

# 固定化丙酸菌发酵生产丙酸

## ——黄水应用新途径

梁慧珍,赵树欣,杨志岩,程丽娟,曹井国

(天津科技大学生物工程学院,天津 300222)

**摘 要:** 研究了固定化丙酸菌利用黄水发酵产丙酸。在本实验条件下,选取固定丙酸菌的最适海藻酸钠的浓度为 4%。黄水做底物时固定化丙酸菌产酸量为 17.7 g/L,发酵时间 168 h;游离细胞产酸量为 11.5 g/L,发酵时间为 216 h;混合底物(葡萄糖:乳酸=1:1,1:2,1:3,1:4)的产酸量分别为 11 g/L,17 g/L,20 g/L,24 g/L。发酵时间 96 h。

**关键词:** 综合利用; 黄水; 固定化; 丙酸菌; 发酵; 丙酸

中图分类号:X797;TS262.3;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)02-0075-04

## Propionic Acid Production by Immobilized Propionibacteria

### ——New Utilization Method of Yellow Water

LIANG Hui-zhen,ZHAO Shu-xin,YANG Zhi-yan,CHENG Li-juan and CAO Jing-guo

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

**Abstract:** Yellow water, as the by-product during the production of liquor, was used as the substrate to produce propionic acid. In the laboratory-scale experiments, it was observed that the optimal concentration of sodium alginate was 4%; propionic acid output of immobilized propionibacteria as 17.7 g/L under the conditions of yellow water as substrate with fermentation time as 168 h; propionic acid output of free cells as 11.5 g/L with fermentation time as 216 h; and propionic acid output of mixed substrate (glucose: lactic acid=1:1,1:2,1:3 and 1:4) as 11 g/L,17 g/L,20 g/L and 24 g/L respectively with fermentation time as 96 h. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** comprehensive utilization; yellow water; immobilization; propionibacteria; fermentation; propionic acid

黄水是浓香型白酒酿造过程中的副产物,又名黄浆水,含有丰富的有机酸、酒精、还原糖、微生物菌体及活细胞等<sup>[1]</sup>。一般情况下,每生产 1000 kg 大曲酒,产生黄水 300~400 kg,年产万吨规模的大曲酒厂要产生黄水 3000~4000 t,日产量 10 t 左右。虽然黄水中含有众多可利用物质,但目前实际生产中,有不少厂家认为黄水是发酵的副产物,无利用价值,未能很好利用,甚至作为废物直接排放。据测定,黄水的 pH3~3.5;COD 25000~40000 mg/L,BOD 325000~30000 mg/L,远远超过国家允许的废水排放标准,黄水若不经处理直接排放,将造成严重的环境污染。

丙酸(Propionic acid,以下简称为 PA)是一种常见的有机酸,应用极为广泛<sup>[2]</sup>。目前,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。它可以有效抑制

霉菌、杆菌,且对人畜基本无害,因而被广泛用于谷物、饲料和食品的防腐保鲜。

因丙酸发酵是一条较难进行的代谢途径且受终产物抑制,故难以使产物积累到较高浓度<sup>[3-4]</sup>。为了克服上述困难,在实验室采用固定化丙酸菌的方法进行丙酸发酵。可以缩短菌体生长时间,提高细胞重复使用率,以减少菌体培养费用,提高产量。

黄水中乳酸和还原糖含量很高,可以做丙酸菌发酵的底物,且有丙酸菌生长和发酵所需的氮源。适合丙酸菌发酵产丙酸的条件,具有很高利用价值,通过实际应用,可以获得较好的经济效益和社会效益。

本实验中,我们首先以乳酸和葡萄糖作为混合底物进行了丙酸发酵,然后又用黄水为底物做发酵研究。

收稿日期:2004-10-22; 修回日期 2004-12-13

作者简介 梁慧珍(1968-),女,山东莱阳人,在读硕士研究生。

## 1 材料

### 1.1 菌种

丙酸杆菌 *Propionibacterium* spp.TQ-10, 由本实验室提供。

### 1.2 培养基

活化培养基(%): 乳酸钠 2, 磷酸氢二钠 0.1, 酵母膏 0.5, 硫酸镁 0.04, 碳酸钙 0.5。

固定化种子培养基(%): 葡萄糖 1, 酵母膏 1, 胰蛋白胨 1。

发酵培养基(%): 葡萄糖和乳酸的混合培养基(葡萄糖与乳酸之比分别为 1:1, 1:2, 1:3, 1:4)。

黄水发酵培养基: 将黄水加 15 % NaOH 调 pH6.8~7.0, 然后过滤, 过滤液灭菌(121 °C, 20 min)。

以上所有培养基调 pH6.8~7.0, 培养温度 30 °C。

### 1.3 试剂

海藻酸钠(上海化学试剂分装厂, 化学纯)。

### 1.4 仪器

GC7890 II 高效气相色谱仪, 上海天美科学仪器有限公司。

SBA 生物传感分析仪, 山东微生物研究所。

## 2 方法

### 2.1 固定化细胞制备方法

海藻酸钠固定方法<sup>[5-7]</sup> 用固定化种子培养基培养的丙酸菌, 30 °C 培养 4 d, 放入离心管中, 7000 r/min 冷冻离心 15 min, 倒出上清液, 再加入生理盐水(原菌液:生理盐水=8:3), 摇匀, 再离心, 倒出生理盐水溶液, 称重, 估算体积=细胞重量/1.08。按估算细胞体积: 无菌生理盐水体积: 4 % 海藻酸钠溶液的体积=1:1:6, 将混合液摇匀用注射器做成固定化颗粒, 先放到 1.5 % CaCl<sub>2</sub> 溶液中, 30 °C, 90 min。然后, 放到 0.6 % 的氯化钙溶液中, 应用前放到 4 °C 冰箱存放 1~7 d。

### 2.2 游离丙酸菌生长曲线的测定

生长曲线的测定是对培养基清液的可见光吸光度的测定, 以 24 h 为间隔, 吸取游离丙酸菌发酵液 2 mL, 稀释 10 倍, 蒸馏水为空白溶液, 波长为 600 nm, 测量 OD 值。

### 2.3 有机酸的测定

使用 GC7890 II 高效气相色谱仪测定发酵液中有机酸的含量。检测条件: 氢火焰离子检测器, T2000 数据处理, 采用色谱工作站, 色谱柱 GDX-401, 60~80 目, 柱长 2 m, 内径 3 mm, 柱温 200 °C, FID 温度 220 °C, 进样器温度 220 °C, 流速(N<sub>2</sub>)40 mL/min, (H<sub>2</sub>)40 mL/min, (空气) 400 mL/min, 取发酵液 1 mL, 加 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 mL,

10000 r/min 离心 5 min, 用微量注射器取上清液 1 μL 进样, 外标法定量。

### 2.4 残糖的测定

使用 SBA 生物传感分析仪对发酵液的残糖进行测定。取发酵液 1 mL, 10000 r/min 离心 5 min, 稀释 10 倍, 用微量注射器取上清液 25 μL 进样。

## 3 结果和讨论

### 3.1 游离丙酸菌对数生长期的测定

用活化培养基对丙酸菌进行培养, 按照 2.2 的方法测定生长曲线, 结果如图 1。

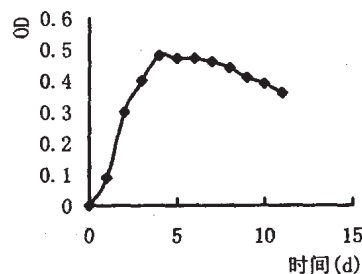


图1 丙酸菌生长曲线

从图 1 中可以看出, 丙酸菌培养到第 4 天时 OD 值最高, 说明第 4 天为对数生长期, 以后的实验中我们选用培养 4 d 的丙酸菌作固定化细胞。

### 3.2 不同的海藻酸钠浓度对固定化细胞的产酸影响

本次实验用 2 %, 3 %, 4 %, 5 % 4 种浓度海藻酸钠按 2.1 的方法制备固定化细胞, 然后进行发酵, 结果见表 1。

| 批次 | 不同海藻酸钠浓度对固定化丙酸菌产酸的影响 |      |      |      |      |      |      |      |
|----|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|    | 海藻酸钠浓度(g/100 mL)     |      |      |      |      |      |      |      |
|    | 2                    |      | 3    |      | 4    |      | 5    |      |
|    | PA                   | AA   | PA   | AA   | PA   | AA   | PA   | AA   |
| 1  | 0.17                 | 0.11 | 0.24 | 0.11 | 0.29 | 0.14 | 0.21 | 0.09 |
| 2  | 0.19                 | 0.10 | 0.26 | 0.12 | 0.30 | 0.14 | 0.22 | 0.11 |
| 3  | 0.22                 | 0.12 | 0.23 | 0.11 | 0.28 | 0.13 | 0.20 | 0.11 |
| 4  | 0.18                 | 0.10 | 0.21 | 0.10 | 0.26 | 0.12 | 0.17 | 0.12 |
| 5  | 0.15                 | 0.08 | 0.19 | 0.11 | 0.31 | 0.15 | 0.18 | 0.11 |
| 6  | 0.19                 | 0.10 | 0.22 | 0.09 | 0.30 | 0.13 | 0.20 | 0.12 |
| 9  | 0.16                 | 0.09 | 0.20 | 0.11 | 0.28 | 0.15 | 0.17 | 0.11 |

注: PA-丙酸 AA-乙酸。

从表 1 可以看出, 不同的海藻酸钠浓度所固定的丙酸菌产酸量不同, 4 % 的海藻酸钠产酸量最高, 其次是 3 % 海藻酸钠, 2 % 和 5 % 的海藻酸钠的产酸量较低。这是由于 2 % 的海藻酸钠与菌体混合后制备的固定化颗粒较软, 成型不是太好, 容易发生菌体泄漏, 影响产酸。又从海藻酸钠固定化细胞的原理可知<sup>[8-10]</sup>, 海藻酸钙凝胶体的多孔性系数随海藻酸钠浓度的增加而降低, 因而 5 % 海藻酸钠固定化的细胞产酸量较低。因此, 从全面考

虑凝胶的成型质量、通透性及丙酸产量出发,较佳的海藻酸钠浓度取4%。

### 3.3 以乳酸和葡萄糖混合物为底物对固定化丙酸菌发酵产酸的影响

由于黄水中含有多量的乳酸和葡萄糖,还含有其他成分,是一种混合物。先将乳酸和葡萄糖的混合物做底物以模拟黄水进行比较。固定好的丙酸菌以葡萄糖和乳酸混合物为底物,葡萄糖和乳酸的比例分别为1:1,1:2,1:3,1:4。即4种培养基中浓度分别为:A 10 g/L 葡萄糖+10 g/L 乳酸,B 10 g/L 葡萄糖+20 g/L 乳酸,C 10 g/L 葡萄糖+30 g/L 乳酸,D 10 g/L 葡萄糖+40 g/L 乳酸进行发酵,其检测结果见图2~图5。

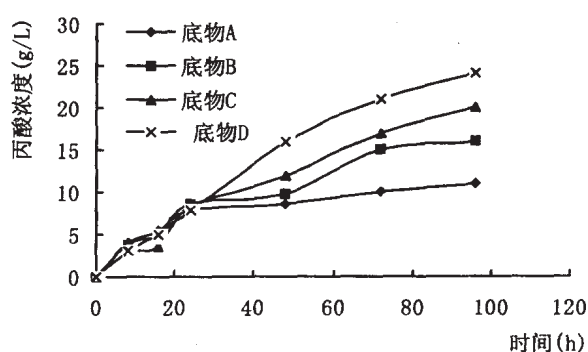


图2 混合底物产丙酸情况

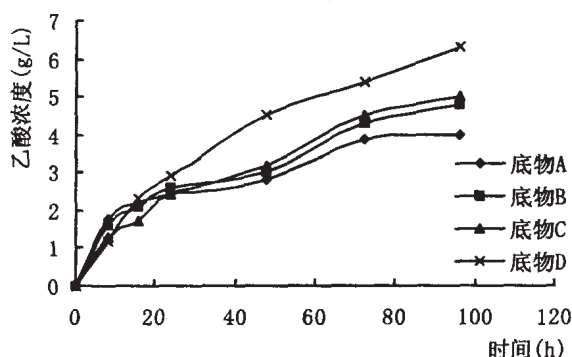


图3 混合底物产乙酸情况

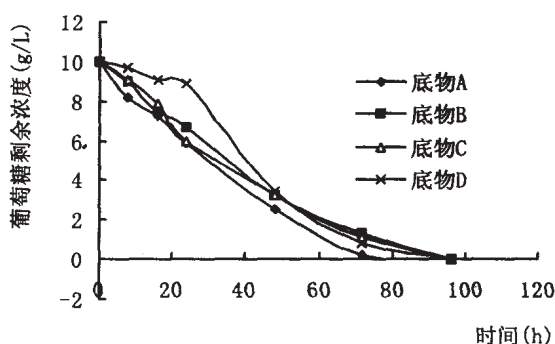


图4 混合底物中葡萄糖的消耗情况

由图4,图5中可以看出,以葡萄糖和乳酸为混合底物时,48 h后不同浓度的乳酸全部消耗,96 h 葡萄糖也消耗完毕。从图2看出,发酵结束时不同浓度的混合

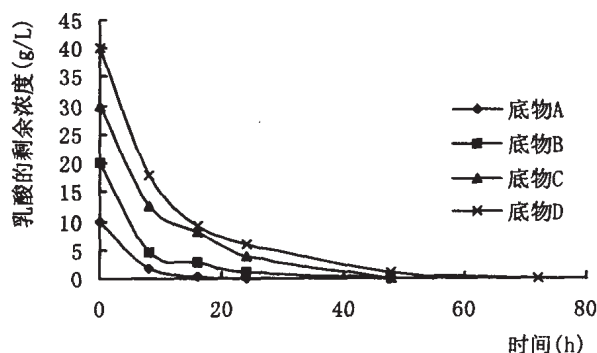


图5 混合底物中乳酸的消耗情况

底物的丙酸产率分别为53%,53%,50%,48%,整个发酵过程中的丙酸生成速率分别为0.0058 g/L·h,0.0055 g/L·h,0.0052 g/L·h,0.005 g/L·h。

实验中发现,乳酸和葡萄糖总是同时消耗的,混合后乳酸和葡萄糖的消耗速度加快,而乳酸比葡萄糖更快。当乳酸浓度:葡萄糖浓度为3时,丙酸:乙酸=4,其他都在3~4之间。根据Martínez-Campos R and de La Torre M<sup>[12]</sup>在文中所说的作为共同底物,葡萄糖改变了丙酸:乙酸的克分子比,并增加了用于生物体生长的碳源部分。乳酸的浓度对丙酸杆菌生长有负面作用,葡萄糖和乳酸共同代谢时可以降低乳酸的生长抑制作用。葡萄糖能增加可利用的NADH,并限制乳酸到乙酸的代谢流向,批次发酵中有利于丙酸的生产。

Excel单因素方差分析混合底物产丙酸的结果( $\alpha=0.05$ )见表2。

| 表2 Excel单因素方差分析混合底物产丙酸的结果 |          |     |
|---------------------------|----------|-----|
| F                         | fcrit    | 显著性 |
| 4.05163                   | 2.689632 | *   |

由表2的分析可以看出,不同浓度的混合底物对丙酸产量的影响是显著的。综合产率、底物利用率及发酵时间,C是最佳浓度。

### 3.3 以黄水为底物时固定化丙酸菌的发酵情况

根据资料介绍,黄水的成分分析结果<sup>[13]</sup>见表3和表4。

| 表3 黄水中的常规成分 (g/L) |         |          |           |
|-------------------|---------|----------|-----------|
| 种类                | 含量      | 种类       | 含量        |
| 固形物               | 131~175 | 粘度(Pa/s) | 36.5~50.1 |
| 酸度                | 4.3~6.7 | 总氮量      | 2.5~3.7   |
| 淀粉                | 23~45   | 总酸量      | 28~36     |
| 还原糖               | 23~45   | 总酯       | 1.2~2.1   |
| pH                | 2.5~4.2 |          |           |

| 表4 黄水中有机酸的含量 (g/L) |          |    |           |
|--------------------|----------|----|-----------|
| 种类                 | 含量       | 种类 | 含量        |
| 乳酸                 | 21~78    | 丁酸 | 0.65~1.6  |
| 己酸                 | 0.13~2.4 | 丙酸 | 0.002~0.2 |
| 乙酸                 | 2.8~5.2  |    |           |

本次实验所用的黄水来自天津某酒厂,其乳酸和葡萄糖含量分别为 21 g/L 和 20 g/L。配制好的黄水培养基中加入固定化丙酸菌在 30℃进行批式发酵,同时用游离丙酸菌作对照实验。结果见图 6 和图 7。

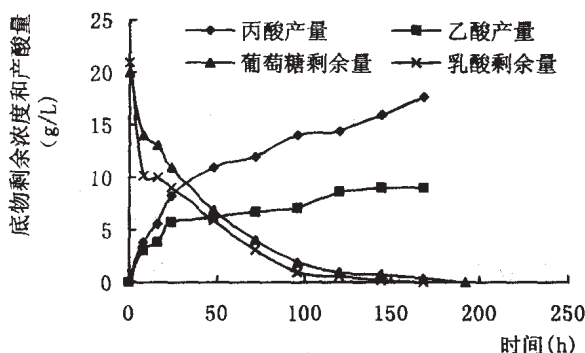


图 6 黄水为底物固定化丙酸菌的发酵情况

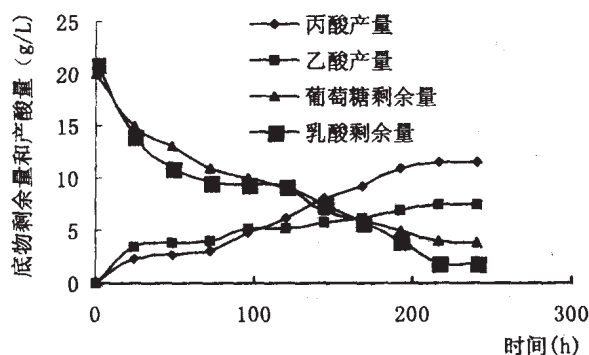


图 7 黄水为底物游离丙酸菌的发酵情况

从图 6 和图 7 可以看出,固定化丙酸菌利用黄水发酵所用时间为 168 h,此时底物消耗完毕,高于混合底物所用时间(96 h)。最终丙酸产量为 17.7 g/L,产率为 0.2 g/L·h,游离丙酸菌利用黄水发酵所用时间为 240 h,底物没有消耗彻底,随着时间的延长,消耗不明显,最终丙酸产量为 11.6 g/L,产率为 0.11 g/L·h。以黄水为底物时,无论是固定化还是游离丙酸菌发酵都是葡萄糖和乳酸同时消耗,葡萄糖的消耗速度要比乳酸慢。这一点与混合底物的发酵是相同的。对固定化丙酸菌的发酵来说,前 24 h 丙酸与乙酸之比小于 2,以后在 2 左右。而混合底物发酵在 3~4 之间。对游离细胞发酵来说,前 96 h 丙酸与乙酸之比小于 1,以后都大于 1 但小于 2。这是因

为黄水中有少量乙酸的存在,它对发酵产生一定的影响。

#### 4 结论

将黄水进行简单处理,利用固定化丙酸菌发酵产生丙酸是可行的。对黄水的利用开辟了一条新途径,既有经济效益又有社会效益。

#### 参考文献:

- [1] 刘兴禹,张为民,徐光.浓香型白酒生产中黄水的应用[J].酿酒,2000,(3):43-44.
- [2] 陈天书,王海霞,郭宏伟.丙酸及其利用[J].化学工程师,2001,85(4):41-42.
- [3] 熊海燕,王为国,曾东方,等.发酵法生产丙酸的研究[J].化学与生物工程,2003,(5):23-24.
- [4] 徐虹,欧阳平凯,王莎莎.发酵法生产丙酸[J].食品与发酵工业,1997,23(6):62-65.
- [5] David A.Rickert, Charles E, and Bonita A.Glatz.Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized propionibacteria[J].Enzyme and Microbial Technology,1998,22:409-414.
- [6] H.-D.Paik·B.A.Glatz.Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of propionibacterium acidipropionici[J].Appl Microbiol Biotechnol,1994,42:22-27.
- [7] BusABA Yongsmith and Krisna Chutima. Production of vitamin B<sub>12</sub> by Living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels[J].J.Ferment.Technol.,1983,6(61):593-598.
- [8] 曹永梅.海藻酸钠固定化细胞及其在食品工业中的应用[J].中国乳品工业,2001,29(6):34-36.
- [9] 王蓓,金石云,乐爱华.海藻酸盐固定化北京杆菌丙酸发酵的研究[J].生物工程学报,1992,8(2):178-185.
- [10] K.Czaczyk·K.Trojanowska·W.Grajek.The influence of a specific microelemental environment in alginate gel beads on the course of propionic acid fermentation[J].Appl Microbiol Biotechnol (1997) 48:630-635.
- [11] Martínez-Campos R and de la Torre M.[J].Biotech Lett, 2002, 24(6): 427-431.
- [12] 罗惠波,张宿义,卢中明.浓香型白酒黄水的应用探索[J].酿酒科技,2004,(1):40-41.

## 习酒公司荣获国家级管理创新成果二等奖

本刊讯:第十一届国家级企业管理现代化创新成果评审日前揭晓,以习酒公司董事长、总经理刘自力为主创人员提出的《酿酒企业生产与营销中的诚信管理》荣获全国企业管理现代化创新成果二等奖。《酿酒企业生产与营销中的诚信管理》是习酒公司企业文化建设的核心内容,它激励、规范员工在生产经营行为中要以诚为始,用诚律己,终情而归,实现企业发展与富商、安商、乐商、亲商的同步。(小小)