

透明质酸在电-膜分离过程中的迁移规律

张建东, 周海东, 倪晋仁

(北京大学环境学院环境工程系, 北京 100871)

摘要: 对电-膜分离技术用于透明质酸分离过程的可行性进行了初步研究. 着重研究了透明质酸在电场作用下的行为, 并考察了料液中透明质酸浓度、溶液 pH 值、离子强度、电流强度等因素对迁移过程的影响. 结果表明, 透明质酸透过膜的速度在一定范围内与料液的浓度和电流强度成正比, 在 pH 7~9 范围内透明质酸的电迁移率基本保持恒定. 膜孔径对迁移速度没有明显影响, 单位膜面积的产量也与电流密度成正比. 该方法能有效地将透明质酸与蛋白质分离.

关键词: 透明质酸; 电-膜分离; 膜分离

中图分类号: TQ028.8

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2007)01-0119-05

1 前言

透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)的生产主要有动物组织提取法^[1-3]和发酵法^[4-6]两种工艺. 由于受原料来源少及原料中透明质酸含量低的限制, 提取法生产透明质酸成本较高. 发酵法不受原料来源限制, 发酵液中透明质酸以游离状态存在, 易于分离纯化和形成规模化工业生产, 且发酵法无动物来源的致病病毒污染的危险, 目前提取法正逐渐被发酵法所取代.

目前, 发酵法生产透明质酸的产量为 4~6 g/L. 提取时先将发酵液稀释至透明质酸含量为 0.2~0.3 g/L, 然后用絮凝、离心等手段去除菌体, 再反复进行乙醇沉淀和选择性沉淀去除蛋白质等杂质. 每次沉淀用 2~3 倍体积的乙醇, 致使透明质酸的生产成本仍然很高, 极大地限制了透明质酸的应用范围.

电-膜分离技术是将膜分离技术与电泳原理相结合的一种新型分离技术. 大量实验表明, 在错流膜滤过程中施加电场可大幅度提高滤速^[7,8]. 由于透明质酸和蛋白质的带电特性差异极大, 所以利用电场力很容易将它们分离. 本工作就透明质酸在电-膜分离过程中的迁移规律进行了研究.

2 材料和方法

透明质酸购自北京耐确生物技术研究所. 滤膜采用上海兴亚净化材料厂的混合纤维素微孔滤膜, 直径 50 mm, 孔径 0.22 μm . 其他化学试剂均为分析纯试剂.

pH 7.0 磷酸盐缓冲液的配制: 称 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.9 g, 溶于 500 mL 去离子水中, 配成 0.1 mol/L 磷酸氢二钠储备液. 称 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.8 g, 溶于 500 mL 去

离子水中, 配成 0.1 mol/L 磷酸二氢钠储备液. 取磷酸氢二钠储备液 19.5 mL, 磷酸二氢钠储备液 30.5 mL, 加去离子水至 500 mL, 得到 0.01 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液.

碳酸氢钠缓冲液的配制: 称 4.2 g NaHCO_3 溶于 500 mL 水中, 配成 0.1 mol/L 溶液. 使用时稀释到所需浓度.

硼砂硫酸液的配制: 称取四硼酸钠 4.77 g, 溶于 500 mL 浓硫酸中.

咪唑试液的配制: 称咪唑 0.125 g, 溶于 100 mL 乙醇中, 置于棕色瓶中冰箱内保存.

考马斯亮蓝染色液的配制: 称 100 mg 考马斯亮蓝 G 250 溶于 50 mL 95%的乙醇中, 再加 85%磷酸 100 mL, 最后加水至 1000 mL, 配成考马斯亮蓝染色液.

摇瓶发酵培养基(%): 酵母膏 1, 蛋白胨 1.5~2, 葡萄糖 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, KH_2PO_4 0.12, Na_2HPO_4 0.1, NaCl 0.2, 调 pH 到 7.2. 121 $^\circ\text{C}$ 灭菌. 葡萄糖分开单独灭菌, 灭菌后再与其他成分混合.

电导率采用雷磁 DDS-307 电导率仪(上海)测定, pH 采用 HANNA pH201 pH 计(意大利)测定, 恒流电源采用北京市六一仪器厂 DYY-6C 型电泳仪, 吸光度采用上海精密科学仪器有限公司 722S 型分光光度计测定.

电-膜分离装置如图 1 所示, 主体由有机玻璃制成, 石墨作电极. 实验装置中间可被膜分隔成 3 个室, 分别称为阴极室、料液室和阳极室. 阳极室和阴极室的体积均为 29.3 mL, 料液室的体积为 25.1 mL. 膜的有效过滤面积为 12.6 cm^2 .

透明质酸含量测定: 取 5 mL 硼砂硫酸液置于具塞试管中, 在冰浴中冷却至 4 $^\circ\text{C}$. 加入 1 mL 样品, 轻轻摇动, 再充分混匀, 并不断用冰浴冷却. 然后将试管置于

收稿日期: 2006-01-18, 修回日期: 2006-05-18

作者简介: 张建东(1966-), 男, 河北省保定市人, 博士, 生物化工专业, E-mail: zhangjiandong@iee.pku.edu.cn; 倪晋仁, 通讯联系人, E-mail: nijinren@iee.pku.edu.cn.

沸水中加热 10 min. 将试管放在水中冷却至室温后, 加入 0.2 mL 吡唑试液, 混匀, 沸水浴中再加热 15 min. 冷却至室温后, 在 530 nm 处测定吸光度. 以葡萄糖醛酸作标准曲线, 根据葡萄糖醛酸的含量推算出透明质酸的量.

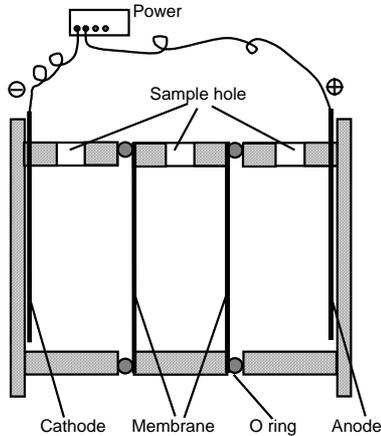


图1 电-膜分离提取透明质酸的装置

Fig.1 Scheme of electro-membrane separation apparatus

摇瓶发酵: 500 mL 三角瓶中放 100 mL 培养基, 接种兽疫链球菌, 37 °C 摇床培养.

发酵样品的预处理: 发酵结束后将三角瓶置于 80 °C 水浴中加热 20 min, 杀死细菌并终止发酵. 发酵液在 3000 r/m 离心 10 min. 上清液作为分离透明质酸的原料液.

蛋白质的测定方法: 取 0.3 mL 水加 3 mL 考马斯亮蓝染色液作参比液, 取 0.3 mL 样品加 3 mL 考马斯亮蓝染色液, 充分混匀后在 595 nm 处测定吸光度. 以牛血清白蛋白制作标准曲线, 计算样品中蛋白质的含量.

电-膜分离实验: 先将微滤膜放在去离子水中浸泡 24 h, 然后放在与实验所用相同的缓冲液中浸泡过夜. 将膜固定到实验装置后, 实验装置中间被膜分隔成阴极室、料液室和阳极室 3 个室. 实验时先用缓冲液充满阳极室和阴极室, 然后迅速将料液充满料液室, 接通电源. 在恒定电流下通电一定时间后, 关闭电源, 立即取出阳极室溶液, 冰箱中保存.

3 结果和讨论

3.1 透明质酸的跨膜扩散

将经过预处理的孔径 0.22 μm 的混合纤维素膜安装到电-膜分离装置中. 在料液室装入用 pH 7.0、浓度 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液配制的 0.1% 透明质酸溶液, 在两侧的隔室装入 pH 7.0、浓度 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液. 静置一定时间后, 将两侧隔室中的样品取出, 并测定透明质酸的浓度. 以浓度对时间作图, 得图 2. 由图可见,

在一定时间范围内, 透明质酸透过膜的速度基本不变. 由曲线斜率计算出透明质酸透过微滤膜的传质系数. 按透明质酸粗品中含 60% 纯透明质酸计算, 传质系数为 6.8×10^{-9} m/s. 如果料液中透明质酸的浓度为 0.1%, 分离膜采用 0.22 μm 微滤膜, 按此传质系数进行计算, 在实验进行 30 min 后, 由于扩散作用进入阳极室的透明质酸浓度为 0.32 μg/mL. 由于本研究的提取过程大部分在 30 min 内完成, 所以可以完全忽略扩散作用的影响. 用同样方法测定碱性条件下透明质酸通过微滤膜的传质系数为 2.89×10^{-8} m/s.

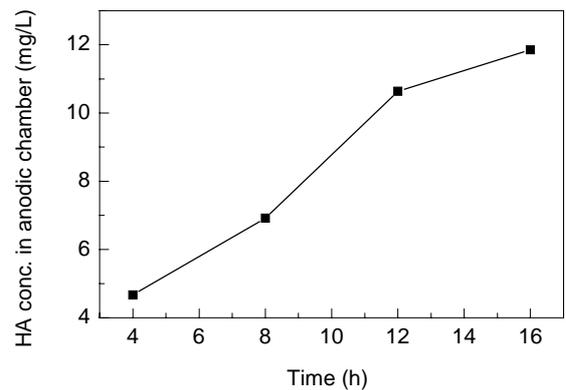


图2 透明质酸的跨膜扩散过程

Fig.2 Transmembrane diffusion of hyaluronic acid (HA)

3.2 透明质酸的电-膜分离过程

将 pH 7.0、浓度 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液配制的 0.1% 透明质酸溶液放入提取器, 阳极室和阴极室充满 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 提取过程如图 3. 在 50 mA 电流下 10 min 内阳极室溶液中透明质酸的浓度随时间线性增加, 10 min 后不再随提取时间变化. 这是由于在提取过程中阳极的电解反应使阳极室溶液的 pH 值不断降低. 当膜面附近的 pH 值低到透明质酸不带电荷时, 透明质酸就不再透过膜.

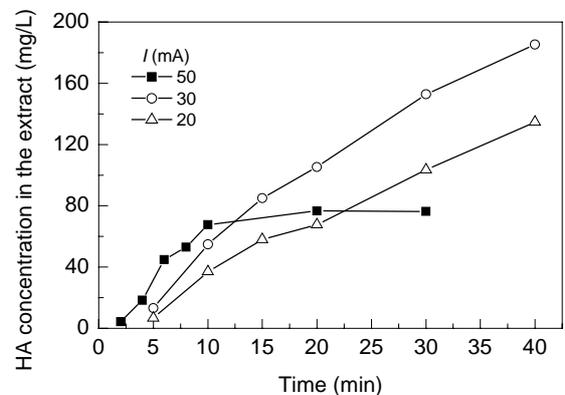


图3 透明质酸在电-膜分离中的迁移过程

Fig.3 Transport of HA in electro-membrane separation

在 20 和 30 mA 电流下与在 50 mA 下的结果有一明显的区别, 在 50 mA 条件下, 当超过 10 min 后, 阳极室的透明质酸浓度就不再增加, 最高浓度为 80 mg/L 左右. 而在小电流强度条件下提取到 40 min 时还没出现这种现象, 而且在 30 mA 条件下阳极液中透明质酸的浓度达到了 180 mg/L. 根据图中的斜率计算出不同电流条件下透明质酸透过微滤膜的速度 v (50 mA 条件下指前 10 min)与电流 I 的关系为 $v=0.36I+0.7$. 阳极室中溶液的 pH 值随时间的变化如图 4 所示.

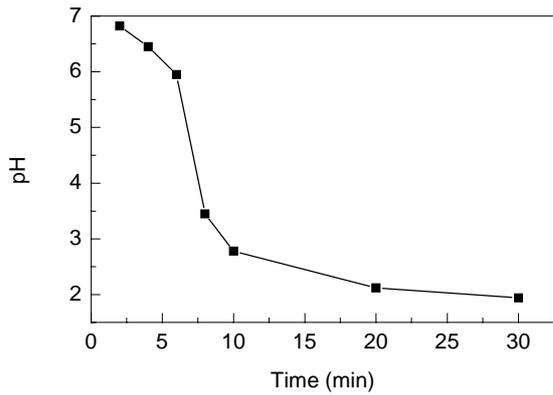


图 4 阳极室溶液 pH 值的变化
Fig.4 Variation of pH in anodic chamber

3.3 料液中透明质酸的浓度对提取过程的影响

当电场强度恒定时, 透明质酸分子的移动速度也保持恒定. 所以理论上单位时间通过膜的透明质酸的量应与料液中透明质酸的浓度成正比. 但在实际操作中, 当料液中透明质酸超过一定浓度时, 透明质酸透过膜的速率就不再增加, 如图 5 所示. 在高料液浓度时过膜速度不再变化的原因可能是由于在高浓度时透明质酸分子之间相互作用形成网架结构, 减慢了透明质酸进入膜孔的速度. 当料液中透明质酸的浓度低于 0.1%时, 迁移速度与料液中透明质酸的浓度呈很好的线性关系.

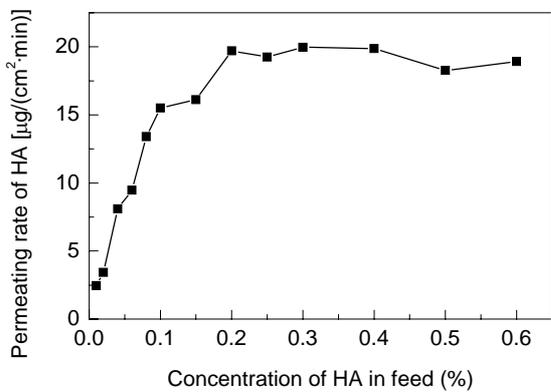


图 5 不同料液浓度下透明质酸的过膜速率
Fig.5 Permeating rate of HA passing through membrane at different feed concentrations

3.4 不同孔径膜的提取实验

据文献^[9]报道, 透明质酸分子在溶液中所占空间直径可达 0.4 µm, 而一般微滤膜的孔径为 0.22 µm. 透明质酸分子的直径大于膜孔径, 按理透明质酸透过膜时应该受到巨大的阻力, 并且透明质酸分子通过膜的阻力应该与膜孔的直径相关. 图 6 是不同孔径的膜在不同条件下的电-膜分离实验结果. 在相同条件下透明质酸透过两种孔径膜的速度近乎相同. 这表明透明质酸分子与一般的球形分子具有完全不同的运动行为. 在水溶液中透明质酸分子处于一种极度伸展的疏松的无规则线团状态. 虽然透明质酸分子所占空间的平均直径可达 0.4 µm, 但由于透明质酸分子是形状易变的柔性大分子, 而不是刚性的球体, 所以它能够通过孔径很小的微滤膜, 只有超滤膜才能截留透明质酸. 上面的实验结果可能正是由于透明质酸分子的柔性所致.

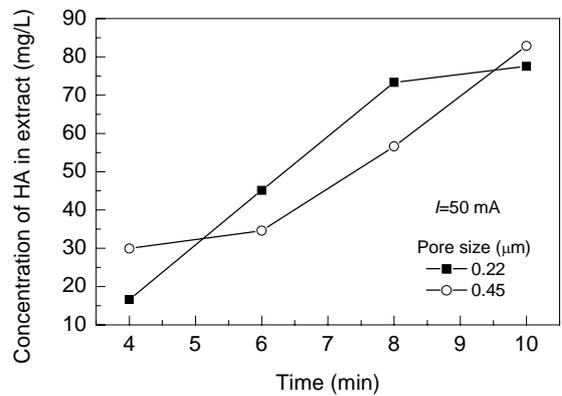


图 6 不同孔径的膜对透明质酸电-膜分离过程的影响
Fig.6 Effect of pore size on electro-membrane separation of HA

3.5 离子类型和强度对提取的影响

本研究采用增加缓冲液浓度和向缓冲液中加入乙酸钠等方法改变缓冲液的离子强度. 料液中透明质酸的浓度为 0.1%. 在不同溶液条件下以 50 mA 电流提取, 透明质酸的浓度变化如图 7 所示. 由于在改变离子强度的同时也改变了缓冲溶液的电导率, 所以图中的数据不能直接进行比较, 必须根据数据计算出透明质酸通过微滤膜的速度, 再用下式计算出透明质酸的电迁移率:

$$\mu = kV\kappa/I \quad (1)$$

其中, μ 为透明质酸的电迁移率[m²/(V·s)], k 为图 7 中的斜率, V 为体积(m³), κ 为溶液的电导率(S/m), I 为电流(A).

不同离子强度条件下透明质酸的电迁移率如表 1 所示. 由表可见, 通过增加磷酸盐缓冲液浓度增加离子强度与通过添加乙酸钠增加离子强度具有完全不同的结果. 在增加磷酸盐缓冲液的浓度后, 透明质酸的电迁

移率有所上升. 但添加乙酸钠后透明质酸的电迁移率却下降. 另外, 添加不同浓度的乙酸钠时, 透明质酸的电迁移率变化不大, 离子对透明质酸电迁移率的影响规律不明显.

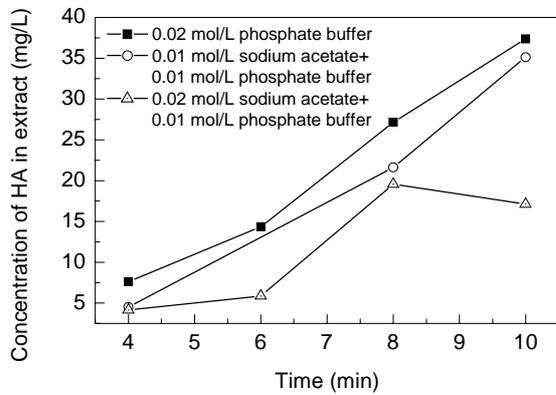


图7 离子强度对透明质酸电-膜分离过程的影响
Fig.7 Effect of ionic strength on electro-membrane separation

表1 不同离子强度条件下透明质酸的电迁移率

Table 1 Electrophoreses mobility of HA at various ion strength

Buffer	Electrophoreses mobility [$\times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$]
0.01 mol/L phosphate	1.96
0.02 mol/L phosphate buffer	2.24
0.01 mol/L sodium acetate+ 0.01 mol/L phosphate	1.71
0.01 mol/L sodium acetate+ 0.01 mol/L phosphate	1.71

3.6 溶液 pH 值对电-膜分离过程的影响

用不同 pH 值的缓冲液配制透明质酸浓度为 0.1% 的溶液, 阳极室与阴极室充满与料液中相同浓度和成分的缓冲液, 然后在 50 mA 条件下进行恒流电-膜分离实验, 结果如图 8 所示. 改变 pH 值同样会影响溶液的电导率.

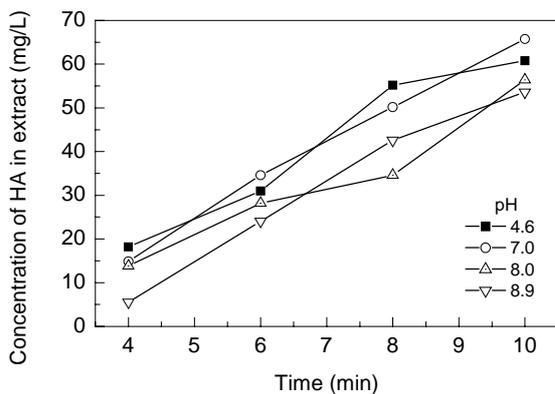


图8 溶液 pH 值对透明质酸电-膜分离过程的影响
Fig.8 Effect of pH on electro-membrane separation of HA

用式(1)计算得到的透明质酸电迁移率如表 2 所示. 从表可见, 在 pH 7~9 范围内透明质酸的电迁移率很相

近. 但在 pH 4.6 时透明质酸的电迁移率却低很多. 这可能是由于低 pH 值影响透明质酸的电离, 也可能是缓冲液中的乙酸根离子影响了透明质酸的电迁移率, 原因有待进一步研究.

表2 不同 pH 溶液条件下透明质酸的电迁移率

Table 2 Electrophoreses mobility of HA at different pH

pH	Electrophoreses mobility [$\times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$]
4.6	1.38
7.0	1.96
8.0	1.84
8.9	2.10

3.7 发酵液中透明质酸的提取

将经过预处理的发酵液放于提取装置的料液室, 发酵液中透明质酸的含量为 0.17 g/L, 电极室装入电导率与发酵液相近的磷酸盐缓冲液(浓度 0.06 mol/L, pH 7.0). 在 200 mA 电流下提取一定时间后, 测定阳极溶液中透明质酸和蛋白质的浓度. 透明质酸的测定结果如图 9 所示. 用考马斯亮蓝法不能测定出蛋白质的含量, 这说明在提取过程中透明质酸透过微滤膜的速度远远大于蛋白质透过微滤膜的速度.

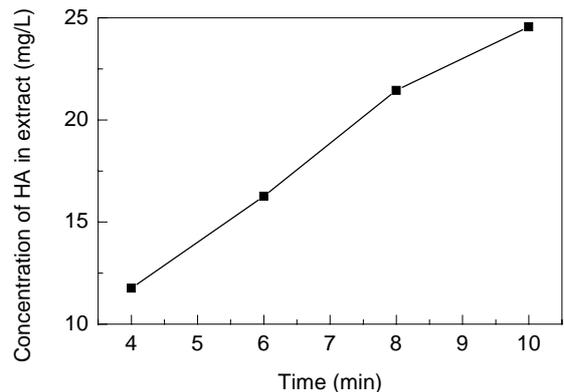


图9 发酵液为原料时透明质酸的电-膜分离过程
Fig.9 Electro-membrane separation of hyaluronic acid from fermentation broth

3.8 提取透明质酸过程中的电能消耗和膜利用率

单位膜面积消耗的电功率 $P(\text{W})$ 可用下式计算:

$$P=Ui=i^2l/\kappa \quad (2)$$

其中 U 为电压(V), i 为电流密度(A/m^2), l 为两电极之间的距离(m).

单位膜面积透明质酸通量 $q[\text{kg}/(\text{m}^2\cdot\text{s})]$ 可用下式计算:

$$q=\mu C/\kappa \quad (3)$$

其中 C 为透明质酸的浓度(g/L). 则透过单位质量透明质酸的电能消耗为

$$P/q=i/l/(\mu C). \quad (4)$$

用本实验的典型条件: $i=40 \text{ A/m}^2$, $l=0.06 \text{ m}$, $\mu=1.3 \times 10^{-8} \text{ m}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$, $C=0.6 \text{ g/L}$, $\kappa=0.15 \text{ S/m}$ 分别代入式(3)和(4), 可得到单位膜面积的透明质酸产量为 $7.5 \text{ g}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$, 单位质量透明质酸的电能消耗为 $85 \text{ W}\cdot\text{h/g}$.

4 结 论

(1) 透明质酸浓度较低时, 透明质酸通过微滤膜的通量与料液中透明质酸的浓度及电流强度成正比. 当料液中透明质酸浓度高于 0.1% 时, 透明质酸通过微滤膜的通量不再随浓度变化.

(2) 膜的孔径对透明质酸的提取速度没有明显影响.

(3) 在 $\text{pH } 7\sim 9$ 范围内, 透明质酸的电迁移率基本保持恒定.

(4) 发酵液中的透明质酸经过电-膜分离装置提取后可有效地与蛋白质分离.

参考文献:

- [1] 罗曼, 蒋立科, 钱万英. 牛眼透明质酸分级制备 [J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(5): 266-267.
- [2] 张效良, 刘隆跃, 吴功柱. 人脐带透明质酸制备及理化性质分析 [J]. 中国药房, 1999, 10(1): 10-11.
- [3] 李润, 查五一, 倪杭生. 羊眼透明质酸制备工艺的改进 [J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(7): 289-291.
- [4] 郭学平. 微生物发酵法生产透明质酸 [J]. 精细与专用化学品, 2002, (3/4): 21-22, 17.
- [5] 陈乌桥, 刘祖同, 孔金明. 透明质酸产生菌的诱变育种及发酵条件 [J]. 清华大学学报(自然科学版), 1994, 34(6): 63-67.
- [6] 赵惠明. 透明质酸发酵条件的研究 [J]. 嘉兴学院学报, 2003, 15(3): 38-40.
- [7] Bowen W R, Sabuni H A M. Electrically Enhanced Membrane Filtration at Low Crossflow Velocities [J]. Ind. Eng. Chem. Res., 1991, 30(7): 1573-1579.
- [8] Wakeman R J, Sabri M N. Utilizing Pulsed Electric Fields in Crossflow Microfiltration for Titania Suspensions [J]. Trans. IChemE. Part A, 1995, 73: 455-463.
- [9] Lapčik L, Smedt S D, Demeester J. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications [J]. Chem. Rev., 1998, 98(8): 2663-2684.

Behavior of Hyaluronic Acid in Electro-Membrane Separation

ZHANG Jian-dong, ZHOU Hai-dong, NI Jin-ren

(Department of Environmental Engineering, College of Environment, Peaking University, Beijing 100871, China)

Abstract: An electro-membrane separation technique was introduced to extract hyaluronic acid from fermentation broth. The present studies were focused on the behavior of hyaluronic acid under electrical field and the effects of hyaluronic acid concentration, pH, ion strength and electric current intensity on the extraction. The results show that the extraction rate of hyaluronic acid is proportional to the concentration and the electric current. The electrophoresis mobility of hyaluronic acid is kept constant within $\text{pH } 7\sim 9$, and the extraction of hyaluronic acid is independent of pore size. The separation experiment with fermentation broth shows that hyaluronic acid can be fully separated from proteins in broth.

Key words: hyaluronic acid; electro-membrane separation; membrane separation