

六级连续化膜生物反应工艺在丙烯酰胺生产中的应用研究

孙旭东¹, 于慧敏¹, 罗 晖², 沈忠耀¹

(1. 清华大学化学工程系生物化工研究所, 北京 100084; 2. 北京科技大学环境工程系, 北京 100083)

摘要:以自由细胞替代固定化细胞, 成功设计了六级连续化中空纤维膜生物反应器新工艺, 应用于丙烯酰胺的微生物转化过程, 并对其操作工艺和可行性进行了研究。结果表明: 在 15℃ 下, 该六级连续化过程稳定运行 80 h 时, 丙烯腈的转化率达 99.9% 以上, 丙烯酰胺产物浓度达 434.23 g/L, 生产效率达到 0.01526 mol/(L·min), 生产效率比固定化细胞批次反应提高了一倍以上, 产品溶液浓度提高 50% 以上。中空纤维膜可以使反应液和菌体得到有效的分离, 且在反应液中没有检测到副产物丙烯酸。新工艺实现了丙烯酰胺的稳定连续化生产。

关键词:自由细胞; 丙烯酰胺; 微生物连续转化; 中空纤维膜生物反应器

中图分类号: TQ225.261; TQ920.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2006)07-0045-04

Continuous bioconversion of acrylamide using a six-stage hollow-fiber membrane bioreactor

SUN Xu-dong¹, YU hui-min¹, LUO Hui², SHEN Zhong-yao¹

(1. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Department of Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: A new process of six-stage hollow-fiber membrane bioreaction system was designed for microbial continuous bioconversion of acrylamide from acrylonitrile, in which free cells of *Nocardia* was used to substitute the immobilized ones. The operating feasibility of the new system was studied. The results showed that the conversion rate of acrylonitrile, the concentration of acrylamide in the output solution and the final productivity reached 99.9%, 434.23 g/L and 0.01526 mol/(L·min), respectively, after steady running for 80h at 15℃, resulting in one-fold increase of productivity and 50% increase of product concentration compared with the traditional batch biocatalysis technique using immobilized cells as biocatalysts. Further studies showed that the product acrylamide could be separated well from the free cells with no by-product, acrylate acid, which ensured a favorable foreground of the new technique for industrial application.

Key words: free cell; acrylamide; microbial continuous bioconversion; hollow-fiber membrane bioreactor

丙烯酰胺(AM)是一种用途广泛的有机化工原料, 主要采用微生物转化法生产, 其主要生产工艺是以丙烯腈(AN)为底物, 以固定化细胞为生物催化剂, 在搅拌反应罐内进行间歇式水合反应。这种固定化细胞的批次反应方式存在较多缺点, 如固定化细胞容易破碎, 给后续处理带来麻烦、生产过程不连续, 致使产品质量不稳定以及生产效率不高等。优化设计出新的反应器和反应工艺以实现更高的生产效率, 已经成为其研究热点^[1-7]。采用游离细胞代替固定化细胞作为催化剂, 以长期稳定的连续化生产方式代替批次操作是丙烯酰胺微生物法工业应用的发展趋势。而具有反应与膜分离耦合特点的膜生

物反应器可以实现游离细胞催化反应的连续化过程, 并已经在蛋白水解^[8]、污水处理^[9-12]、多糖水解^[13]等领域得到广泛的应用。笔者在膜生物反应器的设计及单级非稳态、单级拟稳态工艺探索的基础上^[14], 进一步设计了全新的六级中空纤维膜生物反应器系统, 进行丙烯酰胺的游离细胞催化及多级连续化转化研究。

1 实验部分

1.1 游离细胞生物催化剂的制备

野生诺卡氏菌株 *Nocardia* YS-2002 来自山东胜利油田, 培养基配方同文献^[14]。将菌种从平皿转

收稿日期: 2006-04-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(20206014); 全国百篇优秀博士学位论文作者专项(200345)资助

作者简介: 孙旭东(1975-), 男, 博士, 研究方向为生物催化和生物分离; 沈忠耀(1937-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为生物化工, 通讯

联系人, 010-62788568, szy-dce@tsinghua.edu.cn。

接于 1 000 mL 发酵摇瓶中,培养基装液量为 100 mL,于 28℃ 下培养 96 h,摇床转速 240 r/min。发酵液在 4℃ 下冷冻离心(10 000 r/min),获得菌体,洗涤离心后用磷酸钾缓冲溶液重悬,配制菌体质量浓度为 15 g/L 的菌体重悬液,酶活为 3 000 U/mL,直接作为生物催化剂使用。

1.2 分析方法

采用气相色谱法内标法测定丙烯酰胺、丙烯腈浓度,内标物为乙酰胺。气相色谱操作条件如下:GC-9AM 气相色谱仪;不锈钢填充柱,填料为 Porapak Q,长 2 m,内径 4 mm,柱温 180℃,进样室和检测室温度 220℃,载气为氮气,流速为 30 mL/min。

1.3 单级中空纤维膜生物反应器的设计

单级中空纤维膜生物反应器采用内置式,膜件采用聚砜膜或聚偏氟乙烯膜。膜生物反应器的选型与设计及膜件的评价与选择参见文献[14]。

2 实验结果与讨论

2.1 六级连续化中空纤维膜生物反应工艺的设计

在丙烯酰胺的微生物催化过程中存在产物抑制和底物抑制问题,生物催化剂脲水合酶对环境也比较敏感,容易失活^[15]。在之前的研究中已经对膜生物反应器中的单级非稳态工艺过程^[16]和多级拟稳态工艺过程进行了研究^[17]。虽然和固定化细胞反应工艺相比都有一定的优越性,但这 2 种工艺过程中也存在一些缺点,如单级非稳态工艺过程虽然简单高效,但过程不连续,生产不稳定,同时不适合生产高浓度的产物溶液;多级拟稳态工艺的设计一定程度上解决了单级拟稳态工艺中生产效率低、转化率低的问题,但设备中引入了过多的膜分离组件会导致设备投资成本的上升,另外菌体在各级间不流动,菌体利用率较低,过程不经济。

而应用多级膜生物反应工艺则可根据不同的反应环境,分级利用菌体酶活,从而提高酶活的综合利用效率,并能够提高底物转化率和生产能力。笔者进一步采用多级串联全混釜和中空纤维膜组件耦合的思想设计了六级连续化工艺过程,如图 1 所示。该工艺可以分为 2 个区域,即反应区(第 1 级到第 5 级)和完成区(第 6 级)。在反应区里,第 1 级按照一定的比例流加丙烯腈和水,其他各级则根据实际的反应速度流加丙烯腈,因此丙烯酰胺浓度逐级升高。最后一级为完成级,主要是将剩余的丙烯腈转化完全,以提高底物的转化率。完成级和中空纤维膜组件连接,实现反应与膜分离的耦合。游离细胞随着

反应体系由丙烯酰胺低浓度级流向高浓度级,并随着反应过程的进行而逐渐失活。在完成级中游离细胞的酶活性已经很低。在完成级后通过膜分离得到高浓度的丙烯酰胺溶液,而游离细胞则在完成级中截留下来。因此随着反应过程的进行,完成级中的菌体浓度越来越高。当游离细胞浓度累积到一定程度时,可以通过中空纤维膜组件分离出一部分失活的菌体,排出体系。由于完成级中的产物浓度接近游离细胞酶失活的临界浓度,因此细胞在这个反应环境中失活非常快,只有通过这种菌体的不断补充,才能使完成级在高浓度的丙烯酰胺环境中维持一定的反应速度,达到高的丙烯腈转化率。

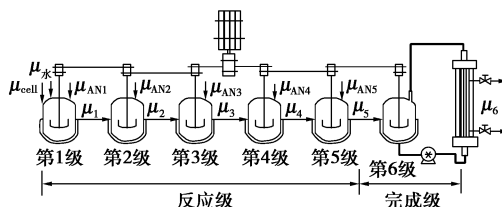


图 1 六级连续化工艺流程示意图

每一个反应罐体积为 250 mL,各级搅拌桨为金属搅拌桨,六级搅拌均由一个三相交流电机同步带动,转速为 700 r/min。各级间有导管可以相互串联,导管间由硅胶管连接,硅胶管间设计放空口,用于排气,保证各级之间反应体系流动通畅。反应罐底部设计取样口,便于对反应体系进行取样监控。各级均采用夹套冷却,冷却水出入口用硅胶管连接,冷却水来自低温浴槽,从第 6 级进入体系,从第 1 级流出返回低温浴槽。另外,因反应罐为不锈钢材料,需要在夹套外壁加保温材料。

各级均设有丙烯腈加料口,通过蠕动泵从丙烯腈储罐向各级加料,由于蠕动泵对丙烯腈流量控制不准,因此采用滴液管控制各级丙烯腈的加料速度。原料水和新鲜菌液在菌液稀释罐中按照一定比例混合,作为向第 1 级流加的原料水和生物催化剂,用蠕动泵流加,并通过流量计控制流量。应用的中空纤维膜组件为聚偏氟乙烯材料,膜面积为 0.3 m²。

2.2 六级连续化工艺的可行性实验过程

由于各级反应热不同,加上冷却水由第 6 级向第 1 级流动,因此导致各级控制温度有所不同,一般控制在 15~17℃,随着级数的增高温度降低。每一级反应体系体积定为 200 mL,各级菌液体积分数为 5%。菌液流加罐中用中性的去离子水和菌液混合成菌液体积分数为 5% 的游离细胞稀释液,作为向

第1级流加的原料和催化剂来源。

根据物料衡算,设定各级初始反应参数,包括各

级初始产物浓度、各级原料流加速度 μ 等,如图2所示。

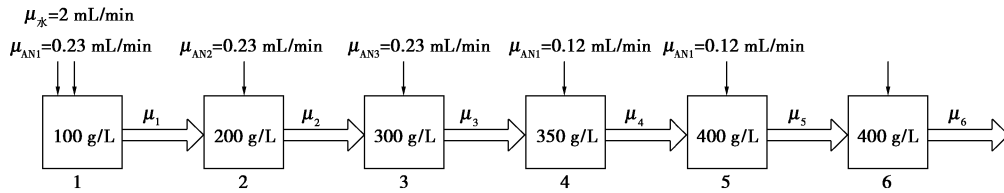
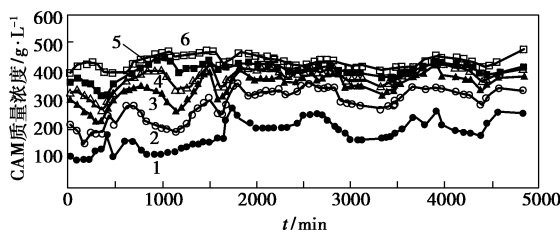


图2 六级连续化反应过程中各级初始反应参数设定

以上设定仅是各级的初始状态,达到各级体系平衡是一个动态平衡的过程,需要在反应过程中对于各级反应体系中的产物浓度和底物浓度进行监控,并且根据监控结果,不断地进行调整。在反应过程中保持原料水和菌液混合液的进料速度不变,主要调整各级丙烯腈的流加浓度,使其在各级中的浓度保持在一定的范围内,保证反应过程的稳定连续化运行。各反应级间反应体系的流动主要靠位差的压力推动,由于体系流速比较小(2~3 mL/min),各级间位差不明显,因此各反应级的体积基本保持相等。

从理论上讲体系流动速度和原料流加速度的确定意味着各体系中菌体浓度的确定,菌体浓度决定了体系实际反应速度,而反应速度又决定了体系的产物浓度和底物的转化率,同时产物和底物浓度又决定了菌体的失活速度和体系实际反应速度。因此在各级反应过程中,各项参数实际上是保持一种动态平衡。

经过80 h的操作,该六级连续化工艺过程的可行性得到了验证。整个工艺过程达到动态平衡,各级产物浓度,实际生产速度都能够维持动态平衡。在操作时间达到40 h时,完成级中的菌体浓度已经达到了比较高的程度,通过切换中空纤维备用膜组件对完成级中的部分菌体进行分离,排除一部分失活菌体。由于膜组件的切换,菌体排出的过程不会对连续化过程造成影响。各反应级的监控频率为1 h。各反应级丙烯酸胺浓度的监控曲线如图3所示。



曲线标号对应各级反应器

图3 多级连续化过程中各反应级产物浓度变化

从控制结果来看,各级产物浓度控制得不是很稳定,特别是前面几级,产物浓度变化更大,这主要是因为人工测定和手动控制的缘故,以及控制的频率不够,另外对于各级丙烯腈流加速度的控制精度也不够准确。如果能够实现计算机在线检测和自控控制,则能够进一步提高各级反应过程的稳定性。但从总体上来看,整个反应过程是稳定的,底物不会在反应体系中累积,从完成级中采出高浓度丙烯酸胺溶液中底物浓度接近于零,转化率达到99.9%。

对于各反应级的动态平衡数据总结如表1所示。

表1 各反应级动态平衡数据总结

反应级数	1	2	3
产物平衡浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	183.5213	286.7917	347.3438
各级平均反应速度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	0.03872	0.02178	0.01278
反应级数	4	5	6
产物平衡浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	381.4192	409.1365	434.2278
各级平均反应速度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	0.007196	0.005846	0.005297

2.3 六级连续化工艺的可行性实验总结

从整个反应过程来看,共操作80 h,得到丙烯酸胺溶液14.4 L,产物质量浓度达到了434.23 g/L,中空纤维膜组件的平均出料速度为3 mL/min。菌液总用量为580 mL。对于该可行性实验的总结如表2所示。

表2 六级连续化过程可行性实验数据总结

操作时间/h	产物质 量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	生产产 物量/ g	菌液总 用量/ mL	菌体利用率/ $\text{g}(\text{AM})\cdot\text{mL}^{-1}$ (菌液)	生产效率/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
80	434.227	6292.8	580	10.849	0.01526

从表2中可以看出,通过六级连续化工艺过程,达到了高效率的产出高浓度丙烯酸胺溶液的理想效

果,生产效率达到了 $0.01526 \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$,产物丙烯酰胺的质量浓度达到了 434 g/L 以上,该产物浓度已经接近菌种所能承受的极限浓度。和传统的固定化细胞反应工艺过程相比,其生产效率提高了 1 倍以上,产物浓度提高了 50% 以上,如表 3 所示。

表 3 六级连续化过程和固定化细胞反应工艺过程对比

操作方式	产物质 底物转 菌体利用率/生产效率/		过程评价		
	量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	化率/ % $\text{g}(\text{AM})\cdot\text{mL}^{-1}$ (菌液)		$\text{mol}\cdot$ $(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$	
固定化细胞反应工艺过程	250	99.9	10.00	0.008	不稳定,不连续
六级连续化稳态工艺过程	434	99.9	10.85	0.015	稳定,连续

若能够使用酶稳定性更高的基因工程菌株或者驯化改良菌种,则能够进一步地提高最终产物浓度。和膜生物反应器的其他几种工艺相比^[15-16],该工艺过程的高生产效率和产物浓度的优越性也表现得非常明显,同时该过程流程简单、设备投资小,因此具有更好的工业应用前景。

参考文献

[1] Hwang J S, Chang H N. Biotransformation of acrylonitrile to acrylamide using immobilized whole cells of *Brevibacterium* CH1 in a recycle fed-batch reactor[J]. J Biotech and Bioeng, 1989, 34: 380 - 386.

[2] Lee C Y, Chang H N. Continuous production of acrylamide using immobilized *Brevibacterium* sp. CH2 in a two-stage packed bed reactor[J]. J Biotech Lett, 1990, 12: 23 - 28.

[3] Hwang J S, Chang H N. Continuous production of acrylamide by *Brevibacterium* sp. CH1 immobilized in a dual hollow fiber bioreactor[J]. J Biotech Lett, 1987, 9(4): 237 - 242.

[4] Rios G. M, Bernet N, Naouri P, et al. Bioconversion of acrylonitrile into acrylamide using a highly compact multi-phasic reactor[J]. J Chem Eng, 1991, 46: 43 - 45.

[5] Lee Y H, Chang H N. Biosynthesis of acrylamide from acrylonitrile in aqueous two phase system[J]. J Biotech Lett, 1989, 11: 23 - 26.

[6] Cantarella M, Spera A, Cesti P, et al. Synthesis of acrylamide by *Brevibacterium imperialis* CBS 489 - 74 resting cells in UF-membrane reactors[J]. AUDIC Conference Series, 1995, 1: 369 - 377.

[7] Cantarella M, Spera A, Canteralla L, et al. Acrylamide production in an ultrafiltration-membrane bioreactor using cells of *Brevibacterium imperialis* CBS 489 - 74[J]. J Membrane Sci, 1998, 147: 279 - 290.

[8] Belhocine D, Mokrane H, Grib H, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor[J]. J Chem Eng, 2000, 76: 189 - 196.

[9] 李雪辉, 王乐夫. 新型反应器-酶膜反应器[J]. 天然气化工, 2001, 26(2): 48 - 52.

[10] 杨琦, 文湘华, 孟耀斌. 膜生物反应器处理丙烯腈废水实验[J]. 环境科学, 2000, 3(2): 85 - 87.

[11] 顾平, 姜立群, 杨造燕. 中空纤维膜生物床处理生活污水的中试实验[J]. 中国给水排水, 2000, 16(3): 5 - 8.

[12] 徐又一, 石灯水, 王剑鸣. 环保领域中聚丙烯中空纤维膜生物反应器的研究[J]. 膜科学与技术, 2000, 20(2): 26 - 30.

[13] 朱宏吉, 胡金榜, 赵忠祥. 动态膜分离式连续化酶解装置生产果糖的研究[J]. 化学工业与工程, 1995, 12(4): 1 - 7.

[14] Sun X D, Shi Y, Yu H M, et al. Bioconversion of acrylonitrile to acrylamide using hollow-fiber membrane bioreactor system[J]. Biochem Eng J, 2004, 18: 239 - 243.

[15] 刘铭, 焦鹏, 曹竹安. 微生物法生产丙烯酰胺的生物催化剂-膾水合酶研究进展[J]. 化工学报, 2001, 52(10): 847 - 852.

[16] 孙旭东, 史悦, 于慧敏, 等. 游离细胞膜生物反应器法与固定化细胞法在丙烯酰胺微生物转化中的比较[J]. 现代化工, 2003, 23(6): 42 - 44.

[17] 孙旭东, 史悦, 于慧敏, 等. 三级连续化中空纤维膜生物反应工艺在丙烯酰胺微生物转化中的应用[J]. 化工学报, 2004, 55(1): 81 - 86. ■

《全国粉体加工设备购销指南》征订通知

《全国粉体加工设备购销指南》是由中国化工信息中心《现代化工》编辑部和中国粉体工业信息网联合编辑出版的一部汇集粉体行业全貌的参考书,收录了约 1 700 家国内和 110 家日本相关企业的产品信息。涉及的粉体加工设备包括粉碎、筛分、研磨、分级、固液分离、混合、选料、过滤、乳化、包覆、干燥、成型、烧结、供料、送料、输送、收尘、包装、环保及其他辅助设备。为了便于读者查阅,企业信息按地区分布排列,同时列出了产品索引,是粉体企业极好的宣传窗口。该手册已在 2003 年年底发行,定价 100 元(含邮寄费),欢迎广大读者订阅(通过邮局或银行均可)。

户名:北京中化信深达信息技术有限责任公司

账号:230101040001610

开户行:农行亚运村支行营业室

地址:北京安外小关街 53 号《现代化工》编辑部(100029)

电话:(010)64444105/4025 拨 842

联系人:杨瑞影