

# 谷氨酸发酵液絮凝除菌的研究

云逢霖 崔焕明

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

**摘要** 采用天然高分子聚合物壳聚糖为絮凝剂, 对谷氨酸发酵液中菌体的絮凝作用及絮体处理进行了系统的研究, 并进行了 1000 l 中间试验。结果表明, 发酵液 pH、壳聚糖用量是影响絮凝效果的主要因素。pH5.5~6.5, 壳聚糖用量  $30 \times 10^{-3} \text{g/l}$ , 温度 30~35℃, 搅拌转速 20r/min, 搅拌 1~2min, 可获得良好的絮凝效果。1000 l 中试结果, 除菌上清液低温等电点提取谷氨酸收率 83%, 谷氨酸纯度 91.3%, 谷氨酸总收率 80.26%。壳聚糖对谷氨酸发酵液和等电点母液中的菌体均有良好的絮凝作用。

**关键词** 壳聚糖, 絮凝, 谷氨酸发酵液, 提取

谷氨酸发酵液中含有 0.8%~1.2% 干菌体, 它是影响谷氨酸提取收率和谷氨酸质量的主要因素。从发酵液中除去菌体将大大提高谷氨酸收率和质量, 有利于味精制造, 同时可得到大量菌体蛋白<sup>[1]</sup>, 又能降低废液的 COD、BOD<sup>[2]</sup>。壳聚糖是天然高分子聚合物, 具有无毒、易被动物消化吸收, 对提高家禽(畜)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<sup>[3~5]</sup>。本研究用壳聚糖絮凝谷氨酸发酵中的菌体, 用离心分离法使絮体脱水取得很好的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 谷氨酸发酵液:** 含谷氨酸 80~85g/l, pH6.5~7.0, OD 1.30~1.35, 干菌体 8~12g/l, 由佛山调味食品公司提供。

**1.1.2 壳聚糖溶液:** 将壳聚糖用 1% 醋酸配制成 1% 溶液。壳聚糖由浙江某甲壳素厂提供。

**1.1.3 阳离子聚丙烯酰胺(pAMC):** 自制。

**1.1.4 淀粉-丙烯酰胺共聚物:** 广州化学所提供。其它材料为化学纯试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 絮体沉降速度( $V_{30}$ ):** 发酵液加入絮凝剂搅拌絮凝后, 倒入 100ml 量筒中, 30min 后记录絮体沉降的刻度。

**1.2.2 菌体去除率:** 分别吸 10ml 发酵液和絮凝上清液于离心管中, 以 3000r/min 离心 15min, 倒去上清液, 水洗沉淀物两次, 得菌体于滤纸上, 干燥后称重, 两者之差与前者之比为除菌率。

**1.2.3 发酵液光密度(OD):** 用 581-G 光电比色计测定波长 650nm 的光密度<sup>[6]</sup>。

**1.2.4 谷氨酸含量(GA):** 用微量呼吸仪检压法测定<sup>[6]</sup>。

**1.2.5 谷氨酸纯度:** 用旋光法测定<sup>[6]</sup>。

**1.2.6 絮体脱水:** (1) 台式离心机 1000r/min, 分离 15min; (2) 改造的三足式离心机连续分离。

**1.2.7 上清液等电点提取谷氨酸:** 将 1000l 发酵液絮凝后所得的上清液于等电点桶中, 在搅拌下加  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调 pH3.2, 降温至 5℃, 沉淀后,

分离谷氨酸。

## 2 结果

### 2.1 絮凝剂的选择和用法

由于发酵液中谷氨酸菌体细胞表面带负电荷,采用几种阳离子絮凝剂进行絮凝作用,比较其结果如表1所示:无机絮凝剂,如 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{CaO}$ 等单独作用,絮凝效果很差;高分子阳离子絮凝剂,如pAMC、壳聚糖的絮凝作用效果最好;淀粉-聚丙烯酰胺次之。

表1 几种絮凝剂对谷氨酸发酵液的絮凝效果

絮凝剂	pH	絮凝效果
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	6.0~9.0	效果很差
$\text{FeSO}_4$	8.0~11.0	局部絮凝,效果差
$\text{FeCl}_3$	5.0~11.0	局部絮凝,效果差
$\text{CaO}$	9.0~11.0	用量多,絮凝快,上层混浊
淀粉-pAMC	5.0~7.0	有絮凝作用,上层混浊
pAMC	5.0~6.5	絮凝快,絮体大,结实,沉淀快,上层清
壳聚糖	5.0~6.5	絮体细,沉淀较慢,上层液清

在一定条件下,采用不同絮凝剂配合使用可增进絮凝效果,以壳聚糖与pAMC配合效果最佳,但无机絮凝剂与壳聚糖配合效果不明显。

### 2.2 絮凝工艺条件正交试验

以影响絮凝效果的pH值、温度和壳聚糖用量为因素,各取三个水平,以 $V_{30}$ 和上清液OD为指标进行正交试验,结果如表2所示。

极差分析表明,pH5.5~6.5范围内对絮凝效果影响不大,但 $\text{pH} > 7.0$ 和 $\text{pH} < 5.0$ 时絮凝作用很差;絮凝剂用量影响最大,温度影响最小。

在正交试验基础上为获得最佳的絮凝条件,对各因素继续进一步的研究。

表2  $L_9(3^4)$ 正交实验

	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	剂量 ( $\text{mg/l}$ )	误差	$V_{30}$	OD
1	21	5.5	20	1	29	0.51
2	21	6.0	50	2	33	0.09
3	21	6.5	80	3	65	0.34
4	30	5.5	50	3	40	0.15
5	30	6.0	80	1	64	0.20
6	30	6.5	20	2	36	0.34
7	36	5.5	80	2	61	0.15
8	36	6.0	20	3	27	0.40
9	36	6.5	50	1	38	0.22
$V_{30}$	$\bar{K}_1$	42.3	43.3	30.7	$R_1 = 4.7$	
	$\bar{K}_2$	46.7	41.3	37	$R_2 = 5$	
	$\bar{K}_3$	42	46.3	63.3	$R_3 = 26.3$	
OD	$\bar{K}_1$	0.31	0.27	0.42	$R_1 = 0.08$	
	$\bar{K}_2$	0.23	0.23	0.15	$R_2 = 0.07$	
	$\bar{K}_3$	0.26	0.3	0.23	$R_3 = 0.27$	

### 2.3 pH及调节方式对絮凝作用的影响

溶液pH值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,二是影响絮凝剂胺基等基团的电离程度和絮凝剂分子链伸展程度。因此,最佳pH值应考虑几方面的效应。pH对絮凝效果的影响见图1。pH5.5时 $V_{30}$ 最小,pH值向两边变化, $V_{30}$ 均升高。在pH5.5~6.0之间,对 $V_{30}$ 影响不大;pH由5.0至6.0变化时,上清液OD值逐渐变小,pH6.0~6.5时OD基本无变化,但pH7.0以上时

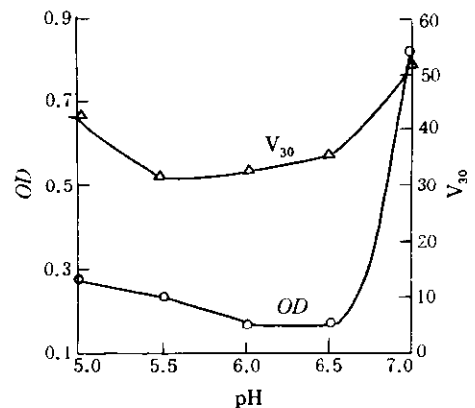


图1 pH对絮凝效果的影响

OD 升高很快。综合考虑以 pH6.0 为最佳。

以壳聚糖与 pAMC 配合使用,采用以下三种调节 pH 的方式:

- (1) 调节 pH, 加壳聚糖, 再加 pAMC;
- (2) 加壳聚糖, 调节 pH 值, 再加 pAMC;
- (3) 加壳聚糖, 加 pAMC, 调节 pH。

其絮凝效果以方式(1)最好(表 3)。

表 3 pH 调节方式对絮凝效果的影响

pH	OD		
	(1)	(2)	(3)
5.5	0.12	0.36	0.47
6.0	0.10	0.40	0.55
6.5	0.12	0.43	0.38

#### 2.4 絮凝剂用量对絮凝效果的影响

发酵液调节 pH6.0, 壳聚糖用量从  $10 \times 10^{-3} \text{g/l}$  增加至  $30 \times 10^{-3} \text{g/l}$  时, OD 下降很快,  $V_{30}$  逐渐增大; 由  $30 \times 10^{-3} \text{g/l}$  增至  $60 \times 10^{-3} \text{g/l}$  时, OD 值和  $V_{30}$  基本不变; 由  $60 \times 10^{-3} \text{g/l}$  增至  $120 \times 10^{-3} \text{g/l}$  时, OD 值略有升高而  $V_{30}$  迅速增大(图 2)。此结果与 Ruelieim 和 Ward 等提出的架桥理论<sup>[7]</sup>相吻合。

当 pAMC 与壳聚糖配合使用时, pAMC 用量适当时可增进絮凝效果, 但如用量过多, 因液体粘度增大反而对絮凝不利。当壳聚糖用量  $30 \times 10^{-3} \text{g/l}$ , pAMC 为  $20 \times 10^{-3} \text{g/l}$  时, 效果

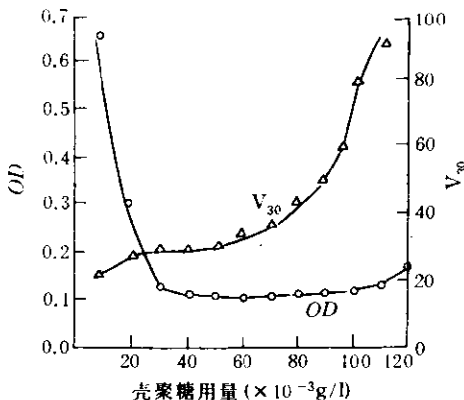


图 2 壳聚糖剂量对絮凝效果的影响

比单独使用壳聚糖时更好。

#### 2.5 温度对絮凝作用的影响

在 pH6.0, 壳聚糖用量  $30 \times 10^{-3} \text{g/l}$ , 温度在  $10 \sim 38^\circ\text{C}$  范围内均获得满意的絮凝效果。此温度正与发酵液温度一致。

#### 2.6 絮凝剂分子量对絮凝效果的影响

将六种不同粘度的壳聚糖配成 1% 溶液, 用旋转粘度计测定粘度。根据粘度与分子量的关系式:  $\eta = KM^2$  ( $\eta$  为粘度,  $M$  为分子量,  $K, \alpha$  为常数)。

以粘度作为反应分子量的参数, 在壳聚糖用量  $30 \times 10^{-3} \text{g/l}$ , pH6.0 时, 随壳聚糖分子量的增大, OD 和  $V_{30}$  均有下降, OD 下降幅度更大些(图 3)。因为壳聚糖分子大, 分子链长, 链上的胺基增多, 分子链上结合的细胞就多, 形成的絮体大, 故絮凝效果好。

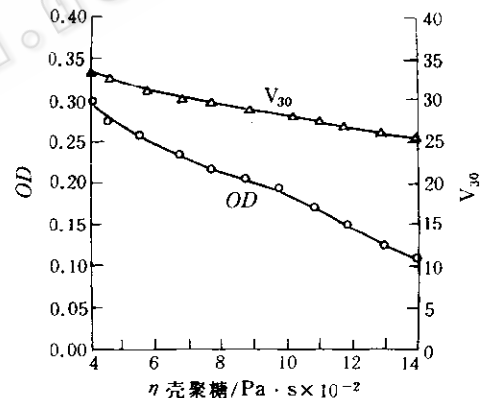


图 3 壳聚糖粘度对絮凝效果的影响

#### 2.7 搅拌对絮凝效果的影响

搅拌的作用是使絮凝剂快速均匀分散, 使絮体在形成过程中增大。搅拌太慢、时间过短, 絮凝剂不均匀分散, 不能完成絮凝作用。搅拌过快、时间过长, 又会将已形成的絮体打碎, 影响絮体沉淀。壳聚糖溶液粘度较小, 容易分散。试验结果表明, 以搅拌转速  $20 \sim 25 \text{r/min}$ , 搅拌  $1 \sim 2 \text{min}$  为好。

#### 2.8 絮体的脱水

发酵液 1000ml, 调 pH6.0, 加 1% 壳聚糖溶液, 搅拌絮凝, 静置 1h, 絮体浆液体积约为发酵液总体积的 20%~25%, 沉淀絮体浆液含干菌

体 40~60g/l, 其余为含谷氨酸的发酵液。这些发酵液必须回收, 否则造成很大浪费。絮体脱水的方法主要有过滤法和离心法。由于菌体絮体粘度大, 不易过滤, 即使添加大量助滤剂, 过滤也困难, 而且添加助滤剂影响菌体蛋白的

应用。本研究采用离心分离法脱水, 沉淀的絮体经离心脱水后, 获得平均含水 73.5% 左右的菌体泥, 菌泥体积为发酵液总体积的 4% 左右。谷氨酸平均收率 97.29% (表 4)。

表 4 发酵液絮凝及脱水试验结果

发酵液			1%壳聚糖量	絮凝上清液			沉淀物	离心清液			菌泥		菌体除率	GA收率
体积 (ml)	OD	GA (g/l)	(ml)	体积 (ml)	OD	GA (g/l)	(ml)	体积 (ml)	OD	GA (g/l)	体积 (ml)	含水 (%)	(%)	(%)
1000	1.28	82	3.5	803.5	0.095	83	200	160	0.09	83	40	72	96.2	97.5
1000	1.32	85	3.5	803.5	0.1	85.9	200	158	0.095	85.9	42	74	95.8	97.16
1000	1.30	83	3.5	805	0.12	83.8	198.5	158	0.1	83.8	40.5	73.5	97	97.2
1000	1.32	84	3.5	804	0.1	84.8	199.5	160	0.1	84.8	39.5	73.5	94	97.3
1000	1.3	83.5	3.5	804	0.104	84.38	199.5	159	0.1	84.38	40.5	73.25	95.75	97.29

## 2.9 1000 l 中间试验

在 1500 l 容器中装 1000 l 发酵液 (含谷氨酸 84.5g/l, OD 1.35), 调节 pH6.0, 加入  $35 \times 10^{-3}$ g/l 壳聚糖, 搅拌絮凝, 停搅拌沉淀 1h, 放出上清液, 沉淀絮体经离心分离, 得菌泥 36.5 l, 菌泥含水 72%, 离心清液合并于上清液中, 共得清液 967.5 l, 谷氨酸含量 84.8g/l, 谷氨酸收率 96.75%。

将 967.5 l 上清液按常规操作进行低温等电点提取谷氨酸, 得湿谷氨酸 74.28kg, 谷氨酸含量 91.3%, 等电点谷氨酸收率 83%, 谷氨酸总收率 80.26%。

## 3 讨论

a. 壳聚糖对谷氨酸发酵液中的菌体有良好的絮凝作用, 且用量少, 可单独使用, 不需加助凝剂, 壳聚糖不络合或絮凝谷氨酸, 是一种优良的絮凝剂。

b. 溶液 pH 值和壳聚糖用量是影响絮凝

效果的重要因素。pH5.5~6.5, 壳聚糖用量  $35 \times 10^{-3}$ g/l 可得良好絮凝效果。絮体沉淀 1h 后, 絮体体积约为总体积的 20%~25%, 上清液 OD 值达 0.1, 菌体去除率达 95%。

c. 壳聚糖絮凝发酵液菌体, 絮体松散, 不影响絮体脱水, 离心法脱水效果好。

d. 从发酵液中絮凝除菌可得到大量菌体蛋白, 同时提高了谷氨酸提取收率和谷氨酸纯度, 有利于下工序处理, 减少废液中的 COD 和 BOD, 具有很大的经济效益和社会效益。

## 参 考 文 献

- [1] 云逢霖, 杨志敏. 华南理工大学学报, 1993, 21(增刊): 20.
- [2] 吴水胜, 周秀琴, 刘道康. 轻工环保, 1994, 16(1): 1.
- [3] 段沛仁. 国外科技, 1987, 5: 25.
- [4] 张善贵, 郭燕君, 历夫守. 食品工业科技, 1992, 1: 39.
- [5] 严俊. 化学通报, 1984, 11: 26.
- [6] 于信令, 尤新, 王凤义, 等. 味精工业手册, 北京, 中国轻工业出版社, 1995, 575~587.
- [7] R. 艾克斯著, 潘才元译. 絮凝技术. 北京: 原子能出版社, 1981 年.