

乳酸链球菌肽发酵动力学的研究*

庄绪亮¹ 邱季杰² 张洪勋¹ 谢慧君¹ 王晓谊¹

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术室 北京 100085)¹

(宁波市科技园区贝源塑化有限公司 宁波 315050)²

摘要: 提出了在恒定不同 pH 的发酵条件下, 乳酸链球菌 SM526 的菌体生长、底物消耗、乳酸及 Nisin 产生的动力学模型。菌体生长、乳酸及 Nisin 产生用逻辑方程描述, 而底物消耗是菌体生长和乳酸产生速率的函数。模型表明, 乳酸链球菌 SM526 菌体生长和乳酸产生的最佳 pH 为 7.0, 而 Nisin 产生的最佳 pH 却为 6.5。

关键词: 乳酸链球菌, 乳酸链球菌肽, 发酵动力学

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0040-06

Study on Fermentation Kinetics of Nisin by *Lactococcus lactis* *

ZHUANG Xu-Liang¹ QIU Ji-Jie² ZHANG Hong-Xun¹

XIE Hui-Jun¹ WANG Xiao-Yi¹

(Department of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)¹

(Bei-Yuan Plastic Chemicals Co. Ltd. of Ningbo Science Park, Ningbo 315050)²

Abstract: The kinetics of growth, lactic acid and nisin production and substrate consumption by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SM526 were studied in different pH. Growth, lactic acid and nisin production were modelled using a simple logistic equation while substrate consumption was found to be a function of growth and lactic acid production rate. The optimal pH for growth and lactic acid production was 7.0 while it was 6.5 for nisin production according to the models developed.

Key words: *Lactococcus lactis*, Nisin, Fermentation kinetics

Nisin, 即乳酸链球菌肽 (也有人译为乳酸链球菌素或尼生素), 是目前细菌素中研究最多的一种, 是由某些乳酸链球菌所产生, 含有 34 个氨基酸残基及 5 个硫醚桥, 能对某些 G⁺ 的致病菌和腐败菌产生抑制作用的短肽^[1,2]。1953 年, Nisin 的第一批商业化制品—NISAPLIN 在英国面世。1969 年^[3], FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会批准 Nisin 可作为一种食品添加剂使用。到 1990 年, 已有 46 个国家和地区批准 Nisin 作为一种天然生物食品防腐剂使用。同年, 我国卫生部签发了在国内使用 Nisin 作为食品保藏剂的使用合格证明书, 并被列入国标 GB2760-86 的 1990 年增补品种中, 可用于罐藏食品、植物蛋白食品、乳制品和肉制品中, 从而极大地促进了 Nisin 在我国的研究。

Nisin 能杀死食品中的大部分致病菌和腐败菌。有证据表明在 Nisin 存在的条件下, 芽孢变得对温度敏感。反之, 经过热处理后存活下来的芽孢对 Nisin 也敏感。另外热处理后保留在食品中的 Nisin 可以防止芽孢的萌发。因此在热处理程度降低的情况下加入

* 中国科学院宁波市高新技术种子资金资助项目 (No. 2003D10045)

** 通讯作者 Tel: 010-62923562, E-mail: xlzhuang@mail.rcees.ac.cn

收稿日期: 2004-08-09, 修回日期: 2004-11-10

Nisin 可达到食品安全的目的。这种温和处理,使食品在营养价值、风味、质地、外观上得以提高,从而延长保质期,同时还可以节约大量能源。

在 Nisin 发酵研究中,为提高其发酵单位,控制培养基的 pH 值是极其重要的^[1,4~6],但迄今为止,在恒 pH 发酵条件下关于控制不同的 pH 值对 Nisin 发酵水平的影响还未有报道。本文的目的是研究菌体生长、乳酸和 Nisin 产生的发酵动力学,以比较并确定乳酸链球菌菌体生长、乳酸和 Nisin 产生的最佳 pH 值。

1 材料与方法

1.1 菌种

乳酸链球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SM526 由本实验室筛选并保存;溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 由本实验室保存。

1.2 培养基

MRS、LB、营养琼脂牛奶培养基见参考文献 [7];发酵培养基:在 SYS3 培养基^[7]基础上,添加 1% 的 Tween-80。

1.3 发酵条件

培养基灭菌后,在接种前其 pH 值精确调至 6.0~7.5,接种量 1%,发酵罐装料系数 70%,培养温度 32℃,转速 200r/min,罐内通入适量 N₂ 以保证无氧条件。培养基中加入 0.2% 的花生油以控制泡沫。发酵过程中通过蠕动泵加入 10mol/L NaOH 分别恒定发酵液 pH 至 6.0, 6.5, 7.0, 7.5。

1.4 分析及测定方法

生物量测定:细胞干重法^[7];蔗糖测定:Roe 比色法^[7];抑菌活性测定:杯碟法^[7]。

乳酸测定:所用设备为 SBA-50 型生物传感分析仪。标准品为 5.0mmol/L 的乳酸标准液,定标时误差不大于 2%。

1.5 统计分析方法

运用 SAS 统计分析软件^[8]的 GLM 过程进行模型参数的一元或多元线性回归。对于非线性方程,通过数学变换化为线性方程后再进行回归分析。

2 结果

2.1 乳酸链球菌 SM526 菌体生长的动力学模型

Mercier 等^[9]提出的逻辑模型能较好地描述乳酸链球菌 SM526 的菌体生长:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{1-X}{X_{\max}} \quad \dots\dots (1)$$

式中: μ_{\max} 为最大比生长速率 (h^{-1}), X 为菌体浓度 ($g \cdot l^{-1}$), t 为发酵时间 (h), dX/dt 为菌体生长速率 ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)。

为求出式中的 μ_{\max} , 对方程 (1) 进行积分, 并进行数学变换后可得:

$$\frac{1}{t} = \mu_{\max} \cdot \frac{1}{\ln \frac{X}{X_0} \cdot \frac{(X_{\max} - X_0)}{(X_{\max} - X)}} \quad \dots\dots (2)$$

运用方程 (2), 代入实验数据并做一元线性回归分析, 既可求得不同 pH 下的

μ_{\max} , 结果见表 1。

表 1 不同 pH 条件下菌体生长的 μ_{\max}

pH	X_0 (g l^{-1})	X_{\max} (g l^{-1})	μ_{\max} (h $^{-1}$)	RSS	R ²
6.0	0.04	2.680	0.562 ± 0.01612	0.00535	0.9927
6.5	0.04	3.500	0.826 ± 0.0049	0.00019	0.9997
7.0	0.04	3.800	1.129 ± 0.032	0.00446	0.9395
7.5	0.04	3.200	0.7907 ± 0.0041	0.00017	0.9997

RSS 残差平方和, R² 相关系数平方, X_0 、 X_{\max} 均为实验值

从表 1 中可以看出, 随着 pH 值从 6.0 提高到 7.0, 菌体的最大生长量 X_{\max} (g l^{-1}) 从 2.68 提高到 3.8, 但 pH 升至 7.5 时, X_{\max} 值有所降低。同时 μ_{\max} (h $^{-1}$) 值也从 0.562 (pH6.0) 提高到 1.129 (pH7.0), 然后开始降低, 表明 pH 值 7.0 适合菌体生长。

2.2 乳酸产生的动力学模型

Chara 等人^[10]曾用 Monod 模型较好地描述了乳酸产生的动力学过程, 但用于乳酸链球菌 SM526 效果并不理想。同菌体生长一样, 运用简单的逻辑模型^[9]来描述乳酸产生过程, 与实验数据拟合得较好。

$$\frac{dP}{dt} P_0' \cdot \frac{1-P}{P_{\max}} \cdot P \dots\dots (3)$$

式中: $P_0' = r_{P0}/P_0$, 其中, P_0' 为乳酸初始比产生速率 (h $^{-1}$), r_{P0} 为乳酸初始产生速率 (g $l^{-1}h^{-1}$), P_{\max} 为乳酸最大浓度 (g l^{-1})。经过公式变换后得到:

$$\frac{1}{t} = P_0' \cdot \frac{1}{Ln \frac{P(P_{\max}-P_0)}{P_0(P_{\max}-P)}} \dots\dots (4)$$

通过式 (4), 根据不同时间的 P 值并经回归分析可分别测定不同 pH 下的 P_0' 值 (表 2)。从表中可以看出控制不同的 pH 值对乳酸链球菌 SM526 产乳酸的影响。同菌体生物量的增加相似, 随着 pH 值的提高, P_0' 值和 P_{\max} 值都在 pH7.0 时达到最高值, pH7.0 时有所降低, 表明 pH7.0 是乳酸产生的最佳 pH。

表 2 不同 pH 下的 P_0' 值

pH	P_0 (g l^{-1})	P_{\max} (g l^{-1})	P_0' (h $^{-1}$)	RSS	R ²
6.0	0.200	15.20	0.8740 ± 0.001795	0.0000277	0.9999
6.5	0.200	15.70	1.1535 ± 0.01599	0.001062	0.9985
7.0	0.200	16.10	1.3334 ± 0.0325	0.003275	0.9950
7.5	0.200	15.90	1.2292 ± 0.02199	0.002094	0.9970

P_0 、 P_{\max} 为实验值

每消耗一单位的底物所产生的乳酸量是不依赖于时间的常数, 通过回归分析得出的乳酸链球菌 SM526 乳酸对消耗基质的得率系数 ($Y_{p/s}$) 在 pH6.0, 6.5, 7.0, 7.5 下分别为: 0.8217 ± 0.0214, 0.7736 ± 0.0411, 0.7764 ± 0.0525, 0.7833 ± 0.0556。其中, pH 为 6.0 时, $Y_{p/s}$ 值最高, 而 pH 在 6.5 和 7.0 时 $Y_{p/s}$ 值差别不大, pH 为 7.5 时, $Y_{p/s}$ 值略大于前两者。

2.3 底物消耗的动力学模型

底物的消耗用下列微分方程来描述：

$$-\frac{dS}{dt}=K1\frac{dX}{dt}+K2\frac{dP}{dt} \dots\dots (5)$$

式中，K1=1/Y_{x/s}，K2=1/Y_{p/s}，分别指与菌体生长和乳酸产生有关的底物消耗常数，运用 SAS 统计分析软件进行二元一次线性回归，所得结果见表 3。

表 3 不同 pH 发酵条件下的 K1 及 K2 值

pH	K1	K2	RSS	R ²
6.0	3.6873 ±0.0454	0.5679 ±0.0079	0.00525	0.9999
6.5	2.9224 ±0.0203	0.6139 ±0.0047	0.00554	0.9999
7.0	2.6534 ±0.0218	0.6122 ±0.0055	0.01167	0.9999
7.5	3.1227 ±0.0093	0.5969 ±0.0020	0.00218	0.9999

从表 3 中可以看出，随 pH 从 6.0 提高到 7.0，K1 值降低，pH 再提高时其值升高。随 pH 从 6.0 提高到 6.5，K2 值提高，pH 再提高时，其值开始降低。虽然方程（5）能较好地模拟底物消耗的实验数据，但遗憾的是方程（5）中本应分别为 Y_{x/s}、Y_{p/s} 倒数的 K1 及 K2 值同分别通过 X-X₀对 S₀-S 和 P-P₀对 S₀-S 作线性回归所得出的 Y_{x/s}、Y_{p/s}值相比，偏差都比较大。

2.4 不同 pH 发酵条件对 Nisin 产生的影响及其动力学模型

恒定不同 pH 值的发酵条件下，菌体生长（X-X₀）与 Nisin 活性（NA-NA₀）之间的关系见图 1。

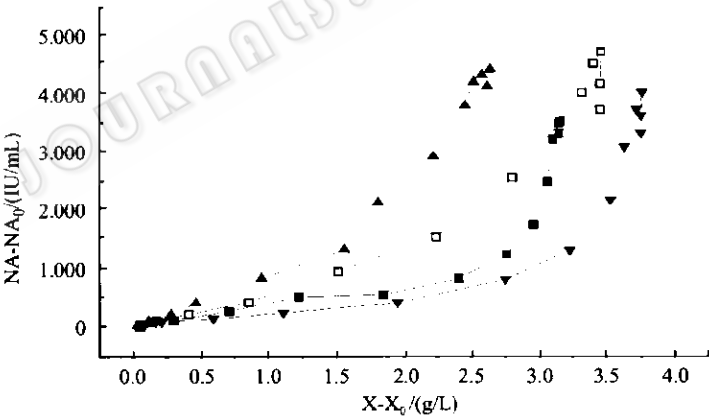


图 1 不同 pH 条件下菌体生长（X-X₀）与 Nisin 活性（NA-NA₀）之间的关系

▲ pH6.0, □ pH6.5, ▼ pH7.0, ■ pH7.5

乳酸链球菌 SM526 在厌氧发酵条件下，Nisin 主要在菌体生长的对数期产生，在对数末期，Nisin 合成基本停止。不同 pH 的发酵条件下，Nisin 活性到达峰值所需要的时间有所不同。pH 在 7.0 时为 11h，而 pH 在 7.5 和 6.0 时则为 12h。11 或 12h 后 Nisin 活性迅速降低。从图 1 中可以看出，随着 pH 值从 7.5 降低至 6.5，Nisin 发酵单位却从 3,600IU/mL 提高到 4,800IU/mL，然后降至 4,500IU/mL（pH6.0）。表明 pH6.5 是 Nisin 发酵的最佳 pH。

从图 1 中还可以发现，在 pH6.0 和 6.5 的发酵条件下，Nisin 活性较高，但其活性

下降速度也快。在 pH 分别为 7.5 和 7.0 的情况下, Nisin 活性较低 (分别为 3,600IU/mL 和 4,100IU/mL), 但其活性下降速度却比 pH 为 6.5 和 6.0 时要小。对每一种 pH 的发酵而言, 当 Nisin 活性到达峰值时, 相应的菌体生长量也达到最大值, 说明 Nisin 是作为一种初级代谢产物产生 (厌氧发酵条件下)。

pH 为 6.0 和 6.5 时 Nisin 的产生速率和下降速率都大于 pH 在 7.5 和 7.0 时的值, Nisin 活性的降低被认为是由于菌体对 Nisin 的吸附作用^[11] 以及菌体本身所产生的蛋白酶对 Nisin 的分解作用^[4,12,13], 为避免出现这种现象, 在实际生产中, 应该在菌株发酵的对数末期及时停止发酵, 收获产品。

乳酸链球菌 SM526 的菌体生长和乳酸产生的最佳 pH 值为 7.0, 但 Nisin 产生的最佳 pH 值却为 6.5。在 pH6.5 的发酵条件下, 虽然菌体生长量有所减少, 但 Nisin 活性却比 pH 为 7.5 时提高了约 33%, Nisin 活性上的这种“补偿效果”正是我们的实验所期望的。

用逻辑方程可较好地描述 Nisin 的产生过程:

$$\frac{dN}{dt} = N_0' \cdot \frac{1 - N}{N_{\max}} \cdot N \quad \cdots \cdots (6)$$

$$\text{则: } \frac{1}{t} = N_0' \cdot \frac{1}{\ln \frac{N(N_{\max} - N_0)}{N_0(N_{\max} - N)}} \quad \cdots \cdots (7)$$

式中, dN/dt : Nisin 产生速率 ($\text{IUml}^{-1}\text{t}^{-1}$) $N_0' = r_{N0}/N_0$: Nisin 的初始比产生速率 (h^{-1})

N_0 、 N_{\max} : 分别为 Nisin 的初始和最大浓度 (IUml^{-1})。不同 pH 条件下的 N_0' 值见表 4。

表 4 不同 pH 条件下的 N_0' 值

pH	N_0'	RSS	R^2
6.0	0.5848 ± 0.00569	0.000621	0.9991
6.5	0.6865 ± 0.0230	0.00616	0.9911
7.0	0.5901 ± 0.02516	0.00992	0.9857
7.5	0.3346 ± 0.01907	0.0207	0.9716

从表 4 中可以看出, pH 为 6.5 时, N_0' 达到最大值, pH 超过或低于此值, N_0' 均减小, pH 为 7.5 时, N_0' 值最低, 而 pH 在 6.0 和 7.0 时, N_0' 值相差不大。

由于 Nisin 活性在菌体生长的对数末期后迅速下降, 因此该逻辑方程只能描述 Nisin 在菌体生长的对数末期之前的产生状况, 尚不能描述 Nisin 活性变化的全过程。

3 讨论

对于大部分细菌素产生菌来说, 其产物产生的最适 pH 值往往低于菌体生长和乳酸产生的最适 pH 值^[6], Nisin 发酵也是如此。本文的研究结果表明, 乳酸链球菌 SM526 菌体生长和乳酸产生的最适 pH 值为 7.0, 而 Nisin 产生的最适 pH 值为 6.5。

我们曾试图用 Monod 方程来描述乳酸链球菌 SM526 的菌体生长过程, 但与实验数据拟合得很差, 其原因可能在于: ①分批培养发酵条件下 μ_{\max} 和 K_s 值难以精确测定, 从而使误差较大。②菌种乳酸链球菌 SM526 乳酸产量较低 (16gL^{-1} 左右), 大大低于其

它乳球菌产乳酸的能力 (高达 70gL^{-1} 左右)^[12,13]。因此适合于描述这些乳球菌生长及产物生成的 Monod 方程并不能较好地表示乳酸链球菌 SM526 的菌体生长及乳酸生产过程。本研究运用简单的逻辑模型不仅较好地描述了菌体生长和乳酸生产过程, 而且对 Nisin 的生成过程也得到了较好的模拟。

Parente 等人^[6]曾提出了一个定性方程来描述细菌素 Lactococcin140 产生的全过程:

$$dAu/dt = YA/X \cdot dX/dt - K \cdot AU \cdot X \quad \dots\dots (8)$$

其中 $YA/X \cdot dX/dt$ 用来描述与菌体生长有关的 Lactococcin140 的合成, $K \cdot AU \cdot X$ 用来描述由于菌体对 Lactococcin140 的吸附而引起的 Lactococcin140 产量的降低。这个模型可以定性地解释 Lactococcin140 活性到达峰值后又迅速降低这一现象 (活性降低是由于菌体对 Lactococcin140 的吸附量大于它的产生量)。但 Nisin 活性降低的原因是极其复杂的, 除了 Parente 等人所认为的菌体吸附作用外, Nisin 酶对 Nisin 的分解作用也不可忽视^[4], 这使得描述 Nisin 合成的全过程更加困难。关于 Nisin 合成及降解机制的深入研究将有助于这一问题的最终解决。

参 考 文 献

- [1] Hurst A. Adv Appl Microbiol, 1981, **27** (1): 85 ~ 92.
- [2] Klaenhammer T R. Biochem, 1988, **70** (2): 337 ~ 340.
- [3] Hurst A. Adv Appl Microbiol, 1981, **27** (1): 110 ~ 115.
- [4] De Vuyst L, Vandanme E J. J Gen Microbiol, 1992, **138**: 571 ~ 578.
- [5] Matsusaki H, Endo N, Sonomoto K. Appl Microbiol Biotechnol, 1996, **45**: 36 ~ 40.
- [6] Parente E, Ricciardi A, Addario G. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, **41**: 388 ~ 394.
- [7] 庄绪亮, 张洪勋. 化工冶金, 2000, **21** (1): 93 ~ 97.
- [8] Anon. SAS/STAT Guide for personal computers. 1987, Cary, NC: SAS institute Inc.
- [9] Mercier P, Yerushalmi L J. Chem Technol Biotechnol, 1992, **55**: 111 ~ 121.
- [10] Ohara H, Hiyama K, Yoshida T. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, **37**: 544 ~ 548.
- [11] Yang R, Johnson M C, Ray B. Appl Environ Microbiol, 1992, **58**: 3355 ~ 3359.
- [12] Rogers P L, Bramall L. Can J Microbiol, 1978, **24**: 372 ~ 380.
- [13] Bihal B, Goma G, Vayssier Y. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, **28**: 340 ~ 344.