

文章编号 :1009-038X(2003)03-0076-04

离子交换法从发酵液中提取 L-异亮氨酸

刘清华¹, 张伟国², 钱和¹, 何志勇¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要 :采用天然高分子絮凝剂壳聚糖对 L-异亮氨酸发酵液进行预处理,在发酵液 pH 2、壳聚糖用量 30 mg/L 的条件下可取得较好的絮凝效果.通过静态吸附实验,考察了 pH 和 L-异亮氨酸质量浓度对平衡吸附量的影响,最后确定了 732# 离子交换树脂提取 L-异亮氨酸的最佳工艺条件:上柱发酵液 pH 2,上柱速度 0.6 BV/h,洗脱液为 0.5 mol/L 的 NH₄Cl,洗脱体积流量 0.5 BV/h.洗脱液经脱色、浓缩结晶后得 L-异亮氨酸成品,总提取率为 55%.

关键词 :L-异亮氨酸;离子交换;提取;工艺条件

中图分类号 :TQ 922

文献标识码 :A

Recovery of L-Isoleucine from Fermentation Broth via Ion-Exchange

LIU Qing-hua¹, ZHANG Wei-guo², QIAN He¹, HE Zhi-yong¹

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract : Pretreatment of L-isoleucine fermentation broth was conducted by using chitosan. Excellent coagulation result was achieved under the following conditions : pH 2.0 and chitosan dosage 30 mg/L. Effects of factors such as pH and concentration of L-isoleucine on absorption capacity were investigated by static state absorption experiment. The optimal operation conditions of extracting L-isoleucine were as following : fermentation broth of pH 2, sample flow-rate of 0.6 BV/h, 0.5 mol/L NH₄Cl as the eluant and the elution velocity of 0.5 BV/h. The effluent was then decolored, concentrated and crystallized. The total recovery ratio is 55%.

Key words : L-isoleucine; ion-exchange; recovery; process conditions

早在 1936 年, Rose 等人根据动物营养试验,证实 L-异亮氨酸是人和动物体的必需氨基酸之一.它可作为强化剂添加于食品中以及用于配制一般营养复合氨基酸输液和治疗型特种氨基酸输液,其用量逐年增长^[1].目前, L-异亮氨酸主要是通过发酵法来生产,在 L-异亮氨酸的发酵液中,除主要产物外还有其他氨基酸如丙氨酸、缬氨酸.因 L-异亮氨

酸与这两种氨基酸均为中性氨基酸,它们的结构相似,等电点也接近,导致 L-异亮氨酸分离非常困难.目前中性氨基酸的工业化分离方法国内外报道不多,国内仅来彩霞等人报道了利用离子交换法提取异亮氨酸,总提取率为 45%^[2].为了提高总提取率,作者采用离子交换法对 L-异亮氨酸的分离提取进行了研究.

收稿日期 2002-12-30; 修回日期 2003-03-10.

作者简介:刘清华(1975-)女,江西萍乡人,食品科学与工程硕士研究生.

万方数据

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

001×7(732[#])离子交换树脂:中国医药(集团)上海化学试剂公司生产;离子交换柱(36 mm×600 mm)无锡仪器厂生产;L-异亮氨酸发酵液:江南大学生物工程学院氨基酸研究室提供;回转式恒温调速摇瓶柜(HYG-II型):上海欣蕊自动化设备有限公司制造;pHs-3C型精密pH计:上海雷磁仪器厂生产;721分光光度计:上海第三分析仪器厂制造。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液预处理 在发酵液中加入草酸并加热至80℃,保温3 min,离心除去部分菌体和碳酸钙,上清液用絮凝剂处理,过滤,在波长为650 nm处测定透光率,得到最佳絮凝条件。

1.2.2 树脂的预处理 阳离子树脂依次用20 g/dL NaCl, 2 mol/L NaOH, 2 mol/L HCl浸泡洗涤,最后浸泡在去离子水中备用^[3]。

1.2.3 静态吸附实验 三角瓶中加入10 mL离子交换树脂和100 mL的L-异亮氨酸发酵液,放在恒温摇床柜中振荡,直至平衡为止,以差减法计算平衡交换容量。

1.2.4 动态吸附实验 将一定量的离子交换树脂装入玻璃交换柱中,通入已经预处理过的L-异亮氨酸发酵液,直至穿透液与茚三酮反应呈阳性为止;水洗后,用洗脱剂洗脱,分部收集流出液,确定最佳洗脱条件。

1.2.5 脱色实验 将待脱色的溶液调到一定的pH后,加入一定量的活性炭,在一定的温度下搅拌吸附一定时间,过滤得清液,在波长为400 nm处测其透光率。

1.3 分析方法

L-异亮氨酸和L-丙氨酸含量的测定:采用纸色谱定量分析法^[4]。将待测液点样于新华3号层析纸上,电吹风加热除去氨水,经展开剂V(正丁醇):V(冰醋酸):V(水)=4:1:1展开后,用1.0%茚三酮-丙酮溶液显色,剪下斑点加5 mL 75%乙醇和0.2% CuSO₄·5H₂O(体积比为39:1)的溶液洗脱,显色液在570 nm波长下测吸光值,然后从标准曲线上查出氨基酸的含量。

2 结果与讨论

2.1 发酵液预处理工艺的确定

发酵液是含有大量菌体的固形物组成复杂的带有负电荷的胶体分散体系,同时具有亲水性和憎

水性的胶体特性^[3]。如果采用带菌体的发酵液直接上柱,不仅给操作带来困难,而且影响产品的质量和收率,因此采用絮凝沉降的办法对发酵液进行预处理。

壳聚糖是天然聚合物,具有无毒,易被动物消化吸收,对提高家禽的产蛋率和瘦肉率很有好处,用壳聚糖絮凝得到的菌体蛋白是很好的饲料添加剂,故采用壳聚糖为絮凝剂。以其处理后发酵液的透光率为考察指标,结果发现溶液pH和壳聚糖用量是影响絮凝效果的重要因素。

2.1.1 pH对絮凝效果的影响 溶液pH对絮凝作用的影响有两方面:一是影响菌体细胞表面带电情况;二是影响絮凝剂的电离程度和絮凝剂分子链伸展程度。发酵液pH对絮凝效果的影响见图1。可以看出当pH值为2时,絮凝效果最好。这是因为壳聚糖在酸性介质中质子化,表现出阳离子絮凝剂的性质。pH值降低,壳聚糖阳离子絮凝剂的性质更加明显。然而当溶液的pH值太低时,会使壳聚糖溶解,反而影响絮凝的效果。另外,pH值还会影响壳聚糖的架桥能力。因此,pH值太高或太低对絮凝都不利,应该把发酵液控制在合适的pH值。

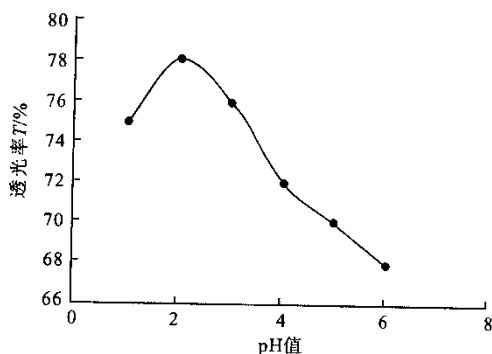


图1 pH值对絮凝效果的影响

Fig.1 Effect of pH on coagulation result

2.1.2 壳聚糖用量对絮凝效果的影响 壳聚糖用量对絮凝效果的影响见图2。可以看出,在一定的pH值下,絮凝效果随絮凝剂用量的增加而增加,达到峰值后,又随絮凝剂用量的增加而降低,这与架桥絮凝机理一致^[6]:当高分子絮凝剂覆盖微粒表面的部分接近50%时,其絮凝作用最佳;当絮凝剂过量时,微粒表面全部被覆盖,已没有空余表面吸附起架桥作用的其他絮凝剂;又由于覆盖的絮凝剂带有许多亲水官能团,故反而起分散作用,这时悬浮液又变为稳定的分散体系,因此絮凝剂过量反而使絮凝效果下降。

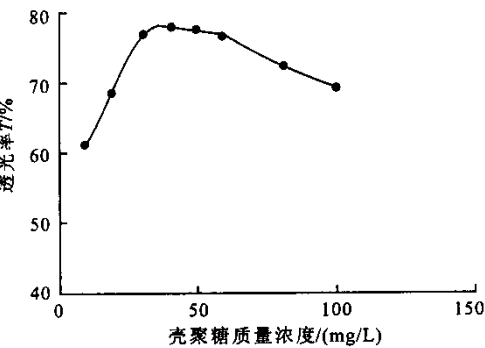


图 2 壳聚糖质量浓度对絮凝效果的影响

Fig.2 Effect of chitosan dosage on coagulation result

2.2 树脂交换容量的测定

于三角瓶中加入树脂和发酵液,用浓盐酸调至 pH 2,在恒温摇床柜中振荡直至平衡,取样测定溶液中异亮氨酸质量浓度.交换容量按下式计算:

$$Q=(c_0-c^*)V/131.16W$$

式中 c_0 :起始发酵液中异亮氨酸的质量浓度(g/L); c^* :平衡后发酵液中异亮氨酸的质量浓度(g/L); V :发酵液体积(L); W :湿树脂体积(L);131.16:L-异亮氨酸的相对分子质量; Q :树脂交换容量(mol/L),测得交换容量为 0.882 mol/L.

2.3 发酵液 pH 值对离子交换容量的影响

发酵液 pH 值是影响交换平衡关系的一个重要因素.通过静态实验,测定了不同 pH 值下的离子交换容量,结果见图 3.

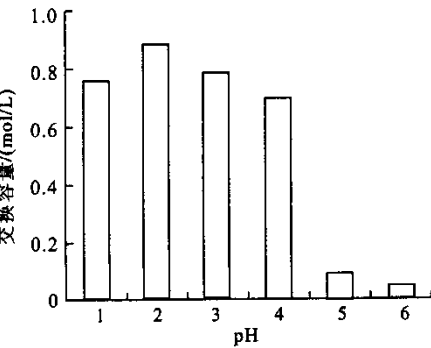


图 3 pH 对交换容量的影响

Fig.3 Effect of pH on exchange capacity

由图 3 可以看出,pH 值为 2 时,树脂的交换容量最大.在 pH 值由 6 降至 2 的过程中,L-异亮氨酸以阳离子形式存在,使阳离子交换树脂的吸附量增加,但当 pH 值继续降低时,溶液中 H^+ 浓度增加,与异亮氨酸根离子发生竞争吸附,导致交换容量降低.

不同 pH 值时,732#树脂对 L-异亮氨酸和 L-丙氨酸的选择性系数(K_A^B)值的计算结果见表 1,选择性系数计算公式按下式计算:

$$K_A^B=c_A/c_B\cdot\overline{R}_B/\overline{R}_A$$

式中 c_A :发酵液中 L-丙氨酸的质量浓度(g/L); c_B :发酵液中 L-异亮氨酸的质量浓度(g/L); $\overline{R}_A$:树脂上 L-丙氨酸的质量浓度(g/L); $\overline{R}_B$:树脂上 L-异亮氨酸的质量浓度(g/L).

表 1 pH 对选择性系数 K_A^B 的影响

Tab.1 Effect of pH on selectivity coefficient(K_A^B)

pH	K_A^B
1	2.43
2	2.81
3	2.51
4	2.20

从表 1 可以看出,将 pH 值调至 2 时,选择性系数最大.732#离子交换树脂对 L-异亮氨酸的吸附能力最强.

2.4 发酵液 L-异亮氨酸对树脂交换容量的影响

配制不同浓度的 L-异亮氨酸溶液,在 pH 值为 2 的条件下测定树脂的静态交换容量,结果见图 4.

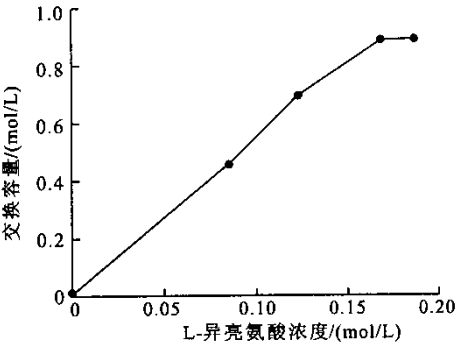


图 4 L-异亮氨酸浓度对交换容量的影响

Fig.4 Effect of concentration on exchange capacity

从图 4 可以看出,随溶液中 L-异亮氨酸浓度的增加,树脂的交换容量增大,但在浓度大于 0.16 mol/L 以后,增加 L-异亮氨酸浓度对提高交换容量效果不大.

2.5 固定床操作工艺

上柱:经预处理后的发酵液调酸至 pH 2 时上柱.另外固定床操作的一个重要参数是固液两相的接触时间,用 BV/h 表示,即每小时流经柱子的上样液为床体积 BV(Bed Volume)的倍数^[7].为了有效地进行交换,离子交换过程中必须使固液两相有充分的接触时间,如果液相流速增加,固液接触时间缩短,树脂与上样液来不及交换,就会导致交换区拉长,很快发生渗漏现象.上柱流速采用 0.6 BV/h.

水洗:上柱后,用适量的水洗,一般为上柱发酵液体积的 1~2 倍,水洗流量为 1.0 BV/h.

洗脱:以 0.1, 0.2, 0.5, 1 mol/L 氨水和 0.2, 0.5, 0.8, 1 mol/L NH_4Cl 作为洗脱剂进行洗脱。结果发现,以 0.5 mol/L NH_4Cl 作为洗脱剂,洗脱流量采用 0.5 BV/h 的分离效果最佳。

2.6 洗脱液的脱色与精制

采用粉末状活性炭脱色。活性炭脱色是利用优先选择吸附有机大分子色素的特性,将色素分子强烈吸附于活性炭颗粒表面,随活性炭的分离而被除去。据文献[8]报道,在偏酸性条件下活性炭脱色效果显著。因此本实验选定 pH 4.5 的条件下考察活性炭用量和温度对脱色效果的影响。

2.6.1 pH 对脱色效果的影响 将洗脱液 pH 调至 4.5,加入不同量的活性炭,在 80 °C 下吸附 60 min,试验结果见图 5。由图 5 可以看出,活性炭用量对脱色效果影响较大。活性炭在 0~1% 范围内,脱色效果随活性炭用量增加而较大幅度地增加;活性炭用量大于 1% 以后,脱色效果随活性炭用量增加而缓慢增加,考虑到活性炭用量的增加会使 L-异亮氨酸损失增大,且生产成本也随着提高,所以选 1% 活性炭比较合适。

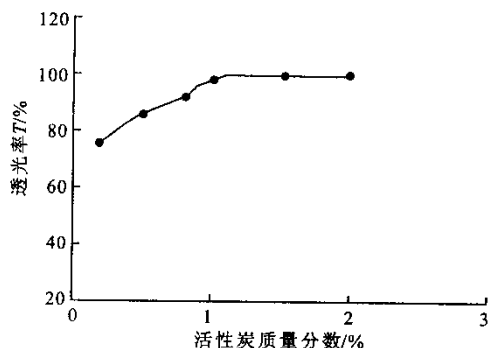


图5 活性炭用量对脱色效果的影响

Fig.5 Effect of active carbon dosage on decoloration result

2.6.2 温度对脱色效果的影响 将洗脱液的 pH 调至 4.5,加入 1% 的活性炭,在不同温度下搅拌脱色 60 min,结果见图 6。可以看出,脱色效果随脱色

温度的增加而增强。这是由于活性炭颗粒表面吸附色素分子是通过活性炭颗粒和色素分子的相互碰撞实现的,提高温度可以加快色素分子同活性炭颗粒碰撞的速率,从而提高脱色效果。煮沸脱色虽可达到很好的脱色效果,但脱色液爆沸飞溅影响 L-异亮氨酸产品的收率,因此脱色温度采用 80 °C 较合适。

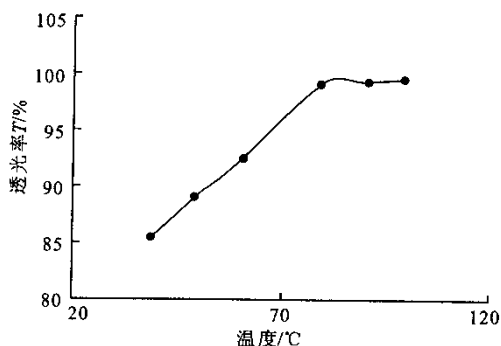


图6 温度对脱色效果的影响

Fig.6 Effect of temperature on decoloration result

脱色液经旋转蒸发仪浓缩,加入乙醇结晶,于 4 °C 静置过夜,过滤晶体,真空干燥 12 h,即得成品。成品总提取率为 55%,高氯酸滴定法测得其纯度达 98.5%。

3 结论

1) 壳聚糖对 L-异亮氨酸发酵液中的菌体具有良好的絮凝作用。溶液 pH 和壳聚糖用量是影响絮凝效果的重要因素。pH 值为 2、壳聚糖用量为 30 mg/L 时可获得良好的絮凝效果。

2) pH 2 时最有利于 732[#] 树脂吸附 L-异亮氨酸。增加溶液中 L-异亮氨酸浓度有利于增加树脂吸附量,但当 L-异亮氨酸浓度大于 0.16 mol/L 时,这种影响不明显。

3) L-异亮氨酸经 732[#] 树脂吸附,0.5 mol/L NH_4Cl 洗脱后浓缩结晶得成品,成品总提取收率为 55%。

4) 洗脱液在 pH 为 4.5,活性炭用量为 1%,温度为 80 °C 的条件下可取得理想的脱色效果。

参考文献:

- [1] 张伟国. L-异亮氨酸高产菌选育及其发酵优化的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1999.
- [2] 来彩霞, 陈炜, 白秀峰, 等. 利用离子交换法提取 L-异亮氨酸的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 1998 (3): 182-184.
- [3] 姜志新, 湛竟清, 宋正孝. 离子交换分离[M]. 天津: 天津大学出版社, 1992.
- [4] 刘菊湘, 刘国栋, 何柄林, 等. 用离子交换树脂脱除氨基酸与盐混合液中的盐[J]. 离子交换与吸附, 2000, 16(6): 521-527.
- [5] 郑连英, 姚恕. 肌苷发酵液净化技术的研究[J]. 发酵科技通讯, 1993 (2): 5-8.
- [6] 毕喜婧, 张建安, 刘德华. 甘油发酵液的絮凝除菌研究[J]. 精细化工, 2002, 19(7): 394-397.
- [7] 陈瑛, 钟俊辉, 陶文沂. 离子交换法提取茶氨酸的研究[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(1): 31-34.
- [8] 郑桂富, 徐振相. 鲑鱼蛋白水解液脱色效果的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(9): 25-27. (责任编辑: 李春丽)