

# 固定化耶氏酵母提高产 $\gamma$ -癸内酯能力

赵玉萍<sup>1,2</sup>, 徐岩<sup>1,\*</sup>, 王栋<sup>1</sup>

(1.江南大学生物工程学院酿造科学与酶技术中心,教育部工业生物技术重点实验室,江苏无锡 214122;2.淮阴工学院生命科学与化学工程学院,江苏淮安 223003)

**摘要:**通过添加凹凸棒石粘土增加了固定化细胞凝胶珠的机械强度,同时疏松了凝胶网格,增加了传质性能,提高了固定化细胞发酵生产  $\gamma$ -癸内酯的能力。其固定细胞制备工艺为:将2%海藻酸钠复合2%凹凸棒石粘土,与9g/100mL 耶氏酵母悬液等体积混匀,氯化钙浓度为2%,温度30℃,固化pH为7,时间为4h,制得固定化酵母细胞。发酵条件为:在250mL的三角瓶中装30mL发酵培养基,摇床转速为150r/min,于26℃发酵48h。以此方法生产GDL产量可达4.17g/L,是游离细胞的2.5倍。该固定化细胞重复使用3次后,GDL产量仍可达3.87g/L。

**关键词:**  $\gamma$ -癸内酯,固定化细胞,耶氏酵母,凹凸棒石粘土,海藻酸钠

## Production capacity of $\gamma$ -decalactone increased by using immobilized *Yarrowia* sp.

ZHAO Yu-ping<sup>1,2</sup>, XU Yan<sup>1,\*</sup>, WANG Dong<sup>1</sup>

(1.Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Center of Brewing Science and Enzyme Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.School of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

**Abstract:** *Yarrowia* sp. cells of better mechanical structure and mass transfer with loose net-based structure improved  $\gamma$ -decalactone yield by adding attapulgite were immobilized. The processes of preparation immobilized cells were as followed: immobilized cells were used to produce  $\gamma$ -decalactone (GDL). 2% Sodium alginate compounded with 2% attapulgite, and 9g/100mL *Yarrowia* sp. were mixed with equal volumes, calcium chloride concentration of 2%, temperature 30℃, pH 7, and the time of 4h, then immobilized yeast cells were obtained. The fermentation conditions were as followed: fermentation medium of 30mL was installed in a 250mL flask, and fermentation was proceeded at 26℃ for 48h under shaking speed of 150r/min. GDL output was up to 4.17g/L and was 2.5 times higher than that of the free cells. The immobilized cells could be used for three times, and then GDL production was still up to 3.87g/L.

**Key words:**  $\gamma$ -decalactone; immobilized cells; *Yarrowia* sp.; attapulgite; sodium alginate

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)04-0230-04

$\gamma$ -癸内酯( $\gamma$ -decalactone, GDL)广泛地存在于水果、肉制品和日常食品中,其以诱人的桃香和低香气阈值的特性而在香料工业中得到普遍应用。1969年,GDL被美国有关食品组织认为是安全的食品添加剂和药物添加剂<sup>[1]</sup>。利用生物技术生产 $\gamma$ -癸内酯普遍采用生物转化的方法,即利用酵母菌,以蓖麻油为底物,经 $\beta$ -氧化再成环,形成 $\gamma$ -癸内酯<sup>[2-6]</sup>。许多研究人员认为内酯对细胞的毒性是造成产率低下的原因之一,因此他们采用固定化技术降低毒性提高GDL产量<sup>[7]</sup>。林芳采用聚乙烯醇和卡拉胶固定化耶罗维亚酵母使GDL产量达到482mg/L<sup>[8]</sup>。凹凸棒石粘土又名坡缕石,是一种层链状结构的含水富镁铝

硅酸粘土矿物,由于其来源广泛,价格低廉,安全无毒,已有将其成功应用于固定化酶的研究<sup>[9]</sup>。本文采用海藻酸钠复合凹凸棒石粘土固定化耶氏酵母生产 $\gamma$ -癸内酯,还未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

菌种 实验室筛选得到并经诱变技术和定向选育技术获得的耶氏酵母(*Yarrowia* sp. CGMCC 2.1405),试管斜面保藏。

BCM-1000 超净工作台, QYC-211 恒温摇床, HH-6 数显恒温水浴锅, PB-10 型 pH 计, DHG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱, 3K15 台式高速冷冻离心机, DZF 6020MBE 真空干燥箱, UV-2401PC 紫外分光光度计, Spectrumlab 22PC 分光光度计, 6820 气相色谱仪。

### 1.2 培养基及配制方法<sup>[10]</sup>

1.2.1 种子培养基 葡萄糖 15g/L, 酵母膏 3g/L,

收稿日期:2011-10-13 \*通讯联系人

作者简介:赵玉萍(1977-),女,硕士研究生,副教授,研究方向:发酵工程。

基金项目:淮安市工业科技计划资助项目(HAG09040)。

表2 添加凹凸棒石粘土后凝胶珠机械强度和 GDL 产量

Table 2 The bead mechanical intensity and GDL production after adding attapulgite

凹凸棒石粘土添加量(g/L)	0(游离细胞)	0	10	20	40	60
固定化强度(g/30个)	-	629	747	963	712	549
GDL产量(g/L)	1.67	3.18	3.23	3.68	2.36	1.97

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  13g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75g/L, 吐温-80 0.2%, pH 7.5; 30mL 分装于 250mL 三角瓶, 112℃ 灭菌 20min 备用。

1.2.2 发酵培养基 麸皮 20g/L, 酵母膏 7.5g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  16.5g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/L, 吐温-80 0.2%, 蓖麻油 5%, pH 7.5; 30mL 分装于 250mL 三角瓶, 121℃ 灭菌 20min 备用。

### 1.3 实验方法

1.3.1 固定化细胞培养方法 在无菌条件下, 用接种针取一环斜面上生长的菌种, 接到种子培养基中, 在 26℃, 150r/min 的条件下培养 20h 作为一级种子。将一级种子转接培养, 于 8000r/min 离心 10min 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤 2 次, 计湿菌体重, 配成 9g/100mL 的菌悬液待用。

1.3.2 细胞固定化方法 凹凸棒石粘土的处理: 取凹土原矿, 粉碎, 研磨至 120 目, 置于烧杯中加水磁力搅拌 24h, 静置 24h, 混合液大致可分为 3 层, 弃去上层清水和下层泥沙, 取中层匀浆, 加水继续磁力搅拌 24h, 静置 24h, 取中层匀浆, 120℃ 烘箱烘干, 研磨至 120 目待用。

配制一定浓度的海藻酸钠溶液复合一定量的凹凸棒石粘土并灭菌冷却, 与预先制得的酵母菌悬液等体积混匀, 用 20mL 医用注射器吸取并滴入一定浓度的灭菌冷却的氯化钙溶液中, 静置固化一段时间, 倾去氯化钙溶液并用无菌生理盐水洗涤 3 次, 即得包埋了酵母细胞的凝胶珠<sup>[11]</sup>。

1.3.3 固定化条件选择 海藻酸钠浓度的确定: 不同浓度的海藻酸钠会对固定化结果产生不同的影响。分别取 1%、2%、3%、4% 的海藻酸钠, 确定凹凸棒石粘土的添加量为 10%, 氯化钙浓度 2%, 固化温度 30℃, 固化 pH 6, 静置固化 2h, 倾去氯化钙溶液并用无菌生理盐水洗涤 3 次, 由制得凝胶珠的成球性、机械强度及发酵产 GDL 能力, 得到海藻酸钠的最佳浓度。

以上述方法, 进行单因素实验, 确定最佳凹凸棒石粘土的添加量、氯化钙浓度、固化温度、固化 pH 和固化时间。

1.3.4 固定化细胞发酵培养 在 26℃、150r/min 的条件下培养 48h 后, 检测 GDL 的产量。

1.3.5 固定化细胞可重复使用性的测试 将制得的凝胶珠用于发酵, 测定其 GDL 产量, 发酵完成后收集凝胶珠用于第 2 次发酵, 再次测定第 2 次发酵终点 GDL 产量, 如此重复使用凝胶珠直至珠体破坏或 GDL 产量急剧下降, 通过 GDL 的产量确定该工艺制备的凝胶珠可重复发酵的次数。

1.3.6 固定化细胞与游离细胞发酵能力的比较 固定化细胞的发酵能力: 称取适量固定化酵母接入发酵培养基, 摇床转速 150r/min, 于 26℃ 发酵 48h, 测定 GDL 产量。

游离细胞的发酵能力: 采用与固定化酵母活菌数相同的量直接接入发酵培养基, 在相同条件下进行发酵并测定 GDL 产量。

### 1.3.7 分析检测项目及其方法

1.3.7.1 固定化细胞机械强度的测定<sup>[12]</sup> 取 30 个固定化耶氏酵母颗粒, 测定使其变形一半时所需的力。

1.3.7.2  $\gamma$ -癸内酯定量测定方法 发酵液离心去除菌体, 上清液酸化至 pH = 2, 乙酸乙酯室温萃取, 吸取一定量上层有机相加内标后通过气相进行检测<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 海藻酸钠浓度的确定

选择海藻酸钠浓度进行单因素实验, 以凝胶珠机械强度和 GDL 产量作为考核指标, 对耶氏酵母进行固定化、发酵。凝胶珠机械强度和 GDL 产量如表 1 所示。

表1 凝胶珠机械强度和 GDL 产量

Table 1 The bead mechanical intensity and GDL production

海藻酸钠浓度(%)	0(游离细胞)	1	2	3	4
固定化强度(g/30个)	-	397	629	833	996
GDL产量(g/L)	1.67	2.84	3.18	2.75	2.67

由表 1 可以看出, 随着海藻酸钠浓度的提高, 其机械强度越大。当海藻酸钠浓度取 2% 时, GDL 产量达到最高。可能由于海藻酸钠浓度过高则形成的凝胶珠过于致密而导致传质性能下降, 而海藻酸钠浓度过低时形成的凝胶珠不够致密、机械强度较低导致细胞固定率及在发酵实验中凝胶珠破碎影响了实验结果。另外, 实验中还发现当海藻酸钠浓度为 1% 时, 在固定中已不易成球。海藻酸钠浓度取 2% 时, 有利于耶氏酵母代谢产物 GDL 的合成, 但在发酵后期发现凝胶珠有一定的破损, 因此考虑通过添加凹凸棒石粘土来提高其机械强度及改善固定效果。

### 2.2 凹凸棒石粘土添加量的确定

在 1L 的 2% 海藻酸钠溶液中添加 0、10、20、40 和 60g 的凹凸棒石粘土, 使其终浓度达到 0、10、20、40 和 60g/L, 氯化钙浓度为 2%, 固化 pH 为 6, 于 30℃ 固化 2h, 实验结果如表 2 所示。

本研究将凹凸棒石粘土添加到海藻酸钠中制备固定化细胞, 增大了凝胶颗粒的密度及颗粒机械强度, 当添加量为 20g/L 时, 机械强度最大达 963g/30 个, 且 GDL 产量有了明显提高达 3.68g/L, 发酵结束凝胶珠几乎可以保持形态, 这可能是因为凹土疏松了凝胶网格, 增加了传质性能。但当添加量为 30g/L 时, 凝胶颗粒结构反而变得疏松、弹性下降, 再进一步增加添加量甚至无法形成颗粒, 且 GDL 产量也降低, 在发酵后期凝胶珠破损严重。此外, 由于凹凸棒石粘土价格相对低廉, 与海藻酸钠混合使用, 可以降低成本, 是一种合理有效的实际应用方法。

### 2.3 氯化钙浓度的确定

选择氯化钙浓度分别为 1%、1.5%、2% 和 2.5%,

并以游离细胞作为对照进行实验,测定 GDL 产量,其结果如图 1 所示。

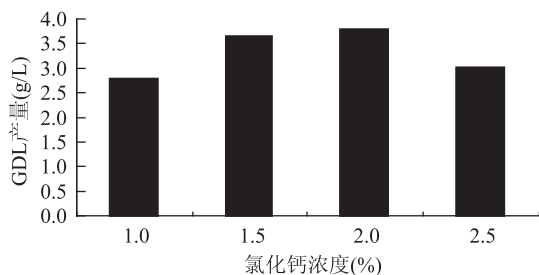


图 1 固定化细胞中氯化钙浓度对 GDL 产量的影响

Fig.1 Effect of CaCl<sub>2</sub> concentration on the production of GDL with immobilized cells

由图 1 可以看出,氯化钙浓度 1.5%~2% 时,发酵产物 GDL 的产量高于其它浓度值,可能是由于氯化钙浓度过低时,不能与海藻酸钠整合成足够致密的凝胶珠,导致细胞固定率下降,凝胶珠对细胞的保护作用也下降;氯化钙浓度过高则使得凝胶珠太过致密而导致传质性能下降。因此确定最适氯化钙浓度为 2%。

## 2.4 固化温度的确定

选择固化温度为 10、20、30 和 40℃ 进行实验,比较了不同固化温度下制得凝胶珠发酵产 GDL 的能力,实验结果如图 2 所示。

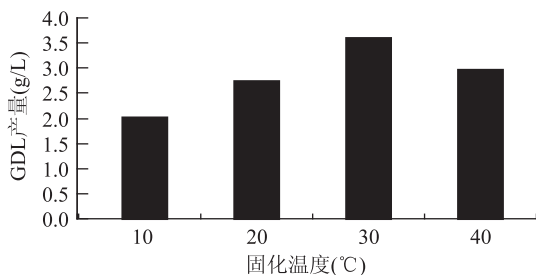


图 2 固定温度对 GDL 产量的影响

Fig.2 Effect of temperature on the production of GDL with immobilized cells

由图 2 可知,随着固化温度的升高,GDL 产量逐渐变大,当温度达到 40℃ 时,GDL 产量下降,原因可能是在一定的温度范围内,较利于形成机械强度较好、通透性较强的凝胶珠,当温度升高时,一方面形成的凝胶珠性能不够好,另一方面菌体因温度太高,有部分死亡,影响了后继的发酵转化实验。因此选择固化温度为 30℃。

## 2.5 固化 pH 的确定

选择固化 pH 为 4、5、6、7、8、9 进行实验,比较了不同固化 pH 制得凝胶珠发酵产 GDL 的能力,实验结果如图 3 所示。

由图 3 可知,固化 pH 为 6~7 时,GDL 产量最高,固化 pH 对 GDL 产量的影响可能是因为不同 pH 影响了凝胶珠的网孔结构的形成。

## 2.6 固化时间的确定

选择固化时间分别为 2、4、6、8h 进行实验,比较了不同固化时间制得凝胶珠发酵产 GDL 的能力,实验结果如图 4 所示。

由图 4 可知,随着固化时间的延长,GDL 产量进

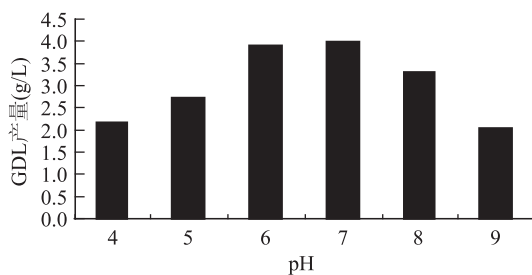


图 3 固定化 pH 对 GDL 产量的影响

Fig.3 Effect of pH on the production of GDL with immobilized cells

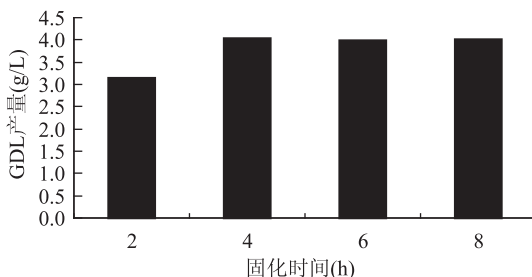


图 4 固定化时间对 GDL 产量的影响

Fig.4 Effect of time on the production of GDL with immobilized cells

一步增加,但超过 4h 后增加不明显,选择固化 4h 为最佳固化时间。

## 2.7 固定化细胞可重复使用性的测试

2% 海藻酸钠复合 2% 的凹凸棒石粘土,灭菌冷却,与预先制得的酵母菌悬液(温菌体 9g/100mL)等体积混匀,用 20mL 医用注射器吸取并滴入 2% 的灭菌冷却的氯化钙溶液中,pH 为 7,静置固化 4h,倾去氯化钙溶液并用无菌生理盐水洗涤 3 次,获得固定化酵母细胞,以游离细胞为对照,将固定化细胞连续使用 4 次,研究固定化细胞可重复使用次数,结果如图 5 所示。

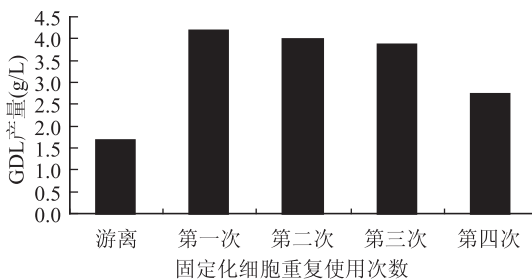


图 5 重复使用固定化细胞转化生产 GDL

Fig.5 Repeated use of immobilized cells to produce GDL

由图 5 可知,固定化细胞第一次使用时即采用 1.3.4 条件培养后,GDL 产量达 4.17g/L,比游离细胞高 2.5 倍,随着使用次数的增加,固定化细胞的产量逐渐降低,使用第三次时,GDL 产量可达 3.87g/L,第四次时,GDL 产量降至 2.73g/L,且在发酵后期,凝胶珠破损率较高,由此可知,使用该工艺制得的凝胶珠可重复使用 3 次,大大节约了生产成本。因此,固定化细胞可作为提高 GDL 产量的一种行之有效的方法。

## 3 结论

综上所述,采用固定化细胞发酵生产 GDL,固定



化细胞制备工艺和参数如下:采用2%海藻酸钠复合2%的凹凸棒石粘土,灭菌冷却,与预先制得的酵母菌悬液(湿菌体9g/100mL)等体积混匀,用20mL医用注射器吸取并滴入2%的灭菌冷却的氯化钙溶液中,30℃下调pH为7,静置固化4h,倾去氯化钙溶液并用无菌生理盐水洗涤3次,获得固定化酵母细胞。在250mL的三角瓶中装30mL发酵培养基,摇床转速为150r/min,于26℃发酵48h,GDL产量可达4.17g/L,比游离细胞高2.5倍。以该工艺制得的固定化酵母细胞可重复使用3次,第3次的GDL产量仍可达3.87g/L。实验证明采用固定化细胞发酵转化法提高GDL产量是一种行之有效的方法。

### 参考文献

- [1] Siek T J, Albin I A, Sather L A, et al. Comparison of flavor thresholds of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols, and ketones [J]. Journal of Dairy Science, 1971, 54: 1-9.
- [2] Gilles F, Caroline B P, Isabelle K, et al. Metabolism of fatty acid in yeast: Characterisation of  $\beta$ -oxidation and ultrastructural changes in the genus *Sporidio-bolus sp.* cultivated on ricinoleic acid methyl ester [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 250: 63-69.
- [3] Palmela V, Maurice NJ, Diana SZ, et al. Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli [J]. Food Chemistry, 2008, 108: 1217-1225.

(上接第229页)

$\beta$ -1,3-葡聚糖酶的粗酶液后,经硫酸铵盐析发现当饱和度为80%时出现最大盐析峰,但是饱和度为70%时酶活达到最高,因此确定硫酸铵盐析最佳饱和度和为70%。

**3.2 粗酶液经过硫酸铵40%~70%分段盐析、透析浓缩、DEAE-Sephadex A-50离子交换层析、Sephadex G-75凝胶过滤层析等的分离纯化后,实验测得内切 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的比活力由20.90U/mg提高到933.37U/mg,纯化倍数为44.7倍,酶活回收率为11.6%。**

**3.3 浓缩纯化后的含酶组分,经过SDS-PAGE电泳分析,可发现酶蛋白呈单一条带,分子量约为45ku。**

### 参考文献

- [1] 李兆兰. 裂褶多糖的结构研究[J]. 南京大学学报:自然科学版, 1994, 30(3): 482-486.
- [2] 王振河, 霍云凤. 裂褶菌及裂褶菌多糖研究进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 73-76.
- [3] Kikumoto S, Yamamoto O, Komatsu N. Method of producing neoschizophyllan having novel pharmacological activity [J]. United States Patent, 1978(4): 661.
- [4] Jung Min Song, Kiwoong Nam, Young-Uk Sun. Molecular and biochemical characterizations of a novel arthropod endo- $\beta$ -1,3-glucanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*, horizontally acquired from bacteria [J]. Comparative Biochemistry

[4] 宋焕禄, 刘晋芳, 吕跃钢. 耶罗维亚酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 发酵蓖麻油制备  $\gamma$ -癸内酯的研究 [J]. 中国食品学报, 2007(5): 102-107.

[5] Schrader J, Etschmann MMW, Sell D, et al. Applied biocatalysts for the synthesis of natural flavour compounds current industrial processes and future prospects [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26: 463-472.

[6] 苏畅, 杜毅, 陈洪, 等. 微生物发酵法生产  $\gamma$ -癸内酯的研究 [J]. 食品工业科技, 2004(10): 118-119.

[7] Feron G, Dufosse L, Pierard E, et al. Production, identification and toxicity of  $\gamma$ -decalactone and 4-hydroxydecanoic acid from *Sporidiobolus sp.* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(8): 2826-2831.

[8] 林芳, 张伟国. 固定化耶罗维亚酵母发酵生产  $\gamma$ -癸内酯 [J]. 生物技术, 2008, 18(5): 66-69.

[9] 李雪雁, 王玉丽. 凹凸棒土-壳聚糖耦合固定化乳糖酶及其在低乳糖乳制备中的应用 [J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(2): 149-152.

[10] 仲惠, 赵玉萍, 李文谦, 等. 原生质体融合法构建  $\gamma$ -癸内酯高产菌株 [J]. 中国酿造, 2011(5): 102-105.

[11] 张春红, 张莹, 赵菲. 利用固定化酶改善酸法大豆浓缩蛋白持水性和吸油性的研究 [J]. 食品工业科技, 2011(3): 208-214.

[12] 杨秋明, 郭彩华, 蔡慧农, 等. 耐盐酵母固定化方法的初步研究 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(6): 85-93.

[13] 于伟, 徐岩, 喻晓蔚, 等. 生物法转化分离耦合制备  $\gamma$ -癸内酯研究 [J]. 化工进展, 2007, 26(8): 1151-1154.

and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 155(4): 403-412.

[5] Alexander M Zakharenko, Mikhail I Kusaykin, Svetlana N Kovalchuk. Enzymatic and molecular characterization of an endo-1,3- $\beta$ -d-glucanase from the crystalline styles of the mussel *Perna viridis* [J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(2): 243-252.

[6] Ana-Belén Martín-Cuadrado, Thierry Fontaine. Characterization of the endo- $\beta$ -1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(4): 542-553.

[7] Bei-Wei Zhu, Jun-Gang Zhao, Jing-Feng Yang. Purification and partial characterization of a novel  $\beta$ -1,3-glucanase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus* [J]. Process Biochemistry, 2008, 43(10): 1102-1106.

[8] Kyoung-Mi Lee, Marimuthu Jeya, Ah-Reum Joo. Purification and characterization of a thermostable endo- $\beta$ -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3-4): 206-211.

[9] Brodford M M. Determination of trace amount of proteins by (CBB)G-250 [J]. Anal Biochem, 1996, 204(2): 254-256.

[10] 张龙翔. 生化实验方法和技术 [M]. 人民教育出版社, 1982.

[11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-100.