



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109400458 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201811450932.0

(22)申请日 2018.11.30

(71)申请人 内蒙古金达威药业有限公司

地址 010206 内蒙古自治区呼和浩特市托  
克托工业园区

申请人 厦门金达威集团股份有限公司

(72)发明人 胡泽君 廖炜程 王丽 薛文琳  
石晓梅

(74)专利代理机构 厦门市精诚新创知识产权代  
理有限公司 35218

代理人 秦华

(51)Int.Cl.

C07C 50/28(2006.01)

C07C 46/10(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的  
方法

(57)摘要

本发明公开了一种从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法。包括：将微生物发酵液过滤，干燥得到菌粉；再利用超微粉碎技术将菌粉粉碎成粒径为2-35 μm的辅酶Q10微粉；再进行提取和固液分离，层析，结晶，得到辅酶Q10成品。本发明的方法收率高，产品质量好，工艺简单，提取时间短，分离提取效率高，成本低，适宜工业化生产。

1. 一种从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,包括以下步骤:

菌粉制备:将微生物发酵液过滤,干燥得到菌粉;

菌粉粉碎:利用超微粉碎技术将菌粉粉碎成粒径为2-35 $\mu\text{m}$ 的辅酶Q10微粉;

提取:将溶剂1与所述辅酶Q10微粉搅拌后进行萃取;

固液分离:将上述萃取得到的萃取液1与菌渣进入旋流分离器,采用旋流分离技术进行分离得到萃取液2;

层析:萃取液2进行柱层析,其中的层析柱用洗脱剂进行洗涤,洗脱,分段收集洗脱液,减压浓缩蒸出有机溶剂,得到辅酶Q10浓缩物;

结晶:往所述辅酶Q10浓缩物中加入溶剂2,结晶,过滤,得到辅酶Q10成品。

2. 如权利要求1所述从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,其特征在于,所述微生物发酵液为产辅酶Q10的微生物发酵液;优选的,为类球红细菌、烟曲霉、放射型根瘤菌、荚膜红假单胞菌、胶装红假单胞菌、假白布勒弹孢酵母、热带假丝酵母、脱氮假单胞菌、斯谷假单胞菌、脱氮副球菌、鱼精蛋白杆菌属的发酵液中的至少一种。

3. 如权利要求1所述从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,其特征在于,所述菌粉粉碎步骤是指用超微粉碎机进行粉碎,粉碎时的温度在10-45 $^{\circ}\text{C}$ 。

4. 如权利要求1所述从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,其特征在于,所述提取步骤中,将辅酶Q10微粉输送进萃取罐中,通入溶剂1进行搅拌萃取,搅拌转速控制在15-20r/min,搅拌0.5-3h;

任选的,所述溶剂1为丙酮、氯仿、乙醚、正己烷、乙醇或石油醚;

任选的,所述辅酶Q10微粉与溶剂1中的料液质量比为1:4-1:20;

任选的,所述提取温度控制在15-45 $^{\circ}\text{C}$ 。

5. 如权利要求1所述从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,其特征在于,所述固液分离步骤中,将萃取后的萃取液1和菌渣通入旋流分离器进行分离,控制旋流分离器进料压力为0.1-0.5MPa,所述旋流分离器由一级旋流分离器组成或多级旋流分离器串联组成。

6. 如权利要求1所述从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,其特征在于,所述层析步骤中,层析柱的填料为氧化铝或硅胶;

任选的,洗脱剂包括组分A和组分B,其中组分A为石油醚、乙醚、异丙醚、二异丙醚、乙基丁基醚、正己烷、正庚烷、正辛烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷的一种或几种;

组分B为丙酮、丁酮、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、乙酸乙酯、乙酸甲酯的一种或几种;

任选的,组分A与组分B的体积浓度比控制在(97-30):(3-70);

任选的,所述洗脱液是指辅酶Q10的纯度在90%-98%段的洗脱液。

7. 如权利要求1所述从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,其特征在于,所述结晶步骤中,所述溶剂2的用量为浓缩物质量的2-15倍;

任选的,所述溶剂2为丙酮、丁酮、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、乙酸乙酯、乙酸甲酯、油醚、乙醚、异丙醚、二异丙醚、乙基丁基醚、正己烷、正庚烷、正辛烷中的一种或几种;

任选的,所述结晶、过滤,干燥为,加热进行溶解,溶解温度控制在40-65 $^{\circ}\text{C}$ ,溶解后再搅拌降温,搅拌转速控制在15-20r/min,降温速率控制在5-15 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ,降温结晶,终温控制在0-

25℃,离心机过滤,干燥。

## 一种从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及辅酶Q10提取领域,尤其涉及一种从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法。

### 背景技术

[0002] 辅酶Q10 (Coenzyme Q10, 简称为CoQ10) 又名泛醌,是一种类维生素物质,在动植物及微生物中广泛存在。辅酶Q10是生物自发合成的细胞代谢激活剂和抗氧化剂,它能作用于某些酶,使之发生三维结构的变化,从而影响其生理活动。过去的研究及临床试验证明辅酶Q10具有增加机体免疫力,预防心脑血管硬化的作用,对改善高血压,充血性心衰竭,神经系统疾病以及肿瘤的治疗等都有帮助。当前,辅酶Q10作为一种珍贵的天然产物,普遍用于生化药物,养生食品以及美容化妆品的生产中。

[0003] 辅酶Q10的制备方法主要有三种:化学合成法、动植物组织提取法和微生物发酵法。而微生物发酵法相较于前两种方法有以下优点:微生物资源丰富,生产成本低,不产生光学异构,生物活性高等。所以微生物发酵法被认为是最具发展前景的一种生产方式。

[0004] 由于微生物发酵液成分复杂,当从微生物中分离提取辅酶Q10时,大量杂质也会一起提取出来,这直接影响后续提纯精制操作的难易程度。提取工艺的优劣也直接影响到提取的收率、产品的质量、提纯的成本等。

[0005] 根据目前的文献报道,从辅酶Q10发酵液中提取辅酶Q10的方法主要有碱醇皂化法、碱化皂化法、超声波破碎法、超临界CO<sub>2</sub>萃取法等。公开号为CN104694613A的中国专利公开了一种碱醇皂化法提取辅酶Q10的方法,以辅酶Q10发酵液为原料,通过有机溶剂萃取、碱醇皂化、硅胶柱层析、无水乙醇结晶、抽滤、真空干燥得到辅酶Q10产品,此工艺能在一定程度上提高辅酶Q10粗提物的纯度,但工艺过程中有机溶剂消耗量大,提取效率不高,产生大量皂化废水和洗涤废水,严重污染环境,是环境非友好型工艺。

[0006] 公开号为CN102557912A的中国专利文献公开了一种皂化法制备辅酶Q10粗提物的方法。用碱液皂化辅酶Q10提取液,有机相水洗后得到皂化后的提取液,用于进一步的纯化精制,该工艺中,不生成单或双乙氧基衍生物,但萃取过程乳化严重,影响萃取收率和质量,提取效率低。

[0007] 公开号为CN103819326A的中国专利文献公开了一种超声破碎提取、层析纯化制备辅酶Q10的方法。该工艺中,能提高提取效率,但超声波处理过程大量放热,需增加冷冻降温设备,超声波随处理层厚度增加能量衰减快,限制处理量,而且超声波设备价值昂贵,大生产应用生产成本高,不适用于工业化生产。

[0008] 公开号为CN101591685A的中国专利公开的一种超临界CO<sub>2</sub>条件下微生物转化制备辅酶Q10的方法,将粟酒裂殖酵母菌接入含有茄尼醇的培养基中,在温度为25-35℃、压力为5-20MPa的超临界CO<sub>2</sub>的环境中进行发酵,得到辅酶Q10,该工艺能提高辅酶Q10合成的速度及产量,但此方法操作压力高,投资大,耗能高,设备不稳定,不利于工业推广。

[0009] 公开号为CN107337593A的中国专利公开的一种辅酶Q10纯品的制备方法,采用陶

瓷膜微滤、喷雾干燥方法粉碎菌丝,再经丙酮回流浸提、陶瓷膜过滤器分离,将菌丝细胞破壁、分离,富集辅酶Q10,该方法可提高提取收率7%左右,但喷雾干燥方法粉碎菌丝,设备较复杂,占地面积大,一次投资大;雾化器,菌粉回收装置价格较高;需要空气量多,增加鼓风机的电能消耗与回收装置的容量;热效率不高,热消耗大,且粉碎的菌丝粒径较大,细胞破壁不彻底,细胞中仍然残留较多难提取的辅酶Q10。前期发酵液采用陶瓷膜微滤及固液分离过程使用的陶瓷膜过滤器在碱性环境易腐蚀,弹性小易碎,成型困难,滤膜易堵塞,不利于工业推广。

[0010] 超微粉碎技术是20世纪末派生的一种物料加工新技术,主要应用对象是矿物药、贵重药和具有特殊性质的中药,是目前国际先进的粉碎技术,能将物料从传统粉碎工艺得到的中心粒径75 $\mu\text{m}$ 以下,提高到5 $\mu\text{m}$ 以下,细胞破壁率 $\geq 95\%$ ,可使细胞中的有效成分直接暴露出来,而不是传统的通过细胞壁和细胞膜释放。

[0011] 杨婧等报道了超微粉碎联合超声法提取红花中多糖工艺研究《杨婧,张帅,王冬梅,等.超微粉碎联合超声法提取红花中多糖工艺研究[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2014(3):354-356.》,通过对超微粉碎前后红花多糖的提取率的对比研究,确定超微粉碎对多糖提取率具有显著提高作用;吕平报道了超微粉碎联合超声辅助萃取制备人参总皂苷的研究《吕平.超微粉碎联合超声辅助萃取制备人参总皂苷的研究[J].食品研究与开发,2016,37(16):42-46.》,试验结果表明,超微粉碎后的人参微粉最小平均粒径可达到49.18 $\mu\text{m}$ ,只有粗粉的1/3到1/4,并可以显著提高人参中总皂苷的提取效率。多糖是高分子碳水化合物,人参总皂苷是固醇类化合物,三萜皂苷,而辅酶Q10是一种类维生素物质,脂溶性醌类化合物,将超微粉碎技术应用于从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10尚未见报道。

## 发明内容

[0012] 本发明的目的在于克服现有技术不足,提供一种收率高,产品质量好,工艺简单,提取时间短,分离提取效率高,成本低,适宜工业化生产的从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法。

[0013] 为实现上述目的,本发明提供一种从微生物发酵液中分离提取辅酶Q10的方法,包括以下步骤:

[0014] 菌粉制备:将微生物发酵液过滤,干燥得到菌粉;

[0015] 菌粉粉碎:利用超微粉碎技术将菌粉粉碎成粒径为2-35 $\mu\text{m}$ 的辅酶Q10微粉;

[0016] 提取:将溶剂1与所述辅酶Q10微粉搅拌后进行萃取;

[0017] 固液分离:将上述萃取得到的萃取液1与菌渣进入旋流分离器,采用旋流分离技术进行分离得到萃取液2;

[0018] 层析:萃取液2进行柱层析,其中的层析柱用洗脱剂进行洗涤,洗脱,分段收集洗脱液,减压浓缩蒸出有机溶剂,得到辅酶Q10浓缩物;

[0019] 结晶:往所述辅酶Q10浓缩物中加入溶剂2,结晶,过滤,得到辅酶Q10成品。

[0020] 进一步,所述微生物发酵液为产辅酶Q10的微生物发酵液,优选的,为类球红细菌、烟曲霉、放射型根瘤菌、荚膜红假单胞菌、胶装红假单胞菌、假白布勒弹孢酵母、热带假丝酵母、脱氮假单胞菌、斯谷假单胞菌、脱氮副球菌、鱼精蛋白杆菌属的发酵液中的至少一种。

[0021] 进一步,所述菌粉粉碎步骤是指用超微粉碎机进行粉碎,粉碎时的温度在10-45

℃。

[0022] 进一步,所述提取步骤中,将辅酶Q10微粉输送进萃取罐中,通入溶剂1进行搅拌萃取,搅拌转速控制在15-20r/min,搅拌0.5-3h;

[0023] 任选的,所述溶剂1为丙酮、氯仿、乙醚、正己烷、乙醇或石油醚。

[0024] 任选的,所述辅酶Q10微粉与溶剂1中的料液质量比为1:4-1:20;

[0025] 任选的,所述提取温度控制在15-45℃。

[0026] 进一步,所述固液分离步骤中,将萃取后的萃取液1和菌渣通入旋流分离器进行分离,控制旋流分离器进料压力为0.1-0.5MPa,所述旋流分离器由一级旋流分离器组成或多级旋流分离器串联组成。

[0027] 进一步,所述层析步骤中,层析柱的填料为氧化铝或硅胶;

[0028] 任选的,洗脱剂包括组分A和组分B,其中组分A为石油醚、乙醚、异丙醚、二异丙醚、乙基丁基醚、正己烷、正庚烷、正辛烷、环戊烷、甲基环戊烷、环己烷、甲基环己烷的一种或几种;

[0029] 组分B为丙酮、丁酮、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、乙酸乙酯、乙酸甲酯的一种或几种;

[0030] 任选的,组分A与组分B的体积浓度比控制在(97=30):(3=70);

[0031] 任选的,所述洗脱液是指辅酶Q10的纯度在90%-98%段的洗脱液。

[0032] 进一步,所述结晶步骤中,所述溶剂2的用量为浓缩物质量的2-15倍;

[0033] 任选的,所述溶剂2为丙酮、丁酮、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、甲酸甲酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、乙酸乙酯、乙酸甲酯、油醚、乙醚、异丙醚、二异丙醚、乙基丁基醚、正己烷、正庚烷、正辛烷中的一种或几种;

[0034] 任选的,所述结晶、过滤,干燥为,加热进行溶解,溶解温度控制在40-65℃,溶解后再搅拌降温,搅拌转速控制在15=20r/min,降温速率控制在5-15℃/h,降温结晶,终温控制在0-25℃,离心机过滤,干燥。

[0035] 本发明在现有辅酶Q10的提取方法基础上,针对提取过程效率较低,耗时长,收率不高的缺点,在萃取前引入超微粉碎技术将菌粉粉碎成2-35μm的辅酶Q10微粉,显著提高了提取收率,极大的提高了提取效率,缩短了提取时间。

[0036] 本发明的申请人经过深入研究之后发现,超微粉碎能有效提高菌粉中辅酶Q10的溶出,但超微粉碎的粒径与提取效率并不呈现比例关系,在菌粉被粉碎至75-35μm范围内时,辅酶Q10溶出率变化较小,基本达到溶出平衡;当菌粉粉碎至35-2μm范围内时,粉体细胞组织发生改变,有效成分呈充分释放状态,溶出速率加快,在一定时间内溶出量突然增大,释放较完全;而当粒径继续降低时,细胞几乎已全部破碎,但提取率反而有所降低。因此确定提取辅酶Q10时,菌粉超微粉碎的最佳粒径范围为35-2μm。在超微粉碎过程中不会产生局部过热现象,甚至可在低温状态下进行,粉碎瞬时即可完成,因而能最大限度地保留粉体的生物活性成分,有利于制成高质量产品。超微粉碎技术分级系统的设置,既严格限制了大颗粒,又避免了过碎,得到粒径分布均匀的超细粉,同时很大程度上增加了微粉的比表面积,使粉碎后的菌粉具有更良好的溶解性、分散性、吸附性、化学反应活性等。超微粉碎是在封闭系统内进行的,既避免了微粉污染周围环境,又可防止空气中的灰尘污染产品。由于经过超微粉碎后的原料,具有极大的比表面,在生物、化学等反应过程中,反应接触的面积大大

增加了,因而超微粉碎技术的应用能够将胞内残留的难以提取出来的辅酶Q10成分彻底提取出来。

[0037] 本发明的申请人在提取过程中,发现菌体粉碎太细,易发生凝聚,粘壁,堵塞,导致后续过程存在菌体与提取液难以分离的问题,因此申请人创造性的在固液分离过程引入旋流分离技术,使菌渣与萃取液在一定压力下从滤砂器进口以切向进入旋流滤砂器,在其内高速旋转,产生离心场,根据物体间的密度差异及离心力的作用进行分离,可做到连续化,且能进行多级串联,极大的提高了分离效果。后续采用结晶的方法进行纯化。此方法具有污染少、操作方便、流程简单、提取时间短、分离提取效率和收率高、成本低等优点,具有很高的工业推广潜力。

[0038] 本发明的有益效果是:

[0039] 本发明工艺方法在萃取前引入超微粉碎技术对菌粉进行粉碎,在超微粉碎过程中不会产生局部过热现象,甚至可在低温状态下进行,粉碎瞬时即可完成,因而能最大限度地保留粉体的生物活性成分,有利于制成高质量产品。超微粉碎技术分级系统的设置,既严格限制了大颗粒,又避免了过碎,得到粒径分布均匀的超细粉,同时很大程度上增加了微粉的比表面积,使粉碎后的菌粉具有更良好的溶解性、分散性、吸附性、化学反应活性等。超微粉碎是在封闭系统内进行的,既避免了微粉污染周围环境,又可防止空气中的灰尘污染产品。由于经过超微粉碎后的原料,具有极大的比表面,在生物、化学等反应过程中,反应接触的面积大大增加了,提高了辅酶Q10溶出率,因而超微粉碎技术的应用能够将胞内残留的难以提取出来的辅酶Q10成分彻底提取出来,显著提高了提取收率,极大的提高了提取效率,缩短了提取时间。

[0040] 本发明工艺方法在固液分离过程中采用旋流分离技术,使菌渣与萃取液在一定压力下从滤砂器进口以切向进入旋流滤砂器,在其内高速旋转,产生离心场,根据物体间的密度差异及离心力的作用,达到分离的效果,可做到连续化,且能进行串联,极大的提高了分离效果。

[0041] 本发明工艺方法与传统方法相比,具有污染少、操作方便、流程简单、提取时间短、分离提取效率高、成本低等优点,最终提取得到的辅酶Q10晶体的纯度>99.5%,总收率>95%。

[0042] 本发明所述微生物发酵液为有辅酶Q10生产能力的发酵液,能产生辅酶Q10的微生物的发酵液都适用。比如类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、放射型根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*)、荚膜红假单胞菌(*Rhodopseudomonas capsulata*)、胶装红假单胞菌(*Rhodopseudomonas gelatinosa*)、假白布勒弹孢酵母(*Bullera pseudoalba*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、脱氮假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)、斯谷假单胞菌(*Pseudomonas umeros*)、脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)、鱼精蛋白杆菌属(*Protaminobacter*)等的发酵液。

[0043] 本发明的实施例表明,未经过超微粉碎的提取,其总收率只有89.32%。而采用本发明技术方案的实施例1-9的总收率均大于95%,纯度均大于99.5%。充分证明采用本发明技术方案的实施例1-9的总收率高,纯度高。

## 具体实施方式

[0044] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0045] 实施例1:

[0046] 取10L类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 发酵液(含量为3150mg/L),用布氏漏斗抽滤后将菌粉在真空干燥箱中烘干,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径2 $\mu$ m左右,置于广口瓶中,加入5倍质量正己烷在30 $^{\circ}$ C左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用4%的乙醇-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入2倍质量乙醇,加热至60 $^{\circ}$ C溶解后,再以5 $^{\circ}$ C/h速率降温至5 $^{\circ}$ C结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品30.02g,纯度达到99.60%,总收率95.30%。

[0047] 实施例2:

[0048] 取10L类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 发酵液(含量为3150mg/L),用布氏漏斗抽滤后将菌粉在真空干燥箱中烘干,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径5 $\mu$ m左右,置于广口瓶中,加入10倍质量乙醚,在40 $^{\circ}$ C左右搅拌萃取1.5h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用10%乙酸甲酯-甲醇溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入4倍质量丙酮,加热溶解后,再以10 $^{\circ}$ C/h速率降温至10 $^{\circ}$ C结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品30.53g,纯度达到99.61%,总收率96.92%。

[0049] 实施例3:

[0050] 取10L类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 发酵液(含量为3150mg/L),用布氏漏斗抽滤后将菌粉在真空干燥箱中烘干,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径10 $\mu$ m左右,置于广口瓶中,加入15倍质量石油醚在35 $^{\circ}$ C左右搅拌萃取1.2h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用15%的丁酮-正庚烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入8倍质量乙醇,加热至55 $^{\circ}$ C溶解后,再以12 $^{\circ}$ C/h速率降温至15 $^{\circ}$ C结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品30.72g,纯度达到99.67%,总收率97.52%。

[0051] 实施例4:

[0052] 取1000L类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉用气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径20 $\mu$ m左右,置于广口瓶中,加入20倍质量环己烷,在45 $^{\circ}$ C左右搅拌萃取2h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用30%的甲醇-正辛烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入10倍质量乙醇,加热溶解后,再以15 $^{\circ}$ C/h速率降温至20 $^{\circ}$ C结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品30.76kg,纯度达到99.52%,总收率97.65%。

[0053] 实施例5:

[0054] 取1000L类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径30 $\mu$ m左右,置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15 $^{\circ}$ C左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,



溶剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品3.02kg,纯度达到99.53%,总收率95.87%。

[0055] 实施例6:

[0056] 取1000L类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径2 $\mu$ m左右,置于萃取罐中,加入15倍质量正己烷在15℃左右搅拌萃取1.2h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用60%的丙酮-乙醚溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入15倍质量乙醇,加热至45℃溶解后,再以10℃/h速率降温至5℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品3.01kg,纯度达到99.58%,总收率95.56%。

[0057] 实施例7:

[0058] 取1000L荚膜红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas capsulata*) 发酵液(含量为2260mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径10 $\mu$ m左右,置于萃取罐中,加入20倍质量氯仿在20℃左右搅拌萃取1.5h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用10%的正丙醇-环戊烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入15倍质量乙酸甲酯,加热至50℃溶解后,再以15℃/h速率降温至15℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品2.19kg,纯度达到99.63%,总收率96.83%。

[0059] 实施例8:

[0060] 取90m<sup>3</sup>脱氮假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 发酵液(含量为2030mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径15 $\mu$ m左右,置于萃取罐中,加入5倍质量丙酮在30℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流器进行分离,萃取液过硅胶柱,用5%乙酸乙酯-石油醚溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入10倍质量甲醇-乙酸乙酯混合溶液,加热至50℃溶解后,再以5℃/h速率降温至15℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品177.2kg,纯度达到99.58%,总收率97.01%。

[0061] 实施例9:

[0062] 取1000L热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 发酵液(含量为1780mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径35 $\mu$ m左右,置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品1.70kg,纯度达到99.50%,总收率95.24%。

[0063] 对比实施例1(碱醇皂化提取法):

[0064] 取类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 发酵液1000L(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉放入提取柱中,温度控制在30℃左右,对菌粉中辅酶Q10用石油醚进行回流提取,回流2h后,将提取液转入反应釜中,加入碱甲醇(PH7.8~8.0)进行碱醇皂化,搅拌20分钟,静置、分层,分出上层提取液,进硅胶柱进行纯化分离,洗脱液为石油醚,收集含辅酶Q10段洗脱液,减压蒸馏,得到纯化辅酶Q10浓缩物,将浓缩物转入溶解罐中,加入10倍质量无水乙醇,加热至48~50℃,搅拌下溶解后,将过滤液缓慢降

温至30℃,加入辅酶Q10晶种,析出晶体,温度控制23~25℃,保温3h,过滤,湿晶体经减压干燥,得到辅酶Q10纯品2.58kg,纯度为98.36%,总收率82.00%。

[0065] 对比实施例2(碱化皂化提取法):

[0066] 取类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液1000L(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉放入提取柱中,温度控制在30℃左右,对菌粉中辅酶Q10用石油醚进行回流提取,回流2h后,将提取液转入反应釜中,加入液碱(5%氢氧化钠)进行皂化,搅拌20分钟,静置、分层,分出上层提取液,进硅胶柱进行纯化分离,洗脱液为石油醚,收集含辅酶Q10段洗脱液,减压蒸馏,得到纯化辅酶Q10浓缩物,将浓缩物转入溶解罐中,加入10倍质量无水乙醇,加热至48~50℃,搅拌下溶解后,将过滤液缓慢降温至30℃,加入辅酶Q10晶种,析出晶体,温度控制23~25℃,保温3h,过滤,湿晶体经减压干燥,得到辅酶Q10纯品2.75kg,纯度为98.56%,总收率87.32%。

[0067] 对比实施例3(陶瓷膜微滤和喷雾干燥提取法):

[0068] 取类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液1000L(含量为3150mg/L),用进陶瓷膜微滤膜(孔径0.1 $\mu$ m)过滤后将菌粉进行喷雾干燥,干燥后的菌粉加到蒸馏器中,加入3.5倍体积丙酮,加入0.6‰(w/v)沸石,缓慢升温至50℃,回流2.2h后,趁热经陶瓷滤芯过滤器过滤(孔径0.5 $\mu$ m),过滤后提取液进硅胶柱进行纯化分离,洗脱液为石油醚,收集含辅酶Q10段洗脱液,减压蒸馏,得到纯化辅酶Q10浓缩物,将浓缩物转入溶解罐中,加入10倍质量无水乙醇,加热至48~50℃,搅拌下溶解后,将过滤液缓慢降温至30℃,加入辅酶Q10晶种,析出晶体,温度控制23~25℃,保温3h,过滤,湿晶体经减压干燥,得到辅酶Q10纯品2.79kg,纯度为99.26%,总收率88.45%。

[0069] 对比实施例4(未经超微粉碎的提取):

[0070] 取1000L类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%的乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品2.81kg,纯度达到99.18%,总收率89.32%。

[0071] 对比实施例5(超微粉碎提取-粒径0.1 $\mu$ m):

[0072] 取1000L类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径0.1 $\mu$ m左右,置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品2.89kg,纯度达到99.34%,总收率91.77%。

[0073] 对比实施例6(超微粉碎提取-粒径1 $\mu$ m):

[0074] 取1000L类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径1 $\mu$ m左右,置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶

剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品2.93kg,纯度达到99.39%,总收率92.97%。

[0075] 对比实施例7(超微粉碎提取-粒径40um):

[0076] 取1000L类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径40μm左右,置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品2.90kg,纯度达到99.44%,总收率92.18%。

[0077] 对比实施例8(超微粉碎提取-粒径50um):

[0078] 取1000L类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径50μm左右,置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品2.87kg,纯度达到99.52%,总收率91.01%。

[0079] 对比实施例9(超微粉碎提取-粒径70um):

[0080] 取1000L类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)发酵液(含量为3150mg/L),用板框过滤后将菌粉进行气流干燥,干燥后的菌粉用超微粉碎机粉碎至粒径70μm左右,置于萃取罐中,加入10倍质量石油醚在15℃左右搅拌萃取1h,萃取液和菌渣通入旋流分离器进行分离,萃取液过硅胶柱,用20%乙酸乙酯-正己烷溶液进行洗涤,洗脱,收集主段进行浓缩,溶剂回收利用,往浓缩物中加入12倍质量乙酸乙酯,加热至40℃溶解后,再以7℃/h速率降温至0℃结晶,离心过滤,干燥得到辅酶Q10成品2.84kg,纯度达到99.58%,总收率90.13%。

[0081] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。