

# 絮凝法处理 L-脯氨酸发酵液的研究

严希康 李卫东 易向群 杨雅琴

(华东化工学院生化工程研究所, 上海)

**摘要** 通过滤饼的重量比阻和溶液流动电位(亦称 $\xi$ 电位)的测定, 分析、讨论了用絮凝技术预处理 L-脯氨酸发酵液的合理性, 实践也表明不仅能大大提高发酵液的固液分离效果, 同时使树脂对 L-脯氨酸的重量吸附容量增加了 40%。

**关键词** L-脯氨酸; 絮凝技术; 滤饼的重量比阻

L-脯氨酸(L-Proline)是人体蛋白质的重要组成部分之一, 广泛应用于有机化学、分子生物学、实验医学和食品工业上。如 L-脯氨酸可用于合成抗高血压药物巯甲脯氨酸、配制复方氨基酸输液, 食品工业甜香剂, 化学反应的催化剂, 农作物的增产剂等。

L-脯氨酸可通过发酵法生产、离子交换法分离精制<sup>[1]</sup>。国内目前一般采用带菌体上柱吸附, 这样不仅给操作带来困难, 而且影响过程的收率和产品的质量。因此我们采用絮凝沉降的办法对发酵液进行预处理, 然后固液分离, 进行清液吸附。本文就重量比阻和溶液流动电位的测定对絮凝法处理 L-脯氨酸发酵液进行了研究。

## 材料与方法

### (一) 药品和试剂

L-脯氨酸发酵液: 本所脯氨酸发酵组提供。

高分子絮凝剂: 本院辐射化学组研制。

磷酸三钠(C. P): 上海新华化工厂。

### (二) 实验方法和设备

絮凝效果的测定: 重量比阻法<sup>[2]</sup>。

交换容量测定: 静态法<sup>[3]</sup>。

装置: 真空吸滤系统。

### (三) 分析方法

L-脯氨酸测定: 茚三酮法<sup>[4]</sup>。

pH 值测定: PHS-2C 型酸度计。

色度值测定: 比色法(CM-2 型数字式测色计)。

流动电位测定: DPM-1 型微电泳仪。

粘度测定: Rheotest-II 型粘度计。

## 结 果

### (一) 絮凝剂的筛选

1. 高分子絮凝剂类型的选择: 一般说来, 发酵液中影响离子交换法提取氨基酸的主要杂质为高价无机离子和蛋白质。从 L-脯氨酸培养基成份分析看, 除  $\text{CaCO}_3$  外, 所加无机盐甚微, 其中一部分还要参加到代谢过程中去, 因此看来杂质主要是蛋白质、菌丝体和  $\text{CaCO}_3$  等一些不溶性固形物。其处理方法较多, 目前比较新型的技术是使用絮凝技术。依靠絮凝剂分子上众多的离子化基团絮凝胶体和长链的架桥作用, 使胶体成团聚沉<sup>[5]</sup>, 所以我们先进行了有关絮凝剂——聚丙烯酰胺的定性筛选见表 1。

表 1 絮凝剂的类型与絮凝效果比较

絮凝条件	絮凝剂类型	聚丙烯酰胺		
		阳离子型	非离子型	阴离子型
pH		3	6.5	9
使用剂量		5ppm	5ppm	5ppm
保温时间		20min	20min	20min
絮凝现象		+++	+++	++

注: 处理温度为 40℃、搅拌、沉降

由表 1 可见,阳离子和非离子型絮凝剂,在絮凝现象上相当,都比阴离子型絮凝剂好。但阳离子型絮凝剂一般毒性较大,稳定性差,同时 L-脯氨酸放罐时 pH 一般就在 6—7 之间,絮凝时可不必调节 pH。所以我们决定选用非离子型絮凝剂。

2. 高分子絮凝剂使用剂量的选择:絮凝效果与絮凝剂使用剂量的多少直接有关,最适剂量的试验结果见表 2。

表 2 絮凝剂添加剂量与效果的关系

絮凝剂 添加剂量	pH	处理温度 (℃)	保温时间 (min)	絮凝现象	透光度 (%)
5ppm	6.5	40	20	+++	34
10ppm	6.5	40	20	+	20
20ppm	6.5	40	20	++	32
对照	6.5	40	20	—	25

由表 2 可见,絮凝现象和透光度都以加入 5ppm 聚丙烯酰胺非离子型高分子絮凝剂为好。

3. 无机絮凝剂的使用:由于我们在后续工序中采用离子交换法提取 L-脯氨酸,所以最初考虑不想引入无机絮凝剂,以防无机离子影响吸附。通过上面的试验,我们发现有机絮凝剂对蛋白质等杂质虽有一定的絮凝效果,但絮凝的胶团比较松散,对色素的去除和透光度的改变上都不够大。因此我们根据培养基中已有的无机离子,再引入磷酸三钠盐,使它们相互作用,

表 3 有机絮凝剂单独使用和与无机絮凝剂合并使用的比较

絮凝剂 使用条件	合 并 使 用				单独使用
pH	3	4	6.5	7	6.5
保温时间	20分	20分	20分	20分	20分
絮凝现象	—	+	+++	++	+
透光度(%)	47	53	94	79	34

注:有机絮凝剂(非离子型聚丙烯酰胺)为 5ppm 无机絮凝剂(饱和  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  溶液)10ml,处理温度 40℃

生成不溶解的  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  沉淀。作为填充-凝固剂,既可使有机絮凝作用增效,又不会引入其他无机离子,影响 L-脯氨酸的离子交换吸附,试验结果见表 3。

由表 3 可见,加入磷酸三钠后可大大提高絮凝效果和透光度。

4. 发酵液絮凝最佳条件的确定:根据上述定性试验结果,确定发酵液的 pH、温度和絮凝剂投加剂量对胶体粒子的絮凝作用影响较大,故对每个因子选三个水平进行  $L_9(3^4)$  正交试验<sup>[6]</sup>,其结果为:

(1) 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。因此絮凝量增大,透光度上升,过滤速度也提高,但温度高于 50℃ 高分子絮凝剂易分解,絮凝作用降低故以 40℃ 为最佳。

(2) 发酵液的 pH 对絮凝作用的影响最大,其中特别对于无机试剂相互作用生成填充-凝固剂的影响更为突出,根据我们的试验一定要在  $\text{pH} > 6$  时才能产生效果,当  $\text{pH} = 6.5$  时,所得滤饼含固量和透光度都最大,过滤速度也较快。

(3) 絮凝剂用量。在正交试验中采用是固定有机絮凝剂为 5ppm 时,改变  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  的用量来进行试验的。其中以投加发酵液体积 3.75%  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  饱和溶液为最好,这时过滤速度最快,絮凝的固形物也最多。

(二) 重量比阻和流动电位的测定与分析

为进一步考证正交试验结果,进行了过滤特性参数重量比阻  $r_B$  和流动电位(亦称 Zeta 电位)的测定。

1. 重量比阻的测定和比较:发酵液属于非牛顿型液体,要想通过过滤,使固液两相分离是困难的,主要由发酵液的滤饼的比阻力决定,因此它是过滤特性的主要指标,其值  $r_B = \frac{2M \Delta P}{\mu X_B}$  米/公斤<sup>[2]</sup> 式中  $M$  可以利用图解法求得,然后代入上式求得  $r_B$ 。絮凝的好坏可直接反映在  $r_B$  的变化上,所以我们用它来综合考证絮凝效果。

(1) 溶液 pH 的变化对  $r_B$  的影响: 在放有相同体积发酵液的三个烧杯中, 分别加入同样的絮凝剂剂量, 调节成不同的 pH: 6.5, 7, 8, 在 40℃ 下保温 20 分钟后过滤, 记录不同时间内所得到的滤液量, 以  $\tau/q$  为纵轴,  $q$  为横轴作图, 得不同曲线(图 1)。并求得  $r_B$  值(表 4)。

由图 1 和表 4 可见, 溶液 pH 以控制在 6.5 为好。

表 4 溶液 pH 的大小对  $r_B$  值变化的关系

pH 值	6.5	7.0	8.0
$r_B$ 值 (m/kg)	$2.0 \times 10^{-12}$	$5.24 \times 10^{-12}$	$8.79 \times 10^{-12}$

(2) 絮凝剂投加剂量对  $r_B$  的影响  
改变有机絮凝剂投加剂量, 控制其他条件相同进行过滤试验分别得图 2 和表 5。

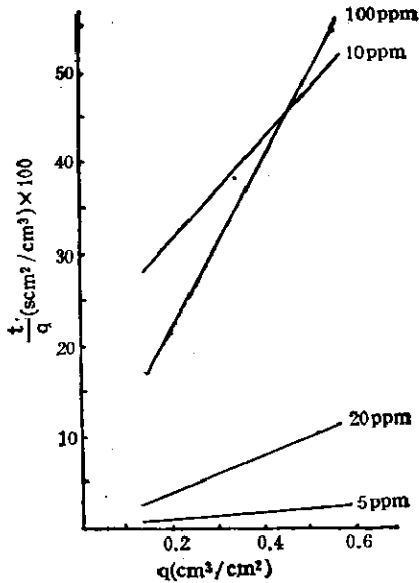


图 2 絮凝剂投加量与过滤的关系  
性蛋白质胶体, 又有憎水性悬浮微粒, 用 DPM-1 型微电泳仪测得其胶体等粒子带负电,  $\zeta$  电位为 -25.4, 由于它的存在使胶粒相互排斥, 抵制凝聚。所以我们用无机及有机絮凝剂进行预处理来降低流动电位绝对值, 达到使胶粒凝聚沉降, 结果见图 3 和图 4。

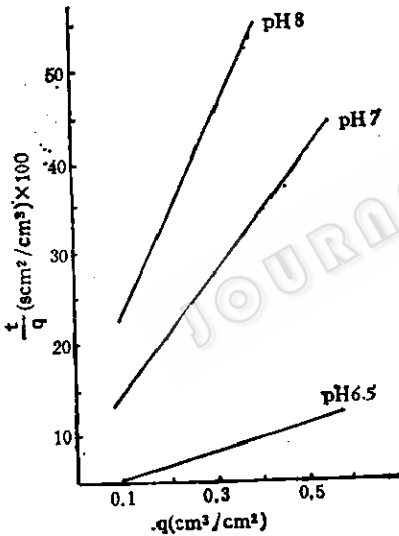


图 1 溶液 pH 不同时对过滤的影响

表 5 絮凝剂投加剂量对  $r_B$  值变化的关系

剂量 (ppm)	5	10	20	100
$r_B$ 值 ( $\times 10^{12}$ m/kg)	0.75	9.52	4.20	10.60

由图 2 和表 5 可见以 5ppm 剂量最佳。  
2. 流动电位的测定: 在发酵液中既有亲水

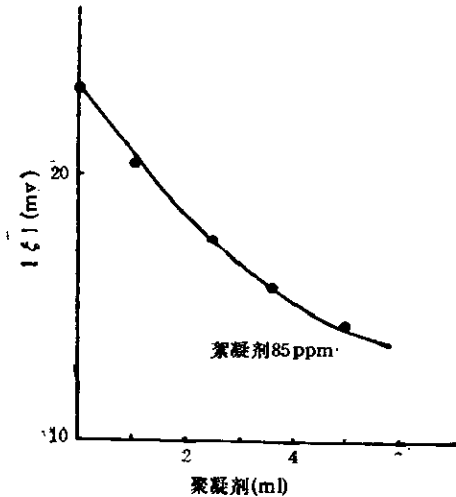


图 3 无机絮凝剂添加量对  $\zeta$  地位的影响  
由图可见, 随着无机絮凝剂投加量的增加, 流动电位逐渐下降, 最后趋于平稳, 而对于有机絮凝剂的投加有一个最适浓度问题, 低于或高于此值均会导致胶粒间电荷排斥力的增加, 使流动电位上升。

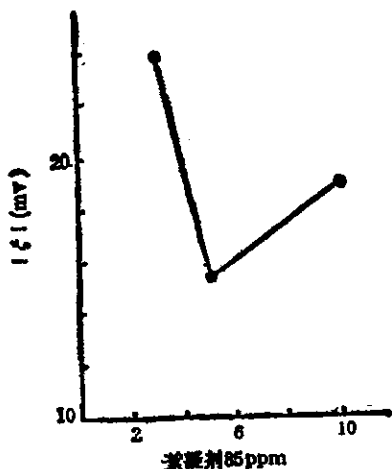


图4 有机絮凝剂量变化对 $\zeta$ 电位的影响

总之,通过重量比阻和流动电位测定,说明正交试验中所确定的最佳条件是符合理论分析的。

为了进一步说明预处理的优劣,我们还测定了发酵液处理前后 L-脯氨酸的量以及对离子交换树脂吸附 L-脯氨酸影响。测定结果表明,通过预处理 L-脯氨酸仅损失 0.8%,相反使树脂对它的静态吸附容量增加了 40% 左右。所以这一处理方案是具有实际意义的。

## 讨 论

1. L-脯氨酸发酵液的固液分离实验室往往采用离心法也不甚容易。我们采用无机絮凝剂和非离子型高分子电解质并用的絮凝方法后可

通过过滤将固液分离。实践证明可改善过滤性能分离去除菌体和一些杂质并改变滤液性质,提高树脂对 L-脯氨酸的静态交换容量达 40% 左右。

2. 过滤特性的主要指标是滤饼的重量比阻,通过对它的实验室测定,可以作为综合考察絮凝条件和效果好坏的一个比较好的方法,从我们的实验中也证实了这一点。

3. 流动电位,可用公式计算  $\zeta = \frac{C \mu_0 B \omega}{I}$ ,

它的电性和大小表示了胶体粒子的性质和稳定性,如果 $\zeta$ 电位下降则意味着胶体粒子的稳定性下降<sup>[1]</sup>,所以从另一个侧面反映了发酵液预处理的好坏,我们利用 DPM-1 型微电泳仪测定了不同处理条件下 $\zeta$ 电位的变化,实验结果说明也是一个比较好的实验手段,与絮凝条件的正交试验所得结果是吻合的。

## 参 考 文 献

- [1] 郭慧珍等: 工业微生物, 17(2): 1—6, 1987.
- [2] Жуковская, С. А. и Линькова, О. С. *АНТИБИОТИКИ*, 20: 217, 1975.
- [3] 严希康等: 微生物学通报, 12(6): 246—249, 1985.
- [4] Chinard F. P.: *J Biom Chem.*, 199:91, 1952.
- [5] R·文克斯著,潘才元译“絮凝技术”,原子能出版社,1981.
- [6] 北京大学数学系概率统计组: 正交试验设计,人民教育出版社,1981.
- [7] 上海市计量局实验工厂: DPM-1 型微电泳仪使用说明书 1984.
- [8] 陈宗洪: <胶体化学>,高等教育出版社,1986.