

有机酸对 *Actinobacillus succinogenes* 厌氧发酵过程的抑制作用*

左鹏, 吴昊, 李建, 陈可泉, 姜岷, 韦萍

(南京工业大学制药与生命科学学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京, 210009)

摘 要 通过在发酵培养基中分别添加不同浓度的丁二酸、甲酸和乙酸, 考察了3种有机酸对菌体生长及代谢产物积累的影响。结果表明, 在初始葡萄糖浓度为40 g/L厌氧发酵产丁二酸体系中, 甲酸抑制作用最强, 乙酸次之, 丁二酸无明显抑制作用。当甲酸和乙酸总浓度超过13.70 g/L时, 菌体开始衰亡。利用膜循环生物反应器在发酵过程甲酸和乙酸总浓度达到13.70 g/L时移出部分抑制性代谢产物, 有效地降低了有机酸对 *A. succinogenes* NJ113 生长代谢的抑制作用, 丁二酸生产强度达1.70 g/(L·h), 比分批发酵提高了17.2%。

关键词 *Actinobacillus succinogenes* NJ113, 厌氧发酵, 有机酸抑制, 丁二酸, 膜循环生物反应器

丁二酸又称琥珀酸, 是重要的碳四平台化合物之一, 被广泛用于食品、化工和制药行业。目前主要的生产方法是以顺丁烯二酸酐为原料通过电解生产, 污染大, 成本高, 这严重制约了丁二酸这一大宗化学品的发展潜力^[1]。随着石油资源日益枯竭和生物法制备丁二酸的技术进步, 利用微生物发酵法生产丁二酸引起越来越多国家的重视^[2]。

有机酸对发酵过程的抑制作用是一种常见的现象, 例如在丙酸、乳酸的发酵过程中, 随着有机酸的积累, 影响了生产效率^[3,4]。目前用于丁二酸生产的野生型菌株, 如 *Actinobacillus succinogenes*^[5,6], *Anaerobiospirillum succiniciproducens*^[7,8] 和 *Mannheimia succiniciproducens*^[9], 在高产丁二酸的同时也积累了甲酸、乙酸等有机酸。这些有机酸在发酵液中的积累一定程度上抑制了菌体的生长代谢, 降低了丁二酸的生产效率^[2]。因此研究有机酸对微生物厌氧发酵产丁二酸抑制作用, 对于指导丁二酸发酵的代谢调控, 提高丁二酸的生产效率具有重要的意义。

本文通过在初始培养基中添加抑制性有机酸产物, 考察各有机酸对 *A. succinogenes* NJ113 发酵过程的抑制作用, 进一步通过膜循环生物反应器在发酵过程中移出部分抑制性产物, 提高丁二酸的生产效率。

第一作者: 硕士研究生(姜岷为通讯作者)。

* 国家高技术发展计划“863”(No. 2006AA02Z235), 国家自然科学基金资助项目(No. 20606017), 江苏省高技术研究计划项目(BG2007001), 江苏省高校自然科学研究计划项目(08KJB180003)

收稿日期: 2008-09-16, 改回日期: 2009-01-13

1 材料及方法

1.1 实验菌株

Actinobacillus succinogenes NJ113 (CGMCC No. 1716), 南京工业大学制药与生命科学学院实验室分离并保存。

1.2 培养基

1.2.1 平板培养基(g/L)

葡萄糖 2.5 (分消), 酪蛋白 17, NaCl 5, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.5, 琼脂 20, pH 7.0, 121℃灭菌 15min。

1.2.2 种子培养基(g/L)

葡萄糖 10 (分消), 酵母膏 5, $NaHCO_3$ 10, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 9.6, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 15.5, pH 7.0, 121℃灭菌 15 min。

1.2.3 发酵培养基(g/L)

葡萄糖 30~40 (分消), 酵母膏 10, 富马酸二钠 1, KH_2PO_4 3, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.3, $CaCl_2$ 0.3, NaCl 1, pH 7.0, 121℃灭菌 15 min。

1.2.4 补料培养基(g/L)

葡萄糖 40 (分消), 酵母膏 10, 富马酸二钠 1, KH_2PO_4 3, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.3, $CaCl_2$ 0.3, NaCl 1, pH 7.0, 121℃灭菌 15 min。

1.3 主要仪器及设备

孔径为0.1 μm 有机中空纤维膜组件: 天津膜天膜工程技术有限公司; 保定兰格 BT00-300M 蠕动泵: 保定兰格恒流泵有限公司; KBT-5L 生物反应器: 韩国 KBT 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 种子培养方法

将保存于-80℃的菌种接种到平板, 37℃厌氧

培养箱活化培养,然后转接到种子培养液中,摇床转速 200 r/min,37 ℃下培养 11 h 作为种子。

1.4.2 分批发酵培养方法

5 L 发酵罐,装液量 3 L,初始葡萄糖浓度为 40 g/L,按 5% 的接种量接种,分别控制搅拌转速和温度在 200 r/min 和 37 ℃,CO₂ 通气量为 0.25 vvm,用 300 g/L 的 Na₂CO₃ 调节 pH 在 6.7。每隔 2~3 h 取样 1 次。当葡萄糖消耗速率小于 0.5 g/(L·h) 时发酵终止。

分批培养时通过添加甲酸钠、乙酸钠和丁二酸二钠考察有机酸对发酵过程的影响,文中有机酸浓度为各有机酸钠盐的换算值。

1.4.3 膜循环生物反应器半连续发酵培养方法

发酵初始进行分批培养,初始葡萄糖浓度为 30 g/L,其他条件同 1.4.2,当发酵液中有有机酸总浓度达到一定值时,通过中空纤维膜将发酵液分离出去,然后再补入相同体积的补料培养基,分离补料体积均为发酵体积的 50%,补料结束后进行分批发酵,以此重复至发酵终止。每隔 2~3 h 取样 1 次。

1.5 分析方法

1.5.1 葡萄糖含量分析

SBA-40C 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)检测。

1.5.2 有机酸含量测定

高效液相色谱法(HPLC)^[10]。

1.5.3 菌体浓度检测

菌体生长通过菌体细胞干重测定。干燥的 5 mL 离心管称重(G_1),取 4 mL 发酵液置于离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;再用 4 mL 生理盐水清洗一次重复离心步骤;将沉淀物连同离心管置于烘箱中,50℃干燥至恒重,称重(G_2)。菌体干重/ $g \cdot L^{-1} = (G_2 - G_1)/4$ 。

1.5.4 丁二酸收率及生产强度定义

丁二酸收率定义:丁二酸浓度与初始葡萄糖浓度的比值,表示为百分数。丁二酸生产强度定义:单位时间、单位体积产丁二酸的质量。

2 结果与讨论

2.1 *A. succinogenes* NJ113 厌氧发酵产丁二酸的过程特征

初始浓度为 40 g/L 的葡萄糖厌氧分批发酵,考察发酵过程中各参数随时间的变化。如图 1 所示,当发酵至 8 h,菌体生长进入稳定期,菌体浓度达到

4.33 g/L,稳定期维持 4 h 后菌体开始衰亡,此时甲酸、乙酸和丁二酸的浓度分别为 5.79 g/L、7.91 g/L 和 19.67 g/L,总有机酸浓度达到 33.37 g/L,发酵初始至稳定期后期丁二酸生产强度为 1.63 g/(L·h)。随着有机酸的积累,丁二酸生产强度不断下降,至发酵结束时,丁二酸生产强度下降至 0.98 g/(L·h),且菌体浓度也下降至 3.20 g/L。最终丁二酸产量为 26.10 g/L,收率为 65.0%,平均生产强度为 1.45 g/(L·h)。由此可见,随着发酵液中有有机酸的积累,抑制了菌体的生长,降低了丁二酸的生产强度。

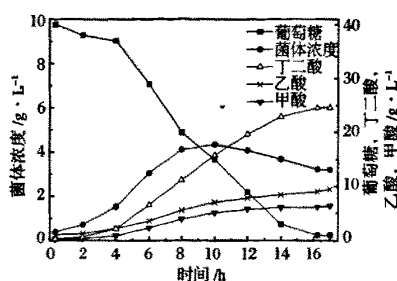


图1 40 g/L 初始葡萄糖用 *A. succinogenes* NJ113 分批发酵过程曲线

2.2 添加有机酸对 *A. succinogenes* NJ113 厌氧发酵的影响

由于各有机酸代谢产物对发酵过程可能有不同程度的抑制作用,因此,在 40 g/L 初始葡萄糖浓度下,发酵培养基中分别添加不同浓度的甲酸、乙酸和丁二酸,考察其对 *A. succinogenes* NJ113 厌氧发酵过程的抑制作用强弱。

2.2.1 甲酸的影响

在初始发酵培养基中分别添加 0、3.00、5.00 和 7.50 g/L 甲酸,考察不同浓度的甲酸对菌体生长和代谢产酸的影响。由图 2 可以看出,随着甲酸添加量的提高,菌体生长延滞期随之延长,稳定期时菌体浓度不断下降。当添加 3.00 g/L 和 5.00 g/L 甲酸时,稳定期菌体浓度分别为 3.23 g/L 和 2.17 g/L,比未添加甲酸的分别减少 25.4% 和 49.9%;而添加 7.50 g/L 甲酸时,菌体生长缓慢,菌体最高浓度仅为 1.52 g/L,比未添加甲酸稳定期时菌体浓度下降 64.9%。

从表 1 可以看出,随着甲酸添加量的增加,发酵液中残糖浓度不断增加,发酵时间不断延长,丁二酸生产强度也随之降低,当初始添加甲酸从 0 g/L 至 7.50 g/L 时,到发酵终止,残糖浓度从 0 g/L 上升至 26 g/L,丁二酸生产强度从 1.45 g/(L·h) 下降至 0.33 g/(L·h)。

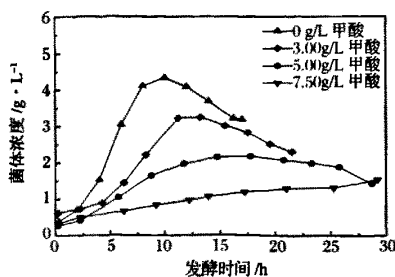


图2 添加不同浓度甲酸的分批发酵菌体生长曲线

表1 甲酸对发酵过程的影响

初始添加 甲酸浓度 /g · L ⁻¹	发酵时间 /h	残糖浓度 /g · L ⁻¹	丁二酸 收率 /%	丁二酸生 产强度 /g/(L · h) ⁻¹
0	17	0	65.0	1.45
3.00	22	0	56.0	1.02
5.00	28	8	48.0	0.68
7.50	30	26	24.4	0.33

2.2.2 乙酸的影响

在初始发酵培养基中分别添加 0、3.00、6.00 和 10.30 g/L 乙酸,考察不同浓度乙酸对菌体生长和代谢产酸的影响。由图 3 和表 2 可以看出,随着乙酸添加量的提高,菌体生长延滞期略有延长,稳定期时菌体浓度不断下降,丁二酸生产强度也随之下降,至发酵结束时,虽然葡萄糖均被完全消耗,但发酵时间大大延长。当初始添加乙酸至 10.30 g/L 时,稳定期时菌体浓度和丁二酸生产强度分别下降至 2.82 g/L 和 0.86 g/(L · h),与未添加乙酸的相比,分别减少 34.9% 和 40.7%。

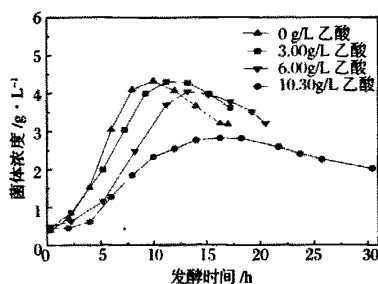


图3 添加不同浓度乙酸的分批发酵菌体生长曲线

表2 乙酸对发酵过程的影响

初始添加 乙酸浓度 /g · L ⁻¹	发酵时间 /h	残糖浓度 /g · L ⁻¹	丁二酸 收率 /%	丁二酸生 产强度 /g/(L · h) ⁻¹
0	17	0	65.0	1.45
3.00	18	0	65.6	1.40
6.00	20	0	67.4	1.28
10.30	30	0	65.4	0.86

2.2.3 丁二酸的影响

在初始发酵培养基中分别添加 0、8.00、15.00 和 20.00 g/L 丁二酸,考察不同浓度的丁二酸对菌体生长和代谢产酸的影响。由图 4 和表 3 可以看出,添加 8.00、15.00 和 20.00 g/L 丁二酸的发酵与未添加丁二酸的相比,菌体生长延滞期和发酵时间均相当,至发酵结束时,葡萄糖全部耗尽。添加 3 种浓度的丁二酸均使丁二酸生产强度有所下降,当添加至 20.00 g/L 时,至发酵结束丁二酸生产强度为 1.27 g/(L · h),仅比未添加的减少 12.4%。

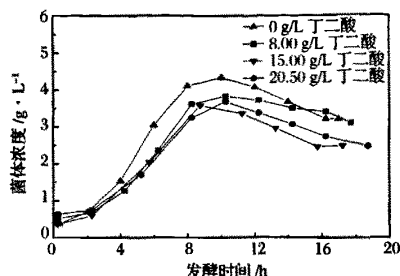


图4 添加不同浓度丁二酸的分批发酵菌体生长曲线

表3 丁二酸对发酵过程的影响

初始添加 丁二酸浓度 /g · L ⁻¹	发酵时间 /h	残糖浓度 /g · L ⁻¹	丁二酸 收率 /%	丁二酸生 产强度 /g/(L · h) ⁻¹
0	17	0	65.0	1.45
8.00	17	0	65.6	1.37
15.00	17	0	65.1	1.36
20.00	18	0	66.7	1.27

2.2.4 有机酸对发酵产丁二酸过程抑制作用分析

目前,普遍认为,有机酸对发酵过程的抑制作用是与培养基的 pH、有机酸的解离常数(pKa)以及它们的浓度有关^[11,12]。由于各种有机酸的物理化学性质不同,它们对发酵过程的抑制作用也可能不同。

Samson 等人^[13]研究认为,甲酸和乙酸对菌体生长的抑制作用机制是相似的,都是通过抑制糖酵解途径实现对菌体的抑制。但在添加甲酸的发酵时我们发现, *A. succinogenes* NJ113 代谢产丁二酸过程中富马酸有明显的积累。富马酸是厌氧呼吸链的终端电子受体,富马酸通过接受电子合成丁二酸^[14],因此在发酵过程中添加甲酸导致富马酸的积累,可能是由于甲酸影响了厌氧呼吸链的传递,从而导致菌体能量代谢不足,抑制了菌体的生长与代谢产酸。然而,在添加乙酸的发酵过程中未发现有富马酸积累这一现象。因此在厌氧发酵产丁二酸过程中,甲酸与乙酸的抑制机理可能是不一样的。有关乙酸的抑制作用机

理正在研究中。

Neal 等人^[15]的研究表明酵母均质体中糖酵解途径对丁二酸很敏感,但对于完整细胞,丁二酸的抑制性明显减弱^[13],这可能是由于丁二酸的立体空间构型使其不易透过细胞膜而无法进入胞内^[16]。Lin 等人^[17]的研究结果表明, *A. succinogenes* 可以耐受 104 g/L 丁二酸盐,相当于 44.69 g/L 丁二酸。因此,这可能是在低浓度情况下(<20 g/L),丁二酸对 *A. succinogenes* NJ113 抑制作用相对较弱的原因。

综上所述,甲酸、乙酸和丁二酸的抑制作用机制可能不同,同时 3 种有机酸对 *A. succinogenes* NJ113 厌氧发酵过程的抑制作用程度也不相同,其中甲酸最强,乙酸次之,而丁二酸无明显的抑制作用。因此,在初始葡萄糖浓度为 40g/L 厌氧发酵产丁二酸体系中,甲酸和乙酸是抑制菌体生长和代谢产酸两个主要因子,当其总浓度超过 13.70 g/L 时,菌体开始衰亡。

2.3 膜循环生物反应器半连续发酵产丁二酸

在以上研究的基础上,采用膜循环生物反应器控制发酵液中有有机酸的浓度进行半连续发酵。从图 1 和图 5 可以看出,分批发酵至 10 h,菌体即开始衰亡,发酵结束时,丁二酸生产强度为 1.45 g/(L·h);而通过膜循环生物反应器控制发酵液中甲酸和乙酸总浓度在 13.70 g/L 以下,菌体持续生长,至发酵结束时,丁二酸平均生产强度达 1.70 g/(L·h),比分批发酵提高 17.2%。由此说明有机酸的大量积累抑制了菌体的生长代谢,通过膜循环生物反应器移出一部分有机酸可以减少有机酸的抑制作用,提高了丁二酸的生产强度。

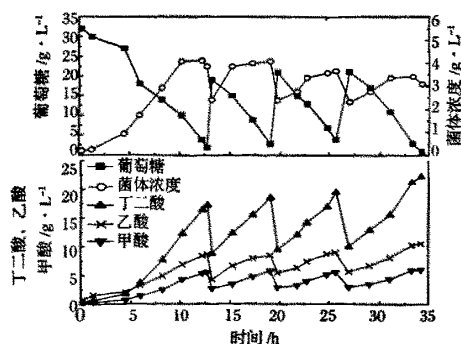


图 5 膜循环生物反应器半连续培养 *A. succinogenes* NJ113 产丁二酸过程曲线

3 结论

(1) 发酵过程中产生的有机酸对 *A. succino-*

genes NJ113 抑制作用强度各不相同,甲酸的抑制作用最强,乙酸次之,丁二酸无明显抑制作用。

(2) 在低葡萄糖浓度下,用 *A. succinogenes* NJ113 厌氧发酵产丁二酸,当甲酸和乙酸总浓度超过 13.70 g/L 时,菌体开始衰亡。

(3) 通过膜循环生物反应器控制甲酸、乙酸和丁二酸浓度,减少了有机酸的抑制作用,实现用 *A. succinogenes* NJ113 高效产丁二酸。

参 考 文 献

- Willke T, Vorlop KD. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry [J]. *App Microbiol Biotechnol*, 2004, 66(2): 131~142
- Song H, Lee S Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(3): 352~361
- Lueck E. Propionic acid. In E. Lueck (ed.). *Microbial food additives: characteristics, uses, effects* [M]. New York: Springer-Verlag, 1980. 175~182
- Loubiere P, Coccagn-Bousquet M, Matos J, et al. Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* [J]. *J Appl Microbiol*, 1997, 82: 95
- Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51: 545~552
- Kim P, Laivenieks M, McKinlay J, et al. Construction of a shuttle vector for the overexpression of recombinant proteins in *Actinobacillus succinogenes* [J]. *Plasmid*, 2004, 51(2): 108~115
- Lee PC, Lee WG, Lee SY, et al. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H_2/CO_2 supply and glucose concentration [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1999, 24: 549~554
- Samuelov NS, Datta R, Jain MK, et al. Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2260~2263
- Kim DY, Yim SC, Lee PC, et al. Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 35: 648~653
- 蔡婷, 苏深, 陈可泉, 姜眠. 高效液相色谱法在测定琥珀酸厌氧发酵体系中有机的应用 [J]. *生物加工过程*, 2007, 5(1): 66~70
- Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew W M. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms [J]. *J Am Soc Brew Chem*, 2001, 59: 187~194
- Vasseur C, Baverel L, Hébraud M, et al. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes* [J]. *J Appl Microbiol*, 1999, 86: 469~476
- Samson FE, Katz AM, Harris DL. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on yeast metabolism [J].

- Arch Biochem Biophys, 1955, 54: 406~423
- 14 张星元, 发酵原理[M]. 北京: 科学出版社, 2005. 52~53
 - 15 Neal AL, Weinstock J, Oliver Lampen J. Mechanisms of fatty acid toxicity for yeast [J]. Journal of Bacteriology, 1965, 90: 126~131
 - 16 Suomalainen H, Oura E. Buffer effect in fermentation solutions [J]. Exptl Cell, 1955, 9: 355~359
 - 17 Lin SKC, Du C, Koutinas A, et al. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41: 128~135

Effect of Organic Acids Inhibition on Anaerobic Fermentation by *Actinobacillus succinogenes*

Zuo Peng, Wu Hao, Li Jian, Chen Kequan, Jiang Min, Wei Ping

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

ABSTRACT The effect of organic acids inhibition on the cell growth and products accumulation by anaerobic fermentation with *Actinobacillus succinogenes* NJ113 was investigated by adding different concentrations of succinic acid, formic acid and acetic acid, respectively. It was shown that formic acid had most significant influence on cell growth and succinic acid production, acetic acid also had stronger influence, but succinic acid had no serious influence in three factors within the initial glucose concentration of 40g/L. When the total concentration of formic and acetic acid reached 13.70 g/L, cell growth was ceased. By removing parts of the organic acids through coupling reaction and separation with membrane-reactor at the 13.70 g/L of total concentration of formic and acetic acid, inhibition was reduced successfully. The productivity of succinic acid could reach 1.70 g/(L · h), 17.2% higher than that obtained by batch culture.

Key words *Actinobacillus succinogenes* NJ113, anaerobic fermentation, organic acid inhibition, succinic acid, membrane-reactor

(上接第 11 页)

Compared the Physicochemical Quality of Purple Sweet Potato Pigment Between the First Refine and the Second Refine

Lv Xiaoling, Fan Hui, Ma Shuqing, Zhang Shujuan

(Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT Under different environmental conditions, compare the physicochemical quality of purple sweet potato pigment (PSPP) between the first refine and the second refine, the results indicate that: the second refine PSPP had spectral characteristics of the general anthocyanin pigment. The color of anthocyanin solution was bright red at pH 3.0 and the resistant to heat and the light was lower to the first refine PSPP. Fe^{3+} , H_2O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and Vc can decompose it by oxidization, low concentration of Benzoic Acid has little influence on the stability of PSPP. The light absorbency of PSPP solution increased after added Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} and other metalline hydronium and organic acid, sucrose, dextrose and salt; the second refine PSPP was easier to effect than the first one because of the increase of the anthocyanin content and the elimination of polyphenols flavonoid that are not part of pigment but protect pigment.

Key words purple sweet potato, refine, pigment, physicochemical quality