

文章编号: 1000-0615(2017)06-0817-10

DOI: 10.11964/jfc.20161010585

纳豆芽孢杆菌固态发酵罗非鱼下脚料过程相关参数 变化及产脂肽动力学

冯涛¹, 张宁¹, 孙力军^{1*}, 王雅玲^{1*}, 洪鹏志¹, 廖建萌²,
邓旗¹, 叶日英¹, 吴金红³, 陈康建³

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524088;

2. 湛江市食品药品检验所, 广东 湛江 524000;

3. 湛江恒兴水产科技有限公司, 广东 湛江 524000)

摘要: 为了探明发酵参数与脂肽生成间的关系, 实验以罗非鱼下脚料为主要基质接种纳豆芽孢杆菌, 控制一定条件在三角瓶中进行固态发酵, 测定发酵过程中菌体量、基质的温度、pH、水分含量、生物酶活性、蛋白含量及水解度和抗菌脂肽生成量; 通过数学拟合建立底物消耗、菌体生长、脂肽生成的动力学模型, 并分析各参数与脂肽生成和蛋白水解间的关系及其变化规律。结果显示, 在下脚料固态基质中生长曲线为典型的S型, 最大生长速率 μ_m 为 0.2355×10^8 cfu/h, 48 h菌体处于最大生长量, 通过动力学模型拟合, 符合Logistic模型。脂肽的生成趋势和菌体生长基本一致。同样符合Logistic模型, 最大生成量为7.30 g/kg, 最大生成速率为0.1112 g/h。在菌体生长过程中, 基质中的蛋白酶活性在前期呈直线上升的趋势, 48 h达到最高30 304.56 U/g, 随后迅速下降。在菌体生长前60 h, 基质中的粗蛋白含量呈直线下降, 最终水解度达26.26%, 蛋白消耗动力学模型符合物料衡算理论模型。发酵过程中, 基质的温度、pH和水分会发生小幅波动。研究表明, 脂肽生成和菌体生长是偶联型; 蛋白酶是同步合成型, 蛋白酶产量可以为后续二步酶解制备小肽提供充足酶源; 建立的动力学模型拟合度好, 可以用于描述发酵过程和脂肽生成规律。本研究为利用罗非鱼下脚料固态发酵生产抗菌脂肽和营养小肽复合型活性肽工业化生产调控提供了重要的理论依据。

关键词: 罗非鱼下脚料; 纳豆芽孢杆菌; 抗菌脂肽; 动力学

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

我国水产品加工下脚料数量庞大, 往往会带来资源浪费和环境污染^[1-3], 探寻高附加值和低排放的再加工新方法成为当务之急。饲用活性肽是一种高值、低门槛产品, 成为海洋低值蛋白开发和利用的新途径。抗菌肽和营养小肽作为饲用活性肽主要成员被认为是目前最具潜力的饲用抗生素替代品。

芽孢杆菌抗菌脂肽是抗菌肽家族中的一

类, 其成员通常有表面活性素(surfactin)、芬芥素(fengycin)、伊枯草菌素(iturin)、杆菌霉素(bacillomycin)、抗霉枯草菌素(mycosubtilin)、制磷脂菌素(plipstatin)等。这类抗菌肽具有显著的抗细菌、霉菌、病毒和原虫等功效^[4-5], 对酸碱和热处理有非常好的稳定性, 且口服使用是安全的。以上这些特性有助于其在饲料添加剂行业的广泛应用。其中部分成员已被应用于动物

收稿日期: 2016-10-19 修回日期: 2017-04-08

资助项目: 广东省科技厅公益研究与能力建设专项(2014B020204005, 2014B020205006); 广东省高等学校创新强校工程计划(GDOU2013050312, GDOU2013050205, GDOU 20014050203)

通信作者: 孙力军, E-mail: suncamt@126.com; 王雅玲, E-mail: wangylchina@163.com

养殖中的抗病促生长,其效果显著^[6-7]。但主要还存在菌种产脂肽能力相对偏低;产物抗菌谱相对较窄,抗菌针对性单一;发酵产率偏低等难题。尤其是液态发酵生产,由于会产生大量泡沫,罐效低,成为产业化的瓶颈。

饲用营养小肽是蛋白质水解的中间产物,是由2个或2个以上氨基酸残基组成的化合物。营养小肽因具有高吸收性、高转化率和免疫刺激作用,添加于饲料中能显著提高动物存活率,促进饲料中矿物元素吸收利用和饲料转化,促进动物体内蛋白质的合成,并增强动物体自身免疫力,从而实现养殖大幅增产及增效^[8]。目前,饲用活性营养小肽主要原料采用豆粕、羽毛粉、鱼粉等蛋白质资源,采用酶解法、微生物发酵法或酶解法和微生物发酵法联合进行生产^[9]。国内外参与此方面研究的研究部门和企业较多,其中也不乏国际化大企业,产品已在一定范围内得到应用,但仍存在产率偏低、成本较高和功能相对单一等缺点,限制了进一步大范围推广。

如果能将抗菌脂肽发酵生产和营养小肽的酶解工艺相结合,不仅可以利用水产品下脚料低值蛋白作为芽孢杆菌的营养底物生产抗菌脂肽,还可以利用发酵过程中芽孢杆菌产生的复合蛋白酶酶解下脚料低值蛋白生产营养小肽。因此可以简化工艺,大幅度降低成本,拓展产品的使用范围,增强产品竞争力;还可以显著提高下脚料的附加值,实现无渣排放高效环保型工业化生产,推动水产养殖业的健康可持续发展。

本研究团队在中国传统发酵豆豉中分离得到了一株抗菌脂肽高产菌株纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto* NT-6),该菌株可以产生iturins、fengycins和surfactins等3类抗菌脂肽。该脂肽组分中含有20多种脂肽类同系物,具有广泛的抗菌活性和抗菌谱^[10],已被证明在动物促生长、抗病及水产品保鲜等方面具有良好的效果^[11-12]。利用该菌株,以罗非鱼下脚料为原料,研究团队开展了固态发酵生产富含抗菌脂肽和营养小肽的复合型饲用活性肽关键技术的研究。前期实验针对发酵过程产生的脂肽组分进行了分析,并通过单因素实验和响应面设计优化了发酵工艺条件,脂肽产量有了较大幅度的提升^[13]。然而,罗非鱼下脚料固态发酵体系相对复杂,发酵过程中基质

的组成、温度、水分含量、pH、菌体量及发酵基质中的水解酶活性等与抗菌脂肽产量和小肽含量有密切的关联。通过对发酵过程各参数变化的了解,可以更好地解析发酵系统中各个因素间的相互作用关系,逐步完善罗非鱼下脚料固态发酵生产脂肽和营养小肽过程的动力学模型,从理论上更好地掌握其发酵过程各关键指标的控制策略,为大规模工业化生产奠定基础。

本实验拟对纳豆芽孢杆菌固态发酵罗非鱼下脚料过程中相关参数的变化规律及脂肽生成动力学模型进行研究,旨在能更有效地将该技术应用用于工业生产并为实现高效控制提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验菌株

纳豆芽孢杆菌分离自中国传统食品细菌性豆豉^[10],于广东海洋大学食品科技学院水产品食源性病原微生物及毒素绿色控制研究室保存。

1.2 实验材料

生产罗非鱼片的下脚料由广东湛江恒兴科技水产有限公司提供,鲜活罗非鱼放血采肉去内脏,剩余的肉和骨架,漂洗后-20℃冷藏,使用前粉碎解冻;麸皮购自湛江某面粉厂;甘蔗渣购自湛江某制糖厂;使用前60℃干燥2h。Surfactin和Iturin标准品(Sigma公司);BPY培养基,无机盐溶液(谷氨酸钠5.00g、氯化钾1.00g、MgSO₄·7H₂O 1.92g、葡萄糖10.00g、K₂HPO₄·3H₂O 1.96g、MnSO₄ 5.00×10⁻³g、CuSO₄ 0.16×10⁻³g、FeSO₄ 0.15×10⁻³g、蒸馏水1000.00mL)。牛血清蛋白;甘氨酸(国药集团化学试剂有限公司);可溶性淀粉;酪蛋白;干酪素(N≥14%,上海源叶生物科技有限公司);L-酪氨酸(99%)。

1.3 仪器和设备

MS-70快速水分含量测定仪(日本AND);HH-6数显恒温水浴锅(上海诺顶仪器设备有限公司);高速冷冻离心机(Sigma Laborzentrifugen GmbH, 3-18K);液相质谱联用仪(美国热电公司);722S可见分光光度计(上海精科仪器有限公司)。

1.4 实验方法

菌株活化及种子液的制备 取甘油保藏的

纳豆芽孢杆菌用接种环挑取一环进行平板划线, 37 °C倒置培养24 h, 挑取平板上的单菌落至NA琼脂斜面, 静置培养24 h。挑取斜面上的NT-6菌株接种于BPY液体培养基中, 37 °C, 150 r/min振荡培养24 h, 即为种子液。

发酵方法 将发酵基质(罗非鱼下脚料40.00 g、麸皮11.50 g和甘蔗渣3.00 g)混匀, 装入250 mL锥形瓶, 加入无机盐溶液5.30 mL(前期优化实验确定), 121 °C高压灭菌15 min, 冷却至室温。接入NT-6种子液, 接种量5%(V/W)。置于生化培养箱中30 °C发酵, 期间每6 h搅拌、取样1次, 直到发酵时间达到96 h。发酵完成后, 将产物于恒温鼓风干燥箱中60 °C烘干, 粉碎即得复合生物制剂。

产物粗酶液的制备 自接入种子液开始每6 h准确称取发酵基质2.00 g, 用40.00 mL的蒸馏水溶解, 在40 °C水浴锅中浸提5 min, 转移至50 mL的离心管中, 4000 r/min离心20 min, 取上清液备用。

1.5 发酵过程中各参数的测定

发酵过程中相关参数的测定 自种子液接入开始每6 h准确称取一定量发酵后的基质用于参数测定, 每个参数做3个平行。生物量的测定使用NA平板计数; 发酵基质pH测定采用超纯水溶解基质后直接测量; 水分含量采用MS-70快速水分含量测定仪测定; 发酵产物中粗蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法; 样品特性产物水解度的测定采用茚三酮法。水解度(%)=(产物中氨基态氮含量-初始基质中氨基态氮含量)/(总氨基态氮含量-初始基质中氨基态氮含量); 发酵基质的温度用温度计直接插入发酵基质内部测量。

发酵产物中酶活性测定 脂肪酶活性的测定采用对硝基苯酚法^[14], 淀粉酶活性的测定采用小体系DNS法^[15], 蛋白酶活性的测定采用国标SB/T10317-1999中的福林法^[16]。

发酵产物中抗菌脂肽含量测定 每隔6 h准确称取5.00 g发酵基质, 按1:5(W/V)加入无水甲醇浸提12 h。之后, 将提取液10 000 r/min离心15 min, 取上清液, 0.22 μm有机滤膜过滤除去不溶物, 所得液体即为抗菌脂肽提取液。

采用团队自建的液质联用法^[17](LC-MS/MS)检测产物中抗菌脂肽的含量^[17]。HPLC条件: 色谱柱为Venusil XBP CN (150 mm×2.1 mm, 5 μL); 柱温35 °C; 进样量: 10 μL; 进样速度: 8.0 μL/s。

流动相: 乙腈(A), 5 mmol/L乙酸铵溶液(0.1%甲酸)(B); 洗脱速率: 300 μL/min; 梯度洗脱条件: 0~4 min, 40% A和60% B; 4~7 min, 90% A和10% B; 7~12 min, 40% A和60% B。质谱条件: 在ESI正离子模式下, 采用选择性离子扫描SIR模式, 喷雾电压4.5 kV; 鞘气压力40 arb; 辅助气压力15 arb; 毛细管温度270 °C, 碰撞压-22 mTorr。

实验数据处理及动力学模型拟合 使用Origin 8.5处理实验结果, 作图和发酵动力学方程拟合。

2 结果

2.1 发酵过程中相关参数的变化趋势

菌体生长、底物消耗和产物生成等参数的动态变化 菌体生长6 h后进入对数期, 并维持较高的生长速率, 24 h后菌体的生长速率进一步提高, 一直维持到48 h, 之后进入稳定期, 此时的菌体量达到 3.60×10^8 cfu/g, 并维持24 h; 72 h后, 菌体量略微下降; 84 h后, 基本保持不变, 直到发酵结束(图1)。在发酵过程中菌体量的变化趋势为S形, 同经典的生长曲线一致, 稳定期相对较长。

在纳豆芽孢杆菌所产的内源蛋白酶作用下, 罗非鱼下脚料中的蛋白质不断被分解, 粗蛋白含量不断下降, 且蛋白质的下降曲线呈倒置的S型, 在菌体生长初期培养基中的粗蛋白含量即开始快速下降, 并保持较高的下降速率, 至60 h止(图1)。随后粗蛋白含量相对平衡, 72 h后, 又有所上升。说明在菌体对数生长期, 基质中的蛋白可以被纳豆菌快速利用; 在菌体稳定期前期(48~60 h), 蛋白含量仍然以较快的速率下降, 可能与脂肽合成有关。之后蛋白的升高可能是菌体的部分自溶造成的。

发酵过程中, 基质中的脂肽含量在6~48 h以对数趋势增长, 之后趋于稳定, 60 h后脂肽的含量又有缓慢增长。发酵结束时最大脂肽产量为7.15 g/kg, 脂肽产量的变化趋势和菌体生长曲线趋势一致, 同时与水解度的趋势也相同(图1)。可以推测脂肽的合成模式是生长偶联型; 纳豆菌在生长过程中可以很好地将蛋白水解, 蛋白的水解和菌体生长也是偶联型的。

生物酶活性变化趋势 3种酶活性均是先升高后降低, 其中淀粉酶活性变化趋势与蛋白酶

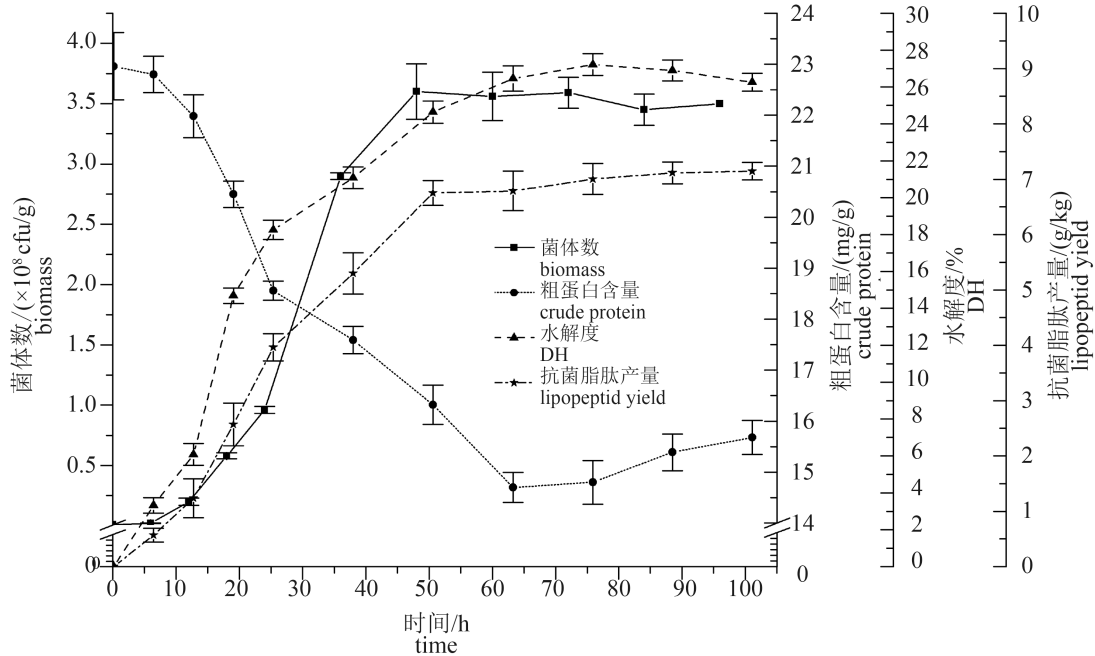


图1 固态发酵过程中产物生成和底物消耗变化曲线

Fig. 1 Dynamic curves of product formation and substrate consumption during solid state fermentation process

与脂肪酶变化趋势不同，与微生物的生长曲线变化趋势相近，呈现典型的S型曲线，在发酵进行到72 h时淀粉酶活性达到最大，之后保持稳定(图2)。而蛋白酶和脂肪酶活性变化趋势相近，在6~48 h快速上升并在48 h时达到最大，此后不断下降，不同的是在发酵后期(72~96 h)，脂肪酶活性几乎不再发生变化，而蛋白酶活性继续缓慢下降；三者之中，以蛋白酶活性为最强，最高时(48 h)可达30 304.56 U/g。

温度、pH、水分含量变化 在整个发酵过程中，温度、pH、含水量3个参数变化节点均与菌体生长和脂肽生成的变化节点一致。发酵基质的pH整体呈现明显的先升高后小幅度下降最后保持稳定的趋势，且变化趋势同发酵基质中生物量的变化趋势相近(图3)。整个发酵过程中pH都在中性附近，6~12 h时出现小幅下降达到7.1，最高为8.5，60~96 h保持稳定，变化幅度为1.4，最终在8.2保持稳定，菌体分泌的蛋白酶等生物酶分解基质中的蛋白质等大分子成分引起了pH的变化；发酵基质温度在发酵初期呈现明显上升的趋势，在12~36 h达到最大(35 °C)，之后开始下降并在60 h时重新稳定在30 °C附近直到发酵结束；在整个发酵过程中最高温度为35 °C，最低温度为30 °C，温度变化幅度为16.67%，其变化趋势前半部分同生物量的变化趋势，但后

半部分有差异，趋势发生变化的时间点一致，均在36和48 h；水分是影响微生物生长代谢的一个重要因素，在本实验中菌体的生长代谢和水解对水分子的消耗使得水分含量持续降低，仅在发酵的最后阶段保持了稳定。其变化趋势与生物量及另外两个参数的变化趋势有明显的不同，水分含量从最初的60.6%下降到发酵结束时的52.5%，下降了13.2%。

2.2 发酵动力学模型分析

纳豆芽孢杆菌NT-6生长动力学模型

Logistic模型是应用最广泛的用于描述微生物生长的模型^[18]，它可以任何指数增长并最终接近固定限值^[19]。该模型的方程式：

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (1)$$

式中， X 为菌体浓度(cfu/g)， t 为发酵时间， μ_m 为最大生长速率(cfu/h)， X_m 为最大菌体浓度(cfu/g)；初始条件下， $t=0$ ， $X=X_0$ ，将公式(1)积分得公式(2)：

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \quad (2)$$

利用得到的菌体实验数据 $X_{0实}=2.00 \times 10^6$ cfu/g， $X_{m实}=3.60 \times 10^8$ cfu/g，结合方程(2)用Origin 8.5软件拟合处理，得到拟合曲线(图4)： $X_0=1.30 \times 10^7$ cfu/g， $X_m=3.57 \times 10^8$ cfu/g， $\mu_m=0.2355 \times 10^8$ cfu/h；

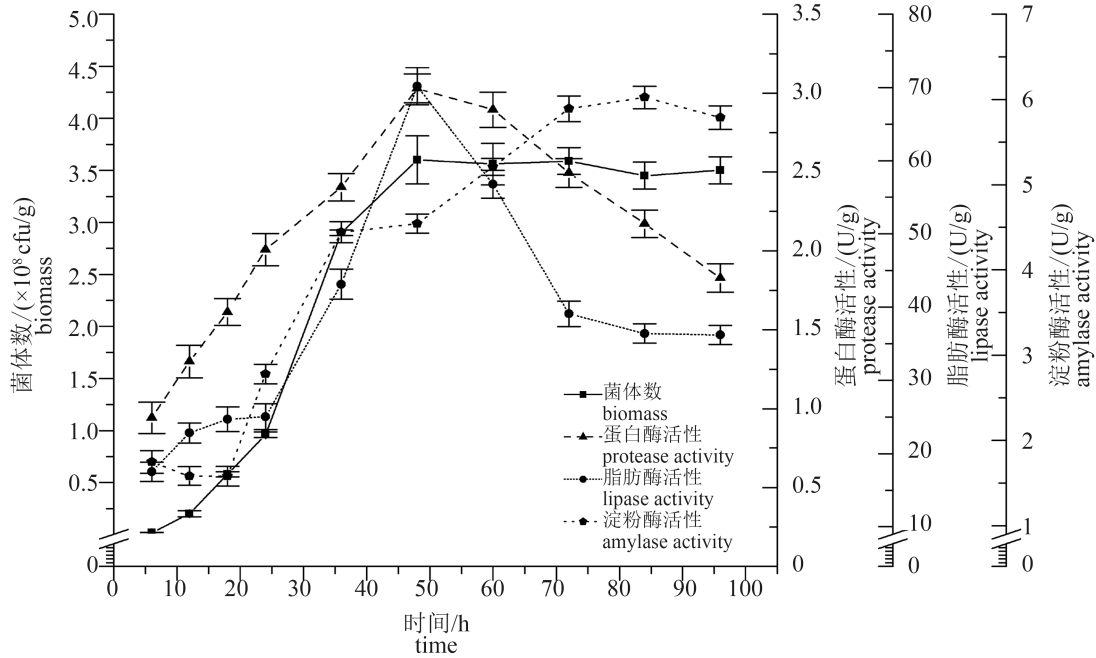


图2 固态发酵过程中酶活性动态变化曲线

Fig. 2 Dynamic curves of enzyme activity during solid state fermentation process

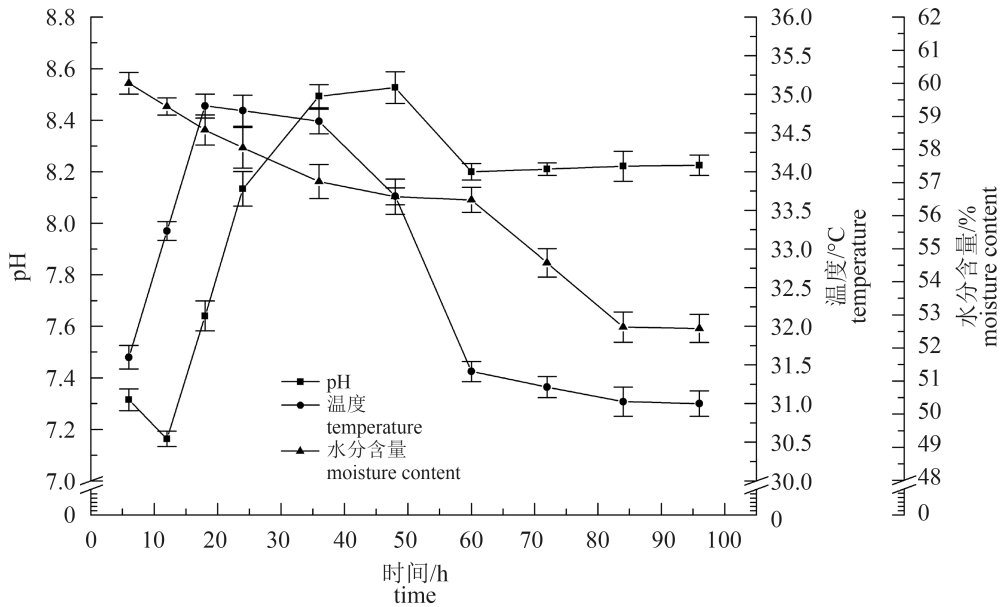


图3 固态发酵过程中环境参数的动态变化曲线

Fig. 3 Dynamic curve of environmental parameters during solid fermentation process

将以上数据代入方程(2)得到菌体生长的动力学方程:

$$X = \frac{1.30 \times 10^7 \times 3.57 \times 10^8 e^{0.2355t}}{3.57 \times 10^8 - 1.30 \times 10^7 + 1.30 \times 10^7 e^{0.2355t}}$$

方程拟合度 $R^2=0.9914$,表明该模型理想且能较为准确地反映和预测此发酵过程中菌体数的生长变化。

脂肽生成动力学模型 根据微生物生长和产物合成的关系,产物生成模式分为3类:①生长与产物合成偶联型;②生长与产物合成半偶联型;③生长与产物生成非偶联型。抗菌脂肽生成的动力学研究参照Luedeking-Piret模型方程,该模型最初被开发是用来研究德氏乳杆菌生成乳酸^[20-21]。根据此模型,产物形成率与瞬时生物

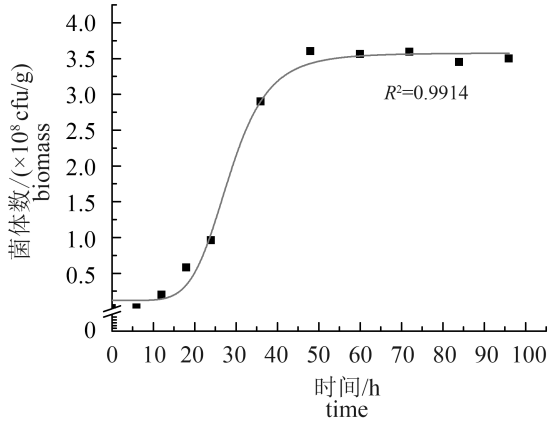


图4 纳豆芽孢杆菌NT-6生长的动力学拟合曲线

Fig. 4 Kinetic fitting curve of *B. natto* NT-6's growth

量浓度(X)和其生长速率(dX/dt)呈线性关系。

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (3)$$

式中, P为抗菌脂肽产量(g/kg), dP/dt为脂肽生成速率, α为生长相关脂肽生成系数, β为非生长相关脂肽生成系数。

当α≠0, β=0时, 产物生成和微生物生长呈线性关系, 方程(2)转变:

$$P = \alpha X + k \quad (4)$$

假设抗菌脂肽的生成和微生物的生长呈线性关系, 即脂肽生成曲线符合方程(4), 将得到的脂肽产量实验数据进行拟合, 得到的拟合方程为P=1.269+1.598×10⁻⁸X, R²=0.9945, 拟合效果不理想, 即说明此发酵过程中二者并非成简单的线性关系。依据得到的抗菌脂肽的曲线, 利用Logistic方程再次进行拟合, 最终得到拟合曲线(图5)。

拟合时参照方程:

$$P = \frac{P_0 P_m e^{\mu_m t}}{P_m - P_0 + P_0 e^{\mu_m t}} \quad (5)$$

式中, P代表抗菌脂肽的产量(g/kg), t为时间(h), μ_m为菌体最大生长速率(cfuh), 利用Origin8.5软件, 进行拟合可得, P₀=0.3963 g/kg, P_m=7.3482 g/kg, μ_p=0.1112 g/h, 将μ_m=0.2355×10⁸ cfu/h带入方程(5), 可得到此发酵过程中抗菌脂肽的生成动力学模型:

$$P = \frac{0.39628 \times 7.34815 e^{0.2355t}}{7.34815 - 0.39628 + 0.39628 e^{0.2355t}}$$

此模型拟合度良好, R²=0.9945, 可以用来描述抗菌脂肽的生成。

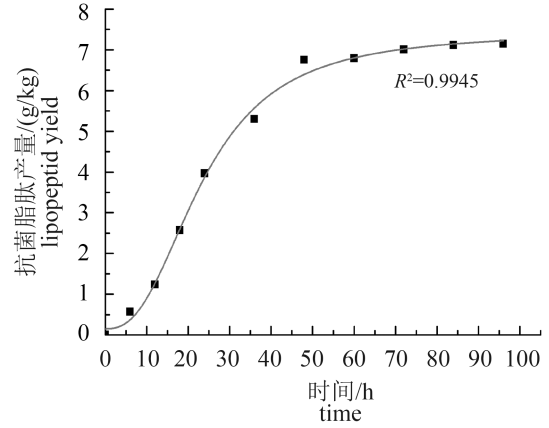


图5 抗菌脂肽生成的动力学拟合曲线

Fig. 5 Kinetic fitting curve of antimicrobial lipopeptide formation

蛋白消耗动力学模型 底物消耗采用物料衡算理论模型, 公式:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + m_s X \quad (6)$$

式中, t为发酵时间(h); S蛋白质含量(%); Y_{x/s}为最大菌体生长系数; X为菌体量(cfuh); m_s为菌体细胞维持相关常数。把方程(2)带入方程(6)整合得到以下公式:

$$S = S_0 - \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{Y_{X/S}(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t})} + \frac{X_0}{Y_{X/S}} - \frac{X_m m_s}{\mu_m} \ln \frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} \quad (7)$$

式中, 当t=0时, S=S₀, 采用方程(7)拟合蛋白变化曲线。通过方程(6), 对实验数据进行拟合, 可得, S₀=23.0548, Y_{X/S}=2.2350×10⁷ cfu/h, m_s=0.0880 g/(g·h), 得到拟合曲线(图6), 将以上

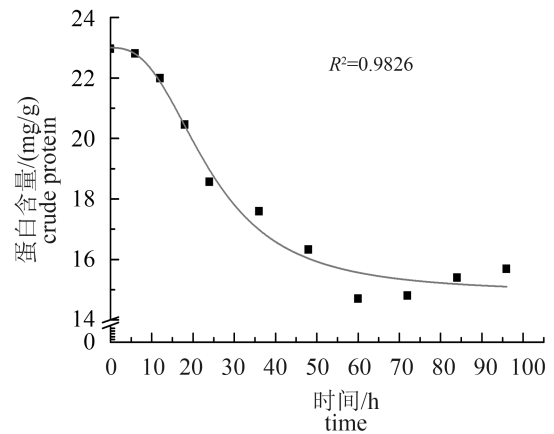


图6 蛋白消耗动力学拟合曲线

Fig. 6 Kinetic fitting curve of protein consumption

数据代入方程(7),可得最终拟合方程:

$$S = 23.0548 - \frac{1.30 \times 10^7 \times 3.57 \times 10^8 e^{0.2355t}}{2.235 \times 10^7 (3.57 \times 10^8 - 1.30 \times 10^7 + 1.30 \times 10^7 e^{0.2355t})} + \frac{1.30 \times 10^7}{2.235 \times 10^7} - \frac{3.57 \times 10^8 \times 0.088}{0.2355} \ln \frac{3.57 \times 10^8 - 1.30 \times 10^7 + 1.30 \times 10^7 e^{0.2355t}}{3.57 \times 10^8}$$

拟合方程的 $R^2=0.9826$,拟合度较好(图6)。

3 讨论

本研究以罗非鱼下脚料为主要基质接种纳豆芽孢杆菌进行固态发酵,针对发酵过程中菌体量、基质的温度、pH、水分含量、生物酶活性、蛋白含量及水解度和抗菌脂肽生成量等参数,通过数学拟合成功地建立了底物消耗、菌体生长、脂肽生成的动力学模型,阐明了各参数与脂肽生成和蛋白水解间的关系及其变化规律。本研究结果可为罗非鱼下脚料固态发酵生产脂肽和营养小肽发酵过程高效控制提供有效的支持。研究结果显示以罗非鱼下脚料为主要成分的基质是纳豆芽孢杆菌良好的固态发酵培养基。罗非鱼下脚料发酵后不仅可以使脂肽产量达到7.15 g/kg的相对高产,而且发酵基质中的蛋白酶活性最高可达30 304.56 U/g,是一般商业酶活性的60%左右,高于帅明等^[22]报道的纳豆芽孢杆菌固态发酵制备的蛋白酶活性(12 847 U/g)。可见发酵产生的酶可为后期的二步酶解提供充足的酶及酶活性,为营养小肽的生成提供充分条件。由此可见利用罗非鱼下脚料为基质接种纳豆芽孢杆菌生产含有抗菌脂肽和营养小肽的复合型活性肽制剂不仅可行,而且高效。

实验结果显示,抗菌脂肽的分泌属于生长偶联型,蛋白酶属于同步合成型,抗菌脂肽和蛋白酶的积累量同菌体量有直接的关系。因此,通过增加菌体量可以提高抗菌脂肽和营养小肽的产量。谭铭胜等^[23]以豆粕为主要基质接种芽孢杆菌发酵培养的最大菌体量可以达到 6.48×10^{10} cfu/g,徐速等^[24]以豆粕、秸秆、稻谷壳为原料添加无机盐等营养物活菌量可达 5.35×10^9 cfu/g,而本实验仅为 3.60×10^8 cfu/g。以罗非鱼下脚料为主要成分的发酵基质的理化特征和纳豆芽孢杆菌的原始生境相似,但营养成分存在一定的差异,正是

该差异限制了最大菌体量。因此,可以推测通过调整发酵基质营养成分和发酵条件仍可以使菌体生长量进一步提高,从而提升抗菌脂肽和生物酶的产量,是否可行仍有待于进一步验证。受菌体生长繁殖及基质中生理生化反应的影响,温度、pH、含水量3个参数有一定的变化,以上变化使得基质偏离了菌体的最佳生长条件。在张宁等^[13]的报道中以罗非鱼下脚料为发酵基质的产脂肽的最佳温度为28℃,最佳pH为7.5,最佳含水量为70%。因此,在发酵进入稳定期后适当降低发酵环境的温度和pH,以及调整水分含量等,使得相关参数保持在最佳条件,有利于提高抗菌脂肽和生物酶的产量。

动力学模型是研究发酵过程和指导发酵生产的有力工具,本研究建立的罗非鱼下脚料固态发酵过程中菌体生长、脂肽生成、底物消耗的动力学模型 R^2 均高于0.98,可以对发酵过程中菌体量、脂肽生成量、粗蛋白的消耗进行预测。由于脂肽生成和蛋白酶合成的最佳发酵条件不同,如何在发酵期间使二者同时达到相对最大产量有待进一步研究;有关利用发酵期间积累的蛋白酶二步酶解制备小肽时的温度、pH、料液比以及二步酶解时间等参数的确定和二步水解期间如何继续积累抗菌脂肽需要进一步研究。

4 结论

纳豆芽孢杆菌可以在以罗非鱼下脚料为主要成分的发酵基质上良好地生长,并分泌抗菌脂肽和蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等生物酶,脂肽的产量为7.3 g/kg,产量相对较高,蛋白酶活性为30 304.5 U/g,可以为后续二步酶解提供充足蛋白酶源。用Logistic模型对菌体生长和脂肽生成进行拟合,用物料衡算理论模型对蛋白质消耗进行拟合,拟合度分别为0.9914、0.9945、0.9826;建立的动力学模型拟合度好,可以用于描述发酵过程中菌体生长、脂肽生成和底物消耗的规律。此外,本实验阐明了发酵过程中胞外酶活性、pH、温度以及含水量的变化规律。这些参数的阐明为利用罗非鱼下脚料为主要基质发酵生产抗菌脂肽和营养小肽复合型活性肽代谢调控提供全面的理论依据。

参考文献:

- [1] 张红燕,袁永明,贺艳辉,等.中国罗非鱼生产与贸易

- 现状分析及建议[J]. 中国渔业经济, 2015, 33(3): 95-100.
- Zhang H Y, Yuan Y M, He Y H, *et al.* Analysis and suggestions on production and trade of tilapia in China[J]. Chinese Fisheries Economics, 2015, 33(3): 95-100(in Chinese).
- [2] 彭燕, 李瑞伟, 巩育军, 等. 罗非鱼加工下脚料的营养成分分析及评价[J]. 茂名学院学报, 2010, 20(6): 18-20.
- Peng Y, Li R W, Gong Y J, *et al.* Analysis and assessment of nutritive composition from tilapia processing waste[J]. Journal of Maoming University, 2010, 20(6): 18-20(in Chinese).
- [3] 夏虹. 低值水产品加工副产物高值化综合利用的研究进展[J]. 农业工程技术, 2016(32): 65-67.
- Xia H. Research progress of comprehensive utilization of low value aquatic products and processing by-products[J]. Agricultural Engineering Technology, 2016(32): 65-67(in Chinese).
- [4] Lin D J, Grossfield A. Thermodynamics of micelle formation and membrane fusion modulate antimicrobial lipopeptide activity[J]. Biophysical Journal, 2015, 109(4): 750-759.
- [5] Palmieri G, Balestrieri M, Proroga Y T R, *et al.* New antimicrobial peptides against foodborne pathogens: from *in silico* design to experimental evidence[J]. Food Chemistry, 2016, 211: 546-554.
- [6] 翟少伟, 史庆超, 王楠, 等. 饲料中添加抗菌脂肽对中华鳖稚鳖生长性能及肠道消化酶活性的影响[J]. 饲料工业, 2016, 37(2): 29-32.
- Zhai S W, Shi Q C, Wang N, *et al.* Effects of antimicrobial lipopeptides surfactin supplementation on growth performance and intestinal digestive enzyme activities of juvenile Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Feed Industry, 2016, 37(2): 29-32(in Chinese).
- [7] 苏恺, 王凯, 孙力军, 等. 抗菌肽对断奶仔猪生产性能和健康水平的影响[J]. 河南农业科学, 2013, 42(9): 112-115, 127.
- Su K, Wang K, Sun L J, *et al.* Effects of antimicrobial peptide on growth performance and health of weaning piglets[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(9): 112-115, 127(in Chinese).
- [8] 郭玉东, 张洋, 张均国. 小肽饲料营养价值及评价方法[J]. 饲料工业, 2007, 28(7): 13-16.
- Guo Y D, Zhang Y, Zhang J G. The evaluation method for nutrition of small peptide feed[J]. Feed Industry, 2007, 28(7): 13-16(in Chinese).
- [9] 马静. 微生物发酵豆粕产活性大豆肽饲料的研究进展[J]. 饲料工业, 2016, 37(8): 27-31.
- Ma J. The research progress of microorganism fermented soybean meal produce with active soybean peptide in feed[J]. Feed Industry, 2016, 37(8): 27-31(in Chinese).
- [10] 孙力军, 王雅玲, 刘唤明, 等. 抗菌豆豉发酵菌株的筛选及其脂肽组分鉴定和特性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7): 50-56.
- Sun L J, Wang Y L, Liu H M, *et al.* Identification of antimicrobial lipopeptides component produced by isolate from Douchi and its antimicrobial properties[J]. China Biotechnology, 2013, 33(7): 50-56(in Chinese).
- [11] 王东. 纳豆菌抗菌脂肽固态发酵工艺优化及其在对虾保鲜上的应用[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012: 29-34.
- Wang D. Optimization of cultivation processes for antimicrobial lipopeptide produced by *Bacillus natto* in solid-state fermentation and application in fresh-keeping of prawn[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012: 29-34 (in Chinese).
- [12] Xu D F, Wang Y L, Sun L J, *et al.* Inhibitory activity of a novel antibacterial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* against *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp[J]. Food Control, 2013, 30(1): 58-61.
- [13] 张宁, 孙力军, 王雅玲, 等. 纳豆芽孢杆菌NT-6固态发酵罗非鱼下脚料条件优化及产脂肽组分分析[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 144-150.
- Zhang N, Sun L J, Wang Y L, *et al.* Component analysis of antimicrobial lipopeptides from solid-state fermentation of tilapia processing byproducts with *Bacillus natto* NT-6 and optimization of fermentation conditions[J]. Food Science, 2016, 37(21): 144-150(in Chinese).
- [14] 董夏莲. 红曲色素对脂肪酶活力的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2012: 7-8.
- Dong X L. Effect of monascus pigment on lipase activity[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2012: 7-8 (in Chinese).
- [15] 冯旭明, 迟乃玉, 张庆芳. 低温淀粉酶菌株C2的分离鉴定及其产低温淀粉酶的酶学性质[J]. 微生物学通报, 2011, 38(12): 1762-1767.
- Feng X M, Chi N Y, Zhang Q F. Screening and

- identification of cold-active amylase strain C2 and its amylase characterization[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(12): 1762-1767(in Chinese).
- [16] SB/T 10317-1999蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- SB/T 10317-1999 Measurement of proteinase activity [S]. Beijing: Standards Press of China, 1999(in Chinese).
- [17] Deng Q, Wang W J, Sun L J, *et al.* A sensitive method for simultaneous quantitative determination of surfactin and iturin by LC-MS/MS[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(1): 179-191.
- [18] Wachenheim D E, Patterson J A, Ladisch M R. Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 86(2): 157-164.
- [19] Gaden Jr E L. Fermentation process kinetics[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1959, 1(4): 413-429.
- [20] Altok D, Tokatlı F, Harsa Ş. Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441)[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, 81(7): 1190-1197.
- [21] Luedeking R, Piret E L. A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 67(6): 636-644.
- [22] 帅明, 黄占旺, 牛丽亚. 纳豆芽孢杆菌产蛋白酶固态发酵条件研究[J]. *饲料工业*, 2008, 29(8): 18-20.
- Shuai M, Huang Z W, Niu L Y. Research on the solid fermentation conditions of *Bacillus natto* producing protease[J]. *Feed Industry*, 2008, 29(8): 18-20(in Chinese).
- [23] 谭铭胜, 厉大伟, 邓元元, 等. 纳豆芽孢杆菌固体发酵条件及其优化研究[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(35): 84-90.
- Tan M S, Li D W, Deng Y Y, *et al.* Studies on solid-fermentation condition of *Bacillus natto* and its optimization[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(35): 84-90(in Chinese).
- [24] 徐速, 孙立斌, 赵清霞, 等. 替代抗生素枯草芽孢杆菌菌剂固态发酵工艺优化[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(8): 132-139.
- Xu S, Sun L B, Zhao Q X, *et al.* Optimization of solid-state fermentation process on antibiotic alternative *Bacillus Subtilis* probiotics[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(8): 132-139(in Chinese).

Kinetics of lipopeptides production of tilapia processing byproduct fermentation by *Bacillus natto* NT-6 in solid state

FENG Tao¹, ZHANG Ning¹, SUN Lijun^{1*}, WANG Yaling^{1*}, HONG Pengzhi¹, LIAO Jianmeng²,
DENG Qi¹, YE Riyang¹, WU Jinhong³, CHEN Kangjian³

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety,
College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Zhanjiang Food and Drug Inspection Institute, Zhanjiang 524000, China;

3. Zhanjiang Hengxing Aquatic Science and Technology Co. Ltd., Zhanjiang 524000, China)

Abstract: A 60 h solid state fermentation experiment was conducted to investigate the production technology of tilapia sp. byproduct as an antimicrobial product and source of nutritious feed. Crushed tilapia sp. byproduct and water was put in a triangular flask and then inoculated with 5% *Bacillus Natto* NT-6 with fermentation temperature at 30 °C. Studies on changes in pH, temperature, ratio of water and enzymatic activity during the fermentation process was conducted. In addition to this, modelling of the antimicrobial concentration of the biomass and protein concentration was done. Analysis of the relationship between these parameters and lipopeptide yield was also made. The results showed that during fermentation the biomass increased for 48 h, then stabilized, the maximum growth rate was 0.2355×10^8 cfu/h. The production trend of lipopeptide is same as the biomass, the maximum yield was 7.3 g/kg and the maximum generation rate was 0.1112 g/h. The bacteria (*B. Natto* NT-6) secreted a high amount of enzymes, extraordinarily, the protease enzymatic activity was as highly as 30 304.56 U/g. During the process, the temperature, pH and water content of the substrate was fluctuating slightly. On the bases of Logistic and material balance equation, the model of bacteria growth kinetics, comprehensive product generation and substrate consumption were set up and the non-linear fitting was employed to model the kinetics of fermentation by the software Origin 8.5. At the time, the models and the experimental data were well fitted and the relative error non-significant. The model developed in this study could predict the concentration of surfactin in biomass, substrate consumption and also help to determine whether the fermentation process was normal or not. This would enable a sound scientific control of surfactin fermentation process in real-time. This is of great significance to antimicrobial lipopeptides at large-scale production and application.

Key words: tilapia byproduct; *Bacillus natto*; antimicrobial lipopeptides; kinetics

Corresponding author: SUN Lijun. E-mail: suncamt@126.com; WANG Yaling. E-mail: wangylchina@163.com

Funding projects: Guangdong Province Department of Science and Technology Public Welfare Project Research and Capacity Building Special Funds (2014B020204005, 2014B020205006); Guangdong Province Colleges and Universities Innovation Strong School Project Plan (GDOU2013050312, GDOU2013050205, GDOU 20014050203)