

## 酵母单细胞蛋白絮凝分离的研究

刘树楷 樊菊池 王荣民 王勇民

(化学与化学工程系)

(食品科学与工程系)

**摘要** 本文提出了分离酵母单细胞蛋白的一种新方法——用絮凝沉降法分离酵母单细胞蛋白;研究了鞣酸+A对酵母细胞的絮凝作用。探讨鞣酸+A絮凝酵母细胞的机理;较为系统地研究了环境因素对鞣酸+A絮凝酵母细胞的影响;首次将质心映射优化法(CMO法)和响应面法(RSM法)结合起来,运用计算机优化了絮凝条件,并就鞣酸+A对酵母细胞的絮凝作用进行表征;通过对酵母细胞表面的X-射线能谱分析,证实金属离子 $Ca^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 和 $K^+$ 参与了鞣酸+A对酵母细胞的絮凝作用。通过鞣酸+A絮凝酵母细胞的小试研究,可以认为采用絮凝沉降法分离酵母单细胞蛋白是可行的,且节能效果显著,具有较大的现实意义。

**关键词** 单细胞蛋白;絮凝分离;絮凝剂;质心映射优化法;响应面法

### 0 前 言

单细胞蛋白工业是一门很有发展前途的生物工程产业。从研究结果和一些生产实践来看,以工业废水为原料生产单细胞蛋白,可以变废为宝,很有发展前途。然而,这项技术的工业化,则遇到了一个非常棘手的问题,这就是单细胞蛋白的分离。在某种程度上说,改进单细胞蛋白回收工艺,对本项技术今后的发展,有着决定性的影响。

酵母细胞一般只有几微米大小,直接采用沉降和过滤操作相当困难。现在生产饲料酵母的厂家,一般都采用“发酵→一次离心→二次离心→烘干”的工艺。由于酵母分离机价格昂贵,设备投资占很大比重,操作费用亦高,而且用酵母分离机只能回收发酵液中85%左右的酵母菌体。特别是分离机的喷嘴被堵时,损失的酵母菌体更多。因此,为防止喷嘴堵塞,每工作8h,离心机就得拆洗一次,既费时又费力,工作量很大<sup>[1]</sup>。若能用可行的方法来取代或部分代替离心机分离菌体将会节约大量能源。

本研究采用经过甄选适合于分离酵母单细胞蛋白[以味精废水生产的产脲假丝酵母(*Candida Utilis* 131)为例](的鞣酸+A)絮凝剂;研究用絮凝沉降法分离酵母单细胞蛋白;探讨(鞣酸+A)絮凝酵母细胞的机理;较为系统地研究了环境因素对(鞣酸+A)絮凝酵母细胞的影响,优化絮凝工艺,并就(鞣酸+A)对酵母细胞的絮凝作用进行表征;以期能够高效并经济地分离出单细胞蛋白,达到节约能源的目的。

作者通过试验,将酵母细胞的絮凝率确定为衡量絮凝性能的主要指标,但也必须有一定

的沉降速度, 最后, 决定采用粒度分布及平均粒度变化等方法来评价絮凝作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 酵母单细胞蛋白的培养

#### 1.1.1 材料

无锡市第三制药厂味精车间离子交换工段排放的酸性离交废母液

菌种 产朊假丝酵母131

培养基 培养基A, 培养基B

#### 1.1.2 主要仪器和设备

旋转式摇床

72-1型分光光度计

#### 1.1.3 方法

a. 酸性离交废液的处理 酸性离交废液→加热至100℃→袋滤除去谷氨酸产生菌体  
→置冷柜和冰箱中待用。

b. 酵母单细胞蛋白的培养

活化菌种 酵母单细胞蛋白的摇瓶培养→种子培养→扩大培养(30h)→摇瓶培养  
(27h)(接种量10%; 转速为180r/min; 温度32—34℃; 用旋转式摇床)→酵母单细胞蛋白  
发酵液。

c. 细胞浓度测定法 光密度法。

### 1.2 絮凝试验

#### 1.2.1 材料

酵母单细胞蛋白发酵液

絮凝剂 鞣酸+A。鞣酸分析纯, 无锡县化学试剂厂

#### 1.2.2 主要仪器

恒温水浴, 恒温仪精度±0.5%

pHS-2型酸度计, 上海第二分析仪器厂

微量移液器

混匀机 江苏金坛国华仪器厂

#### 1.2.3 絮凝率的测定

用盐酸或氢氧化钠溶液, 调节酵母细胞发酵液至给定的pH值, 以25ml移液管取25ml发  
酵液于50ml刻度试管中, 加入一定量絮凝剂, 用混匀机快速混匀, 置于恒温水浴中, 保温  
一定时间;

准确吸取5ml保温液体, 加入装有5ml的0.01mol/L EDTA溶液的试管中, 混匀, 用72-1  
分光光度计, 测O.D.<sub>(660nm)</sub>值, 算出絮凝率。

### 1.3 酵母细胞形态的观察

仪器 SEM-501B型扫描电镜, 荷兰飞利浦公司

方法 取1ml左右的酵母细胞培养液, 用滤纸过滤, 经洗涤后, 将粘有酵母细胞的滤  
纸, 小心剪成数小块, 以2%戊二醛和1%四氧化钨固定→乙醇逐级脱水→液态二氧化碳

临界点干燥—→喷金—→观察摄影。

#### 1.4 酵母细胞表面金属离子分布的测定(絮凝前后)

仪器 SEM-501B型扫描电镜(带EDAX9100/60能谱仪), 荷兰飞利浦公司

方法 X-射线能谱分析技术<sup>[2]</sup>

测定絮凝前酵母细胞表面金属离子的分布和较适条件下所得的絮凝酵母细胞(以鞣酸+A絮凝酵母细胞发酵液)表面金属离子的分布。

#### 1.5 粒子分析

仪器 HORIBA CAPA-500型离心自动粒子分析仪, 日本三元筑波株式会社。

方法见[3]

#### 1.6 絮凝动力学试验

主要仪器、材料见1.2.2

方法 于量筒内准确移入混合均匀的酵母细胞发酵液若干毫升, 按要求将其调整至较适絮凝条件, 加入适量絮凝剂, 快速混匀后, 放入恒温水浴(控制较适温度), 用秒表计时: 观察絮凝物形成所需时间并记下絮凝物与上清液界面或絮凝物高度随时间的变化。

#### 1.7 絮凝作用的表征试验

1.7.1 絮凝前后粒度分布和平均粒径的比较分析 测定在较优条件下所得絮凝物(以鞣酸+A絮凝酵母细胞发酵液)的粒度分布和平均粒径, 仪器和方法同1.5。然后, 再将所得结果与絮凝前酵母细胞的粒度分布和平均粒径作比较。

#### 1.7.2 氨基酸含量分析

a. 材料 酵母细胞发酵液以鞣酸+A絮凝酵母细胞发酵液所得的絮凝体

b. 仪器 H835-50型氨基酸自动分析仪, 日立公司

c. 方法 分别取样, 用6molHCl, 于110℃下, 水解24h后, 进样测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酵母单细胞蛋白絮凝机理的探讨

絮凝作用是复杂的物理、化学过程, 若涉及象酵母单细胞蛋白发酵液这样的生物体系, 情况就更为复杂。絮凝作用的产生, 往往难以用某一机理来解释清楚。

试验表明, 悬浮酵母细胞平均粒径为7.87 μm, 大多数分布在2—12 μm的范围内, 粒径大于12 μm的酵母细胞占16.6%(近似)。因为由粒径大于1 μm的分散相和分散介质组成的食品胶体体系, 往往还表现出胶体的性质, 所以细胞分散体系同时具有胶体和悬浮液的性质。

自然沉降试验和 Zeta 电位的测定结果说明, 酵母细胞于发酵液中, 虽有自发凝聚的趋势, 但凝聚沉降的速度慢, 体系存在着稳定因素。

这些因素包括: 双电层的分散稳定作用; 酵母细胞表面的水化作用。

其中酵母细胞表面的水化作用是酵母细胞分散体系稳定的主要因素。

2.1.1 鞣酸+A絮凝酵母细胞机制的探讨 鞣酸分子中有亲水基团, 也有疏水基团。没食子酰基中, 亲水的酚羟基上的氧原子, 因与苯环形成 p-π 共轭, 电子云向苯环移动, 且被苯环上的大 π 键平均化, 其对氢原子的束缚力下降, 使得酚羟基上的氢原子更为活泼。

以一定的试验为基础, 设鞣酸+A絮凝酵母细胞有下列环节:

a. 鞣酸分子于酵母细胞表面的吸附。

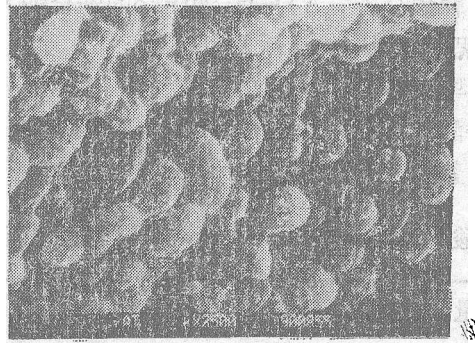


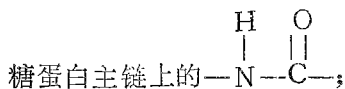
图1 鞣酸+A絮凝酵母细胞所得絮凝物的扫描电镜图

图1显示酵母细胞表面为一层物质所覆盖，这些物质与酵母细胞的絮凝密切相关，鞣酸分子在酵母细胞表面的吸附作用是絮凝产生的前提。

添加一定量的鞣酸于酵母细胞分散体系中，因鞣酸分子大部分以单分子形式在体系中扩散，且分子量较小，所以扩散速度相对来说是比较快的。当其与细胞表面相遇时，由于鞣酸分子的酚羟基与酵母细胞表面物质（如：磷酸甘露聚糖-蛋白质复合体）有多个位点可以结合，因而鞣酸分子就迅速被吸附，疏水部分朝向水相。

b. 被吸附的鞣酸分子的酚羟基、羰基与糖蛋白进一步作用形成较多的氢键，使酵母细胞壁中一定数量的疏水基团暴露于水相。

酵母细胞表面的糖蛋白中，可与鞣酸作用的官能团有：



氨基酸残基侧链上的羟基，包括Ser, Thr, Tyr残基上的羟基；

侧链上的—NH<sub>2</sub>基和—NH<sub>3</sub><sup>+</sup>，包括Arg, Lys, His残基上相应的基团；

端基上的—COOH基和—COO<sup>-</sup>，包括Asp和Glu残基上相应的基团；

糖蛋白中具有极性部分，能产生范德华力，而使糖蛋白与鞣酸分子相结合。

c. 产生新的疏水作用 酵母细胞表面吸附着的鞣酸分子中，疏水部分与细胞壁中暴露于水相的疏水基团，产生新的疏水作用，破坏酵母细胞表面原有的水化膜，随之，细胞表面的双电层稳定作用亦不复存在，导致酵母细胞结合成大颗粒而沉降。

从热力学上分析，破坏酵母细胞表面的水化膜，使原来与细胞表面结合的水分子从有序变成无序是个熵增的过程；而细胞表面间的疏水基团重新组合，产生新的疏水作用，则是个熵减的过程，絮凝作用发生了，说明该体系内部的熵增大于熵减，净熵增 $\Delta S > 0$ ，且体系自由能变化 $\Delta G < 0$ 。

d. 金属离子Cd<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>参与酵母细胞间的絮凝作用。表1表示酵母细胞用鞣酸+A絮凝前(O\*)和后(AT)表面金属离子的分布情况。

悬浮酵母细胞经加鞣酸+A絮凝，其表面金属离子分布情况有了变化。其中Cd<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>及Mn<sup>2+</sup>的含量，从絮凝前的0.00%分别提高到0.44%、0.12%、0.20%和1.80%，说明上述金属离子与酵母细胞间的絮凝作用有关。

经氨基酸分析，算得以鞣酸+A絮凝酵母细胞，His和Pro的回收率特别高，分别为

91.67%和85.84%,推测:(鞣酸分子+A)与His和Pro的结合能力特别强,酵母细胞表面的His残基和Pro残基可能是絮凝作用中的活性基团。

至于A物质,它的作用与细胞间的相互作用力有关。

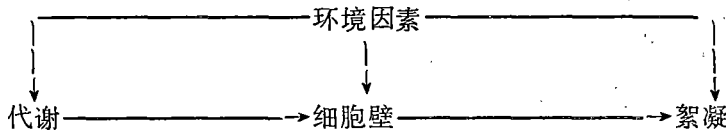
实际上,环境因素——酵母细胞发酵液的pH值、温度、酵母细胞浓度、 $Ca^{2+}$ 浓度、离子强度、絮凝剂的添加量、絮凝反应时间等,对酵母细胞的絮凝作用均有不同程度的影响。

表1 酵母细胞用鞣酸+A絮凝前(O\*)和后(AT)细胞表面几种金属离子的含量

离子	重量百分含量 (%)		原子百分含量 (%)	
	O*	AT	O*	AT
$Cd^{2+}$	0.00	0.44	0.00	0.25
$K^+$	0.00	0.12	0.00	0.20
$Ca^{2+}$	0.00	0.20	0.00	0.31
$Mn^{2+}$	0.00	1.80	0.00	2.05

## 2.2 环境因素对(鞣酸+A)絮凝酵母细胞的影响

环境因素对絮凝酵母细胞的影响,可用下述简图示意:



通过改变环境因素,可控制酵母细胞的絮凝。

### 2.2.1 发酵液的pH值对鞣酸+A絮凝酵母细胞的影响

图2表示发酵液pH值的变化对鞣酸+A絮凝酵母细胞的影响。

鞣酸是一种有机弱酸,在pH4.0左右,发酵液中以单分子形式存在的鞣酸占大多数,这些鞣酸容易为酵母细胞所吸附,表现为絮凝率高;当pH低于或高于4.0时,因鞣酸带电荷的数量的增加而以单分子形式存在的鞣酸减少,影响了鞣酸在细胞表面的吸附,导致絮凝率下降;当pH>5.5时,因鞣酸分子解离,带负电荷的鞣酸根离子急剧上升,使其在细胞表面吸附困难,表现出絮凝率下降迅速。

### 2.2.2 发酵液温度对鞣酸+A絮凝酵母细胞的影响

图3表示发酵液温度对鞣酸+A絮凝酵母细胞作用的影响。

根据鞣酸分子缔合的一般规律:颗粒分子运动愈强烈,缔合愈难。推测:由于发酵液温度上升,与酵母细胞表面结合的鞣酸分子中的疏水部分,疏水性下降;当温度为70.0℃时,由于细胞表面的蛋白质变性程度加剧,暴露的疏水基团增加,细胞间的疏水作用加强,表现出絮凝率小有回升。

图2实验条件:发酵液O.D.<sub>(650nm)</sub>为1.05,絮凝作用时间为30.0min,鞣酸添加量为400.0mg/L,发酵液温度为18.0℃

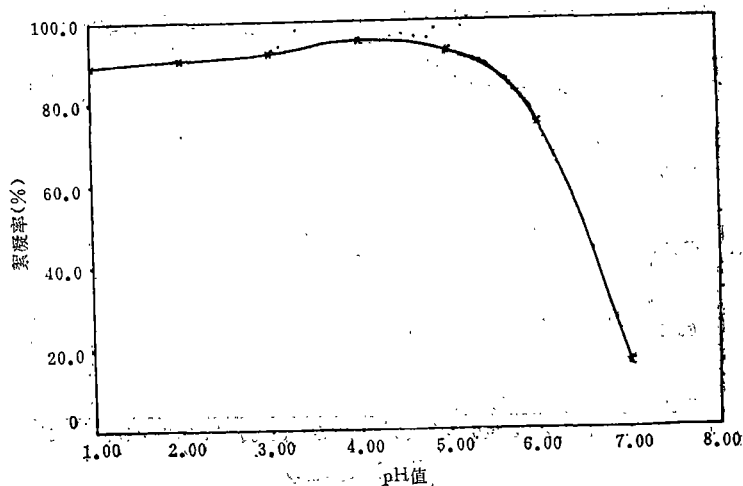


图2 发酵液的pH值与酵母细胞絮凝率的关系曲线

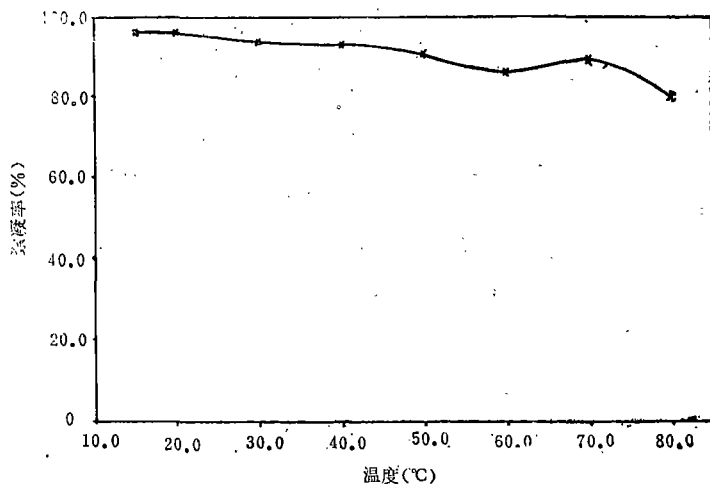


图3 发酵液温度与酵母细胞絮凝率的关系曲线

实验条件: 发酵液O.D.<sub>(660nm)</sub>为1.05, pH值为4.00, 鞣酸添加量为400.0mg/L, 絮凝作用时间为30.0min.

**2.2.3 鞣酸的添加量对酵母细胞絮凝作用的影响** 图4表示发酵液中鞣酸添加量对酵母细胞絮凝作用的影响。

鞣酸浓度在0—200.0mg/L范围内, 缔合的鞣酸分子数量很少, 鞣酸分子的绝大多数功能团可与细胞表面结合, 表现出鞣酸添加量的增加对细胞絮凝作用很有效; 尔后, 随着鞣酸浓度的增加, 缔合的鞣酸分子数也增加(鞣酸浓度400.0mg/L, 缔合度为7.0%), 部分功能团用于分子间缔合、与酵母表面结合的功能团的相对百分数下降, 表现出絮凝率上升缓慢; 当鞣酸浓度达700.0mg/L时, 细胞表面能与鞣酸分子结合的位点已基本被占满, 表现出絮凝率最大; 此后, 鞣酸添加量再增大, 则过量的鞣酸分子很难与细胞表面直接结合, 表现为絮凝率不再增加。

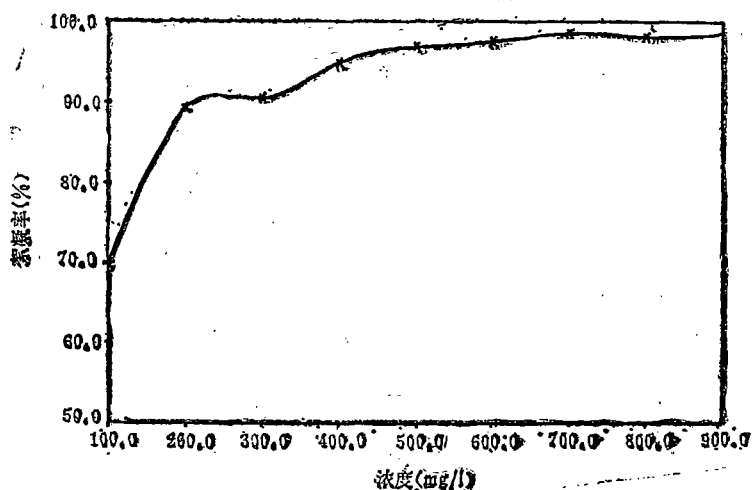


图4 发酵液中鞣酸添加量与酵母细胞絮凝率的关系曲线

实验条件：发酵液O.D.<sub>(660nm)</sub>为1.05，温度为18.0℃，pH值为4.00，絮凝作用时间为30.0min。

推测：鞣酸分子在酵母细胞表面吸属于单分子层吸附。

2.2.4 絮凝沉降时间对鞣酸 + A 絮凝酵母细胞的影响 图5表示絮凝沉降时间对鞣酸 + A 絮凝酵母细胞的影响。

图5中曲线表明，在20℃时，当絮凝沉降时间超过5min，随着该时间的增加，酵母细胞的絮凝率上升缓慢。

推测：絮凝反应时间5min，絮凝作用已经接近完全。

发酵液酵母细胞浓度对鞣酸 + A 絮凝酵母细胞的影响 图6表示发酵液酵母细胞浓度对鞣酸 + A 絮凝酵母细胞的影响。

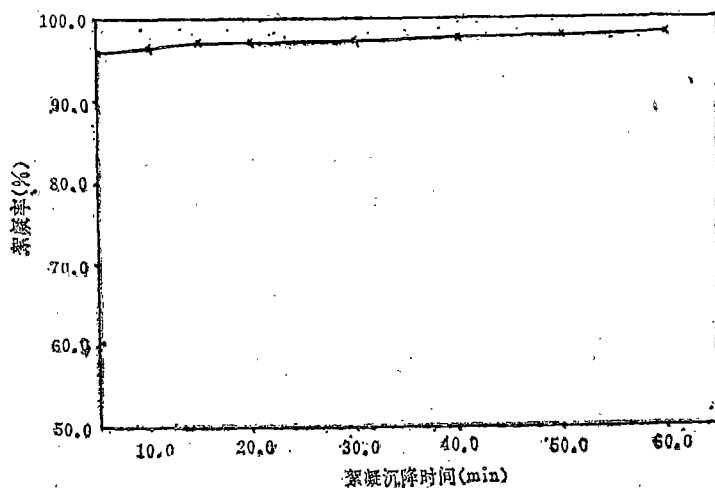


图5 絮凝沉降时间与酵母细胞絮凝率的关系曲线

实验条件：发酵液O.D.<sub>(660nm)</sub>为1.11，温度为20℃，pH值为4.00，鞣酸添加量400.0mg/L

图6曲线表明,当酵母细胞发酵液的 $O.D._{(660nm)} < 1.02$ 时,随着酵母细胞的浓度增加,絮凝率略有上升;当酵母细胞发酵液 $O.D._{(660nm)} > 1.02$ 时随着浓度的增加,酵母细胞絮凝率略有下降。前者是由于细胞浓度增加,细胞间碰撞频率增大之故;后者则因为细胞浓度增至一定程度,酵母细胞表面未结合的位点逐渐增多,鞣酸量尚嫌不足。

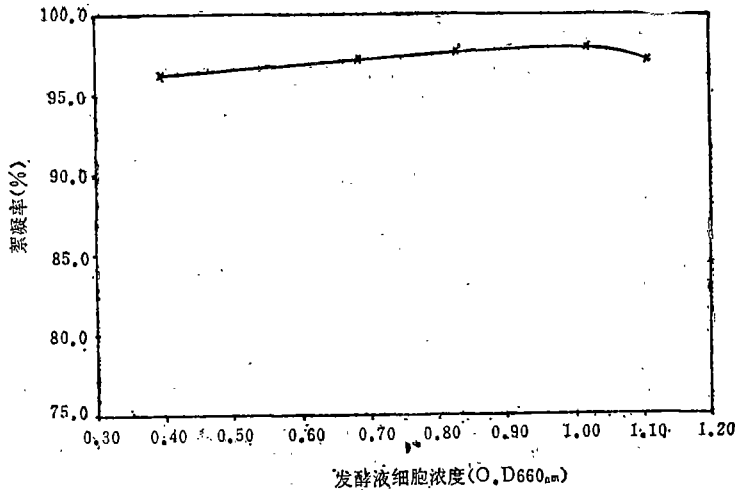


图6 发酵液酵母细胞浓度与絮凝率的关系曲线

实验条件: 发酵液温度为 $22.0^{\circ}C$ , pH值为4.00, 鞣酸添加量为 $400.0mg/L$ , 絮凝作用时间为 $30.0min$ 。

2.2.5 发酵液  $Ca^{2+}$  浓度对鞣酸 + A 絮凝酵母细胞的影响 图7表示发酵液中,  $Ca^{2+}$  浓度的增加对鞣酸 + A 絮凝酵母细胞的影响。

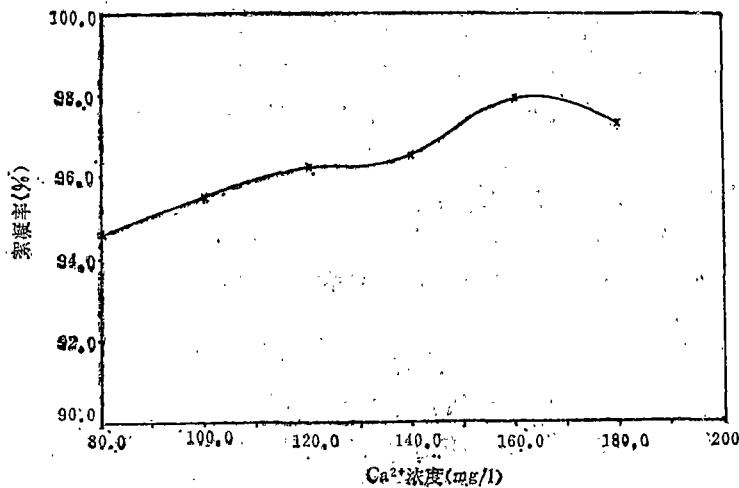


图7 发酵液钙离子浓度与酵母细胞絮凝率的关系曲线

实验条件: 发酵液 $O.D._{(660nm)}$ 为1.10, 温度为 $21.0^{\circ}C$ , pH值为4.00, 鞣酸添加量为 $400.0mg/L$ , 絮凝作用时间为 $30min$ 。

$Ca^{2+}$ 在絮凝中的作用是参与酵母细胞壁之间的桥连<sup>[5]</sup>, 当 $Ca^{2+}$ 浓度为 $164mg/L$ 时比较合



适,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度 $>164\text{mg/L}$ 时,由于过量的与水结合的 $\text{Ca}^{2+}$ 存在于细胞表面,削弱了细胞表面的疏水作用。

**2.2.6 发酵液中硫酸钠浓度的增加对鞣酸 + A絮凝酵母细胞的影响** 图8表示发酵液中硫酸钠浓度的增加对酵母细胞絮凝作用的影响。

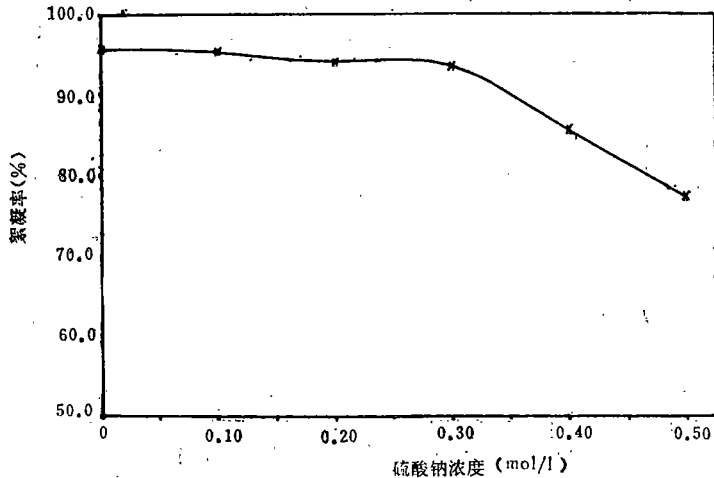


图8 发酵液中硫酸钠浓度的增加与酵母细胞絮凝率的关系曲线

实验条件: 发酵液O.D.<sub>(560nm)</sub>为1.05, 温度为28.0℃, pH值为4.00, 鞣酸添加量为400.0mg/L, 絮凝作用时间为30.0min.

图8表明, 随着发酵液中, 硫酸钠添加量的增大(从0—0.30mol/L), 酵母细胞的絮凝率略有下降, 但相差并不大, 当硫酸钠添加量大于0.30mol/L时, 絮凝率大幅度下降。

味精废水中含有大量的盐, 酵母细胞发酵液中离子强度已经比较高, 随着硫酸钠添加量的增大, 离子强度上升, 细胞表面蛋白质的盐溶作用亦渐产生; 当硫酸钠添加量大于0.3mol/L时, 随着添加量的增加, 细胞表面蛋白质的盐溶作用大大增加, 导致酵母细胞絮凝率大幅度下降。

### 2.3 鞣酸 + A絮凝酵母细胞的动力学分析

观察鞣酸 + A絮凝酵母细胞可知, 若条件合适, 只需30S, 就有大量肉眼可见的较均匀的絮凝微粒形成。所以可将该絮凝过程作为快速絮凝来处理。

结合试验有下述推论:

- 絮凝微粒的形成速度随酵母细胞间碰撞频率的增加而增大;
- 酵母细胞的絮凝沉降速度, 受鞣酸传质速度的控制。

在酵母细胞的絮凝过程中, 鞣酸的传质依靠分子扩散是比较慢的, 而采用混匀机涡流传质, 能迅速增大絮凝沉降速度。结合絮凝体的性质, 宜采用鞣酸 + A的一次加入, 迅速混匀后, 静置。

图9中的絮凝沉降曲线表明, 当絮凝沉降时间小于30min时, 沉降界面随沉降时间的增加, 下降迅速, 沉降速度大。

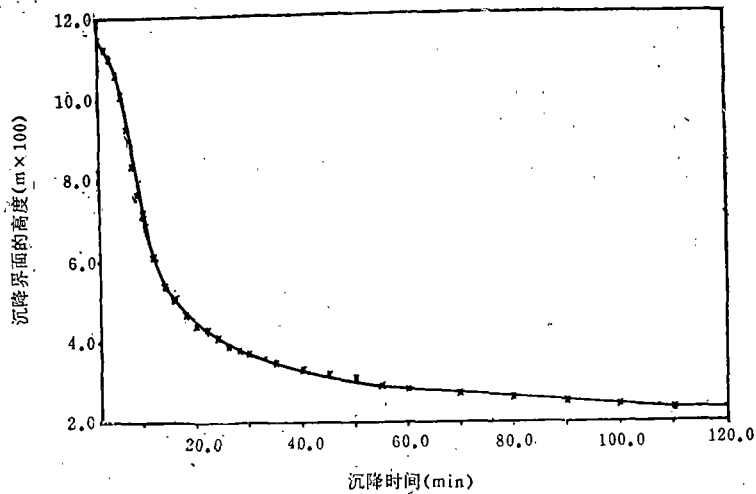


图9 鞣酸+A絮凝酵母细胞的沉降曲线

实验条件：发酵液 $O.D_{660nm}$ 为1.21，温度为 $26.0^{\circ}C$ ，pH值为4.00，鞣酸添加量为 $400.0mg/L$ ，絮凝体的形成时间为1min。

图10表示以鞣酸+A絮凝酵母细胞所得絮凝沉降物体积与絮凝沉降时间的关系。依上述试验数据可以算出，经絮凝沉降40min和110min能分别脱去78%和82%的水分。

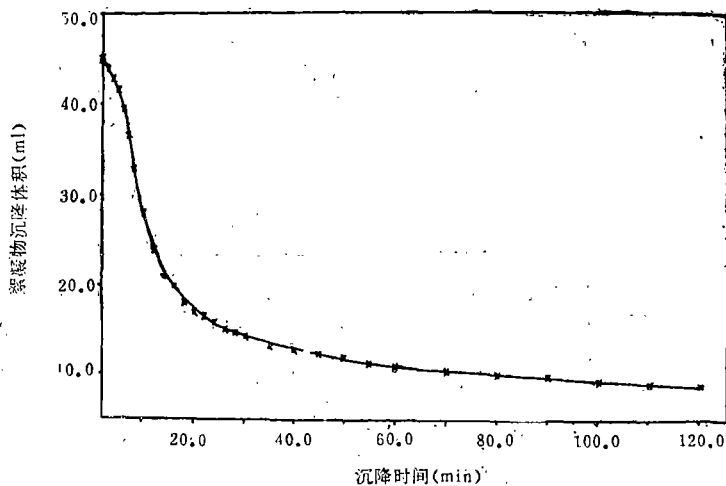


图10 絮凝物沉降体积与絮凝沉降时间的关系曲线

实验条件：发酵液 $O.D_{660nm}$ 为1.21，温度为 $26.0^{\circ}C$ ，pH值4.00，鞣酸添加量为 $400.0mg/L$ ，絮凝体的形成时间为1min。

(注：酵母细胞发酵液絮凝前总体积为50ml)

## 2.4 (鞣酸+A)絮凝酵母细胞工艺的优化

本文优化试验充分利用CMO法-质心映射优化法(Centroid Mapping Optimization<sup>[6]</sup>和RSM法-响应面法(Response Surface Methodology)<sup>[7][8]</sup>的特点，将两者有机地结合起来。

运用CMO法考察了酵母细胞絮凝率与发酵液pH值、温度、絮凝剂添加量之间的关系，粗选出这三个因素的较优水平；结合环境因素对絮凝剂絮凝酵母细胞的考察结果，将发酵液的酵母细胞浓度、钙离子浓度、盐浓度和絮凝沉降时间固定在较优水平，再在发酵液的pH值、温度、絮凝剂添加量的较优水平附近，采用RSM法，以旋转设计，建立酵母细胞絮凝率与发酵液pH值、温度和絮凝剂添加量之间的响应面方程；用计算机进行实验数据处理，绘制等值面图；通过分析等值面，得出絮凝的优化工艺。

在固定絮凝沉降时间为30min,酵母细胞发酵液O.D.<sub>(660nm)</sub>为1.08,钙离子浓度为80mg/L

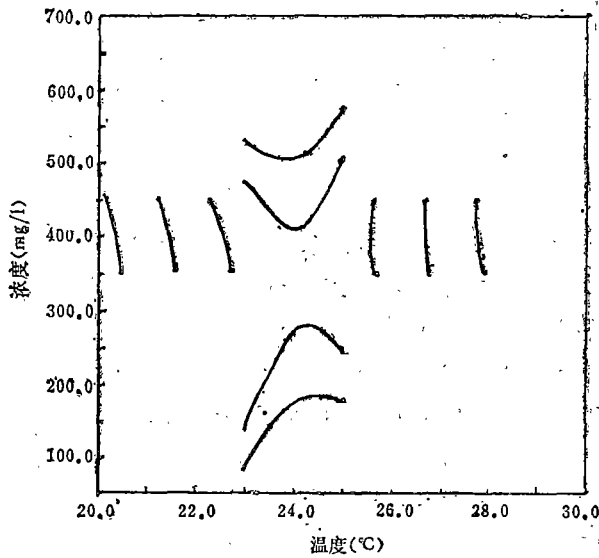


图11 pH4.0时之等值面图

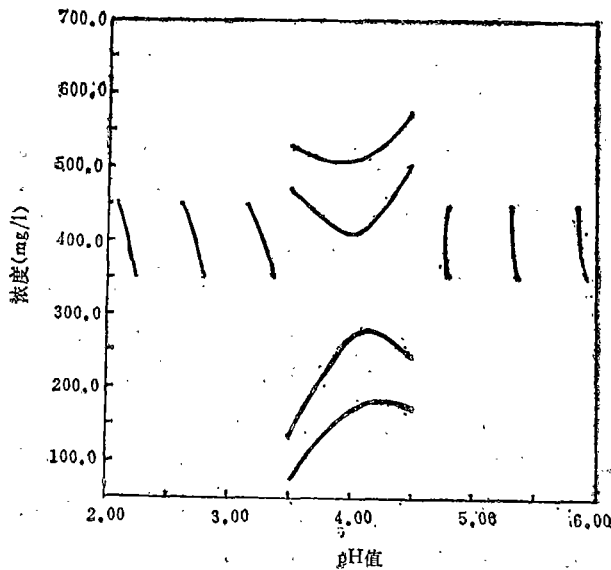


图12 发酵液温度为22.0°C时之等值面图

L, 盐浓度取发酵液原有水平的条件下, 运用旋转设计建立起鞣酸 + A 絮凝酵母细胞的絮凝率 (F.R.) 与发酵液的 pH、温度 ( $t$ ) 和发酵液中鞣酸浓度之间的响应面方程。取 pH 值为 4.00, 温度为 22.0°C, 鞣酸的添加量为 400mg/L, 分别代入所得之响应面方程, 用计算机绘制出如图 11—图 13 所示之等值面。

在可能的情况下, 以响应值大为好。依此衡量标准, 对图 11—图 13 进行综合分析, 得出鞣酸 + A 絮凝酵母细胞发酵液的最优水平为:

$$\text{pH} = 4.0; t = 24.3^{\circ}\text{C}; \text{浓度} = 400\text{mg/L}.$$

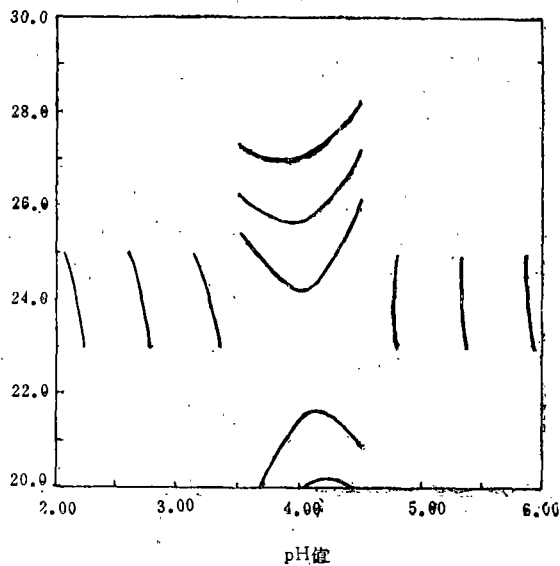


图 13 发酵液中鞣酸浓度为 400mg/L 时之等值面图

此时, 絮凝率可达 95%。

较优区域为:  $\text{pH} = 3.0-5.0; t = 20.0-26.0^{\circ}\text{C}; \text{浓度} = 200-450\text{mg/L}.$

此时, 絮凝率可达 90% 以上。

鞣酸 + A 絮凝酵母细胞发酵液, 在发酵液 pH 值、温度、鞣酸添加量的最优水平或较优区域上进行时, 其它絮凝作用条件分别是:

絮凝沉降时间 = 30.0min; 酵母细胞发酵液  $\text{O.D.}_{(660\text{nm})} = 1.08$ ; 钙离子浓度 = 80mg/L; 盐浓度为发酵液的原有水平。

## 2.5 絮凝作用的表征

### 2.5.1 酵母细胞粒度分布的改善

图 14 表示酵母细胞经絮凝后的粒度分布。

悬浮酵母细胞经鞣酸 + A 絮凝, 平均粒径从原来的  $7.87 \mu\text{m}$  提高到  $43.05 \mu\text{m}$ , 使采用沉降-过滤代替离心分离酵母细胞成为可能。

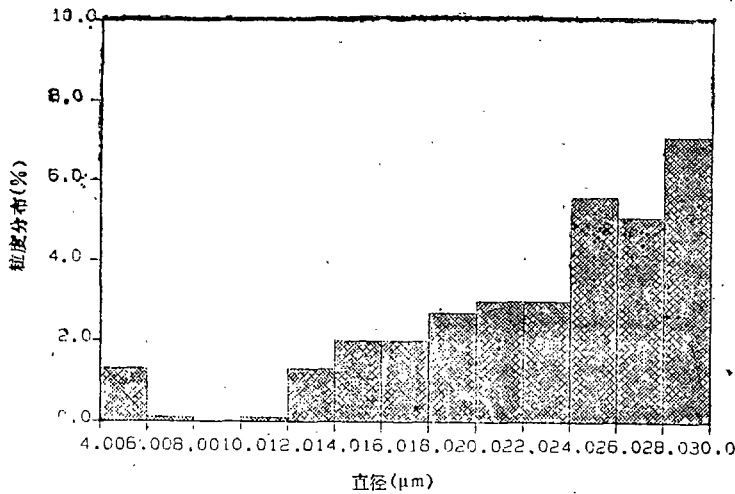


图14 酵母细胞经鞣酸 + A絮凝后的粒度分布图

注: 发酵液O.D.<sub>(660nm)</sub>为1.01, 温度为30.0°C, pH值为4.00, 鞣酸添加量为400.0mg/L, 絮凝作用时间为30.0min; 酵母细胞经絮凝后, 粒径>30.0μm的占66.7%; 平均粒径为43.05μm.

2.5.2 酵母细胞发酵液中氨基酸的总回收率 图15表示酵母细胞发酵液经鞣酸 + A絮凝后, 氨基酸的回收率。

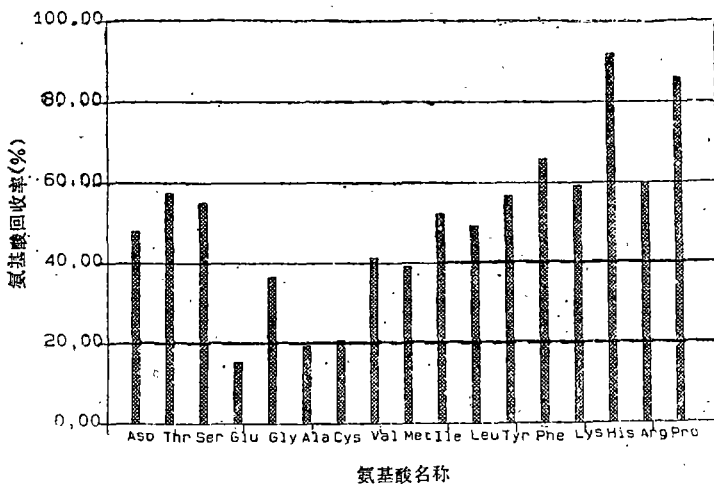


图15 酵母细胞发酵液经鞣酸 + A絮凝后, 氨基酸的回收率

注: 鞣酸 + A絮凝发酵液中酵母细胞的条件为:

发酵液温度 = 18.5°C; 发酵液pH值 = 4.00;

鞣酸添加量 = 400.0mg/L; 絮凝沉降时间 = 75.0min;

原发酵液O.D.<sub>(660nm)</sub>值 = 1.10.

25ml发酵液经鞣酸 + A在上述条件下絮凝, 得絮凝物4.5ml.

图15表明酵母细胞发酵经鞣酸 + A絮凝, 其中组氨酸(His)和脯氨酸(Pro)的回收率特

别高, 分别达91.67%和85.84%。

沉降过程和优化过程表明, 酵母细胞发酵液经鞣酸 + A絮凝, 沉降性能较好, 酵母细胞回收率高。

### 3 絮凝剂资源、安全性问题和节能效果的初探

鞣酸是存在于植物中的一类分子较大的复杂多元酚类化合物, 广泛分布于植物界, 在种子植物中分布得更为广泛。被昆虫伤害部分所形成的虫瘿常含有相当多的鞣酸, 如五倍子含鞣酸量高达78%<sup>[9]</sup>。

作为絮凝剂, 其应用于酵母细胞的分离, 在毒性上是没有问题的, 因为作为食品添加剂, 在工业中已有运用<sup>[10]</sup>, 至于A物质更是无毒无害。

若用鞣酸 + A絮凝沉降法分离酵母单细胞蛋白, 根据提供的信息, 经初步估算, 节能效果显著。

小试证实, 以鞣酸 + A絮凝沉降法分离酵母单细胞蛋白, 是可行的, 具有良好的应用前景。

### 4 结 论

a. 酵母细胞的X-射线能谱分析证实:  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 参与了鞣酸 + A对酵母细胞的絮凝作用。

b. 发酵液的pH值、温度、鞣酸的添加量, 对酵母细胞的絮凝有明显的影响。在发酵液的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为80.0mg/L, 酵母细胞发酵液O.D.<sub>(660nm)</sub>为1.08, 盐浓度维持在发酵液的原有水平, 絮凝沉降时间为30.0min的情况下, 鞣酸 + A絮凝酵母细胞的最优条件为:

发酵液的pH值 = 4.0; 发酵液的温度 = 24.3℃;

鞣酸的添加量 = 400.0mg/L;

此时酵母细胞絮凝率可达95%。

较优区域为:

发酵液pH值: 3.0—5.0; 发酵液温度: 20—26℃;

鞣酸添加量: 200—450mg/L;

实际运用时, 应视具体情况, 灵活调节絮凝剂之添加量。

c. 发酵液中的酵母细胞经鞣酸 + A在较优条件下絮凝。条件如下:

发酵液pH值 = 4.00; 发酵液温度 = 30.0℃; 絮凝沉降时间 = 30.0min; 鞣酸添加量 = 400.0mg/L; 酵母细胞发酵液的O.D.<sub>(660nm)</sub> = 1.01;  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度80.0mg/L; 盐浓度维持在发酵液原有水平; 平均粒径从原来的7.87  $\mu\text{m}$ 提高到43.05  $\mu\text{m}$ , 粒度分布, 从原来的大于12.0  $\mu\text{m}$ 的占16.6%上升到粒径大于30.0  $\mu\text{m}$ 的占66.7%。

d. 酵母细胞发酵液经鞣酸 + A在较优条件絮凝, 条件同c下絮凝。组氨酸和脯氨酸的回收率分别可达91.67%和85.84%。

e. 在单细胞蛋白的生产中, 添加一定量的鞣酸 + A, 能大大提高其固液分离效率, 节约能量; 以鞣酸 + A为絮凝剂, 采用絮凝沉降技术分离酵母细胞, 通过小试, 证明是可行的。

## 致 谢

工作中得到乐红兵、周晓宏、堵国成、崔正刚、曹寅、姚克明、莫子沂和韩榕涛等同志的帮助,在此谨表谢意。

## 参 考 文 献

- 1 龚有辉.发酵科技通讯,1990; 19(2): 36
- 2 周剑雄等.电子探针分析.地质出版社, 1988; 345
- 3 上海市计量局试验工厂.Zeta电位测定仪使用说明书.1984
- 4 Ami M A et al. Yeast Flocculation. J Gen Microbial, 1982;128;2001
- 5 Attia Y A Flocculation in Biotechnology and Separation Systems. Elsevier Science Publisher, 1987;385
- 6 Nakai S and Kaneko. Journal of Food Science, 1985;50, 845
- 7 Johnson N L & Leone F C. Statistics & Experimental Design in Engineering & Physical Science. John Wiley, 1977;965
- 8 William G Cochran, et al. Experimental Designs. Wiley Publication in Statistics, 1957;351
- 9 北京医学院,北京中医学院.中草药成分化学.人民卫生出版社, 1980; 479
- 10 凌关庭等.食品添加剂手册(下册).化学工业出版社, 1989; 464

## Studies on the Separation of Single Cell Protein in Yeast Broth by Flocculation

Liu Shukai Fan Juchi Wang Rongmin Wang Yongmin

(Dept. of Chem. and Chem. Eng.) (Dept. of Food Sci. and Eng.)

**Abstract** This paper proposed a new method of separating single cell protein in yeast broth by flocculation-sedimentation. In this paper, the mechanism was probed into of yeast cell flocculation with tannic acid + A. Then, the effects of environmental factors on the flocculation were systematically studied. For the first time, we combined the methods of Centroid Mapping Optimization with Response Surface Methodology to optimize the conditions of the flocculation by the computer. Furthermore, a better flocculation between tannic acid + A and yeast cells was demonstrated. By Energy dispersiv X-ray analyses on yeast cell surfaces, it is confirmed that metallic ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{K}^{+}$  participate in the flocculation between tannic acid + A and yeast cells. The results show that it is practical to separate single cell protein with flocculation-sedimentation in yeast broth. By this method enormous energy can be economized.

**Keywords** Single Cell Protein; Flocculation; Flocculant; Centroid Mapping Optimization; Response Surface Methodology