

# 丙酸积累对薛氏丙酸杆菌生长及产酸的影响\*

仪 宏 王丽丽 冯惠勇 董秀平 侯建革

(河北科技大学生物科学与工程学院 石家庄 050018)

**摘要:** 报道丙酸积累对维生素 B<sub>12</sub> 产生菌 *Propionibacterium shermanii* 生长及丙酸产生的影响, 在初糖浓度 6%, pH6.5 的批次发酵条件下, 测定了该菌的耗糖、产酸和菌体生长曲线。发酵 24h 后, 培养基中添加 1%、3% 和 6% 的丙酸, 发酵结束时菌体干重只有对照的 75.2%、65.4% 和 52.9%, 产酸是对照的 79.3%、69.2% 和 39.3%。加入 6% 的丙酸不能完全抑制耗糖和产酸。部分解除丙酸抑制可使菌体干重增加 60%。

**关键词:** 丙酸, 薛氏丙酸杆菌, 生长, 产酸

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0029-05

## THE EFFECTS OF PROPANOIC ACID ACCUMULATION ON THE GROWTH AND ACID-PRODUCTION OF *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

YI Hong WANG Li-Li FENG Hui-Yong DONG Xiu-Ping HOU Jian-Ge

(College of Bioscience & Bioengineering, Hebei university of science and technology, Shijiazhuang 050018)

**Abstract:** The effects of propanoic acid accumulation on the growth and acid-production of *Propionibacterium shermanii* are reported in this paper, the glucose consumption, acid production and cell growth curve are measured in the batch fermentation process with 6% glucose serves as carbon source and pH value controlled at 6.5. If 1%, 3%, and 6% propanoic acid are added to the broth 24 hours after inoculation, the cell dry weights obtained at the end of the fermentation change to 75.3%, 65.4%, 52.9% of the CK respectively, at the same time, the acid accumulation becomes 79.3%, 69.2%, 39.3% of the CK respectively. But even 6% propanoic acid is added, the glucose consumption and acid production could not be stopped completely. The cell dry weight increased 60% if part of the propanoic acid is removed from the broth and replaced by fresh medium.

**Key words:** Propanoic acid, *Propionibacterium shermanii*, Growth, Acid production

薛氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium shermanii*) 是丙酸杆菌属的一个种, 在厌氧条件下, 降解葡萄糖、蔗糖等碳源, 产生丙酸及少量乙酸等有机酸。丙酸是一种在化工方面有重要用途的有机酸, 丙酸及其盐类可作为食品及饲料防腐剂, 目前主要以化工法生产<sup>[1,2]</sup>。国际上一直在进行发酵法生产丙酸的研究, 由于丙酸的积累对丙酸菌的生长及产酸有显著抑制, 利用萃取、膜分离、电渗析等分离技术解除丙酸抑制是提高发酵法效率的重要策略, 但由于总体成本仍然偏高, 所以至今尚无工业生产的报道, 国内外研究仅仅停留在实验室水平<sup>[3-11]</sup>。用于丙酸发酵的菌种一般采用产酸丙酸杆菌 (*Propionibacterium acidpropionici*) 等, 薛氏丙酸杆菌并非丙酸发酵的首选菌种, 但它是厌氧发酵法生产 VB<sub>12</sub> 的首选菌种。采用该菌厌氧发酵生产 VB<sub>12</sub>, 发酵过程能耗低、成本低, 但由于丙酸积累等不利因素的制约, 发酵单位也比较低。

一个很好的策略是: 通过耦合发酵措施解除丙酸抑制, 提高维生素 B<sub>12</sub> 发酵单位,

\*“十五”国家科技攻关计划资助项目

收稿日期: 2002-05-31, 修回日期: 2002-08-14

同时收获丙酸作为副产品。但由于 VB<sub>12</sub> 的生物合成过程比较复杂敏感，容易受到发酵条件的变化的影响，而国外报道的耦合发酵技术措施大多是从单纯获得丙酸的角度去进行考虑的，在此策略中往往不能直接应用。因此，有必要针对该菌种的发酵过程的一些基本生理特征和生长动力学特征进行研究，为实现耦合发酵联产 VB<sub>12</sub> 及丙酸类化学品提供依据。本文报道丙酸积累对薛氏丙酸杆菌生长及产酸的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

*Propionibacterium shermanii*、*E. Coli* (VB<sub>12</sub>) 营养缺陷型菌株均由河北华荣制药有限公司提供。

### 1.2 发酵工艺

采用丙酸菌特定培养基，厌氧静止发酵，接种量 10%，30℃，维持 pH6.5，发酵周期 100h。

### 1.3 菌体干重测定

发酵过程定时取样，10,000 r/min 离心 5min，105℃烘干 4h，测定干重。

### 1.4 发酵总酸的测定

发酵过程定时取样，以 25% 的分析纯氨水滴定测定总酸，以丙酸计。

### 1.5 还原糖的测定

按 DNS 法<sup>[12]</sup>。

### 1.6 维生素 B<sub>12</sub> 的生物法测定

25mL 发酵液 100℃加热 30min，离心，上清液稀释后，定量培养大肠杆菌维生素 B<sub>12</sub> 缺陷型，经 30℃，20h 培养后，大肠杆菌在平板产生生长圈，维生素 B<sub>12</sub> 在一定的浓度下与大肠杆菌生长圈直径大小呈准确的比例关系。

## 2 结果

### 2.1 pH 值对菌体生长及产酸的影响

用定时补加氨水的方法维持不同的 pH 值，发酵结束时得到了不同的产酸总量和菌体干重，结果见表 1。

表 1 6% 初糖，30℃ 条件下，pH 值对菌体生长、产酸及 VB<sub>12</sub> 的影响

pH	6.0	6.5	7.0	7.2
100 h 产酸 (g/100mL)	2.01	2.09	2.26	2.38
干重 (g/100mL)	1.34	1.35	1.42	1.56
维生素 B <sub>12</sub> (mg/L)	34.0	35.1	32.8	27.6

由以上结果看出，pH 值高时菌体产酸较多，菌体干重有所增加，但对维生素 B<sub>12</sub> 的生成有影响，说明 pH6.5 最有利于维生素 B<sub>12</sub> 的合成。

### 2.2 初糖浓度对菌体生长的影响

发酵过程控制 pH 6.5，初糖浓度低时，菌体产量低，加大初糖浓度可以增加菌体干重，但初糖浓度超过 6g/100mL 之后，菌体干重、维生素 B<sub>12</sub> 产量不再增加，但产酸依然增加，这表明一定浓度的丙酸只抑制细胞生长，不完全抑制耗糖产酸。结果见表 2，认为 6% 为最佳糖浓度。

### 2.3 批次发酵情况下，*P. shermanii* 的生长、产酸、耗糖情况

由图 1 可见发酵 60h 后，此时产酸约为 1.6g/100mL，菌体的产酸速率及菌体的生长

速率开始下降,耗糖速率减慢,这与文献[7]报道一致。但60h后菌体的生长与产酸并不平行,菌体生长缓慢,但继续积累丙酸,最后达2.09g/100mL,糖酸转化率约为40%。  
**2.4 外加丙酸对 *P. shermanii* 生长的影响**

**2.4.1 发酵起始加入丙酸的影响:**在发酵培养基中加入2%的丙酸,pH6.5,然后接种发酵,结果菌体生长极度缓慢,100h后菌体干重只有0.31g/100mL,说明外加丙酸对菌体启动生长有较强的抑制作用。

**2.4.2 发酵过程中补加丙酸的影响:**接种发酵24h后,加入不同浓度的丙酸,维持pH6.5,结果见表3。由表3的结果看出,接种24h后加入丙酸,菌体耗糖减慢,菌体生长及产酸均受抑制,抑制程度随外加丙酸浓度成正比关系,但薛氏丙酸菌十分耐酸,即使加入了6%的纯丙酸,依然缓慢生长及产酸。

**2.5 解除丙酸对 *P. shermanii* 菌体生长的影响**

**2.5.1 发酵中期一次解除部分丙酸的影响:**在发酵40h后,取50%发酵液6,000r/min离心,弃去上清液,以除去发酵液中积累的一部分丙酸,离心后的菌体加入同等上清液体积的新鲜培养基(该新鲜培养基的组成同40h的发酵液基本组成一致),与剩余50%发酵液合并后继续培养。与对照比较,菌体的生长见图2,产酸曲线见图3。

由图2和图3可见,在发酵进行至40h一次离心解除丙酸后,菌体干重增加,产酸也增加;到72h,试验组与对照组的菌体干重分别是1.68g/100mL和1.37g/100mL,试验组高出

表2 糖浓度对 *P. shermanii* 生长及产酸的影响 (pH6.5)

初糖浓度 (g/100mL)	4.00	5.50	6.00	7.00	8.50
24h 残糖	2.88	4.52	5.08	6.18	8.08
48h 残糖	1.01	2.42	2.88	3.52	5.38
100h 残糖	0.28	0.41	0.52	0.6	0.96
100h 菌体干重	0.88	1.25	1.34	1.35	1.34
100h 产酸量	1.68	2.04	2.13	2.66	3.01
维生素 B <sub>12</sub> (mg/L)	22.4	35.1	35.3	35.4	35.2

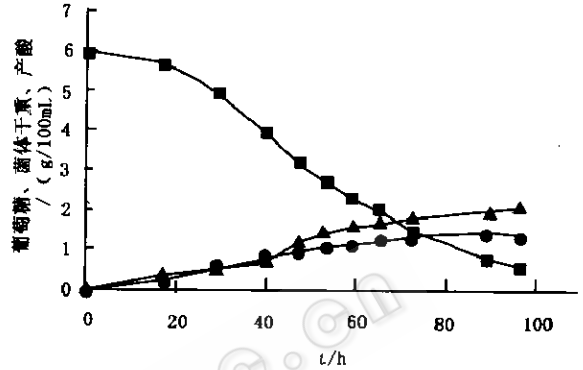


图1 薛氏丙酸菌的生长、产酸、耗糖曲线

●菌体干重, ■残糖, ▲产酸

表3 外加丙酸对 *P. shermanii* 降糖、菌体干重及产酸的影响

实验组号 (g/100mL)	对照	1号	2号	3号
0~24h 降糖	0.82	0.87	0.84	0.80
24~48h 降糖	2.21	1.22	0.78	0.72
48~72h 降糖	2.38	1.85	0.42	0.21
72~100h 降糖	0.68	0.32	0.44	0.40
100h 菌体干重 (相对百分比)	100	75.2	65.4	52.9
100h 产酸 (相对百分比)	100	79.3	69.2	39.3

注:接种24h后,以v/v百分比计,1号加入1%,2号加入3%,3号加入6%

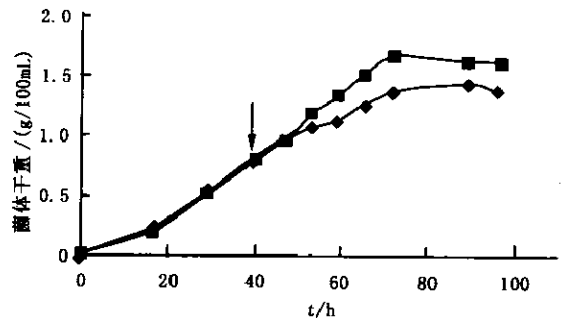


图2 一次解除丙酸对薛氏丙酸菌生长的影响

◆对照, ■解除丙酸

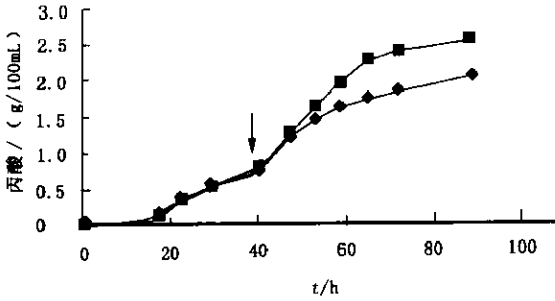


图3 一次解除丙酸对薛氏丙酸菌产酸的影响  
◆-对照, ■-解除丙酸

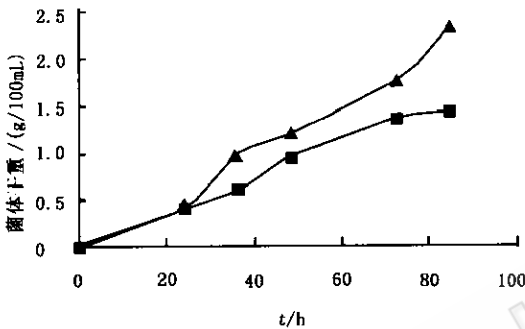


图4 多次解除丙酸对薛氏丙酸菌生长的影响  
▲-解除丙酸, ■-对照

对照 22%。

**2.5.2 多次解除丙酸的影响:** 发酵 24h 后, 每隔一定时间在无菌条件下, 对发酵液全部离心, 弃去上清液, 菌体加入新鲜的培养基, 继续培养, 结果见图 4。

由图 4 可见, 经 4 次解除丙酸后, 试验组菌体干重在 84h 达到 2.31g/100mL, 比同期对照组 1.44g/100mL 高出 60.4%。

### 3 讨论

通过以上实验初步可以得出以下结论: (1) 薛氏丙酸杆菌厌氧发酵葡萄糖产生维生素 B<sub>12</sub> 最适 pH 为 6.5, 初糖为 6.0g/100mL; (2) 丙酸积累反馈抑制菌体的生长速率及产酸速率; 批次发酵过程一般从 60h 开始表现抑制。(3) 当菌体生长过程中, 外加丙酸, 菌体生长及产酸均受抑制, 抑制程度随外加丙酸浓度成正比关系。(4) 发酵过程中, 采用离心换料的方式一次或多次解除丙酸抑制

后, 菌体干重增加, 经 4 次解除丙酸抑制可使干重增加 60% 以上。

丙酸积累对薛氏丙酸杆菌有较强的抑制作用, 这也是厌氧发酵维生素 B<sub>12</sub> 产率较低的主要原因。维生素 B<sub>12</sub> 是薛氏丙酸杆菌的胞内产物, 我们希望通过解除丙酸抑制, 增加菌体干重, 以期较大幅度的提高 VB<sub>12</sub> 的产量, 并能得到丙酸副产品。以上实验结果为从工业生产过程中建立连续解除丙酸工艺提供了依据。

### 参 考 文 献

[1] 冯景贤, 王大为. 广东化工, 1997 (2): 15~17.  
 [2] 玄恩锋. 现代化工, 1999 (11): 33~35.  
 [3] 徐虹, 欧阳平凯, 王莎莎. 食品与发酵工业, 1997, 23 (6): 62~65.  
 [4] Colomban A. Biotechnology and Bioengineering, 1993, 42 (9): 1091~1098.  
 [5] Lowi V P, Yang S H. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40 (4): 465~474.  
 [6] Jin Z W, Yang S T. Biotechnology Progress, 1998, 14 (3): 457~465.  
 [7] Quesada C A. Acta Biotechnol, 1998, 18 (3): 267~274.  
 [8] Rickert, David A, Glatz, et al. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22 (5): 409~414.  
 [9] Gu Z, Glatz, Bonita A, et al. Biotech and Bioengineering, 1998, 57 (4): 454~461.  
 [10] Boyaval, Patrick C, Christian M, et al. Enzyme and Microbial Technology, 1994, 16 (10): 883~886.  
 [11] Gu Z, Glatz B A, Glatz C E. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22 (1): 13~18.  
 [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 2001.1~3.