

发酵法生产丙酸的研究进展

马小魁 姚培鑫

(陕西省微生物研究所 西安 710043)

关键词: 发酵法, 丙酸

中图分类号: Q93-936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654-(1999)-06-0443-04

目前广泛使用的三大防腐剂苯甲酸、丙酸、山梨酸中, 丙酸是世界上公认的最经济实惠、安全有效的食用性防腐剂, 它可有效抑制霉菌、嗜氧芽孢杆菌、革兰氏阴性杆菌且对人畜基本无害, 因而被广泛运用在谷物、饲料和食品的防腐保鲜中。另外还可用来合成医药、塑料、农药、香料及除草剂等产品。目前世界年生产能力达 20 万吨且呈上升趋势。

丙酸最早曾用糖蜜淀粉发酵制备, 后随着化工技术的提高, 目前世界上已能用乙烯合成法、乙烯碳基化

法、丙稀还原法等生产。但随着现代生物技术的迅猛发展, 发酵法生产经济性的日渐提高, 近年来国外这方面的研究报道增多而国内甚少, 我们总结了近年来世界各国生产研究的情况, 以期对国内的研究有所启示。

1 发酵生产菌株

丙酸发酵以丙酸菌发酵为主。国内学者相继报道的北京丙酸杆菌费氏丙酸杆菌亚种就属此种^[1,2]。国外开展此方面的研究很早, 尤以研究 *P. acidipronici* 的较多, 详见表 1。

表1 丙酸发酵生产菌株

| 发酵菌株名 | 培养方式 | 底物 | 细胞浓度 | 丙酸浓度 | 生产率 | 作者 |
|--|-----------------|-----------------|-----------------------------|-------|------|--|
| <i>P. beiiingense</i> sp. nov | 分批培养 | 葡萄糖 | — | 9.36 | — | 乐华爱等 |
| <i>P. acidipropionici</i> (ATCC25562) | CSTR | 葡萄糖 | 1.5×10^9 | 3.74 | 0.18 | Clausen & Gaddy (1984) |
| | | 木糖 | 9.5×10^9 cfu/mL | | | |
| <i>Propionbacterium</i> sp. | 海藻酸钙 | 乳酸钠 | 4×10^9 | 5 | 2 | Cavin <i>et al</i> (1989) |
| | 固定化床 | | cfu/mL | | | |
| <i>P. acidipropionici</i> (ATCC25562) | CSTR+UF 细胞循环 | 木糖 | 95g/L | 18 | 2.2 | Cahondo <i>et al</i> (1987) |
| <i>P. acidipropionici</i> | CSTR+UF 细胞循环 | 乳糖 | 100g/L | 25 | 14.3 | Boyaval & Corre (1987) |
| <i>P. shermanii</i> | 连续搅拌 反应床 | 木糖(乳酸做 为中间物) | — | — | — | Ralphvv, Tyree <i>et al</i> (1991) |
| <i>P. acidipropionici</i> | CSTR+分阶 段培养 | 葡萄糖 糖蜜 | 125g/L | — | 3 | DEV. A. M. B (1994) |
| <i>P. pentosaceum</i> | 膜反应器 | 甘油 | — | 40±2 | 0.3 | Patrick Boyaval ⁽⁶⁾ Paik H-D (1994) |
| <i>P. acidipropionici</i> | 细胞固定化 | — | — | 57g/L | — | (1994) |

除丙酸杆菌外, Eur J Appl 1979 年报道他们发现瘤胃细菌可产生大量丙酸。Dong Jing 等人 1994 年报道一种命名为 *Zyga-charomyces rouxi* 的真菌可以在不同的 NaCl 浓度下产生丙酸。日本的谷口正之 1996 年

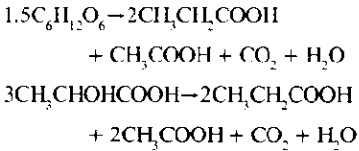
报道可利用双歧杆菌和丙酸菌进行混合菌发酵, 同年他又开发的膜型混合培养系统, 也是利用丙酸菌和长

收稿日期: 1998-11-25, 修回日期: 1999-03-08

双歧杆菌的,这种发酵提高了培养的生物量,还检不出乳酸。另外 GU Zhang 等人从生产实际出发选育了五株抗细胞自溶性强的菌株,对延长生产时间很有意义^[5]。这些都是丙酸生产资源的研究方向,

2 代谢过程机理

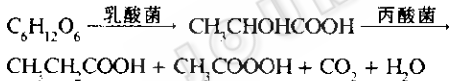
丙酸菌可利用多种碳水化合物、有机酸、多元醇产生丙酸,同时还生成醋酸、琥珀酸及二氧化碳等。其中消耗的糖中有75%生成丙酸及乙酸,其余大都生成二氧化碳。以葡萄糖和乳酸为底物的化学反应式为:



其中以丙酮酸做中间体经草酰乙酸生成琥珀酸,经 C₄-二羧酸途径形成丙酸,最大理论产率为 54.8% (W/W)总酸为 77%(W/W),但是各种产物的生成比率因基质和培养条件不同而异。

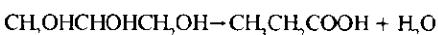
国外最近多尝试利用工业废料如木浆废液、淀粉水解液、硅酸盐废水等生产丙酸,但利用的主要成分还是原料中的糖类和有机酸,其反应途径仍然是 C₄-二羧酸循环。

Palph W tyree edgar C 等人利用乳酸做中间体采用混合菌发酵研究生产丙酸,其反应历程可简写为:



发酵中使用了乳酸菌和丙酸菌两种菌,后者利用前者的代谢产物做底物生成丙酸,从总的情况看,也好象完全等同于由葡萄糖生成丙酸,但丙酸菌直接转化乳酸的速度却比转化葡萄糖要大得多,可见乳酸是做为中间体参与丙酸代谢的,这样就可缩短丙酸发酵的周期,这在发酵工艺的控制上有意义^[4]。Sheng-Tsng Hsu 等人研究乳糖的丙酸发酵时,发现在 *P. acidipropionici* 的代谢过程中丙酮酸被检出,但是最后又消失了,这一现象足以证明以糖和乳酸为底物的丙酸代谢确是三羧酸循环的分支。

另外法国的 Patrick Boyaval 等人首先在膜反应器中以甘油为底物发酵只生成了丙酸,没有乙酸,而且丙酸浓度高达 40g/L,其反应式为:



这种机理历程短,转化率高,底物价格低,对

于工业化很有意义^[5],Barbirato, F 等人特别研究了三株菌转化甘油生成丙酸的能力,认为以甘油为碳源比葡萄糖更有优点^[6]。

Gu Zhang 等人研究认为在丙酸发酵中添加丙酸对其代谢历程、产物有影响^[7]。

3 发酵工艺

研究发酵工艺主要的目的之一,是提高目的产物产率或比体积产率,其直接关系到生产的经济性。

3.1 批式发酵 (batch Fermentation) 这是一种传统的培养方式,即“一次投料,一次放罐”。丙酸菌的批式发酵要注意控制温度、pH、溶解氧、培养基成份及浓度等参数。

pH是发酵工艺中的一个重要参数,尤其在产酸式发酵中,Sheng-Tslung Hsu 等人认为 *P. acidi propionici* 利用乳糖发酵时,pH在 4.5 到 7.12 的范围对生长速率、体积比生产率都有不同的影响。他指出:在 pH > 6.0 和 pH < 6.0 的丙酸发酵中,发酵产物都有丙酸、乙酸、琥珀酸、丙酮酸等,而且丙酸的生成也是在底物耗尽时才停止;但低的 pH 却强烈影响发酵速度,导致 pH < 6.0 下的速度比 pH > 6.0 下的要慢得多,而且在低 pH 下,细胞生长在稳定条件下对丙酸形成没有影响,却和乙酸和琥珀酸的生成呈正相关关系;他进步指出 5.0 到 5.5 的 pH 是丙酸发酵的最佳 pH。

丙酸菌属兼性厌氧菌,但是不同的菌株对氧有不同的耐受性。Camzi E 等人研究了八株丙酸菌对氧的敏感程度,指出有些菌株的比生长速率不明显的受好氧或厌氧的影响,而有些却不同程度的受受氧压的影响。控制氧压对菌株产丙酸及乙酸都有一定的影响^[8]。

3.2 高浓度细胞培养 这类装置一般通过固定化、充填床、细胞循环、电渗析膜技术等手段实现细胞的高浓度培养而大量生产目的产物。近年来这些技术被广泛地应用在发酵丙酸研究中。

H-D Paik, B. A Glatz 利用海藻酸钙固定丙酸菌细胞分别进行了批式、补料及连续培养,他们指出细胞固定化的条件参数是常常变化的,海藻酸钙的浓度应在 10g/L到 30g/L,如果选择不当,固定化床或柱子就不够稳定,而且为保证固定化床的稳定,培养物中的 CaCl₂浓度应保证在 18mmol/L,正是这种独特的固定技术使得三种培养方式的丙酸产率都比自由细胞的培养要高得多,其中连续培养的体积产率高达 0.95g/L · h

而且允许有比较高的稀释率^[9]。加拿大的 B. Ciu A 1996年指出在培养物中加入钙盐可大大提高固定化细胞的操作稳定性^[10]。Yang S-T等人开发了新式的纤维床反应器而从乳清发酵生产丙酸,这种反应器巧妙将 *P. acidipropionici* 细胞固定于涡卷状的纤维体上,并将其填充于内径5cm,长45cm的玻璃柱中,从而成功的实现了丙酸的高速发酵,生产性比分批发酵提高了约10倍^[11]。但是从整个看,丙酸菌的固定材料,条件等还需进一步的研究。

Vivian P等人用中空纤维丝过滤截留丙酸菌细胞建立了充填高浓度细胞反应器,他们选用的这种纤维质亲水性强、表面积大、亲和力高,因而比一般充填床有好多优点:(1)丙酸浓度高达2.5%;(2)操作稳定性好,长达4月之久,且无滞流、阻塞、活性降低等问题;(3)细胞滞流时间长,浓度高。正是这些优点使得丙酸生产率大大提高,生产操作也易于工业化^[12]。而且法国的 Patrick Boyavat等人利用带超滤膜循环细胞的连续装置(CSTR)组成高浓度细胞反应器,它巧妙地利用超滤膜(UF)截留细胞再返回培养器继续培养,尤其值得注意的,这种以甘油为唯一碳源的发酵,产物只有丙酸,没有乙酸,体积产率达0.3g/L·h,最大丙酸浓度为40±2g/L。在他们1995年发表的研究综述中指出当利用此装置发酵乳清中乳糖时,大大降低了丙酸对细胞的抑制,提高了丙酸菌的单位体积重量以及体积比产

率,其体积产率高达14.3g/L·h,比传统的批式发酵提高了480倍(批式发酵为0.03g/L·h),丙酸浓度高达25g/L,细胞浓度100g/L,他们还构建了一个37m³的实验工厂(陶瓷膜面积为32m³)^[13],为发酵法生产丙醇的工业化迈出了重要一步。

3.3 其它培养方式 丙酸代谢属典型的终产物抑制型,Nakano K等人用旋转的陶瓷膜和活性炭充填的柱子吸收发酵中产生的丙酸和乙酸从而降低了丙酸终产物抑制,使得葡萄糖对细胞增殖和产率的影响比分批培养都有所改善。我国留日学者张书延1993年报道用 *P. Shermanii* 菌与电渗析装置组合控制产物低浓度发酵亦减轻了最终产物抑制,提高了菌体浓度及丙酸和醋酸的生产率。Jin Zu Wei等人1998年也有类似报道。另外谷口正之在乳酸发酵中用能分离培养菌体的膜研制了膜式混合系统,这种膜的应用使得混合培养中常见的乳酸被直接代谢而促进了丙酸代谢,提高了生物量产出,活菌体量达12.5g/L,比乳酸菌和内酸菌单独培养时的总和还要高^[14]。

4 丙酸提取、精制

丙酸代谢除前面提到的以甘油为底物的以外,一般产物均为多种有机酸的混合物,这给丙酸的提取精制造成了很大困难,因为丙酸和主要的副产物乙酸同属弱酸且含量低,而且成份复杂,还可能包括水、琥珀酸、乳酸等。表2是近年来国外丙酸提取的研究汇总。

表2 各种丙酸提取精制方法优缺点的比较

| 名称 | 主要步骤 | 主要机理 | 优缺点 | 在丙酸提取中的应用 |
|-------|----------|--------|-----------|----------------------|
| 离子交换 | 酸化、吸附、洗脱 | 吸附力差异 | 操作简单 | 有一定应用 |
| 萃取和蒸馏 | 略 | 分子量差异 | 提取率低产品质量差 | 应用报道少 |
| 盐析 | 中和、酸化 | 酸碱反应 | 易操作 | 多用来生产其盐类 |
| 膜技术 | 过滤 | 具体方式而异 | 渗析技术分离效率高 | 应用广泛 ^[15] |

而且对各种技术也有具体的研究报道。美国的 Weier A等人1992年利用丙酸、乙酸、盐溶液分别变换的溶液做模式溶液,而用电渗析法研究分离其中的丙酸,研究指出培养液中盐的浓度对酸的分离有重要影响。

Nankano K等人研究了3种吸附剂吸附发酵醪液中丙酸的情况,特别指出醪液中pH的变化对吸附效率有很大影响。尤让人们感兴趣的 P. Boyavat等人在研究丙酸发酵的基础上,成功的开发了电渗析(ED)和电极—电渗析技术,这类技术在发酵过程中可以很容易

地降低发酵液中的丙酸,从而保证了细胞的高密度培养提高了丙酸产率;而且产生的氢氧化钙可以随时用来调节发酵液的pH值,同时使得产品中没有任何化学残留而更适于食品的防腐。

从以上看,提取精制丙酸难度大,费用高,严重影响着它的推广应用,随着发酵产酸水平的提高,我们设想可直接利用丙酸发酵液或经Ca(OH)₂中和脱色,浓缩的粗品做为大型饲料厂、农场、粮库的防腐保鲜剂,CoLomban A等人1993年就报道过用丙酸菌发酵液直

接做为青贮饲料的防腐剂。Block Wolfgang 1998年还报道了利用丙酸菌培养物制造防腐剂的步骤。

目前,虽然丙酸生产在国外仍为石油化工法生产,但发酵法生产研究已在多个层次上展开,发酵新菌种、培养方式、提取和精制的方法都是目前研究的重点。

国内丙酸产业基本还属空白,虽有化工法和发酵法生产的研究报道,但还没有正式形成生产能力,在我国开展此方面的任何研究对于形成丙酸产业,促进我国饲料和食品等行业的发展有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 乐华爱,金石运,王大超等. 微生物学报, 1987, 27(2): 105~109.
- [2] 谭蓓英,陈敏,程光胜等. 微生物学通报, 98, 25(1): 63~65.
- [3] Gu Zhang, Glatz, Glatz, Bonita A. Glatz Charees E, Biotech Bioeng, 1998, 57(4):454~461.
- [4] Rakog w. Chem Tech Biotechnol, 1991, 50:157~166.
- [5] Boyaval P, Shang Tian Yang. lait, 1995, 75:453~461.
- [6] Barbirato F, Chedaitte D, Bories A, Appe Microbiot Bioteehnot, 1997, 47(4):441~446.
- [7] Gu Zhang, Glatz Bonita, Glatz Chartes E. Enzyme Microb & Tech, 1998, 22(9):13~19.
- [8] Canzi, Del Puppo E. Microbiol Enainol, 1993, 43: 147~157.
- [9] H~D Paik, B. A. GLatz. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 42:22~27.
- [10] B., Gin A. Milchwisens Chaft, 1996, 51(2):73~78.
- [11] Yang S~T, Zhu H, Li Y, Biotechnol Bioeng, 1994, 43(11):1124~1130.
- [12] Vivian P, lewis, Shang Tian Yang, Biotech & Bioeng, 1992, 40:456~474.
- [13] P Boyaval C Corre. Lait, 1995, 75:453~461.
- [14] 谷口正之. 乳酸发酵总系统的开发, 1996, 89(1):89~