



pH 调控和蔗糖流加控制对乳酸链球菌素发酵的影响

刘亚丽, 贾士儒, 谭之磊, 黄皓

(天津科技大学生物工程学院, 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457)

摘要: 研究了乳酸乳球菌发酵过程中 pH 调控和补料对产物生成的影响. 研究采用三种不同的 pH 调控方式 (初始 pH 7.0): (1) 恒定 pH 6.8; (2) 当 pH 降到 6.2 时恒定 pH 6.2; (3) 发酵 6 h 后每 2 h 调节 pH 至 6.8. 结果表明, 在发酵过程中按方式 2 调节 pH 与不调控 pH 相比, 乳酸链球菌素效价提高了 2.48 倍. 分别选用了 4、5、6 和 8 g·(L⁻¹·h⁻¹) 蔗糖流加速度, 当按 5 g·(L⁻¹·h⁻¹) 恒速流加蔗糖溶液, 乳酸链球菌素效价提高约 2.9 倍.

关键词: 乳酸乳球菌; 乳酸链球菌素; pH 调控; 补料发酵

中图分类号: TQ920.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2008) 03-0005-03

Effects of pH Control and Sucrose Feeding Rates on Nisin Production

LIU Ya-li, JIA Shi-ru, TAN Zhi-lei, HUANG Hao

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The combined effects of various pH control strategies and sucrose feeding rates on nisin production were studied. Three different pH control strategies were studied in this study (the initial pH was 7.0): (1) a constant pH at 6.8; (2) after pH dropped 6.2, a constant pH at 6.2; (3) after 6 h, adjusting pH at 6.8 every 2 h. The results demonstrate that nisin titer by strategy (2) yielded almost 2.6 times higher than that by strategy without pH adjustment. Sucrose feeding rates are designed at 4, 5, 6 and 8 g·(L⁻¹·h⁻¹), respectively. Nisin titer increase about 2.9-fold by constant addition of sucrose at a feeding rate of 5 g·(L⁻¹·h⁻¹).

Keywords: *Streptococcus lactis*; nisin; pH control; fed-batch fermentation

乳酸链球菌素 (nisin) 是由乳酸乳球菌产生的一种由 34 个氨基酸组成的阳离子型疏水抗菌多肽, 分子质量为 3.4 ku^[1]. 由于它具有广泛的抗革兰氏阳性菌和病原细菌的性质, 并对人体的安全性, 所以被作为一种食品防腐剂广泛地应用于食品、保健品等众多行业. 目前, 有 50 多个国家和地区允许使用乳酸链球菌素作为食品防腐剂^[2], 我国也颁布了乳酸链球菌素在食品中的使用标准.

乳酸乳球菌发酵过程中生成大量的乳酸链球菌素, 并伴有副产物乳酸的产生, 乳酸的存在使得发酵液 pH 降低, 从而抑制了菌株的生长和代谢, 同时乳酸链球菌素对 pH 敏感, 因此有必要通过流加碱液来控制发酵液在适宜的 pH 范围内, 从而提高发酵液中乳

酸链球菌素的效价. 蔗糖对乳酸链球菌素的合成具有调控作用, 适当提高蔗糖浓度可以提高菌体浓度及乳酸链球菌素效价, 但过高的蔗糖浓度会抑制乳酸链球菌素的合成^[3]. 所以, 本文试图从发酵过程中的 pH 和补料调控来促进乳酸链球菌素的生物合成.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

乳酸乳球菌 (*Streptococcus lactis*) TCCC12001、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*) TCCC12002 分别为乳酸链球菌素产生菌和乳酸链球菌素效价检测指示菌.

收稿日期: 2007-09-27; 修回日期: 2007-12-11

基金项目: 国家 863 项目 (2006AA102347); 天津科技大学自然科学基金资助项目 (20060207)

作者简介: 刘亚丽 (1979—), 女, 山东人, 硕士研究生.

1.1.2 培养基

菌种保藏与传代培养基为M17培养基^[4].

种子培养基为不加琼脂的M17培养基.

发酵培养基 (g·L⁻¹): 大豆蛋白胨 10, 蔗糖 10, K₂HPO₄·12H₂O 10, NaCl 2, MgSO₄·7H₂O 0.2, pH按实验需要进行调整, 121 °C, 灭菌 20 min.

乳酸链球菌素效价测定培养基 (g·L⁻¹): 胰蛋白胨 8, 酵母膏 5, 葡萄糖 5, NaCl 5, Na₂HPO₄·12H₂O 2, 琼脂 1.5, pH 6.8, 121 °C, 灭菌 20 min.

1.1.3 试剂

乳酸链球菌素标准品购于Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 分析方法

菌体量测定: 菌体生长以波长为600 nm处的吸光度值表示, 用同样稀释度的同种培养基作对照.

Nisin 效价测定: 参见文献[1].

蔗糖: 采用硫酸蒽酮比色法^[5]进行测定.

1.2.2 实验方法

(1) 培养条件

乳酸乳球菌接入摇瓶种子培养基, 30 °C静置培养 12 h, 作为种子液, 按体积分数为3%的接种量接入5 L BIO-2000型发酵罐. 5 L发酵罐装料量为3 L, 温度30 °C, 通过蠕动泵自动流加4 mol/L的NaOH或蔗糖溶液. 轻微搅拌(100 r/min)保持发酵液均一, 间隔1~2 h取样分析. 以同样的实验方法, 不流加NaOH或蔗糖溶液的实验, 作为对照.

(2) pH 调控

pH调控采用以下方法: 一是在罐上发酵开始后调节至恒定值, 分别为6.8和6.2^[6]; 二是在罐上发酵开始6 h后每隔2 h调节发酵液pH至6.8.

(3) 补料发酵

根据相关研究的结果, 选择1%蔗糖起始浓度的发酵液, 开始发酵5 h后, 按4、5、6、8 g·(L⁻¹·h⁻¹)的流加速度流加蔗糖溶液至发酵终点.

2 结果与讨论

2.1 生长曲线的对照

生长曲线对照实验结果如图1所示. 菌体从3 h开始进入指数生长期, 到11 h达到最大值. 蔗糖浓度从3 h开始进入快速下降期, 同时乳酸链球菌素含量迅速上升, 其合成表现为初级代谢动力学特征. 稳定期后期乳酸链球菌素含量开始下降. 这可能是由于细胞吸附或细胞自溶释放出的非特异性蛋白酶的降解

引起的^[7].

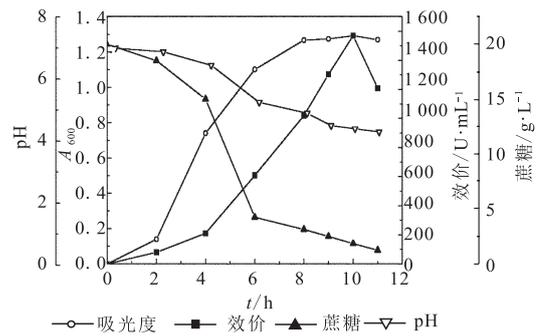


图1 不调节pH的发酵结果

Fig. 1 Experiment data of TCCC12001 fermentation without pH adjustment

2.2 pH 的调控

pH 调控实验结果见图2、3、4.

pH控制在6.2的发酵液乳酸链球菌素效价最高, 为3890 U·mL⁻¹, 是对照实验(图1)的2.48倍, 菌体量也最多(1.656). pH控制在6.8的方法菌体量最低(1.455), 效价是对照实验的1.53倍(2403 U·mL⁻¹). 每隔2 h调控pH的方法得到的菌体量(1.55)和乳酸链球菌素的效价(3540 U·mL⁻¹)介于上述两种方法之间, 为对照实验的2.25倍. 如图2、3、4所示, 不同的pH调控方式对于菌体的生长和蔗糖的消耗影响不大, 但是对于乳酸链球菌素效价影响较大. 乳酸链球菌素最大效价都出现在对数生长期后期.

乳酸链球菌素发酵生产工艺通常是采用维持恒定的最适pH, 根据生产菌株的不同, 从5.5到6.8不等^[8]. 有研究表明^[9], 在生物反应器中阶段性地流加碱来调节pH的方法能提高乳酸链球菌素效价和乳酸乳球菌的初级代谢水平. 乳酸乳球菌发酵过程中伴有副产物乳酸生成, 乳酸的存在使得发酵液pH降低, 进而抑制了菌体生长, 使得乳酸链球菌素效价下降. 流加NaOH是为了消除乳酸的影响, 解除pH抑制菌体生长这一因素. 本实验证明了流加NaOH可以有效地解除乳酸抑制, 提高乳酸链球菌素的效价.

蔗糖与乳酸链球菌素生物合成存在遗传上的联系, 较高的初始碳源浓度会抑制菌的分解代谢和乳酸链球菌素的生物合成^[3]. 三种pH调控方法下, 蔗糖消耗的趋势大致相同, 随着菌体的大量生长, 蔗糖的消耗曲线类似于菌体生长曲线, 在菌体对数生长阶段, 蔗糖的消耗也呈现类似的对数期. 从消耗曲线中可以看到, 6 h左右菌体消耗掉80%以上的初始培养基中的蔗糖, 12 h左右蔗糖基本被消耗完. 因此, pH调控

结合补料流加蔗糖可能是提高乳酸链球菌素效价的有效途径。

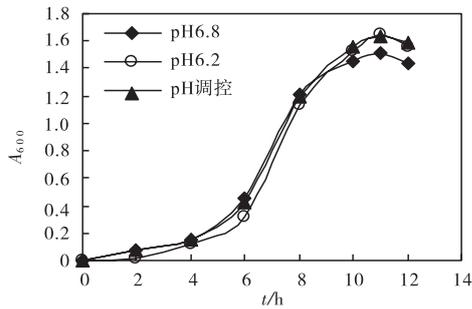


图2 pH调控的菌体浓度曲线

Fig. 2 Biomass of TCCC12001 when using different pH profiles

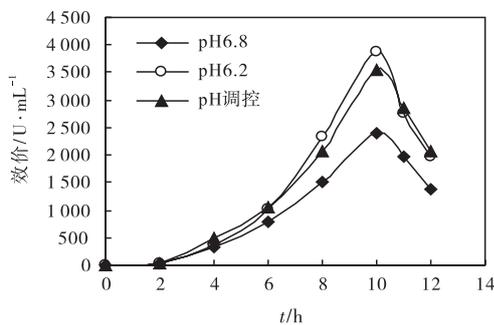


图3 pH调控的效价变化曲线

Fig. 3 Nisin production of TCCC12001 when using different pH profiles

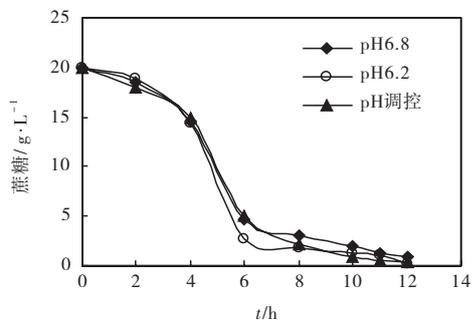


图4 pH调控的蔗糖变化曲线

Fig. 4 Sucrose consumptions of TCCC12001 when using different pH profiles

2.3 蔗糖的流加

通过对 pH 调控实验的结论,进一步考察蔗糖作为碳源对乳酸乳球菌产乳酸链球菌素效价的影响。蔗糖流加实验结果见图 5。

由此看出,蔗糖流加可提高乳酸链球菌素得率。初糖质量浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,从 5 h 开始分别按 4、5、6、8 $\text{g}\cdot(\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$ 流加,乳酸链球菌素最高效价分别为 3 789、4 560、3 210、3 047 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,得率分别为对照实验的 2.41、2.90、1.96、1.94 倍。

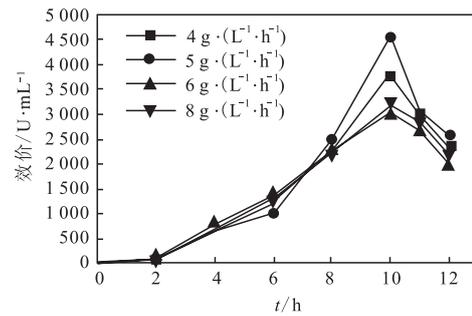


图5 补料流加蔗糖的效价变化曲线

Fig. 5 Nisin production of fed-batch culture of TCCC12001 with different constant feeding rate of sucrose

3 结论

使用初糖质量浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基,发酵至 5 h,采用恒定 pH 的调控方法(发酵开始至恒定 6.2),按 $5 \text{ g}\cdot(\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$ 流加速度流加蔗糖,乳酸链球菌素最高效价达到 $4560 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,比对照实验的效价提高 2.9 倍。

参考文献:

- [1] Tramer J, Fowler G G J. Estimation of nisin in foods [J]. Sci Fd Agric, 1964, 15: 522—528.
- [2] Gross E, Morell J L. The structure of nisin [J]. J Am Chem Soc, 1971, 93: 4634—4635.
- [3] De Vuyst L, Vandamme E J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis sp. lactis* Batch Fermentations [J]. J Gen Micro, 1992, 138: 571—578.
- [4] Betty E T, Sanding W E. Improved medium for *lactic streptococcus* and their bacteriophages [J]. Appl Microbio, 1975, 29: 807—813.
- [5] 王福荣. 生物工程分析与检验 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 141.
- [6] 吴兆亮, 宫立鹏, 赵艳丽, 等. 乳链菌肽发酵工艺的研究 [J]. 化学反应工程与工艺, 2006, 22 (4): 377—380.
- [7] 吕文华, 丛威, 蔡昭铃. 蔗糖、乳酸及 KH_2PO_4 对乳链菌肽合成的影响 [J]. 过程工程学报, 2004, 4 (1): 28—31.
- [8] Meghrous J, Huot E, Quittelier M, et al. Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis sp. lactis* [J]. Res Microbiol, 1992, 143: 890—897.
- [9] Cabo M L, Murado M A, Gonzalez M P, et al. Effects of aeration and pH gradient on nisin production [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 29: 264—273.