

文章编号: 1001-8255(2003)08-0421-04

维生素 B₁₂ 工业生产技术的进展

曾碧榕, 何旭敏, 夏海平, 蓝伟光*

(厦门大学化学化工学院, 福建厦门 361005)

摘要:介绍了维生素 B₁₂ 生产过程中菌株的选育和工艺的优化进展, 包括二步发酵工艺和膜反应器的应用与改进。通过菌株选育和工艺改进大大提高了产量, 推进了生产。特别是膜技术和其他分离技术的联用弥补了单一膜反应器中原料利用率低的缺点, 具有良好的生产应用价值。

关键词: 维生素 B₁₂; 发酵工艺; 菌株; 膜反应器; 综述

中图分类号: TQ466.2 **文献标识码:** A

维生素 B₁₂ (VB₁₂), 又称钴胺素 (cyanocobalamin), 是一种含有钴的咕啉类有机化合物, 分子式 C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄P。VB₁₂ 是人体组织代谢过程中所必需的维生素, 是人和其它哺乳动物维持生长和促进红细胞生长的重要因子, 在临床上用于治疗恶性贫血和恢复造血功能等。

虽然 Woodward 已于 1973 年以非常出色的工作完成了 VB₁₂ 的全化学合成, 但工业上仍利用放线菌(如链霉菌等)培养液发酵生产 VB₁₂^[1]。本文侧重于菌株的选育、优化和发酵工艺的改进等方面介绍了 VB₁₂ 工业生产技术的最新进展, 特别是膜反应器的合理使用给 VB₁₂ 工业生产带来的较大突破。

1 产生菌及菌种选育

产生 VB₁₂ 的微生物有各种细菌和放线菌, 早期从抗生素, 如链霉素、新霉素、氯霉素和庆大霉素等发酵废液中提取 VB₁₂ 之后, 有报道称, 从天然肥料或土壤中可分离出能产生 VB₁₂ 的菌株。1992 年 Kojima 等^[2]首次报道, 从 568 份土壤样品中分离出 500 种能够消解异丙醇并产生 VB₁₂ 的微生物, 其中以菌株 Hi16.3(又名 *A. hyalinus*) 产生的 VB₁₂ 量最多, 浓度为 2.0 mg/L。近年来还发现诺卡氏菌、棒状菌、芽孢杆菌、乙酸杆菌和丁酸杆菌属的细菌也能产生 VB₁₂, 如 1991 年 Inoue 等^[3]从海底沉积物中分离出一种新的厌氧型乙酸杆菌属菌株 69, 可以产生胞内 VB₁₂。在该实验中, 乙酸杆菌产生 VB₁₂ 的同时也产生副产物类钴胺酶, 它会抑制 VB₁₂ 的生成。所以, 寻找到可抑制类钴胺酶生成的方法将有助于提高 VB₁₂ 产量。根据卤代烷烃会与含钴化合物发生甲基

化转移反应使钴原子发生烷基取代的性质, 在培养液中加入卤代烷烃便可以抑制类钴胺酶的生成。因此, 选育出对卤代烷烃具有抗性的菌株极为关键。实验的进一步做法是在四氯甲烷(TCM)介质中, 以甲磺酸乙酯作为诱变剂对菌株 69 进行诱变。结果表明, 由此得到的突变菌株 69-7 在含 10 μmol/L TCM 基质中产生的 VB₁₂ 达 7.6 mg/L, 是原来没有加卤代烷烃产生的 VB₁₂(3.4 mg/L)的 2.2 倍。

具有工业生产价值的 VB₁₂ 产生菌, 如谢氏丙酸杆菌(*Propionibacterium shermanii*) 和菲氏丙酸杆菌(*P. freudenreichii*) 产生 VB₁₂ 可达 23~25 mg/L (厌气, 30℃ 培养 80~132 h)。进一步从各种产生菌中选择生长快、产量高的谢氏丙酸杆菌和脱氮假单胞杆菌(*Pseudomonas denitrificans*), 产生的 VB₁₂ 可达 59 mg/L^[4], 可作为工业生产用菌株。

为了提高 VB₁₂ 的产率, 在生物合成 VB₁₂ 过程中除了加入前体, 如谷氨酸、苏氨酸、δ-氨基乙酰丙酸和氨基丙醇外, 还需要补充加入钴盐和 5, 6-二甲基苯并咪唑。甜菜碱(主要存在于糖、甜菜和糖蜜中)和胆碱对细菌产生 VB₁₂ 也具有刺激效果, 主要是促进细胞表面对代谢产物的分泌^[5]。

2 发酵工艺的改进

2.1 二步发酵工艺

发酵工艺主要围绕着减少生物合成过程的自抑制作用和维持较高微生物细胞浓度这两方面展开工作。通常认为, 只有在厌氧条件下, 丙酸杆菌才会发酵生成胞内 VB₁₂ 和胞外产物——丙酸、乙酸, 因而传统工艺一般采取一步厌氧发酵。实际生产中发现这一工艺的 VB₁₂ 产率并不理想, 主要是因为厌氧过程中, 副产物丙酸会抑制细胞的生长。显然, 只有及时消除发酵体系中不断增多的丙酸, 才能推动生物合成反应的有效进行。然而, 只有发酵体系处在有氧条件下, 丙酸才会被分解掉。所以, 目前的工业生产在传统的厌氧发酵上进一步改进, 采用二步发酵工艺, 第一步先厌氧发酵, 提高细胞生长速率; 第二

收稿日期: 2002-05-20

基金项目:福建省科技重点项目(2000-1-015)、教育部科技重点项目(00076)、教育部骨干教师基金、福建省青年科技人才创新项目资助课题(0043-k32008)

作者简介:曾碧榕(1978), 女, 硕士, 从事发酵分离工艺方面的研究。

Tel: 0592-2184520

E-mail: hpxia@jingxian.xmu.edu.cn

步好氧发酵,以分解丙酸。

Ye 等^[6]报道了一种由厌氧、好氧周期交替循环的新型操作工艺。实验发现,对于细胞代谢途径的改变以及目的产物和其他代谢产物之间的分配来讲,氧是一个关键的参数。利用菲氏丙酸杆菌进行发酵,在厌氧阶段,葡萄糖分解成丙酸、乙酸,同时生成 VB₁₂; 在好氧阶段,氧的存在有利于丙酸的分解。但是不同的溶解氧浓度和通氧时间对实验效果影响较大,必须严格控制,如果通氧时间太长(超过 6 h),发酵过程中会生成细胞色素,反而不利于细胞生长。只有在合适的时间内进行有氧发酵,细胞才会快速增长,达到最佳状态。实验证实好氧阶段溶解氧的最佳浓度为 1 ppm,最佳通氧时间为 6 h。在生物合成过程中厌氧和好氧条件适时交替实施,可以充分利用两者各自的优点,得到的 VB₁₂ 浓度是纯厌氧发酵条件下所得 VB₁₂ 浓度的 2 倍以上。以上证明在发酵液中存在低浓度的溶解氧对发酵是有利的,可以提高 VB₁₂ 产量。二步发酵工艺不仅提高了 VB₁₂ 的产量,还给出发酵生产工艺的新思路,对于其他发酵体系也有一定的启发和指导意义。

总之,丙酸是 VB₁₂ 发酵生产中的抑制因素,工业生产常采用添加氨水等碱性物质及通入少量氧气来减少这种影响。

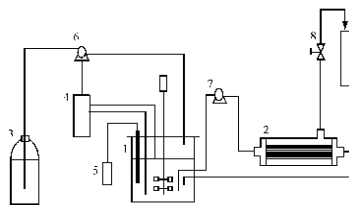
2.2 膜反应器

可将影响 VB₁₂ 产量的丙酸从反应体系分离出去的工艺最好是可以实现发酵与分离一体化组合的发酵系统——膜反应器。这是最新发展起来的一种发酵与分离耦合的体系,利用分离膜的优良分离性能,既可在反应的过程中选择性地及时脱除某些产物,突破反应平衡的限制或减少生化反应中这些产物对反应的抑制作用,提高目的产物的转化率和选择性(有的膜反应器中的分离膜还兼具催化反应的性能);同时,因为膜对酶和细胞组织不具破坏性,使得酶和细胞可以重复使用,从而使反应体系维持较高的酶浓度和细胞浓度。因此膜过滤系统被认为是实现细胞循环利用的最有前景性的方法。根据反应和分离设备组合方式的不同,膜反应器可分为循环式和一体式^[7]。在国外,特别是日本和德国,已有过一些研究,但国内尚未见这方面的报道。

2.2.1 单一膜反应器

1988 年 Hatanaka 等^[8]建立了一套由中空纤维膜滤器和 VB₁₂ 发酵罐组成的膜反应系统。生产工艺

流程如图 1 所示。



1—发酵罐;2—中空纤维膜滤器;3—新鲜基质储罐;4—自控水平器;
5—pH 控制器;6—输料泵;7—循环泵;8—膜滤液排出阀门

图 1 由膜滤器和发酵罐组成的膜反应系统

其中,膜滤器可用于去除丙酸,减少其对体系的抑制作用。所采用的中空纤维膜为 Asahi Kasei 公司的 Microza PW 103 膜,膜组件含 400 根中空纤维,纤维内径 0.7 mm,有效膜面积 0.2 m²,膜孔径 0.1 μm。膜组件投入运行前,先后用 3% 甲醛溶液和 0.3%~1% 次氯酸钠溶液处理,然后用足量的高压消毒热水(80℃)进行冲洗。

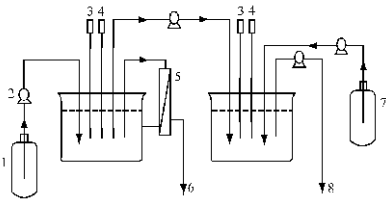
利用这套膜反应器分别进行了谢氏丙酸杆菌和甲基自营养化丁酸杆菌的发酵实验,结果细胞和 VB₁₂ 的产率均比仅用 VB₁₂ 发酵罐批量培养有很大的提高,VB₁₂ 产量分别为 52 和 92.5 mg/L,分别是未采用膜反应器培养的 24 和 43 倍。可见膜反应器对提高 VB₁₂ 产量的作用极其可观,是一种行之有效、应用前景良好的生产工艺。

Crespo 等^[9]在丙酸杆菌发酵实验中也应用了超滤膜设备,一方面移走有抑制作用的产物,另一方面通过料液的循环流动,避免了反应罐中因细胞浓度剧增而导致料液粘度和操作压力变大的情况,从而消除了不利于细胞再生和体系操作的负面影响。结果表明,使用连续反应釜(CSTR)后产率提高了 17 倍。

2.2.2 与二步发酵相结合的膜反应器

膜反应器除了单独作为一种工艺外,还可以当作一种辅助环节,起到与其他工艺相结合的目的。1994 年 Quesada-Chanto 等^[10]把膜反应器应用到二步发酵中,采用丙酸杆菌在糖蜜和蔗糖液中进行二步发酵,可分别生产丙酸和 VB₁₂。第一步发酵赤糖糊得到丙酸 17.7 g/L;第二步发酵得到 VB₁₂ 49 mg/L。生产工艺流程如图 2 所示。

其中,第一步在 37℃ 下进行厌氧发酵,调整料液 pH 6.5。在该阶段应用超滤膜设备的目的是保持发酵罐中细胞浓度的平衡以及料液体积的稳定,并且将生成的丙酸排除,另作收集。在此,用以细胞循



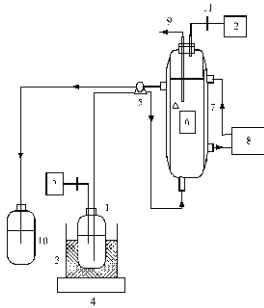
1-新鲜基质罐;2-泵;3-pH计;4-温度计;5-膜组件;
6-含丙酸的滤液出口;7-补给基质料罐;8-产品出口

图2 结合膜反应器的二步发酵系统流程

环的膜组件是中空纤维超滤膜,膜材料是聚砜,规格为0.01 μm。第二步厌氧发酵,温度40℃,料液pH 6.5。

2.2.3 一体式膜反应器

上述膜反应器均属循环式,2000年Bainotli等^[11]报道了一体式膜反应器的实验研究,采用乙酸杆菌在升流式厌氧过滤反应器(UAFR)中生产VB₁₂。生产工艺流程如图3所示。



1-新鲜基质储罐;2-气瓶;3-冰浴罐;4-磁力搅拌器;5-输料泵;
6-UAFR膜反应器;7-反应釜;8-水浴循环;9-产物出口;
10-滤渣储罐;11-气体控制阀门

图3 采用乙酸杆菌发酵的UAFR反应器流程图

UAFR属于一体式膜反应器,在玻璃圆柱形反应器内装填基质支撑材料,乙酸杆菌的固定化活性细胞就固定在支撑材料上,形成生物膜。支撑材料装填率为35%~40%。在该膜反应器投入使用之前,为形成良好的生物膜,基质支撑材料需用含125 mmol/L的甲醇-甲酸甲酯和0.16 mmol/L CoCl₂·6H₂O的溶液进行预处理,然后将乙酸杆菌活性细胞固定在基质材料上。处理后的膜反应器可起到分离和催化两重性能。

实验结果表明,最大VB₁₂的比浓度为5.1 mg·g⁻¹ cell, UAFR中流体的细胞生长率为0.20 g·L⁻¹·h⁻¹,是恒化器培养时细胞生长率(0.035 g·L⁻¹·h⁻¹)的6倍。

2.2.4 膜反应器与其他技术的联用

膜反应器能够有效地去除丙酸,有时还兼具催化性能,又可以有效地维持反应器中的细胞浓度,从而提高VB₁₂的生产能力。但是由于营养介质在超滤

时会随丙酸一同透过膜而流失,降低了碳源的利用率,因此需要补充大量的新鲜介质。目前,这个问题已经有了一些较好的解决方案,如Ye等^[12]在研究乳酸发酵时,采用错流过滤和阴离子交换树脂联用的新型技术即可较好地解决这类问题。此项联合技术也可借鉴应用到其他终产物抑制反应的体系中。

1996年Nakano等^[13]建立了由旋转陶瓷膜滤器、活性炭填装柱和发酵罐组成的发酵体系。膜滤器和活性炭填装柱可用于去除丙酸和回收重复使用的发酵细胞和培养基。菲氏丙酸杆菌在发酵罐内的发酵液先经旋转陶瓷膜过滤,滤液再进入装填柱。最终的透过液里已不再含有丙酸,可以循环回到发酵罐中重复使用,丙酸和乙酸也可回收成为副产品。与传统的发酵法相比,菲氏丙酸杆菌和糖类等营养物质的利用率都大大提高了,减少了基质的浪费,有望降低成本,有利于实际生产的应用和推广。

3 结论

综上所述,可通过菌株选育和改善发酵工艺提高VB₁₂的收率。在利用丙酸杆菌生产VB₁₂的过程中,主要有3种方法可以降低体系中丙酸的浓度,提高VB₁₂的产量:(1)使用碱性物质中和丙酸;(2)控制溶解氧的浓度为0~1 ppm交替变换,分解掉丙酸;(3)利用膜反应器从体系中移除丙酸。使用膜反应器不但能够有效地将细胞生长代谢时伴随产生的代谢产物丙酸从发酵体系中移除,同时又能够实现细胞的循环利用,从而大大提高VB₁₂产量。针对膜反应器中原料流失多、利用率低的缺点,有多种方法可以改进,如在混合发酵体系中加入可吞噬或消耗丙酸的微生物,直接减弱或消除丙酸的抑制作用^[14];采取联合处理技术,如膜-树脂联用、膜-活性炭联用进行有效物质的回收和重复利用。这些技术行之有效,可借鉴应用到其他终产物抑制反应的发酵体系中,具有良好的发展前景。

参考文献:

[1] 熊宗贵. 发酵工艺原理[M]. 北京:中国医药科技出版社,1995. 374-376.
[2] Kojima I, Sato H, Fujiwara Y. Vitamin B₁₂ production by isopropanol-assimilating microorganisms[J]. *J Ferment Bioeng*, 1993, **75**(3):182-186.
[3] Inoue K, Kangeyama S, Morinaga T, et al. Vitamin B₁₂ production by *Acetobacterium* sp. and its tetrachloromethane-resistant mutants[J]. *J Ferment Bioeng*, 1992, **73**(1):76-78.
[4] 宋友礼. 水溶性维生素微生物合成法进展[J]. 中国医

药工业杂志, 1995, 26(6):278-284.

- [5] Vandamme EJ. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological process [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 1992, 53(4):313-327.
- [6] Ye K, Shijo M, Jin S, *et al.* Efficient production of vitamin B₁₂ from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration [J]. *J Ferment Bioeng*, 1996, 82(5):484-491.
- [7] 戚以政, 汪叔雄. 生化反应动力学与反应器[M]. 第二版, 北京: 化学工业出版社, 1999. 248-255.
- [8] Hatanaka H, Wang E, Taniguchi M, *et al.* Production of vitamin B₁₂ by a fermentor with a hollow-fiber module [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 27(5-6):470-473.
- [9] Crespo JPSG, Moura MJ, Almeida JS, *et al.* Ultrafiltration membrane cell recycle for continuous culture of *Propionibacterium* [J]. *J Membra Sci*, 1991, 61:303-314.
- [10] Quesada-Chanto A, Afschar AS, Wagner F. Microbial production of propionic acid and vitamin B₁₂ using molasses or sugar [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 41(4):378-383.
- [11] Bainotli AE, Eslebanez B, Nagadomi H, *et al.* Production of vitamin B₁₂ in an upflow anaerobic filter continuous reactor using *Acetobacterium* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(6):503-508.
- [12] Ye K, Jin S, Shimizu K. Cell recycle and broth reuse fermentation with cross-flow filtration and ion-exchange resin [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 1996, 66(3):223-226.
- [13] Nakano K, Kataoka H, Matsumura M. High density culture of *Propionibacterium freudenreichii* coupled with propionic acid removal system with activated charcoal [J]. *J Ferment Bioeng*, 1996, 81(1):37-41.
- [14] Miyano K, Ye K, Shimizu K. Improvement of vitamin B₁₂ fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture [J]. *Biochem Eng J*, 2000, 6(3):207-214.

Process of Industrial Production of Vitamin B₁₂

ZENG Bi-Rong, HE Xu-Min, XIA Hai-Ping, LAN Wei-Guang*

(Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

ABSTRACT: This review introduces some improvements of strain selection and process optimization of vitamin B₁₂ production. The two-stage fermentation and application of membrane reactor coupling with other separation technology had been used to increase the yield of vitamin B₁₂ greatly.

Key Words: cyanocobalamin or vitamin B₁₂; fermentation process; mutant; membrane-reactor; review

(上接第 401 页)

Determination of Promethazine Hydrochloride and Potassium Guaiacolsulfonate in Syrup by HPLC

YANG Yong-Jian, ZHANG Xin-Yun

(Shanghai Institute for Drug Control, Shanghai 200233)

ABSTRACT: A HPLC method for simultaneous determination of promethazine hydrochloride and potassium guaiacolsulfonate in syrup was presented. An Inertsil ODS³ column was used, with the mobile phase of acetonitrile-0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate buffer solution (25:75), at detection wavelength of 249 nm. Promethazine hydrochloride and potassium guaiacolsulfonate had good linearities over the concentration range of 10~100 μg/ml ($r=0.9999$) and 0.25~2.0 mg/ml ($r=0.9992$), respectively. The average recoveries were 100.0% (RSD 0.65%) and 100.3% (RSD 1.23%), respectively.

Key Words: promethazine hydrochloride; potassium guaiacolsulfonate (sulfogaiacol); HPLC; syrup; determination