

离子交换法纯化 α -酮戊二酸

占宏德², 李江华^{*1,2}, 刘 龙², 堵国成², 陈 坚²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了从发酵液中分离纯化出 α -酮戊二酸, 作者利用活性炭对发酵液进行脱色后, 采用离子交换法对 α -酮戊二酸的纯化工艺进行了研究。结果表明, 活性炭用量 1.5 g/L、pH 3.0、脱色时间 1 h、脱色温度 50 °C 的条件下能取得最佳脱色效果, 脱色率达 89.2%。分析了 6 种阴离子交换树脂对 α -酮戊二酸的吸附容量, 确定了吸附性能显著的 D301 大孔弱碱型树脂。在固定床上上样条件优化表明, 当发酵液中 α -酮戊二酸质量浓度为 20 g/L、上样流速为 2.67 BV/h、径高比为 1:12 时, 上样吸附效果最佳。采取阶段洗脱工艺: 第一阶段用 0.01 mol/L 的 NaCl 和 0.01 mol/L 的 HCl 混合溶液进行洗脱, 第二阶段采用 0.3 mol/L 的 HCl 溶液在 6 BV/h 的流速下进行洗脱。验证结果表明, 在此洗脱工艺下, 收集液中 α -酮戊二酸与丙酮酸的质量比由初始发酵液中的 1.5:1 提高为 10:1 时, α -酮戊二酸收率为 93.2%。因此, 采用离子交换法可有效的分离纯化发酵液中的 α -酮戊二酸。

关键词: α -酮戊二酸; 脱色; 离子交换; 吸附; 阶段洗脱

中图分类号: TQ 921 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)10—1043—06

Ion-Exchang Purificatioon of Alpha-Ketoglutaric Acid in Fermentation Broth

ZHAN Hong-de², LI Jiang-hua^{*1,2}, LIU Long², DU Guo-cheng², CHENG Jian²

(1. Key laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to purify α -ketoglutarate acid from fermentation broth, the purification technology of α -ketoglutarate acid by ion-exchange method was studied after decolorized by activated carbon. The results showed as follows. Firstly, the decolorization ratio reached 89.2% under the following optimal conditions: carbon dosage 1.5 g/L, pH 3, bleaching time 1 h, bleaching temperature 50 °C. Subsequently, the process of ion-exchange was studied and among 6 different resins D301 weakly-based anion resin was the optimal one for α -ketoglutaric acid abstraction by comparison of the adsorption capacity. And the optimal absorption efficiency was achieved when the α -ketoglutarate acid concentration in the fermentation broth was 20 g/L, the sample flow rate was 2.67 BV/h and the diameter to height ratio was 1:12. Finally, a process of stepwise elution was

收稿日期: 2013-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171638)。

* 通信作者: 李江华(1966—), 男, 江西修水人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事酶技术、发酵过程优化与控制等研究。

E-mail: a302304@163.com

investigated. In the first step, 0.01 mol/L NaCl and 0.01 mol/L HCl mixed solution was used as eluent and in the second step, 0.3 mol/L HCl was used as eluent and the flow rate was 6 BV/h. With the elution strategy above, the final yield of α -ketoglutaric acid reached 93.2% and an excellent purification result was achieved with the increased mass ratio of α -ketoglutaric acid to pyruvic acid from 1.5:1 to 10:1. Therefore, ion-exchange method was valid to purify α -ketoglutaric acid from fermentation broth.

Keywords: α -ketoglutaric acid, decolorization, ion-exchange, adsorption, stepwise elution

α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, 又 α -KG)作为三羧酸循环(TCA)的重要中间产物之一,在生物体内参与氨基酸、蛋白质、维生素的合成以及能量代谢,在各个领域有着重要的应用前景^[1]。作为一种营养强化剂, α -KG可广泛应用于食品、医药、有机合成、化妆品和饲料等工业中。传统工业上,采用有机合成法生产 α -KG,涉及一系列复杂的化学反应过程,从而存在原料来源、环境污染等方面的问题^[2]。为此,国内外很多学者对微生物发酵法生产 α -KG进行了研究。作者室通过研究,实现了发酵法生产 α -KG^[3],并在5 m³发酵罐上进行了中试。

离子交换法用于提取各种生物活性代谢物质具有成本低,工艺操作方便,提炼效率高,设备结构简单,以及节约大量的有机溶液等优点^[4]。已有文献资料中也多见离子交换法用于有机酸等的提取。如李寅等^[4]采用离子交换法从发酵液中提取丙酮酸;郑辉杰等^[5]用离子交换法对发酵液中乳酸的提取工艺进行了研究;余炜等^[6]采用离子交换法从发酵液中提取L-亮氨酸;王岸娜等^[7]离子交换层析色谱法分离壳聚糖。 α -KG发酵液中含有一定量的副产物丙酮酸,增加了纯化难度,有关 α -KG的提取鲜有文献报道。作者以离子交换法对 α -KG的提取纯化工艺进行了研究,为 α -KG的提取与纯化提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

离子交换树脂:201×7、202、213、D201、D202、D301,浙江杭州争光树脂有限公司生产;粉末状活性炭:国药集团化学试剂有限公司生产;丙酮酸及 α -KG试剂:购自生工生物工程(上海)有限公司; α -KG发酵液:作者所在实验室发酵制备(发酵菌种:*Yarrowia lipolytica* WSH-Z06)。

高速冷冻离心机:HITACHI公司产品;恒温摇床:上海欣蕊自动化设备有限公司产品;烘箱:上海货德实验设备有限公司产品;电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;UV2450紫外分光光度计:Shimadzu公司产品;HPLC高效液相色谱:Agilent公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液预处理 采用静态法对发酵液进行脱色处理。发酵液脱色:将脱色前发酵液和脱色后发酵液进行全波长扫描,采取平均法来确定吸收波长^[8]。采用单因素变量法优化脱色条件。在100 mL锥形瓶中加入25 mL发酵液,在不同的活性炭用量、pH、温度和脱色时间条件下,于恒温摇床上进行震荡脱色。测定脱色后发酵液的吸光度,计算脱色率:脱色率(%)=(脱色前发酵液吸光值-脱色后发酵液吸光值)/脱色前发酵液吸光值×100%

1.2.2 树脂的预处理及选型 树脂的预处理:见参考文献^[9]。树脂的选型:通过静态试验来选择合适的树脂进行实验^[4]。静态试验:准确量取已预处理好的离子交换树脂6 mL,分别放入内盛80 mL一定浓度的 α -KG溶液的100 mL的锥形瓶中,在恒温摇床中28℃、200 r/min转速下震荡交换20 h,以减差法计算树脂平衡吸附量。

1.2.3 固定床动态吸附与洗脱 离子交换柱采用1×20 mm的玻璃层析柱,树脂装填量为14 mL。将预处理过的发酵液进行上样,待树脂吸附饱和后,用超纯水洗去柱中残留的发酵液。然后用洗脱液进行洗脱。经过试验,采取阶段洗脱策略^[10-11]。分别收集流出液、洗脱液,测定其中 α -KG和丙酮酸含量,分析树脂的吸附情况以及 α -KG和丙酮酸的分离情况。

1.2.4 分析方法 用HPLC法来检测 α -KG和丙酮酸的含量^[3]。将待测样品稀释一定倍数,过滤后,

HPLC 检测。流动相:5 mmol/L 硫酸溶液(550 μ L 浓硫酸定容到 2 L),用 0.22 μ m 孔径的微滤膜抽滤并脱气。HPLC 条件:Aminex HPX-87H ion exchange column,柱温:35 $^{\circ}$ C,进样量:10 μ L,流量:0.6 mL/min。检测器:紫外检测器;检测波长:210 nm。

2 结果与讨论

2.1 发酵液的脱色

2.1.1 吸收波长的确定 采用活性炭对发酵液进行脱色。将脱色前后的发酵液进行全波长扫描,如图 1 所示。全波长扫描图没有特征吸收峰,因此采用平均法^[8],计算得到平均脱色率为 64.4%,在 440 nm 到 450 nm 之间。不同波长下吸收光的颜色和观察到的颜色之间的关系,如表 1 所示。而发酵液颜色呈浅黄色偏橙色,故确定 440 nm 为检测波长。

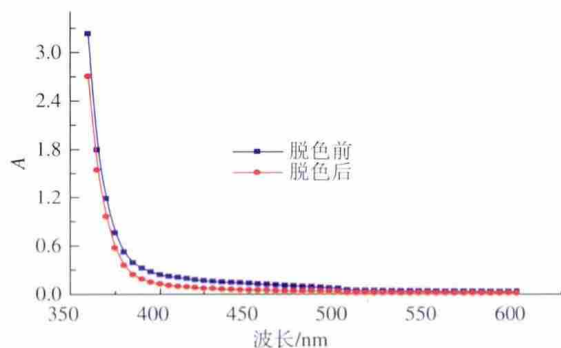


图 1 全波长扫描

Fig. 1 Wavelength scanning

表 1 吸收波长的颜色和观察到的颜色

Table 1 Absorption of light color and observed color

波长/nm	吸收光		观察到的颜色
	频率/cm ⁻¹	吸收光颜色	
400	25 000	紫	绿黄
425	23 500	深黄	黄
450	22 200	蓝	橙
490	20 400	蓝绿	红
510	19 600	绿	玫瑰
530	18 900	黄绿	紫
550	18 500	橙黄	深蓝
590	16 900	橙	蓝

2.1.2 活性炭用量对脱色效果的影响 活性炭用量对脱色效果的影响如图 2 所示。随着活性炭用量

的增加,脱色率也不断增大,当活性炭用量为 1.5 g/L 时,脱色率达最大,为 78.2%。故活性炭用量选择 1.5 g/L。

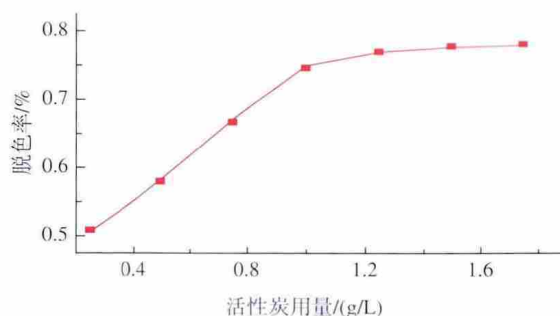


图 2 活性炭用量对脱色率的影响

Fig. 2 Effect of carbon dosage on decolorization rate of fermentation broth

2.1.3 脱色时间对脱色效果的影响 脱色时间对脱色效果的影响如图 3 所示。脱色率在 1 h 时脱色率达到最大,为 78.1%。随着时间的延长,脱色率反而下降。分析原因可能是随着脱色时间的延长,活性炭上吸附的色素物质会有一定程度的解吸附现象,直到吸附达平衡状态。故选择脱色时间为 1 h。

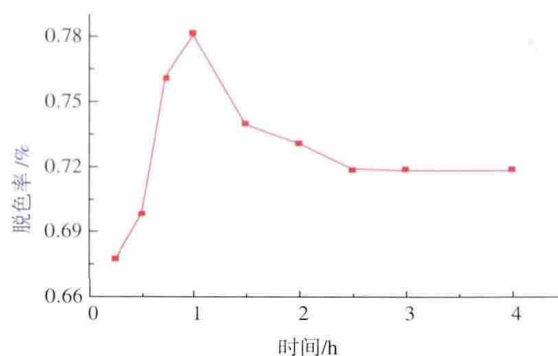


图 3 脱色时间对脱色率的影响

Fig. 3 Effect of time on decolorization rate of fermentation broth

2.1.4 温度对脱色效果的影响 温度对脱色效果的影响如图 4 所示。随着温度的升高,脱色率也逐渐增大,在温度达 50 $^{\circ}$ C 后,脱色率变化趋于平缓。升高温度,能促进分子的运动,有利于提高活性炭的吸附效率。综合能耗考虑,选择脱色温度为 50 $^{\circ}$ C。

2.1.5 pH 对脱色效果的影响 pH 对脱色效果的影响如图 5 所示。随着 pH 值的降低,脱色率逐渐增大,在 pH 3.0 时,脱色率最高,为 71.3%。故最佳脱色 pH 值为 3.0。

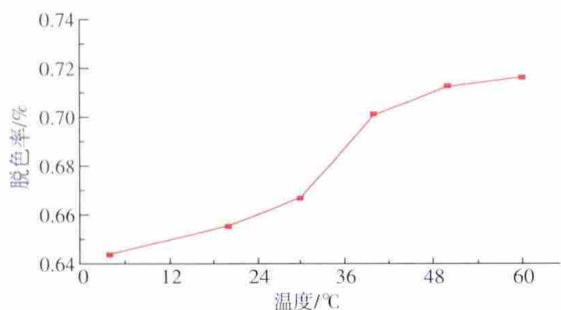


图4 温度对脱色率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on decolorization rate of fermentation broth

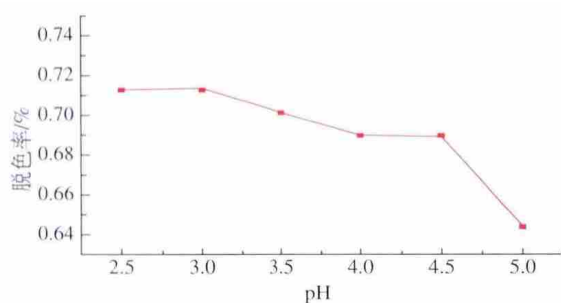


图5 pH对脱色率的影响

Fig. 5 Effect of pH on decolorization rate of fermentation broth

综合以上脱色条件,进行脱色验证,结果活性炭对发酵液的脱色率达到 89.2%,脱色后的发酵液澄清透明带有少许浅橙黄色(440 nm 下吸光值为 0.015)。

2.2 树脂的选型

通过静态吸附试验,得到各树脂吸附能力,如表 2 所示。其中弱碱大孔型树脂 D301 和强碱凝胶型树脂 202 对 α -KG 具有较大的吸附容量,但 D301 的吸附容量最大,为 109.3 mg/mL。而弱碱性树脂在洗脱时较强碱性树脂更易于目标产物的洗脱。故选择弱碱大孔型树脂 D301 作为本实验的离子交换材料。

2.3 固定床上样条件优化

2.3.1 流量对流出曲线的影响 空间流量对流出曲线的影响如图 6 所示。随着上样流量的增加,固液接触时间变短,交换区域拉长,穿透点提前,流出曲线拉平展开,这不利于提高树脂的利用率。在实验范围内选择较低的流量 2.67 BV/h 较为合理。在实际生产中,可以根据实际情况,在上样开始阶段以高流量上样,之后选择低流量上样至穿透,可以在保证柱子利用率的前提下,适当提高生产效率。

表 2 不同树脂交换容量的比较

Table 2 Comparison of the exchange capacity by different resin

树脂名称	树脂类型	树脂体积/ mL	料液体积/ mL	体积交换容量/(mg/mL)
201×7	强碱凝胶型	6	80	57.5
202	强碱凝胶型	6	80	93.3
213	强碱凝胶型	6	80	56.5
D201	强碱大孔型	6	80	53.7
D202	强碱大孔型	6	80	65.6
D301	弱碱大孔型	6	80	109.3

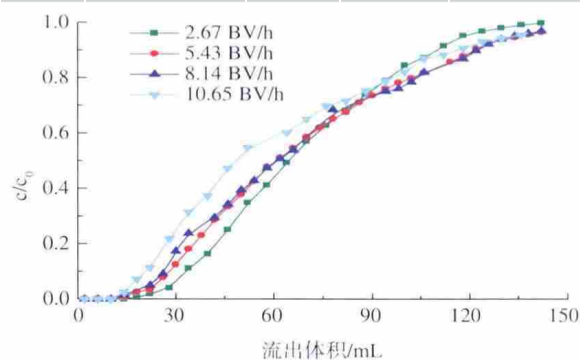


图6 不同流量对流出曲线的影响

Fig. 6 Effect of space velocity on the effluent curve

2.3.2 质量浓度对流出曲线的影响 上样质量浓度对流出曲线的影响如图 7 所示。当质量浓度较低为 9.03 g/L 时,曲线拉平展开,交换区间拉长;当质量浓度为 20.3 g/L 和 33.9 g/L 时,曲线前半部分变化趋势相似,但质量浓度为 33.9 g/L 时,曲线严重拖尾。分析原因可能是因为柱子体积较小导致吸附容量有限所致。故在实验范围内, α -KG 的上样质量浓度选择为 20 g/L 较为合理,实际生产中可根据固定床大小来选择其合适的上样质量浓度。

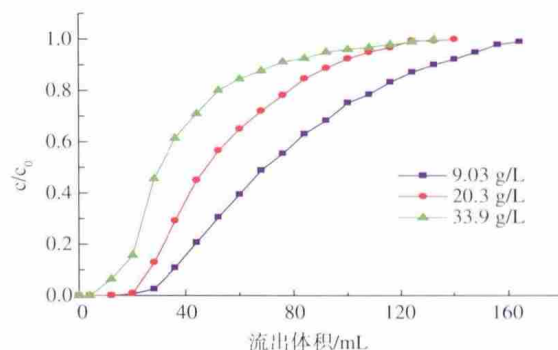


图7 不同上样质量浓度对流出曲线的影响

Fig. 7 Effect of concentration of α -KG on the effluent curve

2.3.3 装填高度对流出曲线的影响 在不同的装填高度条件下进行上样,得到流出曲线,如图 8 所示。分析图中曲线发现,不同的径高比对流出曲线变化趋势的影响不大。当径高比为 1:24 时,流出曲线坡度相对较缓,交换区域相对拉长,出现拖尾现象。分析原因可能主要是由于树脂装填不严实所致。故在实验条件下,选择径高比为 1:12 较好。

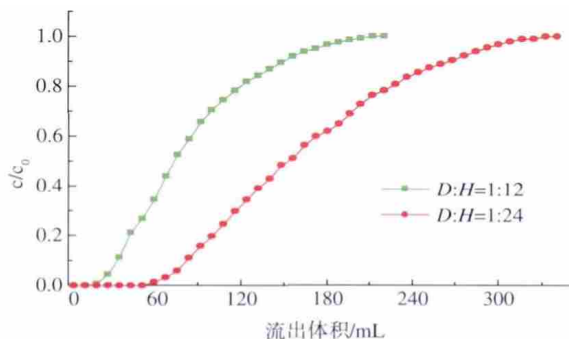


图 8 径高比对流出曲线的影响

Fig. 8 Effect of resin height on the effluent curve

2.4 洗脱条件优化

由于发酵液中存在较高比例的丙酮酸,故将二者分离是 α -KG 纯化过程中最关键的一步。经过试验,确定采取阶段洗脱策略来分离 α -KG。

第一阶段采用混合洗脱剂低浓度 (0.01 mol/L NaCl 和 0.01 mol/L HCl 混合液) 下进行洗脱,在损失一定量的 α -KG 的同时,将丙酮酸大量洗脱下来;第二阶段则用 HCl 一次洗脱,可得到较纯的 α -KG 溶液。收集洗脱液,测定其中 α -KG 和丙酮酸的含量,得到阶段洗脱曲线,如图 9 所示。第一阶段洗脱体积 240 mL,第二阶段洗脱体积 150 mL。在第二阶段洗脱液中,丙酮酸的含量几乎为零, α -KG 的纯化效果较好。分析图 9 发现,洗脱液中所含丙酮酸的比例要远远低于原始发酵液中丙酮酸的含量,说明 D301 树脂对 α -KG 的吸附选择性较大。

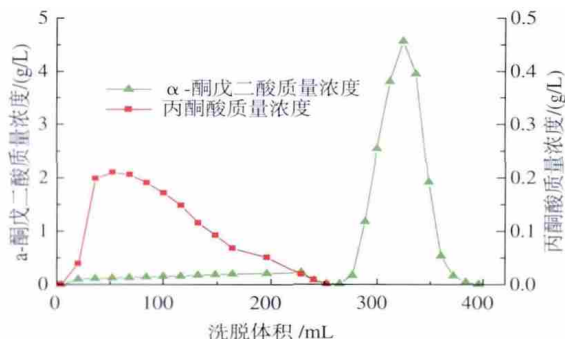
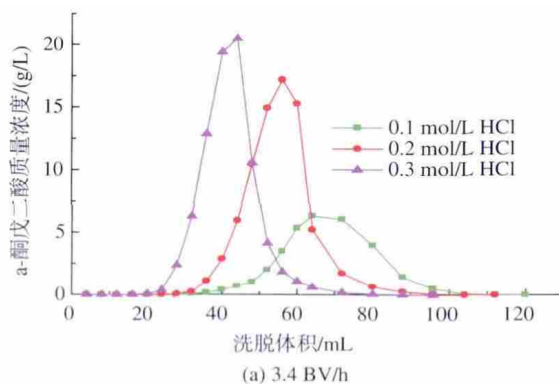


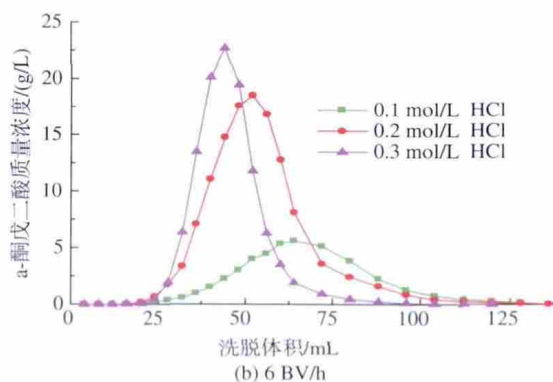
图 9 阶段洗脱曲线

Fig. 9 Stepwise elution curve

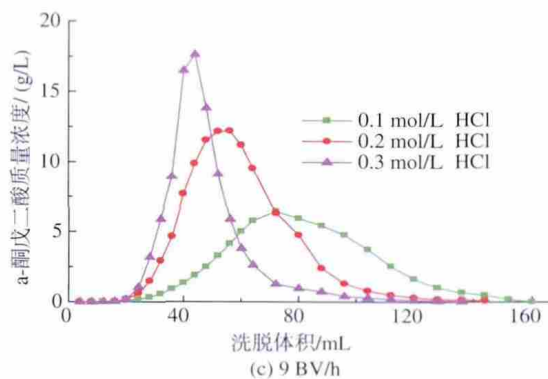
对第二阶段洗脱液浓度和洗脱流量进行了优化,如图 10 所示。当洗脱流量为 6 BV/h,洗脱剂浓度为 0.3 mol/L HCl 时,洗脱峰较集中,且峰高较大,洗脱效果最佳。



(a) 3.4 BV/h



(b) 6 BV/h



(c) 9 BV/h

图 10 不同流量对第二阶段洗脱曲线的影响

Fig. 10 Effect of elution velocity on elution curve

2.5 洗脱验证

上样至刚好穿透,记上样体积 V_0 ,收集上样流出液和洗柱液 V_1 ,第一阶段洗脱液 V_2 ,第二阶段洗脱液 V_3 ,测定其中 α -KG 和丙酮酸的含量,计算得率,结果如表 3 所示。在第二阶段洗脱时,丙酮酸洗脱量为 56.74 mg,远远大于 α -KG 的洗脱量 6.21

mg;第二阶段中, α -KG 大量洗脱,为 93.67 mg。在上述阶段洗脱策略下,最终 α -KG 收率达 93.2%。在 93.67 mg α -KG 中含丙酮酸 9.59 mg,由初始发酵液中 α -KG 与丙酮酸质量比 1.5:1 提高到 10:1,更有利于后续的结晶。如果延长第一阶段洗脱时间,则最终 α -KG 纯度可进一步提高至完全不含丙酮酸,但 α -KG 的收率会有所下降。对比 V_0 和 V_1 中 α -KG 和丙酮酸的含量可知,D301 树脂对 α -KG 的吸附选择性较大。因此可以设计串联柱过量上样,然后分柱洗脱,有助于 α -KG 和丙酮酸的分离。

表 3 纯化结果验证

Table 3 Consequence of purification

类别	体积/mL	丙酮酸质量/mg	α -KG 质量/mg
V_0	10	73.99	100.5
V_1	25	7.22	0.46
V_2	233	56.74	6.21
V_3	143	9.59	93.67

参考文献:

- [1] Sauer M, Porro D, Mattanovich D, et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets [J]. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(2): 100-108.
- [2] Zhang D, Liang N, Shi Z, et al. Enhancement of α -ketoglutarate production in *Torulopsis glabrata*: Redistribution of carbon flux from pyruvate to α -ketoglutarate [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 14(2): 134-139.
- [3] YU Zong-zhong, DU Guo-cheng, ZHOU Jing-wen, et al. Enhanced α -ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by an improved integrated fed-batch strategy [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 597-602.
- [4] 李寅, 傅为民, 陈坚. 离子交换法从发酵液中提取丙酮酸 [J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(4): 335-339.
LI Yin, FU Wei-ming, CHEN Jian. Extract pyruvate from fermentation broth by Ion-exchange [J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2001, 20(4): 335-339. (in Chinese)
- [5] 郑辉杰, 李志强, 何姗, 等. 离子交换法提取发酵液中乳酸的工艺研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(6): 84-87.
ZHEN Hui-jie, LI Zhi-qiang, HE Shan, et al. Study on extraction process of lactic acid from fermentation broth with anionic resin [J]. *Food Science*, 2009, 30(6): 84-87. (in Chinese)
- [6] 余炜, 伍时华, 王恒山, 等. 离子交换法分离提取发酵液中 L-亮氨酸 [J]. 化学世界, 2005, 46(2): 109-113.
YU Wei, WU Shi-hua, WANG Heng-shan, et al. Separating and abstracting L-leucine from fermentation liquok with ion exchange [J]. *Chemical World*, 2005, 46(2): 109-113. (in Chinese)
- [7] 王岸娜, 王璋, 许时婴. 离子交换层析色谱法分离壳聚糖 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(6): 75-80.
WANG An'na, WANG Zhang, XU Shi-yin. Study on the separation of chitosan by ion exchange chromatography [J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2003, 22(6): 75-80. (in Chinese)
- [8] 楼良旺, 高年发. 丙酮酸发酵液脱色工艺的研究 [J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(3): 12-14.
LOU Liang-wang, GAO Nian-fa. Decolorization of pyruvate fermentation broth [J]. *Guangzhou Food Science and Technology*, 2004, 20(3): 12-14. (in Chinese)
- [9] 石慧东. 离子交换法提取赖氨酸的研究 [D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1996.
- [10] 阮文辉. 离子交换法分离纯化 5'-三磷酸胞苷的研究 [D]. 南京: 南京工业大学, 2004.

3 结语

通过全波长扫描, 采取平均法确定检测波长为 440 nm。用活性炭对发酵液进行脱色, 在活性炭用量 1.5 g/L、pH 3.0、脱色时间 1 h、脱色温度 50 °C 的条件下, 脱色率可达 89.2%。通过静态试验, 选择吸附量最大的弱碱大孔型树脂 D301 为实验用离子交换树脂。上柱条件优化表明, 在发酵液中 α -KG 质量浓度 20 g/L、较低的流量 (2.67 BV/h) 和较小的装填高度 ($D:H=1:12$) 时, 上样吸附效果最好。采用阶段洗脱: 第一阶段用 0.01 mol/L 的 NaCl 和 0.01 mol/L 的 HCl 混合溶液进行洗脱, 第二阶段采用 0.3 mol/L 的 HCl 溶液进行洗脱, 洗脱流速 6 BV/h。在此工艺条件下验证, 洗脱液中 α -KG 与丙酮酸的质量比由初始发酵液中的 1.5:1 提高为 10:1, α -KG 收率可达 93.2%, 纯化效果较好。该工艺可较好的纯化 α -KG, 但依然存在一定的损失, 而且丙酮酸完全浪费, 可进一步尝试其他洗脱策略, 提高 α -KG 收率, 并尽可能分离出丙酮酸, 实现副产物的利用。