

丁二酸发酵液的膜分离过程研究*

吴昊,姚忠,姜岷,刘辉,陈可泉,韦萍

(南京工业大学 制药与生命科学学院,江苏南京,210009)

摘要 通过微滤、超滤等膜分离技术对丁二酸发酵液进行了分离纯化,考察了温度、压力差、pH值、循环流速等因素及操作方式对丁二酸分离的影响。丁二酸发酵液经稀释后可直接进行微滤操作,微滤的优化工艺条件为:pH 5.0,40℃,ΔP=0.03 MPa,循环流速 0.71 m/s,采用间歇反冲可降低膜污染程度,维持较高通量;微滤除菌率达 99.6%,蛋白质去除率 87%,脱色率 92%。将得到的微滤液在 20℃,pH 5.0,ΔP=0.05 MPa,0.83 m/s 循环流速下进行超滤,滤液透光率≥60%,蛋白质质量浓度仅 5mg/L。经 2 步膜分离,蛋白质去除率达 99.45%,丁二酸收率达 93%。

关键词 丁二酸,发酵,膜分离,微滤,超滤

丁二酸(succinic acid)又称琥珀酸,是一种四碳二元羧酸,可用于制备 1,4-丁二醇、四氢呋喃、γ-丁内酯等一系列重要的基础化学品,在食品、医药等行业也有广泛的应用,市场需求量大^[1]。丁二酸可由化学法或微生物厌氧发酵法制备,当前市场上绝大部分丁二酸是通过化学法生产的,但是该法原料来自日益匮乏的石油资源,同时在产生过程中存在严重的环境污染。而厌氧发酵法则是通过微生物利用可再生的农业资源和 CO₂ 高效生产丁二酸,不仅摆脱了对石油资源的依赖,而且开辟了温室气体 CO₂ 利用的新途径,已成为生物质化工研究与应用的热点。

丁二酸发酵液中含有大量菌体、不溶物颗粒、残留底物、蛋白质及色素物质等杂质,在对其进行提取纯化之前,需将发酵液中的不溶物颗粒及大分子杂质进行有效的分离。目前,对生物法制备丁二酸的分离提取工艺,国内尚无公开的文献报道。

近年来,膜分离技术以其能耗低,适宜连续操作等优点已成功应用于氨基酸、抗生素等发酵产品的分离提取,但分离过程中,由于膜的污染带来的通量下降一直是困扰膜分离技术在生物分离工程领域应用的主要问题。

实验采用微滤、超滤等膜分离手段对丁二酸发酵液的预处理方法进行研究,以确定较佳的工艺参数,并从工艺的角度探讨膜污染的解决方法,以期膜技术在生物体系分离中的应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

丁二酸发酵液(橘黄色悬浮液,丁二酸浓度约 60g/L,含有大量细胞碎片、微粒、色素、蛋白质,固体含量为 2.6%,pH=6.2):南京工业大学提供;考马斯亮蓝 G-250(化学纯);检测所用的其他分析试剂均为色谱纯。

中空纤维微滤膜(PVDF,膜孔径 0.2μm,有效膜面积 0.2 m²,外压式)、中空纤维超滤膜(PS,截留分子量 8 000 u,有效膜面积 1.5 m²,内压式):均由天津膜天膜工程有限公司提供;蠕动泵:保定兰格恒流泵有限公司;752s 紫外可见分光光度计:上海棱光技术有限公司。微滤与超滤均采用错流过滤及全循环操作方式。

1.2 试验方法

拟采用膜微滤除去发酵液中的菌体、颗粒物及部分蛋白质,微滤液经膜超滤除去滤液中的蛋白质等大分子杂质,超滤液经活性炭脱色进一步纯化,实现丁二酸的初步分离提取。

1.2.1 发酵液的微滤处理

考察 pH、发酵液稀释度、循环流速、压差、操作温度对通量 J 的影响(J 的检测方法见文献[2]),考察除菌、除蛋白及脱色效果,并比较全过滤与间歇式反冲等操作方式对微滤通量的影响,筛选出合适的微滤操作条件。

1.2.2 微滤液的超滤处理

考察 pH、循环流速、压差、操作温度对通量 J 的影响,考察除菌、除蛋白及脱色效果,筛选出优化的超滤操作条件。

第一作者:硕士,讲师[韦萍(863 课题负责)为通讯作者]。

* 国家“863”计划项目(No. 2006AA02Z235),国家自然科学基金项目(No. 20606017),江苏省高校自然科学基金计划一般项目(No. 05KJB180043)

收稿日期:2006-12-08

1.2.3 分析方法

(1)除菌率的检测:以 660 nm 下吸光值 OD_{660} 代表菌体颗粒浓度。

$$\text{除菌率}/\% = \frac{OD_0 - OD_1}{OD_0} \times 100$$

其中: OD_0 为过滤前的吸光值, OD_1 为过滤后的吸光值。

(2)脱色率的检测:由于发酵液呈橘黄色,实验是在 430nm 波长下检测吸光值,以纯水为参比。

$$\text{脱色率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0}$$

A_0 :处理前的吸光值; A_1 :处理后的吸光值;透光率亦在 430nm 波长下检测。

(3)丁二酸的定量检测:采用反相高效液相色谱法^[3]。

(4)可溶性蛋白质的定量检测:采用考马斯亮蓝法^[4]。

2 结果与讨论

2.1 微滤操作参数的优化

2.1.1 发酵液 pH 对微滤的影响

将发酵液各稀释 0.5 倍至 2 L,调节 pH 为 4.5, 5.0, 5.5, $\Delta P=0.02$ MPa,在 55 mL/min 的循环流速下微滤 95 min,微滤通量随时间的变化见图 1,微滤效果见表 1。可见微滤 10 min 后,通量开始迅速下降,微滤至 50 min 时,滤液通量逐渐稳定。

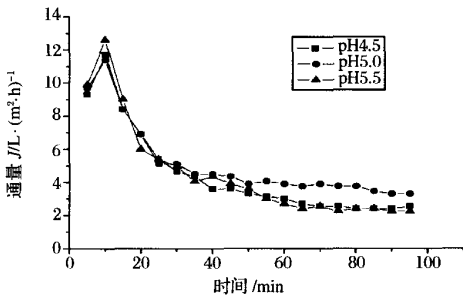


图 1 pH 对微滤通量的影响

表 1 不同 pH 下的微滤效果

pH	除菌率/%	蛋白去除率/%	脱色率/%
4.5	98.24	91.35	78.6
5.0	99.28	85.05	81.24
5.5	99.30	81.61	80.11

而 pH 从 5.5 降至 5.0 时,料液中的菌体与析出的不溶物不断絮凝成块状,并上浮至液体表面,料液变清,微滤通量明显提高。继续降至 pH4.5,料液中

大块的絮凝体破碎,滤液开始出现浑浊,除菌率下降,通量降低,这可能是由于在此 pH 值下菌体细胞溶解破碎,形成胶体颗粒,在膜表面形成凝胶层,增大了过滤阻力,故选择 pH5.0。

2.1.2 发酵液稀释对微滤的影响

将发酵液稀释一定倍数(0.25~1.0 倍)至 2 L, pH 5.0,以 660 nm 下的吸光值 OD_{660} 代表料液中菌体颗粒的浓度, $\Delta P=0.02$ MPa,在 55 mL/min 的循环流速下考察菌体颗粒的浓度对微滤的影响,其通量随时间的变化见图 2。

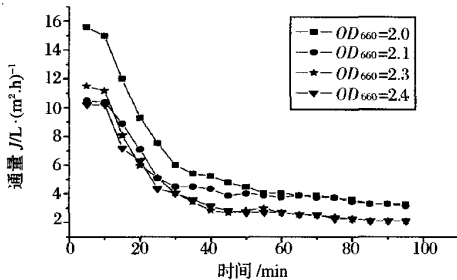


图 2 颗粒浓度对微滤通量的影响

由图 2 可见,随着料液中菌体颗粒浓度的逐步下降,微滤通量明显提高,即发酵液稀释 1.0 倍时, $OD_{660}=2.0$,其微滤液通量最高。不同菌体颗粒浓度下的微滤效果见表 2。

表 2 不同菌体浓度下微滤的效果

OD_{660}	除菌率/%	蛋白质去除率/%	脱色率/%
2.0	99.33	81.25	87.46
2.1	99.19	81.63	83.64
2.3	98.83	83.60	82.54
2.4	97.81	84.78	75.05

随着料液的稀释,微滤的除菌率、脱色率逐渐提高,但蛋白去除率却开始下降,可能是随着料液中的颗粒减少,膜表面形成的截留层逐渐变薄,对蛋白质分子的吸附拦截作用有所减弱。微滤以快速滤除菌体及颗粒为主,并从分离成本考虑,不宜将发酵液稀释过多,故将发酵液稀释 1.0 倍后(丁二酸浓度约 30 g/L)即可用于微滤操作。

2.1.3 循环流速对微滤的影响

将发酵液稀释 1.0 倍至 2 L ($OD_{660}=2.0$), pH 5.0, $\Delta P=0.02$ MPa,以不同的循环流速(0.46~0.83 m/s 相当于 55~100 mL/min)微滤 1 h,通量随时间的变化见图 3。

在错流过滤中较高的循环流速可明显减少膜表面截留层的阻力,可见当流速为 0.71 m/s(约为 85

mL/min)时, 通量明显提高, 但继续提高流速, 通量无显著提高, 实验采用 0.71 m/s 的流速作为微滤操作的循环流速。

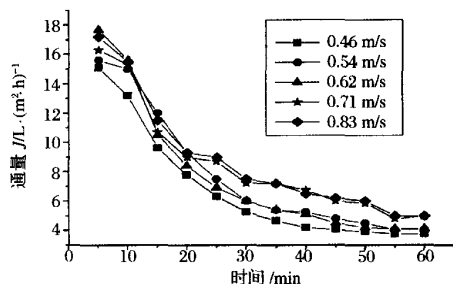


图3 循环流速对微滤通量的影响

2.1.4 压差对微滤通量的影响

将发酵液稀释 1.0 倍至 2 L, pH5.0, 常温下以 0.71 m/s 的循环流速在不同压差 ΔP 下微滤 1 h, 其平均通量 (J_v) 的变化见图 4。

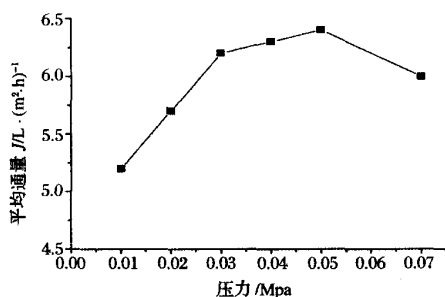


图4 压差对微滤平均通量的影响

可见当微滤处于传质控制区时, 通过提高初始压差加大过滤的推动力, 可明显提高微滤通量。但随着压差提高, 大量悬浮的菌体及颗粒在膜表面形成的截留层被压紧, 过滤阻力明显提高, 膜污染加重, 通量增加缓慢甚至出现下降趋势。可见压差为 0.03 MPa 时, 微滤通量较高, 可作为工作压差。

2.1.5 温度对微滤的影响

将发酵液稀释 1.0 倍至 2 L, pH5.0, $\Delta P=0.03$ MPa, 分别在 20~40℃ 下, 以 0.71 m/s 的循环流速微滤 1 h, 其平均通量 (J_v) 见图 5。

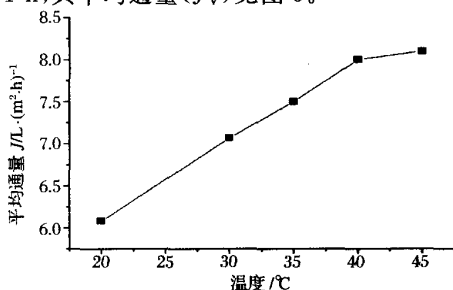


图5 温度对微滤平均通量的影响

当料液温度由 20℃ 提高到 40℃, 通量显著提高至 9.73 L/(m²·h), 增加了 31.5%, 这是由于温度升高后, 溶液粘度下降, 扩散系数增加, 有利于料液在膜管内的流动^[5]。同时发现蛋白去除率由 81% 增至 87%, 因为较高的温度使料液中蛋白质受热变性析出, 有利于分离。考虑到微滤膜操作温度上限为 45℃, 故选择 40℃ 作为操作温度。

2.2 全过滤与间歇式反冲操作的对比

由于膜分离不能实现彻底的固液分离, 为了提高收率, 将产品与截留物进一步分离, 研究了间断全过滤操作 (DD), 在选定的条件下进行微滤, 当 2 L 料液浓缩至初始体积的 1/4 时, 加水 (pH=5.0) 稀释至初始体积的 1/2, 继续微滤, 如此连续操作 3 次, 通量变化如图 6。可见随着全过滤的进行, 微滤通量可以得到部分恢复, 丁二酸的收率变化见表 3。可见 3 次全过滤后, 丁二酸的收率已达 98% 以上。但滤液全部收集后, 丁二酸浓度被稀释至 10g/L 左右, 后续分离处理量大, 能耗增加, 因此全过滤并非最佳操作方式。

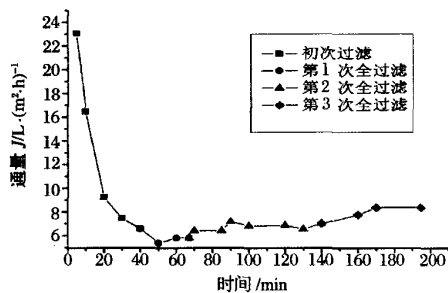


图6 连续3次全过滤的通量变化

表3 全过滤过程中丁二酸的收率变化

过滤次数	初次过滤	第1次全过滤	第2次全过滤	第3次全过滤
丁二酸收率/%	71.25	89.24	96.45	98.76
滤液总体积/L	1.5	2	3.5	5

由于料液中悬浮物颗粒在膜表面形成的截留层厚度逐渐增加导致阻力越来越大, 因此通过间歇反冲向膜表面施加反向压力, 可破坏截留层, 减缓膜的堵塞^[6]。在相同的条件下微滤 2.5 L 料液, 每隔一段时间, 快速排空组件内的死体积, 采用纯水间歇反冲, 反冲液不返回料液中, 此后继续循环过滤, 间歇反冲共 3 次, 其平均通量 (J_v) 的变化见表 4。

由表 4 可见, 微滤至 20 min 时, 膜污染尚不严重, 此时进行反冲, 可明显破坏截留层, 通量部分恢复, 但当反冲时间超过 10 min 后, 恢复有限, 微滤至 30 min 时, 膜污染比较严重, 此时反冲已不能明显破

坏截留层。实验选择的间歇反冲微滤操作条件为：发酵液稀释 1.0 倍至 2.5 L，调节 pH=5.0，40℃ 下以 0.71 m/s 流速微滤 20 min，随后快速排空组件内的死体积，纯水间歇反冲 10 min，前 5 min 的反冲液收集，随后的反冲液废弃，如此重复多次，直至微滤的浓

缩比达 50，将收集的反冲液与浓缩液混合进行一次全过滤，得到的滤液用于稀释发酵液。按此条件进行微滤操作，除菌率达 99.6%，蛋白去除率 87%，滤液中蛋白浓度仅 108 mg/L，脱色率 92%，料液的透光率由不足 1%，提高至 43%。

表 4 不同提交下间歇反冲微滤平均通量的比较

实验序号	间歇微滤时间 /min	间歇反冲时间 /min	1 次反冲后 J_v /L · (m ² · h) ⁻¹	2 次反冲后 J_v /L · (m ² · h) ⁻¹	3 次反冲后 J_v /L · (m ² · h) ⁻¹	全过程 J_v /L · (m ² · h) ⁻¹
1	60	0	—	—	—	8.0
2	20	5	10.65	9.3	7.95	9.3
3	20	10	14.7	12.0	8.25	11.65
4	20	15	15.0	11.84	8.4	11.75
5	30	10	11.35	7.15	5.5	8.0

2.3 超滤操作参数的优化

2.3.1 初始压差对超滤的影响

在 pH=5.0，20℃ 下在 0.83 m/s (100 mL/min) 循环流速下超滤 2L，不同压差下的超滤结果见表 5。

表 5 不同初始压差下的超滤效果

△P 压差/MPa	平均通量 /L · (m ² · h) ⁻¹	滤液透光率/%	脱色率/%
0.01	2.33	60.4	29.87
0.03	2.76	61.2	31.25
0.05	3.49	61.5	31.67
0.06	3.51	62.0	32.58
0.07	3.47	62.1	32.64

当超滤处于传质控制区时，通过提高初始压差加大过滤的推动力，明显提高超滤通量，但随着压差提高，在膜表面形成的凝胶层被压实增厚^[5]，阻力加大，导致通量增加缓慢并出现下降，因此实验选择超滤压差为 0.05 MPa。

2.3.2 料液 pH 对超滤的影响

△P=0.05 MPa，循环流速为 0.83 m/s，分别在不同 pH 下进行超滤，其平均通量的变化见图 7。

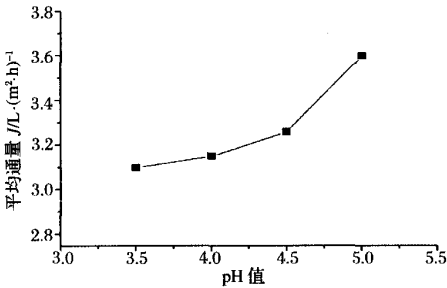


图 7 pH 对超滤通量的影响

当 pH<5.0 时，通量显著下降，可能强酸性导致蛋白质变性，溶解性能降低，容易沉积在膜面，沉淀的

蛋白质堵塞了膜孔，加剧了超滤阻力^[7]。经检测滤液中蛋白浓度均<10 mg/L，蛋白去除率均>96%，故采用 pH=5.0 作为超滤 pH。

2.3.3 循环流速对超滤的影响

考察了不同循环流速(0.54~0.95 m/s，相当于 65~115 mL/min)对超滤通量的影响，其平均通量的变化结果见图 8。

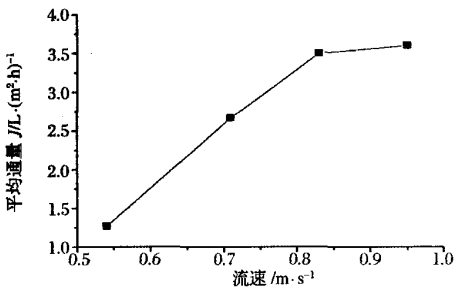


图 8 循环流速对超滤通量的影响

可见随着循环流速的提高，显著减少了浓差极化效应，超滤通量显著增加，实验选择 0.83m/s (100mL/min)为超滤循环流速。

2.3.4 温度对超滤的影响

在已优化的条件下，考察温度对超滤的影响，超滤结果见表 6。

表 6 不同温度下的超滤效果

操作温度 /℃	平均通量 /L · (m ² · h) ⁻¹	滤液透光率 /%	蛋白去除率 /%	脱色率 /%
20	3.53	61.2	97.35	29.05
30	3.70	60.5	97.12	28.55
40	3.83	56.3	96.48	26.94

随着温度升高，料液粘度下降并可减缓浓差极化现象，对超滤有利，但料液已经过微滤，绝大部分悬浮颗粒已除去，故至 40℃ 时，超滤通量仅比 20℃ 提高了

8.58%,但高温下导致膜孔隙扩大,滤液透光率、脱色率和蛋白去除率均有下降,从能耗和效果考虑,选择20℃下进行超滤。超滤浓缩比达50时,浓缩液进行全过滤,得到的滤液用于稀释发酵液,可将整个膜分离过程中丁二酸收率提高至93%。超滤液直接经活性炭脱色、结晶等精制手段可获得符合质量要求的丁二酸产品,另文报道,该研究成果现已申请专利(一种从厌氧发酵液中提取丁二酸的方法,专利申请号:20061008003.7)。

3 结 论

实验选择膜微滤与超滤法结合除去丁二酸发酵液中的菌体颗粒、蛋白及色素。微滤的优化工艺条件为:丁二酸发酵液稀释1.0倍(丁二酸浓度30 g/L),pH 5.0,在40℃下以0.71 m/s的循环流速进行微滤, $\Delta P=0.03$ MPa,每微滤20 min,随即排空膜组件内的死体积,纯水间歇反冲10 min,前5 min的反冲液收集,随后的反冲液废弃,如此重复多次,直至微滤浓缩比达50,移走滤液用于下一步超滤处理,微滤平均通量为8.6 L/(m²·h),除菌率可达99.6%,蛋白去除率达87%,脱色率达92%,料液透光率由微滤前的0.5%提高至43%。超滤法进一步精制滤液的工艺条件为:20℃,pH 5.0, $\Delta P=0.05$ MPa,循环流

速0.83 m/s,当浓缩比达50时,移走滤液用于进一步分离,超滤通量为3.5 L/(m²·h),蛋白去除率97%,脱色率约29%,滤液透光率 $\geq 60\%$,滤液中蛋白浓度约5 mg/L。膜分离过程中产生的反冲液与浓缩液混合后进行全过滤,得到的滤液可回收使用,整个膜分离过程中蛋白去除率达99.45%,丁二酸收率达93%。

参 考 文 献

- 1 詹晓北,朱一晖.琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场[J].食品科技,2003,(2):44~49
- 2 张 宁,彭志英.中空纤维超滤膜浓缩胞外多糖PS-9415发酵液的研究[J].食品工业科技,2003,24(2):24~27
- 3 陈可泉,韦 萍,蔡 婷,等.反相高效液相色谱在发酵制备琥珀酸中的应用[J].生物加工过程,2005,3(2):50~57
- 4 李如亮.生物化学实验[M].武汉:武汉大学出版社,1998.59~61
- 5 华耀祖.超滤技术与应用[M].北京:化学工业出版社,2004
- 6 王 文,冯 鑫.超滤技术在GABA发酵液分离纯化过程中的应用[J].江苏大学学报,2005,26(1):5~8
- 7 肖恩荣,李定,丁一刚,等.中空纤维超滤膜去除乳酸钙中蛋白质的研究[J].化学世界,2004,(12):638~641

Study on Purification of Succinic Acid Broth by Membrane Separation

Wu Hao, Yao Zhong, Jiang Min, Liu Hui, Chen Kequan, Wei Ping

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjin University of Technology, Nanjin 210009, China)

ABSTRACT Succinic acid was purified from broth by microfiltration and ultrafiltration, the influence of parameters in separation such as temperature, pressure difference, pH, circulation flow rate and operation mode were studied. Succinic acid broth was diluted and microfiltrated in better conditions such as pH5.0, 40℃, $\Delta P=0.03$ MPa, 0.71m/s; batch recoil operation can reduce membrane pollution; 95% bacterial cells were removed, the removal ratio of protein was 87% and ratio of decoloration was 92%. The filtrate from microfiltration was ultrafiltrated in better conditions such as 20℃, pH5.0, $\Delta P=0.05$ MPa, 0.83m/s, the light transmittance of filtrate from ultrafiltration was above 60% and concentration of protein was only 5mg/L. Finally, after two step of membrane separation, the removal ratio of protein was 99.45% and the recovery of succinic acid was 93%.

Key words succinic acid, fermentation, membrane separation, microfiltration, ultrafiltration