

丙酸发酵的研究*

乐华爱 金石云 苏京军 赵玉峰 王大程 方心芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

北京丙酸杆菌 (*Propionibacterium beijingense*) 不能利用无机氮。蛋白胨和酵母膏的种类对该菌生长和产酸的影响显著, 其中以酵母膏最好, 浓度以 1—2% 为宜。丙酸发酵最适温度为 25—30℃, 最适 pH 为 6.5, 葡萄糖浓度以 1—2% 为佳。使用下列发酵培养基(%): 葡萄糖 2, 酵母膏 2, CaCO₃ 1.5, 丙酸产量为 9.35g/L, 对糖的产率达 51.94%, 丙酸对乙酸的比例近 5:1。

关键词 北京丙酸杆菌; 丙酸发酵

丙酸菌最早的用途是在干酪中起生香作用, 最近有人认为瑞士型干酪的香味与丙酸等有关^[1]。丙酸又是无毒抑菌剂, 可作食品和饲料添加剂, 在谷物储藏方面也有良好效果^[2,3]。丙酸菌还能产生维生素 B₁₂ 和叶酸, 因此丙酸杆菌是工业发酵方面有应用价值的菌。在丙酸发酵方面, 近来国外以乳清为原料, 乳酸菌和丙酸菌混合培养等的研究较多^[4-6]。本文报道营养条件和发酵条件对北京丙酸杆菌生长和产酸的影响。

材料和方法

(一) 菌种

北京丙酸杆菌 (*Propionibacterium beijingense*) P₄, 是由沼气发酵液中分出的一个新种^[7]。

(二) 培养基和培养条件

1. 前培养: 将 P₄ 接种到 BPYL 斜面, 其成份为 (%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1, 酵母膏 0.5, NaCl 0.5, 乳酸钠 2, 琼脂 2, pH 6.9—7.0。在抽空气换氮气的厌氧罐中, 30℃ 培养 4 天。以 10ml 无菌水洗下菌体, 制成菌悬液。

2. 发酵: 在 25ml 厌氧管中, 装入 20ml

以葡萄糖和酵母膏为基础的培养基, 进行各种条件试验, 接入上述前培养菌悬液 0.5ml, 30℃ 培养 7 天(例外者另加说明)。

(三) 分析方法

1. 生物量的测定: 发酵液稀释 10 倍, 用 721 型分光光度计, 波长 600nm, 光程 0.5cm 比色杯比浊, 以吸光度 A 表示生物量。

2. pH 的测定: 用 ZD-2 型自动电位滴定计测定。

3. 有机酸的测定: 用 Shimadzu GC-7AG 气相色谱仪测定丙酸和乙酸等挥发酸, 基本同前报^[7], 唯发酵液终了 pH 达到 5 左右者, 可省略酸化离心步骤, 直接取发酵液 1μl 测定。每次测定均用浓度 10mmol/L 的 C₂-C₆ 的挥发酸溶液做外标样校准, 实测样品经 Chromatopac C-R3A 处理, 绘制图谱并打印各组份含量。

4. 残糖测定: 采用 3, 5-二硝基水杨酸比色定糖法^[8]。

结 果

(一) 酵母膏种类对北京丙酸杆菌 P₄

本文于 1988 年 4 月 5 日收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

表 1 酵母膏种类对北京丙酸杆菌 P₁ 生长和产酸的影响Table 1 Effect of yeast extract sorts on growth and acids production by *Propionibacterium beijngense* P₁

酵母膏种类 Sorts of yeast extract	生物量 Biomass (A ₅₀₀)	pH	丙酸 Propionic acid (g/L)	乙酸 Acetic acid(g/L)
酵母膏 I Yeast extract II	0.208 0.155	5.7 5.8	7.78 4.35	2.34 1.90
III (上海) (Shanghai)	0.232	5.7	6.43	1.58
酵母粉 IV (Oxoid) yeast extract powder	0.297	5.6	9.03	2.22
V (Sigma)	0.300	5.7	9.27	3.51
VI	0.076	6.0	1.65	0.73
酵母膏 III (上海) Yeast extract (Shanghai) 用量加倍(1%) Double	0.310	5.8	9.00	1.94

生长和产酸的影响

在更换新批号的酵母膏时,发现酵母膏 II 效果不好。因此采用 BPYL 培养基。试验了不同批号的酵母膏和国内外的酵母粉对 P₁ 生长和产酸的影响(表 1)。Sigma 和 Oxoid 的酵母粉最好,上海酵母厂的酵母膏 III 用量加倍时,丙酸产量也能达到与采用 Sigma 和 Oxoid 酵母粉同样的水平。同时看出丙酸产量的多少与生物量的高低有关。

(二) 氮源的影响

首先以无机氮合成培养基^[6]进行实验,证明该菌不能利用硫酸铵为生长氮源,只由接种物产生极微量的丙酸。另外以葡萄糖为基础进行了各种有机氮的试验,结果见表 2。以酵母膏为氮源时,丙酸产量最高。各种蛋白胨的效果差别很大,其中以牛肉蛋白胨较好,鱼脲 F403 次之。豆腐废水接近牛肉胨的水平。

(三) 酵母膏浓度的影响

不同浓度的酵母膏试验结果如图 1。酵母膏含量低于 1% 者,生物量随着酵母膏含量的增加近于直线上升,酵母膏含量超过 1%。则生物量增加很少。1% 酵母膏者就有相当数量的生物量 (A₅₀₀=0.407) 和

相当高的丙酸产量(7.98g/L),但是以 2% 酵母膏者丙酸含量最高(10.69g/L)。

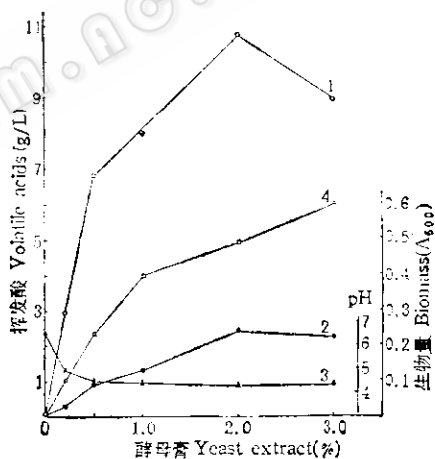


图 1 酵母膏浓度对丙酸发酵的影响

Fig. 1 Effect of yeast extract concentration on propionic acid fermentation

1. 丙酸 Propionic acid;
2. 乙酸 Acetic acid;
3. pH;
4. 生物量 Biomass

(四) 蛋白胨含量的影响

虽然牛肉蛋白胨最好,但不易买到。所以选用鱼脲 F403 进行不同含量试验(图 2)。蛋白胨含量在 0.2—1.5% 之间,丙酸产量近直线上升,但将其增加到 3% 时,丙

表 2 各种氮源对 P₁ 生长和产酸的影响

Table 2 Effect of nitrogen sources on growth and acids production by P₁

氮源 Nitrogen source	生物量 Biomass (A ₆₀₀)	pH	丙酸 Propionic acid(g/L)	乙酸 Acetic acid(g/L)
硫酸铵 Ammonium sulfate	0.008	6.7	0.19	0.04
鱼脲 Fish peptone	0.063	5.2	0.40	0.39
牛肉脲 Beef peptone	0.382	4.6	3.80	0.64
大豆脲 Soybean peptone	0.084	4.8	0.95	0.91
鱼脲 F403 Fish peptone F403	0.248	4.7	1.96	1.01
胰蛋白脲 Tryptone (oxid)	0.050	5.2	0.11	0.66
日本聚脲 Polypepton (Japan)	0.058	5.4	0.66	0.14
胰蛋白脲 Tryptose (oxid)	0.111	4.8	0.11	1.82
酵母膏 Yeast extract	0.352	4.5	7.98	1.31
豆腐废水 Soybean curd waste	0.375	4.8	3.35	0.57

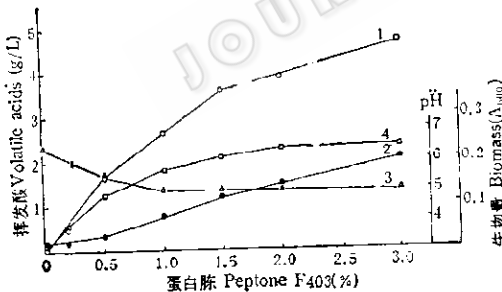


图 2 蛋白脲含量对丙酸发酵的影响

Fig. 2 Effect of peptone content on propionic acid fermentation

- 1. 丙酸 Propionic acid;
- 2. 乙酸 Acetic acid;
- 3. pH;
- 4. 生物量 Biomass

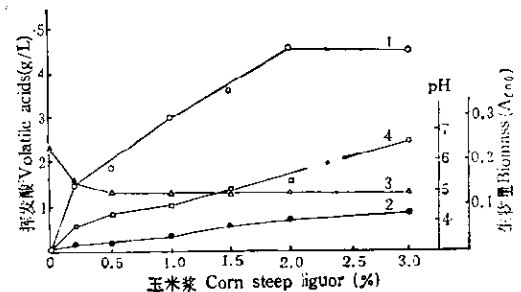


图 3 玉米浆含量对丙酸发酵的影响

Fig. 3 Effect of corn steep liquor on fermentation

- 1. 丙酸 Propionic acid; 2. 乙酸 Acetic acid;
- 3. pH; 4. 生物量 Biomass

量缓慢上升,但最终含量也不高,只有 4.51g/L(图 3)。

(六) 碳酸钙的影响

葡萄糖酵母膏培养基加 CaCO₃ 控制由于产酸形成的 pH 剧降。蛋白脲不仅可以

酸含量只有 4.75g/L。

(五) 玉米浆含量的影响

玉米浆含量在 0.2—2% 之间,丙酸产

做氮源, 也具有缓冲作用。酵母膏既可

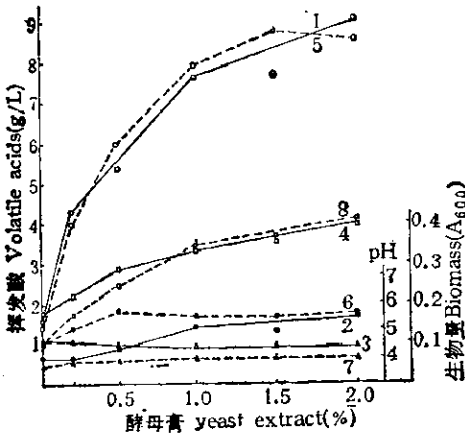


图4 碳酸钙对丙酸发酵的影响

Fig. 4 Effect of calcium carbonate on propionic acid fermentation

+CaCO₃

- 1. 丙酸 Propionic acid
 - 2. 乙酸 Acetic acid
 - 3. pH
 - 4. 生物量 Biomass
- CaCO₃
- 5. 丙酸 Propionic acid
 - 6. 乙酸 Acetic acid
 - 7. pH
 - 8. 生物量 Biomass

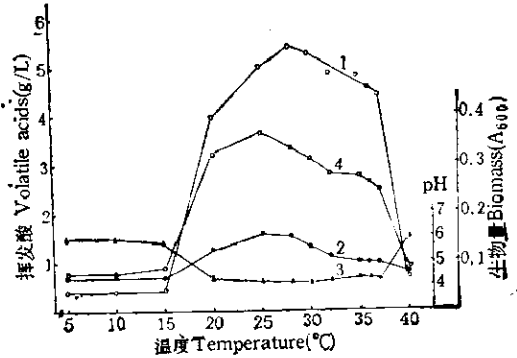


图5 温度对生长和产酸的影响

Fig. 5 Effect of temperature on growth and acid production

- 1. 丙酸 Propionic acid;
- 2. 乙酸 Acetic acid;
- 3. pH;
- 4. 生物量 Biomass

氮源, 还含有某些刺激生长的因素。所以进行了蛋白胨和酵母膏的搭配试验。同时考虑到在某些试验中不宜加 CaCO₃, 所以用这种方法试验了 CaCO₃ 存在与否的影响, 结果如图 4。以 2% 葡萄糖, 1% 蛋白胨, 补加不同量的酵母膏的培养基。加 CaCO₃ 与

表 3 培养基的实际 pH 值

Table 3 The actual pH values of the media

缓冲液 Buffer pH	培养基的 pH 值 pH Value of the medium		
	灭菌前 Before sterilization	灭菌后 After sterilization	灭菌后+CaCO ₃ After sterilization + CaCO ₃
2.1	2.10	2.10	4.90
3.6	4.25	4.30	5.80
4.7	5.85	5.70	6.50
5.5	5.95	5.80	6.55
6.0	6.25	6.10	6.55
6.5	6.50	6.30	6.60
7.0	7.00	6.60	6.70
7.2	7.20	6.70	6.90
7.5	7.45	6.90	7.00
8.0	7.70	7.00	7.05
9.8	8.20	7.05	7.15
10.7	10.20	7.25	7.35
11.2	10.95	7.40	7.40

表4 糖浓度对丙酸发酵的影响

Table 4 Effect of glucose concentration on propionic acid fermentation

葡萄糖 Glucose (mmol/L)	酵母膏 Yeast extract (%)	丙酸 Propionic acid		乙酸 Acetic acid		生物量 Biomass (A ₆₀₀)	pH	残糖 Residual sugar (%)
		含量(g/L) Content	产率(%) yield	含量(g/L) Content	产率(%) yield			
0	1	0.30	—	0.48	—	0.087	7.0	0
25	1	1.77	51.56	0.64	14.22	0.217	5.3	0
50	1	3.76	41.78	0.64	7.11	0.264	5.1	0.02
100	1	5.53	30.72	0.75	4.16	0.352	4.9	0.38
150	1	6.63	24.56	1.02	3.77	0.366	4.9	1.37
200	1	7.77	21.58	1.48	4.11	0.371	4.9	2.06
250	1	8.52	18.33	1.06	2.35	0.376	4.9	3.10
0	2	0.50	—	0.90	—	0.163	7.0	0
25	2	2.57	57.11	0.99	18.67	0.316	5.3	0
50	2	4.58	50.89	1.64	18.22	0.390	5.0	0.02
100	2	8.09	44.94	1.63	8.39	0.465	4.8	0.10
150	2	9.40	34.81	1.68	6.89	0.530	4.8	0.91
200	2	10.07	27.97	2.28	6.35	0.532	4.8	1.83
250	2	11.32	25.16	2.94	6.53	0.532	4.8	2.72

否影响不大,只是酵母膏含量少者(小于0.5%)而无CaCO₃者,生长速度略慢,所以可采用1%蛋白胨加1%酵母膏的混合氮源可不加CaCO₃。

(七) 温度的影响

以YGCa液体厌氧管发酵,在不同温度(5—40℃)培养三天,结果如图5。生物量在25℃最多,丙酸产量在25—30℃最高。同时以BPYL斜面穿刺后拉直线,在不同温度下培养,每天观察生长情况至7天。发现5℃的始终未长,10℃的极弱,15℃的微长,25—32℃之间生长较好,其中29—30℃生长最好,低温方向生长慢,20℃7天才逐渐赶上,35℃开始生长略差。

(八) pH的影响

由于丙酸菌产酸,只用0.1mol/L缓冲液不能完全控制其pH而影响实际效果,所以在灭菌后又补加CaCO₃,即采用YGCa培养基,其灭菌前后实际pH列于表3。以灭

菌前培养基pH为标准,结果如图6。30℃培养三天,丙酸产量以pH6.5者最好;30℃培养七天(未列于图中),低于pH7者丙酸产量继续增加,高于pH7者丙酸含量不增加,可见pH太高会破坏某些营养,也许是该菌耐酸不耐碱,有待进一步研究。

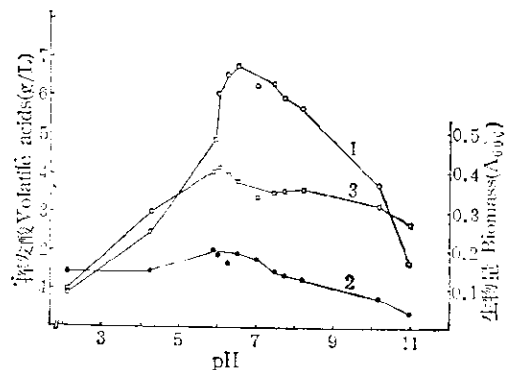


图6 pH对生长和产酸的影响

Fig. 6 Effect of pH value on growth and acids production

1. 丙酸 Propionic acid;
2. 乙酸 Acetic acid;
3. 生物量 Biomass

(九) 葡萄糖浓度的影响

葡萄糖浓度对丙酸发酵的影响配合不同量的酵母膏一起试验, 结果如表 4。生物量随糖浓度的增加而提高, 糖浓度达 100mmol/L 以后变化很小。丙酸产量则随着糖浓度的增加而增加。但对葡萄糖的产率则随着糖浓度的增加而降低。糖浓度为 25—50mmol/L 的产率最高, 按化学平衡式达到理论水平^[10-12]。其中配 2% 酵母膏, 糖浓度为 50—100mmol/L 者, 丙酸产量较高, 残糖接近于零, 产率也高, 可采用之。糖浓度高于 100mmol/L 者, 残糖逐渐增加, 丙酸产量微增, 也已达 1% 左右, 可能是丙酸的抑制作用^[13]所引起的。

(十) 不同碳源对丙酸发酵的影响

P₁ 能广泛地利用各种碳水化合物^[7]。现在使用最适的发酵条件, 以 2% 糖, 2% 酵母膏, 1.5% CaCO₃, 对葡萄糖和蔗糖进行发酵过程的研究 (图 7) 葡萄糖为基质时, 菌生长很快, 2 天生物量即达 0.440 (A₆₀₀), pH 降至 5.1。以后菌增长很少, 但丙酸仍近直线上升至第 6 天残糖耗尽为止,

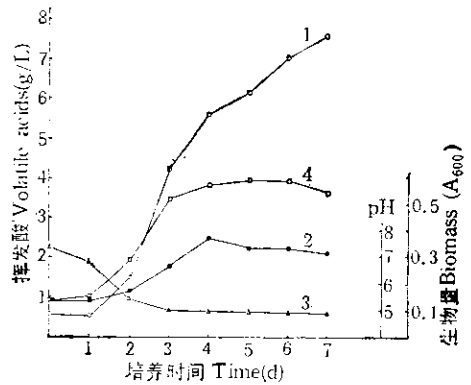


图 8 蔗糖培养基丙酸发酵过程
Fig. 8 Time course of propionic acid fermentation in sucrose medium

1. 丙酸 Propionic acid; 2. 乙酸 Acetic acid; 3. pH; 4. 生物量 Biomass

丙酸产量为 9.35g/L, 产率达 51.94%, 丙酸与乙酸之比接近 5:1。蔗糖发酵结果 (图 8) 与葡萄糖者类似, 唯菌生长路漫, 但菌浓度却路高。

讨 论

我们在最初分离筛选丙酸菌时采用牛肉蛋白胨培养基, 丙酸菌生长很好, 产生一定量丙酸。改用鱼胨后, 选出的菌突然生长极弱, 几乎不产酸。后经试验证明, 不同种类的蛋白胨对北京丙酸杆菌 P₁ 的生长和产酸影响很大。其中以牛肉胨最好, 另一种鱼胨 F403 第二, 其它国内外的胨类等都不好。这可能是由于蛋白胨因来源和制备方法不同, 往往也含有不同成份的胨、肽和氨基酸。因此各种商品蛋白胨虽然总氮含量一般在 12% 左右, 氨基氮在 3.5% 以上, 但营养价值却差别很大。

菌株 P₁ 丙酸发酵的最适氮源是酵母膏, 我们选用的国产酵母膏 (上海酵母厂产品, 含氮量为 7% 以上), 根据糖浓度和其他条件, 使用 1—2% 即能达到理想目的。值得注意的是酵母膏为多种氨基酸、肽、水

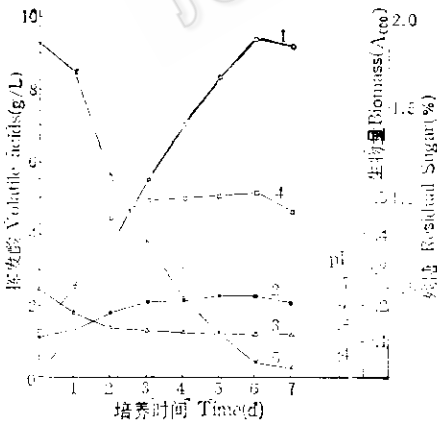


图 7 葡萄糖培养基丙酸发酵过程

Fig. 7 Time course of propionic acid fermentation in glucose medium

1. 丙酸 Propionic acid; 2. 乙酸 Acetic acid; 3. pH; 4. 生物量 Biomass; 5. 残糖 Residual sugar

溶性维生素和碳水化合物的混合物。它不仅能做氮源,而且还含有刺激北京丙酸杆菌生长和产酸的其他因子。Wood 等认为酵母膏中有一种非挥发酸,是所试过的丙酸细菌在合成培养基中不可缺少的,而且不是混合维生素所能取代的,在土豆汁和玉米浆中也都有,因此使用酵母膏等粗原料不能单凭氮含量计算,还应以实效测定为妥。

本菌不仅能利用葡萄糖达到丙酸的理论产率,而且能利用蔗糖和乳酸盐获得良好结果。我们也做了利用糊精产酸的发酵过程,但产率较低,尚需继续研究。

参 考 文 献

- [1] Vangtal, A. et al.: *J. Dairy Sci.*, 89(12): 2982—2993, 1986.
[2] Ghosh, J. et al.: *Acta Agric. Scand.*, 35(3):

- 245—254, 1985.
[3] Vanselow, D. G. et al.: *J. Stored Prod. Res.*, 21(1): 7—11, 1985.
[4] Anderson, T. M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(2): 427—428, 1986.
[5] Bodie, E. A. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25(5): 434—437, 1987.
[6] Bodie, E. A. et al.: *J. Ind. Microbiol.*, 1(6): 349—353, 1987.
[7] 乐华爱等:微生物学报,27(2):105—109,1987。
[8] 北京大学生物系生物化学教研室:生物化学实验指导,人民教育出版社,北京,p. 22—24,1980。
[9] Prescott, S. C. et al.: *Industrial Microbiology*, 3d ed., McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, p. 474—481, 1959.
[10] Thimann V. K.: *The Life of Bacteria, Their Growth, Metabolism, and Relationships*, The Macmillan Company, New York, p. 428—440, 1955.
[11] Lee, I. H. et al.: *Appl. Microbiol.*, 28(5): 831—835, 1974.
[12] Liu, J. A. P. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(3): 715—722, 1982.
[13] Nanba, A. et al.: *J. Ferment. Technol.*, 61(6): 551—556, 1983.

STUDY ON PROPIONIC ACID FERMENTATION

Yue Huaai Jin Shiyun Su Jingjun Zhao Yufeng Wang Dasi Fang Xinfang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Ammonium sulfate did not be utilized as the only source of nitrogen for *Propionibacterium beijngense*. The effects of kinds of peptone and yeast extract on it's growth and acids production are of much importance. Yeast extract was the most satisfied nitrogen source at a concentration of 1—2 per cent. The optimum temperature for propionic acid fermentation was 25—30°C. The largest amount of propionic acid was produced at pH 6.5. The favorable concentration of glucose was 1—2% using the following fermenta-

tion medium (%): glucose 2, yeast extract 2, calcium carbonate 1.5, the level of propionic acid production was 9.35g/L; propionic acid yield based on sugar was 51.94%, the ratio of propionic acid to acetic acid was approximately 5: 1.

Key words

Propionibacterium beijngense; Propionic acid fermentation