

Span-20 和 Tween-80 对发酵液中 Nisin 泡沫分离的影响

李新涛, 吴兆亮, 赵艳丽, 武亚明

(河北工业大学化工学院生物工程系, 天津 300130)

摘要: 研究了微量非离子表面活性剂 Tween-80 和 Span-20 对发酵液中乳链菌肽(Nisin)泡沫分离的影响. 结果表明, 发酵液泡沫分离时泡沫层轴向气泡直径、连续通气过程的泡沫层高度、泡沫层平均持气量等均因添加活性剂而明显变化. 不同体系气泡大小为, 含 0.2 g/L Span-20 发酵液>含 0.5 g/L Span-20 发酵液>发酵液>含 0.2 g/L Tween-80 发酵液>含 0.5 g/L Tween-80 发酵液; Tween-80 的加入破坏了气泡表面的网状结构, 因而泡沫层持气量较高; 连续通气时, 2 种表面活性剂都会引起泡沫层高度降低, 但 Tween-80 会增加泡沫层的稳定性. 当 Tween-80 浓度达 0.5 g/L 时, Nisin 的收率大幅度提高, 原因是分离过程中 Nisin 失活率减少.

关键词: 泡沫分离; 非离子表面活性剂; 乳链菌肽

中图分类号: TQ028.8

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2009)02-0279-05

1 前言

泡沫分离技术适用于低浓度表面活性物质的分离, 由于其设备简单、费用低和分离过程不产生污染而越来越受到更多研究者的关注. 泡沫分离技术最早用于冶金和环境工程的工业化生产中, 近些年已经应用于生物化工研究中, 包括天然产物的富集, 特别是蛋白质的分离. 本课题组通过多年努力, 已经将泡沫分离技术应用于发酵液中乳链菌肽(Nisin)的分离提取, 并且实现了工业化生产^[1].

在实际生产过程中, 收率和富集比是评价分离结果的 2 个主要指标. 优化 pH、气速、泡沫层高度等操作条件是提高分离效果的重要方法^[2,3], 本课题组经过多年努力, 针对乳链菌肽发酵液的泡沫分离, 对这些操作参数已经进行了优化. 如何进一步提高蛋白质的分离效果是亟待研究的方向.

Wei 等^[4]以十二烷基硫酸钠和牛血清白蛋白为体系, 研究了阴离子表面活性剂/蛋白质混合体系泡沫的富集行为, 结果表明, 十二烷基硫酸钠浓度较低时, 牛血清白蛋白的富集比提高较大; Saint-Jalmes 等^[5]和魏晓芳等^[6]的研究表明, 十二烷基硫酸钠对水溶液中酪蛋白的泡沫分离性能有重要影响. 这些研究表明, 通过添加微量表面活性剂来提高目的蛋白的泡沫分离效果是一种切实可行的方法. 但迄今为止, 文献所报道的都是采用模拟体系, 微量非离子表面活性剂对实际发酵液泡沫分离的影响未见报道.

本工作以乳链菌肽发酵液为研究对象, 研究 Span-20 和 Tween-80 两种典型的表面活性剂对分离过程

中泡沫层轴向气泡直径、连续通气过程的泡沫层高度、泡沫层平均持气量和乳链菌肽失活率的影响, 从而为在乳链菌肽泡沫分离过程中提高富集比和收率提供依据.

2 实验

Nisin 是一种食品添加剂, 选取表面活性剂时要考虑其食品安全性; 同时, 选取的表面活性剂要有一定的代表性, 其亲水亲油平衡值(HLB)要在一个合适的范围内. 因此, 本工作所选的表面活性剂为 Tween-80 (HLB=15)和 Span-20(HLB=8.6).

2.1 材料与仪器

失水山梨醇单月桂酸酯(Span-20)和聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯(Tween-80)(天津大茂化学试剂厂), 乳链菌肽发酵液(天津康益生物工程有限公司), pH-25 型 pH 计(上海精科雷磁有限公司), Nikon 4500 数码相机.

2.2 实验过程与装置

实验装置为简单泡沫塔, 塔高 1000 mm, 内径 50 mm, 塔底气体分布器孔径为 50 μm .

同时, 为了方便气泡直径的计算, 以气液界面为起点, 在泡沫层的轴向高度上每间隔 5 cm 设一个观测点, 在塔的外壁放置一个已知长度的细铁丝作为标记物, 从下向上一共设置 10 个观测点.

实验时加入 Nisin 发酵液, 使液面与第一个观测点相平, 然后打开阀门, 气速控制在 200 mL/min.

2.3 气泡直径、比表面积的测量与计算

2.3.1 轴向高度气泡直径 d_{32} 的计算

气泡直径的测量对 Saleh 等^[3]提出的方法进行了改进. 实验开始后, 在塔外壁上用 Nikon 4500 微距相机对

准标记物照相,然后将所拍摄的图像传至计算机,用 Photoshop 对图片进行初步处理,最后用软件 Scion Image J 1.32(IBM)测量每个气泡区域的面积(S_w),进而计算其直径. Saleh 等是直接利用软件测量气泡直径,误差相对较大. 本实验具体计算方法如下:

(1) 假设每个气泡的形状为正十二面体,则每一面的形状为五边形,通过 Scion Image J(1.32)求出的五边形面积为 S_w ,则单个气泡的直径 $d \approx 1.63\sqrt{S_w}$.

(2) 为了进一步减小实验误差,采用 Sauter-mean (d_{32})代替平均直径作为该轴向高度上的气泡直径. d_{32} 的计算公式如下:

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^3}{\sum_{i=1}^n d_i^2}$$

其中, n 是测量的气泡总数,实验中 $n=100$.

2.3.2 比表面积 a 的计算

令第 $i(i=1, 2, 3 \dots 10)$ 个轴向高度的气泡平均直径为 d_{32}^i ,则泡沫层气泡的平均直径为

$$d = \frac{\sum_{i=1}^{10} d_{32}^i}{10}$$

对于理想的球体气泡,比表面积与气泡直径的关系为

$$a = \frac{4\pi R^2}{(4/3)\pi R^3} = \frac{3}{R} = \frac{6}{d}$$

其中, R 与 d 分别指气泡的半径与直径.

2.4 泡沫的平均持气量 $\bar{\varepsilon}$ 的计算

实验中,控制空气以恒定体积流速 q 通过气体分布器鼓入泡沫塔内,泡沫层高度 h 随时间 t 增加而增加,液池高度 l 随时间增加而降低. 同时,在泡沫的轴向高度上,气泡由于相互之间的聚并,其平均直径随泡沫层的升高而增加.

根据 Eisner 等^[7]的描述,在泡沫刚刚开始上升到顶部之前,泡沫层中的聚并可以分为两类,泡沫顶部与外界气体之间的聚并及泡沫内部气泡之间的聚并,前者主要引起泡沫高度减小,而后者则引起泡沫层气泡轴向高度增大. 其中,定义泡沫层顶部的聚并速率为 ψ_i .

根据 Joshi 等^[8]的描述,泡沫塔中单位体积内空气体积 v 的增加率 dv/dt 可表示为

$$dv/dt = q - \psi_i$$

由于液池中的空气体积与泡沫层中相比可忽略不计,且 $v = \bar{\varepsilon}h$, 故有

$$\bar{\varepsilon} \frac{dh}{dt} = q - \psi_i$$

泡沫层高度随时间的变化趋势可以分为 2 个阶段,线性增长区和缓慢增长区. 本实验中空气的恒体积流速 $q=200$ mL/min,在此情况下泡沫层高度的增加只有 1 个线性增长区. 这是因为实验所用 Nisin 发酵液泡沫很稳定,聚并速率不快,在实验的泡沫层高度下, ψ_i 远小于 q ,故表观聚并速率 ψ_i 可忽略不计. 在这种情况下,上式便可简化为

$$\bar{\varepsilon} \frac{dh}{dt} = q$$

对上式积分可得泡沫层高度 h 与时间 t 的线性关系函数 $h=(q/\bar{\varepsilon})t$,即可求出泡沫的平均持气量 $\bar{\varepsilon}=(q/h)t$.

3 结果与讨论

3.1 Span-20 和 Tween-80 对泡沫层气泡直径轴向分布的影响

气泡的聚并现象是泡沫分离过程中的一个重要过程,一般以气泡直径的轴向分布反映聚并的程度. 聚并会减少表面区域(通过增加气泡尺寸)并会扩大气泡尺寸分布范围. 大气泡会加速排液速率并提供更少的界面区域,而小气泡以更慢的排液速率为代价可产生更多的界面区域.

不同表面活性剂的加入会显著改变气泡直径的轴向分布,所得结果如图 1 所示(图中 H 为观测点与液池界面的距离).

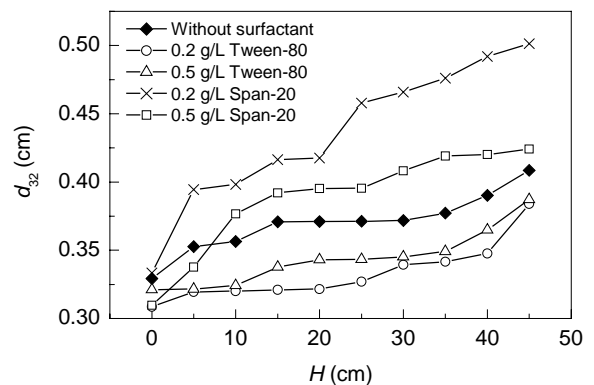


图 1 气泡直径的轴向分布

Fig.1 Bubble size distributions at different axial heights

由图 1 可看出,在泡沫层底部,即泡沫层与液池分界面处,不同体系的气泡直径相差不大,而在泡沫层顶部不同体系的气泡直径却有很大差别,这说明不同表面活性剂所形成的混合体系气泡聚并速率变化很大. 依据泡沫层顶部气泡直径大小可确定不同物系泡沫聚并速率的关系,气泡大小为,含 0.2 g/L Span-20 发酵液 > 含 0.5 g/L Span-20 发酵液 > 原始发酵液 > 含 0.2 g/L Tween-80 发

酵液>含 0.5 g/L Tween-80 发酵液。

发酵液成分复杂,除蛋白质外,还有脂肪颗粒、糖类等。其中,脂肪颗粒对泡沫分离影响较大。Brooker^[9]认为,在水溶液中亲油性表面活性剂可以促进蛋白质在脂肪颗粒上的吸附;Gelin 等^[10]认为亲水性表面活性剂可以减少蛋白质在脂肪上的覆盖面积,进而促进其在水中的分散。Span-20 可以加剧 Nisin 等表面活性蛋白在脂肪颗粒上的吸附,造成气泡表面上的表面活性蛋白浓度不高,引起泡沫层不稳定,因而聚并速率很快,气泡直径较大,当其浓度达到 0.5 g/L 时,界面几乎完全被其占领,泡沫又趋于稳定,因而聚并速率又趋于变小。Tween-80 一方面可以增大 Nisin 等表面活性蛋白在溶液

中的浓度,进而提高其在界面上的吸附量,另一方面,随着其浓度的增大,界面上吸附的 Tween-80 浓度逐渐增大,混合体系的泡沫性能逐渐趋于纯 Tween-80 体系。纯 Tween-80 体系形成的泡沫具有细小均匀、持气量低等特点,而混合体系气泡直径随着 Tween-80 浓度增大而减小,混合体系的聚并速率也逐渐减小,有助于形成气泡直径小且稳定的泡沫层。

3.2 Span-20 和 Tween-80 对连续通过程泡沫层高度的影响

实验中选取了不同浓度的 Tween-80 和 Span-20 进行研究。气速控制在 200 mL/min, 不同时刻泡沫层在塔中的高度如图 2 所示。

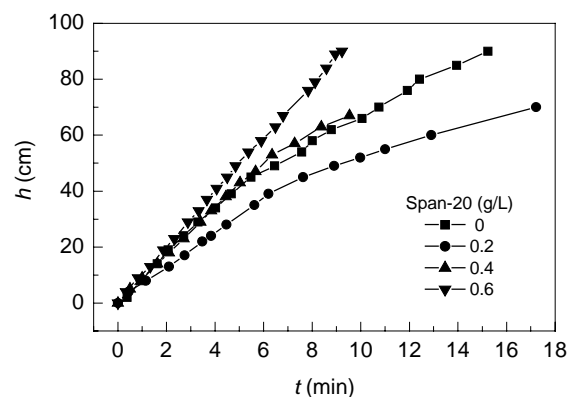
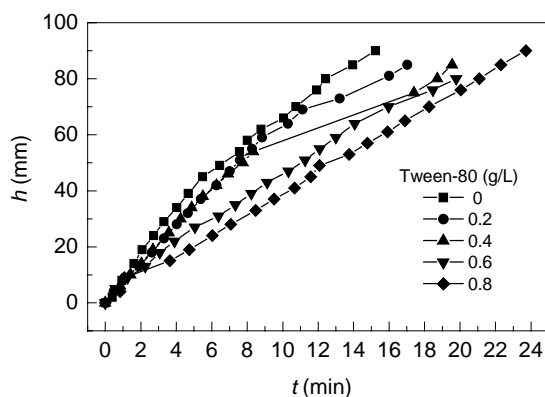


图 2 含 Tween-80 和 Span-20 的发酵液泡沫层高度随时间的变化
Fig.2 Heights of foam layer with Tween-80 and Span-20 in different times

图 2 表明,由于 Tween-80 和 Span-20 的加入,发酵液的泡沫性能发生了很大的改变。

Tween-80 为亲水性表面活性剂,可减少 Nisin 等表面活性蛋白在脂肪颗粒上的吸附,增加其在水相中的浓度,进而增加了其在气液界面上的浓度,因而其泡沫稳定性增加;同时, Tween-80 还会降低混合体系起泡能力。Saint-Jalmes 等^[5]和魏晓芳等^[6]都把原因归结为蛋白质和表面活性剂之间的相互作用,本工作也认为是 Tween-80 和发酵液之间的相互作用引起了其起泡性能降低,然而其具体的作用方式尚有待研究。

Span-20 则不同,加入少量 Span-20 即会引起大量 Nisin 等表面活性蛋白与脂肪颗粒结合,而不能扩散到气泡表面上,故其起泡性能、泡沫稳定性很快大幅下降。随着 Span-20 浓度的提高,界面已完全被其所控制,当其浓度达到 0.4 g/L 时,其泡沫性能又有所改善。

总之,不管是高 HLB 还是低 HLB 表面活性剂的加入,都会引起 Nisin 发酵液的起泡能力降低,但高 HLB 值的表面活性剂将增加泡沫的稳定性。

3.3 Span-20 和 Tween-80 对泡沫层平均持气量的影响

不同物系的泡沫层平均持气量如表 1 所示。

表 1 不同物系的泡沫层平均持气量
Table 1 Average gas holdup of foam layer containing different surfactants

Serial number	System	Average gas holdup, $\bar{\epsilon}$
1	Broth	0.643
2	Broth with 0.2 g/L Tween-80	0.824
3	Broth with 0.4 g/L Tween-80	0.742
4	Broth with 0.6 g/L Tween-80	0.725
5	Broth with 0.8 g/L Tween-80	0.702
6	Broth with 0.2g/L Span-20	0.715
7	Broth with 0.4g/L Span-20	0.625
8	Broth with 0.6g/L Span-20	0.620

气泡直径是影响泡沫层持气量的一个很重要的因素。对于同一个物系,大气泡界面面积小,排液速率快。Span-20 由于其形成的泡沫层聚并速率快,平均直径大,因而持气量较高。当其浓度大于 0.4 g/L 时,泡沫层较稳定,平均直径与不含 Span-20 的发酵液相差不大,因而其持气量与发酵液近似。

表 1 表明, Tween-80 体系的持气量最高,这仅从

气泡直径上已无法解释. 体系的物性如粘度等也影响泡沫层排液. 蛋白质由于自身分子量大, 所形成的溶液粘度高, 同时 Nisin 本身吸附能力较强, 气泡表面的 Nisin 很可能相互吸引而形成多聚体, 这些多聚体会像网状结构一样将气泡包起来^[4], 加剧了排液的难度, 而加入 Tween-80 会破坏网状结构, 进而促进泡沫层排液, 提高泡沫层持气量, 提高分离过程的富集比.

3.4 Span-20 和 Tween-80 浓度对相对收率(β)的影响

定义收率(η)为泡沫分离过程中收集的泡沫液中 Nisin 的总效价与原料液中 Nisin 的总效价之比, 失活率(α)为泡沫分离过程中失去生物活性的 Nisin 所占的比例, 计算公式如下:

$$\alpha = [(IU_f V_f) / (IU_y V_y)] \times 100\%$$

$$\eta = [1 - \alpha - (IU_f V_f) / (IU_y V_y)] \times 100\%$$

其中, IU_f , IU_r , IU_y , V_f , V_r 与 V_y 分别表示泡沫液中 Nisin 效价、残液中 Nisin 效价、原料液中 Nisin 效价、泡沫液体积、残液体积与原料液体积, Nisin 效价指的是单位质量 Nisin 所含的功价单位, 其测定采用二剂量法^[11].

为了清楚表明分离结果的变化, 以相对收率(β)代替收率. 定义不添加非离子表面活性剂原始发酵液的泡沫分离收率为 1, 其他体系的实际收率与原始发酵液的实际收率之比即为其相应的相对收率.

从图 3 可以看出, 当 Tween-80 的浓度达到 0.5 g/L 时, Nisin 的收率迅速提高, 浓度继续提高, 相对收率反而有下降趋势. 当其浓度小于 0.5 g/L 时, 失活率与纯发酵液物系相比并无太大变化; 而浓度达到 0.5 g/L 后, Nisin 的失活率迅速降低, 且随着 Tween-80 浓度继续增大, 失活率仍然近似 0.

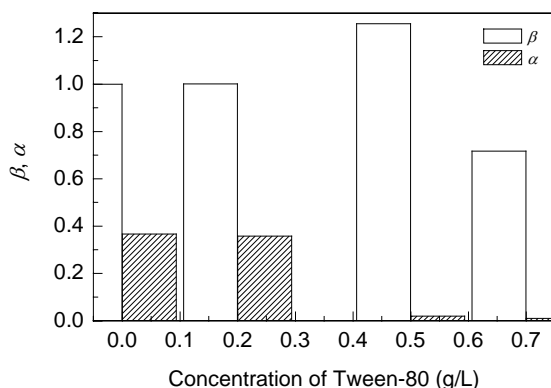


图3 不同浓度 Tween-80 的分离结果

Fig.3 Effect of concentration of Tween-80 on separation result

在泡沫分离过程中, 通过减小起泡面积进而增大气液界面面积也是提高收率的一个重要方法. 从表 2 可以

看出, 当 Tween-80 为 0.2 和 0.5 g/L 时, 比表面积的增长率分别为 11.1% 和 7.6%, 同时, 相对收率的增长率分别为 2.6% 和 25.6%. 综合可知, 比表面积增加对收率的提高作用有限, 泡沫分离过程中失活率降低才是收率提高的主要因素.

表 2 不同体系的比表面积增加率和相对收率

Table 2 Increases of specific surface area and incremental relative recovery rate

Broth	Incremental rate of specific surface area (%)	Increase rate of relative recovery rate (%)
0.2 g/L Tween-80	11.1	2.6
0.5 g/L Tween-80	7.6	25.6
0.5 g/L Span-20	-4.0	-62.5

实验已证实, 当原有发酵液中加入浓度大于 0.5 g/L 的 Tween-80 后, Nisin 发酵液在泡沫分离过程中的失活现象可大幅度降低. 蛋白质在泡沫分离过程失去活性主要有 3 种方式: 在气液界面上的展开、高剪切力和氧化造成的化学损害. Maa 等^[12]认为, 剪切力对蛋白质结构的破坏仅起次要作用, 破坏主要取决于蛋白质与气液界面的相互作用. 结合本实验, 界面上 Tween-80 与 Nisin 同时存在, 从某种程度上分担了 Nisin 单独存在时在界面上所受到的拉伸力, 很可能是失活率降低的原因. Span-20 为亲油性表面活性剂, 会抑制蛋白质在气液界面的吸附, 其加剧蛋白质失活的原因还有待研究.

从图 3 还可看出, 当 Tween-80 浓度大于 0.5 g/L 时, 其相对收率反而开始下降. 这是因为 Tween-80 浓度增大, Nisin 的失活几乎可以忽略, 与此同时, 由于竞争吸附加剧, Nisin 在界面上的吸附受到影响.

4 结论

(1) 加入微量的 Tween-80, Span-20 会对 Nisin 发酵液的泡沫性能产生很大影响, 引起连续通气过程泡沫层高度的降低, 不同的是 Tween-80 会产生较小的气泡和较大的泡沫层持气量, 进而提高分离过程的富集比, 而 Span-20 形成的泡沫层气泡直径较大, 聚并速率很快.

(2) Tween-80 浓度达 0.5 g/L 时, 可显著降低泡沫分离过程中蛋白质的失活率, 从而大幅度提高分离效果.

参考文献:

- [1] 于广和, 吴兆亮, 胡国武. 乳链菌肽的分离制备方法 [P]. 中国专利: CN1743339, 2008-01-30.
- [2] 刘志红, 刘铮, 丁富新, 等. 用泡沫分离法浓缩和分离蛋白质 [J]. 清华大学学报(自然科学版), 1997, 37(12): 50-54.
- [3] Saleh Z S, Hossain M M. A Study of the Separation of Proteins from Multicomponent Mixtures by a Semi-batch Foaming Process [J]. Chem. Eng. Process., 2001, 40(4): 371-378.
- [4] Wei X F, Liu H Z. Relationship between Foaming Properties and Solution Properties of Protein/Nonionic Surfactant Mixtures [J].

- Journal of Surfactants and Detergents, 2000, 3(4): 491–495.
- [5] Saint-Jalmes A, Peugeot M L, Ferraz H, et al. Differences between Protein and Surfactant Foams: Microscopic Properties, Stability and Coarsening [J]. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng., 2005, 263(2): 219–225.
- [6] 魏晓芳, 常志东, 刘会洲. 阴离子表面活性剂/蛋白质混合体系泡沫的富集行为 [J]. 化工学报, 2000, 51: 295–298.
- [7] Eisner M D, Jeelani S A K, Bernhard L, et al. Stability of Foams Containing Proteins, Fat Particles and Nonionic Surfactants [J]. Chem. Eng. Sci., 2007, 62(5): 1974–1987.
- [8] Joshi K S, Jeelani S A K, Blickenstorfer C, et al. Influence of Fatty Alcohol Antifoam Suspensions on Foam Stability [J]. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng., 2005, 263(2): 239–249.
- [9] Brooker B E. Observations on the Air–Serum Interface of Milk Foams [J]. Food Microstructure, 1985, 4(2): 289–296.
- [10] Gelin J L, Poyen L, Rizzotti R, et al. Interactions between Food Components in Ice Cream: II. Structure–Texture Relationships [J]. Journal of Texture Studies, 1996, 27(2): 199–215.
- [11] 辛宇, 吴兆亮, 于广和. 二剂量法测定乳链菌肽效价及其 C++ 运算程序 [J]. 河北工业大学学报, 2005, 34(1): 80–84.
- [12] Maa Y F, Hsu C C. Protein Denaturation by Combined Effect of Shear and Air–Liquid Interface [J]. Biotechnol. Bioeng., 1997, 54(6): 503–512.

Effects of Span-20 and Tween-80 on Foam Fractionation Behavior of Nisin in Fermentation Broth

LI Xin-tao, WU Zhao-liang, ZHAO Yan-li, WU Ya-ming

(Department of Bioengineering, School of Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract: The effects of Tween-80 and Span-20 on foam fractionation of Nisin (a food additive) fermentation broth were studied by using a single foam column. The results indicated that bubble size distribution, foam height and average gas holdup of the foam layer of the mixed system containing Tween-80 and Span-20 changed obviously from Nisin fermentation broth. The bubble size order of different mixed systems was: fermentation broth containing 0.2 g/L Span-20 > fermentation broth containing 0.5 g/L Span-20 > fermentation broth containing 0.2 g/L Tween-80 > fermentation broth containing 0.5 g/L Tween-80. The addition of surfactants decreased the height of foam layer and gas holdup, but Tween-80 increased the foam stability. And Tween-80 reduced the denaturation rate of Nisin in foam fractionation, so the separation effect was improved distinctly.

Key words: foam fractionation; nonionic surfactant; Nisin