

# 己酸菌和产酯酵母共固定产己酸乙酯的研究

吴根福 陈佩华

(杭州大学生命科学学院 杭州 310012)

**摘 要** 用吸附-包埋法将己酸菌和产酯酵母共固定在海藻酸钙-棉纤维上,在帘式生物反应器中进行分批式发酵。最适 pH 为 6.5,温度 30~35℃。经过共固定 10 批发酵,历时 100d,凝胶的稳定性良好,己酸乙酯产量也稳定在 1.9~2.3mg/ml 之间,经对比试验证明,用共固定法合成己酸乙酯比游离细胞混菌发酵法产量提高约 22%。

**关键词** 共固定,帘式生物反应器,己酸乙酯。

己酸乙酯是一种具有浓郁菠萝香味的物质,广泛存在于水果中,还是浓香型大曲酒的主体香成分<sup>[1]</sup>,已经证明己酸乙酯可由己酸菌产生的己酸和酵母菌产生的乙醇经酯化作用生成<sup>[2]</sup>。己酸菌是一种不严格的厌氧菌<sup>[3]</sup>,而酵母菌是一种兼性厌氧微生物。如果利用共固定技术把两者培养在一起,酵母菌生长消耗氧气,给己酸菌创造一个相对厌氧的环境,并有利于发酵和酯化的进行;而酯化酶的作用还可部分解除各自终产物的反馈抑制,这样就造成了一个互利的环境,为己酸乙酯的合成创造了有利的条件。本文报道用共固定化技术对己酸乙酯的合成作初步研究的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

1.1.1 己酸菌(*Clostridium* sp.):分离自杭州酒厂窖池中<sup>[4]</sup>。

1.1.2 产酯酵母:汉逊酵母(*Hansenula* sp.)和球拟酵母(*Torulopsis* sp.),购自黑龙江食品发酵研究所。

### 1.2 培养基

1.2.1 YEPD 培养基:按文献<sup>[5]</sup>配制。

1.2.2 醋酸钠培养基:按文献<sup>[6]</sup>配制。

1.2.3 发酵培养基(%):参照文献<sup>[1]</sup>略加改进。醋酸钠 1.0,硫酸铵 0.05,硫酸镁 0.02,磷酸氢二钾 0.04,酵母提取物 0.2,葡萄糖 6.0,乙醇 1.0(接种前加入),碳酸钙 1.0(单独灭菌),pH 6.5。以上培养基在 0.05 MPa 灭菌 30min。

### 1.3 细胞的培养

1.3.1 己酸菌的培养:经活化后的己酸菌接种在醋酸钠培养基中,34℃ 深层静置培养 8d。

1.3.2 产酯酵母的培养:将汉逊酵母和球拟酵母分别培养在 YEPD 培养基中,30℃ 培养 2d,

浙江省自然科学基金资助课题。

本文于 1995 年 9 月 19 日收到。

中间摇动数次。

#### 1.4 共固定细胞的制备

将培养好的己酸菌和产酯酵母离心,收集菌体,显微镜下计数,以 15:1 的比例混合(其中汉逊酵母:球拟酵母 = 1:1),再与海藻酸钠溶液充分混匀,使混合物中海藻酸钠浓度为 3%,己酸菌的细胞数为  $0.9 \times 10^8$  个/ml,酵母细胞浓度为  $6 \times 10^6$  个/ml。将  $20\text{cm} \times 5\text{cm}$  不锈钢丝框架固定的毛巾织物条对折后浸在混合物中,让其吸涨 1h,然后浸入 2%  $\text{CaCl}_2$  溶液中固定 2h,即成共固定细胞。

#### 1.5 共固定细胞的分批式发酵

发酵容器采用 500ml 标本缸(直径 6cm,高 20cm),发酵培养基装量为容器的 90%,载有共固定细胞的毛巾织物悬垂于容器中,构成一“帘式”生物反应器(如图 1)。 $32^\circ\text{C}$  静置发酵 10d 为一个发酵周期。

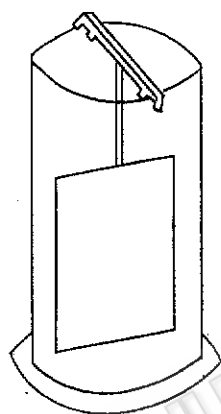


图 1 帘式生物反应器示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the curtain-type bioreactor

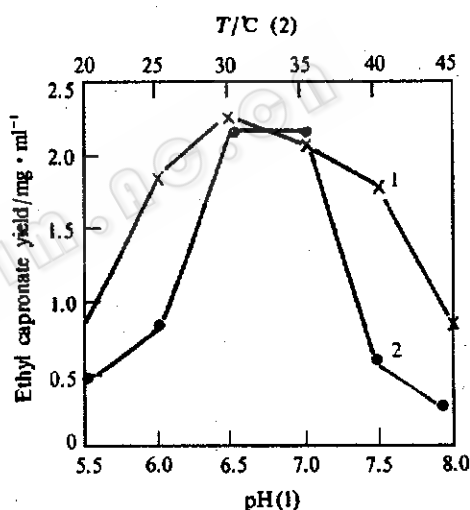


图 2 pH 和温度对己酸乙酯合成的影响

Fig. 2 Effects of pH and temperature on the synthesis of ethyl capronate  
1. pH, 2. Temperature

#### 1.6 分析方法

1.6.1 己酸、己酸乙酯、丁酸、丁酸乙酯用气相色谱法测定;见文献[7]。

1.6.2 己酸菌、酵母菌细胞数的测定:固定化凝胶经 0.2mol/L 柠檬酸三钠溶解后用血球计数板计数,用美兰染色法测定酵母活细胞数,计算细胞死亡率与存活率(%)。

## 2 结果与讨论

#### 2.1 温度和 pH 对己酸乙酯合成的影响

将发酵培养基的起始 pH 调至 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0,  $32^\circ\text{C}$  发酵 10d 后测己酸乙酯的含量,发现以起始 pH6.5 较为合适;将培养在发酵培养基中的共固定细胞置于不同温度下

进行发酵, 10d 后测定己酸乙酯量, 发现 30~35℃ 是己酸乙酯合成的适宜温度(见图 2)。

## 2.2 两种固定化方法与反应器的比较

海藻酸钙是固定化细胞首选的优良载体, 大多数研究者采用包埋式凝胶珠的固定化方法, 用填充式反应器进行发酵<sup>[8]</sup>。但这种方法机械强度较低, 凝胶珠易破裂, 从而影响固定化细胞的使用寿命。我们使用了吸附-包埋的固定化方法, 将两菌共固定在毛巾织物条上, 再悬挂于发酵培养基中构成一帘式反应器来进行发酵。由于细胞包埋在海藻酸钙凝胶中, 凝胶牢固地吸附在纵横交叉的棉纤维上, 因此机械强度大大超过凝胶珠, 经 10 批发酵, 历时 100d, 未见凝胶破裂、胶落。此外, 在帘式反应器中, 固定化细胞与发酵培养基的接触比较均匀, 质障碍较小, 这样就有利 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> 的排出。我们将两种固定化方法与反应器用于发酵中, 对第九批发酵的结果进行比较, 见表 1。由表可见, 用吸附-包埋的固定化方法和“帘式”反应器有利于细胞的生长和代谢产物的合成。

表 1 两种固定化方法的比较

Table 1 Comparison of immobilized methods

| Immobilized method   | Adsorption - entrapped | Entrapped   |
|--|------------------------|-------------|
| Bioreactor type  | Curtain                | Packed bead |
| Numbers of caproic acid bacteria in gel/<br>$\times 10 \cdot g^{-1}$ | 22.2                   | 20.8        |
| Numbers of yeast in gel<br>$/ \times 10 \cdot g^{-1}$                | 4.5                    | 4.8         |
| Dead yeast cells percentage<br>in gel/ %                             | 3.2                    | 5.4         |
| Ethyl capronate yield<br>$/mg \cdot ml^{-1}$                         | 1.9                    | 1.4         |

## 2.3 共固定体系中细胞的增殖

己酸菌适宜在低氧化还原电位的环境中生长, 而酵母菌在有氧时进行生长繁殖, 无氧时进行发酵, 因此, 当两者共固定后, 由于酵母菌的生长耗掉了培养基中的溶氧, 使酵母菌在厌氧的环境中进行发酵, 不断将葡萄糖转化为乙醇, 这些为己酸菌的生长和己酸乙酯的合成创造了良好的条件。图 3 显示了共固定凝胶中两菌的增殖情况。己酸菌与酵母菌在第 1~2 批发酵时增殖较多, 第三批后基本保持恒定。但这并不意味着凝胶中的己酸菌和酵母菌不再分裂, 由于己酸菌具有鞭毛, 能从较大的凝胶间隙中游到发酵液中, 表面分裂的酵母菌也会由于振动作用(如发酵产生的气体等)而游离到发酵液中, 图 4 显示了每批结束时发酵液中两菌的变化情况, 游离细胞的高峰出现在第 4 批以后, 由于这些游离细胞在己酸乙酯的合成过程中也起着重要的作用, 因此己酸乙酯的合成也在第 4 批时最高。

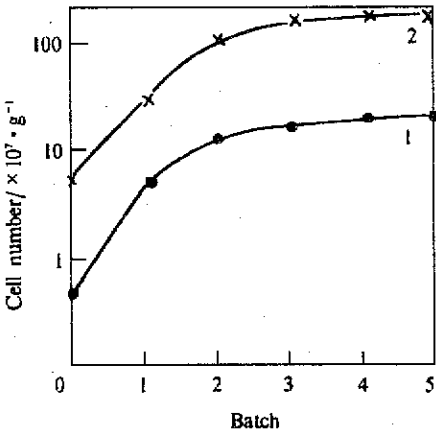


图 3 共固定化凝胶中两菌的增殖

Fig.3 Growth of two kinds of cells in co-immobilized gel

1. Yeast cells. 2. Caproic acid bacteria cells

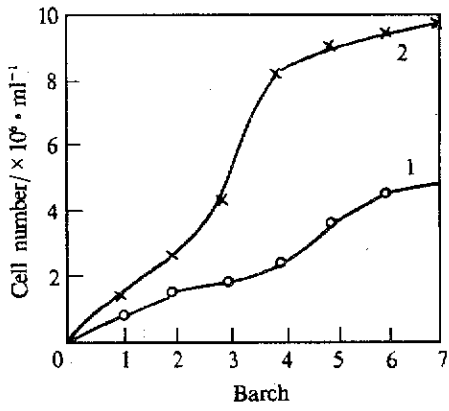


图 4 发酵液中两种游离细胞的变化

Fig.4 Two kinds of free cells in fermentation liquid

1. Yeast cells. 2. Caproic acid bacteria cells

2.4 共固定发酵与游离细胞混菌发酵产己酸乙酯的比较

由表 2 可以看出,共固定细胞发酵时己酸乙酯的产量要比游离细胞混菌发酵时高出约 22%,虽然起始细浓度都一样,但是由于己酸菌具有吸附性,常吸附在固体颗粒上,酵母菌具有一定的凝集性,所以混菌发酵时有相当一部分己酸菌和酵母菌沉在发酵容器的底部;而在“帘式”反应器中,固定化细胞包埋在凝胶中,与发酵液的接触比较均匀,对营养物的吸收和产物的排出有利,因此在一个发酵周期内(10d),产物量也就相对较多。

表 2 共固定化发酵与游离细胞混菌发酵产己酸乙酯的比较

Table 2 Ethyl capronate yields in the co-immobilized fermentation and mixed free cells fermentation

| Fermentation type                         | Co-immobilized | Mixed free cells |
|---|----------------|------------------|
| Ethyl capronate yield/mg·ml <sup>-1</sup> | 2.2            | 1.8              |

After 10 days

2.5 共固定细胞发酵时己酸乙酯的合成进程

每隔一天取发酵液测丁酸、丁酸乙酯、己酸、己酸乙酯的含量,结果见图 5。可见,前期以合成丁酸、丁酸乙酯为主、后期己酸,己酸乙酯量逐渐增多。所以丁酸很可能是己酸合成过程中的前体物质,至于丁酸乙酯究竟是己酸乙酯合成过程中的前体物质,还是一种副产物,尚有待进一步研究。

2.6 共固定细胞合成己酸乙酯的稳定性

批次发酵结果见图 6,从进行的 10 批发酵来看,己酸乙酯的合成相当稳定,说明用共固定法来生产己酸乙酯是可行的。但有关己酸乙酯的合成机理及共固定细胞的生理生化特性尚需进一步深入研究,己酸乙酯的提取等工作有待进一步开展。

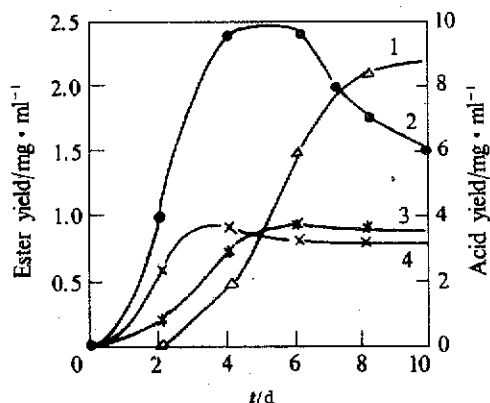


图5 共固定化体系中己酸乙酯的合成

Fig.5 Synthesis of ethyl capronate in co-immobilized system

1. Ethyl capronate, 2. Caproic acid,  
3. Ethyl butyrate, 4. Butanoic acid

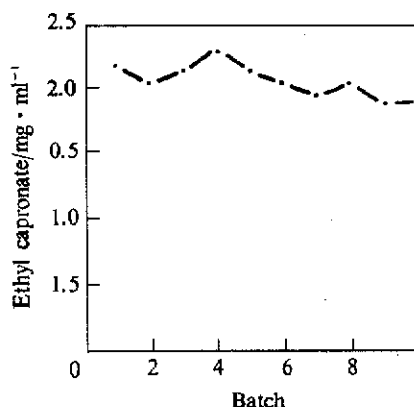


图6 共固定化体系中己酸乙酯合成的稳定性

Fig.6 Stability of ethyl capronate synthesis

## 参 考 文 献

- [1]袁 军,陈家任,薛堂荣等.生物工程学报,1993,9(2):142~146.  
[2]卢世珩,刘光桦,江跃林等.微生物学通报,1994,21(1):23~25.  
[3]薛堂荣,陈昭蓉,卢世珩等.食品与发酵工业,1988,82(4):1~6.  
[4]吴根福,陈佩华.杭州大学学报,1996,23(2):269~274.  
[5]陈士怡,徐洪基.酵母遗传学.北京:科学出版社,1989.  
[6]吴衍庸,刘义鹏,徐成基等.微生物学通报,1980,7(3):108~112.  
[7]陈周平,邹飞玲,黄祥瑛等.酿酒,1991,(1):28~31.  
[8]Scott C D. Enzyme Microb Technol, 1987, 9(2):66~73.

## Studies on Ethyl Capronate Fermentation by Co-immobilized Cells from Caproic Acid Bacteria and Esterifying Yeasts

Wu Genfu Chen Peihua

(College of Life Science, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

**Abstract** Caproic acid bacteria and esterifying yeasts were co-immobilized in calcium alginate-cotton fiber with the adsorption-entrapped method, and batch fermentations were made in the curtain-type bioreactor to produce ethyl capronate. The optimum pH for ethyl capronate synthesis was 6.5, and the optimum temperature was 30~35°C. In each of the 10 batch of successive co-immobilized fermentations (100 days in total), the gel had good stability and ethyl capronate yield reached 1.9~2.3mg/ml. Comparison showed that the ethyl capronate yield was 22% higher in co-immobilized fermentation than that in mixed free cells fermentation when cultivated at optimum condition.

**Key words** Co-immobilized, curtain-type bioreactor, ethly capronate