

离子交换法吸附分离发酵液中的丙酸

郝廷^{1,2} 李强² 王鹏² 王云山^{2*} 马润宇¹ 苏志国²

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 中国科学院过程工程研究所国家生化重点实验室, 北京 100080)

摘要: 比较了9种弱碱性阴离子交换树脂对费氏丙酸杆菌发酵液中丙酸的静态和动态吸附性能。结果表明:树脂 ZGA330 对含有 12.6 g/L 丙酸的发酵液丙酸的静态吸附量最大, 吸附量为 44.9 mg/g; 动态吸附过程中对发酵液中主要营养成分糖、氨基酸吸附很少, 而对丙酸吸附量高达 205.5 mg/g。成功地通过树脂吸附将发酵系统中的丙酸分离出去, 实现了维生素 B₁₂ 的高密度发酵, 维生素 B₁₂ 的产量由 9.1 mg/L 提高到 13.1 mg/L, 增加了 0.44 倍。研究结果为丙酸的发酵与吸附分离耦合过程研究提供了基础, 丙酸吸附分离后的发酵液继续进行维生素 B₁₂ 发酵生产可以解除丙酸的抑制作用, 提高了维生素 B₁₂ 的产量。

关键词: 离子交换树脂; 丙酸; 吸附; 维生素 B₁₂

中图分类号: TQ028.3

引言

维生素 B₁₂ (VB₁₂) 即钴胺素 (cobalamin), 是一类含有钴的咕啉类化合物^[1]。费氏丙酸杆菌是 VB₁₂ 的重要工业生产菌之一^[2], 它在一定条件下可以合成脱氧腺苷钴胺素 (deoxyadenosylcobalamin) 并在细胞内积累。利用费氏丙酸杆菌发酵生产 VB₁₂ 为厌氧发酵过程, 具有能耗低、染菌概率小等优势, 而且在生长过程中不产生内毒素和外毒素, 符合医药和食品安全生产标准^[1]。

费氏丙酸杆菌发酵生产 VB₁₂ 的过程中将产生以丙酸为主的有机酸, 使得发酵液的 pH 值下降, 丙酸的积累严重抑制了细胞的生长^[3]。所以在发酵的同时如果能将发酵液中的丙酸选择性分离, 则可以解除丙酸对菌体生长的抑制作用^[4], 实现菌体细胞的高密度培养, 从而提高 VB₁₂ 的产量; 同时分离得到的丙酸也是重要的化工产品, 广泛用于食品、饲料、防腐添加剂等领域^[5]。

从发酵液中提取丙酸的方法很多, 如溶剂萃取法^[6]、超滤膜法^[7]、蒸馏法^[8]等。溶剂萃取中所用的溶剂毒性很大; 膜技术去除丙酸的过程中容易受

到膜污染和膜堵塞的影响; 蒸馏则较难除去副产物乙酸。而离子交换树脂选择吸附克服了其他分离方法的缺陷, 同时树脂对细胞毒性小, 有利于丙酸分离与发酵的耦合; 离子交换树脂与其他分离方法的耗材相比生产成本低, 而且可以重复利用; 分离过程操作简单, 劳动强度较低^[9]。与强碱性阴离子交换树脂相比, 弱碱性阴离子交换树脂对发酵液其他营养成分的吸附作用和对丙酸杆菌破坏作用都比较小。因此本文对丙酸等有机酸和发酵液中葡萄糖、氨基酸等营养成分具有选择吸附的弱碱性阴离子交换树脂进行了筛选。初步探索了从发酵液中提取丙酸的离子交换工艺, 为用于丙酸发酵和吸附分离耦合过程提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和培养基

菌种: 费氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium freudenreichii*) CICC: 10019, 购自中国工业微生物种保藏中心。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 35, 玉米浆 21, 硫酸铵 5, 磷酸二氢钾 4, 碳酸钙 4, 氯化钴 0.005, pH 7.0。

发酵培养基(g/L): 葡萄糖 60, 玉米浆 40, 磷酸二氢钾 4.6, 碳酸钙 5, 氯化钴 0.0127, pH 7.0。

1.1.2 树脂

ZGA454、ZGA456、D301、ZGA330、312、

收稿日期: 2008-01-14

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目资助 (KSCX2-YW-G-021)

第一作者: 男, 1980 生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: yswang@home.ipe.ac.cn

ZGD730, 杭州争光树脂有限公司; D301R、D301T、D380, 天津南开和成科技有限公司。树脂性能指标见表 1。

表 1 树脂的性能指标和静态吸附结果

Table 1 Properties of the resins and comparison of the results of static adsorption

树脂型号	骨架	功能基团	$Q_1/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$Q_2/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
ZGA454	丙烯酸系	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	45.7	32.7
ZGA456	丙烯酸系	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	46.6	14.5
D301	苯乙烯系	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	37.3	32.6
ZGA330	环氧系	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2-\text{C}_2\text{H}_4\text{NHR}$ $-\text{C}_2\text{H}_4\text{NR}_2-\text{C}_2\text{H}_4\text{NR}_3$	50.5	44.9
312	丙烯酸系	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	49.0	19.6
ZGD730	丙烯酸系	$-\text{N}^+(\text{R}_3)$	65.1	42.7
D301R	苯乙烯系	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	45.4	32.9
D301T	苯乙烯系	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$	49.4	33.2
D380	苯乙烯系	$-\text{NH}_2$	105.1	44.2

Q_1 为每 g 干树脂吸附丙酸溶液中的丙酸的质量; Q_2 为每 g 干树脂吸附发酵液中丙酸的质量

1.1.3 试剂

丙酸、乙腈, 色谱纯, 盐酸、氢氧化钠, 分析纯, 北京化学试剂公司。

1.2 实验仪器

2695 型 HPLC (Waters 2996 二极管阵列检测器), 美国 Waters 公司; SBA-40C 型生物传感分析仪, 山东省科学院生物研究所; Sartorius Arium 611UF 型纯水机, 德国 Sartorius 公司; XL-90 型大容量离心机, 美国 Beckman 公司; HYG-A 全温摇瓶柜, 太仓市实验设备厂; FE 411 型蠕动泵, 德国 B. Braun 公司; UNIC 7200 型分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 弱碱性阴离子交换树脂的预处理

采取三步处理法: 首先, 将树脂用去离子水浸泡 24 h 后, 用 1 mol/L HCl 溶液浸泡 4 h 去除树脂中的有机物及金属杂质, 用去离子水洗至中性; 然后用 1 mol/L NaOH 浸泡 4 h, 将其转化为游离碱型; 最后用去离子水反复冲洗至中性, 洗脱出多余的 NaOH。

1.3.2 费氏丙酸杆菌发酵液的处理

费氏丙酸杆菌发酵培养 72 h 后发酵液 10000 r/min 离心 20 min, 取上清液进行树脂吸附试验。

1.3.3 静态吸附

准确称取 1.0 g 已转型并用滤纸吸干表面水分的湿树脂于 100 mL 具塞三角瓶中, 再分别移取 20 mL 的 25、20、15、10、7.5、5、2.5、1 g/L 丙酸溶液, 摇

床转速 100 r/min, 30 ℃ 振荡吸附 4 h, 静置 0.5 h 后, HPLC 测量平衡溶液丙酸的质量浓度。丙酸溶液用 10 mol/L NaOH 调节 pH 为 6.85。

准确称取 7.5 g 已转型并用滤纸吸干表面水分的湿树脂于 500 mL 具塞三角瓶中, 移取 100 mL 的 13 g/L 丙酸溶液, 恒温振荡反应 4 h, 间隔一定时间取样 1 mL, HPLC 测量丙酸的质量浓度。

1.3.4 动态吸附-解吸附

在室温下, 分别用丙酸溶液和发酵液以 3 BV/h (BV 为柱体积) 的流速通过装有 120 mL 树脂的 $\varphi 3.0\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ 的玻璃层析柱, 测定流出液中的丙酸浓度, 考察样品液流速对树脂吸附性能的影响, 绘制树脂的穿透曲线, 确定最佳的吸附工艺条件。

对已吸附样品的树脂进行解吸附实验, 1 mol/L NaOH 以 3 BV/h 的流速绘制解吸附曲线, 确定最佳的解吸附工艺条件。

1.4 解除丙酸抑制发酵实验

树脂用 1 mol/L NaOH (无菌水配制) 再生 4 h, 用无菌水洗至中性。取 600 mL 1.3.2 节中的上清液以 3 BV/h 的流速通过装填树脂的层析柱, 收集去除丙酸的流出液。600 mL 流出液分成三份分别与 200 mL 未离心的发酵液等体积混合发酵培养 (I 组) 60 h, 同时取 200 mL 1.3.2 中的上清液按同样方法发酵培养作为对照 (II 组)。测定细胞和 VB₁₂ 产量, 考察发酵液中部分解除丙酸抑制的生长效果。

1.5 检测方法

丙酸的测定采用高效液相色谱法^[10], 色谱柱: Beckman C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm \times 25 cm); 色谱条件: 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.02 mol/L K₂HPO₄ 缓冲液(浓磷酸调节 pH 值为 2.8), $V_A:V_B=8:92$; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 215 nm; 流速: 1 mL/min; 进样量: 10 μ L。糖含量的测定采用葡萄糖/乳酸生物传感分析仪测定。氨基酸总量用 α -氨基氮来表示, 采用茚三酮比色法^[11-12]。VB₁₂ 的测定采用高效液相色谱法^[13]。

2 结果与讨论

2.1 各因素对树脂的静态吸附-解吸附的影响

2.1.1 树脂的筛选

9 种不同型号的树脂对 12.6 g/L 丙酸纯品及 12.6 g/L 丙酸发酵液的分离效果见表 1。从表 1 可以看出, D380 树脂对丙酸纯品吸附量最高, ZGA330 在吸附发酵液中的丙酸吸附量最高。D380 在发酵液环境下吸附量降为原来的 42.0%, ZGA330 在发酵液环境下吸附量降为原来的 88.9%, 说明 ZGA330 对发酵液中丙酸的吸附受发酵液各成分的影响比较小。因此选择 ZGA330 树脂研究对丙酸的吸附行为。

2.1.2 pH 对树脂吸附能力的影响

实验考察了不同 pH 下 (2.58、3.49、4.48、5.48、6.83) 树脂的交换过程, 结果如图 1 所示, 随着 pH 的升高, 树脂吸附量减小。当 pH 高于 4.5 吸附量明显降低, 说明 pH 在 4.5 以下时树脂对丙酸的吸附效果好。

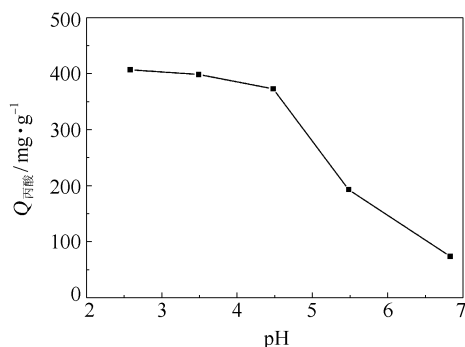


图 1 pH 对树脂吸附能力的影响

Fig. 1 The effect of the pH on the adsorption capacity of propionic acid by the ZGA330 resin

2.1.3 丙酸质量浓度对树脂吸附能力的影响

实验考察了在不同丙酸质量浓度下 (25.0、

19.8、14.6、9.6、7.2、4.7、2.4 g/L) 的交换过程, 实验结果如图 2 所示, 随着丙酸质量浓度的升高, 树脂对丙酸的吸附量增加, 但在丙酸质量浓度大于 20 g/L 以后增加丙酸质量浓度对吸附量的提高影响不大。丙酸溶液 pH 值均 6.85。

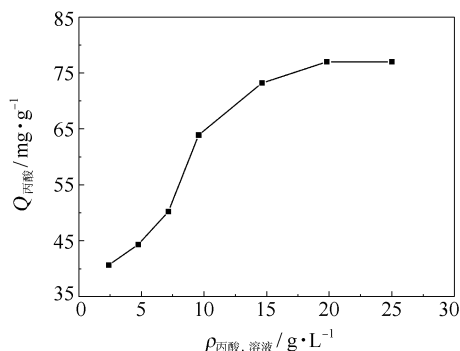


图 2 丙酸质量浓度对树脂吸附能力的影响

Fig. 2 The effect of concentration on the adsorption capacity of propionic acid by the ZGA330 resin

2.1.4 平衡时间的确定

树脂静态吸附的动力学实验如图 3 所示, 在 10 min 左右, 树脂对丙酸的吸附趋近平衡。

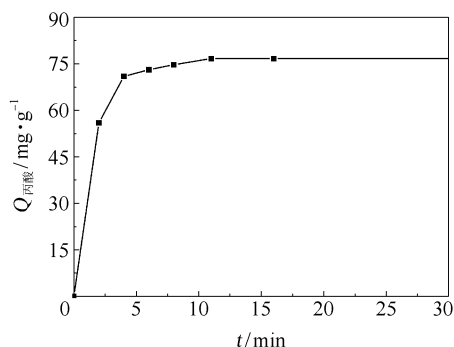


图 3 树脂吸附丙酸的速率

Fig. 3 The effect of contact time on the adsorption capacity of propionic acid by the ZGA330 resin

2.2 各因素对动态吸附-解吸附的影响

2.2.1 吸附流速对吸附效果的影响

实验采用流速分别为 2、3、4 BV/h 作相对比较, 结果如图 4 所示。随着吸附流速的加快, 丙酸的穿透点提前, 但流速太慢会延长生产周期, 提高成本。经综合考虑, 选择吸附流速为 3 BV/h, 树脂对丙酸的饱和吸附量为 388.5 mg/g。

2.2.2 动态吸附发酵液

以吸附流速为 3 BV/h 进行树脂吸附发酵液中的丙酸研究。并对树脂吸附发酵液中的主要营养成分、氨基酸做了进一步的研究。由图 5 可以看出,

糖、氨基酸很快达到穿透点。与图 4 相比树脂吸附发酵液中的丙酸的穿透点提前,说明发酵液中的其它成分对丙酸的吸附有影响,如发酵液中乙酸的存在对丙酸吸附的影响,具体原因还需要进一步研究。树脂处理样品溶液量约为 5 BV,树脂对丙酸吸附量为 205.5 mg/g。

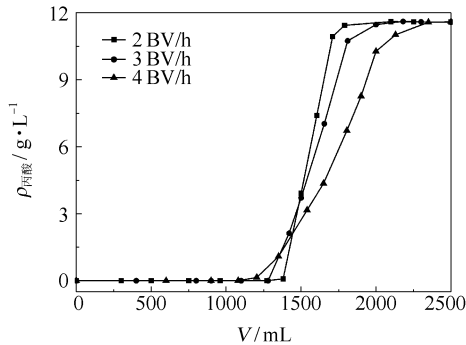


图 4 不同流速对树脂吸附丙酸的影响

Fig.4 Dynamic adsorption curve for propionic acid

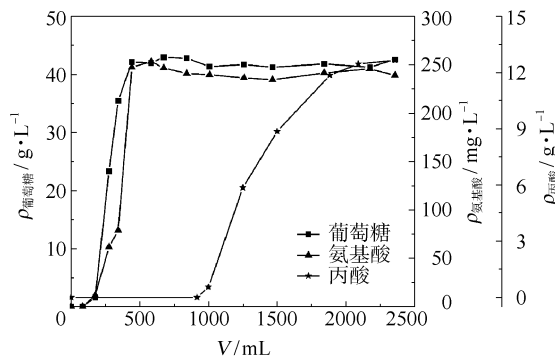


图 5 树脂对发酵液动态吸附的影响

Fig.5 Dynamic adsorption curve for the fermentation broth

2.2.3 动态解吸发酵液

以吸附流速为 3 BV/h 进行树脂解吸发酵液中的丙酸、糖和氨基酸研究。解吸前先用 400 mL 水洗,然后用 500 mL 1 mol/L 的 NaOH 解吸。实验结果如图 6 所示,水洗过程中糖含量降为零,说明树脂对糖没有吸附,树脂对氨基酸有少量的吸附。2.5 BV 解吸液能够解吸丙酸 95% 以上,因此在解吸过程中解吸液用量为 2.5 BV 的 1 mol/L NaOH。

2.3 发酵液中部分去除丙酸对发酵的影响

解除丙酸抑止发酵实验结果如表 2 所示,部分去除丙酸,细胞生长增加,VB₁₂量增加,VB₁₂产量提高了 0.44 倍,这说明发酵液中部分去除丙酸解除了丙酸对菌体生长的抑制作用,实现了 VB₁₂的高密度发酵。

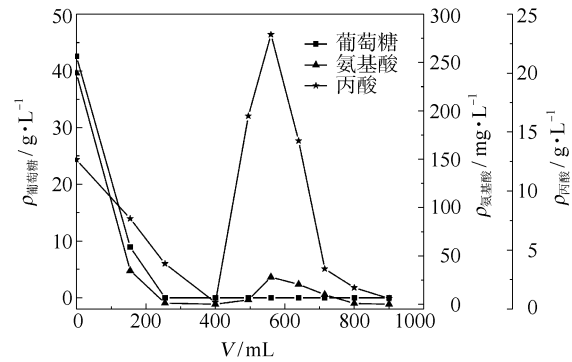


图 6 树脂对发酵液动态解吸的影响

Fig.6 Elution curve of the fermentation broth

表 2 发酵液中部分去除丙酸对 VB₁₂产量的影响

Table 2 The effect on the VB₁₂ concentration of partial removal of propionic acid

样品	$\rho_{\text{丙酸}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\rho_{\text{菌体}} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$		$\rho(\text{VB}_{12}) / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
		0 h	60 h	
I 组*	7	18.2	46.1	13.1
II 组	12	21.0	34.4	9.1

* 为 3 组平行数据取其平均值

3 结论

从 9 种弱碱性阴离子交换树脂中筛选出了一种对费氏丙酸杆菌发酵液中的丙酸吸附性能良好的树脂 ZGA330。树脂 ZGA330 对含有 12.6 g/L 丙酸发酵液中的丙酸的最佳工艺条件为,吸附:室温,流速 3 BV/h,溶液处理量为 5 BV;解吸附:洗脱剂为 1 mol/L NaOH 溶液,流速 3 BV/h,用量 2.5 BV 洗脱丙酸。发酵液中的丙酸的吸附率 84.9%,洗脱液丙酸浓度达 2.04%。

参考文献:

- [1] 张玉明,倪志华,王云山,等. 费氏丙酸杆菌发酵生产 VB₁₂[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 92-95.
- [2] Martens J H, Barg H, Warren M J, et al. Microbial production of vitamin B₁₂ [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58: 275-285.
- [3] Hsu S-T, Yang S-T. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of pH [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1991, 38(6): 571-578.
- [4] Miyano K, Ye K, Shimizu K. Improvement of vitamin B₁₂ fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture[J]. Biochemical Engineering Journal, 2000, 6(3): 207-214.

- [5] 杨华. 丙醛、丙酸、丙醇及其衍生物的生产应用与市场分析[J]. 化工中间体, 2003(22): 16–20.
- [6] Gu Z, Glatz B A, Glatz C E. Propionic acid production by extractive fermentation. I. Solvent considerations[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 57(4): 454–461.
- [7] Ozadali F, Glatz B A, Glatz C E. Fed-batch fermentation with and without online extraction for propionic and acetic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1996, 44(6): 710–716.
- [8] Himmi E H, Bories A, Boussaid A, et al. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium frudenreichii* ssp. *Shermanii* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53: 435–440.
- [9] Gluszczyk P, Jamroz T, Sencio B, et al. Equilibrium and dynamic investigations of organic acids adsorption onto ion-exchange resins[J]. Bioprocess Biosystems Engineering, 2004, 26(3): 185–190.
- [10] 刘晨明, 曹宏斌, 曹俊雅, 等. 梯度洗脱高效液相色谱法快速检测厌氧菌代谢物中的有机酸[J]. 分析化学, 2006, 34(9): 1231–1234.
- [11] Panasiuk R, Amarowicz R, Kostyra H, et al. Determination of α -amino nitrogen in pea protein hydrolyzates: a comparison of three analytical methods[J]. Food Chemistry, 1998, 62(3): 363–367.
- [12] 陈志慧. 酿造酱油两种不同检验标准测定氨基氮的准确性分析[J]. 食品科学, 2005, 26(3): 198–200.
- [13] 张玉明, 王雷, 王云山, 等. 一种简便、快速测定发酵液中 VB₁₂含量的方法[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 123–125.

Removal of propionic acid from fermentation broth by ion-exchange resins

HAO Ting^{1,2} LI Qiang² WANG Peng² WANG YunShan²
MA RunYu¹ SU ZhiGuo²

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029; 2. National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The adsorption abilities of nine weakly basic anion exchange resins for propionic acid (PA) in vitamin B₁₂(VB₁₂) fermentation broth have been evaluated. The static adsorption capacity on resin ZGA330 was found to be 44.9 mg/g dry beads at 12.6 g/L of PA. Dynamic state exchange trials, including the adsorption of glucose, amino acids and PA in the fermentation broth, were also carried out; these indicated that the adsorption of glucose and amino acids-the main nutrient components of the fermentation broth-was minimal. The dynamic adsorption capacity was 205.5 mg/g dry beads. By removal of propionic acid with ZGA330, the concentration of VB₁₂ increased from 9.1 mg/L to 13.1 mg/L, an increase of 44%. This demonstrates that coupling of the fermentation process with separation and removal of propionic acid affords a significant improvement in the cell concentration and productivity of VB₁₂.

Key words: anion exchange resin; propionic acid (PA); adsorption; vitamin B₁₂