

# 固定化乳酸乳球菌连续生产 Nisin 的研究\*

孔 健<sup>1</sup> 庄绪亮<sup>2</sup> 马桂荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(<sup>2</sup> 中国科学院生态环境研究中心生物技术研究室 北京 100085)

**摘 要:**以海藻酸钙为材料,固定乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SM526,研究不同条件对 Nisin 合成的影响。结果表明,利用 2% 海藻酸钠在 10mmol/L CaCl<sub>2</sub> 条件下,得到的固定化细胞颗粒稳定性较好,可维持 90h 无破裂;在发酵过程中 SYS3 培养基中的无机盐成分尤其磷酸盐对固定化颗粒有破坏作用;用 mSYS3 培养基代替 SYS3,通过 72h 三批次循环的半连续培养,Nisin 活性为 850 IU/mL,无明显的细胞渗漏现象。连续化生产 70h, Nisin 活性达 1150 IU/mL,相当于游离细胞的发酵水平。

**关键词:**乳酸乳球菌,乳酸菌肽,海藻酸钙,固定化细胞

**中图分类号:**Q939.11 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 06-0731-05

乳酸菌肽(Nisin)是乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)产生、由 34 个氨基酸组成的短肽,对革兰氏阳性菌尤其对食物中的致病菌如肉毒梭菌、利斯特菌有强烈的抑制作用,并具有较强的热稳定性,作为天然食品防腐剂,已被 50 多个国家和地区用于乳制品、罐头食品、高蛋白食品、乙醇饮料等的防腐保鲜。目前国内 Nisin 的应用仅见于牛奶的保鲜。由于 Nisin 产率低,价格昂贵,成为扩大 Nisin 应用范围的限制因素。采用中心组合实验设计法优化培养基得到 SYS3, Nisin 发酵单位提高了 64%<sup>[1]</sup>; De Vuyst 利用限制营养基质的间歇补料技术提高了 Nisin 产量<sup>[2]</sup>。提高产率,降低成本,是扩大 Nisin 应用范围的关键。

细胞固定化技术已成功地应用于生产微生物酶和其他蛋白质,此技术用于生产细菌素国外研究较少<sup>[3,4]</sup>,国内未见报道。本文报道利用海藻酸钙为材料,固定 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SM526 细胞来连续生产 Nisin 的研究结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) SM526 由本实验室筛选并保存。

溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*) M101 由本实验室保存。

### 1.2 培养基

SYS3 培养基:参考文献[1]配制。

\* 山东大学青年基因资助项目(98A23)。

作者简介:孔 健(1964-),女,山东菏泽人,山东大学生命科学院副教授,博士,1999 年赴丹麦皇家畜牧和农业大学研修,主要从事乳酸菌应用基础性研究。

收稿日期:2001-01-10,修回日期:2001-03-05

mSYS3 培养基:将 SYS3 培养基中的  $K_2HPO_4$ 、柠檬酸三胺及醋酸钠去掉代之以 10 mmol/L  $CaCl_2$ ,其它成分不变。

### 1.3 Nisin 活性测定

发酵液离心,去掉菌体,将上清液用 0.02mol/L HCl(pH2)溶液稀释 2 倍,以溶壁微球菌为指示菌,利用牛津杯法测定抑菌活性。Nisin 活性单位以标准品 Nisaplin (Sigma)用 0.02mol/L HCl(pH2)进行系列稀释,测定其抑菌力,单位为 IU/mL。

### 1.4 蔗糖的测定

Roe 比色法,参见文献[5]。

### 1.5 固定化细胞的制备

100mL 发酵液离心去上清,菌体细胞用生理盐水洗涤,将菌体细胞溶于 5mL 生理盐水做成菌悬液,再与 50mL 2% 海藻酸钠溶液混合均匀,用无菌注射器缓慢滴入 200mL 10mmol/L  $CaCl_2$  溶液中,形成 2~3mm 的固定化细胞颗粒,放置 30min 使颗粒稳定成型,再用生理盐水洗涤 2 次,即得固定化颗粒。

### 1.6 固定化细胞的半连续化发酵

将固定化细胞按 10% 的量接种于新鲜的 mSYS3 培养基中,32℃ 静止培养 24h,测定不同时间间隔内 Nisin 活性、残糖及 pH。一个循环完成后,将固定化颗粒在无菌条件下过滤,经无菌生理盐水和新鲜培养基洗涤后,加入新鲜培养基,在同样条件下培养,进入下一个循环。

### 1.7 固定化细胞的连续化发酵

将固定化颗粒 10mL 装入无菌培养柱(15mm × 250mm),加入 20mL mSYS3 新鲜培养基,置于 32℃ 恒温培养箱中静止培养 12h,以使细胞增殖。然后以 30mL/h 的速度恒速从柱底向上流加新鲜培养基 mSYS3,进行连续化发酵。

## 2 实验结果

### 2.1 海藻酸钠浓度对 Nisin 活性的影响

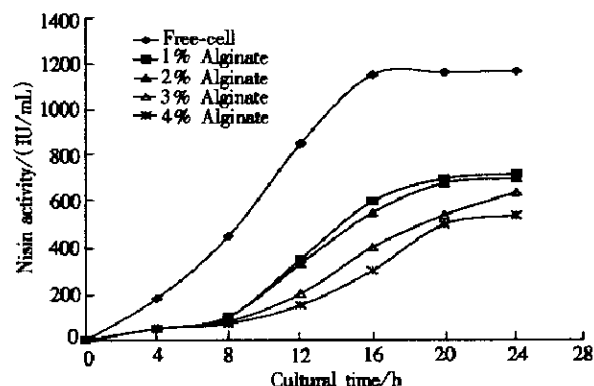


图 1 海藻酸钠浓度对 Nisin 活性的影响

Fig.1 Effect of various concentration of calcium alginate on nisin activity

选用不同浓度的海藻酸钠溶液固定菌体细胞,所得固定化颗粒在 mSYS3 培养基中静止培养 24h(图 1)。由图 1 可知,不经固定的游离细胞,Nisin 产量较高,培养 16h 即可达到最高生长期,Nisin 产量为 1150IU/mL。而菌体细胞固定化后延迟期延长了 4h,并且随着海藻酸钠浓度的增加,Nisin 产率降低,但固定化颗粒的稳定性逐渐上升,由 1% 海藻酸钠时的 70h 增加到 4% 的 120h(数据图中没显示)。以 1% 和 2% 的海藻酸钠固定菌体细胞时,经培养 20h Nisin 产量达到最高,分别为 720 和 700IU/mL,低于游离细胞的发酵

水平。1%海藻酸钠包埋的固定化颗粒强度弱,易破裂,故选用 2%海藻酸钠浓度固定 *L. lactis* subsp. *lactis* SM526 细胞。

### 2.2 无机盐离子对 Nisin 活性的影响

以 mSYS3 培养基为基础,分别加入一定量的磷酸氢二钾、柠檬酸钾、醋酸钾,配制成不同组分的培养基,培养固定化颗粒细胞,表 1 所示。

表 1 无机盐离子对固定化细胞 Nisin 活性的影响

| Medium  | Stability of immobilized beads/h | Nisin activity/(IU/mL) |
|---|----------------------------------|------------------------|
| SYS3  | 30                               | 850                    |
| mSYS3   | 90                               | 750                    |
| mSYS3 + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                             | 40                               | 820                    |
| mSYS3 + K <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> | 75                               | 780                    |
| mSYS3 + KAc   | 75                               | 780                    |

SYS3 培养基是采用中心组合实验设计优化后而得到的 Nisin 发酵培养基<sup>[1]</sup>,培养基中含有的  $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 、 $\text{Ac}^-$  离子有利于 Nisin 生物合成,表现为固定化颗粒在 SYS3 培养基中 Nisin 活性最高,但固定化颗粒的强度降低,培养 24 ~ 30h 就有细胞渗漏现象;而将 SYS3 培养基中的上述三种离子去掉得到 mSYS3, Nisin 活性虽有降低,但固定化颗粒的稳定性提高,即培养 90h 无破损。在这三种离子中,  $\text{PO}_4^{3-}$  对固定化颗粒稳定性破坏性最大。故选用 mSYS3 作为固定化细胞生产 Nisin 的发酵培养基。

### 2.3 固定化细胞半连续化生产 Nisin

将固定化颗粒以 10% 的接种量接入 200mL mSYS3 新鲜培养基中,32℃ 静止培养,图 2 所示。与游离细胞相比固定化细胞 Nisin 产生时间推迟了 4h,其产量在 20h 时达到最高,其活性为 700 IU/mL,为游离细胞的 60%,发酵液中的残糖和 pH 与游离细胞相当,而发酵液中游离细胞数为  $10^5-10^6$  cfu/mL,相当于游离细胞 1/100。将固定化颗粒过滤洗涤后再重新溶入新鲜的 mSYS3 培养基,培养 24h 后,固定化颗粒再在无菌条件下过滤,重新溶入新鲜的 mSYS3 培养基中,在相同条件下完成第二、三个循环的培养。在二、三个循环中,其 Nisin 活性逐渐增大。在第三循环中, Nisin 活性达 850IU/mL,发酵液保持与第一循环相同的游离细胞数。继续使用该颗粒,进入第四循环,固定化颗粒虽然仍保持完整,但发酵液中游离细胞数目增加。

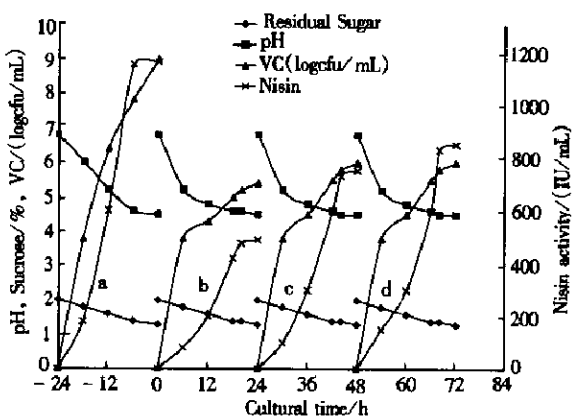


图 2 固定化细胞在 mSYS3 培养基中的半连续化发酵  
Fig.2 Nisin production by immobilized beads in repeated-batch fermentation in mSYS3 media  
a. Free-cell; b. First cycle; c. Second cycle; d. Third cycle.

### 2.4 固定化细胞连续生产 Nisin

将固定化颗粒装入反应柱中,注满新鲜 mSYS3 培养基,32℃ 静止培养 12h 以使固定化颗粒内细胞数增殖,这时发酵液中游离细胞数也随着增加,但 Nisin 浓度保持在较低水平,为 460IU/mL。然后通过蠕动泵由柱底向上通入新鲜 mSYS3 培养基(流速 30mL/h),进行连续化生产。

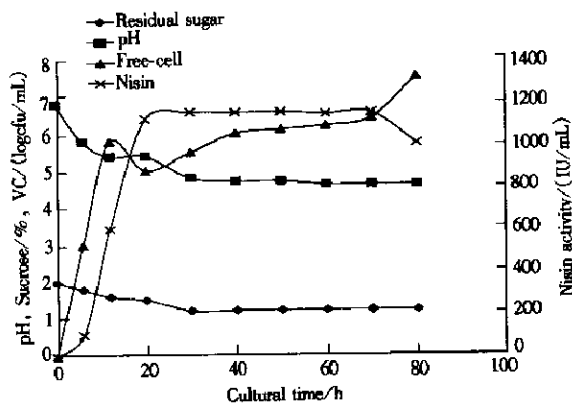


图3 固定化细胞在 mSYS3 培养基中的连续化培养

Fig. 3 Nisin production by immobilized beads in continuous fermentation in mSYS3 medium

化条件的摸索,得到了稳定性较好的固定化颗粒,通过三批次 72h 的半连续和 70h 的连续化培养,得到了较稳定的 Nisin 活力,证明了用固定化 *L. lactis* SM526 生产 Nisin 是可行的。按 30mL/h 流速流加培养基,一个 15mm × 250mm 柱子,一天可得 720mL 发酵液,一个柱子一次可连续发酵 3d,可得 2160mL 发酵液。而用常规的分批培养技术,该菌株的发酵周期为 24h, 15mm × 250mm 柱子一次最多可得 20mL 发酵液,三天共可得到 60mL,为连续发酵的 1/24,可见用固定化细胞连续生产 Nisin,大大提高了生产效率,并且发酵液中游离细胞少,有利于产品 Nisin 分离纯化。

通过固定化细菌或真菌细胞进行分批或连续发酵生产某些蛋白质类物质,其产量往往高于游离细胞的发酵水平<sup>[6,7]</sup>, *L. lactis* SM526 用海藻酸钙固定后,其生产性能稍有降低,尤其在分批和半连续发酵实验中,其原因可能是海藻酸为多聚物,包围在细胞外,影响了物质的传质扩散作用,同时  $\text{Ca}^{2+}$  可以和细胞膜成分进行络合,改变细胞的微环境和生理状态,以影响其生产性能。而在连续化发酵中, Nisin 产量高于分批和半连续化实验中的产量,接近于游离细胞的水平,这是因为连续化生产所用的固定化细胞的生理活性较高,始终保持在指数生长期,随着新鲜培养基的流加,一部分代谢产物如乳酸和 Nisin 被移开,减少了终产物的反馈抑制作用。

海藻酸钙颗粒的循环使用次数报道从三次到十次不等, Dierkes 等人研究认为通过限制磷酸盐浓度,并在培养基中加入一定量的  $\text{CaCl}_2$  可以提高颗粒的稳定性<sup>[8]</sup>。在研究中,去掉三种缓冲盐成分( $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ 、 $\text{Ac}^-$ ),而向培养基中加入 10mmol/mL  $\text{CaCl}_2$ ,提高了颗粒的稳定性。经半连续培养 3 个循环及连续培养 70h,颗粒中细胞的渗漏程度仍比较低,由此证明了用海藻酸钙固定化细胞连续化生产 Nisin 是可行的,尽管还有许

在连续发酵的前 8h (即在柱中培养 20h), Nisin 活性迅速增加,由 460IU/mL 提高到 1150IU/mL,达到游离细胞时的发酵水平,而这个时期由于新鲜培养基的流加,发酵液的游离细胞数稍有降低,随后又增加。在发酵的前 70h, Nisin 产量一直保持在游离细胞的水平,流出液的 pH 值稳定在 4.6 左右,残糖浓度基本维持不变。游离细胞数为  $10^6$  CFU/mL。70h 后,固定化颗粒开始破裂,流出液中游离细胞数增多 ( $> 10^7$  CFU/mL), Nisin 活性降低,其 pH 和残糖几乎不变。

### 3 讨论

本研究以海藻酸钠为包埋剂,经过固定

多亟待完善的地方,但本论文的研究为 Nisin 的商业化生产和应用提供了一种新的技术和方法。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 庄绪亮,张洪勋,马桂荣,等.化工冶金,2000,21(1):93 ~ 97.
- [ 2 ] De Vuyst L, Vandamme E J. *Microbial manipulation of nisin biosynthesis and fermentation*. In: Jung C, Sahl H. Nisin and novel lantibiotics. The Netherlands: Escom Science Publishers B.V. 1991. 397 ~ 409.
- [ 3 ] Zezza N, Pasini G, Lombardi A, et al. *Journal of Dairy Research*, 1993, 60: 581 ~ 591.
- [ 4 ] Wan J, Hickey M W, Coventry M J. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79: 671 ~ 676.
- [ 5 ] 蔡武诚编.生物物质常用化学分析法.北京:科学出版社,1982. 15.
- [ 6 ] 魏东芝,王筱兰,陈少欣,等.生物工程学报,2000,16(3):392 ~ 395.
- [ 7 ] Jamuna R, Ramakrishna S V. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992, 14(1): 36 ~ 41.
- [ 8 ] Dierkes W, Lohmeyer M, Rehm H J. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59(7): 2029 ~ 2033.

## CONTINUOUS PRODUCTION OF NISIN BY CALCIUM ALGINATE- IMMOBILIZED *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* SM526

Kong Jian<sup>1</sup> Zhuang Xuliang<sup>2</sup> Ma Guirong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

(<sup>2</sup> Research Center of Eco-Environment Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100086, China)

**Abstract:** The attempts were made to produce nisin by immobilized cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SM526 entrapped in calcium alginate beads. The results showed that the immobilized cell beads were intact for 90hr under 2% of calcium alginate in 10mmol/L CaCl<sub>2</sub> solution. The physical stability of beads was improved by removing phosphate, citrate and acetate salts supplied in SYS3 medium. Repeated-batch fermentation utilizing immobilized cells were performed in mSYS3 medium without agitation at 32℃, the concentration of nisin produced during the third cycles increased to 850 IU/mL, and the beads were still intact with little cell leakage. The immobilized beads were loaded into a sterilized glass column to continuous fermentation, nisin concentration increased to 1150 IU/mL, as high as that obtained in free-cell fermentation, and the high productivity was stable for up to 70h under a constant supplied of the fresh mSYS3 medium.

**Key words:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Nisin, Calcium alginate, Immobilized cell