

# 微生物发酵法中试生产1,3-丙二醇

刘海军<sup>1,2</sup>, 张代佳<sup>1</sup>, 徐友海<sup>1,2</sup>, 孙亚琴<sup>1</sup>, 吕继萍<sup>2</sup>, 牟英<sup>1</sup>, 修志龙<sup>1</sup>

(1. 大连理工大学生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024;

2. 中国石油吉林石化分公司研究院, 吉林 吉林 132021)

**摘要:**以甘油为原料,利用克雷伯氏菌进行了发酵罐容积规模分别为1 m<sup>3</sup>和20 m<sup>3</sup>的发酵法1,3-丙二醇生产的中试研究。试验结果表明:1 m<sup>3</sup>和20 m<sup>3</sup>的发酵罐最终发酵液中1,3-丙二醇平均质量浓度分别达到了74.6 g/L和63.9 g/L,1,3-丙二醇相对于甘油的得率分别为61.2%和49.9%。采用发酵液醇沉预处理、再精馏的专利技术可分离得到纯度大于99%的1,3-丙二醇产品,分离收率大于85%,产品质量达到了聚对苯二甲酸丙二酯(PIT)聚合反应的要求。成本分析表明,生物法生产1,3-丙二醇技术是经济可行的。

**关键词:**1,3-丙二醇;克雷伯氏菌;甘油;微生物发酵;中试

中图分类号:TQ923

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2007)02-0056-03

## Production of 1,3-propanediol by microbiological fermentation on a pilot scale

LIU Hai-jun<sup>1,2</sup>, ZHANG Dai-jia<sup>1</sup>, XU You-hai<sup>1,2</sup>, SUN Ya-qin<sup>1</sup>, LU Ji-ping<sup>2</sup>, MU Ying<sup>1</sup>, XIU Zhi-long<sup>1</sup>

(1. Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. PetroChina Research Institute of Jilin Petrochemical Company, Jilin 132021, China)

**Abstract:** Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* has been conducted up to the scale of 1 m<sup>3</sup> and 20 m<sup>3</sup>. The experimental results showed that the final mass concentration, molar yield of 1,3-propanediol to glycerol were 74.6 g/L and 61.2% in 1 m<sup>3</sup> reactor, 63.9 g/L and 49.9% in 20 m<sup>3</sup> reactor, respectively. By using ethanol precipitative pretreatment and rectification patent technology, the product 1,3-propanediol with purity of 99% had been harvested, the separation yield of 1,3-propanediol was greater than 85%, and the product quality had met the polymerization standard. The cost analysis demonstrated that the microbial production of 1,3-propanediol was economically feasible.

**Key words:** 1,3-propanediol; *Klebsiella pneumoniae*; glycerol; microbiological fermentation; pilot scale

作为重要的化工原料,1,3-丙二醇(1,3-PD)可用作溶剂、抗冻剂、保护剂、精细化工原料以及药物合成中间体等,但其最主要的用途是作为单体与对苯二甲酸合成新型聚酯材料——聚对苯二甲酸丙二酯(PIT)。随着全球对 PIT 需求量的日益增高,对其关键原料1,3-丙二醇的需求量也逐渐加大。据壳牌(Shell)公司预计,2010年全世界 PIT 产量可达到100万t以上,而1,3-丙二醇的需求量相应也将达到30万t左右。目前1,3-丙二醇的工业化生产方法为化学合成法,国际市场主要由壳牌公司和杜邦(Du Pont)公司垄断<sup>[1-4]</sup>。但从1,3-丙二醇生产技术的发展趋势看,已由相对成熟的化学合成法向微生物发酵法过渡<sup>[5-9]</sup>。我国1,3-丙二醇的产量非常少,仅有少数几家化学试剂厂生产,而大宗工业用1,3-丙二醇仍需从国外进口。

笔者所在课题组在实验室试验研究基础上,以

甘油为原料,利用克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)完成了发酵法生产1,3-丙二醇的中试研究。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

原始 *K. pneumoniae* 菌株购自德国菌种和细胞收集中心(DSMZ),试验用菌株是其经过等离子体诱变和筛选的优良菌株,种子和发酵培养基制取同文献[10]所示方法。发酵粗甘油是以淀粉为原料经微生物发酵后浓缩的甘油溶液,甘油质量分数为85%;纯甘油是质量分数为98%的皂化甘油。

### 1.2 分析方法

甘油浓度用高碘酸氧化法测定;菌体浓度是以蒸馏水为空白样,用在波长650 nm下测得的光密度OD值表示;1,3-丙二醇浓度用GC-14B气相色谱法检测(日本岛津公司),色谱柱( $\Phi$  5 mm  $\times$  2 m)填料

收稿日期:2006-09-26;修回日期:2006-12-14

基金项目:国家“十五”攻关项目(2004BA713B06-03);国家“973”项目(2003CB716000)

作者简介:刘海军(1967-),男,博士生,高级工程师;修志龙(1965-),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为生物催化与转化,通讯联系人,0411-84706369, zhixiu@dlut.edu.cn。

为 Chromsorb 101 型填料,柱温 145℃,汽化室与检测器的温度均为 250℃,载气为 N<sub>2</sub>,流速 40 mL/min,进样量为 1 μL,采用外标法测量。

## 2 结果与讨论

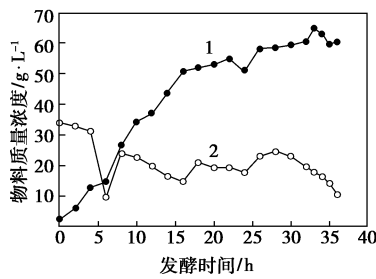
### 2.1 实验室试验结果

实验室试验在 10 L 发酵罐中进行,分别考察了发酵粗甘油和纯甘油为原料的发酵试验。以发酵粗甘油为原料的发酵试验共进行了 30.0 h,产物 1,3-丙二醇最高质量浓度为 79.98 g/L,生产效率为 2.61 g/(L·h);以纯甘油为原料的发酵试验共进行了 40.5 h,OD 值达到 14.00 以上,1,3-丙二醇最高质量浓度为 81.45 g/L,生产效率为 2.01 g/(L·h)。

### 2.2 中试结果

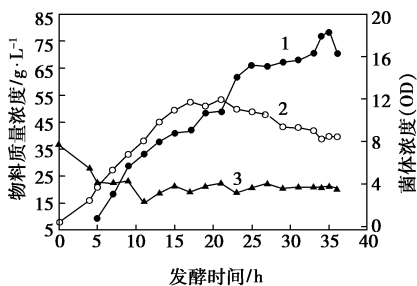
#### 2.2.1 1 m<sup>3</sup> 规模发酵罐的发酵试验结果

中试首先利用 1 m<sup>3</sup> 规模的发酵罐进行,同样以发酵粗甘油和纯甘油为原料进行了厌氧批式流加发酵试验,试验结果如图 1、图 2 所示。从试验结果可以看出,发酵粗甘油的发酵结果比纯甘油的发酵结果要差些。在 33.0 h 的发酵时间里,以发酵粗甘油为原料,最终发酵液中 1,3-丙二醇质量浓度为 64.6 g/L,得率为 54.5%,生产效率为 1.96 g/(L·h);而以纯甘油为原料发酵的 1,3-丙二醇质量浓度为 74.6 g/L,得率为 61.2%,生产效率为 2.26 g/(L·h)。



1—1,3-丙二醇;2—粗甘油

图 1 1 m<sup>3</sup> 罐发酵粗甘油厌氧批式流加发酵结果



1—1,3-丙二醇;2—菌体浓度;3—纯甘油

图 2 1 m<sup>3</sup> 罐纯甘油厌氧批式流加发酵结果

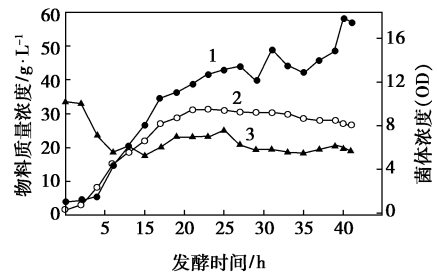
以纯甘油为原料,容积规模为 1 m<sup>3</sup> 发酵罐的中

试试验结果基本上与实验室试验结果持平,个别指标甚至高于实验室试验结果,说明该研究所采用的工艺路线是可行的,完全具有进行工程放大的能力。

另外,以发酵粗甘油为原料的试验结果差于以纯甘油为原料的试验结果的原因可能有 3 方面:首先是由于发酵粗甘油中焦糖含量较高,在发酵控制过程中,无法用电磁阀实现自动控制,只能人为手工控制,造成局部抑制现象;二是发酵粗甘油本身浓度不高,质量分数仅为 85% 左右,因此使得发酵液的体积增大,造成 1,3-丙二醇产品含量较低;三是发酵粗甘油原料本身其他杂质存在的影响。

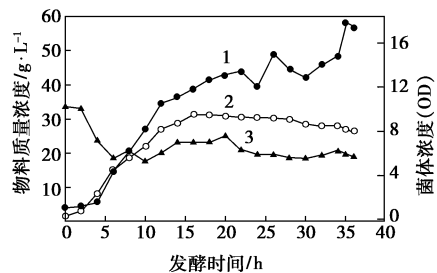
#### 2.2.2 20 m<sup>3</sup> 规模发酵罐的发酵试验结果

以 1 m<sup>3</sup> 发酵罐中试试验为基础,以纯甘油为原料,进行了容积规模为 20 m<sup>3</sup> 发酵罐的中试发酵试验,获得了更大规模的试验数据。2 次 20 m<sup>3</sup> 规模发酵罐的厌氧批式流加发酵试验结果分别如图 3、图 4 所示。



1—1,3-丙二醇;2—菌体浓度;3—纯甘油

图 3 20 m<sup>3</sup> 罐纯甘油厌氧批式流加发酵结果



1—1,3-丙二醇;2—菌体浓度;3—纯甘油

图 4 20 m<sup>3</sup> 罐纯甘油厌氧批式流加发酵结果

从发酵结果可以看出,20 m<sup>3</sup> 发酵罐试验结果要差于 1 m<sup>3</sup> 发酵罐的试验结果。在相同的发酵时间里,2 次发酵结果的平均数据如下:1,3-丙二醇质量浓度为 63.9 g/L,得率为 49.9%,生产效率为 1.87 g/(L·h)。

比较试验结果发现,实验室试验发酵罐(10 L)的结果要好于容积为 1 m<sup>3</sup> 的发酵罐,而 1 m<sup>3</sup> 发酵罐的试验结果则要优于 20 m<sup>3</sup> 发酵罐。表面看起来是

反应器放大带来的负效应,即随着发酵装置的增大,目标产物的浓度反而下降。但仔细分析会发现,设备和操作的差异是不容忽视的影响因素。中试采用批式流加底物发酵的目的在于减少底物的抑制作用<sup>[10]</sup>,这样流加物料的位置和流加方式应随着发酵罐体积增大而相应调整,从而使发酵液的传质快速均匀。10 L 发酵罐体积小、物料传质快,流加的底物和碱液分布更均匀,相应的产物浓度较高。1 m<sup>3</sup> 和 20 m<sup>3</sup> 的发酵罐都在罐顶单点加碱和补料,罐体自身的搅拌和传质效果较差,另外随着设备体积增大,单位时间内加碱和补料的量也加大,因此造成的局部抑制作用增强。这一点从各罐的菌体浓度 OD 值上也能看出差别,10 L 发酵罐试验的 OD 值最高可以达到 14.00 以上,1 m<sup>3</sup> 发酵罐试验 OD 值最高为 11.97,而 20 m<sup>3</sup> 发酵罐中的菌体浓度 OD 值最高仅为 10.32。另外 20 m<sup>3</sup> 发酵罐内菌体发酵到 30.0 h 后有死菌体出现,而在 10 L 发酵罐中则未发现该现象。如果改变发酵罐的搅拌形式、增大径高比值、改单点补料为多点多位置补料,在大型发酵罐中得到浓度较高的 1,3-丙二醇是完全可能的。

### 2.2.3 产品分离与聚合试验结果

在中试发酵试验的同时,笔者采用发酵液醇沉预处理、再精馏的专利技术<sup>[11]</sup>,完成了 1,3-丙二醇产品分离的小试工艺研究。并利用该工艺对中试试验得到的发酵液进行了分离精制处理,得到了外观无色透明、澄清的 1,3-丙二醇产品,产品纯度 > 99%,分离收率 > 85%。经聚合试验证明,该产品质量达到了 PTT 聚合指标要求。

### 2.2.4 技术经济分析

表 1 以玉米淀粉为原料两步发酵法生产 1,3-丙二醇  
单位产品成本估算表

项目	单耗/t	单价/元·t <sup>-1</sup>	金额/元
原料			
玉米淀粉	5.94	1700	10098
辅助原料			1572
燃料及动力费用			
蒸汽	10	70	700
电耗	3500 kWh	0.60 元/kWh	2100
新鲜水	100	0.47	47
循环水	60	0.30	20
分离成本			3000
其他费用			2000
成本合计			19537

依据中试技术指标,结合该课题组提出的两步发酵法生产 1,3-丙二醇的专利技术<sup>[12-13]</sup>,并借鉴国内成熟的淀粉发酵法生产甘油工艺<sup>[14-15]</sup>,笔者进行了以玉米淀粉为原料经两步发酵生产 1,3-丙二醇的成本估算,结果见表 1。采用两步发酵法生产 1,3-丙二醇的成本为 1.95 万元/t,与目前化学法生产成本 1.70 万~2.10 万元/t 相比较,生物法与化学法有可竞争性,具有很好的发展前景。

## 3 结语

在 1 m<sup>3</sup> 发酵罐规模上进行的中试结果表明,发酵液中目标产物 1,3-丙二醇的平均质量浓度达到 74.6 g/L,纯甘油到 1,3-丙二醇的平均得率为 61.2%,平均发酵时间为 33.0 h,平均生产效率为 2.26 g/(L·h),另外又以发酵甘油粗产品为原料进行了试验。采用醇沉预处理、精馏的专利技术得到了纯度大于 99% 的 1,3-丙二醇产品,满足了 PTT 生产的聚合试验要求。在 20 m<sup>3</sup> 发酵罐规模上进行了初步的中试试验,得到了比较好的试验结果,为进一步工业试验提供了可靠的依据。

微生物发酵法中试生产 1,3-丙二醇是以可再生的生物质资源淀粉或甘油为原料,取代传统的石油原料,具有绿色加工业的特征,涉及农产品深加工、纺织、化工、环境等诸多行业。虽然目前生物法生产 1,3-丙二醇尚未实现产业化,但它以生物技术为特征的“绿色工业”向传统的石油化工提出了强有力的挑战,尤其是在全球原油短缺、环境污染趋于严重的情况下,以廉价的可再生资源生产大宗的化工产品,更具有长远的战略意义和社会效益。

## 参考文献

- [1] Biehl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial production of 1,3-propanediol[J]. Appl Microbiol Biotech, 1999, 52: 298-297.
- [2] 汪朝阳. 2003 年美国绿色化学挑战奖[J]. 当代化工, 2004, 33(1): 51-54.
- [3] E I Du Pont de Nemours and Company. Process for making 1,3-propanediol from carbohydrates using mixed microbial cultures: US, 5599689[P]. 1997-02-04.
- [4] RUHRCHEMIE AG. Process for purifying 1,3-propanediol: US, 5008473[P]. 1991-04-16.
- [5] Deckwer W D. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1995, 16: 143-149.

(下转第 60 页)

结晶时体系的 pH 为其等电点。但现有的生产工艺中由于溶剂甲醇需循环利用,反应过程中带入体系的游离氨逐渐在回收的甲醇中累积到饱和浓度(质量分数为 1.5%),使回收的甲醇呈明显的碱性,pH 达到了 12 以上。现有生产工艺存在两大主要问题:

(1) 产品甘氨酸的收率受到影响。回收甲醇中游离氨的存在增加了甘氨酸在甲醇-水体系中的溶解度,从而使工业生产中甘氨酸的收率不高,一般仅为 80% 左右。

(2) 部分游离氨在生产过程中从体系中逸出,污染环境并导致车间工作环境恶化。

上述问题的存在严重影响到甘氨酸生产的经济效益,同时影响到工人身体健康,并且污染环境。

## 2 工艺方案的选择

要解决上述 2 个问题,最直接的方案是将系统中的游离氨除去。经分析,系统中的氨来源于 2 条途径:一是通入氨的反应过程中,少量氨残留于合成液中;二是催化剂乌洛托品在母液精馏过程中发生部分分解反应形成的氨。这 2 条途径产生的氨通过甲醇的循环利用而逐渐在溶剂甲醇中累积,因此除去回收甲醇中的氨,防止体系中氨的累积,就能显著降低体系中的游离氨含量。脱除系统中的游离氨可采用化学法和物理法。

(1) 化学法。采用加酸中和的方法来除去回收甲醇中的氨,可以通过精确地调整体系的 pH 至甘氨酸的等电点,但这样会生成大量的铵盐(氯化铵或硫酸铵)。铵离子的增加必然影响反应副产物氯化铵的溶解度,从而加大结晶过程中甲醇的用量。例如用盐酸进行中和,氯化铵在醇析体系中的饱和浓度约为 9% (质量分数),通过计算知生产每吨甘氨酸需增加甲醇用量约 3 t,增加成本近 400 元,经济性较差。

(2) 物理法。氨在甲醇中的溶解度随温度的变化非常敏感(见表 1),因此可以采用汽提的方法来除去回收甲醇中的氨。将原有的常规甲醇精馏塔(如图 2(a)所示)改进为带汽提装置的甲醇精馏塔(如图 2(b)所示),该方案充分利用了甲醇精馏塔塔顶气相出料的潜热,只需在解吸塔底部提供少量的热能,就可使回收甲醇中游离氨的质量分数降低至 0.01% 以下。

表 1 氨在甲醇中的溶解度

温度/°C	0	15	25	64.5
溶解度/mL·mL <sup>-1</sup>	29.3	21.6	16.5	0

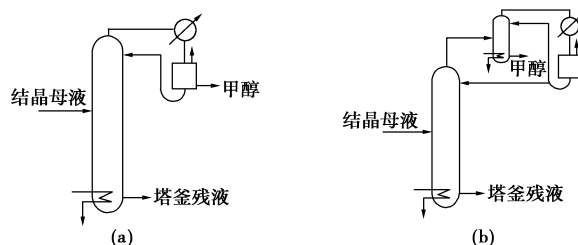


图 2 甲醇回收装置的改造方案示意图

## 3 改进后的甲醇回收装置工艺流程

该系统改造主要采用物理法进行,甘氨酸生产过程中产生的结晶母液主要含有甲醇、水、氯化铵、甘氨酸、乌洛托品及少量未反应的反应物,置于母液槽中。甲醇回收塔为填料塔,塔顶气相馏出物作为甲醇解吸塔的进料。控制甲醇回收塔塔釜温度为 115 ~ 120 °C,塔釜残液中甲醇质量分数在 1% 以下。塔釜残液去残液处理工序,经浓缩结晶后得副产品氯化铵。甲醇解吸塔塔顶出料经冷凝,含氨量较高的甲醇全部用于甲醇回收、解吸 2 个塔的回流,不凝性气体主要为氨气,通过氨吸收塔用水吸收为氨水。控制甲醇解吸塔塔釜温度为 64 ~ 65 °C,就能保证

(上接第 58 页)

[6] Zeng A P, Biehl H. Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1, 3-propanediol production and the new trends[J]. *Adv Biochem Eng/ Biotechnol*, 2002, 74: 239 - 259.

[7] E I Du Pont de Nemours and Company. Production of 1, 3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing recombinant diol dehydratase: US, 5821092[P]. 1998 - 10 - 13.

[8] Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung mbH. Fermentive production of 1, 3-propanediol: US, 5254467[P]. 1993 - 10 - 19.

[9] 修志龙. 微生物发酵法生产 1, 3-丙二醇的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2000, 27(4): 300 - 302.

[10] 刘海军, 王剑峰, 张代佳, 等. 用克雷伯氏菌批式流加发酵法生产 1, 3-丙二醇[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 25(7): 4 - 7.

[11] 大连理工大学. 微生物发酵液中提取分离 1, 3-丙二醇的方法: 中国, 03133584. 5[P]. 2005 - 02 - 23.

[12] 大连理工大学. 两步微生物发酵生产 1, 3-丙二醇的方法: 中国, 01138769. 6[P]. 2004 - 09 - 08.

[13] 大连理工大学. 一种微生物微氧发酵生产 1, 3-丙二醇的方法: 中国, 01117282. 7[P]. 2005 - 06 - 01.

[14] 邹世能, 刘得忠. 发酵法生产甘油[J]. *日用化学工业*, 1997(1): 41 - 43.

[15] 诸葛健, 方慧英. 发酵法生产甘油的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 1994(4): 65 - 70. ■