

Lǜ Sè FA JIAO
YU SHENG WU HUA XUE PIN

绿色

◆ 主 编 汪多仁 副主编 汪驰宇

发酵与生物化学品



 科学技术文献出版社

TQ92
3122
2

绿色发酵与生物化学品

主 编 汪多仁
副主编 汪驰宇

科学技术文献出版社

Scientific and Technical Documents Publishing House

北 京

图书在版编目(CIP)数据

绿色发酵与生物化学品/汪多仁编著.-北京:科学技术文献出版社,
2007.8

ISBN 978-7-5023-5718-4

I. 绿… II. 汪… III. 发酵工业-化工产品-无污染工艺
IV. TQ92

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 106326 号

出 版 者 科学技术文献出版社
地 址 北京市复兴路 15 号(中央电视台西侧)/100038
图书编务部电话 (010)51501739
图书发行部电话 (010)51501720,(010)68514035(传真)
邮 购 部 电 话 (010)51501729
网 址 <http://www.stdph.com>
E-mail: stdph@istic.ac.cn
策 划 编 辑 孙江莉
责 任 编 辑 杨 光
责 任 校 对 张叫咪
责 任 出 版 王杰馨
发 行 者 科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销
印 刷 者 北京国马印刷厂
版 (印) 次 2007 年 8 月第 1 版第 1 次印刷
开 本 850×1168 32 开
字 数 319 千
印 张 13
印 数 1~5000 册
定 价 20.00 元

© 版权所有 违法必究

购买本社图书,凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责调换。

(京)新登字 130 号

内 容 简 介

生物发酵产品是利用生物体如酶、微生物等进行化学品加工与环境治理的一门科学。本书系统介绍了采用最新绿色技术生产发酵与生物化学品,包括甲壳胺与下游产品、单体与聚合物、复合产品、生物化学品、酸与酰胺、纳米化学品、生物酶、糖醇等的理化性质、制备工艺技术、质量标准及实际应用。

本书是化学轻工、生物制品行业技术开发人员、学生教师的必备工具书和实用指南。

科学技术文献出版社是国家科学技术部系统唯一一家中央级综合性科技出版机构,我们所有的努力都是为了使您增长知识和才干。

前 言

生物发酵产品是利用生物体如酶、微生物等进行化学品加工与环境治理的一门科学。它属于生物技术与化工技术相互融合、交叉发展的领域,是生物技术产业化的关键,也是化工技术的主要前沿领域。生物化学品的开发是生物化工产业的主要支撑和重要组成部分,将推动生物技术和化工技术的变革和进步,产生巨大的经济效益和社会效益。

在当今生物技术迅速发展转化为商品的新生物技术时代,生物发酵产业的发展十分迅猛,在化工领域 20%~30%的化工工艺过程中将会被生物技术过程所取代,生物发酵产业将成为 21 世纪的重大化工产业。

随着基因重组、细胞融合、酶的固定化等技术的发展,生物发酵技术将革新某些化工产品的传统工艺,出现少污染、省能源的新工艺,甚至一些不为人所知的性能优异的化合物也将被生物催化所合成。

我国生物发酵清洁工艺开发已取得了许多重大的科技成果,在有机酸中,柠檬酸的产量居世界前列,乳酸、苹果酸的新工艺也已开发成功;氨基酸中赖氨酸和谷氨酸的生产工艺和产量在世界上都有一定的优势;微生物法生产丙烯酰胺已建成万吨级的工业化生产装置,达到国际先进水平;发酵法甘油生产发酵水平不断提高,后提取工艺也有很大进展;黄原胶生产在发酵设备、分离及成本等已取得了突破性的进展;酶制剂、果葡

糖浆、单细胞蛋白、纤维素酶、胡萝卜素等产品的清洁生产工艺开发也日益成熟。

在能源方面,纤维素发酵连续制乙醇已开发成功;利用高效分离精制技术、高选择性精制技术、超临界气体萃取技术和高效双水相分离技术开发高纯度生物发酵化学品制造技术不断完善;反应器的研究在向多样化、大型化、高度自动化方面发展。

近年来,生物发酵产品正向专业化、高科技含量、高附加值方向发展,高价位产品如生化药物、保健品、生化催化剂等则备受青睐。

特别是发酵工业蓬勃发展,发酵工业的收率和纯度都比过去有了极大的提高。酶工程技术有了长足的进步,包括酶源开发、酶制剂生产、酶分离提纯和固定化技术、酶反应器与酶的应用。

现代生物技术的发展离不开化学工程,如生物反应器以及目的产物的分离、提纯技术和设备都要靠化学工程来解决。生物化学品工业已成为当今世界高新科技技术竞争的重要焦点之一和新的经济增长点。

生物化工是生物技术的重要分支,与传统工业相比,生物化工有其突出特点:①可利用再生资源为主要原料;②反应条件温和,多为常温、常压,因此能耗低、选择性好,效率高;③环境污染较少;④投资较少。

生物发酵技术是在维持生物体生存的温度与常压下,按照一定的程序准确、快速进行的反应,它由不断产生的多种酶控制,这些酶能对特定的物质发生特异的作用。反应的能量供给方式也是独特的,从能量的转换方式看,只是一种化学能转换,也就是说仅是把某种物质中积累的化学能转变为其他物质进

行化学反应所需要的化学能,几乎没有能量损耗。已开发的工业用生物反应器是用微生物或酶代替金属类催化剂,由于不需要高温、高压,并且改变了供能形式,可以达到节能、省资源、无公害,因此可说是一种清洁生产工艺。

酶催化或微生物转化具有专一性高,条件温和的特点,已成为化学合成的重要支柱。由于化学生产中酶的新用途被不断开发,促使工业用酶需求量增长,美国工业用酶和专用酶的市场在以10%以上的增长率扩大。工业用酶将在21世纪日益广泛地应用于化学工业、医药农药工业、食品业等方面。

近年,生物过程已向设备大型化、过程连续化、自动化、高效率方向发展,生物化工将在化工产业结构调整 and 培育新的经济增长点方面发挥重要作用。

生物化工是基于生物转化生产化学品的高新技术,是生物技术的重要组成部分,具有选择性高的特点,是现代绿色化学加工业的重要组成部分。生物化工是21世纪化学工业最富生命力的技术。对于促进化学工业技术进步和产业结构调整、促进绿色化学工业的发展起着至关重要的作用。

选择重点领域开发清洁化学技术,发展清洁生物化工技术包括微生物发酵技术、酶工程技术、基因工程技术和细胞工程技术。我国每年农作物秸秆就有10多亿吨,但是利用率不到5%(主要用于造纸)。若利用绿色生物化工技术将其转化为有机化工原料,则至少可创造数百亿元的价值。因此,生物质资源的转化和利用,清洁化学和技术将是大有作为的。目前,生物催化技术、微波化学技术、超声化学技术、膜分离技术等引起人们的极大关注,并且有的已投入工业应用,展示了广阔的发展前景。

21世纪将是“生物技术的时代”。生物化工技术是当今世

界高技术竞争的主要焦点之一。生物化工将成为 21 世纪的重大化工产业。目前,应选择市场适应能力强的有机化工产品为开发的突破口,使我国生物化工产业水平赶上并超过世界先进水平。

为适应现代化学工业快速发展的要求,作者编著了此书,全书提供的最新资料内容准确翔实,更好的体现出综述性、专用性、实用性、普及性、代表性,对促进生物发酵化工产品的应用、开发与环境保护和节约能源,具有积极和进步的意义。

本书是应广大读者需求完成的,涉及产品品种广泛,但限于编者水平,错误之处在所难免,敬请广大读者指正。

汪多仁

2007 年

目 录

第一单元 甲壳胺与下游产品	(1)
一、纳米生物低聚糖甲壳胺	(1)
二、甲壳胺微球.....	(14)
第二单元 单体与聚事物	(31)
一、可溶性改性生物塑料聚乳酸.....	(31)
二、(聚)谷氨酸.....	(54)
三、(聚)苹果酸.....	(72)
第三单元 复合产品	(84)
一、蛋白功能材料.....	(84)
二、复合生物柔软剂	(104)
第四单元 生物化学品	(112)
一、生物传感器	(112)
二、生物碱	(127)
三、人工生物膜	(140)
四、生物微胶囊	(156)
五、生物脱硫汽油	(173)
第五单元 酸与酰胺	(182)
一、对羟基苯甘氨酸	(182)

二、赖氨酸	(198)
三、L-谷氨酰胺	(208)
四、苯丙氨酸	(219)
五、L-半胱氨酸盐-水化合物	(234)
第六单元 纳米化学品	(241)
一、纳米明胶杂化材料	(241)
二、纳米银生物复合材料	(250)
三、生物亲合性纳米二氧化硅	(261)
四、纳米铁氧体生物复合材料	(268)
第七单元 生物酶	(279)
一、甲壳胺酶	(279)
二、 α -淀粉酶	(291)
第八单元 糖醇	(300)
一、木糖醇	(300)
二、固醇	(305)
三、1,3-丙二醇	(314)
四、果胶	(325)
五、生物活性多糖	(336)
六、葡萄糖与衍生物	(350)
第九单元 其他	(370)
一、维生素 C	(370)
二、类胡萝卜素	(380)
三、酒精	(384)
四、天然聚合物 PHB	(397)

第一单元 甲壳胺与下游产品

一、纳米生物低聚糖甲壳胺

21 世纪是“生物技术的时代”。随着生物技术的发展而诞生的生物化工技术,是当今世界高技术竞争的主要焦点之一。生物化工将成为 21 世纪的重大化工产业。

现代生物技术是当今高新技术的重要领域之一,化学工程和生物工程结合的生物化工工程是化工发展的新方向。与传统的化学方法相比,生物技术具有能耗低、污染少、可利用再生资源等优点。

生物酶催化是催化科学的前沿,它已被应用数千年。酶催化与一般催化剂催化相比,具有反应条件不苛刻,一般在常温、常压、合适的 pH 值条件下进行、高催化效率、对反应的专一性、节约资源和能源、对环境友好、是一种无废或少废反应过程、产物可生物降解等优点。

纳米生物低聚糖甲壳胺可以采用酶法生产。酶法包括使用专一性的甲壳胺酶降解,以及利用非专一性的其他酶,与化学降解法、物理降解法和合成法相比,酶解法反应过程易于控制,易于得到所需分子量范围的产品,不需要化学试剂,无副产物生成,对设备要求低,是生产低聚甲壳胺的更为理想的方法。

来源于天然甲壳的甲壳胺与脱乙酰甲壳胺市售价格平均为

3 000~4 000 日元/kg, 而用微生物培养法生产的甲壳胺、脱乙酰甲壳胺可能以 1 000 日元/kg 的价格供应。

1 理化性质

甲壳素化学上命名为(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖或 β -(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖。天然甲壳素分子的直链上有 15%~20% 脱乙酰氨基葡萄糖链结。

由于甲壳素在一般溶剂下难溶, 使它在提纯、加工、化学反应等过程中都比较困难, 应用受到限制。在碱性条件下将其水解, 脱去分子中的部分乙酰基, 就转变为甲壳胺。甲壳胺的溶解性能大为改善, 故也常称之为可溶性甲壳素, 或称为脱乙酰甲壳素、脱乙酰壳多糖、聚甲壳糖、聚氨基葡萄糖、黏性甲壳素等, 化学名为聚(2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖)。

甲壳胺的急性毒性实验经口腔、皮下和腹腔给药, 大黑鼠、老鼠试验证明毒性极低。亚急性毒性实验连续投药三个月未发现病理异常。对人类皮肤几乎无刺激、无过敏反应, 不经皮肤吸收。其他实验表明不溶血、无热源性、无致突变性、抗原性很低。

2 工艺开发

国内有多种改进的制备方法, 但大多采用虾蟹壳为原料。

目前随着发酵技术进展的开发, 利用发酵工业的大量菌丝体提取方法极有前途, 不仅能变废为宝, 且产品纯度高、原料来源丰富, 不受地点、季节的限制。综合利用, 降低了生产的成本。

2.1 操作过程

例 1 生物法制备甲壳胺是用易得的抗生素生产废弃物或柠檬酸菌丝体为原料, 经粉碎处理后, 按常规方法进行提取, 经处理、干燥得甲壳胺, 产品收率为菌体干重的 4%, 灰分小于 5%, 脱乙酰

度为 85%。

使真菌菌丝体在 115℃ 下于 2% 氢氧化钠溶液内除去碱不溶物后, 再在 2% 乙酸作用下经过滤渣后得甲壳素及其他多糖。清液用碱处理可得低聚甲壳胺。

在用柠檬酸发酵的黑曲霉菌丝体中, 甲壳素占细胞壁干重的 20%~42%, 另外还有 24% 的蛋白质, 73.4% 的葡聚糖, 3.7% 的半乳甘露聚糖、半乳糖胺及少量脂类。从黑曲霉体制备甲壳素的关键是适当破壁后, 除去蛋白质和其他糖类。脱蛋白质有酸法、碱法和酸碱交替法, 采用酸碱交替脱蛋白质。在保证蛋白质、氨基酸充分溶出后, 以成品含氮量(%) 为主要指标。

黑曲霉细胞壁中主要含壳质和蛋白质, 蛋白质具有可电离的基团, 在溶液中能形成带电荷的阳离子和阴离子, 在电场中向一方迁移, 从而把蛋白质分离。

黑曲霉为菌种, 选用适宜的培养液, 电泳仪控制电压为 30V, 相对电流强度 15 mA, 反应液为 2% 的 NaOH 溶液。反应时间视菌体多少而定。电解后固体物质经洗涤并干燥得到白色半透明片状固体, 得率为 20.6%。

将捣碎的黑曲霉湿菌体在 5% NaOH 溶液中, 100℃ 处理 6 h。或用 45% NaOH 溶液 126℃ 处理 2~3 h, 或用 10% 醋酸, 95~100℃ 处理 3 h, 离心后得到的醋酸抽提液用 NaOH 溶液调 pH 值为 10, 出现白色絮状甲壳胺, 抽滤洗涤, 60~70℃ 干燥至恒重得脱乙度为 93.76% 的甲壳胺。

甲壳胺的制备方法不同、制备目的不同, 分离纯化方法也不同, 但通常都包括调节体系; pH 值、过滤(或离心)、真空(或冷冻)干燥等操作, 必要时可进行脱色和重结晶。例如, 由酸法水解甲壳素得到的甲壳胺经活性炭-硅藻土色谱柱吸附后, 用乙醇梯度洗脱可得到不同聚合度(通常为 1~7)的寡聚糖, 然后在甲醇中结晶, 可精制得高纯度的产物。采用凝胶过滤法处理快速, 可获得较大

量的产物。

用离子交换膜法是以离子交换膜将剩余的盐酸去除,这样可高效回收生成的甲壳素低聚糖和单糖,从而使得工业化成为可能。用盐酸梯度洗脱可得到不同聚合度的寡聚糖。此法可分离自由氨基葡萄糖,分离较有效,可进行大规模色谱分离。高压液相色谱法也是分离和纯化甲壳胺的有效方法。此外,也可采用膜法进行甲壳胺的分离。

例 2 甲壳胺和脱乙酰甲壳胺有生物降解性、生物相容性和各种生理活性与机能,研究难分解性物质的微生物分解过程中发现在菌体外制造高分子化合物的微生物,此高分子化合物为甲壳胺和脱乙酰甲壳胺,可进行培养技术的开发。该菌株能以醋酸为原料进行培养,在菌体外制造甲壳胺和脱乙酰甲壳胺。通过研究原料供给量和原料浓度、pH 值与营养盐类等培养条件,确立可自动控制的培养方法,生产速度能提高 30 倍,培养时间由 5 天缩短至 3 天。因是在菌体外产生甲壳胺和脱乙酰甲壳胺,用离心分离等简单的分离精制方法就可回收高纯度的甲壳胺和脱乙酰甲壳胺。

通常的甲壳素/甲壳胺是以微纤维的形式存在的,而微纤维又主要由微晶粒和非晶区两部分组成。原料预先用球磨机粉碎成 40 目粉末,将 0.7 g 粉末原料加入到 50 mL 10% NaOH 溶液和 60 mL 异丙醇的混合溶液中,于 80 °C 下,搅拌回流 4.5 h,然后过滤,用蒸馏水洗至中性得到甲壳素/甲壳胺溶胀体,将这一溶胀体与 50 mL 40% 混合酸(浓硫酸与浓盐酸体积比为 2 : 1)溶液混合、在 110 °C 下搅拌回流 2 h,接着在超声波清洗器(50 Hz, 100 W)中,用超声波处理 2 h,再重复以上回流反应和超声波处理 3 次,最后得一悬浊液。

在这一制备过程中,以异丙醇为分散剂,甲壳素/甲壳胺经碱处理后,形成溶胀体,晶体结构疏松,使溶剂易于渗入,而后加入的

酸使部分聚合物链断键,逐步降解甲壳素/甲壳胺,从而得到纳米尺寸的甲壳素/甲壳胺微粒。

用超声波降解甲壳胺,反应温和,可以在低温下进行,且在降解过程中不会发生 NH_2 基被缔合的反应。

例 3 取 200 mL 液体培养基置于 500 mL 三角瓶中,按 2% 的接种量接入液体菌种,于 25 °C 下恒温摇床(120 r/min)培养。

在培养基中,分别加入酵母膏、牛肉膏、玉米浆、酪蛋白、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 NaNO_3 、 NH_4Cl 和尿素替代原培养基中的蛋白胨作为氮源,分别以胶体甲壳胺、乳糖、半乳糖、蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、甘油和 N-乙酰氨基葡萄糖替代培养基中的碳源,并以 0.5% 的蛋白胨作为氮源,进行发酵培养,测定发酵液的酶活力。

在最佳氮源和碳源条件下,试验培养基起始 pH 值分别为 5.0 ~ 8.5,对产酶的影响。

上述优化条件下,试验培养基盐度分别为 1% ~ 40%,培养温度分别为 15 ~ 40 °C,培养时间分别为 24 ~ 72 h,可以获得最优菌株。

水解甲壳胺 K-值为 2.88 mg/mL。酶反应的最适温度为 55 °C,最适 pH 值为 6.0,生物法制备甲壳胺是用易得的抗生素生产废弃物或柠檬酸菌丝体为原料,经粉碎处理后,再按常规方法进行提取,经处理、干燥得甲壳胺,产品收率为菌体干重的 4%,灰分小于 5%,脱乙酰度为 85%。

例 4 青霉素菌株发酵液经离心去除菌体后,往上清液内先加入 20% ~ 70% 饱和度的硫酸铵,静置 8 h 后冷冻离心,分出蛋白后再向生成的上清液内加入硫酸铵至 70% 饱和度,4 °C 下静置过夜,离心收集沉淀,将沉淀置于透析袋内水透析 15 h,再用聚乙二醇浓缩。将所得的甲壳胺酶经离心交换层析后再用凝胶过滤层析,使活性提高为 1 020 U/mg。

用聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的专一性很强的生物酶生产甲壳胺。

用此活性酶生产甲壳胺控制生成温度为 50 ℃, 在 pH 值为 5 时, 可得最高产率。

例 5 将 3 g 甲壳胺溶于 120 mL 10% 的醋酸溶液中, 加入乙醇 60 mL 后, 室温下搅拌 30 min 内逐渐滴加苯甲醛 15.8 g, 继续搅拌 1 h 后将胶状物于烘箱(55~60 ℃)中放置 20 h, 加稀 NaOH 溶液调 pH 值至中性, 析出沉淀、过滤, 固体用甲醇多次洗涤, 除去未反应的苯甲醛, 得纤维状浅黄色 N-苯亚甲基甲壳胺固体, 产率 69%。

例 6 在加热糊化的土豆淀粉中混合 1%~15% 甲壳胺(脱乙酰度为 99%, 以乙酸溶液加入); 在此混合液中加入淀粉量 75% 的甘油。将混合物在不锈钢上流延成形, 在 70 ℃ 热风干燥, 可制成薄膜。

如在玉米淀粉中固定壳降糖含量(20%), 改变甘油添加量, 则可改善薄膜的柔软性和强度, 复合材料中甲壳胺含量 20% (以乳酸溶液加入), 甘油含量为 60%, 淀粉的粒度在 1 μm 以下。这种甲壳胺-淀粉薄膜材料埋入土中 10 个月即完全分解。

纳米甲壳素/甲壳胺可以进行酰基化、羧甲基化、季铵化、硫酸酯化。通过这些化学修饰作用在甲壳素/甲壳胺分子结构中引入了各种功能团, 改善了甲壳素/甲壳胺的物化性质, 从而使其各自具有不同的功能及功效, 可应用于各种领域, 为我国的国民经济发展作出贡献。

2.2 酶降解法

到目前为止, 有很多有关酶法制备的报道, 如直接利用能生产甲壳胺酶的微生物开发简便的酶解法。即在含有胶体状甲壳胺的液体培养基中培养出从海水中分离出来的鳃弧 3 菌 E-383, 可获

得较高收率和选择性的 N-乙酰基壳二糖。用芽孢杆菌属 SP-7-M 株得到甲壳胺降解酶,可以获得由二糖到五糖的低聚甲壳胺。用芽孢杆菌属 R-4 生产的脱乙酰基甲壳胺酶以高效率获得的是四糖的低聚糖。目前已能用许多的甲壳胺酶生产甲壳胺。可以制备由二至六的壳低聚糖。在长时间反应后。生成的二糖、三糖的比率增加。可以利用脱乙酰基甲壳胺酶容易地制备甲壳胺,但生产高聚合度的甲壳胺较难。

采用单纯的酶反应合成较高聚合度的低聚糖是困难的,可以利用某些甲壳胺酶所具有的糖转移活性,成功地以较好的收率合成具有生理活性的 N-乙酰基六糖与 N-乙酰基七糖,即使用来自诺卡氏放线菌或木霉属具有高的糖基转移能力的甲壳胺酶,在醋酸缓冲液中使二糖链发生链接反应,从而得到六糖的白色沉淀。同样,以五糖为基质合成七糖。这种转移反应一般要受基质浓度、反应温度及 pH 值的影响。

利用糖转移反应的低聚糖合成法,不仅可调节聚合度,而且可通过精心设计基质也可合成特殊结构的甲壳胺低聚糖衍生物。

利用单纯的酶生产甲壳胺可以利用糖转移反应的甲壳胺合成法来调节聚合度,在经精心设计基质后可以合成具有特殊结构的甲壳胺低聚糖的衍生物。

目前制备低聚糖的主要方法有化学法和酶降解法,采用化学法降解得率低,分离困难,对环境污染严重;而酶降解法具有反应条件温和,糖得率高,不造成环境污染等优点,是目前甲壳胺降解发展的方向。

采用几种酶复合作用降解甲壳胺是将纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶共同作用于甲壳胺,并利用膜分离技术将反应中产生的低聚甲壳胺及时分离出来,获得 3~10 糖的最大产率。某些非专一性酶类水解甲壳胺具有协同作用,采用这些酶组成复合酶,水解作用比单一酶要强。在适当的条件下,用这些酶水解甲壳胺可以得到相