

## 发酵产丁二酸过程中废弃细胞的循环利用

白雪飞, 陈可泉, 叶贵子, 黄秀梅, 李建, 姜岷

南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

**摘要:** 对厌氧发酵产丁二酸后的废弃细胞进行破壁处理, 考察了以细胞水解液作为有机氮源重新用于丁二酸发酵的可行性。比较了超声破碎、盐溶、酶解 3 种方法破碎细胞获得的水解液作为氮源发酵产丁二酸的效果, 结果表明酶解制得的细胞水解液效果最佳。以总氮含量为 1.11 g/L 的酶解液 (相当于 10 g/L 酵母膏) 作为氮源发酵, 丁二酸产量可达 42.0 g/L, 继续增大酶解液用量对耗糖、产酸能力没有显著提高。将细胞酶解液与 5 g/L 酵母膏联用发酵 36 h 后, 丁二酸产量达 75.5 g/L, 且丁二酸生产强度为 2.10 g/(L·h), 比使用 10 g/L 酵母膏时提高了 66.7%。因此, 厌氧发酵产丁二酸结束后的废弃细胞酶解液可以替代原培养基中 50% 的酵母膏用于发酵。

**关键词:** 废弃细胞, 酶水解, 氮源, 丁二酸

## Recycle of spent cells from anaerobic succinate fermentation

Xuefei Bai, Kequan Chen, Guizi Ye, Xiumei Huang, Jian Li, and Min Jiang

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

**Abstract:** Spent cells recovered from anaerobic fermentation by *Actinobacillus succinogenes* were used as nitrogen source for succinic acid production. Three methods were investigated for cell wall-breaking. The results showed that enzymatic hydrolysis was more effective for higher succinic acid yield. When the enzymatic hydrolysate of spent cells was added to reach a total nitrogen concentration 1.11 g/L (equivalent to 10 g/L yeast extract), the succinic acid concentration was 42.0 g/L, but it increased slightly when enhancing the level of enzymatic hydrolysate. However, when 5 g/L yeast extract was supplemented with the enzymatic hydrolysate of spent cells, the succinic acid concentration reached 75.5 g/L after 36 hours and, the succinic acid productivity was 2.10 g/(L·h), which increased by 66.7% compared with the fermentation using 10 g/L yeast extract. Therefore, enzymatic hydrolysate of spent cells could replace 50% yeast extract in the original medium for succinic acid production.

**Keywords:** recycle spent cells, enzymatic hydrolysis, nitrogen source, succinic acid

微生物细胞作为一个有机体, 其胞内含有丰富的氨基酸、维生素及其他微量元素<sup>[1-2]</sup>。发酵生产中, 微生物细胞在发酵结束后常常被作为废弃物而丢

弃, 造成环境污染以及资源浪费。因此, 将废弃细胞作为营养源重新利用具有重要的意义。York 等<sup>[3]</sup>以废酵母细胞自溶液为氮源, 补加营养盐和维生素

**Received:** March 1, 2010; **Accepted:** June 22, 2010

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), National Natural Science Foundation of China (No. 20606017), State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, "Qinglan Project" of Jiangsu Province.

**Corresponding author:** Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-83172075; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724701), 国家自然科学基金 (No. 20606017), 材料化学工程国家重点实验室基金, 江苏省“青蓝工程”资助。

后用于乙醇的生产, 其乙醇产量与以蛋白胨为氮源时相当, 达到 46 g/L; Marco 等<sup>[4]</sup>研究了酵母细胞自溶液在乙醇生产中的应用, 证明了酵母细胞自溶液能够为乙醇的生产提供必要的氨基酸、脂肪酸等物质, 使乙醇产量达到 12% (V/V)。Gao 等<sup>[5-6]</sup>以鼠李糖乳杆菌 *Lactobacillus rhamnosus* 细胞水解液作为氮源用于乳酸的发酵时可以使原培养基中酵母膏用量减少 20%, 乳酸产量达到 80 g/L; Amrane<sup>[7]</sup>在考察乳酸杆菌自溶液用于乳酸发酵的效果时, 乳酸产量最高达到 38 g/L, 与 2 g/L 酵母膏的发酵产乳酸能力相当。

微生物发酵法生产丁二酸与化学法相比, 具有利用可再生资源、固定 CO<sub>2</sub> 等优点, 近年来备受瞩目。在众多的丁二酸生产菌株中, 产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* 具有高产丁二酸、耐高底物、产物浓度、可以利用广泛碳源等优点, 已成为目前具备产业化生产丁二酸能力的菌株之一<sup>[8]</sup>。然而, *A. succinogenes* 培养过程中通常需要添加酵母膏等营养源用于菌体生长与产酸<sup>[9]</sup>, 这些营养成分价格昂贵, 无法适应丁二酸工业化生产的需求。本文将丁二酸发酵后的废弃细胞制得的水解液替代培养基中部分氮源重新用于丁二酸发酵。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*Actinobacillus succinogenes* NJ113 (CGMCC No. 1716) 为本实验室筛选并保藏。

### 1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母膏 5.0, NaHCO<sub>3</sub> 10.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.6, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15.5, pH 7.0。

发酵培养基 (g/L): 富马酸二钠 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.3, CaCl<sub>2</sub> 0.3, NaCl 1.0, 酵母膏 10.0 g/L 或含有相应总氮质量的废弃细胞水解液, 一定浓度葡萄糖分消后加入, 加入与葡萄糖等质量的 MgCO<sub>3</sub> 调节发酵 pH。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 血清瓶培养

将 *A. succinogenes* 接种到装有 50 mL 种子培养基的血清瓶 (血清瓶容积 100 mL) 中进行活化培养

10 h 后, 按 5% 接种量将种子液接于装有 30 mL 发酵培养基的血清瓶 (血清瓶容积 100 mL) 中, 37°C 下 200 r/min 摇床培养 48 h。

#### 1.3.2 3 L 发酵罐培养

3 L 发酵罐 (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) 装有 1.5 L 发酵培养基。接种量 5%, 培养温度 37°C, 搅拌转速 200 r/min, CO<sub>2</sub> 流速 0.3 L/min, 发酵至葡萄糖不再消耗。

#### 1.3.3 细胞的破碎方法

将丁二酸发酵结束后的细胞离心收集, 用蒸馏水洗涤 2 次之后配制成 60 g/L 的菌悬液。采用超声波、自溶和酶水解 3 种方法对菌悬液进行处理。超声破碎法<sup>[4]</sup>: 将菌悬液在 150 W 的功率下超声处理 20 min; 自溶法<sup>[3]</sup>: 向菌悬液中加入 1% (W/V) NaCl 和 6% (W/V) 无水乙醇, 50°C 水浴处理 24 h; 酶水解法: 将菌悬液在 pH 8.0, 55°C 下采用碱性蛋白酶 (活力 2.4 AU/g) 水解 24 h, 其中酶添加量为 3.45 μL/g 干细胞。3 种方法分别处理后得到的水解液在 8 000 r/min 下离心 15 min, 得到上清液即为所需的细胞水解液, 测定其中氨基氮 Amino nitrogen (AN)、总氮 Total nitrogen (TN) 含量后用于配制培养基。当培养基中需添加总氮含量大于 2.22 g/L 的酶解液时, 先将酶解液浓缩 1 倍后再用于配制培养基。

#### 1.3.4 分析方法

葡萄糖浓度由生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定, 菌体生长以紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司) 测定波长 660 nm 处吸光值 ( $OD_{660}$ ) 表示, AN、TN 含量分别用甲醛滴定法<sup>[10]</sup>和凯氏定氮法测定<sup>[11]</sup>, 丁二酸含量采用 HPLC (美国戴安公司) 法测定<sup>[12]</sup>, 丁二酸收率 (%) = [丁二酸产量 (g/L)/葡萄糖消耗量 (g/L)] × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞水解液的制备及用于发酵产丁二酸

分别采用超声波、自溶和酶水解 3 种不同的方法对丁二酸发酵结束后的细胞进行破碎, 通过测定水解液中氨基氮及总氮含量, 考察 3 种方法的破壁效果, 结果见表 1。

表1 3种细胞破碎法对水解液中AN含量及水解度的影响  
Table 1 Effects of three kinds of cell disruption on the AN content and AN/TN ratio in the hydrolysate

	Ultrasonication	Autolysis	Enzymatic hydrolysis
AN g/100 mL	0.13	0.08	0.15
AN/TN	0.47	0.29	0.55

由表1可知,酶水解液 Enzymatic hydrolysate (EH) 中 AN 含量和水解度 (AN/TN) 最高,其次是超声破碎法制得的水解液 Ultrasonic hydrolysate (UH),自溶法制得水解液 Autolysate (AS) 中 AN 的含量仅为酶水解液的一半左右。

在葡萄糖浓度 20 g/L 及相同总氮添加量条件下,考察3种水解液分别作为氮源发酵产丁二酸的效果。由图1可知,当EH作为氮源时,丁二酸产量与菌体生长量较高,而UH和AS作为氮源时发酵效果较差,且菌体几乎不能利用AS作为氮源发酵产丁二酸。虽然EH与UH在氨基氮含量、水解度方面相差不大,但其发酵产丁二酸的能力却相差甚远,利用EH作为氮源时丁二酸产量是采用UH的8倍。文献报道,在利用超声波破碎细胞时,超声波产生的化学自由基能使某些敏感性活性物质变性失活<sup>[13]</sup>,从而有可能影响了UH用于发酵产丁二酸的效果;自溶虽然是一种比较经济的细胞破壁方法,但存在水解收率低、水解液中残余盐浓度高等缺点<sup>[1]</sup>,且高浓度的Na<sup>+</sup>以及乙醇对*A. succinogenes*的生长代谢均有抑制作用<sup>[14]</sup>。因此,本研究选择酶解法制备细胞水解液作为氮源用于发酵产丁二酸。

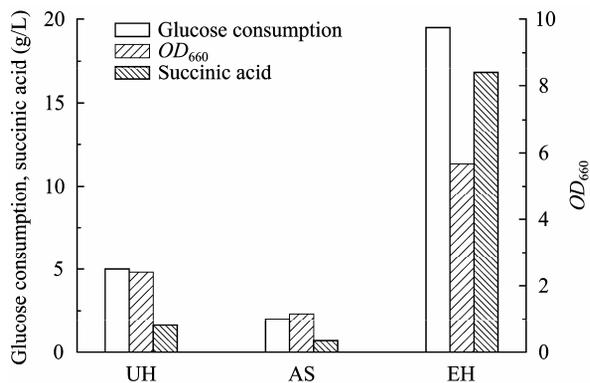


图1 利用不同水解液制备丁二酸的结果对比  
Fig. 1 Succinic acid production from different hydrolysates. UH: ultrasonic hydrolysate; AS: autolysate; EH: enzymatic hydrolysate.

## 2.2 酶解液作为有机氮源用于发酵制备丁二酸

在葡萄糖浓度 100 g/L,不同总氮添加量的条件下考察酵母膏 (YE) 和酶解液分别作为氮源对于发酵产丁二酸的影响,结果如图2所示。

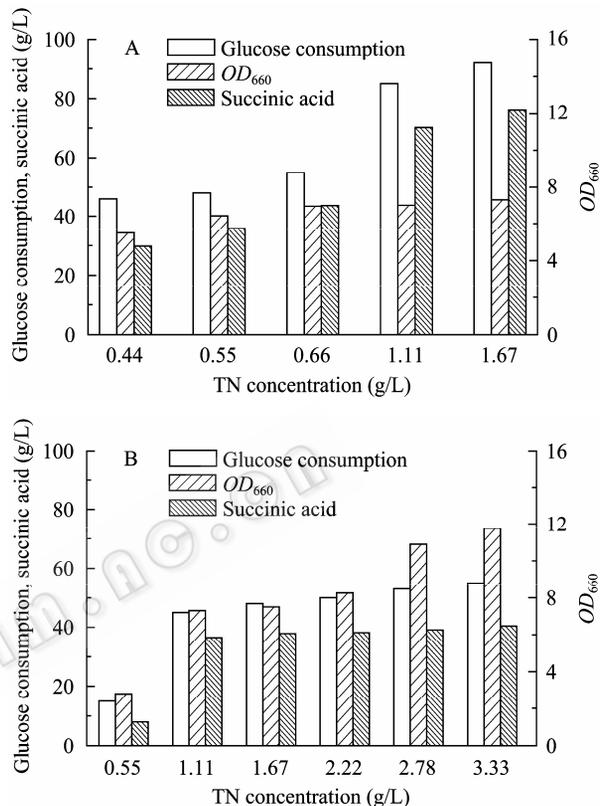


图2 酵母膏和酶解液分别作为氮源发酵制备丁二酸  
Fig. 2 Succinic acid production with yeast extract and EH separately as nitrogen source. (A) Fermentation with yeast extract. (B) Fermentation with EH.

以4 g/L、5 g/L、6 g/L、10 g/L与16 g/L的酵母膏作为氮源时,其总氮含量分别如图2A横坐标所示。随总氮含量的增加,丁二酸产量增势较为明显,当酵母膏的添加量从TN含量0.55 g/L增加到1.11 g/L时,葡萄糖消耗从48 g/L增加到85 g/L,丁二酸产量增加了0.95倍。而以酶解液作为氮源时,图2B所示,随着TN含量从0.55 g/L增加至1.11 g/L,葡萄糖的消耗量增加了约30 g/L,丁二酸产量提高了3倍,而继续增加酶解液用量对丁二酸产量几乎没有影响。在TN含量均为1.11 g/L时,菌体生长量相当,然而酶解液用于发酵的丁二酸产量达36.5 g/L,仅为以酵母膏为氮源时丁二酸产量的一半左右,说明酶解液无法完全替代酵母膏用于丁二酸的制备。文献报道,在乳酸的发酵生产中,当采用一些廉价

的氮源替代时通常也难以完全达到酵母膏的发酵特性, 只能部分取代酵母膏, 因此需要添加一定量酵母膏作为氮源用于菌体生长与产乳酸<sup>[15]</sup>。在前期研究中采用啤酒酵母水解液替代酵母膏时, 虽然啤酒酵母水解液在添加混合维生素的基础上能替代酵母膏用于发酵产丁二酸, 但生产强度仍然较低。因此, 本文考虑在酶解液中添加其他氮源用于丁二酸的发酵生产。

### 2.3 复合氮源对发酵制备丁二酸的影响

在葡萄糖浓度为 100 g/L 的条件下, 向 TN 含量为 1.11 g/L (与 10 g/L 酵母膏 TN 含量相等) 酶解液中分别添加不同量的酵母膏、玉米浆 (CSL), 考察对发酵产丁二酸的影响。由表 2 可知, 向酶解液中添加 15 g/L CSL 后, 丁二酸产量只增加了 17.2%。而在酶解液中添加 3 g/L YE 后, 丁二酸产量增加了 66.9%; 添加 5 g/L YE 以后, 丁二酸产量增加了 1 倍左右, 且丁二酸收率达到最大为 80.7%, 与 10 g/L YE 发酵时丁二酸产量相当 (图 2)。

### 2.4 利用复合氮源在 3 L 发酵罐中分批发酵制备丁二酸

在 3 L 发酵罐中, 分别考察不同氮源对丁二酸发酵的影响, 结果图 3 所示。单独以酶解液作为氮源发酵时, 葡萄糖消耗速率及产酸速率较慢,  $OD$  值仅为 8.0, 发酵结束时残糖为 47 g/L, 丁二酸产量达

42.0 g/L。当在酶解液中添加 5 g/L 酵母膏后,  $OD$  值高达 14, 发酵 36 h 葡萄糖耗尽, 丁二酸产量达到 75.5 g/L, 发酵效果与以 10 g/L 酵母膏作为氮源时的结果相当, 且丁二酸的生产强度达到 2.10 g/(L·h), 比单独采用酵母膏、酶解液发酵的生产强度分别提高了 66.7% 和 140%。因此, 细胞酶解液在补加 5 g/L YE 后可以完全替代 10 g/L 酵母膏用于发酵生产丁二酸, 可使原培养基中酵母膏的用量减少 50%。在原培养基中氮源所占原料成本的比例约 47.5%, 而采用酶解液添加 5 g/L 酵母膏作为氮源时其所占原料成本的比例降低为 31.8%。

表 2 不同氮源组成对发酵制备丁二酸的影响

Table 2 Effects of supplementation of nitrogen sources with EH on succinic acid production

Supplementation <sup>a</sup>	Glucose consumed (g/L)	$OD_{660}$	Succinic acid (g/L)	Succinic acid yield (%)
None	45.0	6.8	36.0	80.0
3 g/L YE	77.5	9.7	60.1	77.5
5 g/L YE	90.5	11.2	73.0	80.7
7 g/L YE	96.5	13.9	75.7	78.4
10 g/L YE	100.0	14.1	75.9	75.9
5 g/L CSL	50.5	7.7	36.4	72.1
10 g/L CSL	57.0	9.0	38.6	67.7
15 g/L CSL	60.5	9.6	42.2	69.8

<sup>a</sup> Different amount of nitrogen sources were supplemented separately to the medium containing enzymatic hydrolysate with TN concentration equivalent to 10 g/L YE.

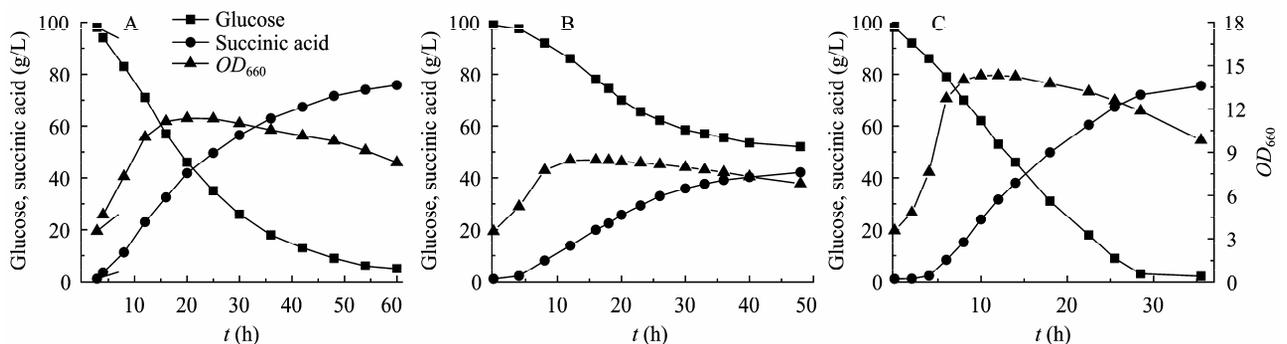


图 3 不同氮源发酵制备丁二酸

Fig. 3 Succinic acid production with different nitrogen source. (A) Fermentation with 10 g/L YE. (B) Fermentation with EH. (C) Fermentation with EH supplemented with 5 g/L YE.

## 3 结论

分别采用超声破碎、盐溶和酶水解 3 种方法制备细胞水解液, 其中酶解制备的水解液用于发酵制

备丁二酸的效果最佳。

在葡萄糖浓度为 100 g/L 的条件下, 添加 TN 含量为 1.11 g/L 的酶解液时, 丁二酸产量可达 36.5 g/L, 然而继续增加酶解液用量对丁二酸产量增加不显著;

在 TN 含量 1.11 g/L 酶解液中添加 5 g/L 酵母膏后, 丁二酸产量提高 102.8%, 丁二酸收率高达 80.7%。

复合氮源的 3 L 发酵罐发酵产丁二酸实验结果表明, 酶解液可以替代原培养基中 50% 的酵母膏用于发酵产丁二酸, 且丁二酸生产强度比采用原培养基时提高了 66.7%, 使氮源成本在原料成本中所占的比例由原来的 47.5% 降低至 31.8%。

## REFERENCES

- [1] Tatjana VM, Marica R, Slavica SM. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. *J Serb Chem Soc*, 2007, **72**(5): 451-457.
- [2] Chae HJ, Hyun J, In MJ. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technol*, 2001, **76**(3): 253-258.
- [3] York SW, Ingram LO. Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* KO11 using crude yeast autolysate as a nutrient supplement. *Biotechnol Lett*, 1996, **18**(6): 683-688.
- [4] Marco AG, Moreno NJ, Azpilicueta CA. Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine. *J SCI Food Agr*, 2006, **86**(13): 2221-2227.
- [5] Gao MT, Hirata M, Toorisaka E, et al. Study on acid-hydrolysis of spent cells for lactic acid fermentation. *Biochem Eng J*, 2006, **28**(1): 87-91.
- [6] Gao MT, Hirata M, Toorisaka E, et al. Lactic acid production with the supplementation of spent cells and fish wastes for the purpose of reducing impurities in fermentation broth. *Biochem Eng J*, 2007, **36**(3): 276-280.
- [7] Amrane A. Evaluation of lactic acid bacteria autolysate for the supplementation of lactic acid bacteria fermentation. *World J Microb Biotechnol*, 2000, **16**(2): 207-209.
- [8] Guettler MV, Rumler D, Jain MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov, a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**(1): 207-216.
- [9] Jiang M, Wang QN, Chen KQ, et al. Research on the production of succinic acid by anaerobic fermentation with yeast zymolysis solution as organic nitrogen source. *Food Sci Technol*, 2007, **32**(10): 238-242.  
姜岷, 王倩楠, 陈可泉, 等. 啤酒废酵母酶解液作为有机氮源厌氧发酵制备丁二酸的研究. *食品科技*, 2007, **32**(10): 238-242.
- [10] Ning ZX. *Food Ingredients Analyzing: A Analysis Manual*. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 119-124.  
宁正祥. *食品成分分析手册*. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 119-124.
- [11] GB/T 5009. 5-1985. Determination of protein in food. GB/T 5009. 5-1985. 食品中蛋白质的测定方法.
- [12] Chen KQ, Wei P, Cai T, et al. Application of reversed phase HPLC for the production of succinic acid by fermentation. *Chin J Biopro Eng*, 2005, **3**(2): 50-52.  
陈可泉, 韦萍, 蔡婷, 等. 反相高效液相色谱在发酵制备琥珀酸中的应用. *生物加工过程*, 2005, **3**(2): 50-52.
- [13] Xiu ZL, Jiang W, Su ZG. Achievements and future trends on disintegration of microbial cells. *Chem Ind Eng Prog*, 1994, (1): 15-21.  
修志龙, 姜伟, 苏志国. 细胞破碎技术的研究进展和发展方向. *化工进展*, 1994, (1): 15-21.
- [14] Lin SKC, Du C, Koutinas A, et al. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *actinobacillus succinogenes*. *Biochem Eng J*, 2008, **41**(2): 128-135.
- [15] Kwon S, Lee PC, Lee EG, et al. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **26**(2): 209-215.