

文章编号 :1009 - 038X(2000)05 - 0437 - 03

发酵液中透明质酸提取的新方法

郭育涛¹, 陈坚², 高海军², 陈银广²

(1. 南阳理工学院生物与化学工程系, 河南南阳 473004 ; 2. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036)

摘要 :以氯仿为除菌介质,在温度为 28 ℃,pH 值为 7.5 及搅拌直径比为 2/3 条件下,从发酵液中提取透明质酸(HA),其提取率大于 97.5%,纯度大于 97.3%.

关键词 :透明质酸 ; 提取 条件优化

中图分类号 :TQ929

文献标识码 :A

A Novel Method of Extracting Hyaluronic Acid(HA) from Fermentation Mash

GUO Yu-tao¹, CHEN Jian², GAO Hai-jun², CHEN Yen-guang²

(1. Nan-Yang Institute of Science and Technology, Nanyang 473004 ; 2. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract : A new process which removes cells from fermentation suspension by chloroform had been developed. The optimal conditions were 28 ℃、pH 7.5 and 2/3 ratio of stirrer diameter to stirred-bank diameter. Under such conditions, a hyaluronic acid purity of 97.37% and a extraction rate of 97.5% were obtained.

Key words : hyaluronic acid ; extraction ; condition optimization

透明质酸(Hyaluronic acid, 简称 HA)是一种具有生物相容性的新材料^[1],主要用于药物和化妆品中^[2].微生物发酵法是 HA 生产的重要途径之一.从发酵液中提取 HA 的过程分为初提,即除去发酵液中菌体并回收得到初级 HA,再经除蛋白质、核酸及重金属等可得精制 HA.

HA 的初提方法有浓缩发酵液后的 CPC 法^[3],大量稀释膜滤法^[4],高速离心法及有机溶剂法^[5]等.为了充分提取发酵液中 HA,作者以有机溶剂作为除菌剂,在较优条件下经搅拌、离心、乙醇沉淀等过程得到较高提取率及较低蛋白质含量的 HA 产品.

1 材料与方法

1.1 材料

透明质酸发酵液 无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室提供.成分分析结果(g/L): 菌体 4.0 高速离心除菌后:HA 3.1,蛋白质 3.1,乳酸 5.0.

1.2 方法

1.2.1 HA 提取方法 取新鲜发酵液 100 mL 装于 500 mL 三角瓶中,以 25% 三氯乙酸或 2 mol/L 氢

收稿日期 :1999 - 07 - 08 修订日期 :2000 - 06 - 01.

作者简介:郭育涛(1963 -),男,河南南阳人,生物工程硕士研究生,讲师.

万方数据

氧化钠调至发酵液的 pH 值为 7.0,加 2 倍氯仿,在 25 ℃水浴中以 1 200 r/min 搅拌 1 h,离心(2 500 r/min, 20 min),倾出液体并分离 HA 溶液和氯仿,以 30 mL 水洗菌体沉淀物并以相同条件离心,上清液并入除菌 HA 溶液中,以水补至原发酵液体积的 1.5 倍于 4 ℃冰箱保存.上述得到的 HA 溶液不断加入乙醇并搅拌直至乙醇质量分数达 64%后,静置 12 h 以上,弃上层清液,下层沉淀离心(2 000 r/min,20 min),沉淀物冷冻干燥,所得产物为精制 HA.

1.2.2 最终发酵液中 HA 含量的测定 取 10 mL 最终发酵液加入 20 mL 水,充分混匀后离心(10 000 r/min,10 min),取定量上清液加 1 倍体积水及 4.4 倍体积 95%的乙醇,振荡后离心(2 000 r/min,15 min),沉淀物 HA 以生理缓冲液充分溶解并以原体积的 10 倍定容.

1.3 化学试剂

透明质酸生化试剂 和光纯药工业株式会社提供 其它药品均为分析纯,水为二次去离子水.

1.4 分析方法

- 1) HA 含量测定:见文献[6].
- 2) 蛋白质测定:采用 Lorwy 法.
- 3) 相对分子质量测定:见文献[7].

2 结果与讨论

2.1 提取条件对 HA 相对分子质量的影响

HA 属于多分散性物质^[8],不适当的条件能使其解聚.为了便于研究,作者以 HA 的标准样品(和光纯药工业株式会社提供)为对象,研究氯仿、温度、pH 值以及搅拌对透明质酸相对分子质量的影响.试样 HA 相对分子质量为 2.54×10^6 .不同氯仿添加量及不同的搅拌转速不会使 HA 产生解聚.在 1 200 r/min、搅拌 30 min 的条件下,温度、pH 值对相对分子质量的影响如图 1.

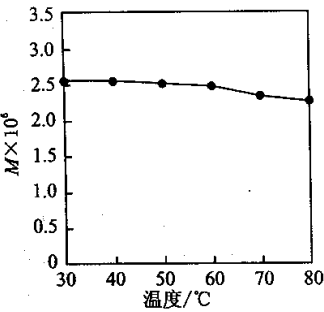


图 1 不同温度下 HA 相对分子质量的变化

Fig.1 The change of relative molecular weight at different temperature

从图 1 可见,相对分子质量在 40 ℃以后开始下降,50 ℃以后下降速度加快.表明加热除菌的方法很易引起 HA 相对分子质量的降解.图 2 表明,当 pH > 8 及 pH < 6 时相对分子质量有所降低,并且随静置时间延长相对分子质量降解增加.因此,提取 HA 时 pH 值以 6 ~ 8 为佳,当系统的 pH > 8 或 pH < 6 时,必须控制提取在短小时内完成.

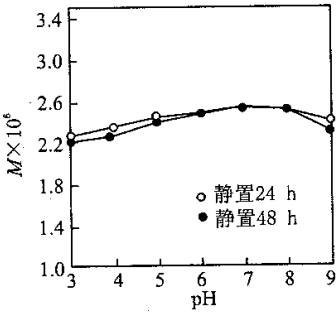


图 2 不同 pH 值下 HA 相对分子质量的变化

Fig.2 The change of relative molecular weight at different pH values

2.2 不同除菌条件对 HA 提取率的影响

利用氯仿为除菌剂,在不同温度下通过改变混合液 pH 值使细胞壁适当破坏,以考察除菌过程中温度及 pH 对提取率的影响.图 3 表明,当温度为 30 ℃时,HA 提取率随 pH 值升高而增加,但如果再升高 pH,提取率反而下降.当温度升高到 37 ℃,提取率在 pH < 5 时随 pH 值升高而增加,在 pH > 5 时随 pH 升高而降低.分析图 3 变化趋势发现,30 ℃时,酸性范围内提取率随 pH 值上升缓慢增加,而碱性范围内则较快下降;37 ℃时,最高提取率的 pH 值出现在酸性范围内,比 30 ℃时的最高提取率的 pH 值降低了.由此得出结论,较低的 pH 值与较高的温度组合或较高的 pH 值与较低的温度组合可以较充分地提取发酵液中的 HA.

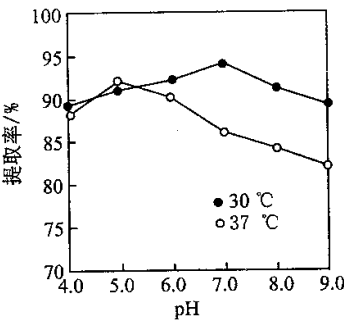


图 3 不同 pH 条件下 HA 提取率

Fig.3 The extraction rate at different pH values

出现上述结果的可能原因是,因氯仿对细胞有一定破坏作用,即细胞上的脂类物质溶于有机相

中,蛋白质结构发生改变 ;此后氯仿渗入细胞膜,随着 pH 值的增大及温度的升高,这一过程逐渐增强.这样,一方面细胞膜上 HA^[9] 逐渐脱落并溶于溶液中 ;另一方面细胞本身的脂多糖及蛋白质也逐渐脱落于溶液中,结果细胞上 HA 的脱落增加了溶液中 HA 的含量,而脂多糖及蛋白质在溶液中的增加使得部分 HA 在离心分离过程中粘附包藏在沉淀物中而使提取率下降.

2.3 发酵液除菌条件的优化

提取 HA 不但要求高的提取率和其分子不发生

解聚,而且要求有高的产品纯度.蛋白质是影响 HA 产品纯度的主要杂质之一.研究中发现,在搅拌速度为 1 000 ~ 1 200 r/min,搅拌时间为 60 min 时,氯仿加量为发酵液量的 2 倍时,蛋白质去除率较高.由图 3 可知,pH 值和温度对提取率的影响存在交互作用,因此,在固定氯仿加量及搅拌时间的条件下,选取 pH 7.5、pH 6.5,温度 28 ℃、32 ℃ 及搅拌直径比为 1/2 和 2/3 作 L₈ (2⁷) 正交实验,结果见表 1.

表 1 发酵液除菌正交试验结果

Tab.1 The orthogonal experiment result of fermentation removal thalli

试验号	A 温度/℃	B pH	A × B 温度 × pH	C 搅拌直径比	A × C 温度 × 搅拌 直径比	B × C pH × 搅拌直径比	HA 初提 提取率/%
1	1(28)	1(7.5)	1	1(1/2)	1	1	97.1
2	1	1	1	2(2/3)	2	2	98.3
3	1	2(6.5)	2	1	1	2	94.3
4	1	2	2	2	2	1	95.1
5	2(32)	1	2	1	2	1	94.0
6	2	1	2	2	1	2	94.2
7	2	2	1	1	2	2	95.2
8	2	2	1	2	1	1	96.2
K ₁	384.8	383.6	386.8	380.6	381.8	382.4	
K ₂	379.6	380.8	377.6	383.8	382.6	382.1	
k ₁	192.4	191.8	193.4	190.3	190.9	191.2	
k ₂	189.8	190.4	188.8	191.9	191.3	191.05	
R	2.60	1.40	4.65	1.10	0.40	0.20	

分析表 1,正交试验结果得 :A₁B₁C₂ 为较优条件组合.即采用 25 ℃,pH 7.0,搅拌直径比 2/3,氯仿加量 2 倍及搅拌时间 60 min 为较优条件.在上述较优条件下,HA 提取率均高于 97.5%,纯度均高于

97.3%,比文献 [6] 的提取率高 15%,提取纯度高 17% 以上.通过上述方法提取得到的初级 HA 经酶法等精制纯化后,产品中蛋白质的质量分数小于 0.01%,相对分子质量大于 1.5 × 10⁶.

参考文献

[1] RIEKE P C, CALVERT P D. Material synthesis utilizing biological process[M]. Pitsburgy :Mater Ress Sos, 1990.

[2] 张文会.透明质酸的药物载体作用[J].日用化学品科学,1998(2) :43 ~ 45.

[3] CIFONELLI J A, MAYEDA M. The purification hyaluronic acid by the use of carcoal[J]. Biochimica et Biophysica acta, 1957,24 :397 ~ 400.

[4] HOSOYE H. Novel production process of hyaluronic acid and bacterium acid[P]. 欧州专利 :EP 0249759, 1987 - 11 - 11.

[5] 姚敏捷,安海平.透明质酸发酵工艺和提取工艺条件研究[J].江苏食品与发酵,1995(2) :19 ~ 24.

[6] BITTER T, MUIR H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Analtical biochemistry, 1962(4) :330 ~ 334.

[7] LAUREN T C, PIETRUSZKIEWICZ A. Fractionation of hyaluronic acid[J]. Biochimial et biophysica acta, 1960,42 :476 ~ 478.

[8] PIETRUSZKIEWICZ L V, RYAN M. Studies on hyaluronic I the influence of ionic strength on the sedimentation and diffusion properties[J]. Biochim Biophys Acta, 1959,32 :155 ~ 165.

[9] MARKOVITZ A, DORFMAN A. Synthesis of capsular polysaccharide (Hyaluronic Acid) by protoplast membrane preparations of group a streptococcus[J]. J Bio Chem. 1962,238(2) :273 ~ 279.