

· 技术与应用 ·

文章编号: 1001-5493(2024)05-0421-08

DOI: 10.16026/j.cnki.iea.2024050421

离子交换柱层析纯化右旋糖酐40提高产品品质*

问清江, 郑巧霞, 孙晓宇, 丁浩, 慕娟**

(陕西省微生物研究所, 西安 710043)

摘要: 右旋糖酐发酵液酶解制备的右旋糖酐40经过离子交换柱层析分离纯化后, 相关产品指标达到国际最高标准。右旋糖酐发酵液酶解制备的右旋糖酐40, 产率可达31.70 g/L, 产品的重均分子量(M_w)为36125、10%大分子 M_w 为106805、10%小分子 M_w 为7272, 达到欧洲标准; 阳-阴-阳-阴不连续离子交换柱层析右旋糖酐40产品的灼灼残渣、重金属和氮含量分别为0.01%、0.000643%和0.004%, 灼灼残渣和氮含量达到国际最高标准, 重金属含量达国家标准, 电导率降至70 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下; 阳-阴-阳-阴-阳-阴不连续离子交换柱层析右旋糖酐40的灼灼残渣、重金属和氮含量分别为0.01%、0.0001%和0.005%, 均达到国际最高标准, 电导率降至10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下; 3次阳-阴连续离子交换柱层析右旋糖酐40的灼灼残渣、重金属和氮含量分别为0.01%、0.0001%和0.004%, 均达到国际最高标准, 重均分子量和分子量分布达到欧洲标准, 收率超过85%, 电导率降至5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下。

关键词: 离子交换, 柱层析, 右旋糖酐40, 发酵液, 酶解, 电导率

中图分类号: TQ464.1 **文献标志码:** A

1 引言

肠膜状明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 可在自身产生的右旋糖酐蔗糖酶 (Dextranase, EC 2.4.5.1) 的作用下, 将蔗糖转化为主要由 α -1,6糖苷键连接的高分子胞外多糖右旋糖酐 (Dextran) 和果糖^[1-4]。右旋糖酐40是将高分子右旋糖酐降解分离纯化为重均分子量(M_w)在32000~42000、10%大分子 $M_w \leq 120000$ 、10%小分子 $M_w \geq 5000$ 的低分子右旋糖酐, 以用作血浆代用品的医用产品^[5]。右旋糖酐酶 (Dextranase, EC 3.2.1.11) 能够催化水解右旋糖酐分子中的 α -1,6糖苷键, 将右旋糖酐降解为小分子的右旋糖酐、异麦芽糖、异麦芽三糖、葡萄糖及少量多聚糖等, 具有专一性和高效性,

可以提高水解效率; 酶的底物特异性显示酶的亲和力随底物分子量的增加而增强, 在右旋糖酐酶水解右旋糖酐时, 酶作用于大分子的概率高于小分子, 这一特点有益于改善水解物的分子量分布^[6], 因此在右旋糖酐40生产中采用右旋糖酐酶酶解替代传统工艺中的盐酸水解。我国右旋糖酐40产品标准与欧美等国家和地区存在一定的差距 (表1)^[5,7-8], 尤其是灼灼残渣和重金属含量。在右旋糖酐40生产新工艺研究中发现, 氮主要存在于肠膜状明串珠菌菌体、右旋糖酐蔗糖酶等蛋白类及小分子代谢产物中^[9]。右旋糖酐40分离纯化中, 在活性炭吸附、乙醇沉淀的基础上应用离子交换柱层析, 不仅可以去除氮, 而且可以去除金属离子而降低灼灼残渣和重金属含量, 使右旋糖酐的氮、灼灼残渣和

* 收稿日期: 2023-10-31

基金项目: 陕西省科学院科学研究专项 (项目号 2020K-06); 西安市科技创新人才服务企业项目 (项目号 2020KJRC0149)。

**通信作者: 慕娟, E-mail: mujuan2007@163.com.

引用本文: 问清江, 郑巧霞, 孙晓宇, 丁浩, 慕娟. 离子交换柱层析纯化右旋糖酐40提高产品品质 [J]. 离子交换与吸附, 2024, 40(5): 421-428.

Citation: WEN Qing-jiang, ZHENG Qiao-xia, SUN Xiao-yu, DING Hao, MU Juan. Purification of Dextran 40 by Ion Exchange Column Chromatography to Improve Product Quality [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2024, 40(5): 421-428.

重金属含量均达到国际最高标准,降低右旋糖酐40的用药安全隐患,造福患者;同时扩展右旋糖酐40生产企业的国际市场,增加企业的经济效益。本研究对右旋糖酐发酵液酶解分离得到的右旋糖酐40进一步进行离子交换柱层析纯化(图1),通过研究离子交换条件,确定离子交换树脂、层析柱规格、流量、交换次数(离子交换柱组数)等,进一步优化离子交换条件,逐步扩大实验规模。最后得出一定规模的离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40工艺条件,右旋糖

酐40产品的氮、炽灼残渣和重金属含量均达到国际最高标准。

表1 各国右旋糖酐40产品指标比较。

Table 1 Comparison of Dextran 40 producy indicators among countries.

指标	美国 药典	英国 药典	欧洲 药典	中国 药典
氮 (%)	≤0.010	≤0.007	≤0.011	≤0.007
炽灼残渣 (%)	≤0.03	≤0.3	≤0.3	≤0.5
重金属 (%)	≤0.0005	≤0.0008	≤0.0010	≤0.0008

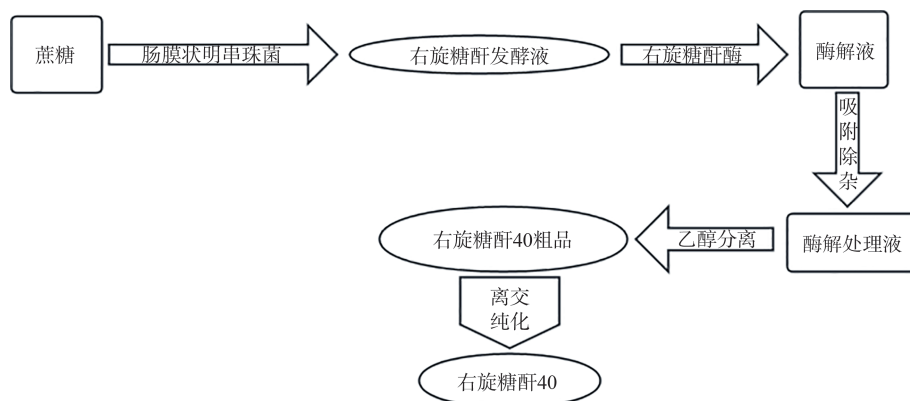


图1 右旋糖酐40制备工艺路线。

Figure 1 Preparation process route of Dextran 40.

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器

电导率仪 FE30 (梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);SPX-150BIII 生化培养箱 (天津泰斯特仪器有限公司);GH-500 型隔水式培养箱 (北京科伟永兴仪器有限公司);722 分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司);WYT-J 糖度计 (成都豪创光电仪器有限公司);85-2 数显恒温磁力搅拌器 (杭州仪表电机有限公司);101 型电热鼓风干燥箱 (北京科伟永兴仪器有限公司);2010A-HT 高效液相色谱仪 (苏州贝锐仪器科技有限公司);层析柱 (20 mm×170 mm, 40 mm×200 mm, 定制)。

2.1.2 试剂

右旋糖酐酶 (宁夏夏圣实业集团有限公司, 批号: Y200301);732 阳离子交换树脂 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20220105);717 阴离子交换树脂 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20220715);白砂糖 (孟连昌裕糖业有限责任

公司, 一级, 批号: 2022-0302-0497);葡萄糖及其他试剂, 均为市售分析纯。

2.2 方法

2.2.1 右旋糖酐发酵液酶解制备右旋糖酐40

右旋糖酐发酵液在 50 °C、0.20 IU/mL 右旋糖酐酶浓度条件下酶解 3.5 h, 取样检测还原糖 (以葡萄糖计) 的变化和糖度, 以衡量水解率和产率。酶解结束后加入活性炭, 升温至 85 °C, 保温脱色 40 min, 过滤, 收集滤液经过乙醇分离沉淀、干燥箱烘干即为右旋糖酐40。

2.2.2 离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40 条件选择

将右旋糖酐40 按照 10% 浓度配制上柱溶液, 取样测定其糖度和电导率。选用 20 mm×170 mm 柱作为层析柱, 以 732 阳离子交换树脂 (氢型) 和 717 阴离子交换树脂 (氢氧根型) 为离子交换树脂。上柱溶液先经过阳离子交换柱, 再经过阴离子交换柱, 每柱流出液取样检测其糖度和电导率。经过离子交换溶液后用乙醇沉淀, 干燥箱烘干即为右旋糖酐40。

2.2.3 离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40条件优化

采用阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换，阴阳树脂同2.2，层析柱40 mm×200 mm，取样检测糖度、电导率等；离子交换纯化溶液经乙醇沉淀制取右旋糖酐40干品，成品进行炽灼残渣、重金属和氮含量检测。

2.2.4 右旋糖酐40离子交换柱层析分离纯化

将2根柱子(40 mm×200 mm)串联，分别填入732阳离子交换树脂(氢型)和717阴离子交换树脂(氢氧根型)，右旋糖酐溶液循环连续离子交换直至所有溶液完成3次离子交换，流出液糖度4.0%时开始或结束收集，随时取样检测糖度。右旋糖酐40离子交换收集溶液经乙醇沉淀制取干品，对其炽灼残渣、重金属和氮含量进行检测。

2.2.5 重均分子量与分子量分布

取样品适量，加流动相溶解并稀释制成每1 mL约含10 mg右旋糖酐40的溶液，振摇，室温放置过夜作为供试品溶液。另取4~5个已知分子量的右旋糖酐对照品，依法检查(2020年版《中国药典》四部通则0514)，样品应满足10%大分子 $M_w \leq 120000$ ，10%小分子 $M_w \geq 5000$ [5]。

2.2.6 还原糖测定(以葡萄糖计)

采用DNS法测定葡萄糖。葡萄糖标准曲线

绘制：配制1 mg/mL葡萄糖标准溶液，分别量取0.30、0.35、0.40、0.45和0.50 mL葡萄糖标准溶液，用蒸馏水定容至1.0 mL，再加入2.0 mL DNS，沸水浴2 min，冷水浴冷却后加蒸馏水至10 mL，在540 nm进行光吸收测定，绘制葡萄糖标准曲线，得出回归方程用于葡萄糖的测定。

酶解液等样品稀释一定倍数，取样品1.0 mL加入2.0 mL DNS煮沸2 min显色，然后冷水浴冷却至室温，定容至10.0 mL，以蒸馏水为对照，540 nm测定吸光值，根据回归方程得出样品中的葡萄糖含量。

3 结果与分析

3.1 右旋糖酐发酵液酶解制备右旋糖酐40

8000 mL右旋糖酐发酵液酶解制备右旋糖酐40(表2)，还原糖(以葡萄糖计)变化的平均值为26.42 mg/mL；制取的右旋糖酐40为253.54 g，产率可达31.70 g/L；产品分子量分布为 M_w 36125、10%大分子 M_w 106805、10%小分子 M_w 7272，改善了分子量分布，优于国家标准(M_w 在32000~42000，10%大分子 $M_w \leq 120000$ ，10%小分子 $M_w \geq 5000$)，达到欧洲标准(M_w 在35000~45000，10%大分子 $M_w \leq 110000$ ，10%小分子 $M_w \geq 7000$)。

表2 右旋糖酐发酵液酶解制备右旋糖酐40.

Table 2 Enzymatic hydrolysis of Dextran fermentation broth to produce Dextran 40.

No	发酵液体积(mL)	还原糖变化 (mg·mL ⁻¹)	右旋糖酐40(g)	产率(g·L ⁻¹)	分子量分布		
					M_w	10%大分子 M_w	10%小分子 M_w
1	8000	24.89	245.01	30.63	35323	106853	7176
2	8000	28.66	263.57	32.95	35598	106015	7437
3	8000	25.70	252.05	31.51	37454	107548	7202
平均值	8000	26.42	253.54	31.70	36125	106805	7272

3.2 离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40条件选择

按照阳-阴-阳-阴进行右旋糖酐40溶液离子交换，每次离子交换后进行部分收集，每管样品检测电导率和糖度，结果如图2~5所示；按照糖度5%以上合并每次离子交换层析液，对其进行电导率和糖度测定，阳-阴-阳-阴离子交换柱层析电导率的变化如图6所示；右旋糖酐40溶液经过阳-阴-阳-阴离子交换柱层析的结果见表3。

由图表可知，各次离子交换柱层析的电导率分别降低17.92%、75.89%、78.87%和94.47%，总糖收率分别为95.74%、83.37%、77.00%和66.71%；右旋糖酐40溶液的电导率从1207 μ S/cm降至66.71 μ S/cm，将近95%的金属离子等带电荷杂质被去除。

阳-阴和阳-阴-阳-阴离子交换柱层析液经乙醇沉淀和干燥被制成右旋糖酐40成品，对其炽灼残渣、重金属和氮含量进行测定[5]，并且与原

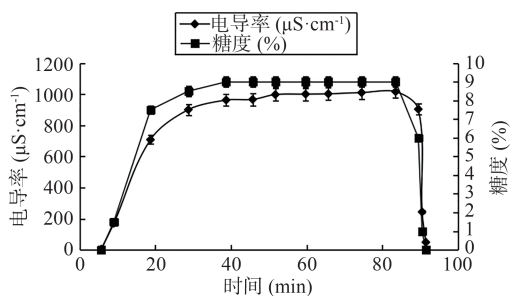


图2 732 阳离子交换一次柱层析.

Figure 2 732 Cation exchange primary column chromatography.

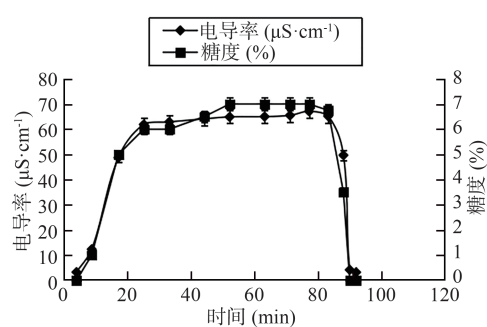


图5 717 阴离子交换二次柱层析.

Figure 5 717 Anion exchange secondary column chromatography.

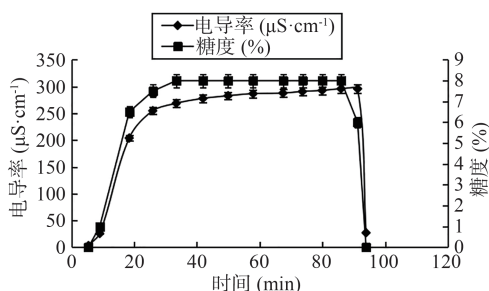


图3 717 阴离子交换一次柱层析.

Figure 3 717 Anion exchange primary column chromatography.

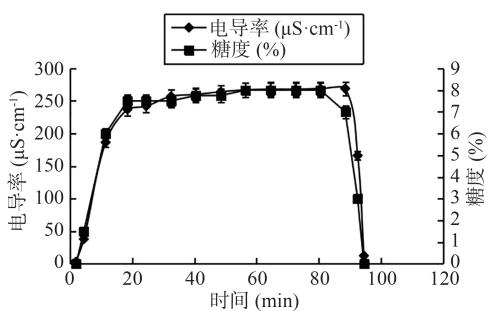


图4 732 阴离子交换二次柱层析.

Figure 4 732 Cation exchange secondary column chromatography.

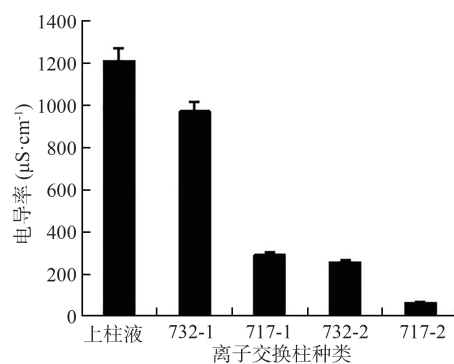


图6 阳-阴-阳-阴离子交换柱层析电导率变化.

Figure 6 Changes in conductivity of 732-717-732-717 cation anion exchange column chromatography.

有所提高, 阳-阴离子交换产品的灼灼残渣、重金属和氮含量分别为 0.06%、0.001448% 和 0.006%, 灼灼残渣含量达到欧洲标准, 氮含量达到国际最高标准, 重金属含量不达标; 阳-阴-阳-阴离子交换产品的灼灼残渣、重金属和氮含量分别为 0.01%、0.000643% 和 0.004%, 灼灼残渣和氮含量达到国际最高标准, 重金属含量达国家标准。因此, 要使右旋糖酐 40 重金属含量达到国际最高标准, 需要通过增加离子交换次数、改进离子交换柱层析条件等进行进一步研究。

右旋糖酐 40 进行比较, 结果见表 4。由表 4 可知, 右旋糖酐 40 经离子交换柱层析, 产品品质

表3 右旋糖酐 40 阳-阴-阳-阴离子交换柱层析结果.

Table 3 Dextran 40 732-717-732-717 cation anion exchange column chromatography results.

离子交换	体积 (mL)	糖度 (%)	pH	电导率 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	总糖收率 (%)	电导率降低率 (%)
上柱液	200±0	9.5±0.5	6.0±0.5	1207.00±5	100	0
732 一次离子交换	214±10	8.5±0.5	3.5±0.5	969.00±5	95.74±0.04	19.72±2.0
717 一次离子交换	198±5	8.0±0.5	7.0±0.5	291.00±3	83.37±0.03	75.89±0.4
732 二次离子交换	209±10	7.0±0.5	6.0±0.5	255.00±3	77.00±0.01	78.87±0.3
717 二次离子交换	195±10	6.5±0.5	6.0±0.5	63.80±3	66.71±0.01	94.47±0.3

表4 右旋糖酐40离子交换柱层析产品品质变化.

Table 4 Quality changes of Dextran 40 ion exchange column chromatography products.

产品	炽灼残渣		重金属		氮	
	含量 (%)	降低率 (%)	含量 (%)	降低率 (%)	含量 (%)	降低率 (%)
原右旋糖酐40	1.48±0.02	0	0.003484±0.0001	0	0.018±0.0003	0
阳-阴离子交换	0.06±0.01	95.95±0.7	0.001448±0.00003	58.44±1.5	0.006±0.0003	66.67±2.5
阳-阴-阳-阴离子交换	0.01±0.003	99.32±0.2	0.000643±0.000004	81.54±0.1	0.004±0.0003	77.78±1.8

3.3 离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40条件优化

3.2中阳-阴-阳-阴离子交换制取的右旋糖酐40的炽灼残渣、重金属和氮含量均达到《中国药典》标准, 但与国际标准仍有差距, 因此需要将离子交换条件进一步优化, 以进一步降低其电导率。阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换柱层析流出液电导率的变化见图7, 右旋糖酐40溶液经阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换柱层析结果见表5, 右旋糖酐40品质变化见表6。随着离子交换次数的增加, 右旋糖酐40溶液的电导率显著降低, 各次离子交换柱层析的电导率分别降低19.50%、77.76%、83.73%、96.39%、97.23%和99.38%; 总糖收率分别为89.12%、79.18%、77.60%、76.61%、65.92%和58.69%; 右旋糖酐40溶液的电导率从1205 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 降至7.53 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 低于10.00 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换柱层析液经乙醇沉淀和干燥制成右旋糖酐40成品的炽

灼残渣、重金属和氮含量分别为0.01%、0.0001%和0.005%, 均达到国际最高标准(炽灼残渣 $\leq 0.03\%$, 重金属 $\leq 0.0005\%$, 氮含量 $\leq 0.007\%$)。因此, 右旋糖酐40溶液经过阳-阴-阳-阴-阳-阴3次阳阴离子交换柱层析纯化, 炽灼残渣、重金属和氮含量可以达到国际最高标准。

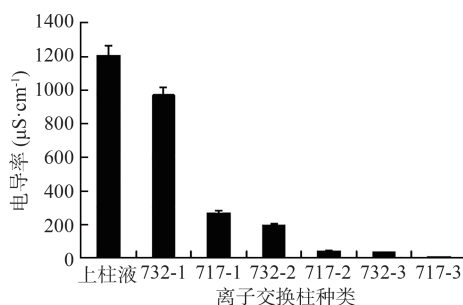


图7 阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换柱层析流出液的电导率变化.

Figure 7 Changes in conductivity of 732-717-732-717-732-717 cation anion exchange column chromatography.

表5 右旋糖酐40溶液经过阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换柱层析结果.

Table 5 Dextran 40 732-717-732-717-732-717 cation anion exchange column chromatography results.

离子交换	体积 (mL)	糖度 (%)	电导率 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	总糖收率 (%)	电导率降低率 (%)
上柱液	400±0	9.8±0.5	1205.00±5	100	0
732一次离子交换	397±10	8.8±0.5	970.00±5	89.12±0.05	19.50±2.1
717一次离子交换	388±10	8.0±0.5	268.00±3	79.18±0.04	77.76±0.3
732二次离子交换	390±10	7.8±0.5	196.10±3	77.60±0.04	83.73±0.3
717二次离子交换	385±10	7.8±0.5	43.50±3	76.61±0.03	96.39±0.3
732三次离子交换	380±5	6.8±0.5	33.40±1	65.92±0.01	97.23±0.1
717三次离子交换	390±5	6.0±0.5	7.53±0.1	59.69±0.01	99.38±0.1

表6 阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换柱层析右旋糖酐40品质变化.

Table 6 Quality changes of Dextran 40 732-717-732-717-732-717 cation anion exchange column chromatography products.

产品	炽灼残渣		重金属		氮	
	含量 (%)	降低率 (%)	含量 (%)	降低率 (%)	含量 (%)	降低率 (%)
原右旋糖酐40	1.48±0.02	0	0.003484±0.0001	0	0.018±0.001	0
阳-阴-阳-阴-阳-阴离子交换	0.01±0.003	99.32±0.2	0.0001±0.000001	97.13±0.03	0.005±0.0001	72.22±0.8

3.4 右旋糖酐40离子交换柱层析分离纯化

右旋糖酐40离子交换柱层析分离纯化结果如表7所示,右旋糖酐40产品的炽灼残渣、重金属、氮含量等检测结果如表8所示。由表7和表8可知,右旋糖酐40溶液经过3次阳-阴离子连续交换,电导率降至 $2\mu\text{S}/\text{cm}$ 以下,收率因右旋糖酐溶液量的大小有所不同,800 mL和1600 mL的收率分别超过86%和90%。右旋糖酐40离子交换产品的炽灼残

渣、重金属和氮含量均达到国际最高标准(炽灼残渣 $\leq 0.03\%$,重金属 $\leq 0.0005\%$,氮 $\leq 0.007\%$);重均分子量和分子量分布达到欧洲标准(M_w 在35000~45000,10%大分子 $M_w \leq 110000$,10%小分子 $M_w \geq 7000$)。结果表明,右旋糖酐40溶液经3次阳-阴循环持续离子交换分离纯化制备的右旋糖酐40产品的炽灼残渣、重金属和氮含量可以达到国际最高标准,工艺条件参数可靠,线路可行。

表7 右旋糖酐40离子交换柱层析分离纯化结果。

Table 7 Separation and purification of dextran 40 ion exchange column chromatography.

No	右旋糖酐40粗品			离子交换柱层析产品			
	体积 (mL)	糖度 (%)	电导率 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	体积 (mL)	糖度 (%)	电导率 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	收率 (%)
1	800±0	9.4±0.5	1022.00±5	770±5	8.4±0.5	1.70±0.1	86.01±0.03
2	1600±0	9.0±0.5	1041.00±5	1490±10	8.8±0.5	1.12±0.09	91.05±0.04

表8 离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40产品分子量分布及杂质含量。

Table 8 Molecular weight distribution and impurity content of dextran 40 product isolated and purified by ion exchange column chromatography.

No	炽灼残渣 (%)	重金属 (%)	氮 (%)	分子量分布		
				M_w	10%大分子 M_w	10%小分子 M_w
1	0.01±0.003	0.0001±0.000001	0.004±0.0001	35395	108830	9150
2	0.01±0.003	0.0001±0.000001	0.001±0.0001	38103	109896	8927

4 结论

我国现行的右旋糖酐40原料药的产品标准中,氮含量是国际最高标准($\leq 0.007\%$),但是炽灼残渣($\leq 0.5\%$)和重金属($\leq 0.0008\%$)与国际最高标准(炽灼残渣 $\leq 0.03\%$,重金属 $\leq 0.0005\%$)存在差距,因此在右旋糖酐40酶解制备新工艺研究中,有必要采用离子交换对带电荷的小分子杂质去除的工艺参数条件进行研究。右旋糖酐发酵液酶解制备的右旋糖酐40,产率可达31.70 g/L,产品的 M_w 为36125、10%大分子 M_w 为106805、10%小分子 M_w 为7272,优于国家标准(M_w 在32000~42000,10%大分子 $M_w \leq 120000$,10%小分子 $M_w \geq 5000$),达到欧洲标准(M_w 在35000~45000,10%大分子 $M_w \leq 110000$,10%小分子 $M_w \geq 7000$);省去了乙醇提取粗酐和粗酐溶解工艺过程,酶解温度(50 °C)低于盐酸水解温度(95~100 °C),大大降低生产成本。右旋糖酐酶替代盐酸,避免了氯的环境污染,降低企业的环保负荷;同时右旋糖酐酶的高效性决定了其用量小,使得右旋糖酐40的生产更加绿

色和低耗。离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40条件选择:阳-阴离子交换产品的炽灼残渣、重金属和氮含量分别为0.06%、0.001448%和0.006%,阳-阴-阳-阴离子交换产品的炽灼残渣、重金属和氮含量分别为0.01%、0.000643%和0.004%,后者的炽灼残渣和氮含量达到国际最高标准,重金属含量达到国家标准。从图5可以得出,阳离子交换柱流出液电导率变化不大,阴离子交换柱流出液电导率降低明显,右旋糖酐40溶液首先经过阳离子交换柱,溶液中带正电荷的物质与氢型732阳离子交换树脂上的 H^+ 交换,绝大部分 H^+ 游离于溶液中,电导率无明显降低;进一步经过氢氧根型的717阴离子交换树脂,释放到溶液中的 OH^- 与 H^+ 结合为 H_2O ,溶液中的离子浓度降低,电导率明显降低。离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40条件优化:右旋糖酐40溶液经过阳-阴-阳-阴-阳-阴不连续离子交换柱层析,电导率降幅达99%,降低到 $7.53\mu\text{S}/\text{cm}$,低于 $10.00\mu\text{S}/\text{cm}$;右旋糖酐40成品的炽灼残渣、重金属和氮含量分别为0.01%、0.0001%和0.005%,均达到国际最高标准(炽灼

残渣 $\leq 0.03\%$, 重金属 $\leq 0.0005\%$, 氮 $\leq 0.007\%$); 产品收率为58.69%, 收率不高的主要原因在于, 离子交换过程非连续, 每过一次层析, 不仅在上柱时需要用水赶出柱子中的料液, 而且结束时要用水洗脱, 造成物料损失。右旋糖酐40离子交换柱层析分离纯化, 右旋糖酐40溶液经过3次阳-阴连续离子交换, 电导率降至 $2\ \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下, 800 mL和1600 mL的收率分别超过86%和90%, 右旋糖酐40离子交换产品的灼灼残渣、重金属和氮含量均达到国际最高标准, 重均分子量和分子量分布达到欧洲标准。在质量保证的前提下产率大大提升的原因在于阳-阴柱子串联且循环连续离子交换, 省去了不连续离子交换每次柱子用水赶出料液和洗脱过程, 避免物料损耗; 800 mL和1600 mL离子交换产率不同, 离子交换柱中存在物料滞留, 还有一性性的用水赶出料液和洗脱, 造成物料的损耗, 相同离子交换体系的损耗基本相同, 相对于800 mL和1600

mL物料量的占比不同。右旋糖酐40离子交换柱层析分离纯化工艺在一组阳-阴循环重复使用的基础上还需要进一步向着多组串联方向的工艺研究, 趋近于产业化的实际应用。

右旋糖酐40的生产用右旋糖酐酶替代盐酸水解, 可以大大降低能耗和耐酸性设备材料耗。右旋糖酐酶的专一性使得右旋糖酐的酶解成为唯一的水解反应, 避免了残留蔗糖的水解, 提高了右旋糖酐水解的效率。右旋糖酐酶的高效性在于使用其替代盐酸提高生产效率的同时不会增加生产成本。同时其使得右旋糖酐的生产更加绿色环保。离子交换柱层析分离纯化右旋糖酐40大大提高了产品质量并使其达到国际最高标准, 同时降低了右旋糖酐40相关药品不良反应的潜在风险, 造福于广大患者; 右旋糖酐40产品在满足国内市场的同时走向国际市场, 产生了良好的经济效益和社会效益。

参考文献

- 1 Kim D, Robyt J F. Production, selection and characteristic of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextran [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, **1995**, 17:689-695.
- 2 Monchois V, Willemot R M, Monsa P. Glucansucrase: mechanism of action and structure-relationships [J]. *FEMS Microbiol Lett*, **1999**, 23:131-151.
- 3 Davies G, Enrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases [J]. *Structure*, **1995**, 3: 853-859.
- 4 Santos M, Teixeira J, Rodrigues A. Production of dextransucrase, dextran and fructose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRLB512[J]. *Biochemical Engineering Journal*, **2000**, 4: 177-188.
- 5 中国国家药典委员会. 中国药典2020版: 二部[M]. 北京:中国医药科技出版社, **2020**.
- 6 问清江, 慕娟, 孙晓宇, 丁浩. 右旋糖酐酶学性质研究[J]. 陕西农业科学, **2019**, 65 (5): 50-53.
- 7 美国药典委员会. 美国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, **2007**.
- 8 欧洲药典委员会. 欧洲药典[M]. 伦敦: 欧洲药品质量管理局, **2013**.
- 9 问清江, 慕娟, 孙晓宇, 郑巧霞, 丁浩. 右旋糖酐发酵液酶解制备右旋糖酐40中氮的控制[J]. 微生物学杂志, **2022**, 42 (5): 67-72.

Technology and Application

Purification of Dextran 40 by Ion Exchange Column Chromatography to Improve Product Quality

WEN Qing-jiang, ZHENG Qiao-xia, SUN Xiao-yu, DING Hao, MU Juan*
(Shaanxi Institute of Microbiology, Xi'an 710043, China)

Abstract Dextran 40 prepared by enzymatic hydrolysis of dextran fermentation broth was separated and purified by ion exchange column chromatography, achieving the highest international standards for product indexes.

Dextran 40 was prepared by enzymatic hydrolysis of dextran fermentation broth, with a yield of 31.70 g/L of fermentation broth. The weight average molecular weight and molecular weight distribution of product were M_w 36125, 10% macromolecular M_w 106805, and 10% small molecular M_w 7272, meeting European standards. The contents of ignition residue, heavy metals, and nitrogen in the dextran 40 product obtained by cation - anion - cation-anion discontinuous ion exchange column chromatography were 0.01%, 0.000643%, and 0.004%, respectively. The contents of ignition residue and nitrogen met the highest international standards, while the heavy metal content met the national standard. The conductivity dropped below 70 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The contents of ignition residue, heavy metals, and nitrogen in the Dextran 40 product by cation-anion-cation-anion-cation-anion discontinuous ion exchange column chromatography were 0.01%, 0.0001%, and 0.005%, respectively, meeting the highest international standards. The conductivity dropped below 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The ignition residue, heavy metals, and nitrogen contents of dextran 40 obtained from three consecutive cation - anion ion exchange column chromatographies were 0.01%, 0.0001%, and 0.004%, respectively, meeting the highest international standards. The weight average molecular weight and molecular weight distribution met European standards. The yield exceeded 85%. The conductivity dropped below 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Keywords Ion exchange, Column chromatography, Dextran40, Fermentation broth, Enzymolysis, Conductivity

* **Corresponding author:** MU Juan, E-mail: mujuan2007@163.com.