

米糠纤维床反应器固定化发酵产丁酸的研究

周丽春¹, 朱建忠², 王文广², 蔡 谨¹, 黄 磊¹, 徐志南^{*1}

(1. 浙江大学 化学工程与生物工程学院, 浙江 杭州 310027; 2. 杭州贝谷生物科技有限公司, 浙江 杭州 310013)

摘要: 将米糠作为固定化载体, 构建了一种新型的外置式纤维床反应器, 应用于固定化发酵产丁酸实验。以酪丁酸梭菌为发酵菌株, 进行了游离细胞和固定化细胞发酵比较。结果表明: 固定化细胞分批发酵丁酸生产率为 0.48 g/L/h, 比游离分批发酵提高了 55%。进行了重复分批发酵, 8 个批次的丁酸浓度平均值为 21.05 g/L, 可以稳定多批次运行。在发酵条件一致的情况下, 进行了米糠对丁酸钠的吸附模拟实验, 米糠对丁酸钠的平衡吸附量可达 0.084 g/g。固定化发酵后的米糠会吸附产物丁酸钠, 吸附量为 0.105 g/g, 这有利于将反应后的米糠直接用来生产含丁酸钠的饲料添加剂。

关键词: 丁酸; 米糠; 外置式纤维床反应器; 发酵; 吸附

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)02-0140-05 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.020

Production of Butyric Acid by Immobilized Cell Fermentation in a Rice Bran Fibrous-Bed Bioreactor

ZHOU Lichun¹, ZHU Jianzhong², WANG Wenguang², CAI Jin¹, HUANG Lei¹, XU Zhinan^{*1}

(1. College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Hangzhou Beigu Biological Technology Co. Ltd., Hangzhou 310013, China)

Abstract: A novel external fibrous-bed bioreactor with rice bran as cell immobilized material for butyric acid production is established in this study. Using *Clostridium tyrobutyricum* as the fermentation strain, free-cell and immobilized-cell fermentation for butyric acid production are conducted. The results show that the productivity of immobilized-cell batch fermentation reaches 0.48 g/L/h, which is 55% higher than that of free cells. Furthermore, 21.05 g/L butyrate is achieved by immobilized cells in the repeated batch fermentation and butyrate production is stable by using this system. Finally, the simulation experiments about adsorption of sodium butyrate by rice bran are conducted, and the ratio of equilibrium adsorption is about 0.084 g/g. The sodium butyrate in the fermentation broth could be adsorbed by the rice bran and the ratio of adsorption is 0.105 g/g. The rice bran in this study can be directly used as feed additive.

Keywords: butyric acid, rice bran, external fibrous-bed bioreactor, fermentation, adsorption

收稿日期: 2016-04-08

基金项目: 杭州市科技发展规划(20150432B22)。

* 通信作者: 徐志南(1966—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物化工研究。E-mail: znxu@zju.edu.cn

引用本文: 周丽春, 朱建忠, 王文广, 等. 米糠纤维床反应器固定化发酵产丁酸的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 140-144.

丁酸作为一种极为重要的大宗化学品已被广泛应用于化工、医药、食品、饲料等行业^[1]。在饲料行业,丁酸是一种生物调节剂,可以作为肠道细胞的能量来源,调节胃肠道微生物菌群和促进动物的消化吸收等^[2]。因为游离性丁酸容易挥发,在饲料生产中通常将其制成相对稳定的钠盐——丁酸钠。丁酸钠无污染、无有害残留,具有独特的营养生理功能,正逐渐成为热门的抗生素替代品之一^[3]。

丁酸的生产方法主要有化学合成法和生物发酵法。目前,丁酸工业生产采用化学合成法。生物发酵法仍然无法与化学合成法竞争,其主要原因是:发酵周期长,产物分离难,生产成本低^[4-5]。因此,开发一种更为简便有效、成本低廉的发酵形式至关重要。美国俄亥俄州立大学杨尚天教授等人在传统的填充床反应器基础上,设计出纤维床生物反应器(Fibrous-Bed Bioreactor, FBB),使得固定化载体上一直保持较高的活细胞密度,提高了发酵产物的终产量、得率和生产率等,已应用于乙酸、丙酸、丁酸和乳酸等多种有机酸发酵^[6-9]。但该反应器的固定床制作成本较高,且难以工业放大。

米糠作为稻谷加工的副产物,资源丰富,且价格低廉^[10]。在饲料加工中,米糠是一种常用的饲料添加剂载体。同时,米糠也是一种纤维材料,可用于细胞固定化。

本研究首次提出将低廉的米糠作为固定化载体,构建了一种外置式纤维床反应器(external fibrous-bed bioreactor)发酵生产丁酸,发酵后直接将吸附了产物——丁酸钠的米糠用作饲料添加剂。以简化原有的提取丁酸,再添加到饲料制备过程中。开拓一条综合利用饲料原料,高效、廉价生产饲料添加剂——丁酸钠的新思路。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

酪丁酸梭菌(*Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755),由浙江大学生物工程研究所所保藏。

种子培养基(g/L):胰酪胨 5,酵母粉 5,氯化钠 4.18,葡萄糖 30,痕量金属溶液 10 mL,0.2% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液 2 mL。pH 6.0,沸水浴加热除氧。

发酵培养基(g/L):胰酪胨 5,酵母粉 5,氯化钠 4.18,葡萄糖 50,痕量金属溶液 10 mL。

痕量金属溶液(g/L): $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CoCl_2

0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 0.01, H_3BO_3 0.01, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.01。

1.2 种子液制备

将保藏的菌种以 5% 的接种量接种于含 40 mL 种子培养基的 100 mL 血清瓶中,于 YQX-II 厌氧培养箱(上海跃进医疗器械厂)中 37 °C 厌氧培养 48 h,制成一级种子液。以 5% 的接种量继续传代,得到二级种子液。

1.3 游离细胞发酵

在 5 L 机械搅拌式发酵罐(上海保兴生物设备工程有限公司)中进行游离细胞发酵。2 L 发酵培养基中接入 100 mL 二级种子液,37 °C,150 r/min 条件下发酵,通入氮气以保证反应器中的厌氧环境,利用 6 mol/L NaOH 控制发酵液 pH 值 6.0。

1.4 外置式纤维床反应器构建

玻璃固定化柱(柱长:31 cm;内部直径:5 cm)带有夹套,装填 80 g 洗净、烘干至恒重的米糠,两端采用不锈钢丝网固定,玻璃柱底部填充高约 15~30 mm 的玻璃弹簧,其工作体积约为 500 mL。将发酵罐与玻璃固定化柱分别灭菌,利用蠕动泵将二者相连接,采用循环恒温水浴锅控制固定化柱温度,构建为外置式纤维床反应器(见图 1)。

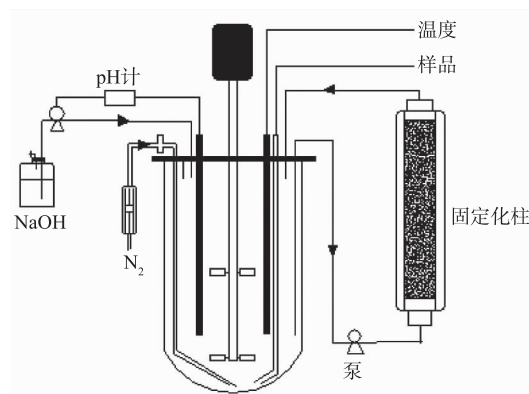


图 1 外置式纤维床反应器示意

Fig. 1 Structure of external fibrous-bed bioreactor

1.5 固定化细胞发酵

发酵操作同游离细胞发酵,待发酵罐中 OD_{600} 值达到 6.0 时即开启纤维床生物反应器,初始循环速度为 30 mL/min,维持循环 36~48 h,进行菌体固定化培养,至发酵罐内的游离菌体浓度不再降低,取出所有的发酵液并更换新鲜的发酵培养基(2 L

体系),提高泵的转速至 100 mL/min,开始进行固定化发酵。

1.6 米糠对丁酸钠的吸附实验

1.6.1 米糠吸附丁酸钠模拟实验 移取 50 mL 浓度为 30 g/L 丁酸钠溶液于 250 mL 锥形瓶中,调节溶液 pH 值为 6.0,投加 8.0 g 的米糠,置于 37 °C 摇床中进行振荡吸附反应(150 r/min),在时间为 0.5、1、2、4、8、10 和 24 h 时后取出溶液并测定丁酸钠的浓度。同时设置平行实验和空白实验。

$$\text{吸附量 } q = (c_0 - c_1)v/m \quad (1)$$

式中: q 为米糠吸附丁酸钠的质量分数, g/g; c_0 为空白对照丁酸钠质量浓度, g/L; c_1 为剩余丁酸钠质量浓度, g/L; v 为溶液体积, L; m 为米糠投加量, g。

1.6.2 固定化发酵后的米糠吸附丁酸钠的测定 用 1% 的磷酸溶液洗涤米糠,直至洗下溶液中丁酸钠质量浓度为 0 g/L,定容后测洗下溶液的丁酸钠含量。将米糠在 80 °C 烘箱中烘干至恒重,测定其质量 M 。吸附量为

$$Q = CV/M \quad (2)$$

式中: Q 为发酵后的米糠吸附丁酸钠的质量分数, g/g; C 为洗下溶液中丁酸钠的质量浓度, g/L; V 为定容后的溶液体积, L; M 为米糠的质量, g。

1.7 分析方法

1.7.1 菌体含量测定 游离细胞生物量的测定:采用紫外/可见分光光度计于 600 nm 读取菌悬液的 OD_{600} 。

固定化细胞生物量(m_1)的测定:发酵前测定固定化所用米糠的干重(m_2),发酵后取出固定化菌体后的米糠,在 80 °C 烘箱内烘干至恒重(m_3)。固定化细胞生物量为($m_1 = m_3 - m_2$)。

1.7.2 葡萄糖含量测定 采用 SBA-40C 生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所)测定葡萄糖的含量。

1.7.3 丁酸和乙酸含量测定 采用安捷伦 6820 型气相色谱系统检测,以内标法定量分析发酵液中丁酸和乙酸浓度。检测所用检测器为氢火焰离子化检测器,色谱柱为 HP-INNOWAX 毛细管柱(30 m × 0.32 mm),流动相为高纯氮气,流速为 3 mL/min。测定条件:柱温 250 °C,进样口温度 250 °C。发酵液 10 000 r/min 离心后取上清液 1 mL,加入内标物丙酸 30 μ L,进样量 0.4 μ L。

2 结果与讨论

2.1 游离和固定化细胞分批发酵产丁酸

进行了游离细胞和外置式纤维床反应器固定化细胞发酵生产丁酸的比较,结果如图 2 所示。在游离发酵模式中,50 g/L 的葡萄糖在 64 h 后被完全消耗,丁酸最终产量为 19.84 g/L,生产率为 0.31 g/L/h。而固定化细胞发酵模式中的葡萄糖在 48 h 后被完全消耗,丁酸最终产量达到 22.85 g/L,生产率达到 0.48 g/L/h,比游离发酵分别提高了 15% 和 55%。同时糖酸转化率与游离细胞发酵相比提高了 13% (0.46 g/g vs. 0.40 g/g),发酵时间从 64 h 缩短到 48 h。因此,外置式纤维床固定化细胞发酵生产丁酸比游离发酵具有明显的优势。从图 2 中可以看出,固定化细胞分批发酵模式可以缩短菌体的迟滞期。这一研究结果与其他类似的纤维床反应器发酵的结果基本一致^[11-12]。

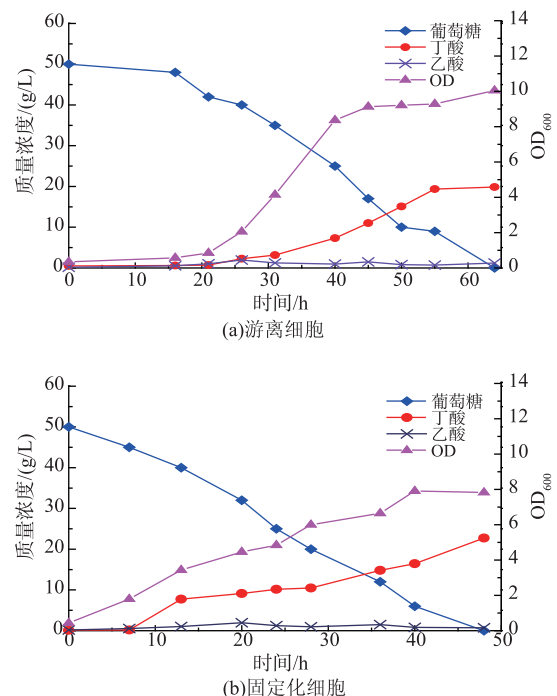


图 2 游离细胞和固定化细胞分批发酵产丁酸

Fig. 2 Batch fermentation for butyric acid production with free-cell and immobilized-cell

2.2 固定化细胞补料分批发酵产丁酸

如图 3 所示,初始葡萄糖质量浓度为 50 g/L,所有的葡萄糖(135 g/L)在 165 h 后被消耗完,共产生 30.69 g/L 的丁酸。糖消耗速率和丁酸生产速率在每

次补料后都有所降低,这是由于随着丁酸浓度的增加,产生了产物抑制,这与文献[12]的研究结果一致。文献[11]发酵结果表明固定化补料分批模式有利于提高丁酸的产量,而本实验采用补料分批模式未见丁酸产量有明显提高,因此推测作为固定化介质的米糠对发酵液中的丁酸钠存在吸附作用。

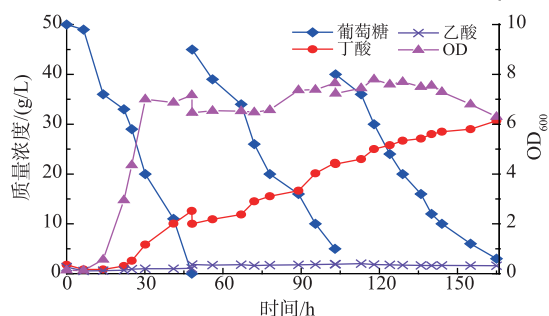


图3 固定化细胞补料分批发酵产丁酸

Fig. 3 Fed-batch fermentation for butyric acid production with immobilized-cell

2.3 米糠对丁酸钠的吸附

2.3.1 米糠对丁酸钠吸附的模拟实验 在与发酵条件基本一致的情况下(丁酸钠 30 g/L, pH 6.0, 温度 37 °C)进行了米糠对丁酸钠的吸附模拟实验,实验结果如图4所示。从图4可以看出,米糠对丁酸钠的吸附量随着时间的延长而逐渐增加,最后达到吸附平衡。吸附开始的前8 h,吸附量增加迅速,8 h后,吸附量增加缓慢并逐渐趋向吸附平衡,最终平衡吸附量可以达到 0.084 g/g。

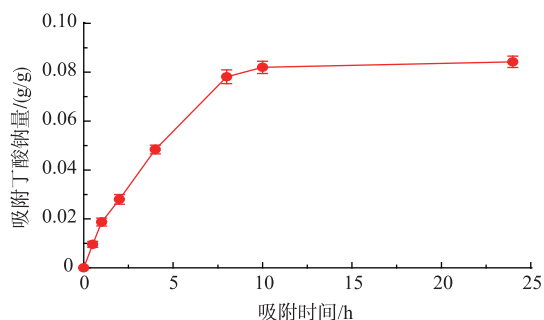


图4 米糠对丁酸钠的吸附

Fig. 4 Adsorption of sodium butyrate by rice bran

2.3.2 固定化发酵后的米糠对丁酸钠的吸附 将固定化补料分批发酵后的米糠取出烘干后,对其上吸附的丁酸钠和酪丁酸梭菌的量进行了测量,实验结果可得,作为固定化介质后的米糠对酪丁酸梭菌

的吸附量为 0.106 g/g, 对丁酸钠的吸附量为 0.105 g/g。固定化发酵后的米糠对丁酸钠的吸附量略高于模拟实验中米糠对丁酸钠的吸附量,这可能是由于在固定化发酵的长期过程中,米糠的结构发生了一定的变化,提高了米糠对丁酸钠的吸附效率,此外,米糠会吸附酪丁酸梭菌,菌体中含有的丁酸钠也会对实验结果产生影响。在饲料添加中,丁酸钠的添加量通常为 0.2~3 kg/t, 米糠的添加量通常为 50 kg/t, 二者的添加比例为 0.004~0.06 g/g。固定化后的米糠经适当稀释后可保持与饲料添加中米糠和丁酸钠的添加比例一致,这一发酵模式可为饲料添加提供参考。在饲料添加中,可以利用米糠作为固定化载体,发酵生产丁酸,待发酵结束后直接将米糠投加到饲料中,米糠所吸附的酪丁酸梭菌可以满足动物的营养需求。同时米糠吸附的酪丁酸梭菌作为益生菌有着优异的益生、防病作用,在替代抗生素、防治疾病和改善环境方面起到了很好的作用^[13]。

2.4 固定化重复分批发酵产丁酸

为了观察外置式纤维床反应器的长期稳定性,采用了固定化重复分批发酵模式,实验结果如图5所示。在重复8次固定化分批发酵中,菌体的生长过程几乎没有迟滞期,底物消耗速度都很快。每次更换新鲜培养基时,菌体的生长均未出现迟滞期,表明固定在米糠纤维床反应器内的菌体具有较高的活性且稳定。所有批次中的丁酸质量浓度在 19.03 g/L 到 22.58 g/L 间,平均值为 21.05 g/L。丁酸生产率从 0.36 g/L/h 到 0.45 g/L/h 不等,平均值为 0.40 g/L/h。文献[14]利用菊芋水解液重复分批发酵生产丁酸,10个批次的丁酸产量保持稳定,本文的研究结果与其一致。

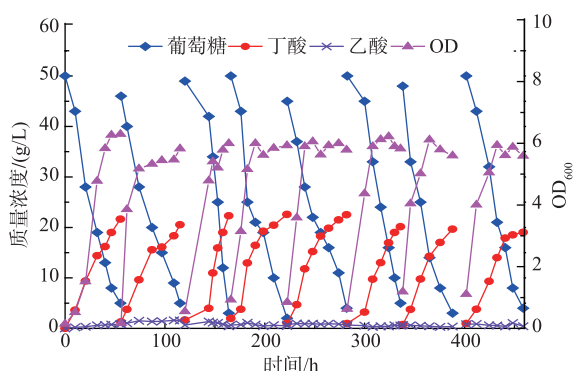


图5 固定化细胞重复分批发酵产丁酸

Fig. 5 Repeated-batch fermentation for butyric acid production with immobilized-cell

3 结 语

1) 本研究构建了一种新型的外置式纤维床生物反应器用于酪丁酸梭菌固定化分批发酵丁酸,丁酸的生产率比游离发酵提高了 55%。

2) 米糠在发酵过程中吸附丁酸钠的量与常规饲料中丁酸钠的添加量基本一致,因此可以作为一

种简便快速的饲料添加新方式。

3) 在固定化重复分批发酵模式中,得到丁酸的平均浓度为 21.05 g/L,外置式纤维床反应器展现了很好的稳定性。这对于实现发酵法工业生产丁酸及丁酸钠在饲料中的添加新途径具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] ZIGOVA J, STURDIK E. Advances in biotechnological production of butyric acid [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2000, 24(3): 153-160.
- [2] DING Meifang. Research of a new feed additive—sodium butyrate[J]. **Feed Research**, 2010(7): 24-26. (in Chinese)
- [3] YUE Shuangming, ZHAO Sheng, ZHOU Anguo, et al. A new feed additive-sodium butyrate [J]. **Feed Industry**, 2007, 28(16): 6-10. (in Chinese)
- [4] ZHANG C, YANG H, YANG F, et al. Current progress on butyric acid production by fermentation [J]. **Current Microbiology**, 2009, 59(6): 656-663.
- [5] DENG Mingrong, GUO Jun, ZHU Honghui. Progress on butyric acid production by microbial catalysis [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2009(3): 117-122. (in Chinese)
- [6] YU L H, MANN K, NOVAK J M, et al. Acetic acid production from fructose by *Clostridium formicoaceticum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor[J]. **Biotechnology Progress**, 1997, 14(5): 800-806.
- [7] LIANG Z X, LI L, LI S, et al. Enhanced propionic acid production from Jerusalem artichoke hydrolysate by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a fibrous-bed bioreactor[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2012, 35(6): 915-921.
- [8] JIANG L, WANG J, LIANG S Z, et al. Production of butyric acid from glucose and xylose with immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010, 160(2): 350-359.
- [9] SHI Z M, WEI P L, ZHU X C, et al. Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2012, 51(51): 263-268.
- [10] DONG Yongpeng, YAN Menggang. The utilization of rice bran[J]. **Chemical Education**, 2006, 27(1): 4-5. (in Chinese)
- [11] JIANG L, WANG J, LIANG S Z, et al. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses[J]. **Bioresource Technology**, 2009, 100(13): 3403-3409.
- [12] WEI D, LIU X, YANG S T. Butyric acid production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium tyrobutyricum* immobilized in a fibrous-bed bioreactor[J]. **Bioresource Technology**, 2013, 129(2): 553-560.
- [13] ZHAO Jianxin, ZHANG Hao, TIAN Fengwei. Isolation, identification and selection of *Clostridium butyricum* [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2002(6): 597-601. (in Chinese)
- [14] HUANG J, CAI J, WANG J, et al. Efficient production of butyric acid from Jerusalem artichoke by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor[J]. **Bioresource Technology**, 2011, 102(4): 3923-3926.