

过滤法分离纯化透明质酸

盛瑞堂, 孙猛, 谭天伟

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 针对透明质酸的分离纯化, 提出了用过滤法分离纯化透明质酸的工艺. 首先以 20 g/L 的溶解浓度将透明质酸粗品溶于去离子水中, 并加入硅藻土作为吸附剂, 调节溶液 pH 至 4.6~4.8; 然后采用硅藻土过滤、滤板过滤、超滤, 用乙醇结晶后可得葡萄糖醛酸含量高达 44.2% 的透明质酸. 该工艺已成功应用于工业生产, 所得产品的葡萄糖醛酸含量达 47.3%, 蛋白质含量为 0.01%, 相对分子量可达 110 万, 收率高达 90.5%.

关键词: 透明质酸; 分离; 纯化; 过滤; 工业生产

中图分类号: Q539 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2006)02-0285-04

1 前言

透明质酸(HA)是由 β -D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰基-D-氨基葡糖交替聚合而成的高分子粘多糖. HA 最先由 Mayer 等在 1934 年从牛眼玻璃体中分离出来. 近年来, 由于对 HA 的理化性质、生理功能、合成与代谢等了解的逐步深入, HA 越来越广泛地应用于化妆品和临床医学方面^[1,2].

目前生产透明质酸主要用细菌发酵法, 但是分离方法却多种多样. 文献报道的有季铵盐法^[3-5]、酶法^[6]、氯仿法^[7]、离子交换层析法和凝胶层析法, 如 DEAE-纤维素、DEAE-Sephadex A-25 和 Sephadex-100 层析柱^[6]等. 季铵盐多用于发酵液的直接沉淀, 但也容易引起其他多糖和蛋白质的沉淀, 影响产品纯度; 另外季铵盐的用量较大, 成本较高; 酶法所得 HA 的蛋白含量仍达 1%^[3], 且也极易把新的蛋白带入产品中. 离子交换层析法和凝胶层析法是常规的制备较高纯度 HA 的方法, 但成本较高. 为此, 本工作提出了一种简单有效并可以规模化生产 HA 的分离纯化方法, 即采用过滤法分离纯化发酵液中的 HA, 并将此工艺成功用于工业生产中.

2 实验

2.1 实验材料

HA 粗品(北京化工大学生命科学与技术学院提供)、工业乙醇(95%)、硅藻土、活性炭、滤板(H 乙-1 型)、支撑板; 葡萄糖醛酸对照品、牛血清白蛋白对照品为生化试剂.

2.2 实验仪器

实验仪器: 过滤面积为 0.5 m² 的硅藻土过滤器, 过滤面积为 0.2 m² 的板框过滤器, 过滤面积为 0.18 m² 的

中空纤维膜(截留分子量 6 万).

2.3 实验方法

2.3.1 分离纯化方法

HA 发酵结束后, 将发酵液加入 2 倍发酵液体积的工业乙醇(95%)中, 即得粗品沉淀(含 HA 约 12%). 取出粗品以 20 g/L 的浓度溶于去离子水, 加入吸附剂硅藻土充分搅拌以吸附菌体杂质, 调其 pH 至 4.6~4.8; 然后再采用硅藻土过滤、滤板过滤、超滤; 最后用 95% 的乙醇沉淀制得粉状透明质酸. 将 HA 产品进行真空干燥, 即得精制透明质酸.

2.3.2 分析测试方法

葡萄糖醛酸含量测定: 参照 Bitter-Muir^[8] 的喹啉法, 与葡萄糖醛酸对照品对照.

蛋白质含量的测定: 参照 Bradford^[9] 法, 与牛血清白蛋白对照品对照.

相对分子量的测定: 采用乌氏粘度法^[10]. 参比液为 0.2 mol/L 的 NaCl 溶液, 测定温度为(25±0.05)°C, 3 点外推至比浓度为 0, 求出特性粘度 $[\eta]$, 并根据公式 $[\eta]=3.6 \times 10^{-4} M_r^{0.78}$ 计算出平均相对分子量(Da).

HA 收率的计算:

$$\text{HA 收率} = \frac{\text{产品中葡萄糖醛酸含量}(\%) \times \text{产品质量}(\text{g})}{\text{发酵液中葡萄糖醛酸含量}(\text{g/L}) \times \text{发酵液体积}(\text{L})}$$

3 结果与讨论

3.1 工艺参数的确定

3.1.1 粗品的溶解

透明质酸水溶液的浓度太高时, 溶液粘度太大, 难以操作, 因此需选择一个合适的 HA 浓度. 经实验, 选择 HA 浓度为 20 g/L, 并在溶液中加入 10%~12% 乙醇(与

水的体积比), 即得 HA 粗品溶解液。

3.1.2 吸附剂的选择

硅藻土和活性炭均是常用且有效的吸附剂。在相同粗品溶解液中加入占 HA 粗品质量 9% 和 18% 的活性炭吸附剂和占 HA 粗品质量 9% 和 18% 的硅藻土吸附剂, 然后使之分别经过相同的过滤工艺, 最后根据滤液的浊度、产品中的葡醛酸含量、产品中蛋白含量和滤液收率 4 个参数, 比较活性炭和硅藻土的吸附效果, 结果如表 1 所示。由表可看出, 从整体除杂效果来看, 加入活性炭和硅藻土作为吸附剂均好于不加吸附剂。从滤液浊度

可以看出硅藻土比活性炭吸附杂质的能力强。从最终产品中的葡萄糖醛酸含量看, 9% 和 18% 的活性炭的效果基本相同, 硅藻土的加量为 18% 时, 效果明显优于活性炭。从最终产品中的蛋白质含量看, 使用硅藻土得到的产品的蛋白含量均低于使用活性炭。从终滤液收率看, 不加任何吸附剂的样品的收率最低, 活性炭次之, 硅藻土最高。这是由于硅藻土不仅可以吸附杂质, 还具有助滤的作用, 这样就可减少过滤过程溶液中 HA 的截留量。因此选择硅藻土作为吸附剂, 其最佳用量为 18%。

表 1 吸附剂的影响

Table 1 Effect of sorbent

Sorbent	Filtrate turbidity (OD ₆₀₀)	Glucuronic acid content of HA (%)	Protein content of HA (%)	Filtrate yield (%)
No sorbent	1.128	27.9	2.01	48.5
9% active carbon	0.251	37.9	1.37	76.5
18% active carbon	0.266	37.7	1.89	77.6
9% silicon earth	0.069	35.4	1.25	90.6
18% silicon earth	0.079	42.4	1.25	94.1

3.1.3 硅藻土的用量

固定过滤方式, 将硅藻土用量从 0 增至占 HA 粗品质量的 20%, 考察滤液浊度、产品中葡醛酸含量、蛋白含量和收率。由图 1 可见, 当硅藻土的用量大于 18% 时, 滤液的浊度、产品的葡醛酸含量、蛋白含量和收率均没有显著变化。因此, 选择硅藻土的用量为 18%。

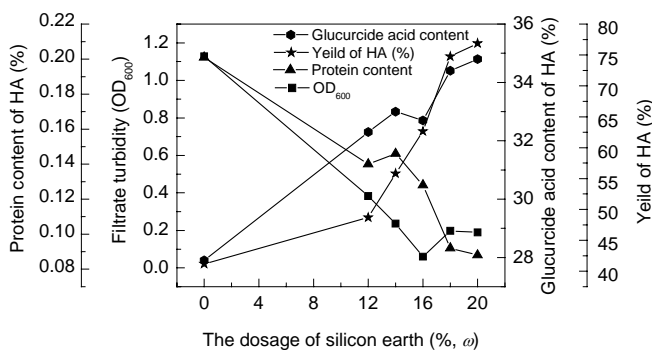


图 1 硅藻土用量的影响

Fig.1 Effect of silicon earth dosage

3.1.4 pH 对过滤的影响

分别调节 pH 为 4.0, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 6.0, 7.0, 考察滤液浊度和蛋白含量。由图 2 可知, 在 pH=4.0 时, 产品的葡萄糖醛酸含量较低, 但在 pH 为 4.4~7.0 时, 产品的葡萄糖醛酸含量基本无变化, 即 pH 为 4.4~7.0 对产品质量基本无影响。蛋白含量和浊度的变化趋势基本一致, 浊度在 pH=4.8 时最小, 蛋白在 pH=4.6 时最小。说明 HA 粗品中所含杂蛋白的等电点在 4.6~4.8 间。因此, pH 值应选在 4.6~4.8 之间。

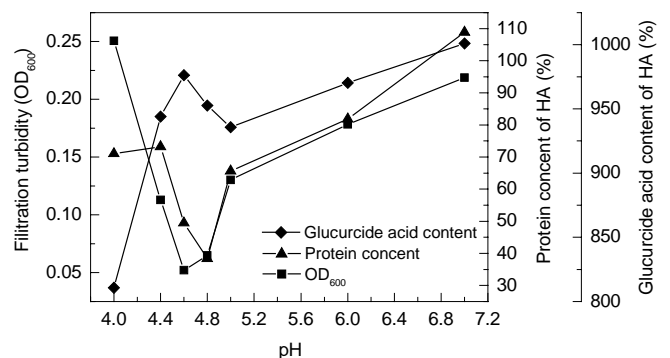


图 2 pH 对过滤效果的影响

Fig.2 Effect of pH on the filtration results

3.1.5 过滤方式

将经初步处理后的相同的 HA 粗品溶解液各 30 L 以 4 种不同的方式过滤, 见表 2。一次过滤时都采用硅藻土过滤, 二次过滤采用硅藻土过滤或滤板过滤, 三次过滤采用滤纸过滤或取消过滤。硅藻土过滤的方法是将 HA 粗品溶解液加入硅藻土, 经过已预涂好的硅藻土滤饼, 收集滤液即可。改变预涂的硅藻土和助滤硅藻土中粗土与细土的质量比, 过滤效果会不同。本实验通过不同过滤方法的组合确定了方式 4 为最佳过滤方式, 经 2 次过滤后的产品中葡萄糖醛酸含量就可达 44.2%。方式 4 利用的 0.5 m² 的过滤机装 1 次硅藻土最多可过滤 27 L。

3.1.6 超滤

分离过程中溶液的透明质酸浓度小于 0.5%, 直接采用乙醇结晶造粉会消耗大量乙醇, 所以采用超滤浓缩透明质酸。实验采用相同的 HA 溶液, 前者直接用乙醇沉淀, 后者超滤后用乙醇沉淀, 结果见表 3。由表可以

表 2 几种过滤方式的效果对照

Table 2 Comparison of filtration results with several filtration ways

No.	First filtration			Second filtration			Third filtration	Glucuronic acid content of HA (%)
	Bolster	Silicon earth for filter mass (g)	Silicon earth for filter aid (g/L)	Bolster	Silicon earth for filter mass (g)	Silicon earth for filter aid (g/L)	Filter	
1	Bolster board	Coarse 622	Coarse 1 330	Bolster board	Coarse 311 Small 311	Coarse 10 Small 3.3	Filter paper	39.2
2	Bolster board	Coarse 622 Small 311	Coarse 1 330	Bolster board	Coarse 187 Small 435	Coarse 10 Small 3.3	Filter paper	45.5
3	Filter board B-1	Coarse 187 Small 435	Coarse 10 Small 3.3	Filter board B-1	—	—	—	40.5
4	Bolster board	Coarse 187 Small 435	Coarse 10 Small 3.3	Filter board B-1	—	—	—	44.2

看出, 超滤浓缩后的 HA 溶液体积减少了 67.1%, 从而使乙醇的消耗量降低了 67.1%; 同时超滤还可以除去杂蛋白总量的 53.9%; 而超滤单步收率可达 95.2%. 因此, 采用超滤不仅使乙醇用量显著降低, 还可以去除一些小分子杂蛋白, 改善产品质量.

表 3 未使用与使用超滤的比较

Table 3 Comparison between without or with ultrafiltration

	Without ultrafiltration	With ultrafiltration
HA solution (L)	29.5	9.7
Alcohol consumed (L)	59.0	19.4
Protein in HA solution (g)	13.45	7.25

3.2 工业应用

3.2.1 工业应用结果

上述 HA 分离纯化工艺已在新疆独山子石化总厂应用于 2 t/a 工业装置, 收率达 90.5%. 其产品质量分析结果如表 4 所示. 可以看出本工艺生产的产品质量明显优于文献^[11]结果, 且产品中葡萄糖醛酸含量也优于文献^[12]结果, 已达到化妆品级的要求.

表 4 工业产品质量分析

Table 4 The quality parameter of the HA in factory

Item	Result
Glucuronic acid content (%)	47.3
Protein content (%)	0.01
Relative molecular weight (Da)	1.1×10^6
Residua after burning (% ω)	12.9
Lost weight after drying (% ω)	7.4
Number of bacterium	10
Haemolysis	Nonexistence
Hemolytic streptococcus	Nonexistence

3.2.2 成本比较

目前国内已有工业应用的提取工艺是经过一次硅藻土过滤、一次滤板过滤或两次板框过滤, 然后用乙醇沉淀, 这样要消耗大量乙醇. 本工艺在硅藻土过滤和滤板过滤后增加了超滤. 表 5 粗略比较了两种工艺的生产成本, 其中用于 2 t/a 的透明质酸生产的超滤膜组件的使用寿命为 1 年, 价值为 10 万元左右, 即 HA 超滤的设备成本为 50 元/kg. 乙醇回收率为 80%, 其他原料是指硅藻土、滤板等. 通过比较可知, 本研究工艺比原有工

艺降低成本约 36%.

表 5 成本对比

Table 5 Cost comparison between the two techniques (¥/kg)

	Conventional techniques	This work
Acohol	1574.6	852
Other raw material	296	296
Ultrafiltration membrane	0	50
Total	1870.6	1198

4 结论

(1) 过滤法分离纯化透明质酸的工艺方法是: 将透明质酸粗品以 20 g/L 的浓度溶于水, 加入硅藻土作为吸附剂, 调节溶液 pH 至 4.6~4.8; 在 HA 粗品溶液中加入 10 g/L 粗硅藻土和 3.3 g/L 细硅藻土为助滤剂, 用 187 g 粗硅藻土和 435 g 细硅藻土预涂层过滤, 然后用 H 乙-1 型滤板过滤. 经过超滤后, 将滤液用乙醇沉淀并干燥, 即可得葡萄糖醛酸含量达 44.2% 的透明质酸.

(2) 工业应用: 将上述工艺用于 2 t/a 的工业装置, 得到的 HA 的葡醛酸含量高达 47.3%, 蛋白含量仅为 0.01%, 分子量为 110 万, 收率为 90.5%, 并且比原有工艺节约成本 36%.

参考文献:

- [1] 黄光斗, 赵宇, 张方樱, 等. 透明质酸的制备与应用研究进展 [J]. 广西轻工业, 2002, 1: 24-27.
- [2] 凌裴学. 透明质酸 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 5-8.
- [3] 王淼, 王立媛. 发酵液中透明质酸的分离纯化 [J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(6): 106-109.
- [4] Cifonelli J A, Mayeda M. The Purification Hyaluronic Acid by the Use of Carcoal [J]. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24: 397-400.
- [5] 郭学平, 凌沛学, 王春喜, 等. 透明质酸的生产 [J]. 药物生物技术, 2000, 7(1): 61-64.
- [6] 钱万英, 石堂春, 周明霞, 等. 透明质酸的制备与鉴定 [J]. 生物学杂志, 1999, 16(6): 19-21.
- [7] 郭育涛, 陈坚, 高海军, 等. 发酵液中透明质酸提取的新方法 [J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(5): 437-439.
- [8] Bitter T, Muir M. A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction [J]. Anal. Biochem., 1962, 4: 19-24.
- [9] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein (Dye Binding) [J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248-254.
- [10] Laurent T C, Ryan M, Pietruszkiewicz A. Fractionation of

- Hyaluronic Acid, the Polydispersity of Hyaluronic Acid from the Bovine Vitreous Body [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 42(3): 476-485.
- [11] 倪杭生, 李润, 贺艳丽, 等. 透明质酸的离子交换层析纯化 [J]. *中国医药工业杂志*, 2001, 32(11): 485-488.
- [12] 洪水声, 陈佳, 滕利荣, 等. 兽疫链球菌变异株产生的透明质酸的纯化及表征 [J]. *高等学校化学学报*, 2004, 25(5): 853-857.
- [11] 倪杭生, 李润, 贺艳丽, 等. 透明质酸的离子交换层析纯化 [J].

Separating and Purifying Hyaluronic Acid by Filtration Method

SHENG Rui-tang, SUN Meng, TAN Tian-wei

(*College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China*)

Abstract: A filtration method was developed to separate and purify hyaluronic acid (HA) from fermentation broth. Crude HA was dissolved in distilled water and reached its concentration of 20 g/L. Silicon earth as sorbent was added into the HA solution. pH of the solution was adjusted between 4.6~4.8. Then, the solution was filtrated with silicon earth, filter B-1 and ultrafiltration membrane. Finally the HA solution was crystallized by ethanol, thus, farinose HA containing glucuronic acid 44.2% was prepared. This method was successfully applied to the industry. The relative molecular weight of factory product was up to 1.1 million. The factory product contained 47.3% glucuronic acid and 0.01% protein. The yield of HA reach to 90.5% in the factory. The cost of the production was reduced to 64.3% by the filtration method in this work.

Key words: hyaluronic acid; separation; purification; filtration; industrialization