

响应面法优化嗜热链球菌 WHH003 的发酵条件

陈琳, 邢良英, 李宝磊, 侯保朝, 李言郡*

(杭州娃哈哈集团有限公司, 浙江省食品生物工程重点实验室, 杭州 310018)

摘要: **目的** 对嗜热链球菌 WHH003 发酵条件进行优化, 以提高其发酵活菌数。 **方法** 采用单因素实验确定嗜热链球菌发酵条件的响应值, 采用响应面法优化嗜热链球菌的发酵温度、pH 以及接种量, 确定最佳发酵条件。 **结果** 对嗜热链球菌活菌数的影响因素大小依次为: 发酵 pH 值>接种量>发酵温度; 最优发酵条件为: pH5.5、发酵温度 45 °C、接种量 4%。在此条件下, 嗜热链球菌的活菌数 LG 值为 9.62。 **结论** 本研究建立的响应面模型可行, 可降低其工业化生产成本。

关键词: 响应面法; 嗜热链球菌; 活菌数; 发酵

Optimization of fermentation conditions of *Streptococcus thermophilus* WHH003 by response surface methodology

CHEN Lin, XING Liang-Ying, LI Bao-Lei, HOU Bao-Chao, LI Yan-Jun*

(Key Laboratory of Food and Biological Engineering of Zhejiang Province, Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the fermentation conditions of *Streptococcus thermophilus* WHH003 so as to improve the bacterial count. **Methods** The response values were determined by single factor experiment. The conditions of fermentation temperature, pH value and inoculums size were optimized by response surface methodology in order to confirm the optimal fermentation conditions. **Results** The influencing factors for the bacterial counts of *Streptococcus thermophilus* WHH003 in the order were: fermentation pH value>inoculums size>fermentation temperature, and the optimal fermentation conditions were as follows: pH 5.5, temperature 45 °C and inoculums size 4%. Under the optimized conditions, the bacterial count LG was up to 9.62. **Conclusion** The established response surface model is feasible, which can reduce the cost of production.

KEY WORDS: response surface methodology; *Streptococcus thermophilus*; bacterial counts; fermentation

1 引言

嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)是在食品工业中应用较为广泛的一种乳酸菌^[1], 属于链球菌属, 是酸乳制作过程中必不可少的一个重要菌株, 主要功能是发酵糖类物质产生乳酸、胞外多糖、乙醛等^[2]风味物质和功能性物质, 可提高酸乳的风味和口感, 并降低酸乳的凝乳时间,

同时具有改善肠道微环境、免疫力等生理作用^[3]。近年来, 随着食品科学的深入发展, 酸乳制品已经成为消费者最受欢迎的产品之一, 作为发酵剂中必不可少的一个菌株, 嗜热链球菌的活菌增殖是一个重要的研究方向^[4]。

目前, 直投式发酵剂是食品企业中的主要应用制剂, 嗜热链球菌为其中重要的一株菌株, 常规培养的嗜热链球菌经过发酵后, 活菌数通常在 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g, 为提高活菌

基金项目: 浙江省科技厅重点研发项目(2015C02SA1000006)

Fund: Supported by the Key Research Projects of Science and Technology Department of Zhejiang Province (2015C02SA1000006)

*通讯作者: 李言郡, 高级工程师, 主要研究方向为食品饮料学, E-mail: lyj@wahaha.com.cn

*Corresponding author: LI Yan-Jun, Senior Engineer, Key Laboratory of Biological Engineering of Zhejiang Province, Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China. E-mail: lyj@wahaha.com.cn.

数可优化该菌的发酵条件,提高菌体的活力,减少直投式发酵剂的成本。本研究采用单因素试验和响应面法优化了嗜热链球菌 WHH003 的发酵条件^[5]以提高活菌数,从而为直投式发酵剂的工业化生产提供依据。

2 材料与方法

2.1 实验菌株

嗜热链球菌 WHH003(*Streptococcus thermophilus*),由杭州娃哈哈公司生物工程研究所保藏。

MRS 培养基(De Man Rogosa Sharpe),英国 Oxoid 公司。

2.2 仪器与设备

10 L 发酵罐 S-000118931(Infors 生物技术(中国)有限公司);电子显微镜 M40001(徕卡公司);pH 计 seven MULT1 S20、电子天平 MS603S(梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司);SG403A-HE-INT 超净工作台(美国 Joan Baker 公司);生化培养箱 KB400(Thermo 有限公司);高压灭菌锅 HL410(日本 Hirayama 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 菌种的培养

嗜热链球菌 WHH003 活化,3 次传代^[6],以 1%接种量接入 De Man Rogosa Sharpe(MRS 培养基)中,37 ℃静置培养 16 h^[7]。

2.3.2 单因素实验

制备 6 L MRS 培养基,1%接种量,装入 10 L 发酵罐中,121 ℃灭菌 30 min。发酵 pH 值、温度、接种量为影响嗜热链球菌发酵活菌数的单因素,通过单因素试验确定响应面试验的因素和水平。

(1)发酵 pH 值对嗜热链球菌活菌数的影响

发酵 pH 值分别设为 4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5,发酵温度 37 ℃,1%接种量,发酵时间 8 h。发酵结束后,取样,稀释涂布法测定活菌数。

(2)接种量对嗜热链球菌活菌数的影响

分别以 1%、2%、3%、4%和 5%的接种量接种嗜热链球菌培养液,发酵 pH 值为 5.5,发酵温度 37 ℃,发酵时间 8 h。发酵结束后,取样,稀释涂布法测定活菌数。

(3)发酵温度对嗜热链球菌活菌数的影响

以 3%接种量接种嗜热链球菌培养液,发酵 pH 值为 5.5,发酵温度分别设为 25、30、35、40 和 45 ℃,发酵时间为 8 h。发酵结束后,取样,稀释涂布法测定活菌数。

2.3.3 响应面法优化嗜热链球菌发酵的培养条件

采用 Box-Behnken 试验设计,根据单因素试验结果,确定 Box-Behnken 设计的自变量,以发酵温度、pH、接种量为因素,以活菌数为响应值。运用 Design-Expert 进行分析^[8],试验因素水平见表 1。

表 1 响应面试验因素
Table 1 Factors of response surface experiment

水平	X ₁ 发酵 pH	X ₂ 发酵温度/℃	X ₃ 接种量/%
-1	5.0	35	2%
0	5.5	40	3%
1	6.0	45	4%

2.3.4 模型可行性的验证

在响应面优化后的条件下进行实验,比较预测值和实验值并验证模型的有效性。

2.3.5 数据处理

所有实验结果测定 3 次,取平均值。活菌数 LG 值 =Log₁₀(活菌数)。

3 结果与分析

3.1 单因素试验

3.1.1 发酵 pH 值对嗜热链球菌活菌数的影响

发酵 pH 值对嗜热链球菌活菌数的影响见图 1。由图 1 可见,发酵 pH 对嗜热链球菌活菌数的影响显著($P<0.05$)。发酵 pH 值对活菌数的影响呈现先上升后下降的趋势,当发酵 pH 值为 5.5 时活菌数最高。因此,确定发酵 pH5.5 为响应面中心值^[9]。

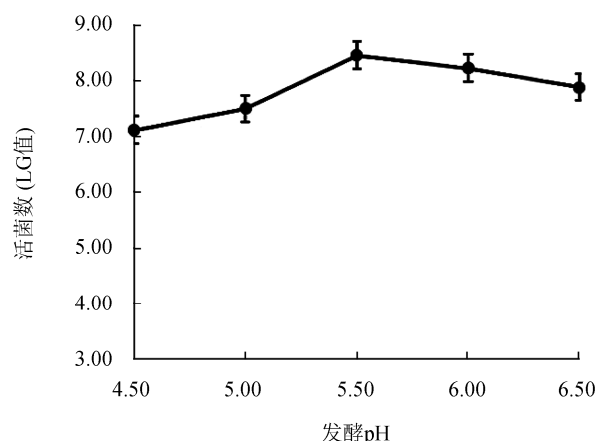


图 1 发酵 pH 值对嗜热链球菌活菌数的影响($n=3$)

Fig. 1 Effect of fermentation pH on bacterial counts of *Streptococcus thermophilus* ($n=3$)

3.1.2 接种量对嗜热链球菌活菌数的影响

接种量对嗜热链球菌活菌数的影响如图 2 所示。当接种量为 1%~3%时,菌株的活菌数迅速增加,随接种量继续增加,活菌数呈逐渐下降趋势,接种量对该菌活菌数的影响显著($P<0.05$)^[10]。因此,确定接种量为 3%。

3.1.3 发酵温度对嗜热链球菌活菌数的影响

发酵温度对嗜热链球菌活菌数的影响如图 3 所示。当发酵温度为 40 ℃时,活菌数最高,活菌数随发酵温度变化差异不显著($P>0.05$)。根据活菌数变化情况,选择发酵温度为 40 ℃进行响应面实验^[10]。

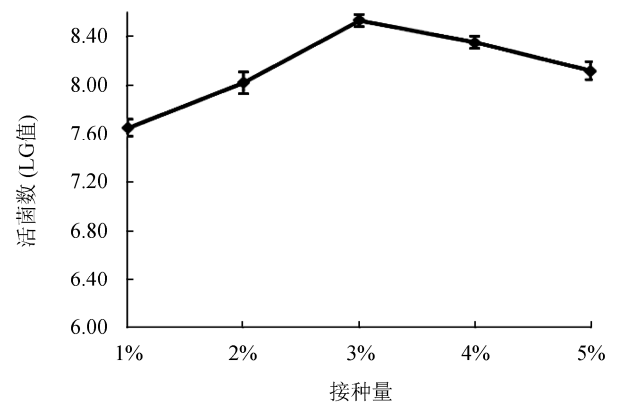


图 2 接种量对嗜热链球菌活菌数的影响($n=3$)

Fig. 2 Effect of inoculums size on bacterial counts of *Streptococcus thermophilus* ($n=3$)

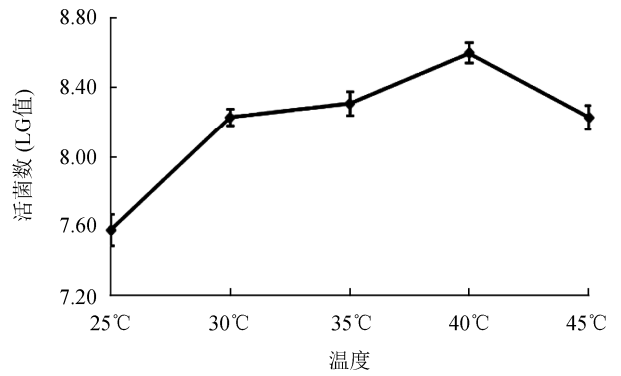


图 3 发酵温度对嗜热链球菌活菌数的影响($n=3$)

Fig. 3 Effect of fermentation temperature on bacterial counts of *Streptococcus thermophilus* ($n=3$)

3.2 响应面模型的建立及其显著性

响应面试验设计及结果见表 2。采用 Design-Expert

软件对实验数据进行 ANOVA 分析, 各因素经过拟合得到的回归方程为二次多项式回归模型方程为 $Y = 9.65 - 0.094X_1 + 0.26X_2 - 0.081X_3 - 0.13X_1X_2 - 0.020X_1X_3 - 0.13X_2X_3 - 0.62X_1^2 - 0.43X_2^2 - 0.36X_3^2$ 。

结果表明, 模型是显著的($P < 0.05$), 回归模型的决定系数为 0.9623, 说明该模型拟合程度良好, 可用该模型分析与预测嗜热链球菌发酵的培养条件^[11]。

表 2 响应面试验设计及结果					
Table 2 Design and results of response surface experiment					
编号	编码			活菌数(LG 值)	
	X_1	X_2	X_3	试验值	预测值
1	-1	0	-1	8.85	8.83
2	1	0	1	8.45	8.50
3	0	0	0	9.65	9.68
4	0	1	1	8.83	8.78
5	1	-1	0	8.23	8.20
6	-1	1	0	9.25	9.35
7	0	0	0	9.65	9.68
8	0	1	-1	9.15	9.20
9	1	0	-1	8.75	8.82
10	-1	-1	0	8.20	8.35
11	0	0	0	9.65	9.68
12	0	-1	1	8.82	8.78
13	-1	0	1	8.63	8.58
14	1	1	0	8.75	8.80
15	0	0	0	9.65	9.68
16	0	-1	-1	8.63	8.58
17	0	0	0	9.65	9.68

表 3 回归方程系数显著性检验表						
Table 3 Significance test table for regression equation coefficients						
模型中系数项	系数估计值	自由度	标准误差	95%置信度区间下限	95%置信度区间上限	P 值
常数项	9.65	1	0.067	9.49	9.81	
X_1	-0.094	1	0.053	-0.22	0.032	0.0017
X_2	0.26	1	0.053	0.14	0.39	0.1216
X_3	-0.081	1	0.053	-0.21	0.045	0.1708
X_1^2	-0.62	1	0.073	-0.79	-0.44	0.0001
X_2^2	-0.43	1	0.073	-0.60	-0.25	0.0006
X_3^2	-0.36	1	0.073	-0.54	-0.19	0.0016
X_1X_2	-0.13	1	0.075	-0.31	0.046	0.1218
X_1X_3	-0.020	1	0.075	-0.20	0.16	0.7982
X_2X_3	-0.13	1	0.075	-0.31	0.051	0.1342

回归模型的显著性分析见表3。由回归方程系数显著性检验可知,模型一次项 X_1 极显著, X_2 、 X_3 不显著;二次项 X_1^2 极显著, X_2^2 显著, X_3^2 不显著。通过回归系数绝对值大小分析各因素变化对嗜热链球菌活菌数的发酵培养条件的影响。结果表明,3个因素对该菌活力影响大小依次为:发酵pH值>接种量>发酵温度。

利用 Design Expert 软件进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面分别见图4~6。

由图4所示,两个因素的交互项不显著,发酵温度不变,随发酵pH值增加,活菌数先增大,当发酵pH值超过5.5后,活菌数呈逐渐下降的趋势。

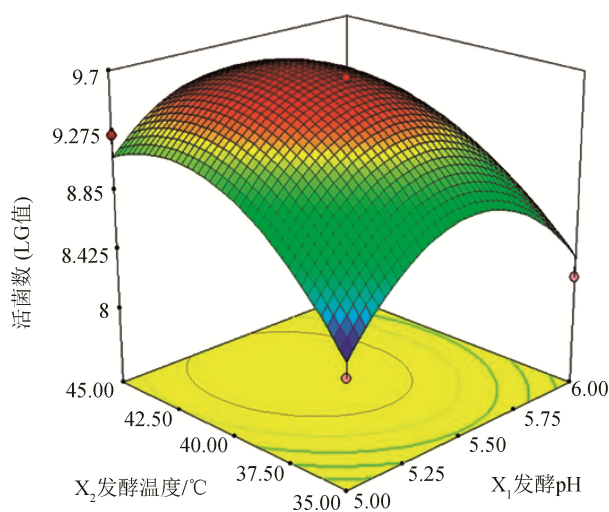


图4 发酵温度和pH值对嗜热链球菌活菌数影响的响应面图

Fig. 4 Response surface and contour plot for the effect of cross-interaction between fermentation temperature and pH on bacterial counts of *Streptococcus thermophilus*

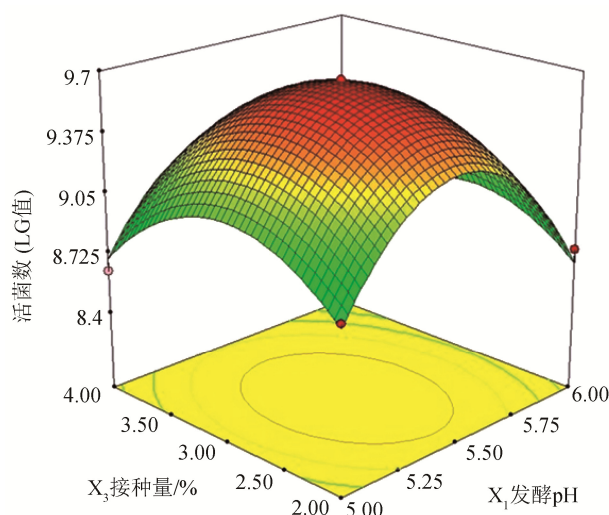


图5 接种量和发酵pH值对嗜热链球菌活菌数影响的响应面图

Fig. 5 Response surface and contour plot for the effect of cross-interaction between inoculum size and pH on bacterial counts of *Streptococcus thermophilus*

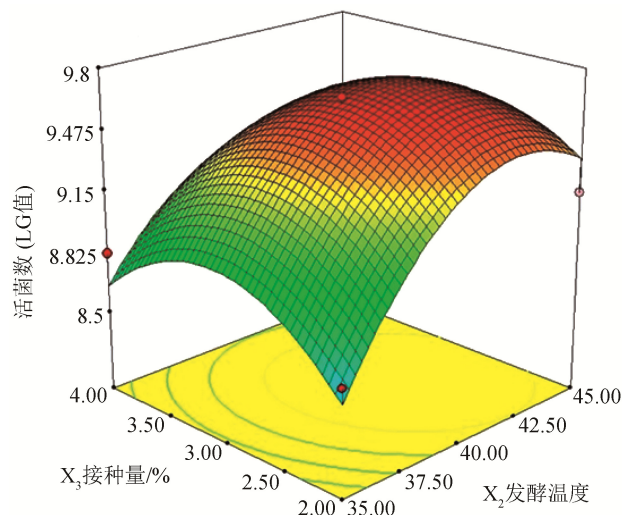


图6 接种量和发酵温度对嗜热链球菌活菌数影响的响应面图

Fig. 6 Response surface and contour plot for the effect of cross-interaction between inoculum size and fermentation temperature on bacterial counts of *Streptococcus thermophilus*

由图5可见,两个因素的交互项不显著,发酵pH值不变,抑菌活性随接种量的增加而迅速增加,当接种量超4%时,活菌数开始下降。

由图6可见,接种量不变,活菌数随发酵温度的升高而逐渐增加,当发酵温度超过40~45℃时,抑菌活性迅速下降。当发酵温度在45℃,接种量在3%~4%范围内,活菌数较高,活菌数LG值可达到9.65。

3.3 回归模型的验证

通过上述回归模型,采用 Design-Expert 7.1 软件优化发酵条件,获得嗜热链球菌的最适发酵条件为:发酵pH为5.5、发酵温度为45℃、接种量为4%,在此条件下活菌数LG值可达到9.65。采用上述条件进行验证实验^[12],结果活菌数LG值为可达到9.62,相对误差为0.3%,证明该模型建立成功^[13]。

4 结论

本研究采用响应面法对嗜热链球菌的发酵条件进行了优化^[14],建立了活菌数与发酵pH值、发酵温度、接种量3个因素的回归模型,该模型合理可靠。3个因素对嗜热链球菌活菌数的影响大小依次为:发酵pH值>接种量>发酵温度^[15];最优发酵条件为:pH5.5、发酵温度45℃、接种量4%。在此条件下,嗜热链球菌的活菌数LG值为9.62。

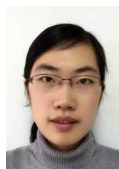
参考文献

- [1] Maira J, Noura K, Florian C, et al. A large scale in vitro screening of *Streptococcus thermophilus* strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential [J]. Food Sci Technol, 2016, 70(7): 78-87.

- [2] Esteban VP, Maria EJ, Andrea D, *et al.* Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations [J]. Food Sci Technol, 2016, 71(9): 288–294.
- [3] Kontham KV, Kesavan MN. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures [J]. Food Control, 2016, 69(11): 61–64.
- [4] Tamime A. Fermented milks: a historical food with modern applications-a review [J]. Eur J Clin Nutr, 2002, 4(12): S2.
- [5] Vinderola C, Mocchiutti P, Reinheimer J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products [J]. J Dairy Sci, 2002, 85(4): 721–729.
- [6] Bongers RS, Hoefnagel MHN, Kleerebezem M. High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 71(2): 1109–1113
- [7] Chaves AC, Fernandez M, Lerayer AL, *et al.* Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(11): 5656–5662.
- [8] Zdravko Šumić, Anita Vakula, Aleksandra Tepić, *et al.* Modeling and optimization of red currants vacuum drying process by response surface methodology (RSM) [J]. Food Chem, 2016, 203(15): 465–475.
- [9] Manohar B, Divakar S. Applications of surface plots and statistical designs to selected lipase catalysed esterification reactions [J]. Process Biochem, 2004, 39(7): 847–853.
- [10] Schiraldic, Assuciv Maresca C, *et al.* High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, 82(2): 213–222.
- [11] Nakajima H, Kaizu YS, Hirota T. Cholesterol-lowering activity of ropy fermented milk [J]. J Food Sci, 1992, 52(6): 1327–1329.
- [12] Curtin AC, De AM, Cipriani M, *et al.* Amino acid catabolism in cheese-related bacteria; selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology [J]. Appl Microbiol, 2001, 91(2): 312–321.
- [13] Dan L, Jiaxi L, Feng Z, *et al.* The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium [J]. Food Chem, 2016, 197(15): 367–372.
- [14] Ligia R, Jose T, Rosario O, *et al.* Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria [J]. Process Biochem, 2006, 41(1): 1–10.
- [15] Kristo E, Biliaderis CG, Tzanetakis N. Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology [J]. Food Chem, 2003, 83(3): 437–446.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



陈 琳, 工程师, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: lin.chen1@wahaha.com.cn ,
chenlinlucky@163.com

李言郡, 高级工程师, 主要研究方向为食品饮料科学。

E-mail: lyj@wahaha.com.cn