

利用纤维床反应器固定化发酵生产丙酸

冯小海, 吴波, 沈晓波, 徐虹

南京工业大学制药与生命科学学院 材料化学国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 构建了一种纤维床反应器(FBB), 并将其应用于丙酸的生产。将棉纤维绕成桶状, 固定于反应器中, 即可用于丙酸固定化发酵。以 40 g/L 的葡萄糖为碳源, 与游离细胞相比, 利用 FBB 生产丙酸, 丙酸产量由 14.58 g/L 提高至 20.41 g/L, 发酵时间由 120 h 缩短至 60 h。研究了不同糖浓度条件下 FBB 生产丙酸情况, 并将补料策略应用于丙酸发酵中。结果表明: 补料发酵能够有效改善 *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 在高糖条件下丙酸对葡萄糖转化率较低、副产物较多的问题。经补料发酵 280 h, 丙酸产量达 45.91 g/L, 丙酸质量约占有有机酸总质量比例为 72.31%。

关键词: 纤维床反应器, *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015, 丙酸, 补料发酵

Propionic Acid Fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 with a Fibrous-bed Bioreactor

Xiaohai Feng, Bo Wu, Xiaobo Shen, and Hong Xu

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: The production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 was investigated in a Fibrous-bed bioreactor (FBB). The FBB was constructed by packing spiral cotton fibrous and immobilized into a bioreactor. By applying this bioreactor to propionic acid fermentation, the propionic acid yield had a significant improvement and reached 20.41 g/L, compared with the cell-free culture of 14.58 g/L (40 g/L of glucose). At the same time, the glucose exhausting time decreased from 120 h to 60 h. Batch fermentations at various glucose concentrations were carried out with FBB. Based on the analysis of the time course of production, fed-batch fermentation was also applied to produce propionic acid with FBB, the maximal propionic acid yield reached 45.91 g/L, and the proportion of propionic acid to total acids was about 72.31%.

Keywords: fibrous-bed bioreactor, *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015, propionic acid, fed-batch fermentation

丙酸是一种重要的精细化工产品 and 基本化工原料, 作为一种重要的“C3 平台化合物”, 丙酸及其衍生物广泛应用于食品、饲料、香料、医药、农药等领域^[1-4]。丙酸的生产方法有化学合成法和生物发酵法。目前, 丙酸的工业化方法为化学合成法, 随着石油价格的不断攀升, 近年来丙酸的价格不断上

涨。微生物发酵法由于原料可再生、对环境无污染等优点而受到了越来越多的青睐^[5,6]。

目前, 生物法生产丙酸面临着生产效率低、成本高等问题, 提高丙酸的生产效率, 降低丙酸生产成本, 对于能否实现生物法制备丙酸的工业化至关重要。研究表明, 固定化丙酸杆菌能够减少丙酸生

Received: March 14, 2007; Accepted: April 7, 2007

Supported by: the National Basic Research Program of China (973) (No. 2007CB714304) and the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2006AA03Z453).

Corresponding author: Hong Xu. Tel: +86-25-83587332; E-mail: xuh@njut.edu.cn

国家“973”项目(2007CB714304); 国家“863”项目(No. 2006AA03Z453)资助。

产时间,提高生产效率。丙酸杆菌的固定化方法主要是海藻酸钙包埋法,Paik HD和Woskow SA分别利用海藻酸钙固定化丙酸杆菌,实现了丙酸的固定化生产^[2,7],赵树欣等也成功利用海藻酸钙固定化丙酸杆菌实现了丙酸的固定化发酵^[8]。但是,由于传质条件的限制,凝胶包埋法包埋的细胞难以实现自我更新,难以长时间保证菌体活力,此外,凝胶包埋的成本较高,不适用于丙酸的大规模生产。近年来,Yang ST等构建了一种纤维床反应器(Fibrous-bed Bioreactor, FBB),将一种改性后的纤维绕成轴状固定于固定化柱中,通过恒流泵循环,实现了固定化柱与优化罐中的物质交换与丙酸的生产,发酵 900 h,丙酸产量达 71.8 g/L(生产效率 0.08 g/L/h)^[9]。

本研究构建了一种简单、高效的新型纤维床反应器(FBB),并将其应用于丙酸的固定化生产。考察了游离细胞与 FBB 发酵生产丙酸的差异,研究了不同葡萄糖浓度条件下 FBB 生产丙酸的情况,并基于副产物生成情况将补料分批发酵应用于 FBB 丙酸生产过程中。该研究对于开拓丙酸生产方法、提高丙酸生产效率具有重要的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

费氏丙酸杆菌 (*P. freudenreichii*),由本实验室筛选并保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC M207015)^[10]。

1.1.2 培养基

种子培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 5,酵母膏 5,NaCl 5,pH 6.9。

发酵培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母膏 5,NaCl 3,(NH₄)₂SO₄ 5,KH₂PO₄ 5。

1.2 实验方法

1.2.1 种子液的制备

将穿刺保藏的*P. freudenreichii* CCTCC M207015接种于装有 80 mL的种子培养基的三角瓶(250 mL)中,35°C下静置培养 24 h,制成一级种子液。将 80 mL一级种子液转接于装有 450 mL新鲜种子培养基的三角瓶(1000 mL)中,35°C下静置培养 48 h,即为二级种子液。

1.2.2 游离细胞发酵

将 450 mL二级种子液转接于装有 4 L新鲜发酵培养基的反应器中(葡萄糖浓度 40 g/L),35°C,100 r/min,

利用 6 mol/L的NaOH溶液控制发酵液pH 6.0进行*P. freudenreichii* CCTCC M207015的游离细胞发酵。

1.2.3 固定化纤维床反应器(FBB)的构建与细胞吸附

将总质量为 200 g 的棉布剪成长条状,绕成桶状,固定于 7.5 L 反应器中,构建为纤维床反应器(FBB),示意图见图 1。

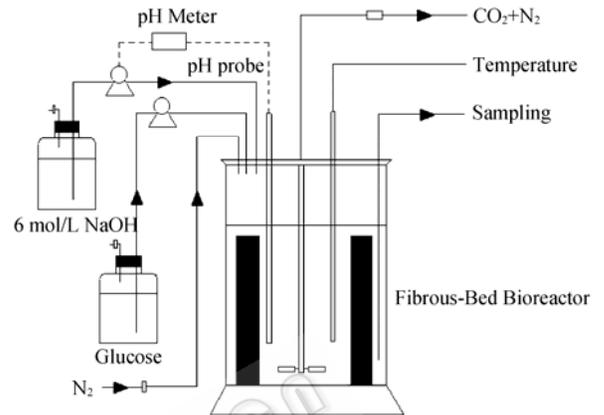


图 1 固定化纤维床反应器示意图

Fig. 1 Sketch map of the fibrous-bed bioreactor

将构建的FBB装入 4 L种子培养基,121°C灭菌 15 min。将 450 mL二级种子液接种于FBB中,通入 0.1 L/min的N₂保持反应器中的厌氧环境,35°C,100 r/min,利用 6 mol/L的NaOH溶液控制种子液pH 6.0培养 48 h,实现细胞的增殖和吸附,将反应器中的种子液全部移出,替换为发酵培养基,即可实现*P. freudenreichii* CCTCC M207015在FBB中的固定化发酵。

1.2.4 不同葡萄糖浓度 FBB 固定化发酵丙酸

按 1.2.3 条件将 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 固定于 FBB,将初始浓度分别为 40、60、70、80 g/L 的葡萄糖作为碳源进行固定化发酵实验,考察 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 在不同浓度的葡萄糖浓度条件下进行丙酸发酵的情况。

1.3 分析方法

1.3.1 葡萄糖含量分析: SBA-40C 型生物传感仪检测。

1.3.2 游离细胞含量检测

将含有游离细胞的发酵液稀释 25 倍后于 660 nm 处读取吸光值。

1.3.3 有机酸含量测定

高效液相色谱(HPLC)法测定,Agilent 1200 工作站,色谱条件: Aminex HPX-87H柱(7.8 mm × 300 mm);流动相为 0.04 mol/L H₂SO₄;检测波长 215 nm;柱温 60°C;进样量 20 μL,流速 0.6 mL/min。

2 实验结果和讨论

2.1 游离细胞发酵

利用游离的 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 发酵生产丙酸, 发酵曲线如图 2 所示, 发酵 120 h 后, 葡萄糖被全部消耗, 生成 14.58 g/L 的丙酸, 同时生成 3.11 g/L 的乙酸和 1.01 g/L 的琥珀酸, 丙酸的生产效率较低, 仅为 0.12 g/L/h。

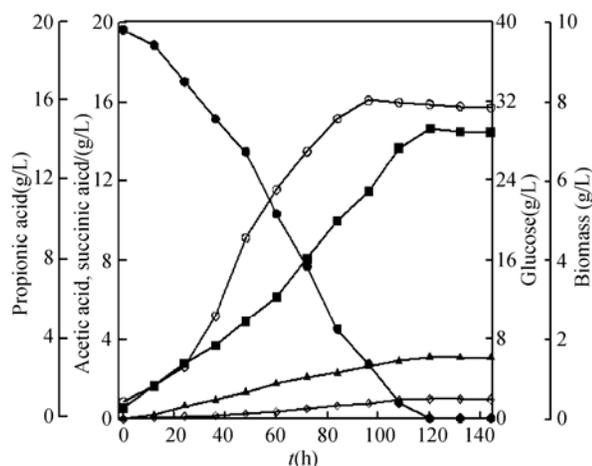


图 2 游离细胞发酵曲线

Fig. 2 Propionic acid production by free cell of *P. freudenreichii* CCTCC M207015

Propionic acid (■); acetic acid (▲); succinic acid (◇); glucose (●); biomass of free cell (○)

2.2 不同初始葡萄糖浓度对于 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 固定化发酵丙酸的影响

对初始葡萄糖浓度为 40、60、70、80 g/L 时利用 FBB 发酵生产丙酸的情况进行考察(图 3)。由图 3-A 所示, 以 40 g/L 的葡萄糖为碳源, 发酵 60 h 葡萄糖被全部消耗, 丙酸产量达 20.41 g/L, 生产效率 0.34 g/L/h, 丙酸对于葡萄糖的转化率达 51.02%。

当 FBB 发酵生产丙酸的初始葡萄糖浓度逐渐提高时, 丙酸产量也逐渐增加。以 60 g/L 葡萄糖为碳源, 发酵 96 h 后丙酸产量达 28.76 g/L(图 3-B)。以 80 g/L 的葡萄糖为碳源, 发酵 168 h 丙酸产量达 32.65 g/L。但是, 随着葡萄糖浓度的提高, 丙酸对于葡萄糖的转化率逐渐降低, 副产物乙酸、琥珀酸的含量逐渐增加。当初始葡萄糖浓度为 80 g/L 时, 丙酸对于葡萄糖的转化率降低为 40.81%。显然, 这对于丙酸发酵是不利的。

对不同初始糖浓度条件下 FBB 生产丙酸情况进行横向比较(图 4)。由图可知, 不同初始葡萄糖浓度条件下, 丙酸、乙酸、琥珀酸的生成情况差别较大。在相同的发酵时间, 高浓度葡萄糖条件下所生成的乙酸、琥珀酸含量明显高于低浓度葡萄糖。由此推测,

选择较低的初始葡萄糖浓度, 在葡萄糖基本消耗完全时, 通过补料将葡萄糖补入反应器中, 将可能有助于减少副产物的生成, 提高葡萄糖对于丙酸的转化率。

2.3 补料发酵对于 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 固定化发酵丙酸的影响

对两种不同补料浓度进行了考察(图 5)。图 5-A 和 5-B 总葡萄糖浓度分别达到 80 g/L 和 105 g/L。由图 5-A 可知, 通过补料发酵, 80 g/L 的葡萄糖在 156 h 时被全部消耗。与一次补入 80 g/L 的葡萄糖相比, 丙酸的终产量由 32.65 g/L 增加至 36.61 g/L, 提高了 12.13%。同时, 乙酸、琥珀酸的含量分别由 11.93 g/L、8.98 g/L 降低至 7.67 g/L、6.98 g/L, 丙酸占总酸的比例由 60.96% 提高至 71.42%。当补料发酵的总糖浓度达到 105 g/L 时, 发酵 280 h, 丙酸浓度达 45.91 g/L, 同时生成 8.89 g/L 的乙酸和 8.69 g/L 的琥珀酸。

2.4 不同发酵条件参数分析

对不同发酵条件下 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 发酵生产丙酸的参数进行分析(表 1)。数据表明, FBB 能够有效的实现丙酸的发酵生产, 与游离细胞相比, 丙酸生产效率得到了大幅的提高, 以 40 g/L 的葡萄糖为碳源, FBB 的发酵时间由 120 h 缩短至 60 h, 丙酸产量由 14.58 g/L 提高至 20.41 g/L, 产量提高了 40%, 生产效率提高了 1.7 倍。

随着 FBB 初始糖浓度的提高, 丙酸对于葡萄糖的转化率和丙酸占总有机酸含量均呈现出下降趋势, 分别从 40 g/L 葡萄糖的 51.02%、72.78% 降低至 80 g/L 葡萄糖的 40.81%、60.96%, 副产物含量的增多对于丙酸发酵是极为不利的, 发酵过程中初始葡萄糖浓度过高不利于丙酸的发酵。补料发酵能够较好的解决这一问题。当补料葡萄糖总浓度达到 80 g/L 和 105 g/L 时, 丙酸对于葡萄糖的转化率和丙酸占总有机酸的含量分别达到 45.76%、71.42% 和 43.72%、72.31%。

3 结论

以 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 为研究对象, 构建了一种新型 FBB 并将其应用于丙酸的生产。实验表明, 该 FBB 具有装置简单、生产高效等优点, 能够有效的运用于丙酸的固定化生产。

以 40 g/L 的葡萄糖为碳源, 与游离细胞相比, 利用 FBB 进行丙酸发酵生产, 丙酸产量由 14.58 g/L 提高至 20.41 g/L, 丙酸对于葡萄糖的转化率由 36.45% 提高至 51.02%。与游离细胞发酵相比, FBB 能够有效的提高丙酸的生产效率, 是一种有效的丙酸生产方法。

基于对 40~80 g/L 的葡萄糖浓度条件下 FBB 发

酵生产丙酸过程中的产物生成过程分析, 将补料分批发酵应用于丙酸发酵过程中。以 80 g/L 的葡萄糖为碳源进行丙酸发酵, 丙酸产量由 32.65 g/L 提高至 36.61 g/L, 发酵时间由 168 h 缩短至 156 h。当补料发酵葡萄糖总浓度达到 105 g/L 时, 丙酸产量达到

45.91 g/L, 丙酸占总有机酸含量的比例达 72.31%。与一次补入葡萄糖进行 FBB 发酵生产丙酸相比, 补料分批发酵能够有效的提高丙酸对于葡萄糖的转化率, 减少副产物的生成, 是一种较佳的丙酸生产方法。

此外, FBB 能够有效的实现细胞的吸附与解吸附,

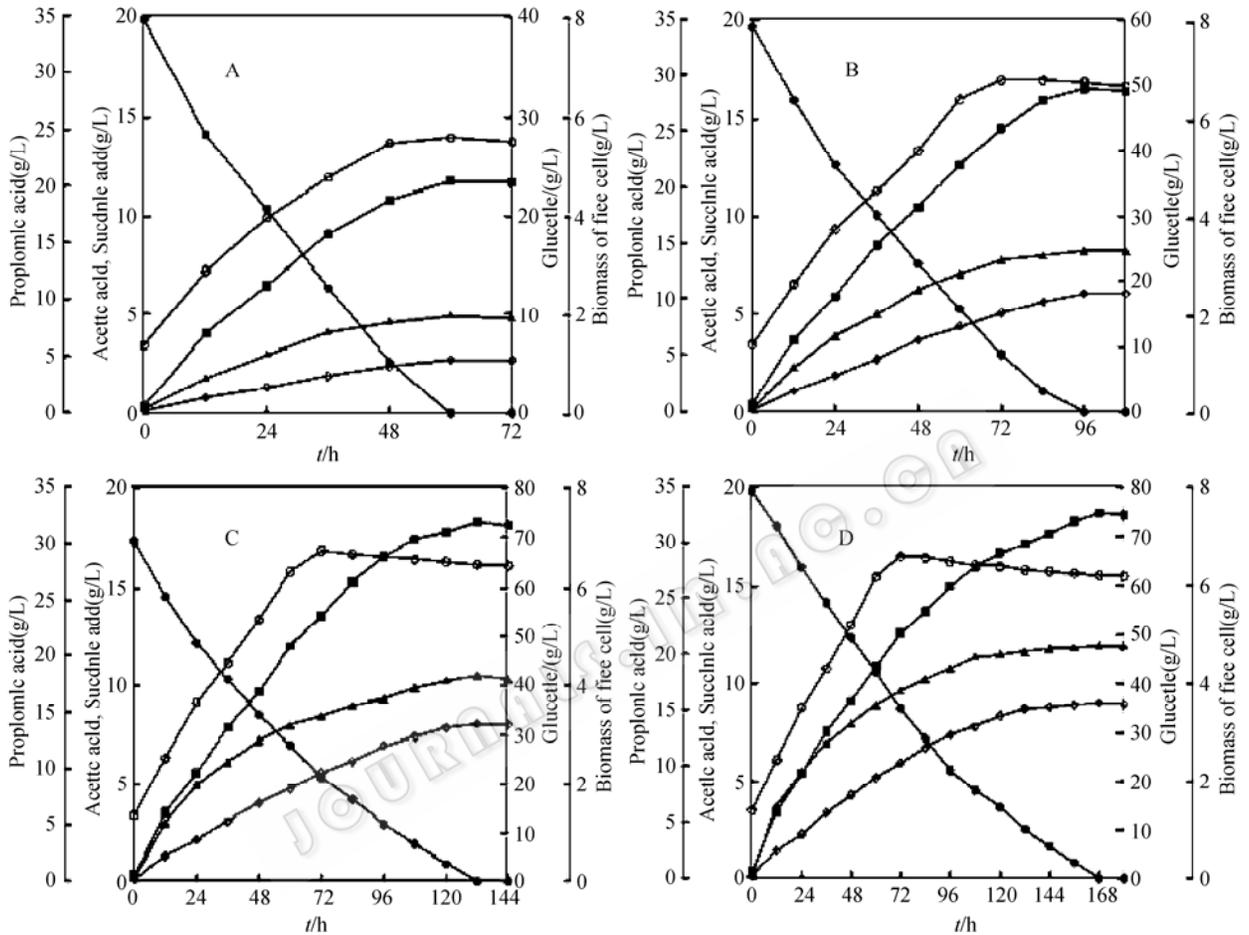


图 3 不同初始葡萄糖浓度对于 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 生产丙酸的影响

Fig. 3 Time course of propionic acid production by *P. freudenreichii* CCTCC M207015 with different glucose concentration

A, B, C, D: the glucose were 40 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L respectively. (■) propionic acid; (▲) acetic acid; (◇) succinic acid; (●) glucose; (○) biomass of free cell

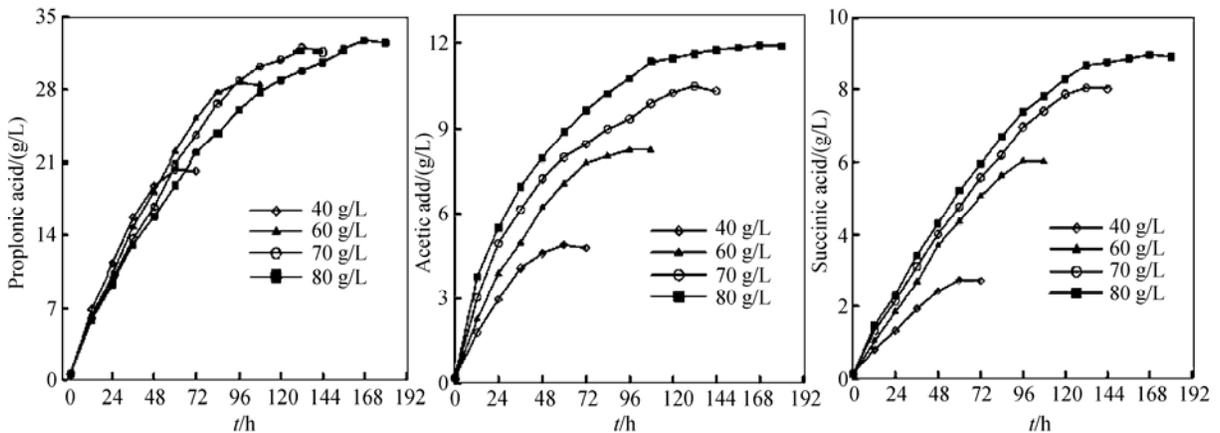


图 4 不同糖浓度条件下产物分析

Fig. 4 Analysis of productions with different glucose concentrations

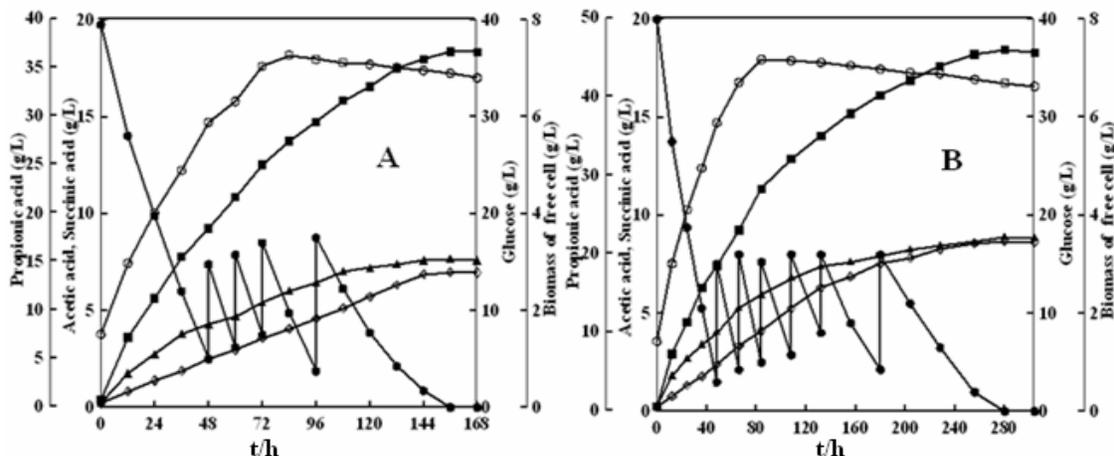


Fig. 5 补料发酵对于 *P. freudenreichii* CCTCC M207015 生产丙酸的影响

Fig. 5 Time course of propionic acid production by *P. freudenreichii* CCTCC M207015 with fed-batch fermentation

The total glucose was 80 g/L (A), 105 g/L (B). Propionic acid (■), Acetic acid (▲), Succinic acid (◇), Glucose (●), Biomass of free cell (○)

表 1 不同发酵条件参数分析

Table 1 Analysis of parameters with different fermentation culture

Culture	Free-cell fermentation	Fibrous-bed bioreactor					
		Batch fermentation			Fed-batch fermentation		
Glucose (g/L)	40.00	40.00	60.00	70.00	80.00	80.00	105.00
Biomass of free cell (g/L)	8.05	5.61	6.83	6.74	6.59	7.27	7.20
Propionic acid (g/L)	14.58	20.41	28.76	31.99	32.65	36.61	45.91
Acetic acid (g/L)	3.11	4.89	8.23	10.49	11.93	7.67	8.89
Succinic acid (g/L)	1.01	2.74	6.04	8.05	8.98	6.98	8.69
Conversion efficiency (%)	36.45	51.02	47.93	45.70	40.81	45.76	43.72
Propionic acid productivity (g/L/h)	0.12	0.34	0.30	0.24	0.19	0.23	0.16
Propionic acid/Acetic acid (g/g)	4.69	4.17	3.49	3.05	2.74	4.77	5.16
Propionic acid/Total acids (%)	78.00	72.78	66.83	63.30	60.96	71.42	72.31
Glucose exhausted time (h)	120.00	60.00	96.00	132.00	168.00	156.00	280.00

有利于保持 FBB 中细胞的活力, 这是原有的固定化方法所难以比拟的。该装置的构建为丙酸发酵开辟一个新的方法, 同时, 该装置的构建 FBB 对于其他有机酸的生产同样具有借鉴意义。

REFERENCES

- [1] Kerjean JR, Condon S, Lodi R, *et al.* Improving the quality of European hard-cheeses by controlling of interactions between lactic acid bacteria and propionibacteria, *Food Res Int*, 2000, **33**: 281–287.
- [2] Woskow SA, Glatz BA. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of propionibacterium acidipropionici in batch and semicontinuous fermentation, *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(10): 2821–2828.
- [3] Jin Z, Yang ST. Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol Progr*, 1998, **14**: 457–465.
- [4] Playne MJ. Propionic and butyric acids. In: Moo-Young M editor, *Comprehensive Biotechnology*, New York Pergamon, 1985, **3**: 731–755.
- [5] Huang YL, Wu Z, Zhang L, *et al.* Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. *Bioresour Technol*, 2002, **82**: 51–59.
- [6] Yang ST, Zhu H, Li Y, *et al.* Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**: 1124–1130.
- [7] Paik HD, Glatz BA. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42**: 22–27.
- [8] Zhao SX, Liang HZ, Cheng LJ, *et al.* Research on immobilization propionibacterium fermentation substrate. *China Food Additives*, 2005, **1**: 7–11. 赵树欣, 梁慧珍, 陈丽娟, 等. 固定化丙酸菌发酵底物的研究. *中国食品添加剂*, 2005, **1**: 7–11.
- [9] Suwannakham S, Yang ST. Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **91**(3): 325–337.
- [10] Xu H, Hong HS, Li S, *et al.* A method of production of propionic acid and vitamin B₂ with *Propionibacterium freudenreichii* NX-4. CN. Patent 2007100205798. 徐虹, 洪厚胜, 李莎, 等. 利用费氏丙酸杆菌NX-4 制备丙酸及联产维生素B₁₂的方法. 申请号: 2007100205798.