

基于 PEG/DEX 双水相体系的 餐厨垃圾乳酸发酵

叶志隆^{1,2} 蔡伟民² 芦敏³(1. 中国科学院城市环境研究所城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021;
2. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 3. 厦门大学环境与生态学院, 厦门 361005)

摘要 利用聚乙二醇(PEG)/葡聚糖(DEX)双水相体系分离餐厨垃圾发酵产物乳酸,分析了聚合物浓度和分子量的影响,以及餐厨垃圾多批次连续发酵时乳酸产率。实验结果表明,PEG/DEX双水相体系对乳酸菌生长影响不大,PEG和DEX浓度变化对乳酸产率、相体积比无显著影响;当DEX分子量由20 000升至40 000,乳酸生成速率由0.631 g/(L·h)降至0.518 g/(L·h),乳酸浓度由33 g/L降至22 g/L。多批次餐厨垃圾连续发酵可极大缩短发酵时间,在不投加缓冲剂的情况下,单批次乳酸产率仍大于0.30 g/g,累积产率大于0.45 g/g。

关键词 双水相 餐厨垃圾 乳酸 发酵

中图分类号 Q814.1 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2012)09-3299-06

Lactic acid extraction from kitchen wastes fermentation using aqueous two-phase systems

Ye Zhilong^{1,2} Cai Weimin² Lu Min³

(1. Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 2. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 3. College of Environment & Ecology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Polyethylene glycol (PEG)/dextran (DEX) aqueous two-phase systems were used to extract lactic acid from kitchen wastes fermentation. Results showed that PEG/DEX system had insignificant effect on the growth of lactic acid bacteria. The variation of PEG and DEX concentrations influenced cells growth and lactic acid biosynthesis indistinctively. Volume ratio kept stable throughout the processes, despite the changes of raw material and product concentrations. Different from little influence of PEG molecular weight on fermentation, the increase of DEX molecular weight from 20 000 to 40 000 led to declines of lactate conversion rate from 0.631 g/(L·h) to 0.518 g/(L·h) and lactic acid concentration from 33 g/L to 22 g/L. A repeated extractive fermentation was carried out with four top-phase replacements. Results presented that when cell density reached the stationary phase in the first extractive fermentation, the lactate yield was maintained above 0.30 g/g per batch and 0.45 g/g in the total process.

Key words aqueous two-phase system; kitchen waste; lactic acid; fermentation

餐厨垃圾是指家庭和各类企事业单位食堂产生的食物废料和食物残余垃圾,由于它有机物含量和含水率高,极易腐败,并滋生细菌,如果处置不当会造成严重的污染。另一方面,餐厨垃圾富含脂肪、蛋白质和多种糖类营养成分,具有资源化利用的广阔前景。利用餐厨垃圾发酵生产乳酸是实现资源化的有效途径之一^[1,2],所得乳酸是一种重要的工业原料,被广泛应用于食品、医药和化工等领域,并且由乳酸还可以合成聚乳酸类生物可降解塑料,成为石油化工生产通用塑料的替代品。

工业上的乳酸发酵生产工艺由水解糖化、发酵、乳酸分离过程组成。由于乳酸发酵是产酸过程,需要在发酵中添加CaCO₃以维持适宜的pH值。现有的乳酸分离工艺采用乳酸钙结晶-硫酸酸化法从发酵液中分离出乳酸,这一工艺流程长,消耗化工原料

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2009J05132);福建省科技计划项目(2010I004);厦门市科技计划项目(3502Z20111049)

收稿日期:2011-05-17; 修订日期:2011-10-02

作者简介:叶志隆(1975~),男,博士,副研究员,主要从事固体废物处置与资源化研究工作。E-mail: zlye@iue.ac.cn

多,并容易引起环境污染^[3,4]。近年来,双水相(aqueous two-phase system, ATPS)分离技术由于具有良好的生物相容性、操作简便、高的产品收率和反应器容易放大^[5,6]等特点被广泛应用于蛋白质、酶等生物产品的分离和纯化。基于ATPS的发酵体系意味着细胞富集于ATPS中的一相,而产物则从另一相分离。由于有机酸等小分子有机物往往均匀分配于两相,而细胞往往单相分配^[7],在这种情况下,改变ATPS两相的体积比大小可获得理想的产品收率。目前应用双水相技术分离餐厨垃圾乳酸发酵产物的研究还未见报道。本研究将聚乙二醇(PEG)/葡聚糖(DEX)双水相体系运用到餐厨垃圾发酵提取乳酸,分析了聚合物浓度和分子量对双水相发酵体系的影响,并考察了餐厨垃圾多批次连续发酵提取乳酸的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用餐厨垃圾来自某大学食堂,挑去骨头、塑料袋等不可降解物后,垃圾主要成分为米饭、蔬菜、肉、蛋、豆腐和面条等。经105℃干燥24 h后,用小型食品粉碎机对垃圾进行粉碎(粒度小于0.5 mm)、均质,并储存于-5℃,备用。干垃圾中各组分含量为(W/W):灰分4.74%,总糖71.55%,还原糖4.06%,粗蛋白8.82%,粗脂肪12.03%。

乳酸发酵菌株采用本实验室分离的乳杆菌株 *Lactobacillus plantarum* BP04^[8,9]。种子培养基采用MRS液体培养基,接种后,置于摇床,转速200 r/min,35℃培养24 h。由于乳酸菌缺乏水解酶类的能力,不能直接利用淀粉进行乳酸发酵,因此实验选用河北省天丰生物工程有限公司的 α -淀粉酶(2 000 U/g)与蛋白酶(5 000 U/g)作为餐厨垃圾的水解酶。

PEG(分子量6 000、10 000和20 000)与DEX(分子量20 000和40 000)均采用上海国药化学试剂有限公司的分析纯试剂。

1.2 实验过程

1.2.1 批次实验

分别考察聚合物浓度和分子量对餐厨垃圾乳酸发酵PEG/DEX体系的影响,具体实验过程如下:往锥形瓶中分别加入不同质量或不同分子量的PEG和DEX,形成PEG/DEX双水相体系,再加入10 g干垃圾,121℃灭菌20 min;然后按每g干垃圾加入40 U/g α -淀粉酶、50 U/g蛋白酶及5%(W/W)的种

子培养液,发酵液定量于200 mL,置于摇床内,转速200 r/min,35℃厌氧发酵,定时取样分析。

1.2.2 多批次连续发酵

往锥形瓶中加入PEG10000 6.0%和DEX20000 8.0%的PEG/DEX双水相体系,及8 g干垃圾,121℃灭菌20 min。按每g干垃圾加入40 U/g α -淀粉酶、50 U/g蛋白酶及5%(W/W)的种子培养液,发酵液定量于200 mL,置于摇床内,转速200 r/min,35℃厌氧发酵。第一次发酵36 h后,将发酵液移至经灭菌的500 mL容器中,静置,分相,移去上相,将下相及新补充的新鲜上相倒入锥形瓶中,放置摇床内,继续发酵。之后每隔24 h进行相分离,提取上相液体,再补充新鲜上相。补充的新鲜上相中含有6%的PEG10000与4 g干垃圾。由于每次移去的上相中含有约1%~2%的DEX,因此,在补料时,加入相应的量的DEX。 α -淀粉酶与蛋白酶则按消耗50%的量进行补充。

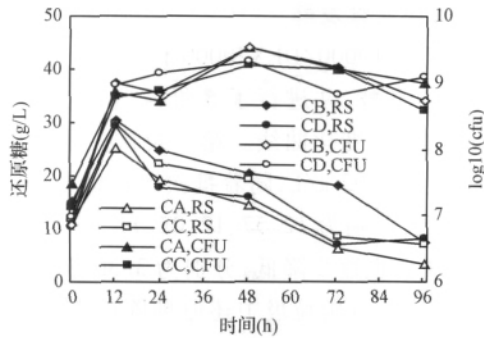
1.3 分析方法

还原糖采用DNS法测定;活菌数(colony-forming unit, CFU)采用平板计数法;粘度采用Gemini 200 HR旋转流变仪测定。发酵时上下相体积直接由目测获取,并计算相体积。乳酸测定采用高效液相色谱法,样品经10 000 r/min高速离心5 min后,去上清液经0.45 μ m滤膜过滤,再送至高效液相色谱仪(Agilent HPLC 1100)进行测定。体积比(volume ratio)为ATPS分相后上相体积与下相体积之比。

2 结果与讨论

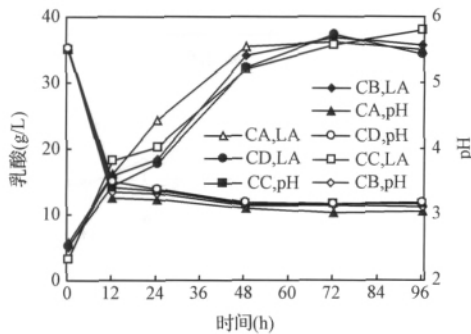
2.1 聚合物浓度影响

图1~图3显示了聚合物浓度变化对餐厨垃圾乳酸发酵的影响。图中CA为对照反应体系,即不加PEG和DEX的发酵体系。由图1可知,乳酸菌在ATPS中生长情况与在参照组中相差不大,在12 h时达到稳定期,乳酸浓度在发酵终了时约为35 g/L左右。但参照组乳酸菌在对数生长期内具有较快的乳酸产率(图2),其12 h与24 h时的平均乳酸产率为0.683 g/(L·h),高于ATPS体系的0.201 g/(L·h)(PEG/DEX中PEG 5.0%、DEX 8.0%)、0.191 g/(L·h)(PEG/DEX中PEG 8.0%、DEX 8.0%)与0.282 g/(L·h)(PEG/DEX中PEG 8.0%、DEX 11.0%)。对于各ATPS组来说,成相聚合物浓度升高,粘度相应增加(图3),但对餐厨垃圾发酵影响不明显(图1、图2)。图4显示在发酵过程中相体积基本不变,不受乳酸生产或还原糖降低的影响。



(CA:对照体系;CB:PEG10000 和 DEX20000 浓度分别为 5.0% 和 8.0%;CC:PEG10000 和 DEX20000 浓度分别为 8.0% 和 8.0%;CD: PEG10000 和 DEX20000 浓度分别为 8.0% 和 11.0%;RS:还原糖;CFU:菌落数)

图 1 不同聚合物浓度时的还原糖浓度和菌体浓度
Fig.1 Reducing sugar concentration and colony-form units in fermentation operating in different PEG10000/DEX20000 systems



(CA:对照体系;CB:PEG10000 和 DEX20000 浓度分别为 5.0% 和 8.0%;CC:PEG10000 和 DEX20000 浓度分别为 8.0% 和 8.0%;CD: PEG10000 和 DEX20000 浓度分别为 8.0% 和 11.0%;LA:乳酸;pH:pH 值)

图 2 不同聚合物浓度时的乳酸浓度、pH 值
Fig.2 Lactic acid concentration and pH values in fermentation operating in different PEG10000/DEX20000 systems

从上述对比可以看出,PEG/DEX 体系具有良好的生物相容性,且不影响乳酸产率,适合作为餐厨垃圾生产乳酸的发酵体系。一般认为,由于聚合物浓度增加会引起 ATPS 体系粘度升高,渗透压增加,导致发酵过程减缓^[10,11]。本研究显示,ATPS 中乳酸菌生长不受聚合物浓度影响,但乳酸生成速率在对数生长期较低,这是可能由于 PEG/DEX 体系粘度

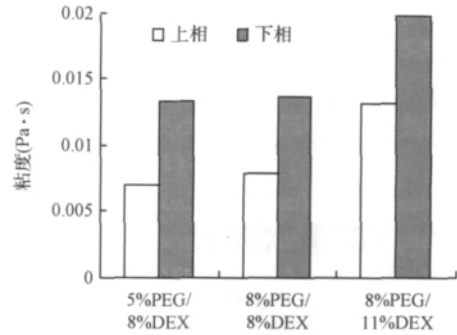
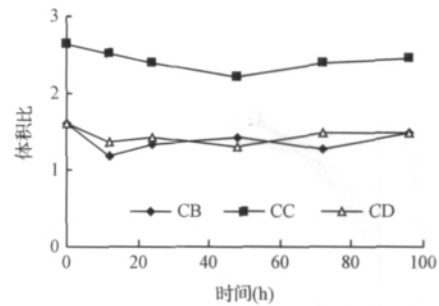


图 3 不同聚合物浓度时 PEG10000/DEX20000 体系粘度

Fig.3 Viscosity of different PEG10000/DEX20000 bi-phasic systems. White columns stand for top phase, black columns for bottom phase



(CB:PEG 和 DEX 浓度分别为 5.0% 和 8.0%;CC:PEG 和 DEX 浓度分别为 8.0% 和 8.0%;CD:PEG 和 DEX 浓度分别为 8.0% 和 11.0%)

图 4 不同聚合物浓度时的体积比
Fig.4 Volume ratio during fermentation

(图 3) 远高于水的粘度(0.8937×10^{-3} , 25°C)^[12], 导致发酵时传质受阻。体积比是评价发酵产率的重要参数^[13,14],受聚合物浓度影响^[15]。从实验结果看,餐厨垃圾发酵过程中 PEG/DEX 体积比稳定,不受聚合物浓度变化影响,这可能是由于 PEG/DEX 体系成相聚合物均为非离子型聚合物,所组成的 ATPS 为非离子型体系^[16,17]。

2.2 聚合物分子量影响

图 5 ~ 图 7 为聚合物分子量变化对餐厨垃圾发酵的影响。PEG 分子量升高,体系粘度有小幅增加(图 7),但对乳酸菌生长与乳酸生成速率影响不大(图 5 与图 6)。DEX 分子量从 20 000 升至 40 000 时,发酵前 48 h 乳酸平均生成速率由 0.631 g/(L·h) 降至 0.518 g/(L·h),且发酵终了时,乳酸浓度也由 33 g/L 降至 22 g/L 左右,可见 DEX 分子量的

变化对发酵速率与乳酸产量有显著影响。DEX 分子量增加 相应引起上下相粘度协同增大(图7)。由于乳酸菌主要分配于 DEX 相,粘度增加会带来发酵传质受阻^[18],因此发酵速率与乳酸产量相应降低。

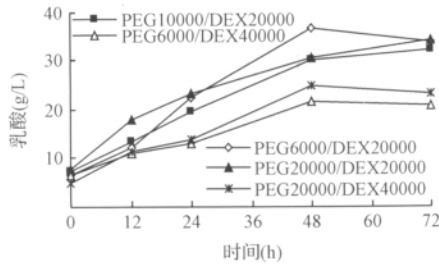


图5 不同聚合物分子量时的乳酸浓度

Fig. 5 Lactic acid concentration during fermentation operating with different molecular weight of polymers

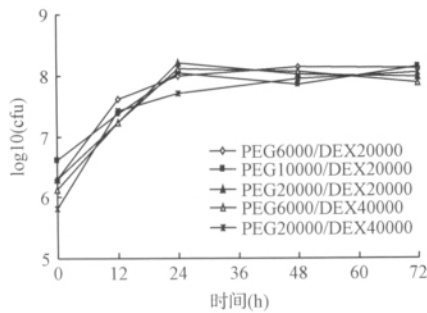
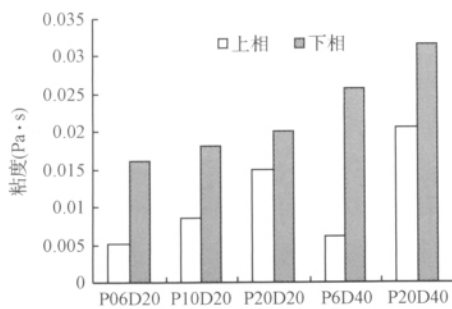


图6 不同聚合物分子量时的细菌浓度

Fig. 6 Colony-form units during fermentation operating with different molecular weight of polymers



(P06D20: PEG6000/DEX20000; P10D20: PEG10000/DEX20000; P20D20: PEG20000/DEX20000; P6D40: PEG6000/DEX20000; P20D40: PEG20000/DEX40000)

图7 不同聚合物分子量 PEG/DEX 体系粘度
Fig. 7 Viscosity of different PEG/DEX biphasic systems (White columns stand for top phase, black columns for bottom phase)

2.3 多批次连续发酵

采用 PEG10000/DEX20000 体系进行餐厨垃圾多批次连续发酵,并进行了5批次乳酸分离。图8为乳酸与 pH 值变化曲线。第一批次发酵结束时乳酸浓度达到 29.92 g/L,随着批次增加体系中乳酸浓度逐步降低,分别为 12.57、12.05、11.95 和 9.09 g/L,对应 pH 值也逐步降低,分别为 3.30、3.29、3.29、3.14 和 3.14。餐厨垃圾中还原糖除前 12 h 因酶解浓度升高外,12 h 后的变化趋势大致与乳酸对应(图9)。而乳酸菌生长在经历前 12 h 快速生长后,整个发酵过程浓度一直保持 3.2×10^7 CFU/mL 与 1.0×10^8 CFU/mL 之间(图9)。图10为连续发酵时体积比变化曲线,由于补料中加入的 DEX 大体弥补了每次提取乳酸损失的 DEX,因此体积比稳定在 2.0~2.5 左右。表1列出了在不添加酸碱缓冲剂情况下,餐厨垃圾在 PEG/DEX 中发酵的乳酸产率,5个批式发酵累积产率在 0.40~0.50 左右,而单批次乳酸产率在 0.3~0.47 之间。

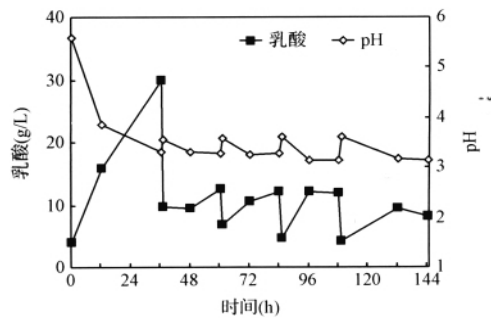


图8 多批次连续发酵时乳酸与 pH 值

Fig. 8 Lactic acid concentration and pH values during repeated extractive batch fermentation

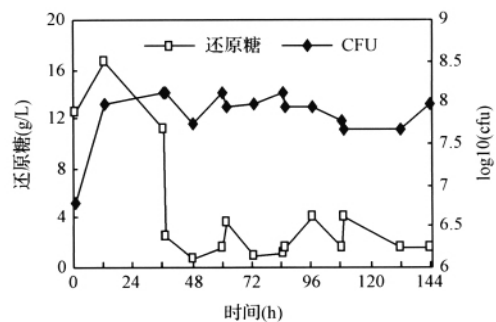


图9 多批次连续发酵时还原糖与细菌浓度

Fig. 9 Reducing sugar concentration and colony-form units during repeated extractive batch fermentation

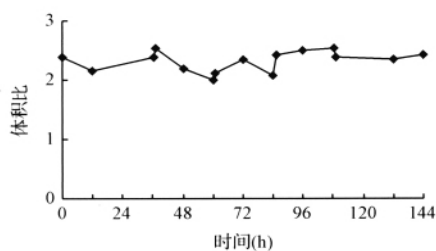


图 10 多批次连续发酵时的体积比

Fig. 10 Volume ratio during repeated extractive batch fermentation

表 1 多批次连续发酵乳酸产率

Table 1 Lactic acid productivity in repeated extractive batch fermentation

参数	第 1 批	第 2 批	第 3 批	第 4 批	第 5 批
垃圾补料 (g)	8	4	4	4	4
$[LA]_i$ (g/L) ^a	3.96	9.64	6.82	4.58	4.15
$[LA]_p$ (g/L) ^b	29.92	12.57	12.05	11.95	9.09
体积比	2.396	1.990	2.068	2.533	2.429
pH	3.30	3.29	3.29	3.14	3.14
单批次产率 (g/g) ^c	0.475	0.445	0.374	0.407	0.322
累积产率 (g/g) ^d	0.475	0.465	0.505	0.544	0.500

a) $[LA]_i$ 为每批次发酵前乳酸浓度;b) $[LA]_p$ 为每批次发酵后乳酸浓度;

c) 每批次产率 (g/g) = 每批次乳酸浓度 (g/L) × 上相体积 (L) / 单批次添加垃圾量 (g);

d) 累积产率 (g/g) = 累积提取乳酸量 / 累积添加垃圾量。

应用 ATPS 进行餐厨垃圾批式发酵提取乳酸的研究还未见报导。本研究用 PEG/DEX 体系在餐厨垃圾发酵时进行乳酸提取。由于 DEX 相能很好地富集乳酸菌, 保证每批次发酵时乳酸菌具有高浓度 (图 9) 乳酸菌生长不须经历停滞期、对数期, 相比于传统批次发酵能极大缩短发酵时间。由于乳酸发酵是产酸过程, 现有生产工艺条件下不添加缓冲剂或不即时从发酵液中分离出乳酸, 会造成发酵反应的停滞。本研究由于未添加缓冲剂, 每批次提取后 DEX 相中仍含有乳酸, 造成下批次发酵的起始 pH 值比较低 (约 3.6 左右), 在此情况下, 单批次乳酸产率仍大于 0.30 g/g, 累积产率大于 0.45 g/g。可见, 在 ATPS 体系中进行发酵产酸, pH 值控制的要求可相应降低, 能极大减少缓冲剂用量。连续发酵时, PEG 相的移除会引起 ATPS 相系统的变化, 改变两相体积比, 影响乳酸回收率。由于 PEG 在 DEX

相中含量极低, 而 DEX 在 PEG 相中的含量约为 1% ~ 2%^[19], 因此在补料时应适当添加 DEX 于 ATPS 中。本实验分批垃圾补料为 4 g, 相应乳酸单批次产率在 0.3 ~ 0.47 之间。如垃圾补料量降低, 则产率将提高, 从另一方面说明, 在不影响总乳酸产量的基础上, 小范围减少餐厨垃圾投加量, 以获得更高的乳酸产率。

3 结 论

(1) 相比于常规发酵体系, PEG/DEX 双水相体系对乳酸菌生长影响不大, 而乳酸平均生成速率在 12 ~ 24 h 为 0.20 g/(L · h) 左右, 低于常规发酵体系的 0.683 g/(L · h); ATPS 中上下相聚合物浓度变化对餐厨垃圾发酵影响不明显; PEG/DEX 体系在发酵过程中, 体积比稳定, 不受产物与基质浓度变化的影响。

(2) PEG 分子量增加对餐厨垃圾乳酸发酵影响不大; 而 DEX 分子量 20 000 增加到 40 000, 乳酸生成速率相应由 0.631 g/(L · h) 降至 0.518 g/(L · h), 乳酸浓度也由 33 g/L 降至 22 g/L。

(3) 在 PEG10000/DEX20000 体系中进行了 5 个批次的餐厨垃圾连续发酵, 由于 DEX 相很好地富集乳酸菌, 每批次发酵时乳酸菌具有高的初始浓度, 乳酸菌生长不经历停滞期、对数期, 相比于传统发酵极大缩短发酵的时间; 在不投加酸碱缓冲剂的情况下, 餐厨垃圾发酵单批次乳酸产率大于 0.30 g/g, 累积产率大于 0.45 g/g。

参 考 文 献

- [1] 王孝强, 汪群慧, 王旭明, 等. 餐厨垃圾发酵生产乳酸的工艺优化. 哈尔滨工业大学学报, 2009, 41(10): 58-63
Wang Xiaoqiang, Wang Qunhui, Wang Xuming, et al. Process optimization for lactic acid production from kitchen waste. Journal of Harbin Institute of Technology, 2009, 41(10): 58-63 (in Chinese)
- [2] Ma H., Liu J., Zou D., et al. Application of compound microbial preparation in composting with lactic acid fermentation residue from kitchen waste. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 2010, 24(4): 481-487
- [3] Joglekar H. G., Rahman I., Badu S., et al. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. Separation and Purification Technology, 2006, 52(1): 1-7

- [4] 田康明,周丽,陈献忠,等. L-乳酸的发酵生成和聚 L-乳酸的化学加工. 中国生物工程杂志, **2011**, 31(2): 102-115
Tian Kangming, Zhou Li, Chen Xianzhong, et al. Fermentation of L-lactic acid and synthesis of poly(L-lactic acid). China Biotechnology **2011**, 31(2): 102-115 (in Chinese)
- [5] Aguilar O., Rito-Palomares M. Aqueous two-phase systems strategies for the recovery and characterization of biological products from plants. Journal of the Science of Food and Agriculture **2010**, 90(9): 1385-1392
- [6] Rosa P. A. J., Ferreira I. F., Azevedo A. M., et al. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. Journal of Chromatography A **2010**, 1217(16): 2296-2305
- [7] Zijlstra G. M., de Gooijer C. D., Tramper J. Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems. Current Opinion in Biotechnology, **1998**, 9(2): 171-176
- [8] Ye Z. L., Lu M., Zheng Y., et al. Lactic acid production from dining-hall food waste by *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, **2008**, 83(11): 1541-1550
- [9] Ye Z. L., Zheng Y., Li Y. H., et al. Use of starter culture of *Lactobacillus plantarum* BP04 in the preservation of eatery food waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology, **2008**, 24(10): 2249-2256
- [10] Karakatsanis A., Liakopoulou-Kyriakides M. Comparison of PEG/fractionated dextran and PEG/industrial grade dextran aqueous two-phase systems for the enzymic hydrolysis of starch. Journal of Food Engineering, **2007**, 80(4): 1213-1217
- [11] Zijlstra G. M., de Gooijer C. D., van der Pol L. A., et al. Design of aqueous two-phase systems supporting animal cell growth: A first step toward extractive bioconversions. Enzyme and Microbial Technology, **1996**, 19(1): 2-8
- [12] 泵阀技术信息网, <http://www.cpumps.com/article/show.php?itemid=213>, **2007**
Cpumps, <http://www.cpumps.com/article/show.php?itemid=213>, **2007** (in Chinese)
- [13] Sinha J., Dey P. K., Panda T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, **2000**, 54(4): 476-486
- [14] Patil G., Raghavarao K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoerythrin. Biochemical Engineering Journal, **2007**, 34(2): 156-164
- [15] Rito-Palomares M., Negrete A., Miranda L., et al. The potential application of aqueous two-phase systems for in situ recovery of 6-pentyl- α -pyrone produced by *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microbial Technology, **2001**, 28(7-8): 625-631
- [16] Albertsson P. A. Partition of Cell Particles and Macromolecules (3rd Edition). New York: Wiley, **1986**
- [17] King R. S., Blanch H. W., Prausnitz J. M. Molecular thermodynamics of aqueous two-phase systems for bioseparations. AIChE Journal, **1988**, 34(10): 1585-1594
- [18] Ghosh S., Vijayalakshmi R., Swaminathan T. Evaluation of an alternative source of dextran as a phase forming polymer for aqueous two-phase extractive system. Biochemical Engineering Journal, **2004**, 21(3): 241-252
- [19] da Silva L. H. M., Meirelles A. J. A. Phase equilibrium in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. Carbohydrate Polymers, **2000**, 42(3): 273-278