

己酸菌 LII 己酸发酵过程中生理及代谢特点

祁庆生 刘复今 肖 敏

(山东大学微生物系, 济南 250100)

摘要 在了解了产己酸细菌 LII 的发酵最适条件的基础上, 进一步对己酸发酵过程中的生理及代谢特

1995-06-15收稿

性作了较详细的分析。结果表明,在己酸发酵过程中除产生正常代谢产物己酸外,还产生丁酸、乙酸、戊酸等其它酸类和甲烷,氢气和 CO_2 等气体。用 $1\text{-}^{13}\text{C}$ -乙酸钠和未标记的乙醇作为底物发酵,用色质联用仪(GC/MS)分析,结果表明:在己酸合成中碳的来源为乙醇和乙酸,中间代谢产物为丁酸。

关键词 己酸,发酵,代谢

己酸菌应用在传统发酵白酒的生产上已有多年的历史了。到目前为止已应用到工业生产的菌株也有多种,如己酸菌 LII、W₁^[1] 这些菌株应用在工业生产上都能大幅度地提高白酒中己酸乙酯的含量,进而提高白酒的质量。但分离的这些培养物主要着眼于应用,对其发酵的最适条件及影响因素研究较多,而对发酵过程中的生理及代谢特点探讨较少。因此,我们在研究生理过程的基础上,进一步用 GC/MS 和同位素方法,对己酸菌 LII 的代谢产物进行分析,并在此基础上确定己酸菌 LII 在己酸合成过程中碳的来源和中间产物。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养

菌种:己酸菌 LII (*Clostridium* sp.)。

培养基(%):乙醇 2, 乙酸钠 0.5, 酵母膏 0.1, CaCO_3 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05, K_2HPO_4 0.04, pH7.0。

乙醇经过滤除菌,接种前加入,培养过程为厌氧深层。

1.2 待测发酵液的制备

1.2.1 有机酸的萃取^[2]:将 20ml 发酵液置于 50ml 的烧杯中,用 0.03mol/L 的四乙基氢氧化铵中和并调至 pH9.0,然后在沸水浴中蒸干。60℃干燥箱中放置 2h,取出后冷却置室温。加入 5ml 丙酮使其充分溶解,取上清液 2ml 于 25ml 比色管中,加入苯基溴。混匀后在室温下放置 2h 即可。

1.2.2 发酵液的萃取浓缩:(用于非有机酸的分析)50ml 发酵液离心 (4000r/min) 10min,用 10ml 二氯甲烷分两次提取各 2min,静止分层,取二氯甲烷层浓缩至 1ml 待用。

1.3 产物分析^[3,4]

1.3.1 气相色谱:岛津 GC-9A 气相色谱仪。

柱体:苯乙烯共聚。柱温:30℃。

1.3.2 GC/MS(色质联用仪)Finnigan MAT 4510。

柱体:弹性石英毛细管柱 SE-54 (30m × 0.25mm)。

色谱条件:①有机酸:100℃ $\xrightarrow{3^\circ\text{C}/\text{min}}$ 180℃。

②非有机酸:30℃ $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 150℃。

载气:氮气。

质谱条件:接口温度 240℃,质量范围 30~300。

2 结果和讨论

2.1 发酵过程中生理现象的变化

在 100ml 培养基中接入 2ml 乙酸菌 LII 菌液,观察 pH 值,氧化还原电位等参数的变化(图 1)。

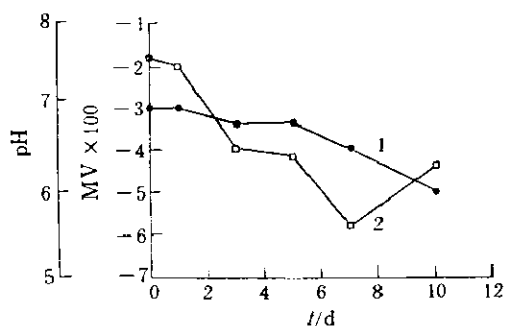


图 1 发酵过程中 pH 和氧化还原电位变化

1. pH, 2. 氧化还原电位

表 1 己酸菌 LII 发酵液定量分析

项	H	t/d			
		0	5	7	10
乙醇 (%)		2	—	—	1.16
乙酸 (mg/100ml)		380	125.5	100.0	48.3
己酸 (mg/100ml)		0	342.5	566	696.3

对己酸菌 LII 发酵过程中各种现象的检测。

发现其发酵的最终 pH 值为 6.0 左右,在发酵过程中氧化还原电位逐渐下降。这是由于氧气的消耗和还原物质的产生造成的。己酸的产量随着生物量的增加而增加,并且在发酵过程中有大量的气体产生(图 2)。

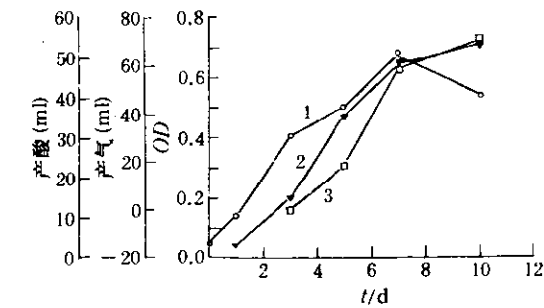


图 2 发酵过程中生物量、产酸和产气量的变化

1. 生物量, 2. 产酸量, 3. 产气量

2.2 己酸菌 LII 代谢产物的分析

2.2.1 气体: 将己酸菌 LII 接种在厌氧管内, 经过发酵后抽取气体进行气相色谱分析。结果发现主要成份为甲烷, 另外还有少量的氢气和 CO₂。

2.2.2 液体分析: 己酸菌 LII 的发酵液经苯酯化酸类分析和非苯酯化其它物质分析。色质联用仪分析结果表明酸类物质主要有乙酸、丁酸和己酸, 而非酸类物质中主要是少量乙醇和苯甲醛等。

表 2 培养基成分替代物试验

替代物	己酸量 (mg / 100ml)
丙酸钠	470
丙酮酸钠	380
丙二酸钠	0
乳酸钠	0
丁二酸钠	680
丁酸钠	180
丙 醇	30
甲 醇	0

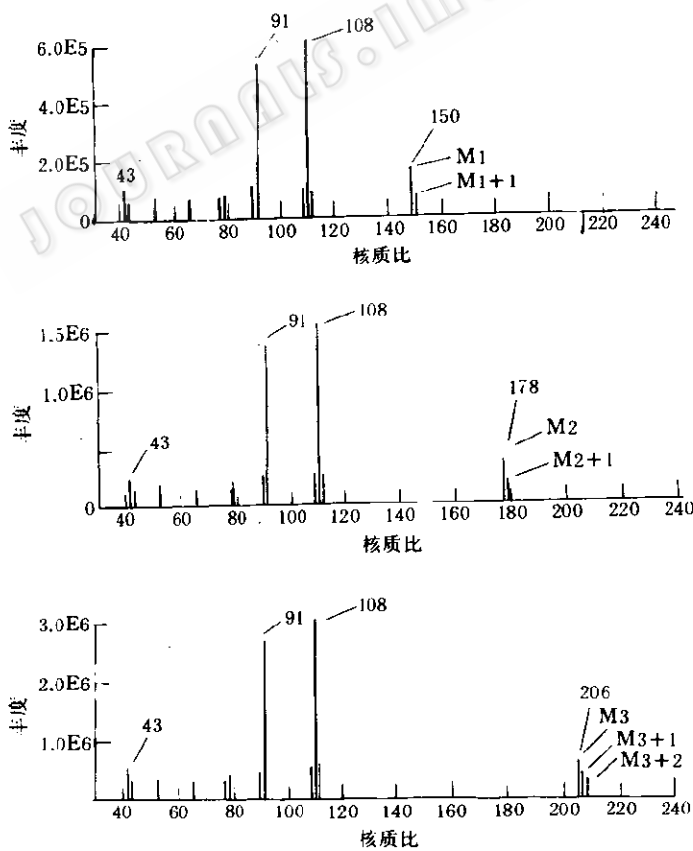


图 3 乙酸(上)、丁酸(中)、己酸苯酯(下)的质谱图

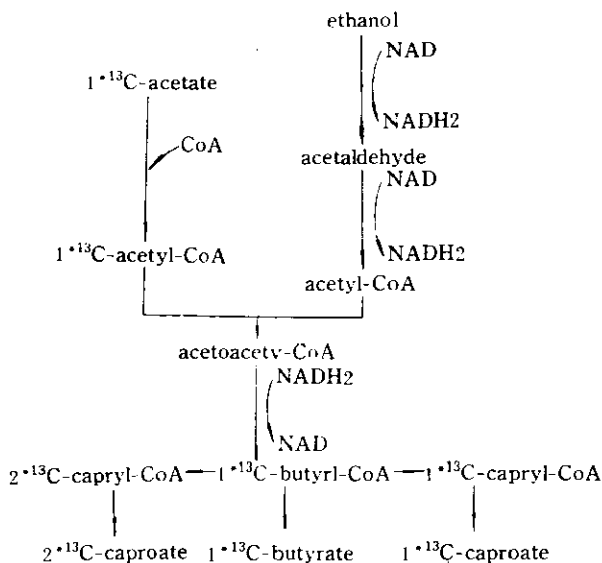


图4 己酸菌的碳源代谢途径

2.2.3 发酵液的定量分析:通过对己酸菌 LII 发酵液的定量分析,可以从发酵最初和最终的乙醇和乙酸钠的测定值推算出乙醇和乙酸钠的消耗量,进一步计算出消耗比例为 2.5 : 1。

2.2.4 培养基成份的替代物试验:以己酸菌 LII 的标准培养基试验作为对照,分别取代标准培养基中的主要碳源乙醇和乙酸进行试验,结果表明,丙酸钠、丙酮酸钠、丁二酸钠、丁酸钠替代乙酸可产生己酸。丙醇替代乙醇可产生己酸(表 2)。

2.3 己酸菌 LII 己酸合成的碳来源

在己酸菌 LII 发酵的标准培养基中,用稳定性同位素 $1-^{13}\text{C}$ -乙酸钠代替普通的未标记的乙

酸钠,用未标记的乙醇培养己酸菌 LII,采用 GC/MS 来分析其代谢产物,其结果如图 3。

从质谱图中可以看出,乙酸苄酯、丁酸苄酯和己酸苄酯的分子离子峰分别是 (M1 150), (M2 178), (M3 206)。除正常的分子离子峰外,乙酸苄酯还有同位素峰 M1+1,即样品中含有 CH_3COOH 的苄酯外,还含有 $\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$ 的苄酯。同样丁酸中还含有 M2+1 的同位素峰,己酸中还含有 M3+1, M3+2 的同位素峰。这些数据表明 ^{13}C 标记的乙酸已经作为底物被细菌转移到丁酸和己酸中去了。在己酸合成中,丁酸是中间产物,从标记的类型可以大体推测其代谢途径如图 4。

在质谱图中,同位素分子离子峰的高度代表这种同位素的丰度^[5]。也就是说,如果标记的和未标记的分子离子峰的高度比是 1 : 2,则这种化合物的同位素含量与普通化合物含量之比是 1 : 2。在代谢图中,标记的碳源来自乙酸,而未标记的碳源来自乙醇,因此这种方法可以估计乙酸和乙醇的消耗比。

参 考 文 献

- [1] 吴衍庸. 微生物学通报. 1980. 7(3): 1~3.
- [2] 沈尧坤,曾祖训. 白酒气相色谱分析. 北京: 轻工出版社, 1986, 49~53.
- [3] H. W. 多伊尔著. 郭生炎,汪训明,陈永青等译. 细菌的新陈代谢. 北京: 科学出版社, 1983. 570~582.
- [4] Houwen F P. FEMS Microbiology Letters. 1987. 41: 269.
- [5] Borne D R. Appl Environ Microbiol. 1980. 40: 626~629.

MORE STUDIES ON CAPROATE-PRODUCING BACTERIA LII

Qi Qingsheng Liu Fujin Xiao Min

(Microbiology Department of Shandong University, Jinan 250100)

Abstract Based on the detection of the optimum conditions of the caproate fermentation, we analyzed the physiology and metabolism characteristic in the process of the fermentation. The results shows that the metabolite contains acetate, butyrate, CH_4 , CO_2 and so on except caproate. Using the

stable isotope $1-^{13}\text{C}$ sodium acetate and ethanol as the substrate we analysis the fermented fluid by the technology of the GC / MS. It shows that the butyrate is the medium in the synthesis of caproate and the consuming rate of ethanol and acetate is 2.5 : 1 approximately.

Key word Caproate, Fermentation, Metabolism