

枯草芽孢杆菌发酵产 N-乙酰神经氨酸的分离提纯

高兰兰, 袁丽霞*, 吴金勇, 陈祥松, 孙立洁, 朱微微, 姚建铭*

(中国科学院合肥物质科学研究院等离子体物理研究所, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的]对 GRAS 认证的枯草芽孢杆菌发酵所得 N-乙酰神经氨酸进行分离纯化, 获得安全性高的目的产物。[方法]通过沸水浴破壁、菌液分离、活性炭脱色、乙醇分步沉淀除杂、乙酸结晶以及重结晶等工艺对枯草芽孢杆菌基因工程菌株经培养所得的 N-乙酰神经氨酸发酵液进行分离纯化。[结果]分离纯化后, N-乙酰神经氨酸纯度在 96.0% 以上。[结论]研究结果为 N-乙酰神经氨酸应用于食品、保健品等领域提供了质量保障。

关键词 枯草芽孢杆菌; N-乙酰神经氨酸; 纯化

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)28-0001-02

Separation and Purification of N-acetylneuraminic Acid Produced by *Bacillus subtilis*

GAO Lan-lan, YUAN Li-xia*, WU Jin-yong, YAO Jian-ming* et al (Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] The aim was to separate and purify of N-acetylneuraminic acid from *Bacillus subtilis* which has a Generally Recognized as Safe (GRAS) status to get the safe and good production. [Method] After the fermentation of *Bacillus subtilis* in right medium, N-acetylneuraminic acid, was obtained by eradicating cell wall in boiling water, separating impurity, decolorization process, ethanol precipitation, acetic acid crystallization, recrystallization and other steps. [Result] Through the high performance liquid chromatography (HPLC) detection, the purity of N-acetylneuraminic acid reached above 96.0%. [Conclusion] The results provide reference for the application of N-acetylneuraminic acid in health products and other fields.

Key words *Bacillus subtilis*; N-acetylneuraminic acid; Purification

N-乙酰神经氨酸, 又称唾液酸(简称 SA), 属于唾液酸家族中最主要的一员。唾液酸是 20 世纪 50 年代最早从颌下腺黏蛋白中分离纯化而命名的, 带有极强的负电荷, 是一类含有 9 个碳原子且具有吡喃糖结构的酸性氨基糖的总称^[1-2]。唾液酸属于神经氨酸的衍生物, 广泛分布在各生物组织内, 是细胞膜上糖蛋白和糖脂的重要成分^[3], 在许多糖与蛋白相互作用的生理过程中发挥着重要作用。由于唾液酸中大多数是 N-乙酰神经氨酸, 仅有少部分是以 N-羟乙酰基神经氨酸、去氨基神经氨酸等形式存在, 所以通常所说的唾液酸主要是指 N-乙酰神经氨酸^[4]。N-乙酰神经氨酸与人类有着密切的联系, 能够促进婴幼儿大脑发育, 可被应用于治疗流感、风湿性关节炎等疾病, 与癌细胞的黏附和转移有关, 赋予细胞抗识别等众多生理功能与用途^[5-8], 所以被广泛应用到食品、医药品、疾病诊断等领域, 如添加到婴幼儿奶粉中, 用于抗流感病毒扎那米韦的研发。因此, N-乙酰神经氨酸具有很大的经济价值与应用前景。

N-乙酰神经氨酸的生产方法有很多, 如天然原料提取法、固定化酶法、全细胞生物催化法等^[9-10], 而微生物发酵法由于生产成本低, 纯化工艺相对简单, 克服了其他方法中存在的纯化复杂、反应苛刻、成本高等缺点, 成为了近几年的研究热点。目前, 国内外主要是基于大肠杆菌基因工程菌发酵生产的研究, 而关于枯草芽孢杆菌发酵产 N-乙酰神经氨酸

的报道相对较少。枯草芽孢杆菌是 GRAS 认证的安全菌株, 遗传背景清晰、生长速率快、不具有致病性、发酵及基因操作技术成熟, 并且不易受噬菌体污染^[11-12], 是一种重要的工业生产菌株。笔者研究了从枯草芽孢杆菌发酵液中提取 N-乙酰神经氨酸的方法, 以期获得安全性高的目的产物, 为其应用于食品、保健品等领域提供质量保障。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。枯草芽孢杆菌 1505-SA-BS-G2-除芽孢由中国科学院合肥物质科学研究院等离子体物理研究所构建。

1.1.2 试剂与仪器。N-乙酰神经氨酸标准品: Sigma Aldrich 公司; 乙醇: 国药分析纯; 乙酸: 国药分析纯; 0.22 μm 微孔滤膜: 上海半岛实业有限公司; 台式离心机: Allegra X-30R, Beckman 公司; 旋转蒸发器: 上海亚荣生化仪器厂; 正(负)压过滤器: 海宁市亚泰制药机械有限公司。

1.1.3 培养基。种子培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 氯化钠 10 g/L。发酵培养基: 甘油 20 g/L, 酵母粉 16 g/L, 磷酸二氢钾 5 g/L, 硫酸铵 4 g/L, 柠檬酸钠 2 g/L, 七水硫酸镁 1 g/L, IPTG 2 mmol/L, V_{B1} 0.004 9 g/L, 微量元素 1 mL/L(微量元素母液: FeSO₄ · 7H₂O 3.500 g/L, MnCl₂ · 4H₂O 0.600 g/L, CoCl₂ · 6H₂O 0.100 g/L, CuCl₂ · 2H₂O 0.065 g/L, H₃BO₃ 0.370 g/L, ZnSO₄ · 7H₂O 1.200 g/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.160 g/L)。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养。用接种环蘸取少量甘油管菌液, 接种至 10 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 5 h, 得到一级种子液; 将一级种子液 1% 接种量转接至 80 mL 液体 LB 培

基金项目 国家自然科学基金青年项目(21506235); 安徽省自然科学基金面上项目(1508085MB38)。

作者简介 高兰兰(1991—), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物育种及发酵工艺。* 通讯作者: 袁丽霞, 工程师, 博士, 从事生物质能源的研究与开发利用; 姚建铭, 研究员, 博士, 博士生导师, 从事微生物育种及发酵工艺研究。

收稿日期 2017-06-30

培养基,同上培养;将微量元素和硫酸镁的混合液,以及培养5 h的二级种子液,依次加入到各参数已稳定的5 L发酵罐中开始培养[pH设为6.80,通过25% (m/V)的氨水来维持调节pH。温度设为37℃,溶氧保持在30%以上,开始发酵培养]。

该发酵采用补料分批发酵的方法,以甘油为主要碳源,发酵约4 h后甘油耗完,开始补加碳源,发酵约108 h,最终N-乙酰神经氨酸产量为8.6 g/L。

1.2.2 N-乙酰神经氨酸的分离提纯。

1.2.2.1 破壁处理。将培养后的发酵液盛在敞口的玻璃器皿里,置于恒温水浴锅中,沸水浴加热5 min(加热过程中要确保搅拌均匀),使菌体细胞壁充分破坏,胞内产物释放到液体中。

1.2.2.2 菌液分离。将破壁后的发酵液8 000 r/min离心5 min,收集上清液。

1.2.2.3 活性炭脱色。向上述上清液加入1%活性炭,室温下搅拌10 min,用0.22 μm膜抽真空过滤,脱掉色素等部分杂质。

1.2.2.4 浓缩。将脱色后发酵液置于旋转蒸发器中,50℃下进行减压蒸发浓缩,浓缩至80 g/L左右。

1.2.2.5 除蛋白。向上述浓缩液加入盐酸,调节其pH为3.5,加入1倍体积乙醇溶液,搅拌均匀,静置后出现白色絮凝状沉淀(其成分主要为杂蛋白),用微滤膜抽真空过滤,收集上清液。

1.2.2.6 乙醇分步沉淀除杂。继续浓缩上述上清液,同时回收乙醇,将其浓缩至80 g/L左右。重复上述步骤,调节pH后,加入乙醇再次沉淀除杂。

1.2.2.7 乙酸初结晶。继续浓缩分步除杂后的上清液至200 g/L,加入4倍体积乙酸,4℃结晶24 h。

1.2.2.8 洗涤干燥。用无水乙醇洗涤结晶后所得的晶体3次,60℃烘干至恒重,检测N-乙酰神经氨酸含量。

1.2.2.9 重结晶。用4倍体积乙酸对一次结晶后的样品重结晶,无水乙醇洗涤并烘干,得重结晶样品。

1.2.3 N-乙酰神经氨酸的检测。利用HPLC进行检测样品中N-乙酰神经氨酸的含量。高效液相色谱型号:岛津Lc-15c。检测条件:检测柱 Bio-Rad AMINEX HPX 87H Organic Analysis Column (300.0 mm×7.8 mm);柱温60℃;流动相是6 mmol硫酸,流速0.6 mL/min;检测波长210 nm。

2 结果与分析

2.1 乙醇分步沉淀法的选择 枯草芽孢杆菌培养后的发酵液比较黏稠,杂质较多,浓缩后的发酵液愈发黏稠,直接加乙酸结晶不能达到纯化的目标。经过试验,发现乙醇可除去部分蛋白和杂质,但因枯草芽孢杆菌发酵液中N-乙酰神经氨酸浓度不高,在8~10 g/L,发酵液大部分是杂质,高浓度浓缩后混合液变性成黏性的凝胶状物质,再用乙醇处理很难除去杂质。经过多次研究发现,乙醇分步沉淀是一种有效去除蛋白质和杂质的方法。首先浓缩液浓缩到80 g/L左右,然后调pH至3.5,再加入1倍体积乙醇,然后采用微滤膜进行过滤。收集滤液,滤液再次蒸发浓缩,重复上述步骤,2次沉淀

除杂后,即可除去大部分蛋白质和杂质。一次乙醇处理后有较多的杂质析出,且第2次1倍乙醇处理后仍可观察到有杂质,说明1倍乙醇2次处理的必要性。因此,选用2步1倍乙醇沉淀法进行除杂。

2.2 结晶溶剂及结晶条件的确定 溶剂结晶法是生化分离过程中常用的提纯方法,微生物发酵液中,一般含有大量的菌体、蛋白质、色素、无机盐等杂质,这就需要通过各种理化方法对目标产物进行提纯。利用溶剂结晶法,可以使杂质(结晶母液中)与产品(固体)分离开来,达到提纯的目的。对于结晶溶剂的选择,理论上应根据提纯产物在溶剂中的溶解度、溶剂的介电常数和溶剂的理化性质等来考虑,一般选择介电常数小、与水互溶性好的有机溶剂。通过对多种溶剂研究对比发现,虽然乙酸沸点(117.9℃)相对较高,但乙酸介电常数较小,在20℃时只有6.2,2℃时只有4.1,较小的介电常数使溶质在其中较难解离;同时乙酸与N-乙酰神经氨酸在溶液中带有相同的电荷,带有相同电荷的离子在溶液中不可能聚集,只有相互排斥。另外乙酸能够与水以任意比互溶,且N-乙酰神经氨酸也是一种水溶性溶剂,在水中溶解度较大,而N-乙酰神经氨酸在乙酸中溶解度却较小。以上性质显示,且试验结果也证实,乙酸是一种优良的结晶提纯N-乙酰神经氨酸的溶剂。

确定了结晶溶剂,进一步对乙酸结晶提纯的条件进行了研究,首先对浓缩液进行浓缩,浓缩后加入不同体积的乙酸进行结晶。结果表明,当加入1~3倍体积的乙酸时,均未出现结晶;而加入4~7倍体积的乙酸时,均出现了结晶。在4倍体积乙酸条件下,结晶后N-乙酰神经氨酸纯度达68.9%,然而N-乙酰神经氨酸的纯度并不随乙酸体积的增加而明显变化。因此,选择4倍体积乙酸来进行结晶。

2.3 重结晶 把纯度60.0%~70.0%的晶体进行重结晶。首先把晶体溶于水中,配成浓度200 g/L的水溶液,然后加入4倍体积的乙酸,低温结晶。晶体用无水乙醇洗涤,然后烘干检测。结果显示,重结晶后N-乙酰神经氨酸纯度均提高到96.0%以上(表1)。

表1 重结晶结果

Table 1 Results of recrystallization

原始样品纯度 Purity of original sample %	重结晶条件 Conditions of recrystallization	重结晶后样品纯度 Purity of sample after recrystallization %
68.9	浓度201.6 g/L,4倍体积乙酸结晶	96.0
61.8	浓度210.5 g/L,4倍体积乙酸结晶	96.7
66.8	浓度205.8 g/L,4倍体积乙酸结晶	96.3
65.4	浓度202.4 g/L,4倍体积乙酸结晶	96.8

2.4 N-乙酰神经氨酸的分离提纯工艺流程 对枯草芽孢杆菌5 L罐发酵108 h,发酵液中N-乙酰神经氨酸含量为8.6 g/L左右,根据试验结果设计了N-乙酰神经氨酸的提取工艺流程(图1)。

(下转第35页)

旱性,均可推广或者作为种质资源加以利用^[20]。

通过此次的品种筛选试验,各参试品种农艺性状较好,产量较高。综合性状较优的为固糜 21 号和冀黍 2 号,建议进行大面积推广,同时可进行其他品种比较试验,进一步提高黑龙江西部地区糜子生产产业化与市场化,筛选出适合该地区种植和推广的糜子品种。

参考文献

- [1] HU X Y, WANG J F, LU P, et al. Assessment of genetic diversity in broom-corn millet (*Panicum miliaceum* L.) using SSR markers[J]. *J Genet Genomics*, 2009, 36(8): 491–500.
- [2] 连帅,王瑞云,马跃敏,等. 不同生态区糜子种质资源的遗传多样性分析[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(3): 225–231.
- [3] 王德慧,乔治军,盛晋华,等. 种植密度对糜子生长发育及产量影响[J]. *干旱区资源与环境*, 2015, 29(5): 127–131.
- [4] BETTINGER R L, BARTON L, MORGAN C. The origins of food production in north China: A different kind of agricultural revolution[J]. *Evolutionary anthropology: Issues, news, and reviews*, 2010, 19(1): 9–21.
- [5] 黄先伟. 糜子[J]. *生物学通报*, 1955(11): 33–35.
- [6] 贾艳荣,李斌. 偏关县糜子产业现状和发展建议[J]. *农业技术与装备*, 2014(10): 75–77.
- [7] 林汝法,柴岩,廖琴,等. 中国小杂粮[M]. 北京:中国农业出版社, 2002:74.
- [8] 段体康,王振斌,王力刚,等. 浅议黑龙江省西部半干旱区植被恢复技术[J]. *防护林科技*, 2009(1): 109–110.

- [9] 张雄. 黄土高原主要小杂粮作物的干旱适应性研究[J]. *干旱区资源与环境*, 2007, 21(8): 111–115.
- [10] 李清泉. 黑龙江半干旱地区糜子生产及无公害种植技术[J]. *贵州农业科学*, 2008, 36(3): 55–56.
- [11] 苏占明,李海,皇甫红芳. 晋北地区不同糜子品种适应性研究[J]. *现代农业科技*, 2016(3): 79–80, 82.
- [12] SALEH A S M, ZHANG Q, CHEN J, et al. Millet grains: Nutritional quality, processing, and potential health benefits[J]. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2013, 12(3): 281–295.
- [13] 马建科,何世新. 糜子新品系在灵台县区域试验初报[J]. *中国农业信息*, 2016(7): 98–100.
- [14] 董俊丽,王海岗,陈凌,等. 糜子骨干种质遗传多样性和遗传结构分析[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(16): 3121–3131.
- [15] 晁桂梅,周瑜,高金锋,等. 粳性和糯性糜子淀粉的理化性质[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(11): 13–19.
- [16] 魏仰浩. 中国黍稷品种资源及生态型研究[C]//中国黍稷论文选. 北京:农业出版社, 1990.
- [17] 艾尔肯·艾林别克,阿依努尔·阿木尔哈孜,吾买尔夏提·塔汉. 新疆糜子品种比较试验[J]. *园艺与种苗*, 2015(5): 29–30, 64.
- [18] 葛维德,赵阳,于利娟,等. 辽宁省糜子品种引种试验[J]. *杂粮作物*, 2009, 29(5): 345–346.
- [19] 刘晓欢,王瑞云,杜海娥,等. 糜子(*Panicum miliaceum* L.)品种间农艺性状的形态解剖差异[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(4): 295–298.
- [20] 盖琼辉,王百姓,王东. 16 个糜子新品种在陇东干旱地区的应用评价[J]. *种子*, 2015, 34(5): 103–106.

(上接第 2 页)

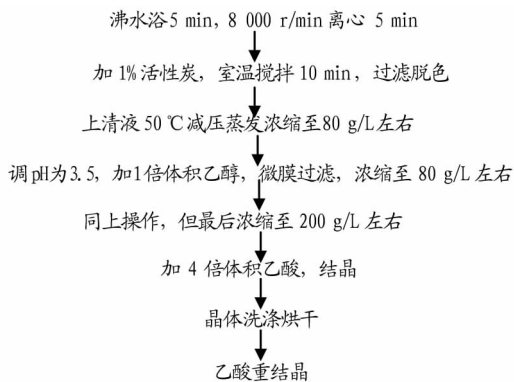


图 1 N-乙酰神经氨酸的提取工艺流程

Fig. 1 Extraction process of N-acetylneuraminic acid

对发酵液经该工艺流程处理,最后所得 N-乙酰神经氨酸成品,经测定纯度均在 96.0% 以上。

3 结论

由该研究构建的整合性枯草芽孢杆菌经发酵培养得到的 N-乙酰神经氨酸发酵液含 N-乙酰神经氨酸 8~10 g/L,对该发酵液进行菌液分离、脱色、除杂除蛋白、浓缩、结晶、重结晶等分离提纯后,可得到纯度 96.0% 以上的 N-乙酰神经氨酸结晶样品,为大规模发酵产 N-乙酰神经氨酸的分离提纯提供技术方法,为枯草芽孢杆菌生产的 N-乙酰神经氨酸

的应用奠定基础。

参考文献

- [1] BLIX F G, GOTTSCHALK A, KLENK E. Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids[J]. *Nature*, 1957, 179(4569): 1088.
- [2] 刘志东,王荫榆,郭本恒,等. 唾液酸的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2010(4): 368–373.
- [3] MARU I, OHNISHI J, OHTA Y, et al. Why is sialic acid attracting interest now? Complete enzymatic synthesis of sialic acid with N-acetylglucosaminase 2-epimerase[J]. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2002, 93(3): 258–265.
- [4] 李宏越. 微生物发酵法生产 N-乙酰神经氨酸的研究[D]. 沈阳:大连工业大学, 2014.
- [5] WANG B. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition[J]. *Annual review of nutrition*, 2009, 29(1): 177–222.
- [6] BABU Y S, CHAND P, BANTIA S, et al. BCX-1812 (RWJ-270201): Discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design[J]. *Cheminform*, 2000, 43(19): 3482–3486.
- [7] 程铨,高春芳. 唾液酸的生物学意义及其在肝病中的研究进展[J]. *检验医学*, 2013, 28(4): 333–336.
- [8] HSU C C, LIN T W, CHANG W W, et al. Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids[J]. *Gynecologic oncology*, 2005, 96(2): 415–422.
- [9] 李宏越,柳鹏福,史吉平,等. 唾液酸的生理功能、应用及其生产方法[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(3): 363–368.
- [10] CHEN X, VARKI A. Advances in the biology and chemistry of sialic acids[J]. *ACS chemical biology*, 2010, 5(2): 163–176.
- [11] 刘延峰. 代谢工程改造枯草芽孢杆菌高效合成 N-乙酰氨基葡萄糖[D]. 无锡:江南大学, 2015.
- [12] MEYER F M, GERWIG J, HAMMER E, et al. Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: Evidence for a metabolon[J]. *Metabolic engineering*, 2011, 13(1): 18–27.

本刊提示 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。