

从肝素副产物废蛋白中提取类肝素 工艺研究

汤彬彩,童永刚*,潘卫春,杨志秋,马青青,江玲超
(杭州惠顺生物科技有限公司,浙江 杭州 311500)

摘要:提出了一种从肝素提取过程中产生的废蛋白中提取类肝素的工艺。以类肝素总单位数为评价指标,通过单因素实验和正交设计实验确定了吸附工艺最佳条件:温度为55℃,盐浓度为0.8 mol/L,pH为8.72。氧化工艺最佳条件为:加入双氧水的量与待氧化的类肝素粗品溶液体积比为2:100,氧化时间为6 h。与传统的处理废蛋白的方式相比,有效地增加了其经济价值。

关键词:类肝素;吸附;氧化;单因素;正交设计

中图分类号:Q819

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2015)11-0125-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2015.11.030

Extraction process of heparinoid from waste protein by-product of heparin

TANG Bin-cai, TONG Yong-gang*, PAN Wei-chun, YANG Zhi-qiu, MA Qing-qing, JIANG Ling-chao
(Hangzhou Huishun Biological Technology Co., Ltd., Hangzhou 311500, China)

Abstract: A kind of extraction technology of heparinoid from waste protein generated in the heparin extraction process is proposed. With the total unit number of heparinoid as the assessment index, the optimum conditions for the adsorption process are determined by single factor and orthogonal design experiments as follows: 55℃ of the temperature, 0.8 mol/L of the salt concentration and 8.72 of pH value. Besides that, the optimum conditions for the oxidation process are also shown as follows: 2:100 of the volume ratio of hydrogen peroxide and 6 hours of the reaction time. Compared to the traditional processing method for waste protein, the economic value is efficiently improved. It provides a good reference for the heparin production enterprises.

Key words: heparinoid; adsorption; oxidation; single factor; orthogonal design

类肝素是指天然的、合成的和半合成的与肝素有类似作用的物质。类肝素能够与数百种蛋白质相结合,从而影响蛋白质的空间构象、寿命和生物活性;类肝素还可以和胞外基质中的多种蛋白质相结合,控制他们的分布、转移和信息传递。因此,类肝素是一种重要的信息分子,能够对主体细胞的行为如细胞的增殖、分化、结合起调控作用,并参与外来细胞的识别和控制过程。舒洛地特、冠心舒等类肝素药物因安全有效性得到患者的认同^[1]。

肝素是从猪小肠黏膜中提取的黏多糖物质,具有显著地抗凝血和防止血栓形成的作用^[2-4],在临床中常作为抗凝血药物。在利用树脂吸附法提取肝素钠的传统工艺中,由于大量的蛋白被树脂吸附,在树脂洗脱条件单一的情况下,造成大量类肝素残留在废蛋白中,其中主要包括硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素和少量残留肝素,从而导致资源浪费。笔者提出了一种从废蛋白中提取类肝素的工

艺,并确定了其最佳的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

肝素钠标准品,357 U/mL, U. S. Pharmacopeial Convention 生产;绵羊血浆,山东苍山向明生化助剂厂生产;FPA98Cl树脂;Rohm and Haas Company 生产;2709 酶,北京东华强盛生物技术有限公司生产;双氧水,无锡市晶科化工有限公司;乙醇等其他试剂,均为分析纯,市售。

双层玻璃反应釜:S212B型,杭州惠创仪器设备有限公司生产;磁力搅拌油浴锅:DF-II型,常州澳华仪器有限公司生产;紫外可见分光光度计:752N型,上海仪电分析仪器有限公司生产;手持式pH计:PHB-4型,上海仪电科学仪器股份有限公司生产;真空干燥箱:DZF-6021型,上海精宏实验设备有限公司生产。

收稿日期:2015-05-11

作者简介:汤彬彩(1987-),男,硕士生,主要从事畜牧业科技项目研究,tangbc@zjnc.com;童永刚(1968-),男,硕士,主要从事畜产品外贸商业项目研究,通讯联系人,tongyg@zjnc.com。

1.2 实验方法

1.2.1 类肝素提取工艺

类肝素提取工艺流程如图 1 所示。

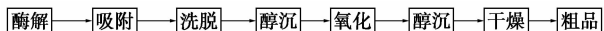


图 1 类肝素提取工艺流程

首先采用 2709 碱性蛋白酶进行酶解,酶解时蛋白与水体积比约为 1:2,加入 2709 酶的酶量为 1 g/L,反应温度设置为 53℃,pH 为 8.5 左右,盐浓度为 0.6 mol/L 左右,保温时间为 3 h。保温结束后升温至 80℃,灭酶活反应 15 min。吸附阶段首先加入 0.5 g/L 的 FPA98Cl 树脂进行吸附,吸附条件为 58℃,盐浓度为 0.8 mol/L 左右,pH 为 8 左右,吸附时间为 8~10 h。吸附结束后,收集树脂,第 1 次洗脱依次用 55℃ pH 9 的碱液洗涤 20 min,55℃ 盐浓度为 0.82 mol/L 的盐水洗涤 20 min,55℃ 盐浓度为 4.5 mol/L 的盐水洗脱 4 h,洗脱结束后收集洗脱液,静置冷却,再将树脂放在 55℃ 盐浓度为 4.5 mol/L 的盐水进行第 2 次洗脱,洗脱 2 h。洗脱结束后收集一二次洗脱液混合进行醇沉,加入 90% 酒精进行沉淀,沉淀 24 h 后,将上清液倒去,将沉淀加入水溶解,然后进行氧化步骤。氧化步骤首先将 pH 调至 11.5 左右,加入双氧水氧化,初加入时 pH 会降低,需进行补碱操作,氧化时间为 6 h 左右,氧化完成后用亚硫酸氢钠中和多余的双氧水,然后将 pH 调至 1.8 左右,加入盐酸进行酸沉,酸沉之后离心取上清液。将 pH 调至 5 左右,电导率调至 50 mS 左右,然后进行醇沉,电导率在 10 mS 左右,醇沉之后进行脱水干燥,最终得到类肝素产品。

1.2.2 类肝素效价的测定方法

采用冷冻羊血浆法测定类肝素效价^[5-6]。称取类肝素原料或量取类肝素注射液适量,按估计效价用 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液稀释至标准溶液(8 U/mL)相当的效价浓度,根据绵羊血浆的半凝固点分别吸取样品和标准品的 3 到 5 个梯度,加 1 mL 绵羊血浆和 0.02 mol/L 的 CaCl₂ 溶液 0.8 mL,置于(37±0.5)℃水浴 1 h,记录每管凝结程度,类肝素效价计算式为:

$$X = (V_s \times V \times C_s) / (V_m \times W_m) \quad (1)$$

得到类肝素的总单位为:

$$U_{\text{总}} = X \times m \quad (2)$$

式中,X 为类肝素效价,U/mg;V_s 为标准品 1/2 凝固度的肝素加入体积,μL;C_s 为标准品溶液的浓度,U/mL;V_m 为样品 1/2 凝固度时的样液加入体积,

μL;W_m 为样品称取的质量,mg;V 为测定样品的总体积,mL;m 为类肝素的质量,mg。

1.3 单因素实验设计

在吸附工艺中,单因素包括吸附温度、pH、盐浓度^[5-6]。将现有车间工艺作为平衡工艺,使其中 1 个工艺参数进行改变,其他参数保持不变,从而得到一个合理的参数范围。

1.4 类肝素提取工艺的优化

依照单因素试验结果,利用正交软件 design-Expert 设计各个步骤的单因素进行正交实验。

2 结果与分析

2.1 废蛋白酶解实验

在肝素生产工艺中有酶解工艺,为了验证提取类肝素工艺中是否还需进行酶解实验,将相同批次的等量蛋白进行对比实验,第 1 组进行酶解反应,加入 2709 酶的酶量为 1 g/L,温度为 53℃,pH 为 8.5 左右,盐浓度为 0.6 mol/L 左右,保温时间为 3 h。保温结束后升温至 80℃,灭酶活反应 15 min,编号为 1。第 2 组不进行酶解反应,将该组吸附条件调至与第 1 组一致,其他步骤反应条件也保持一致,编号为 2。得到的对比实验结果如表 1 所示。

表 1 废蛋白的性质实验对比

编号	效价/(U·mg ⁻¹)	吸光度	总质量/g	单位数/U	旋光度
1	61.8	0.022	10.0429	621012	22°
2	61.3	0.024	10.1482	622085	21°

由表 1 可以看出,酶解与否对于最后得率、吸光度、旋光度都没有显著的影响,考虑到工业生产成本,对废蛋白的酶解步骤可以省略掉。

2.2 废蛋白吸附实验

2.2.1 吸附温度对类肝素得率的影响

吸附条件设定在 pH 为 8,盐浓度为 0.8 mol/L,吸附时间为 8 h,考察吸附温度对类肝素得率的影响,结果如图 2 所示。

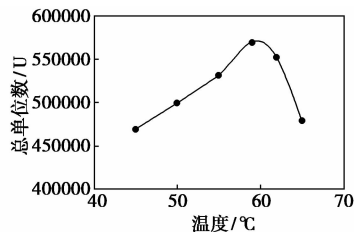


图 2 吸附温度对类肝素得率的影响

由图 2 可见,当温度为 59℃ 时,类肝素的得率

最高。温度过低会影响树脂的吸附能力,温度过高会破坏类肝素的稳定性,影响得率。

2.2.2 吸附 pH 对类肝素得率的影响

吸附条件设定在温度为 59℃,盐浓度为 0.8 mol/L,吸附时间为 8 h,考察吸附 pH 对类肝素得率的影响,结果如图 3 所示。由图 3 可以看出,pH 为 8.5 时,类肝素得率最高。

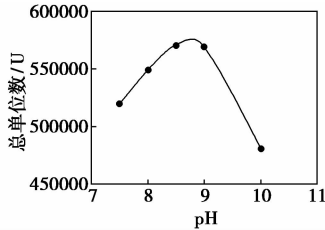


图 3 吸附 pH 对类肝素得率的影响

2.2.3 吸附盐浓度对类肝素得率的影响

吸附条件设定在温度为 59℃,pH 为 8.5,吸附时间为 8 h,考察吸附盐浓度对类肝素得率的影响,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,盐浓度为 0.7 mol/L 时,类肝素得率最高。

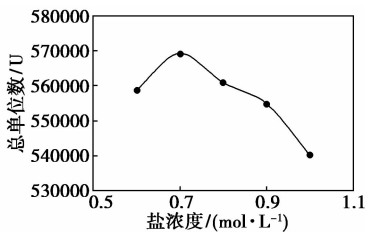


图 4 吸附盐浓度对类肝素得率的影响

2.2.4 正交实验优化吸附工艺结果

依据单因素试验结果,利用 design-Expert 软件对废蛋白吸附工艺的温度、盐浓度、pH 进行因素 Box-Behnken 设计。产生 17 个试验,试验因素水平如表 2 所示,结果如表 3 所示。

表 2 正交试验因素水平表

水平	温度(A)/℃	盐浓度(B)/(mol·L ⁻¹)	pH(C)
1	45	0.6	7.5
2	55	0.8	8.5
3	65	1	10

从表 3 中可看出,选用的废蛋白中提取类肝素总单位数回归模型具有高度的显著性($P < 0.0001$)。失拟项在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著($P = 0.0501 > 0.05$),其校正决定系数为 0.9930,表明此模型可解释 99.30% 响应值的变化,仅有 0.70% 的总变异不

能由此模型进行解释。复相关系数为 0.9839,说明该模型拟合程度良好,试验误差小。同时从 F 值和 P 值可以看出,温度对提取效果的影响显著($P < 0.01$)。

表 3 响应面分析结果

	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	6.636E+008	9	7.374E+007	109.96	<0.0001
温度(A)	4.621E+006	1	4.621E+006	61.89	<0.0001
盐浓度(B)	3321.13	1	3321.13	4.953E-003	0.9459
pH(C)	1.397E+005	1	1.397E+005	0.21	0.6620
AB	9.428E+005	1	9.428E+005	1.41	0.2744
AC	3.260E+005	1	3.260E+005	0.49	0.5081
BC	1.229E+006	1	1.229E+006	1.83	0.2179
A ²	5.093E+008	1	5.093E+008	759.47	<0.0001
B ²	5.680E+007	1	5.680E+007	84.70	<0.0001
C ²	4.510E+007	1	4.510E+007	67.25	<0.0001
残差	4.694E+006	7	6.706E+005		
失拟项	3.904E+006	3	1.301E+006	6.59	0.0501
误差项	7.904E+005	4	1.976E+005		
总和	6.683E+008	16			

注: $R = 0.9930$, $R_{adj}^2 = 0.9839$ 。

2.2.5 正交实验优化工艺参数的试验验证

利用构建的类肝素总单位数回归模型进行模拟得到不同的最优工艺路线,不同工艺路线模拟值与真实值比较结果如表 4 所示。

表 4 响应参数值与真实实验值的关系

编号	温度/℃	pH	盐浓度/(mol·L ⁻¹)	总单位数/U	
				预测值	实际值
1	55	8.72	0.8	324612	325312
2	65	7.7	0.6	308740	308812
3	65	7.5	0.7	308470	308501
4	45	7.5	0.6	308352	308409
相关性				$R^2 = 0.9980$	

从表 4 可以看出,在优化条件下,类肝素总单位数的预测值与实际值具有很好的相关性,可利用上述模型对实际吸附过程进行预测和控制。类肝素吸附工艺经过优化实验后,最佳工艺参数最后确定为:温度为 55℃,盐浓度为 0.8 mol/L,pH 为 8.72。

2.3 粗品类肝素的氧化提纯

废蛋白经过吸附后,再经过脱附、醇沉步骤后,

可以得到类肝素粗品,但由于杂质很多,效价很低,旋光度、吸光度都达不到质量要求,因而需要进行氧化提纯。

2.3.1 双氧水的量对类肝素得率的影响

将类肝素粗品按照质量比为 1:15 用水进行溶解, pH 调至 11.5, 均分为 6 份, 加入不同量的双氧水进行氧化, 分别是体积比 1:100、2:100、3:100、4:100、5:100、6:100, 对应为 6 组。氧化时间为 6 h, 氧化结束后将 pH 调至 7, 加入亚硫酸氢钠除去多余的双氧水, 之后将 pH 调至 1.8, 进行酸沉, 离心除去固体, 取上清液, 进行醇沉。醇沉终点控制在电导率为 10 mS 左右, 醇沉时间为 12 h, 结束后将固体烘干, 得到类肝素产品。结果如图 5 所示。

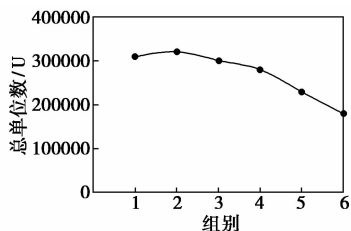


图 5 双氧水的量对类肝素得率的影响

从图 5 可以看出, 双氧水浓度过低、过高都会导致类肝素得率下降。这是因为过低时, 杂质没有完全氧化, 影响到效价; 而过高时, 双氧水会破坏类肝素分子。当双氧水体积比为 2:100 时, 类肝素得率最高。

2.3.2 氧化时间对类肝素得率的影响

实验条件同 2.3.1 中一样, 当双氧水体积比为 2:100 时, 氧化时间 (2、4、6、10、15、24 h) 对类肝素得率的影响如图 6 所示。

从图 6 可以看出, 氧化时间为 6 h 时, 类肝素得率最高。类肝素得率不会随着氧化时间的增加而提升, 这是因为类肝素存在的形式是与其他物质结合在一起, 时间越久, 解离率越高, 有效成分被氧化的越多, 得率越低。

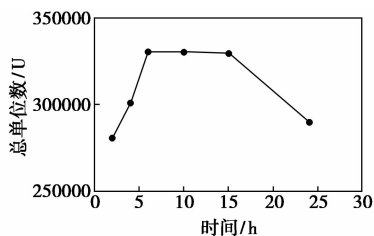


图 6 氧化时间对类肝素得率的影响

因此, 在提取类肝素的工艺中, 最佳氧化条件为加入双氧水量的体积比为 2:100, 氧化时间为 6 h。

3 结论

提出了从肝素提取过程中产生的副产物废蛋白里提取类肝素的工艺, 通过单因素试验与正交试验优化确定了吸附工艺的最佳条件: 温度为 55℃, 盐浓度为 0.8 mol/L, pH 为 8.72。氧化工艺最佳条件为: 加入双氧水的量的体积比为 2:100, 氧化时间为 6 h。该工艺使废蛋白变为类肝素, 对现有的肝素企业也有很好的参考价值。

参考文献

- [1] 薛发刚, 姬胜利, 张云峰. 多组分糖胺聚糖药物舒洛地特研究进展[J]. 中国生化药理学杂志, 2009, 30(6): 430-432.
- [2] 李红心. 精品肝素钠的制备及效价分析[J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2006, 23(5): 32-34.
- [3] 徐俊涛. 酶解法制备肝素钠关键工艺技术研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [4] 海文英. 酶法结合膜技术制备精品肝素钠的工艺研究[D]. 湖北: 湖北工业大学, 2012.
- [6] 孟长虹, 陆益红. 肝素钠及其制剂效价测定方法的改进[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(5): 337-339.
- [7] 方井晋. 肝素钠有关物质检测方法学研究及效价的快速测定[D]. 浙江: 浙江大学, 2012.
- [8] 游永豪, 温爱玲. 几种单因素实验设计在体育科学中的应用研究[J]. 体育科技, 2014, (1): 71-73.
- [9] 徐俊涛, 王玉芬, 谢华, 等. 粗品肝素钠精制工艺优化研究[J]. 食品与机械, 2012, (4): 206-208. ■

科思创与 Reverdia 携手研发生物基热塑性聚氨酯

2015 年 9 月 29 日消息, 科思创已与 Reverdia 达成协议, 双方将共同研发并推广生物基热塑性聚氨酯(TPU)。科思创将在其 Desmopan™ 品牌生物基热塑性聚氨酯生产中使用 Reverdia 公司的生物基丁二酸™, 进而满足制鞋行业和消费性电子产品等行业的需要。

生物基丁二酸™采用 Reverdia 公司的低 pH 酵母科技, 于 2012 年投入商业规模生产。利用该产品, 科思创将其位于台湾生产工厂的生物基热塑性聚氨酯生产

提升至工业规模。目前, 生物基 Desmopan™ 产品可适用于多个硬度级别, 比如邵氏硬度 A85 度、A95 度和 D60 度。

Reverdia 进行的一项模拟测验显示, 与使用化石燃料产品相比, 使用生物基热塑性聚氨酯可减少高达 65% 的碳排放量。不同硬度条件下, Desmopan™ 品牌生物基热塑性聚氨酯的质量分数分别为 65% (邵氏硬度 A85 度), 52% (邵氏硬度 A95 度) 和 42% (邵氏硬度 D60 度)。(王丽华)