

文章编号:1673-1689(2010)06-0931-06

## 基于发酵液特性的聚唾液酸提纯工艺的研究

刘金龙, 吴剑荣, 申凤丹, 郁丹凤, 詹晓北\*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 为了从发酵液中提纯制备聚唾液酸, 作者对聚唾液酸特性和发酵液中主要杂质的去除方法进行了研究。结果表明, 聚唾液酸具备一定的热稳定性和抗碱性分解能力, 并且在一定条件下, 可以被乙醇和阳离子表面活性剂氯代十六烷基吡啶(CPC)沉淀。发酵液中的主要杂质可以在一定条件下利用珍珠岩助滤的方式除去。最终构建了聚唾液酸提纯工艺, 利用该工艺得到的产品纯度达到了 $(98.1 \pm 1.6)\%$ , 回收率为 $(56.1 \pm 1.7)\%$ 。

**关键词:** 聚唾液酸; 发酵液; 提纯

**中图分类号:** TQ 920

**文献标识码:** A

## Research on the Purification of Polysialic Acid Based on the Property of the Fermentation Broth

LIU Jin-long, WU Jian-rong, SHENG Feng-dan, YU Dan-feng, ZHAN Xiao-bei\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In order to obtain Polysialic acid (PSA) from the fermentation broth, the property of PSA and methods to remove the impurities in the fermentation broth were studied in this manuscript. The results demonstrated that PSA showed a good heat-stability and anti-alkalinescence capability, and it was precipitated by ethanol and cetyl pyridinium chloride (CPC) in certain condition; impurities in the fermentation broth can be removed by filtration with Perlite as filter aid. Based on this, a novel PSA purification process was established. Through this process, the final PSA product was obtained with a purity and recovery  $(98.1 \pm 1.6)\%$  and  $(56.1 \pm 1.7)\%$ , respectively.

**Key words:** polysialic acid, fermentation broth, purification

聚唾液酸(Polysialic acid 简称 PSA)是 N-乙酰神经氨酸以  $\alpha$ -2,8 和(或)  $\alpha$ -2,9 糖苷键连接而成的同聚物<sup>[1]</sup>, 通常存在于哺乳动物和少数几种细菌细胞表面<sup>[2]</sup>。在动物体内, 聚唾液酸参与了机体内众

多的生理活动, 在胚胎发育、神经细胞增殖、细胞信号传导以及内膜运输等方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。随着对聚唾液酸功能的揭示, 其在医药领域潜在应用价值正日益凸现。目前, 聚唾液酸主要应用于药物

**收稿日期:** 2009-11-24

**基金项目:** 国家 863 计划项目(2006AA02Z207)。

**作者简介:** 刘金龙(1980—), 男, 河北石家庄人, 发酵工程专业博士研究生。Email: bdljl2004@yahoo.com.cn

**\* 通信作者:** 詹晓北(1962—), 男, 北京人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生化工程与反应器方面的研究。

Email: xbzhan@yahoo.com

缓释和医用脚手架材料两个领域<sup>[4-7]</sup>。另外,将聚唾液酸完全降解,可以得到单体 N-乙酰神经氨酸(俗称唾液酸或者燕窝酸),是一种广泛应用于医药、食品和保健品领域的高附加值材料<sup>[8]</sup>。

聚唾液酸目前主要通过细菌发酵法来制备,迄今已发现许多细菌如 *N. meningitidis*, *E. coli*, *H. ducreyi*, *P. haemolytica* 能够分泌以聚唾液酸为主要成分的荚膜多糖<sup>[9]</sup>。国外一些研究学者对细菌合成聚唾液酸进行了研究,如 Rodriguez-Aparicio 等人发现聚唾液酸合成受温度和溶解氧的影响<sup>[10-11]</sup>。Rode 等人优化了 *E. coli* K-1 合成聚唾液酸的营养和培养条件<sup>[12]</sup>。Kapre 和 Shaligram 建立一种高相对分子质量聚唾液酸的生产工艺<sup>[13]</sup>。此外,郭良栋等用大肠杆菌 C-8 发酵生产聚唾液酸,产量为 1 200 mg/L<sup>[14]</sup>。作者所在实验室詹晓北等诱变筛选出一株较高产量的聚唾液酸的生产菌株——*E. coli* K235,并对其培养条件进行了优化,聚唾液酸产量高达 2 700 mg/L,极具工业化前景<sup>[15-16]</sup>。

尽管目前有一些关于细菌合成法制备聚唾液酸的报道,但是主要集中于上游发酵部分,对于下游提纯方面的报道较少。提纯工艺研究的滞后在一定程度上影响了聚唾液酸实现工业化生产的进程。作者对聚唾液酸分离纯化进行了系统的研究,主要包括:考察了影响目标产物稳定性的因素(温度和 pH),研究了目标产物聚唾液酸的特性和有效去除发酵液中主要杂质的适宜操作条件。在完成这些工作的基础上,构建了完整的聚唾液酸提取纯化工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

发酵液:由江南大学生化工工程研究室提供,其中聚唾液酸质量浓度为 4.49 g/L,蛋白质质量浓度为 3.14 g/L;珍珠岩(200 目):购自信阳市崇真助滤剂有限公司;纯度为 90% 的聚唾液酸:由作者所在研究室制备,用于聚唾液酸稳定性和特性的考察部分的实验。用于检测的唾液酸标准品:由 Pfantstiehl Lab Inc 公司赠送;牛血清白蛋白和右旋糖苷:购自上海国药化学试剂有限公司,其余药品均为国产分析纯。超滤和过滤实验装置:由浙江湖州科滤膜技术有限公司友情提供;红外光谱仪 IR-440:日本岛津公司制造。

### 1.2 检测方法

#### 1.2.1 聚唾液酸的测定 参照间苯二酚法<sup>[17]</sup>。

1.2.2 蛋白质的测定 采用考马斯亮蓝法<sup>[18]</sup>,以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.3 聚唾液酸相对分子质量的测定 采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)。色谱条件:色谱柱 Ultrahydrogel™ Linear 300 mm×7.8 mmid×2;流动相 0.1 mol/L NaNO<sub>3</sub>,流速 0.9 mL/min;柱温 45 °C。以低相对分子质量的右旋糖苷为标准。

1.2.4 聚唾液酸纯度 取 5~10 mL 含有聚唾液酸的处理液,冷冻干燥至恒重,再从冻干样中称取 10~50 mg 样品(样品干重),溶于一定体积纯化水中,测定其实际聚唾液酸质量浓度。

质量浓度×体积=聚唾液酸实际质量。

产品纯度=实际聚唾液酸质量/样品干重×100%。

1.2.5 聚唾液酸回收率 工艺处理前后聚唾液酸总量比值。

聚唾液酸回收率=工艺处理后聚唾液酸总量/工艺处理前聚唾液酸总量×100%

1.2.6 聚唾液酸稳定性检测 100 mL 聚唾液酸溶液(1.25 g/L, pH 7),分别保持在 25、50、80、100 °C 水浴 5 h,重复实验 3 次,测定处理前后的回收率,以确定聚唾液酸的热稳定性。100 mL 聚唾液酸溶液(1.25 g/L, pH 7)通过滴加 0.2 mol/L 盐酸和氢氧化钠溶液调整其 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9、10、11 共 9 个梯度,25 °C 或 50 °C 保持 5 h 后,再用 0.2 mol/L 盐酸和氢氧化钠调至 pH 7,重复实验 3 次,测定聚唾液酸处理前后的回收率,以检测聚唾液酸在不同 pH 值条件下的稳定性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚唾液酸的稳定性

胞外多聚糖—聚唾液酸的 α-2,8 糖苷键通常对于外界环境比较敏感,在酸性、碱性、高温或者氧化剂存在的情况下,容易发生断裂,造成其聚合度和结构的变化<sup>[19]</sup>。因此,首先考察聚唾液酸在不同条件下的稳定性。主要研究了不同温度和 pH 值对聚唾液酸的影响,结果见图 1。从图 1 可以看出,聚唾液酸在 25~80 °C 范围内较为稳定。在 25 °C 下,不同 pH 值对聚唾液酸的稳定性影响不大,但是当温度为 50 °C 且在酸性环境中(pH≤4),聚唾液酸发生了明显的降解(图 1b)。从温度和 pH 值两个因素对聚唾液酸的影响来看,在提纯处理过程中,只要热处理不超过 100 °C、碱处理时 pH≤10,就不会对聚唾液酸的得率造成明显的影响。

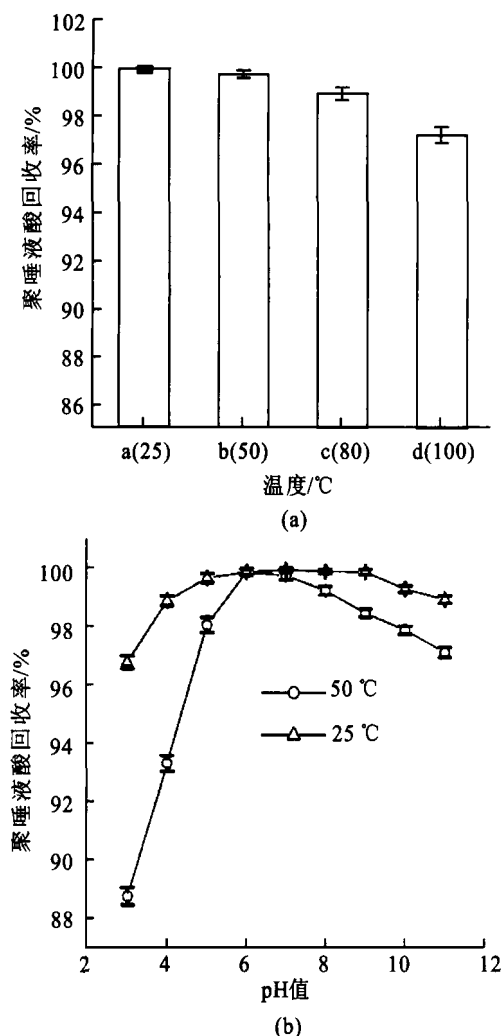


图 1 温度和 pH 值对聚唾液酸稳定性的影响

Fig. 1 Effect of temperature and pH on the stability of PSA

## 2.2 聚唾液酸的特性

作者在实验中发现,聚唾液酸在一定条件下可以与氯代十六烷基吡啶(CPC)发生沉淀反应,利用这个特性将聚唾液酸与杂质分离。聚唾液酸是含有聚阴离子的水溶性聚合物,能与带相反电荷的阳离子表面活性剂(CPC)相互络合形成复合物而絮凝沉淀,该复合物主要通过静电吸引和疏水作用形成,而影响这种络合沉淀反应的因素主要有表面活性剂质量浓度、离子强度、pH 值和温度等,其他微生物多糖也有类似报道,如谭天伟等发现阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)可以与透明质酸发生沉淀反应<sup>[20]</sup>。

作者研究了聚唾液酸与 CPC 发生沉淀反应的适宜条件,主要从 4 个方面进行了考察,即 CPC 用量、NaCl 浓度、pH 值和温度,结果见图 2。当 CPC 用量为聚唾液酸 3 倍时,NaCl 浓度低于 0.1 mol/L, pH 值处于 6~7 范围以及温度低于 40 °C 时为 CPC 沉淀反应的适宜条件。实验过程中发现,当 NaCl 盐浓度高于 0.1 mol/L 时,会严重影响的络合沉淀的反应效果,这可能是大量盐离子的存在干扰

了 CPC 与聚唾液酸之间电荷相互作用。而在实际的提纯操作中,发酵处理液中客观上会含有很多盐离子(磷酸盐等),这就要求我们在引入 CPC 处理之前,增加一步超滤脱盐的操作。发酵液中聚唾液酸平均相对分子质量分布在 30 000~40 000 之间,因此超滤脱盐操作采用的膜孔径为 10 000。

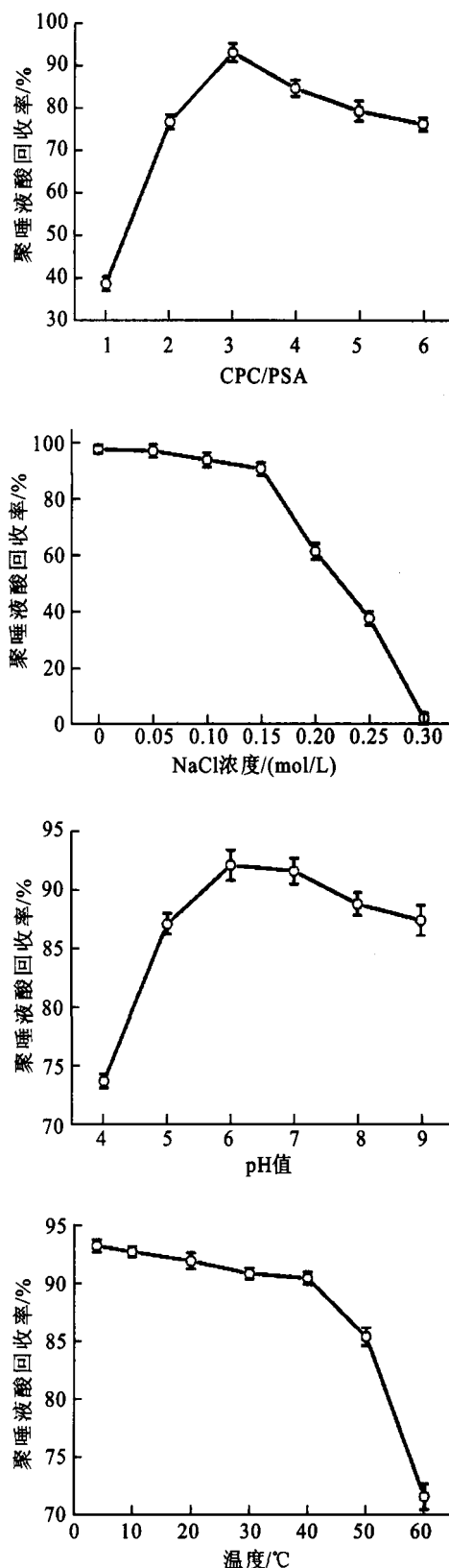


图 2 CPC 络合沉淀聚唾液酸的影响因素

Fig. 2 Effect of different factors on the PSA-CPC precipitation

同很多微生物多糖一样,在一定条件下,聚唾液酸可以在一定浓度的有机溶液如乙醇、丙酮、异丙醇溶液中发生沉淀。作者选择乙醇作为聚唾液酸的沉淀剂,考察乙醇用量和 NaCl 质量浓度对聚唾液酸沉淀的影响。由图 3 可以看出,当乙醇用量达到处理液 3 倍体积,氯化钠质量浓度达到 40 g/L 时,沉淀效果最佳。NaCl 能够降低溶液体系的介电常数并能中和多聚阴离子——聚唾液酸表面的负电荷,减少分子之间的同性电荷相斥力,因而促进了多糖的聚集沉淀。

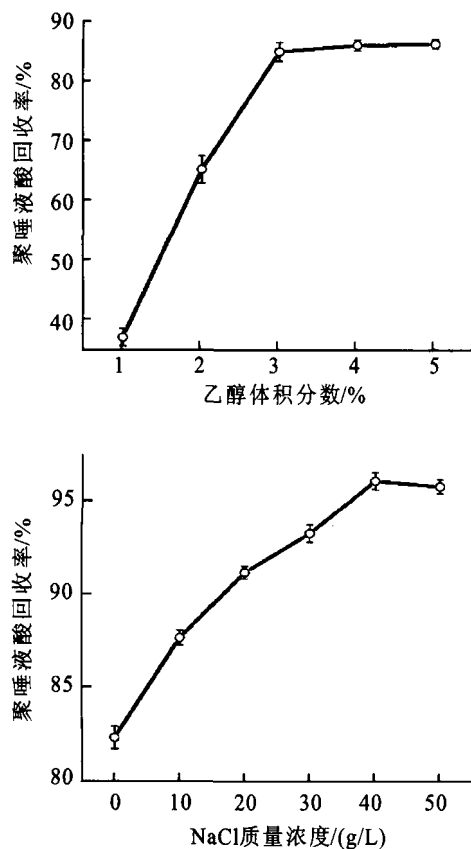


图3 乙醇用量和氯化钠质量浓度对聚唾液酸沉淀的影响

Fig. 3 Effect of alcohol and NaCl titer on PSA precipitation

虽然乙醇可以用来沉淀聚唾液酸,但是在相同的条件下,它也可以使蛋白质变性沉淀;相对而言,CPC 沉淀反应的特异性较强,其在与聚唾液酸发生络合沉淀时,不会引起蛋白质的沉淀。

### 2.3 发酵液中的主要杂质

从发酵液中提取聚唾液酸过程中,要去除的杂质包括菌体、蛋白质和培养基残余成分等,其中蛋白质是比较难以去除的部分。通过预实验发现,以珍珠岩为助滤剂的处理效果较好,可以大幅度地去除处理液中的杂质,尤其是蛋白质,同时产品损失较少。于是,以珍珠岩为助滤剂,研究了过滤操作过程中的影响因素,主要包括助滤剂用量和 pH 值。如图 4 所示,随着珍珠岩的增加,蛋白质去除情况

和聚唾液酸纯度随之改善,但是,过滤速度明显下降并且产品损失逐渐增大。综合考虑,最终确定过滤操作采用 8 g/dL 的珍珠岩用量。

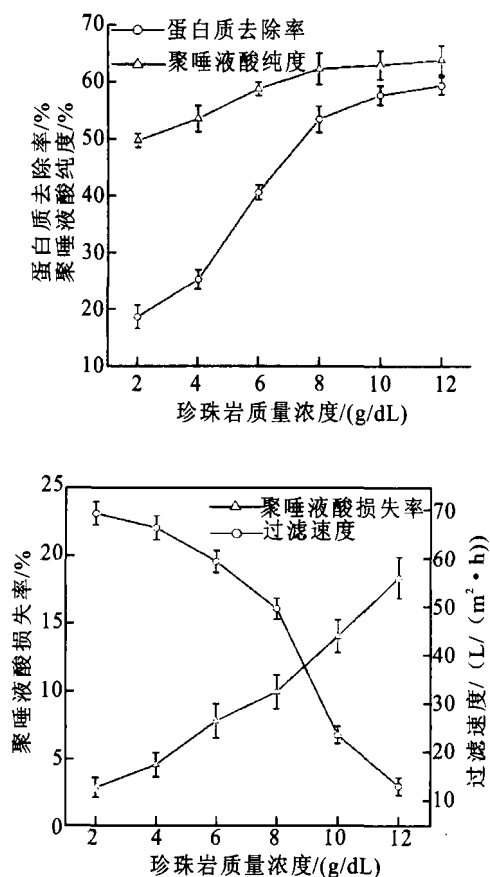
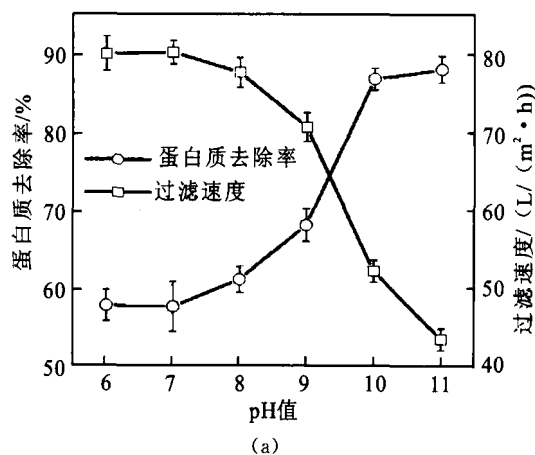


图4 珍珠岩添加量对过滤的影响

Fig. 4 Effect of perlite addition on the filtration

前面聚唾液酸的稳定性实验已经证明在  $\text{pH} < 4$  的情况下,它会出现明显降解。因此,过滤操作必须严格控制 pH 值,限定在  $\text{pH} 6 \sim 11$  的范围内,结果见图 5。随着 pH 值的升高,实验中观察到待处理液逐渐变混浊,甚至出现了微量的絮状物的现象,判定可能为体系中一些生物大分子如蛋白质变性所致。随着 pH 值的增加,处理液中蛋白质的去除率和聚唾液酸的纯度明显增大。同时,由于过滤阻力的增加,过滤的速率明显放缓。综合考虑,最终确定待处理液的适宜 pH 为 10。



(a)

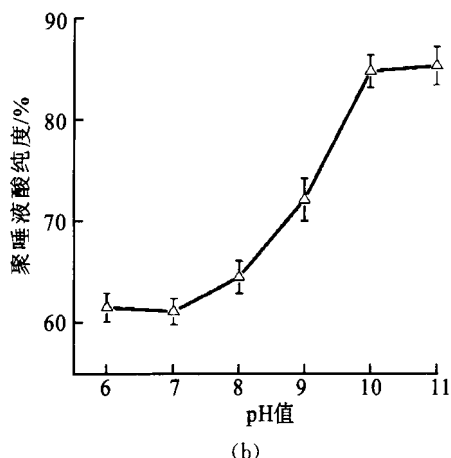


图 5 pH 值对过滤的影响

Fig. 5 Effect of pH on the filtration

## 2.4 聚唾液酸提纯工艺的构建

基于上述结果,作者构建了完整的聚唾液酸提纯工艺,见图 6。发酵液经过 80 ℃ 加热预处理 30 min,离心去除菌体,上清液用乙醇沉淀,沉淀溶解后,以珍珠岩为助滤剂,过滤前,将上清液调为 pH 10,滤液经过超滤脱盐,再用 CPC 溶液沉淀分离,形成的 PSA-CPC 络合沉淀物在 0.8 mol/L NaCl 溶液中溶解,然后再经过酒精沉淀,沉淀物冻干即得到最终产品。

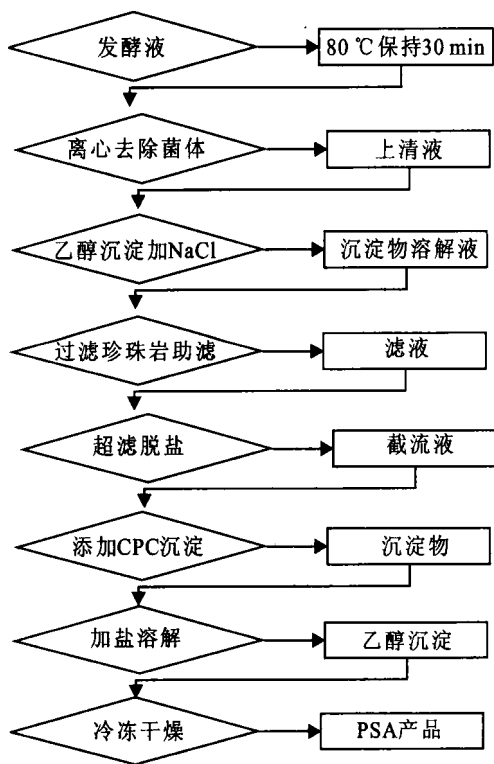


图 6 聚唾液酸提纯的工艺流程

Fig. 6 Flow chart of the PSA extraction process

图 7 列举了提纯工艺中各主要步骤的提纯效果和损失情况。经过这条工艺路线的处理,最终产品纯度达到  $(98.1 \pm 1.6)\%$ ,回收率为  $(56.1 \pm 1.7)\%$ 。提纯的聚唾液酸的红外光谱图见图 8,与文献[21]报道的聚唾液酸红外图谱完全一致。

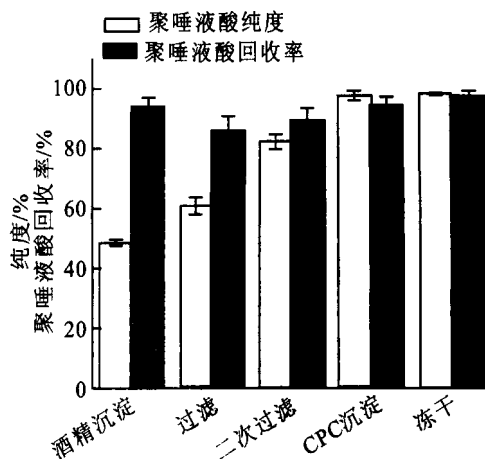


图 7 提纯主要步骤的回收率和纯度

Fig. 7 Purity and recovery of PSA in main steps of the extraction process

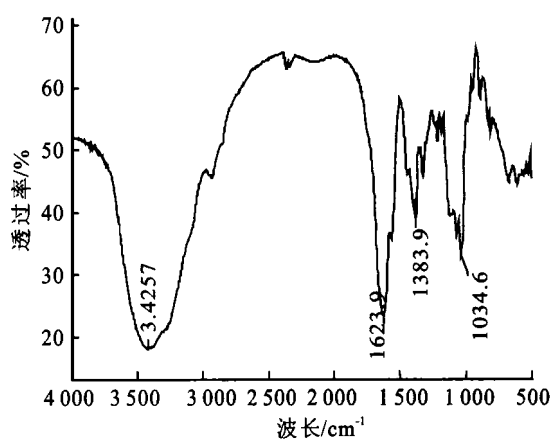


图 8 聚唾液酸产品的红外图谱

Fig. 8 Infrared spectrum of final PSA product

## 3 结 语

作者在充分考察聚唾液酸和发酵液的性质的基础上,构建了一套完整的提纯工艺。其中的主要操作如过滤、CPC 和酒精沉淀具有易操作、重复性好、成本不高和容易放大的特点,实验结果证明了这条工艺的可行性。

## 参考文献(References):

- [1] Troy F A. Rosenberg A (ed) Biology of the Sialic Acids[M]. New York: Plenum Press, 1996: 95—144.
- [2] Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids; an evolutionary perspective[J]. Chem Rev, 2002, 102: 439—469.

- [3] Vimr E R, Kalivoda K A, Deszo E L, et al. Diversity of microbial sialic acid metabolism [J]. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2004, 68: 132—153.
- [4] Wunder D E, Aaronson W, Hayes S F, et al. Nucleotide sequence and mutational analysis of the gene encoding KpsD, a periplasmic protein involved in transport of polysialic acid in *Escherichia coli* K1 [J]. **J Bacteriol**, 1994, 176: 4025—4033
- [5] Gregoriadis G, Jain S, Papaioannous I, et al. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids[J]. **Int J Pharm**, 2005, 300: 125—130.
- [6] Bruns S, Stark Y, Wieland M, et al. Fast and efficient screening system for new biomaterials in tissue engineering: a model for peripheral nerve regeneration [J]. **J Biomed Mater Res**, 2007, 81A (3), 736—747.
- [7] Stark Y, Bruns S, Stahl F, et al. A study on polysialic acid as a biomaterial for cell culture applications [J]. **J Biomed Mater Res**, 2008, 85A: 284.
- [8] Maru I, Ohnishi J, Otha Y, et al. Why is sialic acid attracting interest now? complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acylglucosamine 2-epimerase [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2002, 93(3): 258—265.
- [9] Rahman M, Mizanu, Nicola L, et al. Bacterial CMP—sialic acid synthetases: production, properties, and applications [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2008, 80: 757—765.
- [10] Camino G C, Luengo J M, Rodriguez-Aparicio L B. High production of polysialic acid [Neu5Ac alpha (2-8)-Neu5Ac alpha(2-9)]<sub>n</sub> by *Escherichia coli* K92 grown in a chemically defined medium: Regulation of temperature[J]. **Biol Chem Hoppe Seyler**, 1990, 371: 1101—1106.
- [11] Rodriguez-Aparicio L B, Reglero A, Ortiz A I, et al. Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1988, 27: 474—483.
- [12] Rode B, Endres C, Ran C, et al. Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1[J]. **J Biotechnol**, 2008, 135: 202—209.
- [13] Kapre S V, Shaligram U. Process for the preparation of highly pure polysialic acid of high molecular weights [P]. PCT Int Patent Application; WO 2008035373, 2008-03-27.
- [14] Guo L D, Qian S J, Ye J, et al. Studies on the selection of strains producing colominic acid and culture conditions[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1998, 38 (2): 103—107.
- [15] Zhan X B, Yu J H, Wu J R, et al. Screening of polysialic acid yield of *E. coli* by NTG mutagenesis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2002, 9(5): 456—459.
- [16] Zhan X B, Zhu L, Wu J R, et al. Production of polysialic acid from fed—batch fermentation with pH control[J]. **Biochem Eng J**, 2002, 11: 201—204.
- [17] Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1957, 24: 604—611.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248—254.
- [19] Cheng M C, Wang K T, Inoue S, et al. Controlled acid hydrolysis of colominic acid under microwave irradiation[J]. **Analytical Biochemistry**, 1999, 267: 287—293.
- [20] Cheng R T, Tan T W. Separating hyaluronic acid from fermentation broth with CTAB[J]. **Journal of Beijing University of Chemical Technology**, 2006, 33 (3): 33—36.
- [21] Zheng Z Y, Zhan X B, Wu J R, et al. Structure analysis of polysialic acid in *Escherichia coli* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24 (5): 38241.

(责任编辑:李春丽)