

醋酸杆菌 AS1.41 的醋酸发酵动力学特性

郭养浩 张雅惠

(福州大学轻工系, 福州 350002)

摘要 用分批培养的方法研究了醋酸发酵过程的动力学特性。醋酸杆菌 AS 1.41 的醋酸发酵过程属“非生长偶联型”, 发酵初期菌体迅速增殖, 发酵中期为醋酸生成的高峰期。高浓度的底物和产物对菌体生长及其产酸活性有抑制作用。在乙醇浓度 2—4g/100ml 和醋酸浓度小于 3g/100ml 范围内, 发酵反应效率最佳, 最大菌体比生长速率可达 0.127h^{-1} , 最大醋酸比生成速率为 $0.12\text{g 醋酸/h} \cdot \text{OD}$ 。在工业常用的初始底物浓度范围内, 底物抑制效应主要表现在对菌体生长的影响上。高浓度醋酸的存在显著抑制该菌的产酸能力, 最高产酸浓度约为 $7.5\text{g}/100\text{ml}$ 。

关键词 醋酸杆菌 AS1.41; 发酵动力学

醋酸发酵是重要的一类生物学过程, 对醋酸发酵机理已有不少研究报道^[1-3]。在分批醋酸发酵过程中, 醋酸菌接种入培养基后, 主要经历两个过程, 醋酸菌利用培养基中的营养成分生长繁殖, 同时将乙醇氧化成醋酸。森明彦曾报道, 分批培养时醋酸菌的比生长速率与醋酸比生成速率成正比关系^[4]。Ebner 发现醋酸的生成不完全取决于细胞的繁殖, 在细菌停止生长后的相当一段时间内, 细菌仍具有产生醋酸的能力^[5]。为了提高发酵效率, 对醋酸发酵过程的动力学特性进行研究是有意义的。国内尚未见此报道。

本文报道, 恶臭醋酸杆菌 AS1.41 在醋酸发酵过程中的比生长速率和醋酸比生成速率的关系, 以及底物抑制和产物抑制的效应。

材料与方法

(一) 菌种和培养基

实验菌种采用国内广泛应用的恶臭醋酸杆菌混浊变种 (*Acetobacter rancens* var. *turbidans*) (AS 1.41), 由中国科学院菌种中心站提供。

合成培养基(每升): 葡萄糖 10 克, 碳酸钙 10 克, 酵母膏 10 克, 乙醇和醋酸含量按实验要求配制。

大米酒醪培养基取自福州调味品厂食醋车间。

(二) 培养方法

500 毫升三角瓶内装培养基 85 毫升, 接种量按工业生产中常用的接种量 12—15%。振荡培养, 180r/min, 30℃。

(三) 分析方法

乙醇含量分析: 采用气相色谱仪热导分析。色谱柱为聚乙二醇 6000, 10% 附载在硅烷化、酸化处理的 101 白色担体上。高纯氮为载气, 柱温 110℃。

总酸度(以醋酸浓度计)采用氢氧化钠中和法测定, 酚酞为指示剂。

菌体浓度分析: 用 721 分光光度计浊度法测定。将未加菌种的培养基用蒸馏水稀释一倍作为参比, 将发酵液也稀释一倍, 测定 610nm 时的光密度 (OD)。在本实验范围内, 细胞干重 (g 细胞干重/l) 与光密度 OD 值具有良好的线性关系。

结果与讨论

(一) 醋酸杆菌 AS 1.41 的生长和发酵特性

本科研项目由福建省教委(科委)资助。

将预培养的醋酸杆菌 AS1.41,按规定的接种量分别接种于合成培养基和酒醪培养基中。实验表明,在工业生产的乙醇和醋酸浓度范围内,两种培养基中醋酸杆菌的生长和发酵特性没有明显区别。因此,本工作主要考察合成培养基中的发酵过程。

观察到迟缓期,整个发酵过程约 50 小时完成。将细胞浓度的自然对数 $\ln X$ 对发酵时间 t 标绘,可求得各个时间 t_i 时的醋酸杆菌的比生长速率 $\mu\left(\mu=\frac{dX}{X \cdot dt}\right)$ 。醋酸比生成速率 q_p

$$\left(q_p=\frac{dp}{X \cdot dt}\right)$$

也可从 $\ln P$ 对 t 的标绘曲线和对应的菌体浓度 X 计算而得。图 1b 为醋酸发酵过程中醋酸杆菌的比生长速率和醋酸比生成速率随发酵时间的变化曲线。醋酸发酵过程中,菌体的生长和醋酸的合成基本上是分阶段进行的,二者并不同步。接种后,醋酸菌迅速增殖,比生长速率最大。接种后的 20 小时对菌体生长最为重要,随后菌体的比增长速率迅速下降。而醋酸的比生成速率则呈不同的变化趋势,前 20 小时为渐升期, q_p 逐渐上升至最大值。醋酸菌的最大 q_p 可维持较长的时间,甚至在 μ 很小(趋于零)时仍可保持较高数值。发酵 45 小时之后, q_p 的下降是由于底物耗尽的缘故。根据微生物代谢过程中比速率(μ 和 q_p) 的关系,醋酸杆菌 AS1.41 的醋酸发酵过程应属于“非生长偶联型”(non-growth-associated) 的发酵过程^[4]。

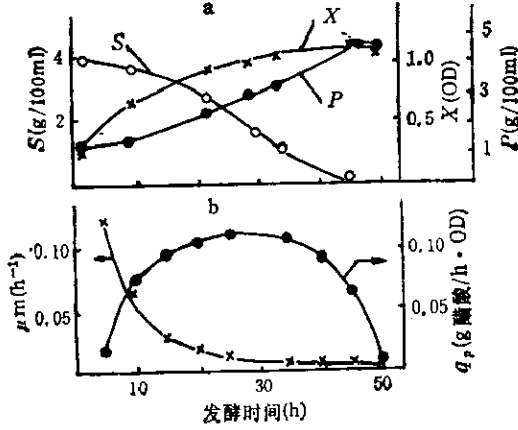


图 1 醋酸杆菌的典型分批培养实验
 $S_0 = 4.0\text{g}$ 乙醇/100ml, $P_0 = 1.2\text{g}$ 醋酸/100ml
S: 底物乙醇浓度, X: 菌体浓度 (OD)
P: 产物醋酸浓度

图 1a 表示一组典型的在合成培养基中的分批培养实验数据(初始乙醇浓度 S_0 为 $4.0\text{g}/100\text{ml}$, 初始醋酸浓度 P_0 为 $1.2\text{g}/100\text{ml}$)。未

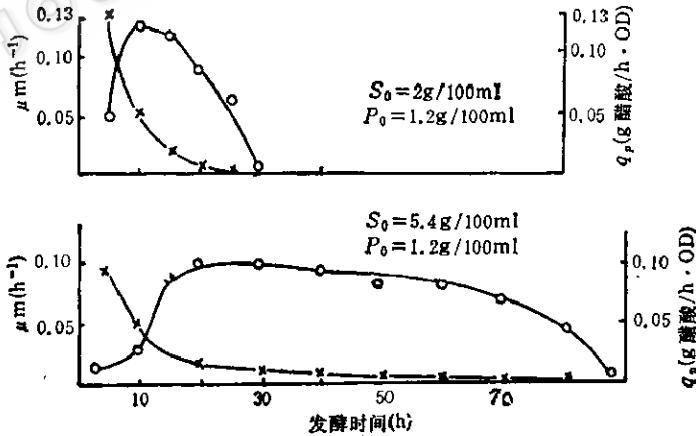


图 2 不同初始乙醇浓度时醋酸杆菌的生长和产酸活性

×: μ , ○: q_p

(二) 底物抑制效应

配制不同的底物(乙醇)初始浓度的合成培养基,在相同的培养条件下考察不同的乙醇浓度对 μ 和 q_p 的影响。图 2 为乙醇初始浓度

$2\text{g}/100\text{ml}$ 和 $5.4\text{g}/100\text{ml}$ 时的实验数据。图 1—2 表明,在工业常用的底物浓度和接种量范围内,醋酸杆菌 AS 1.41 的醋酸发酵过程具有“非生长偶联型”的发酵反应动力学特性。

将一系列不同初始乙醇浓度 S_0 的发酵过程中微生物的最大比生长速率 μ_m 和最大比产酸速率 q_{pm} 对 S_0 进行标绘, 得出典型的底物抑制曲线(图3)。高浓度的乙醇对微生物的生长具有一定的抑制作用, S_0 为 2—4g/100ml 范围内, 菌体比生长速率 μ 达最大值 $0.127h^{-1}$, S_0 大于 5g/100ml 时, 底物抑制效应越加显著, 当 S_0 等于 7.8g/100ml 时, 菌体仅在接种后数小时内有少量增殖, 很快就丧失生长能力。但

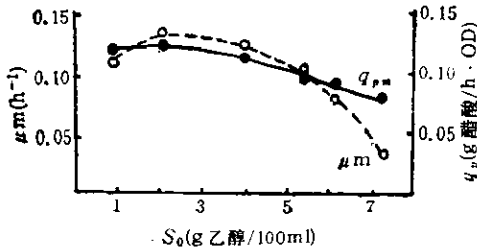


图3 初始底物浓度 S_0 与发酵过程的最大菌体比生长速率 μ_m 和最大醋酸比生成速率 q_{pm} 的关系
●: q_{pm} , ○: μ_m

对醋酸比生成速率 q_p 而言, 尽管各批发酵过程的 q_{pm} 值随 S_0 的增大有所下降, 但下降幅度不大, 并且在发酵过程中, 菌体产酸活性可长时间地维持在接近 q_{pm} 的水平上(图2)。因此可认为高浓度乙醇对 q_p 的抑制效应不很明显。

影响醋酸发酵速率($\frac{dp}{dt} = q_p \cdot X$)的因素

有: 醋酸比生成速率 q_p 和菌体浓度 X 。在工业常见的初始乙醇浓度范围内(5—7 g/100ml), 底物抑制效应主要表现在对菌体生长的影响上。分批培养时, 若初始乙醇浓度较大将导致 μ 下降, 也即菌体浓度 X 增加速度减慢, 乙醇的消耗速率和醋酸生成速率下降, 这将使发酵周期延长, 发酵效率下降。

(三) 产物抑制效应

在一定的乙醇含量($S_0 = 2-3g/100ml$)的合成培养基中添加醋酸, 配制成一系列不同初始产物浓度 P_0 的培养介质, 考查产物浓度对 μ 和 q_p 的影响。实验数据清楚地表明了醋酸的产物抑制效应(图4和图5)。高浓度醋酸

的存在不利于醋酸菌的生长, 细胞比增长速率随 P_0 的增加逐渐下降。由于此增长速率的差异, 相同接种量的各批实验发酵液中菌体浓度增加

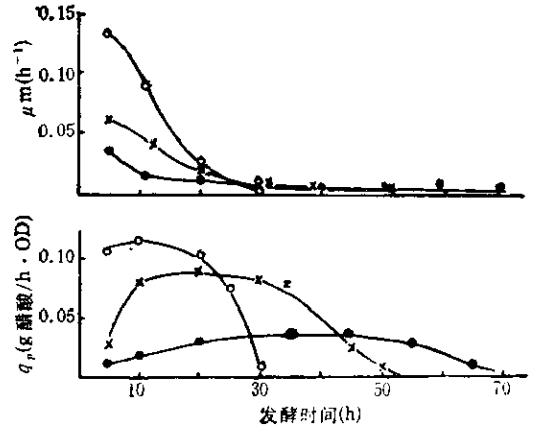


图4 不同初始产物浓度时醋酸杆菌的生长和产酸特性
○: $P_0 = 0.42g/100ml$, ×: $P_0 = 4.6g/100ml$
●: $P_0 = 6.5g/100ml$

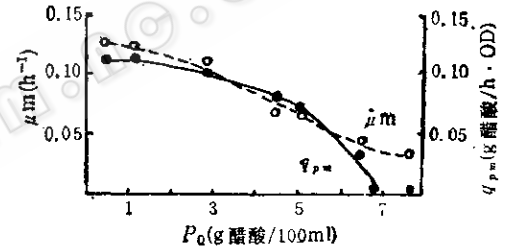


图5 初始产物浓度 P_0 与发酵过程的最大菌体比生长速率(μ_m)和最大醋酸比生成速率(q_{pm})的关系
●: q_{pm} , ○: μ_m

的速率和发酵结束时的最终菌体浓度有较大差别。但在高的醋酸浓度时, 醋酸菌仍可缓慢增长, 实验观察到, 当 $P_0 = 8g/100ml$ 时, μ_m 约等于 $0.5h^{-1}$ 。图5表明, P_0 对 q_{pm} 的影响主要表现在高浓度区。 P_0 小于 3g/100ml 时, q_{pm} 所受的影响甚小; P_0 继续增加, q_{pm} 急剧下降; 在 P_0 为 6.5—7.0g/100ml 范围内, 醋酸杆菌 AS1.41 的产酸活性几乎丧失。

从生化反应动力学角度考虑, 具有显著产物抑制效应的发酵过程采用分批培养方式是合理的。醋酸发酵的动力学特点是菌体生长和产物合成不能偶联, 对分批培养而言, 由于发酵初期菌体的生长是至关重要的, 因而在保证一定接种量时, 应考虑初始产物浓度对菌体生长的

(下转第63页)

(上接第 26 页)

影响。随着发酵过程的进行,醋酸浓度不断增加,产物抑制效应也逐渐加剧,高浓度醋酸的存在将抑制醋酸菌的产酸活性,对 AS1.41 来说,最高产酸浓度约 7.5g/100ml。

参 考 文 献

1. 怡山实: 酵素,バイオテクノロジーへの指針,日本农芸

化学会志,朝仓书店,p. 71, 1983。

2. 徐跃: 中国调味品,2: 1,1989。

3. 合叶修一著,胡章助译: 生物化学工程——反应动力学,化学工业出版社,p. 230, 1984。

4. 森明彦,照井堯照: 醸工,50: 70,1972。

5. Heinrich Ebner and Heirich Follmann: In Biotechnology Vol. 3. Verlag Chemie, 1983。

6. Anton Moser: Biotechnology, 2: 248, 1985。