

文章编号:1671-6833(2014)06-0039-04

氮源与其补加方式对 1,3-丙二醇生物合成的影响

乔建援, 赵 峰, 齐笑飞, 孙沛勇, 杜风光

(河南天冠企业集团有限公司 试验中心, 河南 南阳 473000)

摘 要: 氮源是发酵法生产 1,3-丙二醇的一种重要原料, 培养基中氮源浓度的高低直接影响了发酵结果. 从氮源的选择与补加方式着手, 研究了各种有机氮与无机氮的使用及补加方式对发酵的影响. 研究表明: 纯有机氮源无法满足 1,3-丙二醇生产的需求, 而 3.0 g/L 的玉米浆粉可以有效替代 1.0 g/L 的酵母浸粉成为工业大生产中的有机氮源, 并且采用与 pH 值控制耦合的方式进行补加, 使甘油转化生产 1,3-丙二醇的最终含量提高到 72.5 g/L.

关键词: 氮源; 补加方式; 1,3-丙二醇; 生物合成

中图分类号: TQ923 **文献标志码:** A **doi:**10.3969/j.issn.1671-6833.2014.06.010

0 引言

1,3-丙二醇(1,3-propanediol, 以下简称 PDO) 是一种重要的精细化工原料, 主要用作合成聚酯和聚氨酯的单体等^[1]. 近几年的研究表明, 以 PDO 为单体合成的对苯二甲酸丙二醇酯(PTT) 具有优良的加工、染色等性能^[2], 可以广泛地应用于纺织工业. 最近十几年国际市场上甘油的生产过剩, 也促进了甘油生物转化法生产 PDO 的研究. 和化学法相比, 微生物转化法具有安全、环保和可持续发展性, 特别是随着石化资源的日益枯竭, 生物基化学品的研究不断升温, 微生物转化法生产 PDO 已成为研究的热点^[3-4].

陶春平等研究表明^[5]: 培养基中氮浓度较低时, 菌体生长和产物生成都会因氮源不足受到影响; 氮源浓度较高时会导致菌体过度生长和副产物的大量生成, 降低 PDO 的最终浓度以及甘油生产 1,3-丙二醇的转化率. 笔者在进行产业化评估时发现, 以目前的培养基配方来进行产业化, 不仅成本高, 而且在氮源的添加方面没有一个较好的控制方式, 这必将制约 PDO 的产业化.

笔者从培养基成本及氮源的控制角度出发, 研究了 3 种不同的有机氮源、无机氮源用量情况以及不同的补加方式下对发酵法生产 1,3-丙二醇的影响.

1 实验部分

1.1 菌株与培养基

克雷伯氏肺炎杆菌: 河南天冠企业集团有限公司车用燃料生物技术国家重点试验室保存.

种子培养基 (g/L)^[6]: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 7.0, $(NH_4)_2SO_4$ 4.0, KH_2PO_4 2.0, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1, 酵母浸粉 1.0, 微量元素液 0.3 mL, pH 值 7.0.

发酵培养基 (g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 6.8, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.38, $(NH_4)_2SO_4$ 3.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.26, 酵母浸粉 1.0, 微量元素液 0.3 mL, pH 值 7.0.

1.2 试剂和仪器

化学试剂均为市购, 分析纯; 酵母浸粉为安琪 FM801; 玉米浆粉为上海西王淀粉糖有限公司产品; 全脂黄豆粉为本地黄豆经粉碎而成.

全自动发酵罐为上海国强生化装备有限公司出产. 摇床采用上海智诚 ZHWY-2112C 型. pH 监测采用 Mettler Inpro2000 型电极, M400 变送器.

1.3 培养方法

种子培养条件: 三角瓶装液量 50 mL/250 mL, 摇床培养温度 37 °C, 转速 175 r/min, 培养时间 12 h.

发酵采用 50 L 全自动发酵罐, 初始发酵培

收稿日期: 2014-05-07; 修订日期: 2014-08-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA02A208)

作者简介: 乔建援(1974-), 男, 河南新野人, 河南天冠企业集团有限公司工程师, 主要从事新产品的开发及中试放大研究, E-mail: qiaojy@163.com

培养基体积 35 L, 接种量 1% (质量分数), 初始甘油浓度 25 g/L, 发酵液 pH 值 6.3, 发酵温度 37 ℃, 转速 120 r/min, 风量为 0.56 Nm³/h. 采用 2 mol/L 的氢氧化钠溶液控制发酵过程中 pH 值, 过程流加甘油, 发酵时间 48 h.

1.4 分析方法

1.4.1 生物量

生物量通过测定发酵液在 650 nm 下的吸光度值转换所得. 分光光度计采用 Unico722 型.

1.4.2 化学成分的测定

甘油、PDO 及副产物中的有机酸^[7]采用高效液相色谱法测定. 高效液相色谱为安捷伦 1200.

1.4.3 氨氮的测定方法

氨氮的测定采用 HJ 535—2009^[8]中的碘化汞-碘化钾-氢氧化钠法测定, 添加酒石酸钠钾来消除金属离子的影响. 分光光度计采用 Unico722 型.

2 结果与讨论

2.1 初始氮用量对 PDO 生物合成的影响

通过试验发现, 如果降低初始氮用量, 会延长菌体的对数生长期, 且 PDO 的最终含量也较高. 因此, 选择基础培养基中初始氮用量的 50%、75%、100% (质量比) 为条件, 保持 3 种条件下发酵全过程总氮用量相同, 研究了初始氮用量对发酵的影响, 结果如图 1 所示.

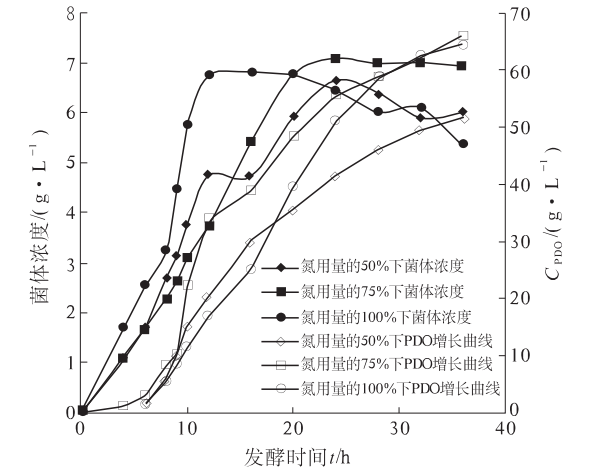


图 1 不同的初始氮用量对发酵的影响
Fig. 1 Effects of different initial nitrogen content in the fermentation

由图 1 可知, 当初始氮用量过低时, PDO 合成明显放慢, 且操作中, 补氮时间明显提前, 在 9 h 左右就必须补入氮源, 补氮后菌浓出现了快速提升. 由于菌体处于亚健康状态, 50% 的初始氮用量

下的最终 PDO 的合成远低于另两种方式. 而初始氮用量 100% 的条件下, 菌体的增长明显较快, 但 PDO 的增长低于 75% 的状态.

同时测量了不同初始氮用量下的培养基在消毒前后的氨氮含量, 如表 1 所示. 从表 1 可以看出, 起始氮源用量高时, 氨氮的损失也大, 消毒后培养基的颜色也较深. 因此认为, 消毒时在高温的作用下氨氮与培养基中的糖分发生美拉德反应, 从而损失了部分氨氮, 产生了氨基糖, 造成了发酵液颜色加深.

表 1 不同初始氮用量下氮源的损失率
Tab. 1 The nitrogen loss rate of different initial nitrogen by disinfection treatment

初始氮用量/%	氨氮含量/(mg·L ⁻¹)		损失率/%
	消毒前	消毒后	
50	415.3	402.2	3.15
75	612.1	591.5	3.37
100	814.5	786.0	3.50

2.2 纯无机氮对 PDO 生物合成的影响

在做学术研究时, 试验方案中可以采用优质的氮源为原料, 但大生产中高成本将是一个新产品进入市场的关键制约因素. 因此, 笔者试验了纯无机氮源对 PDO 生物合成的影响, 结果如图 2 所示.

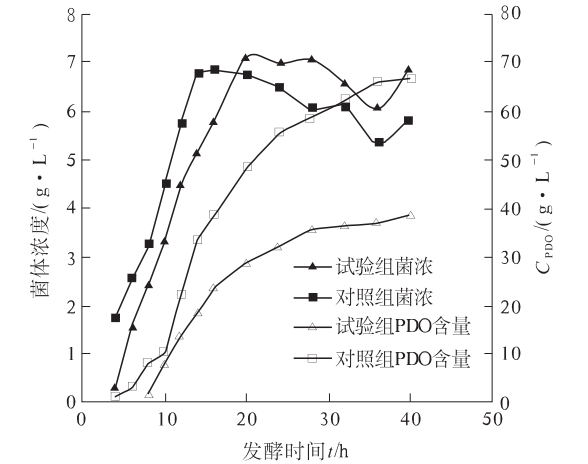


图 2 纯无机氮源对 PDO 生物合成的影响
Fig. 2 Effects of pure inorganic nitrogen sources on PDO biosynthesis

试验组选用了初始氮用量的 75%, 两次间隙补加无机氮源, 保持总氮用量不变, 对照组也为初始氮用量的 75%. 图 2 的对比试验表明, 纯无机氮对菌体生长基本没有影响, 但 PDO 合成速度低, 且合成滞后, 发酵终了 PDO 的含量低. 表明纯无机氮无法提供产物合成用的一些微量生物因子.

2.3 有机氮对 PDO 生物合成的影响

针对工业中常使用的几种有机氮源,笔者选用安琪酵母浸粉、西王玉米浆粉、全脂黄豆粉等 3 种有机氮源进行了对比试验,试验结果如图 3 所示.

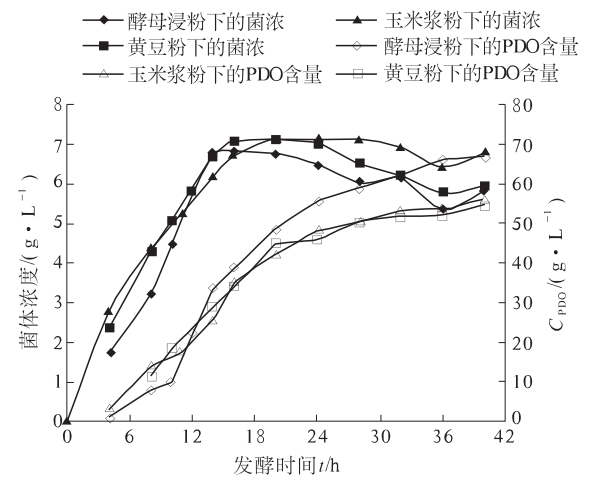


图 3 等量有机氮下对发酵的影响
Fig.3 Effect on Fermentation of equal amount of organic nitrogen

试验表明,相同用量下后两者比酵母浸粉差.因此,笔者对不同氮源的添加量进行了优化,结果如图 4 所示.通过优化试验发现,3.0 g/L 玉米浆粉、2.5 g/L 的全脂黄豆粉与 1.0 g/L 酵母浸粉的 PDO 生物合成结果相当.但全脂黄豆粉虽提供了充足的有机物,却在发酵中产生了大量的泡沫,对发酵的影响较大,因此,玉米浆粉是 PDO 产业化中的最佳选择.

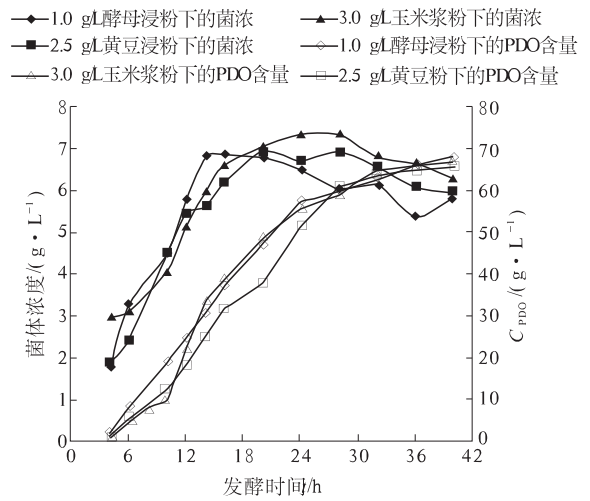


图 4 优化后不同有机氮对发酵的影响
Fig.4 Effect of different organic nitrogen on fermentation after optimizing

2.4 补加方式对 PDO 生物合成的影响

为了分析氮源浓度对发酵的影响,笔者试验了 3 种补加方式:二次间隙补料、连续稳定的补

加、与 pH 值耦合补加,试验结果如图 3 所示.试验表明:常用的二次间隙补料存在着氨氮浓度的起伏,对菌株的生长不利;而连续稳定的补加方式,在发酵中前期发酵液氨氮含量会逐渐下降,使 PDO 合成较慢,而后期最终发酵液中氨氮含量的增加,不利于废水的处理.

随后笔者选用了与 pH 值调控耦合的补加方式,分析了发酵过程 pH 值与氮源消耗的变化规律.该补加方式前期主要产乙酸,乙酸有利于 PDO 的生成^[9],此时氮源消耗随碱液消耗的增大而增大,后期产乳酸,氮源消耗与碱液消耗基本没有关系.因此,笔者选择了前 24 h 与 pH 值的调控耦合补加氮源,而后期停止补加的方式,并取得较好的发酵结果,试验结果如图 5.

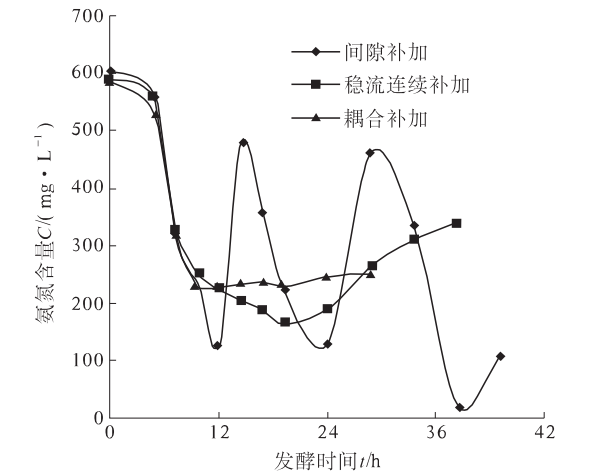


图 5 3 种补加方式下氨氮的变化曲线
Fig.5 Variation curves of ammonia nitrogen in three feeding mode

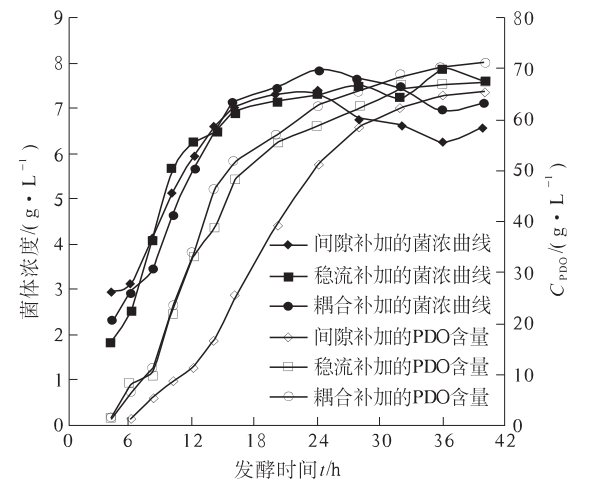


图 6 3 种补加方式的发酵的影响
Fig.6 Effects of three kinds of adding method in fermentation

试验表明:连续补加有利于氨氮含量的稳定,

对菌株生长及 PDO 生物合成有利;而与 pH 值调控相耦合的补加方式,更有利于发酵料中氮含量的稳定,有利于大生产中的操控. 试验证明,采用与 pH 值调控相耦合的方式, PDO 的最终含量提高到 72.5 g/L.

3 结论

(1)本试验表明,纯有机氮只能提供菌株生长需要的氮源,但无法提高 PDO 的产量,说明必要的有机氮源添加是促进 PDO 生物合成的有效方式.

(2)初始氮含量的控制不仅有效地减少氮源的损失,而且能促进菌株转化甘油为 PDO,提高最终发酵液中 PDO 的含量. 氮源与糖类物质的美拉德反应所产生的物质是否会阻碍菌株合成 PDO 仍有待研究.

(3)3.0 g/L 的玉米浆粉与 1.0 g/L 的酵母浸粉均能有效地促进甘油转化为 PDO. 说明玉米浆粉可以成为工业大生产中的有机氮源,从而降低产品的生产成本.

(4)氮源的补加方式是 PDO 生物合成的一个重要的影响因子,控制稳定的氮源浓度使得 PDO 的生物合成可以得到显著的提高. 采用与 pH 值调控相耦合的补加方式能有效地稳定发酵液中的氮源浓度,使 PDO 的最终含量达到 72.5 g/L.

参考文献:

- [1] 刘德华,刘宏娟,程可可. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇研究进展[J]. 合成纤维,2005,(6):11-15.
- [2] ZHANG Zong-ming, HU Qiu-long. Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* AC15 via control composite design[J]. *Bioresour. Technology*, 2008, 99:1052-1056.
- [3] 刘婷,刘均洪,刘登. 微生物转化甘油生产 1,3-丙二醇的研究进展[J]. 上海化工,2010(4):24-27.
- [4] 张文斗,孟宋冬,马春玲,等. 微生物法生产 1,3-丙二醇的研究进展[J]. 山东轻工业学院学报,2011(4):11-14.
- [5] 陶春平,刘朋波,宫衡,等. 控制氮源浓度提高 1,3-丙二醇的发酵水平[J]. 化学与生物工程,2007,(5):38-41.
- [6] 徐佳杰,刘朋波,宫衡,等. 1,3-丙二醇发酵过程中盐浓度的胁迫作用[J]. 生物工程学报,2008, 24(6): 1098-11021.
- [7] 张浩勤,张伟,刘金盾,等. 气相色谱法测定牛粪厌氧发酵液中挥发性脂肪酸[J]. 郑州大学学报:工学版,2007(2):51-53.
- [8] 中国环境保护部. HJ 535—2009,水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法[S]. 北京:中国环境科学出版社,2009.
- [9] 张延平. 1,3-丙二醇生物合成过程中的辅因子代谢调控[D]. 北京:清华大学化工学院,2006.

The Effect of Nitrogen and Its Adding Modes on 1,3-Propanediol Biosynthesis

QIAO Jian-yuan, ZHAO Feng, QI Xiao-fei, SUN Pei-yong, DU Feng-guang

(Technology Center, Henan Tianguan Enterprise Group Co., Ltd., Nanyang 473000, China)

Abstract: Nitrogen source is an important raw material for the production of 1,3-propanediol fermentation, nitrogen concentration in the medium directly influences the fermentation results, from the choice of nitrogen source and adding mode, research the use of a variety of organic nitrogen and inorganic nitrogen, the effect of addition on fermentation. Through the study, the pure organic nitrogen sources can not appease the demand of PDO production, while the corn steep powder 3.0 g/L as organic nitrogen source can be used in industrial production effectively instead of yeast extract. With the complement model of uniting the PH value control model, the final content of 1,3-propylene glycol glycerol was increased to 72.5 g/L.

Key words: Nitrogen source; adding mode; 1,3-propanediol, biosynthesis