

从发酵液中分离提取核黄素

章克昌 吴佩琮 陆文清

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 核黄素的溶解度受溶液的 pH 值影响较大,在碱性条件下核黄素的溶解度较大,而在偏酸性溶液中溶解度较小。实验中分析了温度、pH 值、作用时间和避光条件等因素对核黄素分解损失的影响,在此基础上设计了碱溶法提取核黄素的新工艺,并用核黄素的发酵液进行了试验,获得了较好的效果。与传统的酸溶法提取工艺相比,不仅提高了收得率,能耗也大大降低。

关键词 核黄素;分离;发酵;提取

分类号 Q563.2

0 前 言

成熟的核黄素发酵液中菌体蛋白的含量很高,溶液的粘度很大,核黄素主要以针状晶体形式存在,它们大部分分散在发酵液中,与菌丝体和大分子胶体混杂在一起,小部分存在于菌丝体内,给分离精制带来了较大困难。常温下,在中性和偏酸性溶液中,核黄素的溶解度很低,通常不超过250 mg/L,在高温80~90 和 pH 值为1.0~1.1条件下,核黄素的溶解度较大,可以达到5 000~6 000 mg/L。但随着发酵液中核黄素浓度的不断提高,核黄素的溶解分离也变得越来越困难。

核黄素的提取方法主要有重金属盐沉淀法^[1]、Morehouse 法^[2]和酸溶法等。目前工业生产中大多采用酸溶法。酸溶法提取核黄素的能耗较大,经一次溶解、分离、结晶获得的产品其纯度只有60%~70%,要获得高纯度的成品晶体必须经过多次溶解、分离和结晶操作,所以提取总收率往往不高。

在碱性溶液中,核黄素有较大的溶解度,但在碱性条件下核黄素容易发生不可逆变性反应,从而造成损失。研究影响核黄素变性的因素,控制合适的溶解条件,使核黄素的变性损失降到尽可能低的程度,对于建立核黄素提取新工艺,提高收得率和降低能耗,具有积极的指导意义。

1 器材与方法

1.1 材料

核黄素发酵液 作者自制;

NaOH, H₂SO₄, 冰醋酸 均为分析纯。

收稿日期:1997-09-25

第一作者:章克昌,男,1935年10月生,教授

1.2 设备

酸度计 上海天达仪器有限公司制;
电光分析天平 上海医疗器械厂制;
冷冻超速离心机 日本日立公司制。

1.3 方法

核黄素浓度测定: 分光光度法^[3]。
pH 值测定: 以酸度计测。

2 结果与讨论

2.1 pH 值与核黄素溶解度的关系

用 NaOH 调节核黄素溶液呈不同的 pH 值, 在25 条件下测得核黄素溶解度与 pH 值对应关系, 见表1。

表1 pH 值与核黄素溶解度的关系												mg/ L	
pH 值	1. 32	2. 7	3. 38	5. 50	6. 68	8. 32	10. 32	10.53	10. 96	11. 26	11. 48	12. 20	12. 22
溶解度	187. 8	91. 4	87. 8	84. 2	95. 5	97. 4	305. 9	413. 2	3853	5953	10209	17716	20658

pH 对核黄素溶解度的影响极大, 特别是在 pH 值达到11.0以后, pH 值只要很小的变化, 核黄素的溶解度就会产生很大的波动。调节溶液的 pH 值在11.3~12.2的范围内, 核黄素的溶解度处在5 000~20 000 mg/L 之间, 该质量浓度范围已覆盖目前发酵生产核黄素的最高质量浓度, 而且溶解时间极短, 一般不超过5 min。

2.2 碱性条件下核黄素的稳定性分析

核黄素在碱性条件下具有较大的溶解度, 这一特性为提取分离核黄素提供了较大方便, 但是在碱性条件下核黄素的稳定性较差, 如果控制不好容易发生分解反应, 造成损失。

影响核黄素稳定性的因素主要有: 避光条件、溶液的温度、溶液的 pH 值和核黄素在溶液中的作用时间和核黄素的浓度等。大量实验已证实, 避光是防止核黄素分解的必要条件。在工业生产中避光分离提取核黄素比较容易实现。

2.2.1 温度对核黄素稳定性的影响 调节核黄素发酵液(核黄素质量浓度4 031 mg/L)的 pH 值至11.4, 避光放置30 min, 测定在不同温度下核黄素的分解量, 结果见图1。温度对核黄素稳定性的影响是相当显著的, 为了减少核黄素的分解损失, 在高 pH 值条件下溶解分离核黄素必须低温操作。

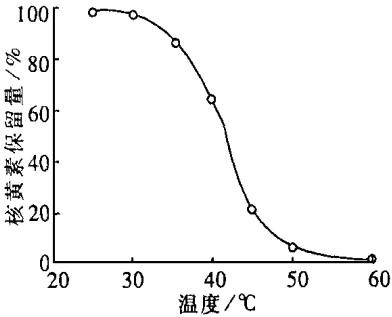


图1 温度对核黄素稳定性的影响

2.2.2 溶液的 pH 值和作用时间对核黄素稳定性的影响 调节核黄素发酵液(核黄素质量浓度502 mg/L)的 pH 值分别为11.4, 12.6和13.0。测定在不同作用时间下核黄素的保留量, 结果见图2。pH 值越高, 作用时间越长, 核黄素的分解损失越大, 所以分离提取核黄素的时间应尽可能短。

2.2.3 核黄素的初始质量浓度与核黄素相对损失的关系 配制不同质量浓度的核黄素溶

液, 分别测定在不同作用时间下的分解损失, 结果见图3.

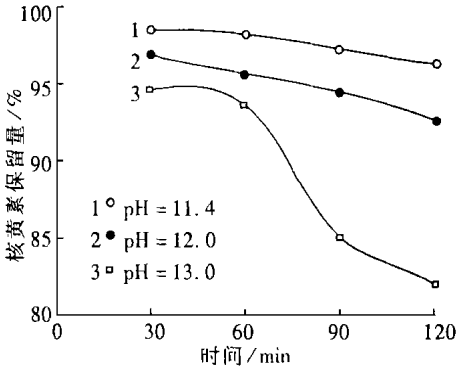


图2 不同 pH 值和作用时间对核黄素稳定性的影响

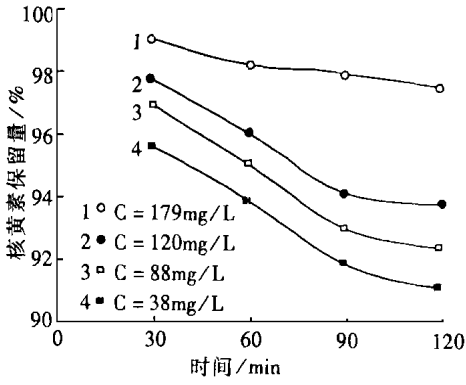


图3 不同质量浓度的核黄素溶液在不同时间下的分解

核黄素的初始质量浓度越高, 核黄素的相对损失越小。对于普通的核黄素发酵液(核黄素质量浓度 5 000 mg/L 左右), 调节 pH 值为 11.4, 25℃ 避光放置 1 h, 核黄素的相对损失一般不超过 3%, 这种损失相对于目前的酸溶法是较低的。

2.3 碱溶法分离提取核黄素的工艺流程

根据碱性条件下核黄素的溶解性与稳定性之间的实验结果, 采用碱性条件常温溶解分离提取核黄素可以获得良好的效果, 提取流程见图4.

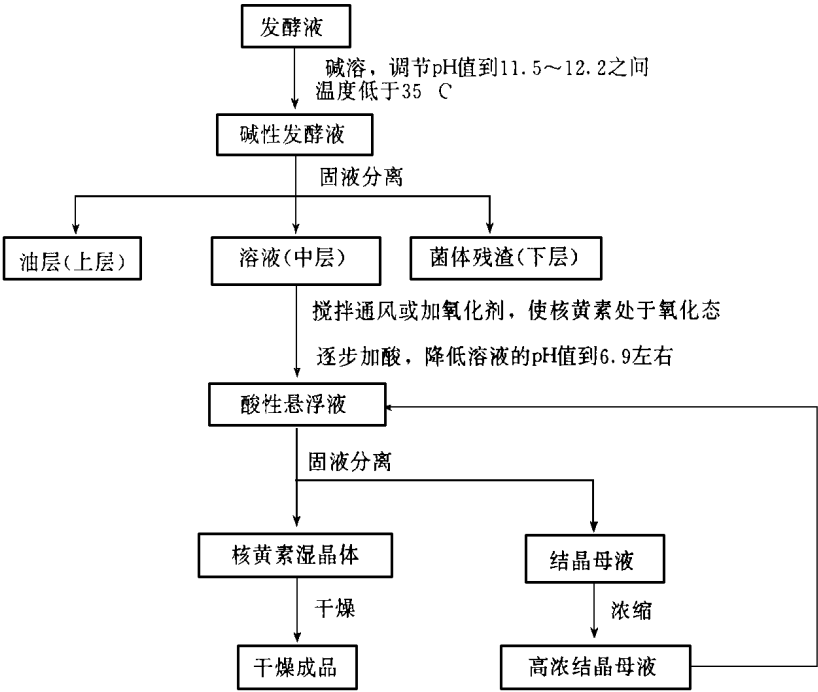


图4 碱溶法分离提取核黄素的工艺流程

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net
以摇瓶发酵液(核黄素质量浓度 6 250 mg/L)为原料, 应用碱溶法分离提取核黄素, 离

心分离因数 $Fr = 8\ 000$, 经二次分离结晶, 总收率为79.8%, 成品纯度为92.6%.

2.4 影响成品核黄素纯度的因素分析

影响成品核黄素纯度的因素很多, 采用的提取工艺不同, 影响的因素自然也不一样, 即使提取工艺相同, 但选用的生产设备不同, 其最终产品的纯度也会产生较大的差异。

采用碱溶法提取核黄素时, 第一步的固液分离是关键, 对最终成品核黄素的纯度具有决定性的影响。如果这一步分离效果不好, 最终的成品纯度必然也差^[4]。

在加碱溶解核黄素时, 菌体细胞很容易被破碎, 细胞内的胶体大分子释放到溶液中, 导致溶液粘度大幅度上升, 采用普通的板框过滤进行固液分离时过滤速度很慢, 滤孔极易阻塞^[4]。由实验可知, 在碱性条件下, 核黄素的稳定性较差, 必须避光操作, 分离时间应尽可能短, 所以第一步的固液分离采用普通的板框过滤是不合适的。

离心分离虽然能耗较大, 但可以获得较好的分离效果。实验中用超速离心机, 测定在不同分离因数条件下, 分离时间对成品核黄素纯度的影响, 结果见图5。

分离因数 Fr 对成品核黄素的影响较大, 延长分离时间可以提高成品纯度, 但提高分离因数 Fr 的效果更好。

操作方法对最终的结果也有较大影响, 合适的操作方法也是获得高纯度成品核黄素的必要前提。实验表明, 在加碱溶解核黄素和加酸结晶核黄素过程中必须注意以下几点:

1) 加碱溶解核黄素时应充分搅拌, 避免局部 pH 值过高;

2) 在溶液中加入适量的氧化剂(如 H_2O_2 等), 使核黄素处于氧化态, 有利于核黄素的稳定, 比较方便的方法是通入经适当过滤的干净空气, 使溶液中的氧含量保持在 5×10^{-6} 左右, 即可满足要求^[4];

3) 加酸回调 pH 值时应适当搅拌, 避免局部过酸, 但也不能激烈搅动, 以免破坏晶型^[5];

4) 加酸速度宜慢不宜快, 否则容易形成细小的粉末结晶。当溶液中有少量核黄素结晶析出时, 搅拌速度应适当放慢, 并加入适量的高纯度核黄素晶体作为晶种, 随着核黄素晶体的不断析出, 加酸速度和搅拌速度还应进一步放慢^[5]。

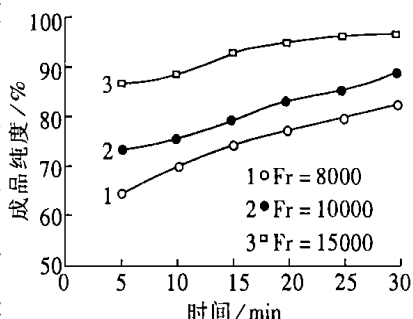


图5 不同分离因数条件下离心分离时间对成品核黄素纯度的影响

3 结 论

碱溶法提取核黄素不仅收得率高, 而且能耗低。在碱性溶液中核黄素的溶解度很大。在温度低于30℃, 避光和 pH 值 ≤ 13.0 的条件下, 存放30 min, 发酵液中的核黄素由于分解造成的损失不会超过3.0%。调节发酵液的 pH 在11.8~13.0之间, 可以充分溶解其中的核黄素, 经离心可以较方便地除去发酵液中的菌体和其他杂质。离心获得的上清液回调到偏酸性 (pH 值在3.0~5.0之间) 后, 核黄素溶解度大幅度下降(约200 mg/L), 晶体大量析出。以质量浓度为6 400 mg/L 的核黄素发酵液为原料, 用碱溶法, 经二次分离结晶, 最终获得的成品纯度达到92.6%, 总收得率接近80%。随着离心分离设备的不断改进, 碱溶法分离提取核黄素的优越性将越来越明显。

参 考 文 献

- 1 褚志义主编. 生物合成药物学. 上海: 上海医科大学出版社, 1991. 175 ~ 182
- 2 Alpha L. More house, Riboflavin recovery from fermentation broth. U S Patent 2 822 361. 1958-02-04
- 3 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 1995. 818 ~ 819
- 4 Gyure Dale C, Landerdale George W. Process for recovery of crystalline riboflavin from solutions. 世界专利. W091, 01, 320. 1991-02-07
- 5 阎灼辉. 核黄素提取技术的研究: [学士学位论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1994

Separation and Extraction Riboflavin from its Fermentation Broth

Zhang Kechang Wu Peicong Lu Wenqing

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract The solubility of riboflavin was greatly influenced by pH. The solubility of riboflavin has quite low in acidic solution while that has high in alkaline solution. The stability of riboflavin was deeply affected by the factors such as temperature, pH, time and lighting. Based on the results of experiments which analyzed the above factors, a new method for recovering riboflavin by alkaline solubilization separation was developed. This method was verified by actual fermentation broth and satisfactory results were obtained. Compared with traditional acidic solubilization separation process, not only the ratio of recovery was increased, but also the energy lost was reduced considerably with the method.

Key words riboflavin; separation process; fermentation; extraction

(责任编辑: 秦和平)