

乳链球菌 P-99 发酵乳清生产乳链菌肽的研究*

罗水忠 潘利华 潘丽军

【摘要】 研究了乳清培养基中乳链球菌 P-99 的细胞生长和乳链菌肽合成特性,采用正交试验对乳清发酵培养基中的碳源、氮源和磷源进行了优化。结果表明,乳链球菌 P-99 能够在没有添加物的乳清培养基中生长并合成乳链菌肽,其细胞生长和产物合成可以分别用 Monod 方程和 Luedeking-Piret 方程拟合。培养基优化试验结果表明,在乳清发酵培养基中添加 19 g/L 乳糖、0.8 g/L 甘氨酸、0.45 g/L KH_2PO_4 时,乳链菌肽的合成量提高了 31.7%。

关键词: 乳清 乳链菌肽 发酵动力学 细菌素

中图分类号: TS201.3 **文献标识码:** A

Experiment Study of Nisin Producing on Whey by *Streptococcus Lactis* P-99

Luo Shuizhong Pan Lihua Pan Lijun
(Hefei University of Technology)

Abstract

In this paper, the characteristics of cell growth and nisin production on whey by *Streptococcus lactis* P-99 were investigated, and concentrations of carbon source, nitrogen source and phosphorus source in whey medium were optimized. The results showed that *Streptococcus lactis* P-99 could grow well and produce nisin on whey medium without any adjuncts. Based on Monod equation and Luedeking-Piret equation, the kinetic model describing cell growth and nisin production was established. The producing rate of Nisin was improved by 31.7% when 19 g/L lactose, 0.8 g/L glycine, 0.45 g/L KH_2PO_4 were added to the whey medium.

Key words Whey, Nisin, Fermentation kinetics, Bacteriocin

引言

乳链菌肽(Nisin)是由某些乳链球菌(*Streptococcus lactis*)产生的一种多肽类细菌素,对大多数 G^+ 致病菌和腐败菌具有强烈的抑制作用。同时,它是一种安全、高效、无毒的天然食品防腐剂,已被许多国家和地区用于罐装食品、高蛋白食品、乳制品和肉制品的防腐保鲜。发酵生产乳链菌肽通常采用 MRS、 M_{17} 等有机氮含量较高的培养基^[1~3]。虽

然这些培养基可以获得较高的产量,但是由于这类培养基生产成本高,并且含有许多不能被微生物利用的含氮物质,影响了分离提纯,因而不适合工业化大规模生产。

乳清是干酪或干酪素的副产品,含有乳糖、乳清蛋白、多种维生素和无机盐等物质。工业发达的国家十分重视乳清的再利用。随着我国干酪产量的不断增加,乳清的开发利用也日益迫切,本文对乳链球菌 P-99 利用乳清发酵生产乳链菌肽的可行性和发酵

收稿日期:2006-07-17

* 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(项目编号:20040359008)和合肥工业大学科学发展基金资助项目(项目编号:053001F)

罗水忠 合肥工业大学生物与食品工程学院 讲师 博士生,230009 合肥市

潘利华 合肥工业大学生物与食品工程学院 讲师

潘丽军 合肥工业大学生物与食品工程学院 教授 博士生导师 通讯作者

动力学进行研究。

1 材料与方法

1.1 乳清的制备

全脂乳在 85℃、10 min 条件下杀菌后,冷却到 (36±1)℃,添加质量浓度为 0.02 kg/L 的 CaCl₂ 及一定量的凝乳酶(按效价添加),30 min 凝乳后切割、排乳清。收集到的乳清用乳脂分离机脱脂后备用^[4]。

1.2 发酵

1.2.1 菌种

(1) 乳链菌肽生产用菌种:乳链球菌 P-99,由本实验室选育。

(2) 检测菌:黄色微球菌(*Micrococcus flavus*) NCI8166,购于中国科学院微生物研究所。

1.2.2 培养基

(1) 菌种保藏与传代培养基:M₁₇固体培养基。

(2) 种子培养基:M₁₇液体培养基。

(3) 发酵培养基:发酵培养基 I 为按照 1.1 节制备的乳清;发酵培养基 II(乳清发酵培养基)由发酵培养基 I 中加适量蒸馏水稀释制备。

(4) 乳链菌肽效价测定培养基:每 100 mL 含胰蛋白胨 0.8 g,酵母膏 0.5 g,葡萄糖 0.5 g,NaCl 0.5 g,Na₂HPO₄·12H₂O 0.2 g,琼脂 1.5 g;pH 值 6.8。

1.2.3 培养条件

种子培养:取试管斜面活化菌体一环,接 1 瓶种子培养基,(30±1)℃,200 r/min 摇床培养 18 h。乳链菌肽发酵培养:250 mL 三角瓶中装 50 mL 发酵培养基,接入种子液 5 mL,(30±1)℃,200 r/min 摇床培养 24 h。

1.3 分析方法

总糖测定:苯酚-硫酸法^[5],用葡萄糖作对照。

总氮测定:微量凯氏定氮法^[6],用硫酸铵作对照。

总磷测定:钼酸盐反应法^[6],用磷酸二氢钾作对照。

蛋白质测定:Lowry 法^[6],用牛血清白蛋白作对照。

灰分测定:550℃马弗炉中煅烧 6 h。

pH 值:采用 pHREX-2 型酸度计测定。

菌体的生长:测定波长 600 nm 处的光密度值,并通过标准曲线转换成细胞干质量。

乳链菌肽效价的测定:溶化检测培养基,冷却至 50℃左右,加入体积分数 2%的吐温-80 与无菌水 1:1 混合液至培养基,混匀,再加入体积分数 2%检

测指示菌悬液,混匀,取 20 mL 该培养基制平板,用中空打孔器打孔,分别吸取等量标准溶液和待测液滴入各孔内,盖上皿盖,移至 30℃培养箱内培养 18 h 左右,测量抑菌圈直径,计算效价^[7]。

2 结果与分析

2.1 乳链球菌 P-99 培养时细胞生长与合成乳链菌肽的特性

乳清培养基的主要成分平均值和 pH 值见表 1。从表 1 可以看出,乳清培养基含有微生物生长需要的碳源、氮源、磷源等,碳氮比协调,pH 值偏中性,适合细菌生长。

表 1 乳清培养基的主要成分和 pH 值

Tab. 1 Main components and pH value in whey medium

| 项目 | 发酵培养基 I | 发酵培养基 II |
|---------------------------|---------|----------|
| 总糖质量浓度/g·L ⁻¹ | 45.81 | 18.92 |
| 总氮质量浓度/g·L ⁻¹ | 2.02 | 0.89 |
| 总磷质量浓度/g·L ⁻¹ | 0.44 | 0.26 |
| 蛋白质质量浓度/g·L ⁻¹ | 4.95 | 2.01 |
| 灰分质量浓度/g·L ⁻¹ | 4.51 | 2.07 |
| pH 值 | 6.21 | 6.22 |

乳链球菌 P-99 在乳清培养基培养过程中基质消耗、细胞生长、产物形成等参数的变化如图 1 所示。由图 1 可知,乳链球菌 P-99 能够在没有添加物的乳清培养基中生长并合成乳链菌肽。乳链球菌 P-99 在乳清培养基中经过短暂的延滞期,培养至 4 h,菌体量迅速增大,细胞代谢旺盛,进入对数生长期;20 h 后,由于营养物的减少,碳氮比失调以及培养基中 pH 值下降等原因,菌体量增加缓慢,进入平稳期;24 h 后,细胞出现退化、自溶现象,细胞群体呈负增长,进入衰亡期(图中未显示)。在 4~20 h 时间段内,乳链菌肽效价增大迅速,此后,乳链菌肽效价逐渐下降。由此可见,乳链菌肽合成和细胞生长呈生长偶联型,乳链菌肽是细胞的初级代谢产物。

图 1 还可看出,尽管乳链球菌 P-99 在发酵培养基 I 中的代谢作用比在发酵培养基 II 中更强,但是,发酵培养基 I 中乳链菌肽的效价明显低于发酵培养基 II 中的乳链菌肽效价。因此,选择发酵培养基 II 作进一步研究。

2.2 乳链球菌 P-99 在乳清发酵培养基中的细胞生长动力学

当培养基中不存在抑制细胞生长的物质时,细胞的比生长速率与限制性基质浓度有关,可用 Monod 方程表示为

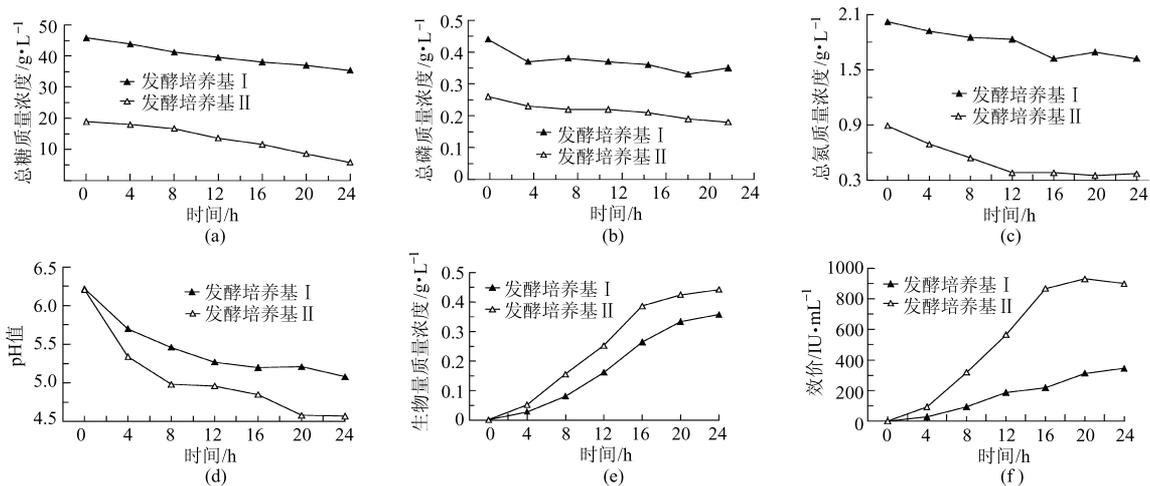


图 1 乳链球菌 P-99 在乳清培养基中的培养特性

Fig. 1 Culture characteristic of *Streptococcus lactis* P-99 in whey medium

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

$$q_v = \alpha\mu + \beta = 1\,394\mu + 14.144 \quad (6)$$

式中 μ ——比生长速率, $1/h$, $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$

X ——生物量, g/L

μ_m ——最大比生长速率, $1/h$

S ——总糖质量浓度, g/L

K_s ——饱和常数, g/L

将 Monod 方程变形并用线性回归处理图 1 数据, 得方程为

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} = 864.9 \frac{1}{S} + 55.919 \quad (2)$$

式(2)的相关系数 $R^2 = 0.9734$, 得试验条件下 $K_s = 15.467$, $\mu_m = 0.018$ 。因此, 得乳链球菌 P-99 细胞生长与限制性基质浓度间的关系为

$$\frac{dX}{dt} = 0.018 \frac{S}{15.467 + S} X \quad (3)$$

2.3 乳链球菌 P-99 在乳清发酵培养基中乳链菌肽合成动力学

由图 1 结果知, 乳链菌肽合成和细胞生长为生长偶联型, 可用 Luedeking-Piret 方程表示乳链球菌 P-99 在乳清发酵培养基中合成乳链菌肽和细胞生长的关系

$$\frac{dU}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4)$$

将式(4)两边同除以 X , 得到

$$q_v = \alpha\mu + \beta \quad (5)$$

式中 U ——乳链菌肽效价, IU/mL

q_v ——乳链菌肽比合成速率, $\text{IU}/(\text{h} \cdot \text{mg})$,

$$q_v = \frac{1}{X} \frac{dU}{dt}$$

α, β ——常数

利用线性回归处理图 1 数据, 得回归方程为

式(6)的相关系数 $R^2 = 0.9138$, 由于 β 相对较小, 因此乳链球菌 P-99 合成乳链菌肽为不太紧密的生长偶联型, 将计算所得的常数代入式(4)得

$$\frac{dU}{dt} = 25.092 \frac{S}{15.467 + S} X + 14.144 X \quad (7)$$

由式(3)和式(7)可以看出, 乳链球菌 P-99 菌株的细胞生长速率和乳链菌肽合成速率都与基质浓度有很大关系。因为 K_s 值较大, 所以可以尽量提高限制性底物浓度以获得较大的细胞生长量和乳链菌肽合成量。但由于过高的底物浓度会引起底物抑制现象, 故可以采用底物流加方法以弥补高底物浓度的不足。

2.4 乳清发酵培养基的优化

根据文献[8~10], 碳源、氮源和磷源对发酵液中乳链菌肽效价大小起重要作用, 故以发酵液中乳链菌肽效价为检测指标, 对乳清发酵培养基中的碳源、氮源和磷源进行优化。选用 $L_{27}(3^{13})$ 正交表进行试验, 因素和水平见表 2, 试验方案及试验结果见表 3。方差分析表明, B (甘氨酸)、 C (KH_2PO_4) 及 $A \times B$ 、 $A \times C$ 、 $B \times C$ 对乳链菌肽效价均起高度显著作用。因素作用的主次顺序为: C 、 $A \times C$ 、 $B \times C$ 、 $A \times B$ 、 B 、 A 。经两因素搭配表分析得各因素的最佳组合方

表 2 正交试验因素水平表

Tab. 2 Experimental variables and levels g/L

| 水平 | 因素 | | |
|----|--------------|---------------|-------------------------------------|
| | 乳糖质量 浓度 A | 甘氨酸质量 浓度 B | KH_2PO_4 质量 浓度 C |
| 1 | 19 | 0.8 | 0.25 |
| 2 | 32 | 1.4 | 0.35 |
| 3 | 45 | 2.0 | 0.45 |

表3 正交试验安排和试验结果
Tab. 3 Experiment scheme and results

| 试验 序号 | A | B | (A×B) ₁ | (A×B) ₂ | C | (A×C) ₁ | (A×C) ₂ | (B×C) ₁ | e | e | (B×C) ₂ | e | e | x_i /IU·mL ⁻¹ |
|----------|---------|----------|--------------------|--------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 130.1 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 463.1 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 723.7 |
| 4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 50.0 |
| 5 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 367.3 |
| 6 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 423.6 |
| 7 | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 137.1 |
| 8 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 473.4 |
| 9 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 707.7 |
| 10 | 2 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 47.4 |
| 11 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 347.3 |
| 12 | 2 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 613.6 |
| 13 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 33.9 |
| 14 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 3 | 343.8 |
| 15 | 2 | 2 | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 1 | 580.5 |
| 16 | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 63.6 |
| 17 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 1 | 2 | 397.3 |
| 18 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 2 | 3 | 650.6 |
| 19 | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 3.0 |
| 20 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 340.3 |
| 21 | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 680.6 |
| 22 | 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 57.5 |
| 23 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 397.2 |
| 24 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 3 | 683.6 |
| 25 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 | 107.1 |
| 26 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 1 | 397.8 |
| 27 | 3 | 3 | 2 | 1 | 3 | 2 | 1 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 657.6 |
| K_1 | 3 476.0 | 3 349.1 | 3 567 | 3 437.9 | 629.7 | 3 297.2 | 3 427.4 | 3 136.7 | 3 103.5 | 3 243.8 | 3 304.7 | 3 380.9 | 3 332.4 | |
| K_2 | 3 078.0 | 2 937.4 | 3 011.7 | 2 976.3 | 3 527.8 | 1 616.6 | 3 316.4 | 3 308.3 | 3 431.2 | 3 326.5 | 2 015.5 | 3 146.5 | 3 126.7 | |
| K_3 | 3 324.7 | 3 492.2 | 3 300.3 | 3 464.8 | 5 721.5 | 4 965.2 | 3 135.2 | 3 434 | 3 344.3 | 3 308.7 | 4 558.8 | 3 351.6 | 3 419.9 | |
| S_j | 8 980.9 | 24 350.3 | 17 139.9 | 16 756.7 | 1 449 545.6 | 622 954.2 | 4 834.6 | 4 949.4 | 6 404.6 | 421.1 | 359 377.0 | 3 624.7 | 5 034.6 | |

注： x_i 指发酵液中乳链菌肽效价检测值减去500 IU/mL

案为 $A_1B_1C_3$ ，即在乳清发酵培养基中添加乳糖、甘氨酸和 KH_2PO_4 质量浓度分别为 19 g/L、0.8 g/L 和 0.45 g/L 更有利于乳链球菌 P-99 合成乳链菌肽，发酵中乳链菌肽效价提高了 31.7%。

3 结束语

乳链球菌 P-99 能够在乳清培养基中生长并合

成乳链菌肽，这为乳清的再利用提供了新途径。乳链球菌 P-99 在乳清发酵培养基中的细胞生长模型符合 Monod 方程，而乳链菌肽合成动力学可用 Luedeking-Piret 方程拟合。研究发现在乳清发酵培养基中添加乳糖、甘氨酸和 KH_2PO_4 质量浓度分别为 19 g/L、0.8 g/L 和 0.45 g/L 更有利于乳链球菌 P-99 合成乳链菌肽。

参 考 文 献

- 1 Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, et al. Isolation of Nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham[J]. Int. J Food Microbiol. , 2003, 81(2):137~145.
- 2 Qiao M, Omaetrebarria M J, Ra R, et al. Isolation of a *Lactococcus lactis* strain with high resistance to nisin and increased nisin production[J]. Biotechnol. Lett. , 1999, 19(2):199~202.
- 3 罗水忠, 潘利华, 潘丽军. 乳链菌肽产生菌的选育及其发酵性能研究[J]. 食品科学, 2004, 25(4):53~55.
- 4 孙天松, 杨永林, 吉雁平. 乳清的发酵特性及澄清发酵乳清饮料的研制[J]. 食品工业, 1996, 26(2):42~43, 41.
- 5 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- 6 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- 7 吴琼. 乳链菌肽效价测定方法的研究[J]. 食品科学, 1999, 20(6):56~59.
- 8 Vuyst D L. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium[J]. J. Appl. Bacteriol. , 1995, 78(1):28~33.
- 9 Vuyst D L, Vandamme E J. Influence of phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* batch fermentation using a complex medium[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol. , 1993, 40(1):17~22.
- 10 Guerra N P, Rua M L, Pastrana L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria[J]. Int. J. Food Microbiol. , 2001, 70(3): 267~281.

~~~~~

(上接第 68 页)

## 参 考 文 献

- 1 Delphine R, Emmanuel D, Isabelle Y, et al. Aliphatic polyester-based biodegradable materials: new amphiphilic graft copolymers [J]. Polymer Degradation and Stability, 2001, 73(3): 561~566.
- 2 Chang G Cho, Kiho Lee. Preparation of starch-g-polystyrene copolymer by emulsion polymerization [J]. Carbohydrate Polymer, 2002, 48(2): 125~130.
- 3 Lutfor M R, Sidik S, Wan Yunus W M Z, et al. Preparation and swelling of polymeric absorbent containing hydroxamic acid group from polymer grafted sago starch[J]. Carbohydrate Polymer, 2001, 45(1): 95~100.
- 4 Bajpai S K, Susamma Johnson. Superabsorbent hydrogels for removal of divalent toxic ions. Part 1: Synthesis and swelling characterization[J]. Reactive & Functional Polymers, 2005, 62(3): 271~283.
- 5 邹新禧. 超强吸水剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- 6 王解新, 陈建定. 高吸水性树脂研究进展[J]. 功能高分子学报, 1999, 12(2):211~217.
- 7 Omidian H, Hashemi S A, Sammes P G, et al. Modified acrylic-ased superabsorbent polymers (dependence on particle size and salinity) [J]. Polymer, 1999, 40(7): 1 753~1 761.
- 8 Lim Doo-Woo, Song Kyong-Geun, Yoon Kee-Jong, et al. Synthesis of acrylic acid-based superabsorbent interpenetrated with sodium PVA sulfate using inverse-emulsion polymerization[J]. European Polymer Journal, 2002, 38(3): 579~586.
- 9 江龙. 胶体化学概论[M]. 北京: 科学出版社, 2002.