

2,3-丁二醇发酵液的絮凝除菌与絮凝细胞的循环利用

张江红, 孙丽慧, 修志龙

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024)

摘要: 研究了用壳聚糖/海藻酸钠复合絮凝剂处理 2,3-丁二醇发酵液的工艺条件, 以絮凝率为指标, 考察了壳聚糖分子量、壳聚糖用量、海藻酸钠助凝剂用量、发酵液 pH 值、搅拌时间等因素对处理效果的影响, 确定了适于 2,3-丁二醇发酵液体系的絮凝工艺. 结果表明, 最佳操作条件为壳聚糖分子量 40 kDa, 壳聚糖用量 0.375 g/L, 海藻酸钠助凝剂用量 0.250 g/L, 发酵液 pH 5.0, 搅拌时间 30 min, 静置 1 h. 该条件下, 絮凝率可达 98% 以上, 2,3-丁二醇保留率约为 99%, 且絮凝后上清液清澈、透明. 絮凝后的菌体可再次利用, 发酵过程中菌体最高浓度(OD 值)可达 13.5, 其转化能力与絮凝前相当.

关键词: 2,3-丁二醇; 絮凝; 壳聚糖; 发酵

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2008)04-0779-05

1 前言

2,3-丁二醇(2,3-Butanediol, 2,3-BD)是一种重要的化工原料和液体燃料, 广泛应用于化工、食品、燃料以及航空航天等领域^[1,2]. 目前其生产方法主要是生物转化法, 即以可再生资源为原料, 通过微生物代谢将单糖转化为目标产物. 但发酵液中产物 2,3-BD 的有效提纯一直是阻碍其大规模工业化生产的重要因素之一. 工业上采用的分离方法多为高速离心法或微孔膜过滤法. 用高速离心法处理发酵液, 设备投入成本高、能耗大; 采用膜过滤法存在膜污染严重、清洗困难、成本高等缺点. 絮凝技术由于具有低成本、操作简单、能提高固液分离速度和液体澄清晰度等一系列特点, 逐渐成为微生物产品分离研究的热点^[3,4], 在甘油发酵液、透明质酸发酵液、乳酸发酵液^[5]、赖氨酸发酵液、1,3-丙二醇发酵液^[6]等的预处理上有很多成功报道, 如鲁诗峰等^[6]采用壳聚糖絮凝 1,3-丙二醇发酵液菌体, 取得了显著效果, 发酵液的菌体和蛋白质去除率分别可达 99.97% 和 91.56%. 但在处理 2,3-BD 发酵液中还未曾报道.

常用的处理发酵液的絮凝剂有壳聚糖、聚丙烯酰胺、天然絮凝剂 II 型 B 组分等, 但聚丙烯酰胺有毒性, 天然絮凝剂 II 型 B 组分成本过高、不利于工业化应用, 而壳聚糖作为絮凝剂具有来源广、用量少、无毒、环境友好、廉价等优点^[7].

本实验根据 2,3-BD 发酵液的特点, 采用壳聚糖对发酵液进行絮凝预处理, 在前期实验的基础上, 选用海藻酸钠为助凝剂, 以絮凝率为指标, 分别考察了壳聚糖分子量、壳聚糖用量、海藻酸钠助凝剂用量、发酵液 pH

值、搅拌时间等因素对 2,3-BD 发酵液絮凝效果的影响, 在实验室条件下初步确定了絮凝的最佳工艺条件, 为其工业化应用打下了基础. 并通过絮凝细胞的再发酵实验, 验证了絮凝后的菌体可再次利用, 从而省略了种子培养、接种步骤, 简化了发酵工艺.

2 实验

2.1 实验材料与仪器

菌种为 *Klebsiella pneumoniae* CICC 10011, 种子培养基和发酵培养基见文献[8]. 2,3-BD 发酵液是本实验室以葡萄糖为底物发酵所得, 发酵液 OD 值(A_{650})12.3, pH 5.5, 2,3-BD 浓度 57 g/L, 葡萄糖浓度 57 g/L. 本实验使用的絮凝剂为壳聚糖(脱乙酰度大于 85%, 分子量 6~140 kDa), 助凝剂为海藻酸钠, 均为市售工业级产品. 主要仪器: 721 分光光度计, 磁力搅拌器, 恒温水浴锅, pH 电极, 5 L 自控发酵罐(BIOTECH-5BG, 上海保兴生物设备工程有限公司), 葡萄糖分析仪(SBA-50B, 山东省科学院), 气相色谱仪(GC-14B, 日本岛津公司).

2.2 实验方法

2.2.1 絮凝实验

絮凝剂的配制: 壳聚糖均用 1%(ρ)醋酸溶液配制, 浓度为 10 g/L, 磁力搅拌溶解后, 静置溶胀 24 h 即可.

海藻酸钠溶液的配制: 以蒸馏水为溶剂, 浓度为 10 g/L.

将于冰箱中保存的发酵液恒温水浴预热到 37℃, 量取 40 mL 于 50 mL 小烧杯中, 在磁力搅拌下, 向发酵液中逐滴加入 1.0 mL 絮凝剂(空白加蒸馏水), 然后滴加

1.0 mL 海藻酸钠助凝剂, 搅拌 5 min, 静置 1 h 后, 取上清液, 于 650 nm 下测定其 OD 值.

2.2.2 絮凝细胞再利用实验

种子培养条件: 接菌量 2% (φ), 温度 37℃, 转速 200 r/min, 培养时间 24 h. 发酵培养条件: 在 5 L 自控发酵罐中装液量 2 L, 接种量 5% (φ), 葡萄糖初始浓度 135 g/L, 温度 37℃, 搅拌转速 300 r/min, 通入空气维持微氧条件, 通气量 200 mL/min. 用 5 mol/L NaOH 溶液控制 pH 值为 6.0. 采用批式流加培养方式, 当葡萄糖浓度低于 30 g/L, 加入固体葡萄糖 100 g. 当发酵进行到后期(菌体浓度维持恒定, 底物消耗缓慢, 产物浓度基本不再增加), 停止发酵, 按最佳配比加入絮凝剂和助凝剂, 搅拌 30 min, 静置 1 h 后, 虹吸出上清液. 留 0.5 L 絮凝菌体, 向其中加入新配制的发酵培养基 2.0 L, 再次进行发酵实验. 到发酵后期, 重复以上操作.

2.2.3 分析方法

蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法^[9]测定, 葡萄糖采用葡萄糖分析仪测定, 菌体浓度以蒸馏水为空白在波长 650 nm 下的光密度(OD 值)表示, 2,3-BD 浓度用气相色谱法检测, 色谱柱(ϕ 5 mm \times 2 m)填料为 Chromsorb 101, 柱温 190℃, 汽化室与检测器温度均为 200℃, 载气为 N₂, 流速 40 mL/min, 进样量 1 μ L, 采用外标法定量.

$$\text{絮凝率(Flocculation rate)} = (\text{OD}_{\text{絮凝前}} - \text{OD}_{\text{絮凝后}}) / \text{OD}_{\text{絮凝前}} \times 100\%$$

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

$$M = \text{蛋白质浓度} \times \text{体积} = \text{蛋白质质量}$$

絮凝率和蛋白去除率越大, 说明絮凝效果越好.

3 结果与讨论

3.1 絮凝条件的确定

3.1.1 壳聚糖分子量的影响

考察不同壳聚糖分子量对絮凝效果的影响, 结果如图 1 所示. 从图可以看出, 在小分子量范围内, 壳聚糖的分子量增大, 絮凝率升高, 当壳聚糖分子量为 40 kDa 时, 絮凝效果最好, 絮凝率可达 83.5%, 但当分子量超过 40 kDa 时, 絮凝率又随着壳聚糖分子量的增加而降低. 陈东辉等^[10]利用苝荧光探针法研究了壳聚糖絮凝机理, 表明壳聚糖分子量是影响絮凝效果的关键性分子结构参数. 一般地壳聚糖分子量越大, 粘度相对也较高; 分子量小, 壳聚糖分子链相对短, 溶液粘度较低^[11]. 粘度低时形成的胶团小, 不利于沉降; 较高的粘度有较好的絮凝效果, 但粘度过高不利于絮凝剂和发酵液中菌体充分接触, 影响其絮凝作用, 也给后续操作带来不便. 故

选择壳聚糖分子量为 40 kDa. 鲁诗峰等^[6]在采用壳聚糖絮凝 1,3-丙二醇发酵液菌体时考察了壳聚糖分子量对絮凝效果的影响, 最终确定的壳聚糖分子量也为 40 kDa, 与本实验结果相同, 而其他相关研究很少考察壳聚糖分子量的影响作用.

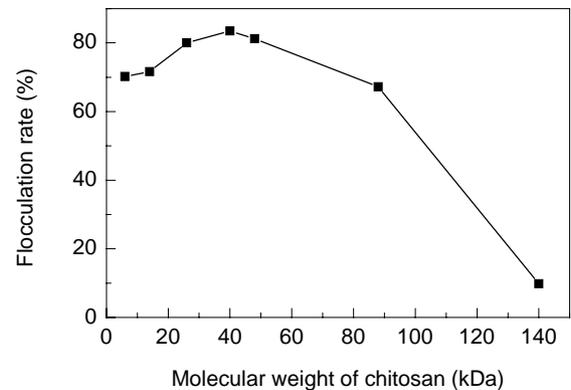


图 1 壳聚糖分子量对絮凝效果的影响

Fig.1 Effect of chitosan molecular weight on the flocculation rate

3.1.2 壳聚糖、海藻酸钠用量的影响

40 mL 发酵液中 10 g/L 海藻酸钠溶液用量均为 1.0 mL, 10 g/L 壳聚糖溶液用量对絮凝效果的影响结果如图 2 所示. 由图可以看出, 絮凝率随絮凝剂用量的增加而增加, 达到峰值后, 又随絮凝剂用量增加而降低. 此现象符合架桥絮凝机理, 絮凝剂用量增加有助于其与微粒充分架桥, 当高分子絮凝剂覆盖微粒表面接近 50% 时, 其絮凝作用最佳^[12]; 但用量过多反而会引起吸附饱和, 在每个胶粒上形成覆盖层, 从而使胶粒产生再次稳定现象. 所以, 体系中絮凝剂用量过多和过少都达不到好的絮凝效果. 本实验条件下, 壳聚糖溶液的用量控制在 1.0~1.5 mL 比较理想, 在 1.5 mL 时处理效果最好, 絮凝率可达 94.0%. 这样, 絮凝 1 L 发酵液只需 0.375 g 壳聚糖. 谭天伟等^[13]在利用壳聚糖去除十五碳二元酸发酵

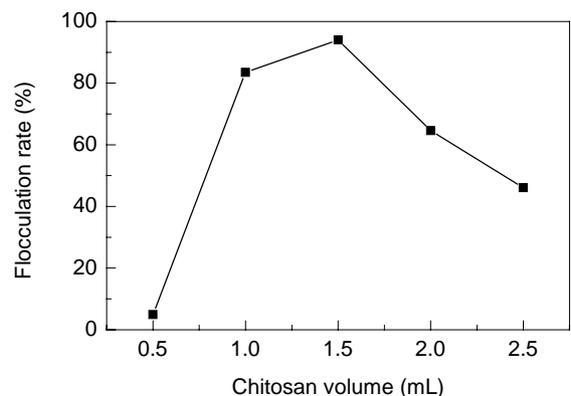


图 2 壳聚糖加入量对絮凝效果的影响

Fig.2 Effect of chitosan volume on the flocculation rate

液中酵母菌的研究中,确定了壳聚糖的用量为 600 $\mu\text{g/g}$, 较本实验值高. 本实验确定的壳聚糖絮凝剂用量少, 可以在很大程度上降低分离成本.

确定壳聚糖溶液用量为 1.5 mL 后, 考察了海藻酸钠溶液用量对絮凝效果的影响, 结果如图 3 所示. 海藻酸钠溶液用量在 1.0~2.5 mL 之间时, 对絮凝效果的影响不大, 絮凝率均能达到 92% 以上, 而在 1.0 mL 时, 处理效果最好, 絮凝率可达 94.0%. 在前期的实验中, 不加海藻酸钠时, 壳聚糖对 2,3-BD 发酵液的絮凝效果甚微, 但加入海藻酸钠助凝剂后, 立刻发生絮凝作用. 这是因为壳聚糖和海藻酸钠在溶液体系中会发生络合反应, 单个壳聚糖分子可以结合海藻酸钠负电荷位点, 即在海藻酸钠分子间架桥^[14], 在此过程中可以携带发酵液中菌体和蛋白等大分子物质, 使其沉淀下来. 海藻酸钠用量太少, 不利于充分架桥; 而用量太多, 壳聚糖和海藻酸钠会快速形成大的胶团沉淀下来, 反而不利于对发酵液的澄清. 姚文娟等^[15]利用絮凝法处理酒精废液, 比较了 2 种助凝剂海藻酸钠和羧甲基纤维素钠的助凝效果, 发现采用羧甲基纤维素钠作助凝剂时, 壳聚糖的最适用量和助凝剂本身的用量均大于用海藻酸钠的对应值, 所以本实验采用海藻酸钠助凝剂可以降低成本.

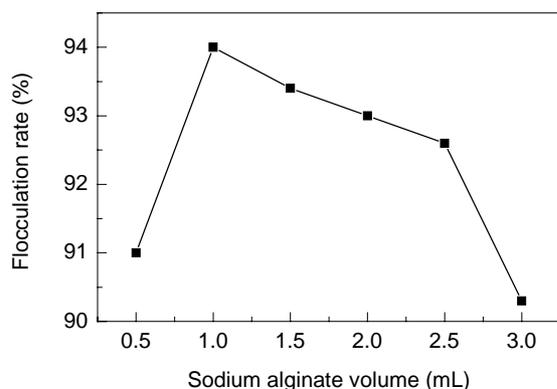


图3 海藻酸钠加入量对絮凝效果的影响

Fig.3 Effect of sodium alginate volume on the flocculation rate

3.1.3 pH 值的影响

因为 pH 值过高(>10)或过低(<4)都会影响壳聚糖同发酵液中各种微粒间的电荷分配比例, 所以在预实验的基础上, 本实验考察 pH 值范围为 5.0~7.5. 用 5% 的 HCl 溶液或 5% 的 NaOH 溶液将发酵液的 pH 值分别调至 5.0~7.5, 结果如图 4 所示. 由此可见, pH 值是影响絮凝的一个重要因素, 在碱性条件下絮凝效果不理想, 而酸性条件下较好. 壳聚糖属于阳离子絮凝剂, 体系的 pH 值对絮凝效果有明显影响. 在碱性条件下, 其氨基呈电中性, 吸附络合能力大大下降^[14]; 而在酸性条件下壳聚糖主链易发生水解^[15], 球凝体结构松散, 难以再吸附络

合大分子物质. 同时, pH 值影响胶体颗粒表面电荷的 ζ 电位, 从而影响分子链的伸展程度和溶解度. 预实验考察了发酵液 pH<5 或 >7.5 时的絮凝效果, 结果没有絮凝现象产生. 由图 4 可知最佳絮凝 pH 值为 5.0, 此时絮凝效果最好, 絮凝率可达 96.0%. 而 pH 值为 5.0 也接近 2,3-BD 的发酵 pH 值(5.0~6.0), 这样发酵结束略微调节 pH 值即可, 不会对发酵液造成大的波动.

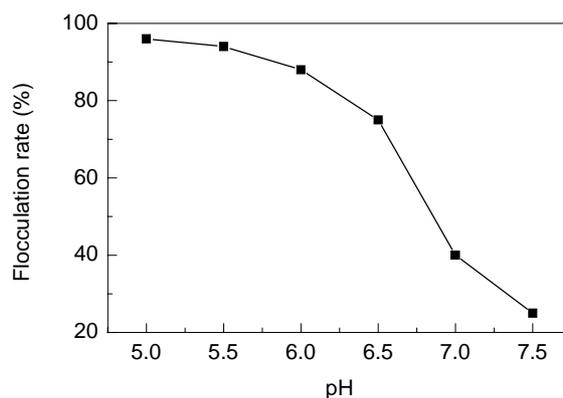


图4 发酵液 pH 值对絮凝效果的影响

Fig.4 Effect of broth pH on the flocculation rate

此外还考察了搅拌时间对絮凝效果的影响, 结果如图 5 所示. 由此可见, 搅拌时间在 5~50 min 之间时, 对絮凝效果的影响不大, 最佳搅拌时间为 30 min, 絮凝率能达到 98% 以上. 絮凝操作后静置 1 h 即可, 此时上清液体积不再发生变化.

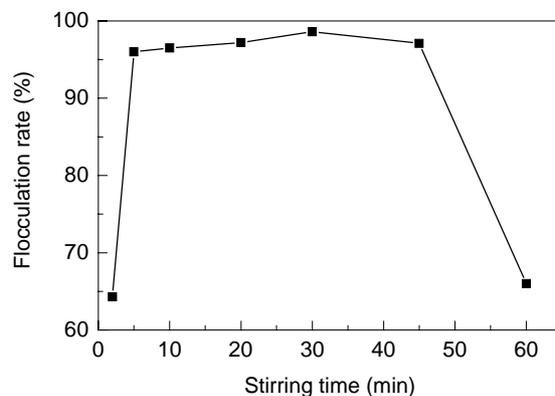


图5 搅拌时间对絮凝效果的影响

Fig.5 Effect of stirring time on the flocculation rate

3.2 絮凝除菌对发酵液成分的影响

絮凝处理的目的是除去发酵液中的菌体, 同时考察了其发酵液中蛋白、目标产物 2,3-BD 的影响. 在最佳絮凝条件下对发酵液进行处理, 分别检测发酵液和絮凝后上清液中蛋白和 2,3-BD 的含量. 发酵液和絮凝后上清液中 2,3-BD 的比值即产品的保留率. 实验测得絮凝前后 2,3-BD 的浓度分别为 57.0 和 56.6 g/L, 絮凝前后

发酵液体积相差不大(絮凝后体积增加 6%), 2,3-BD 的保留率约为 99%, 可见本实验操作对目标产物造成的损失小. 絮凝前后测得发酵液中蛋白浓度分别为 0.7 和 0.2 mg/mL, 蛋白去除率约为 71.4%.

3.3 絮凝细胞的再利用

利用 *K. pneumoniae* 批式流加发酵生产 2,3-BD, 发酵液经过絮凝处理后, 絮凝菌体加入新配制培养基再次培养, 实验结果如图 6 所示.

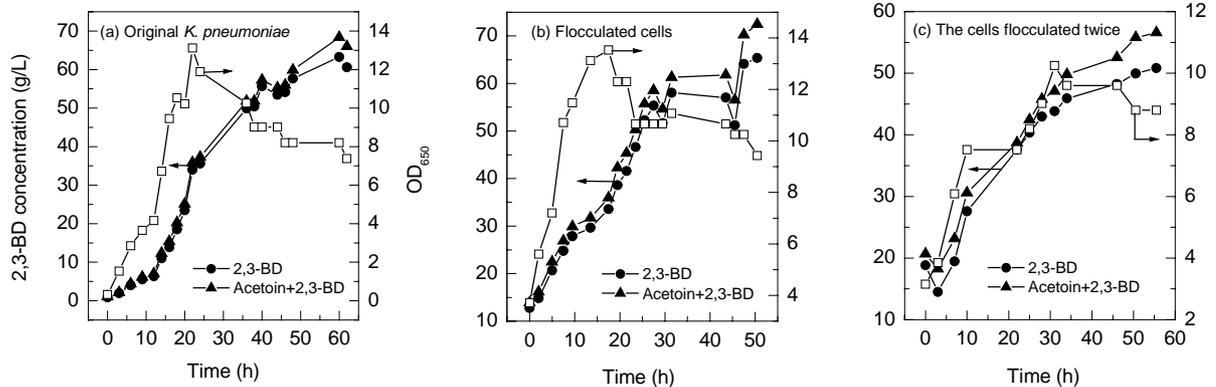


图 6 原始菌种和絮凝后菌种批式流加发酵实验结果

Fig.6 Results of fed-batch fermentation with original *K. pneumoniae* and flocculated ones

图 6(a)是由原始 *K. pneumoniae* 批式流加微氧发酵的结果, 菌体在 12~22 h 内生长迅速, 2,3-BD 很快地积累; 当发酵进行到 62 h 时, 菌体浓度不再变化, 底物不再消耗, 产物积累缓慢, 此时停止发酵实验. 2,3-BD 最终浓度为 66 g/L, 生产强度为 1.06 g/(L·h), 底物转化率为最大理论值的 60%. 转化率的原因可能是初始底物浓度过高, 抑制了菌体的生长, 降低了其转化能力. 絮凝后加入发酵培养基再次发酵, 初始糖浓度控制在 50 g/L 左右, 实验结果见图 6(b). 随着对 *K. pneumoniae* 生长有抑制作用的乙醇、乙酸等副产物^[16]减少及初始底物浓度降低, 菌体开始再次生长, 在 0~18 h 内, 菌体迅速增长, OD 值最高可达 13.5, 且 2,3-BD 快速积累; 当发酵进行到 50 h 时, 停止发酵实验, 产物最终浓度为 72 g/L. 由于絮凝菌体中有发酵液残留, 导致第二次发酵开始 2,3-BD 浓度为 14 g/L, 结束时浓度实际增加 58 g/L, 生产强度为 1.16 g/(L·h), 底物转化率为最大理论值的 67%.

从图 6(c)第二次絮凝沉淀中菌体再发酵实验结果可以看出, 发酵进行到 31 h 时菌体浓度最高, OD 值可达 10.3, 在 55 h 时停止发酵实验, 产物最终浓度为 56 g/L, 而初始浓度为 26 g/L, 实际增加了 30 g/L, 生产强度为 0.55 g/(L·h), 底物转化率为最大理论值的 40%. 菌体生长不好, 转化率降低, 原因一方面壳聚糖本身对菌体有抑制作用, 菌体经过絮凝后, 细菌细胞壁和细胞膜上的负电荷分布不均, 干扰细胞壁的合成, 打破了在自然状态下的细胞壁合成与溶解平衡, 使细胞壁趋向于溶解, 改变了膜的渗透压, 细胞膜因不能承受渗透压而变形破裂, 细胞的内容物如水、蛋白质等渗出, 发生细

菌溶解而死亡^[17-19]; 另一方面是第二次絮凝沉淀中残留一部分发酵液, 其中的物质对菌体的生长也有不利影响. 可以通过预留更少量的絮凝菌体进行再发酵以减少其不利影响. 本实验证实了絮凝沉淀中的细胞可再次发酵生产 2,3-BD. 絮凝细胞再利用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, 节约发酵时间和成本.

4 结论

本实验确定了壳聚糖絮凝 2,3-BD 发酵液的最佳工艺条件: 壳聚糖分子量 40 kDa, 壳聚糖用量 0.375 g/L, 海藻酸钠助凝剂用量 0.250 g/L, 发酵液 pH 值 5.0, 搅拌时间 30 min, 静置 1 h. 在最佳工艺条件下絮凝率达 98% 以上, 2,3-丁二醇保留率约为 99%, 蛋白去除率约为 71.4%, 且絮凝后上清液清澈、透明. 通过絮凝细胞再发酵实验, 证实了絮凝沉淀中的菌体可以重复利用, 从而能简化发酵工艺, 节约生产成本.

参考文献:

- [1] Garg S K, Jain A. Fermentative Production of 2,3-Butanediol: A Review [J]. *Bioresour. Technol.*, 1995, 51: 103-109.
- [2] Syu M J. Biological Production of 2,3-Butanediol [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 55: 10-18.
- [3] 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]. *微生物学通报*, 2004, 31(3): 30-35.
- [4] 毕喜婧, 刘德华. 7 种絮凝剂对甘油发酵液的絮凝效果比较 [J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(9): 15-18.
- [5] 江龙法, 张所信. L-乳酸发酵液絮凝研究 [J]. *食品科技*, 1999, (5): 42-43.
- [6] 鲁诗峰, 张代佳, 修志龙. 1,3-丙二醇发酵液的絮凝处理及絮凝细

- 胞的再利用 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9): 10-13.
- [7] 毕喜婧, 刘德华. 絮凝在生物技术中的发展及应用 [J]. 化工进展, 2002, 21(11): 845-850.
- [8] Qin J Y, Xiao Z J, Ma C Q, et al. Production of 2,3-Butanediol by *K. pneumoniae* Using Glucose and Ammonium Phosphate [J]. Chin. J. Chem. Eng., 2006, 14(1): 132-136.
- [9] 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.
- [10] 陈东辉, 吴重亮, 陈亮. 荧光探针法研究壳聚糖絮凝机理 [J]. 环境保护科学, 2002, (6): 34-37.
- [11] 蒋挺大. 甲壳素 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996. 99-109.
- [12] 刘清华, 钱和, 张伟国. 用絮凝法处理 L-异亮氨酸发酵液 [J]. 加工工艺, 2004, (11): 54-55.
- [13] 谭天伟, 陈远童, 马润宇. 絮凝法除去十五碳二元酸发酵液中的酵母菌 [J]. 北京化工大学学报, 1995, 22(4): 17-21.
- [14] 王勇, 解玉冰, 马小军. 壳聚糖/海藻酸钠生物微胶囊的研究进展 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 13-16.
- [15] 姚文娟, 李绩, 肖冬光, 等. 絮凝法处理酒精废液的研究 [J]. 酿酒科技, 2001, (3): 62-64.
- [16] 王子杰, 李顺鹏, 沈标, 等. 高效絮凝剂壳聚糖对味精废水的絮凝效果研究 [J]. 中国沼气, 1998, 16(4): 12-14.
- [17] 冉旭, 苟立, 孟宪伟. 壳聚糖溶液的制备和壳聚糖降解性的研究 [J]. 食品科学, 2001, 22(7): 18-21.
- [18] Cheng K K, Liu H J, Liu D H. Multiple Growth Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-Propanediol Fermentation [J]. Biotechnol. Lett., 2005, 27: 19-22.
- [19] 杨冬芝, 刘晓飞, 李治. 壳聚糖抗菌活性的影响因素 [J]. 应用化学, 2000, 17(6): 598-602.

Removal of *Klebsiella pneumoniae* Cells from 2, 3-Butanediol Fermentation Broth by Flocculation and Reuse of Cells in Flocs

ZHANG Jiang-hong, SUN Li-hui, XIU Zhi-long

(Dept. Biosci. & Biotechnol., Sch. Environ. & Biol. Sci. Technol., Dalian Univ. Technol., Dalian, Liaoning 116024, China)

Abstract: The pretreatment of 2,3-butanediol fermentation broth by chitosan flocculation was investigated. Using sodium alginate as coagulant, the effects of chitosan molecular weight, chitosan dosage, coagulant dosage, pH and turbidity time on the flocculation of fermentation broth were investigated, respectively. The performance was evaluated by flocculation ratio. According to the results, the optimum flocculation conditions for *Klebsiella pneumoniae* cells were as follows: 0.375 g/L of chitosan with 40 kDa molecular weight, 0.250 g/L of sodium alginate, pH 5.0, 30 min of stirring time and 1 h of settlement time. The flocculation rate reached 98%, the retained ratio of 2,3-butanediol reached 99%, and the supernatant in the broth was clear. After flocculation the cells of *Klebsiella pneumoniae* in the flocs grew well (OD 13.5) and were used repeatedly.

Key words: 2,3-butanediol; flocculation; chitosan; fermentation