

1,3-丙二醇发酵液的絮凝处理及絮凝细胞的再利用*

鲁诗锋 张代佳 修志龙

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系,大连,116024)

摘要 考察了12种絮凝剂或沉淀剂对1,3-丙二醇发酵液预处理的效果,并探索了壳聚糖絮凝 *Klebsiella pneumoniae* 细胞再利用的可行性。以菌体和蛋白质去除率为指标,从12种絮凝剂中筛选出壳聚糖为有效的絮凝剂,并确定了适宜的工艺条件为:温度37℃,搅拌转速300 r/min, pH 5.0,壳聚糖分子质量4万u,浓度0.5 g/L,搅拌20 min,静置15 min。发酵液的菌体和蛋白质去除率分别为99.97%和91.56%。絮凝细胞的发酵实验表明,絮凝的 *K. pneumoniae* 可再次利用,菌体浓度高达11.4(OD值)。

关键词 絮凝,去除率,壳聚糖,1,3-丙二醇,发酵液

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol,以下简称1,3-PD)是一种有机合成的重要中间体,可应用于油墨、涂料、抗冻剂、保护剂以及医药等行业,主要用于合成新型聚酯-聚对苯二甲酸丙二酯(PTT)。由于PTT具有易染色、弹性好、生物可降性等特点^[1],有广阔的应用前景,是目前合成纤维新品种开发的焦点。1,3-PD的生产方法主要有化学法和微生物发酵法,但从安全、环保和可持续发展的角度看,微生物转化法的研究更引人注目^[2]。

醇沉^[3]、反应萃取^[4]、分子筛吸附^[5]、阳离子交换树脂吸附^[6]、沸石膜^[7]和电渗析除盐^[8]等方法均可或有利于从微生物发酵液中提取或分离1,3-PD。许多专利和文献的研究工作是在模拟发酵液中的,但实际发酵液除了菌体以外,还含有乙醇、乙酸、2,3-丁二醇、甘油、有机和无机酸(盐)、少量蛋白质、核酸和多糖等。工业上大多首先采用发酵液经高速离心或膜(如纤维膜)过滤分离菌体、可溶性蛋白质、核酸和多糖等大分子物质,然后减压蒸馏(或精馏)分离1,3-PD。从发酵液中分离1,3-PD的第1步是菌体细胞及其碎片、可溶性杂蛋白和其他胶状物的分离,否则将会影响后续的1,3-PD提取。用高速离心法分离菌体,尽管能够取得预期的效果,但设备投入成本高、能耗大,导致1,3-PD生产成本过高。采用膜技术存在膜污染严重、清洗困难、成本高等缺点。

絮凝技术由于具有促使固形颗粒结合成团,容易沉降、过滤、离心、提高固液分离速度和液体澄清度等一系列特点而成为分离研究的热点^[9]。絮凝技术在

甘油发酵液、透明质酸发酵液、赖氨酸发酵液等中的应用已有很多成功的报道,在1,3-PD发酵液中的应用也有报道。李凡锋等^[10]发现,天然絮凝剂Ⅱ型B组分处理1,3-PD发酵液可以加快电渗析脱盐速度。Jian Hao等人^[11]使用壳聚糖和聚丙烯酰胺2种絮凝剂耦合对1,3-PD发酵液进行絮凝处理,能使发酵液的蛋白质去除率大于99%。但以上研究均未考察絮凝剂的分子质量对絮凝效果的影响以及絮凝细胞能否再次利用等问题。另外,天然絮凝剂Ⅱ型B组分成本过高,不利于工业的应用。

文中对12种絮凝剂进行初步筛选,以菌体和蛋白质去除率为指标,考察它们对1,3-PD发酵液的絮凝效果,并确定絮凝剂的适宜工艺条件。在此基础上通过絮凝细胞的发酵实验,验证絮凝后的 *K. pneumoniae* 能否再次利用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Klebsiella pneumoniae 购自德国菌种和细胞收集中心(DSMZ),种子和发酵培养基参考文献[12]。1,3-PD的发酵液是以皂化甘油(质量分数,95%)为底物发酵所得。天然澄清剂、壳聚糖(脱乙酰度大于85%,分子质量4~95万u)、聚丙烯酰胺(阴、阳、非离子型)、明矾、PEG、海藻酸钠等均是工业级产品,NaH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄、CaCl₂、其它药品和试剂均为AR级。

1.2 实验方法

1.2.1 絮凝实验

絮凝剂配制方法:天然澄清剂A组分用去离子水配制。天然澄清剂B组分和壳聚糖均用体积分数为1%的醋酸溶液配制,搅拌至溶解,溶胀24 h即可。

第一作者:硕士研究生。

* 国家自然科学基金(20176005),科技部“十五”科技攻关计划(2004BA713B0603)、“973”计划项目(2003CB716000)

收稿日期:2006-05-09,改回日期:2006-07-19

其他的絮凝剂均是以蒸馏水为溶剂。絮凝剂浓度均是 10 g/L。

将发酵液分成 3 份,用 HCl 和 NaOH 溶液调节 1,3-PD 发酵液分别为酸性(pH=5.0)、中性(pH=7.0)和碱性(pH=9.0)。在磁力搅拌下,向 40 mL 发酵液中逐滴加入 2 mL 絮凝剂(空白加蒸馏水),搅拌 20 min,静置 30 min 后,取上清液,测定菌体和蛋白质浓度。

1.2.2 絮凝细胞再利用实验

甘油初始质量浓度为 2%,接菌量为 1% 体积分数,在 37℃、150 r/min 的摇床上厌氧条件培养种子 10 h。在 5 L 自控发酵罐(BIOTECH-5BG 发酵罐,上海保兴生物工程设备有限公司)中进行发酵培养,装液量为 3 L,接种量为装液量的 10%,甘油初始质量浓度为 4%,温度 37℃,搅拌转速 300 r/min,发酵过程中通入氮气维持厌氧条件,通气量为 0.005 vvm。用 5 mol/L NaOH 控制 pH 为 7.0。

当菌体浓度开始下降时,停止发酵实验,调节到最佳的絮凝条件,加入絮凝剂,搅拌 20 min,静置 15 min 后,虹吸出上清液。向其中加入发酵培养基,再次进行发酵实验。当菌体浓度再次下降时,重复以上实验。

1.2.3 分析方法

甘油浓度用高碘酸氧化法^[13]测定;蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法^[14]测定;菌体浓度是以蒸馏水为空白在波长 650 nm 下的光密度 OD 值表示;1,3-PD 浓度用气相色谱法检测(GC-14B 气相色谱仪,日本岛津公司)。色谱柱(2 m×Φ5 mm)填料为 Chrom-sorb101,柱温 145℃,汽化室与检测器的温度均为 250℃,载气为 N₂ 气,流速 40 mL/min,进样量为 1μL,采用外标法定量。菌体去除率和蛋白质去除率的价值越大,说明絮凝效果越好。

$$\text{菌体去除率(RC)/\%} = \frac{(OD_{\text{絮凝前}} - OD_{\text{絮凝后}})}{OD_{\text{絮凝前}}} \times 100$$

$$\text{蛋白去除率(RP)/\%} = \frac{(M_{\text{絮凝前}} - M_{\text{絮凝后}})}{M_{\text{絮凝前}}} \times 100$$

$$M = \text{蛋白质的浓度} \times \text{体积}$$

2 实验结果和讨论

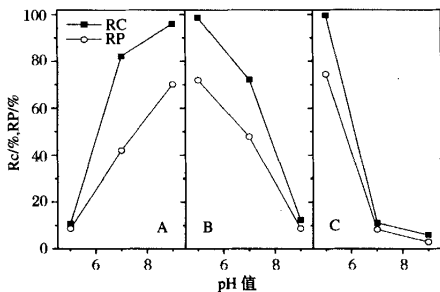
2.1 絮凝实验

2.1.1 絮凝剂的初选

初步实验结果表明,聚丙烯酰胺(阴、阳、非离子型)、明矾、PEG、海藻酸钠、天然絮凝剂 A 组分、NaH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄ 等对 1,3-PD 发酵液没有明显

的絮凝效果。

CaCl₂ 对 1,3-PD 发酵液絮凝效果如图 1A 所示。从图中可以看出, CaCl₂ 在碱性条件下会絮凝效果较好。但是 CaCl₂ 在碱性条件下生成微溶的 Ca(OH)₂ 导致上清液混浊。絮凝的原因可能是由于 Ca²⁺ 可以促进带负电荷的菌体和蛋白质电中和,压缩了溶液中胶体的双电层,降低了絮凝颗粒的电位 ζ^[15],或者通过在大分子链上架桥形成沉淀,从而有利于絮凝物的形成;另外在碱性条件下,部分菌体死亡和蛋白质变性也有助于絮凝。具体的絮凝机理还有待于进一步的研究。天然絮凝剂 B 组分对 1,3-PD 发酵液絮凝效果如图 1B 所示。从图 1B 可知,在酸性条件下有很好的絮凝效果,这与文献[10]的结果相同。



A—CaCl₂, B—天然絮凝剂 B 组分, C—壳聚糖

图 1 絮凝剂对发酵液的絮凝效果的影响

CaCl₂ 虽然在碱性条件下有较好的絮凝效果,其中的 Ca²⁺ 可与发酵液含量少的琥珀酸(盐)和柠檬酸(盐)形成沉淀,但不能与含量较多的乙酸(盐)和乳酸(盐)形成沉淀。由于 1,3-PD 发酵液中有大量的有机酸盐,在后续减压蒸馏后期会出现盐结晶、黑色类焦物^[10]和粘性物质,阻碍蒸发并降低 1,3-PD 的收率。因此 CaCl₂ 的加入增加了后续分离的难度。另外,天然絮凝剂 B 组分成本较高。综合考虑价位、可行性、絮凝效果等方面的因素,选用壳聚糖作为 1,3-PD 发酵液的絮凝剂。

2.1.2 絮凝剂的最佳工艺的确定

2.1.2.1 pH 值对絮凝效果的影响

pH 值对絮凝效果的影响如图 2A,从图 2 中可以看出,壳聚糖在 pH 4.5 时絮凝效果好,菌体和蛋白质去除率都很高,分别为 99.58% 和 92.56%。由于发酵液中的有机酸(盐)具有缓冲作用,低 pH 值的调节需要加入大量的酸。考虑到酸性太强对絮凝细胞的致死作用以及后续分离设备要求较高等问题,选择

pH=5 为壳聚糖对 1,3-PD 发酵液絮凝的条件。

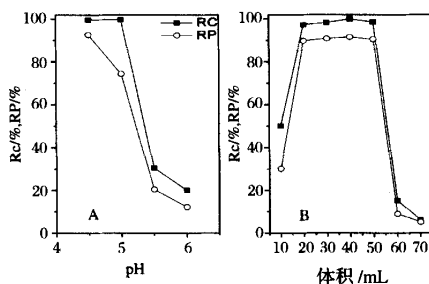


图2 pH值(A)和壳聚糖用量(B)对絮凝效果的影响

2.1.2.2 壳聚糖用量对絮凝效果的影响

壳聚糖用量对絮凝效果的影响结果如图2B。从图2B可知,当发酵液的体积小于20 mL或大于50 mL时,对发酵液的絮凝效果不明显。当发酵液的体积是40 mL时,即絮凝剂浓度为0.5 g/L时,对发酵液的絮凝效果较好,菌体和蛋白质去除率分别为99.97%和91.56%。

2.1.2.3 壳聚糖分子质量对絮凝效果的影响

图3A是壳聚糖分子质量对絮凝效果的影响,从中可见,壳聚糖的分子质量的大小对发酵液的絮凝效果影响较小,一般壳聚糖分子质量越大,粘度相对较大。考虑到在絮凝细胞再利用实验中,粘度大不利于流加,故选择壳聚糖分子质量为4万u。

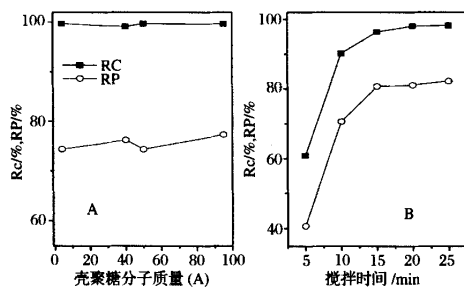


图3 壳聚糖分子质量(A)和搅拌时间(B)对絮凝效果的影响

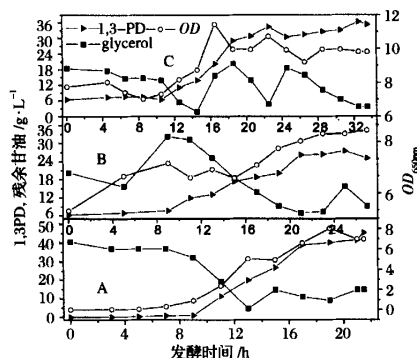
2.1.2.4 搅拌时间对絮凝效果的影响

絮凝预处理发酵液时,选择与发酵时相同的温度和搅拌速度,可以简化流程。絮凝试验在发酵罐中进行,采用以上确定的条件。搅拌时间对絮凝效果的影响如图3B。搅拌时间在15 min以内,絮凝剂在发酵液中的分散不均匀,絮凝的小颗粒不能有效地通过架桥或电中和作用形成大的絮团,絮凝效果不明显。搅拌时间在20 min以后,絮凝剂在发酵液中的分散比较均匀,对发酵液的絮凝效果比较好。为了减少长时

间pH值过低对菌体生长的抑制甚至致死作用,故选择搅拌时间是20 min,静置15 min。

通过以上实验,得到絮凝的最佳工艺条件:温度为37℃,搅拌转速为300 r/min,pH 5,壳聚糖分子质量为4万u,絮凝剂浓度为0.5 g/L,搅拌时间是20 min,静置15 min。

2.2 絮凝细胞的再利用实验



A-原始菌种,B-第1次絮凝物中的细胞,

C-第2次絮凝物中的细胞

图4 三种 *K. pneumoniae* 批式流加厌氧发酵的结果

图4A是由原始 *K. pneumoniae* 批式流加厌氧发酵的结果。从中发现,菌体在对数生长期时,1,3-PD很快地积累。当发酵到20 h左右时,菌体生长达到衰减期,停止发酵实验。由于发酵液中甘油浓度维持在2%时,有利于菌体生长和1,3-PD积累^[16]。为了使絮凝的 *K. pneumoniae* 能快速地生长,故选择加入的发酵培养基的甘油浓度为2%。絮凝沉淀中的 *K. pneumoniae* 发酵实验结果见图4B。从图4可见,对 *K. pneumoniae* 生长产生抑制作用的乙醇、3-羟基丙醛、乙酸、1,3-PD等物质^[17]的减少,有利于菌体的再次生长。在发酵7 h左右流加甘油过多,导致发酵液中残留的甘油浓度变化较大,对菌体的生长不利,造成9~17 h菌体浓度几乎没有变化。从图4C的第2次絮凝沉淀中 *K. pneumoniae* 发酵实验的结果可以看出,在发酵7 h时菌体浓度达到较低值。一方面原因是连续2次的絮凝沉淀中的大量蛋白质、核酸和糖类对菌体的生长有不利的影响;另一方面是发酵液中残留的对菌体生长抑制作用的物质的积累^[18],还有反复调节pH值也造成一部分不适应环境的菌体死亡。在发酵22.5 h时,菌体浓度达到最高(OD值为11.4),证实了絮凝沉淀中的细胞可再次发酵生产1,3-PD。这样可以减少发酵实验的种子培养基配制、种子培养及接种等环节,节约生产时间和

成本。

3 结 论

从12种絮凝剂中筛选出壳聚糖为1,3-PD的发酵液的絮凝剂,并确定了最佳工艺条件为:温度为37℃,搅拌速度为300 r/min, pH=5,壳聚糖分子质量为4万u,絮凝剂浓度为0.5 g/L,搅拌时间是20 min,静置15 min。通过絮凝细胞的发酵实验,证实了絮凝沉淀中*K. pneumoniae*仍可继续发酵生产1,3-PD。本试验对1,3-PD的工业化生产具有很强的参考价值。

参 考 文 献

- 1 Zeng A P, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends[J]. Adv Biochem Engin/Biotechnol, 2002, 74:239~259
- 2 Biebl H. Glycerol fermentation of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum*, Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 35:701~705
- 3 修志龙,张代佳,高素军,等.微生物发酵液中提取分离1,3-丙二醇的方法[P]. CN,031335845.2003-06
- 4 Janusz J M. Evaluation of liquid extraction potentials for downstream separation of 1, 3-propanediol [J]. Biotech Tech, 1999,13(1): 127~130
- 5 Norton T, Corbin D R. Process to separate 1,3-propanediol or glycerol, or mixture thereof from a biological mixture[P]. WO,01/25178.2001-04-12
- 6 Roturier Jean-Michel, Fouache Catherine, Berghmans Elie. Process for purification of 1,3-propanediol from a fermentation medium [P]. U. S., 6428992. 2002-08-06
- 7 Hilaly A K, Binder T P. Method of recovering 1,3-propanediol from a fermentation broth [P]. U. S. Patent 6479716
- 8 龚燕,唐宇,王晓琳.电渗析用于1,3-丙二醇发酵液脱盐的实验研究[J].膜科学,2004,24(5):33~36
- 9 郭晨,刘春朝,刘德华,等.酵母细胞的絮凝[J].化工冶金,1997,18(3):245~249
- 10 李凡锋,周玉杰,刘德华.1,3-丙二醇发酵液的絮凝预处理研究[J].微生物通报,2004,31(3):30~35
- 11 Jian Hao, Feng Xu, Hongjuan Liu, et al. Downstream processing of 1,3-propanediol fermentation broth [J]. Chem Technol Biotechnol 2006, 81:102~108
- 12 修志龙.甘油连续生物歧化过程培养基和pH调控策略研究[J].高校化学工程学报,2001,15(4):397~402
- 13 王剑锋,修志龙,范圣第.甘油转化生产1,3-PD发酵液中甘油含量的测定[J].工业微生物,2001,31(2):33~35
- 14 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248~251
- 15 马青山等.絮凝化学和絮凝剂[M].北京:环境科学出版社,1988. 89
- 16 刘海军,张代佳,修志龙.用克雷伯氏菌批式流加发酵法生产1,3-PD[J].食品与发酵工业,2001,27(7):4~7
- 17 Cheng Ke ke, Liu Hongjuan, Liu Dehua. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation[J]. Biotechnol Letters,2005,27:19~22
- 18 Zeng A P, Ross A, Biebl H, et al. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation[J]. Biotechnol Bioeng,1994,44:902~911

Flocculation of 1,3-PD Fermentation Broth and Reuse of Cell in Flocs

Lu Shifeng Zhang Daijia Xiu Zhilong

(Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

ABSTRACT The pretreatment of 1,3-PD fermentation broth with flocculants and the reuse of *K. pneumoniae* in flocs were investigated in this paper. Chitosan was proved to be the best among the twelve flocculants, whose performance was evaluated by the cell and protein removal rate. The flocculation performed the best when the temperature was controlled at 37℃, pH was 5.0, the concentration of chitosan was 0.5 g/L with 40k molecular weight, stirring rate was 300r/min, the time of turbidity and settlement were 20 min and 15min, respectively. Then, it was confirmed that *K. pneumoniae* in floc could grow well in fermentation medium.

Key words flocculation, removal rate, chitosan, 1,3-PD, fermentation broth