

两步发酵过程中有机酸对产 1,3 丙二醇的影响

吕吉鸿 诸葛斌 沈 微 饶志明 方慧英* 诸葛健*

(江南大学工业微生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要 考察了基因工程菌两步发酵生产 1,3 丙二醇过程中,有机酸对发酵过程的影响,并选用了不同的离子交换树脂对甘油发酵液进行处理。发现有机酸,特别是乳酸对 1,3 丙二醇生产的抑制作用最明显。在使用离子交换树脂处理有机酸的过程中,确定了使用 005 号离子交换树脂处理效果最好,005 号离子交换树脂可除去大部分的有机酸,处理有机酸后的发酵液发酵产 1,3 丙二醇产量比未处理的发酵液产量提高 166%,转化率提高 34%。

关键词 1,3 丙二醇 发酵 离子交换法 有机酸

中图分类号 TQ920.1

1,3 丙二醇(1,3PDO),是一种重要的化工原料,可应用于油墨、涂料、抗冻剂、保护剂以及医药等行业。最近的研究表明,以 1,3 丙二醇与对苯二甲酸为单体合成的聚合物聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)比以乙二醇和对苯二甲酸为单体形成的聚合物——聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)更具良好特性^[1,2],因而 1,3PDO 在纺织、地毯以及工程塑料领域也具有非常广阔的应用前景。微生物发酵法具有条件温和、操作简单、副产物少、绿色环保等优点,所以这方面的研究正受到国内外越来越多的重视。但是微生物发酵法目前并没有明显的成本优势,其主要原因是发酵液中产品浓度和发酵强度低,从而使生产成本相对较高,对取得更大的经济效益尚存障碍^[4]。因此,开发提高 1,3PDO 发酵液中产品浓度和研究降低生产强度工艺成为该领域研究的重点。

现今微生物发酵法生产 1,3PDO 主要从三条途径进行研究,一条途径是以德国 Henkel 公司为代表的技术路线,利用细菌在厌氧条件下直接将甘油歧化为 1,3-丙二醇,虽然产量相对较高,但是成本很大;另一条途径是以美国 Dupont 公司和 Genercor 公司为代表的技术路线,利用基因工程菌将葡萄糖直接转化为 1,3-丙二醇,报道的产物浓度比较低,如 Nagarajan 等^[5]利用重

组基因工程菌生产 1,3PDO,产物浓度只有 0.67g/L。现今开始研究比较多的是两步法发酵,即先用假丝酵母生产甘油,然后再用其他菌株直接利用甘油发酵液生产 1,3PDO^[6,7],但是酵母在发酵生产甘油时,产生的副产物比较多,并且主要副产物是有机酸和醇类,从而影响下一步的生产。离子交换树脂可以选择性地去除某种离子物质,而且工艺简单,投资少、节能、无污染,所以我们选用离子交换树脂对甘油发酵液进行下一步的处理。本文就是研究利用两步法发酵生产 1,3PDO 过程中,有机酸对产量的影响,并研究利用离子交换树脂对甘油发酵液进行处理的情况。

1 材料与方法

1.1 菌种

江南大工业微生物技术教育部重点实验室张晓梅博士构建的产 1,3 丙二醇新型重组大肠杆菌^[8]。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基(g/L) 胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,pH7.0。需要使用的 Amp^r 浓度为 100 μg/ml。

1.2.2 种子培养基(g/L) 胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,pH7.0。需要使用的 Amp^r 浓度为 100 μg/ml。

1.2.3 发酵培养基(g/L) 甘油 50,KH₂PO₄ 7.5,MgSO₄·7H₂O₂,酵母膏 5,硫酸铵 0.2,FeSO₄·7H₂O

收稿日期:2007-01-04 修回日期:2007-03-07

* 通讯作者,电子信箱: jzhuge@sohu.com

0.005,用10mol/L KOH调节pH值至7.0;再加入 VB_{12} 0.1。

1.3 离子交换树脂

1.3.1 离子交换树脂种类 001~003 阳离子交换树脂和004~007 阴离子交换树脂等产品(华东理工大学化工厂产品),以上新树脂均按相关产品的说明书进行预处理,转化相应型备用。

1.3.2 离子交换吸附方法 (1)静态吸附方法 称取50~100g 湿树脂,装入摇瓶,然后再加入150~200ml 甘油发酵液,将摇瓶置摇床上室温振荡5~12h 或者静止过夜。测定上清液中有机酸的含量。

(2)动态吸附方法 称取200g 湿树脂,装入离子交换柱,用一定的流速加入发酵液。定期取样并测定流出液中有机酸的含量,当流出液中有机酸含量明显增加时,停止进样。

1.4 甘油发酵液

利用产甘油假丝酵母发酵产的甘油发酵液,经过孔径为 $0.2\mu\text{m}$ 的陶瓷膜过滤备用。发酵产1,3PDO时,根据实测的甘油浓度调到发酵培养基中甘油浓度为5%。主要指标见表1。

表1 甘油发酵液的主要指标

Table 1 The characteris of glycerol fermentation liquor

Glycerol % (w/v)	Ethanol % (w/v)	Propanol % (w/v)	Acetate % (w/v)	Lactate % (w/v)	pH
8.3~9.2	0.44	0.11	0.31	0.054	3.0~3.3

1.5 培养条件

将于甘油管保藏的菌种转接至LB斜面培养基上,37℃下活化14~16h。然后从斜面上取一环置于250ml的三角瓶中,装液量25ml,在37℃下振荡培养12h。发酵培养是在250ml的三角瓶(装液量25ml),按2%的接种量,在37℃旋转式摇床振荡培养,摇瓶柜转速150r/min。

1.6 分析方法

甘油、1,3PDO和副产物的测定:发酵液中甘油、1,3PDO和副产物的浓度用气相色谱法检测,柱温260℃、气化室温度260℃,载气为氮气,采用外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 副产物对发酵产1,3PDO的影响

在分析纯甘油培养基中添加0.005%~0.5%不同浓度的不同副产物(醇类包括乙醇、丙醇和丁醇,酸类

包括乙酸、乳酸、丙酸和丁二酸)观其对发酵过程中产1,3PDO的影响。结果如图1。

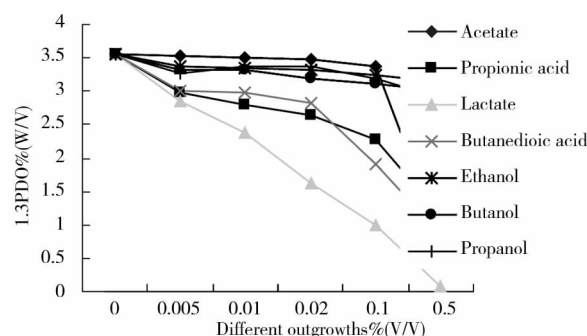


图1 不同副产物对发酵产1,3丙二醇的影响

Fig. 1 Effect of different outgrowths on the synthesis of 1,3propanediol

从结果可以看出,添加的副产物中醇类对发酵产1,3PDO的产量影响很少,乙醇、丁醇和丙醇三种醇类在0.005~0.5%不同的浓度下,1,3PDO的产量变化不大。而有机酸类则影响非常明显,乳酸含量在0.005% w/v时,1,3PDO产量已经降低到3.00% w/v,而且随着乳酸浓度的提高影响更明显,在0.5%的乳酸含量时,基本不产生1,3PDO;丙酸和丁二酸也影响明显,随着添加浓度的增大,1,3丙二醇产量急剧下降;乙酸的影响相对有特色,在低于0.1%的浓度下对产1,3PDO影响不明显但是在高的浓度下如0.1~0.5%时,1,3PDO的产量出现明显下降。而在甘油发酵液中,乙酸和乳酸含量分别在0.31%和0.054%,乳酸在此含量的情况下,影响是非常明显的,乙酸也有一定的影响。因此在利用甘油发酵液二步法生产1,3PDO时,应该尽可能地先去除有机酸,特别是乳酸,减少其对进一步发酵产1,3PDO的影响。离子交换树脂可以选择性地去除某种离子物质,而且工艺简单,投资少、节能、无污染,所以我们选用离子交换树脂对甘油发酵液进行下一步的处理。

2.2 离子交换树脂的选择

我们通过检测树脂静态吸附过程中乙酸、乳酸的变化以及处理后的发酵液二步发酵产1,3PDO的情况,选用了编号为001~003的阳离子交换树脂和编号为004~007的阴离子交换树脂,从以上种树脂中,初步筛选出吸附性能较好的离子交换树脂005,见表2。

可见,无论是对于发酵液中有机酸的吸附还是发酵液处理后发酵产1,3PDO的产量,树脂编号为005的

表 2 不同离子交换树脂处理甘油发酵液效果对比^{a)}

Table. 2 The comparison of the different Ion-exchange resins with the glycerol fermentation liquor

Ion-exchange resins	001	002	003	004	005	006	007	001 ~ 005	Unhandled	Glycerol
Conversion rate%	20	21	20	22	54	37	29	58	20	64
1,3PDO% (w/v)	1.05	1.09	0.96	1.10	2.66	1.86	1.44	2.89	1.02	3.21
Acetate% (w/v)	0.27	0.28	0.10	0.16	0.02	0.00	0.11	0.00	0.30	0.00
Lactate% (w/v)	0.051	0.050	0.037	0.040	0.003	0.015	0.035	0.002	0.054	0.000

a) 001 ~ 005 是 001 处理后的发酵液再进行 005 的处理

静态吸附效果最好,处理后的发酵液发酵产 1,3PDO 的产量达到 2.66% (w/v),比未处理的甘油发酵液直接发酵产量提高 166%,转化率提高 34%,并可达到利用分析纯甘油发酵产 1,3PDO 产量的 82.8%。乙酸从 0.30% 降低到 0.02%,可以基本去除,乳酸从 0.05% 处理到 0.00%,去除率达到 94%,效果明显。用 001 ~ 005 对发酵液进行处理,虽然丁酸可以降低到 0.002%,效果比单独用树脂 005 效果更好,但是在工业生产中进行串联离子交换会导致消耗增多、操作复杂,而且效果也不明显。因此可以选用 005 离子交换树脂对甘油发酵液进行处理。

005 大孔型阴离子交换树脂主要用于对有机分子的离子交换处理^[9],进一步说明应该是发酵产生的副产物—有机酸类对进一步发酵的抑制作用,使未处理的甘油发酵液发酵产 1,3PDO 的产量偏低。

2.3 离子交换树脂 005 的动态吸附试验

将静态吸附量较大的树脂 005 装柱,为了避免带入人为气泡造成沟流和液体分布不均匀,采用排水法装柱,即先用水装满整个柱子,再用排水法量得一定的树脂慢慢装入柱中。温度 25℃,流速 5.5ml/min,交换柱柱高 25cm,柱体积 250ml,对比进行动态吸附试验,见表 3。

表 3 离子交换树脂 005 的动态吸附效果

Table. 3 The results of glycerol fermentation liquor by Ion-exchange resin 005

Time/min	pH	Glycerol % (w/v)	Acetate % (w/v)	Lactate % (w/v)	1,3PDO % (w/v)
0	3.60	8.4	0.24	0.043	1.01
10	4.75	4.8	0.00	0.001	2.46
20	5.26	6.2	0.00	0.001	
30	5.56	7.8	0.00	0.003	2.62
40	5.69	8.2	0.00	0.003	
50	5.74	8.3	0.00	0.002	2.66
60	5.72	8.3	0.00	0.003	
70	5.71	8.3	0.00	0.003	2.67
80	5.71	8.3	0.00	0.003	
90	5.69	8.3	0.03	0.011	1.67
100	5.69	8.3	0.10	0.025	

从结果可知,原始发酵液的甘油浓度是 8.4%,乙酸浓度是 0.24%,乳酸浓度是 0.043%,pH 是 3.60,此时的发酵液发酵产 1,3PDO 的产量在 1.01%。20 ~ 30min 后,甘油浓度趋于原始发酵液的浓度,pH 逐渐增加到 8.0 左右开始保持稳定,同时在离子交换处理前期,乙酸和乳酸浓度很低,保持在 0.00 和 0.002 左右,取此时的发酵液发酵,1,3PDO 的产量在 2.65 左右,当处理时间达到 90min 时,乙酸和乳酸浓度出现明显升高,分别达到 0.03% 和 0.011%,再取此时的处理发酵液进行发酵,1,3PDO 的产量出现明显下降,下降到 1.67%。可以看出,当发酵液中乙酸和乳酸浓度出现明显变化时,处理后的发酵液二次发酵 1,3PDO 的产量也发生明显的变化。所以根据甘油和有机酸的变化,选用处理时间在 20-80min 之间的处理甘油发酵液,处理体积在 2 倍柱体积左右。

2.4 离子交换树脂 005 的再生试验

离子交换树脂 005 在处理甘油发酵液过程中和经过去离子水冲洗后,仍较多残留甘油发酵液的颜色,这表明离子交换树脂 005 可能容易污染。为此,以乙酸残余量的检测结果对树脂 005 的再生性能进行了研究。如图 2。

从图中可以看出,使用新树脂 005 和使用了 5 次、10 次、15 次后的离子交换树脂 005 吸附乙酸的效果都很好,在处理体积在 430ml 前,乙酸的浓度都能够控制在 0.05% 以下,而且都是在 450ml 时达到饱和。所以通过比较新树脂 005 和使用了 5 次、10 次、15 次的树脂 005 的吸附性能发现,重复使用对树脂 005 的吸附性能并无显著影响。说明树脂 005 的再生性能良好,抗污染能力较强。也就是说,树脂 005 耐有机物的污染,吸附、洗脱后残留发酵液的颜色并不影响树脂 005 的吸附性能,发酵液中的色素可能是通过物理附着作用黏附在树脂颗粒上,而不是通过离子交换吸附在树脂颗粒上的。

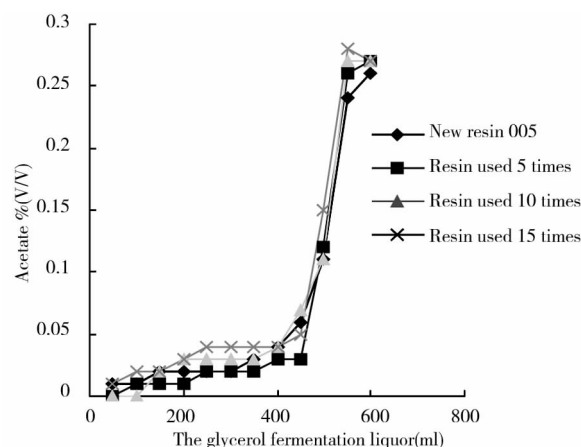


图2 离子交换树脂005的重复利用对性能的影响

Fig. 2 The adsorption curve of glycerol fermentation liquor by Ion-exchange resin 005

3 结论

在二步法生产1,3PDO的过程中,由于产生的甘油发酵液中存在大量的副产物,造成产量很低,与利用相同浓度的分析纯甘油发酵的产量相比,只有30%左右。在添加不同的副产物进行发酵研究中发现,主要是有机酸的影响最明显,所以使用离子交换树脂对甘油发酵液进行前处理。在多种离子交换树脂中选用005树脂处理效果最好,利用005离子交换树脂对甘油发酵液进行处理后,再进行二步发酵生产1,3PDO,产量比未处理的发酵液提高166%,转化率可提高34%,效果明显,处理量在2倍柱体积左右,可以重复多次使用。

参考文献

- [1] Biebl H. Glycerol fermentation to 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1991, 35: 701 ~ 705
- [2] Barbirato F, Claret C C, Grivet J P. Glycerol Fermentation by a New 1, 3-propanediol-producing Microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 12: 4405 ~ 4409
- [3] Malaoui H, Marczak R. Purification and properties of the 1,3-propanediol dehydrogenase of *butyricum* E5. *Enzyme Microbiology Technology*, 2000, 27: 399 ~ 405
- [4] 杨东, 李春, 曹竹安. 发酵法生产1,3-丙二醇的高产策略. 精细与专用化学品, 2002, 20: 15 ~ 18
- [5] Nagarajan V, Nakamura C E. Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing diol dehydratase. US, 5821092, 1998. 10 ~ 13
- [6] Hartlep M, Hussmann W, Prayitno N, et al. Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glucose. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2002, 60: 60 ~ 66
- [7] Uyttendaele M, Debevere J. Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*, 1998, 20: 913 ~ 991
- [8] 张晓梅, 唐雪明, 诸葛斌, 等. 产1,3-丙二醇新型重组大肠杆菌的构建. 生物工程学报, 2005, 9(5): 743 ~ 747
Zhang X M, Tang X M, Zhuge B, et al. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 9(5): 743 ~ 747
- [9] 毛忠贵. 生物工业下游技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2003. 224 ~ 225
Mao ZH G. *The Downstream Techniques of Bioindustry*. Beijing: Chinese Light Industry Press, 2003. 224 ~ 225

Effect on the Synthesis of 1,3propanediol of Organic acids in the Two-stage Fermentation

LU Ji-hong ZHU Ge-bin SHEN Wei RAO Zhi-ming FANG Hui-ying ZHU Ge-jian

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Wuxi 214036, China)

Abstract Effect of organic acids on the synthesis of 1,3 propanediol was studied. The adsorption of organic acids from glycerol fermentation liquor by ion-exchange resins was investigated. The results showed that organic acid and 1,3 propanediol production was in negative relationship. The static adsorption showed that ion-exchange resin 005 had the best adsorption abilities of the organic acids in the glycerol fermentation liquor. It was showed that the yield of 1,3propanediol increased by 166% after the extraction of organic acids from glycerol fermentation liquor and the conversion rate increased by 34%.

Key words 1,3 Propanediol Fermentation Ion-exchange Organic acids