

补料策略优化促进乳酸乳球菌HB03发酵合成Nisin

熊华仪¹, 陈曦¹, 刘月锋², 陈雄¹, 李沛², 王志^{1*}

(1.湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室, 工业发酵省部共建协同创新中心, 湖北武汉 430068;

2.安琪酵母股份有限公司, 酵母功能湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443003)

摘要: 为提高乳酸乳球菌HB03发酵合成Nisin的效率, 本研究基于乳酸乳球菌发酵生长期间存在的氧化胁迫效应和胞外氨基酸消长规律, 分析了肽水解酶系、UMP从头合成和肽聚糖合成代谢在转录组水平的表达差异, 确定对数中后期Nisin合成限制因素为半胱氨酸(cysteine, Cys)和精氨酸(arginine, Arg)供应不足, 并通过氨基酸单因素和碳氮源补加优化, 确定10 L发酵罐水平优化的补料策略为: 11、13.5、17、19.5 h分别加入0.15 mmol/L的Cys, 12 h补入蛋白胨(15 g/L), 10~24 h补入蔗糖(1.5 g/(L·h)), 12~21 h流加Arg(0.25 g/(L·h))。在此条件下Nisin效价达到了8 963 IU/mL, 比只补加Cys发酵效价(6 993 IU/mL)提高了28.2%, 研究结果可为Nisin工业发酵提供重要参考。

关键词: 乳酸乳球菌; 乳酸链球菌素; 补料批培养优化; 发酵合成

Optimization of Fed-batch Culture Strategy for Improved Synthesis of Nisin by *Lactococcus lactis* HB03

XIONG Huayi¹, CHEN Xi¹, LIU Yuefeng², CHEN Xiong¹, LI Pei², WANG Zhi^{1*}

(1. Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei Collaborative Innovation Center of

Industrial Fermentation, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

2. Hubei Key Laboratory of Yeast Function, Angela Yeast Co. Ltd., Yichang 443003, China)

Abstract: To improve the efficiency of nisin synthesis by *Lactococcus lactis* HB03, the oxidative stress effect and the pattern of changes in the concentration of extracellular amino acids during the growth and fermentation of this strain were determined. Then, the differences in gene expression related to the peptide hydrolase system, UMP *de novo* synthesis, and peptidoglycan anabolism at the transcriptome level were analyzed. As a result, deficiencies of cysteine (Cys) and arginine (Arg) were identified as the limiting factors for nisin synthesis at the mid to late logarithmic phase. The optimal fed-batch culture strategy in a 10 L fermentor was obtained as follows: addition of 0.15 mmol/L Cys at 11, 13.5, 17, and 19.5 h, addition of 15 g/L peptone at 12 h, addition of sucrose at a flow rate of 1.5 g/(L·h) during 10 to 24 h, and addition of Arg at a flow rate of 0.25 g/(L·h) during 12 to 21 h. Under these conditions, nisin production was increased to 8 963 IU/mL, which was 28.2% higher than that obtained by adding only Cys (6 993 IU/mL). These results provide an important reference for the industrial fermentation of nisin.

Keywords: *Lactococcus lactis*; nisin; fed-batch culture optimization; fermentative synthesis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230306-050

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)22-0218-07

引文格式:

熊华仪, 陈曦, 刘月锋, 等. 补料策略优化促进乳酸乳球菌HB03发酵合成Nisin[J]. 食品科学, 2023, 44(22): 218-224.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230306-050. <http://www.spkx.net.cn>

XIONG Huayi, CHEN Xi, LIU Yuefeng, et al. Optimization of fed-batch culture strategy for improved synthesis of nisin by *Lactococcus lactis* HB03[J]. Food Science, 2023, 44(22): 218-224. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230306-050. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 湖北省区域创新发展科技专项(2020BGC010); 工业发酵省部共建协同创新中心项目(2022KF25)

第一作者简介: 熊华仪(1998—)(ORCID: 0009-0008-0120-0422), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。

E-mail: 852770522@qq.com

*通信作者简介: 王志(1971—)(ORCID: 0000-0002-6903-778X), 男, 教授, 博士, 研究方向为微生物发酵过程调控优化。

E-mail: wangzhi@hbut.edu.cn

乳酸乳球菌同型乳酸发酵过程中合成的乳酸链球菌素(Nisin)由34个氨基酸组成^[1],其能有效抑制革兰氏阳性菌(G^+)的生长,是一种安全、绿色的活性抗菌肽,被广泛应用于食品发酵领域^[2]。运用基因工程改造菌株有效提高了Nisin合成效率,Papagianni等^[3]将黑曲霉A60的磷酸果糖激酶基因 $pfk13$ 、编码cAMP依赖型蛋白激酶 $pkaC$ 和选择性氧化酶 $aox1$ 基因克隆至乳酸乳球菌ATCC11454,提高了其糖酵解活性并促进了菌株的氧化呼吸能力,Nisin效价达到14 000 IU/mL。Hao Panlong等^[4]发现过表达天冬氨酸合成酶基因($asnH$)可以使乳酸乳球菌F44在pH 3条件下的存活率提高7倍,同时Nisin产量提高57%,达到5 346 IU/mL。然而基因工程菌应用于食品发酵存在一定的安全风险,运用发酵工程策略提高Nisin合成效率仍然具有一定的积极意义。

Nisin合成效率与氨基酸前体或多肽的供给有关^[5],并与乳酸乳球菌生长存在氮源竞争关系^[6]。Nisin含有5个脱水氨基酸残基丝氨酸($serine$, Ser)、苏氨酸($threonine$, Thr)和半胱氨酸($cysteine$, Cys)合成的硫醚键^[2],因而Cys的合理供应是满足高效Nisin发酵的基础条件之一。另外,乳酸乳球菌厌氧发酵过程依然存在氧化胁迫效应^[7],Gaudu等^[8]发现Cys作为还原剂能显著增加乳酸乳球菌的存活率并减少氧化胁迫损伤而促进细胞生长^[7]。而有关Cys对Nisin发酵合成和氧化应激的影响鲜见报道。

乳酸乳球菌的蛋白水解体系^[9]包括壁膜蛋白酶PrpP、多肽转运蛋白DtpP、胞内肽酶PepV^[10]。该系统的表达受氮代谢全局调控子CodY负控制且主要受异亮氨酸的调节^[11]。另外,Vido等^[12]发现了不依赖于CodY的蛋白水解体系调控机制,乳酸乳球菌由发酵转为呼吸代谢可强烈诱导蛋白水解体系中中性内肽酶(PepO1)和氨肽酶C(PepC)的表达。

精氨酸($arginine$, Arg)在乳酸乳球菌生长代谢过程中也发挥了重要作用,Arg经脱亚氨酶($arginine$ deiminase, ADI)途径^[13]分解,产生铵根和氨甲酰磷酸以及后续的分解产物 CO_2 、铵根和ATP,这在细胞应对酸胁迫中发挥了重要作用^[14]。乳酸乳球菌Arg代谢与嘧啶合成代谢也密切相关^[15-16],调控蛋白ArgR阻遏 arg 操纵子表达, $\Delta argR$ 菌株中Arg合成基因上调,同时尿嘧啶核苷酸(uridine monophosphate, UMP)从头生物合成基因($pyrRPB$ 、 $carA$ 、 $pyrEC$ 及 $pyrKDbF$)表达也上调^[15]。由于肽聚糖合成始于尿苷三磷酸(uridine triphosphate, UTP)和N-乙酰葡萄糖胺-1-P^[9],因而UTP的不足也可能导致细胞肽聚糖合成及生长受限^[17],甚至引起细胞在胁迫条件下自溶^[18],因此Arg在细胞能量供应、酸胁迫应激及UTP与肽聚糖合成方面发挥着重要作用,而有关Arg对乳酸乳球菌Nisin发酵合成效率的影响鲜见报道。

为了提高Nisin的合成效率,在10 L发酵罐水平研究碳氮源(糖、Cys、蛋白胨)的补料策略对Nisin合成的影响,分析Nisin合成关键时间节点前后转录组表达差异,并结合胞外氨基酸浓度变化规律,确定Arg为限制氨基酸,并优化补料策略,显著提高Nisin发酵合成效率。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HB03),本实验室保藏。

蛋白胨、酵母浸粉 安琪酵母股份有限公司;蔗糖(食用级) 市售; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、NaCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、 $CaCO_3$ 、 H_2SO_4 、HCl、萘酮、柠檬酸铵(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;Nisin标准品(1 000 IU/mg) 美国Sigma公司。

斜面种子培养基:15 g/L胰蛋白胨,15 g/L酵母浸粉,15 g/L牛肉膏,10 g/L葡萄糖,10 g/L CH_3COONa ,2 g/L Na_2HPO_4 ,2 g/L柠檬酸铵,10 g/L $CaCO_3$,20 g/L琼脂,pH 6.8。

摇瓶培养基:70 g/L蛋白胨,16 g/L蔗糖,10 g/L酵母浸粉,2 g/L K_2HPO_4 ,0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.05 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$,5 g/L柠檬酸铵,6 g/L $CaCO_3$ 。

10 L发酵罐培养基:70 g/L蛋白胨,16 g/L蔗糖,10 g/L酵母浸粉,2 g/L K_2HPO_4 ,0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.05 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$,5 g/L柠檬酸铵。

1.2 仪器与设备

SPX-150D恒温培养箱 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;HNV-211B摇床 天津市欧诺仪器仪表有限公司;YXQ-75SII立式蒸汽灭菌锅 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司;Ultimate 3000高效液相色谱仪 美国Agilent公司;S-10生物传感器仪 西尔曼科技有限公司;CJ-2D净化操作台 天津泰斯特仪器有限公司;10 L机械搅拌通风发酵罐 上海保兴生物设备有限公司;V-1300分光光度计 上海美析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株活化

将-80℃冰箱保存的乳酸乳球菌HB03甘油管接种于斜面种子培养基的平板,于30℃培养箱24 h后转接茄子瓶,30℃培养24 h,无菌操作加入60 mL无菌水,并用无菌竹签将菌苔挑起混合于无菌水中,得到种子液,备用。

1.3.2 摇瓶培养及10 L发酵罐实验

摇瓶培养:装液量为50 mL/250 mL发酵培养基,调节初始pH 6.8~7.0,121℃灭菌20 min,每瓶按 $OD_{600\text{nm}}=0.1$ 接种。放置于30℃恒温摇床间歇振荡培养12 h(每小时工作30 s,转速200 r/min,随后调整转速为0 r/min)。

10 L罐分批发酵：10 L发酵罐中装量7 L发酵培养基，调整初始pH 6.8~7.0，121~123 °C灭菌25 min；接种60 mL种子液，30 °C、100 r/min不通气培养20~24 h。

1.3.3 分析检测

1.3.3.1 生物量（以细胞数计）测定

稀释涂布平板法^[19]。

1.3.3.2 总糖测定

参考硫酸-蒽酮法^[20]。

1.3.3.3 乳酸测定

生物传感仪^[21]测定。

1.3.3.4 平均Nisin合成速率 (\bar{v}_q) 计算

按式 (1) 计算：

$$\bar{v}_q / (\text{IU} / (\text{mL} \cdot \text{h})) = \frac{\text{Nisin效价}}{\text{发酵时间}} \quad (1)$$

1.3.3.5 Nisin效价测定

采用高效液相色谱法^[22]测定。样品处理：发酵液用盐酸稀释至pH 2.0~2.7^[23]，12 000 r/min离心20 min，经0.45 μm滤膜过滤后备用。Nisin标准方程绘制：将0.25 g Nisin标准品称取至50 mL容量瓶，使用0.01 mol/L盐酸溶液（pH 2.0）定容，得到标准液（5 000 IU/mL），经0.45 μm滤膜过滤备用。色谱条件：流动相：水-乙腈（81:19, V/V）混溶后加入0.05%三氟乙酸；流速1 mL/min；检测波长200 nm；柱温40 °C；进样量20 μL。

1.3.3.6 H₂O₂浓度的测定

采用索莱宝公司试剂盒，按说明书方法检测H₂O₂浓度。

1.3.3.7 游离氨基酸的测定

参考文献[24]的方法进行测定。

1.3.4 转录组数据分析

取发酵15、18 h的发酵液20 mL于50 mL离心管中，4 °C、12 000 r/min离心5 min，无菌操作留取菌体沉淀并-80 °C保存。转录组测序由美吉生物科技有限公司完成。转录表达定量分析每百万读取次数中某个转录本占比（transcripts per million, TPM）值按照式 (2) 计算^[25]：

$$\text{TPM} = \frac{R \times 10^6}{\left(\frac{R_1}{L_1} + \frac{R_2}{L_2} + \dots + \frac{R_n}{L_n} \right) \times L} \quad (2)$$

式中：R、L为需计算基因的read counts和基因长度/kb；R_i、L_i（i=1, 2, ..., n）为样品中第i个基因的read counts和基因长度/kb。

1.4 数据分析

每组进行3次平行实验，所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过Origin 9.0和SPSS 23.0进行作图以及数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 摇瓶水平Cys添加促进Nisin合成

Nisin是由34个氨基酸组成的多肽，含有5个硫醚桥（由Cys、Thr、Ser生成）^[2]。因而，Cys是Nisin的重要前体氨基酸。另外，其作为含硫氨基酸还具有抵御氧化胁迫的作用^[8]。因此，摇瓶水平考察了对数中期（16 h左右）添加不同浓度Cys对菌株HB03合成Nisin的影响，如图1所示。16 h添加0.15~0.6 mmol/L的Cys在24 h的Nisin效价较对照（未添加Cys）分别提升7.9%~20%。显然，Cys的添加促进了Nisin的生成。Cys添加量为0.6 mmol/L时Nisin效价为6 457 IU/mL。但随着Cys的添加量增多Nisin效价呈下降趋势，当添加量为0.75 mmol/L和0.9 mmol/L时，Nisin效价分别为6 140 IU/mL和5 862 IU/mL，也较对照提高14.8%和9%。综上Cys添加量0.6 mmol/L为最优，提高效价幅度达到20%。

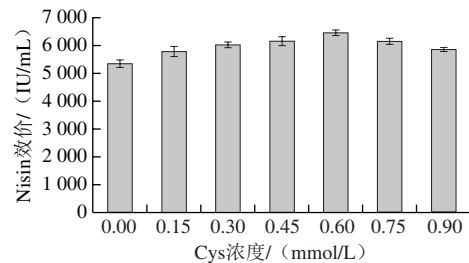


图1 摇瓶中Cys浓度对Nisin合成的影响

Fig. 1 Effect of Cys concentration on nsin production in shake flask culture

2.2 10 L发酵罐水平Cys添加促进Nisin合成

虽然发酵过程是静置（摇瓶）和未通空气的搅拌状态（10 L罐），但是发酵体系存在空气接触过程，乳酸乳球菌通过乳酸氧化酶LOX途径^[26-27]、NADH氧化途径^[28]等把氧气消耗，但同时产生了H₂O₂，而乳酸乳球菌是接触酶阴性菌株，因而细胞生长过程伴随着氧化胁迫发生^[29-30]。由于Nisin合成与生长偶联^[7]，为了降低氧化胁迫效应以及维持细胞生长效率，在罐上将Cys的添加策略调整为对数期及其稳定期（11、13.5、18、23.5 h每次添加0.15 mmol/L，总计0.6 mmol/L）。10 L罐水平Cys添加策略（终浓度0.6 mmol/L，策略1#）对乳酸乳球菌HB03生长代谢的影响如图2所示。

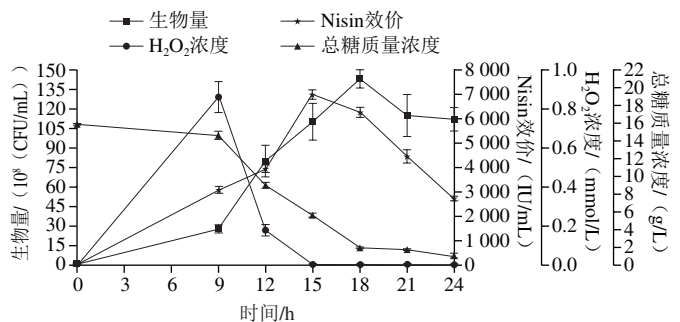


图2 Cys补料策略1#对Nisin合成的影响

Fig. 2 Effect of Cys supplementation strategy 1# on nsin synthesis

细胞生长至18 h达到峰值 (1.43×10^{10} CFU/mL)，而后自溶至21 h的 1.16×10^{10} CFU/mL并维持稳定。总糖由15.8 g/L缓慢消耗至14.62 g/L (9 h)后迅速消耗至1.75 g/L (21 h)。Nisin合成于15 h达到峰值 (6 993 IU/mL)后迅速分解。同时，细胞对数早期 (9 h) H_2O_2 为0.87 mmol/L，这与文献[30-31]氧化胁迫伴随着细胞生长过程的报道一致。前9 h细胞生长启动较慢 (糖耗也较低)可能也与细胞调整代谢以适应氧化胁迫过程有关。在细胞对数生长早期 (11 h)添加Cys (0.15 mmol/L)使 H_2O_2 迅速降至0.18 mmol/L，在15 h降至0 mmol/L并维持至发酵结束。说明Cys少量多次添加方式对消除 H_2O_2 有效。

Cys消除 H_2O_2 使细胞生长加速，18 h细胞数为 1.43×10^{10} CFU/mL，平均生长速率为 79×10^8 CFU/(mL·h)，是前9 h生长速率 (3×10^8 CFU/(mL·h))的2.6倍。Nisin合成偶联细胞生长至15 h达到峰值 (6 993 IU/mL)，15~18 h细胞继续生长，但Nisin处于被降解的状态，也印证了Nisin合成与细胞生长对氮源存在竞争关系的报道^[10]。此时，Nisin可能作为一种胞外多肽的储备分子，其被降解可能也是细胞维持活性的一种生存策略。由于15 h后 H_2O_2 浓度为0 mmol/L，因而Nisin的降解可能与其他未知因素有关，并调整Cys补加策略为：11 h和13.5 h分别加入0.15 mmol/L Cys。

2.3 Nisin对数后期降解前后转录组水平基因表达差异分析

1#策略发酵15~18 h期间，Nisin以221.6 IU/(mL·h)的速率迅速降解，但细胞数却提高了30%，达到了 1.43×10^{10} CFU/mL。即15~18 h是Nisin合成和细胞生长竞争的关键节点，因此，在转录组水平研究了15~18 h相关基因转录差异，包括肽酶相关基因、UMP从头合成途径基因、肽聚糖合成相关基因等，其显著差异基因如图3所示。

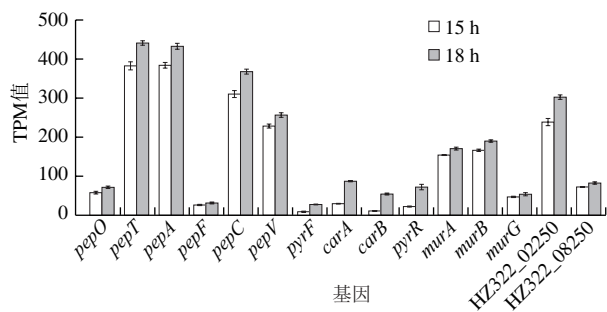


图3 15 h与18 h相关基因表达差异
Fig. 3 Differential expression of related genes at 15 and 18 h

pepO、*pepT*、*pepA*、*pepF*、*pepC*、*pepV*等胞内肽酶表达相关基因分别上调12%~24%，说明发酵15~18 h肽酶表达上升，强化了蛋白、多肽 (含Nisin)的分解

以用于生长。同时，18 h细胞UMP从头合成途径合成基因 (*pyrF*、*carA*、*carB*、*pyrR*等)显著上调至2~4倍，而18 h后细胞大量自溶，这可能与UMP合成 (或合成前体)不足有关。而肽聚糖合成相关基因 (*murA*、*murB*、*murG*等)以及与肽聚糖聚合的LysM蛋白相关基因 (HZ322_08250、HZ322_02250)表达也均上调10%~27%。这与文献[15,32]报道一致。说明UMP合成前体氨甲酰磷酸可能处于限制状态，使得UMP、UTP供应不足，进而影响肽聚糖前体二磷酸尿苷葡萄糖的合成。细胞通过大幅上调UMP合成途径与肽聚糖合成相关基因以期满足细胞需求。

氨甲酰磷酸在Arg ADI途径中产生^[13]，说明18 h不仅氨甲酰磷酸可能缺乏，同时Arg也处于限制状态。因而，细胞为寻求Arg的及时补充，肽酶相关表达也上调12%~24%。这与含硫氨基酸或Arg的缺乏导致肽酶表达增强^[9]的报道一致，细胞需要大量分解多肽以响应含硫氨基酸的缺乏，以及通过ADI途径降解Arg缓解UMP合成压力和应对酸胁迫压力。Nisin作为一种胞外的多肽“储备分子”，在细胞存在生存压力而加强肽酶表达时必然会被大量的降解。因此15~18 h细胞仍能持续生长，但Nisin效价下降。

2.4 基于转录组分析的Nisin补料策略优化

Nisin合成与细胞生长对氮源存在竞争关系^[10]说明氮源的供应不足，因而，发酵过程中补加氮源 (蛋白胨等)能缓解细胞对氮源的需求，也可作为前体直接用于Nisin合成；而Arg具有氮源和能源分子的双功能，也是需要考虑的因素。另外，蔗糖作为发酵过程唯一的碳源，适宜的流加也是必要的。补加碳氮源时间以及氨基酸对Nisin合成影响的设计如表1所示。

表1 10 L发酵罐上补料策略设计

策略编号	补料策略设计
1#	9 h开始间歇加入Cys，共加入0.6 mmol/L Cys
2#	15 h补入蛋白胨 (15 g/L)，10~24 h补入蔗糖 (1.5 g/(L·h))
3#	17、19.5 h分别加入0.15 mmol/L Cys，12 h补入蛋白胨 (15 g/L)，10~24 h补入蔗糖 (1.5 g/(L·h))
4#	策略3#基础上12~21 h加入Arg (0.25 g/(L·h))

注：补料策略2#~4#均在11、13.5 h分别加入0.15 mmol/L Cys。

在补加Cys (11、13.5 h分别加入0.15 mmol/L Cys)的前提下，考虑到细胞自溶和Nisin降解同时发生，以及策略1# 9~18 h的平均糖耗速率为1.42 g/(L·h)，确定策略2#为15 h补入蛋白胨 (15 g/L) (1.5 g/(L·h))，其对乳酸乳球菌HB03代谢以及Nisin合成的影响如图4所示。

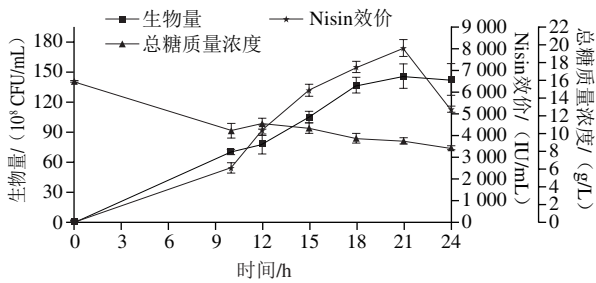


图4 策略2#对细胞生长代谢的影响

Fig. 4 Effect of strategy 2# on cell growth and nisin production in a 10 L bioreactor

Nisin 迅速合成至 21 h 效价达到峰值，为 8 042 IU/mL，较 1# 策略提高 15%，后迅速分解。其 \bar{v}_q 为 383 IU/(mL·h)。10 h 开始补糖以及 15 h 补加的蛋白胨使生物量在 18~24 h 稳定，总糖由 15.8 g/L 降至 10.33 g/L (10 h)，10~24 h 残糖稳定维持在 8~11 g/L 之间。

以上结果说明，碳氮源的持续补加为乳酸乳球菌 HB03 生长以及 Nisin 合成起着积极作用，15 h 补入蛋白胨使 Nisin 持续合成，但 21 h Nisin 合成达到峰值后依然以较快的速率降解。考虑到蛋白胨体系中可能存在氨基酸比例不平衡的问题，因此对策略 2# 细胞生长和 Nisin 主合成期 (10~24 h) 胞外氨基酸进行了测定，如表 2 所示。

表 2 策略 2# 中胞外 14 种氨基酸随时间的变化

Table 2 Changes in concentrations of 14 extracellular amino acids in strategy 2#

氨基酸	质量分数/%					
	10 h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h
甲硫氨酸 (methionine, Met)	0.03±0.002	0.03±0.002	0.042±0.003	0.040±0.001	0.043±0.002	0.037±0.003
酪氨酸 (tyrosine, Tyr)	0.064±0.001	0.055±0.003	0.072±0.002	0.068±0.001	0.067±0.015	0.059±0.002
苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe)	0.059±0.004	0.065±0.002	0.073±0.001	0.075±0.001	0.072±0.001	0.071±0.001
赖氨酸 (lysine, Lys)	0.105±0.001	0.104±0.003	0.118±0.002	0.119±0.003	0.117±0.001	0.114±0.001
组氨酸 (histidine, His)	0.021±0.003	0.022±0.002	0.026±0.001	0.028±0.003	0.028±0.003	0.027±0.003
Arg	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
脯氨酸 (proline, Pro)	0.020±0.005	0.028±0.003	0.043±0.004	0.046±0.002	0.048±0.003	0.049±0.004
天冬氨酸 (aspartic acid, Asp)	0.045±0.004	0.049±0.003	0.059±0.004	0.065±0.002	0.071±0.002	0.074±0.004
Thr	0.042±0.001	0.043±0.003	0.051±0.003	0.058±0.004	0.061±0.002	0.063±0.001
Ser	0.045±0.001	0.040±0.002	0.039±0.004	0.031±0.000	0.026±0.001	0.022±0.003
谷氨酸 (glutamic acid, Glu)	0.148±0.001	0.152±0.002	0.17±0.003	0.185±0.001	0.191±0.005	0.192±0.004
甘氨酸 (glycine, Gly)	0.171±0.040	0.182±0.003	0.215±0.006	0.224±0.001	0.228±0.002	0.232±0.002
丙氨酸 (alanine, Ala)	0.148±0.002	0.151±0.003	0.169±0.001	0.183±0.005	0.191±0.004	0.206±0.007
胱氨酸	0.022±0.010	0.018±0.001	0.019±0.002	0.023±0.003	0.010±0.046	0.014±0.001

Arg 发酵过程均未检出，说明 Arg 是一种严重缺少的限制氨基酸。Arg 参与 ADI 途径产能、缓解胞内 pH 值下降引起的酸胁迫、满足细胞生长、参与嘧啶合成^[33]。因而，Arg 的严重不足导致嘧啶途径表达的大量上调，与转录组基因差异结果一致，需要适量补充。

另外，胱氨酸发酵全过程质量分数稳定维持 0.015%~0.025%，氧化条件下 Cys 会转化为胱氨酸，考虑添加的 Cys 可能不足，所以在策略 2# 的基础上

17、19.5 h 分别加入 0.15 mmol/L Cys。12~15 h \bar{v}_q 为 614 IU/(mL·h)，15~18 h \bar{v}_q 为 356 IU/(mL·h)，从 Nisin 合成速率看 12~15 h 速率更快，所以将蛋白胨 (15 g/L) 补充时间提前至 12 h，形成策略 3# (11、13.5、17、19.5 h 分别加入 0.15 mmol/L Cys，10 h 补蔗糖 (1.5 g/(L·h)) 以及 12 h 补充蛋白胨 (15 g/L)。其对乳酸乳球菌 HB03 代谢以及 Nisin 合成的影响如图 5 所示。

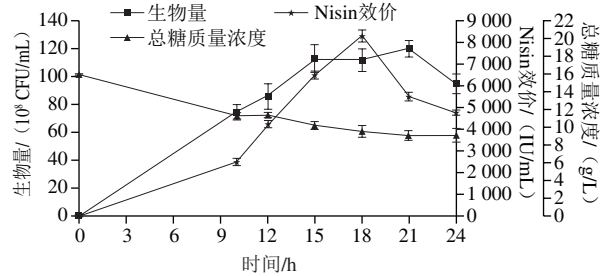


图5 策略3#对细胞生长代谢的影响

Fig. 5 Effect of strategy 3# on cell growth and nisin production in a 10 L bioreactor

细胞在 10 h 已经进入对数期，持续生长至 15 h 稳定后，于 21 h 生物量达到峰值，为 1.20×10^{10} CFU/mL，为 1# 策略的 84%，后自溶。残糖由 0 h 的 15.8 g/L 迅速下降至 10 h 的 11.32 g/L，10~24 h 缓慢利用至 9.18 g/L。Nisin 合成在 18 h 达到峰值，为 8 311 IU/mL，较 1# 策略提高 18.8%，后迅速降解。其 \bar{v}_q 为 461.7 IU/(mL·h)，较 2# 策略提高 20%。3# 策略与 2# 策略相比，Nisin 峰值效价差别较小，但达到 Nisin 效价峰值的时间点有所偏移，提前加入蛋白胨提前了 Nisin 的合成峰值时间。显然，加大含硫氨基酸的浓度以及提前蛋白胨的添加时间对于细胞来说虽然效价无明显提升，却提高了 Nisin 合成的速率 \bar{v}_q 。然而 Nisin 效价达到最高后仍然迅速分解，18~24 h Nisin 以 589.3 IU/(mL·h) 的速率迅速降解。

细胞通过 ADI 途径获得能量、升高胞内 pH 值。ADI 中间产物-氨甲酰磷酸可以作为前体进入嘧啶代谢，进而可能缓解细胞肽聚糖合成不足导致的细胞自溶以及肽酶大量表达等影响。因此需要确定 Arg 对 Nisin 合成的影响，如图 6 所示。

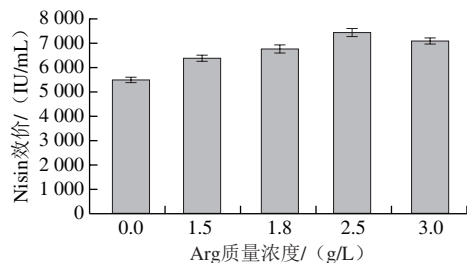


图6 摇瓶中Arg质量浓度对Nisin合成的影响

Fig. 6 Effect of different concentrations of Arg on nisin production in shake flask culture

摇瓶水平21 h添加1.5、1.8、2.5、3 g/L的Arg, 在24 h较对照(未添加Arg) Nisin效价分别提升16%、23%、35%、29%。显然, 添加Arg显著促进了Nisin的生成, 以2.5 g/L最佳。在策略3#的基础上12~21 h加入Arg 0.25 g/(L·h), 形成策略4#。其对乳酸乳球菌HB03代谢以及Nisin合成的影响如图7所示。

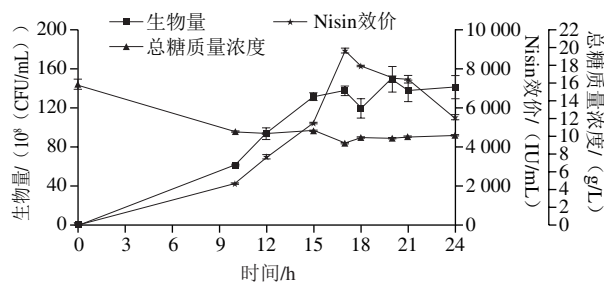


图7 策略4#对细胞生长代谢的影响

Fig. 7 Effect of strategy 4# on cell growth and nisin production in a 10 L bioreactor

细胞在10 h已经进入对数期, 持续生长至15 h达到 1.32×10^{10} CFU/mL, 后15~24 h维持稳定, 其中生物量峰值为 1.50×10^{10} CFU/mL (20 h), 较策略3#提高25%。残糖由0 h 15.8 g/L迅速下降至10 h 10.48 g/L, 补糖后10~24 h保持在9~10 g/L之间。Nisin合成在17 h达到峰值, 为8963 IU/mL, 较策略3#提高8%, 17~21 h的Nisin以342.5 IU/(mL·h)速率降解, 为策略3#的58%。而21 h后Arg不再流加, 21~24 h Nisin降解速率恢复至686 IU/(mL·h), 较17~21 h提高100%。说明Arg可大幅度延缓Nisin的降解速率, 后续可增大添加量以持续促进Nisin合成和细胞生长。

3 结论

乳酸乳球菌HB03发酵合成Nisin过程存在氧化胁迫(9 h的 H_2O_2 为0.87 mmol/L), 10 L罐发酵过程分4次添加Cys(11、13.5、18、23.5 h分别加入0.15 mmol/L)降低了 H_2O_2 浓度, 加速了细胞的生长, 促进了Nisin合成, 达到6993 IU/mL。通过分析胞外氨基酸消长规律和肽水解酶系、UMP从头合成、肽聚糖合成代谢在转录组水平的表达差异, 确定了对数中后期Nisin合成限制因素为碳氮源及Arg供应不足, 并通过氨基酸单因素和碳氮源补加优化, 确定了10 L发酵罐水平优化的补料策略。在此条件下Nisin效价达到8963 IU/mL, 比只补加Cys发酵效价(6993 IU/mL)提高了28.2%, 也比优化前效价(5349 IU/mL, 资料未显示)提高了67%。

参考文献:

- [1] DELVES-BROUGHTON J, BLACKBURN P, EVANS R J, et al. Applications of the bacteriocin, nisin[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996, 69(2): 193-202. DOI:10.1007/BF003994.
- [2] KHELISA S, CHIHIB N E, GHARSALLAOUI A. Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(2): 465-480. DOI:10.1007/s00203-020-02054-z.
- [3] PAPAGIANNI M, AVRAMIDIS N. Engineering the central pathways in *Lactococcus lactis*: functional expression of the phosphofructokinase (*pfk*) and alternative oxidase (*aox1*) genes from *Aspergillus niger* in *Lactococcus lactis* facilitates improved carbon conversion rates under oxidizing conditions[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(3): 125-130. DOI:10.1016/j.enzmictec.2012.04.007.
- [4] HAO P L, LIANG D M, CAO L J, et al. Promoting acid resistance and nisin yield of *Lactococcus lactis* F44 by genetically increasing *D*-Asp amidation level inside cell wall[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(15): 6137-6153. DOI:10.1007/s00253-017-8365-7.
- [5] KLEEREBEZEM M, BACHMANN H, VAN PELT-KLEINJAN E, et al. Lifestyle, metabolism and environmental adaptation in *Lactococcus lactis*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, 44(6): 804-820. DOI:10.1093/femsre/fuaa033.
- [6] GUÉDON E, RENAULT P, EHRlich S D, et al. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(12): 3614-3622.
- [7] GIRGIN ERSOY Z, KAYIHAN C, TUNCA S. Higher nisin yield is reached with glutathione and pyruvate compared with heme in *Lactococcus lactis* N8[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(3): 1247-1257. DOI:10.1007/s42770-019-00216-w.
- [8] GAUDU P, LAMBERET G, PONCET S, et al. CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(1): 183-192. DOI:10.1046/j.1365-2958.2003.03700.x.
- [9] HUANG C, HERNANDEZ-VALDES J A, KUIPERS O P, et al. Lysis of a *Lactococcus lactis* dipeptidase mutant and rescue by mutation in the pleiotropic regulator CodY[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(8): e02937-19. DOI:10.1128/AEM.02937-19.
- [10] KOK J, VAN GIJTENBEEK L A, DE JONG A, et al. The evolution of gene regulation research in *Lactococcus lactis*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(1): S220-S243. DOI:10.1093/femsre/fux028.
- [11] PETRANOVIC D, GUÉDON E, SPERANDIO B, et al. Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 613-621. DOI:10.1111/j.1365-2958.2004.04136.x.
- [12] VIDO K, LE BARS D, MISTOU M Y, et al. Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(6): 1648-1657. DOI:10.1128/JB.186.6.1648-1657.2004.
- [13] MARTINUSSEN J, SCHALLERT J, ANDERSEN B, et al. The pyrimidine operon *pyrRPB-carA* from *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(9): 2785-2794. DOI:10.1128/JB.183.9.2785-2794.2001.
- [14] POOLMAN B, DRIESSEN A J, KONINGS W N. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5597-5604. DOI:10.1128/jb.169.12.5597-5604.1987.

- [15] LARSEN R, VAN HIJUM S A, MARTINUSSEN J, et al. Transcriptome analysis of the *Lactococcus lactis* ArgR and AhcC regulons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4768-4771. DOI:10.1128/AEM.00117-08.
- [16] GAUDU P, YAMAMOTO Y, JENSEN P R, et al. Genetics of *Lactococci*[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(4): GPP3-0035-2018. DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0035-2018.
- [17] MARTÍNEZ B, RODRÍGUEZ A, KULAKAUSKAS S, et al. Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(5): 538-564. DOI:10.1093/femsre/fuaa021.
- [18] DUCHÈNE M C, ROLAIN T, KNOOPS A, et al. Distinct and specific role of NlpC/P60 endopeptidases LytA and LytB in cell elongation and division of *Lactobacillus plantarum*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 713. DOI:10.3389/fmicb.2019.00713.
- [19] 董安利. 乳酸乳球菌乳酸亚种BL19的高密度培养研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019: 56. DOI:10.27229/d.cnki.gnmnu.2019.000093.
- [20] 刘桂茹. 不同硫酸蒽酮比色定糖法的比较[J]. 天津农业科学, 2016, 22(3): 5-7.
- [21] 任石苟 李奠础, 许志芳. 生物传感分析仪在乳酸发酵中的应用研究[J]. 食品工程, 2011(3): 47-51.
- [22] 黄谦 余莲芳, 朱明扬, 等. HPLC评价Nisin物化特性及其在食品中提取研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(5): 256-260. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2018.05.048.
- [23] ZHENG H J, ZHANG D, GUO K M, et al. Online recovery of nisin during fermentation coupling with foam fractionation[J]. Journal of Food Engineering, 2015, 162(10): 25-30. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.006.
- [24] KIM Y, KIM E Y, SON H J, et al. Identification of a key umami-active fraction in modernized Korean soy sauce and the impact thereof on bitter-masking[J]. Food Chemistry, 2017, 233: 256-262. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.04.123.
- [25] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323. DOI:10.1186/1471-2105-12-323.
- [26] AXELSSON L T. Lactic acid bacteria: classification and physiology[J]. Food Science and Technology Series, 2004, 139: A1-A315. DOI:10.1142/S0129055X0200151X.
- [27] KUPLETSKAIA M B, SUKHACHEVA M V, KURAKOV A V, et al. Search for lactate oxidase producer microorganisms[J]. Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya, 2007, 43(2): 199-202.
- [28] GAUDU P, VIDO K, CESSÉLIN B, et al. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 82: 263-269.
- [29] VAN DE GUCHTE M, SERROR P, CHERVAUX C, et al. Stress responses in lactic acid bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 82: 187-216.
- [30] ROCHAT T, BOUDEBBOUZE S, GRATADOUX J J, et al. Proteomic analysis of spontaneous mutants of *Lactococcus lactis*: involvement of GAPDH and arginine deiminase pathway in H₂O₂ resistance[J]. Proteomics, 2012, 12(11): 1792-1805. DOI:10.1002/pmic.201100465.
- [31] JÄNSCH A, FREIDING S, BEHR J, et al. Contribution of the NADH-oxidase (Nox) to the aerobic life of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 29-37.
- [32] GUILLOT A, BOULAY M, CHAMBELLON É, et al. Mass spectrometry analysis of the extracellular peptidome of *Lactococcus lactis*: lines of evidence for the coexistence of extracellular protein hydrolysis and intracellular peptide excretion[J]. Journal of Proteome Research, 2016, 15(9): 3214-3224. DOI:10.1021/acs.jproteome.6b00424.
- [33] SONG Q, WU H, ZHANG P, et al. LssR plays a positive regulatory role in acid and nisin tolerance response of *Lactococcus lactis*[J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(8): 6483-6498.