

文章编号 :1009-038X(2001)06-0560-04

离子交换法提取发酵液中唾液酸

詹晓北, 吴剑荣, 朱莉, 于军华

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

摘要:研究了离子交换树脂从发酵液中提取唾液酸的方法,包括树脂的筛选、吸附条件和洗脱条件的确定,唾液酸纯度达到 97.4%。

关键词:唾液酸;离子交换;吸附;洗脱

中图分类号:Q 503

文献标识码:A

Purification of Sialic Acid from *Escherichia coli* K235-WXJ4 by Ion Exchange

ZHAN Xiao-bei, WU Jian-rong, ZHU Li, YU Jun-hua

(The key Laboratory of Industrial Biotechnological under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Purification of Sialic acid from the *Escherichia-coli* fermentation broth by ion exchange was studied. Ion exchange resins were selected and the conditions of adsorption and elution were determined.

Key words: sialic acid; ion exchange; adsorption; elution

唾液酸(Sialic acids)是一族神经氨酸(Neu-raminic acid)的衍生物^[1],广泛存在于动物细胞表面糖蛋白和糖脂的糖链末端^[2]。唾液酸及其衍生物在治疗流感、神经性疾病、炎症、肿瘤等方面有很重要的应用价值^[3]。有报导从鸡蛋^[4]、乳清和酪蛋白^[5,6]中制取的, Roland Schauer^[7]、冯万祥等^[8,9]从猪血中提取唾液酸, Whitehouse^[5]、钱世均^[10]等报导了从大肠杆菌菌种制备唾液酸的方法。作者研究了从大肠杆菌发酵液^[11]中提取唾液酸的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

争光 D 314、TD 113 树脂由杭州争光化工厂提供,南开 D 290、732、717、D 392、D 301-R 树脂由南

开大学化工厂提供,东大 D 113、717、D 301×7 由山东东大公司提供,中医 717、732 树脂由中国医药上海试剂公司提供,唾液酸标准品, Pfanstiehl Lab Inc 公司赠送。其余试剂为市售国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 唾液酸的测定方法 唾液酸用间苯二酚法测定^[12]。

1.2.2 唾液酸溶液的制备 上柱的唾液酸溶液的制备方法见图 1。

1.2.3 树脂对唾液酸的静态吸附 取一定质量浓度、一定体积的唾液酸溶液加入 5 mL 的湿树脂,在室温下振荡 12 h,测定溶液中唾液酸的质量浓度,按下式计算各种树脂的静态吸附量。

$$W = \frac{(C_0 - C) \times V_{\text{溶液}}}{V_{\text{树脂}}}$$

收稿日期 2001-06-28; 修订日期 2001-09-05。
基金项目 江苏省自然科学基金项目(BK99190)资助课题。
作者简介 詹晓北(1962-),男,北京人,工学博士,副教授。

其中 C_0 、 C 分别为吸附前后唾液酸的质量浓度 (mg/mL), $V_{\text{溶液}}$ 为溶液体积 (mL), $V_{\text{树脂}}$ 是树脂体

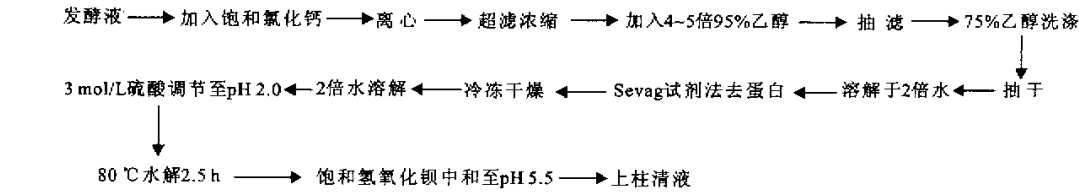


图 1 唾液酸溶液的制备

Fig.1 Preparation of sialic acid solution

1.2.4 阳离子树脂对唾液酸的动态吸附 一定体积的阳离子树脂装到柱上(1.2 cm×50 cm),一定质量浓度的唾液酸溶液进柱,再以1倍的去离子水洗脱,收集流出溶液,测定唾液酸含量。

1.2.5 阴离子树脂对唾液酸的动态吸附洗脱 一定体积的阴离子树脂装到柱上(1.0 cm×80 cm),一定质量浓度的唾液酸溶液先进阳离子树脂柱,流出液偶联到装好的阴离子树脂柱,用3倍的水洗脱阳离子柱,然后撤去阳离子柱,用0~2 mol/L的甲酸梯度以流速1.0 mL/min(除特殊说明外)洗脱阴离子柱,部分收集器收集流出液体的唾液酸,测定各管唾液酸含量(室温下操作)。

2 结果与讨论

2.1 树脂的筛选

2.1.1 阳离子交换树脂的选择

选择4种阳离子交换树脂(H^+)进行动态洗脱实验,比较唾液酸的收率情况。实验结果见表1。

表 1 唾液酸在各种阳离子树脂上的收率

Tab.1 Recovery ratio of sialic acid from cation

树脂型号	唾液酸收率/%	收集液 pH
中医 732	93.7	1.52
东大 D113	86.1	2.20
南开 732	99.6	1.50
争光 TD031	101.7	1.56

从表1可以看出,唾液酸在TD031上的收率最高。D113是一种弱酸性阳离子树脂,因此它流出液的pH只降到2.2,但是它的唾液酸收率低。TD031是一种吸附能力强的强酸性大孔阳离子树脂,它有利于吸附盐和其他杂分子,所以选用TD031(H^+)树脂。

2.1.2 阴离子交换树脂的选择

选择了8种阴离子交换树脂($HCOO^-$)进行静

态吸附,比较了其 对底物唾液酸的吸附量,结果见表2。从表2可以看出,对唾液酸吸附量最大的是争光D314,其次是南开D290和中医717。因为选用的洗脱剂是甲酸,甲酸浓度高对唾液酸的稳定性会产生影响,因此有必要对3种吸附量较高的树脂进行动态洗脱研究(用恒定0.35 mol/L甲酸洗脱),结果见图2。

表 2 唾液酸在各种阴离子树脂上的吸附量

Tab.2 Recovery ratio of sialic acid from cation resins

树脂型号	对唾液酸的吸附量/mg·mL ⁻¹
南开 D290	16.87
南开 717	9.65
南开 D301-R	5.88
南开 D392	4.8
东大 717	10.27
东大 D301×7	4.8
争光 D314	20.28
中医 717	10.85

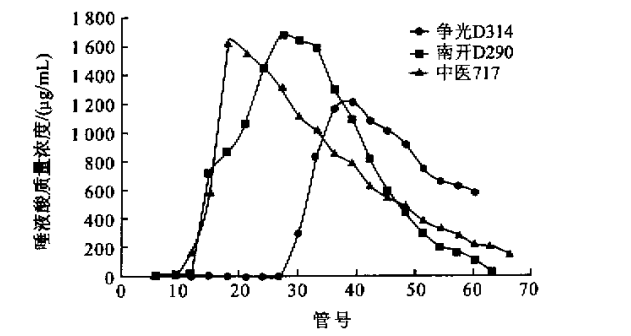


图 2 唾液酸在 3 种树脂上的洗脱曲线

Fig.2 The elution curve of sialic acid on three different resin

从图2可以看出,D314树脂的洗出峰在后面才出来,说明其对唾液酸的吸附能力较强,需要较高的甲酸浓度才能洗脱出来,拖尾较严重;中医717树脂出峰较快,说明其对唾液酸的吸附能力较弱,

且拖尾较严重 ;D290 的出峰时间较为合适 ,峰型较为对称 ,如果用梯度洗脱 ,将有更好的峰形 .因此确定使用南开 D290 作为分离唾液酸的阴离子交换树脂 .

2.2 吸附条件的选择

2.2.1 上柱清液 pH 对唾液酸分离的影响

测定上柱清液在不同的 pH 值条件下 ,唾液酸的分离情况见图 3.

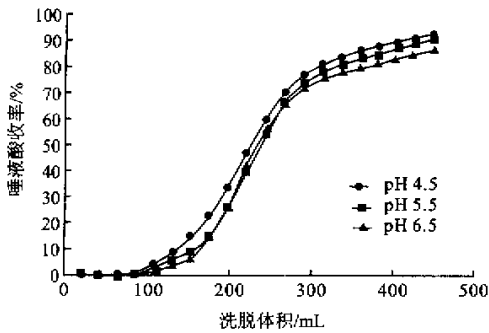
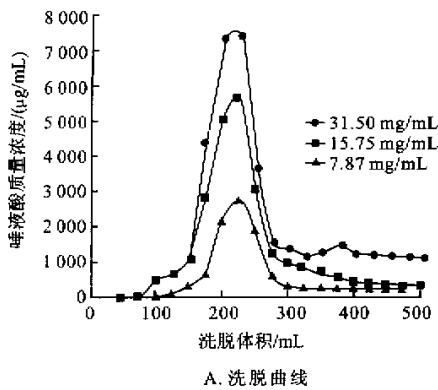


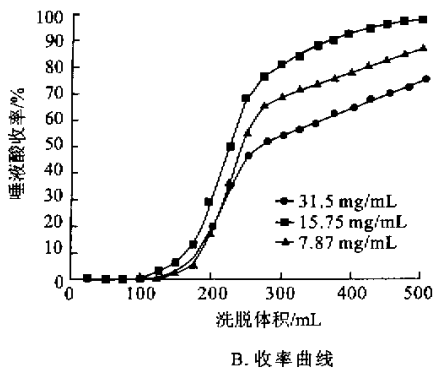
图 3 pH 对唾液酸分离的影响

Fig.3 Effect of pH on the separation of sialic acid

由图 3 可看出 ,3 条流出曲线的形状比较接近 .



A. 洗脱曲线



B. 收率曲线

图 4 上柱清液唾液酸质量浓度对唾液酸分离的影响(上柱体积 40 mL)

Fig.4 Effect of initial concentration on the separation of sialic acid(Volume = 40 mL)

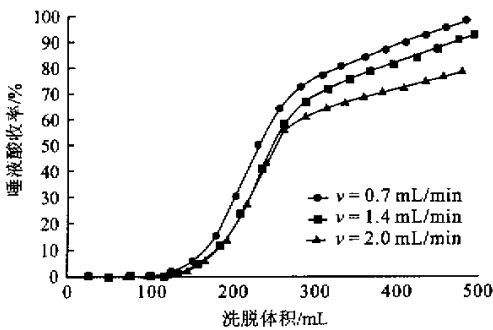


图 5 清液上柱流量对唾液酸分离的影响

Fig.5 Effect of flow rate on the separation of sialic acid

唾液酸的 pH 值在 2.6 左右 ,pH 大于 2.6 有利于唾液酸解离成 SA^- 负离子 ;又唾液酸溶液经过阳离子树脂柱时由于脱盐作用置换出 H^+ 离子 ,因此 pH 也不能选太低 .另外碱性条件下唾液酸容易受到破坏 ,酸性条件下唾液酸的稳定性也受到影响 .综合考虑 ,pH 选择为 4.5.

2.2.2 上柱清液唾液酸质量浓度对唾液酸分离的影响

配制不同质量浓度(pH 4.5)的唾液酸进行上柱实验 ,结果见图 4.

由图 4 可以看出 ,随着唾液酸质量浓度的上升 ,洗脱峰也越高 ,但是拖尾也逐渐严重 ;从图 4 看 ,质量浓度太低或太高的收率都不高 ,质量浓度在中间的(15.75 mg/mL)收率较高 .因此选择上柱清液唾液酸质量浓度为 15.75 mg/mL.

2.2.3 上柱清液流量对唾液酸分离的影响

将质量浓度为 15.75 mg/mL ,pH 4.5 的唾液酸进树脂柱 ,体积流量分别为 0.70、1.4、2.0 mL/min.按照 1.2.5 进行实验 ,测定洗脱液中唾液酸的收率 ,结果见图 5.

由图 5 可以看出 ,体积流量的变化导致了唾液酸流出曲线的变化 ,随着吸附时间的减少(空速变大) ,收率下降 .流量小 ,则吸附时间长 ,唾液酸和树脂之间的离子交换作用完全 ,收率高 .另外文献报道唾液酸在树脂中停留的时间不宜太长 ,否则树脂会使唾液酸产生脱羟基作用^[7] .因此选择空速为 0.7~1.4 mL/min 之间.

2.3 洗脱条件的选择

2.3.1 洗脱剂的选择 根据文献选择了甲酸和乙酸两种作为洗脱剂进行实验 ,发现乙酸造成唾液酸的洗脱峰拖尾严重 ,这可能是由于乙酸酸性较弱 ,

不足以把唾液酸洗脱出来. 而用甲酸时则洗脱峰较尖, 这是因为甲酸属于中强酸, 另外甲酸的沸点较低, 可以用冷冻干燥法把它和唾液酸分离开, 所以选择甲酸作为洗脱剂.

2.3.2 洗脱流速的确定 分别以 1.0, 1.8, 2.6 mL/min 流量的甲酸梯度洗脱, 结果见图 6. 从图 6 可以看出, 洗脱速度太快则流出曲线峰变宽, 相对有点拖尾. 洗脱速度太小也会影响时间, 因此确定洗脱速度在 1.0~1.8 mL/min 之间为宜.

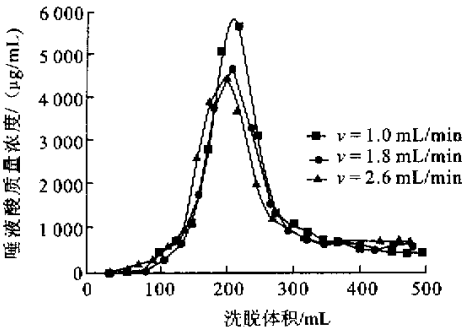


图 6 洗脱流量对唾液酸分离的影响

Fig.6 Effect of elution rate on the separation of sialic acid

2.4 离子交换法提取唾液酸的工艺

根据上述实验结果, 设计了一个离子交换法提

取唾液酸的工艺流程, 结果见图 7.

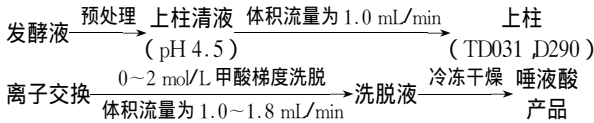


图 7 唾液酸提取的工艺流程

Fig.7 Process for sialic acid extraction

用此工艺流程进行实验, 唾液酸的收率达到 85%, 唾液酸产品的纯度为 97.4%.

3 结 论

- 1) 南开 D290 为较理想的阴离子树脂, 争光 TD031 为较理想的阳离子树脂.
- 2) 最佳的上柱条件为: 15.75 mg/mL 的唾液酸溶液, 体积流量选择为 0.70~1.4 mL/min, pH 4.5.
- 3) 洗脱剂为 0~2 mol/L 的甲酸, 洗脱体积流量为 1.0~1.8 mL/min.
- 4) 离子交换法提取唾液酸的工艺条件收率比较高, 可进一步研究并实现工业化.

参考文献:

[1] BLIX G, GOTTSCHARLK A, KLENK E. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acid[J]. *Nature*, 1957, 179 :1088.

[2] GWO-JENN SHEN, ARUN K DATTA, MASAYUKI IZUMI, *et al.* Expression of α -2, 9/ α -2, 8-Polysialyltransferase from *Escherichia coli* K9[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(49):39~46.

[3] ZBIGNIEW J. WITCZAK, KARL A. NIEFORTH. Carbohydrate in drugs design[M]. New York : Marcel Dekker, 1997.

[4] LEKH RAJ JUNEJA, MAMORU KOKETSU. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membran[J]. *Carbohydrate Research*, 1991, 214 :179~186.

[5] WHITEHOUSE M W, ZILLIKEN F. Isolation and Determination of Neuraminic(sialic) Acid[M]. *Methods of Biochemical Analysis*, 1960 (8):199~218.

[6] MASSKARN SHIMATANL. Process for manufacturing sialic acids-containing composition[P]. United States Patent, 5270462, 1993-12-14.

[7] SCHAUER R. Sialic acid, Chemistry, Metabolism and Function[M]. New York : Wien New York Springer-Verlag, 1982.

[8] 冯万祥, 洪麟, 冯启浩等. 猪血中唾液酸的分离纯化工艺[J]. *医药工业*, 1987, 18(8) 342~343.

[9] 高剑峰, 冯万祥. 血液中唾液酸的提取和结晶纯化[J]. *中国医药工业杂志*, 1996, 27(6) 246~247.

[10] 钱世钧, 李剑, 高建梅等. 从大肠杆菌 C-8 制备和纯化唾液酸. *微生物学报*, 1999, 39(2):178~180.

[11] 詹晓北, 郑志永, 朱莉等. pH 值对聚唾液酸分批发酵的影响及补料发酵[J]. *无锡轻工大学学报*, 2001, 20(3) 223~227.

[12] LARS SVENNERHOLM. Quantitative estimation of sialic acid[J]. *Biochim Biophys ACTA*, 1957, 24 :604~611.

(责任编辑: 李春丽)