

克雷伯杆菌微胶囊化生产 1,3-丙二醇的研究

陈宏文^{1,2} 陈瑜丽² 兰凤英² 方柏山² 胡宗定¹

(1. 天津大学化工学院生化工程系, 天津 300072; 2. 华侨大学生物工程与技术系, 福建 泉州 362011)

摘要: 研究了用高压微胶囊成型装置制备克雷伯杆菌 NaCS-PDMAAC 微胶囊生产 1,3-丙二醇。考察了 PDMDAAC 浓度对微胶囊性能的影响及推进速度、电压、针头内径对微胶囊直径的影响。摇瓶条件下, 微胶囊细胞连续发酵 10 批, 粒径 2.5 mm 的微囊得到最大 1,3-丙二醇浓度为 13.38 g/L, 发酵时间从游离培养的 34 h 缩短为 19 h, 最大生产能力为 0.60 g/(L·h), 比游离细胞提高 2.56 倍。

关键词: 1,3-丙二醇; NaCS-PDMAAC 微胶囊; 固定化

中图分类号: TQ223.162

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)S1-0138-03

Study on 1,3-propanediol production by immobilized *Klebsiella pneumoniae* in microcapsules

CHEN Hong-wen^{1,2}, CHEN Yu-li², LAN Feng-ying², FANG Bai-shan², HU Zong-ding¹

(1. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Department of Bioengineering & Biotechnology, Hua Qiao University, Quanzhou 362011, China)

Abstract: The production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in NaCS-PDMAAC microcapsules prepared in high-voltage electrostatic field was studied. The influence of PDMDAAC concentration on gel bead characteristics and its push speed, type of pinhead and voltage on microcapsule diameter were studied also. The encapsulated cells were fermented sequentially in 10 batches in shaking flasks, the maximum concentration of 1,3-propanediol was 13.38 g/L when the mean diameter of microcapsules was 2.5mm. The maximum 1,3-propanediol productivity was 0.60 g/(L·h), which was 2.56 times higher than that of free cells.

Key words: xylitol; NaCS-PDMAAC microcapsule; immobilization

1,3-丙二醇(1,3-PD)是一种重要的化工原料,它可作为抗冻剂、多种增塑剂、洗涤剂、防腐剂和乳化剂的合成原料,也可用于食品、化妆品和制药等行业,它最主要的用途是作为新型聚酯(如 PTT)、聚酯和聚亚氨酯的单体^[1]。1,3-PD 的生产方法有化学法和生物转化法,而 1,3-PD 的得率、浓度和生产能力一直是限制大规模发酵法生产的瓶颈。固定化细胞技术相对于游离细胞培养有助于提高生产能力、降低产品成本,在多种固定化技术中,NaCS-PDMAAC(聚二甲基二烯丙基氯化铵)生物微胶囊体系以其稳定的化学物理性质、良好的生物相容性、较高的机械强度以及制备简便的特点受到关注^[2]。近年来 NaCS-PDMAAC 生物微胶囊已在柠檬酸^[3]、乳酸^[4]、酒精^[5]等生物转化过程中取得成功,但目前还未见到有关 NaCS-PDMAAC 微胶囊生产 1,3-PD 的报道。笔者尝试用高压微胶囊成型装置^[6]制备

NaCS-PDMAAC 微胶囊,通过制备条件优化,力求缩短 1,3-PD 发酵周期,提高产品得率和生产能力。

1 材料和方法

1.1 实验材料和主要仪器

克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae* DSM 2026),来源于德国生物技术中心;微囊化材料 NaCS,浙江大学生物化工系提供;PDMDAAC,美国 Aldrich 公司;甘油、1,3-丙二醇等,上海化学试剂公司。

高压微胶囊成型装置,上海理工大学;HYG-II 旋转式恒温摇床柜,上海新蕊自动化设备有限公司;高速冷冻离心机,3K30,德国 Sigma;气相色谱仪 Agilent 6890,美国惠普。

LB 培养基:胰蛋白胨,10.0 g/L;酵母浸膏,5.0 g/L;NaCl,10.0 g/L,pH 7.0。

种子培养基:甘油,20.0 g/L;K₂HPO₄,3.4 g/L;

收稿日期:2004-06-07

基金项目:国家自然科学基金(20276026)和福建省自然科学基金重点项目基金资助(D0120002)

作者简介:陈宏文(1969-),女,博士生,讲师,主要从事生物化学工程研究;方柏山(1957-),男,教授,博士生导师,主要从事生物化学工程、基因工程研究,通讯联系人,0595-2691560, fangbs@hqu.edu.cn。

KH_2PO_4 , 1.3 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L; 酵母浸膏, 1.0 g/L; CaCO_3 , 2.0 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0×10^{-3} g/L; CaCl_2 , 2.0×10^{-3} g/L; 微量元素溶液, 2.0 mL/L。其中微量元素溶液含: ZnCl_2 , 0.07 g/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L; H_3BO_3 , 0.06 g/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.035 g/L。

发酵培养基: 甘油, 33 g/L; NH_4Cl , 6.70 g/L; KCl , 1.66 g/L; 酵母浸膏, 2.82 g/L; CaCl_2 0.28 g/L, pH 值 7.0。

1.2 培养方法

种子培养: 50 mL 种子培养基置于 250 mL 三角瓶, 接入 1 mL 经过活化、保存于 LB 培养基的菌液, 37°C 、120 r/min 旋转式摇床培养 24 h。

发酵培养: 500 mL 三角瓶装发酵培养基 250 mL, 接种量 5%, 37°C 、200 r/min 旋转式摇床微氧(三角瓶用棉花塞牛皮纸封口)培养 34 h。

1.3 微胶囊的制备和培养方法

配制含质量分数 5.0% 的 NaCS (20 mL) 和含有 0.9% 质量分数 NaCl 的一定浓度的 PDMDAAC (100 mL) 溶液, 121°C 灭菌 30 min 待用。无菌条件下, 将 5 mL 克雷伯杆菌种子液与 NaCS 溶液充分混合, 成为 4.0% 的 NaCS 菌悬液。在高压微胶囊成型装置形成的高压静电场中, 利用定量输液泵的推动, 将菌悬液通过注射器(一定型号针头)滴入磁力搅拌下的 PDMDAAC 溶液中, 针头距离液面 25 mm, 搅拌(固化)1.5 h, 收集微胶囊, 用无菌生理盐水充分洗涤, 去除表面残留的 PDMDAAC。将微囊化的克雷伯杆菌接入 250 mL 发酵培养基中, 37°C 、200 r/min 旋转式摇床培养, 定时取样分析, 当甘油耗尽时更换培养基。如此反复培养多批。

1.4 分析方法

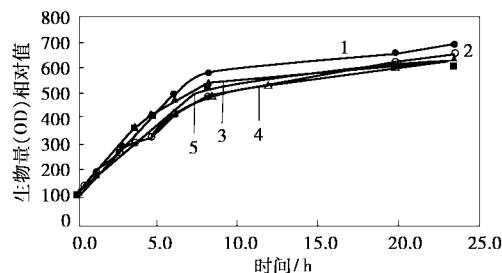
游离细胞含量测定采用光密度法 600 nm 测定, 甘油含量测定采用改进的高碘酸钠氧化法^[7]; 1,3-丙二醇用气相色谱法检测^[8]。微胶囊直径测量方法是取 20 个微胶囊, 用游标卡尺分别测其最大直径, 计算平均值即得单个微胶囊直径。

2 结果和讨论

2.1 PDMDAAC 对克雷伯杆菌生长的影响

考虑到合成高分子 PDMDAAC 可能会影响细胞的生长, 考察了培养基中含不同分子质量 ($< 2 \times 10^5$ g/mol 低分子质量和 400 ~ 500 g/mol 高分子质量)、

不同质量分数(1%和2%)的 PDMDAAC 对克雷伯杆菌生长过程的影响。以初始接种量 OD 值为 100%, 每隔一段时间取样, 稀释适当倍数, 测定其 OD 值(平行 3 次的平均值), 菌体在含不同浓度、分子质量的 PDMDAAC 培养基中的生长情况如图 1 所示。可看出菌体在含不同浓度和分子质量 PDMDAAC 和不含 PDMDAAC 培养基中的生长曲线基本吻合, 说明 PDMDAAC 对菌体生长的影响并不大, 它是一种具有良好生物相容性的微胶囊材料。



1—不含 PDMDAAC; 2—1% 高分子质量; 3—1% 低分子质量; 4—2% 低分子质量; 5—2% 高分子质量

图 1 不同浓度和分子质量 PDMDAAC 对菌体生长的影响

2.2 NaCS-PDMDAAC 微胶囊的制备方法优化

2.2.1 PDMDAAC 的浓度对微胶囊性能的影响

配制不同浓度不同分子质量的 PDMDAAC 溶液(含 0.9% 质量分数的 NaCl)制备微胶囊, 微胶囊的机械强度和外观特征如表 1 所示。由实验结果可知, 含质量分数 2% 的低分子质量 PDMDAAC 溶液制备微胶囊效果较好。

表 1 不同浓度和分子质量的 PDMDAAC 对微胶囊性能影响

质量分数及分子质量	机械强度	外观特征
2% 的低分子质量	较强	表面光滑, 弹性好, 膜厚 50 ~ 100 μm
2% 的高分子质量	较弱	表面欠光滑, 易破裂, 内含液体较多
6% 的低分子质量	较强	膜较厚, 内含液体较少
6% 的高分子质量	较弱	几乎不成囊, 轻轻晃动即破裂

2.2.2 输液泵推进速度对微胶囊直径的影响

固定电压 $4 \times 2/3$ kV (电压表刻度 4 格, 每格 $2/3$ kV), 选用 7# 针头, 调节不同推进速度, 微囊直径与推进速度的关系见图 2。由图可知, 开始微囊的平均直径随推进速度的提高而增大, 但当推进速度在 30 ~ 75 mm/h 之间时, 囊径变化不大, 基本上维持在 3 mm 大小。因此推进速度不适宜作为改变微胶囊

直径的主要参数。

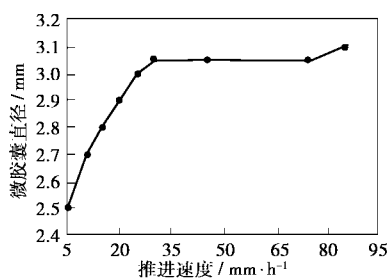


图 2 推进速度对微囊直径的影响

2.2.3 电压对微胶囊直径的影响

固定推进速度为 50 mm/h, 选用 7# 针头, 改变电压, 微囊直径与电压的关系见图 3。从图中可看出, 当电压小于 $3 \times 2/3$ kV 时, 囊径变化不大, 而电压从 $3 \times 2/3$ kV 增加到 $6 \times 2/3$ kV 时, 囊径从 3.0 mm 逐渐减小到 0.75 mm, 这说明在该电压范围内电压对囊径的影响较大, 因此电压可以作为改变微胶囊直径的主要参数。

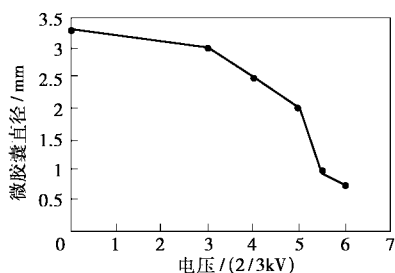


图 3 电压对微囊直径的影响

2.2.4 针头型号对微胶囊直径的影响

固定电压、推进速度, 改变不同针头型号 (4.5#、6#、7#、9#、12#), 尽管微囊直径随针头型号增加而增大, 但微胶囊直径的变化范围不大 (2.5 ~ 3.2 mm 之间), 因此可不把针头型号作为改变微胶囊直径的主要参数。

最后得到优化后制备微胶囊的条件: 采用含质量分数 2% 低分子量的 PDMDAAC 溶液作为制备微胶囊的反应液, 输液泵的推进速度为 50 mm/h, 选用 7# 针头, 通过改变电压制备不同囊径的微胶囊。

2.3 不同囊径微胶囊固定化多批次培养

通常在非高压静电场中, 通过手推得到的微囊直径约 4 mm, 利用高压微胶囊成型装置可制得 1.0 ~ 3.0 mm 不同囊径的微胶囊。在一定范围内, 随着微囊直径减小, 其与培养基接触的比表面积增加, 培养基扩散到微囊中心的距离缩短, 有利于提高传质效果。将各种粒径的微胶囊固定化细胞与游离细胞分别进行多批次培养, 以每批培养甘油耗尽时

间为发酵终点, 前 3 批的实验结果见表 2。可知对于第 1 批培养, 微胶囊细胞培养 1,3-PD 浓度就已接近游离细胞培养 (囊径 4.0 mm 微胶囊细胞除外), 囊径为 2.5 mm 微胶囊产 1,3-PD 的浓度高于游离细胞和其他粒径的微胶囊。第 2 批, 2.5 mm 微胶囊产 1,3-PD 浓度仍然最大, 到第 3 批时其依旧保持较高的生产 1,3-PD 能力, 重复使用的游离细胞转化能力下降较大。粒径为 1.0 mm 和 2.0 mm 的微胶囊分别培养到第 6 批、第 7 批时开始破裂, 到第 10 批破损程度较为严重, 有的甚至超过 40%, 粒径为 3.1 mm 和 4.0 mm 的微胶囊第 3 批开始破裂, 到第 6 批几乎全部破裂, 而粒径 2.5 mm 的微囊培养到第 10 批, 基本没有破损。因此, 对于克雷伯杆菌微囊化培养, 其囊径控制在 2.5 mm 较为理想。

表 2 前 3 批培养微囊直径与 1,3-PD 质量浓度的比较

微囊直径 / mm	1,3-PD 质量浓度 / g·L ⁻¹		
	第 1 批发酵 (34 h)	第 2 批发酵 (25 h)	第 3 批发酵 (19 h)
游离细胞	7.96	6.31	3.47
1.0	7.42	9.54	4.15
2.0	7.87	4.66	3.11
2.5	13.38	12.03	11.36
3.1	8.40	8.42	5.48
4.0	2.30	4.13	2.96

囊径 2.5 mm 微胶囊前 3 批发酵过程曲线如图 4。第 1 批克雷伯杆菌培养 34 h, 1,3-PD 质量浓度为 13.38 g/L。第 2 批培养 25 h, 1,3-PD 质量浓度为 12.03 g/L, 而第 3 批培养 19 h, 甘油就基本耗完, 1,3-PD 质量浓度为 11.36 g/L。从第 4 批开始直至第 10 批产 1,3-PD 的曲线与第 3 批基本一致。由此看出微胶囊固定化生产 1,3-PD 相比于游离培养, 1,3-PD 的发酵时间由 34 h 缩短为 19 h, 生产能力为 0.60 g/(L·h), 是游离细胞的 2.56 倍。NaCS-PDM-DAAC 微胶囊培养一般会使细胞浓度提高一个数量级 (10 倍)^[5], 高密度细胞培养有助于提高生产能力。实验结果也证明, 克雷伯杆菌在 NaCS-PDM-DAAC 微胶囊培养中实现了高密度细胞培养, 从而提高了 1,3-PD 的生产能力。笔者曾利用海藻酸钠-壳聚糖 (ACA) 微胶囊生产 1,3-PD, 其生产能力维持在 0.44 g/(L·h), 但重复利用 3 批后, 细胞开始破损, 而 NaCS-PDMDAAC 微胶囊重复利用 10 批后, 几乎没有明显变化, 仍可进一步使用, 其良好的机械强度充分体现出来。

(下转第 143 页)

促进了流体的溶解能力。但流量过大时,流体在萃取器内的停留时间相对减少,使溶质与超临界流体不能及时充分作用,DHA 萃取率的提高受到限制,导致流体的耗量增加,生产成本提高。与 SFE 相比,在相同的流体流量条件下,USFE 的萃取率高于 SFE 法萃取率;当萃取率相同时,USFE 法所需的流体流量低。

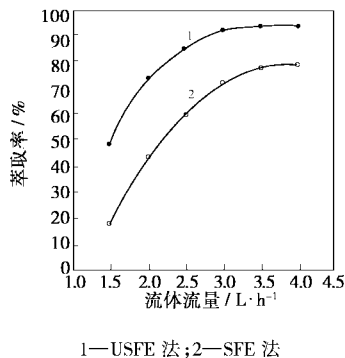


图4 超临界流体流量对 DHA 萃取率的影响

2.4 萃取时间对 DHA 萃取率的影响

图5表明,随着萃取时间的延长,萃取率不断提高。萃取一定时间后,萃取过程已基本达到平衡,再延长萃取时间,DHA 萃取率增加甚微。超临界流体萃取 DHA 的最适萃取时间为 3.5 h;通过超声强化 SFE 过程后,超临界流体的最适萃取时间缩短为 3

h。超声强化超临界流体萃取不仅可以缩短萃取时间,而且可以提高萃取率。

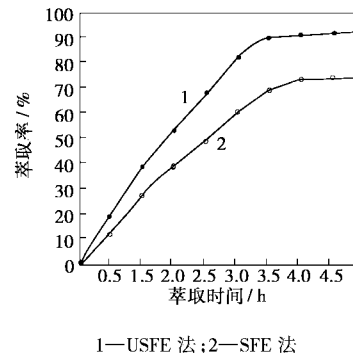


图5 萃取时间对 DHA 萃取率的影响

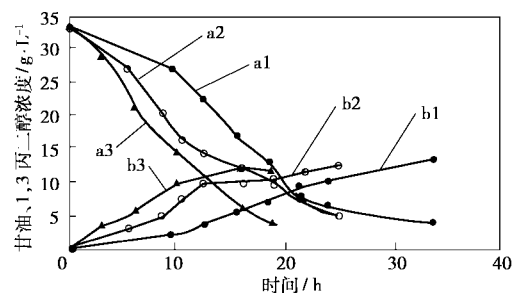
3 结语

以具有广阔开发潜力的海藻为原料,采用超声场强化超临界流体萃取,不仅可以降低萃取温度、萃取压力以及超临界流体的流量,而且还可以缩短萃取时间,提高萃取率,进而节约能耗。

参考文献

- [1] 马海乐,生物资源的超临界流体萃取[M].合肥:安徽科学技术出版社,2000.4-12.
- [2] 胡爱军,丘泰球.[J].精细化工,2001,18(12):736-740.
- [3] 胡爱军,丘泰球,梁汉华.[J].海洋通报,2002,21(2):84-91. ■

(上接第 140 页)



a 为甘油;b 为 1,3-PD,a 与 b 后的数字为批次

图4 2.5 mm 微胶囊前 3 批发酵过程曲线

3 结语

利用高压微胶囊成型装置制备出不同囊径的 NaCS-PDMAAC 生物微胶囊,并将其用于 1,3-PD 的固定化培养。实验结果表明,NaCS-PDMAAC 微胶囊对克雷伯杆菌具有良好的生物相容性,囊径

2.5 mm、2% 低分子质量 PDMDAAC 制得的微胶囊可实现高密度细胞培养,且大大缩短发酵时间,提高了生产能力,同时微胶囊可反复利用,显示良好的机械强度。

参考文献

- [1] Witt U, Muller R J, Augusta J, et al. [J]. Macromol Chem Phys, 1994, 195:793-802.
- [2] Manfeld J, Foster M, Dautzenberg H, et al. [J]. Enzyme Microbial Technology, 1995, 17:11-17.
- [3] Forster I, Mansfield J, Schellenberger A, et al. [J]. Enzyme Microbial Technology, 1994, 16:777-784.
- [4] 叶子坚,姚善泾.[J].微生物学报,2000,40(5):507-512.
- [5] 张惠勇,梅乐和,姚善泾.[J].生物工程学报,1999,15(3):297-300.
- [6] 陈爱政,王士斌,刘源岗,等.[J].山东生物医学工程,2002,21(4):21-23.
- [7] 王剑锋,修志龙,范圣第.[J].工业微生物,2001,31(2):33-35.
- [8] Menzel K, Zeng A P, Biehl H, et al. [J]. Biotech Bioeng, 1996, 52(5): 549-560. ■