

乳链菌肽高产菌株 AL2 的发酵条件研究

陈秀珠 何 松 龙力红 还连栋 薛禹谷

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 对乳链菌肽高产菌株 AL2 的发酵条件进行了研究,发现 30℃ 是产乳链菌肽的最适温度;蔗糖和酵母膏是最佳的碳、氮源,浓度分别为 0.5% 和 1%。发酵培养基起始 pH 为 6.5; 锰离子对乳链菌肽的产生有促进作用,而铜离子却有严重的抑制作用。

关键词 乳酸乳酸球菌,乳链菌肽,发酵条件

乳链菌肽 (Nisin) 是一种高效、无毒的天然食品防腐剂,已被许多国家和地区广泛应用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品和乙醇饮料的防腐保鲜^[1]。本实验室以乳酸乳酸球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) 7962 为出发菌株,经用 UV、LiCl、Co⁶⁰ 等物理和化学方法诱变筛选,获得一株乳链菌肽高产突变株 AL2^[2]。本文报道该菌株的发酵条件研究。

1 材料和方法

1.1 菌株

乳酸乳酸球菌 AL2 是由本实验室诱变得到的乳链菌肽高产突变株^[2]。

1.2 培养基

1.2.1 菌株保藏及传代培养基: M17 培养基^[3], 固体培养基为 M17 培养基中加入 1.5% 琼脂。

1.2.2 种子培养基: 同菌种保藏及传代培养基。

1.2.3 发酵培养基: 采用 M17^[3]、CM^[4]、LTB^[5] 及 S1^[6] 培养基。

1.2.4 乳链菌肽效价测定培养基(%): 胰蛋白胨 0.8, 酵母膏 0.5, 葡萄糖 0.5 NaCl 0.5, Na₂HPO₄ · 12 H₂O 0.2, 琼脂 1.5, pH 6.8。0.55 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.3 分析方法和所用仪器

1.3.1 菌种生长测定: 用 721 型分光光度计在 600 nm 处测定稀释后菌悬液的光密度,以同样

稀释度的同种培养基作为对照。

1.3.2 乳链菌肽效价测定: 根据 WHO 规定, 1 μg 标准批样商品乳链菌肽为 1 个国际单位。1 μg 纯乳链菌肽的效价为 40 个国际单位^[7]。测定方法参见文献^[8]。测定指示菌为黄色微球菌 (*Micrococcus flavus*) NCIB8166。用英国 Aplin & Barrett 公司的产品 (Nisaplin) 为对照样品。

1.3.3 溶液 pH 的测定: 用 pH M82 型标准 pH 计测定溶液的 pH。

2 结果和讨论

2.1 不同培养基对乳链菌肽产生的影响

接种乳酸乳酸球菌 AL2 种子液于 M17、CM、LTB、S1 四种发酵培养基中, 30℃ 静止培养 24 h, 测定发酵液的光密度、pH 值及乳链菌肽效价。

从表 1 结果可知, CM 培养基虽有利于菌体生长, 但乳链菌肽效价远不如 M17。因此, 以后的研究均选择 M17 为 AL2 发酵培养基。

2.2 不同碳源对乳链菌肽产生的影响

用不同的碳水化合物代替 M17 培养基中的蔗糖, 浓度均为 1%, 测定发酵液的光密度及效价 (表 2)。结果表明蔗糖仍为乳酸乳酸球菌 AL2 的最佳碳源。其原因可能是 AL2 与其他产乳链菌肽的乳酸乳酸球菌一样, 有一个有效

表1 不同培养基对效价的影响

培养基	OD _{600nm}	pH	效价(IU/ml)
M17	1.524	4.78	2350
CM	1.692	4.46	1881
LTB	1.084	4.21	1109
S1	0.848	4.03	661

表2 不同碳源对效价的影响

碳源	OD _{600nm}	效价(IU/ml)
蔗糖	1.564	2199
乳糖	1.435	2087
葡萄糖	1.502	1403
果糖	1.392	1605
木糖	0.936	1391
糊精	0.562	867
可溶性淀粉	0.410	342
玉米粉	0.552	883

的磷酸烯醇式丙酮酸依赖型磷酸转移酶系统作为蔗糖的吸收、运输及代谢的途径^[9]。进一步实验表明蔗糖的浓度以0.5%为最佳。

2.3 不同氮源对乳链菌肽产生的影响

以1%多肽或酵母膏等各种含氮化合物作为M17培养基中的唯一氮源。表3结果表明,对乳链菌肽产生有机氮要比无机氮源要好,尤以酵母膏为最佳。

表3 不同氮源对产乳链菌肽的影响

氮源	OD _{600nm}	pH	效价(IU/ml)
酵母膏	1.49	4.65	2193
多肽	0.592	6.12	815
大豆肽	0.969	5.67	1370
胰蛋白胨	0.878	5.65	971
牛肉膏	0.755	5.88	1285
鱼粉蛋白胨	0.317	6.38	427
玉米浆	0.735	5.78	1075
NH ₄ Cl	0.102	6.57	205
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.114	6.54	230

在添加1%酵母膏的培养基中,补加多肽、豆肽和牛肉膏等三种氮源的一种、两种或三种,同时以M17培养基作对照(表4),表4结果表明,补加0.25%大豆肽和0.25%牛肉膏的效价最高,效价为2314 IU/ml,因此,我们将AL2的发酵培养基改良为:0.5%蔗糖,1%酵母膏,

0.25%豆肽,0.25%牛肉膏,0.05%抗坏血酸,0.012% MgSO₄·7H₂O,1.9% β-磷酸甘油二钠。

表4 补加多肽、大豆肽、牛肉膏等氮源对乳链菌肽产生的影响

补加的氮源	补加量(%)	效价(IU/ml)
不补加	0	2038
多肽	0.5	2037
大豆肽	0.5	2100
牛肉膏	0.5	2062
多肽大豆肽	0.25,0.25	2220
多肽牛肉膏	0.25,0.25	2269
大豆肽牛肉膏	0.25,0.25	2314
多肽大豆肽牛肉膏	0.25,0.25,0.25	2292
M17 培养基	0	2103

2.4 不同金属离子对乳链菌肽产生的影响

在上述改良的发酵培养基中分别加入不同的金属离子(终浓度为0.001 mol/L)代替Mg²⁺,测定培养液的光密度及效价(表5)。表5结果表明,Mn²⁺对乳链菌肽的产生有促进作用,而Cu²⁺有严重抑制作用。

表5 金属离子对乳链菌肽产生的影响

金属离子	OD _{600nm}	效价(IU/ml)
无金属离子	1.51	2389
Mg ²⁺	1.49	2441
Ca ²⁺	1.48	2308
Cu ²⁺	0.405	433
Mn ²⁺	1.628	2525
Zn ²⁺	0.884	2041
Co ²⁺	1.075	2241
Fe ²⁺	1.335	2263

2.5 起始 pH 对乳链菌肽产生的影响

用5mol/L HCl 或 NaOH 将发酵培养基调至不同 pH,灭菌后接种子液,于30℃培养24h,测定培养液的光密度和效价。从图1可见,当培养基起始 pH 为6.5时,细胞生长及效价均达最高值。此后随 pH 升高,细胞生长略有下降,而效价基本不变;当 pH 低于6.5时,随 pH 值降低而细胞生长及效价均大幅度下降。

2.6 培养温度对乳链菌肽产生的影响

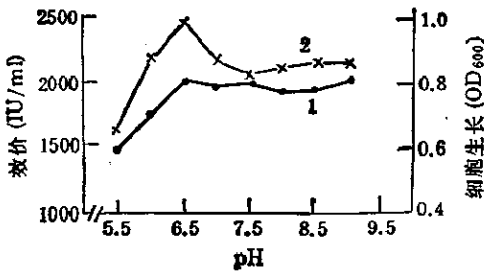


图1 培养基初始 pH 对乳链菌肽产生的影响
1. 效价 2. 细胞生长

将 AL2 种液接入发酵培养基置不同温度下培养, 24h 后测定培养液的 pH 值、光密度及效价(图 2)。结果如图 2 所示, 在 25—35℃ 时, 乳链菌肽的效价基本良好, 而以 30℃ 为最佳。当温度高于 35℃ 时, 生物量及效价明显下降。

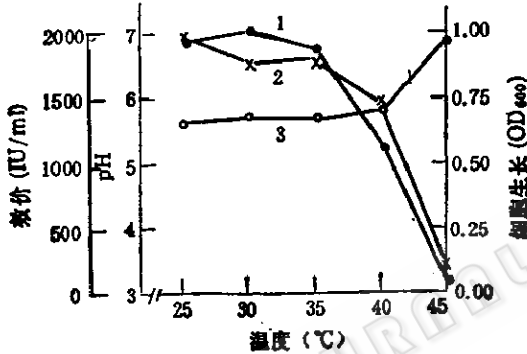


图2 温度对乳链菌肽产生的影响
1. 效价 2. 细胞生长 3. pH

2.7 种龄对乳链菌肽产生的影响

在 6、8、10、12、14、16h 的不同种龄种子接入发酵培养基, 30℃ 培养后测定效价。结果表明 6—16h 种龄的种子均可使效价达 2000 IU/ml 左右, 而以种龄 6h 较好, 效价可达 2255 IU/ml。

2.8 接种量对乳链菌肽产生的影响

以 1—10% 的接种量接入发酵培养基, 结果以 3% 和 5% 接种量的效价较高, 分别为 2138 和 2111 IU/ml, 其余均低于 2000 IU/ml。

2.9 培养方式和装液量对乳链菌肽产生的影响

在 2.5 × 20 cm 试管中分别装入不同体积的改良发酵培养基, 30℃ 静止或振荡培养, 检测

发酵液的效价(表 6)。表 6 结果表明, 静止培养的效价要高于振荡培养的效价。装液量对效价影响不大。

表 6 培养方式和装液量对乳链菌肽产生的影响

培养方式	静止培养			振荡培养	
装液量 (ml)	5	10	20	5	15
效价 (IU/ml)	2405	2477	2401	2286	2278

2.10 培养时间对乳链菌肽产生的影响

将培养 16h 的种子液以 3% 的接种量接入发酵培养基, 于 30℃ 静止培养, 每间隔 2h 取样分析培养液的细胞生长、pH 及效价(图 3)。图 3 结果表明, 用改良的培养基, 细胞生长及效价持续增加直至 22h。

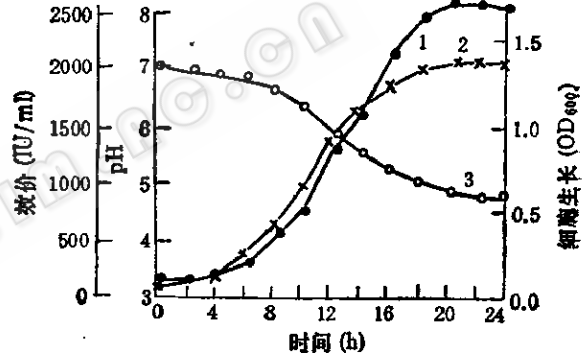


图3 培养时间对乳链菌肽产生的影响
1. 效价 2. 细胞生长 3. pH

综上所述, 对乳链菌肽高产菌株——乳酸乳球菌 AL2 发酵条件的研究结果表明, 采用改良的发酵培养基、6h 种龄、3—5% 接种量、发酵培养基起始 pH 6.5、30℃ 静止培养 20h, 其乳链菌肽效价可达 2300—2500 IU/ml, 高于 M17 培养基所得的结果。另外锰离子对乳链菌肽的产生有促进作用, 而铜离子却有严重抑制作用。

参考文献

- [1] 薛禹谷. 干旱区的研究, 1992, 9(2): 49—53.
- [2] 还连栋, 陶勇, 何松, 等. 微生物学报(待发表).
- [3] Betty E T, Sanding W E. Appl Environ Microbiol, 1975, 29: 807—813.
- [4] Vuyst L D, Vandamme E J. J Gen Microbiol, 1992, 138: 571—578.

- [5] Bailey P J, Hurst A. Can J Microbiol, 1971, 17:61—67.
- [6] Tramer J, Fowler G G. J Sci Food Agric, 1964, 15:522—528.
- [7] Hurst A. Adv in Appl Microbiol, 1981, 27:85—123.
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典. 1977 年版(二部)附录 80—84 抗菌素微生物检定法.
- [9] Thompson J. Biochimie, 1988, 70:325—336.

STUDIES ON FERMENTATION CONDITIONS OF *LACTOCOCCUS LACTIS* AL2 WITH HIGH YIELD OF NISIN

Chen Xiuzhu He Song Long Lihong Huan Liandong Xue Yugu

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The optimum fermentation conditions were studied with *Lactococcus lactis* AL2 strain, a higher Nisin producer. It was found that the optimal pH and temperature range for Nisin production were 6.5 and 30°C respectively. 0.5% sucrose and 1% yeast extract were the best carbon and nitrogen source respectively. Nisin production was increased by Mn^{2+} ion and inhibited strongly by Cu^{2+} ion.

Key words *Lactococcus lactis*, Nisin, Fermer © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>