

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

孙旭东 史悦 于慧敏 沈忠耀

(清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084)

摘要: 研究和介绍了一种新的分离方法——游离细胞法,并用膜生物反应器分离细胞和产品,使其在丙烯酰胺微生物转化中得到了成功的应用。比较了它和固定细胞法的生产工艺、生产效率、产品质量以及生产成本等因素。研究表明,在丙烯酰胺微生物转化中,游离细胞法优于固定化细胞法。

关键词: 丙烯酰胺;游离细胞法;固定化细胞法;膜生物反应器

中图分类号:TQ033

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2003)06-0042-03

Comparisons of free cell reaction coupling with membrane separation with immobilized cell reaction process used in bioconversion for acrylamide

SUN Xu-dong, SHI Yue, YU Hui-min, SHEN Zhong-yao

(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The free cell reaction process was introduced and studied as a new separation method. It's successfully applied in the bioconversion for acrylamide to separate cell and products with membrane. According to the comparative study on the production process, productivity, product quality and product cost, free cell reaction coupling with membrane separation process is evidently superior to the immobilized cell reaction process.

Key words: acrylamide; free cell reaction; immobilized cell reaction; membrane bioreactor

1 概述

丙烯酰胺 (Acrylamide, AM) 是一种用途广泛的有机化工原料。丙烯酰胺是以丙烯腈 (AN) 为原料,通过水合反应生成的。传统的生产方法有硫酸水合法和铜系催化水合法。1985 年日本日东公司建成了世界上第一个以微生物法生产丙烯酰胺的工业装置,与铜系催化法相比,微生物法有许多优点:反应在常温、常压下进行,能降低能耗,提高生产安全性,丙烯腈的转化率达 99.9%,产品的纯度高,特别适合生产超高分子质量的聚丙烯酰胺等。

目前工业上丙烯酰胺微生物转化过程主要是通过细胞固定化后在搅拌反应罐内实现的,属批式间歇的操作方式。这种反应方式存在不少的缺点:固定化细胞容易破碎,生产过程不连续,致使产品质量

不稳定,生产效率不高。

菌体培养液经过洗涤后,直接作为酶源进行底物转化的过程,称为游离细胞法。游离细胞法作为生物催化的一种工艺形式,已经越来越广泛地在工业上得到应用^[1-10]。笔者研究了游离细胞法在丙烯酰胺微生物转化过程中的应用,并与固定化细胞法在酶对底物的转化效率、生产工艺和生产成本等方面进行分析比较。

2 生产工艺的比较

细胞固定化方法和游离细胞法的工艺流程比较如图 1、图 2 所示。在实际工艺过程中,引入了膜生物反应器来实现游离细胞和产品的分离。

在细胞固定化工艺中,一般应用海藻酸钙(或钡)或者聚丙烯酰胺来固定化细胞。但固定化细胞

收稿日期:2003-02-21

作者简介:孙旭东(1975-),男,博士研究生,研究方向为生物催化过程;沈忠耀(1937-),男,教授,博导,主要从事生物反应与分离工程研究,通讯联系人,sunxudong 99@mails.tsinghua.edu.cn。

方法的缺点是:①细胞固定化降低了酶的活性。由于细胞在固定化以后形成的传质阻力,导致单位质量的细胞所表现的酶活力下降。②固定化细胞的洗涤降低了生产效率。由于固定化后,颗粒中固定了发酵残液,因此需要进行反复的洗涤。③固定化细胞颗粒破碎。在生物转化中,固定化颗粒会破碎,使颗粒中的发酵残液和金属离子等进入反应体系,导致体系中离子浓度提高。反应结束后溶液中的电导率最高能够达到 $10\ 000\ \mu\text{s}/\text{m}$ 以上。大大增加了后续精制工艺中离子交换的负荷,一般需要经过阳离子柱、阴离子柱以及混合柱的处理,不仅增加了工艺复杂性,降低了生产效率,而且增加了生产成本。④细胞破碎或自溶以后释放出的蛋白和核酸等物质也会污染产品。

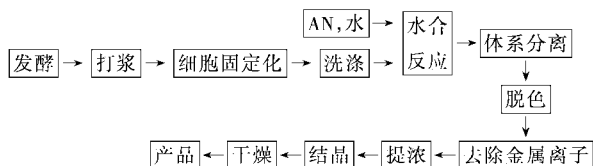


图1 固定化细胞催化生产工艺流程

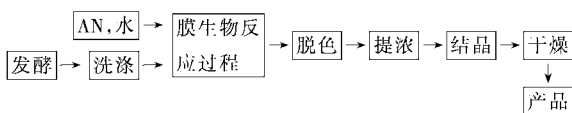


图2 应用膜生物反应过程的游离细胞法工艺过程

应用游离细胞法后省略了细胞固定化过程,不仅简化了工艺过程,而且提高了生产效率。其优点主要表现为:①酶活利用率提高,在反应过程中初始酶活较高,反应时间缩短,生产效率提高;②如果发酵液中的菌体经过多次洗涤,反应过程中不引入其他离子,则反应水合液的电导率较低,可以降到 $1\ 000\ \mu\text{s}/\text{m}$ 以下,降低了对离子交换精制工段的要求;③省去了固定化材料,降低了成本,简化了工艺过程,操作简单。

游离细胞法所带来的菌体分离问题可以通过离

心分离或者膜分离等方法来实现。虽然游离细胞直接面对底物和高浓度的产物环境,但由于反应快、时间短,对酶稳定性的影响不大,相对来说,酶的使用效率还是提高了。

游离细胞法结合离心分离的过程已经在工业化生产中进行了成功的尝试,但是离心机的投资较大、生产效率较低和能耗较高,使其大规模应用受到了限制,通过离心机分离菌体和水合液的方法并不能除去体系中的生物大分子杂质,如果水合液中蛋白质等杂质含量过高会直接影响丙烯酰胺产品的质量。本文的游离细胞法主要通过膜生物反应器的形式来实现,如图3所示。通过膜组件实现细胞和产品反应液的分离,引入膜过程可以在分离细胞的同时,高效地去除反应体系中所产生的蛋白质和核酸等大分子物质以提高产品的质量,如果选择截流相对分子质量 $50\ 000$ 的超滤膜则可以去除 90% 以上的蛋白杂质。

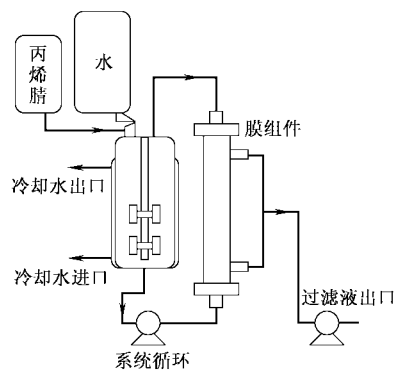


图3 游离细胞法的膜生物反应器

3 生产效率和菌体利用率比较

笔者对应用膜生物反应器的游离细胞法分别进行了实验室小试、工业化中试以及实际工业生产的应用试验,对一些主要的工业化指标进行了核算,并且和现有的工业化应用的细胞固定化方法进行了对比,具体数据如表1所示。

表1 游离细胞法和细胞固定化法部分工业化指标的比较

实验级别	反应方式	产物 AM 质量 分数/%	总操作时间/h	AN 转化率/%	菌体利用率 ^① / $\text{g}\cdot(\text{mL})^{-1}$	生产效率 ^② / $\text{g}\cdot(\text{mL}\cdot\text{h})^{-1}$
实验室小试(1 L)	游离细胞	28	16	99.9	12.48	0.78
中试(50 L)	游离细胞	30	15.3	99.9	12.66	0.827
工业化应用试验(6 000 L)	游离细胞	28	15.9	99.9	19.68	1.238
现有工业生产	固定化细胞	28	20	99.9	11.2	0.559

注:①菌体利用率为每毫升菌液所能生产得到的丙烯酰胺量;②生产效率指每毫升菌液每小时生产丙烯酰胺的量。

从表 1 中数据可以看出,应用膜生物反应过程的游离细胞法和目前工业上普遍采用的固定化细胞工艺过程相比,具有相当大的优势,前者的生产效率和菌体利用率大于固定化细胞法,从对比现有固定化工艺和应用膜生物反应器的游离细胞法的工业化试验数据来看,游离细胞法的生产效率和菌体利用率都提高了一倍左右。由此可以看出,游离细胞法的工业化应用将给丙烯酰胺的工业生产带来巨大的经济效益。

4 生产成本及工艺比较

从生产成本角度来比较,固定化细胞方法的工艺需要一定的设备投资,包括和固定化程序有关的设备,如打浆罐、造粒罐、清洗罐等,这些工序增加了生产成本。同时固定化材料的消耗,以及固定化颗粒清洗所用的大量水耗都会带来成本的增加。另外在后续工艺中由于产品电导率高,精制工序压力大,离子交换树脂的频繁再生和更换也会带来额外的成本。

游离细胞法结合离心机分离的工艺方式,这种工艺过程虽然可以应用游离细胞法,实现较高的生产效率和菌体利用率,但由于离心机分离细胞的效率较低,在批式水合反应过程中需要使用大量的离心机,而离心机的设备投资是比较大的,另外,离心机的能耗大,也会导致成本的增加。此外,离心操作中带来的升温会导致酶较快失活,这也是非常不利的因素。

表 2 不同工艺过程的工业应用评价

项目	固定化细胞法	游离细胞法 (离心机)	游离细胞法 (膜生物反应器)
工艺过程	复杂	简单	简单
操作控制	难	较复杂	易
产品质量	含有金属离子,固定化颗粒碎片等杂质,蛋白质量分数大于 10×10^{-6}	蛋白质量分数大于 20×10^{-6}	稳定,基本无杂质,蛋白质量分数小于 5×10^{-6}
菌体利用率	低	高	高
生产效率	低	高	高
生产能耗	较低	较高	低
设备投资	较高	高	较低

而在应用膜生物反应器的游离细胞法中,可以避免使用离心机的缺点,只要选择经济适用的膜组件,并在使用中保证膜组件一定程度的稳定性就可以使其生产成本较低。

固定化细胞法和游离细胞法工艺过程比较见表 2。

5 结论

20 世纪 70 年代以来,固定化技术的优越性不断被人们所认识,也越来越多地应用于生产。但对一种特定的酶促反应而言,究竟应选用游离细胞法还是固定化细胞法,则应根据酶的成本、酶的活性和稳定性以及工艺过程的特性等因素而定。在丙烯酰胺的微生物转化上,游离细胞法明显优于固定化细胞法,与结合离心机分离的游离细胞法相比,膜生物反应方式的应用进一步增加了游离细胞法工业应用的优越性,前者在设备投资、生产能耗以及产品质量方面和后者相比都缺乏竞争力。另外应用膜生物反应器的游离细胞法能够使连续生产方式成为可能,这将进一步推动丙烯酰胺工业的发展,具有非常大的工业应用前景。

参考文献

- [1] Chibata I, Kakimoto T, Kato. [J]. Appl Microbio, 1965, 13(5): 630 - 645.
- [2] 三菱油化株式会社.L-アラニン(丙氨酸)の製造法[P].日本公开特许,平 2-79989,1990-03-20.
- [3] 三菱油化株式会社.L-アラニン(丙氨酸)の製造法[P].日本公开特许,平 2-242690,1990-09-27.
- [4] 三菱油化株式会社.L-アラニン(丙氨酸)の製造法[P].日本公开特许,平 4-197190,1992-09-27.
- [5] 三菱油化株式会社.L-アラニン(丙氨酸)の製造法[P].日本公开特许,平 5-038292,1993-02-20.
- [6] Guillermo M Bisso, Federico Melelli. [J]. Process Biochem, 1986, 8(3): 113 - 117.
- [7] Dhillin G S, Nagascaeva T, Yamada H. [J]. Enzyme Microb Technol, 1987, 9(5): 277 - 280.
- [8] Mitsubishi Petrochemical Co Ltd. Process of culturing microorganisms of the genus pseudomonas and process for producing L-alanine using said microorganism [P]. EP 045170A2, 1991-04-26.
- [9] 徐虹,王雪根,朱建良,等. [J]. 工业微生物, 1997, 27(2): 17 - 20.
- [10] 徐虹,王雪根,欧阳平凯,等. [J]. 工业微生物, 1998, 28(1): 38 - 40.
- [11] 王雪根,徐虹,欧阳平凯. [J]. 南京化工大学学报, 1999, 21(3): 32 - 34. ■