

谢氏丙酸杆菌产 $V_{B_{12}}$ 原位分离发酵

李 涛 向 微 杜连祥 路福平

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津, 300222)

摘 要 $V_{B_{12}}$ 是谢氏丙酸杆菌的胞内次级代谢产物, 其传统发酵方法是分批发酵。发酵液中丙酸的浓度达到 10 g/L 时就会对菌体生长产生抑制作用。因此及时地将丙酸从发酵液中分离出去, 将会提高菌体浓度, 从而可以显著提高 $V_{B_{12}}$ 产量。文中将无机陶瓷膜分离技术与谢氏丙酸杆菌发酵耦合, 构建了一种新型原位分离发酵系统, 通过活性炭吸附成功地从发酵体系中的丙酸分离出去, 有效解除了丙酸对菌体生长的抑制作用, 实现了 $V_{B_{12}}$ 的高密度发酵, 菌体干重由 13.5 g/L 提高到 35.99 g/L , 提高了 1.67 倍, $V_{B_{12}}$ 的产量由 33.5 mg/L 提高到 63.1 mg/L , 提高了 0.88 倍。

关键词 $V_{B_{12}}$, 原位分离, 无机陶瓷膜, 活性炭

$V_{B_{12}}$ 又称钴胺素, B 族维生素之一, 以辅酶形式参与各种代谢过程, 促进甲基的形成和转移, 参与某些化合物的异构化作用, 维持 SH 基的还原状态, 促进 DNA 和蛋白质的合成, 促进细胞的成熟, 维持神经组织的正常功能, 缺乏 $V_{B_{12}}$ 时会发生恶性贫血、损害神经系统等, $V_{B_{12}}$ 临床上可用于治疗恶性贫血、肝脏疾病、神经炎、神经痛等, 在饲料工业上, 也可用于促进猪、鸡等牲畜的生长。

目前 $V_{B_{12}}$ 的生产都是采用发酵法, 工业生产中常用的生产菌为谢氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium shermanii*) 和脱氮假单胞杆菌 (*Pseudomonas denitrificans*)。由于谢氏丙酸杆菌获得了美国 FDA 的 GRAS 认证, 既无内毒素亦无外毒素, 较含内毒素的假单胞菌发酵生产 $V_{B_{12}}$ 更受青睐。

原位分离发酵技术是近年来兴起的一种新型发酵技术, 可使菌体密度较分批培养有显著的提高, 最终提高特定产物的比生产率。由于丙酸菌分批发酵过程中产生的丙酸会严重抑制菌体的生长, 因此寻找一种解除丙酸抑制作用的发酵方法将会得到高密度的菌体^[1,2], 从而提高 $V_{B_{12}}$ 的产量, 如采用萃取发酵^[3]、电渗析培养^[4]以及固定化培养^[5]等均有报道。近年来无机陶瓷膜技术迅速发展, 具有分离效率高、耐酸、碱、可高温灭菌、机械强度大、可再生能力强等优点。

文中通过将无机陶瓷膜分离技术与 *P. shermanii* 发酵耦合, 并通过活性炭吸附将丙酸从发酵液中分离出去, 实现了 *P. shermanii* 的原位分离发酵,

显著地提高了菌体浓度和 $V_{B_{12}}$ 的产量。

1 材料与方法

1.1 菌 种

谢氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium shermanii*), 大肠杆菌 $V_{B_{12}}$ 营养缺陷型菌株 (*E. coli V_{B_{12}}*) 均由华北制药集团华乐有限公司提供。

1.2 培养基

1.2.1 穿刺种子培养基

葡萄糖 20 g , 玉米浆 10 g (干物), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g , 溶于 $1\ 000\text{ mL}$ 水中, 调 pH $6.8\sim 7.0$ 后加 CaCO_3 2 g , 琼脂 20 g 。

1.2.2 液体种子培养基

葡萄糖 35 g , 玉米浆 20 g (干物), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g , KH_2PO_4 4 g , 氯化钴 0.005 g , 溶于 $1\ 000\text{ mL}$ 水中, 调 pH $6.8\sim 7.0$ 后加 CaCO_3 2 g 。

1.2.3 发酵培养基

葡萄糖 55 g , 玉米浆 35 g (干物), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g , KH_2PO_4 8 g , 氯化钴 0.01 g , 溶于 $1\ 000\text{ mL}$ 水中, 调 pH $6.8\sim 7.0$ 。

1.3 主要仪器设备

无机陶瓷膜组件, 孔径 $0.2\ \mu\text{m}$, 合肥世杰膜工程有限公司。

7 L 发酵罐, 上海高机生物工程有限公司。

1.4 分析方法

1.4.1 葡萄糖浓度

采用葡萄糖/乳酸生物传感仪测定。

1.4.2 pH 值

采用 pH 电极在线测量。

1.4.3 $V_{B_{12}}$ 产量

第一作者: 硕士研究生 (杜连祥教授为通讯作者)。

收稿日期: 2006-07-12, 改回日期: 2006-08-30

采用微生物法测定,检测菌为大肠杆菌 $V_{B_{12}}$ 营养缺陷型菌株(*E. coli* $V_{B_{12}}^-$)。取适量发酵液,煮沸 30 min 后,离心取上清液,适度稀释后采用管碟扩散法培养检测菌,37 ℃ 培养 16 h 后测量生长圈的直径,由标准曲线查出 $V_{B_{12}}$ 的浓度。

1.4.4 丙酸浓度

采用 RP-HPLC,检测波长 210 nm,流动相 0.05 mol/L $NH_4H_2PO_4$ 缓冲液 pH 2.8,流速 1.0 mL/min,4.6×250 mm,5C18-MS-II 型色谱柱。

1.4.5 菌体干重

取适量发酵液于 3 500 r/min 离心 10 min,收集菌体,将湿菌体用生理盐水洗涤 2 次。于 80 ℃ 烘干至恒重,称重。

1.5 分批发酵

取生长好的固体种子管,加入 10 mL 生理盐水,刮动穿刺层,制备菌悬液后接入准备好的液体种子培养基内,于 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 静置培养 48 h。然后以 10% 的接种量接到 7 L 罐中,装液量 5 L,控制发酵温度 30 ℃,深层静止发酵,每 4 h 取样测菌体干重,丙酸含量,残糖,pH, $V_{B_{12}}$ 产量。发酵液中残糖降至 25 g/L 左右时,加入 0.01 g/L 5,6 二甲基苯并咪唑。

1.6 补氨分批发酵

分批发酵过程中流加氨水控制发酵体系的 pH 值在 6.0 左右。

1.7 原位分离发酵

(1)0~22 h 为延滞期,接种后用氨水调节发酵

液的 pH 至 7.0,30 ℃ 分批静止发酵。

(2)22~118 h 菌体经过延滞期后迅速生长,丙酸含量增加,当发酵液的 pH 降到 5.5 左右时,开动蠕动泵,将发酵液通过无机陶瓷膜,过滤后的发酵液返回发酵罐,滤过液经活性炭吸附柱将丙酸等代谢产物吸附后,再通入第 2 组无机陶瓷膜组件,过滤除菌后回流至发酵罐。

(3)当葡萄糖被耗尽,菌体不再生长时,发酵结束。

2 结果与讨论

2.1 分批发酵

分批发酵过程曲线如图 1 所示。可以看出,菌体在经过延滞期后迅速生长,进入对数生长期后葡萄糖浓度迅速下降,同时作为其主要代谢产物丙酸开始积累,随着发酵液中丙酸的积累,其对菌体的抑制作用也逐渐增强,发酵 41 h 后发酵液的 pH 值降到 4.6 以下,丙酸含量达到 11.4 g/L,菌体由于受到丙酸的抑制比生长速率就开始迅速降低,61 h 后菌体就基本不再生长,不再消耗葡萄糖,这与 GU 等^[6]报道的 10 g/L 的丙酸就对菌体产生抑制作用一致。发酵结束时,残余葡萄糖含量高达 23 g/L,菌体干重仅有 11.66 g/L, $V_{B_{12}}$ 的产量仅达到 12.7 mg/L。结果表明,*P. shermanii* 产 $V_{B_{12}}$ 分批发酵过程中积累的丙酸对菌体的生长有严重的抑制作用,严重制约了 $V_{B_{12}}$ 的生成。

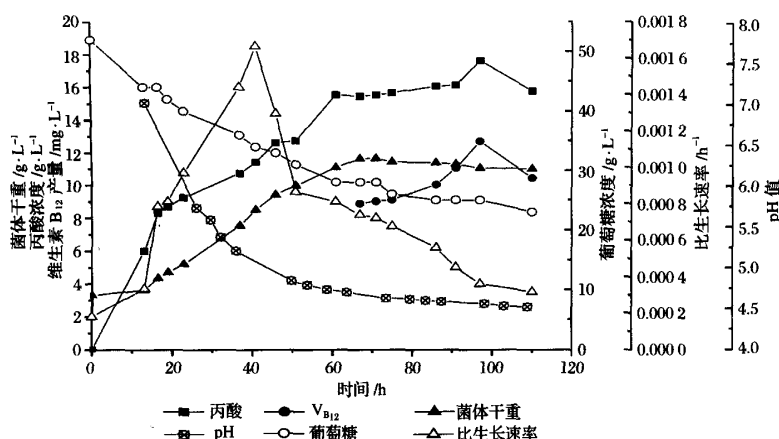


图 1 分批发酵过程曲线

2.2 补氨分批发酵

由于分批发酵过程中积累的丙酸使得发酵体系

的 pH 值很低,而较低的 pH 环境不利于菌体的生长,因此采用补氨分批发酵。发酵结果如图 2 所示。可

以看出, *P. shermanii* 在调节发酵液的 pH 值后能够较好的生长, 发酵结束葡萄糖耗尽, 菌体干重达到 13.5 g/L, $V_{B_{12}}$ 的产量达到 33.5 mg/L, 丙酸含量达到 26.7 g/L, 均比批发酵有了较大的提高。

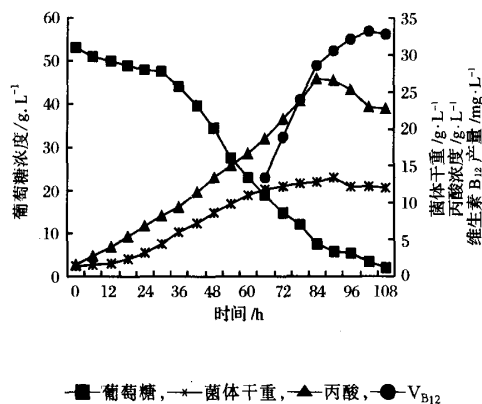


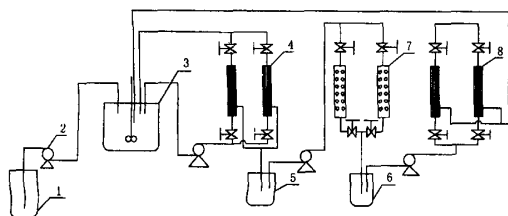
图2 补氮批发酵曲线

补氮批发酵缓解了低 pH 环境对菌体生长的抑制作用, 但不能从根本上解除丙酸的抑制作用, 因为丙酸对发酵过程的抑制作用是一种终产物反馈抑制。当发酵液的 pH 低于一定的阈值时, 丙酸菌的生长受到影响。但是较低的 pH 值并非丙酸反馈抑制的最根本的原因, 丙酸浓度才是丙酸反馈抑制的根源^[7]。目前工厂大生产中仍普遍采用补加氨水调节发酵液的 pH 值。如果采用将丙酸等代谢产物从发酵液中分离出去的原位分离发酵技术, 解除丙酸对菌体生长的抑制, 将会达到延长菌体对数期, 获得高密度菌体和提高 $V_{B_{12}}$ 产量的目的。

2.3 原位分离发酵

2.3.1 原位分离发酵系统

如图 3 所示, 将无机陶瓷膜组件, 活性炭吸附柱, 蠕动泵与 7 L 发酵罐连在一起组成原位分离发酵系统。



1—补料罐; 2—蠕动泵; 3—发酵罐; 4—无机陶瓷膜组件;
5, 6—滤液储罐; 7—活性炭吸附柱; 8—除菌无机陶瓷膜组件

图3 原位分离发酵系统简图

2.3.2 原位分离发酵过程

原位分离发酵过程曲线如图 4 所示。由图 4 可以看出, 发酵初期菌体经过延滞期后, 迅速生长, 丙酸含量也上升, 在 22 h 时丙酸含量达到 8.2 g/L, 发酵液的 pH 由初始 7.0 降到 5.5, 此时进行原位分离发酵。在整个原位分离发酵过程中, 丙酸含量始终维持在 10 g/L 左右, 发酵液的 pH 维持在 6.0 左右, 菌体迅速生长, 比生长速率最高可达 0.064 h^{-1} (图 5), 葡萄糖浓度迅速降低, 在 52 h 加入前体物 5, 6-二甲基苯并咪唑。发酵过程中菌体干重最高可达到 35.19 g/L。丙酸含量达到 39.26 g/L, $V_{B_{12}}$ 产量达到 53 mg/L。

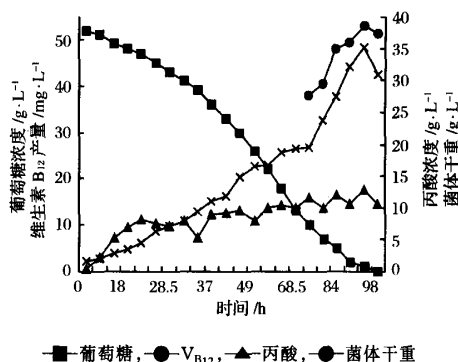
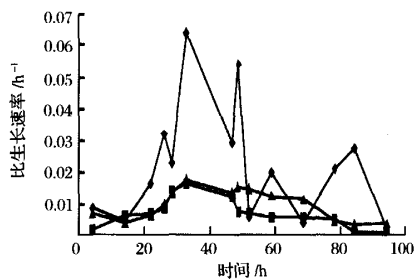


图4 原位分离发酵曲线



◆—原位分离发酵, —■—分批发酵, —▲—补氮分批发酵
图5 三种发酵方式下菌体的比生长速率曲线

整个发酵过程中 $V_{B_{12}}$ 产量相比菌体浓度的提高不成比例, 可能是合成 $V_{B_{12}}$ 的前体物不充足造成的, 因此将初始培养基中前体物氯化钴的浓度提高到 0.03 g/L, 5, 6-二甲基苯并咪唑的加入量也提高到 0.03 g/L, 结果菌体干重最高可达 35.99 g/L, 由此可见氯化钴浓度的提高并没有对菌体生长造成毒害作用, $V_{B_{12}}$ 的产量也由 53 mg/L 提高到 63.1 mg/L。

由图 5 可以看出, 将无机陶瓷膜分离技术与 *P. shermanii* 发酵耦合的原位分离发酵有效地解除了发酵中期丙酸对菌体生长的抑制作用, 大大提高了菌体比生长速率。 *P. shermanii* 分批发酵过程中产生的

丙酸对菌体的生长有严重的抑制作用,补氨分批发酵虽然缓解了低 pH 环境对菌体生长的抑制作用,但不能从根本上解除丙酸的抑制作用,而原位分离发酵则将丙酸从发酵体系中分离出去,从根本上解除了丙酸的抑制作用,从表 1 中对 3 种发酵方式的比较可以看出,原位分离发酵与其它 2 种发酵方式相比大大提高了菌体浓度,实现了 *P. shermanii* 的高密度发酵,大大提高了 $V_{B_{12}}$ 的产量。

表 1 三种发酵方式比较

发酵方式	菌体干重 /g·L ⁻¹	$V_{B_{12}}$	
		产量/mg·L ⁻¹	单位细胞产量 /mg·g ⁻¹
分批发酵	11.66	12.7	1.089 2
补氨分批发酵	13.5	33.5	2.459 3
原位分离发酵	35.99	63.1	1.753 3

原位分离发酵过程中由于菌体迅速生长,葡萄糖被迅速消耗,因此如果在原位分离发酵过程中连续地补加葡萄糖,维持一定的葡萄糖浓度,将会对菌体的生长和 $V_{B_{12}}$ 的合成十分有利,将会进一步提高菌体浓度和 $V_{B_{12}}$ 的产量。

3 结 果

研究中利用无机陶瓷膜分离的优点,将其与发酵罐耦连,并通过活性炭吸附将丙酸从发酵液中分离出去,构建了一种新型的原位分离发酵系统,有效解除了丙酸对菌体的抑制作用,菌体干重由 13.5 g/L 提

高到 35.99 g/L,提高了 1.67 倍, $V_{B_{12}}$ 的产量由 33.5 mg/L 提高到 63.1 mg/L,提高了 0.88 倍,但单位菌体的产量由 2.459 3 mg/g 下降到 1.753 3 mg/g,其原因有待于进一步研究。本研究为工业化生产中实现 $V_{B_{12}}$ 的高密度发酵打下了基础。

参 考 文 献

- 1 Rickert D A, Glatz Ch E, Glatz B A. Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized propionibacteria [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 22: 409~414
- 2 Yongsmith B, Chutima K. Production of vitamin B₁₂ by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels[J]. *J Ferment Technol*, 1983, 61: 593~598
- 3 Luwis V P, Yang S T. A novel extractive fermentation process for propionate production from whey lactose [J]. *Biotechnol Prog*, 1992, 8: 104~110
- 4 Zhang S T, Matsuoka H, Toda K. Production and recovery of propionic and acetic acids in electrodialysis culture of *Propionibacterium shermanii* [J]. *J Ferment Bioeng*, 1993, 75: 276~282
- 5 Yang S T, Huang Y, Hong G. A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 45: 379~386
- 6 U Z, Glatz BA, Glatz CE. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 22: 13~18
- 7 张华峰, 康 慧. 微生物发酵法生产丙酸[J]. *饲料工业*, 2004, 25(8): 29~33

Study on Fermentation of $V_{B_{12}}$ by *Propionibacterium shermanii* in an In Situ Product Removal Bioreactor

Li Tao Xiang We Du Lianxiang Lu Fuping

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

ABSTRACT High concentration cultivation seemed to be the most effective means of achieving higher productivity because vitamin B₁₂ accumulates in the cells. The problems associated with conventional vitamin B₁₂ fermentation largely stem from the strong end product inhibition caused by propionate acid even at very low concentration of 10 g/L. So the cell concentration and productivity of vitamin B₁₂ will be improved by the removal of propionate. A ceramic membrane module was applied in the *P. shermanii* fermentation to improve the cell concentration and productivity of vitamin B₁₂. By the removal of propionate with activated charcoal, high concentration of cell and vitamin B₁₂ were obtained comparing to the batch fermentation. The cell dry weight increased from 13.5 g/L to 35.99 g/L and the vitamin B₁₂ concentration increased from 33.5 mg/L to 63.1 mg/L by applying the new fermentation apparatus. The cell and vitamin B₁₂ concentrationS were 1.67 and 0.88 fold of those in the batch fermentation respectively.

Key words $V_{B_{12}}$, In situ product removal, ceramic membrane, activated charcoal