

聚唾液酸分离纯化过程中脱除蛋白质工艺的研究*

李文强 詹晓北 张丽敏 郑志永

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214036)

摘要 应用不可逆变性后的蛋白溶解力与聚唾液酸溶解力的显著差异来脱除聚唾液酸发酵液中蛋白质。通过实验优化了乙醇分步沉淀法和乙醇沉淀-过滤法脱除蛋白质的工艺操作参数。得到有效脱除聚唾液酸中蛋白质的工艺条件为:在经离心去除菌体的上清液中加入乙醇至体积百分数为75%,室温下放置沉降后,除去上层清液,加入15 g/L硅藻土过滤,加去离子水使滤饼中聚唾液酸溶解,再次过滤,收集滤液。得到聚唾液酸回收率为94.5%,蛋白质的去除率达到89.5%。

关键词 聚唾液酸,纯化,乙醇沉淀,脱蛋白,过滤

唾液酸是生物界普遍存在的一种氨基糖,大量存在于细胞表面,与细胞识别、细胞黏连、细胞之间的信息传递、神经传导、细胞寿命、癌细胞的转移有密切关系^[1-3],唾液酸的类似物Zanamivir(N-乙酰基-2,3-二脱氧-4-胍基唾液酸)和Tamiflu(GS4071)已经被美国FDA正式批准为治疗流感的新药,并已经上市^[4]。而大肠杆菌发酵生产的聚唾液酸经过水解后便可得到唾液酸单体,为大量合成唾液酸类似物提供了前提条件。聚唾液酸本身也可以作为一些药物的缓释剂、作为一些诊断用酶的固定介质和用作治疗一些疾病的疫苗^[5,6]等。

目前唾液酸由于提取成本较高,难以大量生产。聚唾液酸的分离比唾液酸单体的分离相对较为简单,得到纯度较高的聚唾液酸为唾液酸单体制备提供了前提。钱世钧和李剑等^[7]研究了盐析法去除聚唾液酸发酵液中的蛋白,然后透析脱盐,但去除蛋白过程影响了聚唾液酸分离的回收率;本实验室^[8]曾以超滤-乙醇沉淀的方法提取得到聚唾液酸,回收率为78.1%,但没有除去蛋白。乙醇既可以使蛋白质沉淀,也可以使多糖沉淀,但引起多糖和蛋白质沉淀的有机溶剂浓度是不同的,因此采用分步沉淀法可能有效脱除聚唾液酸发酵液中的蛋白质;再则,蛋白质的变性将增加蛋白质与多糖溶解力的差异,应用这种差异常能增加脱除蛋白的效率。

1 材料和方法

1.1 材料

硅藻土助滤剂: SX821, 长白硅藻土有限责任公

司。

聚唾液酸原料:利用本实验室保藏的 *Escherichia coli* K235-WXJYL-11^[9]发酵60 h的发酵液。

1.2 方法

(1)蛋白质含量测定:考马斯亮兰结合法^[8]。

(2)聚唾液酸含量测定:间苯二酚法^[9]。

(3)乙醇分步沉淀工艺:如图1所示。

(4)乙醇沉淀-过滤工艺:如图2所示。

(5)助滤剂用量确定:首先在滤纸上形成1 g/cm²的硅藻土滤饼,在悬浊液中分别加入5 g/L、15 g/L、25 g/L和45 g/L(原发酵液)的硅藻土助滤剂,在0.2 MPa的恒定压力下抽滤,测定不同时间所对应的滤液体积。

(6)Sevage试剂法:取40 mL浓缩过的发酵液,加入10 mL Sevage试剂剧烈振荡20 min后,8 000 r/min离心15 min,取出上清液,再次重复以上步骤,共处理3次,测定处理前后蛋白质的含量,加入3倍体积95%乙醇,离心,沉淀,干燥后配制成50 mL聚唾液酸溶液。

(7)盐析法^[7]:取离心浓缩过的发酵液按照50% (w/v)饱和度加入(NH₄)₂SO₄晶体,搅拌溶解静置30 min后,离心,除去沉淀,测定处理前后的蛋白质含量。

2 结果与讨论

有机溶剂能使蛋白质分子发生聚集和沉淀,并出现蛋白质变性,变性蛋白在水中的溶解度较低。加入高浓度的有机溶剂或加热能促使蛋白质发生不可逆变性,使得变性蛋白不易在水中重新复性和溶解。与此同时,加入的有机溶剂也能使多糖物质发生沉淀,但引起多糖和蛋白质沉淀的有机溶剂浓度可能是不

第一作者:硕士研究生(詹晓北教授为通讯作者)。

* 江苏省自然科学基金(No. BK99190)

收稿日期:2004-11-01

同的,因此控制有机溶剂浓度及蛋白质的变性状态可以应用于多糖和蛋白质的分离过程。以下将对乙醇沉淀聚唾液酸的工艺条件进行研究。

2.1 乙醇分步沉淀法

乙醇的加入改变了介质的介电常数,降低蛋白质的溶解度,加热则促使蛋白质发生不可逆变性,使蛋白质失去溶解力。而在前期研究聚唾液酸分离工艺的实验中^[10]发现,加入体积分数为 50% 的乙醇时,仅有少量的聚唾液酸沉淀,因此,可以结合蛋白质变性沉淀和乙醇分步沉淀的方法来去除聚唾液酸发酵液上清中的蛋白质。拟定分离工艺如图 1 所示。

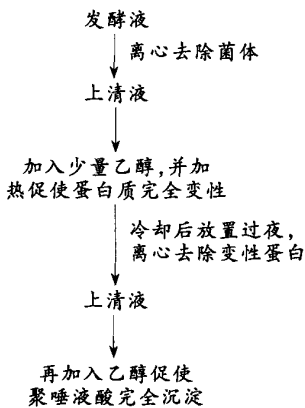


图 1 乙醇分步沉淀法分离聚唾液酸工艺示意图

为明确促使蛋白质变性沉淀过程中各因素及其交互作用的影响,考察了加热温度、加热时间、乙醇浓度和 pH 四个因素对蛋白质去除率及聚唾液酸回收率的影响,采用正交中心组合实验设计(见表 1),并进行回归分析和方差分析。

表 1 正交中心组合设计表及实验结果

试验号	加热温度 $X_1/^\circ\text{C}$	乙醇体积 分数 $X_2/\%$	加热时间 X_3/h	pH X_4	蛋白去除率 $Y_1/\%$	聚唾液酸回收率 $Y_2/\%$
1	68	48	1.4	7.85	54.2	81.6
2	68	48	1.4	3.85	50.8	88.6
3	68	48	0.4	7.85	58.7	86.6
4	68	48	0.4	3.85	60.7	90.3
5	68	24	1.4	7.85	33.4	95.5
6	68	24	1.4	3.85	26.2	102.8
7	68	24	0.4	7.85	15.1	88.8
8	68	24	0.4	3.85	50.8	99.7
9	28	48	1.4	7.85	26	78.3
10	28	48	1.4	3.85	-1.7	81.6
11	28	48	0.4	7.85	25	77.5
12	28	48	0.4	3.85	6	78.3
13	28	24	1.4	7.85	29.5	77.9
14	28	24	1.4	3.85	29.8	94.6
15	28	24	0.4	7.85	22.1	92.8
16	28	24	0.4	3.85	32.1	88.8

续表 1

试验号	加热温度 $X_1/^\circ\text{C}$	乙醇体积 分数 $X_2/\%$	加热时间 X_3/h	pH X_4	蛋白去除率 $Y_1/\%$	聚唾液酸回收率 $Y_2/\%$
17	76	38	0.9	5.85	45.3	105.8
18	20	38	0.9	5.85	-4.7	93.3
19	48	52	0.9	5.85	54.7	67.6
20	48	24	0.9	5.85	-8.2	95.9
21	48	38	1.6	5.85	35	91.5
22	48	38	0.2	5.85	34.2	88.8
23	48	38	0.9	8.65	34.5	88.8
24	48	38	0.9	3.05	26.8	83.2
25	48	38	0.9	5.85	40.7	90.8

用 SAS 软件包进行 RSREG(响应面回归)对实验结果分析,拟合的二次回归方程式为:

$$Y_1 = 91.686 + 0.056X_1 - 1.62X_2 - 35.9X_3 - 16.3X_4 + 0.0079X_1^2 + 0.049X_1X_2 + 0.017X_2^2 - 0.119X_1X_3 - 0.25X_2X_3 + 16.45X_3^2 - 0.077X_1X_4 + 0.25X_2X_4 + 3.5X_3X_4 + 0.697X_4^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 52.27 - 0.826X_1 - 2.74X_2 + 7.48X_3 + 4.08X_4 + 0.011X_1^2 - 0.00047X_1X_2 - 0.0455X_2^2 + 0.051X_1X_3 - 0.039X_2X_3 - 1.05X_3^2 - 0.0153X_1X_4 + 0.0384X_2X_4 - 1.15X_3X_4 - 0.408X_4^2 \quad (2)$$

Y_1, Y_2 的决定系数 R^2 分别为 0.80, 0.82, 回归标准偏差 S 分别为 178.4, 32.38, 方程的 F -检验 Y_1 为显著, Y_2 为高度显著, 说明方程拟合程度较好。方差分析结果表明, 加热温度(X_1), 乙醇添加量(X_2)对蛋白去除率(Y_1)和聚唾液酸回收率(Y_2)有显著影响, pH 和加热时间均不显著。 Y_1 回归模型的一次项 F -检验为高度显著, 二次项不显著, 交互项为显著; Y_2 回归模型的一次项 F -检验为高度显著, 二次项为显著, 交互项不显著。说明 4 个因素的主效应对蛋白去除率(Y_1)和聚唾液酸回收率(Y_2)为高度显著, 而各因素的交互效应对蛋白去除率(Y_1)有显著影响, 对聚唾液酸回收率(Y_2)影响不显著。 Y_1, Y_2 回归模型存在稳定点分别为 $(-1.6, 12.6, 0.26, 8.67), (31.2, 29.1, 3.0, 1.4)$, 稳定点类型为马鞍点。根据函数增减性, 在实验取值范围内, 蛋白去除率(Y_1)随加热温度和乙醇浓度增加而增加; 聚唾液酸回收率(Y_2)随加热温度增加而增加, 随乙醇浓度增加而减小。乙醇浓度的增加有利于蛋白的去除但也造成了聚唾液酸回收率的下降, 因此需要综合考虑蛋白的去除率和聚唾液酸的回收率, 选取比较合适的工艺条件为: 加乙醇至 40%, 80℃ 恒温 1h, pH 为 2.0。

根据优化结果, 进行验证实验, 最终蛋白质的去除率达到 64.6%, 聚唾液酸的回收率为 93.1%。

采用乙醇分步沉淀法提取聚唾液酸过程中, 在第

1 步乙醇沉淀时,加热使蛋白的变性更加完全,大部分蛋白变性后发生聚集和沉淀,变性蛋白重新溶解的能力很弱,但是与此同时,由于体系中乙醇浓度不高,大部分聚唾液酸仍然留在上清液中。而在第 2 步乙醇沉淀过程中聚唾液酸才完全沉淀出来,从而与上清液中的绝大部分小分子物质分离开来。

2.2 乙醇沉淀-过滤法

在乙醇分步沉淀法去除蛋白的实验中发现,增加乙醇添加量虽然可以使蛋白去除得更为彻底,但是也会造成部分聚唾液酸同时沉淀下来而使损失增加,二者不能兼顾。若先使聚唾液酸和变性蛋白质完全沉淀,再依据聚唾液酸和变性蛋白重新溶解能力的显著差异也能达到分离聚唾液酸的目的,并有可能克服第 1 种分离工艺的缺陷。因此拟定第 2 种分离工艺(乙醇沉淀-过滤法),如图 2 所示。

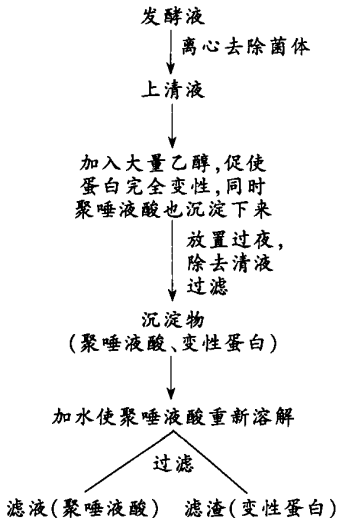


图 2 乙醇沉淀-过滤法分离聚唾液酸工艺示意图

2.2.1 乙醇沉淀和聚唾液酸的共同沉淀

根据乙醇分步沉淀实验得到的结论:乙醇浓度越高,聚唾液酸的溶解度越低,温度越高,聚唾液酸溶解度越高,加热时间和 pH 的影响不显著。因此要使聚唾液酸沉淀得更加完全,需要加入高浓度的乙醇,选取较低的温度,因此选用原发酵液(pH 6.4)加入一定量的乙醇,在室温下来沉淀聚唾液酸,其中这些因素中乙醇浓度使主要的影响因素,添加乙醇目的是为了使聚唾液酸沉淀,同时沉淀的蛋白也发生了变性,因此聚唾液酸的损失是该步骤考察的主要目标,这里测定了聚唾液酸在不同乙醇浓度时的溶解度如表 2,从而衡量聚唾液酸损失的量。

表 2 聚唾液酸在不同乙醇浓度中的溶解度

乙醇体积百分数/%	66.7	75	80	83.3
聚唾液酸 /g·L ⁻¹	0.157	0.053	0.037	0.027

从表 2 可以看出,乙醇浓度越高,聚唾液酸溶解度越低,沉淀越彻底,当乙醇浓度达到 75% 时,聚唾液酸溶解度仅为 0.053 g/L,再增加乙醇浓度会耗费大量乙醇,但是对聚唾液酸的回收率提高意义不大,因此选用 75% 乙醇来沉淀聚唾液酸,然后使聚唾液酸溶解过滤,除去变性蛋白,最终可以使蛋白的去除率达到 89.5%,聚唾液酸回收率达到 94.5%。

在这一工艺过程中,添加乙醇至体积分数为 75% 后,聚唾液酸和蛋白质沉淀下来,而小分子杂质和色素仍可以溶解于上清液之中,可被除去。

2.2.2 过滤工艺的确定

采用乙醇沉淀-过滤法工艺时,聚唾液酸回收率较高,去除蛋白更为有效。但是乙醇沉淀得到的聚唾液酸和蛋白的混合物加水后,变性蛋白在水中会形成非常细小的颗粒,需要很高离心力才能使之沉降。而若采用直接过滤很容易形成可压缩的滤饼,过滤速度相当缓慢。因此,在过滤过程中需要加入助滤剂(硅藻土)以提高过滤速率,并且助滤剂形成的滤饼,可以拦截很细小的蛋白质颗粒,提高过滤效果。因此需对助滤剂的添加量进行研究。

由过滤速率公式^[11]可知,

$$\frac{dV}{dt} = \frac{kA^2}{2(V + V_e)} \quad (3)$$

式中: V 表示滤液体积, t 表示过滤时间, A 表示过滤面积, k 表示过滤常数, V_e 表示当量滤液体积。

积分式(3)后得到: $kt = (V^2 + 2VV_e)/A^2$ (4)

由式(4)可以看出: k 越大,相同时间得到的滤液越多,即过滤的平均速率越大。测定了不同助滤剂添加量时所对应的时间-滤液体积($V-t$)曲线,对 $V-t$ 曲线用式(4)进行拟合,确定不同助滤剂添加量时的过滤常数 k ,从而可以判断平均过滤速率的快慢,最终确定助滤剂的添加量。不同助滤剂添加量时过滤时间与滤液体积的关系如图 3 所示。

根据拟合结果,作出 k (过滤常数)-助滤剂添加量关系如图 4 所示。

从图 4 中可以看出过滤常数 k 随着助滤剂添加量的增加而增加,当助滤剂添加量从 5 g/L 增加到 15 g/L 时, k 迅速增加,再增加助滤剂用量时, K 的增加速度趋于平缓,说明当助滤剂用量为 15 g/L 发酵液时,能够明显的增加过滤速度,大于 15 g/L 时过

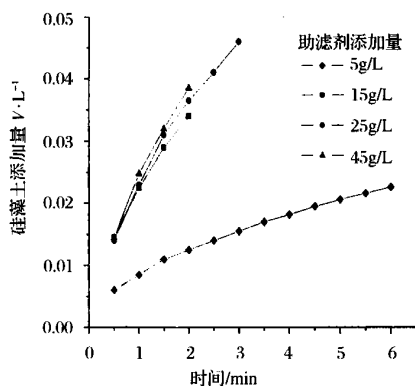


图3 不同硅藻土添加量时的 $V-t$ 的关系
滤速率的增加并不明显。因此助滤剂添加量定为 15 g/L 发酵液,既可以提高过滤效率,又可以尽量减少助滤剂的用量。

2.3 几种除蛋白方法的比较

为检验上述工艺条件的脱蛋白效果,与聚唾液酸分离过程中其他脱蛋白工艺(Sevage 试剂法、盐析法)进行了比较,结果如表 3 所示。

从表 3 中可以看出,4 种提取聚唾液酸的方法的

表 3 Sevage 试剂法、盐析法、乙醇分步沉淀法和乙醇沉淀-过滤法脱蛋白的效果对比

方法	处理前			处理后			蛋白质 去除率 /%	聚唾液酸 回收率 /%
	体积 /L	蛋白质 /mg·L ⁻¹	聚唾液酸 /mg·L ⁻¹	体积 /L	蛋白质 /mg·L ⁻¹	聚唾液酸 /mg·L ⁻¹		
Sevage 法	0.05	814.5	9 220	0.050	569.8	8 900	30	96.5
盐析法	0.05	814.5	9 220	0.053	556.23	7 980	28.2	91.7
乙醇分步沉淀法	0.01	264.24	1 573	0.016	59.5	931	64.6	93.1
乙醇沉淀-过滤法	0.02	2 512.7	8 596	0.030	176.2	5 413.0	89.5	94.5

3 结 语

应用不可逆变性后的蛋白溶解力与聚唾液酸溶解力的显著差异,得到了一种聚唾液酸分离过程中有效脱蛋白的工艺。由于聚唾液酸是一种生物可溶性多糖,具有多糖的共性,因此该方法也为可溶性多糖与蛋白的分离提供了一条新的思路。

参 考 文 献

- 1 卢大用,胥 彬. 唾液酸研究的一些新进展[J]. 生物化学杂志, 1994, 57(1):6~8
- 2 金 城,张树政. 糖生物学与糖工程兴起与前景[J]. 生物工程进展, 1995, 15(3):12~17
- 3 Varki A, Cummings R, Esko J, et al. Essentials of Glycobiology[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999
- 4 李连生,刘克刚,姚祝军,等. 唾液酸类化合物的合成研

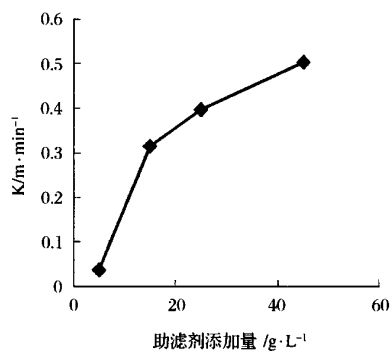


图 4 助滤剂添加量与过滤常数的关系

回收率都比较高,保持在 90% 以上。盐析法与 Sevage 法脱蛋白的效率较低。Sevage 试剂法使用了 CHCl_3 和正丁醇,易污染环境,并且工艺过程需要进行多次脱蛋白处理,步骤较为繁琐;盐析法需要加入大量 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,需要在后续的分离过程中脱盐;乙醇分步沉淀法提高了蛋白质的去除率,但蛋白的去除仍不够彻底。乙醇沉淀-过滤法能够去除绝大部分的蛋白,并且保持了较高的聚唾液酸回收率,优于其他 3 种方法。

究进展[J]. 有机化学, 2002, 22(10):718~734

- 5 Gregoriadis G, McCormack B, Wang Z. Polysialic acids: Potential in drug delivery[J]. FEBS Letters, 1993, 315(3): 271~276
- 6 Sutherland I W. Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides[M]. Cambridge University Press, 1990
- 7 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
- 8 吴剑荣,詹晓北,朱 莉. 大肠杆菌发酵液中唾液酸的提取[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(1):8~9
- 9 于军华. 聚唾液酸生产菌种的选育及其发酵工艺的研究[D]. 江南大学硕士学位论文, 2003
- 10 郑志永. 聚唾液酸及唾液酸单体的发酵生产研究[D]. 无锡轻工大学硕士学位论文, 2001
- 11 朱家骅,叶世超,夏素兰. 化工原理[M]. 北京:科学出版社, 2001

(下转第 31 页)

- 3 Ambat P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface methods[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17: 331~335
- 4 Ratnam B V V, Narasimha Rao M, Dmodar Rao M, et al. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2003, 19: 523~526
- 5 Trupkin S, Levin S, Forchiassin F. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30: 682~690
- 6 Azaola A, Bustarnante P, Huerto S, et al. Use of response surface methodology to describe biomass production of *Bifidobacterium infantis* in complex media [J]. Biotechnology Techniques, 1999, 13: 93~95
- 7 Venkata Dasu V, Panda T. Optimization of microbiological parameters for enhanced griseofulvin production using response surface methodology [J]. Bioprocess Engineering, 2002, 22: 45~49
- 8 Hujanen M, Linko S, Linko Y Y, et al. Optimization of media and cultivation conditions for L(+) (s)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NNRL B-441[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56: 126~130
- 9 GB/T16347—1996. 乳酸菌饮料中乳酸菌的微生物学检验[S]
- 10 李用芳, 李学梅, 单英芳, 等. 唾液链球菌嗜热亚种和乳杆菌最佳促生长剂的选择[J]. 食品与发酵工业, 1998, 24(3): 50~52, 65
- 11 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 中国科学院出版社, 1978. 266~267
- 12 万琦, 陆兆新. 脱苦大豆多肽产生菌的筛选及其水解条件的优化[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 29~32
- 13 吕加平, 梁占东, 骆承萍, 等. 乳酸菌菌培养基的优化设计[J]. 中国乳品工业, 199, 27(3): 12~15
- 14 张建友, 李艳武, 赵群波, 等. 冻干乳酸菌菌种增殖培养基的优化[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(5): 40~43
- 15 黄良昌, 吕晓玲, 姚秀玲. 保加利亚乳杆菌浓缩培养的研究[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(1): 12~15

Optimization of A Culture Medium for Cell Multiplication of *Streptococcus sativarius* subsp *thermophilus* STX2 Using Response Surface Methodology

Huang Lijin Lu Zhaoxin Yuan Yongjun

(College of Food Science & Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing, 210095, China)

ABSTRACT Response surface method was used to optimize the MRS-based enrichment medium of *S. sativarius* subsp *thermophilus* STX2. The influence of twelve additives and the initial pH of the media were evaluated using a Plackett-Burman design. Our results showed that CaCl_2 , defatted soybean hydrolyzate and the initial pH of the media were the main factors while the other additives had no significant effect on the cell multiplication of STX2. The central composite rotatable design and response surface analysis were then used to determine the optimal levels of the main factors. The optimized medium were: MRS supplemented with 1.12 g/L CaCl_2 and 11.88 mL/L defatted soybean hydrolyzate, and the initial pH of the media was 7.18. STX2 concentration increased from 1.5×10^8 cfu/mL to 6.8×10^8 cfu/mL using the optimized medium.

Key words *Streptococcus sativarius* subsp *thermophilus*, enrichment medium, Plackett-Burman design, central composite notatable design, response surface methodology

(上接第 26 页)

Protein Removing Process in Separation of Polysialic Acid

Li Wenqiang Zhan Xiaobei Zhang Limin Zheng Zhiyong

(Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, 214036, China)

ABSTRACT Based on the significant difference of solvency between polysialic acid and irreversibly denatured protein, two processes removing protein from the polysialic acid broth were carried out. The optimal conditions of protein removing process were gained, i.e. Ethanol was added to 75% in supernatant of polysialic acid broth. 15 g/L kieselguhr filter aid was added and filtrated after deposition was formed and the supernatant was discarded. De-ion water was added to dissolve the polysialic acid in the filter cake. The polysialic acid solution was obtained after filtration. The yield of polysiac acid is 94.5%, and the rate of removing protein reaches 89.5%.

Key words polysialic acid, separation, ethanol deposition, filtration, protein removing