



可代谢半乳糖嗜热链球菌的诱变选育及其在发酵乳生产中的应用

何艳艳, 邵佳慧, 卢纹慧, 崔欣蕊, 丹彤*

内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

何艳艳, 邵佳慧, 卢纹慧, 崔欣蕊, 丹彤. 可代谢半乳糖嗜热链球菌的诱变选育及其在发酵乳生产中的应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1436-1454.

HE Yanyan, TAI Jiahui, LU Wenhui, CUI Xinrui, DAN Tong. *Streptococcus thermophilus* capable of metabolizing galactose: mutagenesis and application in production of fermented milk[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1436-1454.

摘要:【目的】嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)作为酸奶、奶酪等发酵乳制品的常用发酵剂,在乳品工业中应用广泛。大多数嗜热链球菌为半乳糖阴性(Gal⁻)菌株,不能代谢半乳糖而将其排出到胞外,导致发酵乳中半乳糖含量增加。因此可通过化学诱变的方法处理嗜热链球菌,使其可代谢半乳糖,开发一种低半乳糖含量的发酵乳。【方法】利用亚硝基胍(nitrosoguanidine, NTG)对嗜热链球菌 IMAU80846 进行诱变处理,测定野生株嗜热链球菌 IMAU80846 与突变株 β-半乳糖苷酶(β-galactosidase, β-Gal)、半乳糖激酶(galactokinase, GalK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)和葡萄糖激酶(glucokinase, GK)活性,分析编码这些酶的氨基酸序列,得到一株可代谢半乳糖的嗜热链球菌 IMAU80846Y,同时对突变株进行全基因组测序,并检测野生株和突变株发酵乳中乳酸、乳糖、半乳糖和葡萄糖的含量,最后将野生株和突变株分别与德氏乳杆菌保加利亚亚种 IMAU20450 进行复配发酵,测定两组发酵乳在发酵与贮藏期间的发酵特性,制备一款低半乳糖含量的发酵乳。【结果】突变株嗜热链球菌 IMAU80846Y 的 β-Gal、GalK 活性高于野生株,PK 和 GK 活性低于野生株,氨基酸序列与全基因组测序结果表明突变株与糖代谢有关基因发生突变,HPLC 检测结果表明突变株发酵乳中乳糖、半乳糖的含量均低于野生株,而乳酸、葡萄糖的含量高于野生株。发酵特性的分析结果表明,与野生株复配组相比,突变株复配组发酵乳具有良好的滴定酸度、活菌数、黏度以及持水力。【结论】嗜热链球菌 IMAU80846 经 NTG 诱变后,菌株代谢半乳

资助项目: 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2022MS03013); 国家自然科学基金(32072235)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2022MS03013) and the National Natural Science Foundation of China (32072235).

*Corresponding author. E-mail: dantong813218@aliyun.com

Received: 2023-10-08; Accepted: 2024-02-22; Published online: 2024-02-26

糖的能力发生了变化, 利用该突变株可生产一款低半乳糖含量的发酵乳。

关键词: 嗜热链球菌; 亚硝基胍诱变; 半乳糖代谢; 发酵乳

***Streptococcus thermophilus* capable of metabolizing galactose: mutagenesis and application in production of fermented milk**

HE Yanyan, TAI Jiahui, LU Wenhui, CUI Xinrui, DAN Tong*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

Abstract: [Objective] *Streptococcus thermophilus* is widely used in the dairy industry as a common starter for fermented dairy products such as yogurt and cheese. Most strains of *S. thermophilus* are galactose-negative (Gal⁻) and unable to metabolize galactose and excrete it extracellularly, which results in an increase in the galactose content in fermented milk. *S. thermophilus* can be treated by chemical mutagenesis to metabolize galactose and then used to develop the fermented milk products with low galactose content. [Methods] We used nitrosoguanidine (NTG) to induce the mutation of *S. thermophilus* IMAU80846. Furthermore, we measured the activities of β -galactosidase (β -Gal), galactokinase (GalK), pyruvate kinase (PK), and glucokinase (GK) in the wild-type and mutant strains of *S. thermophilus* IMAU80846 and analyzed the amino acid sequences encoding these enzymes. *S. thermophilus* IMAU80846Y that could metabolize galactose was obtained. We performed whole genome sequencing of the mutant strain and measured the content of lactic acid, lactose, galactose, and glucose in the fermented milk products produced with the wild-type strain and the mutant strain. We then compounded the wild-type strain and the mutant strain with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMAU20450, respectively, and characterized the two groups of fermented milk products during fermentation and storage. Finally, we prepared a fermented milk product with low galactose content. [Results] *S. thermophiles* IMAU80846Y had higher activities of β -Gal and GalK and lower activities of PK and GK than the wild-type strain. The amino acid sequences and whole genome sequences showed that the mutant strain had mutations in the genes involved in carbohydrate metabolism. The HPLC results showed that the fermented milk produced with the mutant strain had lower content of lactose and galactose and higher content of lactic acid and glucose than that produced with the wild-type strain. Compared with the compound group with the wild-type strain, the compound group with the mutant strain improved the titration acidity, viable cell count, viscosity, and water holding capacity of fermented milk. [Conclusion] The mutagenesis with NTG changed the ability of *S. thermophilus* IMAU80846 to metabolize galactose, and the mutant strain could be used to produce the

fermented milk with low galactose content.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*; mutagenesis with nitrosoguanidine; galactose metabolism; fermented milk

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)作为酸奶、奶酪等发酵乳制品的常用发酵剂,在乳品工业中应用广泛^[1-2]。嗜热链球菌能够代谢多种碳水化合物,但更偏向于乳糖,它可以通过糖酵解途径将乳糖迅速转化为乳酸^[3-4]。Leloir途径是嗜热链球菌利用半乳糖的唯一途径^[5],大多数嗜热链球菌为半乳糖阴性(Gal⁻)菌株,在乳糖被 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -Gal)转运和裂解后,优先代谢其中的葡萄糖,而半乳糖则被排出到胞外^[6],发酵乳制品中半乳糖含量的增加会降低产品的质量。

根据诱变剂的性质,诱变可分为物理诱变和化学诱变^[7]。化学诱变具有成本低、使用方便、诱变作用专一性强等特点,目前已广泛应用于细菌^[8-10]。化学诱变剂亚硝基胍(nitrosoguanidine, NTG)是烷化剂的一种,具有“超诱变剂”之称,它主要在DNA链的复制区引起GC \rightarrow AT的转换,在致死率很低的条件下也可使微生物产生高频率的突变^[11]。Benateya等^[12]利用NTG处理嗜热链球菌菌株CNRZ302后筛选出3个半乳糖阳性(Gal⁺)突变体,其中A70突变体代谢乳糖能力明显高于野生株。高兆建等^[13]采用NTG和微波辐照诱变嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) XG24,获得一株高产 β -Gal菌株XGN52,其产酶量比野生株提高了115.92%,最大产酶量达到31.59 U/mL。

本研究以一株发酵特性良好的嗜热链球菌IMAU80846为野生株^[14],利用适当浓度的NTG进行诱变处理,通过测定野生株和突变株中 β -Gal、半乳糖激酶(galactokinase, GalK)、葡萄糖激酶(glucokinase, GK)、丙酮酸激酶(pyruvate

kinase, PK)的活性,并对编码这些酶的氨基酸序列进行比对分析,筛选出可代谢半乳糖的突变株。在此基础上,以嗜热链球菌IMAU80846和突变株为发酵剂生产发酵乳,分析在发酵和贮藏期间产品中乳糖、半乳糖、葡萄糖和乳酸的含量。最后,利用嗜热链球菌IMAU80846和突变株分别与德氏乳杆菌保加利亚亚种IMAU20450复配发酵生产发酵乳,探讨牛乳发酵和贮藏期间pH值、滴定酸度、黏度、持水力和活菌数的变化趋势,为生产低半乳糖含量的发酵乳制品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究所用菌株由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室乳酸菌菌种资源库(Lactic Acid Bacteria Collection Center, LABCC)提供。

1.2 培养基和主要试剂

M17培养基(g/L):大豆蛋白胨5.0,细菌学蛋白胨2.5,酪蛋白胨2.5,酵母浸粉2.5,牛肉膏5.0,乳糖5.0,硫酸镁0.25, L-抗坏血酸钠0.5, β -甘油磷酸二钠五水合物19.0, 121 °C灭菌15 min。

M17半乳糖培养基:在M17培养基基础上将0.5%乳糖替换为1%半乳糖。

生理盐水:0.85%氯化钠与蒸馏水混合配制而成, 121 °C灭菌15 min。

β -Gal、PK活性检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司; GalK、GK活性检测试剂盒,江苏酶免实业有限公司;细菌基因组DNA提取

试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 主要仪器

电子天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, TOMY 公司; 电热恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 多功能酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; PCR 仪, ThermoFisher Scientific 公司; 高效液相色谱仪, Agilent Technologies 公司; 高压均质机, 上海申鹿均质机有限公司; 高速离心机, Eppendorf 公司。

1.4 菌株活化

以 2% 接种量将于 -80 °C 保藏的嗜热链球菌 IMAU80846 接种于 M17 液体培养基中, 42 °C 静置培养 24 h, 连续传代培养 3 次, 使菌株活力达到最高。

1.5 菌株诱变

1.5.1 NTG 母液的配制

准确称取 NTG 50 mg, 按照 NTG:丙酮=10 mg:1 mL 加入丙酮进行溶解, 得到 10 mg/mL 的 NTG 丙酮溶液。

取上述 NTG 丙酮溶液 1 mL, 以 NTG 丙酮溶液:磷酸缓冲液=1 mL:9 mL 加入 0.1 mol/mL pH 6.0 的无菌磷酸缓冲液, 制得 1 mg/mL NTG 母液。

1.5.2 NTG 诱变

以 2% 接种量将嗜热链球菌 IMAU80846 扩培至 500 mL, 42 °C 静置培养至对数期末期, 4 °C、4 000×g 离心 5 min 收集菌泥, 并用 PBS 缓冲液清洗 2 遍, 称取菌泥 1 g 加入 9 mL PBS 缓冲液制得 0.1 g/mL 菌悬液, 并等分为 6 份。将制备好的 NTG 母液加入上述菌悬液中, 使其终浓度分别为 0、100、300、500、700、900 μg/mL。将样品置于摇床中, 42 °C、100 r/min 避光培养 60 min, 随后使用 PBS 缓冲液清洗 2 遍, 加入 5 mL M17 液体培养基 42 °C 静置培养 2 h, 采用梯度稀释法计数, 计算致死率(公式 1)。选择致

死率为 80%–90% 的菌悬液于 M17 半乳糖固体培养基进行平板划线, 挑取 40 个形态大小不一的单菌落, 进行后续试验。

$$\text{致死率} = \frac{\text{原始平板菌落数} - \text{诱变平板菌落数}}{\text{原始平板菌落数}} \times 100\% (1)$$

1.6 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株 OD_{600} 测定

将嗜热链球菌 IMAU80846 与 1.4.2 中挑取的 40 个突变株分别以 2% 接种量接种于 M17 和 M17 半乳糖液体培养基中, 42 °C 静置培养 24 h, 连续传代 3 次使活力达到最高, 测定 OD_{600} 。

1.7 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株酶活性测定

将嗜热链球菌 IMAU80846 与突变株连续传代培养 3 次后 4 °C、4 000×g 离心 5 min, 并用 PBS 缓冲液清洗 2 遍, 收集菌泥, 采用 β-Gal、PK、GalK 和 GK 活性检测试剂盒检测菌株 β-Gal、PK、GalK 和 GK 活性。

1.8 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株全基因组序列分析

将嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株扩培至 40 mL 并于 42 °C 培养, 当培养液 OD_{600} 达到 0.4–0.6 时, 4 °C、4 000×g 离心 5 min 收集菌泥, 用 PBS 缓冲液清洗 2 遍后, 将收集的菌泥送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行全基因组测序分析。

1.9 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株中和半乳糖代谢相关酶的氨基酸序列比对分析

1.9.1 DNA 提取

将野生株与突变株连续传代培养 2 次, 4 °C、4 000×g 离心 5 min, 并用 PBS 缓冲液清洗 2 遍, 收集菌泥, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取。

1.9.2 PCR 扩增

根据 NCBI 中已公布的嗜热链球菌全基因组序列设计引物(表 1), 以野生株和突变株中

表 1 本研究所用引物

Table 1 The primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
lacZ1F	CTATTATGGATACGGTGC	200
lacZ1R	ATGCTTTATTAAGTGCGG	
galK3	CCGGAAGGACGTTACCTC	386
galR1	CCGATGTCTAGTATCCTC	
pyk3F	CATGGTAACCACGCTGAG	842
pyk4R	AGCATTGTCGCATCAGTA	
glcK4F	TCGGTGGTGGTGTCTCTG	641
glcK4R	GAGGCATTGTCCCTTCAT	

提取的 DNA 为模板, 利用 PCR 对上述目的基因进行扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.5 μ L, EasyTaq DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 无菌 ddH₂O 35.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

根据凝胶电泳鉴定 PCR 结果, 选择条带明亮且单一的 PCR 产物送至上海派森诺生物科技有限公司进行测序, 并对测序结果进行比对分析。

1.10 嗜热链球菌 IMAU80846 突变株的遗传稳定性分析

将筛选出的突变株以 2% 接种量接种于 M17 液体培养基中, 42 $^{\circ}$ C 静置培养 24 h, 连续传代 10 次, 测定每代菌株 β -Gal、GalK、GK 和 PK 活性。

1.11 发酵乳的制备

蒸馏水加热至 50 $^{\circ}$ C, 加入全脂乳粉(11.5%) 进行搅拌溶解, 待乳粉混合均匀后加入蔗糖(0.1%), 65 $^{\circ}$ C 水合 30 min。随后对全脂复原乳进行 2 次均质(65 $^{\circ}$ C, 低压 15 MPa, 高压 35 MPa)。95 $^{\circ}$ C 杀菌 5 min 后迅速冷却至 4 $^{\circ}$ C 待用。

将活化后的嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株以 5×10^7 CFU/mL 接种量接种于全脂乳中,

42 $^{\circ}$ C 静置培养, 分别在培养 0、3、6 h 及贮藏 0、1、3、7、14 d 时取样待测。

1.12 乳糖、半乳糖、葡萄糖及乳酸含量的测定

采用 HPLC 测定嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株在发酵及贮藏期间样品中乳糖、半乳糖、葡萄糖及乳酸含量, 每个时间点各取 3 组样品, 检测结果取平均值。

1.12.1 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株发酵乳中糖含量的测定

样品前处理: 准确称量发酵乳样品 1 g 于 25 mL 容量瓶中, 加入 20 mL 超纯水, 振荡 30 s 后定容, 超声 30 min, 8 000 \times g 离心 10 min 后取上清液, 使用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后置于样品瓶中待测。

HPLC 仪器方法: 色谱柱为 Agilent 氨基柱 (5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm), 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测器为示差检测器, 检测器温度 35 $^{\circ}$ C; 流动相为乙腈与超纯水的混合液, 二者体积比为 70:30, 流速 1 mL/min; 进样量为 10 μ L。

1.12.2 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株发酵乳中乳酸含量的测定

样品前处理: 准确称量发酵乳样品 0.5 g 于 10 mL 容量瓶中, 加入浓度为 0.1 mol/L 的硫酸溶液 8 mL, 振荡 30 s 后定容, 8 000 \times g 离心 10 min 后取上清液, 使用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后置于样品瓶中待测。

HPLC 仪器方法: 色谱柱为 Zorbax SB-Aq 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 150 mm), 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测器为紫外检测器, 检测波长 210 nm; 流动相为甲醇与 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 2.0), 体积比 3:97, 流速 0.5 mL/min; 进样量为 10 μ L。

1.13 发酵特性分析

将嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株分别与德氏乳杆菌保加利亚亚种 IMAU20450 以 1:1 比例

进行复配制备发酵乳, 接种量为 5×10^7 CFU/mL, 测定两组发酵乳的发酵特性。

1.13.1 pH 测定

使用 pH 计测定发酵乳样品的 pH 值。

1.13.2 滴定酸度

称取 5 g 发酵乳样品于 150 mL 锥形瓶中, 加入 40 mL 蒸馏水和 3 滴酚酞, 充分混匀后, 用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定至微红色且在 30 s 内不褪色, 记录消耗 NaOH 标准溶液的体积, 计算(公式 2)测定结果。

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 0.1} \quad (2)$$

式中: X 为样品的酸度, c 为 NaOH 标准溶液的物质的量浓度, V 为滴定时消耗 NaOH 标准溶液的体积, m 为样品的质量, 0.1 为酸度理论定义 NaOH 的物质的量浓度。

1.13.3 黏度的测定

使用黏度计测定发酵乳样品黏度。

1.13.4 持水力的测定

准确称量 15 g 发酵乳样品, 倒入放有滤纸的漏斗中放置 2 h, 称量滤液质量, 计算持水力(公式 3)。

$$\text{持水力}(\%) = 1 - \frac{\text{滤液质量}}{\text{样品质量}} \times 100 \quad (3)$$

1.13.5 活菌数的测定

采用梯度稀释法计算活菌数, 取 500 μ L 发酵乳样品于无菌生理盐水中, 振荡均匀, 进行梯度稀释, 采用 M17 固体培养基进行倾注, 42 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h 后计算平板菌落数量。

1.14 统计与分析

本文采用 Excel 2016、SPSS19.0 进行数据处理; 采用 Origin 2019 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 NTG 浓度的确定

使用不同浓度 NTG 处理嗜热链球菌

IMAU80846 后, 致死率如表 2 所示。随着 NTG 浓度的增加, 菌株致死率逐渐升高, 当 NTG 终浓度为 700 μ g/mL 时, 菌株致死率达到 88.72%。据报道, 当使用化学诱变剂对菌株进行诱变时, 致死率在 80%–90% 时, 正突变率较高^[15]。因此, 选取 700 μ g/mL 的 NTG 处理嗜热链球菌 IMAU80846, 将处理后的菌悬液在 M17 半乳糖平板上划线, 42 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 挑取 40 个大小不同, 形态各异的单菌落, 分别标记为 IMAU80846-1–IMAU80846-40。

2.2 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株 OD_{600} 的测定

嗜热链球菌 IMAU80846 和 2.1 节筛选出的 40 株突变株在 M17 和 M17 半乳糖培养基中培养 24 h 时的 OD_{600} 如图 1 所示, 突变株 IMAU80846-1、IMAU80846-10、IMAU80846-13、IMAU80846-15、IMAU80846-18、IMAU80846-21、IMAU80846-34 和 IMAU80846-39 在 M17 与 M17 半乳糖培养基中的 OD_{600} 高于野生株与其他突变株, 生长情况良好, 选择这些菌株进行下一步试验。

表 2 NTG 诱变处理嗜热链球菌 IMAU80846 的致死率

Table 2 The lethality of NTG mutagenesis in the treatment of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846

Concentration of NTG (μ g/mL)	Viable cell counts (CFU/mL)	Lethality (%)
0	$(4.61 \pm 0.14) \times 10^9$	0 ^a
100	$(2.77 \pm 0.17) \times 10^9$	39.91 ^b
300	$(1.85 \pm 0.11) \times 10^9$	59.87 ^c
500	$(1.63 \pm 0.13) \times 10^9$	64.64 ^c
700	$(0.52 \pm 0.04) \times 10^9$	88.72 ^d
900	$(0.07 \pm 0.01) \times 10^9$	98.48 ^e

The lowercase letters in the table indicate the significance of the difference in lethality at different concentrations ($P < 0.05$).

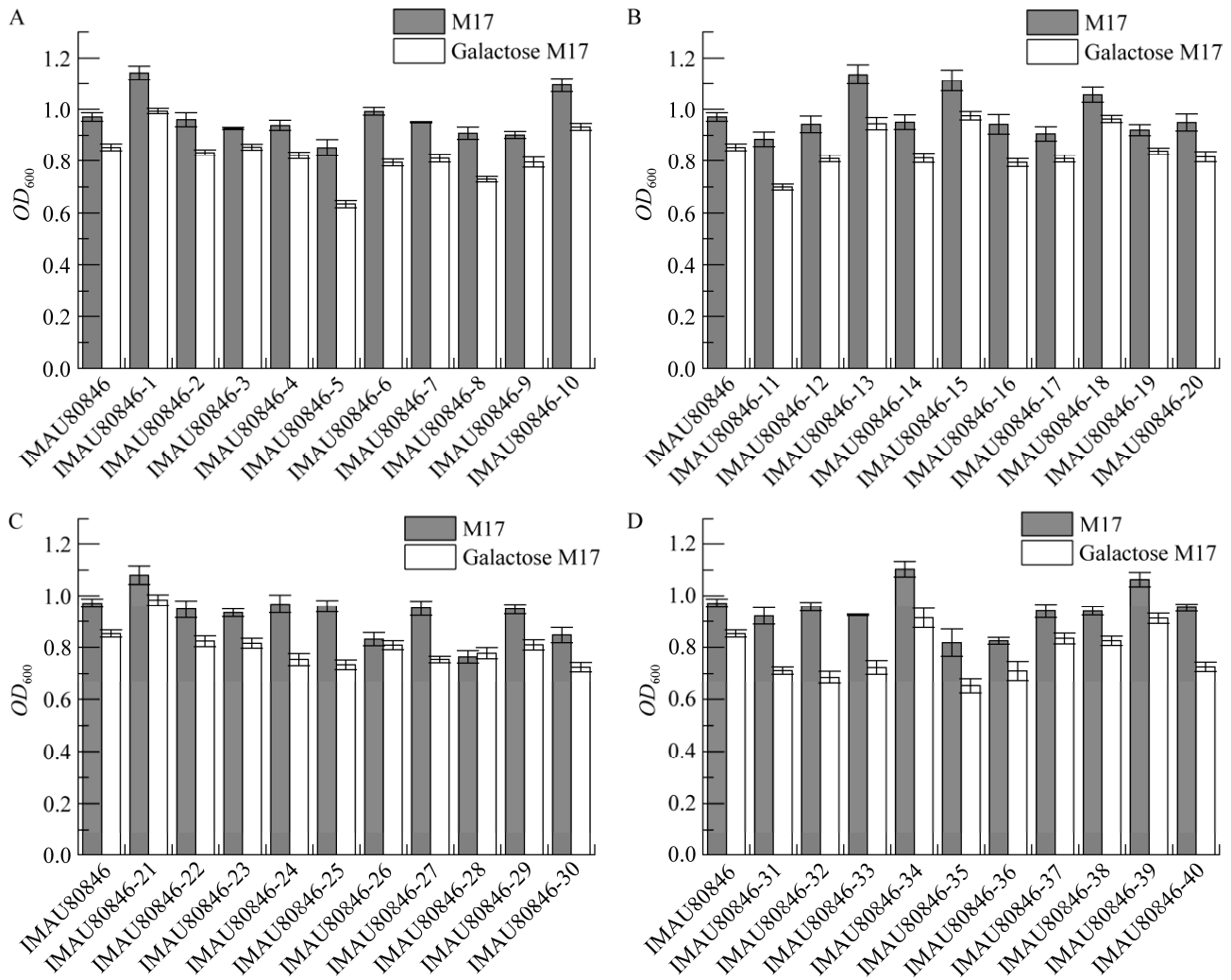


图 1 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株在 M17 与 M17 半乳糖培养基中培养 24 h 时的 OD_{600}

Figure 1 OD_{600} of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846 and mutant strains cultured in M17 and galactose M17 medium for 24 h. A, B, C, and D indicates the difference of OD_{600} in *Streptococcus thermophilus* IMAU80846 and different mutant strains.

2.3 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株中和半乳糖代谢相关酶的活性检测结果

检测嗜热链球菌 IMAU80846 及上述筛选出的 8 株突变株的 β -Gal、GalK、PK 和 GK 活性, 结果如图 2 所示。 β -Gal 具有转半乳糖基化活性, 可催化半乳糖形成低聚半乳糖^[16]。GalK 在半乳糖代谢中可催化 D-半乳糖生成半乳糖-1-磷酸^[17]。PK 是糖酵解过程中的限速酶之一, 可催化磷酸烯醇式丙酮酸分子高能磷酸

基团转移给 ADP, 生成 ATP, 调节糖酵解终产物的生成。在乳糖被 β -Gal 分解为葡萄糖后, GK 可使其磷酸化为葡萄糖-6-磷酸通过糖酵解进一步代谢。与嗜热链球菌 IMAU80846 相比, 嗜热链球菌 IMAU80846-13 的 β -Gal 活性提高 81.26%, GalK 活性提高 33.86%, PK 与 GK 活性下降 80.00%、23.21%, 因此选择嗜热链球菌 IMAU80846-13 进行下一步试验, 并将其命名为 IMAU80846Y。

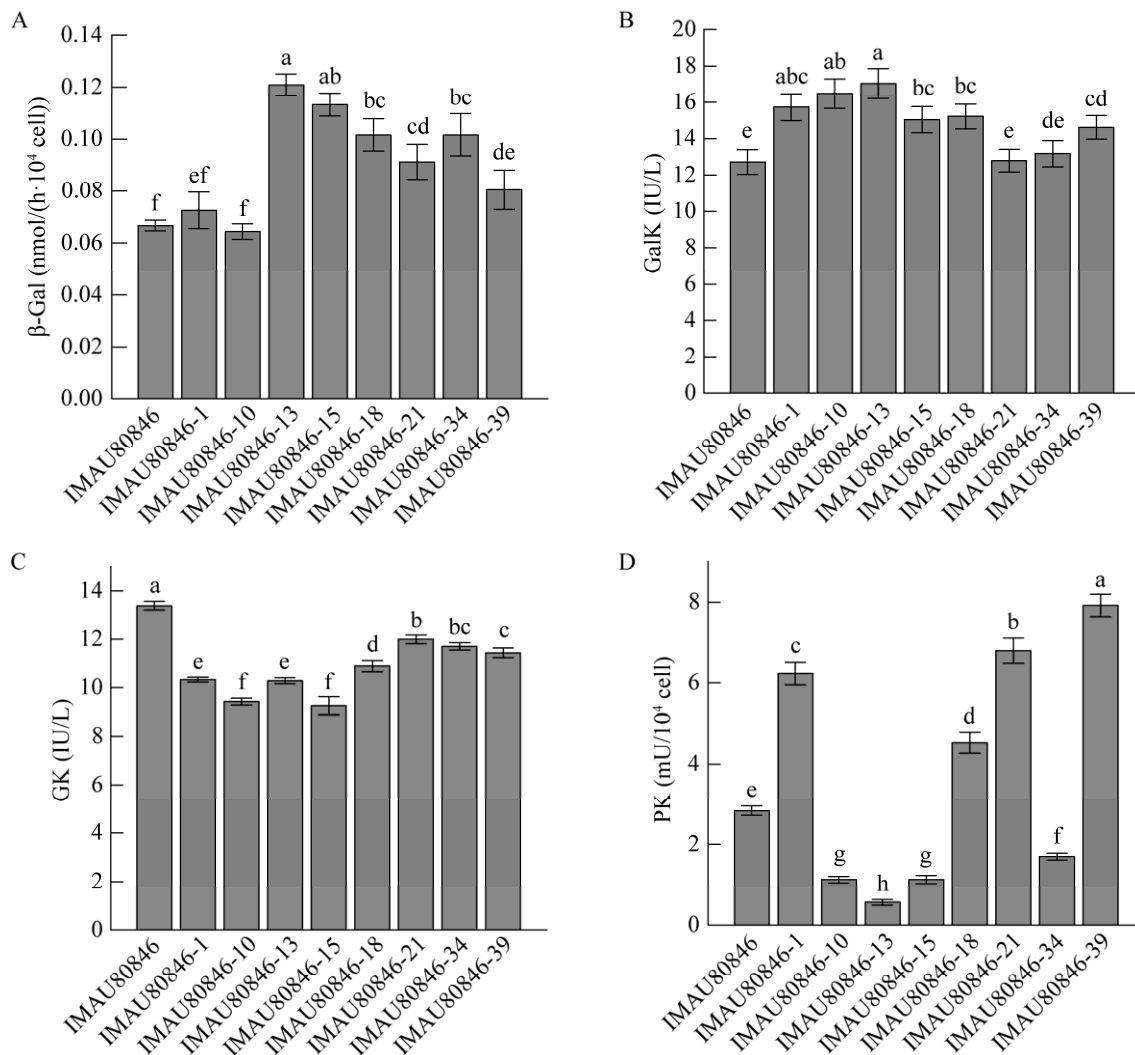


图 2 嗜热链球菌 IMAU80846 和突变株 β -Gal (A)、GalK (B)、GK (C)、PK (D)活性的比较

Figure 2 Comparison of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846 and mutant strains β -Gal (A), GalK (B), GK (C), PK (D) enzyme activity. Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below.

2.4 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株全基因序列比对结果

以嗜热链球菌 IMAU80846 为参考, 使用 Illumina NovaSeq 测序平台对突变株嗜热链球菌 IMAU80846Y 全基因序列进行比对, 结果如图 3 所示。平均测序深度为 422.16 \times , Q20 和 Q30 分别为 98.94%和 96.75%, 组装后得到的 contig 和 Scaffolds 数目分别为 157 和 141。突变株全

基因序列对比率为 99.58%, 共发生 140 个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphisms, SNP)突变, 其中基因间和编码区 SNP 各有 4 个和 76 个(包括 32 个同义突变, 41 个非同义突变, 1 个导致获得终止密码子的 SNP, 2 个导致丢失终止密码子的 SNP)。插入缺失位点(InDel)检测结果表明突变株插入和缺失片段分别有 3 个和 4 个。

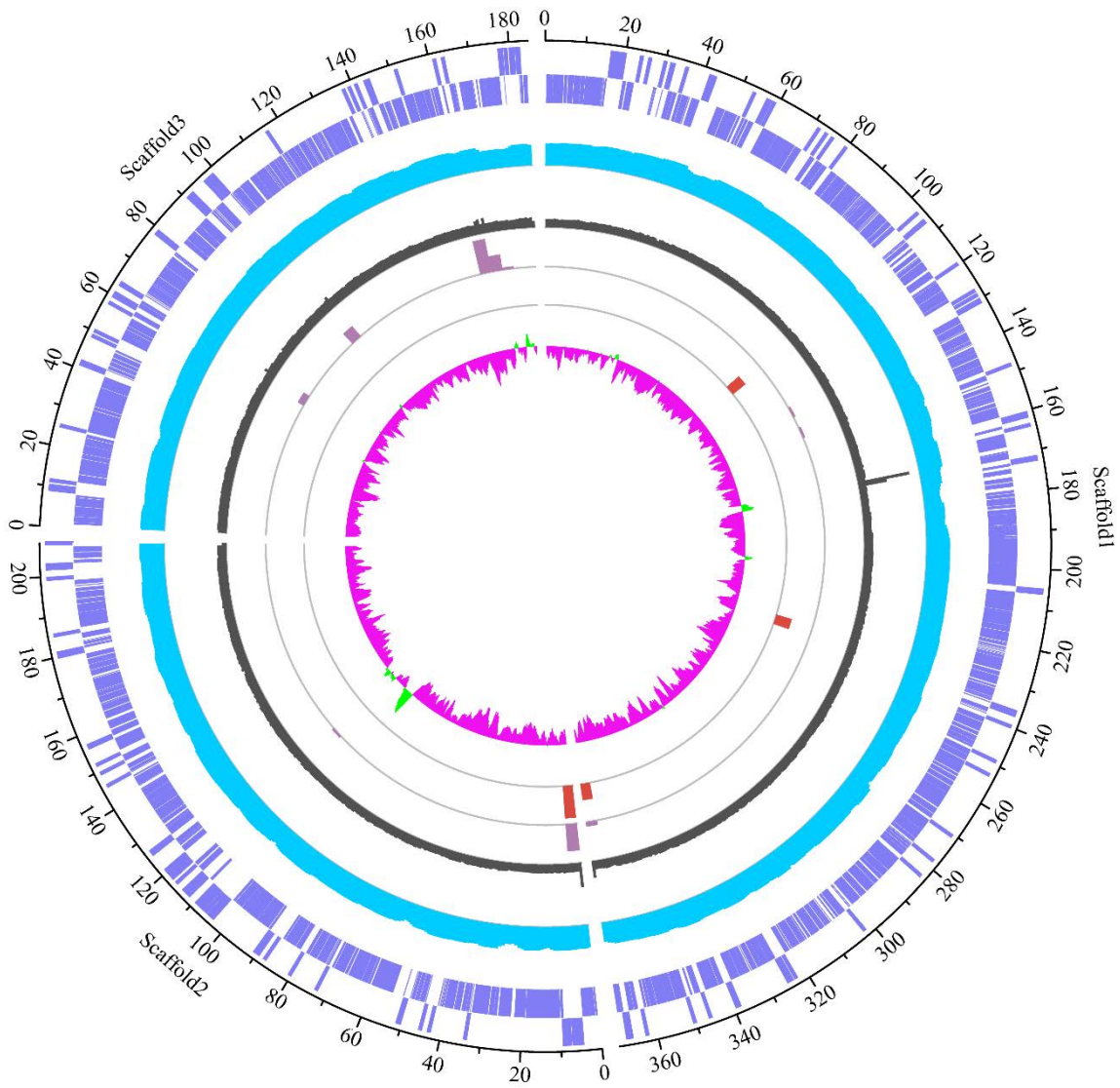


图 3 嗜热链球菌 IMAU80846Y 基因变异图谱

Figure 3 Genetic variant mapping of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846Y. The outermost circle is the position coordinates of the reference sequence, from the outside to the inside, which are the gene location on the reference genome, the G+C content of the reference genome, the sequencing depth of the sample, the SNP number distribution of the sample, the InDel distribution of the sample, and the G+C skew of the reference genome.

KEGG 和 GO 注释结果如图 4、图 5 所示。SNP 突变基因 KEGG 注释结果表明, 突变株发生 3 种与代谢相关突变, 分别为萜类化合物和聚酮类的代谢、核苷酸代谢、碳水化合物代谢突变。SNP 和 InDel 突变基因在 GO 注释中也分别注释到有 18 个和 2 个与代谢过程相关基因

发生突变。

2.5 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株中与半乳糖代谢相关酶的氨基酸序列比对分析

对嗜热链球菌 IMAU80846 及 IMAU80846Y 中和半乳糖代谢相关酶的基因进行测序, 并整理为氨基酸密码子序列, 结果如图 6 所示。 β -Gal

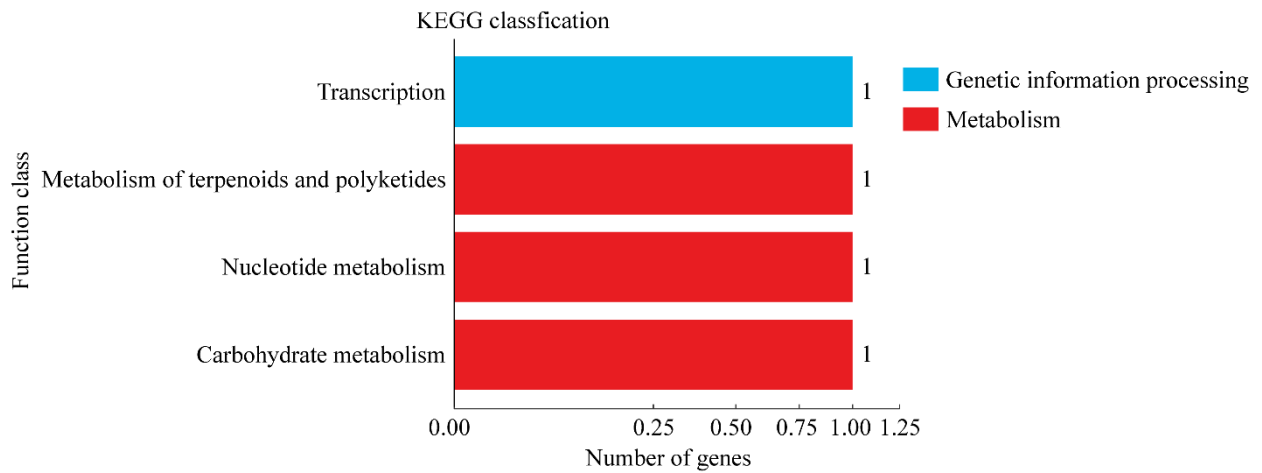


图 4 嗜热链球菌 IMAU80846Y SNP 突变基因 KEGG 注释

Figure 4 SNP mutant gene KEGG annotation of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846Y.

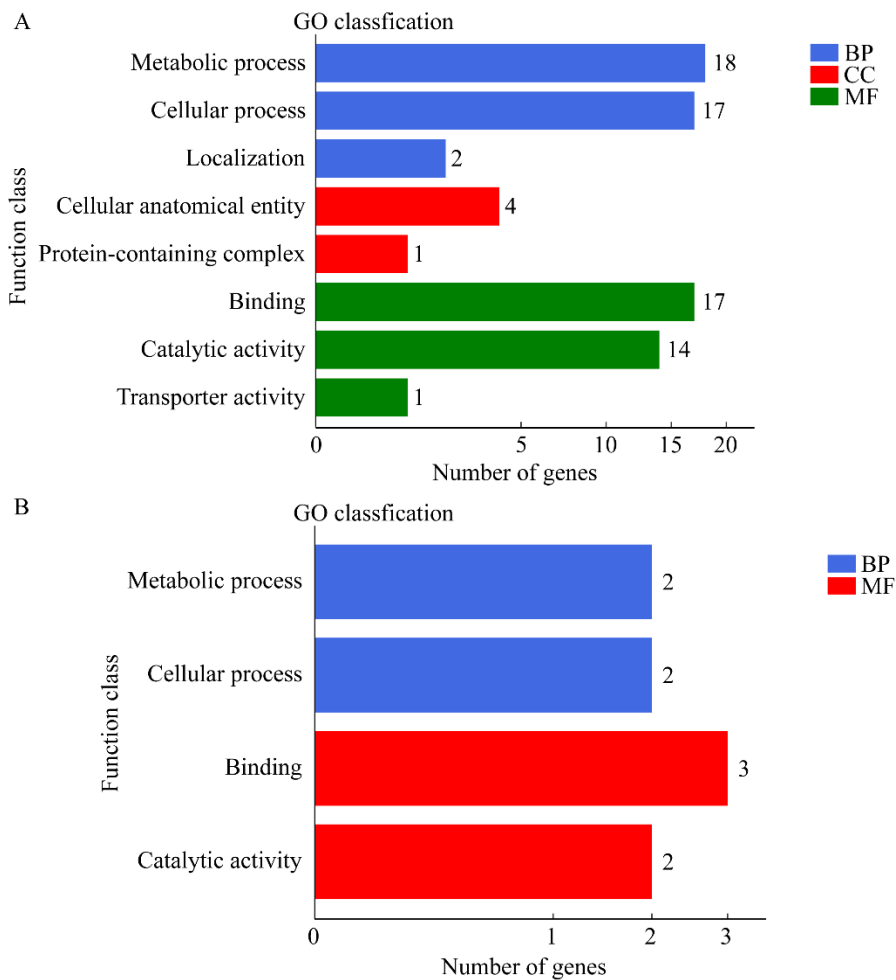


图 5 嗜热链球菌 IMAU80846Y SNP (A)和 InDel (B)突变基因 GO 注释

Figure 5 SNP (A) and InDel (B) mutant gene GO annotation of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846Y.

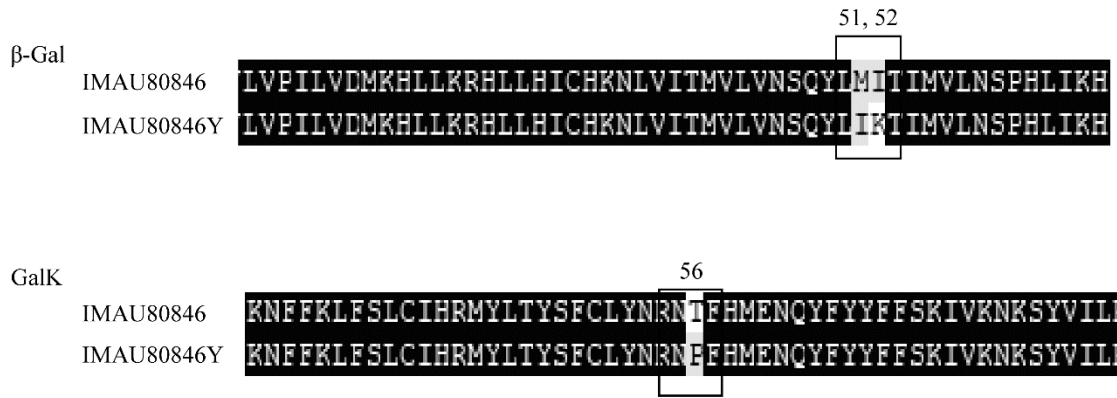


图 6 嗜热链球菌 IMAU80846 和 IMAU80846Y 中 β -Gal、GalK 氨基酸密码子比对结果

Figure 6 Comparison results of amino acid codons of β -Gal and GalK in *Streptococcus thermophilus* IMAU80846 and IMAU80846Y.

氨基酸密码子在 51 位点和 52 位点由“MI”突变为“IK”。GalK 氨基酸密码子在 56 位点由“T”突变为“F”。

2.6 嗜热链球菌 IMAU80846Y 遗传稳定性分析

嗜热链球菌 IMAU80846Y 连续传代培养 10 代, 检测各代的 β -Gal、PK、GalK 和 GK 活性, 结果如图 7 所示。在传代过程中, β -Gal 的活性始终维持在 $0.119\text{--}0.121\text{ nmol}/(\text{h}\cdot 10^4\text{ cell})$, PK 的活性始终维持在 $0.555\text{--}0.575\text{ mU}/10^4\text{ cell}$, GalK 和 GK 活性维持在 $16.331\text{--}17.012\text{ IU/L}$ 和 $9.732\text{--}10.021\text{ IU/L}$ 之间, 结果无显著性差异 ($P>0.05$)。这表明在传代过程中 β -Gal、PK、GalK 和 GK 活性稳定, 该突变株具有良好的遗传稳定性。

2.7 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株发酵乳中代谢产物分析

采用 HPLC 测定嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株在发酵 0、3、6 h 与贮藏 0、1、3、7、14 d 时发酵乳中乳糖、半乳糖、葡萄糖和乳酸的含量, 结果如表 3 所示。在发酵和贮藏期间嗜热链球菌 IMAU80846 与突变株发酵乳中乳糖含量呈下降趋势, 分别由开始(发酵 0 h) $4.85\text{ g}/100\text{ g}$

和 $4.89\text{ g}/100\text{ g}$ 下降至 $2.79\text{ g}/100\text{ g}$ 和 $2.12\text{ g}/100\text{ g}$ (贮藏 14 d)。嗜热链球菌 IMAU80846 发酵乳中有 42.47% 乳糖被代谢, 突变株发酵乳中有 56.65% 乳糖被代谢, 相较于嗜热链球菌 IMAU80846, 突变株代谢乳糖能力提高了 14.18%。

嗜热链球菌 IMAU80846 发酵乳中半乳糖含量随着发酵和贮藏时间的延长逐渐增加, 在 14 d 时达到最高, 为 $0.51\text{ g}/100\text{ g}$, 而突变株发酵乳中半乳糖含量在贮藏 14 d 时为 $0.27\text{ g}/100\text{ g}$, 其半乳糖累积量较野生株下降了 47.06%。这表明与嗜热链球菌 IMAU80846 相比, 突变株发酵乳中有更多的半乳糖被代谢, 导致产品半乳糖含量降低。推测造成这种结果的原因是乳糖在被 β -Gal 水解为半乳糖后经 GalK 磷酸化为半乳糖-1-磷酸进入 Lelior 途径^[18], 而突变株 GalK 酶活性高于嗜热链球菌 IMAU80846, 使更多半乳糖被磷酸化, 导致突变株发酵乳中半乳糖含量减少。

嗜热链球菌 IMAU80846 发酵乳在贮藏 0 d 时未检测到葡萄糖残余, 说明葡萄糖在 0 d 已被完全代谢, 而突变株发酵乳在贮藏 1 d 时仍能检测到葡萄糖残余, 这与突变株 GK 活性低于野生株测定结果(图 2)相符。

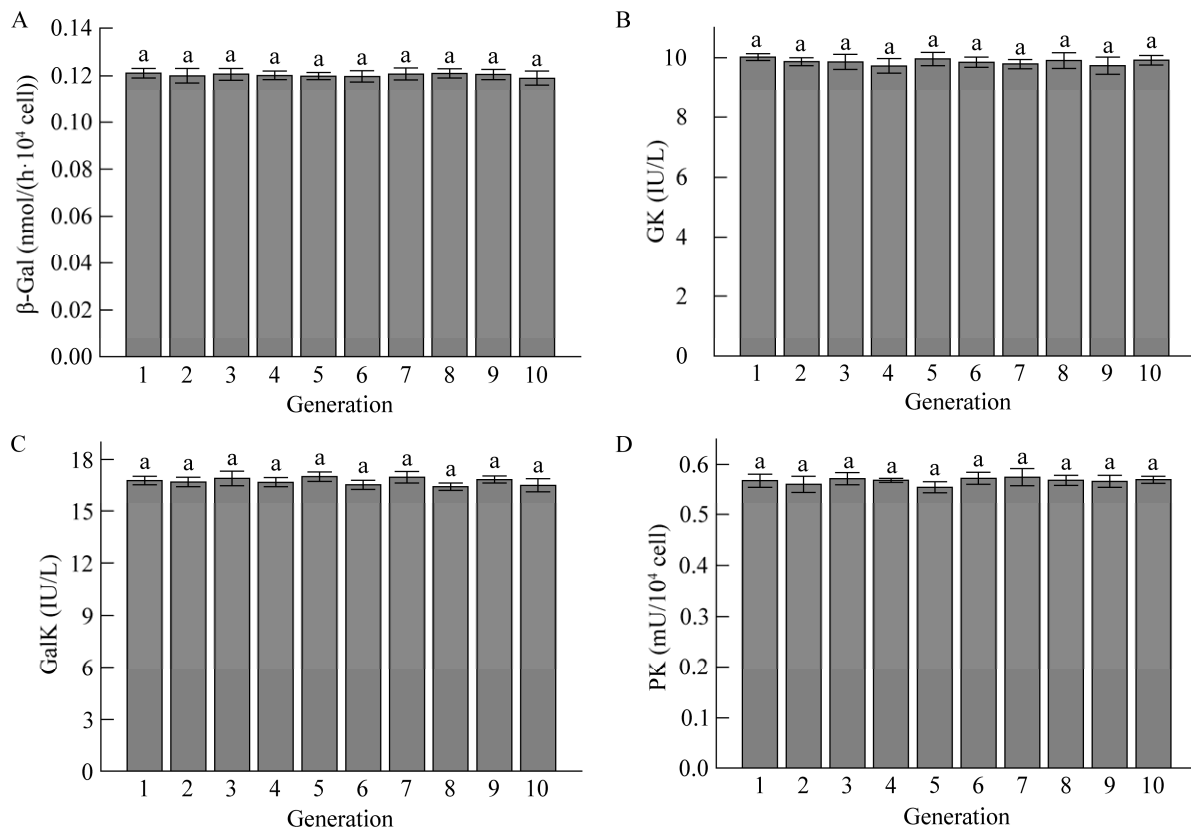


图 7 嗜热链球菌 IMAU80846Y 在 M17 培养基中连续传代培养 10 代, 各代的 β -Gal (A)、GK (B)、GalK (C)、PK (D)活性变化情况

Figure 7 Changes in the activity of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846Y in each generation of β -Gal (A), GK (B), GalK (C) and PK (D) when they were subcultured in M17 medium for 10 consecutive generations.

表 3 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株发酵乳中乳糖、半乳糖、葡萄糖、乳酸含量

Table 3 Lactose, galactose, glucose and lactic acid content in fermented milk of *Streptococcus thermophilus* IMAU80846 and mutant strains

Time	Lactose (g/100 g)		Galactose (g/100 g)		Glucose (g/100 g)		Lactic acid (g/100 g)	
	IMAU80846	IMAU80846Y	IMAU80846	IMAU80846Y	IMAU80846	IMAU80846Y	IMAU80846	IMAU80846Y
0 h	4.85±0.015b	4.89±0.017a	0.18±0.001a	0.16±0.001b	0.12±0.002b	0.24±0.003a	—	—
3 h	4.40±0.013a	4.17±0.012b	0.36±0.002b	0.39±0.002a	0.26±0.004b	0.40±0.006a	0.44±0.006b	0.49±0.008a
6 h	3.43±0.010a	3.24±0.009b	0.41±0.003b	0.46±0.004a	0.24±0.003b	0.48±0.007a	0.58±0.010b	0.64±0.013a
0 d	3.23±0.009a	2.78±0.007b	0.46±0.007a	0.45±0.006b	—	0.55±0.009	0.71±0.013b	0.75±0.016a
1 d	3.03±0.008a	2.54±0.006b	0.47±0.007a	0.40±0.005b	—	0.53±0.008	0.78±0.015b	0.83±0.017a
3 d	2.88±0.008a	2.32±0.005b	0.49±0.009a	0.37±0.003b	—	—	0.80±0.016b	0.86±0.018a
7 d	2.80±0.007a	2.29±0.005b	0.50±0.010a	0.36±0.003b	—	—	0.81±0.017b	0.88±0.020a
14 d	2.79±0.007a	2.12±0.003b	0.51±0.120a	0.27±0.002b	—	—	0.82±0.019b	0.90±0.023a

— indicates undetected; Lowercase letters indicate the significance of differences of the same substance at the same time ($P < 0.05$).

嗜热链球菌通过糖酵解途径 (Embden-Meyerhof-Paras pathway, EMP) 将糖发酵为丙酮酸, 丙酮酸通过乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 转化为乳酸^[19-20]。嗜热链球菌 IMAU80846 与突变株发酵乳均在发酵 3 h 时才检测到乳酸, 贮藏 14 d 后嗜热链球菌 IMAU80846 发酵乳中乳酸含量由最初的 0.44 g/100 g 增加到 0.82 g/100 g, 突变株发酵乳由 0.49 g/100 g 增加到 0.90 g/100 g, 与野生株相比突变株发酵乳中乳酸含量增加 9.76%。说明与野生株相比, 突变株能代谢生成更多的乳酸。

2.8 发酵乳发酵特性分析

2.8.1 发酵与贮藏期间 pH 及滴定酸度的变化

嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株与德氏乳杆菌保加利亚亚种 IMAU20450 复配在牛乳发酵和贮藏期间 pH 值、滴定酸度的变化情况如图 8 所示。在发酵过程中, 发酵乳 pH 值的变化主要由乳酸含量引起^[21]。发酵 6 h 时野生株复配组发酵乳 pH 降至 4.73, 突变株复配组降至 4.59, 突变株复配组的 pH 值较野生株复

配组相比降低 0.14。贮藏 14 d 后野生株复配组 pH 为 4.09, 突变株复配组为 4.05。发酵期间二者滴定酸度相近, 随着贮藏时间延长, 滴定酸度逐渐增加, 贮藏 0 d 时野生株复配组滴定酸度为 74 °T, 突变株复配组为 76 °T, 14 d 时野生株复配组为 91 °T, 突变株复配组为 100 °T。

2.8.2 发酵与贮藏期间黏度的变化

发酵乳黏度的变化是因为乳酸菌在发酵过程中产酸使产品 pH 值下降, 在达到酪蛋白等电点时形成沉淀, 另一方面是由于产黏菌株在发酵过程中分泌黏性多糖, 使发酵乳的黏度增加^[21]。发酵 2 h 时, 嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株与德氏乳杆菌保加利亚亚种 IMAU20450 复配组发酵乳黏度变化不明显, 4–6 h 时随着菌株繁殖速度增加, 发酵乳黏度随之上升, 发酵 4 h 与 6 h 时野生株复配组发酵乳黏度分别为 241.6 mPa·s 和 655.2 mPa·s, 突变株复配组发酵乳为 316.9 mPa·s 和 793.4 mPa·s。贮藏 0–3 d 时野生株复配组黏度持续上升, 由 758.9 mPa·s 增加至 1 592 mPa·s, 3 d 后黏度开始下降, 14 d

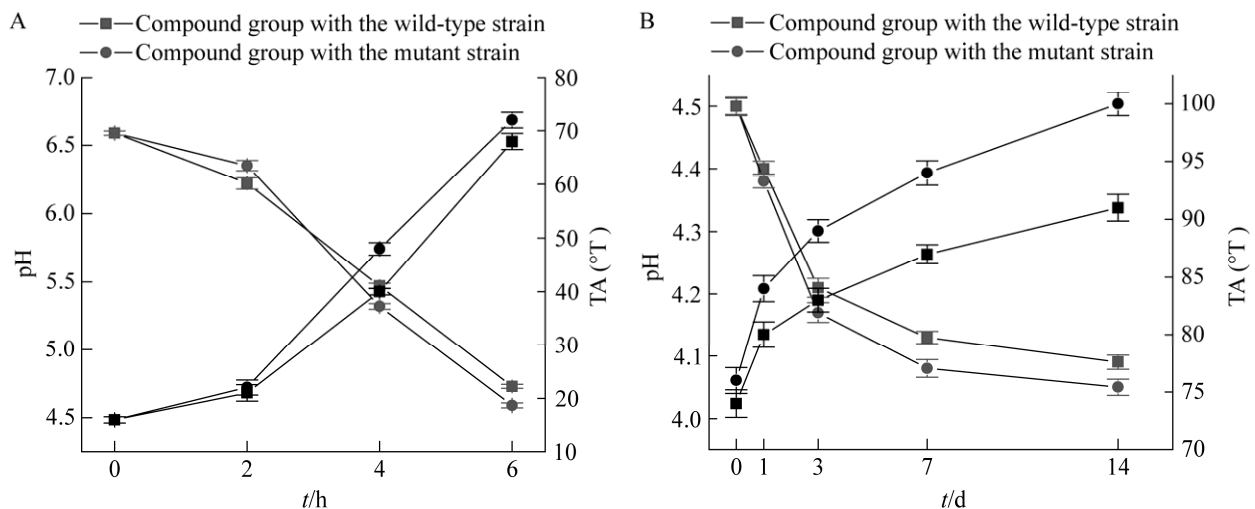


图 8 发酵(A)和贮藏(B)期间野生株复配组与突变株复配组发酵乳 pH 和滴定酸度的变化情况

Figure 8 Changes in pH and titration acidity of fermented milk in the compound group with the wild-type strain and the compound group with the mutant strain during fermentation (A) and storage (B).

时降至 1 467 mPa·s, 突变株复配组在贮藏 0–7 d 时持续上升, 由 929 mPa·s 增加至 1 994 mPa·s, 7 d 后黏度开始下降, 贮藏 14 d 时降至 1 688 mPa·s, 较野生株复配组黏度提高 221 mPa·s (图 9)。

2.8.3 发酵与贮藏期间持水力的变化

持水力是判断发酵乳质地是否稳定的物理特性之一^[22]。发酵初期野生株复配组和突变株复配组发酵乳持水力变化不明显, 2 h 后发酵乳持水力逐渐增加, 发酵 2、4、6 h 时野生株复配

组发酵乳持水力分别为 42.6%、45.2%、48.1%, 突变株复配组发酵乳持水力为 43.5%、46.1%、48.7% (图 10A)。贮藏 0、1、3 d 时野生株复配组发酵乳持水力分别为 50.4%、54.3%、56.2%, 7 d 与 14 d 时降至 55.7%、53.8%, 突变株复配组发酵乳在贮藏 0–7 d 时持水力持续增加, 由 51.2% 增加至 57.6%, 贮藏 7 d 后持水力下降, 在 14 d 时降至 56.4%, 突变株复配组持水力高于野生株复配组 (图 10B)。类似的变化趋势在黏度变化曲线 (图 9) 中也有发现。

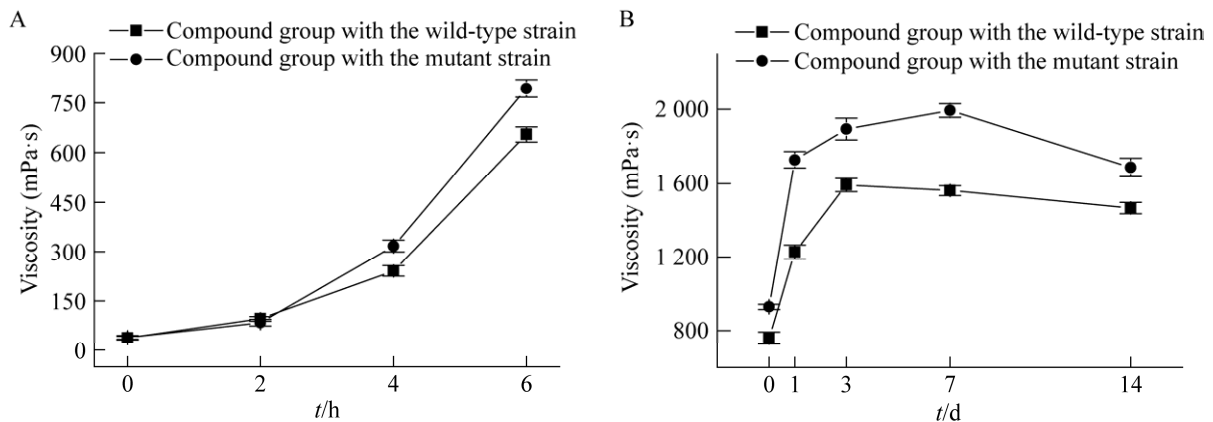


图 9 发酵(A)和贮藏(B)期间野生株复配组与突变株复配组发酵乳黏度的变化情况

Figure 9 Changes in viscosity of fermented milk in the compound group with the wild-type strain and the compound group with the mutant strain during fermentation (A) and storage (B).

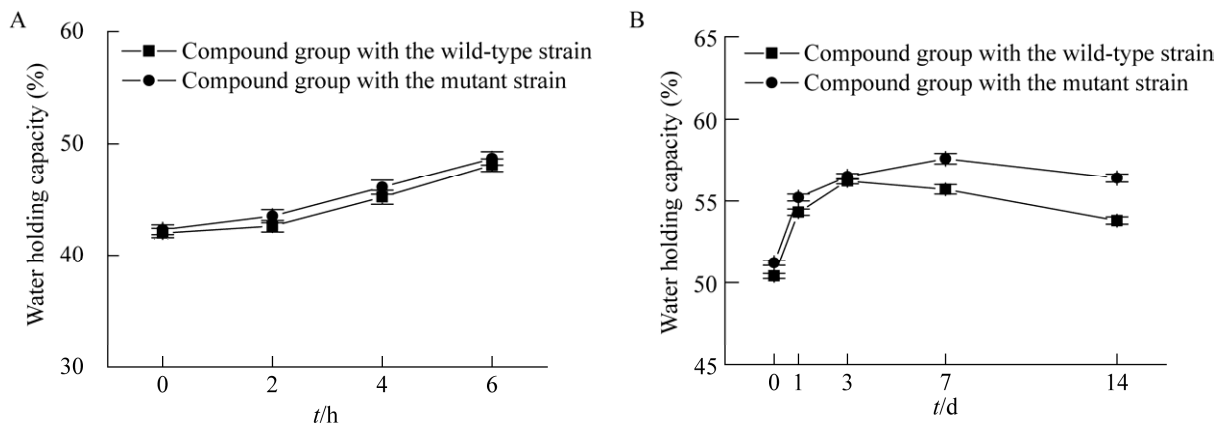


图 10 在发酵(A)和贮藏(B)期间野生株复配组与突变株复配组发酵乳持水力的变化情况

Figure 10 Changes in water holding capacity of fermented milk of the compound group with the wild-type strain and the compound group with the mutant strain during fermentation (A) and storage (B).

2.8.4 发酵与贮藏期间活菌数的变化

嗜热链球菌 IMAU80846 及突变株与德氏乳杆菌保加利亚亚种 IMAU20450 复配组发酵乳活菌数变化情况如图 11 所示。在发酵前 2 h 时野生株复配组发酵乳活菌数较高, 2 h 后突变株复配组发酵乳活菌数逐渐增加并超过野生株复配组, 在 6 h 时野生株复配组发酵乳活菌数为 1.66×10^9 CFU/mL, 突变株复配组为 2.70×10^9 CFU/mL。进入贮藏期后发酵乳中活菌数逐渐减少, 在贮藏 3 d 前突变株复配组中活菌数开始低于野生株复配组, 随贮藏时间延长野生株复配组中活菌数由最初的 1.95×10^9 CFU/mL 减少至 3.55×10^8 CFU/mL, 突变株复配组由最初的 3.02×10^9 CFU/mL 减少至 2.24×10^8 CFU/mL。

3 讨论与结论

大多数乳酸链球菌通过特定的磷酸烯醇丙酮酸依赖的磷酸转移酶(phosphoenolpyruvate-phosphotransferases, PEP-PTS)系统利用乳糖, 在该系统中, 乳糖水解产物葡萄糖和半乳糖同时代谢为乳酸, 而嗜热链球菌缺乏磷酸转移酶活性, 具有乳糖渗透酶活性, 在乳糖被 β -Gal 摄取和裂解后, 葡萄糖部分通过糖酵解被利用,

半乳糖则被大多数菌株排泄到培养基中; 大多数嗜热链球菌无法在半乳糖上生长是因为缺乏 GalK, 一些研究表明, 半乳糖阴性菌株相对于半乳糖阳性菌株的 GalK 活性较低^[23-26], 该酶可将 α -D-半乳糖转化为 α -D-半乳糖-1-磷酸^[20], GK 是糖酵解的第一步反应所需要的酶, PK 是糖酵解最后一步需要的酶, 也是糖酵解关键的限速酶之一。本研究通过利用 NTG 诱变嗜热链球菌 IMAU80846, 获得突变株嗜热链球菌 IMAU80846Y, 该突变株中 β -Gal、GalK 活性提高 81.26%、33.86%, GK、PK 活性降低 80.00%、23.21%。突变株嗜热链球菌 IMAU80846Y 中 β -Gal 和 GalK 氨基酸序列发生突变, 同时其酶活性提高, 推测这种变化与氨基酸序列的改变有关^[27]。对发酵乳代谢产物进行测定后, 确认突变株较野生株相比更有效代谢半乳糖, 全基因序列比对结果也证明突变株中与代谢过程有关的基因发生了突变。

嗜热链球菌利用 PEP-PTS 将乳糖转运到细胞中后, 乳糖被 6-磷酸- β -半乳糖苷酶水解为葡萄糖(通过糖酵解途径代谢)和半乳糖-6-磷酸(通过塔格糖-6-磷酸途径代谢), 或水解为葡萄糖和半乳糖(通过 Leloir 途径代谢)^[20](图 12)。本研究

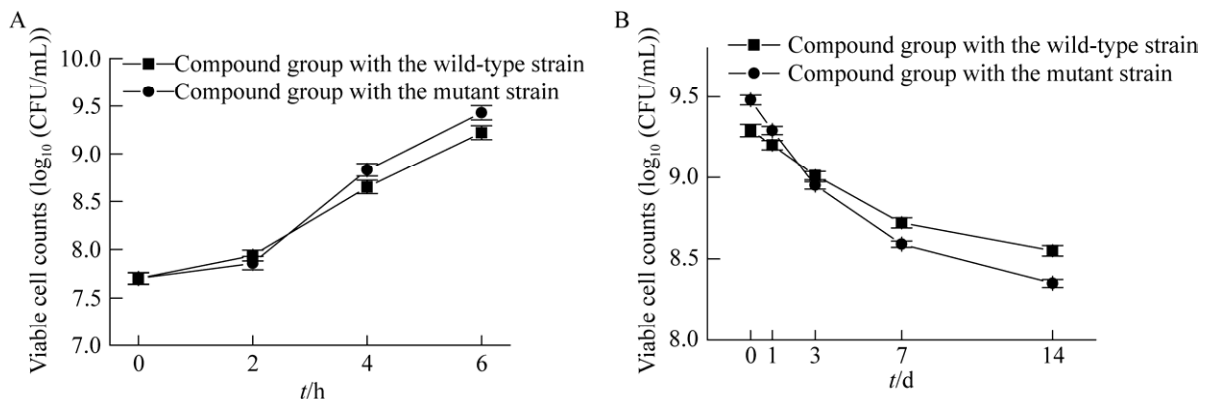


图 11 在发酵(A)和贮藏(B)期间野生株复配组与突变株复配组发酵乳活菌数的变化情况

Figure 11 Changes in the viable cell counts of fermented milk of the compound group with the wild-type strain and the compound group with the mutant strain during fermentation (A) and storage (B).

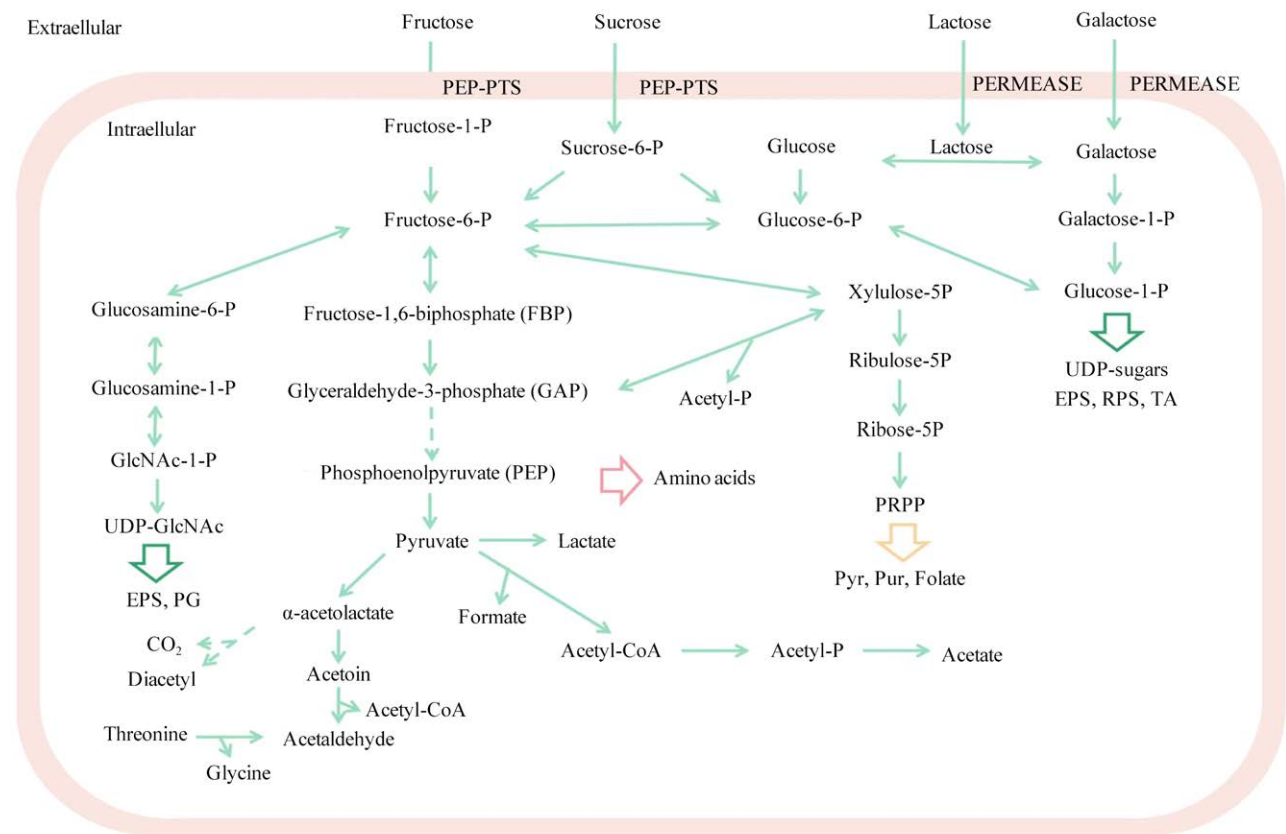


图 12 嗜热链球菌中糖的代谢途径

Figure 12 Pathways of sugar metabolism in *Streptococcus thermophilus*. Arrow indicates a reaction, multiple enzymatic processes are shown by dashed arrows, double-headed arrow indicates a bidirectional reaction.

主要讨论 Leloir 途径对糖的代谢。嗜热链球菌 IMAU80846Y 中 β -Gal 活性的提高使突变株相较于野生株发酵乳中乳糖代谢能力提升 14.18%，并且突变株发生可代谢半乳糖能力的突变，使发酵乳中半乳糖含量降低，与野生株发酵乳相比降低 47.06%。葡萄糖被 GK 磷酸化为葡萄糖-6-磷酸后通过糖酵解途径进一步代谢，而 GK 活性的降低，使被磷酸化的葡萄糖含量减少，从而有更多无法被代谢的葡萄糖被排出胞外，造成发酵乳中葡萄糖含量增加。与此同时，突变株对乳糖与半乳糖利用能力增加导致糖酵解途径终产物乳酸含量增加，与野生株相比突变

株发酵乳增加 9.76%。

凝乳时间是影响发酵乳质量的重要因素之一。酸奶发酵过程中的快速酸化对于稳定生产、降低成本和防止环境微生物污染非常重要，但在贮藏过程中会因酸度过高而出现抑制乳酸菌生长、产生不良风味、乳清脱水收缩、缩短产品保质期等现象^[28]。商业酸奶的最佳 pH 值范围在 4.00–4.40^[29]，本研究中所生产的发酵乳在贮藏期间的 pH 范围为 4.40–4.05，符合该要求。足够的活菌数是有机酸的生成和 pH 值降低不可缺少的因素，影响最终产品的感官特性和保质期^[30]。由于对糖的利用能力更强，发酵 2 h

后突变株复配组发酵乳中的活菌数逐渐高于野生株复配组发酵乳，进入贮藏期后两组发酵乳中活菌数逐渐减少，低 pH 往往更容易导致菌体死亡，突变株乳酸生成量更高，因此在贮藏期间突变株复配组发酵乳中的活菌数减少速度大于野生株复配组发酵乳，并在 3 d 前活菌数开始低于野生株复配组，整体变化趋势符合低 pH 导致的活菌数减少。持水力可以从侧面反映出发酵乳的质地，乳中凝胶网络结构的密度较高时，乳清析出较少^[31]。黏度是发酵乳的重要指标之一，黏度变化主要反映发酵乳在剪切过程中产生流动阻力大小，可体现发酵乳质地和结构差异^[31]。有研究表明酸奶凝乳主要是由蛋白质互相连接形成复杂的三维凝胶网络结构造成的^[32]。当发酵乳 pH 降至酪蛋白的等电点时，酪蛋白变性生成大分子凝聚物，并且随着贮藏时间的延长，乳酸积累量逐渐增加，使发酵乳黏度上升。本研究中突变株复配组发酵乳的黏度高于野生株复配组，这可能和突变株在发酵过程中的乳酸产量始终高于野生株有关。发酵乳贮藏 7 d 后黏度缓慢下降，原因可能是发酵乳的继续酸化使结合在酪蛋白上的钙和磷游离出来，使酪蛋白束的物理性质发生改变从而反映在发酵乳的黏度变化上^[33-34]。与野生株相比，突变株 IMAU80846 与德氏乳杆菌保加利亚亚种 IMAU20450 复配作为发酵剂生产的发酵乳拥有更强的发酵特性。

总之，本研究利用 NTG 诱变选育出一株可代谢半乳糖的嗜热链球菌 IMAU80846Y，该菌株在半乳糖代谢途径中的一些和半乳糖代谢相关氨基酸序列发生突变，全基因测序结果表明突变株与代谢相关基因发生突变，使其可以更好地代谢半乳糖，降低乳制品中半乳糖含量，提高发酵乳品质，HPLC 和发酵特性的分析结果也证实了这一结论。

参考文献

- [1] TARRAH A, NOAL V, GIARETTA S, TREU L, da SILVA DUARTE V, CORICH V, GIACOMINI A. Effect of different initial pH on the growth of *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains[J]. *International Dairy Journal*, 2018, 86: 65-68.
 - [2] LAVELLE K, McDONNELL B, FITZGERALD G, van SINDEREN D, MAHONY J. Bacteriophage-host interactions in *Streptococcus thermophilus* and their impact on co-evolutionary processes[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2023, 47(4): fuad032.
 - [3] XU ZS, LIANG Y, KONG J, ZHANG SS, LIU XL, WANG T. A food-grade vector for *Streptococcus thermophilus* based on the α -complementation of β -galactosidase[J]. *Journal of Dairy Science*, 2022, 105(7): 5641-5653.
 - [4] YU P, LI N, GENG MX, LIU ZM, LIU XM, ZHANG HP, ZHAO JX, ZHANG H, CHEN W. Short communication: lactose utilization of *Streptococcus thermophilus* and correlations with β -galactosidase and urease[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(1): 166-171.
 - [5] ROUX E, NICOLAS A, VALENCE F, SIEKANIEC G, CHUAT V, NICOLAS J, le LOIR Y, GUÉDON E. The genomic basis of the *Streptococcus thermophilus* health-promoting properties[J]. *BMC genomics*, 2022, 23(1): 210-210.
 - [6] de SOUZA OLIVEIRA RP, TORRES BR, PEREGO P, de OLIVEIRA MN, CONVERTI A. Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 62: 62-69.
 - [7] YI ZQ, SU YX, XU MN, BERGMANN A, INGTHORSSON S, ROLFSSON O, SALEHI-ASHTIANI K, BRYNJOLFSSON S, FU WQ. Chemical mutagenesis and fluorescence-based high-throughput screening for enhanced accumulation of carotenoids in a model marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum*[J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(8): 272.
 - [8] 郝宝成, 宋向东, 高艳, 王学红, 刘宇, 陈柯源, 梁妍, 胡毓瑶, 邢小勇, 温峰琴, 胡永浩, 梁剑平. 利用亚硝基胍诱变和高通量测序技术分析疯草内生真菌产 SW 生物合成通路[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(1): 169-182.
- HAO BC, SONG XD, GAO Y, WANG XH, LIU Y,

- CHEN KY, LIANG Y, HU YY, XING XY, WEN FQ, HU YH, LIANG JP. Analysis of the biosynthesis pathway of produced SW by endophytic fungi from locoweed using nitrosoguanidine mutation and high throughput sequencing technology[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(1): 169-182 (in Chinese).
- [9] IBRAHIM SA, O'SULLIVAN DJ. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade β -galactosidase overproducing mutants of bifidobacteria, lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*[J]. *Journal of Dairy Science*, 2000, 83(5): 923-930.
- [10] HU HF, ZHOU HY, CHENG GP, XUE YP, WANG YS, ZHENG YG. Improvement of R-2-(4-hydroxyphenoxy) propionic acid biosynthesis of *Beauveria bassiana* by combined mutagenesis[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020, 67(3): 343-353.
- [11] 杜敬彩, 赵刚, 李白云, 许国峰, 张成虎. 亚硝基胍-紫外复合诱变选育高产衣康酸菌株[J]. *生物化工*, 2023, 9(3): 30-34.
- DU JC, ZHAO G, LI ZY, XU GF, ZHANG CH. Breeding of high itaconic acid producing strain by NTG-UV compound mutation[J]. *Biological Chemical Engineering*, 2023, 9(3): 30-34 (in Chinese).
- [12] BENATEYA A, BRACQUART P, LINDEN G. Galactose-fermenting mutants of *Streptococcus thermophilus*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1991, 37(2): 136-140.
- [13] 高兆建, 李勇, 陈尚龙, 张桂英, 纪伟. 耐高温 β -半乳糖苷酶产生菌诱变和突变菌株产酶特性[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 180-183.
- GAO ZJ, LI Y, CHEN SL, ZHANG GY, JI W. Mutation of thermostable β -galactosidase-producing strain and β -galactosidase producing characterization of mutan[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(24): 180-183 (in Chinese).
- [14] 赵洁, 席晓霞, 张兴昌, 刘文俊, 王记成, 孙志宏, 孙天松. 分子生物学法快速筛选具有优良产酸特性的嗜热链球菌[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(3): 73-80.
- ZHAO J, XI XX, ZHANG XC, LIU WJ, WANG JC, SUN ZH, SUN TS. Rapid screening *Streptococcus thermophilus* strains with superior acid-producing character by molecular biology techniques[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(3): 73-80 (in Chinese).
- [15] 马文瑞, 孙志伟, 石俊, 张小娜, 于佳俊, 裴疆森, 王德良, 贾士儒, 钟成, 薛洁. 非酿酒酵母 *Nakazawaea ishiwadae* GDMCC 60786 产乙酸乙酯的诱变菌株筛选及其安全性评价[J]. *食品科学*, 2023, 44(10): 165-172.
- MA WR, SUN ZW, SHI J, ZHANG XN, YU JJ, PEI JS, WANG DL, JIA SR, ZHONG C, XUE J. Screening and safety evaluation of ethyl acetate-producing mutant of non-*Saccharomyces* yeast *Nakazawaea ishiwadae* GDMCC 60786[J]. *Food Science*, 2023, 44(10): 165-172 (in Chinese).
- [16] ZHAO JC, MU YL, GU XY, XU XN, GUO TT, KONG J. Site-directed mutation of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* for galactooligosaccharide-enriched yogurt making[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 105(2): 940-949.
- [17] THODEN JB, TIMSON DJ, REECE RJ, HOLDEN HM. Molecular structure of human galactokinase: implications for type II galactosemia[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(10): 9662-9670.
- [18] de VOS WM. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 70(2): 223-242.
- [19] LI L, ZHOU L, LIU XM, GONG JY, XIAO GN. Physicochemical, microbiological, and sensory properties of low-lactose yogurt using *Streptococcus thermophilus* with high β -galactosidase activity[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023, 103(15): 7374-7380.
- [20] LIU GF, QIAO YL, ZHANG YJ, LENG C, CHEN HY, SUN JH, FAN XJ, LI AL, FENG Z. Metabolic profiles of carbohydrates in *Streptococcus thermophilus* during pH-controlled batch fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1131.
- [21] 刘刚, 梁琪, 宋雪梅, 张炎. 复合诱变选育高产胞外多糖嗜热链球菌菌株[J]. *食品与发酵科技*, 2019, 55(1): 11-18, 70.
- LIU G, LIANG Q, SONG XM, ZHANG Y. Compound mutation breeding of high-yield extracellular polysaccharide *Streptococcus thermophilus*[J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2019, 55(1): 11-18, 70 (in Chinese).
- [22] RASHWAN AK, OSMAN AI, CHEN W. Natural nutraceuticals for enhancing yogurt properties: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2023, 21(3): 1907-1931.
- [23] CUI YH, XU TT, QU XJ, HU T, JIANG X, ZHAO CY. New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10): 1701.

- [24] ISKANDAR CF, CAILLIEZ-GRIMAL C, BORGES F, REVOL-JUNELLES AM. Review of lactose and galactose metabolism in lactic acid bacteria dedicated to expert genomic annotation[J]. *Trends in Food Science Technology*, 2019, 88: 121-132.
- [25] TARRAH A, TREU L, GIARETTA S, DUARTE V, CORICH V, GIACOMINI A. Differences in carbohydrates utilization and antibiotic resistance between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products in Italy[J]. *Current microbiology*, 2018, 75: 1334-1344.
- [26] GEERTSMA ER, DUURKENS RH, POOLMAN B. The activity of the lactose transporter from *Streptococcus thermophilus* is increased by phosphorylated IIA and the action of β -galactosidase[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(48): 15889-15897.
- [27] SOTOMAYOR-VIVAS C, HERNÁNDEZ-LEMUS E, DORANTES-GILARDI R. Linking protein structural and functional change to mutation using amino acid networks[J]. *PLoS One*, 2022, 17(1): e0261829.
- [28] LIN Y, XU QL, LI XM, SHAO P. *Tremella fuciformis* polysaccharides as a fat substitute on the rheological, texture and sensory attributes of low-fat yogurt[J]. *Current Research in Food Science*, 2022: 51061-1070.
- [29] DESHWAL GK, TIWARI S, KUMAR A, RAMAN RK, KADYAN S. Review on factors affecting and control of post-acidification in yoghurt and related products[J]. *Trends in Food Science Technology*, 2021: 109499-512.
- [30] MATEJČEKOVÁ Z, DUJMIĆ E, LIPTÁKOVÁ D, VALÍK L. Modeling of lactic acid fermentation of soy formulation with *Lactobacillus plantarum* HM1[J]. *Food Science and Technology International*, 2019, 25(2): 141-149.
- [31] 李娜, 宋鸽, 王秀艳, 李慧娟, 逯刚, 张淑丽, 王海斌, 张德喜. 流变仪与粘度计在发酵乳产品中粘度测定的对比研究[J]. *中国乳业*, 2023(8): 105-109.
LI N, SONG G, WANG XY, LI HJ, LU G, ZHANG SL, WANG HB, ZHANG DX. A comparative study of rheometer and viscometer for viscosity determination in fermented milk products[J]. *China Dairy*, 2023(8): 105-109 (in Chinese).
- [32] 惠丹阳, 华舒雨, 唐裕芳, 刘忠义, 刘文星. 大豆蛋白部分替代牛乳蛋白对酸奶理化性质及结构的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(15): 122-128.
HUI DY, HUA SY, TANG YF, LIU ZY, LIU WX. Effect of partial replacement of milk protein by soy protein on the physicochemical properties and structure of yogurt[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(15): 122-128 (in Chinese).
- [33] 刘清霞, 林伟锋, 陈中. 嗜热链球菌在脱脂乳中发酵特性的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(3): 122-126.
LIU QX, LIN WF, CHEN Z. Study on fermentation of *Streptococcus thermophilus* in skimmed milk[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(3): 122-126 (in Chinese).
- [34] QI XY, LIU DS, YUAN JJ, REGENSTEIN JM, ZHOU P. Effects of heating temperatures and pH of skim milk fortified with milk protein concentrate on the texture and microstructure of high-protein yoghurts[J]. *International Dairy Journal*, 2022, 131: 105395.