

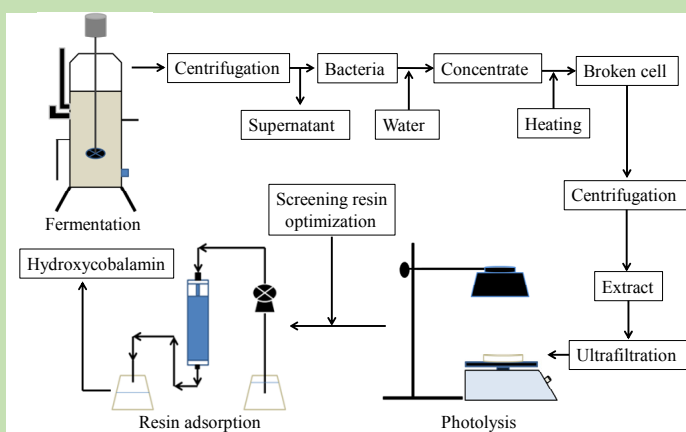
## Extraction of hydroxycobalamin with the method of macroporous resin adsorption

Jun YANG<sup>1,2</sup>, Ziqiang WANG<sup>2</sup>, Yunshan WANG<sup>2\*</sup>, Wanzhong ZHANG<sup>1</sup>, Zhiguo SU<sup>2</sup>

1. College of Pharmaceutial and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142, China

2. National Key Laboratory Biochemistry Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

**Abstract:** *Propionibacterium freudenreichii* is regarded as a GRAS (generally recognized as safe) strain, and has been successfully applied to industrial anaerobic production of deoxyadenosylcobalamin, known as the natural structure of vitamin B<sub>12</sub>. Generally, due to the unstable of deoxyadenosylcobalamin, it needs to be converted to cyanocobalamin by cyanidation during the subsequent extraction and purification steps. Hydroxycobalamin is another form of vitamin B<sub>12</sub> and widely used in the treatment of neurological



diseases and cyanide poisoning. For the industrial production of hydroxycobalamin, cyanocobalamin is usually used as the raw material and then deacylated to form hydroxycobalamin. According to this principle, the production of hydroxycobalamin involves multiple chemical reactions, including cyanidation and deacylation, along with the high cost, environmental pollution, and hazardous conditions to the operators. To avoid these disadvantages, the photolysis production of hydroxycobalamin directly from deoxyadenosylcobalamin was proposed. In this work, the adsorption and extraction of hydroxycobalamin in the deoxyadenosylcobalamin photolysis solution were studied. The adsorption properties of 8 kinds of different macroporous resins on hydroxycobalamin were compared, and the effects of pH and ethanol concentration on hydroxycobalamin adsorption and desorption were discussed. The loading and elution velocity were optimized to improve the hydroxycobalamin yield. The results showed that LX-50B macroporous resin had the best adsorption performance for hydroxycobalamin in the static adsorption process. The adsorption capacity of LX-50B macroporous resin reached 203.87 mg/g at pH 6.0. For hydroxycobalamin eluent, 60% ethanol solution with pH 2.0 was the best choice. The optimal loading velocity and elution velocity were 2 and 0.5 BV (bed volume)/h, respectively. Under the above conditions, the concentration of hydroxycobalamin in the elution was 1863.32 mg/L, improved by 35 times compared with the original photolysis solution, while the purity of hydroxycobalamin increased from 0.38% to 15.73%, with an acceptable extraction yield of 92.46%, which achieved to a good extraction and preliminary purification result.

**Key words:** deoxyadenosylcobalamin; hydroxycobalamin; macroporous resin; extraction

收稿: 2018-11-06, 修回: 2018-12-25, 网络发表: 2019-01-18; Received: 2018-11-06, Revised: 2018-12-25, Published online: 2019-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 21506227)

作者简介: 杨军(1994-), 男, 安徽省合肥市人, 硕士研究生, 主要从事维生素 B<sub>12</sub> 的发酵生产与提取研究, Tel: 18654129318, E-mail: jyang777@sina.com; 王云山, 通讯联系人, Tel: 13911616634, E-mail: yswang@ipe.ac.cn.

**引用格式:** 杨军, 王自强, 王云山, 等. 大孔树脂吸附法提取羟基钴胺素. 过程工程学报, 2019, 19(4): 728-734.

Yang J, Wang Z Q, Wang Y S, et al. Extraction of hydroxycobalamin with the method of macroporous resin adsorption (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2019, 19(4): 728-734, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.218311.

# 大孔树脂吸附法提取羟基钴胺素

杨军<sup>1,2</sup>, 王自强<sup>2</sup>, 王云山<sup>2\*</sup>, 张万忠<sup>1</sup>, 苏志国<sup>2</sup>

1. 沈阳化工大学制药与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

**摘要:** 比较了8种大孔树脂对费氏丙酸杆菌发酵提取液光解转化后形成的羟基钴胺素的吸附性能, 考察了上柱料液 pH 值对吸附量的影响, 分析了不同浓度和 pH 下乙醇溶液作为洗脱剂的解吸情况, 研究了上柱速率对吸附量和解吸率的影响。结果表明, 静态实验中, LX-50B 型大孔树脂对羟基钴胺素的吸附性能最好, 当上柱溶液 pH 为 6 时, LX-50B 树脂饱和吸附量最高, 为 203.87 mg/g。用 pH 为 2 的 60%乙醇溶液作洗脱剂时解吸效果最好, 羟基钴胺素提取液以 2 BV(床柱体积)/h 速度上柱吸附饱和, 用 60%乙醇溶液以 0.5 BV/h 速度洗脱后, 羟基钴胺素浓度提高至 1863.32 mg/L, 为原提取液浓度的 35 倍, 纯度由 0.38% 提升至 15.73%, 提取纯化效果良好。

**关键词:** 脱氧腺苷钴胺素; 羟基钴胺素; 大孔树脂; 提取

中图分类号: O647.3

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2019)04-0728-07

## 1 前言

羟基钴胺素(Hydroxycobalamin)和脱氧腺苷钴胺素(Deoxyadenosylcobalamin, Ado-Cbl)是维生素 B<sub>12</sub> 的两种不同存在形式, 在医药领域主要用于恶性贫血症<sup>[1]</sup>和神经系统类疾病<sup>[2]</sup>的治疗, 其中羟基钴胺素还可用于治疗氰化物中毒<sup>[3]</sup>, 目前也有研究显示维生素 B<sub>12</sub> 与叶酸合用对治疗阿尔茨海默症有积极作用<sup>[4,5]</sup>。维生素 B<sub>12</sub> 的生物合成比自然界中大多数小分子合成更复杂<sup>[6]</sup>, 自然界中存在的许多维生素 B<sub>12</sub> 类似物在人体内没有活性, 以巨大芽孢杆菌为例, 其厌氧发酵产物为一种假维生素 B<sub>12</sub>, 即维生素 B<sub>12</sub> 的无活性形式<sup>[7,8]</sup>。目前利用微生物发酵生产维生素 B<sub>12</sub> 的工艺已十分成熟。近年来, 通过转基因技术用大肠杆菌作为基因工程菌生产维生素 B<sub>12</sub> 的研究也取得了实质性进展<sup>[9]</sup>, 但厌氧发酵的费氏丙酸杆菌仍是目前工业生产中普遍使用的菌种<sup>[10]</sup>, 其在生长过程中不产生内毒素和外毒素<sup>[11]</sup>, 被美国 FDA 列为安全菌种<sup>[12]</sup>。由于其主要产物脱氧腺苷钴胺素结构中的 5'-脱氧核糖中的-CH<sub>2</sub> 直接与 Co 连接形成 Co-C 键, 而烷基中存在的强烈斥电子作用使该有机金属键易断裂, 导致脱氧腺苷钴胺素性质极不稳定<sup>[13]</sup>, 光照后易分解为羟基钴胺素和腺苷<sup>[14,15]</sup>。传统工艺用氰化物将脱氧腺苷钴胺素原结构中的 5'-脱氧核糖取代为氰基<sup>[16]</sup>, 制成性质稳定的氰钴胺素(Cyanocobalamin)<sup>[17]</sup>, 再经化学脱氰处理后生产羟基钴胺素, 此法不仅工艺繁琐, 且由于需要使用剧毒氰化物, 易污染环境, 对工作人员也有安全隐患。

利用脱氧腺苷钴胺素受光照易分解形成羟基钴胺素这一性质, 张玉明等<sup>[18,19]</sup>首次将脱氧腺苷钴胺素通过

光解转化为相对稳定的羟基钴胺素, 并验证了光解转化过程中二者为等摩尔浓度转化, 但该研究仅用于费氏丙酸杆菌发酵液中维生素 B<sub>12</sub> 有效含量的测定, 未用于羟基钴胺素制备和提取纯化。本课题组前期对脱氧腺苷钴胺素光解转化羟基钴胺素过程的研究结果表明, 将费氏丙酸杆菌发酵液浓缩 4 倍后破碎细胞, 调节提取液 pH 值至 8, 并用较高光照强度的紫外灯照射提取液, 脱氧腺苷钴胺素光解转化速率明显提高, 且羟基钴胺素收率最大。但由于浓缩后的费氏丙酸杆菌提取液中可溶性杂质较多, 提高提取液中羟基钴胺素纯度是迫切需要解决的问题。

传统工艺中常用氯仿等有机溶剂<sup>[20]</sup>或苯酚水溶液等<sup>[21,22]</sup>萃取维生素 B<sub>12</sub> 类物质, 但操作繁琐, 需用大量化学试剂, 已不能满足当今对工业生产日益严格的环保要求。而大孔树脂吸附法具有操作流程简便、易洗脱、结构性质稳定、可再生使用等优点, 更适合工业生产, 已广泛应用于多种生物发酵物质的分离提取。本工作将费氏丙酸杆菌发酵液中的脱氧腺苷钴胺素光解转化为羟基钴胺素, 对 8 种大孔吸附树脂进行了筛选评价实验, 寻找吸附量大、吸附选择性强、易洗脱的树脂, 考察了静态和动态吸附及解吸条件, 建立了利用大孔树脂吸附纯化费氏丙酸杆菌发酵提取液中羟基钴胺素的基本工艺, 为羟基钴胺素的绿色生产奠定基础。

## 2 实验

### 2.1 材料

#### 2.1.1 菌种和培养基

费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*) CICC 10019 菌株, 购于中国工业微生物保藏中心。

斜面培养基: 葡萄糖 20 g/L, 玉米浆粉 10 g/L, 硫酸铵 2 g/L, 用氨水调节 pH 至 6.8~7.0 后加入  $\text{CaCO}_3$  2 g/L, 琼脂 20 g/L, 115℃ 灭菌 20 min。

种子培养基: 葡萄糖 35 g/L, 玉米浆粉 21 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g/L,  $\text{CoCl}_2$  0.005 g/L, 用氨水调节 pH 至 6.8~7.0, 121℃ 灭菌 30 min。

发酵培养基: 葡萄糖 60 g/L, 玉米浆粉 41 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4.6 g/L,  $\text{CoCl}_2$  0.0127 g/L, 用氨水调节 pH 至 6.8~7.0, 121℃ 灭菌 30 min, 葡萄糖单独于 115℃ 灭菌 20 min。

### 2.1.2 试剂

羟基钴胺素(Hydroxycobalamin)和脱氧腺苷钴胺素(Deoxyadenosylcobalamin)(河北华荣制药有限公司), 玉米浆干粉(临沂斯凯尔生物技术有限公司), 葡萄糖、氨水、乙酸、硫酸铵、磷酸二氢钾、氯化钴、碳酸钙、氢氧化钠、盐酸、乙醇和醋酸钠均为分析纯(北京化学试剂公司), 乙腈为色谱纯(美国 Fisher Scientific 公司)。

### 2.1.3 大孔树脂

HZ830(上海华震科技有限公司), CAD45 和 CAD40(安徽三星树脂科技有限公司), LX-20, LX-50B 和 LX-412(西安蓝晓科技有限公司), LSD-1 和 LSD-2(河北利江生物科技有限公司)。

### 2.1.4 实验仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪(HPLC, 日本岛津公司), Hypersil GOLD  $\text{C}_{18}$  色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm×250 mm, 北京迪马科技有限公司), HYG-A 型电热恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司), Himac CR22G 型大容量高速离心机(日本 HITACHI 公司), 六联 10 L 全自动搅拌式发酵罐(北京艾吾丁医药科技有限公司), PL203 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), Delta 320 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司), FE 411 型蠕动泵(德国 B.Braun 公司), 层析柱(瑞典 Pharmacia 公司), 175 W 紫外高压汞灯(上海元缘有限公司)。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 维生素 $\text{B}_{12}$ 检测方法

用 HPLC 检测维生素  $\text{B}_{12}$  的有效浓度, 色谱条件: Hypersil GOLD  $\text{C}_{18}$  色谱柱, 检测波长 254 nm, 流动相 I 为 pH=3.5 的乙酸钠缓冲溶液, 流动相 II 为乙腈, 流速 1 mL/min, 柱温 25℃, 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。洗脱条件: 10% 乙腈恒速洗脱 0~5 min, 10%~30% 乙腈梯度洗脱 5~25 min。

### 2.2.2 费氏丙酸杆菌发酵与羟基钴胺素提取液的制备

取甘油管保存的菌种进行平板划线活化, 将活化后的斜面种子接种于摇瓶培养基中, 30℃ 下静置培养 48

h, 按 10% 接种量转接于 5 L 发酵罐中, 于 30℃、转速 50 r/min 下搅拌厌氧培养 132 h。发酵过程中用浓氨水调节 pH 值至 6.8~7.0, 当葡萄糖浓度降至 10 g/L 时补糖至 20 g/L。发酵至 84 h 时添加 5'-二甲基苯并咪唑(Dimethylbenzimidazole, DMB)诱导菌体内积累脱氧腺苷钴胺素。

将费氏丙酸杆菌发酵液于 6000 r/min 转速下离心 30 min, 收集菌体, 用去离子水洗涤 1 次, 加入去离子水重悬使菌体浓度为原发酵液的 4 倍, 将菌悬液于 95℃ 下水浴加热 30 min, 使细胞破碎释放脱氧腺苷钴胺素, 10000 r/min 转速下高速离心 10 min, 收集上清液并调节 pH 至 8, 置于 8000 Lux 光照强度的紫外灯下光解, 使发酵提取液中脱氧腺苷钴胺素完全光解转化为羟基钴胺素, 收集提取液于 4℃ 保存。

### 2.2.3 大孔树脂预处理

用去离子水充分浸泡树脂, 反复洗涤至洗出液澄清, 用 95% 乙醇溶液浸泡 24 h 除去树脂中可溶性杂质, 用乙醇充分淋洗至洗出液澄清, 用水反复洗涤至无乙醇气味。树脂经乙醇清洗后用酸碱处理: 加入 1 mol/L NaOH 浸泡 6 h, 用 3 mL/min NaOH 通过树脂层, 用纯水洗至 pH 近中性, 加入 1 mol/L HCl 浸泡 6 h, 用 3 mL/min HCl 冲洗树脂, 再用去离子水洗至 pH 近中性。

### 2.2.4 静态吸附实验

取 0.5 g 预处理的湿树脂, 吸去表面多余水分, 放入 50 mL 三角瓶中, 加入 5 g/L 的羟基钴胺素纯品溶液 30 mL, 将瓶口密封后放入 25℃ 的恒温摇床中, 调整转速为 100 r/min, 24 h 后检测树脂吸附量。

将 1 g/L 脱氧腺苷钴胺素纯品溶液于紫外灯下完全光解, 取 0.5 g 处理好的湿树脂放入 50 mL 三角瓶中, 加入 30 mL 脱氧腺苷钴胺素光解液, 将瓶口密封后放入温度 25℃、转速 100 r/min 的恒温培养箱中, 用 HPLC 检测并比较吸附前后光解液中物质浓度的变化, 考察树脂对光解液中杂质的吸附情况。

将 5 g/L 羟基钴胺素纯品溶液分别调节 pH 至 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 和 9, 分别取 30 mL 放入装有 0.5 g 湿树脂的 50 mL 三角瓶中, 将瓶口密封后放入温度 25℃、转速 100 r/min 的恒温培养箱中, 24 h 后测定吸附量并比较。

### 2.2.5 静态解吸实验

取吸附羟基钴胺素饱和的树脂, 用水洗涤 1 次, 吸干表面多余水分, 置于 50 mL 三角瓶中, 加入不同 pH 的 50% 乙醇作洗脱剂, 将瓶口密封后放入温度 25℃、转速 100 r/min 的恒温箱中, 24 h 后测定解吸率并比较。

取吸附羟基钴胺素饱和的树脂, 分别加入不同浓度(20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 和 90%)的乙醇作

洗脱剂,于相同条件下放置 24 h 后测定解吸率并比较。

### 2.2.6 羟基钴胺素的动态吸附与解吸

取 10 g 预处理的湿树脂,采用湿法装柱,尽量避免夹带气泡,树脂柱床体积(BV)为 10 mL,以 1 g/L 羟基钴胺素纯品溶液(调节 pH 为 6)上柱,通过调节蠕动泵控制上柱速率,用 HPLC 检测流出液中羟基钴胺素浓度,与上柱前浓度相等时树脂吸附饱和,记录饱和时过柱体积并计算动态饱和和吸附量,比较上柱速率对树脂吸附量的影响。动态饱和和吸附量计算公式:

$$Q=(C_0-C)V/m \quad (1)$$

式中,  $Q$  为树脂动态饱和吸附量(mg/g),  $C_0$  为上柱前样品中羟基钴胺素浓度(mg/L),  $C$  为饱和吸附时过柱流出液中残留的羟基钴胺素浓度(mg/L),  $V$  为过柱样品体积(L),  $m$  为树脂装柱质量(g)。

将吸附饱和的树脂用去离子水过柱洗净,60%乙醇(调节 pH 为 2)作洗脱剂,调节蠕动泵控制洗脱速率,用 HPLC 检测洗脱液中羟基钴胺素浓度,当流出的洗脱液中不含羟基钴胺素时,认为解吸完全。解吸率计算如下:

$$\eta=[C_1V_1/(Qm)]\times 100\% \quad (2)$$

式中,  $\eta$  为解吸率(%),  $C_1$  为解吸完全时洗脱液中羟基钴胺素浓度(mg/L),  $V_1$  为解吸完全时洗脱液总体积(L)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 费氏丙酸杆菌发酵培养与羟基钴胺素提取液制备

费氏丙酸杆菌在厌氧发酵过程中无需通气,为使发酵液中营养物质与菌体细胞充分混合,可将发酵罐搅拌速率设为 50 r/min<sup>[23]</sup>,发酵过程中参数变化如图 1 所示。可以看出,发酵至 72 h 时,发酵液中葡萄糖浓度降至 9 g/L。补加高浓度葡萄糖使残糖浓度回升至 20 g/L,以维

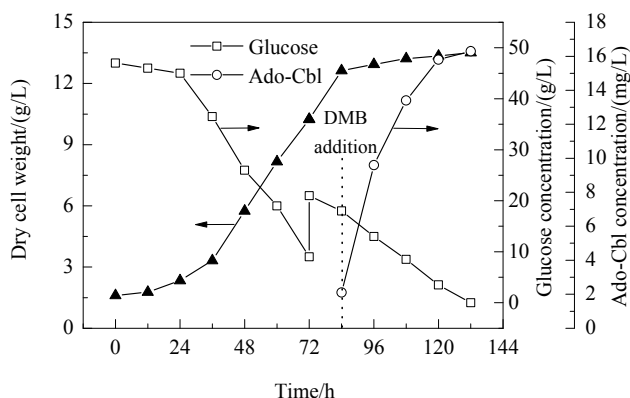


图1 费氏丙酸杆菌厌氧发酵过程中参数的变化  
Fig.1 Variation of anaerobic fermentation parameters of *Propionibacterium freudenreichii*

持菌体细胞生长所需碳源。发酵至 84 h 时,菌体内代谢中间体脱氧腺苷咕琳醇酰胺积累至最大量,加入 DMB 开始诱导菌体内合成脱氧腺苷钴胺素(Ado-Cbl),此时细胞干重为 12.63 g/L。发酵至 132 h 时,发酵液中脱氧腺苷钴胺素积累量达最大,发酵结束。此时用 HPLC 检测发酵液中脱氧腺苷钴胺素浓度为 16.29 mg/L,最终细胞干重为 13.51 g/L。

脱氧腺苷钴胺素是费氏丙酸杆菌的胞内产物<sup>[24]</sup>。将菌体细胞离心后用纯水重悬,使重悬后的菌悬液菌体浓度为原发酵液的 4 倍,采用水浴加热法使胞内的脱氧腺苷钴胺素释放出来,10000 r/min 转速下离心后得到脱氧腺苷钴胺素提取液。调节 pH 至 8,将其置于 8000 Lux 光照强度的紫外灯下光解,直至完全转化成羟基钴胺素。提取液光解前后的 HPLC 谱如图 2 所示。可以看出,经光解转化后,脱氧腺苷钴胺素的峰消失,表明完全转化成了羟基钴胺素。提取液中羟基钴胺素浓度为 53.74 mg/L,换算后与提取液中脱氧腺苷钴胺素的摩尔浓度相同。可见,脱氧腺苷钴胺素可完全光解转化为羟基钴胺素,该过程中维生素 B<sub>12</sub> 成分不损失。

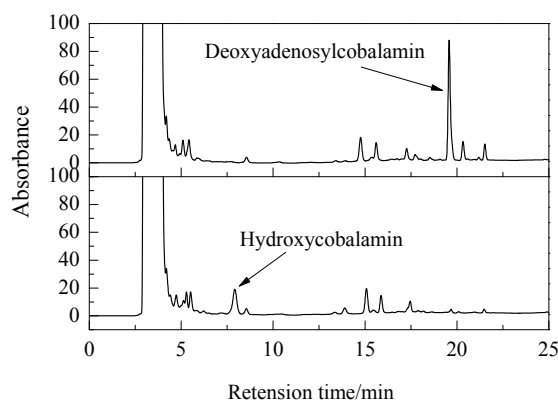


图2 费氏丙酸杆菌发酵提取液中脱氧腺苷钴胺素光解产物的高效液相色谱

Fig.2 HPLC chromatogram of the photolysis products of deoxyadenosylcobalamin in *Propionibacterium freudenreichii* fermentation extract

### 3.2 树脂筛选

#### 3.2.1 大孔树脂对羟基钴胺素纯品的静态吸附性能

分析了 8 种不同大孔树脂对羟基钴胺素纯品的静态吸附过程,可知 8 种树脂均在 24 h 内达吸附饱和,其饱和吸附量如图 3 所示。可以看出,相同条件下,不同大孔树脂吸附性能不同,其中 CAD45 的饱和吸附量最高,达 205.36 mg/g,其次为 LX-50B,饱和吸附量为 197.34 mg/g,因此选择 CAD45 和 LX-50B 进行后续实验。

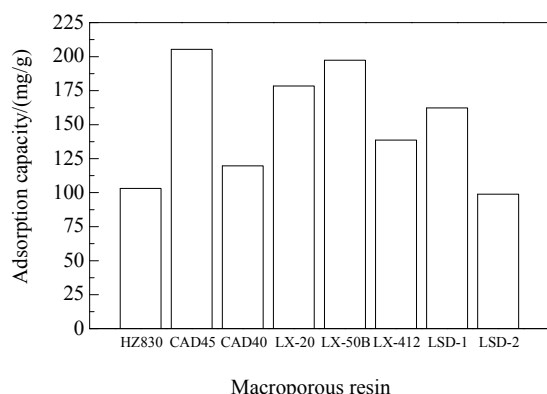


图3 大孔树脂对羟基钴胺素纯品的吸附性能

Fig.3 Adsorption capacity of macroporous resin on hydroxycobalamin

### 3.2.2 大孔树脂对脱氧腺苷钴胺素光解液中羟基钴胺素的吸附性能

将脱氧腺苷钴胺素纯品水溶液置于 8000 Lux 强度的紫外灯下,使其完全光解转化为羟基钴胺素,比较 CAD45 和 LX-50B 两种大孔树脂对脱氧腺苷钴胺素光解液中羟基钴胺素的吸附性能,结果如图 4 所示。可以看出,脱氧腺苷钴胺素经光照后完全光解,产物有羟基钴胺素和腺苷,杂质 1 可能为腺苷分子结构中的核糖结合了 1 个氧原子<sup>[25]</sup>,LX-50B 只吸附了光解液中的羟基钴胺素,腺苷和杂质 1 的峰面积无明显变化。经 CAD45 树脂吸附后,羟基钴胺素峰和杂质 1 的峰完全消失且腺苷峰面积无明显变化,表明 CAD45 不仅吸附羟基钴胺素,也能吸附杂质 1,因此选择 LX-50B 作为提取羟基钴胺素的树脂。

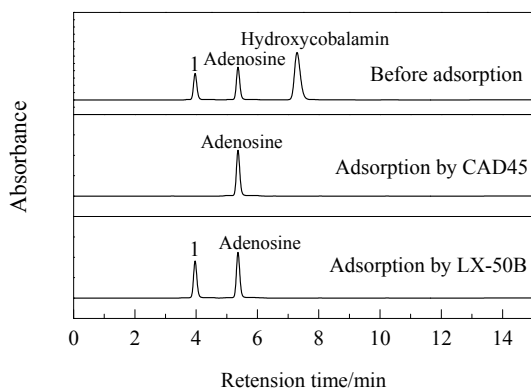


图4 大孔树脂对脱氧腺苷钴胺素纯品光解液中羟基钴胺素的吸附性能

Fig.4 Adsorption properties of CAD45 and LX-50B macroporous resins on hydroxycobalamin in deoxyadenosylcobalamin photolysis solution

### 3.3 pH 值对大孔树脂吸附量的影响

上柱溶液 pH 值会影响大孔树脂的吸附能力,pH 过

低(<2)或过高(>9)钴胺素易分解导致活性丧失<sup>[26,27]</sup>,因此考察了 pH=2~9 条件下,LX-50B 大孔树脂对样品溶液中羟基钴胺素的饱和吸附量,结果如图 5 所示。可以看出,pH=2~6 时,LX-50B 对羟基钴胺素的饱和吸附量随 pH 升高而增大,且 pH=6 时饱和吸附量最高,达 203.87 mg/g;pH=6~9 时饱和吸附量略下降。因此 pH=6.0 为上柱溶液最适 pH。

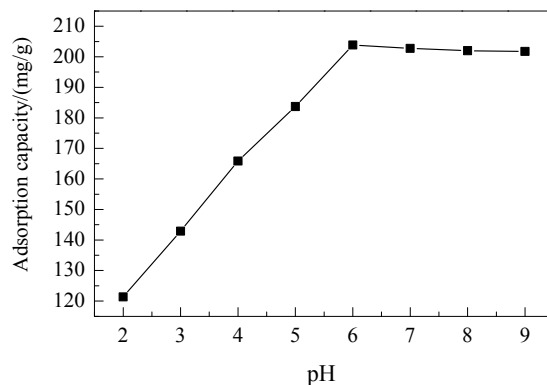


图5 不同 pH 值下 LX-50B 大孔树脂对羟基钴胺素的吸附量

Fig.5 Adsorption capacity of LX-50B macroporous resin on hydroxycobalamin with different pH values

### 3.4 洗脱剂 pH 值对解吸率的影响

乙醇是大孔树脂解吸过程中常用的洗脱剂,与甲醇等其它有机溶剂相比,乙醇更安全。以不同 pH 值的 50% 乙醇溶液作洗脱液,分别加入吸附羟基钴胺素饱和的 LX-50B 树脂,比较解吸率,结果如图 6 所示。可以看出,pH=2 时,50%乙醇溶液解吸率最大,且随 pH 值增大,解吸率迅速下降。这是由于在酸性环境下羟基钴胺素分子在溶液中易发生质子化,带正电荷的分子与树脂的结合能力在浓度较高的  $H^+$  作用下减弱,使羟基钴胺素更易与大孔树脂分离,此时乙醇溶液洗脱率良好。

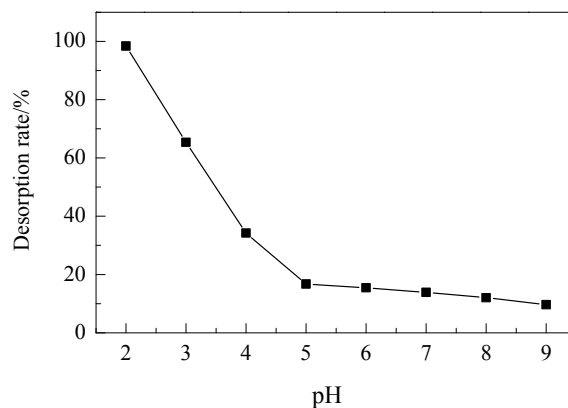


图6 不同 pH 下洗脱剂对羟基钴胺素的解吸效果

Fig.6 Desorption rate of eluent on hydroxycobalamin with different pH values

### 3.5 洗脱剂浓度对解吸率的影响

配制 pH 为 2 的不同浓度的乙醇溶液, 加入吸附羟基钴胺素饱和的 LX-50B 大孔树脂, 考察洗脱剂的解吸能力, 结果如图 7 所示。可以看出, 随乙醇浓度增加, 解吸率逐渐增加, 乙醇浓度为 60% 时解吸率最大, 为 98.45%。

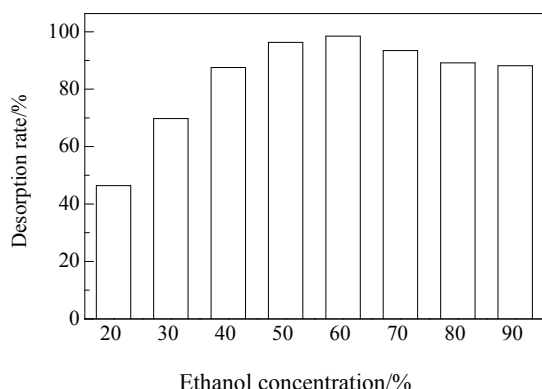


图 7 乙醇浓度对羟基钴胺素解吸率的影响

Fig.7 Desorption rate with different ethanol concentrations

### 3.6 流速对吸附量和解吸率的影响

将羟基钴胺素纯品溶液 pH 调至 6, 比较不同上柱速率对树脂饱和吸附量的影响, 结果见表 1。可以看出, 随上柱速率增加, 饱和吸附量下降。这是由于流速过高可能会导致料液无法与大孔树脂表面充分接触, 进而影响树脂的最大吸附量, 但上柱速率过低会增加吸附时间, 所以选择不高于 2 BV/h 的上柱流速进行吸附。

表 1 上柱速率对吸附量的影响

Table 1 Effect of loading velocity on adsorption capacity				
Flow rate/(BV/h)	1	2	3	4
Adsorption capacity/(mg/g)	211.32	208.56	199.14	189.07

调节 60%乙醇溶液 pH 值至 2, 以不同洗脱速率过柱, 比较解吸率, 结果见表 2。可以看出, 随洗脱液流速增加, 洗脱率下降, 这是因为洗脱速率过高影响洗脱剂与吸附在树脂上的羟基钴胺素的交换速率, 使吸附在树脂表面的羟基钴胺素不能完全溶解于乙醇溶液中。结合实际操作效率, 控制洗脱速率低于 1 BV/h。

表 2 洗脱速率对解吸率的影响

Table 2 Effect of elution velocity on desorption rate				
Flow rate/(BV/h)	0.5	1	1.5	2
Desorption rate/%	98.03	97.56	96.13	94.09

### 3.7 LX-50B 树脂吸附发酵提取液中的羟基钴胺素

调节羟基钴胺素提取液 pH 至 6, 以 2 BV/h 流速上柱, LX-50B 树脂自上而下吸附料液, 收集层析柱的流出液, 至流出液中羟基钴胺素浓度与提取液中浓度相同时, 树脂吸附饱和, 此时共吸附羟基钴胺素 76.94 mg,

饱和吸附量为 7.69 mg/g。与吸附羟基钴胺素纯品溶液相比, 饱和吸附量明显降低, 这是由于发酵提取液中含大量杂质和蛋白, 阻碍了羟基钴胺素与树脂表面接触, 导致吸附量下降。

将吸附羟基钴胺素饱和的大孔树脂用去离子水过柱洗去杂质, 以 60%乙醇(pH=2)作洗脱剂, 以 0.5 BV/h 上柱速率对大孔树脂洗脱。洗脱量为 0.5 BV 时, 羟基钴胺素开始被洗脱下来; 洗脱量接近 3.5 BV 时, 几乎完全洗脱; 洗脱量为 4 BV 时, HPLC 检测流出液中无羟基钴胺素, 此时洗脱结束, 洗脱率为 96.88%, HPLC 谱显示羟基钴胺素峰形完整无拖尾。

费氏丙酸杆菌发酵提取液经 LX-50B 大孔树脂一次提取后, 羟基钴胺素浓度由原来的 53.74 mg/L 提高至 1863.32 mg/L, 纯度由 0.38% 提升至 15.73%, 且料液体积浓缩了 22.5 倍, 羟基钴胺素提取率为 92.46%, 达到了良好的提取效果和初步纯化。与传统萃取法相比, 大孔树脂吸附法可避免萃取后溶液中大量杂蛋白无法去除, 且整个过程溶剂用量较少, 优势明显。

## 4 结论

将费氏丙酸杆菌发酵提取液中脱氧腺苷钴胺素通过光解转化为羟基钴胺素, 用大孔树脂吸附, 比较了 8 种大孔树脂对羟基钴胺素的吸附性能, 考察了上柱料液 pH 值对吸附量的影响, 分析了不同浓度和 pH 值的乙醇溶液作洗脱剂的解吸情况, 研究了上柱速率对吸附量和解析率的影响, 得到以下结论:

(1) 用 LX-50B 大孔树脂吸附羟基钴胺素, 调节上柱溶液 pH 至 6, 静态饱和吸附量达 203.87 mg/g。

(2) 60%乙醇作洗脱剂时, pH=2 时解吸效果最好。

(3) 将费氏丙酸杆菌发酵提取液光解后, 调节 pH 至 6, 以 2 BV(床柱体积)/h 速率上柱使树脂吸附饱和, 饱和吸附量为 7.69 mg/g。用 60%乙醇溶液(pH=2)以 0.5 BV/h 速率洗脱, 解吸率为 96.88%。

(4) 浓度为 53.74 mg/L 的羟基钴胺素提取液经 LX-50B 大孔树脂一次提取后, 洗脱液中羟基钴胺素浓度达 1863.32 mg/L, 纯度由 0.38% 提高至 15.73%。

### 参考文献

- [1] Raux E, Schubert H L, Waren M J. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>): a bacterial conundrum [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000, 57(4): 1880-1893.
- [2] 吕颖坚, 黄俊明. 维生素 B<sub>12</sub> 的研究进展 [J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(4): 394-399.  
Lv Y J, Huang J M. Progress on the studies of vitamin B<sub>12</sub> [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2012, 24(4): 394-399.
- [3] Zakharov S, Vaneckova M, Seidl Z, et al. Successful use of hydroxycobalamin and sodium thiosulfate in acute cyanide poisoning: a case report with follow-up [J]. Basic & Clinical

- Pharmacology & Toxicology, 2015, 117(3): 209–212.
- [4] 汪周兵, 张碧丹, 郭云霞, 等. 同型半胱氨酸、叶酸、维生素 B<sub>12</sub> 与阿尔茨海默病精神行为症状的相关性 [J]. 中国健康心理学杂志, 2019, 27(1): 4–6.
- Wang Z B, Zhang B D, Guo Y X, et al. Correlation between homocysteine, folic acid, vitamin B<sub>12</sub> and psychotic symptoms of Alzheimer's disease [J]. China Journal of Health Psychology, 2019, 27(1): 4–6.
- [5] 王冀芳. 叶酸和维生素 B<sub>12</sub> 联合治疗对血管性痴呆伴 H 型高血压患者血浆 Hcy 及炎症因子水平和血管壁内皮功能的影响效果分析 [J]. 当代医学, 2018, 24(31): 71–73.
- Wang J F. Effect of folic acid combined with vitamin B<sub>12</sub> on plasma Hcy and inflammatory factor levels and endothelial function of vascular wall in patients with vascular dementia and H-type hypertension [J]. Contemporary Medicine, 2018, 24(31): 71–73.
- [6] Fang H, Kang J, Zhang D. Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>: a review and future perspectives [J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 15–28.
- [7] Moore S J, Lawrence A D, Biedendieck R, et al. Elucidation of the anaerobic pathway for the corrin component of cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 110(37): 14906–14911.
- [8] Mohammed Y, Lee B, Kang Z, et al. Capability of *Lactobacillus reuteri* to produce an active form of vitamin B<sub>12</sub> under optimized fermentation conditions [J]. Journal of Artificial Intelligence Research, 2014, 2(11): 617–621.
- [9] Ko Y, Ashok S, Ainala S K, et al. Coenzyme B<sub>12</sub> can be produced by engineered *Escherichia coli* under both anaerobic and aerobic conditions [J]. Biotechnology Journal, 2015, 9(12): 1526–1535.
- [10] Martens J H, Barg H, Warren M J, et al. Microbial production of vitamin B<sub>12</sub> [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(2): 275–285.
- [11] 徐国霞, 杜崑, 王自强, 等. 细胞膜分离费氏丙酸杆菌离位转化合成维生素 B<sub>12</sub> [J]. 过程工程学报, 2016, 16(2): 298–302.
- Xu G X, Du W, Wang Z Q, et al. Separation of propionibacterium freudenreichii cells with membranes and ex-situ transformation of vitamin B<sub>12</sub> [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2016, 16(2): 298–302.
- [12] Salminen S, Wright A, Morelli L, et al. Demonstration of safety of probiotics [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 44(1): 93–106.
- [13] Hodgkin D C, Kamper J, Mackag M, et al. Structure of vitamin B<sub>12</sub> [J]. Nature, 1956, 17(18): 64–66.
- [14] Allwyn G C, Laurie M Y, Joseph J S. Time-resolved spectroscopic studies of B<sub>12</sub> coenzymes: a comparison of the primary photolysis mechanism in methyl-, ethyl-, n-propyl, and 5'-deoxyadenosylcobalamin [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 124(3): 434–441.
- [15] Eefe C, Mark R C. Nanosecond transient absorption spectroscopy of coenzyme B<sub>12</sub> [J]. The Journal of Inorganic Chemistry, 1990, 265(22): 12987–12994.
- [16] Feng X H, Li L G. A study on the stability of cobamamide products and tablet dosage [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 1997, 18(5): 249–250.
- [17] 罗祎, 郝常明. 维生素 B<sub>12</sub> 的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2002, 4(3): 15–18.
- Luo Y, Hao C M. Research advance in vitamin B<sub>12</sub> and its application [J]. China Food Additives, 2002, 4(3): 15–18.
- [18] 张玉明, 王雷, 王云山, 等. 一种简便、快速测定发酵液中 VB<sub>12</sub> 含量的方法 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 123–125.
- Zhang Y M, Wang L, Wang Y S, et al. A simple and rapid method to determine vitamin B<sub>12</sub> in fermentation broth [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(1): 123–125.
- [19] 王雷, 张玉明, 王云山, 等. 维生素 B<sub>12</sub> 的光解研究及发酵液中维生素 B<sub>12</sub> 检测新方法的建立 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(4): 81–85.
- Wang L, Zhang Y M, Wang Y S, et al. Study on photolysis of vitamin B<sub>12</sub> and new method to determine the contents of vitamin B<sub>12</sub> in fermentation broth [J]. China Biotechnology, 2006, 26(4): 81–85.
- [20] 资生堂株式会社. 维生素 B<sub>12</sub> 的纯化方法: JP1016597A [P]. 1989–01–20.
- Shiseido Company Limited. Method for purifying vitamin B<sub>12</sub>: JP1016597A [P]. 1989–01–20.
- [21] Brink N G, Wolf P J. Benzyl alcohol–water countercurrent distribution extraction of vitamin B<sub>12</sub>: US2307717A [P]. 1952–08–19.
- [22] Denkwalter R G, Hughey G B, Kutosh S. Extraction of vitamin B<sub>12</sub>-active compounds from aqueous solutions using solid trichlorophenol: US2635985A [P]. 1953–04–21.
- [23] Guan N, Liu L, Shin H D, et al. Systems-level understanding of how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: mechanism and application [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 167(3): 56–63.
- [24] Charles A, Roessner A, Ian S. Fine-tuning our knowledge of the anaerobic route to cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(21): 7331–7334.
- [25] 杨洪森, 廖海明, 任雪, 等. 腺苷钴胺有关物质分析方法的改进及杂质研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(6): 157–160.
- Yang H M, Liao H M, Ren X, et al. Improved analysis of related substances of cobamamide and the impurities research [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2015, 35(6): 157–160.
- [26] 王雷. 腺苷钴胺素的发酵与羟基钴胺素的制备研究 [D]. 保定: 河北大学, 2006: 1–2.
- Wang L. Fermentation of deoxyadenosylcobalamin and production of hydroxycobalamin [D]. Baoding: Hebei University, 2006: 1–2.
- [27] 张玉明. 发酵生产维生素 B<sub>12</sub> 的检测与提取研究 [D]. 保定: 河北大学, 2005: 1–2.
- Zhang Y M. Determination and extraction of vitamin B<sub>12</sub> in industrial fermentation [D]. Baoding: Hebei University, 2005: 1–2.