

用固定化细胞发酵生产己酸的研究

袁 军* 陈家任 薛堂荣 吴衍庸

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

固定于海藻酸钙、琼脂、卡拉胶、聚丙烯酰胺凝胶、魔芋葡甘露聚糖等几种载体上的己酸菌株(*Doseridium* sp. W1)批次发酵表明, 海藻酸钙包埋己酸菌活性最高。在最适条件下, 己酸产量最高可达15mg/ml, 经18批次(200余天)的批次发酵, 固定化己酸菌产己酸活性稳定性较好, 4℃储存二月后的固定化细胞, 其发酵产己酸活性与储前基本相同。短暂的与空气接触对固定化己酸菌的活性几乎没受影响。与游离己酸菌比较, 固定化细胞的己酸生成速度加快, 己酸产量明显提高, 单位体积内的细胞数目可高出游离培养的近10倍。

关键词 己酸菌; 固定化增殖细胞; 海藻酸钙凝胶

己酸乙酯是浓香型曲酒中主体香成份, 通过己酸与乙醇的酯化反应合成, 己酸发酵曾用于浓香型曲酒的生产。本研究采用不同载体材料进行己酸菌固定化的研究, 试图用固定化增殖细胞代替游离细胞进行己酸发酵, 结合浓香型曲酒微生物技术的应用推广, 使己酸菌在实际生产中得到更好的应用。现将实验结果作一报道。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

从四川宜宾五粮液酒厂老窖泥中分离得到的高产己酸菌 *Doseridium* sp. w1, 由本实验室提供。

(二) 培养方法

该菌可用简单的液体合成培养基作深层培养, 其培养基成份如下: 己酸钠10g, 硫酸铵 0.5g、硫酸镁 0.2g、磷酸氢二钾 0.4g、酵母膏 1g, 乙醇 20ml (接种时加入)、碳酸钙 100g (单独灭菌加入), 蒸馏水 1000ml, pH 7.0, 121℃灭菌 20min。

(三) 固定化材料和方法

1. 固定化材料: 海藻酸钠、氯化钙, 卡拉胶、琼脂, 丙烯酰胺, N,N'-甲叉双丙烯酰胺, 二甲氨基丙腈, 过硫酸铵 (以上均为分析纯试剂), 魔芋葡甘露聚糖。

2. 固定化方法: 海藻酸钙、琼脂、聚丙烯酰胺、卡拉胶的固定化方法见陈驹声等人报道的方法^[1]。魔芋葡甘露聚糖固定化方法^[2,3]: 经 $TiCl_4$ -己二胺戊二醛活化的魔芋葡甘露聚糖粉末状载体在 pH5.0 醋酸缓冲液中 30℃ 保温 6h, 细胞可交联或吸附于载体上。以上各载体均固定 3ml 己酸菌悬液。

(四) 固定化己酸菌批次发酵实验

将上述不同载体固定化己酸菌颗粒用 100ml 血浆瓶盛 100ml 培养液进行批次发酵试验, 34℃ 深层培养, 于 5、7、9、11、13 天取发酵液 1ml, 测定己酸含量。

(五) 海藻酸钙凝胶中己酸菌生长的测定

本文于1991年10月25日收到。
色谱分析得到邵起薰、黄德英帮助, 致谢。
* 本所研究生, 现成都生物制品所。

用 0.4mol/L 磷酸盐溶液破碎凝胶颗粒,血球计数板直接计数每毫升凝胶中的细胞数目,并与游离培养的己酸菌进行比较。

(六) 固定化己酸菌的电镜扫描

固定化颗粒首先用戊二醛固定 20h,然后经 30%、50%、70%、80%、90%、100% 乙醇脱水半小时,置于醋酸异戊酯溶液中制片,扫描电镜观察。

(七) 己酸的测定方法

用 SC-6 型气相色谱仪测定发酵液中酸的产量。

结果与分析

(一) 固定化方法和载体选择

不同方法和载体固定己酸菌对产酸的影响,结果见表 1,从表看出:海藻酸钙包埋的己酸菌,每批次产己酸量均明显高出其它载体包埋者,也高出魔芋多糖固定的

表 1 不同载体固定化己酸菌产己酸比较

Table 1 Comparison of caproic acid yields by fermenting immobilized cells on different carriers

Fermentation time (d)	Caproic acid yield (mg/ml)									
	First batch					Second batch				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
5	0.40	0.03	0.01	0.02	0.70	5.33	4.61	3.35	2.20	2.00
7	2.21	0.51	2.25	0.43	2.01	8.78	6.83	6.06	6.55	4.47
9	6.37	3.35	3.19	1.17	3.45	10.1	7.17	7.38	8.38	6.71

a. Calcium alginate gel, b. Agar gel, c. K-karageenar gel, d. Polyacrylamide gel, e. Konjac glucomannan

己酸菌。

(二) 海藻酸钙浓度对产酸影响

用 2%、3%、4%、5% 的海藻酸钙凝胶固定化己酸菌后,发酵产己酸结果

见表 2。从表看出:每批次发酵都以 4% 的海藻酸钙包埋的己酸菌产己酸量最高,其次是 3% 的浓度,以 2% 或 5% 的浓度表现产己酸量较差。

表 2 海藻酸钙浓度对固定化己酸菌发酵产己酸的影响

Table 2 Effect of concentration of calcium alginate on caproic acid yield of immobilized cells

Time (d)	Caproic acid yield (mg/ml)											
	First batch				Second batch				Third batch			
	Conc. of alginate (%)				Conc. of alginate (%)				Conc. of alginate (%)			
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5
5	1.63	2.82	3.13	2.53	6.23	8.14	9.96	4.40	6.50	6.95	7.56	6.28
7	2.76	4.19	5.90	5.04	8.80	10.3	12.8	7.16	8.20	8.90	9.90	8.33
9	7.43	9.56	11.8	7.20	10.2	10.8	13.1	9.10	9.10	9.80	10.2	
11	9.13	11.9	14.1	9.02	11.3	12.9	15.9	11.7	10.8	11.2	12.9	9.60

(三) 海藻酸钙凝胶中己酸菌的增殖

采用血球计数板直接计数方法,考察己酸菌在海藻酸钙凝胶中的增殖结果,从

图 1 看出发酵第四批时,每毫升凝胶中己酸菌数量比刚包埋时增加近千倍。

(四) 固定化和游离细胞产己酸的

比较

结果见图2。从图2看出：固定化己酸菌的产量与游离菌比较有明显的提高，固定菌产己酸最高时可达14.4mg/ml，而游离细胞最高产酸仅达11.5mg/ml。

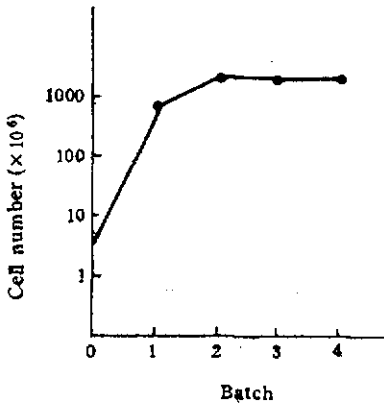


图1 己酸菌在海藻酸钙凝胶中的增殖

Fig.1 Growth of caproic acid bacteria in calcium alginate gel

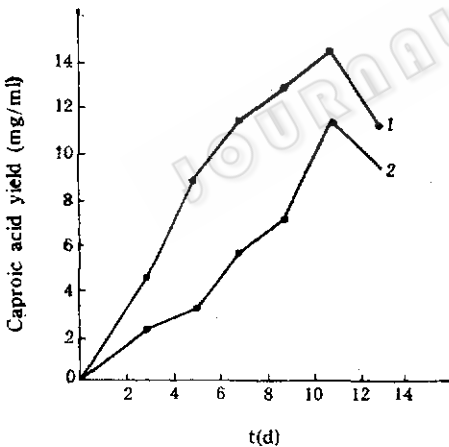


图2 固定化和游离的细胞己酸的生产

Fig.2 Caproic acid production with immobilized and free cells

1. Immobilized cells, 2. Free cells

(五) 温度、pH 值对固定化细胞产酸的影响

1. 温度的影响：在25℃—45℃温度范围内，以每5℃为一间隔，比较不同温度下产酸情况。当温度为35℃时，己酸产

量最高，温度高出45℃或低于25℃，产酸量都大幅度下降，其变化趋势与游离细胞相同^[6]。

2. pH的影响：在pH6.0—8.5范围内，每隔pH0.5值为一间隔，比较其对产酸影响。游离细胞产己酸适宜的pH范围为6.5—7.5，而固定化己酸菌适宜pH范围为7.0—8.0。

(六) 固定化己酸菌对基质的利用

1. 乙醇浓度的影响：用1%乙酸钠，乙醇浓度为1%、2%、3%、4%和5%，结果见表3，从表看出：当乙醇浓度为1%时，可满足其生长和代谢产酸。

表3 乙醇浓度对固定化细胞己酸生产的影响

Table 3 Effect of concentration of ethanol on caproic acid yield during fermenting immobilized cells

Time (d)	Caproic acid yield (mg/ml)				
	Concentration of ethanol %(v/v)				
	1	2	3	4	5
5	7.22	3.27	4.22	2.28	2.14
7	9.68	6.55	4.83	3.24	2.82
9	10.86	9.54	5.98	5.81	4.02
11	10.82	11.61	7.24	4.83	4.92
13	10.62	10.75	6.17	4.06	3.83

2. 乙酸钠用量的影响：结果见图3，从图看出：当乙醇浓度为2%时，乙酸钠浓度超过1%，丁酸积累逐渐增加，己酸产量有所减少，但总产酸量几乎不变；当乙酸钠浓度达到3%时，丁酸与己酸的积累几乎相当，不利丁酸转化为己酸。

(七) 固定化己酸菌对氧的敏感性

将经多批发酵的固定化己酸菌在空气中暴露一天后，继续进行批式发酵。固定化细胞在暴露空气后第一批次发酵的第9天、己酸量为7.3 mg/ml，11天时为11.7mg/ml，达到原有产酸水平；而游离

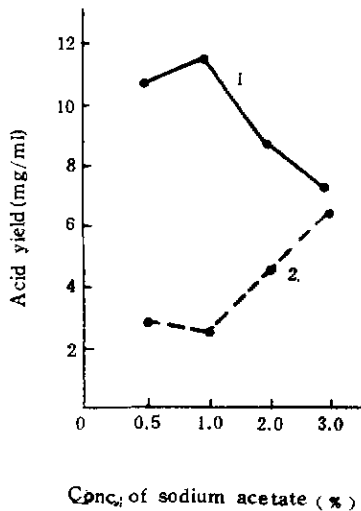


图 3 乙酸钠用量对固定化己酸菌产酸量的影响
Fig.3 Effect of dose of sodium acetate on caproic acid yield with immobilized cells
1. caproic acid; 2. Butanoic acid

己酸菌发酵11天,己酸产量为2.9mg/ml,发酵13天,己酸量仅达3.6mg/ml,总产酸量在5 mg/ml以下,说明凝胶包埋法对固定化己酸菌起到了保护作用,避免了氧对嫌气的己酸菌的毒害。

(八) 固定化己酸菌批次发酵的稳定性

批次发酵结果见图4,从图4看出:在18个批次发酵过程(每批13天,近240天)中,该固定化己酸菌产己酸量在11mg/ml左右,最高可达12.5mg/ml,最低也在9.3 mg/ml以上;丁酸产量保持4 mg/ml上下,总的趋势是己酸量高时,丁酸产量减少;己酸量低时,丁酸量有所增加,总产酸量几乎不变,说明该固定化己酸菌产酸活性是较稳定的。海藻酸钙凝胶在本实验的反应介质中,凝胶完好无破损。固定化细胞扫描电镜观察,在形态特征上与游离细胞比较,没有出现什么变化,细胞都呈直杆状,部份细胞一端膨大成鼓槌状。

(九) 固定化己酸菌贮存稳定性

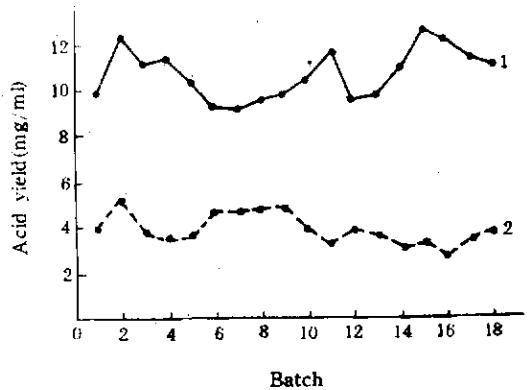


图 4 固定化己酸菌操作稳定性
Fig.4 Operational stability of immobilized caproic acid bacteria
1. Caproic acid; 2. Butanoic acid

经多批次发酵的固定化己酸菌连同其发酵液一起,分别置于4℃冰箱和20℃左右的室温下放置两个月后,考察固定菌的产酸活性,结果见表4。从表看出:4℃储存的固定化己酸菌,第一批次时己酸产量基本与储存前相同,第二批次时完全恢复到原有水平;而在20℃左右室温储存者,第一和第二批次己酸产量都明显低于保存前水平,只有到第三批次发酵时才基本恢复到储存前的水平。

表 4 固定化己酸菌贮存稳定性
Table 4 Stability of cell activity during storage of immobilized caproic acid bacteria

Condition of storage		Caproic acid yield (mg/ml)		
T (°C)	Time (day)	First batch	Second batch	Third batch
4	60	11.95	13.03	10.69
20	60	8.94	9.98	11.98

Period of fermentation 11 days

讨 论

固定化增殖细胞的制备方法主要有包埋法,吸附法和偶联法,针对己酸菌的厌氧

发酵,比较研究了几种包埋法和一种偶联吸附法,筛选出产己酸活性最高的载体——海藻酸钙凝胶。用海藻酸钙凝胶包埋己酸菌表现出许多优点,载体无毒、细胞密度大、产酸量高,凝胶可有效保护己酸菌活性。然而,在一定浓度的磷酸根阴离子、多种一价阳离子如钾、钠、铵离子存在下,海藻酸钙凝胶颗粒易溶胀而破损,但

这可以通过一定的方法加工处理^[4,5],使其得以适应长期的反复操作要求,从实验结果看,在本实验条件下由本方法制备的海藻酸钙凝胶固定化己酸菌、己酸产量高、又具有良好的操作稳定性,有希望在今后的实际生产中代替游离己酸菌进行己酸发酵,解决固定化细胞全液法生产浓香型曲酒中的生香难题。

参 考 文 献

- [1] 陈响声等著:固定化酶理论与应用,轻工业出版社、北京,pp.152—156,1987。
 [2] 贾成禹等:生物化学杂志,7(3):359—364,1991。
 [3] 陈家任等:微生物学报,31(5):390—395,1991。
 [4] 吴衍庸等:中国生化学会第五次全国生化学术讨论会论文摘要汇编,北京,1984。
 [5] 陈家任等:生物工程学报,3(2):146—151,1987。
 [6] 薛堂荣等:食品与发酵工业,82(4):1—6,1988。

Study of Caproic Acid Fermentation of Immobilized Cells

Yuan Jun Chen Jiaren Xue Tangrong Wu Yanyong
 (Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Five methods was tested for immobilized caproic acid bacteria. The batch experiment results shown that the calcium alginate was the best one of the five immobilized methods. The characteristics of immobilized caproic acid bacteria cells were evaluated using a standardized batch fermentation procedure. In the laboratory-scale experiments, the alginate beads could be maintained at least for 8 months with caproic acid level about 11 mg/ml, under the optimum conditions, the maximum concentration of about 15 mg/ml could be obtained. The observed productive acid rate and its yield of immobilized cells appear to be greater than the corresponding cells in suspension. The cell numbers per volume of immobilized cells was about ten times the that of free cells.

Key word Calcium alginate; immobilized cell; caproic acid bacteria