[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12P 13/02 (2006.01)
C07C 231/06 (2006.01)
C07C 233/09 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310121602.4

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100334221C

[22] 申请日 2003.12.31
[21] 申请号 200310121602.4
[73] 专利权人 江西昌九农科化工有限公司
地址 330012 江西省南昌市江西氨厂内
[72] 发明人 顾保中 杨中华 黎常宏 涂火中 万 真
[56] 参考文献
CN8610062A 1986.10.1
CN1227221A 1999.9.1
CN1154360A 1997.7.16
审查员 谢 妍

[74] 专利代理机构 江西省专利事务所
代理人 杨志宇 李 柯

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。该生产方法按常规工艺将发酵液经预处理步骤后，送入反应釜冷却系统，降温，加丙烯腈和水进行反应，其中预处理步骤为除去杂质至色度为 450 以下。本发明的最主要的特色就体现在提前除去杂质：也就是将传统的丙烯酰胺水溶液后续除杂工艺提前至发酵液的预处理阶段，改为提前除杂。不仅整个细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法大为简化，从实验效果上有充分数据表明采用本发明还可节约成本，能耗降低，提高产品质量。

1、一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，预处理步骤为将发酵液经离心机浓缩为20-60%；其特征在于：再经膜分离，除去杂质至色度为450以下，且最低色度为5，送入反应釜冷却系统，降温到8-37℃范围内，加丙烯腈和水进行反应，直到丙烯酰胺浓度为20-45%时，反应终止。

2、根据权利要求1所述的一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，其特征在于：送入反应釜冷却系统，降温到15-25℃范围内。

3、根据权利要求1所述的一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，其特征在于：选用膜分离的截留孔径参数为5-20万分子量。

4、根据权利要求1所述的一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，其特征在于：除去杂质至色度为80以下。

一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法

技术领域

本发明涉及一种细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，尤其是一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。

背景技术

丙烯酰胺是一种重要的化工原料，它通常是在水溶液介质中反应生成的，并经过浓缩，结晶和干燥工序而制得其晶体产品。根据专利文献资料（CN86100062A），申请人：日东化学工业株式会社的发明《利用微生物制备酰胺的方法》提示，利用腈水解酶和腈水化酶的自由细胞反应生成的丙烯酰胺水溶液。其操作方法总结如下：从微生物中选取菌株，培养发酵液，再从培养物（发酵液）中分离细胞或者固化细胞。经过增强粘度，空气造粒，再和盐水交换固定成型，再用盐水缓冲液PH7.7清洗。然后加入一定量的丙烯腈（在0-30℃最适温度0-15℃，反应PH6-10，最适PH7-9，反应0.5-10小时条件下）水化反应成了丙烯酰胺水溶液，最后经过活性炭和离子交换柱过滤去除有色杂质，此工艺可取名为固定化方法。该工艺复杂，生产周期长，成本高，且对环境有一定的污染。

发明内容

本发明的目的在于提供一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，该生产方法工艺简单，生产周期短。

本发明的技术方案为：

一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，按常规工艺将发酵液经预处理步骤后，送入反应釜冷却系统，降温，加丙烯腈和水进行反应，其特征在于：预处理步骤为除去杂质至色度为450以下。

其中杂质为电解质，蛋白酶及固形物等，杂质存在的发酵液在直观上表现为有色的浑浊液。传统的发酵液的预处理是从发酵液中分离细胞或者固化细胞，经过增强粘度，空气造粒，再和盐水交换固定成型，再用盐水缓冲液清洗，传统发酵液的预处理操作复杂，且预处理并不分离除去杂质，其杂质的除去在得到丙烯酰胺水溶液后再进行。除去杂质在实际生产中的质量控制上体现为色度的控制，也就是说，将溶液中的电解质，蛋白酶及固形物等杂质被部分或全

部除去，杂质除去前后溶液的色度表现为下降的趋势。

本发明的最主要的特色就体现在提前除去杂质：也就是将传统的丙烯酰胺水溶液后续除杂工艺提前至发酵液的预处理阶段，改为提前除杂，可以完全省略“传统的发酵液的预处理从发酵液中分离细胞或者固化细胞，经过增强粘度，空气造粒，再和盐水交换固定成型，再用盐水缓冲液清洗”的预处理操作，可以将除杂后的发酵液直接送入反应釜冷却系统，降温，加丙烯腈和水进行反应。不仅整个细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法大为简化，从实验效果上有充分数据表明采用本发明还可节约成本，能耗降低，提高产品质量。本发明的最主要的技术特征是控制预处理步骤中除去杂质至色度为 450 以下。当色度控制为 450 以下可以实现简化整个细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液工艺这一最基本的目的。

本发明的色度的评判标准为：

色度的标准溶液为称取重铬酸钾 0.043 克，硫酸钴 1.000 克置于 500 毫升容量瓶中，用 100 毫升水溶解后，加 0.5 毫升浓硫酸用水稀释至刻度，此标准溶液色度定为 500。

取 100 毫升具塞比色管 6 支，分别加入色度为 500 的标准溶液 0、2、4、6、8、10、20、40、60、80 毫升，然后用水稀释至刻度，则各比色管分别为 0、10、20、30、40、50、100、200、300、400 度，盖上塞子。

待测溶液的色度，用目测测量。

AM 代表丙烯酰胺，AN 代表丙烯腈。

较优的技术方案有下列：

送入反应釜冷却系统，降温到 15-25℃范围内。

预处理步骤具体采用膜分离的方式除去杂质。

预处理步骤具体采用膜分离的方式除去杂质，选用膜分离的截留孔径参数为 5-20 万分子量。

预处理步骤为将发酵液经离心机浓缩为 20-60%；再经膜分离，除去杂质，送入反应釜冷却系统，降温到 8-37℃范围内，加丙烯腈和水进行反应，直到丙烯酰胺浓度为 20-45%时，反应终止。

预处理步骤为将发酵液经离心机浓缩为 40-50%；再经膜过滤，除去杂质，送入反应釜冷却系统，降温到 10-25℃范围内，加丙烯腈和水进行反应，直到

丙烯酰胺浓度为 28-35%时，反应终止。

预处理步骤具体采用离心分离的方式除去杂质。

预处理步骤具体采用离心分离和膜分离联用的方式除去杂质。

预处理步骤为除去杂质至色度为 350 以下。

预处理步骤为除去杂质至色度为 300 以下。

预处理步骤为除去杂质至色度为 250 以下。

预处理步骤为除去杂质至色度为 130 以下。

预处理步骤为除去杂质至色度为 80 以下。

预处理步骤为除去杂质至色度为 50 以下。

预处理步骤为除去杂质至色度为 20 以下。

预处理步骤为除去杂质至色度为 5 以下。

本发明的优点在于：提供了一种直接法细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，其主要工艺为经离心、膜过滤等方式除去杂质步骤的发酵液，未经固化直接投入到反应釜中，和丙烯腈、水反应最终得到丙烯酰胺水溶液产品，本发明具有工艺简单、操作便利、投资少、成本低且产品纯度高、质量优等特点。

具体实施方式

以下所有实施例的生物发酵液可以按 CN86100062A 提供的方法得到。

实施例 1

取 75ml 生物发酵液，经离心机分离，参数为 7000rpm，控制色度为 25 以下，去除上清液，把沉降物投入反应器，再加入去离子水至 725ml，调节反应体系的 PH 值于 6-8，温度控制在 15℃，加入 300ml 化学纯丙烯腈进行反应 240 分钟后，让反应液迅速进行膜过滤，取滤清液测得：AM%为 32.1%（质量比值），AN%为 1.1%(质量比)，电导率为 1220μs/cm，色度为 15，PH 值为 6.8。其余同常规的细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，例如可以采用 CN86100062A 提供的常规的细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。

实施例 2

取 75ml 生物发酵液经膜分离，选用膜分离的截留孔径参数为 6 万分子量，控制色度为 15 以下，重相投入反应器，加入去离子水至 725ml，调节 PH 值于 6-8，反应体系温度控制在 25℃，加 300ml 化学纯丙烯腈进行反应，反应 240 分钟后，让反应液迅速经过膜过滤，取滤清液测得：AM%为 33%（质量比），AN%为 0.12%（质量比），电导率为 500μs/cm，色度为 10，PH 值为 7.1。其余同常规的细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，例如可以采用 CN86100062A 提供的常规的细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。

实施例 3

取 75ml 生物发酵液依次经离心机离心，参数为 8000rpm，沉降物经膜过滤，选用膜分离的截留孔径参数为 5 万分子量，控制色度为 5，取重相投入反应器，加入去离子水至 725ml，调节 PH 值于 6-8，环境温度控制在 18℃，加入 300ml 化学纯丙烯腈进行水合反应，反应 240 分钟后，让该反应液迅速经过膜过滤，取滤清液测得：AM%为 33%（质量比），AN%未测出，电导率 283μs/cm，色度为 5，PH 值为 7.5。其余同常规的细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法，例如可以采用 CN86100062A 提供的常规的细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。

实施例 4

传统固定化细胞酶工艺与本发明的直接法细胞酶工艺的比较：

（1）从微生物中选取菌株，培养发酵液，再从培养物（发酵液）中分离细胞或者固化细胞。经过增强粘度，空气造粒，再和盐水交换固定成型，再用盐水缓冲液 PH7.7 清洗。然后加入一定量的丙烯腈，在 12℃，反应 PH=8，反应 10 小时条件下，水化反应成了丙烯酰胺水溶液，最后经过活性炭和离子交换柱过滤去除有色杂质，此工艺为传统固定化细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。未经除杂的发酵液的起始色度为 530。

（2）具体采用实施例 1、2、3 或类似方法提供的直接法细胞酶工艺，采用 CN86100062A 传统固定化细胞酶工艺。未经除杂的发酵液的起始色度为 530。

所测数据为两种工艺最终得到丙烯酰胺水溶液产品的理化数据。经多组的对比实验数据统计后如下：

项　　目	固定化细胞酶工艺	直接法细胞酶工艺
AM%浓度	20-25	28-35
电导率（μs/cm）	1200	300
杂质（μg/ml）	50	5
色度(hazen)	15-20	5-15
反应时间（min）	600	240
生产周期（h）	30-40	2.5-6

传统固定化细胞酶工艺与本发明的直接法细胞酶工艺的比较，直接法得到的丙烯酰胺水溶液产品的电导率更低，表明电解质杂质含量更低；色度更低，表明有色杂质含量更低，有色蛋白类杂质去除更完全；而 AM%浓度提高，证明产品的回收率更高，而反应时间、生产周期缩短证明直接法的工艺简单、操作更便利、投资少、成本低且产品纯度更高、质量更优。

两种操作方法相比较，固定化细胞酶工艺流程存在如下缺点：

1、从发酵至水合反应的工序多、时间长、增加了能耗，制约着产量。

2、发酵液经固化后，减少了酶细胞的活性，反应丙烯酰胺（AM）浓度为20-25%。

3、反应液中增加了杂质离子和其他固形物，给过滤工序增加了困难。

4、活性炭过滤只能除去发酵液中的菌丝体及发酵固化残渣等固体杂质，不能去除发酵液中的大分子杂质和可溶性蛋白，滤液质量无法保证后期产品质量的稳定。

5、过滤时滤渣带走的产物较多，过滤收率受到影响。

6、反应液的电导率偏高，精制负荷增大，交换树脂用量增加，再生频率加快，收率减少，电导率平均为 1200μs/cm 左右。

7、固化液和精制再生的酸碱废液的处理费用大。

通过研究、实验发现，本发明的非固化工艺流程有如下优点:

1 直接以浓缩纯化后的自由细胞酶投入反应釜进行丙烯腈的水合反应，免去了发酵液的后处理工艺，既避免了发酵液的酶活性的损失，又减少处理液对环境的污染。

2 生产 AM 水剂的总体反应时间大大缩短。将从 600min/釜减少到 240min/釜，AM 水剂的能力大大提高。

3 反应后的 AM 水剂电导率明显降低约 400μs/cm 左右，大幅度节约了精制交换树脂的用量和酸、碱、去离子水的用量。

4 反应物浓度可达到 30-35%，比固定化工艺提高至少 5 个百分点。

5 对非固化细胞反应液进行膜滤后，可将粘液中的大分子有机物蛋白酶及其他固形物去除，由于滤液质量的提高对于后工艺收率的提高及结晶步骤的提高更为显著，产品质量将大幅度提高。

6 使用寿命较长，再生清洗方便。

7 产品质量高，生产费用低，能耗大幅度减少。

本发明的目的就在于克服上述现有工艺技术中的不足之处，提供一种更简单、操作便利、设备投资少、生产成本及能耗低的工艺技术。本工艺大大降低了环境污染程度，提高了生产能力，节约了人力、物力。产品品质有质的飞跃。

实施例 5

从微生物中选取菌株，培养发酵液，再从培养物（发酵液）中分离细胞或

者固化细胞。经过增强粘度，空气造粒，再和盐水交换固定成型，再用盐水缓冲液 PH7.7 清洗。然后加入一定量的丙烯腈（在 0-30℃最适温度 0-15℃，反应 PH6-10，最适 PH7-9，反应 0.5-10 小时条件下）水化反应成了丙烯酰胺水溶液，最后经过活性炭和离子交换柱过滤去除有色杂质，此工艺为传统固定化细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。

实施例 6

（1）从微生物中选取菌株，培养发酵液，再从培养物（发酵液）中分离细胞或者固化细胞。经过增强粘度，空气造粒，再和盐水交换固定成型，再用盐水缓冲液 PH7.7 清洗。然后加入一定量的丙烯腈，在 12℃，反应 PH=7，反应 10 小时条件下，水化反应成了丙烯酰胺水溶液，最后经过活性炭和离子交换柱过滤去除有色杂质，此工艺为传统固定化细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。未经除杂的发酵液的起始色度为 550。

（2）从微生物中选取菌株，培养发酵液，未经除杂的发酵液的起始色度为 550，经过膜过滤去除杂质至色度为 450 以下，选用膜分离的截留孔径参数为 20 万分子量，直接投入到反应釜中，加入一定量的丙烯腈和水在冷却系统中控制温度 15℃，调节 PH 值 7，反应时间在 5 小时，腈化物控制不超过 3%（重量比）最佳，再经膜过滤后最终得到丙烯酰胺水溶液产品。

项　　目	固定化细胞酶工艺	直接法细胞酶工艺
AM%浓度	20-25	25-28
电导率（μs/cm）	1233	1082
杂质（μg/ml）	50	14
色度(hazen)	15-20	5-15
反应时间（min）	600	300
生产周期（h）	30-40	2.5-6

最后得到丙烯酰胺水溶液产品的电解质电导率相比：直接法比固定化法略有下降，另外直接法虽然只除去了少量有色杂质，例如色度只从 530 下降为 400 但相比固定化法，只除去了少量有色和电解质杂质的直接法所得的最终得到丙烯酰胺水溶液产品的质量都已经优于固定化法，且反应时间也缩短，成本更低。

实施例 7

从微生物中选取菌株，培养发酵液，经过膜过滤去除杂质至色度为 50 以下，直接投入到反应釜中，加入一定量的丙烯腈和水在冷却系统中控制温度 10℃，调节 PH 值 6，反应时间在 2.5 小时，腈化物控制不超过 3%（重量比）最佳，再经膜过滤后最终得到丙烯酰胺水溶液产品。

实施例 8

（1）从微生物中选取菌株，培养发酵液，再从培养物（发酵液）中分离细胞或者固化细胞。经过增强粘度，空气造粒，再和盐水交换固定成型，再用盐水缓冲液 PH7.7 清洗。然后加入一定量的丙烯腈，在 12℃，反应 PH=7，反应 10 小时条件下，水化反应成了丙烯酰胺水溶液，最后经过活性炭和离子交换柱过滤去除有色杂质，此工艺为传统固定化细胞酶反应生产丙烯酰胺水溶液的方法。未经除杂的发酵液的起始色度为 480。

（2）从微生物中选取菌株，培养发酵液，未经除杂的发酵液的起始色度为 480，经过膜过滤去除杂质至色度为 400 以下，选用膜分离的截留孔径参数为 18 万分子量，直接投入到反应釜中，加入一定量的丙烯腈和水在冷却系统中控制温度 15℃，调节 PH 值 7，反应时间在 4 小时，腈化物控制不超过 3%（重量比）最佳，再经膜过滤后最终得到丙烯酰胺水溶液产品。

项　　目	固定化细胞酶工艺	直接法细胞酶工艺
AM%浓度	20-25	28-35
电导率（μs/cm）	1241	1056
杂质（μg/ml）	50	17
色度(hazen)	15-20	5-15
反应时间（min）	600	240
生产周期（h）	30-40	2.5-6

实施例 9

调节反应体系的 PH 值于 7，温度控制在 20℃，其余同实施例 2。

实施例 10

调节反应体系的 PH 值于 8，温度控制在 22℃，其余同实施例 1。

实施例 11

去除杂质至色度为 400 以下，其余同实施例 7。

实施例 12

去除杂质至色度为 350 以下，其余同实施例 7。

实施例 13

去除杂质至色度为 250 以下，其余同实施例 8。

实施例 14

去除杂质至色度为 130 以下，其余同实施例 7。

实施例 15

去除杂质至色度为 80 以下，其余同实施例 7。

实施例 16

去除杂质至色度为 50 以下，其余同实施例 7。

实施例 17

去除杂质至色度为 20 以下，其余同实施例 8。

实施例 18

去除杂质至色度为 5 以下，其余同实施例 7。

实施例 19

选用膜分离的截留孔径参数为 9 万分子量，其余同实施例 2。

实施例 20

选用膜分离的截留孔径参数为 10 万分子量，其余同实施例 2。

实施例 21

选用膜分离的截留孔径参数为 12 万分子量，其余同实施例 2。

实施例 22

选用膜分离的截留孔径参数为 16 万分子量，其余同实施例 2。

实施例 23

高速离心过滤 7000-50000rpm。其余同实施例 1。

实施例 24

高速离心过滤 12000rpm。其余同实施例 1。

实施例 25

高速离心过滤 30000rpm。其余同实施例 3。

实施例 26

其中杂质为电解质，蛋白酶及固形物，其余同实施例 3。