

# 利用酒精糟沼气发酵废液提取维生素 B<sub>12</sub>

河南省南阳酒精厂

维生素 B<sub>12</sub> 是治疗贫血、肝炎、神经系统等疾病的药品。我国目前生产的这种药品主要是从链霉素废液中提取的,最近也有从庆大霉素废液中提取的,有的单位还研究用丙酸菌发酵法生产也已取得成功。前两种发酵液含维生素 B<sub>12</sub> 很少,产量不大,后者虽然含量高,但发酵原料需要葡萄糖和玉米浆以及营养盐类,而且都需要粮食。

我厂广大职工在毛主席无产阶级革命路线指引下,发扬自力更生、艰苦奋斗的革命精神,大搞技术革新和技术革命,向酒精糟沼气发酵后的废水要宝,开展科学实验工作。参加实验的工人和技术人员,在实验过程中,不当伸手派,没有设备,就自己动手土法上马,修旧利废。缺少房子,就在露天下日夜奋战,为革命,大干社会主义。经过一百多次的试验,首先闯过了维生素 B<sub>12</sub> 两次水提关。继之又突破了层析、结晶两道工序,终于制成了维生素 B<sub>12</sub> 晶体,产品质量完全符合药典规定标准,临床使用疗效良好。这种方法可不用粮食,节省发酵设备,用钢材少,它为我国生产维生素 B<sub>12</sub> 开创了新的途径。

## 酒精糟沼气发酵过程

### 一、沼气发酵菌种——活性污泥的驯化

采集酒精糟贮池污泥和屠宰场臭水沟污泥共约 800 升,加入中和到 pH8.8 的酒精糟 200 升,保温 33—35℃,发酵 50 天,陆续增添酒精糟,使逐步扩大到 2000 升。

### 二、沼气发酵

将驯化好的活性污泥作为菌种,接种于密闭水泥池中,池内预先投入中和到 pH8.8 的酒精糟 20 立方米,接种后温度 46℃,5 天后开始产气。以后每天把发酵池中发酵好的消化液放出 1/5,然后再加入新酒精糟到原来液面,发酵过程中应将 pH 值控制在 7.5—8.0,发酵温度在 50℃ 左右。

在沼气发酵液中产生维生素 B<sub>12</sub>, 主要是甲烷细菌的作用。所以造成甲烷细菌繁殖的良好条件是产生维生素 B<sub>12</sub> 的关键。通过实践使我们体会到在沼气发酵过程中应注意以下几个问题:

1. 沼气发酵液 pH 值的高低是甲烷菌发酵旺盛与否的主要指标。pH 升高到 8.0 左右,说明甲烷菌发酵

旺盛,产生维生素 B<sub>12</sub> 多。反之,pH 下降到 7 以下,说明甲烷菌发酵不良,产生维生素 B<sub>12</sub> 少,甚至不产生。

2. 温度对发酵速度关系很大,过高则杀死甲烷菌,过低发酵缓慢,实验证明,发酵温度以 50—55℃ 为好。

3. 掌握好每天放出发酵液及加入新酒精糟的数量。每天放出发酵液量应为总容量的 1/5 左右为好,并随时补进新酒精糟,以保持甲烷菌经常处于发酵旺盛状态。

## 维生素 B<sub>12</sub> 的提取

### 一、工艺流程

消化液→酸处理 (pH2.5)→澄清→活性白土吸附→碱性解吸→酸化 (pH3)→澄清→真空浓缩→氯化钠转化→一次溶媒提取(苯酚、丁醇)→饱和盐水洗涤→一次水提→酸化 (pH2.5—3)→澄清过滤→二次溶媒提取(苯酚、氯仿)→二次水提→柱层析(氧化铝)→结晶→干燥→成品

### 二、提取方法

1. 将消化液放入沉淀槽中,加硫酸,调 pH 至 2.5,静置澄清,上清液供吸附用,渣子放掉。

2. 将白土用水淘洗,除去杂质。按白土 7 倍量加入上述酸化液,搅拌 40 分钟,吸附,静置 1.5 小时后放掉废液,反复吸附 15 次达饱和。

3. 白土饱和后,用水洗净,加入白土重量 2.5 倍的水、按水量加 0.5% 亚硫酸钠,加氨水,调 pH 至 11 左右,加热到 78℃,然后再冷却到 40℃,静置 2 小时,放出解吸液。

4. 解吸液调 pH 至 3.0 沉淀渣子,上清液真空蒸发浓缩到 1/3,调 pH3—4,除去渣子,取上清液调 pH4.5—5.5,加 1% 氯化钠转化,加热 45℃,搅拌 1 小时,加 10% 精制食盐。

5. 在转化液中加入 10% 的苯酚、丁醇混合液(苯酚:丁醇 = 1:1.75) 加热 45—50℃,反复搅拌提取多次,后几次苯酚、丁醇加量可适当减少。每次搅拌半小时,静置 1.5 小时分层。

6. 用饱和盐水洗涤上面提取液后加入等量氯仿,边搅拌,边加入无盐水反复提取,再搅拌半小时,静置 1 小时分层,得一次水提液。

7. 一次水提取液加硫酸: 调 pH2.5—3 除渣子, 过滤液加氨水调 pH4.0, 搅拌, 加入 6% 苯酚-氯仿混合液(苯酚: 氯仿 = 1:1), 反复提取多次, 后几次酚和氯仿适当减少。

8. 用水洗去上面提取液中杂质, 加 1.5 倍氯仿和 75% 丁醇, 然后一边搅拌一边加无盐水反复提取, 每次搅拌半小时, 静置 1 小时分层, 得二次水提液。

9. 二次水提液用氯仿洗涤后加 3 倍丙酮, 沉淀渣子后通过氧化铝柱子层析, 用 80% 丙酮显层, 50% 丙酮洗脱, 洗脱液加 4—6 倍丙酮至微混, 置 5℃ 以下冷库, 结晶 2—3 天。

10. 晶体用丙酮洗涤数次, 自然干燥一天, 用红外线灯烘干(温变不得超过 80℃), 即得维生素 B<sub>12</sub> 成品。

### 三、产品质量

产品符合药典规定, 在 278、361、和 550 毫微米波长处有吸收峰。含量为 98.6%。

### 四、疗效

经中国人民解放军 768 医院配成针剂, 用于贫血、外伤后麻木等病例均有明显疗效。患贫血者单用本品维生素 B<sub>12</sub> 100 微克, 一天一支, 半月左右红血球均有增加, 神经麻木患者单用本品维生素 B<sub>12</sub> 100 微克, 一天一支, 1—2 月均恢复正常。

## 对几个问题的讨论

1. 几年来的实践证明, 从酒精糟沼气发酵废液中提取维生素 B<sub>12</sub> 是成功的, 质量是合格的。但由于其产生维生素 B<sub>12</sub> 的过程是个较复杂的过程, 如何在操作中掌握甲烷菌生长条件, 多产维生素 B<sub>12</sub>, 这是生产关键, 需要进一步作细致的试验工作。

2. 维生素 B<sub>12</sub> 的提取工艺条件要求较高, 但是在设备简陋情况下, 吸附剂选用活性白土比采用离子交换树脂吸附方便, 但是采用树脂交换吸附以提高得率, 仍有研究的必要。

3. 我厂曾试验利用酒精糟搞丙酸菌纯种发酵维生素 B<sub>12</sub>, 利用葡萄糖、玉米浆和营养盐配料, 丙酸菌发酵维生素 B<sub>12</sub> 含量可达百万分之十五左右, 我们试用 500 升发酵罐, 以酒精糟加少部分红薯原料糖化液作培养基, 发酵液中维生素 B<sub>12</sub> 可达百万分之三、四左右, 按此计算较现在沼气发酵含量约提高 10 倍左右, 这对降低成本提高设备效率都有一定意义, 还需继续试验。

4. 关于在提取过程中要不要经过吸附这道工序, 我们认为以纯种发酵维生素 B<sub>12</sub> 含量提高后, 可把吸附这一步省去, 改用真空低温蒸发浓缩, 提高发酵液中维生素 B<sub>12</sub> 含量, 直接转化提取, 这样既省去一套吸附设备, 又省搅拌动力。对于这一问题, 有待我们结合纯种发酵试验研究改进。我厂提取维生素 B<sub>12</sub> 的原料十分充足, 丙酮、丁醇、烧碱、氯仿等全可在本厂解决。