <sup>d</sup>
2	0.12 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.17 ± 0.62 <sup>b</sup>	4.25 ± 0.18 <sup>c</sup>	24.89 ± 0.50 <sup>d</sup>
3	0.11 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.39 ± 0.59 <sup>b</sup>	4.39 ± 0.25 <sup>c</sup>	24.92 ± 0.67 <sup>d</sup>
4	0.12 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.35 ± 0.47 <sup>b</sup>	4.34 ± 0.15 <sup>c</sup>	24.88 ± 0.61 <sup>d</sup>
5	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	20.42 ± 0.61 <sup>b</sup>	4.31 ± 0.25 <sup>c</sup>	24.93 ± 0.84 <sup>d</sup>
6	0.11 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.35 ± 0.26 <sup>b</sup>	4.44 ± 0.27 <sup>c</sup>	24.84 ± 0.51 <sup>d</sup>
7	0.11 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.37 ± 0.55 <sup>b</sup>	4.44 ± 0.35 <sup>c</sup>	24.99 ± 0.57 <sup>d</sup>
8	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	20.21 ± 0.29 <sup>b</sup>	4.39 ± 0.21 <sup>c</sup>	24.92 ± 0.73 <sup>d</sup>
9	0.12 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.33 ± 0.45 <sup>b</sup>	4.34 ± 0.21 <sup>c</sup>	24.88 ± 0.65 <sup>d</sup>
10	0.12 ± 0.00 <sup>a</sup>	20.37 ± 0.78 <sup>b</sup>	4.33 ± 0.36 <sup>c</sup>	24.93 ± 0.65 <sup>d</sup>

注:不同小写字母表示不同代次菌株对应酶活力具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

## 2.4 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中与半乳糖代谢关键产物的分析结果

在发酵与贮藏期间,嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中乳糖、半乳糖和葡萄糖及乳酸的含量如表 5 所示。在发酵 0 h 时,嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中乳糖含量分别为 4.814 g/100 g 和 4.859 g/100 g,在贮藏 14 d 时,分别降至 2.665 g/100 g 和 2.066 g/100 g,突变株相较

嗜热链球菌 IMAU80809 多代谢了 0.599 g/100 g 乳糖,说明突变株代谢乳糖的能力显著高于嗜热链球菌 IMAU80809( $P < 0.05$ )。

在发酵与贮藏期间,嗜热链球菌 IMAU80809 发酵乳中半乳糖含量不断积累,在贮藏 14 d 时,从最初的 0 g/100 g 增加到 0.595 g/100 g,而在突变株发酵乳中半乳糖含量在贮藏 1 d 时达到峰值,随后开始下降,表明突变株代谢半乳糖的能力

表5 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中乳酸、乳糖、半乳糖和葡萄糖含量的变化

Table 5 Changes of lactic acid, lactose, galactose and glucose in fermented milk

of *S. thermophilus* IMAU80809 and mutant strains

时间	乳糖/(g/100 g)		半乳糖/(g/100 g)		葡萄糖/(g/100 g)		乳酸/(g/100 g)	
	原始株	突变株	原始株	突变株	原始株	突变株	原始株	突变株
0 h	4.814 ± 0.077 <sup>b</sup>	4.859 ± 0.017 <sup>a</sup>	—	—	—	—	—	—
3 h	4.508 ± 0.127 <sup>b</sup>	4.257 ± 0.043 <sup>a</sup>	0.153 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.181 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.096 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.192 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.217 ± 0.032 <sup>a</sup>	0.197 ± 0.005 <sup>b</sup>
6 h	3.993 ± 0.078 <sup>b</sup>	3.541 ± 0.092 <sup>a</sup>	0.343 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.386 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.161 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.313 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.630 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.645 ± 0.007 <sup>a</sup>
0 d	3.415 ± 0.024 <sup>b</sup>	2.701 ± 0.028 <sup>a</sup>	0.471 ± 0.049 <sup>b</sup>	0.480 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.199 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.495 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.728 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.784 ± 0.009 <sup>a</sup>
1 d	3.006 ± 0.055 <sup>b</sup>	2.511 ± 0.060 <sup>a</sup>	0.508 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.530 ± 0.005 <sup>a</sup>	—	0.444 ± 0.001	0.751 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.881 ± 0.017 <sup>a</sup>
3 d	2.834 ± 0.043 <sup>b</sup>	2.267 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.560 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.501 ± 0.003 <sup>b</sup>	—	0.465 ± 0.006	0.875 ± 0.017 <sup>b</sup>	0.981 ± 0.016 <sup>a</sup>
7 d	2.719 ± 0.014 <sup>b</sup>	2.160 ± 0.069 <sup>a</sup>	0.586 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.439 ± 0.021 <sup>b</sup>	—	0.470 ± 0.004	0.831 ± 0.011 <sup>b</sup>	1.084 ± 0.004 <sup>a</sup>
14 d	2.665 ± 0.047 <sup>b</sup>	2.066 ± 0.105 <sup>a</sup>	0.595 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.387 ± 0.012 <sup>b</sup>	—	0.463 ± 0.006	0.803 ± 0.023 <sup>b</sup>	0.956 ± 0.012 <sup>a</sup>

注:—,未检出( $P < 0.02$ );不同小写字母表示同种物质、同一时间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

显著高于嗜热链球菌 IMAU80809 ( $P < 0.05$ )。

嗜热链球菌 IMAU80809 发酵乳中葡萄糖的含量仅在发酵 3, 6 h 和贮藏 0 d 时被少量检出, 而突变株发酵乳在发酵和贮藏期间均检出葡萄糖, 特别是在贮藏 (0, 1, 3, 7, 14 d) 时葡萄糖含量较高 (0.444~0.4954 g/100 g), 这可能是因为 NTG 诱变致使菌株代谢途径发生改变, 能够分泌更多的葡萄糖至发酵乳中。

在发酵和贮藏期间, 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中乳酸含量均呈上升趋势, 而突变株发酵乳中乳酸含量明显高于原始株, 说明与嗜热链球菌 IMAU80809 相比, 突变株产酸速度更快 ( $P < 0.05$ )。

## 2.5 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中 pH 值、TA、黏度、WHC 及活菌数的变化

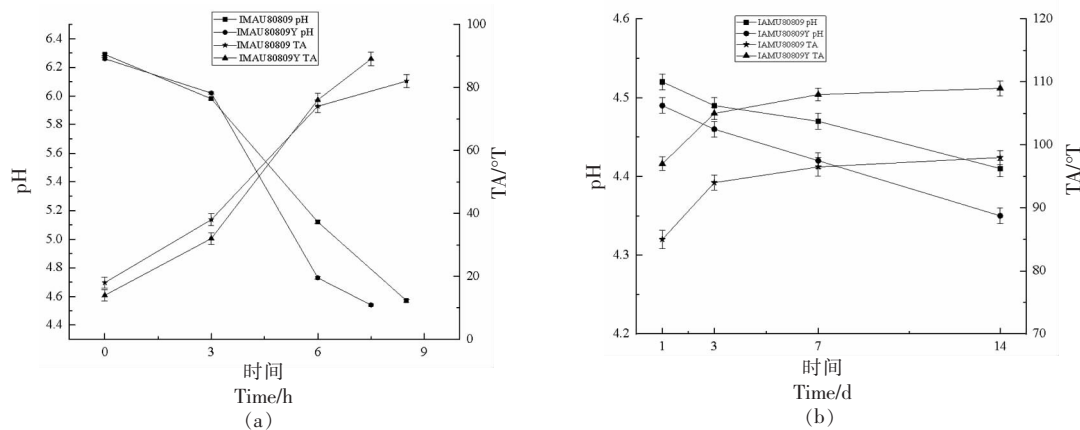


图 4 在发酵(a)和贮藏(b)期间嗜热链球菌 IMAU80809 及其突变株发酵乳中 pH 值、TA 的变化情况

Fig.4 Changes of pH and TA in fermented milk of *S. thermophilus* IMAU80809 and its mutant during fermentation (a) and storage (b)

**2.5.2 黏度** 黏度是影响酸奶口感与质地的重要指标之一。嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳在发酵期间和贮藏期间黏度检测结果如图 5 所示。发酵过程中, 样品黏度随发酵时间的延长而增大, 在发酵终点时, 突变株发酵乳黏度为 985 mPa·s, 嗜热链球菌 IMAU80809 黏度为 825 mPa·s, 在贮藏 14 d 时, 突变株发酵乳黏度高达 1 724 mPa·s, 而嗜热链球菌 IMAU80809 发酵乳黏度仅为 1 504 mPa·s, 说明与嗜热链球菌 IMAU80809 相比, 突变株具有良好的产黏特性。

**2.5.3 持水力** 持水力能够反映凝胶网络的致密

**2.5.1 pH 值与 TA 产酸能力** 是衡量乳酸菌生产特性的重要指标之一。在发酵和贮藏期间, 嗜热链球菌 IMAU80809 及其突变株发酵乳中 pH 值和 TA 检测结果如图 4 所示。与嗜热链球菌 IMAU80809 相比, 突变株发酵乳中的 pH 值在较短的时间内 (7.5 h) 达到发酵终点, 特别在发酵 3~6 h 时, 突变株发酵乳的 pH 值迅速下降, 而 TA 上升, 说明该突变株在此期间的产酸能力高于嗜热链球菌 IMAU80809。嗜热链球菌 IMAU80809 及其突变株发酵乳在贮藏期间, pH 值均呈下降趋势, 在贮藏 14 d 时, 嗜热链球菌 IMAU80809 发酵乳的 pH 值为 4.41, 而突变株发酵乳的 pH 值为 4.35, 说明贮藏期间突变株的产酸能力高于嗜热链球菌 IMAU80809, 类似的结果在 TA 的变化曲线中也有发现。

性与稳定性, 增加样品的 WHC 可改善质地, 减少协同作用, 便于贮存<sup>[21]</sup>。由图 6 可知, 在发酵过程中, 突变株发酵乳的持水力始终优于嗜热链球菌 IMAU80809。

**2.5.4 活菌计数结果** 嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中活菌数的变化情况如图 7 所示。在发酵期间, 突变株发酵乳中的活菌数较嗜热链球菌 IMAU80809 增长幅度更大, 在贮藏 3 d 时, 达到 9.31 lg(CFU/mL), 高于嗜热链球菌 IMAU80809 的最大活菌数 9.29 lg(CFU/mL)。



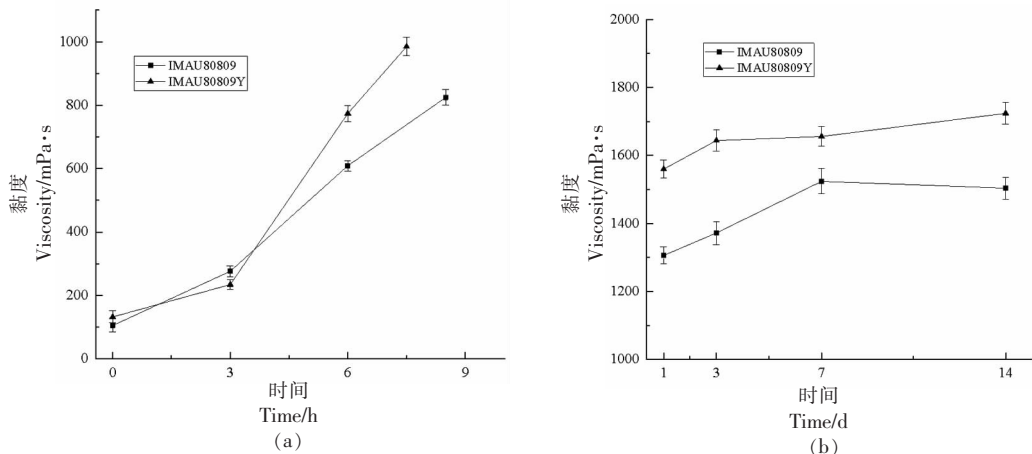


图 5 在发酵(a)和贮藏(b)期间嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中黏度的变化情况  
 Fig.5 Changes of viscosity in fermented milk of *S. thermophilus* IMAU80809 and mutant strains during fermentation (a) and storage (b)

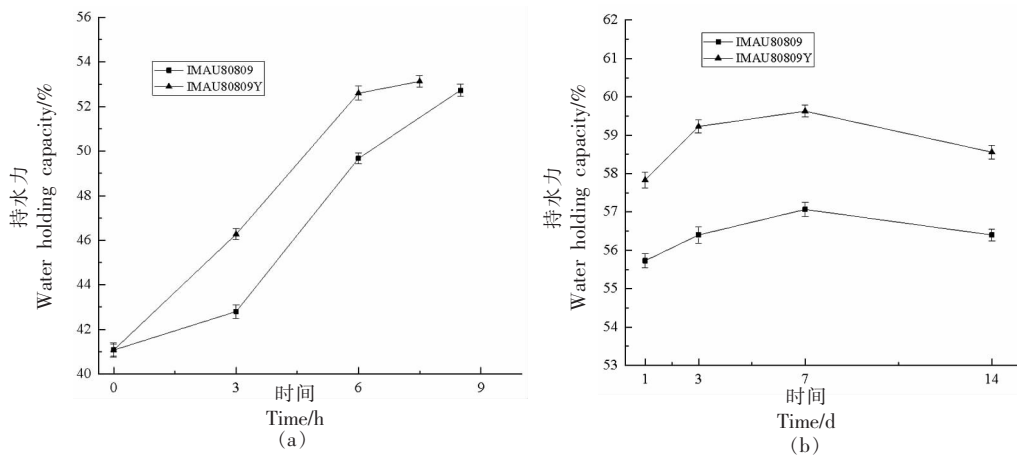


图 6 在发酵(a)和贮藏(b)期间嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳中 WHC 的变化情况  
 Fig.6 Changes of WHC in fermented milk of *S. thermophilus* IMAU80809 and mutant strains during fermentation (a) and storage (b)

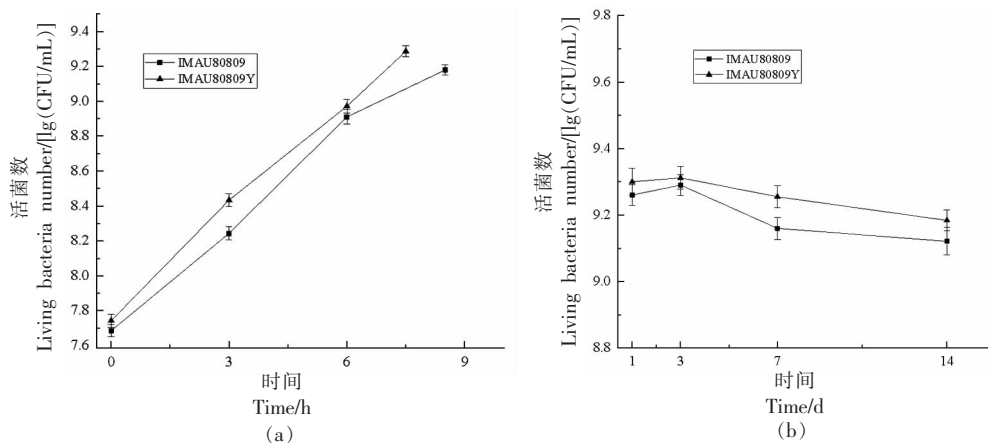


图 7 在发酵(a)和贮藏(b)期间嗜热链球菌 IMAU80809 及突变株发酵乳活菌数的变化情况  
 Fig.7 Changes of viable bacteria count in fermented milk of *S. thermophilus* IMAU80809 and mutant strains during fermentation (a) and storage (b)

### 3 讨论与结论

嗜热链球菌作为乳源型菌株,相较于葡萄糖更偏好于利用牛奶中的乳糖<sup>[22]</sup>。嗜热链球菌具有编码 Leloir 途径所需酶的完整基因,而大多数嗜热链球菌仍然不能利用半乳糖<sup>[23]</sup>,只能代谢乳糖分解后的葡萄糖部分,将半乳糖分泌到乳中。本研

究通过对嗜热链球菌 IMAU80809 进行 NTG 诱变,筛选出 1 株可代谢半乳糖的突变株嗜热链球菌 IMAU80809Y,研究发现该突变株相较于嗜热链球菌 IMAU80809 具有更高的  $\beta$ -GAL 和 GalK 活性和较低的 GK 和 PK 活性,且代谢乳糖/半乳糖的能力强于原始株。

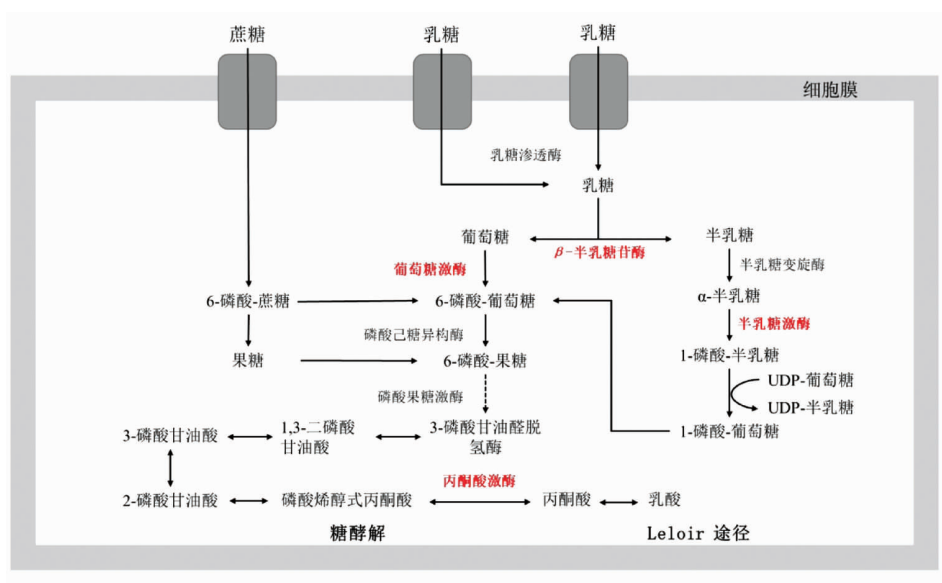


图 8 嗜热链球菌的糖代谢途径

Fig.8 The sugar metabolism pathway of *S. thermophilus*

如图 8 所示,在嗜热链球菌的糖代谢途径中, $\beta$ -GAL 将乳糖转化为葡萄糖和半乳糖,影响培养基中葡萄糖和半乳糖的生成量<sup>[24]</sup>。本试验中酶活性检测结果(图 2)和 HPLC 的分析结果(表 5)证明,嗜热链球菌 IMAU80809 经 NTG 诱变后,具有较高的  $\beta$ -GAL 活性,能消耗更多的乳糖生成葡萄糖和半乳糖。葡萄糖经过糖酵解途径(EMP)生成丙酮酸,其中葡萄糖激酶是葡萄糖磷酸化过程的关键酶<sup>[25]</sup>。与嗜热链球菌 IMAU80809 相比,突变株的 GK 活性(20.39 IU/L)较低,导致更多的葡萄糖在培养基中积累(表 5)。PK 能将磷酸烯醇式丙酮酸催化生成烯醇式丙酮酸,烯醇式丙酮酸不稳定,自动分解为丙酮酸。在牛乳发酵过程中突变株 PK 活性较低,降低了糖酵解速率,延缓了葡萄糖的分解速率。半乳糖通过 Leloir 途径(将  $\alpha$ -D-半乳糖转化为葡萄糖-1-磷酸的代谢途径)进行代谢,其中 GalK 是 Leloir 途径中的关键酶<sup>[26]</sup>。突变株的 GalK 活力(24.92 IU/L)较高,能够提高半乳糖

的分解速度,在发酵过程中能代谢更多的半乳糖(表 5)。

化学诱变是一种操作简便且高效的育种方法,能够加速微生物的进化<sup>[27]</sup>。Thomas 等<sup>[28]</sup>利用 NTG 诱变发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*),获得能够产生更多乳酸的突变株。Zhao 等<sup>[29]</sup>使用紫外线照射和 NTG 对植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)进行复合诱变,得到 1 株黏附力较高的突变株。本试验中嗜热链球菌 IMAU80809 经 NTG 诱变后,与半乳糖代谢途径相关的 *lacZ*, *glck*, *pyk* 和 *galK* 均发生了突变(图 3),说明利用 NTG 诱变菌株能够使与半乳糖代谢相关基因序列发生改变。

发酵是一种能够增加食品营养价值与风味的食品保存技术<sup>[30]</sup>。产酸能力是评价菌株可否作为发酵剂的关键指标,而 pH 和 TA 值则直观地反映了菌株的生长状态和生存能力<sup>[31]</sup>。在发酵与贮藏期间,嗜热链球菌 IMAU80809Y 的产酸能力明显

高于诱变株(图4),导致其发酵乳的黏度和持水力始终优于原始株(图5、图6),这主要是因为与原始株相比,诱变株能产生更多的乳酸,迅速降低发酵乳酸度,使酪蛋白发生絮凝,从而提升发酵乳的黏度和持水力<sup>[32]</sup>。活菌数是发酵乳中重要的检测指标,在牛乳发酵过程中,随着pH值的不断降低,乳酸菌会形成酸应激反应机制,会逐渐适应在酸胁迫条件下生存,使活菌数可以保持稳定状态<sup>[33]</sup>。本试验中,与嗜热链球菌 IMAU80809 相比,突变株在发酵与贮藏期间均保持较高活菌数(图7)。

本试验发现适当质量浓度的 NTG 处理嗜热链球菌 IMAU80809 后,能够引起菌株和半乳糖代谢相关酶的基因序列发生改变,导致突变株发酵乳中乳酸和葡萄糖含量增多,乳糖和半乳糖含量减少。同时,该突变株作为发酵剂生产发酵乳时,能够缩短发酵乳的凝乳时间,增加持水力与黏度,改善产品质地,提高产品中的活菌数,为生产低半乳糖发酵乳制品提供理论依据。

### 参 考 文 献

- [1] YERLIKAYA O, SAYGILI D, AKPINAR A. Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures[J]. Food Science and Technology, 2020, 41: 418–425.
- [2] QI X, TESTER R F. Lactose, maltose and sucrose in health and disease[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2020, 64(8): 1901082.
- [3] GUNNEWIJK M G W, BOGAARD P T C V D, VEENHOFF L M, et al. Hierarchical control versus autoregulation of carbohydrate utilization in bacteria[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2001, 3(3): 401.
- [4] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 98–112, 122–125.  
GUO B H. Probiotics[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 98–112, 122–125.
- [5] WU Q, SHAH N P. The potential of species-specific tagatose-6-phosphate (T6P) pathway in *Lactobacillus casei* group for galactose reduction in fermented dairy foods[J]. Food Microbiology, 2017, 62: 178–187.
- [6] WU Q, CHEUNG C K W, SHAH N P. Towards galactose accumulation in dairy foods fermented by conventional starter cultures: Challenges and strategies[J]. Trends in Food Science and Technology, 2015, 41(1): 24–36.
- [7] 薄永恒, 王亮, 杨修镇, 等. 发酵微生物筛选育种技术研究概述[J]. 山东畜牧兽医, 2020, 41(11): 78–79.  
BO Y H, WANG L, YANG X Z, et al. Overview of screening and breeding technology of fermenting microorganisms[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2020, 41(11): 78–79.
- [8] KHUSHBOO, DUBEY K K. Enhanced production of lipstatin through NTG treatment of *Streptomyces toxytricini* KD18 at 5 L bioreactor level[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195(11): 6881–6892.
- [9] OHNISHI J, MIZOGUCHI H, TAKENO S. Characterization of mutations induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in an industrial *Corynebacterium glutamicum* strain[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2008, 649(1/2): 239–244.
- [10] MARC H, CHRISTOPHER J L. Genome-wide analysis of mutagenesis bias and context sensitivity of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG)[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2012, 731(2): 64–67.
- [11] BENATEYA A, BRACQUART P, LINDEN G. Galactose-fermenting mutants of *Streptococcus thermophilus*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2011, 37(2): 136–140.
- [12] GE X Y, YUAN J, QIN H, et al. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(1): 73–78.
- [13] 靳汝霖. 具有优良发酵特性嗜热链球菌的筛选及其发酵乳中关键性风味物质的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.  
JIN R L. Screening of *Streptococcus thermophilus* with excellent fermentation characteristics and study on key flavor substances in fermented milk[D]. Ho-

- hhot; Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 食品酸度的测定: GB 5009.239-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 2-9.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. Food acidity determination: GB 5009.239-2016 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 2-9.
- [15] 马春丽, 张兰威. 紫外亚硝基胍复合诱变选育高产酸乳酸菌[J]. 中国酿造, 2010(8): 117-119.  
MA C L, ZHANG L W. Breeding of lactic acid bacteria with high acid yield by UV nitrosoguanidine compound mutation [J]. China Brewing, 2010 (8): 117-119.
- [16] 韩龙, 阮国祥, 马杰希, 等. 维生素 B<sub>12</sub> 生产菌的化学诱变和抗生素抗性筛选[J]. 精细与专用化学品, 2019, 27(1): 36-39.  
HAN L, RUAN G X, MA J X, et al. Chemical mutagenesis and antibiotic resistance screening of vitamin B<sub>12</sub> producing strains[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2019, 27(1): 36-39.
- [17] WANG J, JIANG Y, YU P, et al. Effect of carbon catabolite repression on lactose and galactose catabolism in *Lactocaseibacillus paracasei* [J]. Food Bioscience, 2021, 40: 100912.
- [18] BACHMANN H, MOLENAAR D, SANTOS F B D, et al. Experimental evolution and the adjustment of metabolic strategies in lactic acid bacteria[J]. Fems Microbiology Reviews, 2017, 41(1): 201-219.
- [19] TACIAK B, BIAŁASEK M, BRANIEWSKA A, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0198943.
- [20] ISKANDAR C F, CAILLIEZ-GRIMAL C, BORGES F, et al. Review of lactose and galactose metabolism in lactic acid bacteria dedicated to expert genomic annotation[J]. Trends in Food Science and Technology, 2019, 88: 121-132.
- [21] HAVMAND P U, ZACHARIASSEN L G, IPSEN R, et al. Measurement of water-holding capacity in fermented milk using near-infrared spectroscopy combined with chemometric methods [J]. Journal of Dairy Research, 2022, 89(2): 194-200.
- [22] CUI Y H, XU T T, QU X J, et al. New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1701.
- [23] ANBUKKARASI K, NANDA D K, UMAMAHESWARI T, et al. Assessment of expression of Leloir pathway genes in wild-type galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* by real-time PCR [J]. European Food Research and Technology, 2014, 239(5): 895-903.
- [24] LU L, GUO L C, WANG K, et al.  $\beta$ -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates [J]. Biotechnology Advances, 2019, 39: 107465.
- [25] XU J Z, RUAN H Z, YU H B, et al. Metabolic engineering of carbohydrate metabolism systems in *Corynebacterium glutamicum* for improving the efficiency of L-lysine production from mixed sugar [J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 1-15.
- [26] 李秀梅, 陈中健, 晏石娟, 等. 植物  $\alpha$ -半乳糖苷酶的进化及功能研究进展 [J]. 广东农业科学, 2022, 49(11): 138-151.  
LI X M, CHEN Z J, YAN S J, et al. Research progress on the evolution and function of plant  $\alpha$ -galactosidase [J]. Guangdong Agricultural Science, 2022, 49(11): 138-151.
- [27] YU Q H, LI Y C, WU B, et al. Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: Advances and prospects [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(4): 1517-1531.
- [28] THOMAS B T, AGU G C, MAKANJUOLA S O, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus fermentum* for improved production of lactic acid [J]. American Journal of Research, 2014, 2: 245-250.
- [29] ZHAO Y, DUAN C, GAO L, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus plantarum* C88 improves adhesion [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2017, 81(1): 184-193.
- [30] MACORI G, COTTER P D. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 172-178.
- [31] AYENSU I, BEKOE S O, ADU J K, et al. Evaluation of acid neutralising and buffering capacities of selected antacids in Ghana [J]. Scientific African, 2020, 8: 347.
- [32] CORTEZ-TREJO M C, GAYTAN-MARTINEZ M, REYES-VEGA M L, et al. Protein-gum-based gels: Effect of gum addition on microstructure, rheological properties, and water retention capacity [J]. Trends in Food Science and Technology, 2021,

116: 303–317.

- [33] BREYER G M, ARECHAVALETA N N, SIQUEIRA F M, et al. Characterization of lactic acid bacteria in raw buffalo milk: A screening for novel probiotic

candidates and their transcriptional response to acid stress [J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13: 468–483.

### Breeding and Fermentation Characteristics of Galactose Mutant Strains of *Streptococcus thermophilus*

HE Binbin<sup>1,2,3</sup>, TAI Jiahui<sup>1,2,3</sup>, LU Wenhui<sup>1,2,3</sup>, CUI Xinrui<sup>1,2,3</sup>, DAN Tong<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering (IMAU), Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

<sup>2</sup>Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018

<sup>3</sup>Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

**Abstract** *Streptococcus thermophilus* is often used as a starter culture in the production of fermented dairy products. In this study, *S. thermophilus* IMAU80809 was selected as the research object and subjected to mutagenesis treatment with nitrosoguanidine (NTG). Through the determination of enzyme activities related to galactose metabolism and gene sequence alignment analysis, a mutant strain capable of efficiently metabolizing galactose, *S. thermophilus* IMAU80809Y, was screened out. On this basis, fermented milk of *S. thermophilus* IMAU80809 and its mutant strain was prepared, and the changes in pH value, titratable acidity, viscosity, water-holding capacity, viable cell count, and key metabolites were analyzed in detail. The results showed that compared with the wild type strain, the curdling time of the mutant strain's fermented milk was shortened to 7 h. The activities of  $\beta$ -galactosidase and galactokinase increased by 76.16% and 21.13% respectively. While the activities of pyruvate kinase and glucokinase decreased by 46.89% and 18.83% respectively. In addition, the metabolic amounts of lactose and galactose by the mutant strain increased by 0.599 g/100 g and 0.208 g/100 g respectively. These results indicate that the ability of the mutant strain to metabolize lactose and galactose was significantly higher than that of the wild-type strain. This study provides a theoretical basis for the production of low-galactose fermented dairy products.

**Keywords** *Streptococcus thermophilus*; nitrosoguanidine; mutagenesis; galactose