

文章编号: 1009-038X(2004)05-0082-04

# 絮凝法处理 L-异亮氨酸发酵液

刘清华<sup>1</sup>, 钱和<sup>1</sup>, 张伟国<sup>2</sup>

(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:**通过定性试验筛选,壳聚糖絮凝效果较好,并考察了 pH 值、絮凝剂用量和絮凝温度对絮凝效果的影响。结果表明 pH 值为 5,壳聚糖用量为 180 mg/L,絮凝温度为 40 °C 时,絮凝效果最佳。通过对过滤常数的测定分析,从理论上进一步证实了所得的絮凝条件的合理性。

**关键词:**絮凝; L-异亮氨酸; 壳聚糖; 过滤常数

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

## Pretreatment of L-isoleucine Fermentation Broth via Flocculation

LIU Qing-hua<sup>1</sup>, QIAN He<sup>1</sup>, ZHANG Wei-guo<sup>2</sup>

(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 studied. Experiment results indicated that chitosan was the best flocculant and the optimum flocculation conditions were: pH of 5, flocculant dosage of 180 mg/L and temperature of 40 °C. In order to confirm the optimum conditions to be reasonable and reliable, the filtration constant was determined and discussed.

**Key words:** flocculation; L-isoleucine; chitosan; filtration constant

早在 1936 年, Rose 等人根据动物营养试验结果,证实 L-异亮氨酸是人和动物体营养必需氨基酸之一。它可作为食品强化剂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<sup>[1]</sup>。

发酵液是含有大量菌体固形物、组成复杂并带有负电荷的胶体分散体系,同时具有亲水性和憎水性<sup>[2]</sup>。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。絮凝技术由于具有促使颗粒结合成团,容易沉降、

过滤、离心、提高固液分离速度和液体澄清度等一系列特点而成为研究的热点<sup>[3]</sup>。目前,人们已经在很多微生物体系中研究了絮凝现象,如用絮凝法处理 L-乳酸、甘油以及聚- $\delta$ -羟基丁酸(PHB)发酵液<sup>[4-6]</sup>、絮凝法分离酒精酵母<sup>[7]</sup>、谷氨酸发酵液<sup>[8-11]</sup>、十五碳二元酸发酵液<sup>[12]</sup>、抗生素发酵液中的菌体<sup>[13,14]</sup>。但目前尚未见用絮凝法预处理 L-异亮氨酸发酵液报道。作者对絮凝剂进行了初步筛选并确定了最佳絮凝条件。

收稿日期 2003-12-16; 修回日期 2004-01-07。

作者简介:刘清华(1975-),女,江西萍乡人,食品科学与工程专业硕士研究生。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及仪器

壳聚糖、聚丙烯酰胺、明胶、 $Al_2(SO_4)_3$ 、海藻酸钠由中国医药集团上海化学试剂公司提供；L-异亮氨酸发酵液由江南大学生物工程学院氨基酸研究室提供；001×7(732<sup>#</sup>)离子交换树脂由中国医药(集团)上海化学试剂公司生产；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；上海雷磁仪器厂制造；721分光光度计；上海第三分析仪器厂制造。

### 1.2 絮凝效果的测定

取调好pH值的发酵液50 mL，在快速搅拌下缓慢加入絮凝剂，使其完全混合均匀，然后慢速搅拌，絮凝反应结束后移至50 mL量筒中，静置并观察菌体沉降过程，60 min后取上清液，用721型分光光度计以蒸馏水做空白于650 nm处测OD值，与空白试样比较，算出絮凝率(FR值)。

$$FR = (OD_{\text{絮凝前}} - OD_{\text{絮凝后}}) / OD_{\text{絮凝前}} \times 100\%$$

FR值越大，说明絮凝效果越好。

### 1.3 过滤常数的测定

恒压下的过滤方程式：

$$t/q = (q/K) + 2q_e/K$$

式中  $t$  为过滤时间(s)； $q$  为单位过滤面积的滤液量( $m^3/m^2$ )； $K$  为过滤常数( $m^2/s$ )； $q_e$  为过滤常数( $m^3/m^2$ )。

在恒压过滤时  $t/q$  与  $q$  之间具有线性关系，直线的斜率为  $1/K$ ，截距为  $2q_e/K$ 。实验时，测定不同过滤时间  $t$  所获得的单位过滤面积的滤液体积  $q$  的数据，并将数据  $t/q$  与  $q$  标绘于图中，连成一条直线，可得到直线的斜率  $1/K$ ，从而可以得到过滤常数。

### 1.4 静态吸附量的测定

准确量取经预处理的10 mL 001×7(732<sup>#</sup>)阳离子交换树脂，分别加入100 mL经絮凝处理与未经絮凝处理的L-异亮氨酸发酵液，置于500 mL锥形瓶中，25℃下恒温振荡，直至平衡为止，以差减法分别计算吸附量。

### 1.5 分析方法

L-异亮氨酸含量的测定采用纸色谱定量分析法<sup>[15]</sup>。即将待测液点样于新华3号层析纸上，电吹风加热除氨，经展开剂(正丁醇：冰醋酸：水体积比为4:1:1)展开后，用10 g/L茚三酮丙酮溶液显色，剪下斑点，加5 mL洗脱剂(体积分数75%乙醇：体积分数0.2%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  体积比为39:1)洗脱，洗脱液在515 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 絮凝效果的考察

2.1.1 絮凝剂的定性筛选 在不同pH值条件下，菌体呈现不同电性，絮凝剂也呈现不同的电性，因此絮凝实验前，将发酵液分成3份，用HCl或NaOH分别调pH值为3.0、7.0、10.0，分别代表酸性、中性和碱性，用以检验不同絮凝剂在不同pH值条件下对发酵液的絮凝效果，确定絮凝剂对L-异亮氨酸发酵液产生有效絮凝效果的酸碱条件，结果见表1。

表1 絮凝剂定性试验结果

Tab.1 Experiment results of flocculation

絮凝剂	编号	pH值	絮凝剂添加质量浓度/(mg/L)	FR/%
空白试样	0	3	0	-
	0'	7	0	-
	0''	10	0	-
壳聚糖	1	3	400	53.2
	2	7	400	88.7
	3	10	400	42.1
聚丙烯酰胺	4	3	400	0
	5	7	400	69.4
	6	10	400	57.6
明胶	7	3	400	32.1
	8	7	400	73.8
	9	10	400	35.2
$Al_2(SO_4)_3$	10	3	$2 \times 10^5$	64.3
	11	7	$2 \times 10^5$	65.7
	12	10	$2 \times 10^5$	45.2
海藻酸钠	13	3	400	28.9
	14	7	400	70.0
	15	10	400	1.5

由实验结果可知，pH值对絮凝效果有较大的影响，并且壳聚糖絮凝效果最好，故选取壳聚糖做进一步实验。

### 2.1.2 壳聚糖的单因素实验

1) 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1。由图1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<sup>[6]</sup>。即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。

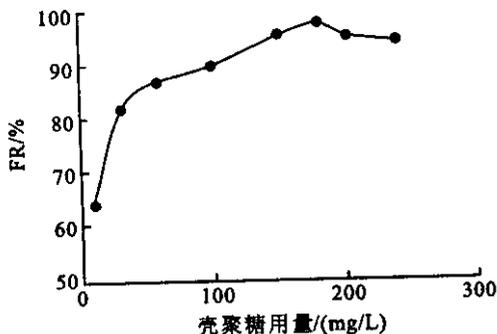


图1 壳聚糖用量对絮凝效果的影响

Fig. 1 Effect of chitosan dosage on flocculation result

2) pH 值对絮凝效果的影响:发酵液 pH 值对絮凝效果的影响见图2。由图2可知,pH 值对絮凝效果影响很大。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,会使壳聚糖降解,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。

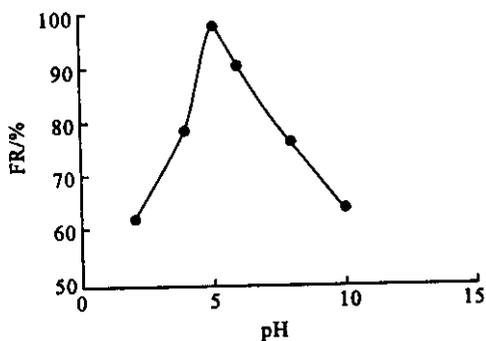


图2 pH 值对絮凝效果的影响

Fig. 2 Effect of pH on flocculation result

3) 温度对絮凝效果的影响:温度对絮凝效果的影响见图3。由图3可知,温度对絮凝效果影响不大。升高温度能增加胶体粒子的动能与碰撞的机会,还可使蛋白质变性,所以对絮凝有利。但温度过高会使壳聚糖分解。

2.1.3 正交试验 根据以上单因素试验,对温度、pH 值、壳聚糖用量进行正交试验,因素水平见表2。  
万方数据

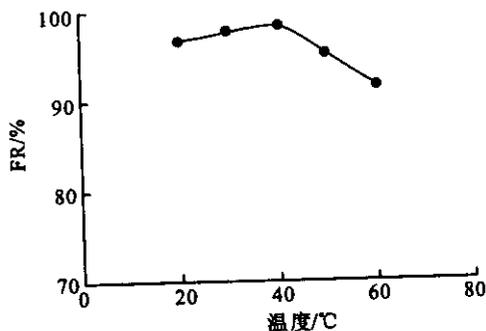


图3 温度对絮凝效果的影响

Fig. 3 Effect of temperature on coagulation result

表2 正交试验因素水平表

Tab. 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	A 温度/℃	B pH	C 壳聚糖用量/(mg/L)
1	20	3	150
2	40	5	180
3	60	8	210

按正交表  $L_9(3^4)$  安排试验,结果见表3。

表3 试验方案和结果分析

Tab. 3 Experiment design and result

编号	A	B	C	FR/%
1	1	1	1	77.5
2	1	2	2	91.4
3	1	3	3	85.1
4	2	1	2	82.1
5	2	2	3	93.8
6	2	3	1	83.0
7	3	1	3	56.4
8	3	2	1	93.6
9	3	3	2	89.0
$K_1$	254.0	216.0	254.1	
$K_2$	258.9	278.8	262.5	
$K_3$	239.0	257.1	235.3	
$K_1/3$	84.7	72.0	84.7	
$K_2/3$	86.3	92.9	87.5	
$K_3/3$	79.7	85.7	78.4	
R	6.6	20.9	9.1	

由表3可知,pH 值对 L-异亮氨酸发酵液絮凝效果影响最大,其次为壳聚糖用量,温度对其影响最小。根据直观极差分析最好的组合为  $A_2B_2C_2$ 。在此条件下,絮凝效果达到 98.5%。

## 2.2 过滤效果的考察

### 2.2.1 壳聚糖用量对过滤常数 K 的影响 固定发

酵液温度与 pH 值,使壳聚糖用量在 100 ~ 210 mg/L 的范围内变化,过滤试验结果见图 4 和表 4。结果表明,壳聚糖用量为 180 mg/L 时絮凝效果最佳。

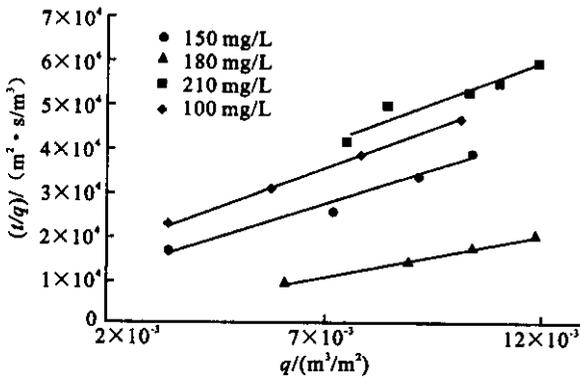


图 4 壳聚糖用量对过滤常数 K 的影响

Fig. 4 Effect of chitosan dosage on filtration constant result

表 4 壳聚糖用量对过滤常数 K 的影响

Tab. 4 Effect of chitosan dosage on filtration constant result

壳聚糖用量/(mg/L)	$K/(m^2/s)$
100	$2.62 \times 10^{-7}$
150	$3.19 \times 10^{-7}$
180	$5.57 \times 10^{-7}$
210	$5.17 \times 10^{-7}$

2.2.2 pH 值对过滤常数 K 的影响 固定发酵液温度与壳聚糖用量,使 pH 值在 3 ~ 8 的范围内变化,进行过滤试验,结果见图 5 和表 5。结果表明 pH 值为 5 时絮凝效果最佳。

为了进一步说明预处理的优劣,测定了离子交换树脂与发酵液处理前后吸附 L-异亮氨酸的变

化。结果表明,树脂对其静态吸附量增加了 38%,所以这一处理方案具有实际意义。

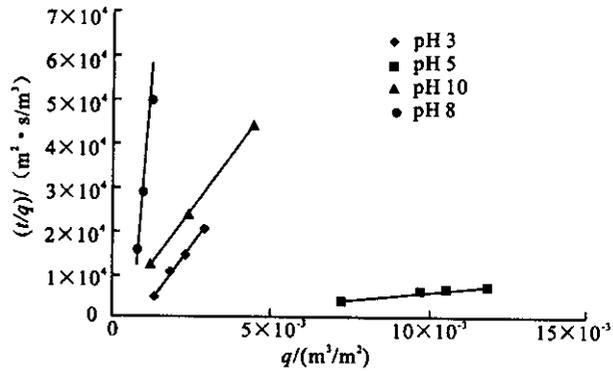


图 5 pH 值对过滤常数 K 的影响

Fig. 5 Effect of pH on filtration constant result

表 5 pH 值对过滤常数 K 的影响

Tab. 5 Effect of pH on filtration constant result

pH	$K/(m^2/s)$
3	$1.07 \times 10^{-8}$
5	$1.39 \times 10^{-7}$
8	$1.05 \times 10^{-9}$
10	$3.80 \times 10^{-10}$

### 3 结 论

实验中絮凝效果最好的絮凝剂为壳聚糖,它对 L-异亮氨酸发酵液的絮凝效果受 pH 值的影响最大,其次为壳聚糖用量,絮凝温度对其影响最小。经絮凝处理后使树脂对 L-异亮氨酸的静态交换容量增加了 38%。另外通过测定过滤常数,进一步证实了所得的絮凝条件的合理性。

### 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] 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.

[3] 郭晨, 刘春朝, 刘德华, 等. 酵母细胞的絮凝[J]. 化工冶金, 1997, 18(3): 245-249.

[4] 江龙法, 张所信. L-乳酸发酵液絮凝研究[J]. 食品科技, 1995 (5): 42-43.

[5] 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): 394-398.

[6] 秦杰, 周正来, 欧阳藩. PHB 生产中发酵液的絮凝[J]. 化工冶金, 2000, 21(3): 327-330.

[7] Bonnejea J, Jackson J, Hoare M, et al. Affinity flocculation of yeast cell debris by carbohydrate-specific compounds[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1988, 10(7): 357-360.

[8] 牟占军, 葛庆仁. 谷氨酸菌体的絮凝及分离[J]. 化学工程, 1996, 24(3): 53-58.

[9] 江龙法, 张所信. 谷氨酸发酵液预处理方法的研究[J]. 中国调味品, 1988 (6): 17-19.

[10] 赵保国, 冯裕新. 发酵液凝聚和絮凝除菌体的研究试验[J]. 中国调味品, 1997 (6): 8-12.

[11] 云逢霖, 崔焕明. 谷氨酸发酵液絮凝除菌的研究[J]. 微生物学通报, 1996, 23(2): 91-94.

[12] 谭天伟, 陈远童, 马润宇. 絮凝法除去十五碳二元酸发酵液中的酵母菌[J]. 北京化工大学学报, 1995, 22(4): 17-21.

[13] 冯闻铮, 元平言. 螺旋霉素发酵液预处理过程技术特性[J]. 化工冶金, 1999, 20(1): 57-61.

[14] 赵彦修, 张露茜. 赤霉素发酵液絮凝处理研究[J]. 微生物学报, 1994, 21(1): 3-5.

[15] 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.

(责任编辑: 李春丽)