

复合酶酶解肝素钠的工艺研究

汤彬彩,童永刚*,潘卫春,杨志秋,马青青,赵琼
(浙江凯胜畜产品加工有限公司,浙江杭州311500)

摘要:提出了一种新的肝素钠酶解工艺,利用2709碱性蛋白酶和胰蛋白酶组合而成的复合酶催化酶解肝素钠。以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得到了复合酶酶解工艺的最佳工艺参数:2709碱性蛋白酶和胰蛋白酶的酶量比以2:1的比例组合,温度为58℃,盐浓度为0.78 mol/L,pH为9,总酶量为0.3 g/L,反应时间为2 h。与现有单一蛋白酶酶解工艺相比,肝素得率提高了6%,肝素粗品吸光度明显降低,肝素质量得到提高。复合酶酶解肝素钠的新工艺为实际车间生产提供了重要的参考。

关键词:肝素钠;酶解;碱性蛋白酶;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)03-0098-03

Enzymatic process of heparin sodium by combinative enzyme

TANG Bin-cai, TONG Yong-gang*, PAN Wei-chun, YANG Zhi-qi, MA Qing-qing, ZHAO Qiong
(Zhejiang Casing Animal By-products Co., Ltd., Hangzhou 311500, China)

Abstract: To improve the enzymatic process of heparin sodium, a kind of innovative enzymatic technology of heparin sodium is presented. The combinative enzyme which combines 2709 alkaline protease with trypsin is adopted in enzymatic process. The optimum conditions in the enzymatic process are obtained through the single factor experiments and orthogonal experiments: 2:1 of 2709 alkaline protease and trypsin, 58℃ of reaction temperature, 0.79 mol/L of salinity, 9 of pH, 0.3 g/L of the amount of combinative enzyme and 2 hours of the reaction time. Compared to the original single enzymatic technology, the yield of crude heparin is improved by 6% and the quality of crude heparin is also improved. The new enzymatic technology of heparin sodium by combinative enzyme provides an important reference for practical workshop production.

Key words: heparin sodium; enzymatic process; alkaline protease; single factor; orthogonal design

肝素钠是一种临床常用的抗凝血药物,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^[1]。酶解提取法是国内常用的猪小肠黏膜肝素提取方法,其主要工艺是在碱性环境下,酶将小肠黏膜中的蛋白质酶解,使肝素从肝素蛋白复合物中分离出来,然后用强碱性阴离子交换树脂从提取液中将肝素阴离子吸附,再使用一定浓度的盐水溶液将肝素阴离子洗脱下来,经乙醇沉淀、干燥后即可得到肝素粗品^[2-3]。目前肝素钠的酶解工艺都是采用单一碱性蛋白酶进行酶解^[4-5],如2709蛋白酶、胰蛋白酶等。2709蛋白酶催化部位为由丝氨酸的羧基参与形成的肽键,而胰蛋白酶只断裂赖氨酸或精氨酸的羧基参与形成的肽键,采用单一碱性蛋白酶酶解的缺点是作用专一性,催化部位单一,肝素钠的酶解程度有一定的限度。为了充分解离杂质蛋白,提高肝素钠酶解效率和肝素粗品得率,笔者提出了一种采用2709碱性蛋白酶与胰蛋白酶复合酶解的新工艺,确定了复合酶酶解肝素钠的最佳工艺条件,并与现有单一蛋白酶酶解工艺进行了比较。

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;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;乙醇等其他试剂:均为市售分析纯。

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。

1.2 实验方法

1.2.1 粗品肝素的生产工艺流程

粗品肝素的生产工艺流程如图1所示,其中酶解是提取肝素的第一步,大多数厂家直接采用单一碱性蛋白酶进行酶解反应。笔者提出的肝素钠酶解新工艺采用由2709碱性蛋白酶和胰蛋白酶2种酶

组合而成的复合酶进行酶解反应。将酶解液的 pH 调节为 9, 在 60℃ 下采用 FPA98Cl 树脂吸附 8 h。吸附结束后, 收集树脂, 依次用 55℃ pH 9 的碱液洗脱 20 min, 55℃ 盐浓度为 0.82 mol/L 的盐水洗脱 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。将上述洗脱液用酒精度 45 的酒精进行沉淀, 为防止在干燥过程中少量的效价损失, 将沉淀得到的固体产品置于真空干燥箱中干燥, 即得粗品肝素。

酶解 → 吸附 → 洗脱 → 沉淀 → 过滤, 干燥 → 粗肝素

图 1 粗品肝素的生产工艺流程

1.2.2 肝素效价的测定方法

采用冷冻羊血浆法测定其效价^[6-7]。称取肝素钠原料或量取肝素钠注射液适量, 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 3~5 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, 肝素钠效价计算式为:

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

式中, X 为肝素钠效价, 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 为样品称取的重量, mg; V 为测定样品的总体积, mL; X 为肝素钠效价, U/mg; M 为肝素钠的质量, mg。

得到肝素的总单位为:

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

1.3 单因素实验设计

在酶解整个工艺中, 单因素包括酶解温度、pH、盐浓度、复合酶比例^[8-9]。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 复合酶酶解工艺的优化

依照单因素试验结果, 利用正交软件对温度、盐浓度、pH 进行三因素正交实验。

2 结果与分析

2.1 碱性蛋白酶单因素实验

2.1.1 温度对粗品肝素得率的影响

在盐浓度为 0.8 mol/L, 反应时间为 2 h, pH 为 8.5, 2709 酶与胰蛋白酶总量为 0.3 g/L, 酶量比例

为 1:1 的酶解条件下, 考察温度对粗品肝素得率的影响, 结果如图 2 所示。由图 2 可以看出, 总单位数随着温度的升高呈先上升后下降的趋势, 在 57℃ 时得率最高。温度过低, 酶活性下降。温度过高, 破坏肝素分子结构, 使得部分肝素严重失活, 得率下降。

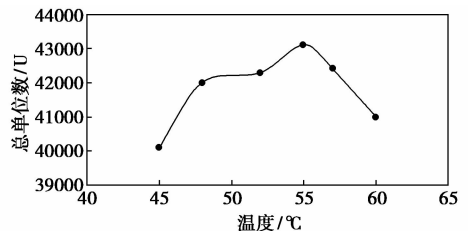


图 2 温度对肝素得率的影响

2.1.2 盐浓度对粗品肝素得率的影响

在温度为 57℃, 反应时间为 2 h, pH 为 8.5, 2709 酶与胰蛋白酶总量为 0.3 g/L, 酶量比例为 1:1 的酶解条件下, 考察盐浓度对粗品肝素得率的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, 总单位数随着盐浓度的升高呈先上升后下降的趋势, 在盐浓度为 0.79 mol/L 时, 得率最高。

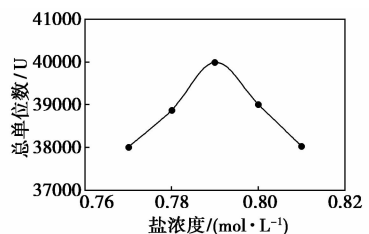


图 3 盐浓度对肝素得率的影响

2.1.3 pH 对粗品肝素得率的影响

在温度为 57℃, 反应时间为 2 h, 盐浓度为 0.79 mol/L, 2709 酶与胰蛋白酶总量为 0.3 g/L, 酶量比例为 1:1 的酶解条件下, 考察 pH 对粗品肝素得率的影响, 结果如图 4 所示。由图 4 可以看出, pH 为 9 时, 肝素得率最高。

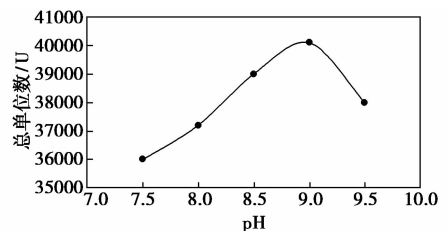


图 4 pH 对肝素得率的影响

2.1.4 酶比例对粗品肝素得率的影响

在温度为 57℃, 反应时间为 2 h, pH 为 9, 盐浓度为 0.79 mol/L, 2709 酶与胰蛋白酶总量为 0.3 g/L 酶

解条件下,考察 2 种酶酶量组成比例对粗品肝素得率的影响,结果如图 5 所示。由图 5 可以看出,当 2709 酶与胰蛋白酶酶量比例为 2:1 时,肝素总单位即得率达到最高值。

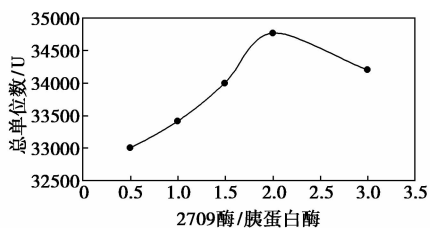


图 5 酶比例对肝素得率的影响

2.2 正交实验优化酶解工艺结果

依据单因素试验结果,利用 design-Expert 软件对复合酶酶解工艺的温度、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 1 所示,结果如表 2 所示。

表 1 正交试验因素水平表

水平	温度(A)/℃	盐浓度(B)/mol/L	pH(C)
1	55	0.77	8.5
2	60	0.80	9.0
3	65	0.82	9.5

表 2 响应面分析结果

RUN	温度(A)/℃	盐浓度(B)/mol/L	pH(C)	总单位数/U	显著性
Model	2.090E+006	9	2.322E+005	55.64	<0.0001
温度(A)	74884.50	1	74884.50	17.94	0.0039
盐浓度(B)	1.016E+006	1	1.016E+006	243.46	<0.0001
pH(C)	58653.12	1	58653.12	14.05	0.0072
AB	8930.25	1	8930.25	2.14	0.1869
AC	15006.25	1	15006.25	3.60	0.0998
BC	1369.00	1	1369.00	0.33	0.5847
A ²	3.882E+005	1	3.882E+005	93.03	<0.0001
B ²	1.586E+005	1	1.586E+005	38.01	0.0005
C ²	3.749E+005	1	3.749E+005	89.84	<0.0001
残差	29213.05	7	4173.29		
失拟项	27898.25	3	9299.42	28.29	0.6125
误差项	1314.80	4	328.70		
总和	2.119E+006	16			

注: $R=0.9931$, $R_{adj}^2=0.9865$ 。

从表 2 中可看出,选用的酶解液总单位数回归

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($P=0.6125 > 0.05$),其校正决定系数为 0.9931,表明此模型可解释 99.31% 响应值的变化,仅有 0.69% 的总变异不能由此模型进行解释。复相关系数为 0.9865,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、盐浓度、pH 3 因素对酶解效果的影响均显著($P < 0.01$)。

2.3 正交实验优化工艺参数的试验验证

利用 2.2 节构建的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 3 所示。

表 3 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	56	8.9	0.78	34197	34011
2	60	9.0	0.77	34196	34021
3	58	9.0	0.78	34239	34198
相关性				$R^2=0.9977$	

由表 3 可以看出,在优化条件下,酶解总单位数的预测值与实际值有很好的相关性,可利用上述模型对实际酶解过程进行预测和控制。碱性复合蛋白酶酶解工艺经过优化实验后,最佳工艺参数最后确定为:温度为 58℃,盐浓度为 0.78 mol/L, pH 为 9,酶量为 0.3 g/L,酶的酶量比例(2709 蛋白酶:胰蛋白酶)为 2:1,反应时间为 2 h。

优化后的新的肝素工艺与现有的肝素工艺通过实验进行验证比较,采用等量相同浓度的黏膜液进行肝素提取反应,结果如表 4 所示。

表 4 不同工艺条件下肝素提取结果

	总单位数/U	吸光度
现有工艺	36787	1.811
优化工艺	38987	1.102

从表 4 中可以看出,复合酶催化酶解肝素钠的效果明显优于现有单一酶酶解工艺,肝素得率提高约 6%,且吸光度下降明显,产品质量得到了提升。

3 结论

首次提出了一种新的肝素钠酶解工艺,由 2709 碱性蛋白酶和胰蛋白酶的酶量以 2:1 的比例组合的

(下转第 102 页)

再用其对二次纳米自组装 Al_2O_3 进行均匀浸渍。在 100°C 下烘干, 400°C 焙烧, 即得反向胶束大孔纳米自组装催化剂。

1.2.2 正向胶束法

向含 $0.1 \sim 5.0 \text{ mol}$ 钼、 $0.05 \sim 1.5 \text{ mol/L}$ 镍的钼镍磷活性金属溶液中加入共浸剂(吐温-80), 得到活性金属质量分数为 35% 的正向胶束浸渍液。以其对二次纳米自组装 Al_2O_3 进行饱和均匀浸渍, 在 100°C 下烘干, 400°C 焙烧, 即得正向胶束大孔纳米自组装催化剂。

1.3 催化材料的表征与评价

1.3.1 催化材料的物性与 XRD 表征

利用美国麦克公司生产的 ASAP2405 型吸附仪, 采用低温 N_2 物理吸附法分析催化剂的比表面积、孔径。

利用日本理学生产的 D/2500 型 X 光射线衍射仪作为仪器进行分析, 具体参数为: 铜靶; 光源波长为 1.54 nm ; 管工作电压为 40 kV ; 管电流为 80 mA ; 扫描范围为 $10 \sim 70^\circ$ 。

1.3.2 催化材料的 H_2 -TPR 表征

利用美国 Micromeritics 公司生产的 Auto Chem 2910 型全自动化学吸附分析仪进行分析, 采用微量的催化剂样品, 在室温至 900°C 之间对其进行测定, 表征了其还原性质。

1.4 催化材料的活性评价

活性评价在固定床渣油微型反应器中进行, 催化材料用量为 20 mL (按其体积计)。进行加氢反应前用质量分数为 2% 的硫化油进行预硫化, 在 230°C 下将催化材料预硫化 3 h, 在 340°C 预硫化 5 h; 反应时温度为 390°C , 压力为 14.0 MPa , 空速为 0.24 h^{-1} , 氢

油比为 800:1, 原料油采用 UFR 生成油, 原料油的基本性质如表 1 所示。

表 1 原料油的性质

项目	残炭/ %	碱性氮/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	总硫/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	饱和份 质量分 数/%	芳香份 质量分 数/%	胶质量 分数/ %	沥青质 质量分 数/%
数据	4.78	2110	5300	50.90	3.07	3.07	0.27

2 结果与讨论

2.1 纳米自组装催化剂活性金属分散参数(NSA)

使用不同的共浸剂, 催化剂中的活性金属在载体上会有不同分散方式, 相应地, 催化剂相对于载体表现出不同的比表面积变化。活性金属分散参数(NSA)的定义是催化剂的比表面积与载体的比表面积乘以载体在催化剂中的质量分数所得积之比^[1], 用来表征催化剂中活性金属在载体孔道中的分散状况。活性金属分散参数(NSA)与一般意义的分散度不同。分散度是指催化剂中暴露在表面的组分占全部负载组分的比^[2], 当活性金属的聚集程度发生变化时, 其分散度也会发生变化; 当活性金属的分散度达到最大时, 说明其为单层分散。此外, NSA 与分散度的灵敏度也有差别。当活性金属质量分数较少时, 其分散状况发生改变时催化剂的比表面积变化不太明显, 此时用分散度表示更为准确; 但当活性金属质量分数较高时, 分散度和 NSA 均能表现出活性金属的分散状况变化。为了更好地分析纳米自组装催化剂活性金属的分散情况, 以 NSA 来表征催化剂活性金属的分散, 估算活性金属在载体表面是呈单层分散还是有聚集现象发生。

(上接第 100 页)

复合酶进行酶解反应。通过单因素试验与正交试验优化, 确定了复合酶酶解的最优工艺条件, 即温度为 58°C , 盐浓度为 0.78 mol/L , pH 为 9, 酶量为 0.3 g/L , 反应时间为 2 h。新的复合酶解工艺与现有的单一酶解工艺相比, 肝素得率、产品质量均得到提高, 对实际生产工艺有很好的参考价值。

参考文献

[1] 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.
[2] 陈自然. 从猪小肠粘膜中提取肝素钠的生产技术改进[J]. 川北教育学院学报, 2004, 11(1): 55-57.

[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, 万端极, 吴正奇, 等. 酶法结合膜技术制备高效价肝素钠的工艺研究[J]. 科学技术与工程, 2013, (11): 3069-3072.
[5] 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. ■