

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20130176

费氏丙酸菌的固定化方法及其发酵丙酸的工艺条件研究

马志刚, 王亚军, 王德培
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为提高丙酸发酵效率, 进行了固定化费氏丙酸菌发酵丙酸的研究. 采取吸附-包埋结合法, 先以麸皮进行吸附, 再用海藻酸钠-聚乙烯醇进行包埋制备固定化细胞. 通过正交实验确定了固定化细胞的工艺条件: 菌液与麸皮比例为 5 mL : 0.6 g, 吸附时间为 15 min, 包埋剂选用海藻酸钠和聚乙烯醇混合物, 质量比为 3 : 3, 此条件下的包埋效率达到 96.86%. 初步研究了碳源及其质量浓度对固定化细胞生产丙酸的影响, 确定了以乳酸钠为碳源, 质量浓度为 40 g/L, 丙酸产量可达 13.75 g/L.

关键词: 费氏丙酸菌; 固定化; 载体; 丙酸; 工艺条件

中图分类号: Q93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2015)01-0025-04

Immobilization of *Propionibacterium freudenreichii* and the Processing Condition of its Propionic Acid Fermentation

MA Zhigang, WANG Yajun, WANG Depei
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of propionic acid fermentation, propionic acid fermentation with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* were investigated. Adsorption-entrapping method was used to prepare immobilized cells with bran as the adsorbent and CA-PVA as the entrapping material. Through orthogonal experiment, the propionic acid immobilized cells' fermentation process conditions were determined. The proportion of bacterium solution to bran was 5 mL : 0.6 g, the adsorption time was 15 min, the entrapping agent was the mixture of CA and PVA, the mass ratio was 3 : 3. Under this immobilization conditions, the encapsulation efficiency reached 96.86%. The effect of the carbon sources and their concentration on propionic acid production were investigated. The experimental results showed that the sodium lactate was a better carbon source. When the sodium lactate concentration was 40 g/L, the yield of propionic acid reached 13.75 g/L.

Key words: *Propionibacterium freudenreichii*; immobilization; carrier; propionic acid; process condition

丙酸作为一种重要的大宗化学品, 广泛应用于各种工业生产中^[1-3]. 丙酸的生产方法有化学合成法和生物发酵法^[4-7], 由于发酵法生产效率低、成本高^[8], 目前, 丙酸的工业化生产方法为化学合成法^[9]. 因此, 如何提高生产效率是实现发酵法生产丙酸的技术关键. 固定化丙酸菌是提高丙酸生产能力的有效方法之一^[10].

本文采用吸附-包埋结合法, 根据前期实验中通过对玉米芯粉、麸皮和米糠几种吸附剂固定化细胞的稳定性、包埋效率以及发酵丙酸能力的综合考虑, 选择以麸皮作为吸附剂, 然后采用两种不同比例包埋

剂, 增强细胞固定效果, 提高固定化细胞使用效率, 从而提高丙酸生产能力.

1 材料与amp;方法

1.1 菌种

费氏丙酸菌 (*Propionibacterium freudenreichii*), 本实验室保存.

1.2 培养基

活化培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, 磷酸铵 5, pH 7.2.

收稿日期: 2013-12-26; 修回日期: 2014-08-11

作者简介: 马志刚 (1981—), 男, 河北人, 硕士研究生; 通信作者: 王德培, 教授, wangdp@tust.edu.cn.

丙酸菌增殖培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, 磷酸铵 5, 碳酸钙 3, pH 7.2.

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 10, 磷酸铵 5, 碳酸钙 3, pH 7.2.

1.3 培养方法

1.3.1 费氏丙酸菌的增殖培养

将活化好的菌株接到 50 mL (250 mL 三角瓶) 增殖培养基中, 接种量为 2%, 30 °C、180 r/min 摇床培养 20 h.

1.3.2 固定化费氏丙酸菌的发酵培养

接种量为 3%, 装液量为 250 mL, 磨口三角瓶装液 100 mL, 发酵温度 30 °C, 静置培养 72 h.

1.4 实验方法

1.4.1 固定化菌体的制备

(1) 菌悬液的制备: 取已增殖培养的丙酸菌液 200 mL 放入离心杯中, 18 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 再加入生理盐水摇匀, 然后离心洗涤 2 次. 加入 60 mL 无菌水摇匀制成菌悬液.

(2) 包埋剂的制备: 按比例称取一定量的聚乙烯醇(PVA)和海藻酸钠(CA), 加入 15 mL 去离子水加热溶化, 搅拌至充分混合, 封口, 放置到灭菌锅中, 115 °C 灭菌 20 min.

(3) 交联剂的制备: 称取一定量的硼酸、无水氯化钙按比例溶于水中, 配成 30 g/L 的氯化钙溶液以及 30 g/L 氯化钙和 30 g/L 硼酸的混合溶液.

(4) 固定化凝胶菌球的成型: 按比例向 5 mL 菌悬液中加入 0.6 g 吸附剂(麸皮), 混匀, 吸附 10 min, 然后将配好的包埋剂倒入上述混合液中, 混匀, 利用注射器吸取并滴入到交联剂溶液中, 形成菌球.

(5) 交联: 将该菌球交联 24 h, 用生理盐水冲洗, 然后转到生理盐水中, 置于 4 °C 冰箱保存.

1.4.2 包埋剂比例及交联剂的确定

选择海藻酸钠和聚乙烯醇作为包埋剂, CA 与 PVA 质量比(g : g) 分别为: 3 : 8、3 : 6、3 : 4、2 : 8、2 : 6、2 : 4, 总体积 20 mL.

选择 30 g/L 氯化钙、30 g/L 硼酸的混合溶液和单独的 30 g/L 氯化钙溶液作为交联剂制备固定化菌球, 观察球体状况.

1.4.3 正交实验确定固定化菌体制备条件

正交实验因素及水平见表 1.

表 1 正交实验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

水平	因素		
	V(菌液) : m(麸皮) / (mL : g)	m(CA) : m(PVA) / (g : g)	吸附时间 / min
1	5.0 : 0.4	3 : 4	5
2	5.0 : 0.6	3 : 3	10
3	5.0 : 0.8	2 : 4	15

1.4.4 碳源对固定化丙酸菌产丙酸的影响

分别以葡萄糖和乳酸钠为碳源进行丙酸发酵, 测定丙酸含量, 计算丙酸转化率.

1.5 分析方法

1.5.1 包埋效率的计算

总活菌数: 采用 10 μL 微量菌落计数法.

菌球表面游离与洗脱菌数: 将制好的菌球加入生理盐水冲洗, 洗液作活菌计数.

包埋效率 = (总菌数 - 游离与洗脱菌数之和) / 总活菌数 × 100%

1.5.2 丙酸菌代谢产物丙酸的测定

参见文献[11].

2 结果与讨论

2.1 包埋剂比例及交联剂的确定

不同包埋剂比例、不同交联剂固定化后的实验结果见表 2. 对于不同包埋剂比例, 以 30 g/L 氯化钙为交联剂固定化后的菌球状况均优于 30 g/L 氯化钙和 30 g/L 硼酸混合溶液作为交联剂的菌球状况, 因此选择 30 g/L 氯化钙溶液为交联剂; 对于 CA 与 PVA 质量比分别为 3 : 4 和 2 : 4 的包埋剂, 成球较好.

表 2 不同包埋剂比例、不同交联剂固定化后的菌球状况

Tab. 2 Immobilized test result of different ratio of entrapping agent to cross-linking agent

m(CA) : m(PVA) / (g : g)	菌球状况	
	30 g/L 氯化钙和 30 g/L 硼酸混合溶液	30 g/L 氯化钙溶液
3 : 8	成球不规则, 拖尾严重而且出现严重的粘连	成球不规则, 有严重拖尾但不出现粘连
3 : 6	成球形状规则, 但球体太软, 有轻微的拖尾, 而且有严重的粘连现象	轻微的拖尾, 没有粘连
3 : 4	成球较好, 稍稍偏软, 有轻微拖尾但基本无碍, 有一定的粘连不过菌球弹性得到很大的改善	成球较好, 球体较大, 有弹性没有粘连
2 : 8	能成球, 但球体太软且迅速就粘连到一起	成球形状好, 但太软, 没有粘连
2 : 6	成球好, 稍稍缺乏硬度, 粘连情况有所缓解, 但最终还是粘在一起	成球好, 球略软
2 : 4	成球很好, 有一定的硬度且只有轻微粘连,	成球很好, 有一定硬度且没有粘连

2.2 正交实验确定固定化菌体制备条件

正交实验结果及极差分析、方差分析分别见表 3 和表 4。

表 3 正交实验结果及极差分析

Tab. 3 Analysis of orthogonal design result and range

实验号	V(菌液): m(麸皮)	m(CA): m(PVA)	吸附 时间	包埋效 率/%
1	1	1	1	92.83
2	1	2	2	94.21
3	1	3	3	95.78
4	2	1	2	94.74
5	2	2	3	96.86
6	2	3	1	92.95
7	3	1	3	95.20
8	3	2	1	93.51
9	3	3	2	92.59
k_1	94.273	94.257	93.097	
k_2	94.850	94.860	93.847	
k_3	93.767	93.773	95.947	
R	1.083	1.087	2.850	

表 4 正交实验方差分析

Tab. 4 Analysis of orthogonal design variance

因素	偏差 平方和	自由度	F 值	F 临 界值	显著性
V(菌液): m(麸皮)	1.763	2	2.708	19.000	
m(CA): m(PVA)	1.778	2	2.731	19.000	
吸附时间	13.095	2	20.115	19.000	*
误差	0.650	2			

根据正交实验结果可确定固定化细胞发酵丙酸的最佳工艺条件为: 菌液与麸皮比例为 5 mL : 0.6 g, 包埋剂的 CA 与 PVA 质量比为 3 : 3, 吸附时间为 15 min, 此时的包埋效率为 96.86%。

根据方差分析结果, 比较各因素对发酵丙酸产量的影响可知, 影响最显著的是吸附时间, 其次是包埋剂比例, 影响最小的是菌液与吸附剂的比例。

表 5 葡萄糖为底物时丙酸转化率

Tab. 5 Analysis of production data with glucose as the substrate

葡萄糖质量 浓度/(g·L ⁻¹)	丙酸转化率/%					平均值	方差
	1	2	3	4	5		
20	53.90	52.70	53.10	53.05	52.75	53.10	0.185 0
40	28.85	27.60	28.08	28.30	28.10	28.19	0.163 2
60	17.52	17.20	17.68	17.57	17.53	17.50	0.025 7
80	8.64	8.48	8.48	8.66	8.35	8.52	0.013 2

2.3.2 乳酸钠质量浓度对丙酸菌发酵的影响

不同质量浓度乳酸钠为碳源时费氏丙酸菌的丙酸生产曲线见图 2。从图 2 可以看出: 发酵 8 h, 以 40 g/L 乳酸钠为碳源时丙酸产生速率较快; 发酵到

2.3 碳源对固定化丙酸菌产丙酸的影响

2.3.1 葡萄糖质量浓度对丙酸菌发酵的影响

不同质量浓度葡萄糖为碳源时费氏丙酸菌的丙酸生产曲线见图 1。从图 1 可以看出: 发酵 8 h, 各质量浓度葡萄糖为碳源的丙酸产生速率均较快, 丙酸产生速率分别为 0.98、0.78、0.53、0.54 g/(L·h); 随着发酵时间的增加, 较低质量浓度葡萄糖为碳源的产酸速率大于高质量浓度的葡萄糖, 并逐渐趋于平缓, 这是因为酸的产生抑制了丙酸菌的发酵^[12]。同时可以看出: 葡萄糖(底物)质量浓度越高, 对丙酸菌的抑制作用越强, 底物的利用率越低; 以 40 g/L 葡萄糖为碳源, 发酵 56 h 丙酸产量达到最大值。

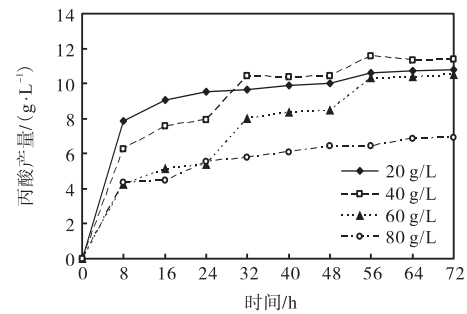


图 1 葡萄糖为碳源时费氏丙酸菌的丙酸生产曲线

Fig. 1 Propionic acid production by *P. freudenreichii* with glucose as the carbon source

不同质量浓度葡萄糖为底物时的丙酸转化率见表 5。从图 1 和表 5 可以看出: 60、80 g/L 葡萄糖质量浓度的丙酸转化率低, 发酵效果不理想; 20、40 g/L 葡萄糖为底物的丙酸产量(丙酸产量 = 葡萄糖质量浓度 × 丙酸转化率)分别为 10.62、11.28 g/L。可见, 虽然与 20 g/L 葡萄糖为底物的丙酸转化率(53.10%)相比, 40 g/L 的丙酸转化率相对较低(28.19%), 但其丙酸产量较高, 是较适合的底物浓度。

32 h 时, 以 20、40、60 g/L 乳酸钠为碳源的丙酸产生速率趋于平稳, 分别为 0.28、0.29、0.25 g/(L·h); 随着时间的增加, 以 40 g/L 乳酸钠为碳源的产酸速率高于其他浓度, 发酵 64 h 丙酸产量达到最大值。

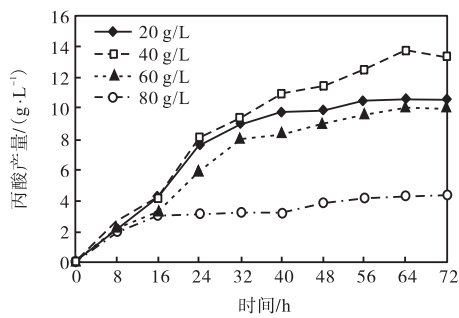


图2 乳酸钠为碳源时费氏丙酸菌的丙酸生产曲线
Fig. 2 Propionic acid production by *P. freudenreichii* with sodium lactate as the carbon source

表6 乳酸钠为底物时的丙酸转化率

Tab. 6 Analysis of production data with sodium lactate as the substrate

乳酸钠质量 浓度/(g·L ⁻¹)	丙酸转化率/%					平均值	方差
	1	2	3	4	5		
20	52.14	52.61	52.34	52.74	52.37	52.44	0.044 8
40	34.58	34.35	34.23	34.30	34.45	34.38	0.014 9
60	16.75	16.68	16.87	16.63	16.77	16.74	0.006 7
80	5.51	5.45	5.61	5.49	5.50	5.51	0.002 8

从以上葡萄糖和乳酸钠为碳源的实验结果可以看出:发酵初期的碳源消耗较大,丙酸产生速率较高;随后的发酵中,以葡萄糖为碳源的发酵曲线相对平缓,以乳酸钠为碳源的曲线呈梯度缓慢上升直至发酵中后期.出现此结果是因为,丙酸菌以葡萄糖和以乳酸钠为碳源时代谢途径不同,当以葡萄糖为单一碳源时,丙酸积累到一定浓度会对菌株生长和产酸产生反馈抑制,所以发酵 8 h 后丙酸浓度上升平缓.与 40 g/L 葡萄糖相比,40 g/L 乳酸钠的丙酸产量较高,为 13.75 g/L,丙酸转化率为 34.38%,与 Lewis 等^[12]的结论一致.

3 结 论

本文通过实验确定了先以麸皮进行吸附,再用海藻酸钠-聚乙烯醇进行包埋的方法制备固定化细胞.确定了固定化细胞的工艺条件:菌液与麸皮比例为 5 mL : 0.6 g,吸附时间为 15 min,包埋剂的海藻酸钠与聚乙烯醇质量比为 3 : 3,此条件下的包埋效率为 96.86%.

分别以葡萄糖、乳酸钠作为单一碳源,进行固定化丙酸菌发酵生产丙酸,相比 40 g/L 葡萄糖,40 g/L 乳酸钠丙酸产量高,达到 13.75 g/L,丙酸转化率也高,达到 34.38%,是丙酸发酵较好的碳源.

参考文献:

[1] 孟晖. 三丙市场需求强劲前景看好:丙醛,丙醇,丙酸

不同质量浓度乳酸钠为底物时的丙酸转化率见表 6. 从图 2 和表 6 可以看出:80 g/L 乳酸钠为底物的丙酸产量为 4.41 g/L,丙酸转化率为 5.51%,丙酸产量和丙酸转化率都很低;20、40、60 g/L 乳酸钠为底物的丙酸产量分别为 10.49、13.75、10.04 g/L,都在 10 g/L 以上,但 60 g/L 乳酸钠为底物的丙酸转化率(16.74%)较低;另外,虽然与 20 g/L 乳酸钠为底物的丙酸转化率(52.44%)相比,40 g/L 的丙酸转化率相对较低(34.38%),但其丙酸产量(13.75 g/L)较高,是较适合的底物浓度.

生产与市场分析[J]. 中国石油和化工,2004(7):28-30.

[2] 菅秀君,丁文光,胡望明. 丙酸的生产工艺及应用前景[J]. 齐鲁石油化工,2004,32(1):32-35.

[3] 周纯海,黄科林,宁红,等. 丙酸的合成进展和应用以及市场前景[J]. 化工技术与开发,2006,35(7):11-13.

[4] 廖列文,崔英德. 丙酸及其酯类的合成与应用进展[J]. 化工进展,2001,20(8):38-41.

[5] 董翠平,郝兴锋. 丙酸的生产技术及市场前景[J]. 精细石油化工进展,2003,4(2):51-54.

[6] 张华峰,康慧. 微生物发酵法生产丙酸[J]. 饲料工业,2004,25(8):29-33.

[7] 熊海燕,王为国,曾东方,等. 微生物发酵法生产丙酸的研究进展[J]. 江苏调味副食品,2005,22(5):10-13.

[8] Goswami V, Srivastava A. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(5/6):676-680.

[9] Goswami V, Srivastava A K. Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 4(2):121-128.

[10] 赵树欣,梁慧珍,程丽娟,等. 固定化丙酸菌发酵底物的研究[J]. 中国食品添加剂,2005(1):7-11.

[11] 揣玉多,王德培,王艳萍,等. 丙酸高产菌株的复合诱变选育[J]. 食品与发酵工业,2007,33(6):45-49.

[12] Lewis V P, Yang S T. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: Effect of growth substrate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 37(4):437-442.

责任编辑:常涛