

# 海藻酸盐固定化北京丙酸杆菌丙酸发酵的研究

王蓓 金石沅 乐华爱

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道利用海藻酸钠固定化北京丙酸杆菌, 及其丙酸发酵的最适条件。最适海藻酸钠和菌体的起始浓度分别为2%和100% (w/v)。菌体和海藻酸盐混合滴入  $\text{CaCl}_2$  溶液中得到直径为3—4 mm球形颗粒。将固定化细胞放入25ml厌氧管中5 g颗粒/15ml培养基。其成分为(%)：葡萄糖1，酵母膏0.5， $\text{CaCl}_2$  0.1。30℃静置培养产生大量的挥发酸，丙酸对乙酸的比例接近10:1。固定化细胞重复利用发酵30次，保持稳定活性65天。

**关键词** 北京丙酸杆菌；海藻酸钠；丙酸发酵；

北京丙酸杆菌是本实验室分离鉴定的新种，该菌的基本特性和丙酸发酵条件已有报道<sup>[1, 2]</sup>它是一个有应用前景的菌株。由于丙酸及其钙钠盐有较强的抑菌作用，可用作食品和饲料添加剂。丙酸还能用来制造香料，生产溶剂，作为某些药物合成的原料，因此对丙酸的需求量极大。尽管过去几十年内对细菌发酵生产丙酸进行了许多研究，但因批式发酵周期长，菌体重复使用困难，导致成本过高。

随着固定化细胞技术的兴起与发展，人们将此技术引入丙酸发酵的研究中，借此克服丙酸发酵的不利因素。Воробьева等<sup>[3]</sup>用聚丙烯酰胺凝胶固定化丙酸杆菌，Clausen等<sup>[4]</sup>将丙酸杆菌用明胶-琼脂包埋。Cavin等<sup>[5]</sup>描述了用海藻酸钙包埋丙酸菌细胞的连续反应罐，对工业应用有吸引力。本文报道，以价格低廉、无毒安全、操作简便的海藻酸钠对北京丙酸杆菌进行包埋和固定化细胞丙酸发酵的研究结果。

## 材料和方法

### (一) 菌种

北京丙酸杆菌 *Propionibacterium beijingense* p. 是我组由沼气发酵液中分离鉴定的新种<sup>[1]</sup>。

### (二) 细菌培养

将菌接到BPYL<sup>[2]</sup>斜面上，用抽空气换氮气法于厌氧罐中，30℃培养4天。然后转入三角瓶培养基，其成分为(%)：葡萄糖2，酵母膏1，蛋白胨1，30℃静置培养3天。经K70D冷冻离心机4000rpm离心，收集菌体，并用生理盐水洗一次，得湿菌体，即可使用。

### (三) 固定化细胞的制备

称取湿菌体10g悬浮于10ml无菌水中，与10ml 2% (w/v) 海藻酸钠溶液充分混匀，混合物通过内径1 mm胶管在恒流泵带动下注入1%  $\text{CaCl}_2$  溶液中，形成直径3—4 mm的小圆球，即成固定化颗粒。颗粒在室温下放置于1%  $\text{CaCl}_2$  溶液中泡1—2 h，再用无菌水冲洗干净即可使用。或装在含水分的烧杯中，于普通冰箱(3—4℃)保存备用。

### (四) 分析方法

本文于1990年10月30日收到。  
国家自然科学基金资助项目。

1. 菌体计数: 菌体密度、湿重、干重按一般常规。稀释平板计数按照Yong-smith的方法<sup>[1]</sup>。

2. 挥发酸: 采用 Shimadzu GC-7AG 气相色谱测定丙酸和乙酸。取酸化后的反应液 1  $\mu$ l 进行测定。色谱柱及其他条件同前报<sup>[1]</sup>。

## 结 果

### (一) 不同培养方式收获的细胞固定化后产酸力的比较

将 1 支斜面菌体接入 500ml 三角瓶培养基中, 静置或摇床培养 3 天收集菌体, 制备的固定化细胞, 培养发酵后测定结果如图 1。静置培养的细胞比摇床培养的细胞丙酸含量高, 而且静置培养的细胞收获量比较稳定, 三次平均菌体密度为 0.570 ( $A_{520nm}$ ), 湿重 3.60(g/500ml 培养液), 干重相当于 1.04g。故采用静置培养收集菌体。

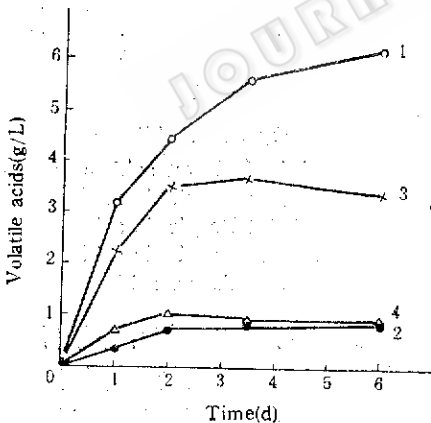


图 1 不同培养方式收获的细胞固定化后产酸力的比较

Fig. 1 Comparison of acid productivity of harvested cells from different cultivation states by immobilization

1. 静置 Static 丙酸 Propionic acid
2. 静置 Static 乙酸 Acetic acid
3. 振荡 Shaking 丙酸 Propionic acid
4. 振荡 Shaking 乙酸 Acetic acid

### (二) 游离细胞与固定化细胞活性的比较

将游离细胞悬液 1 ml 接入 20ml 厌氧管培养液中, 与同量菌体的固定化细胞发酵产酸结果相比(表 1)说明固定化之后的细胞有活性, 此方法可行, 因为丙酸发酵不是简单的葡萄糖转化, 它是多酶体系作用的结果, 所以培养基还需补加些酵母膏。

表 1 游离细胞与固定化细胞活性的比较

Table 1 Comparison of activity between free cells and immobilized cells (24h)

细胞 Cells	培养基 Medium	产 物 Product(g/L)	
		丙 酸 Propionic acid	乙 酸 Acetic acid
游离 Free	I	2.24	0.20
	II	4.50	1.26
固定化 Immobilized	I	1.42	0.12
	II	2.45	0.75

I 葡萄糖 Glucose 2%

II 葡萄糖 2% + 酵母膏 1%

Glucose 2% + Yeast extract 1%

### (三) 固定化及培养条件的选择

1. 海藻酸钠起始浓度的选择: 将不同浓度的海藻酸钠与 100% 起始菌浓的菌体, 按 1:1 体积混合, 由恒流泵经内径 1 mm 的胶管滴入 170g/L 的  $CaCl_2$  溶液中。1%、2% 浓度的海藻酸钠与菌体混合后, 可以顺畅地通过胶管在  $CaCl_2$  中成粒。而 4% 浓度的通过胶管不太顺利, 海藻酸钠起始浓度增至 6%、8% 时, 与菌体混合后易凝聚, 阻塞胶管、无法成粒。由于固定化细胞使用的重复性和长期性, 制成的固定化颗粒需要足够的强度, 在这种意义上讲, 选用 2% 和 4% 的起始海藻酸钠浓度比 1% 的好。2% 和 4% 起始浓度形成的颗粒直径分别为 3—4 mm 和 5—5.5 mm, 2% 浓度者颗粒较小, 产酸量略高, 结果表 2 所示。4% 浓度者在操作

表2 海藻酸钠起始浓度对固定化细胞产酸量的影响

Table 2 Effect of initial concentration of sodium alginate on acid production of immobilized cells

海藻酸钠起始浓度 Initial concentration of sodium alginate (%)	产 酸 量 Acid productivity(g/L)	
	丙 酸 Propionic acid	乙 酸 Acetic acid
2	3.61	0.64
4	3.21	0.60

上具有一定困难，故采用 2% 海藻酸钠起始浓度。

2. 起始菌浓度对产酸量的影响：一般来说，菌浓度越高，转化原料所需时间越短，可以尽快得到较高的产量，如图 2 所示。12h 产酸量明显以菌浓度 10、50、100、200% 依次增加，但到 24h 不同菌浓度间的产酸量差距减小，但是菌浓度太高所需菌体太多，在制备过程中，易过早发生菌体与海藻酸钠的凝聚，所以选择 100% 作为起始菌浓度。

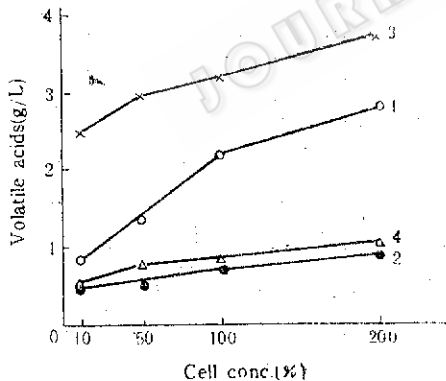


图 2 起始菌浓度对产酸量的影响

Fig.2 Effect of initial cells concentration on acid production

- 1. 12(h) 丙酸 Propionic acid
- 2. 12(h) 乙酸 Acetic acid
- 3. 24(h) 丙酸 Propionic acid
- 4. 24(h) 乙酸 Acetic acid

3. 起始 pH 对产酸量的影响：固定化细胞反应用的培养基，不加缓冲液，灭

菌前不同起始 pH 用 HCl 或 NaOH 调节，每天测定产酸量，如图 3 所示，pH 8—9，2 天就可达到最高产酸量，而 pH 5、6、7 则需 4—5 天才可充分转化。测定灭菌前后培养基 pH 变化为：

灭菌前 pH 5 6 7 8

8.5 9

灭菌后 pH 4.6 5.1 6.4 6.8

6.9 7.0

灭菌前 pH 调至 8—9，灭菌后 pH 实为 6.8—7.0，正是细菌生长和丙酸形成酶系反应的最适范围，产酸最快而多，当 pH 下降时原料也几乎用尽。

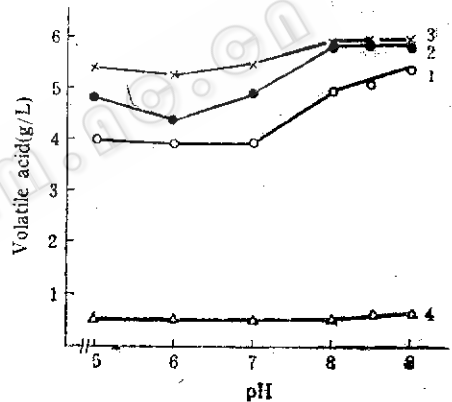


图 3 起始 pH 对产酸量的影响

Fig.3 Effect of initial pH on acid production

- 1. 1 (d) 丙酸 Propionic acid
- 2. 2 (d) 丙酸 Propionic acid
- 3. 5 (d) 丙酸 Propionic acid
- 4. 2 (d) 乙酸 Acetic acid

4. 温度对产酸的影响：固定化细胞产酸的最适温度(图 4)。在一天时以 30℃ 最好；二天时 26—30℃ 都已接近最高峰；34℃ 时虽已超过该菌的最适温度，然而固定化细胞仍有一定的产酸力，但培养到 5—6 天仍不能达到 30℃ 的水平。所以选择 30℃ 进行固定化细胞的发酵。

5. 固定化颗粒重量/培养液体积 不同比例对产酸率的影响：实验中一直选用体积 25ml 厌氧管培养包埋细胞，保持颗粒

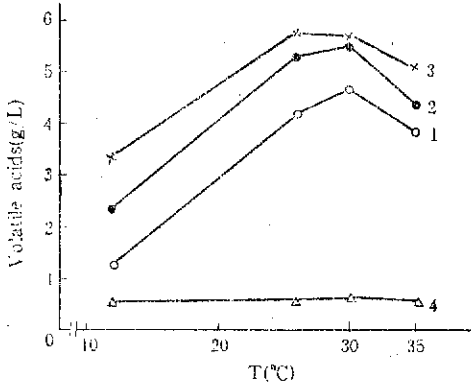


图 4 温度对产酸的影响

Fig.4 Effect of temperature on acid production

1. 1 (d) 丙酸 Propionic acid
2. 2 (d) 丙酸 Propionic acid
3. 5 (d) 丙酸 Propionic acid
4. 2 (d) 乙酸 Acetic acid

与反应液总体积为 20 ml, 留出 5 ml 空气, 菌体所耗氧来自余留的 5 ml 空气柱, 保持该菌新陈代谢所需的兼性厌氧环境。在起始菌浓度为 100% 的条件下, 对四种不同的固定化颗粒重量 (g) 与反应液体积 (ml) 的比例进行实验。由表 3 结果可见, 此比例值越大, 单位体积反应液中菌体越多, 转化越快, 短时间内产率就高。根据综合考虑, 试验中一直采用的比例是 0.333 g 固定化颗粒/ml 反应液。

表 3 固定化细胞重量/培养液体积比例对产率的影响

Table 3 Comparison of yield at the different ratio of immobilized cells weight/broth volume

固定化细胞/培养液 Immobilized cells/broth (g/ml)	丙酸产率 Yield of propionic acid (%)		
	12h	18h	24h
3/17(0.177)	12.9	20.0	21.3
5/15(0.333)	15.4	22.0	24.2
8/12(0.667)	21.0	28.4	31.1
10/10(1.0)	26.4	30.8	29.0

6. 固定化细胞发酵状态对产酸的影响: 把新鲜固定化细胞按 5g/15ml 培养液

的比例装入厌氧管中, 分别以振荡和静置状态发酵, 测定其产酸量(图 5)除刚开始的 16h 外, 其他时间内, 两种发酵状态产酸结果几乎没有差别。这是因为静置发酵一定时间后, 固定化细胞也能因发酵自然起浮翻动, 所以固定化细胞丙酸的产量基本上不受机械振动与否的影响。乙酸的含量振荡发酵者似乎略高。由于在厌氧管内造成了较少的溶氧量, 正好符合丙酸菌兼性厌氧的生理条件, 因此选择厌氧管内静置发酵方式。

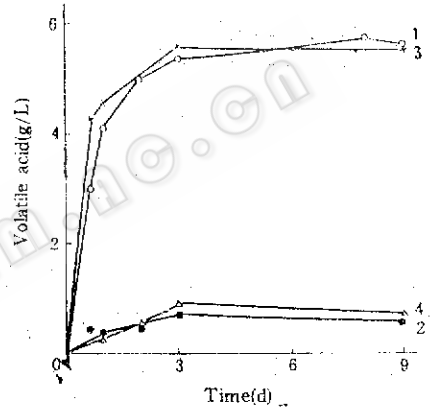


图 5 不同发酵状态对固定化细胞产酸的影响

Fig.5 Effect of different states of fermentation of immobilized cells on acid production

1. 静置 Statical 丙酸 Propionic acid
2. 静置 Statical 乙酸 Acetic acid
3. 振荡 Shaking 丙酸 Propionic acid
4. 振荡 Shaking 乙酸 Acetic acid

7. 酵母膏浓度对产酸的影响: 酵母膏是丙酸菌最理想的氮源之一<sup>[2]</sup>, 因它除了提供氮源之外, 尚含有一些非氮生长因子。前述实验已证明固定化细胞丙酸发酵只用葡萄糖效果不好, 需要加些酵母膏。因此选用酵母膏作为固定化丙酸菌生长发酵的补充营养。以 1% 葡萄糖为碳源, 试验酵母膏的最适用量, 结果(图 6)所示, 其含量 0.25% 时产酸很少, 而 0.5% 和 1% 对包埋细胞产酸已达一定水平并无

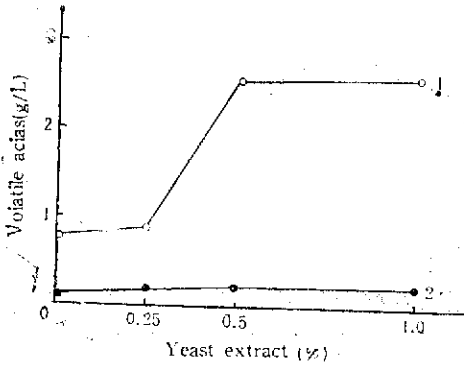


图 6 酵母膏浓度对产酸的影响

Fig.6 Effect of yeast extract concentration on acid production

- 1. 丙酸 Propionic acid
- 2. 乙酸 Acetic acid

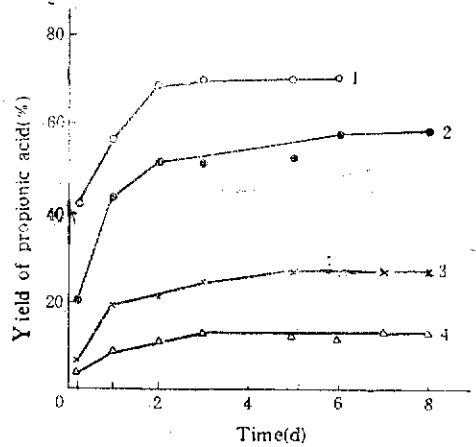


图 7 糖浓度对丙酸转化率的影响

Fig.7 Effect of glucose concentration on propionic acid yield

- 1. 0.5% 2. 1% 3. 5% 4. 10%

差别, 所以选用0.5%酵母膏用量。

8. 不同糖浓度对产酸转化率的影响: 本菌株可以广泛地利用单糖、双糖和多糖, 这里选择含一水分子的葡萄糖为碳源, 以固定化细胞对四种不同糖浓度的产酸结果进行比较, 发现转化率随糖浓度0.5%至10%依次递减, 产量依次递增。在糖浓度0.5%、1%时, 产酸率很快达到最高值, 当糖浓度为5%、10%时产酸率增长缓慢, 始终不高(图7)。考虑到要求

较高的转化率和将来利用废水发酵, 糖浓度也不会太高, 所以选择1%葡萄糖浓度进行半连续发酵探索。

9. 固定化颗粒的批式发酵: 以最佳固定化程序制备的固定化颗粒, 用上面选出的最适固定化细胞发酵条件, 每隔2—3天置换一次新鲜培养液, 固定化细胞重复发酵30次连续作用65天时, 产酸量保持稳定(图8), 主要产物为丙酸。

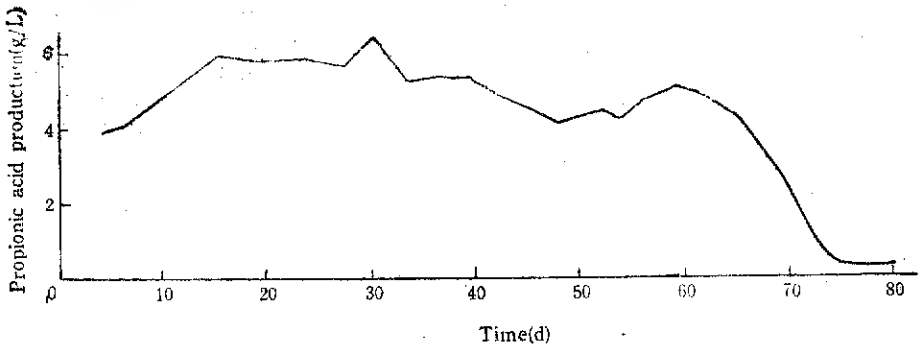


图 8 固定化细胞半连续培养产酸情况

Fig.8 Propionic acid production of immobilized cells by semicontinuous cultivation

### 讨 论

本实验采用海藻酸盐包埋北京丙酸杆

菌, 在包埋细胞发酵过程中, 按 Yong-smirh等<sup>[6]</sup>的方法进行稀释平板活菌计数发现活菌数由最初包埋时  $2 \times 10^8$  个/g 颗

粒于第二天很快增长至  $10^9$ — $2 \times 10^9$  个/g 颗粒。而发酵液中也很快就有从颗粒中溢出的游离细胞, 由 16h 的  $10^4$  个/ml 培养液至第 3 天  $10^7$  个/ml 培养液。说明本实验中包埋后的细胞增殖, 属固定化活细胞。

本实验起初采用磷酸盐缓冲液配制培养基, 凝胶颗粒在培养基中 24h 后即软化变形, 甚至溶解, 后改用 NaOH 调节培养

液 pH, 这虽不能控制其产酸引起的 pH 变化, 但可消除磷酸盐破坏凝胶结构的缺点。同时在培养基中补加 0.1%  $\text{CaCl}_2$ , 在综合的最适条件下, 颗粒可保持稳定产酸活性达 65 天, 形态始终完好, 主要产物为丙酸。固定化细胞克服了游离细胞收集重复使用的困难, 使用寿命延长。

### 参 考 文 献

- [1] 乐华爱等: 微生物学报, 27(2):105—109, 1987.
- [2] 乐华爱等: 微生物学报, 30(1):22—28, 1990.
- [3] Воробьева, Л.И. и Др.: Прикладная Биохимия и Микробиология, 13(4):531—538, 1977.
- [4] Clausen, E.C. and Gaddy, J.L.: Chem. Eng. Prog., 80(12): 59—63, 1984.
- [5] Cavin, J.F. et al.: Biotechnol. Lett., 70(11):821—826, 1985.
- [6] Yongsmith, B. and Chutima, K.: J. Ferment. Technol., 61(6):593—598, 1983.

## Studies on Propionic Acid Fermentation by Immobilized cells of *Propionibacterium beijingense* with Alginate

Wang Bei Jin Shiyun Yue Huaai

(Institute of Microbiology, Academia sinica, Beijing)

The optimum conditions for immobilization and fermentation of *Propionibacterium beijingense* with alginate to produce at great amount of propionic acid were reported. The optimum initial concentrations of sodium alginate and cells were 2% and 100% (w/v) respectively. The mixture of cells and alginate was dropped into a  $\text{CaCl}_2$  solution to get spherical particles with a diameter of 3—4 mm. The immobilized cells were put in a 25ml anaerobic tube at the ratio of 5 g particles/15ml medium contained(%): glucose 1, yeast extract 0.5, and  $\text{CaCl}_2$  0.1. They were cultivated statically at 30°C to produce significant amount of volatile acids. The ratio of propionic acid to acetic acid was approximately 10:1. Immobilized cells were reutilized for 30 times consecutive fermentation. The activity of immobilized cells were stable for 65 days.

### Key words

*Propionibacterium beijingense*; sodium alginate; propionic acid fermentation