

阿维菌素提取工艺优化

郭佳(宁夏泰益欣生物科技有限公司, 宁夏 银川 750205)

摘要: 本研究采用动态超声提取法从发酵菌渣中提取阿维菌素, 以单因素实验分别从静态提取时间、动态提取流速、动态提取流速、动态提取时间及提取溶剂 5 个方面进行工艺优化, 对单因素实验得到的最佳参数进行工艺稳定性验证, 得出结论: 采用乙醇溶剂结合动态超声提取法, 只需一次浸提收率可高达 97.0% 以上。

关键词: 阿维菌素; 动态超声提取法; 工艺稳定性验证

阿维菌素属于十六元大环内酯化合物, 具有杀虫、杀螨、杀线虫的活性, 由链霉菌中灰色链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 发酵产生^[1]。天然阿维菌素中含有 8 个组分(图 1), 其中 A1a、A2a、B1a 和 B2a, 其总含量 $\geq 80\%$; 而其同系物分别是 A1b、A2b、B1b 和 B2b, 比例较小, 其总含量 $\leq 20\%$, 上述 8 种组分中以 B1a 活性最高。

	R ₁	R ₂	X-Y
A1a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=CH
A1b	CH ₃	CH ₃	CH=CH
A2a	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
A2b	CH ₃	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)
B1a	H	C ₂ H ₅	CH=CH
B1b	H	CH ₃	CH=CH
B2a	H	C ₂ H ₅	CH ₂ -CH(OH)
B2b	H	CH ₃	CH ₂ -CH(OH)

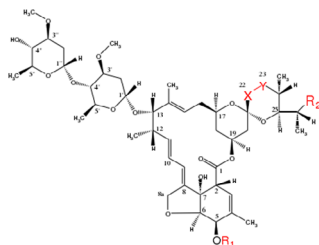


图 1 阿维菌素的结构式

传统的阿维菌素提取工艺采用的是乙醇, 具体为将发酵液过滤获得湿菌丝体后以近 4 倍的乙醇萃取两次, 然后将含有阿维菌素的萃取滤液用大孔树脂进行吸附, 再经丙酮(约 13/ 萃取滤液体积)洗脱、减压浓缩得到油膏物, 最后将油膏用乙醇进行精制, 大约需要精制三次。以上传统工艺涉及的有机溶剂(乙醇、丙酮)消耗量过大, 并提取纯化工艺流程长, 使阿维菌素提取纯化的成本费用大约是发酵所用原料费用的 4 倍, 由于纯化次数过多, 导致一次成品收率偏低, 本研究采用动态超声提取法对阿维菌素菌渣进行提取, 旨在解决传统工艺中存在的问题。

1 试验设备、试剂和材料

1.1 试验设备

YP4002 电子天平(上海越平科学仪器有限公司); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); PHS-3C 酸度计(上海仪电科技有限公司); UV-1750 紫外分光光度计(SHIMADZU CORPORATION); AS5150B 型超声清洗器(AUTOMATIC SCIENCE INSTRUMENT CO.LTD); TAI SHI LI XIN JI 80-2B 超速离心机(上海安享科学仪器厂); HH- 数显恒温水浴锅(江苏金坛市城国胜实验仪器厂);

1.2 试验试剂

珍珠岩(信阳市平桥区四通保温材料有限公司); 甲醇(天津凯通化学试剂有限公司); 乙醇(天津凯通化学试剂有限公司); 氯仿(天津凯通化学试剂有限公司); 纯化水(宁夏泰益欣生物科技有限公司)。

1.3 试验材料

阿维菌素发酵液(宁夏泰益欣生物科技有限公司)

2 试验方法

2.1 发酵液预处理

取发酵液 100L 升温至 85℃, 在发酵液中加入 4-10% 体积的珍珠岩, 搅拌 1h, 此过程中要保证使预处理温度维持在 70-95℃ 之间。对预处理过的发酵液进行板框过滤, 过滤所得滤饼粉碎后得到待浸提菌渣。

2.2 动态超声法提取装置与提取方法

本研究所采用的动态超声提取装置由储液瓶、溶剂泵、超声波发生器、样品槽、接收瓶组成, 这些装置由输液管连接(图 2)。提取方法: 将待浸提菌渣置于样品槽中, 用溶剂泵将提取溶剂从储液瓶中泵入样品槽中, 开启超声波发生器, 超声提取频率设为 20kHz, 收集提取液。

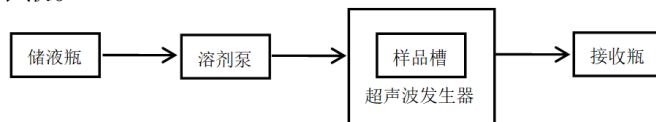


图 2 动态超声提取装置示意图

2.3 静态提取时间的优化

由于被提取物质与提取溶剂间存在分配平衡, 因此需要多次提取, 以达到满意的提取效果。静态提取的优点是样品与提取溶剂作用时间较长, 有利于达到分配平衡。因此, 不同的静态提取时间对阿维菌素提取效率影响不同。

按照上述提取方法, 以乙醇为提取溶剂, 先向样品槽中泵入提取溶剂, 至出口有溶剂流出时关闭溶剂泵, 开启超声波提取并开始计时。分别设置静态提取时间为 0min、2min、4min、6min、8min、10min, 然后以 2mL/min 的流速开始动态提取, 动态提取时间保持一致(5min)。提取完毕后收集提取液, 测定提取液中阿维菌素的效价($C_{\text{初始}}$)并计量提取液体积($V_{\text{初始}}$)。

相比静态提取, 动态超声提取的特点在于提取时提取溶剂处于流动状态, 不断有新鲜溶剂补充, 理论上有利于被提取物质向溶剂中转移。溶剂流速过快, 势必会造成提取溶剂用量大, 提取时间延长, 提取效率低; 流速过低则不能发挥动态提取的优势, 因此, 选择合适的动态提取流速至关重要。

以乙醇为提取溶剂, 设置静态提取时间为 6min, 比

较不同动态提取流速对阿维菌素提取效果的影响。流速分别设置为1mL/min、2mL/min、3mL/min、4mL/min、5mL/min，动态提取时间保持一致（5min）。提取完毕后收集提取液，测定提取液中阿维菌素的效价（ $C_{\text{初始}}$ ）并计量提取液体积（ $V_{\text{初始}}$ ）。

2.4 动态提取时间的优化

动态提取溶剂流速保持一致时，提取时间决定了提取溶剂的用量，同时也会影响提取效率。因此，本研究以乙醇为提取溶剂，保持动态提取流速为3mL/min，静态提取6min后开始动态提取。动态提取时间分别设置为2min、4min、6min、8min、10min。提取完毕后收集提取液，测定提取液中阿维菌素的效价（ $C_{\text{初始}}$ ）并计量提取液体积（ $V_{\text{初始}}$ ）。

2.5 动态提取溶剂的选择

由于被提取物质的理化性质、样品类型及提取溶剂理化性质等差异，不同提取溶剂对物质的提取效果影响极大。因此，本项目考察不同的溶剂对阿维菌素提取效率的影响，以优选出最佳提取溶剂。保持动态提取流速为3mL/min，静态提取6min后动态提取8min。分别用甲醇、乙醇、氯仿为提取溶剂进行提取。提取完毕后收集提取液，测定提取液中阿维菌素的效价（ $C_{\text{初始}}$ ）并计量提取液体积（ $V_{\text{初始}}$ ）。

2.6 工艺稳定性验证

采用上述优选出来的提取条件对阿维菌素菌渣进行提取以验证该工艺的可行性及稳定性。

3 试验结果

3.1 静态提取时间的优化

将待浸提菌渣置于样品槽中，以用量为菌丝体B1a的5倍的乙醇为提取溶剂，分别设置静态提取时间为0min、2min、4min、6min、8min、10min，提取完毕后收集提取液，测定提取液中阿维菌素的效价（ $C_{\text{初始}}$ ）并计量提取液体积（ $V_{\text{初始}}$ ）。结果见图3。

3.2 动态提取流速的优化

以乙醇为提取溶剂，设置静态提取时间为6min，比较不同动态提取流速对阿维菌素提取效果的影响。流速分别设置为1mL/min、2mL/min、3mL/min、4mL/min、5mL/min，动态提取时间保持一致（5min）。提取完毕后收集提取液，测定提取液中阿维菌素效价（ $C_{\text{初始}}$ ）并计量提取液体积（ $V_{\text{初始}}$ ）。结果见图4。

3.3 动态提取时间的优化

以乙醇为提取溶剂，保持动态提取流速为3mL/min，静态提取6min后开始动态提取。动态提取时间分别设置为2min、4min、6min、8min、10min。提取完毕后收集提取液，测定提取液中阿维菌素的效价（ $C_{\text{初始}}$ ）并计量提取液体积（ $V_{\text{初始}}$ ）。结果见图5。

3.4 提取溶剂的选择

保持动态提取流速为3mL/min，静态提取6min后动态提取8min。分别用甲醇、乙醇、氯仿为提取溶剂进行提取。提取完毕后收集提取液，测定提取液中阿维菌素

的效价（ $C_{\text{初始}}$ ）并计量提取液体积（ $V_{\text{初始}}$ ）。结果见图6。

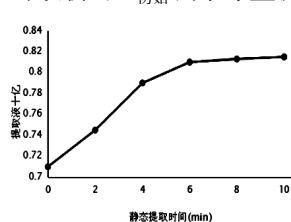


图3 静态提取时间对阿维菌素提取效果

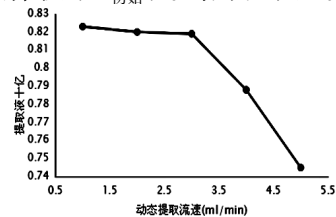


图4 动态提取流速对阿维菌素提取效果

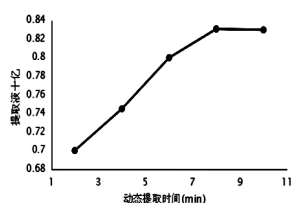


图5 动态提取时间对阿维菌素提取效果

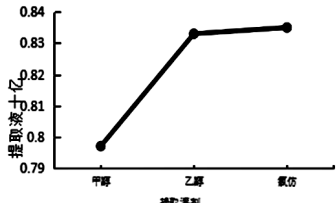


图6 静态提取时间对阿维菌素提取效果

由实验结果可知，静态提取时间达到6min时，提取达到动态平衡，因此最佳静态提取时间为6min。当静态提取时间和动态提取时间保持一定，动态提取流速低于3mL/min时，提取液中阿维菌素的效价维持在相对稳定的水平，动态提取时间对阿维菌素提取效果的影响没有静态提取时间和提取流速那么显著。当动态提取时间达到8min时，提取液中的效价达到最大。就提取溶剂而言，乙醇和氯仿对阿维菌素的提取效果无明显差异，但考虑到氯仿属于第二类有机溶剂，具有致癌性、神经毒性、生殖毒性等，本项目选择乙醇作为提取溶剂。

3.5 工艺稳定性验证

以乙醇为提取溶剂，保持动态提取流速为3mL/min，静态提取6min后开始动态提取8min，平行试验进行5次。结果如图7：

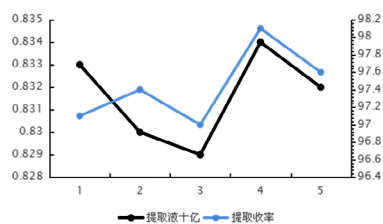


图7 动态超声提取工艺稳定性验证结果

通过5次平行试验结果显示，提取液中的阿维菌素十亿基本在0.83以上，比较稳定，提取收率高达97%，表明该工艺稳定可行。原工艺中采用甲醇对菌渣进行3次浸提，操作过程较为繁琐，而且有机溶剂消耗量大、易燃易爆不利于安全生产，本工艺中采用乙醇结合动态超声提取对菌渣进行一次性浸提，浸提效率可高达97.0%以上。与原工艺相比，本工艺提取效率更高，有机溶剂用量也少一半，降低了溶媒消耗，加之乙醇的价格低于甲醇，并降低了生产成本。

参考文献：

- [1] 何焕君, 邱丽娜, 姚伟芳, 等. 阿维菌素的研究进展 [J]. 生物技术, 2006, 16(6): 84-85.