

三相流化床 L-乳酸发酵及与离子交换分离耦合*

林建平 周 凡 岑沛霖**

(浙江大学化工系 杭州 310027)

L-乳酸因其能被人体代谢而将在食品、医药工业中代替 DL-乳酸^[1]。另外均聚和共聚 L-乳酸在医学及生产可生物降解的包装材料、农膜等方面有巨大的潜在市场^[2~3]。L-乳酸一般采用米根霉来发酵生产^[4]。一些研究者曾在摇瓶中研究了以海藻酸钙包埋法生产 L-乳酸的技术,并取得了较满意的结果^[5~6]。在此基础上进一步进行适合固定化发酵的反应器的研究是很有必要的。近年来国内外进行了采用发酵与分离耦合技术(包括离子交换、溶剂萃取、电渗析等)生产有机酸的研究并取得了一定进展^[7~9]。基于离子交换分离技术的操作稳定性及具有较完整的工业化经验,我们拟采用发酵与离子交换分离耦合技术进行 L-乳酸生产的初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

米根霉 (*Rhizopus oryzae*) R-1 是本实验室保藏的菌种。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基: 采用 PDA 培养基及米饭培养基^[10]。

1.2.2 发酵培养基(g/L): 尿素 0.1, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25, KH_2PO_4 0.2, 葡萄糖适量。

1.3 固定化方法

将灭过菌的 3% 海藻酸钠和从固体种子培养基上洗下的孢子悬液以 2:1 混匀,然后逐滴滴入 2% $CaCl_2$ 溶液中,钙化 1h 左右,用无菌水洗去 $CaCl_2$ 及游离孢子,加培养基后进行增殖。

1.4 实验设备与装置

游离发酵在 B. Braun Biostat B 5L 发酵罐和自制 10L 气升式生物反应器中进行。固定化发酵在自制 10L 及 5L 三相流化床反应器中进行。发酵与分离耦合装置见图 1。

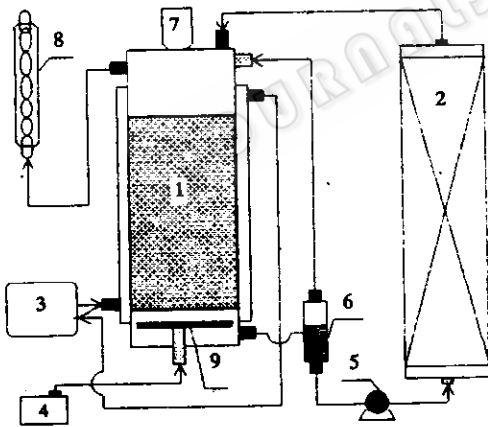


图 1 固定化发酵与分离耦合实验装置

1.三相流化床反应器; 2.离交柱; 3.恒温槽;

4.气泵; 5.蠕动泵; 6.气液分离罐;

7. $CaCO_3$ 贮罐; 8.冷凝管; 9.空气分布器。

* 国家自然科学基金资助项目。

** 通讯联系人。

本文于 1995 年 8 月 11 日收到。

1.5 分析方法

1.5.1 葡萄糖的测定: 采用斐林试剂法^[11]。

1.5.2 L-乳酸的测定: 根据产物形式不同分别采用 EDTA 定钙法^[11]、酸碱滴定法^[11]和 Barker-Summerson 法^[12]。

2 结果和讨论

2.1 游离细胞发酵结果

分别在通气搅拌罐和气升式生物反应器上进行了游离细胞发酵, 实验结果见表 1。各种方式的游离细胞发酵速率较慢, 得率较低, 结果都不十分令人满意。菌丝重复利用是指在一罐结束后, 保留菌丝, 更新培养基进行下一批发酵。

表 1 游离细胞发酵结果

反应器形式	接种方式	初糖 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	产酸速率 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	得率 / $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
气升式	孢子直接接种	119.7	0.36	0.67
搅拌式	孢子直接接种	116.3	0.66	0.60
搅拌式	摇瓶培养后接种	128.1	0.83	0.58
搅拌式	菌丝重复利用	96.3	1.43	0.71

2.2 海藻酸钙包埋固定化米根霉生产 L-乳酸

我们自制了适合固定化米根霉颗粒发酵生产 L-乳酸的三相流化床生物反应器(图 1)。钙化后的固定化颗粒可先经摇瓶预培养, 也可直接接入反应器并在其中萌发并生长。由固定化颗粒切片的显微摄影照片可以看出, 经过数天培养后, 靠近颗粒表面的孢子大部分萌发生成菌丝, 并在颗粒表层形成一层致密的菌丝膜, 而颗粒内部的孢子则很少萌发(照片略)。这是由于颗粒表层供氧充足而其内部缺氧引起的。

在三相流化床上包含固定化孢子萌发过程的发酵曲线(图略), 在初始阶段有一较长的迟滞期, 发酵速率较慢。菌丝长成后, 不再有迟滞期, 随着菌丝量的不断增加, 比产酸速率 P' (指单位固定化包埋剂体积的产酸速率, 下同)也逐批提高, 在固定化细胞颗粒反复使用的分批操作中, 经 3~4 批后基本达到稳定(表 2)。实验表明, 固定化颗粒接入方式对稳定后的发酵没有显著影响。以 2.5L 固定化颗粒和 7L 培养基进行发酵, 其产酸速率 P (单位发酵液体积的产酸速率, 下同)可达 $3 \sim 4 \text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 比游离细胞发酵高得多。

表 2 不同菌丝增殖方式的实验结果

批次	第一罐		第二罐	
	比产酸速率 $P' / \text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	得率 / $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	比产酸速率 $P' / \text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	得率 / $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
1	3.92	0.78	先经摇床培养	
2	5.32	0.77	6.72	0.70
3	8.12	0.77	7.84	0.79
4	8.40	0.77	8.14	0.77
5	8.80	0.79	8.75	0.79

对不同体积反应器、不同固定化颗粒及发酵液装量的实验表明,3~4批后,比生产速率 P' 基本上不随反应器体积及装液量变化。这表明在操作稳定的前提下尽量提高固定化颗粒装量有利于提高发酵速率,这也为该反应器的放大提供了依据。

对不同通气量的考察表明,通气量在0.24~0.60vvm之间变化时,比产酸速率 P' 和L-乳酸得率没有明显变化。这表明由于米根霉菌丝只在固定化颗粒表层生长及三相流化床氧传递状况良好,达到流化所需的通气量已足以满足发酵的要求。

综上所述,用三相流化床生物反应器进行海藻酸钙包埋固定化米根霉的L-乳酸发酵具有发酵速率快、得率高、反应器较易放大等优点。若能解决固定化颗粒的大批量制作的困难,并有效地防止染菌,实现长期稳定的操作是可行的。

2.3 发酵与分离耦合技术在L-乳酸生产中的应用

在本实验室前期研究的基础上,我们采用了对乳酸具有较大的交换容量的D354树脂进行与离子交换耦合生产L-乳酸的实验(图2)。装置见图1。发酵液以恒定的流速(1L/h)经过离子交换柱再回到反应器中,并在此过程中将发酵产生的乳酸交换到树脂上。在发酵过程中不加任何中和剂。固定化技术有效地避免了菌体进入离子交换柱,L-乳酸得率也较高。但由于发酵液的pH较低,产酸速率也较低,这可通过提高发酵液流经离子交换柱的流量而得到改善。

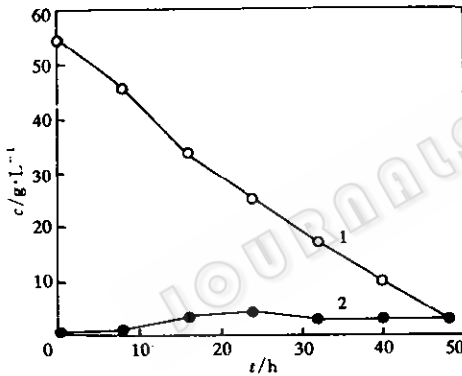


图2 发酵与分离耦合曲线

1.葡萄糖; 2.L-乳酸

3 结论

通过对海藻酸钙固定化米根霉发酵生产L-乳酸过程的反应器及操作条件研究,得到了较高的产酸速率($3\sim 4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)和得率($0.77\sim 0.79\text{g/g}$),说明用三相流化床生物反应器进行这种形式的固定化发酵明显优于游离发酵。实验表明,达到流化所需的空气量就足以满足米根霉发酵生产L-乳酸的需要。L-乳酸的生产能力直接取决于固定化颗粒的装量,兼顾反应器装液量和流化效果的前提下,适当提高固定化颗粒的装量是有利的。

利用离子交换与发酵耦合技术生产L-乳酸的初步实验表明,该技术是适合于这一发酵体系的。

不需加 CaCO_3 作中和剂是其优点之一。由于产物可连续地被除去,该技术将更适合于采用连续或半连续的发酵方式。进一步的详细研究将陆续报道。

参 考 文 献

- [1] Matley M. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1992, 12(1/2):87~132.
- [2] Leenslag J W, Pennings A J, Bos R R et al. *Biomaterial*, 1987, 8:70~73.
- [3] Wehrenberg II R H. *Material Eng*, 1981, 94(3):63~66.
- [4] 曹本昌,徐建林.食品与发酵工业.1993,3:56~61.
- [5] 堀津浩章,河合晋一.公明特許公報(A).昭60—6196,1985.
- [6] Hang Y D, Hamamci H, Woodams E E. *Biotechnology Letters*, 1989, 11(2):119~120.
- [7] Hatzinikolaou D G, Wang H Y. *The Canadian Journal of Chem Eng*, 1992,70:543~552.
- [8] Srivastava A, Roychoudhury P K, Sahai V. *Biotechnol Bioeng*,1992,39:607~613.
- [9] Nomura Y, Iwahara M, Hongo M. *Biotechnol Bioeng*,1987,30:788~793.

- [10] Wang H L, Swain E W, Hesseltine L W. *J Food Sci*, 1975, 40:168~170.
[11] 天津轻工学院编. 工业发酵分析. 北京:轻工业出版社. 1980.1~53.
[12] Barker S B, Summerson W H. *J Biol Chem*, 1941, 138:535~554.

L-LACTIC ACID FERMENTATION AND COUPIED WITH ION-EXCHANGE SEPARATION IN A THREE-PHASE FLUIDIZED-BED BIOREACTOR

Lin Jianping Zhou Fan Cen Peilin

(Department of Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The L-lactic acid production with *R. oryzae* immobilized by calcium alginate entrapment method was studied. A three-phase fluidized-bed bioreactor was developed. Comparing to free-cell fermentation, high productivity ($3\sim 4\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) and yield ($0.77\sim 0.80\text{g} / \text{g}$) was obtained. The simultaneous fermentation and ion-exchange separation was studied to overcome some shortages in the conventional fermentation process with CaCO_3 as the neutralizer, and the process was proved feasible to product L-lactic acid efficiently.

Key words L-lactic acid, Immobilized-cell fermentation, Bioreactor, Coupled fermentation and separation, *Rhizopus oryzae*