

双液相发酵系统中氧传递机理的研究

李小明

包志泉

(无锡轻工大学)

(天津轻工业学院)

摘要 以一种液态烷烃为油相,将其引入青霉素发酵过程以提高氧的传递。通过摇瓶和罐发酵对该双液相系统的发酵过程进行了研究,实验结果表明,油相分数为2%时,发酵体系中的传氧能力得到了最大程度的提高并最终导致了青霉素产量的提高。通过对体积传氧系数及油相与水相物理化学性质的研究,对油相引入后,发酵能力提高的现象作了初步的解释,并提出了双液相系统中氧从气泡传递到微生物细胞的宏观模型。

主题词 双液相;发酵;供氧系统;模型建立

中图分类号 TQ920.1

0 前言

通风发酵过程中,氧的传递通常是一个关键因素,传氧限制的结果造成细胞生长速度减慢,并由此导致低细胞浓度和低产量。解除氧的限制作用可以通过调节适当的通风、转速及设计合理的反应器来达到,这方面的工作已得到了深入的研究。近年来进一步提高传氧能力的构想可以分为以下两类^[1]:第一类是在发酵液中引入一种能产生氧气的物质,这种技术包括化学方法和物理方法,如加入过氧化氢或加入一种能产生氧气的藻类;第二类为双液相发酵系统,即在发酵体系中加入一种新的液相,该液相一般具有较高的溶氧能力,并且与发酵液互不混溶。此类方法的共同优点在于无需增加通风和搅拌即可提高传氧。本文对双液相体系中的传氧现象作了初步的探讨。

1 材料及方法

1.1 材料

DFⅢ6型自控玻璃发酵罐(上海制药机械四厂),液态烷烃:主要为12~14碳直链烷烃混合物,菌种:产黄青霉3.546(*Penicillium chrysogenum*)

收稿日期:1995-03-01

1.2 实验方法

1.2.1 摇瓶发酵 产黄青霉经斜面活化后,转接一环至装有 50ml 发酵培养基的 250ml 三角瓶中,摇瓶培养。转速 200r/min,温度 25℃。每批次发酵中有含油相 分数为 0%,1%,2%,5%,10%平行若干组。

1.2.2 罐发酵 采用流加方式,初糖浓度为 32g/L,发酵至 96h 时流加碳源至还原糖浓度达到 28~30g/L。发酵罐的装液量为 2000~3000ml,罐发酵的操作条件为:1atm,搅拌速度 600~1000r/min,通风量 1VVM,pH 维持在 6.5,温度 25℃。

1.2.3 分析方法 还原糖浓度测定根据斐林试剂法,青霉素浓度测定用比色法^[2],体积传氧系数的测定采用亚硫酸盐法,细胞疏水性根据接触角及表面、界面张力测定结果判定^[3]。

1.2.4 菌体干重的测定 发酵样品经过滤洗涤后,滤渣于 80℃烘箱中烘干至恒重,称重,每次平行做两个样品。

2 实验结果与讨论

2.1 油相加入提高氧传递的初步实验证据

2.1.1 摇瓶发酵 进行摇瓶发酵的主要是为了下面两个目的:一是在 250ml 三角瓶中,装液量 50ml 时比较容易达到溶氧限制,这便于观察油相的加入是否有利于传氧能力的提高,其二则是三角瓶培养便于研究不同油相体积分数对发酵的影响。摇瓶发酵的结果如图 1 所示,从图中可以看出,油相的引入使得菌体的生长速度及还原糖的消耗速度明显加快,青霉素的生成则没有表现出明显的变化。而油相分数由 2%增至 5%及 10%时,发酵性能并无进一步的提高。

2.1.2 罐发酵 以添加 2%油相和不添加油相作两轮发酵对照,结果如图 2,图 3 所示。

对比图 2,图 3 可以看出油相的加入有利于菌体的生长,并最终使青霉素的产量得到了提高(提高约 40%)。由此我们可以得出初步的结论:油相的引入有利于青霉素发酵过程中氧的传递,并最终导致产青霉素能力的提高,当然油相的加入时机及如何同整个青霉素发酵全过程匹配尚有待于进一步的研究。

2.2 细胞疏水性及体积传氧系数的测定

油滴对细胞表面接触角的测定结果如图 4 所示:20min 内,接触角的变化都是小于 90℃的,这表明细胞表面是疏油亲水的。

油水表面及界面张力的测定结果列在表 1 中,油滴在水表面的铺展系数 Sp (Spreading coefficient)由下式确定:

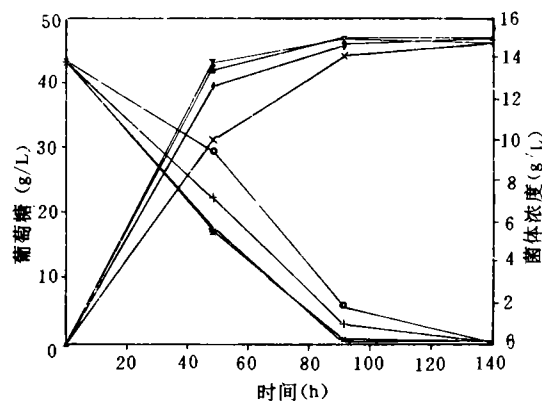


图 1 摇瓶发酵在不同油相分数时,菌体浓度、还原糖浓度的变化

— · — 0%葡萄糖 — + — 1%葡萄糖
 油 — * — 2%葡萄糖 — □ — 5%葡萄糖
 相 — × — 0%菌体浓度 — ● — 1%菌体浓度
 — ▲ — 2%菌体浓度 — □ — 5%菌体浓度

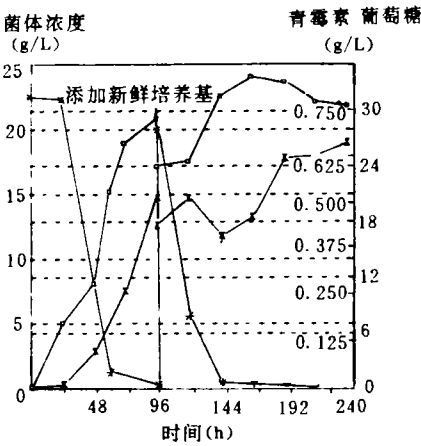


图2 未加油相的青霉素发酵情况

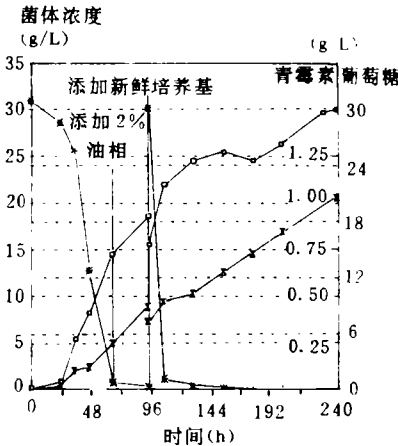


图3 加2%油相时的青霉素发酵情况

—*— 葡萄糖 —△— 菌体 —□— 青霉素

表1 油水表面性质及溶氧能力(1atm, 25℃)

$S_p = \sigma_{WG} - (\sigma_{XG} + \sigma_{OW})$	表面张力	油水界面张力	溶氧能力
σ_{WG} : 气、水表面张力	($10^{-3}N/cm$)	($10^{-3}N/cm$)	(mg/L)
σ_{XG} : 气、油表面张力	油 24.7	51.4	39.68
σ_{OW} : 油、水表面张力	水 72.1		8.48

根据表中的数据计算得到油对水的铺展系数 $S_p = -4.0$ 。从物理化学的角度考虑, 为满足表面自由能最低, 当 $S_p > 0$ 时, 油铺展于水的表面, 形成一层薄的油膜; 当 $S_p < 0$ 时, 油在水的表面不铺展, 而形成一个晶状液滴。通气搅拌系统中, 这种具有负铺展系数的油相引入时, 被打散的细小油滴将附着在气液界面上, 形成一个气泡和油滴的复合体。

不同油相分数加入时对体积传氧系数的影响如图5, 油相分数为2%时, 体积传氧系数达到最大值。

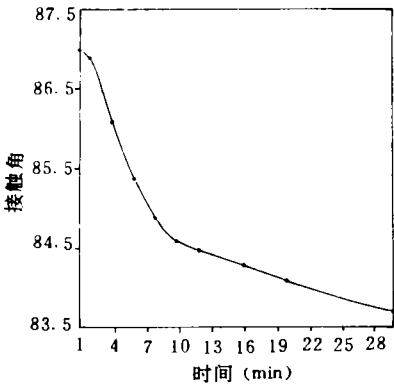


图4 25℃时油滴在细胞表面的接触角变化

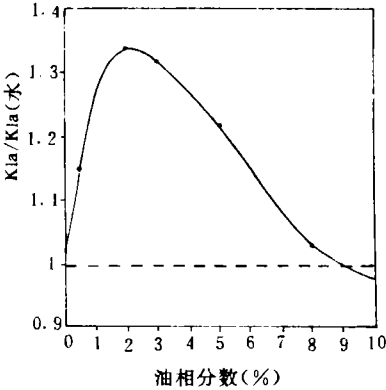


图5 不同油相分数时的体积传氧系数

2.3 双液相发酵体系氧传递机理讨论

根据下面的传质速率公式, 氧的传递取决于体积传氧系数 Kla 及饱和溶氧

$$N_{O_2} = Kla \times (C^* - C) \tag{1}$$

浓度 C^* 。油相的引入使得发酵体系中传氧能力得到了提高可以从下面几方面来考虑。首先, 油相的作用相当于一种表面活性剂, 油相的存在降低了气泡膜的表面张力, 因而使得气

泡的直径明显的减小,这一现象是在实验过程中可以通过肉眼观察得到的。气泡直径的减小,导致了在相同通气量的条件下,气液接触面积相应增加,体积传氧系数及传氧速率也随之增加。对青霉素发酵而言,油相的加入同时也使得产黄青霉的大菌丝团数显著减少,菌丝团内的质量传递效率相应得以提高,这也是油相加入后改变了细胞表面的絮凝性而使得细胞能得以相对分散生长的结果。另一方面,由于油相的溶氧能力比水高出许多,油相引入后,系统的总饱和溶氧浓度得以提高,

$$C_{\text{total}}^* = C_w^* + \Phi C_o^* \quad (2)$$

C_{total}^* 总饱和溶氧浓度; C_w^* 水相饱和溶氧浓度

C_o^* 油相饱和溶氧浓度; Φ 油相分数

(2)式可以推出的结论是,油相分数越高,总的饱和溶氧浓度越高,对传氧也越有利。然而当油相分数高出一定值时,对 Kla 值会产生一定的影响。这种影响与油相在气液界面的作用有关,由油相本身性质决定。

根据油相在水相中的铺展系数,可将油相分为两类:具有正铺展系数的油相,在水溶液的表面能自动铺展开来,形成一层油膜,通气搅拌时,油相被分散乳化,由于油水的互相排斥,最终油相集中在气液界面上,并形成一个覆盖气泡的油膜。从流体力学的角度考虑,油膜显然是存在于水边界层内的,油相对氧较高的溶解能力,使得氧穿过水边界层及油膜的能力增强,从而有利于传质。对于具有负铺展系数的油相,其在水溶液表面不铺展,通气搅拌时,油相以细小分散的油滴存在于溶液中,并逐渐集中于气液界面上。与具有正铺展系数的油相不同的是,前者是以膜的形式存在,且存在于水边界层内,而后者是以液滴的形式存在,这样一方面氧透过水边界层进入油相,其相对速度超过水相,另一方面从油滴再到水的传递过程需要克服新的界面阻力,因此氧传递的效率取决与二者之间的综合平衡。进一步可以推断:对于具有正铺展系数的油相,传氧能力随着油相分数的增加而提高;而具有负铺展系数的油相,其情况相对复杂,但一般情况仍是可以预见的,即随着油相分数的增加,体积传氧系数在达到某一最大值后开始下降,并又可能低于水溶液的体积传氧系数。鉴于此,油相的选择至关重要,具有较强溶氧能力和正铺展系数的油相应优先考虑。

对于含有气、液、油和微生物的四相系统,微生物吸收氧的途径(图6)有下面几种可能:① 气泡-水-细胞,② 气泡-细胞,③ 气泡-油相-细胞,④ 气泡-油相-水-细胞,⑤ 气泡-水-油相-水-细胞。根据接触角的测定结果,本实验所用的微生物(产黄青霉)是疏油的,另外,考虑到微生物直接吸附于气泡上,气泡膜的稳定性,途径②和③是可以排除的。对于途径⑤,油相显然是起了一个中间贮存体的作用,它先从发酵液中吸收氧,然后再释放到发酵液中供微生物利用。这种情况只有当对发酵液的供氧速度高于微生物对氧的利用速度时才会发生,然而,大多数通风发酵体系中,发酵的中、后期甚至前期,都是供氧不足的,因此,途径⑤也是可以排除的。

对于途径①和④,当油相分数还不足以覆盖全部的气泡时,它们是共存的,当油相分数达到一定值时,则主要的传递途径为④,图7简要地表达了双液相发酵体系中,氧从气泡到微生物传递的宏观模型。其中:

$$N_1 = Kl_o \cdot (C_o^* - C_o) \cdot a_1 \quad N_2 = Kl_{ow} \cdot (C_o^* - C_w) \cdot a_2$$

$$N_3 = Kl_w \cdot (C_w^* - C_w) \cdot a_3$$

微生物对氧的总吸收速度为: $N_{O_2} = N_1 = N_2 + N_3$

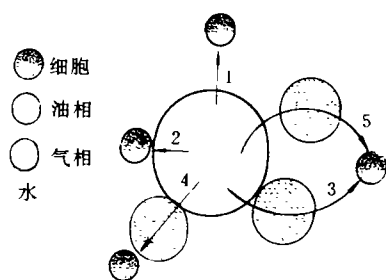


图6 25℃微生物吸收氧途径示意图

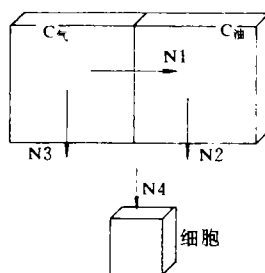


图7 氧传递宏观模型

对该模型进行较为精确的理论计算是一件较为复杂的工作,还有待于进一步的探讨。

参 考 文 献

- 1 Beth H, Junker T, Alan Hatton, and Daniel I. C. Wang, Oxygen Transfer Enhancement in Aqueous/Perfluorocarbon Fermentation systems, *Biotechnol. Bioeng.* 1990,35 578~597
- 2 George E, Boxer, Patricia M7. Everett; Chlorimetric Determination of Benzylpenicillin, *Analytical Chemistry*, 1949, 21(6) 221~225
- 3 Hendrik J, Busscher, etc. Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and Its Relevance for Adhesion, 1984,48(5) 980~983

Study on Mechanism of Oxygen Transfer in Two-liquid Phase Fermentation System

Li Xiaoming

Bao Zhiquan

(Wuxi University of Light Industry) (Tianjin Institute of Light Industry)

Abstract A liquid paraffin as oil phase was added to penicillin fermentation process to increase medium oxygen transfer. Experimental results carried out in shake flasks and laboratory scale tanks with various oil fraction showed that with two percent of oil fraction added, the optimal oxygen transfer could be reached and penicillin product was also enhanced. The theoretical explanation on this fact is given based upon the experimental data measured for volumetric oxygen transfer coefficient and physica-chemical properties of both oil and aqueous phase. Finally, a macro-model for mechanism of oxygen transfer from gas-bubbles to microbial cells was proposed.

Subject-words Two-liquid phase; Fermentation; Oxygen supply system; Model building