

甘蔗糖蜜发酵液分离提纯 L-赖氨酸的研究

刘 幸 林文奎 李啸萍*

(化工与生化工程系)

摘 要

本文主要研究赖氨酸发酵液的预处理,离子交换树脂提取,洗脱和脱色方面的工艺条件。甘蔗糖蜜发酵液经硫酸或盐酸酸化,离心沉降,澄清液在 pH1.5—2.0 上离子交换树脂柱,732NH₄⁺型树脂离子交换吸附量为 80—85 克/升树脂,洗脱回收率在 95% 以上。用活性炭脱色,所得精制品纯度达 98.5%,符合食品级标准。最后提出以 732 树脂提取,用氢氧化铵溶液洗脱为中心的赖氨酸提取过程的模式。

前 言

碳源直接发酵制取赖氨酸是当前赖氨酸工业生产的主要方法^[1]。用甘蔗糖蜜为碳源发酵生产赖氨酸时我国南方产甘蔗省区是有重要意义的课题^[2, 3]。赖氨酸发酵生产过程包括发酵产酸和产品提取精制两个步骤。糖蜜发酵现有水平可稳定在 5%。但分离精制收率较低,一般总收率仅 60% 左右。与国外先进水平(可达 85% 左右)比较差距尚远。因此,要增加赖氨酸的产量,设法提高分离精制收率是重要的一环。赖氨酸的分离精制包括发酵液的预处理,离子交换树脂提取,洗脱,脱色,浓缩和结晶几个步骤。本文主要研究甘蔗糖蜜发酵液的预处理,离子交换树脂提取,洗脱和脱色的工艺条件。

甘蔗糖蜜发酵液的预处理

北京棒杆菌抗 AEC 菌株 pI₂ 的甘蔗糖蜜发酵液一般除含有 5% 左右的主产物赖氨酸外,还含有许多其它杂质。如残糖、有机酸、色素、蛋白质、胶体和 NH₄⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Fe²⁺、Cl⁻、SO₄²⁻、PO₄³⁻ 等正负离子,以及菌体和其它固形物质,这些杂质的存在将造成分离提纯主产物的困难。因此,必须通过预处理除去主要杂质以提高赖氨酸的离子

* 参加实验工作的有陈惠端和蔡婀娜同志。

本文 1985 年 3 月 25 日收到。

交换提取率和改善物料的操作性能。预处理所加入的物质和所采取的措施必须以提高赖氨酸总回收率,提高产品纯度和有利于后继操作为目的。

为了除去发酵液中的杂质,可用加热杀灭菌体和酸化以沉淀蛋白质胶体。大多数蛋白质具有偏酸的等电点(pI 4.0—5.5)。在偏酸的范围能除去较多的蛋白质,且能使悬浮物更容易过滤或沉降,从而得到澄清度较高的液体^[4]。

加入某些离子使之与发酵液的无机离子生成溶解度较小的固体复合物可以除去发酵液中的无机物质。

添加草酸兼具酸化和沉淀钙离子的作用,同时还由于草酸钙沉淀的形成,固体新相所特有的活性表面能有效吸附大分子杂质,因此草酸是一种良好的酸化除杂剂。用硫酸或盐酸酸化,它们的盐类虽然溶解度比草酸钙大,但如不影响离子交换效果,其酸化作用和价格的低廉,对工业生产可能比用草酸更可取。

本文的预处理实验是采用加热凝固蛋白质,用草酸、盐酸和硫酸处理,离心沉降,然后比较杂质的除尽程度和离子交换树脂的吸附量。

一、主要实验器材

1. 赖氨酸发酵液

泉州第二制药厂5000升中试发酵罐生产线,以甘蔗糖蜜为碳源,北京微生物研究所北京棒杆菌抗AEC菌株 pI_3 发酵液。外观棕黑色。发酵终止时 pH 7—7.5,L-赖氨酸含量4—5%,残糖1—2%, OD 0.5—0.6,总糖转化率约25%。发酵终止通入蒸气加热至80℃杀灭菌体,并保持10分钟使部分蛋白质凝固沉降,取上清液作实验用。

2. 酸化剂

- ①草酸:CP级试剂;
- ②盐酸:CP级试剂;
- ③硫酸:CP级试剂。

3. 离心机

- ①常速离心机:LXJ-64-01型,北京医疗仪器修理厂产品,离心分离因数 $2000\times g$;
- ②高速离心机:VAC25型,东德VEB MLW离心机厂产品,离心分离因数 $20000\times g$ 。

二、实验方法

1. 草酸酸化

将草酸饱和溶液在搅拌情况下加入发酵液中,中和至预定 pH 值。放置半小时,离心分离除去沉淀物。测定沉淀物的重量、上清液 OD 值、赖氨酸、残糖、灰分、 CaO 、 MgO 含量,通过732 NH_4^+ 树脂柱,测定吸附和洗脱量。

2. 盐酸酸化

用6N盐酸溶液代替草酸溶液酸化发酵液,其余操作和测定项目同草酸酸化法。

3. 硫酸酸化

用6N硫酸溶液代替草酸溶液酸化发酵液,其余操作和测定项目同草酸酸化法。

三、结果和讨论

1. 用草酸、盐酸和硫酸酸化处理结果见表1。

表 1 发酵液酸化处理结果

项 目	沉 淀 物	上 清 液							
		CaO (%)		MgO (%)		灰 分 (%)		723 树脂吸附赖氨酸量 (克/升)	
		常速离心	高速离心	常速离心	高速离心	常速离心	高速离心	常速离心	高速离心
原发酵液	量 少	0.47*		0.30*		4.10	3.80	/	/
草酸酸化 (pH3.0)	量多, 较疏松	0	0	0.06	0.03	2.40	2.10	62.13	66.00
盐酸酸化 (pH2.0)	量多, 较结实	0.08—0.13	0	0.22—0.27	0.10	2.90	2.40	62.50	/
硫酸酸化 (pH2.0)	量多, 较结实	/	/	/	/	/	/	83.75 (83.15)**	/
硫酸酸化 (pH1.5)	量多, 较结实	/	/	/	/	/	/	88.50 (85.12)**	/

注: · 未离心分离; ** 括弧内数字为 $\phi 50$ 大柱实验结果, 实验方法见离子交换树脂提取部分。

2. 硫酸和盐酸酸化后树脂提取和洗脱结果见表 2。

表 2 酸化处理常速离心除去沉淀物后用 732 NH_4^+ 树脂提取和洗脱结果

处 理 用 酸	硫 酸	盐 酸	硫 酸	盐 酸
上柱发酵液 pH 值	1.5	1.5	2.0	2.0
732 NH_4^+ 树脂对赖氨酸吸附量(克/升树脂)	90.88	74.13	85.13	68.75
洗脱赖氨酸量(克/升树脂)	88.50	73.25	80.75	67.88
洗脱回收率(%)	97.38	98.81	94.85	98.73

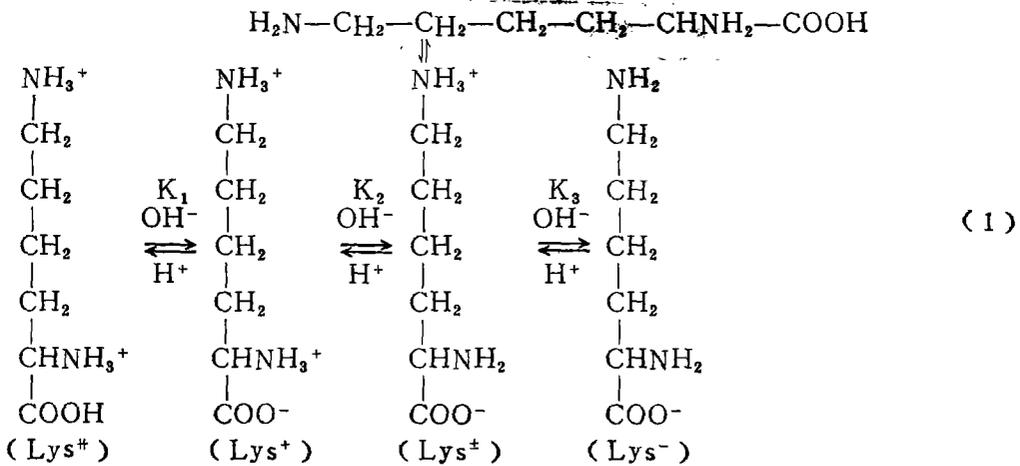
由表 1、2 可见:

- ①草酸酸化处理能除尽 Ca^{2+} , 盐酸酸化处理可除去大部分 Ca^{2+} 。
- ②草酸或盐酸酸化处理, 均不能除去 Mg^{2+} 。
- ③高速离心分离比低速离心分离沉降所得溶液澄清度较高, 但对树脂吸附量无显著影响。
- ④硫酸酸化离心澄清液的树脂吸附量比草酸或盐酸处理的吸附量都高。732 NH_4^+ 树脂 $\phi 50$ 大柱重复试验在 pH 1.5—2.0 时吸附量相近, 可达 80—85 克/升树脂。洗脱回收率在 95% 以上。

离子交换树脂提取和洗脱

用离子交换树脂法提取氨基酸, 具有工艺简单, 设备原材料易得, 操作方便, 产品质量较好等优点, 适合于工业生产使用。

赖氨酸分子有一个羧基和两个氨基, 是两性电解质, 属于碱性氨基酸。在水溶液中的离解方式取决于溶液的酸碱度。在不同 pH 值的水溶液中有如下的离解方式^[5, 6]。



由实验可知^[6]，在 25℃ 时三个极性基团的表现电离常数 K_1 、 K_2 、 K_3 和等电点 pI 分别为

$$\begin{aligned}
 K_1 &= \frac{[\text{H}^+][\text{LyS}^+]}{[\text{LyS}^*]} = 10^{-2.18}, \quad \therefore pK_1 = 2.18 \quad (\alpha\text{-COOH}) \\
 K_2 &= \frac{[\text{H}^+][\text{LyS}^\pm]}{[\text{LyS}^+]} = 10^{-8.95}, \quad \therefore pK_2 = 8.95 \quad (\alpha\text{-NH}_3^+) \\
 K_3 &= \frac{[\text{H}^+][\text{LyS}^-]}{[\text{LyS}^\pm]} = 10^{-10.53}, \quad \therefore pK_3 = 10.53 \quad (\varepsilon\text{-NH}_3^+) \\
 pI &= \frac{pK_2 + pK_3}{2} = \frac{8.95 + 10.53}{2} = 9.74
 \end{aligned}$$

上述四种型式的离子在溶液中根据 pH 值和各级极性基团的电离平衡常数按一定的比例存在。从赖氨酸的各级电离平衡常数可以求出不同 pH 时四种型式的赖氨酸离子的分布比率。

例如，由下列方法可计算 pH9.74 时的赖氨酸离子分布比率。

pH = 9.74 时的 $[\text{H}^+] = 10^{-9.74}$ ，由 K_1 得

$$[\text{Lys}^*] : [\text{Lys}^+] = \frac{[\text{H}^+]}{K_1} = \frac{10^{-9.74}}{10^{-2.18}} = 1 : 3.6308 \times 10^7$$

同理由 K_2 得

$$[\text{Lys}^+] : [\text{Lys}^\pm] = \frac{[\text{H}^+]}{K_2} = \frac{10^{-9.74}}{10^{-8.95}} = 1 : 6.1659$$

再由 K_3 得

$$[\text{Lys}^\pm] : [\text{Lys}^-] = \frac{[\text{H}^+]}{K_3} = \frac{10^{-9.74}}{10^{-10.53}} = 1 : 0.1622$$

因此，

$$\begin{aligned}
 &[\text{Lys}^*] : [\text{Lys}^+] : [\text{Lys}^\pm] : [\text{Lys}^-] \\
 &= 1 : 3.6308 \times 10^7 : 3.6308 \times 10^7 \times 6.1659 : 3.6308 \times 10^7 \times 6.1659 \times 0.1622 \\
 &= 1 : 3.6308 \times 10^7 : 2.2387 \times 10^8 : 3.6308 \times 10^7 \\
 &= 3.37 \times 10^{-7}\% : 12.24\% : 75.50\% : 12.24\%
 \end{aligned}$$

结果可见，当溶液 pH9.74 时赖氨酸偶极离子 (Lys^\pm) 占的比率最大，可达 75.50%

用同样的方法可以计算其它 pH 值时的离子分布比率，计算结果列于表 3，并以 pH 值对浓度标绘示于图 1。

表 3 在不同 pH 值中赖氨酸离子型式的分布比率

pH	离子型式分布 (%)			
	[Lys ⁺]	[Lys ⁺]	[Lys [±]]	[Lys ⁻]
1	93.80	6.19	6.95×10^{-8}	2.05×10^{-17}
2	60.21	39.78	4.46×10^{-6}	1.32×10^{-14}
2.18	49.99	49.99	8.49×10^{-6}	3.79×10^{-14}
3	13.15	86.85	9.75×10^{-5}	2.88×10^{-12}
4	1.49	98.51	1.11×10^{-3}	3.26×10^{-10}
5	1.51×10^{-1}	99.83	1.12×10^{-2}	3.31×10^{-8}
6	1.51×10^{-2}	99.87	1.12×10^{-1}	1.31×10^{-6}
7	1.50×10^{-3}	98.90	1.09	3.28×10^{-4}
8	1.36×10^{-4}	89.88	10.09	2.98×10^{-2}
8.95	8.38×10^{-6}	49.35	49.35	1.30
9	7.02×10^{-6}	46.40	52.06	1.54
10	9.75×10^{-8}	6.44	72.24	21.32
10.53	5.80×10^{-9}	1.30	49.35	49.35
11	3.41×10^{-10}	2.25×10^{-1}	25.25	74.52
12	4.42×10^{-13}	2.92×10^{-3}	3.28	96.71
13	4.56×10^{-16}	3.01×10^{-5}	3.38×10^{-2}	99.66
14	4.57×10^{-19}	3.02×10^{-7}	3.39×10^{-2}	99.97

随着溶液酸碱度的变化，赖氨酸以正负价数各异的离子型式存在。因此，只要选择适当的 pH 条件，既可使用阳离子交换树脂，也可以使用阴离子交换树脂进行提取。本文用 711、717、724、732 和 735 树脂在相应的 pH 条件下试验。然后用交换效率最好的 732 树脂对赖氨酸溶液和发酵液进行改变酸碱度、流速、树脂型式、加料方式等的试验。

一、主要实验器材

1. 赖氨酸试液：

①赖氨酸溶液：工业赖氨酸（饲料级，纯度>95%）配成4%的水溶液，用盐酸或氢氧化钠调 pH 值至所需酸碱度，测定赖氨酸含量，供试验用。

②甘蔗糖蜜发酵液：经过预处理的发酵液调 pH 至所需的酸碱度，测定赖氨酸含量所得液体供试验用。

2. 离子交换树脂：

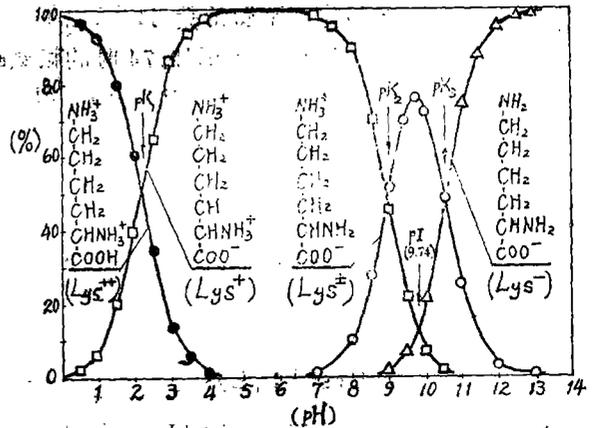


图 1 在不同 pH 值溶液中赖氨酸电离比率的变化

①711(201×4); ②717(201×7); ③724(101×1.28);

④732(1×7); ⑤735(1×2)。

其中 711、717 树脂经酸碱处理后转成氯型, 724、732 和 735 树脂转成铵型。测定含水量、视密度, 全交换容量装柱备用。

3. 洗脱剂:

724、732 和 735 赖氨酸饱和树脂用 2N NH_4OH 溶液为洗脱剂。711 和 717 赖氨酸饱和树脂用 2N HCl 溶液为洗脱剂。

4. 离子交换柱:

用硬质玻璃管加工制成, 小柱内径 $\phi 18$ 毫米, 总高 450 毫米, 树脂装量 80 毫升。大柱内径 $\phi 50$ 毫米, 装量 400 毫升。实验数据除注明者外均为用小柱测得。

5. 分部收集器。

二、实验方法

1. 离子交换树脂对赖氨酸的提取:

将试液加入树脂柱, 控制一定空间流速, 收集交换流出液, 加料完毕, 水洗至流出液不含赖氨酸, 合并交换流出液和水洗液, 测定赖氨酸含量。计算赖氨酸的加入、流出、吸附量和交换率。

2. 赖氨酸的洗脱:

将洗脱剂加入经过水洗的赖氨酸饱和树脂柱进行洗脱。控制一定流速, 收集洗脱流出液, 混合均匀测定含酸量, 计算赖氨酸的洗脱量和洗脱回收率。

三、结果和讨论

1. 不同树脂对赖氨酸的提取和洗脱:

①树脂性能: 所用离子交换树脂的性能测定结果见表 4。

②不同树脂对赖氨酸溶液的提取和洗脱结果见表 5。

表 4 树脂性能

树脂名称	711	717	724	732	735
全交换容量(毫克当量/克干树脂)	/	0.18	9.61	4.55	1.49
含水量(%)	60.7	72.4	54.5	51.1	43.7
视密度(克/毫升)	0.609	0.625	0.571	0.725	0.726

注: 表中数据为实测值, 其余性能详见文献 [4] 488—9 页。

表 5 不同树脂对赖氨酸溶液的交换和洗脱结果

树脂名称	711	717	724	732	735
上柱液 pH 值	11.12	11.12	5.60	4.01	3.05
溶液中的主要离子型式	Lys^- , Lys^\pm	Lys^- , Lys^\pm	Lys^+	Lys^+	Lys^+ , Lys^\pm
树脂吸附量(克/升)	13.63	10.50	166.38	260.00	55.00
洗脱量(克/升)	13.00	9.63	120.38	235.50	52.63
洗脱回收率(%)	95.38	91.67	72.35	90.58	95.68

注: 交换和洗脱的加料方式为正向流动, 交换流速 0.5, 洗脱流速 0.25 毫升/毫升-小时。

实验结果(表4)表明五种树脂的全交换容量大小顺序为724>732>735>717。但从表5可见,它们对赖氨酸吸附量大小的顺序为732>724>735>711>717树脂。对提取用的树脂要求有较大的交换能力。732树脂交换能力最大,且属于强酸性聚苯乙烯树脂,价格低廉,来源容易,机械强度较好,较能适合于工业生产使用,故以下各项实验均采用732树脂进行。

2. 流速对交换和洗脱的影响:

732 NH_4^+ 树脂在不同流速下对赖氨酸的吸附和洗脱结果见表6。

表6 流速对732 NH_4^+ 树脂吸附赖氨酸的影响

体积流速(毫升/毫升-小时)	0.3	0.5	0.9	1.2	1.5	2.0
赖氨酸吸附量(克/升树脂)	175.88	183.75	183.75	182.63	180.50	178.25
赖氨酸交换率(%)	83.75	87.50	87.50	86.90	85.95	84.88
赖氨酸洗脱量(克/升树脂)	138.75	136.88	135.00	145.00	139.00	145.00
洗脱回收率(%)	78.89	74.49	73.47	79.40	77.01	81.35

注:上柱液赖氨酸含量4.20%,体积400毫升/柱,pH 4.5,正向上柱。洗脱液250毫升/柱,流速0.25。

从表6可见,体积流速在0.3—2.0范围内对交换和洗脱率没有明显的影响,说明在小柱的条件下这一流速范围足以达到交换平衡。工业用的交换柱一般为矮胖型,体积流速一定,线速度与径高比成反比。在中试放大时应根据设备结构加以考虑。

3. 加料方式对交换和洗脱的影响:

正反加料与732 NH_4^+ 树脂对赖氨酸的交换和洗脱结果见表7。

表7 加料方式对732 NH_4^+ 树脂吸附与洗脱的影响

加料方式	正向吸附正向洗脱 (自上而下流动)	反向吸附反向洗脱 (自上而下流动)
赖氨酸吸附量(克/升树脂)	260.00	189.75
赖氨酸洗脱量(克/升树脂)	235.50	118.25
洗脱回收率(%)	90.58	62.32

注:上柱赖氨酸溶液pH 4.0,含量4.01%,加料量1000毫升/柱,吸附流速0.5,洗脱剂用量250毫升/柱,洗脱流速0.25毫升/毫升-小时。

实验结果(表7)表明,正向加料具有较高的吸附量和洗脱率。

4. 732不同型树脂对发酵液中赖氨酸的交换和洗脱的影响结果见表8。

表8数据表明732 H^+ 、 Na^+ 和 NH_4^+ 型树脂对发酵液中赖氨酸的吸附和洗脱效果无显著差别,而以 NH_4^+ 型最佳。

表8 三种型式的732树脂对赖氨酸吸附与洗脱的影响

树脂型式	732H ⁺ 型	732Na ⁺ 型	732NH ₄ ⁺ 型
赖氨酸吸附量(克/升树脂)	131.17	133.50	136.83
赖氨酸洗脱量(克/升树脂)	128.67	126.50	135.17
洗脱回收率(%)	98.09	94.76	98.78

注：上柱发酵液 pH 2.18，含赖氨酸 2.85%，体积 500 毫升/柱，吸附流速 1.0，洗脱剂用量 250 毫升/柱，洗脱流速 0.5 毫升/毫升-小时。

结 论

一、发酵液的预处理

用硫酸酸化和常速离心沉降处理发酵液，上清液供离子交换树脂法提取，是较好的预处理方法。在 pH 1.5—2.0 的吸附量可达 80—85 克/升树脂。与日本（考察资料）生产数据 pH 1.5—1.6 吸附量 65—110 克/升树脂相比，居于中等水平。洗脱回收率在 95% 以上。

二、离子交换树脂提取

1. 732 树脂是目前用于提取赖氨酸的较好的国产树脂。724 弱酸树脂也有较大的吸附能力(表 5)。并不是“弱酸树脂几乎对所有氨基酸均不吸附”^[8]。而是由于生成的弱酸(树脂)弱碱(赖氨酸)盐在洗涤时发生水解，使洗脱回收率降低(72.35%)。且 724 树脂在酸碱处理和转型时发生较大的体积变化，不利于生产操作，故 724 树脂不适用赖氨酸的工业生产。

2. 阴离子交换树脂对赖氨酸的交换量低(表 5)，树脂的耐久性也差，且成本高，来源困难，故不能采用碱性树脂提取。

3. 在赖氨酸的离子交换法提取和洗脱方法中，正向加料的效率高(表 7)。与“正上柱有较大的交换能力”^[8]的结论一致。

4. 732 树脂在酸性范围内不同 pH 时对赖氨酸的交换量与溶液中的杂质有关。对于从发酵液中提取，在赖氨酸主要呈正二价离子的 pH 值 (<2.0) 条件下，赖氨酸离子与可电离杂质的竞争有较大的优势，吸附量多，^[8]有利于提取。但在生产上，pH 过低时须虑设备管道的腐蚀问题，工业生产应选择在 pH 2 左右。

5. 732 H⁺、Na⁺和 NH₄⁺型树脂对发酵液中的赖氨酸具有相似的交换和洗脱性能(表 8)。其中以 NH₄⁺型树脂为最好。

三、从糖蜜发酵液中提取赖氨酸的过程

可用图 2 的模式表示。

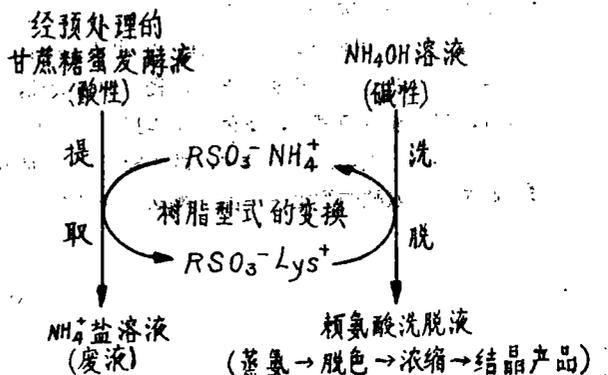


图 2 732 树脂提取赖氨酸的过程

经过预处理的甘蔗糖蜜发酵液,用732NH₄型树脂柱提取,2N NH₄OH溶液洗脱,收集 pH 9—12 的洗脱液分。⑩交换吸附后树脂转换成赖氨酸型,洗脱完毕恢复成铵型,不需再生处理便可直接再用于新发酵液的提取。这样反复循环使用,柱内树脂每一生产周期只发生一次型式的转换,有利于节省酸碱和延长树脂的使用寿命。洗脱液中过剩的 NH₄OH 可以通过减压蒸发除去,避免加入其它无机离子对结晶产生干扰,有利产品质量的提高。用粉状活性炭脱色,⑦浓缩结晶所得精制品符合食品级要求。

主要分析方法

1. 赖氨酸含量 茚三酮比色法^⑩;
2. pH 值 酸度计法;
3. OD 值 比色法;
4. 灰分含量 灼烧重量法;
5. CaO 含量 EDTA 法;
6. MgO 含量 EDTA 法;
7. 离子交换树脂总交换容量:
 - ①724、732、735 树脂 静态法 酸碱滴定,
 - ②711、717 树脂 动态法 氯型硫酸钠置换,硝酸银滴定;
8. 离子交换树脂水分 烘干重量法。

参 考 文 献

- [1] Yoshio Hirose et. al., Amino acid Fermentation, Biotechnology and Bioengineering, 20, 4 (1980), 897.
- [2] 林文鑾等, 福建甘蔗糖蜜生物合成 L-赖氨酸的研究, 华侨大学学报, 3, 1 (1982), 52—59.
- [3] 刘幸等, 赖氨酸的提取精制, 华侨大学学报, 4, 2 (1983), 37—41.
- [4] 华东化工学院等, 抗生素生产工艺学, 化学工业出版社, (1983), 194—6.
- [5] (英) J. G. 莫里斯著, 王嶽等译, 生物学工作者的物理化学, 科学出版社, (1981) 167.
- [6] 天津轻工业学院等, 氨基酸工艺学, 轻工业出版社, (1983) 447—51.
- [7] 刘幸等, 赖氨酸脱色试验, 华侨大学学报, 5, 1 (1985) 122—7.
- [8] 微生物工程编写组, 离子交换法, 微生物工程(下册), 上海科学技术出版社, (1982), 256—7.
- [9] 蔡武城等, 赖氨酸的测定——茚三酮法, 生物物质常用化学分析法, 科学出版社, (1982) 68—70.

Research on Separation and Purification of L-Lysine from Cane Molasses Broth

Liu Xing Lin Wenluan Li Xiaoping

Abstract

In this paper we research mainly on the technological condition of pretreatment of lysine broth, extraction of lysine with ion exchange resin, elution and decolourisation. The cane molasses broth is acidified with sulphuric acid or hydrochloric acid. Centrifugalisation and the clarifying liquor passes through the column of ion exchanger at pH 1.5—2.0; the ion exchange adsorptive power is 80—85 g/l. resin and the yield of elution is above 95%. Decolourised with active carbon, the refined L-lysine is 98.5% pure which accord with the demands of the food grade. And finally we propose the model of sorption extraction process of lysine, which centres around the extraction with 732 NH_4^+ resin and elution with ammonium hydroxide solution.