

丙酸发酵中氮源类型与组成的优化研究

孙浩, 刘寅, 毛多斌, 杨雪鹏, 魏东芝

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:研究不同氮源类型与组成对丙酸发酵的影响,结果表明:有机氮源优于无机氮源,混合有机氮源优于单一氮源.通过单因素试验和正交试验确定了最优氮源条件为:以酵母提取物与胰酶大豆肉汤为混合氮源,混合比例为2:1,氮源浓度为22 g/L.氮源经优化后能有效提高丙酸产量,发酵192 h后丙酸产量达22.89 g/L,与未优化氮源时的发酵结果相比提高26.46%.

关键词:氮源;丙酸;发酵;优化

中图分类号:TS201.3;TS202 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.04.012

The optimization of nitrogen source types and compositions on the propionic acid fermentation

SUN Hao, LIU Yin, MAO Duo-bin, YANG Xue-peng, WEI Dong-zhi

(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The effects of nitrogen source types and compositions on the propionic acid fermentation were examined. The results showed that organic nitrogen was better than inorganic nitrogen, the mixed organic nitrogen were better than single ones. The optimum nitrogen source conditions by single-factor experiment and orthogonal experiment were determined: yeast extract and tryptic soy broth as mixed nitrogen source, mixed ratio 2:1, the concentration of nitrogen source 22 g/L. Under the optimal conditions, the yield of propionic acid was 22.89 g/L after 192 h of fermentation, which increased 26.46% compared with that before the optimization.

Key words: nitrogen source; propionic acid; fermentation; optimization

0 引言

近年来,丙酸作为一种重要的精细化工产品及其化工原料,特别是在其在食品中的应用,使得其生产研究成为热点^[1].微生物发酵法生产丙酸的研究已较为深入,培养基中各种营养成分,如不同碳源(葡萄糖、甘油、乳酸)及浓度、微量元素等^[2-3],对于丙酸发酵的影响屡见报道.但是,对于氮源的类型及

其浓度对丙酸发酵的影响未见进行深入探讨的报道.

氮元素在微生物细胞的干物质含量中仅次于碳和氧,是构成菌体成分的重要元素.氮源是微生物生长所必需的重要营养物质,可分为无机氮源与有机氮源^[4-5].对丙酸发酵而言,氮源的作用十分重要,这是因为丙酸杆菌作为丙酸发酵过程的生产菌种,其对营养要求十分苛刻,需要提供多种维生素

收稿日期:2013-05-02

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX09304009);河南省国际科技合作计划项目(134300510012);郑州轻工业学院博士科研基金(2010BSJJ019)

作者简介:孙浩(1981—),男,河南省濮阳市人,郑州轻工业学院助教,博士,主要研究方向为生物工程.

及丰富氮源才能满足菌体生长及丙酸生产的需要^[6].因此,有必要对丙酸发酵过程中所需氮源的类型、组成及浓度等进行研究.本文拟通过比较不同氮源的类型、组成及浓度对丙酸发酵的影响,进而对氮源进行优化,以期获得较高的丙酸产量,为工业化生产提供参考.

1 实验

1.1 材料与仪器设备

产酸丙酸杆菌(*Propionibacterium acidipropionici* CGMCC1.2225)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心;酵母提取物 YE(yeast extract)和胰化蛋白胨购于英国 OXOID 公司;胰酶大豆肉汤 TSB(tryptic soy broth)购于美国 BD 公司;无水磷酸氢二钾、无水磷酸二氢钾、甘油和葡萄糖,分析纯,天津致远化学试剂有限公司产.

Bugbox 厌氧工作站,英国 Ruskinn 公司产;Varian 450—GC 气相色谱仪,美国 Varian 公司产;Biostat B plus5 L 全自动玻璃发酵罐,德国贝朗公司产;TOC Multi N/C 3100 总碳总氮分析仪,德国耶拿公司产.

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 酵母提取物 15.0 g/L,无水磷酸氢二钾 2.5 g/L,无水磷酸二氢钾 1.5 g/L. pH = 7.0,121 °C 灭菌 15 min.

1.2.2 发酵培养基 酵母提取物 15.0 g/L,无水磷酸氢二钾 2.5 g/L,无水磷酸二氢钾 1.5 g/L,混合碳源 40 g/L(甘油与葡萄糖的摩尔比为 4:1),pH = 6.5,115 °C 灭菌 30 min.

1.3 实验方法

1.3.1 种子培养方法^[7] 将装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 定制摇瓶抽真空后充入约 150 mL 纯氮气,丁基橡胶塞密封后 121 °C 灭菌 15 min,从 4 °C 保藏的液体种子中吸取种子液,以 5% 的接种量接种至 250 mL 厌氧摇瓶中,30 °C,150 r/min 培养 48 h.

1.3.2 发酵过程控制及培养条件 使用贝朗 5 L 全自动玻璃发酵罐,装有 2 L 发酵培养基,灭菌结束后一边降温,一边通入氮气(每 min 通入 0.5 L 氮气,持续通入 30 min,以保证厌氧环境)^[8].温度保持在 30 °C,搅拌转速设定为 150 r/min,通过自动流加 2 mol/L NaOH 溶液控制 pH = 6.5.

1.3.3 正交试验 在单因素试验的基础上,选取对丙酸产量具有较大影响的 2 个因素:混合氮源比例

(A)、氮源浓度(B),并结合发酵时间(C),采用正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,因素水平表见表 1.

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素		
	A/质量比	B/(g·L ⁻¹)	C/h
1	1:2	18	168
2	1:1	20	192
3	2:1	22	216

1.3.4 丙酸测定方法 采用气相色谱法对发酵液中的丙酸进行定量测量^[1].升温程序:1)80 °C 保持 1 min;2)以 25 °C/min 升至 120 °C,0 min;3)以 30 °C/min 升至 135 °C,0 min;4)以 15 °C/min 升至 180 °C,保持 1 min;汽化室温度 240 °C;检测器温度 240 °C.

1.3.5 细胞干重测定方法 取发酵液 2 mL,10 000 r/min 离心 1 min,去离子水洗涤 3 次,105 °C 烘至恒重后称量,通过计算后得出细胞干重 DCW(dry cell weight).

2 结果与分析

2.1 不同有机氮源对丙酸发酵的影响

通过总碳总氮分析仪测得所使用的酵母提取物、胰化蛋白胨、胰酶大豆肉汤和牛肉膏的含氮量分别为 12.5%,12.7%,11.0%,11.8%.在实验中,以初始的有机氮源添加量(15 g/L 酵母提取物)为参照,通过计算保证总氮摩尔数相同,考察上述 4 种有机氮源对发酵的影响,结果见图 1.

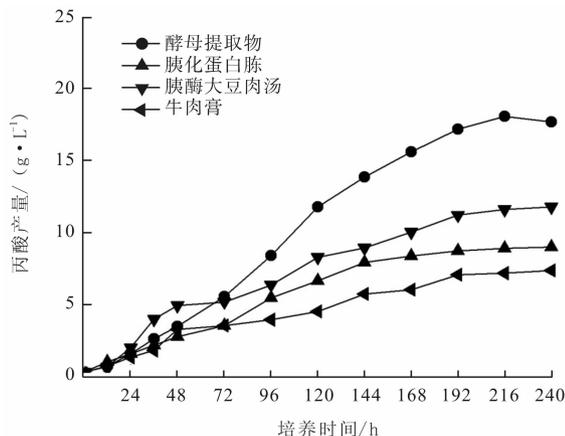


图 1 不同有机氮源对丙酸发酵的影响

由图 1 可知,单纯使用酵母提取物作为氮源时,丙酸产量最高,发酵 240 h 后可达 18.11 g/L;使用胰酶大豆肉汤作为氮源,效果次之,丙酸产量

为 11.76 g/L.

2.2 无机氮源对丙酸发酵的影响

经总碳总氮分析仪测得所使用的酵母提取物的含氮量约为 12.5%. 在实验中,以初始的有机氮源添加量(15 g/L 酵母提取物)为参照,通过计算保证总氮摩尔数相同,考察 2 种无机氮源(氯化铵和硝酸钠)对发酵的影响,结果见图 2.

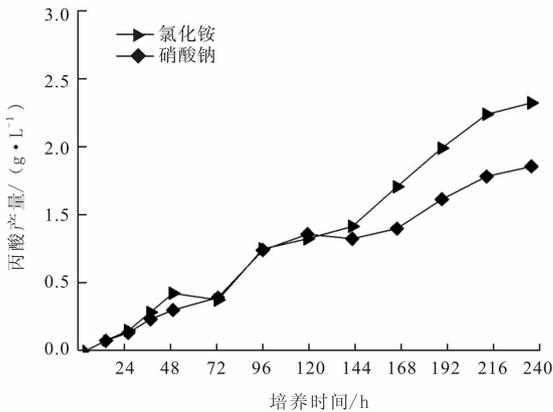


图 2 铵盐与硝酸盐对丙酸发酵的影响

从图 2 中结果并结合发酵情况可以得出以下结论:无机氮源并不适合丙酸发酵,使用无机氮源时丙酸产量极低,发酵 240 h 后分别只有 2.18 g/L(氯化铵)和 1.64 g/L(硝酸钠);但铵盐比硝酸盐略好.

2.3 无机氮源与有机氮源对丙酸发酵影响的比较

分别采用 4 种有机氮源和 2 种无机氮源,对产酸丙酸杆菌生长情况(以细胞干重表示)和产丙酸能力进行比较,试验结果见图 3. 由图 3 可知,可以看出,最优有机氮源为酵母提取物. 此外,无论是对于菌体生长,还是对于丙酸产量而言,有机氮源均优于无机氮源.

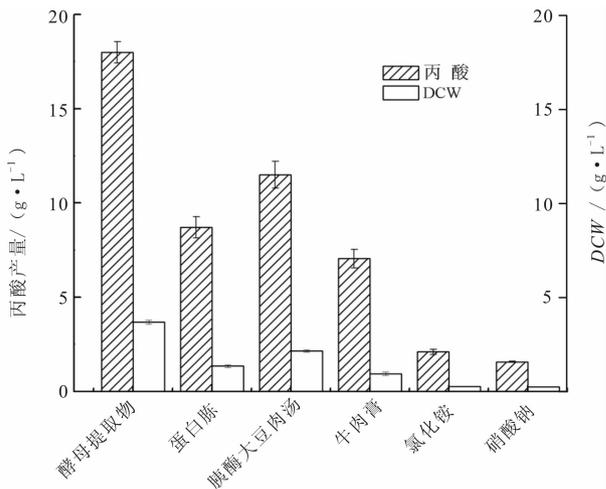


图 3 无机氮源与有机氮源对丙酸发酵的影响

2.4 不同比例混合有机氮源对丙酸发酵产量的影响

将有机氮源中最适合丙酸发酵的 2 种有机氮源(酵母提取物(YE)与胰酶大豆肉汤(TSB))进行复配,比例分别为 2:1,1:1,1:2,试验结果见图 4,并与单一有机氮源的丙酸发酵效果进行比较.

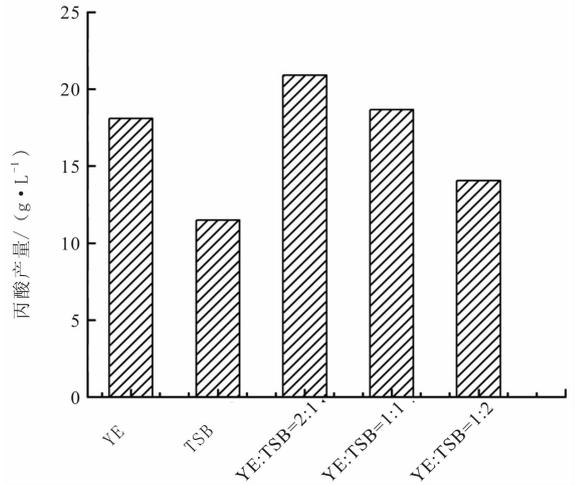


图 4 不同比例混合有机氮源对丙酸发酵的影响

由图 4 可知,混合有机氮源优于单一有机氮源,当 YE:TSB = 2:1 时,丙酸产量最高,发酵 216 h 后为 20.91 g/L.

2.5 氮源浓度对丙酸发酵的影响

选取浓度为 7.5 g/L,10 g/L,12.5 g/L,15 g/L,17.5 g/L,20 g/L,25 g/L,30 g/L,40 g/L 的混合氮源(YE:TSB = 2:1)进行发酵试验,发酵 216 h 后测定丙酸含量,结果见图 5. 由图 5 可知,氮源浓度过高或过低都会影响到菌体的生长和某些次级代谢产

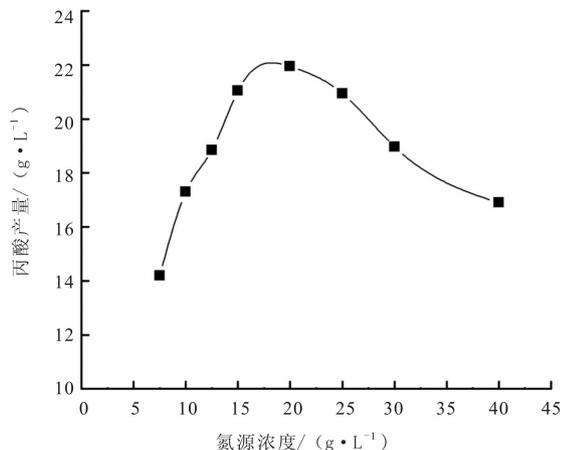


图 5 混合氮源浓度对丙酸发酵的影响

物的生成,当浓度过低时($< 15 \text{ g/L}$),很可能是由于营养物质不充分而未能给菌体提供有利的产酸条件,而过高($> 25 \text{ g/L}$)时则会减少丙酸的合成. 试验结果表明,当氮源浓度为 20 g/L 时丙酸产量最高,为 21.95 g/L .

2.6 正交试验结果

正交试验结果见表2,由表2可知,决定丙酸产量的影响因子顺序为:混合氮源比例(A) > 发酵时间(C) > 氮源浓度(B);丙酸发酵条件的最优因子组合为 $A_3B_3C_2$,即混合氮源比例(YE:TSB)为2:1,氮源浓度为 22 g/L ,发酵时间为192 h.

表2 正交试验结果

实验号	A	B	C	空列	丙酸产量 /($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	1	1	1	1	13.06
2	1	2	2	2	16.68
3	1	3	3	3	17.90
4	2	1	2	3	18.98
5	2	2	3	1	18.26
6	2	3	1	2	17.35
7	3	1	3	2	21.62
8	3	2	1	3	19.13
9	3	3	2	1	22.56
K_1	15.88	17.89	16.51		
K_2	18.20	18.02	19.41		
K_3	21.10	19.27	19.26		
R	5.22	1.38	2.89		

为进一步考查发酵条件的可靠性,进行3次重复性试验,在最优发酵条件下丙酸的平均产量可达 22.89 g/L ,比未优化前的结果提高26.46%.

3 结论

为提高丙酸发酵产量,以产酸丙酸杆菌为菌种,对丙酸发酵所需氮源进行优化. 通过单因素试验筛选出最佳氮源为混合有机氮源,且以酵母提取

物与胰酶大豆肉汤混合结果最优,最佳混合比例为2:1. 选取混合氮源比例、氮源浓度和发酵时间3个因素,确定最佳发酵工艺条件组合为:混合氮源比例 YE:TSB = 2:1,氮源浓度 22 g/L ,发酵时间192 h. 优化后的发酵条件能充分满足产酸丙酸杆菌的生长和代谢需要,并能有效提高丙酸产量,丙酸产量达 22.89 g/L ,比未优化前的结果提高26.46%.

参考文献:

- [1] Liu Y, Zhang Y G, Zhang R B, et al. Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici* [J]. Current Microbiology, 2011, 62: 153.
- [2] Balamurugan K, Dasu V V, Panda T. Propionic acid production by whole cells of *Propionibacterium freudenreichii* [J]. Bioprocess Eng, 1999, 20: 109.
- [3] Coral J, Karp S G, Portode Souza Vandenberghe L, et al. Batch fermentation model of propionic acid production by *propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 151(2): 333.
- [4] 李军, 武满满, 胡佳俊, 等. 非光合固碳微生物菌群最佳组合氮源的正交实验分析[J]. 工业微生物, 2012, 42(5): 14.
- [5] 冯志彬, 王东阳, 徐庆阳, 等. 氮源对L-苏氨酸发酵的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 54.
- [6] Rogers P, Chen J S, Zidwick M J. The Prokaryotes: Volume 1: Organic Acid and Solvent Production [M]. New York: Springer, 2006: 611 - 615.
- [7] 刘寅, 张永光, 张汝兵, 等. 响应面法优化产酸丙酸杆菌丙酸发酵条件的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 168.
- [8] Suwannakham S, Yang S T. Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 91: 326.