

有机溶剂与乳杆菌相容性的研究

范先国 周可可 李友荣 苏元复

(华东化工学院, 上海 200237)

以乳酸发酵——溶剂萃取耦合过程为背景,研究了十二种有机溶剂在发酵培养基中的不同浓度水平,对德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbreuckii*)生理活性的影响。根据乳杆菌生理活性随溶剂浓度变化的特征,将有机溶剂与乳杆菌的相容性分为四种类型;对比溶剂在水中溶解度与溶剂对乳杆菌特征毒性浓度的相对大小,对四种类型作了定性描述。

关键词 萃取发酵; 德氏乳杆菌; 有机溶剂; 生物相容性; 分类

有机溶剂在微生物发酵过程中的应用日益广泛,对乙醇、丙酮和丁醇体系的研究结果^[1-4],已经充分证实了这类萃取发酵过程的科学原理。乳酸发酵过程亦存在强烈的产物抑制现象,萃取发酵应用于这类产物沸点较高的体系,无疑更具有吸引力。

萃取发酵以克服产物抑制、最大限度地发挥微生物的代谢生产能力为目的,但首先要求引入的有机溶剂必须满足与发酵菌种的生物相容性条件。从文献报道来看,溶剂的萃取能力与生物相容性往往不能很好匹配^[6-7],本文以乳酸萃取发酵过程为背景,首先报道有机溶剂与乳杆菌相容性的研究结果。

材料与 方法

(一) 菌种

实验用德氏乳杆菌(*L. delbreuckii*) J8412由国内某厂提供。

(二) 培养基

1. 液体种子培养基(%)：麦芽糖 4.0, 蛋白胨 0.2, 酵母膏 0.25, 牛肉浸膏 0.3, NaCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、

K_2HPO_4 各 0.05, $CaCO_3$ 3.0, 自来水配制。于 250ml 三角瓶中装 100ml 培养基, 0.2MPa 下灭菌 20min。种液于 4℃ 冰箱保存,每周转接一次。

2. 相容性发酵培养基(%)：葡萄糖 5.0, 蛋白胨 0.25, 酵母膏 0.5, NaCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 各 0.05, $CaCO_3$ 4.0, 自来水配制, 0.2 MPa 下灭菌 20min。有机溶剂单独灭菌后于接种前按量加入。种子培养及相容性发酵均在 $49 \pm 1^\circ C$ 恒温箱内静置进行,每 4h 摇动一次。

(三) 有机溶剂

三烷基氧磷(TRPO)系上海试剂三厂工业级产品,三烷基胺(N235)系大连油脂化工厂工业级产品,二丁基亚砷(DBSO)为本院合成产品,煤油为 260 号溶剂油,其余均为国产或进口分装试剂级产品。所有溶剂均预先用 50℃ 蒸馏水洗涤三次(相比 1:1),以消除水溶性杂质的影响。表 1 列出了所用溶剂的有关物性。

(四) 相容性实验方法

在 4 只 250ml 三角瓶中分别盛有 100ml 培养基,其中三只加入不同量的溶

本文于 1992 年 11 月 23 日收到。

表 1 有机溶剂的物理性质
Table 1 Physical properties of organic solvents

Organic solvents	Molecular weight (g/mole)	Density at 20℃ (g/cm ³)	Boiling point (℃)	Solubility in water(20℃) (%wt.)
n-Butanol	74.12	0.810	117.7	9.0
2-Ethylhexanol	130.23	0.833	184.7	0.07
Cyclohexanol	100.16	0.949	161	3.6
Cyclohexanone	98.15	0.948	155.7	2.3
Isoamyl acetate	130.18	0.872	142.0	2.0
Methyl oleate	296.50	0.870	217	<0.06
Kerosene	~200	0.797	198—241	<0.02
Dibutyl sulphoxide	162.29	0.933	n.a.	6.46
Tributyl phosphate	266.32	0.976	154.0(1.3kPa)	0.039
Trialkyl phosphine oxide (TRPO)	~312	0.868	210—224 (1.3kPa)	0.009
Trioctylamine	353.67	0.812	180—202 (0.4kPa)	<0.001
Trialkylamine (Alamine 336)	~320	0.815	180—230 (0.4kPa)	<0.001

剂，使其在培养基中的浓度分别相当于半饱和、饱和以及超饱和形成明显的第二相，另一只不加溶剂作为对照。接入5m_l种液进行发酵培养。定时取样测定菌体浓度、残糖及乳酸浓度，同时用显微镜观察菌体形状。比较德氏乳杆菌在含溶剂培养基与对照培养基中的生理活性，便可看出有机溶剂与乳杆菌的相容性程度。

(五)分析方法

1. 菌体生长^[8]：吸取2ml样品菌液到25ml蒸馏水中，加入1ml 1.0mol/L HCl溶解固体CaCO₃，摇匀后在580nm处测定光密度值，并换算至每ml单位光密度N(U.O.D./ml)，用来间接度量菌体浓度。
2. 乳酸的测定，用0.1mol/L NaOH测定游离乳酸，以EDTA测定乳酸钙，两部分加和后折算至乳酸含量。同时还采用浓硫酸氧化，将乳酸转化成乙醛后，再进行比色分析，直接测定总乳酸根量^[9]，证明EDTA间接测量法是准确的。
3. 葡萄糖：斐林试剂滴定法。

结果与讨论

(一)基准培养基中乳酸的发酵过程

在不含有机溶剂的发酵培养基中，乳杆菌表现其固有的生理活性，相容性实验以此作为对照。实验测定的乳酸发酵曲线如图1所示。以对数期菌体平均生长速

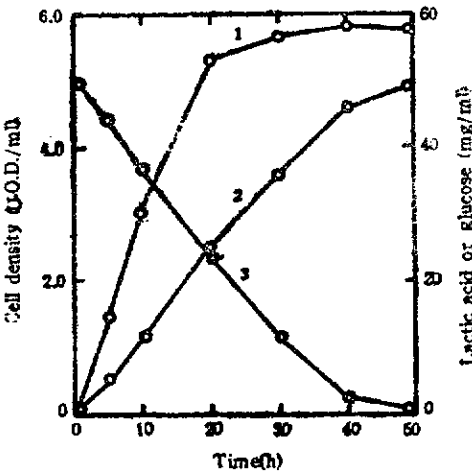


图1 基准培养基中乳酸发酵过程
Fig.1 Time course of lactic acid fermentation in controlled medium
1. Bacterial density, 2. Lactic acid, 3. Residual glucose

率($\Delta N/\Delta t$)、平均产酸速率($\Delta P/\Delta t$)以及菌体生长所能达到的最大浓度($N_{m,x}$)作为相容性程度的数量依据,对照组中此三值分别为 0.295 U. O. D./ml·h, 1.20mg/ml·h 和 5.85 U. O. D./ml.

(二)不同溶剂对乳杆菌发酵过程的影响

1. 煤油、油酸甲酯的影响: 这二种溶剂对乳杆菌发酵过程的影响基本相似: 三种浓度水平下乳杆菌的生长速率及产酸

水平均略低于对照组的结果(见表 2), 表明此二种溶剂无论在分子水平, 还是在相水平上均与乳杆菌相容. Roffler^[7] Bar和Gainer^[6]的研究亦表明, 在溶剂-发酵液两相体系中, 乳杆菌的生理活性不受到影响.

2. 三烷基氧磷、三辛胺及三烷基胺的毒性行为: 乳杆菌在分别含有这三种溶剂的培养基中的发酵行为(以图 2 为代表)基本相似: 两相体系中溶剂对菌种完全致

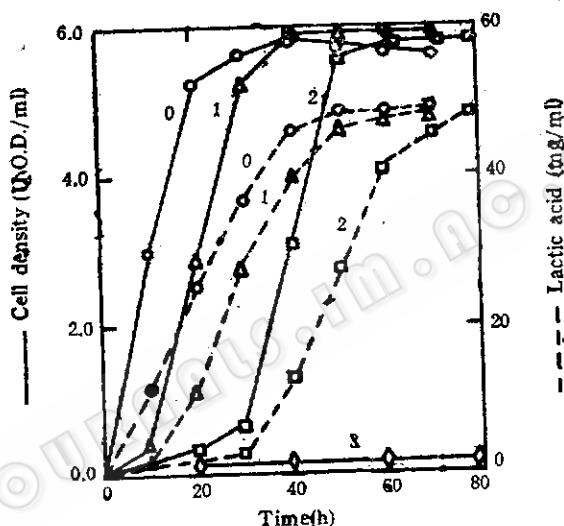


图 2 含三烷基氧磷体系中乳酸发酵过程

Fig.2 Time course of lactic acid fermentation in TRPO-contained medium

0. Medium without solvent; 1. Semi-saturated medium,
2. Saturated medium; 3. Two-phase system.

毒,但在分子水平上即使达到饱和浓度,产酸水平仍达到基准的95%左右,故认为此三种溶剂在分子水平上与乳杆菌相容.至于溶剂的加入导致延迟期加长,只是一个生理适应问题,可以通过对菌种驯化予以消除,作者将另文报道. Datta^[10]发现甲苯、柴油等对厌氧菌无毒,而三辛基氧磷、三烷基胺溶解在这些溶剂中并不影响对菌体的毒性,溶剂限于饱和水平,可见与本文结果基本一致. Playne和Smith^[11]对厌氧混合菌群的调查表明,

三辛胺与三辛基氧磷在 25 μ l/ml 的超饱和浓度水平也只表现出部分抑制作用,与本文结果稍有出入,这可能与所用菌种及溶剂剂量不同有关.

3. 环己醇、环己酮、2-乙基己醇及二丁基亚砷对乳杆菌发酵过程的影响: 上述四种溶剂对乳杆菌表现出类似的抑制作用: 分子水平上抑制作用随溶剂浓度增大而增大,在饱和浓度时表现出部分相容性;超过饱和浓度,由于分子水平毒性与相水平毒性共同作用的结果,抑制作用进

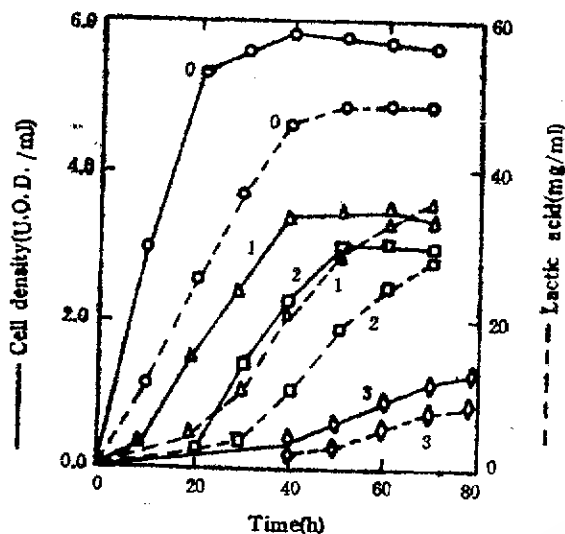


图3 含2-乙基己醇体系中乳酸发酵过程

Fig.3 Time course of lactic acid fermentation in 2-ethylhexanol-contained medium.

The numbers show the same meaning as those described in the legend to Fig.2

一步加大。图3标绘了2-乙基己醇体系中乳杆菌的发酵曲线。Shukla等^[12]报道的2-乙基己醇对丙酮丁醇梭状芽孢杆菌的抑制行为与本文结果相似。

4. 磷酸三丁酯、正丁醇体系中乳杆菌的发酵行为: 图4的结果表明磷酸三丁

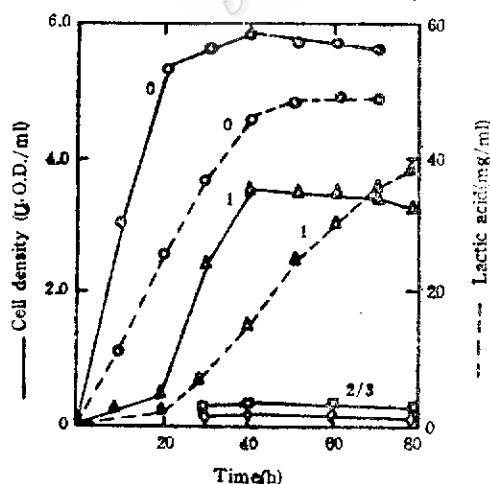


图4 含磷酸三丁酯体系中乳酸发酵过程

Fig.4 Time course of lactic acid fermentation in tributylphosphate-contained medium. The numbers show the same meaning as those described in the legend to Fig.2

酯对乳杆菌具有较强的毒性, 达到饱和浓度(仅380ppm)时便完全抑制乳杆菌的生长, 相水平的毒性根本就观察不到。Cho和Schuler^[13]的研究表明, 磷酸三丁酯与酵母菌在分子水平上完全相容, 只是在超饱和的相水平上才表现出强烈的抑制作用。正丁醇对乳杆菌的影响行为按相对浓度水平比较, 十分类似于磷酸三丁酯的情形, 但其在水中的溶解度较之磷酸三丁酯要大得多。可见毒性太强和溶解度太大能导致类似的相容性行为。在30g/L正丁醇浓度水平上乳杆菌仍能部分生长并产酸, 但10g/L的正丁醇浓度便可致丙酮丁酸梭状芽孢杆菌完全失活。显然, 有机溶剂与微生物的相容性随溶剂、菌体的不同, 表现出极大的差异性。

对乙酸异戊酯体系的研究结果表明, 该溶剂在分子水平上与乳杆菌基本相容, 但在两相体系中因乙酸异戊酯发生水解生成异戊醇, 而致毒性影响明显加大。这与文献[11]报道十分类似。

相容性实验过程中, 对所有处于生长阶段的乳杆菌进行显微镜观察, 菌体形状均未见异常变化。此外, 从高压液相色谱定性分析结果与对照组比较来看, 在溶剂存在下乳杆菌的代谢途径并未发生变化。

(三) 相容性与溶剂浓度的关系

表 2 列出了十二种溶剂在三种浓度水平上与乳杆菌相容性的实验结果, 其中 F_c 为相容性, 其值等于以百分数表示的产酸速率相对于对照组的比值。

表 2 有机溶剂与乳酸杆菌相容性实验结果

Table 2 Experimental results for biocompatibilities of organic solvents with *L. delbreuckii*

Organic solvent	Concentration level(*)	Max. bacterial density (U.O.D/ml)	Growth rate of bacteria (U.O.D/ml·h)	Producing rate of lactic acid (mg/ml·h)	Biocompatibility (%)
Controlled Kerosene	0	5.85	0.295	1.20	100
	1	5.70	0.283	1.18	98.3
	2	5.60	0.276	1.15	95.8
	3	5.65	0.269	1.12	93.3
Methyl oleate	1	5.70	0.277	1.15	95.8
	2	5.66	0.274	1.15	95.8
	3	5.60	0.272	1.14	95.0
Isoamyl acetate	1	5.40	0.247	1.06	88.3
	2	5.14	0.217	0.93	77.5
	3	3.80	0.120	0.76	63.3
Trialkyl phosphine oxide	1	6.27	0.287	1.20	100
	2	6.13	0.267	1.16	96.7
	3	/	/	/	/
Trialkylamine	1	5.68	0.245	1.18	98.3
	2	5.56	0.187	1.12	93.3
	3	/	/	/	/
Trioctylamine	1	5.66	0.252	1.20	100
	2	5.53	0.187	1.15	95.8
	3	/	/	/	/
Tributylphosphate	1	3.93	0.158	0.76	63.3
	2	/	/	/	/
	3	/	/	/	/
n-Butanol	1	4.40	0.180	0.80	66.7
	2	/	/	/	/
	3	/	/	/	/
2-Ethylhexanol	1	3.93	0.109	0.71	59.2
	2	3.33	0.101	0.57	47.5
	3	1.47	0.040	0.25	20.8
Cyclohexanone	1	3.20	0.127	0.53	44.2
	2	2.53	0.103	0.39	32.5
	3	1.20	0.031	0.25	20.8
Cyclohexanol	1	2.80	0.124	0.44	36.7
	2	2.20	0.096	0.37	30.8
	3	0.93	0.031	0.20	16.7
Dibutylsulphoxide	1	3.31	0.136	0.60	50.0
	2	2.67	0.120	0.47	39.2
	3	1.65	0.043	0.22	18.3

*: 0. Broth without organic solvent; 1. Broth semi-saturated with solvent; 2. Broth saturated with solvent; 3. Broth-solvent two phase system.

表中数据更清楚地表明，溶剂浓度是影响相容性的重要因素。有关溶剂抑制微生物活性的作用机制在文献中已有描述^[6]，此处将对溶剂抑制微生物活性在随浓度变化时所表现出来的特征作一些定性归纳和讨论。

有机溶剂在分子水平上对微生物的抑制作用与水溶性物质的抑制作用，本质上是相同的，因此从宏观上可以用类似的函数关系来描述相容性随溶剂浓度的变化趋势。实验进一步研究了不同浓度正丁醇与乳杆菌的相容性(如图 5 所示)。此曲线形式与 Bazua 和 Wilke^[14]研究乙醇影响酵母菌的动力学行为所得结果相似，均表现为一单调下降的曲线，并在某一浓度水平完全抑制菌体活性。图中用 C_m 表示此浓度，称为“以分子水平作用机制完全致毒的溶剂浓度”，即溶剂的特征毒性浓度，用来度量溶剂对微生物的毒性大小； C_i 表示溶剂在水中的溶解度，即溶剂的饱和浓度。

将 C_m 及 C_i 作为定性描述溶剂与微生物相容性的两个特征参数，结合(二)中的

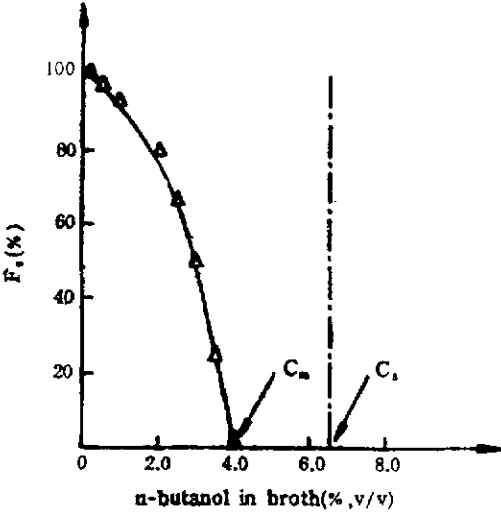


图 5 相容性与正丁醇浓度的关系

Fig.5 The relationship between biocompatibility and concentration of n-butanol in medium.

讨论，进一步对表 2 中的数据分析、整理，发现其中存在某些规律，并可将这些有机溶剂与乳杆菌的相容性归纳为四种类型。表 3 列出了这种分类方法以及每一类型的例证和特征，图 6 则对这四种类型的相容性函数与溶剂浓度的定性关系作了更为直观的统一说明。

表 3 有机溶剂与乳杆菌生物相容性的分类

Table 3 Classification of biocompatibilities of organic solvents with *L. delbreuckii*

Classes	I Complete Compatible	II Compatible at molecular level	III Partial comopatile	IV Non compatible
Example	Ketosent Methylolate	TRPO TOA Alamine 338	Cyclohexanol Cyclohexanone 2-ethylhexanol DBSO	TBP n-Butanol
Feature of solvent	Low polarity and high mol- ecular weight	Very low solubility in water	Moderate solu- bility and polarity	Strong toxicity of high solubility
Charact- eristics of bacterial activity	Nearly total activity retained at any conc. $C_m \rightarrow \infty$	Activity retained $\geq 95\%$ at C_m $C_m \rightarrow 0$ $C_i \ll C_m$	Only partial activity retai- ned at C_m $C_i < C_m$	No activity retained at C_m $C_i > C_m$

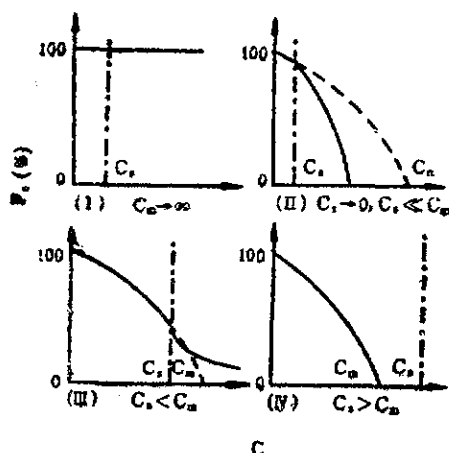


图6 相容性与溶剂浓度关系的定性描述

Fig.6 Qualitative description for the relationship between biocompatibility and concentration of solvent.

C_s —Saturated concentration of solvent in medium, C_m —Solvent concn. at which the activity of bacteria is completely inhibited in the toxicity mechanism at molecular level.

根据以上相容性分类与描述,不仅可以对实验结果作统一说明,而且从中可以得到一个非常有意义的启示,即溶解度极小的溶剂很有可能属于第II种类型,作者将另文报道采用这类溶剂实现萃取发酵的方式和方法。I类溶剂大多无萃取能力,在萃取发酵中可用作稀释剂,改善过程的操作特性或缓解萃取剂的毒性。而III、IV类溶剂几乎不可能用于萃取发酵,即使采用某些手段,要克服分子水平上较强的抑制作用也是非常困难的,而且溶剂在水中较大的溶解度将导致溶剂的大量损失。可见,本文的研究结果对萃取发酵中溶剂的选择具有一定的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Minier, M. and Goma, G., *Biotech. Lett.*, 3:405, 1981.
- [2] Kollerup, F. and Daugulis, A.J., *Annal. N. Y. Acad. Sci.*, 506:478, 1987.
- [3] Ishii, S. et al., *J. Ferment. Technol.*, 63:181, 1985.
- [4] Roffler, S. et al., *Biotech. Bioeng.*, 31:135, 1988.
- [5] Daugulis, A. J., *Biotech. Prog.*, 4:113, 1988.
- [6] Bar, R. and Gainer, J. L., *Biotech. Prog.*, 3:109, 1987.
- [7] Roffler, S. et al., *Trends in Biotech.*, 2:129, 1984.
- [8] Luedeking, R. and Piret, E.L., *J. Biochem. Microb. Technol. Eng.*, 1:393, 1959.
- [9] Tuli, A. et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 7:164, 1986.
- [10] Datta, R., *Biotech. Bioeng.*, 23:61, 1981.
- [11] Playne, M. J. and Smith, B. R., *Biotech. Bioeng.*, 25:1251, 1983.
- [12] Shukla, R. et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 18:315, 1988.
- [13] Cho, T. and Schuler, M. L., *Biotech. Prog.*, 2:53, 1986.
- [14] Bazua, C. D. and Wilke, C. R., *Biotech. Bioeng. Symp.*, 7:105, 1977.

Biocompatibilities of Organic Solvents with *Lactobacillus delbreuckii*

Fan Xianguo Zhou Keke Li Yourong Su Yuanfu
(East China University of Chemical Technology, Shanghai 200237)

In search of biocompatible extractants for extractive fermentation of lactic acid, the effect of twelve organic solvents on the activity of *L. delbreuckii* were studied at different concentration levels. On this basis, the compatibilities with *L. delbreuckii* of twelve solvents were summarized into four classes: compatible, compatible at "molecular level", partial compatible and non-compatible. The characteristics were described qualitatively for each class in terms of relative value between the solubility of organic solvent in water (C_s) and the toxicity of organic solvent, which is indicated by a newly-defined concentration parameter (C_m). The classification was helpful for the selection of extractant in extractive fermentation.

Key words Extractive fermentation, *Lactobacillus delbreuckii*; biocompatibility; organic solvent; classification