



采用BIOSTAT[®] A，通过
产丙酸丙酸杆菌
来生产丙酸。



应用报告

#09

#10

#11

#12

#13

Carlos H Luna-Flores, Lars Nielsen
and Esteban Marcellin*

昆士兰大学澳大利亚生物工程与纳米技术研究所 (AIBN) (澳大利亚昆士兰州 Qld 4072, 布里斯班)。

* 通讯作者

Esteban Marcellin 博士, 来自昆士兰大学澳大利亚生物工程与纳米技术研究所 (澳大利亚昆士兰州 Qld 4072, 布里斯班)。

电话: +61 7 334 64298;

传真: +61 7 3346 3973;

Email: e.marcellin@uq.edu.au

引言

传统上, 源于矿物燃料的丙酸 (PA) 可被广泛应用于食品和制药工业。丙酸作为防腐剂可用于单体的合成, 且该应用日益增多。如今, 丙酸市场的年产量已经增长到高达410,000公吨, 且保持着每年3%的稳定增长率。不断增多的环境问题促使丙酸的终端用户开始寻找可持续的丙酸替代品, 从而打开了生物制造丙酸的特殊市场 (Liu et al., 2012)。丙酸的生物制造可以解决很多环境问题, 同时也为C3化学品 (包括丙烯、丙醇和乙烯丙酸酯) 的生产提供了可持续的替代方案。产丙酸丙酸杆菌 (*P. acidipropionici*) 是一种革兰氏阳性厌氧杆菌, 它能够通过Wood-Werckman循环自然生成作为主要发酵产物的丙酸 (Liu et al., 2012; Parizzi et al., 2012)。本质上而言, 丙酸是连同诸如乳酸、琥珀酸和醋酸在内的其他有机酸一起生成的。

产丙酸丙酸杆菌的厌氧发酵过程对包括温度、PH值、溶氧及剪切力在内的环境条件、物理化学条件及流体动力条件十分敏感的。在发酵过程中, 需对上述条件进行严格控制。产丙酸丙酸杆菌可利用复杂的营养素混合物生产出最佳的丙酸。通过不同的生长周期, 这会产生动态的代谢过程。

本研究证实了BIOSTAT® A发酵产丙酸丙酸杆菌细胞的稳健性。尽管丙酸的产量极大, 其生产设备仍然能够成功地控制住PH值。必须调整PH控制参数, 使其可对PH值进行适当的控制。在发酵过程中, 需要向反应器中不断通入氮气, 以保持厌氧的条件。用再循环冷却装置和容器周围的加热夹套来对温度进行控制。冷却装置还有助于通过冷却废气以控制蒸发。采用两片Rushton桨叶轮来保持动力学条件。

1. 材料和方法

1.1 细菌与培养基

从17份菌株采集样本中选取了产丙酸丙酸杆菌ATCC 55737 (Stowers, Cox, & Rodriguez, 2014)。该菌株采用甘油 (20%) 作为低温防护剂保存在 -80°C。培养基 (PAM) 成分包括 (g/l): 酵母提取物 (10)、胰酶解酪蛋白大豆 (5)、磷酸氢二钾K₂HPO₄ (0.05)、硫酸锰 MnSO₄ (0.05) 和葡萄糖 (75)。将培养基成分及碳源分别在121°C条件下灭菌20分钟。

1.2 培养

在含有采用0.8% (v/v)的甘油储备液孵育的1mL PAM培养液的1.5mL Eppendorf管中复原甘油储备培养物。将培养物置于32°C培养24小时。将培养物转移至含有14mL PAM培养基的15mL Falcon离心管中, 使其继续生长24小时。将5% (v/v)的这种培养物接种至250mL含有100 mL PAM培养液的血清瓶中, 使其同上24小时。将血清瓶中处于指数生长期中期的细胞接种至OD_{600nm}值为0.3的发酵罐中。采用BIOSTAT® A (1L) 发酵罐进行发酵。发酵罐配有标准探头和标准控制器, 可控制PH值、溶氧、温度以及搅拌速率。搅拌速率可控制在300 rpm。采用10M NaOH对PH值进行控制, 使其保持在6.4。采用电加热夹套及再循环冷却装置将培养液的温度维持于32°C条件下。设置废气冷凝器至20%, 以避免培养基的蒸发。在接种前, 用N₂通入发酵罐至少15分钟。在整个发酵过程之中, 采用0.992的质量流量控制器校正系数将N₂的恒定流速保持在300 ccm。

1.3. 分析方法

使用Biochrom Libra S12 UV/Vis分光光度计测量培养液的光密度（600nm波长处）。采用Agilent 1200 HPLC系统及配有保护柱（SecurityGuard Carbo-H, Phenomenex PN: AJO-4490）的Agilent Hixler H色谱柱（300 × 7.7 mm, PL1170-6830）利用离子排斥色谱法来定量测量有机酸及糖类化合物。采用折光率检测器（Agilent RID, G1362A）监测糖类，将检测器调至正极，光学单元温度调节至40°C；在210nm波长处（Agilent MWD, G1365B）监测有机酸。采用自动进样器（Agilent HiP-ALS, G1367B）将30 μL样本注入色谱柱完成进样，采用热稳定柱箱（Agilent TCC, G1316A）将柱温维持在65°C [70°C]。采用4 mM H₂SO₄对分析液进行等度洗脱，洗脱流速为0.6 mL/min，洗脱26分钟。采用ChemStation (Rev B.03.02[341])整合色谱图。

2. 结果

产丙酸丙酸杆菌能够生成需要进行控制的、具有极强PH值动态变化的有机酸。图1显示了采用BIOSTAT® A的生物反应器的控制参数。

如图所示，通过采用集成蠕动泵可实现10 M NaOH的供给，从而添加碱来维持恒定的PH值。将PID控制参数调节至P: 300%，I: 0%和D: 0%。连续供应N₂，以维持发酵罐内的厌氧环境。同时控制和监测发酵罐的温度和搅拌速度。

图2显示了产丙酸丙酸杆菌的动力学增长曲线。发酵的主要产物为丙酸；此外，还有少量的乙酸和琥珀酸。如图所示，在发酵进行到40小时后，生长停止。然而，丙酸的生成一直持续到发酵结束，从而导致NaOH的添加一直延长至第96个小时为止。

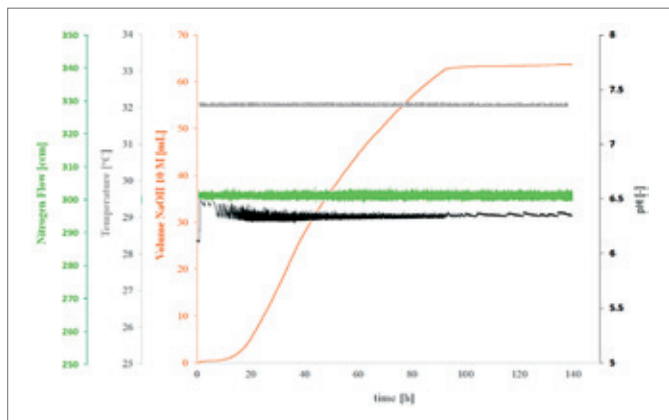
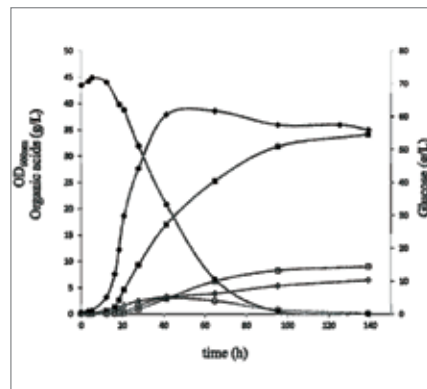


图1：在产丙酸丙酸杆菌的发酵过程中，BIOSTAT®对参数进行控制。氮气流、温度、PH值及NaOH 10 M的体积如图所示。



(a)



(b)

图2：BIOSTAT® A中产丙酸丙酸杆菌发酵的生长动力学。

- (a) BIOSTAT® A 设备；
(b) 生长及生产量的动力学；
光密度：黑线和◆；
丙酸：黑线和■；
葡萄糖：黑线和●；
琥珀酸：灰线和□；
乙酸：灰线和◇；
丙酮酸：灰线和○。

3. 结论

可在BIOSTAT® A中完成产丙酸丙酸杆菌生成丙酸的发酵。在发酵过程中，PH值是最重要的控制参数，可通过改变PID对其进行控制。总而言之，可以采用BIOSTAT® A进行厌氧微生物发酵来生产超过30 g/L的丙酸。

参考文献

- Liu, L., Zhu, Y., Li, J., Wang, M., Lee, P., Du, G., & Chen, J. (2012). 利用丙酸杆菌进行丙酸的微生物制造：现状、挑战和前景。生物技术评论, 32(4), 374-81. doi:10.3109/07388551.2011.651428
- Parizzi, L. P., Grassi, M. C. B., Llerena, L. a, Carazzolle, M. F., Queiroz, V. L., Lunardi, I., ... Pereira, G. a G. (2012). 产丙酸丙酸杆菌的基因组序列为其生物技术和工业应用的潜力提供了洞察力。BMC基因组学 (BMC Genomics), 13, 562. doi:10.1186/1471-2164-13-562
- Stowers, C. C., Cox, B. M., & Rodriguez, B. a. (2014). 丙酸生产的工业化发酵工艺进展。工业微生物学及生物技术期刊, 41(5), 837-52. doi:10.1007/s10295-014-1423-6

Sales and Service Contacts

For further contacts, visit www.sartorius-stedim.com

Europe

Germany

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen

Phone +49.551.308.0
Fax +49.551.308.3289

Sartorius Stedim Systems GmbH
Robert-Bosch-Strasse 5 – 7
34302 Guxhagen

Phone +49.5665.407.0
Fax +49.5665.407.2200

France

Sartorius Stedim FMT S.A.S.
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 91051
13781 Aubagne Cedex

Phone +33.442.845600
Fax +33.442.845619

Sartorius Stedim France SAS
ZI des Paluds
Avenue de Jouques – CS 71058
13781 Aubagne Cedex

Phone +33.442.845600
Fax +33.442.846545

Austria

Sartorius Stedim Austria GmbH
Modecenterstrasse 22
1030 Vienna

Phone +43.1.7965763.18
Fax +43.1.796576344

Belgium

Sartorius Stedim Belgium N.V.
Rue Colonel Bourg 105
1030 Bruxelles

Phone +32.2.756.06.80
Fax +32.2.756.06.81

Hungary

Sartorius Stedim Hungária Kft.
Kagyuló u. 5
2092 Budakeszi

Phone +36.23.457.227
Fax +36.23.457.147

Italy

Sartorius Stedim Italy S.p.A.
Via dell'Antella, 76/A
50012 Antella-Bagno a Ripoli (FI)

Phone +39.055.63.40.41
Fax +39.055.63.40.526

Netherlands

Sartorius Stedim Netherlands B.V.

Phone +31.30.60.25.080
Fax +31.30.60.25.099

filtratie.nederland@sartorius-stedim.com

Poland

Sartorius Stedim Poland Sp. z o.o.
ul. Wrzesinska 70
62-025 Kostrzyn

Phone +48.61.647.38.40
Fax +48.61.879.25.04

Russian Federation

LLC "Sartorius Stedim RUS"
Uralskaya str. 4, Lit. B
199155 St. Petersburg

Phone +7.812.327.53.27
Fax +7.812.327.53.23

Spain

Sartorius Stedim Spain, S.A.U.
Avda. de la Industria, 32
Edificio PAYMA
28108 Alcobendas (Madrid)

Phone +34.913.586.098
Fax +34.913.589.623

Switzerland

Sartorius Stedim Switzerland AG
Ringstrasse 24 a
8317 Tagelswangen

Phone +41.52.354.36.36
Fax +41.52.354.36.46

U.K.

Sartorius Stedim UK Ltd.
Longmead Business Centre
Blenheim Road, Epsom
Surrey KT19 9 QQ

Phone +44.1372.737159
Fax +44.1372.726171

Ukraine

LLS "Sartorius RUS"
Post Box 440 "B"
01001 Kiev, Ukraine

Phone +380.44.411.4918
Fax +380.50.623.3162

Americas

USA

Sartorius Stedim North America Inc.
5 Orville Drive, Suite 200
Bohemia, NY 11716

Toll-Free +1.800.368.7178
Fax +1.631.254.4253

Argentina

Sartorius Argentina S.A.
Int. A. Ávalos 4251
B1605ECS Munro
Buenos Aires

Phone +54.11.4721.0505
Fax +54.11.4762.2333

Brazil

Sartorius do Brasil Ltda
Avenida Senador Vergueiro 2962
São Bernardo do Campo
CEP 09600-000 - SP- Brasil

Phone +55.11.4362.8900
Fax +55.11.4362.8901

Mexico

Sartorius de México, S.A. de C.V.
Libramiento Norte de Tepotzotlan s/n,
Colonia Barrio Tlacateco,
Municipio de Tepotzotlan,
Estado de México,
C.P. 54605

Phone +52.55.5562.1102
Fax +52.55.5562.2942

leadsmex@sartorius.com

Peru

Sartorius Peru S.A.C.
Av. Emilio Cavenecia 264 San Isidro
15073 Lima, Perú

Phone +51.1.441 0158
Fax +51.1.422 6100

Asia | Pacific

Australia

Sartorius Stedim Australia Pty. Ltd.
Unit 5, 7-11 Rodeo Drive
Dandenong South Vic 3175

Phone +61.3.8762.1800
Fax +61.3.8762.1828

China

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
No. 33 Yu'an Road
Airport Industrial Park Zone B
Shunyi District, Beijing 101300

Phone +86.10.80426516
Fax +86.10.80426580

Sartorius Stedim (Shanghai)
Trading Co., Ltd.
3rd Floor, North Wing, Tower 1
No. 4560 Jinke Road
Zhangjiang Hi-Tech Park
Pudong District
Shanghai 201210, P.R. China

Phone +86.21.6878.2300
Fax +86.21.6878.2882

Sartorius Stedim Biotech (Beijing) Co. Ltd.
Guangzhou Representative Office
Unit K, Building 23
Huihua Commerce & Trade Building
No. 80 Xianlie Middle Road
Guangzhou 510070

Phone +86.20.37618687 | 37618651
Fax +86.20.37619051

India

Sartorius Stedim India Pvt. Ltd.
#69/2-69/3, NH 48, Jakkasandra
Nelamangala Tq
562 123 Bangalore, India

Phone +91.80.4350.5250
Fax +91.80.4350.5253

Japan

Sartorius Stedim Japan K.K.
4th Fl., Daiwa Shinagawa North Bldg.
8-11, Kita-Shinagawa 1-chome
Shinagawa-ku, Tokyo, 140-0001 Japan

Phone +81.3.4331.4300
Fax +81.3.4331.4301

Malaysia

Sartorius Stedim Malaysia Sdn. Bhd.
Lot L3-E-3B, Enterprise 4
Technology Park Malaysia
Bukit Jalil
57000 Kuala Lumpur, Malaysia

Phone +60.3.8996.0622
Fax +60.3.8996.0755

Singapore

Sartorius Stedim Singapore Pte. Ltd.
1 Science Park Road,
The Capricorn, #05-08A,
Singapore Science Park II
Singapore 117528

Phone +65.6872.3966
Fax +65.6778.2494

South Korea

Sartorius Korea Biotech Co., Ltd.
8th Floor, Solid Space B/D,
PanGyoYeok-Ro 220, BunDang-Gu
SeongNam-Si, GyeongGi-Do, 463-400

Phone +82.31.622.5700
Fax +82.31.622.5799



▶ www.sartorius-stedim.com