

# 红曲发酵液中水溶性红曲黄色素的吸附分离

吴振强, 汪梅花, 唐锐, 陈功

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本文考察不同极性大孔树脂、离子交换树脂、活性炭及硅胶等吸附介质对红曲菌深层发酵液中水溶性红曲黄色素的吸附分离性能。结果显示非极性大孔树脂 DA201-C 效果最好, 该吸附过程符合 Freundlich 方程, 吸附动力学符合准一级动力学模型, 表明吸附不受单层吸附的限制; 液膜扩散是吸附主要限速步骤, 扩散速率常数为  $0.16 \text{ min}^{-1}$ 。通过静态和动态吸附洗脱条件优化, 运用 SPSS 对数据进行分析, 发现静态吸附、解吸料液比为 1:2, 吸附、解吸时间 15 min, 解吸液 100%乙醇, 酸性条件解吸效果较好; 动态吸附解吸流速为 0.25 BV/min 条件下, 可得到高回收率 (96.99%)、脱盐率 (99.44%) 和脱糖率 (92.52%) 的水溶性红曲黄色素, 经初步扩大实验显示吸附解吸性能稳定。大孔树脂 DA201-C 分离纯化发酵液中水溶性红曲黄色素操作简单、快速、放大性能好, 具有很好的工业化生产应用价值。

**关键词:** 吸附动力学; 水溶性红曲黄色素; 树脂; 脱盐; 脱糖

文章编号: 1673-9078(2017)6-150-157

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.022

## Adsorption and Separation of *Monascus* Yellow Pigments in *Monascus* Fermentation Broth

WU Zhen-qiang, WANG Mei-hua, TANG Rui, CHEN Gong

(School of Biosciences and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The adsorption and isolation capacities of macroporous resins with different polarities, ion exchange resins, activated carbon, and silica gel on water-soluble yellow pigments of submerged *Monascus* fermentation broths were studied. The results showed that nonpolar macroporous resin DA201-C exhibited the best performance; the adsorption isotherm of DA201-C was well fitted with the Freundlich equation, and the adsorption kinetics followed the *pseudo*-first-order kinetics model, indicating that adsorption was not restricted to monolayer adsorption. Liquid film diffusion was the major rate-limiting step, and the diffusion rate constant was  $0.16 \text{ min}^{-1}$ . The purification conditions were optimized by static and dynamic adsorption and desorption experiments, and the results were analyzed using SPSS software. The optimal desorption performance was achieved when the solid material-to-liquid ratio of static adsorption and desorption was 1:2, both the adsorption and desorption times were 15 min, the eluent was 100% ethanol, and the eluent was acidic. When the flow rate of dynamic adsorption and desorption was 0.25 BV/min, the water-soluble *Monascus* yellow pigments could be obtained with high recovery (96.99%), desalination (99.44%), and desugarization rate (92.52%). The preliminary scale-up experiment showed a stable adsorption and desorption efficiency. In conclusion, the method using DA201-C resin to isolate and purify the water-soluble *Monascus* yellow pigments in fermentation liquid is easy to operate, has a short cycle and good performance in a scale-up experiment, and shows a great application value in industrial production.

**Key words:** adsorption kinetics; water-soluble *Monascus* yellow pigments; resin; desalination; desugarization

红曲色素是由红曲菌发酵生产的一种天然食用色素, 传统上是通过红曲霉发酵红曲米提取得到, 这类色素主要可由红曲红色素、黄色素和橙色素等组成, 这类色素一般不溶于水, 易溶于极性较大有机溶剂如乙醇或丙酮。基于其非水溶性, 在食品中的应用受到

收稿日期: 2016-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271925); 广东省教育部产学研结合项目 (2013B090600015); 广州市科技计划项目 (2014J4100192)

作者简介: 吴振强 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程、生物工程、生物化工、生态环境、大健康产业领域理论与应用研究

较大的限制。近年来以液体发酵生产的红曲色素有些具有良好的水溶性。Chen 等<sup>[1]</sup>通过单一补加碳源 (葡萄糖) 进行高密度发酵使得红曲霉液体发酵胞外水溶性红曲黄色素大量增加, 但发酵液中存在高于  $25 \text{ g/L}$  的残糖, 增加了发酵液的粘度, 加大了后期水溶性红曲黄色素产品分离和纯化的难度。研究发现水溶性红曲色素的热稳定性、耐光照、抗氧化剂和耐还原剂的性能较好, 因此具有广阔的应用前景和重大的经济效益<sup>[2]</sup>, 但目前对红曲发酵液中水溶性黄色素的分离纯化的研究报道相对较少。

目前, 基于固体界面上的吸附分离过程在工业和环保领域发挥着重要的作用, 吸附介质如大孔树脂已被广泛应用于药物及生物活性物质的富集和分离<sup>[3,4]</sup>, 其吸附作用是依靠和被吸附的分子(吸附质)之间的范德华引力, 或通过巨大的比表面进行物理吸附而实现, 后经一定溶剂洗脱而达到分离、纯化、除杂等目的<sup>[5-7]</sup>。容艳筠等利用 9 种大孔吸附树脂对红曲红发酵后压滤产的废液进行红曲红色素回收, 研究证明大孔吸附树脂 NKA 对废液中红曲红色素的吸附率和洗脱率可达到 60%, 且大大减少废液中的 COD 值(下降约 45.7%)<sup>[8]</sup>。通过大孔树脂吸附法不仅可回收废液中的色素还可显著降低污水处理的成本, 这对于红曲红工业生产来说是非常有益的。本研究根据红曲发酵液中水溶性红曲黄色素与无机盐、多糖、蛋白质等杂质成分分子大小的不同, 采用大孔吸附树脂将水溶性红曲黄色素进行提纯分离, 消除发酵液中残糖和无机盐等杂质残留, 为高纯度水溶性红曲黄色素制备提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

发酵菌株红曲霉菌 (*Monascus ruber*) WQ15 为实验室筛选分离得到的产水溶性红曲黄色素优质菌, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心、保藏编号为 CGMCC No.10910; 树脂 (732、711、DA201-C、D150、LX-38、XDA-B, 郑州勤实科技有限公司)、柱层层析硅胶 (100-200 目, 青岛海洋化工厂分厂)、粒状活性炭 (分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司)、其他试剂 (分析纯) 均购于市面。

ZWYR-D2402 型摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司); UV-2802S 型紫外可见分光光度计 (上海优尼柯仪器有限公司); DDS-307 型电导率仪 (上海精密仪器仪表有限公司)。

### 1.2 水溶性红曲黄色素发酵液的制备

#### 1.2.1 培养基

种子培养基 (组分 g/L): 葡萄糖 20, 酵母浸粉 3, 鱼粉蛋白胨 10, KCl 0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, pH 自然。

发酵培养基 (组分 g/L): 葡萄糖 150,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, KCl 0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.03, pH 自然。

#### 1.2.2 培养方法

将划线于平板上的红曲霉 WQ15 种子接种于灭菌的种子培养基中进行培养增殖, 即 50 mL 种子培养基

接种 5 个培养 7 d 的单菌落, 30 °C、180 r/min 培养 25 h, 使种子培养基有成熟的孢子, 得到种子液。将种子液按 8% 接种量 (V/V) 接种到发酵培养液中, 30 °C、180 r/min 发酵培养 9 d, 得到水溶性红曲黄色素发酵液。

### 1.3 发酵液中水溶性红曲黄色素分离

#### 1.3.1 发酵液的预处理

将液态发酵 9 d 的红曲霉菌发酵液用快速精密滤纸进行抽滤, 得滤液。

#### 1.3.2 吸附介质的预处理

购买的树脂用 95% 乙醇溶液浸泡 12 h, 首先用乙醇冲洗, 洗到流出的乙醇无浑浊, 再用蒸馏水洗至无醇味; 然后用 4% HCl 浸泡 4 h, 用水洗至中性, 再用 4% NaOH 浸泡 4 h, 用水洗至中性, 重复 2 次, 湿法保存备用<sup>[5-7]</sup>。硅胶和活性炭都是买过了直接使用, 没有进行预处理。

#### 1.3.3 水溶性红曲黄色素吸附介质的筛选

吸附介质筛选: 精确称取 2 g 预处理过的湿树脂和其他吸附介质 (硅胶和活性炭) 于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 发酵液滤液, 180 r/min、25 °C 吸附 30 min, 取出抽滤, 测定滤液体积  $V_1$  和吸光度  $A_1$  (蒸馏水做空白对照)。将吸附过水溶性红曲黄色素的滤饼 (吸附介质) 置于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 75% 乙醇水溶液静态洗脱 30 min, 取出抽滤, 得到洗脱液, 测定洗脱液体积  $V_2$  和吸光度  $A_2$  (75% 乙醇水溶液做空白对照)。考察各吸附介质吸附解吸效果, 基于吸附介质吸附解吸效果筛选一种最佳吸附介质进行下述实验。

#### 1.3.4 最佳吸附介质的静态吸附影响因素探究

##### 1.3.4.1 静态吸附的影响因素实验

以树脂用量 2 g, 水溶性红曲黄色素溶液 4 mL, 振荡吸附时间 30 min, 吸附温度 25 °C 为基本实验条件。在基本条件保持不变的情况下, 分别改变料液比和吸附温度, 研究各因素对树脂吸附色素过程的影响。实验单因素水平如下: 料液比 1:2、1:5、1:10、1:20 和 1:50; 实验温度 15、25、35、45、55 °C。

##### 1.3.4.2 静态吸附中等温吸附实验和最佳吸附介质的吸附动力学研究

等温吸附实验: 精确称取 2 g 预处理过的湿树脂于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 处理过后的不同浓度 (289.8、161.47、80.74、53.82、40.37 AU<sub>350</sub>/mL) 的水溶性红曲黄色素溶液, 在 25 °C、180 r/min 下进行震荡吸附, 待树脂达到吸附平衡, 取样测定溶液残留水溶性红曲黄色素浓度, 计算树脂的吸附量。根据以下两个理论公式, 采用 origin 8.0 的线性拟合, 做出 Langmuir 等温吸附方程和 Freundlich 等温吸附曲线<sup>[4]</sup>。

Langmuir 方程及变形:  $q_e = q_m K_L C_e / (1 + K_L C_e)$

$$1/q_e = 1/q_m + 1/(q_m K_L) \cdot 1/C_e \quad (1)$$

Freundlich 方程及变形:  $q_e = K_F C_e^{1/n}$

$$\ln q_e = 1/n \cdot \ln C_e + \ln K_F \quad (2)$$

吸附动力学实验: 精确称取 2 g 预处理过的湿树脂于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 预处理过的发酵液, 塞 25 °C、180 r/min 吸附 30 min, 间隔一定的时间取出, 测定滤液中水溶性红曲黄色素的吸光度 (蒸馏水做空白对照)。根据以下模型方程, 采用 origin 8.0 的线性拟合, 分别做出准一级动力学模型, 准二级动力学模型以及 Weber-Morris 模型控制曲线<sup>[4]</sup>。

准一级动力学模型方程及变形:  $\ln(q_e - q_t) = -k_1 t + \ln q_e$

$$-\ln(1-F) = k_1 t \quad (3)$$

准二级动力学模型方程及变形:  $t/q_t = 1/(k_2 q_e^2) + t/q_e$

$$1-(1-F)^{1/3} = k_2^* t \quad (4)$$

Weber-Morris 模型方程及变形:  $q_t = k_3 t^{1/2} + C$

$$1-3(1-F)^{2/3} + 2(1-F) = k_3^* t \quad (5)$$

其中  $F = q_t/q_e$

式中:  $q_t$ ,  $q_e$  和  $q_m$ -树脂在 t 时间, 吸附平衡状态, 最大吸附状态时对水溶性红曲黄色素的吸附量 (AU/g 湿树脂);  $C_e$ -平衡浓度 (AU/mL); t-时间 (min);  $K_L$ ,  $K_F$ -树脂的吸附平衡常数;  $1/n$ -树脂的吸附强度;  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_2^*$  和  $k_3^*$ -准一级, 准二级以及 Weber-Morris 动力学模型的速率常数以及变形后常数;  $C$ -颗粒扩散模型的常数。

### 1.3.5 静态解吸实验的影响因素

以树脂用量 2 g, 解吸剂 4 mL、75%乙醇, 振荡解吸时间 30 min, 温度 25 °C 为基本实验条件。在基本条件保持不变的情况下, 分别改变解吸时间、解吸剂浓度、解吸温度和溶液 pH 值, 研究各因素对树脂解吸色素过程的影响。实验单因素水平如下: 解吸时间 5、10、15、30、45、60、75、90 min; 解吸剂浓度 25%、50%、75% 和 100% 乙醇溶液; 解吸温度 15、25、35、45、55 °C; 解吸液 pH 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0。

吸附率、解吸率、回收率相关计算公式如下:

$$\text{吸附率} = (A_0 \times V_0 - A_1 \times V_1) / (A_0 \times V_0) \times 100\%$$

$$\text{解吸率} = A_2 \times V_2 / (A_0 \times V_0 - A_1 \times V_1) \times 100\%$$

$$\text{回收率} = A_2 \times V_2 / (A_0 \times V_0) \times 100\%$$

式中:  $A_0$ -发酵液滤液吸光度;  $V_0$ -发酵液滤液体积, mL;  $A_1$ -吸附后滤液吸光度;  $V_1$ -吸附后滤液体积, mL;  $A_2$ -解吸液吸光度;  $V_2$ -解吸液体积, mL;

### 1.3.6 动态解吸实验的影响因素

称取一定量预处理过的湿树脂装入层析柱, 考察洗脱液流速、层析柱装树脂容量等对水溶性红曲黄色素解吸效率的影响, 以及发酵液中糖与盐的去除率, 确定最佳洗脱参数。

(1) 分别取 2 g 湿树脂 DA201-C 装入常压层析玻璃柱 ( $\Phi 15 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ )、使用玻璃棒引流沿着柱壁缓慢加入 2 倍柱体积 (BV) 水溶性红曲黄色素溶液 (体积  $V_0$ 、色价  $A_0$ 、糖浓度  $A_0^*$ 、电导率  $K_0$ )。同时打开底阀, 控制流出速度分别为 0.15 BV/min、0.25 BV/min、0.4 BV/min、0.5 BV/min, 收集吸附后溶液, 分析体积  $V_1$  和色价  $A_1$ 。然后用 2 BV 的不同浓度的乙醇水溶液 (25%、50%、75% 和 100%) 进行梯度洗脱, 洗脱速度分别为 0.15 BV/min、0.25 BV/min、0.4 BV/min 和 0.5 BV/min, 收集洗脱液, 分析体积  $V_2$ 、色价  $A_2$ 、糖浓度  $A_2^*$  和电导率  $K_2$ 。

(2) 分别取 2 g、10 g 湿树脂 DA201-C 分别装入直径相同、长度不同的两根常压层析玻璃柱 ( $\Phi 15 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ 、 $\Phi 15 \text{ mm} \times 305 \text{ mm}$ )、然后分别缓慢加入 8 mL、40 mL 发酵液滤液 (体积  $V_0$ 、色价  $A_0$ 、糖浓度  $A_0^*$ 、电导率  $K_0$ )。同时打开底阀, 控制流出速度为 0.25 BV/min, 收集吸附后溶液, 分析  $A_1$  和  $V_1$ 。然后用 4 BV 的去离子水冲洗树脂 (流速 0.5 BV/min), 最后分别用 2 BV 的不同浓度的乙醇水溶液 (25%、50%、75% 和 100%) 进行梯度洗脱, 洗脱速度相应为 0.25 BV/min, 收集洗脱液, 分析体积  $V_2$ 、色价  $A_2$ 、糖浓度  $A_2^*$  和电导率  $K_2$ 。

吸附率、洗脱率和回收率计算公式与 1.3.3 相同。

$$\text{脱糖率} = A_2^* \times V_2 / (A_0^* \times V_0) \times 100\%$$

$$\text{脱盐率} = K_2 / K_0 \times 100\%$$

式中:  $A_2^*$ -洗脱液中还原糖浓度, g/L;  $A_0^*$ -发酵液中残糖浓度, g/L;  $K_2$ -洗脱液电导率, mS/cm;  $K_0$ -吸附前溶液电导率, mS/cm。

### 1.3.7 分析方法

盐度的测定采用电导率法<sup>[9]</sup>。

残糖浓度测定采用 DNS 法<sup>[10]</sup>。

水溶性红曲黄色素浓度采用紫外分光光度法, 分别测定吸附前发酵液、吸附后滤液以及解吸液中特征波长 350 nm (光谱扫描显示单吸收峰的最大值波长) 处的吸光度<sup>[11]</sup>。

水溶性红曲黄色素纯化前后色素纯度的化学表征测定采用 HPLC 法, 色谱条件为: C18 色谱柱 (4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 柱温: 30 °C; 流动相: 色谱纯 20% 乙腈:80% 磷酸水 (pH 为 2.5); 流速: 1 mL/min; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 350 nm; 上样量: 20  $\mu\text{L}$ <sup>[12]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 水溶性红曲黄色素吸附介质的筛选

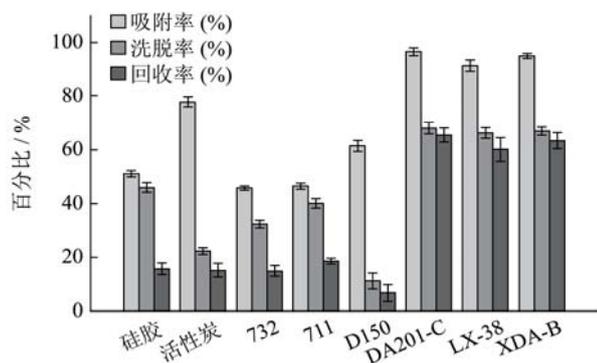


图1 不同吸附介质对水溶性红曲黄色素的吸附解吸性能

Fig.1 Adsorption and desorption efficiency of different adsorption media on water-soluble *Monascus* yellow pigments

本研究考察了阴阳离子交换树脂(711、732、D150)、大孔非极性树脂(DA201-C)、大孔弱极性树脂(XDA-B)、大孔极性树脂(LX-38)以及其他吸附介质(活性炭与硅胶)对水溶性红曲黄色素的吸附性能。结果发现,大孔树脂DA201-C、XDA-B、LX-38对水溶性红曲黄色素吸附及洗脱性能较好,其中大孔非极性树脂DA201-C最好,吸附率达96.6%、一次洗脱率达70.87%,如图1所示。活性炭的吸附率可达到77.71%,但其解吸率较低,一次洗脱率仅为22.44%左右。离子交换树脂和硅胶的吸附效果都较差。

非极性树脂DA201-C对水溶性红曲黄色素具有较高的吸附率和解吸率,可能是因为它们特性相近。非极性树脂由很多的偶极矩较小的单体聚合而成,表面疏水性很强,水溶性红曲黄色素中疏水性基团能够通过范德华力或氢键作用优先被吸附在树脂的网孔机构的疏水性面上。该结果与红曲红色素的吸附结果相反,据连喜军报道,阴阳离子交换树脂对红曲红色素的吸附解吸能力较强,而大孔树脂对红曲红色素的吸附解吸能力都不佳,原因可能是与红曲红色素的主要结构基团-NH<sup>2</sup>或-N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>相关<sup>[13]</sup>。解吸过程中,推测水溶性红曲黄色素通过疏水作用吸附在DA201-C树脂上,吸附力相对较弱,添加介质(乙醇)可以改变吸附体系的亲水-疏水平衡,将水溶性红曲黄色素从树脂上解吸下来<sup>[14]</sup>。故后续实验选择非极性大孔树脂DA201-C为吸附介质。

## 2.2 非极性大孔树脂静态吸附性能的影响因素

### 2.2.1 料液比对静态吸附的影响

水溶性红曲黄色素吸附效率与添加的树脂量有关,一般情况下,树脂量越大,吸附率就越高。本实验条件下,料液比为1:2时,吸附率最高为98.95%,

如图2a所示。随着料液比增加,吸附率减少,当料液比为1:5时,吸附率还可达到93.25%,但料液比为1:50时,吸附率仅为18.34%。考虑到其它优化因素可以协同提高吸附率,综合成本因素,认为1:2~1:5的料液比范围比较适合本水溶性红曲黄色素样品的吸附分离。

### 2.2.2 温度对静态吸附的影响

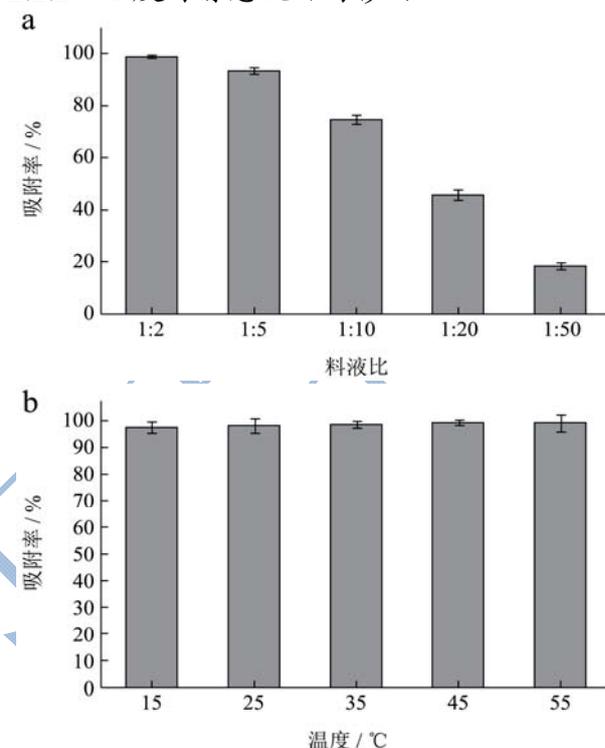


图2 大孔树脂DA201-C吸附性能的单因素分析

Fig.2 Single-factor analysis of the adsorption capacity of DA201-C resin

注: a表示料液比; b表示温度。

通常提高温度有利于分子运动和物质扩散,在本实验15℃~55℃范围内,当温度为15℃时,吸附率达到97.62%,随着温度的升高,DA201-C树脂对于水溶性红曲黄色素的吸附率略有提高,但并不显著。因此,DA201-C树脂对水溶性红曲黄色素的吸附率可以在常温下进行。

## 2.3 吸附性能等温线

吸附等温线是吸附平衡的具体描述,是指一定温度下吸附质分子在两相界面上进行吸附过程达到平衡时它们在吸附剂中浓度和溶液中浓度之间的函数关系曲线,它不但与物性有关,还与温度有关,是选择性吸附的依据。为考察样品性质与树脂吸附能力的关系,我们对等温吸附实验得到的相关实验数据经过origin 8.0的线性拟合,做出Langmuir等温吸附方程和Freundlich等温吸附方程。由线性方程的决定系数 $R^2$

的对比可知, Freundlich 方程的拟合程度更好 (图 3), 说明 Freundlich 等温吸附方程能更好地描述 DA201-C 树脂对色素的吸附过程。1/n 值表示吸附进行的难易程度, 与物性和温度有关, 当 1/n 在 0.1~0.5 之间时, 吸附容易进行。式中 1/n=0.46, 说明 DA201-C 树脂对色素的吸附过程较容易, 吸附剂表面的活性吸附位点的分布是不均匀的, 吸附不受单层吸附的限制<sup>[4]</sup>。

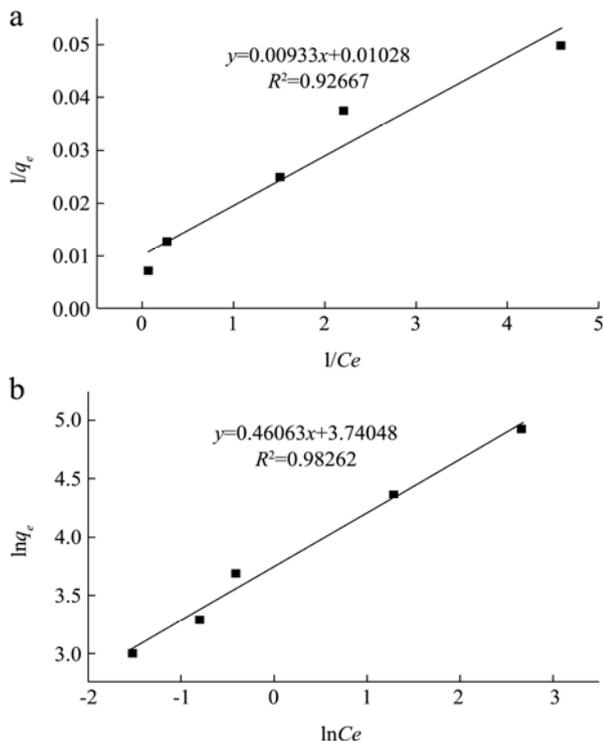


图 3 等温吸附方程拟合曲线

Fig.3 Linear fitting curves of adsorption isotherm equations

注: a 表示 Langmuir 方程; b 表示 Freundlich 方程。

## 2.4 吸附动力学模型

实验结果发现, DA201-C 对水溶性红曲黄色素的吸附迅速, 静态吸附 15 min 左右吸附率接近最大值, 基本达到吸附平衡 (图 4a), 继续吸附随着时间的延长无明显变化, 说明 DA201-C 对水溶性红曲黄色素的吸附是一个快速吸附平衡过程, 这有利于缩短生产周期, 在工业生产上具有很好的应用潜力。

将图 4a 中相关数据用于三种吸附动力学模型, 包括准一级、准二级和 Weber-Morris 模型, 进行拟合, 得到图 4b、4c 和 4d。三条模型曲线均未过原点, 其中  $-\ln(1-F)$  与  $t$  的线性关系最好,  $R^2=0.96$ ,  $k=0.16 \text{ min}^{-1}$ , 其次是  $1-(1-F)^{1/3}$  和  $1-3(1-F)^{2/3}+2(1-F)$ , 因此 DA201-C 树脂对发酵液中水溶性红曲黄色素的吸附动力学过程可以用准一级模型进行很好的描述, 说明液膜扩散是本吸附的主要控速步骤, 同时还受到化学反应及颗粒扩散的影响<sup>[4]</sup>。

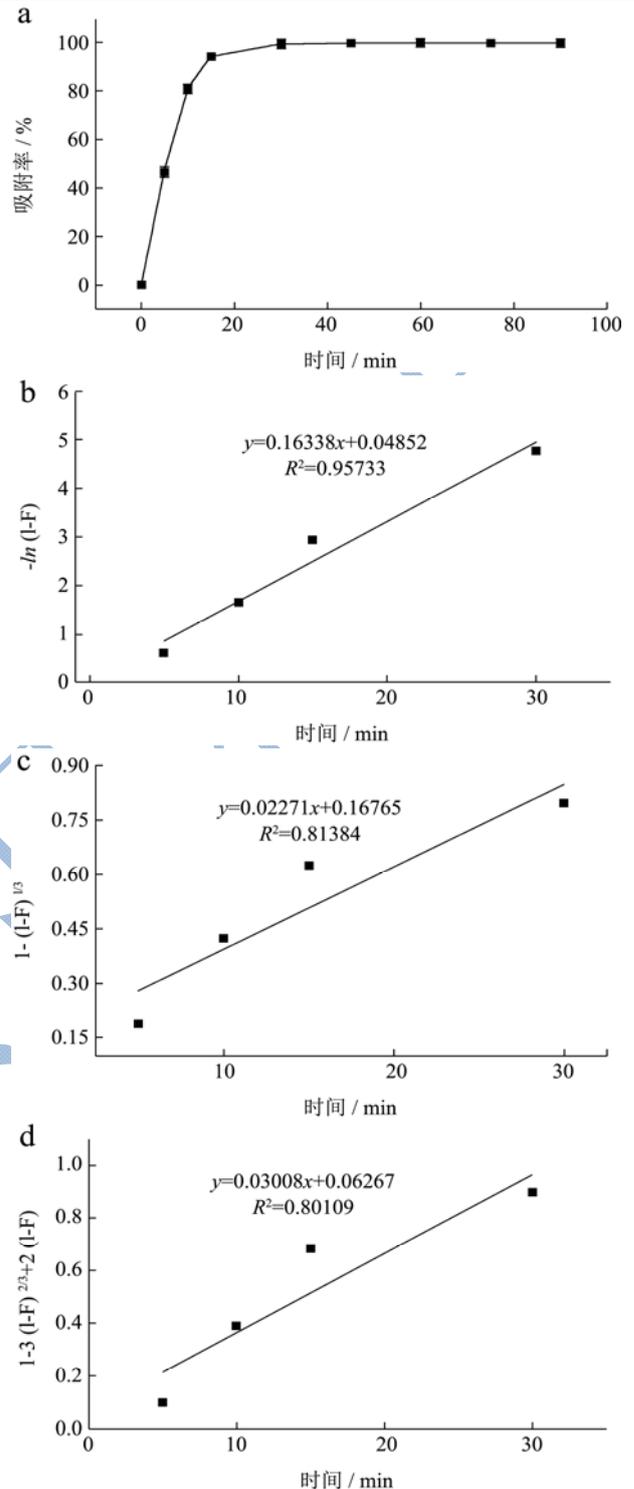


图 4 树脂 DA201-C 对水溶性红曲黄色素的吸附动力学模型分析

Fig.4 Kinetic model analysis of the adsorption of water-soluble

Monascus yellow pigment using DA201-C resin

注: a 表示吸附曲线; b 表示准一级模型; c 表示准二级模型; d 表示 Weber-Morris 模型。

## 2.5 解吸分离性能

### 2.5.1 静态解吸

#### 2.5.1.1 时间对静态解吸的影响

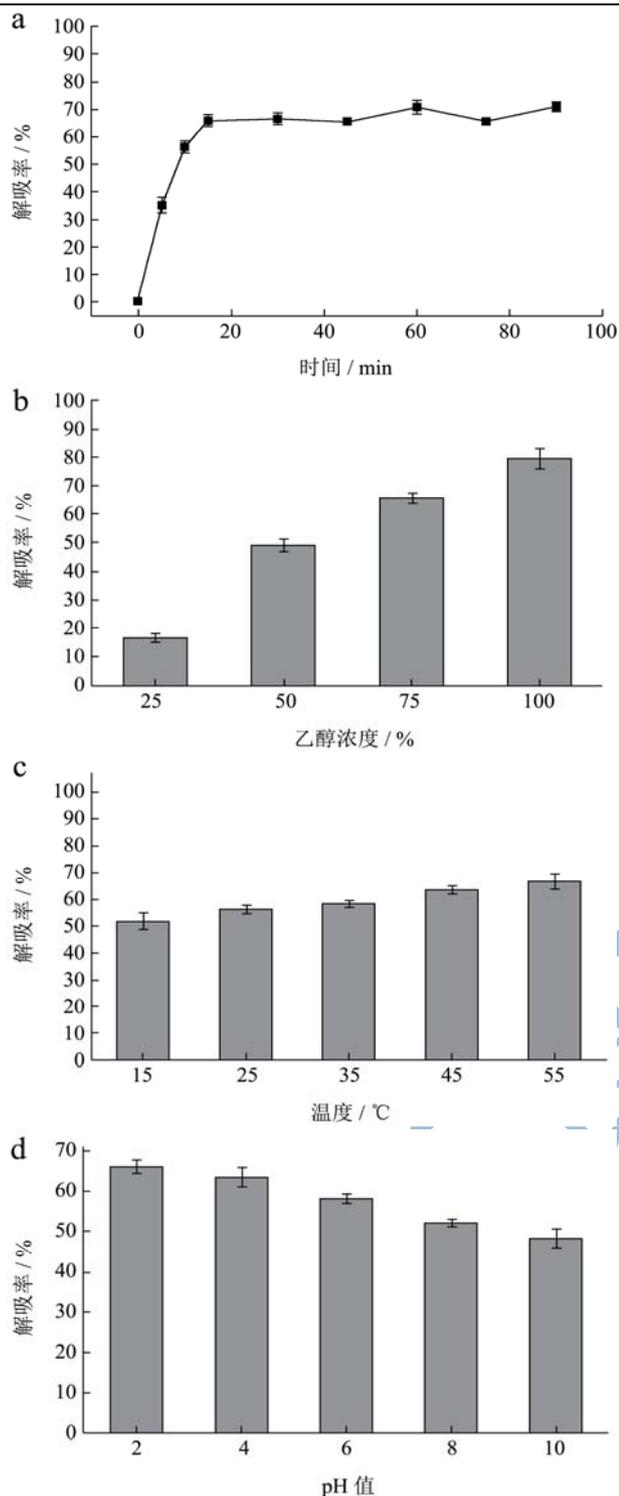


图5 大孔树脂 DA201-C 解吸性能的单因素分析

Fig.5 Single-factor analysis of the desorption capacity of DA201-C resin

注: a 表示时间; b 表示乙醇浓度; c 表示温度; d 表示 pH 值。

与吸附性能相似, DA201-C 树脂对水溶性红曲黄色素的解吸迅速, 静态解吸 15 min 左右, 解吸率接近最大值 (图 5a), 随着时间的延长, 解吸率无明显提高, 说明大孔吸附树脂 DA201-C 对水溶性红曲黄色素

的解吸是一个快速平衡过程, 适合于水溶性红曲黄色素的吸附分离。

### 2.5.1.2 洗脱剂浓度对静态解吸的影响

实验发现, 随着洗脱剂 (乙醇) 浓度的升高, 水溶性红曲黄色素的洗脱率越高, 如图 5b 所示, 采用 100%乙醇作为洗脱剂进行一次洗脱, 水溶性红曲黄色素回收率可达到 79.85%, 这因为高乙醇浓度可使得大孔树脂 DA201-C 更充分溶胀, 调节待分离物质、大孔树脂和洗脱溶剂之间相互作用力, 增大了对待分离有机物质的溶解度, 待分离有机物就容易被溶解到洗脱溶剂中被洗脱下来, 解吸出更多的水溶性红曲黄色素。

### 2.5.1.3 温度对静态解吸的影响

解吸是一个吸热过程, 在一定程度上受到温度的影响。随着温度的升高, 水溶性红曲黄色素的解吸率也逐渐提高, 在 55 °C 条件下, 大孔吸附树脂 DA201-C 对水溶性红曲黄色素的解吸率可达 66.73%, 如图 5c 所示。在解吸温度从 15 °C 升高到 55 °C 时, 色素解吸率仅提高 28.65%, 但提供温度将增加能耗, 而且温度越高, 水溶性红曲黄色素被破坏的风险就越大。综合考虑, DA201-C 树脂对水溶性红曲黄色素的解吸过程可以在室温下进行, 避免额外的加热或冷却装置, 结合其它因素进一步提高解吸率。

### 2.5.1.4 pH 值对静态解吸的影响

pH 对解吸的影响主要是因为影响化合物所带的电荷, 从而影响树脂与被吸附物之间的静电作用和氢键结合。实验结果显示, 酸性条件比碱性条件更适合于水溶性红曲黄色素的解吸, 如图 5d 所示, 这可能与色素的弱酸性相关。当 pH 值为 2.0~4.0 时, DA201-C 对水溶性红曲黄色素的解吸率变化较小, pH 为 6.0 以上时, 随着 pH 值增加, DA201-C 对水溶性红曲黄色素的解吸下降较大, 故大孔吸附树脂 DA201-C 对水溶性红曲黄色素的解吸适合在酸性条件下 (pH 4 以下) 进行。

## 2.5.2 动态解吸

### 2.5.2.1 不同流速对水溶性红曲黄色素解吸的影响

采用 DA201-C 树脂动态吸附、解吸时, 速度越小, 树脂对水溶性红曲黄色素的吸附、解吸效果越好, 见表 1。这是因为越低的流速, 水溶性红曲黄色素分子在树脂中停留时间越久, 接触越充分, 越有利于其吸附; 同样, 解吸液流动速度越小, 越有利于水溶性红曲黄色素的解吸。但是较低的流速延长了水溶性红曲黄色素纯化的操作周期, 降低水溶性红曲黄色素纯化的效率, 而当流速为 0.25 BV/min 时洗脱率可达到 93.98%, 较之 0.15 BV/min 流速下仅少 2.23%, 但时间却节省了 40%。所以我们选择 0.25 BV/min 作为大

孔树脂 DA201-C 纯化水溶性红曲黄色素的最佳流速。

表 1 流速对 DA201-C 树脂吸附及解吸效果的影响

Table 1 Effect of flow rate on adsorption and desorption efficiency of DA201-C resin

流速/(BV/min)	吸附率/%	洗脱率/%	回收率/%
0.15	98.01±1.02	96.21±0.82	94.29±0.22
0.25	98.00±0.88	93.98±2.49	92.10±1.11
0.4	96.74±1.28	83.40±1.89	80.67±2.10
0.5	94.27±1.88	79.35±1.42	74.80±1.56

2.5.2.2 DA201-C 树脂对红曲黄色素分离的纯化效果

表 2 动态洗脱装置的扩大对 DA201-C 纯化色素的影响

Table 2 Effect of the scale-up of the dynamic elution device on the purification of pigments by using DA201-C resin

树脂用量/g	色素吸附率/%	色素回收率/%	去盐率/%	去糖率/%
2	98.49±0.61	96.99±0.92	99.44±2.53	92.52±2.01
10	98.80±1.21	96.76±1.98	99.23±1.11	92.52±1.52

2.5.2.3 HPLC 对纯化前后水溶性红曲黄色素纯度的化学表征

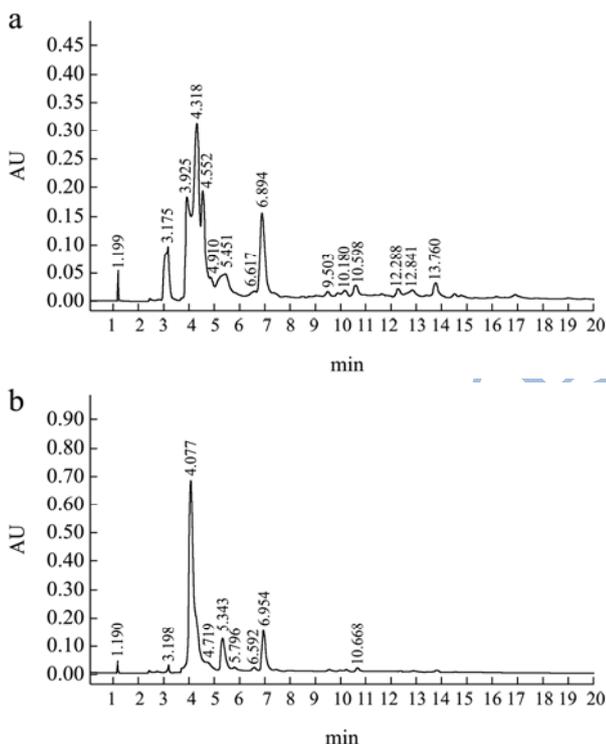


图 6 HPLC 对纯化前后水溶性红曲黄色素纯度的化学表征

Fig.6 Chemical characterization of the purity of water-soluble *Monascus* yellow pigments before and after purification by HPLC

注：a，纯化前；b，纯化后。

分别对 10 g 树脂动态洗脱前后的水溶性红曲黄色素进行 HPLC 检测，并分析大孔树脂 DA201-C 的纯化效果。如图 6 所示，可以看出，树脂纯化后水溶性红曲黄色素溶液中杂质峰个数明显减少，发酵液中水溶性红曲黄色素经大孔树脂 DA201-C 分离纯化后，可

由表 2 可知，采用了 2 g 和 10 g 大孔树脂 DA201-C 分别组成两种柱子层析装置纯化水溶性红曲黄色素，前者水溶性红曲黄色素的回收率可达到 96.99%，去盐率为 99.44%，去糖率为 92.52%，后者回收率可达到 96.76%，去盐率为 99.23%，去糖率为 92.52%，如表 2 所示。组间差异比较采用 SPSS 统计软件进行分析 ( $p=0.938>0.05$ ,  $p=0.610>0.05$ ,  $p=0.798>0.05$ )，说明两个小规模层析分离装置的洗脱效果无显著性差异，可以认为大孔树脂 DA201-C 层析分离水溶性红曲黄色素是可行的。

明显减少杂质的种类和含量，获得一定纯度的水溶性红曲黄色素。

### 3 结论

非极性大孔吸附树脂 DA201-C 对红曲霉深层发酵产水溶性红曲黄色素有很好的吸附解吸性能，优于极性大孔树脂、离子交换树脂、活性炭和硅胶介质。常温、料液比为 1:2 条件下，DA201-C 对发酵液水溶性红曲黄色素吸附率达到 98.95%；酸性条件有利于解吸，采用 100%乙醇解吸液、0.25 BV/min 流速、常温加样进行动态吸附与解吸，水溶性红曲黄色素的回收率可达 96.99%，脱盐率可达 99.44%，脱糖率可达 92.52%，经 HPLC 的鉴定可知树脂纯化后可获得一定纯度的水溶性红曲黄色素。大孔树脂 DA201-C 分离纯化发酵液中水溶性红曲黄色素具有操作简单、周期短、放大性能好等特点，为红曲水溶性黄色素工业化生产提供依据。

### 参考文献

[1] Chen G, Shi K, Song D, et al. The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of *Monascus anka* mycelia [J]. BMC Biotechnology, 2015, 15(72): 1-9

[2] Feng Y, Shao Y, Chen F. *Monascus* pigments [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(6): 1421-1440

[3] 朱义福,李文锋,郑明英,等.大孔吸附树脂分离纯化谷胱甘肽的工艺研究[J].现代食品科技,2013,7:1641-1644

ZHU Yi-fu, LI Wen-feng, ZHENG Ming-ying, et al. Isolation and purification of GSH by macroporous resin [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 7: 1641-1644

[4] Dong Y, Zhao M, Sun-Waterhouse D, et al. Absorption and

- desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins [J]. Food Chemistry, 2015, 168: 538-545
- [5] Mills G C. Removal of salts from aromatic amino acids, their metabolites and related compounds using an xad-4 resin [J]. Journal of Chromatography, 1986, 335: 193-200
- [6] 夏光华, 申铨日, 酒志强, 等. 大孔树脂对罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽脱盐作用的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(5): 1052-1056  
XIA Guang-hua, SHEN Xuan-ri, JIU Zhi-qiang, et al. Desalination of macroporous absorption resin on antioxidant peptides from *Tilapia* skin collagen [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1052-1056
- [7] Zhen B, Chen X, Han D, et al. An alternative method for the decoloration of  $\epsilon$ -poly-L-lysine eluate by macroporous resin in the separation and purification of  $\epsilon$ -poly-L-lysine from fermentation broth [J]. Food and Bioproducts Processing, 2015, 95: 332-338
- [8] 容艳筠, 李英明. 大孔吸附树脂吸附红曲红色素提取废液的研究[J]. 中国食品添加剂, 2012, 1: 154-157  
RONG Yan-jun, LI Ying-ming. The research of macroporous adsorption resin adsorbing monascus red pigment extraction wastewater [J]. China Food Additives, 2012, 1: 154-157
- [9] 马永香, 华欲飞, 孔祥珍, 等. 离子交换树脂对大豆糖蜜上清液脱盐脱色工艺的研究[J]. 中国油脂, 2013, 38(1): 70-75  
MA Yong-xiang, HUA Yu-fei, KONG Xiang-zhen, et al. Effect of ion exchange resin on desalination and decoloration of supernatant of soybean molasses [J]. China Oils and Fats, 2013, 38(1): 70-75
- [10] Shi K, Song D, Chen G, et al. Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(2): 145-154
- [11] 吴振强, 汪梅花, 陈功. 通过高碳源发酵获得胞外水溶性红曲黄色素的方法及应用: 中国专利, CN201510450416.8 [P] 2015-11-4  
WU Zhen-qiang, WANG Mei-hua, CHEN Gong. An approach to achieving extracellular water-soluble *Monascus* yellow pigment by high carbon resource fermentation and its application: China Patent, CN201510450416.8 [P] 2015-11-4
- [12] Zheng Y, Xin Y, Guo Y. Study on the fingerprint profile of *Monascus* products with HPLC-FD, PAD and MS [J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 705-711
- [13] 连喜军, 王昌禄, 顾晓波, 等. 树脂法分离红曲红色素的研究[J]. 食品工业科技, 2003, 8: 81-83  
LIAN Xi-jun, WANG Chang-lu, GU Xiao-bo, et al. Isolation of *Monascus* red pigments by macroporous resin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2003, 8: 81-83
- [14] Cheison S C, Wang Z, Xu S. Use of macroporous adsorption resin for simultaneous desalting and debittering of whey protein hydrolysates [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2007, 42(10): 1228-1239