

乳链菌肽产生菌的选育及其发酵性能研究

罗水忠, 潘利华, 潘丽军*

(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 乳链菌肽是某些乳链球菌产生的一种多肽物质, 对引起食品腐败的大多数革兰氏阳性菌有很好的抑制作用, 是一种高效、无毒副作用的天然生物防腐剂。本文从鲜奶中筛选到一株乳链菌肽产生菌——乳链球菌 P-99, 并研究了该菌株的发酵适宜条件及其发酵过程动力学。结果表明, 该菌株在 M17 培养基、30℃、起始 pH 6.5 条件下发酵良好, 通气量和某些金属离子对其细胞生长与产乳链菌肽无明显影响, 但锰离子对乳链菌肽的产生有促进作用, 而铜离子有较强的抑制作用; 发酵动力学分析表明, 该菌株产乳链菌肽表现出初级代谢动力学特征。

关键词: 乳链球菌; 乳链菌肽; 动力学方程

Studies on Screening and Fermentation Characteristic by *Streptococcus lactis*

LUO Shui-zhong, PAN Li-hua, PAN Li-jun*

(College of Biology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Nisin, an effective, harmless and natural bio-preservative, is a kind of polypeptide produced by *Streptococcus lactis* and can protect the food being spoiled by G⁺ bacteria. A strain named *Streptococcus lactis* P-99 was isolated from fresh milk and its fermentation characteristic was studied. It was found that the optimal pH and temperature for cell growth and Nisin production in M17 medium were 6.5 and 30℃ respectively, and that nisin production was increased by Mn²⁺ and inhibited strongly by Cu²⁺. The kinetics of cell growth and nisin production during culture of the strain was also explored.

Key words: *Streptococcus lactis* Nisin kinetic equation

中图分类号: Q93.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)04-0053-03

乳链菌肽(Nisin), 也叫乳酸链球菌素或尼生素, 是由某些乳链球菌产生的一种多肽类抗生素, 它对大多数革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌、肉毒梭菌、利斯特氏菌等腐败菌和食物病原菌都有强烈的抑制作用; 同时, 它可被人体消化道酶所消化而成为一种安全、高效、无毒的天然食品防腐剂, 已先后被 50 多个国家和地区应用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品等的防腐保鲜^[1,2]。

乳链菌肽的重要实用价值和理论价值得到了各国科研机构的重视和食品加工企业的青睐, 其需求量不断增大, 我国对该产品的推广应用尚处于起步阶段, 其技术水平与国际水平相比还有一定的差距, 尤其在工业化生产方面的研究有待进一步深入。本文对所筛选到的乳链菌肽产生菌——乳链球菌(*Streptococcus lactis*)P-99进行了发酵适宜条件和发酵动力学研究, 以期工业化生产建立一定的理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

1.1.1 乳链菌肽生产用菌种

乳链球菌(*Streptococcus lactis*)P-99, 由本实验室选育。

1.1.2 检测菌

黄色微球菌(*Micrococcus flavus*)NC18166, 购于中国科学院微生物研究所。

1.2 培养基

1.2.1 加富培养基

脱脂奶培养基。

1.2.2 菌种保藏与传代培养基

M17 培养基^[3]。

1.2.3 种子培养基

同上, 不加琼脂。

1.2.4 发酵培养基(%)

大豆蛋白胨 1.0, 蔗糖 1.0, Na₂HPO₄·12H₂O 1.5,

收稿日期: 2003-09-16

* 通讯联系人

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(01041302)

作者简介: 罗水忠(1975-), 男, 硕士, 主要从事工业微生物学研究。

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.012, pH 按试验需要调整。

1.2.5 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, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 琼脂 1.5, pH6.8。

1.3 主要试剂

乳链菌肽标准品 Aplin & Barrett LTD. 生产。

1.4 菌种的筛选与鉴定

参见文献[4]。

1.5 分析方法

G+C 含量的测定: 溶解温度(T_m)法。

菌体的生长: 以波长为 600 nm 处的 OD 值表示, 用同样稀释度的同种培养基作对照。

pH 值: 采用 pHREX-2 型酸度计测定。

乳链菌肽效价的测定: 参考文献[5]进行。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与鉴定

样品经富集、初筛、复筛得乳链球菌 P-99 纯菌株。P-99 菌株在菌种保藏培养基上培养 1d 长出菌落, 菌落直径 1.2~1.5 mm, 乳白色, 隆起, 外形光滑, 湿润; 在显微镜下观察, 细胞球形, 直径 0.6~0.8 μm , 成链状出现。革兰氏阳性, 葡萄糖发酵产生乳酸(同型发酵), VP 试验呈阴性, 能由精氨酸产氨; 生长温度为 10~40 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下几乎不生长; DNA 的含量为 38.3%。初步鉴定为乳链球菌(*Streptococcus lactis*)。

2.2 乳链球菌 P-99 的生长及其产乳链菌肽的适宜条件

2.2.1 温度的影响

将 P-99 种子液接入发酵培养基中, 于不同温度下 120 r/min 振荡培养 24h 后测定培养液的 OD₆₀₀ 值及乳链菌肽效价, 见图 1。结果表明, 在 25~40 $^{\circ}\text{C}$ 时, P-99 均可以生长, 45 $^{\circ}\text{C}$ 时几乎不能生长; 且在 25~35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 乳链菌肽的效价基本良好, 而以 30 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳; 当温度高于 35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 生物量及效价明显下降。因此, 以下发酵均于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。

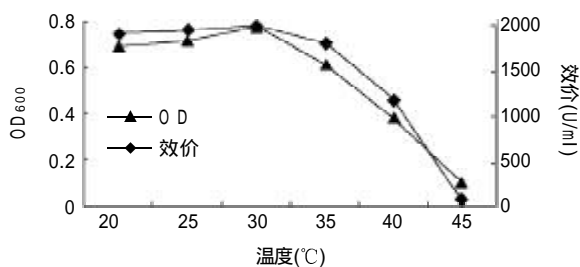


图1 温度对P-99细胞生长与产Nisin的影响

2.2.2 pH 的影响

将 P-99 种子液接种于不同起始 pH 的发酵培养基

中, 120r/min 振荡培养 24h 后测定培养液的 OD₆₀₀ 值及乳链菌肽效价(见图 2)。结果表明, 当发酵培养基起始 pH 为 6.5 时, 细胞生长与效价均达到最高值。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, 随着 pH 值的降低, 细胞生长及效价均大幅度下降。即 pH6.5 时较适合该菌株生长与产乳链菌肽。

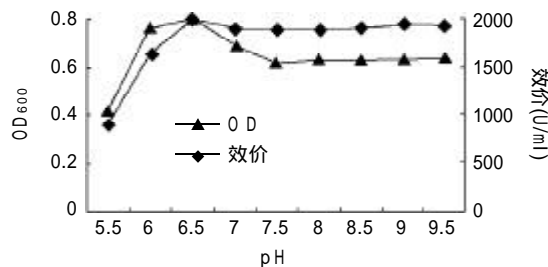


图2 pH对P-99细胞生长与产Nisin的影响

2.2.3 通气量的影响

首先采用 250ml 三角瓶, 改变其中装液量, 摇床转速为 120r/min, 按相同比例接种量将 P-99 种子液接种于发酵培养基中培养 24h; 其次, 改变摇床转速, 固定装液量为 100ml, 按相同比例接种量将 P-99 种子液接种于发酵培养基中培养 24h, 测定发酵液的 OD₆₀₀ 值及乳链菌肽效价, 结果见表 1 和表 2。结果显示, 装液量和摇床转速的改变即通气量对 P-99 细胞生长与乳链菌肽效价并没有显著影响, 因此可以采用静止培养以节省能耗。

表1 装液量对P-99细胞生长与产乳链菌肽的影响

装液量(ml)	50	100	150
OD ₆₀₀	0.662	0.664	0.673
效价(IU/ml)	1986	1995	1990

表2 转速对P-99细胞生长与产乳链菌肽的影响

转速(r/min)	0	60	120	180	240
OD ₆₀₀	0.712	0.722	0.741	0.743	0.755
效价(IU/ml)	1997	2084	2096	1986	1966

2.3 不同金属离子对 P-99 细胞生长与产乳链菌肽的影响

在发酵培养基中分别加入不同的金属离子(终浓度为 0.001mol/L)代替 Mg^{2+} , 接入种子液, 于最适条件下培养 24h 后测定培养液的 OD₆₀₀ 值及乳链菌肽效价。表 3 的结果表明, Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 等对 P-99 细胞生长与产乳链菌肽的影响不大, Mn^{2+} 对乳链菌肽的产生有促进作用, 而 Cu^{2+} 则有较强的抑制作用。

2.4 乳链球菌 P-99 发酵动力学的初步研究

根据上述试验结果, 将 P-99 种子液接种于发酵培养基中, 于最适条件下培养, 定时取样, 检测样液的乳链菌肽效价、OD 值及 pH, 结果如图 3 所示。图 3 显

表3 不同金属离子对P-99细胞生长与产乳链菌肽的影响

金属离子	无金属离子	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cu ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Fe ²⁺
OD ₆₀₀	0.716	0.699	0.687	0.061	0.824	0.455	0.526
效价(IU/ml)	1889	1941	1808	32	2025	1541	1763

示,第8~18h为菌体生长对数期,效价迅速增加;此后菌体生长和产物形成进入稳定期。由此可见,P-99菌株发酵呈现明显的初级代谢动力学特征,可用Logistic方程和Luedeking-Piret模型分别对菌体细胞生长(ODx)和产物(P)形成动力学进行模拟^[6],得菌体细胞生长动力学方程为 $\ln(ODx/(0.836-ODx))=0.464t-5.034$, $r=0.9499$ 产物乳链菌肽形成动力学方程为 $\ln((P+101.694)/(2107.87-P))=0.464t-5.034$, $r=0.9964$ 。

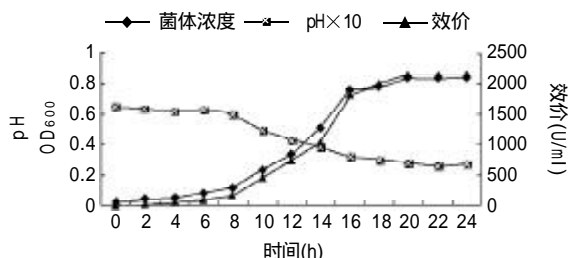


图3 培养时间对P-99菌株细胞生长与产乳链菌肽的影响

3 小 结

本文从鲜奶中筛选到一株乳链菌肽产生菌——乳链球菌P-99,该菌株在M17培养基、30℃、pH6.5条件

下发酵良好,通气量和Ca²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺等对金属离子对其细胞生长与乳链菌肽的产生无明显影响,但Mn²⁺对乳链菌肽的产生有促进作用,而Cu²⁺则有较强的抑制作用;在含1%蔗糖的M17培养基,该菌株产乳链菌肽表现出初级代谢动力学特征,其菌体生长动力学方程为:

$$\ln(ODx/(0.836-ODx))=0.464t-5.034, r=0.9499$$

产物生成动力学方程为:

$$\ln((P+101.694)/(2107.87-P))=0.464t-5.034, r=0.9964.$$

参考文献:

- [1] Delves-broughton J. Nisin and its uses as a food preservative [J]. Food Technol, 1990, 44: 100-117.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 中国食品添加剂[M]. 1994. 36.
- [3] Terzaghi B E, Sandine W E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages[J]. Appl Microbiol, 1975, 29: 807-809.
- [4] 彭沈军, 李东, 孙健. 生物食品防腐剂乳酸链球菌素菌种筛选与鉴定[J]. 中国食品添加剂, 1995, (3): 6-9.
- [5] 吴琼. 乳链菌肽效价测定方法的研究[J]. 食品科学, 1996, (6): 56-59.
- [6] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001. 170-171.

红茶菌混合菌种的分离与鉴定

吴 薇, 盖宝川, 籍保平*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要: 本文对来自北京的某个红茶菌进行了菌种分离和鉴定, 作者从该红茶菌中分离得到了五个菌种, 经鉴定分别为巴斯德酵母(*Saccharomyces pastorianus* Hansen)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe* Lindner)、醋化醋杆菌木质亚种(*Acetobacter xylinum*)、甲醇酸单胞菌(*Acidomonas methanolica*)、乳杆菌科乳杆菌属(*Lactobacillus*)。
关键词: 红茶菌; 菌种分离; 菌种鉴定

Study on the Isolation and Identification of Microbes of Kombucha

WU Wei, GAI Bao-chuan, JI Bao-ping*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China)

Abstract: This paper introduced the isolation and identification of microorganisms from a kind of Kombucha. There were five

收稿日期: 2003-10-15

* 通讯联系人

作者简介: 吴薇(1970-), 讲师, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏工程。