

细菌素发酵培养基的优化及动力学初步分析

李 孱^{1,2*} 白景华² 蔡昭铃¹ 欧阳藩¹

(中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080)

(湖北大学生命科学院 武汉 430062)

摘 要 用响应面方法对 *Lactococcus lactis* 生产细菌素乳链菌肽的培养基进行了优化。首先用部分重复因子实验对培养基组份蔗糖、大豆蛋白胨、酵母粉、 KH_2PO_4 、 NaCl 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对乳链菌肽的影响进行评价,并找出主要影响因子为大豆蛋白胨和磷酸二氢钾,前者为负影响,后者为正效应,其它组份对乳链菌肽产量的影响不显著。第二步用最陡爬坡路径逼近最大响应区域。最后用中心组合设计及响应面分析确定主要影响因子的最佳浓度。菌株在优化培养基中的乳链菌肽产量增加 1 倍为 2150 IU/mL。动力学分析表明,菌株生长与细菌素的产生为部分耦联型,进入对数中期菌体比生长速率和细菌素比产率在优化培养基中均大于优化前培养基。

关键词 乳链菌肽,响应面方法,动力学,优化

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0187-06

微生物的生长和代谢产物的积累受制于培养基的组份如碳源、氮源、生长因子、无机盐等多种因子的影响。在多因子起作用的生化过程中,如何快速地找出主要因子并进行优化并不是一件易事。多因子实验设计的常规方法是每次改变一个因子的方法,这种方法不仅要求的实验次数多,而且还可能导致不可靠的甚至是错误的结论,尤其是对具有交互作用的多因子实验^[1]。响应面方法(Response surface methodology, RSM)是统计技术的合称,它包括实验设计、建模、因子效应评估以及寻求因子最佳操作条件。随着计算方法的完善和微机应用的普及,近些年来响应面方法已成功地应用于生物技术的许多方面^[2,4],但用于优化细菌素发酵培养基方面尚没见报道。

目前用于培养细菌素产生菌的常用培养基有 CM 培养基^[5]、SM8 培养基^[6]、M17S 培养基^[7]等,这些培养基的共同特点是考虑菌体生长及中和代谢抑制物乳酸以促进菌体生长,没有考虑细菌素的积累及培养基中有机氮源含量过高会给细菌素的分离纯化带来困难。本研究以细菌素产量较高的 CM 培养基为基础,首次利用响应面方法对影响细菌素产量的培养基各组份进行评价并对主要影响因子进行优化得到较好的结果,同时对菌株在优化培养基中

的动力学进行了分析,为上罐发酵提供依据。

1 实验材料和方法

1.1 试剂

乳链菌肽, Sigma 公司; 酵母粉, Oxoid 公司。

1.2 菌株

实验所用菌株为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) ATCC 11454 和浅黄色微球菌(*Micrococcus flavus*) NCIB 8166, 均为中科院微生物所还连栋研究员惠赠。在实验中 ATCC 11454 和 NCIB 8166 分别用作乳链菌肽产生菌和乳链菌肽效价检测指示菌。

1.3 培养基及培养条件

菌株 *L. lactis* ATCC 11454 和 *M. flavus* NCIB 8166 分别用 CM 培养基^[5]和 SI 培养基^[8]培养。ATCC 11454 经活化后,以 1%(V/V)的接种量接入 100mL 带橡皮塞的血清瓶中,内装 50mL 无菌 CM 培养基,30℃,180r/min 下振荡培养。在培养的过程中用一次性注射器每小时取样测定乳链菌肽效价及菌体生长量。

1.4 乳链菌肽效价及生物量的测定

乳链菌肽的效价用琼脂扩散法^[8]测定。OD 值以新鲜未接种的培养基作对照,在 Beckman DU

7500 分光光度计上测定,波长为 600nm。

1.5 实验设计

1.5.1 部分因子实验设计(Fractional Factorial Design, FFD) 对于 CM 培养基的 6 个组份,每个组份设定为一个因子,若用全因子设计则为 6 因子 2 水平的 2^6 设计,需要 64 次实验,实现起来较困难。与全因子实验设计相比,部分重复因子设计在不丢掉主要信息的前提下,能大大减少实验次数,能估计因子的主效及部分交互作用。且根据实验数据拟合的一次多项式能有效地确定最陡爬坡方向,由此接近最大响应区域。在本研究的实验体系中,选择 2^{6-2} 部分重复因子设计。

1.5.2 中心组合设计(Central Composite Design, CCD):中心组合设计参考文献[3]进行。用标准多项式回归方法,对实验数据进行拟合,便得到一个二次多项式。该方程为描述响应变量(因变量)与自变量的经验模型。对于 2 因子系统,模型可表述为:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \quad (1)$$

上式中, Y 为预测响应值即细菌素浓度, b_0 为截距, b_1 、 b_2 为线性系数, b_{11} 、 b_{22} 为平方系数。对此方程所代表的面进行分析,可以推测出最适操作条件在实验所覆盖的区域,或是指明在什么方向再进行实验可得到更好的结果。

用国际上最常用的统计软件 SAS/Statistic Version 6.12 对实验数据进行回归分析。用学生 t 检验测试回归系数的显著性。显著性的水平作如下标记:*** 代表 $p < 0.01$, ** 代表 $p < 0.05$, * 代表 $p < 0.10$ 。多项式模型方程拟合的性质由确定系数 $R^2 (= SS_R / S_{YY})$ 表达,其统计学上的显著性由 F 检验确定。用微分计算预测最佳点。

2 结果与讨论

2.1 CM 培养基氮源的改变对菌体生长和细菌素产量的影响

CM 培养基共有 6 种组份,分别为(g/L):蔗糖 10,蛋白胨 10,酵母粉 10, KH_2PO_4 10, NaCl 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 配方中有机氮含量较高,对产物乳链菌肽的分离十分不利。在不影响产物产量的前提下只用一种有机氮源,或减少有机氮源的用量,这样既有利于产物分离又有利于降低生产成本,为此,进行了如下设计(1)全 CM 培养基(2)CM 培养基去掉酵母粉(3)CM 培养基去掉蛋白胨(4)CM 培养基去掉蛋白胨和酵母粉,补充玉米浆 20 g/L 和 NH_4NO_3 2g/L。上述不同处理培养基的起始 pH 均

为 6.8, 121°C 灭菌 15min 后,接种菌株 11454,经 180r/min 30°C 下振荡培养,于 6h 和 8h 取样测定乳链菌肽浓度和 OD 值,其结果见图 1。

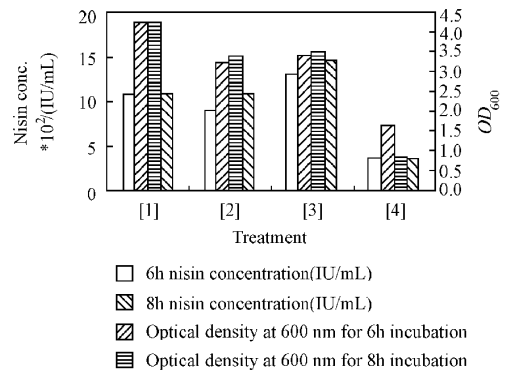


图 1 氮源对菌体生长和乳链菌肽效价的影响

Fig. 1 Influence of nitrogen sources on cell growth and nisin concentration

结果表明,CM 培养基对菌体生长有利,但对于乳链菌肽的积累并不是最佳的培养基配方。此结果与 Kim 等(1997)^[9]得出的最大细菌素水平并不直接对应于最大细胞生物量是一致的。因此,以乳链菌肽浓度为响应变量,可优化出更合理的培养基配方。

2.2 CM 培养基不同组份对乳链菌肽积累的影响

寻求最适操作条件的第一步是识别对响应变量有最大影响的输入变量及其变化幅度。本实验以 CM 培养基配方为基础,将配方中各组份的含量值定为中心点值,并进行适当的扩充而成为自变量的取值范围。

2^{6-2} 部分重复设计需要 16 次实验,为了进行方差分析,在因子中心点处增加 4 次重复,共需要 20 次实验,其设计及结果见表 1。各处理的接种量为 1%, 180r/min 30°C 下振荡培养 8h 取样测定 OD_{600} 和乳链菌肽浓度。乳链菌肽的浓度随实验条件的改变差异很大,从 692 至 1875 IU/mL。磷酸二氢钾的浓度对乳链菌肽的效价有着显著的影响。当用 15g/L 高浓度磷酸二氢钾时,乳链菌肽的浓度普遍比用 5g/L 低浓度磷酸二氢钾时高,前者乳链菌肽的浓度在 1200 IU/mL 以上,后者均低于 922 IU/mL,此结果表明磷酸二氢钾对乳链菌肽合成具有促进作用。其次是大豆蛋白胨含量对乳链菌肽的产量有明显的影 响。当大豆蛋白胨用高浓度时,乳链菌肽的效价低,而用低浓度时乳链菌肽的浓度反而增加。其它因素对乳链菌肽的效价影响不明显。这些结果与这部分因子实验的回归分析是一致的(表 2)。

表 1 部分重复因子设计及其实验结果

Table 1 Experimental design and results of the FFD

Run	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	OD_{600}		Nisin/(IU/mL)	
							Observed	Predicted	Observed	Predicted
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.192	2.16	811	831
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	2.344	2.54	922	895
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	2.688	2.52	692	650
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1	2.632	2.82	692	699
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	2.952	2.76	909	867
6	+1	-1	+1	-1	-1	-1	2.704	2.94	896	993
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	3.16	3.08	922	671
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	3.04	3.30	871	858
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	3.296	3.50	1337	1254
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	3.72	3.76	1875	1621
11	-1	+1	-1	+1	+1	+1	3.56	3.86	1253	1299
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	4.392	4.04	1464	1425
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	3.936	3.98	1583	1593
14	+1	-1	+1	+1	-1	+1	4.44	4.28	1583	1566
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	3.912	4.26	1427	1397
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	4.736	4.64	1390	1461
17	0	0	0	0	0	0	3.536	3.40	1120	1146
18	0	0	0	0	0	0	3.6	3.40	1154	1146
19	0	0	0	0	0	0	3.48	3.40	982	1146
20	0	0	0	0	0	0	3.64	3.40	1040	1146

$x_i = (X_i - 10) / 5$ ($i = 1, 2, 3, 4$); $x_5 = X_5 - 2$; $x_6 = (X_6 - 0.2) / 0.1$. X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 and X_6 stand for natural variables of sucrose, soybean peptone, yeast extract, KH_2PO_4 , NaCl and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L) respectively.

表 2 部分重复因子设计对乳链菌肽和菌体生长回归分析的结果

Table 2 Results of the FFD regression analysis for nisin and OD_{600}

Term	Regression analysis for nisin			Regression analysis for OD_{600}		
	Coefficient	t -value	Significant level	Coefficient	t -value	Significant level
Intercept	1146.15	41.89	0.0001***	3.40	60.74	0.0001***
x_1	47.44	1.55	0.1450	0.14	2.31	0.0379**
x_2	-75.31	-2.46	0.0286**	0.16	2.53	0.0249**
x_3	33.44	1.09	0.2942	0.25	4.05	0.0014***
x_4	324.81	10.62	0.0001***	0.64	10.27	0.0001***
x_5	22.69	0.74	0.4715	0.02	0.25	0.8082
x_6	-38.19	-1.25	0.2339	0.03	0.54	0.6013
	$R^2 = 0.9055, F = 20.752 > F_{6,13,0.01} = 4.62$			$R^2 = 0.9116, F = 22.341 > F_{6,13,0.01} = 4.62$		

由部分重复因子实验的回归结果可知,对于乳链菌肽的生产,磷酸二氢钾和 大豆蛋白胨是主要的影响因素,分别在 99% 和 95% 的概率水平上差异显著。蔗糖、酵母粉、氯化钠和硫酸镁对乳链菌肽的积累在 90% 的概率水平上差异均不显著。

由对乳链菌肽进行回归的回归系数可得一次拟合回归方程为:

$$Y_{\text{nisin}} = 1146.15 + 47.44x_1 - 75.31x_2 + 33.44x_3 + 324.81x_4 + 22.69x_5 - 38.19x_6 \quad (2)$$

该方程的方差分析(ANOVA)表明, $F = 20.752$

$> F_{6,13,0.01} = 4.62$,证明该模型在概率 $\alpha = 0.01$ 水平上足够地拟合了实验数据。该模型的确定系数为 0.9055,这表明 91% 的实验数据的可变性可用此模型解释。

2.3 CM 培养基不同组份对菌体生长的影响

由部分重复因子实验对菌株 11454 生长(OD_{600})进行回归(表 2)可知,磷酸二氢钾和酵母粉对菌体影响最大,在大于 99% 的概率水平上差异显著,其次是蔗糖和 大豆蛋白胨,在大于 95% 的概率水平上差异显著。且这 4 种组份对菌体生长均是正

影响。而氯化钠和硫酸镁对菌体生长的影响不明显,二者在 90% 的概率水平上均差异不显著。由此可以看出,CM 培养基的不同组份对菌体生长和乳链菌肽积累的影响是不一样的。De Vuyst 和 Vandamme 于 1992^[5] 年也发现高浓度蔗糖产生高浓度的生物量,但并不伴随细菌素产量的提高。

2.4 最陡爬坡路径

由方程(2)及回归分析可以确定下一步实验的最陡爬坡路径。对于乳链菌肽的产生,蔗糖(x_1)、酵母粉(x_3)、氯化钠(x_5)和硫酸镁(x_6)在 90% 的概率水平上,差异不显著,均固定在中心点的水平上。磷酸二氢钾(x_4)和大豆蛋白胨(x_2)分别在 99% 和 95% 的概率水平上差异显著,且 x_2 的系数为负, x_4 的为正,减少大豆蛋白胨的用量,增加磷酸二氢钾的浓度对乳链菌肽的积累有积极的影响。

表 3 列出了磷酸二氢钾和大豆蛋白胨改变的方向,即磷酸二氢钾每次增加 0.5%,大豆蛋白胨每次减少 0.116%。从表中可以清楚地看出,处理 4 对应的乳链菌肽浓度(Y 值)达到最大为 1972 IU/mL,随后乳链菌肽的产量开始下降,处理 4 的磷酸二氢钾及大豆蛋白胨浓度可用作下面的优化实验。

表 3 最陡爬坡实验设计及其实验结果

Table 3 Experimental design of steepest ascent and corresponding response

Run	X_2	X_4	OD_{600}	Nisin concentration/(IU/mL)
1	8.84	15	4.250	1285
2	7.68	20	4.976	1647
3	6.52	25	4.944	1847
4	5.36	30	4.624	1972
5	4.20	35	4.496	1758
6	3.04	40	3.968	1701
7	1.88	45	3.752	1673
8	0.72	50	3.560	1566

2.5 培养基的优化

从上述最陡爬坡实验可以看出,响应变量 Y 值接近最大响应值区域。乳链菌肽产量的优化可以用中心组合设计对两个独立的过程变量,即起始磷酸二氢钾(x_4)和大豆蛋白胨(x_2)的浓度进行优化,实验设计及实验结果列于表 4。

用多项式回归技术对此实验数据拟合所得二次多项式方程为:

$$Y = 1993.39 + 144.25x_2 - 76.74x_4 - 82.75x_2x_4 - 113.57x_2^2 - 219.86x_4^2 \quad (3)$$

此方程 b_{11} 、 b_{22} 均为负值,抛物线的开口向下,因而有极大值点。

表 4 中心组合设计及其实验结果

Table 4 Experimental design and results of the 2² full factorial central composite design

Run	Factor		Y value [Nisin concentration/(IU/mL)]	
	x_2	x_4	Observed	Predicted
1	-1	-1	1527	1510
2	1	-1	2058	1964
3	-1	1	1527	1522
4	1	1	1727	1645
5	-1.414	0	1567	1562
6	1.414	0	1866	1970
7	0	-1.414	1604	1662
8	0	1.414	1404	1445
9	0	0	1866	1993
10	0	0	1972	1993
11	0	0	2103	1993
12	0	0	1998	1993
13	0	0	2028	1993

$$x_2 = (X_2 - 5.36) / (-1.16), x_4 = (X_4 - 30) / 5$$

模型的完备性可由方差分析及确定系数两方面考察。方差分析表明:

$$F_{\text{回归}} = MS_R / MS_e = 14.202 > F_{5,7,0.01} = 7.46$$

$$F_{\text{欠失}} = MS_{LF} / MS_{pe} = 10664.33 / 7479.75 = 1.426 < F_{3,4,0.1} = 4.19$$

所以,模型在 $\alpha = 0.01$ 水平上回归显著,在 $\alpha = 0.1$ 水平上欠失不显著,因而模型是充分的。经计算该模型的确定系数 $R^2 = 0.9103$,表明模型能解释 91% 乳链菌肽浓度的变化。因此,方程(3)给乳链菌肽发酵提供了一个合适的模型。图 2 绘出了计算的三维响应面,证实了拟合面有真实的最大值。

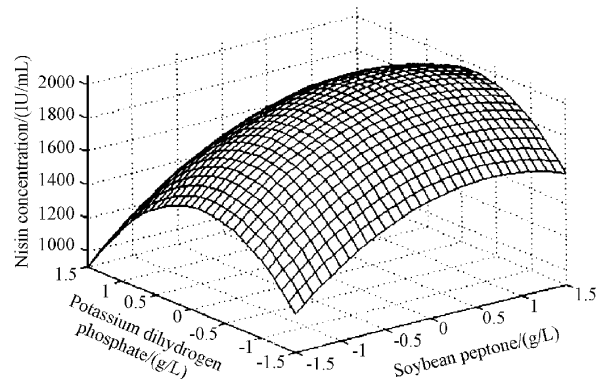


图 2 中心组合实验响应面

Fig. 2 Surface response plot of the central composite design experiment

对方程(3)进行求导,可以得到模型的极值点,大豆蛋白胨为 4.49g/L,磷酸二氢钾为 28.42g/L,此时模型预测的最大响应为 2060IU/mL。为了证

实预测结果,在上述两因子的点处进行重复摇瓶实验,得出响应量为 2150 ± 121 ($N=3$),预测值与实验值之间的良好拟合性证实了模型的有效性及存在着极大值点。菌株 ATCC 11454 在优化培养基中的乳链菌肽浓度比在 CM 培养基中的浓度提高 1 倍。

2.6 菌株 11454 在优化前后培养基中的发酵动力学分析

经上述 RSM 优化后,得到一新的培养基配方(定义为 CM'培养基),其组成如下(g/L):蔗糖 10,大豆蛋白胨 4.49,酵母粉 10, KH_2PO_4 28.42, $NaCl$ 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2。菌株 11454 在 CM 和 CM'培养基中培养测出乳链菌肽浓度和 OD_{600} 值,并以此计算出乳链菌肽生产和菌体生长的比速率,其结果见图 3。

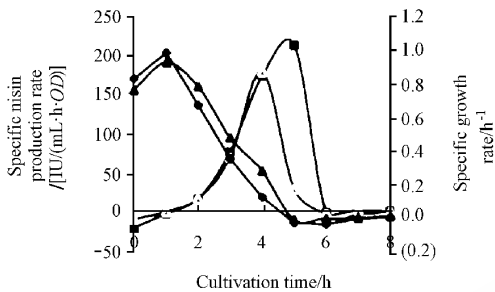


图3 菌株 ATCC11454 在 CM 和 CM'培养基中比生长速率和比产物生成速率的比较

Fig.3 Comparison of specific rates for growth and nisin production versus cultivation at CM and CM' media

◆▲. Specific growth rates at CM and CM' media respectively;
▲△. Specific nisin production rates at CM and CM' media respectively

由图 3 可以看出,菌株 ATCC 11454 在优化前后培养基中的生长动力学基本没有改变。乳链菌肽的积累均部分地与菌体生长相耦联。培养初期菌株在优化前培养基(CM)中的比生长速率稍大于菌株在 CM'培养基中的比生长速率,但在优化培养基中的比生长速率很快就明显超过在 CM 培养基中的比生长速率。这是由于优化前培养基的缓冲能力小,随着乳酸的积累菌体的比生长速率迅速减小。在培养过程的大部分时间内,比生长速率在 CM'培养基中大于优化前 CM 培养基的,从而导致在优化培养基中菌体的生物量大于优化前培养基的。乳链菌肽比生成速率在培养初期小于零,这是由于培养前期菌体不产生乳链菌肽以及接种时带入少量乳链菌肽的降解而造成的。2~4h 之间菌株在优化前后的乳链菌肽的形成速率比较接近,但第 5 小时菌株的比乳链菌肽形成速率在优化培养基中达到最大,而在

优化前培养基中则在第 4 小时就达到最大,在数量上前者远大于后者,分别为 212 和 $171 IU/(mL \cdot h \cdot OD)$,从而造成乳链菌肽的积累在优化培养基中远大于优化前培养基中的。这可能是磷酸盐对乳酸的缓冲作用以及对乳链菌肽合成的促进作用^[10]。

3 结 论

实验证明响应面方法对培养基优化是非常有效的工具。部分重复因子实验能对各因子的效应进行评价并能有效地找出主效,分别是磷酸二氢钾和大豆蛋白胨,最陡爬坡法能充分接近最大响应面区域,中心组合实验能快速地对主要影响因素进行优化,找出最佳值。

经响应面方法优化的最佳培养基配方组成为($g \cdot L^{-1}$):蔗糖 10;大豆蛋白胨 4.49;酵母粉 10; KH_2PO_4 28.42; $NaCl$ 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2。在此优化的培养基中,菌株 ATCC 11454 的乳链菌肽浓度由 $1074 IU/mL$ 提高到 $2150 IU/mL$ 。

菌株在优化前后培养基中的发酵动力学性质相近,均为部分耦联型。进入对数生长中期,无论菌体的比生长速率还是乳链菌肽的比生成速率在优化培养基中均大于优化前培养基的。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Box G E P, Hunter W G, Hunter J S. Statistics for experimenters: an introduction to design, data, analysis, and model building. New York, Wiley, 1978
- [2] Ooiikaas L P, Wilkinson E C, Tramper J *et al.* Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs, *Biotechnol Bioeng*, 1999, **64**: 92~100
- [3] de O Souza M C, Roberto I C, Milagres A M F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 768~772
- [4] Ismail A, Sultani S, Ghoul M. Optimizatin of the enzymatic synthesis of butyl glucoside using response surface methodology, *Biotechnol Prog*, 1998, **14**: 874~878
- [5] De Vuyst L, Vandamme E J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 571~578
- [6] De Vuyst L. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium *J Appl Bacteriol*, 1995, **78**: 28~33
- [7] Li C, Ouyang F, Bai J. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using α -D-glucopyranoside, glycerol, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ aqueous two-phase

system to produce nisin ,*Biotechnol Lett* ,2000 ,**22** :843~847

[8] Tramer J ,Fowler G G. Estimation of nisin in foods ,*J Sci Food Agric* ,1964 ,**15** :522~528

[9] Kim W S ,Hall R J ,Dunn N W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis* ,

Appl Microbiol Biotechnol ,1997 ,**48** :449~453

[10] De Vuyst L ,Vandamme E. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentation using a complex medium *J Appl Microbiol Biotechnol* ,1993 ,**40** :17~22

Culture Medium Optimization and Primary Kinetics Analysis for Nisin Production

LI Chan^{1,2*} BAI Jing-Hua² CAI Zhao-Ling¹ OUYANG Fan¹

¹(State Key Laboratory of Biochemical Engineering ,Institute of Chemical Metallurgy ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China)

²(College of Life Science ,Hubei University ,Wuhan 430062 ,China)

Abstract Response surface methodology was used to optimize a medium for nisin production of *Lactococcus lactis*. In the first optimization step the influence of sucrose ,soybean peptone ,yeast extract ,potassium dihydrogen phosphate ,sodium chloride and magnesium sulfur on nisin production was evaluated using a fractional factorial design. Potassium dihydrogen phosphate influenced nisin production positively while soybean peptone affected nisin production negatively. The other components had no significant effect on nisin production. The path of steepest ascent was used to approach the optimal region of the medium composition. In the third step the optimal concentrations of KH_2PO_4 and soybean peptone were determined by a central composite design and response surface analysis. The optimized medium allowed nisin production to be increased from 1074 IU/mL to 2150 IU/mL. The kinetic analysis showed that nisin production fasion at optimized and non-optimized media was not changed and maintained partially growth-associated. But the specific growth rates and the specific nisin production rates for the strain at the optimized medium were bigger than the ones at the non-optimized medium after the cells entered the middle of exponential phase.

Key words nisin , response surface methodology , kinetics , optimization

Received September 15 2000

* Corresponding author. Tel 86-10-62574372 ; Fax 86-10-62561822 ; E-mail: chanlixyl@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>