

三相流化床中固定化米根霉萃取发酵生产 L-乳酸

李绍壮 林建平 卢英华 李学梅 姚 恕 岑沛霖*

(浙江大学化工系 杭州 310027)

摘 要 以 TRPO/磺化煤油为萃取剂,在 2L 三相流化床反应器中进行了固定化米根霉原位萃取和异位萃取发酵生产 L-乳酸的实验,结果表明,发酵液中的 pH 值能被控制在 3.5 左右,产酸速率高达每小时,每 1L 固定化颗粒产生 11g L-乳酸。提出了一个数学模型用以描述萃取发酵中 L-乳酸的积累及在各相的分配情况,模型计算曲线与实验值符合良好。

关键词 L-乳酸,萃取发酵,TRPO,米根霉,三相流化床生物反应器

L-乳酸通常以米根霉为菌种生产。在游离细胞发酵中米根霉会形成很大的菌丝团,从而影响物质传递,固定化发酵能使米根霉的菌丝均匀地分布在固定介质上,从而在一定程度上缓解这一问题。有些研究者曾对包埋法固定米根霉作了一些探索^[1~3],摇瓶实验证明,其发酵速率和得率均高于游离细胞。作者等曾对三相流化床中的固定化米根霉发酵生产 L-乳酸及发酵与离子交换分离耦合的过程进行了研究,结果表明三相流化床固定化细胞发酵的产酸速率比游离细胞发酵要高得多^[4,5]。

在乳酸发酵中,随着 L-乳酸的积累,发酵液的 pH 值很快地下降。因此,在常规的发酵生产中,必需加碱或碱性盐类以中和产生的酸^[6],最常用的是 CaCO_3 ,要在发酵过程中加入固体 CaCO_3 又保持无菌在工业生产中会造成一些困难,通过萃取发酵,可以将产生的 L-乳酸萃取到有机相中,从而达到控制 pH 值的目的,也避免了在发酵过程中途加入 CaCO_3 。本文拟在三相流化床生物反应器中用海藻酸钙包埋法固定的米根霉采用萃取发酵技术生产 L-乳酸。

1 材料和方法

1.1 微生物和培养基

菌种为 *Rhizopus oryzae* NRRL 395,保存在 PDA 培养基上,每 2 个月转移一次斜面。孢子由米饭培养基生产^[7],用蒸馏水洗下孢子制成悬液。发酵培养基含(g/L):尿素 2, KH_2PO_4 0.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.044, CaCO_3 10,葡萄糖根据需要加入。

1.2 实验装置

发酵在 2L 三相流化床生物反应器中进行。当进行异位萃取发酵时,用蠕动泵将发酵液以一定的流速打入萃取柱中,并将萃余液循环回到流化床中,实验装置见图 1。

国家自然科学基金资助项目。

* 通讯联系人。

本文于 1996 年 6 月 10 日收到。

表 1 不同分批操作方式的比较

Table 1 Comparison among different batch operation modes

CaCO ₃ neutralized fermentation		Extractive fermentation			
		in-situ		with external recycle	
v_{La}	v_{Glc}	v_{La}	v_{Glc}	v_{La}	v_{Glc}
11.4	15.5	9.0	12.2	11.9	16.1

g·(L·h)⁻¹

3 萃取发酵的数学模型

假设反应器中各相均混合良好;水相与有机相之间瞬间就能达到萃取平衡;发酵为等温过程;产酸符合零级动力学,则萃取发酵过程中 L-乳酸的积累及在各相间的分配可用以下数学模型加以描述。

对原位萃取发酵:

$$V_o \frac{dC_{HL_{a,0}}}{dt} + V_a \frac{dC_{HL_{a,a}}}{dt} = v_{La} V_b \tag{2}$$

$$C_{HL_{a,o}} = D_{La} C_{HL_{a,a}} \tag{3}$$

式(2)积分可得:

$$V_o = (C_{HL_{a,o}} - C_{HL_{a,o,0}}) + V_a(C_{HL_{a,a}} - C_{HL_{a,a,0}}) = v_{La} V_b(t - t_0) \tag{4}$$

根据方程(1~4)及初始条件,就可得到各相中 L-乳酸浓度随时间变化的模型曲线(图 5)。

对异位萃取发酵,可将体系简化为如图 6 所示的三相。

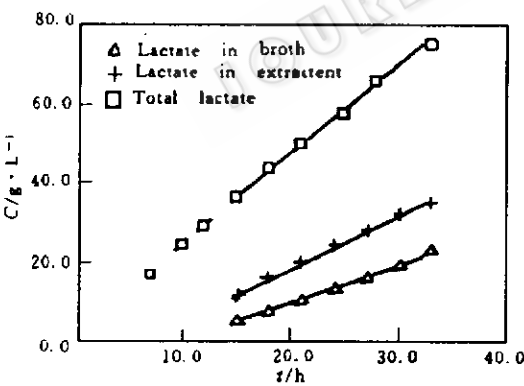


图 5 原位萃取发酵模型计算曲线与实验值的比较
Fig.5 The comparisons between the calculated curves and the experimental data for in-situ extractive L-lactic acid fermentation in fluidized bed

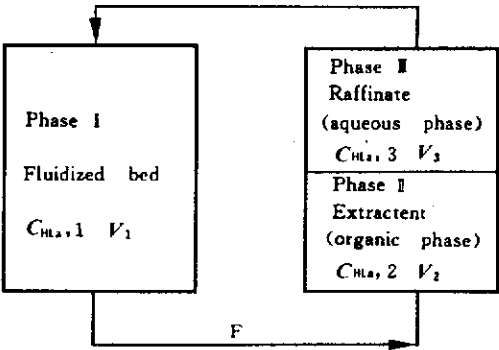


图 6 异位萃取发酵过程的动力学简化
Fig.6 The simplified diagram of extractive fermentation system with external recycle

这样,数学模型为:

$$V_1 \frac{dC_{HL_{a,1}}}{dt} + V_2 \frac{dC_{HL_{a,2}}}{dt} + V_3 \frac{dC_{HL_{a,3}}}{dt} = v_{La} V_b \tag{5}$$

$$V_2 \frac{dC_{HLA,1}}{dt} = v_{La} V_b + F(C_{HLA,3} - C_{HLA,1}) \quad (6)$$

$$C_{HLA,2} = D_{La} C_{HLA,3} \quad (7)$$

式(5)积分可得:

$$V_1(C_{HLA,1} - C_{HLA,1,0}) + V_2(C_{HLA,2,0} - C_{HLA,2,0}) + V_3(C_{HLA,3} - C_{HLA,3,0}) = v_{La} V_b(t - t_0) \quad (8)$$

由于 D_{La} 既是 C_{HLA} 的函数又是 C_{CaLa_2} 的函数, 因此上述方程组难以得到解析解。用四阶 Runge-Kutta 法积分, 得到的数值解如图 7 所示。由图 7 可见, 模型值与实验值符合较好。

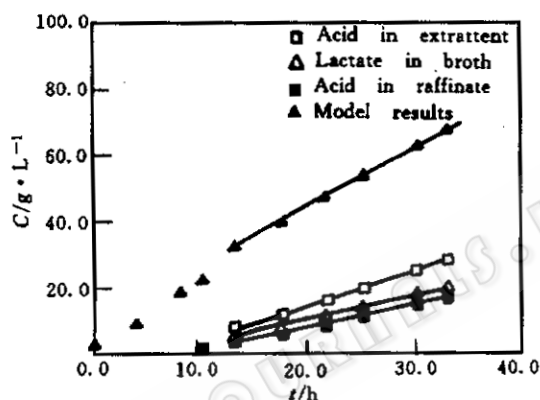


图 7 异位萃取发酵模型计算曲线与实验值的比较

Fig. 7 The comparisons between the calculated curves and the experimental data for the extractive L-lactic acid fermentation with external recycle

4 结 论

以海藻酸钙包埋米根霉孢子的方法制得固定化颗粒, 在三相流化床发酵并与 TRPO/磺化煤油萃取耦合进行 L-乳酸生产的研究。结果表明, 萃取发酵过程适合于 L-乳酸的生产。另外, 异位萃取发酵的结果要优于同位萃取发酵。还对萃取发酵过程的动力学进行了研究, 提出的动力学模型能够较好地描述萃取发酵过程中 L-乳酸的积累及其在各相间分配的规律。

符号说明

F 发酵液通过萃取柱的循环流量/ $L \cdot h^{-1}$
 v_{La} 产酸速率/ $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$
 v_{Glc} 耗糖速率/ $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$
 V 体积/ L
 C 浓度/ $g \cdot L^{-1}$
 D_{La} 乳酸的分配系数
 t 时间/ h

下标
 HLA 乳酸
 $CaLa_2$ 乳酸钙
 o 有机相
 a 水相
 b beads, 固定化细胞颗粒
 0 初值

参 考 文 献

- [1] Hang Y D, Hamamci H, Woodams E E. *Biotechnol. Letters*, 1989, 11(2): 119~120.
[2] Hamamci H, Ryu D D Y. *Applied Biochem Biotechnol*, 1994, 44: 125~133.
[3] Tamada M, Begum A A, Sadi S, J. *Ferment Bioeng*, 1992, 74(6): 379~383.
[4] 李学梅, 刘莱娥, 林建平等, *化学反应工程与工艺*, 1996, 12(3): 301~307.
[5] 林建平, 周 凡, 岑沛霖, *微生物学报*, 1996, 36(4): 310~313.
[6] Vođktavecsuk P, Tonokawa M, Ishizaki A, J. *Ferment Bioeng.*, 1994, 77(5): 508~512.
[7] Wang H L, Swain E W, Hesseltine L W. *J Food Sci*, 1975, 40: 168~170.
[8] 李绍壮, 卢英华, 郑连英等, *高校化学工程学报*, 10(3): 304~308.
[9] Barker S B, Summerson W H J. *Biol Chem*, 1941, 138: 535~554.

Extractive L-lactic Acid Fermentation with Immobilized *Rizopus oryzae* in a Three-phase Fluidized Bed

Li Shaozhuang Lin Jianping Lu Yinghua Li Xuemei Yao Shu Cen Peilin

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

Abstract The *Rhizopus oryzae* was immobilized by calcium alginate entrapment method. A three phase fluidized-bed bioreactor was designed to perform the immobilized-cell L-lactic acid fermentation. A solvent extraction column was coupled with the bioreactor to remove L-lactic acid from fermentation broth. The TRPO was used as solvent and solfonated kerosene as diluent. The results indicated that the pH value in the broth was regulated above pH 3.5 and the fermentation rate was as high as 11g L-lactic acid per hour per liter of beads. A mathematical model was proposed to describe the concentration of L-lactic acid in the extractive fermentation.

Key words L-lactic acid, extractive fermentation, TRPO, *R. oryzae*, three-phase fluidized-bed bioreactor