高产丙酸杆菌的航天诱变叠加化学诱变选育及发酵优化

山晨辉[1]，陈佳磊[1]，陈文文[1]，刘田浩[1]，王德培[1,2*]

（1.天津科技大学生物工程学院，天津 300450）（2.天津科技大学工业发酵微生物教育部重点实验室，天津 300450）

摘要：丙酸是一类重要三碳有机酸，在食品、化工及医药合成等领域具有重要应用价值。微生物发酵产丙酸已成为丙酸合成领域的重要研究方向。该论文研究目的，为获得高产丙酸的詹氏丙酸杆菌，实验以詹氏丙酸杆菌 PA2 为出发菌株，首先确定了菌株初步发酵丙酸条件，以航天诱变叠加甲基磺酸乙酯化学诱变方法结合高效筛选，获得高产丙酸菌株。研究结果表明，出发菌株 PA2 经叠加诱变后筛选到高产丙酸突变株 DJ04-16 丙酸产量达 31.78 g Ł$^{-1}$，较出发菌株提升 31.27%。通过多次正交实验获得最优丙酸发酵培养基，葡萄糖 30 g Ł$^{-1}$、甘油 35 g Ł$^{-1}$、蛋白胨 9 g Ł$^{-1}$、酵母粉 10 g Ł$^{-1}$、硫酸亚铁 80 mg Ł$^{-1}$、泛酸钙 0.8 mg Ł$^{-1}$、生物素 0.8 mg Ł$^{-1}$、160 mg Ł$^{-1}$ 硫酸镁、2 g Ł$^{-1}$ 磷酸氢二钾、1 g Ł$^{-1}$ 磷酸二氢钾以及 8 g Ł$^{-1}$ 玉米浆，DJ04-16 菌株于此条件进行发酵，144 h 丙酸产量达到 33.75 g Ł$^{-1}$。结论，航天诱变叠加化学诱变结合高效筛选策略可有效提高詹氏丙酸杆菌产酸能力，所得突变株 DJ04-16 具有良好的工业应用前景，为微生物法合成丙酸提供了可行性技术支撑。

关键词：詹氏丙酸杆菌; 航天诱变; 甲基磺酸乙酯诱变; 叠加诱变; 发酵优化

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.8.0760

Screening of High-Producing *Propionibacterium* via Space Mutagenesis Coupled with Chemical Mutagenesis and Optimization of Its Fermentation Conditions

SHAN Chenhui[1], CHEN Jialei[1], CHEN Wenwen[1], LIU Tianhao[1], WANG Depei[1,2*]

(1.College of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300450, China)

(2.Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin 300450, China)

Abstract：Propionic acid, an important three-carbon organic acid, holds significant application value in food, chemical, and pharmaceutical synthesis industries. Microbial fermentation for propionic acid production has emerged as a crucial research direction in the field of propionic acid biosynthesis. In this study, the wild-type *Propionibacterium jensenii* strain PA2 was utilized as the progenitor strain. Initial fermentation parameters were established, followed by iterative space mutagenesis and ethyl methanesulfonate (EMS) chemical mutagenesis coupled with high-efficiency screening. It was demonstrated that the iteratively mutagenized strain DJ04-16 achieved propionic acid production of 31.78 g Ł$^{-1}$ under screening conditions, representing a 31.27% increase over PA2. Through orthogonal optimization, the optimal fermentation medium was determined as: glucose (30 g Ł$^{-1}$), glycerol (35 g Ł$^{-1}$), peptone (9 g Ł$^{-1}$), yeast extract (10 g Ł$^{-1}$), $FeSO_4$ (80 mg·L^{-1}), calcium pantothenate (0.8 mg Ł$^{-1}$), biotin (0.8 mg Ł$^{-1}$), $MgSO_4$ (160 mg·L^{-1}), K_2HPO_4 (2 g·L^{-1}), KH_2PO_4 (1 g·L^{-1}), and corn steep liquor (8 g Ł$^{-1}$). When cultivated in this optimized medium, strain DJ04-16 produced 33.75 g Ł$^{-1}$ propionic acid after 144 h of fermentation. The synergistic combination of space and chemical mutagenesis was demonstrated to significantly improve propionic acid productivity in *P. jensenii*. The developed mutant DJ04-16 exhibits considerable potential for industrial applications, providing a robust technological platform for microbial propionic acid biosynthesis.

Key words：*Propionibacterium jensenii*; space mutagenesis; Ethyl methanesulfonate mutagenesis (EMS); sequential mutagenesis; fermentation optimization

收稿日期：2025-05-31；修回日期：2025-08-08；接受日期：2025-08-13

作者简介：山晨辉（2001-），男，硕士研究生，研究方向：发酵工程，E-mail：18822089033@163.com

通讯作者：王德培（1972-），女，博士，教授，研究方向：代谢工程改造工业微生物，E-mail：wangdp@tust.edu.cn

丙酸，又名初油酸，分子式 $C_3H_6O_2$，常温时为无色油状液体，易溶于水和乙醇，广泛应用于食品、饲料、化工以及制药等领域[1,2]。近几年来，得益于丙酸应用领域快速拓展，丙酸需求量不断攀升，截止到 2025 年，全球丙酸年需求量约为 50~60 万 t[3]。目前，丙酸的生产方法主要包括化学合成法和微生物发酵法[4]。化学合成法虽然工艺成熟，但存在环境污染严重、能耗高等问题[5]。而微生物发酵法具有条件温和、环境友好、原料可再生等优势，因此微生物发酵已成为丙酸生产的重要发展方向[6]。

詹氏丙酸杆菌（*Propionibacterium jensenii*）作为丙酸高产菌之一[7]，其主要利用可再生资源（如葡萄糖，甘油）通过 Wood-Werkman 循环合成丙酸[8]，但微生物发酵丙酸存在两大瓶颈：菌株产酸低、发酵周期长，导致发酵丙酸工业生产成本较高[9]；野生菌株普遍存在产物抑制阈值低[10]、底物转化率低等问题[11]。传统单一诱变育种技术（如 UV、NTG）虽可部分改善菌株性能，但正向突变率较低[12]。因此迫切需要新技术、新方法改造菌株，为微生物发酵生产丙酸提供可行性参考。

近年来，航天诱变技术凭借空间辐射与微重力协同诱变效应，在微生物诱变技术中展现出独特优势[13]。王清清等[14]通过航天诱变技术成功筛选出两株遗传稳定性优良诱变菌株（乳酸菌 L1-5 和乳酸菌 L21-48），GABA 产量分别提升 59.58%和 9.29%。张孟雨等[15]通过航天诱变技术筛选获得高产胞外多糖且遗传性状稳定的乳酸片球菌（L21-49），产量达到 196.23 mg Ł$^{-1}$，对比出发菌产量提高了 26.54%。可见，航天诱变作为一种新型的菌种选育途径，具有突变效率高且性状稳定的优势[16]。此外，化学诱变操作简单易行也可能获得较好的效果，Hoffmam 等[17]通过化学诱变策略对产酸丙酸杆菌进行改造已取得一定成效，但单一诱变技术对菌株性能的提升幅度相对有限[18]，因此将传统物理诱变与化学诱变方法叠加使用，应能有效增强菌株的突变效果[19]。此外优化培养基配方，使菌株快速增殖，同时协调代谢途径实现产物的高效积累，也是提升丙酸产量的关键技术手段。Derman 等[20]发现通过优化碳源、氮源、金属离子以及维生素等营养元素添加量，有助于使菌株保持较高比生长速率以及丙酸生长速率，其中添加维生素比未加维生素的发酵生产丙酸速率高 48.5%。

该研究以詹氏丙酸杆菌 PA2 为出发菌株，基于前期碳、氮源比例优化、辅因子添加策略的成果基础上，进一步通过叠加诱变和高效筛选策略，筛选出一株高产丙酸突变株，结合发酵培养基优化，最终实现丙酸产量与转化率的同步提升。该研究不仅为丙酸生物制造提供了稳定高性能生产菌株，同时为丙酸杆菌属突变方法提供参考，对推进微生物发酵丙酸工业化具有重要实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

詹氏丙酸杆菌（*Propionibacterium acidipropionic*i）PA2，由天津科技大学生物工程学院生化过程与技术实验室保存；蛋白胨、酵母粉，Oxoid 公司；乳酸钠，天津市科密欧化学试剂有限公司；胰蛋白胨大豆肉汤（TSB），海博生物技术有限公司；丙酸，天津市津东天正精细化学试剂厂；葡萄糖、硫酸镁、硫代硫酸钠，福晨（天津）化学试剂有限公司；磷酸氢二钾、磷酸氢二钾，天津市风船化学试剂科技有限公司；甲基磺酸乙酯（EMS），上海麦克林生化科技股份有限公司；泛酸钙、生物素，北京索莱宝科技有限公司；玉米浆，金玉米生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

DELTA320 pH，计梅特勒-托利多仪器有限公司；UV-3200 紫外可见光分光光度计，天津市华伟科技有限公司；SBA-40E 物传感分析仪，山东省科学院生物研究所；Agilent 1200 高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；AminexHPX-87H Column. 300×7.8 mm，Bio-Rad（伯乐）公司 Bio-Rad Laboratories, Inc.；分子杂交箱 HL-2000，美国 UVP。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配置

基本培养基：蛋白胨 10 g Ł$^{-1}$、酵母粉 10 g Ł$^{-1}$、乳酸钠 10 g Ł$^{-1}$；

增殖培养基：葡萄糖 20 g Ł$^{-1}$、酵母粉 5 g Ł$^{-1}$、蛋白胨 5 g Ł$^{-1}$、硫酸镁 2.5 g Ł$^{-1}$、磷酸氢二钾 9 g Ł$^{-1}$，pH 值

7.5；

筛选培养基：葡萄糖 20 g Ł$^{-1}$、蛋白胨 10 g Ł$^{-1}$、酵母粉 10 g Ł$^{-1}$、碳酸钙 1 g Ł$^{-1}$、pH 值 7.0。

1.2.2 詹氏丙酸杆菌丙酸发酵

一级种子培养：于新鲜斜面接取一环至基本培养基（血清瓶装液量 40 mL）中，30 ℃厌氧培养 48 h。

二级种子培养：取一级种子液 φ=4%转接于增殖培养基（血清瓶装液量 38.4 mL）中，30 ℃厌氧培养 36 h。

静置发酵：取二级种子液 φ=6%转接于发酵培养基（血清瓶装液量 37.6 mL）中，30 ℃静置发酵培养 144 h，其中第 24、48 h 各补加 1 mL 10%碳酸钙溶液，第 72 h 补加 2 mL 100 g Ł$^{-1}$ 碳酸钙溶液[21]。

滚动发酵：取二级种子液 φ=6%转接于发酵培养基（血清瓶装液量 37.6 mL）中，于分子杂交箱 30 ℃、12 r min^{-1} 厌氧发酵培养 144 h，其中第 24、48 h 各补加 1 mL 100 g Ł$^{-1}$ 碳酸钙溶液，第 72 h 补加 2 mL 100 g Ł$^{-1}$ 碳酸钙溶液。

1.2.3 发酵条件的优化

1.2.3.1 发酵培养基碳源、氮源的正交试验

以葡萄糖（A）、甘油（B）、蛋白胨（C）和酵母粉（D）为四因素，以丙酸产量为指标（Y），设计 4 因素 3 水平 L(3^4）正交试验（表 1），按照正交试验设计表，将不同因素的水平组合进行发酵静置培养试验，每组三个水平，确定优化詹氏丙酸杆菌发酵生产丙酸的最佳碳、氮源条件。

表 1 碳、氮源优化正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test for carbon and nitrogen source optimization (g Ł$^{-1}$)

水平	A 葡萄糖	B 甘油	C 蛋白胨	D 酵母粉
1	30	25	5	5
2	40	35	7	7
3	50	45	9	10

1.2.3.2 发酵方式的选择

菌株 PA2 经二级种子培养后，以 φ=6%接种量转接至优化的发酵培养基中（配方参见 2.1.1），同时进行静置发酵与滚动发酵，每组两个平行，30 ℃厌氧发酵时间 144 h，分别在 96 h 以及 144 h 取样，对发酵液进行丙酸产量以及杂酸（琥珀酸、乳酸）产量检测。

1.2.3.3 发酵培养基亚铁离子与维生素的正交试验

分别以硫酸亚铁（A）、泛酸钙（B）和生物素（C）为三因素，以丙酸产量为指标（Y），设计 3 因素 3 水平 L(3^3）正交试验（表 2），按照正交试验设计表，将不同因素的水平组合进行滚动发酵试验，每组三个水平，确定优化詹氏丙酸杆菌发酵生产丙酸的最佳发酵培养基配方。

表 2 硫酸亚铁、泛酸钙及生物素正交因素与水平

Table 2 Orthogonal factors and levels of ferrous sulfate, calcium pantothenate and biotin (mg Ł$^{-1}$)

水平	A 硫酸亚铁	B 泛酸钙	C 生物素
1	80	0.4	0.4
2	100	0.8	0.8
3	120	1.2	1.2

1.2.4 航天诱变及其筛选

1.2.4.1 航天诱变方法

将 PA2 菌株从超低温冰箱-80 ℃取出，于基本培养基固体平板划线活化，挑选生长较好单菌落，接种于试管斜面 30 ℃厌氧培养 4 d，转移至无菌 2.0 mL 冻存管（Cor-ning 内旋式管盖）30 ℃厌氧培养 4 d，观察生长状态良好保存至 4 ℃冰箱备用。PA2 菌株于实践十九号卫星 2024 年 9 月 27 日搭载长征二号运载火箭发射，菌株在经历太空的高真空压力、微重力、强辐射等特殊环境进行太空诱变处理，并于 2024 年 10 月 11 日返回地面。在整个飞行任务执行期间，样品存放于卫星返回舱，返回地面后取出菌种进行活化工作。

1.2.4.2 航天诱变菌株初次筛选

将航天诱变处理后的突变株从斜面培养基中无菌刮取，用灭菌生理盐水制备成菌体悬液（OD_{600}=1.0），按 φ=4%接种量转接至增殖培养基，于 30 ℃厌氧活化培养 12 h。取对数中期菌液（OD_{600}=3.2），经梯度稀释（10^{-3}~10^{-6}）后均匀涂布于筛选培养基平板，30 ℃静置培养 144 h。通过菌落产酸溶解碳酸钙透明圈量化分析（透明圈直径/

菌落直径≥1.8）[22]，初步筛选获得代谢活性显著提升的候选菌株。

1.2.4.3 航天诱变菌株复筛

将初筛挑选出的菌株点种于筛选培养基平板，30 ℃厌氧培养，144 h 测量菌落直径和透明圈直径，挑选圈径比值高的菌株进行发酵验证。圈径比计算公式为：圈径比=透明圈直径/菌落直径。

1.2.4.4 航天诱变菌株发酵验证

将复筛菌株从新鲜斜面转接至基本培养基中，30 ℃厌氧培养 48 h，取一级种子液 φ=4%接种于增殖培养中，30 ℃培养 36 h 后，以 φ=6%接种量转至优化后发酵培养基中（参见 1.2.3.3 最优发酵配方），滚动发酵 144 h，于 96、120、144 h 分别取样，进行 HPLC 检测。

1.2.5 叠加诱变方法

采用航天-化学叠加诱变策略如图 1。首先出发菌株 PA2 进行"实践十九号"卫星搭载的航天诱变，经初筛和复筛获得的高产菌株 FN88-30；随后对此高产突变株进行甲基磺酸乙酯（EMS）叠加诱变，并通过筛选获得高产丙酸突变菌株。

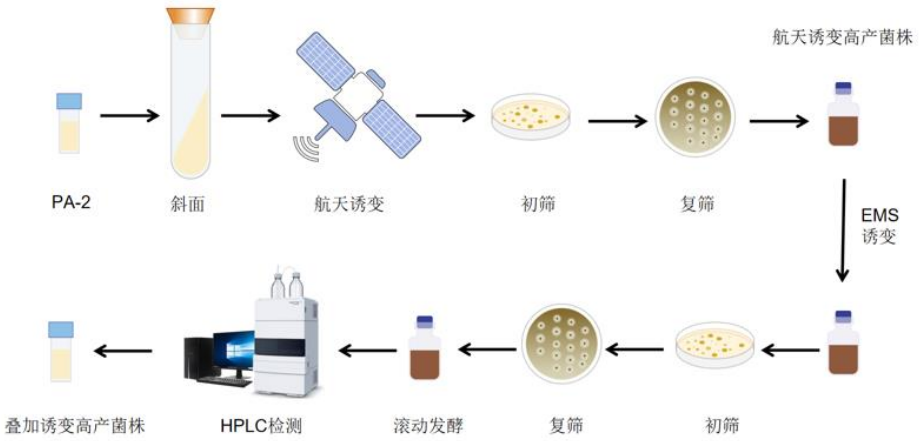

图 1 叠加诱变高产菌株筛选流程图

Fig.1 Flow chart for screening of high-yield strains by superimposed mutagenesis

1.2.5.1 航天诱变高产菌株 FN88-30 生长曲线的绘制

FN88-30 菌株划线活化，单菌落接种至基础培养基中 30 ℃静置培养 48 h，φ=4%接种量转至增殖培养基中，30 ℃静置培养。以增殖培养基作空白对照，前 12 h，每 4 h 测定其生物量，12 h 后，每隔 2 h 测定生物量，绘制该菌株生长曲线。

1.2.5.2 菌悬液的制备

菌株 FN88-30 划线活化，单菌落接种至基础培养基中 30 ℃培养 48 h，φ=4%接种量转至增殖培养基中，30 ℃厌氧培养至对数生长期（25 h）。取 1 mL 菌液，离心洗涤 2 次后用 1 mL 磷酸钾缓冲液重悬，并稀释 50 倍备用。

1.2.5.3 甲磺酸乙酯（EMS）化学诱变

吸取 5 mL 菌悬液置于 10 mL 离心管中，加入 50 uL EMS 溶液，控制诱变时间（0，20，30，50，70，100 min），终止诱变加入质量分数为 2%硫代硫酸钠以 1:1（*V*/*V*）的比例，离心去上清，无菌生理盐水离心洗涤两次，重悬于 5 mL 无菌生理盐水即诱变后菌液[17,23]。化学诱变初次筛选、复筛和发酵验证与航天诱变筛选方法一致。

1.2.6 遗传稳定性验证

将诱变得到的高产丙酸菌株接种至新鲜斜面培养基，于 30 ℃恒温培养箱培养 4 d，连续传代 10 次，分别选取第 1 代、第 5 代、第 10 代菌株进行丙酸产量测定，确定其遗传稳定性较好进行下一步实验并保藏。

1.2.7 最优发酵培养基正交试验

在前期发酵培养基优化的基础上，采用 DJ04-16 菌株进行发酵培养基进一步优化，以硫酸镁（A）、磷酸氢二钾（B）、磷酸二氢钾（C）和玉米浆（D）为考察对象，以丙酸产量为指标（Y），设计 4 因素 3 水平 L（3^4）正交试验（表 3），按照正交试验设计表，将不同因素的水平组合进行发酵试验，每组三个水平，确定优化詹氏丙酸杆

菌 DJ04-16 发酵生产丙酸的最佳发酵培养基配方。

表 3 最优发酵培养基正交试验因素与水平

Table 3 Factors and levels of orthogonal test for the optimal fermentation medium

水平	A 硫酸镁/(mg Ł$^{-1}$)	B 磷酸氢二钾/(g Ł$^{-1}$)	C 磷酸二氢钾/(g Ł$^{-1}$)	D 玉米浆/(g Ł$^{-1}$)
1	40	1	1	4
2	80	2	2	8
3	160	3	3	12

1.2.8 HPLC 检测丙酸及其它主要有机酸方法

（1）标准溶液的制备：丙酸标准溶液 20 g Ł$^{-1}$ 用 5 mmol/L 硫酸分别稀释至 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g Ł$^{-1}$；将乳酸及琥珀酸定容标准溶液 20 g Ł$^{-1}$，分别用 5 mmol Ł$^{-1}$ 硫酸相稀释至 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g Ł$^{-1}$。

（2）样品处理：将样品于 10 000 r min^{1} 离心 5 min，吸取 1 mL 上清置于 10 mL 容量瓶中，使用 5 mmol Ł$^{-1}$ 硫酸定容至 10 mL；0.22 μm 滤器过滤备用。

（3）检测条件：色谱柱 AminexHPX-87H、流动相为 5 mmol Ł$^{-1}$ 硫酸、流速 0.8 mL min^{-1}、柱温 30 ℃、上样量 10 μL，紫外检测波长 215 nm[24]。

（4）标准曲线：以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标，建立丙酸、琥珀酸、乳酸浓度与检测峰面积的回归曲线，在检测浓度范围内，三种有机酸线性范围均良好，回归方程分别为：丙酸（y=424.31x-7.458，R^2=0.999 4）；琥珀酸（y=451.17x-10.115，R^2=0.999 5）；乳酸（y=606.31x-7.359，R^2= 0.999 3）。

1.3 数据处理

所有实验均设置三个平行组，文中展示的所有数据点均为三个平行实验的平均值，误差线代表标准偏差，且所有实验均独立重复三次。采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析，通过 ANOVA 进行方差分析，运用 LSD 法开展差异性检验，数据结果以“平均值±标准误”形式呈现。当 P<0.05 时，表明差异显著；当 P＞0.05 时，表明差异不显著[25]。部分数据借助 Origin 2018 软件，依据相应计算公式绘图并进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 詹氏丙酸杆菌 PA2 发酵丙酸的优化

2.1.1 碳源和氮源正交试验结果

有研究表明，甘油与葡萄糖的组合碳源策略：既为菌体提供必需碳骨架与能量，又可通过调节糖酵解通量抑制乙酸积累，从而提升丙酸合成强度[26,27]，而碳源与氮源对于丙酸生产有着交互作用。因此本研究分别以葡萄糖、甘油、蛋白胨和酵母粉不同浓度进行正交试验，结果如表 4 所示，以 R 值不同代表各因素对丙酸发酵结果影响程度依次为 D＞C＞B＞A，其中因素 D 影响最大为 1.507。因素 A 影响最小为 0.590。经方差分析见表 5，四种因素均为显著性因素（P<0.05），影响丙酸发酵的主次因素与表 4 结果分析一致，最优水平组合为 $A_1B_2C_3D_3$，即 30 g Ł$^{-1}$ 葡萄糖、35 g Ł$^{-1}$ 甘油、9 g Ł$^{-1}$ 蛋白胨和 10 g Ł$^{-1}$ 酵母粉。后续验证最优组合，发酵 144 h 丙酸产量达到 17.05 g Ł$^{-1}$，对比各试验组均有所提高，这说明碳源与氮源种类及其浓度，对发酵丙酸都会有显著影响，且碳、氮源存在交互作用。适宜的 C/N 比可通过调控代谢流导向，有效平衡 EMP 途径与三羧酸循环的碳代谢流分配，促使碳源优先流向丙酸合成通路而非菌体增殖[20]，从而实现产物得率与发酵效能的协同提升。

表 4 碳氮源优化正交试验结果与分析

Table 4 Results and analysis of the orthogonal test for the optimization of carbon and nitrogen sources

试验号	A 葡萄糖	B 甘油	C 蛋白胨	D 酵母粉	丙酸/(g Ł$^{-1}$)
1	1	1	1	1	13.78±0.10
2	1	2	2	2	15.34±0.03
3	1	3	3	3	16.95±0.01
4	2	1	2	3	15.44±0.28
5	2	2	3	1	15.52±0.87

6	2	3	1	2	14.73±0.18
7	3	1	3	2	15.11±0.18
8	3	2	1	3	15.31±0.03
9	3	3	2	1	13.88±0.31
K_1	15.357	14.777	14.607	14.393	
K_2	15.230	15.390	14.887	15.060	
K_3	14.767	15.187	15.860	15.900	
R	0.590	0.613	1.253	1.507	

表 5 碳氮源正交试验方差分析表

Table 5 Analysis of Variance (ANOVA) Table for the Orthogonal Test of Carbon and Nitrogen Sources

因素	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	14.378[a]	8	1.797	16.057	0.000
截距	4 114.152	1	4 114.152	36 757.203	0.000
A 葡萄糖	1.151	2	0.575	5.140	0.032
B 甘油	1.169	2	0.584	5.220	0.031
C 蛋白胨	5.233	2	2.617	23.378	0.000
D 酵母粉	6.826	2	3.413	30.492	0.000
误差	1.007	9	0.112		
总计	4 129.538	18			
修正后总计	15.385	17			

注：a: R^2=0.935（调整后 R^2=0.876）。

2.1.2 发酵方式的选择

在前期发酵培养基优化研究基础上，以 PA2 菌株进行滚动发酵（12 r·min^{-1}）与静置发酵模式的对比发酵丙酸结果如图 2 所示，滚动发酵在 96、144 h 的丙酸产量分别达到 16.56、21.28 g·L^{-1}，比静置发酵提升 23.3%、24.08%。同时有机酸副产物（含乙酸、琥珀酸等）减少 17.50%~22.19%，该现象说明滚动过程使碳酸钙充分分散于发酵液中，易解离与丙酸形成丙酸钙，使发酵液丙酸浓度下降，减少丙酸对菌体形成产酸抑制，同时有效维持发酵液稳定在 pH 值 6.0 滚动发酵在丙酸产量与副产物抑制方面均显著优于静置发酵。发酵方式优化基于模拟工业化发酵罐的低转速环境[10]，同时使碳酸钙充分分散于发酵液中。通过比较静置与滚动发酵模式发现，滚动发酵更适合菌株丙酸发酵。

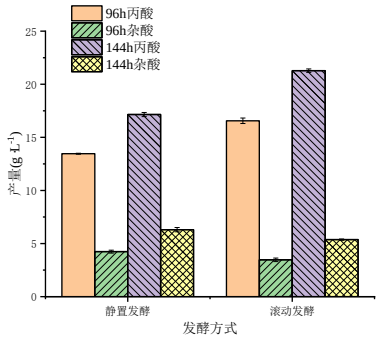

图 2 菌株发酵方式发酵验证结果

Fig.2 Fermentation verification results of different fermentation modes of strains

2.1.3 发酵培养基亚铁离子与维生素正交试验结果

正交试验结果如下表 6 所示，其中 A（硫酸亚铁）R 值最大为 0.573，表明该因素对实验结果影响最大，依 R 值不同对发酵生产丙酸的影响程度为 A＞C＞B。从表 6 中得出最优水平组合为 $A_1B_2C_1$；方差分析见表 7，显示硫酸亚铁为显著性因素（P<0.05），泛酸钙，生物素为不显著性因素（P>0.05），所以影响发酵生产丙酸的主次因素为 A＞C＞B，与表 6 结果分析一致。最优组合为 80 mg·L^{-1} 硫酸亚铁、0.8 mg·L^{-1} 泛酸钙、0.4 mg·L^{-1} 生物素。初

步得到詹氏丙酸杆菌 PA2 发酵丙酸培养基：30 g Ł$^{-1}$ 葡萄糖、35 g Ł$^{-1}$ 甘油、9 g Ł$^{-1}$ 蛋白胨、10 g Ł$^{-1}$ 酵母粉、80 mg Ł$^{-1}$ 硫酸亚铁、0.8 mg Ł$^{-1}$ 泛酸钙、0.4 mg Ł$^{-1}$ 生物素。

后续实验采用优化后培养基配方，发酵 144 h 经 HPLC 检测丙酸产量达到 24.15 g Ł$^{-1}$，较未添加亚铁离子、维生素发酵培养基发酵结果（21.28 g Ł$^{-1}$），产量提高 14.69%。这说明在丙酸代谢阶段，除碳氮源的核心作用外，金属离子与维生素补充菌株营养至关重要：还原性金属离子（如 Fe^{2+}）可能通过缓解胞内氧化胁迫改善菌体代谢环境[28]；而泛酸（维生素 B_5）作为辅酶 A 的前体物质，与生物素（羧化酶核心辅因子）共同参与 Wood-Werkman 循环的关键步骤，其外源添加可补偿诱变菌株的生长因子合成缺陷，进而强化草酰乙酸与乙酰-CoA 的前体供给[29]。Derman 等[20]在实验中添加额外的维生素（0.168 mg Ł$^{-1}$ 泛酸钙和 0.798 mg Ł$^{-1}$ 生物素）获得了更高的丙酸生成速率，比没有额外添加维生素的发酵中产酸速率提高 48.5%。该实验不仅产酸速率提升 13.47%，产量也有所提高（14.69%）。这说明添加亚铁离子、维生素对于丙酸发酵起到重要作用。

表 6 硫酸亚铁、泛酸钙及生物素正交试验结果与分析

Table 6 Results and analysis of the orthogonal test for ferrous sulfate, calcium pantothenate and biotin

试验号	A（硫酸亚铁）	B（泛酸钙）	C（生物素）	丙酸/(g Ł$^{-1}$)
1	1	1	1	24.12±0.21
2	1	2	2	23.78±0.06
3	1	3	3	23.39±0.21
4	2	1	2	23.08±0.20
5	2	2	3	23.39±0.19
6	2	3	1	23.10±0.08
7	3	1	3	22.87±0.23
8	3	2	1	23.46±0.21
9	3	3	2	23.40±0.02
K_1	23.763	23.357	23.560	
K_2	23.190	23.543	23.250	
K_3	23.243	23.297	23.310	
R	0.573	0.246	0.343	

表 7 硫酸亚铁、泛酸钙及生物素正交试验方差分析表

Table 7 Analysis of Variance (ANOVA) Table for the Orthogonal Test of Ferrous Sulfate, Calcium Pantothenate and Biotin

因素	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	1.771[a]	6	0.295	4.16	0.019
截距	9 853.372	1	9 853.272	140 081.847	0.000
A 硫酸亚铁	1.219	2	0.609	8.662	0.006
B 泛酸钙	0.201	2	0.100	1.426	0.281
C 生物素	0.352	2	0.176	2.500	0.127
误差	0.774	11	0.070		
总计	9 855.817	18			
修正后总计	2.545	17			

注：a: R^2=0.696（调整后 R^2=0.530）。

2.2 航天诱变

航天诱变是借助太空微重力环境与高能粒子辐射，进而诱发 DNA 双链断裂、染色体结构变异等复杂遗传改变。陈继红等[30]利用卫星搭载诱变刺糖多孢菌，通过分离、筛选和测定后得到效价为 147.51 μg·mL^{-1} 比出发菌株提高近 3 倍的多杀菌素高产菌株，可见航天诱变对于微生物诱变很有成效。但是，目前并未有关于丙酸杆菌的航天诱变相关研究报道，因此该研究对于詹氏丙酸杆菌进行诱变处理，旨在探寻新型诱变技术筛选高产丙酸杆菌。

2.2.1 航天诱变菌株筛选

以 PA2 菌株为出发菌株，通过航天诱变之后，采用 1.2.4 节所述方法进行平板筛选方法，在初筛中选择 95 株生长速度快，圈径比值大的菌株进行复筛，同时点种出发菌株 PA2 作为对照，在 144 h 时记录菌株圈径比，复筛圈径比结果如表 8。

表 8 航天诱变菌株圈径比

Table 8 Diameter ratio of aerospace-mutagenized strains

菌株名	圈径比	菌株名	圈径比	菌株名	圈径比
PA-2	2.29	FN88-32	2.52	FN66-16	2.24
FN88-1	2.67	FN88-33	2.33	FN66-17	3.19
FN88-2	2.67	FN88-34	2.32	FN66-18	2.67
FN88-3	2.50	FN88-35	2.40	FN66-19	2.33
FN88-4	2.67	FN88-36	3.06	FN66-20	2.50
FN88-5	2.93	FN88-37	2.22	FN66-21	2.41
FN88-6	2.50	FN66-38	2.22	FN66-22	2.50
FN88-7	2.50	FN88-39	2.40	FN66-23	3.33
FN88-8	2.67	FN88-40	2.33	FN66-24	2.24
FN88-9	3.67	FN88-41	2.52	FN66-25	2.27
FN88-10	2.43	FN88-42	2.33	FN66-26	2.80
FN88-11	2.83	FN88-43	2.50	FN66-27	3.60
FN88-12	2.67	FN88-44	2.22	FN66-28	2.33
FN88-13	2.58	FN88-45	2.40	FN66-29	3.17
FN88-14	2.40	FN88-46	2.33	FN66-30	3.67
FN88-15	2.67	FN88-47	2.41	FN66-31	2.33
FN88-16	3.24	FN88-48	2.24	FN66-32	2.50
FN88-17	3.19	FN66-1	2.67	FN66-33	2.67
FN88-18	3.06	FN66-2	3.67	FN66-34	2.67
FN88-19	3.33	FN66-3	2.50	FN66-35	2.33
FN88-20	2.50	FN66-4	2.67	FN66-36	2.33
FN88-21	3.41	FN66-5	2.93	FN66-37	2.67
FN88-22	2.50	FN66-6	3.50	FN66-38	2.50
FN88-23	3.33	FN66-7	2.50	FN66-39	2.65
FN88-24	2.24	FN66-8	2.67	FN66-40	2.67
FN8825	2.27	FN66-9	2.67	FN66-41	2.33
FN88-26	3.80	FN66-10	3.43	FN66-42	2.50
FN88-27	2.60	FN66-11	2.83	FN66-43	2.50
FN88-28	2.33	FN66-12	3.67	FN66-44	2.24
FN88-29	3.67	FN66-13	2.58	FN66-45	2.67
FN88-30	3.86	FN66-14	2.40	FN66-46	2.58
FN88-31	2.33	FN66-15	2.67	FN66-47	3.19

通过诱变后菌株与出发菌株的圈径比如表 8 所示，我们从中挑选出 17 株圈径比大于 PA2 菌株且生长旺盛的菌株，进行发酵筛选，所挑选菌株分别为：FN88-9、FN88-16、FN88-19、FN88-21、FN88-23、FN88-24、FN88-26、FN88-29、FN88-30、FN66-2、FN66-6、FN66-10、FN66-12、FN66-23、FN66-27、FN66-29、FN66-30。

2.2.2 航天诱变菌株发酵验证结果

经复筛获得的 17 株菌株采用 1.2.4.4 所述液体发酵方法进行发酵测试，通过丙酸产量及其占总有机酸比例双重指标筛选优良菌株。如图 3 所示，所有突变株丙酸产量均显著优于出发菌株 PA2，正向筛选率达到 100%，其中 15 株菌株的丙酸/总酸比值较 PA2 提升，正向筛选率达 88.24%，表明该平板透明圈筛选方法具有较好的适用性。

突变株 FN88-21、FN88-30 和 FN66-30 丙酸产量增加均超过 7.06%。其中 FN88-30 产量达 26.03 g Ł$^{-1}$，较 PA2 丙酸产量（24.21 g Ł$^{-1}$）提升 7.52%，为最高产酸菌株。经独立样本 t 检验分析，两组菌株的产量差异具有极显著性（P＜0.01），表明 FN88-30 的产酸能力提升具有统计学意义，并非随机波动。实验结果表明，航天诱变使菌株发酵丙酸有所提高，为获得高产丙酸菌株，考虑对突变株 FN88-30 进一步化学诱变。

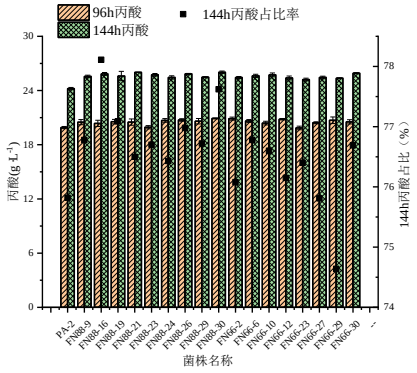

图 3 航天诱变菌株发酵验证

Fig.3 Fermentation verification of aerospace-mutagenized strains

2.3 EMS 化学诱变

该研究使用甲基磺酸乙酯（EMS）进行化学诱变，通过菌株基因组复制过程中 DNA 碱基突变或染色体结构改变，获得大量突变菌体，因此该诱变方法被广泛应用于微生物育种中。Hoffmam 等[17]以 EMS 诱变产酸丙酸杆菌结合耐受丙酸试验，得到突变菌株 M8，丙酸产量达到 31.83 g Ł$^{-1}$，比出发菌株产量提高 23.85%。该研究选择对航天诱变高产丙酸 FN88-30 菌株进行叠加 EMS 化学诱变处理，以期获得高产丙酸菌株。

2.3.1 航天诱变高产丙酸 FN88-30 菌株生长曲线的绘制

按照 1.2.5.1 的方法培养 FN88-30 菌株，并测定生长曲线，结果见图 4。由图 4 可以看出，0~12 h 处于延滞期，12~32 h 处于对数生长期，生物量骤增，菌体繁殖迅速，32 h 后丙酸菌进入平稳期，因此选用培养至对数生长中后期，即 25 h 的丙酸菌体进行 EMS 诱变。

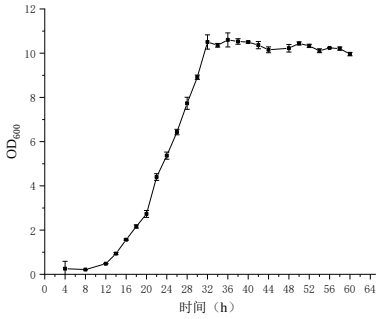

图 4 丙酸杆菌生长曲线

Fig.4 Growth Curve of Propionibacterium

2.3.2 EMS 化学诱变致死曲线的绘制

对詹氏丙酸杆菌 FN88-30 进行 EMS 诱变处理，致死率曲线如图 5 所示 FN88-30 致死率随着诱变时间延长而不断上升，在 0~30 min 的处理时间内致死率快速攀升，30~70 min 的处理时间内致死率大约维持在 95%左右，100 min 的处理后达 100%致死率。

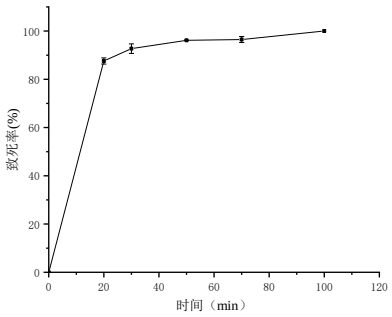

图 5 化学诱变致死率曲线

Fig.5 Lethality Curve of Chemical Mutagenesis

2.3.3 叠加化学诱变菌株复筛结果

以 FN88-30 菌株为出发菌株，通过化学诱变之后，发现在 30 min 以上致死率高于 90%以上，采用 1.2.4.3 节所述方法进行平板筛选实验，选取 30、50 与 70 min 在这三个时间点诱变后菌株涂布于基本平板上初筛，选取 64 株生长速度快的进行复筛，同时点种出发菌株 FN88-30 作为对照，在 144 h 时记录菌株圈径比，结果如表 9。其中 DJ01 组诱变时间为 30 min，DJ02 组诱变时间为 70 min，DJ03、DJ04 组诱变时间为 50 min。

表 9 叠加诱变菌株圈径比

Table 9 Diameter ratio of strains with superimposed mutagenesis

菌株名	圈径比	菌株名	圈径比	菌株名	圈径比
FN88-30	3.86	DJ02-6	4.06	DJ03-12	4.82
DJ01-1	3.59	DJ02-7	3.68	DJ03-13	4.82
DJ01-2	2.50	DJ02-8	3.68	DJ03-14	3.68
DJ01-3	3.75	DJ02-9	3.29	DJ03-15	3.33
DJ01-4	3.09	DJ02-10	3.75	DJ03-16	3.44
DJ01-5	3.14	DJ02-11	3.93	DJ04-1	3.44
DJ01-6	3.15	DJ02-12	4.00	DJ04-2	3.67
DJ01-7	3.00	DJ02-13	4.06	DJ04-3	3.13
DJ01-8	3.00	DJ02-14	3.43	DJ04-4	3.33
DJ01-9	3.33	DJ02-15	3.13	DJ04-5	3.59
DJ01-10	3.11	DJ02-16	4.25	DJ04-6	3.75
DJ01-11	4.17	DJ03-1	3.75	DJ04-7	3.59
DJ01-12	3.75	DJ03-2	4.17	DJ04-8	3.91
DJ01-13	4.00	DJ03-3	3.68	DJ04-9	3.91
DJ01-14	3.01	DJ03-4	3.91	DJ04-10	4.00
DJ01-15	4.50	DJ03-5	4.33	DJ04-11	4.46
DJ01-16	3.80	DJ03-6	4.06	DJ04-12	3.68
DJ02-1	3.11	DJ03-7	4.06	DJ04-13	3.83
DJ02-2	3.68	DJ03-8	4.17	DJ04-14	4.17
DJ02-3	3.91	DJ03-9	3.75	DJ04-15	3.83
DJ02-4	3.24	DJ03-10	4.82	DJ04-16	4.82
DJ02-5	3.68	DJ03-11	3.91	——	——

通过诱变后菌株与出发菌株的圈径比如表 9 所示，从中挑选出 19 株圈径比大于 FN88-30 菌株且生长旺盛的菌株，进行下一步血清瓶滚动发酵筛选，根据圈径比大小所挑选菌株分别为：DJ01-11、DJ01-13、DJ01-15、DJ02-6、DJ02-12、DJ02-13、DJ02-16、DJ03-2、DJ03-5、DJ03-6、DJ03-7、DJ03-8、DJ03-10、DJ03-12、DJ03-13、DJ04-10、DJ04-11、DJ04-14、DJ04-16。

2.3.4 EMS 化学诱变菌株发酵验证结果

经复筛选获得的 19 株突变菌株采用 1.2.4.4 方法进行发酵丙酸实验，通过丙酸产量及其占总有机酸比例双重指标筛选优良菌株。结果如图 6 所示，144 h 发酵终点检测显示：所有突变株丙酸产量均显著优于出发菌株 FN88-30，正向筛选率 100%，其中 15 株菌株的丙酸/总酸比值较菌株 FN88-30 有所提升，表明该平板透明圈筛选方法具有较好的适用性。突变菌株 DJ03-2、DJ03-7、DJ04-16 丙酸产量提高均在 20%以上，其中 DJ04-16 产量达 31.78 g Ł$^{-1}$，比出发菌株 FN88-30 丙酸产量提升 22.11%，为最高产酸菌株。

目前代谢工程技术已应用于詹氏丙酸杆菌中，Liu 等[31]通过构建穿梭载体 pZGX04 过表达来自肺炎克雷伯菌的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因（*ppc*），并敲除乳酸脱氢酶基因（*ldh*），所得菌株在 3 L 罐补料分批发酵中达到最大生产力丙酸 34.93 g Ł$^{-1}$，比亲本菌株 26.95 g Ł$^{-1}$ 提高了 29.61%。本研究结果表明，PA2 经航天诱变叠加化学诱变得到突变菌株 DJ04-16，丙酸产量于血清瓶滚动发酵 144 h 达到 31.78 g Ł$^{-1}$，比原始菌株 PA2 丙酸产量提升 31.27%。

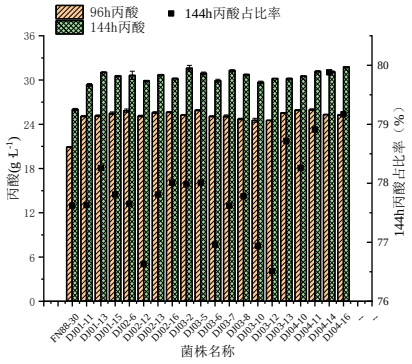

图 6 叠加化学诱变菌株发酵验证

Fig.6 Fermentation verification of strains with superimposed chemical mutagenesis

经对菌株的各项性能综合比较，最终确定筛选出了三株高产丙酸菌株 DJ03-2、DJ03-7、DJ04-16 进行连续传代培养以及遗传稳定性检测。

2.4 遗传稳定性检测结果

经叠加诱变筛选获得的三株高产丙酸突变株 DJ03-2、DJ03-7 和 DJ04-16，在连续十代传代培养过程中的遗传稳定性实验结果如图 7 所示，滚动发酵实验结果表明菌株 DJ03-7、DJ04-16 各代间差异不显著（P＞0.05），而菌株 DJ03-2 则表现出丙酸产量随传代次数增加呈梯度下降趋势，其各代间差异极显著（P＜0.01）。高产菌株 DJ04-16 连续十代培养期间丙酸产量始终稳定在 31.78 g Ł$^{-1}$ 的区间，各代次间无显著差异。上述数据证实，通过诱变育种获得的 DJ04-16 菌株不仅显著增强了丙酸合成能力，同时具备优良的遗传稳定性，为工业化应用提供了可靠的菌种基础。

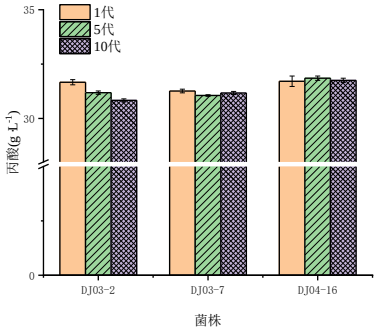

图 7 遗传稳定性验证

Fig.7 Verification of genetic stability

2.5 最优发酵培养基正交试验结果

为进一步提高菌株发酵丙酸产量，本研究选取硫酸镁、磷酸氢二钾、硫酸二氢钾以及玉米浆作为调控因素，进行四因素三水平正交实验，结果如表 10，四种因素对发酵生产丙酸的影响程度为因素 C＞D＞A＞B。从表 10 中得出最优水平组合为 $A_3B_2C_1D_2$；方差分析见表 11，结果显示仅有 B（磷酸氢二钾）为不显著因素（P>0.05），另外三种因素均为显著性因素（P<0.05），影响发酵生产丙酸的主次因素为 C＞D＞A＞B，与表 10 结果分析一致。最优发酵组合为 160 mg Ł$^{-1}$ 硫酸镁、2 g Ł$^{-1}$ 磷酸氢二钾、1 g Ł$^{-1}$ 磷酸二氢钾以及 8 g Ł$^{-1}$ 玉米浆。因此确定菌株 DJ04-16 最佳发酵配方：30 g Ł$^{-1}$ 葡萄糖、35 g Ł$^{-1}$ 甘油、9 g Ł$^{-1}$ 蛋白胨、10 g Ł$^{-1}$ 酵母粉、80 mg Ł$^{-1}$ 硫酸亚铁、0.8 mg Ł$^{-1}$ 泛酸钙、0.4 mg Ł$^{-1}$ 生物素、160 mg Ł$^{-1}$ 硫酸镁、2 g Ł$^{-1}$ 磷酸氢二钾、1 g Ł$^{-1}$ 磷酸二氢钾以及 8 g Ł$^{-1}$ 玉米浆。

表 10 最优发酵培养基正交试验结果与分析

Table 10 Results and analysis of the orthogonal test for the optimal fermentation medium

试验号	A（硫酸镁）	B（磷酸氢二钾）	C（磷酸二氢钾）	D（玉米浆）	丙酸/(g Ł$^{-1}$)
1	1	1	1	1	31.89±0.01
2	1	2	2	2	32.53±0.02
3	1	3	3	3	31.61±0.61
4	2	1	2	3	32.11±0.03
5	2	2	3	1	30.62±0.04
6	2	3	1	2	32.36±0.03
7	3	1	3	2	32.07±0.10
8	3	2	1	3	32.95±0.15
9	3	3	2	1	32.00±0.12
K_1	32.010	32.023	32.400	31.503	
K_2	31.697	32.033	32.213	32.320	
K_3	32.340	31.990	31.433	32.223	
R	0.643	0.043	0.967	0.817	

表 11 最优发酵培养基正交试验方差分析表

Table 11 Analysis of Variance (ANOVA) Table for the Orthogonal Test of the Optimal Fermentation Medium

因素	离差平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	6.772[a]	8	0.847	17.768	0.000
截距	18 447.363	1	18 447.363	387 188.127	0.000
A 硫酸镁	1.229	2	0.615	25.032	0.002
B 磷酸氢二钾	0.007	2	0.003	33.072	0.934
C 磷酸二氢钾	3.151	2	1.576	0.069	0.000
D 玉米浆	2.385	2	1.193	12.900	0.000
误差	0.429	9	0.048		
总计	18 454.564	18			
修正后总计	7.201	17			

注：a: R^2=0.940（调整后 R^2=0.888）。

出发菌株 PA2 与突变株 DJ04-16 分别以上述最佳发酵配方进行丙酸发酵实验，结果如表 12 所示，最终突变株 DJ04-16 于血清瓶中滚动发酵 144 h 丙酸产量达到 33.75 g Ł$^{-1}$，较出发菌株产量提高，一方面证实了诱变方法的有效性，另一方面展示出突变株 DJ04-16 已达到较高发酵水平。该产量较其他丙酸生产菌株具有明显优势：如 Liu 等[32]采用产酸丙酸杆菌 ATCC 4965 在 5 L 发酵罐中发酵 192 h 仅获得 29.20 g Ł$^{-1}$。发酵水平的提升可归因于，硫酸镁可激活 EMP 代谢途径多个酶，特别是 ATP 依赖的代谢酶，为丙酸代谢途径提供必要辅因子；而磷酸氢二钾与磷酸二氢钾构成磷酸盐缓冲体系，在维持胞内 pH 值稳态的同时，通过调节磷代谢影响糖酵解途径通量；以及玉米浆作为复合营养基质，富含氨基酸、多肽及微量元素，可有效促进丙酸菌生长并激活丙酸合成关键酶系[20]，因此发酵产量得以再次提升。

表 12 不同菌株发酵丙酸结果

Table 12 Propionic Acid Production by Different Strains (g Ł$^{-1}$)

菌株	培养基	丙酸	琥珀酸	乳酸
PA2	1	24.21±0.13	1.46±0.12	3.93±0.08
FN88-30	1	26.03±0.13	1.63±0.08	3.80±0.06
DJ04-16	1	31.78±0.03	1.98±0.04	3.81±0.21
PA2	2	25.70±0.14	1.73±0.10	6.11±0.14
DJ04-16	2	33.75±0.06	1.49±0.11	6.79±0.06

注：培养基 1 为发酵验证培养基，培养基 2 为最优发酵培养基。

3 结论

该研究首先优化了詹氏丙酸杆菌 PA2 发酵的初始培养基碳氮源比例，并比较了静态发酵与滚动发酵的产酸优劣。在此基础上，进一步优化了硫酸亚铁及维生素（泛酸钙、生物素）的添加量，获得了后续诱变发酵验证条件。随后，以 PA2 为出发菌株，经航天诱变筛选叠加甲基磺酸乙酯化学诱变，并结合高效筛选，成功获得一株高产且遗传稳定的突变株 DJ04-16。最后，通过进一步优化发酵培养基组分，确立了最优发酵配方。在此发酵培养基中，突变菌株 DJ04-16 产丙酸能力进一步提升至 33.75 g Ł$^{-1}$。综上，该研究通过航天诱变与化学诱变技术相结合，并辅以高效筛选策略，成功实现了詹氏丙酸杆菌的高产丙酸菌株选育，为产丙酸微生物的遗传改造提供了新思路，并为微生物发酵法工业化生产丙酸奠定了重要的理论与应用基础。

参考文献

[1] ISMAIL E, MOUSAVI A K, BAGHER M S H, et al. Current advances in biological production of propionic acid [J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(5): 635-645.

[2] RANAEI V, PILEVAR Z, KHANEGHAH M A, et al. Propionic acid: method of production, current state and perspectives [J]. Food Technology and Biotechnology, 2020, 58(2): 115-127.

[3] MERVE A, ZEYNEP C. Bioaugmentation as a strategy for tailor-made volatile fatty acid production [J]. Journal of Environmental Management, 2021, 295: 113093.

[4] TAVARES A L, MEIRA O D F C A, SILVA D L F, et al. Biosynthesis of propionic acid from whey permeate and corn steep liquor by *Propionibacterium freudenreichii subsp* ATCC 6207 and partial purification using ion exchange cryogels [J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2024, 42(2): 1-13.

[5] CRISTINA K C, CARVALHO A C D, LUTZ J I. Fermentation strategies to improve propionic acid production with *propionibacterium* ssp: a review [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 42(8): 21-23.

[6] KAMIL P, EDYTA L, ELŻBIETA H, et al. Use of apple pomace, glycerine, and potato wastewater for the production of propionic acid and vitamin B12 [J]. Applied Mmicrobiology and Biotechnology, 2022, 106(17): 5433-5448.

[7] AMMAR, M. E, PHILIPPIDIS, GEORGE P. Fermentative production of propionic acid: prospects and limitations of microorganisms and substrates [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(16-17): 1-15.

[8] WOOD H G, Werkman C H. Mechanism of glucose dissimilation by the propionic acid bacteria [J]. Biochemical Journal, 1936, 30(4): 618-623.

[9] LIU L, ZHU Y F, LI J H, et al. Microbial production of propionic acid from propionibacteria: Current state, challenges and perspectives [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2012, 32(4): 374-381.

[10] 诸葛鑫.代谢工程改造詹氏丙酸杆菌和过程优化提高丙酸产量[D].无锡:江南大学,2014.

[11] ZHUGE X, LIU L, HYUN-DONG S, et al. Development of a *Propionibacterium-Escherichia coli* shuttle vector for metabolic engineering of *Propionibacterium jensenii*, an efficient producer of propionic acid [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(15): 4595-4602.

[12] ZHU Z R, CHEN W Q, CAO L, et al. ARTP/NTG Compound mutagenesis improved the spinosad production and the insecticidal virulence of saccharopolyspora spinosa [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(22): 12308.

[13] GUO S A, SUN Y, WU T, et al. Metabolic profiling and growth characteristics of a spaceflight-induced mutant of *Lacticaseibacillus rhamnosus:* Unveiling enhanced carbohydrate and amino acid metabolism for improved probiotic potential [J]. Food Bioscience, 2024, 58: 103758.

[14] 王清清,张孟雨,江雨静,等.产 γ-氨基丁酸航天育种乳酸菌的筛选与发酵剂的制备[J].食品与发酵工业,2024,50(16):93-100.

[15] 张孟雨,李尧,彭嘉屹,等. 高产 EPS 乳酸片球菌的航天育种及其 EPS 性能研究[J].食品工业科技,2023,44(17):158-167.

[16] 杨素晶,蹇华丽,魏锋,等.航天诱变菌株 JH-R23 产虾青素培养条件优化[J].食品科技,2021,46(11):1-8.

[17] BRUNA Z H, BERGMANN L S, RODRIGO E M D, et al. Evolutionary engineering and chemical mutagenesis of *Propionibacterium* for improved propionic acid production from sugarcane-derived saccharides [J]. Process Biochemistry, 2023, 130: 584-594.

[18] 王海霞,陈园,王超,等.组合抗生素抗性选育多杀菌素高产菌株[J].粮油食品科技,2017,25(4):70-75.

[19] 张昳,扶教龙,张瀚,等.多杀菌素生产菌诱变选育的研究进展[J].中国抗生素杂志,2021,46(10):910-916.

[20] CEM Ü D, ATACAN E, FILIZ A, et al. Kinetics of fermentative production of propionic acid on a range of carbon and nitrogen sources using *Acidipropionibacterium acidipropionici* [J]. Food Bioscience, 2024, 57: 103507.

[21] TOMÁS M N, FREITAS C A M O D, HERNÁNDEZ L D T, et al. Biosynthesis of propionic acid using whey and calcium carbonate by mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei* [J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2021, 38(4): 811-822.

[22] 刘博雅.产柠檬酸黑曲霉耐热菌株的构建及其发酵研究[D].天津:天津科技大学,2021

[23] AMEERAH T, ADIBAH Y, MD M S, et al. Improvement and screening of astaxanthin producing mutants of newly isolated *Coelastrum* sp. using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis technique [J]. Biotechnology Reports, 2021, 32: e00673.

[24] 杨海朋,王自强,王云山,等.丙酸发酵过程中四种有机酸快速、简便的分析方法[J].中国酿造,2016,35(5):107-110.

[25] 夏青,孙泽鹏,柳梅梅,等.浒苔发酵工艺优化及青蛤喂养效果评价[J].海洋科学,2022,46(10):68-77.

[26] TAREK D, MRIDUL J, RAJNI K H. High cell density sequential batch fermentation for enhanced propionic acid production from glucose and glycerol/glucose mixture using *Acidipropionibacterium acidipropionici* [J]. Microbial Cell Factories, 2024, 23(1): 91-91.

[27] WANG P, JIAO Y J, LIU S X. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(12): 1811-1815.

[28] SOUMYA K M, PRATYASHA P, KRISHAN S, et al. Effective usage of biochar and microorganisms for the removal of heavy metal ions and pesticides [J]. Molecules, 2023, 28(2): 719.

[29] DAHIYA S, LAKSHMINARAYANAN S, MOHAN V S. Steering acidogenesis towards selective propionic acid production using co-factors and evaluating environmental sustainability [J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 379: 122135.

[30] 陈继红,张利平,郭立格,等.多杀菌素产生菌株航天育种效果研究[J].安徽农业科学,2008,36(12):4951-4953.

[31] LIU L, GUAN N Z, ZHUGE X, et al. Pathway engineering of *Propionibacterium jensenii* for improved production of propionic acid [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 19963.

[32] LIU Y, ZHANG Y G, ZHANG R B, et al. Glycerol/glucose co-fermentation: One more proficient process to produce propionic acid by *Propionibacterium acidipropionici* [J]. Current Microbiology, 2011, 62(1): 152-158.