

聚唾液酸的水解与唾液酸的纯化

赵 慧 , 詹晓北 , 朱一晖 , 张丽敏

(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 :在 HPLC 分析唾液酸质量分数的基础上 ,选择盐酸作为大肠杆菌发酵液中聚唾液酸的水解用酸.在 85 ℃ 水浴. 盐酸浓度为 0.1 mol/L 的条件下 ,水解 2 h ,水解率平均可达 95% 以上. 水解液中和过滤后 ,用离子交换色谱分离与冷冻干燥得到唾液酸产品. 质谱及 HPLC 分析证实所得产品中主要成分是 N-乙酰神经氨酸 ,其纯度达 96.4% .

关键词 :高效液相色谱 ;唾液酸 ;水解 ;离子交换色谱

中图分类号 :O 622

文献标识码 :A

Hydrolyzation of Polysialic Acid and Purification of Sialic Acid

ZHAO Hui , ZHAN Xiao-bei , ZHU Yi-hui , ZHANG Li-min

(Industrial Biotechnological Key Laboratory of Education Ministry , Southern Yangtze University , Wuxi , 214036 ,China)

Abstract :Hydrochloric acid was selected as the acid for hydrolyzing polysialic acid based on HPLC analysis results. After hydrolysis of polysialic acid at 0.1 mol/L of HCl , 85 ℃ for 2 h , ratio of sialic acid was more than 95% . The solid sialic acid was obtained by lyophilization after counteraction , filtration and separation using ion exchange chromatography. The analytic results of mass spectra and HPLC showed that the product was identical with that of standard sample , and its purity was 96.4% .

Key words : HPLC ; sialic acid ; hydrolyzation ; Ion exchange chromatography

唾液酸(Sialic acids , SA)是一族神经氨酸(neuraminic acid)的衍生物^[1] ,广泛存在于动物细胞表面糖蛋白质和糖脂的糖链末端 ,在许多与糖和蛋白相互作用的生理过程中起着重要的作用^[2] . 唾液酸的生物学功能有两大类 ,即唾液酸本身能被识别的受体作用和掩盖其它分子的掩蔽作用. 唾液酸及其衍生物在治疗流感、神经性疾病、炎症、肿瘤等方面有重要的应用价值^[3] . 高剑峰^[4] 等从猪血中提取了唾液酸 ,也有报道从鸡蛋^[5]、牛乳乳清^[6]和酪

蛋白^[7]中提取得到. 作者所在实验室用微生物发酵法制备聚唾液酸^[8,9] ,再经过水解得到单体唾液酸. 作者在用 HPLC 分析单体唾液酸质量分数的基础上 ,对聚唾液酸的水解条件以及唾液酸单体的提取进行了进一步研究.

1 材料与方法

1.1 试剂和器材

透析膜 :华美生物工程公司产品 ;高效液相色谱

收稿日期 2003-08-13 ; 修回日期 2003-09-26.

基金项目 :江苏省自然科学基金项目(BK99190)资助课题.

作者简介 :赵慧(1980-) ,女 ,安徽肥东人 ,发酵工程硕士研究生.

谱仪 :安杰伦公司产品 ;15 L 发酵罐 Biostat C10-3 : Braun 公司产品 ;唾液酸标准品(N-乙酰神经氨酸) Sigma 公司产品 ;乙醇为食用级 ,其余试剂为国产分析纯试剂.

1.2 菌种、培养基、培养方法

大肠杆菌(*Escherichia coli*) K235-WXJ4 (作者所在实验室保藏号). 培养基和培养方法如前文所述^[8].

1.3 聚唾液酸的发酵

15 L 的发酵罐装液量为 9 L ,接种量为体积分数 4% ,发酵温度 37 ℃ ,搅拌转速 400 r/min ,通气量 4.5 L/min. 灭菌前加入少量泡敌以控制发酵过程中的泡沫. 发酵 60 h 可得聚唾液酸发酵液.

1.4 聚唾液酸的制备

发酵液加入一定量的氯化钙饱和溶液 ,调 pH 值到 8.0 左右 ,于 7 000 r/min 离心 10 min ,上清液加入 4 倍体积 95%(体积分数)的乙醇 ,静置后离心得到沉淀 ,再用 75%(体积分数)乙醇洗涤 3 遍 ,抽干 ,透析后干燥即得到聚唾液酸粗品.

1.5 聚唾液酸的水解

称取一定量的聚唾液酸粗品 ,用去离子水溶解 ,在一定浓度的无机酸溶液中水解. HPLC 法测定水解液中的唾液酸质量分数.

1.6 聚唾液酸的测定

间苯二酚-盐酸法.

1.7 唾液酸的测定

HPLC 法测定唾液酸质量分数. 色谱条件 :色谱柱 ZORBAX SB C₁₈ ,流动相 :pH 为 3 的硫酸溶液 ;流动相体积流量 :1. 000 mL/min ;检测器 :UV 210 nm ,进样量 5 μL.

1.8 水解率的测定

水解之前和水解之后的总唾液酸质量分数(x_0 和 x_1)用间苯二酚-盐酸法测定 ,水解后游离单体唾液酸质量分数(x_2)用 HPLC 法测定. 唾液酸收率 $y_1 = x_1/x_0$,唾液酸水解率 $y_2 = x_2/x_0$.

2 结果与讨论

2.1 水解方法的确定

为了获得单体唾液酸 ,需要把聚唾液酸水解. 聚唾液酸的水解方法有酶法和酸法 ,其中酶水解由于唾液酸酶价格较高 ,且难以获得 ,不适合工业化应用. 一般来说 ,多糖类物质的水解常用三氟乙酸、硫酸或盐酸. 唾液酸在微量有机酸存在的环境中稳定性受到很大的影响 ,故三氟乙酸不可用于聚唾液酸的水解. 研究^[9]了硫酸和盐酸分别作为水解用酸对

HPLC 法测定唾液酸单体质量分数的影响. 实验中发现 ,同样的色谱条件下 ,盐酸的色谱图中没有可识别的色谱峰 ,而同样浓度的硫酸与唾液酸标准样品的保留时间非常接近(3. 052 min 和 3. 117 min). 唾液酸标样溶于 0. 001 mol/L 的 H₂SO₄水溶液进行色谱分析 ,两种物质不能得到有效分离. 由此可见 ,现有的分析条件在测定硫酸对大肠杆菌发酵液中的聚唾液酸的水解程度时受到很大的干扰 ,因此选择盐酸作为聚唾液酸的水解用酸.

2.2 水解条件的优化

通过预备实验确立酸浓度、温度、时间 3 个因素 ,取 3 个水平 ,根据 L₉(3⁴)安排正交试验 ,实验数据如表 1 所示. 水解率的测定如前所述.

表 1 正交实验结果

Tab. 1 The results of the orthogonal experiment					
试验号	因 素			水解率	
	酸浓度 A / (mol/L)	温度 B/ ℃	时间 C/ h	x_i	x_i^2
1	0. 05	75	1	16. 9	285. 61
2	0. 05	80	2	74. 5	5550. 25
3	0. 05	85	3	80. 4	6464. 16
4	0. 1	75	2	54. 4	2959. 36
5	0. 1	80	3	85. 8	7361. 64
6	0. 1	85	1	69. 3	4802. 49
7	0. 15	75	3	57. 1	3260. 41
8	0. 15	80	1	38. 4	1474. 56
9	0. 15	85	2	94	8836
K_1	171. 8	128. 4	124. 6	$\sum x_i = 570. 8$	$\sum x_i^2 = 40994. 48$
K_2	209. 5	198. 7	222. 9		
K_3	189. 5	243. 7	223. 3		
K_1^2	29515. 24	16486. 56	15525. 16		
K_2^2	43890. 25	39481. 69	49684. 41		
K_3^2	35910. 25	59389. 69	49862. 89		
$\sum K_i^2$	109315. 7	115357. 9	115072. 5		

计算可得

$$n \overline{x^2} = \frac{1}{n} (\sum x_i)^2 = 36\ 201. 4$$
$$Q_A = \frac{1}{a} \sum k_i^2 - n \overline{x^2} = \frac{109315. 7}{3} - 36201. 4 = 237. 1756$$

类似地

$$Q_B = 2251. 242$$

$Q_c = 2156.082$

而 $Q = \sum x_i^2 - n \overline{x^2} = 4793.076$

于是 $Q_e = Q - (Q_A + Q_B + Q_C) = 148.5756$

方差分析的结果如表 2 所示. 对显著水平 $\alpha = 0.10$ 查 F 分布表, 得 $F_{0.05}(2, 2) = 9.00$, 因素 B 和 C 都是显著的. 根据显著性检验的结果选择最优工艺条件时, 根据方差分析理论, 只需对显著的因素选择最优水平, 不显著的因素原则上可选试验范围内的任一点. 因此, 水解温度选择 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 水解时间本因选择 3 h , 但是从 K 值可以看出, 3 h 和 2 h 的水解效果非常接近, 考虑到设备利用以及热能消耗的问题, 选择水解时间 2 h . 水解所用的盐酸浓度选择 0.1 mol/L . 用以上条件进行了 3 次水解实验, 水解率均达 95% 左右. 结果如表 3 所示.

表 2 方差分析					
Tab. 2 Analysis of standard deviation					
方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F	显著性
A	237.1756	2	118.5878	1.596389	
B	2251.242	2	1125.621	15.15274	*
C	2156.082	2	1078.041	14.51223	*
误差	148.58	2			
总和	4793.076	8			

表 3 验证实验结果			
Tab. 3 The results of validated experiment			
实验序号	总唾液酸质量/mg	水解后 SA 质量/mg	水解率/%
1	10.83	10.24	94.55
2	8.53	8.21	96.24
3	14.21	13.56	95.43

2.3 唾液酸的提取

唾液酸水解液上阳离子树脂柱($1.2\text{ cm} \times 45\text{ cm}$)和阴离子树脂柱($1.6\text{ cm} \times 80\text{ cm}$), 经过水洗脱及 0.2 mol/L 氯化钠溶液洗脱, 流量为 1.2 mL/min , 每管收集洗脱液约 9 mL , 含唾液酸的洗脱液大部分集中在 $80 \sim 200\text{ mL}$ 之间(见图 1), 正态分布明显. 得到的样品经真空干燥后再溶解进行 HPLC 分析(见图 2)和质谱分析(见图 3), 证实所得产品是唾液酸系列中的 N-乙酰神经氨酸, 与标样相符, 其中 N-乙酰神经氨酸占唾液酸类物质总质量的 96.4% .

万方数据

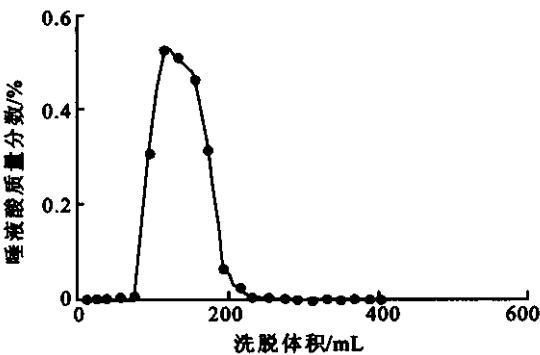


图 1 洗脱曲线

Fig. 1 The elution curve of sialic acid

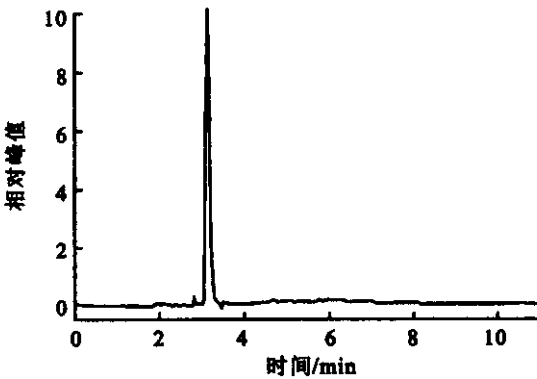


图 2 冷冻干燥产品的 HPLC 图谱

Fig. 2 The HPLC chromatogram of the lyophilized product

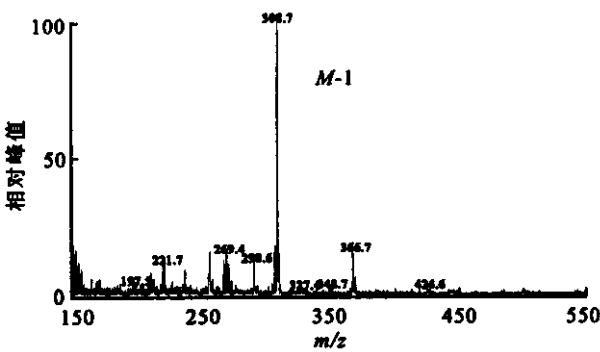


图 3 冷冻干燥产品的质谱图

Fig. 3 The MS chromatogram of the lyophilized product

2.4 讨论

从发酵液中提取唾液酸以前也有报道^[10], 但一般没有对聚唾液酸水解到唾液酸单体进行细致地研究. 为了提高唾液酸提取纯化的收率, 水解条件的研究是十分必要的. 在实验中得到的唾液酸产品中还含有很多的氯化钠, 对唾液酸单体的利用带来了一定的困难. 如何除去唾液酸单体产品中的氯化钠, 尚待进一步的研究.

参考文献：

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

[2] Gwo-Jenn Shen ,Arun K ,Masayuki Izumi , *et al.* Expression of α -2 ,9/ α -2 ,8-Polysialyltransferase from *Escherichia coli* K92 [J]. **Biol Chem** ,1999 ,274(49) :35139 – 35146.

[3] Zbigniew J ,Karl A Nieforth. Carbohydrate in Drugs Design[M]. New York :Marcel Dekker ,1997.

[4] 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.

[5] Lekh Raj Juneja , Mamoru Koketsu. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane[J]. **Carbohydrate Research** ,1991 ,214 :179 – 186.

[6] M W Whitehouse , F Zilliken. Isolation and determination of neuraminic(sialic) acids[J]. **Methods of Biochemical Analysis** ,1960 ,8 :199 – 218.

[7] Masskarn Shimatanl. Process for manufacturing sialic acids-containing composition[P]. USP :5 270 462 ,1993-12-14.

[8] 于军华 ,詹晓北 ,朱莉. 聚唾液酸的摇瓶工艺[J]. 无锡轻工大学学报 2002 21(6) 583 – 587.

[9] Xiaobei Zhan , Li Zhu , Jianrong Wu , *et al.* Effect of pH on the production of polysialic acid from batch and fed-batch fermentation[J]. **Biochemical Engineering Journal** ,2002 ,11 :201 – 204.

[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[J]. 微生物学报 ,1999 39(2) :178 – 180.

(责任编辑 朱 明)

(上接第 15 页)

[3] Knorr D. Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality[J]. **Food Technol** ,1993 ,(6) :156 – 161.

[4] Mertens B. New Methods of Food Preservation[M]. London :Blackie ,1995. 135 – 158.

[5] 林树英. 超高压对食品中酶的影响[J]. 食品与机械 ,1999 ,73(5) 30 – 32.

[6] 陈祥奎. 超高压杀菌新技术[J]. 食品与发酵工业 ,1995 ,(4) 69 – 79.

[7] 潘见 ,张文成 ,成从贵. 超高压液体饮料实用性灭菌工艺及设备设计[J]. 食品科学 ,1999 (1) 62 – 64.

[8] Armando Smendes , Joao E Decarvalho. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production[J]. **Biotechnol Lett** ,2001 ,23 :1963 – 1969.

[9] 周宇光. 菌种目录[M]. 北京 :中国农业科技出版社 ,1997. 231.

[10] 沈萍 ,范秀容 ,李广武. 微生物学实验[M]. 北京 :高等教育出版社 ,2000. 92 – 94.

[11] Smelt J P P M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing[J]. **Trends Food Sci Technol** ,1998 ,(9) : 152 – 158.

(责任编辑 李春丽)