

# 鱼鳔类肝素提取工艺优化及抗凝血活性研究

## Optimization of Extraction process of heparinoid from swim bladder and evaluation its anticoagulant activity

周斯仪<sup>1</sup> 屈义<sup>1</sup> 钟赛意<sup>1,2,3</sup> 杜振兴<sup>1</sup>  
ZHOU Si-yi<sup>1</sup> QU Yi<sup>1</sup> ZHONG Sai-yi<sup>1,2,3</sup> DU Zhen-xing<sup>1</sup>  
苏伟明<sup>1,3</sup> 谌素华<sup>1</sup> 洪鹏志<sup>1</sup> 吴小禾<sup>4</sup>  
SU Wei-min<sup>1,3</sup> CHEN Su-hua<sup>1</sup> HONG Peng-zhi<sup>1</sup> WU Xiao-he<sup>4</sup>

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学深圳研究院, 广东 深圳 518108;  
3. 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524088; 4. 中山火炬职业技术学院, 广东 中山 528436)  
(1. Guangdong Ocean University, College of Food Science and Technology, Zhanjiang, Guangdong 524088, China;  
2. Shenzhen Research Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen, Guangdong 518108, China;  
3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Zhanjiang, Guangdong  
524088, China; 4. Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan, Guangdong 528436, China)

**摘要:**以鱼鳔为原料,采用酶法提取类肝素,研究其提取工艺参数和体外抗凝血活性。在单因素试验基础上,以加酶量、酶解时间和温度为影响因子,类肝素得率为响应值,采用响应曲面法优化鱼鳔类肝素(HSB)提取工艺,并通过测定活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和血浆凝血酶时间(TT)评价其抗凝血活性。结果显示,最优提取条件为2709碱性蛋白酶添加量5.4 mg/mL,酶解温度50℃,时间20 h,在该条件下类肝素得率为(1.79±0.05)%,与预测值相差3.24%;同时,所提取的类肝素具有一定的抗凝血活性,并通过外源性凝血途径和共同凝血途径发挥作用。

**关键词:**鱼鳔;类肝素;酶法;抗凝血活性

**Abstract:** A natural heparin-like compound was isolated from swim bladder and its anticoagulant activities were determined. The response surface analysis based on Box-Behnken design was adopted to examine effects of protease consumption, extracting time and temperature on heparin-like compound extraction. The anticoagulant activity of swim bladder heparin-like compound was evaluated by APTT, PT and TT method. Consequently, the optimum conditions

**基金项目:**广东省渔港建设和渔业产业发展专项资金(编号:A201708C13);深圳市科技计划项目(编号:JCYJ20170818111335796);中山市淡水产品技术服务协同创新中心项目(编号:2016C1007);湛江市海洋经济创新发展示范市建设项目(编号:湛海创2017C8B1)

**作者简介:**周斯仪,女,广东海洋大学在读硕士研究生。

**通信作者:**钟赛意(1979—),男,广东海洋大学副教授,博士。

E-mail: zsy1xc@126.com

**收稿日期:**2017-12-25

were as follows. The concentration of protease from *Bacillus licheniformis* was 5.4 mg/mL, extracted at 50℃ for 20 h. Under the control of these conditions, the predicted extraction rate by mathematical model was (1.79±0.05)%, and the standard error was 3.24%. In addition, the heparin-like compound from swimming bladder (HSB) showed negligible in vitro anticoagulant activity, and played a role through the exogenous coagulation pathway and the common coagulation pathway.

**Keywords:** swim bladder; heparinoid; enzymic method; anticoagulant activity

随着渔业和水产品养殖业技术的不断进步,中国水产品的产量逐年增长。同时,水产品加工业也迅猛发展,每年产生大量的加工下脚料。开发和利用这些加工副产品,提高水产品综合利用价值已成为水产品加工的重要课题。鱼鳔作为水产品加工副产物之一,富含胶原蛋白、多肽和黏多糖等活性物质,具有补肾益精、散瘀消肿等功效,是药食两用的滋补珍品<sup>[1]</sup>。目前,国内外对鱼鳔的研究主要集中在鱼鳔蛋白和多肽的提取、结构特性及生物活性等方面<sup>[2-4]</sup>。近几年有学者<sup>[5-7]</sup>发现鱼鳔多糖具有预防结肠癌、胃溃疡和缓解系统性红斑狼疮炎症的作用,但针对的是粗多糖,且对其提取分离工艺、多糖组成等未明确阐述。本课题组前期研究表明鱼鳔多糖中类肝素多糖占比较高。

肝素具有较强的抗肿瘤、抗炎、抗补体等活性,但其强抗凝活性和出血副作用限制了肝素在这些方面的应用<sup>[8]242</sup>。为此,许多学者正致力于寻找低副作用并保留肝素某些活性

的类肝素化合物<sup>[9]</sup>。海洋生物处于独特的生存环境,具有结构独特、功能特异的生物活性,是筛选生物活性物质的重要来源。如吴丽娟等<sup>[10]</sup>报道了5种海洋类肝素具有明显的抗乙型肝炎病毒作用且无毒副作用;有学者<sup>[11-12]</sup>从凡纳滨对虾分离出类肝素化合物,并发现其抗血管生成和抗炎活性较强,且抗凝和出血性作用不明显;红藻(*Hypnea musciformis*)中类肝素具有抗血栓作用并能防止副反应的产生<sup>[13]</sup>。而关于鱼鳔类肝素的研究未见报道。因此,本试验拟从鱼鳔提取类肝素,并通过体外试验评价其抗凝血活性,以期为进一步阐述鱼鳔功能因子及其构效关系和提高鱼鳔的利用价值提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

鱼鳔:干制品,湛江市霞山区东风市场;

枯草杆菌中性蛋白酶( $1.0 \times 10^5$  U/g)、胰蛋白酶( $2.5 \times 10^5$  U/g):上海源叶生物科技有限公司;

2709碱性蛋白酶( $1.2 \times 10^5$  U/g)、动物水解蛋白酶( $2.0 \times 10^4$  U/g):南宁庞博生物工程有限公司;

风味蛋白酶: $2.0 \times 10^4$  U/g,诺维信(中国)生物技术有限公司;

大孔阴离子交换树脂:FPA98 Cl型,罗门哈斯(中国)公司;

APTT、PT和TT试剂盒:上海太阳生物技术有限公司;

盐酸、氯化钠等:分析纯,广东光华科技股份有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-5100型,上海元析仪器有限公司;

pH计:PHS-3E型,上海雷磁仪器厂;

旋转蒸发器:N-1300D-WB型,东京理化公司;

高速冷冻离心机:HR/T20MM型,湖南赫西仪器装备有限公司;

真空冷冻干燥机:FD8508型,韩国ILSHIN公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 类肝素提取工艺流程 参考文献<sup>[8]</sup><sup>50-53</sup>并稍作调整:

鱼鳔干粉→酶解→灭酶→离心取上清液→大孔阴离子交换树脂吸附洗脱→醇沉→离心收集沉淀→无水乙醇洗涤2次→透析→冷冻干燥→鱼鳔类肝素(HSB)

#### 1.2.2 基本成分测定

(1) 类肝素含量测定:采用阿利新蓝法<sup>[14]</sup>,以肝素为标准品。

(2) 蛋白质含量测定:采用福林-酚法<sup>[15]</sup>,以牛血清蛋白为标准品。

(3) 肝素效测定:采用天青A法<sup>[16]</sup>,以肝素为标准品。

(4) 糖醛酸含量测定:采用咔唑-硫酸法<sup>[17]</sup>,以葡萄糖醛酸为标准品。

(5) 氨基己糖含量测定:采用改进的Wagner法<sup>[18]</sup>,以葡萄糖胺为标准品。

(6) 硫酸基含量测定:采用BaCl<sub>2</sub>-gel比浊法<sup>[19]</sup>,以硫酸钾为标准品。

1.2.3 鱼鳔种类的筛选 分别取黄花鱼鳔、金龙鱼鳔、鳖鱼鳔、鳊鱼鳔、白花鱼鳔和鲈鱼鳔各20 g,加入400 mL蒸馏水、6.0 mg/mL氯化钠和5.0 mg/mL的2709碱性蛋白酶,在酶解液pH 8、温度50℃条件下酶解8 h后,沸水浴灭酶10 min,冷却后离心(8 000 r/min,20 min)。取上清液测定类肝素化合物、糖醛酸和蛋白质的得率。各指标得率按式(1)计算:

$$Y = \frac{CVN}{M \times 1\,000} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Y——某指标的得率,%;

C——酶解液中某指标的浓度,mg/mL;

V——酶解液的体积,mL;

N——稀释倍数;

M——鱼鳔干粉的质量,g。

1.2.4 蛋白酶的选择 取5份鱼鳔干粉各20 g,加入400 mL蒸馏水,分别加入 $4.0 \times 10^5$  U的枯草杆菌中性蛋白酶、2709碱性蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶、动物水解蛋白酶。在各种酶的最适条件下(见表1),酶解8 h,其他操作同1.2.3。

表1 5种蛋白酶的酶活与最适酶解条件

Table 1 Factors and levels in response surface design

酶种类	酶活/( $\times 10^4$ U·g <sup>-1</sup> )	温度/℃	pH
枯草杆菌中性蛋白酶	11	45	7.0
2709碱性蛋白酶	10	50	8.0
风味蛋白酶	5	50	7.0
胰蛋白酶	25	40	8.0
动物水解蛋白酶	10	50	7.0

#### 1.2.5 单因素试验

(1) 氯化钠添加量对类肝素得率的影响:设定料液比1:20(g/mL)、加酶量5.0 mg/mL、酶解液pH 8、温度50℃、酶解时间8 h,分别考察氯化钠添加量为0.0,6.0,12.0,18.0,24.0 mg/mL时类肝素得率的变化。

(2) 料液比对类肝素得率的影响:设定氯化钠添加量6.0 mg/mL、加酶量5.0 mg/mL、酶解液pH 8、温度50℃、酶解时间8 h,分别考察料液比为1:5,1:10,1:15,1:20,1:25,1:30(g/mL)时类肝素得率的变化。

(3) 蛋白酶添加量对类肝素得率的影响:设定氯化钠添加量6.0 mg/mL、料液比1:20(g/mL)、酶解液pH 8、温度50℃、酶解时间8 h,分别考察2709蛋白酶添加量为0.0,1.0,3.0,5.0,7.0,9.0 mg/mL时类肝素得率的变化。

(4) 酶解液pH对类肝素得率的影响:设定氯化钠添加量6.0 mg/mL、加酶量5.0 mg/mL、料液比1:20(g/mL)、温度50℃、酶解时间8 h,分别考察酶解液pH值为6.7,8,9,10时类肝素得率的变化。

(5) 酶解温度对类肝素得率的影响:设定氯化钠添加量6.0 mg/mL、加酶量5.0 mg/mL、酶解液pH 8、料液比1:20(g/mL)、酶解时间8 h,分别考察酶解温度为35,45,55,65,

75 °C 时类肝素得率的变化。

(6) 酶解时间对类肝素得率的影响:设定氯化钠添加量 6.0 mg/mL、加酶量 5.0 mg/mL、酶解液 pH 8、温度 50 °C、料液比 1:20 (g/mL),分别考察酶解时间为 10,12,14,16,18,20,22,24 h 时类肝素得率的变化。

1.2.6 响应曲面试验 根据单因素试验结果,选取加酶量、酶解温度和酶解时间为影响因素,以类肝素得率为响应值,采用 Box-Behnken 试验设计和响应曲面分析优化鱼鳔类肝素的提取。

1.2.7 体外抗凝血试验 静脉取血法取 SD 大鼠血于抗凝试管中,并于 4 °C,3 000 r/min 离心 15 min 后,取上层血浆备用。活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和血浆凝血酶时间(TT)的测定采用试剂盒法。

### 1.3 数据处理

所有试验重复 3 次,结果以平均值±标准偏差表示,采用 Design Expert 8.05 统计软件进行响应曲面分析,Microsoft Excel 2003 和 Origin 8.5 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 鱼鳔种类的筛选

类肝素在生物体内一般以糖蛋白的形式存在,酶解可以将鱼鳔中的蛋白质降解为易于去除的小分子多肽和氨基酸,使类肝素从糖蛋白中释放出来。糖醛酸是类肝素的基本组成之一,其含量可以反映类肝素的含量;蛋白质是鱼鳔主要成分,又是类肝素提取物的主要杂质之一。因此,糖醛酸和类肝素得率越高、蛋白质得率越低,提取效果越理想。6 种鱼鳔的糖醛酸、类肝素和蛋白质的得率见图 1。鲈鱼鳔、黄花鱼提取物的糖醛酸和类肝素得率明显比其他 4 种鱼鳔高;蛋白质得率也比其他 4 种鱼鳔低。另外,类肝素化合物应是白色固体<sup>[8]91</sup>,本试验所制备的鲈鱼鳔的提取物颜色为白色,其他鱼鳔的提取物呈不同程度的暗黄色。故本试验选取鲈鱼鳔提取类肝素。

### 2.2 蛋白酶的选择

类肝素在温热的稀酸和强碱中会失活,在中性及弱碱性条件下较稳定<sup>[8]47-48</sup>。为选择合适的蛋白酶,本试验取 5 种

适宜 pH 范围在 7~8 的蛋白酶,并比较其对鱼鳔类肝素得率的影响。如图 2 所示,2709 碱性蛋白酶的提取效果最好,所得到的鱼鳔类肝素得率最高,其次是中性蛋白酶,另外 3 种酶的提取效果较低。此外,碱性条件可以破坏蛋白质与类肝素之间的共价键,使类肝素从中释放出来。2709 碱性蛋白酶所适宜的酶解条件具有较好的碱提效果,因此其提取类肝素的效果优于其他最适 pH 为中性的蛋白酶。故本试验选择 2709 碱性蛋白酶提取类肝素。

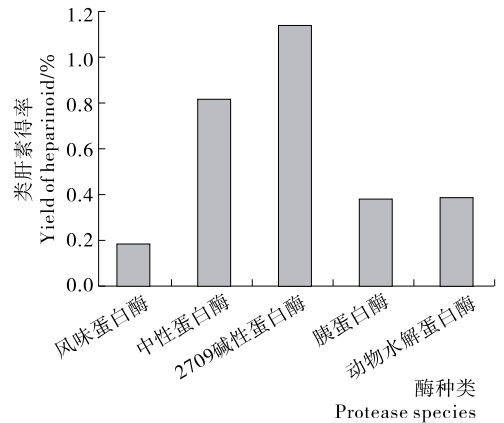


图 2 蛋白酶种类对提取率的影响

Figure 2 Effect of protease species on extraction yield

### 2.3 单因素试验

2.3.1 氯化钠对类肝素得率的影响 在肝素的工业生产中,常在酶解液中添加氯化钠。但各文献报道氯化钠的最适添加量都有所差异。因此,有必要探究酶解时氯化钠的添加量。如图 3 所示,添加氯化钠有助于提高类肝素得率。这可能是低浓度的中性盐可以提高蛋白质的溶解度<sup>[20]</sup>,从而提高酶解效率,促进多糖从糖蛋白中分离。另外,钠离子可以与带负电荷的类肝素结合,促进更多类肝素的释放。当氯化钠添加量分别为 6.0,12.0,18.0,24.0 mg/mL 时,所得类肝素得率之间相差小于 5%,差异并不显著。因此,本试验选取氯化钠的添加量为 6.0 mg/mL。

2.3.2 料液比对类肝素得率的影响 由图 4 可见,随着料液比的增加,类肝素得率显著上升;当料液比为 1:10 (g/mL) 时,类肝素得率达到最大值(1.49%);当继续增加料液比到 1:5 (g/mL) 时,类肝素得率又有所下降。这符合酶解动力

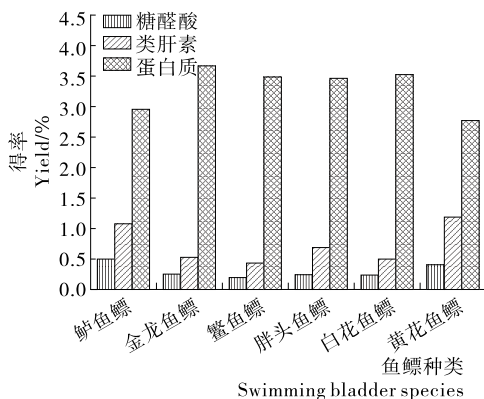


图 1 鱼鳔种类对得率的影响

Figure 1 Effect of swimming bladder species on extraction yield

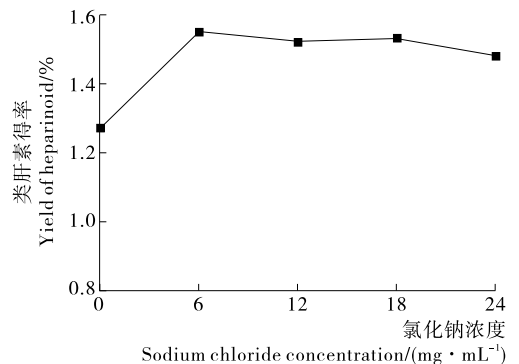


图 3 氯化钠浓度对提取率的影响

Figure 3 Effect of sodium chloride on extraction yield

学规律,在一定范围内,随着底物浓度的增大其酶解效率增加,当底物浓度到达饱和时,酶解效率趋于平缓。此外,料液比太高会增加酶解液的黏稠度,不利于酶解工艺的进行。料液比在 1:5,1:10 (g/mL)时对类肝素得率的影响无显著差异,为提高资源利用率,选取料液比为 1:10 (g/mL)进行类肝素的提取。

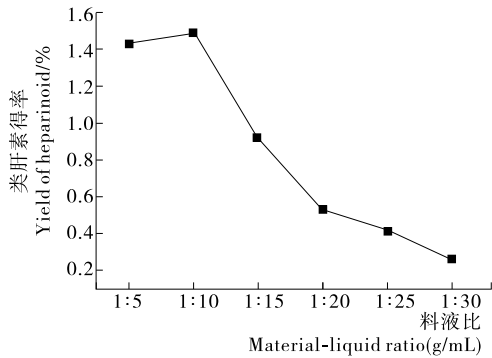


图4 料液比对提取率的影响

Figure 4 Effect of material-liquid on extraction yield

2.3.3 蛋白酶添加量对类肝素得率的影响 由图5可见,类肝素得率随着蛋白酶添加量的增加显著上升;当蛋白酶添加量达 5.0 mg/mL 以上时,类肝素得率上升平缓。在其他条件不变的情况下,随着酶浓度的增加,鱼鳔与蛋白酶的接触概率增加,从而使多糖从糖蛋白快速分离出来;当底物逐渐到达饱和时,继续提高酶用量对得率影响不大。因此选取 5.0 mg/mL 为响应曲面设计中蛋白酶添加量的 0 水平。

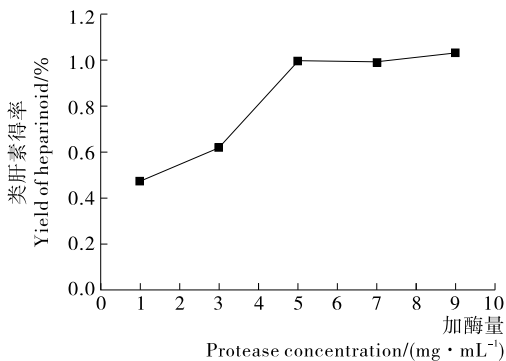


图5 蛋白酶添加量对提取率的影响

Figure 5 Effect of protease concentration on extraction yield

2.3.4 pH对鱼鳔类肝素得率的影响 pH不仅影响酶解的效率,还会影响提取物的结构和活性。因此,合适的pH对天然产物的提取至关重要。如图6所示,当pH为8时,类肝素的得率达到最大;此时随着pH上升或下降,其得率逐渐下降。该蛋白酶的最适pH值为8,偏离此pH值会减低酶解效率。其次,一定量的碱可以使类肝素从糖蛋白中解离,从而提高得率。再次,pH值过高或过低都会破坏类肝素的结构和活性。因此,本试验选取该酶的最适pH为8。

2.3.5 酶解温度对类肝素得率的影响 由图7可知,类肝素得率随着温度的上升而提高,当温度至55℃时达最高值,

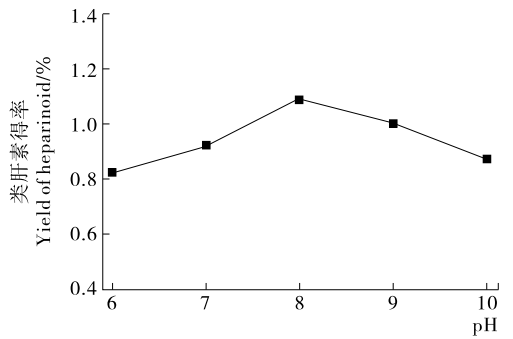


图6 pH对提取率的影响

Figure 6 Effect of pH on extraction yield

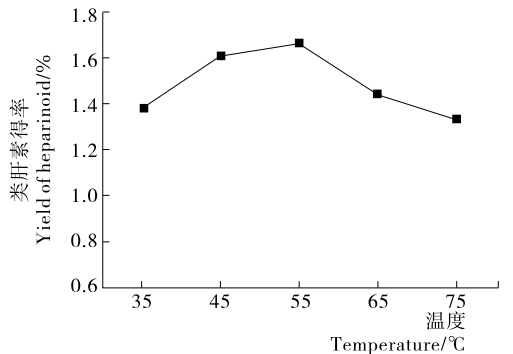


图7 温度对提取率的影响

Figure 7 Effect of temperature on extraction yield

随后温度越高得率越低。增加温度可以提高酶解反应速率;但温度太高又会减低酶活性,也会影响类肝素的结构和活性。故选取55℃为响应曲面设计中酶解温度的0水平。

2.3.6 酶解时间对类肝素得率的影响 如图8所示,随着时间的延长,类肝素得率逐渐上升,而后又出现下降的趋势。在反应的初级阶段,随着酶解时间的延长,得率快速上升,到20h时达到最大值,随后又迅速下降。相同条件下,酶解时间过长会导致类肝素结构发生变化,甚至降解,从而降低了得率。故选取20h为响应曲面设计中酶解时间的0水平。

## 2.4 响应曲面试验

2.4.1 试验设计与结果 根据以上单因素试验结果,选取加酶量、酶解时间和酶解温度为影响因子,类肝素得率为响应值,采用Box-Behnken模型进行鱼鳔类肝素提取的响应面试验。试验因素水平见表2,结果见表3。

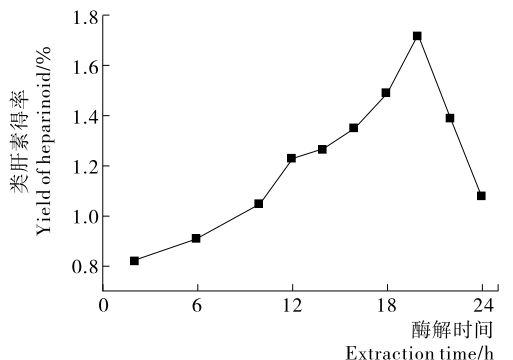


图8 酶解时间对提取率的影响

Figure 8 Effect of extraction time on yield

表 2 Box-Behnken 试验因素及水平表

Table 2 Factors and levels in response surface design

水平	A 酶用量/(mg·mL <sup>-1</sup> )	B 酶解温度/°C	C 酶解时间/h
-1	3.0	45	16
0	5.0	55	20
1	7.0	65	24

表 3 响应面试验分析方案及试验结果

Table 3 Response surface design arrangement and experimental results

试验序号	A	B	C	类肝素得率/%
1	-1	1	0	1.18
2	1	1	0	1.56
3	-1	-1	0	0.48
4	1	-1	0	0.73
5	-1	0	-1	0.82
6	1	0	-1	1.16
7	-1	0	1	0.88
8	1	0	1	1.10
9	0	-1	-1	1.33
10	0	1	-1	0.76
11	0	-1	1	1.51
12	0	1	1	0.63
13	0	0	0	1.71
14	0	0	0	1.74
15	0	0	0	1.75
16	0	0	0	1.76
17	0	0	0	1.72

2.4.2 二次回归方程和方差分析 通过软件 Design-Expert 8.0.6.1 对各因素进行多元回归拟合,得到的二次回归方程为:

$$Y = -20.87162 + 12.5875A + 0.38418B + 0.97187C - 0.01625AB - 0.0375AC - 0.0019375BC - 10.2A^2 - 0.34B^2 - 0.34C^2 \quad (2)$$

对试验数据进行方差分析,结果见表 4。根据  $F$  值和  $P$  值可得出,3 个因素对鱼鳔类肝素得率的影响为  $B > A > C$ ,其中  $A$  和  $B$  为极显著因素, $C$  为不显著因素; $AB$  和  $AC$  交互作用显著, $BC$  交互作用极显著 ( $P < 0.01$ );方程二次项中  $A^2$ 、 $B^2$  和  $C^2$  的系数都为负值,且  $P$  值都小于 0.000 1,说明各因素对类肝素得率的影响为抛物线关系,且抛物面开口向下,有极大值点。

表 4 所示,回归模型  $P < 0.000 1$ ,即模型极显著;失拟项  $P = 0.380 3 > 0.05$ ,不显著,说明该二次回归方程有效。该回归方程的相关系数  $R^2 = 0.998 9$ ,校正决定系数  $R^2_{Adj} = 0.997 5$ ;变异系数为  $1.08\% < 10\%$ ;精密密度为  $72.714 > 4$ ;说明试验的重复性较好,方程拟合度较高。因此,利用该模型来优化鱼鳔类肝素的提取工艺是可行的。

表 4 HSB 提取参数 ANOVA 分析结果<sup>†</sup>

Table 4 ANOVA of the constructed regression model of glycosaminoglycan sample

方差来源	平方和	自由度	方差	$F$ 值	$P$ 值	显著性
模型	3.180 0	9	0.350 0	718.76	<0.000 1	**
A	0.180 0	1	0.180 0	359.68	<0.000 1	**
B	1.110 0	1	1.110 0	2 255.54	<0.000 1	**
C	0.000 3	1	0.000 3	0.63	0.451 7	
AB	0.004 2	1	0.004 2	8.58	0.022 0	*
AC	0.003 6	1	0.003 6	7.31	0.030 4	*
BC	0.024 0	1	0.024 0	48.82	0.000 2	**
$A^2$	0.700 0	1	0.700 0	1 424.18	<0.000 1	**
$B^2$	0.490 0	1	0.490 0	991.93	<0.000 1	**
$C^2$	0.480 0	1	0.480 0	977.41	<0.000 1	**
残差	0.003 4	7	0.000 5			
失拟项	0.001 7	3	0.000 6	1.34	0.380 3	
绝对误差	0.001 7	4	0.000 4			
总离差	3.190 0	16				

<sup>†</sup> \*\*  $P < 0.01$  为极显著; \*  $P < 0.05$  为差异显著。

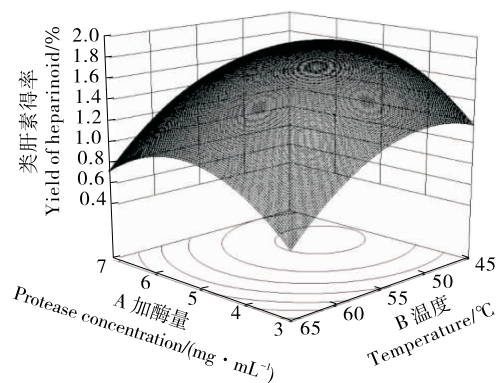
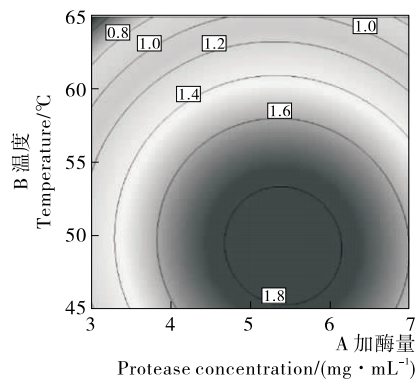
2.4.3 响应曲面和等高线分析 各交互因素的响应曲面图和等高线图见图 9。图 9 中,加酶量和酶解温度交互作用、加酶量和酶解时间交互作用的等高线图呈椭圆形、响应曲面比较偏平,说明交互作用显著;酶解温度和酶解时间交互作用的等高线图呈扁长椭圆形且响应曲面较陡直,说明交互作用更显著。该结论与以上方差分析得出的结果一致。加酶量与酶解温度和酶解时间的交互作用相比较弱可能是因为试验设计所选取酶解温度的最低水平(45 °C)在蛋白酶最适温度内;且酶解时间最低水平为 16 h,相对于前人<sup>[3]</sup>所用的酶解时间来说较长。而酶解温度和酶解时间交互作用是极显著的。因为当加酶量一定时,提高温度就可以相应地缩短提取时间;降低温度一方面可以减少对所提取化合物结构和活性的破坏,另一方面又延长了酶解时间,降低了提取效率。

2.4.4 验证实验 通过响应曲面分析得到鱼鳔类肝素最佳提取条件为:2709 碱性蛋白酶添加量 5.40 mg/mL,温度 49.67 °C,时间 20.00 h。此条件下,鱼鳔类肝素得率的预测值为 1.85%。考虑到实际操作的可行性,将提取工艺修整为:2709 碱性蛋白酶添加量 5.4 mg/mL,温度 50 °C,时间 20 h,在该条件下类肝素得率为  $(1.79 \pm 0.05)\%$ ,与预测值相差 3.24%,进一步说明该模型可行。

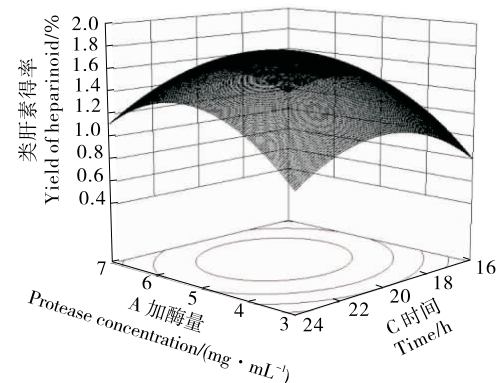
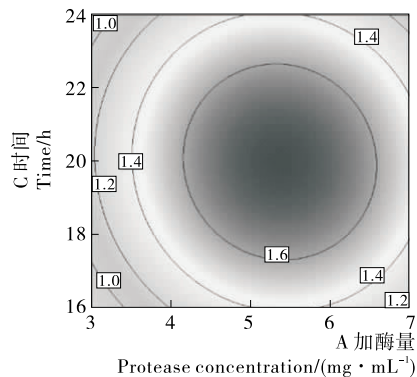
## 2.5 HSB 组成成分

采用 1.2.1 所示工艺提取的鲈鱼鳔类肝素的基本理化指标见表 5。HSB 中类肝素含量较高,为  $(86.35 \pm 1.21)\%$ ;而肝素效价较低,为  $(4.94 \pm 0.33)$  U/mg。文献报道的类肝素效价普遍偏低,Arumugam<sup>[21]</sup>用一种海螺(*Turritella attenuata*)提取类肝素,其效价是 16 U/mg;Balamurugan 等<sup>[22]</sup>从乐谱芋螺(*Conus musicus*)提取的类肝素效价为 12 U/mg;而从肝素钠下脚料提取的类肝素效价则较高,为 30 ~ 50 U/mg<sup>[23-24]</sup>。

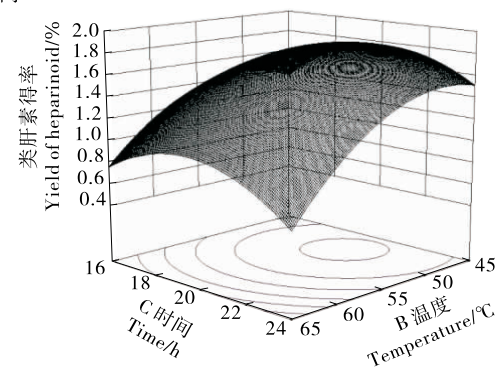
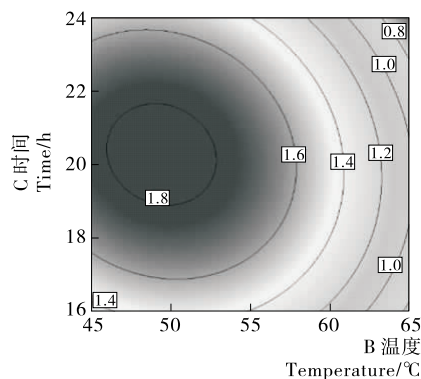




(a) 加酶量与提取温度



(b) 加酶量与提取时间



(c) 提取温度与提取时间

图9 各因素交互作用对HSB得率影响的等高线图和响应面图

Figure 9 Response surface and contour plots showing the interaction effects of factors on the extraction yield of HSB

表5 HSB组成成分

Table 5 The main chemical composition of HSB

类肝素/%	肝素效价/(U · mg <sup>-1</sup> )	蛋白质/%	糖醛酸/%	己糖胺/%	硫酸基/%
86.35 ± 1.21	4.94 ± 0.33	1.19 ± 0.03	29.64 ± 0.18	33.58 ± 1.49	17.71 ± 0.90

从表5可知,HSB的蛋白质含量较低,说明该提取方法能较好地将类肝素与蛋白质、多肽等分离开来。HSB的糖醛酸和己糖胺含量相近,这符合类肝素的结构特征。HSB的硫酸基含量较高,为(17.71 ± 0.90)%。据报道<sup>[25]</sup>多糖的硫酸基含量与活性密切相关,一定范围内硫酸基的含量越高,生物活性越强。Gloria等<sup>[26]</sup>的研究也发现硫酸化的卡拉胶抗凝血活性提高了30倍;有学者<sup>[27]</sup>用海螵蛸壳提取类肝素的硫酸基含量为(23.00 ± 0.03)%,并具有较强的抗凝血和抗细胞增殖作用。而HSB是否也具有较高的生物活性有待

进一步研究。

### 2.6 体外抗凝血活性

鱼鳔类肝素的体外抗凝血三项指标见图10。PT、APTT和TT3个指标分别反映外源性凝血系统、内源性凝血系统和共同凝血途径。由图10可知,HSB的APTT和TT值随着样品浓度的上升缓慢提高;而PT值在该样品浓度范围内变化不大,保持在16~19s,与阴性对照(生理盐水)的无显著差异。HSB浓度在1~10mg/mL时,浓度与APTT时间存在正相关性;此后,APTT时间随着浓度的提

高无明显上升,保持在 48 s 左右;阳性对照(0.01 mg/mL 肝素钠)的 APTT 值为 40 s。同样,HSB 浓度在 1~8 mg/mL 时,浓度与 TT 时间存在正相关性;此后,TT 值随着浓度的提高无明显上升,稳定在 58 s 左右;而阳性对照(0.01 mg/mL 肝素钠)的 TT 值为 71 s。由此看出,与肝素相比,HSB 抗凝血活性较弱,并通过外源性凝血途径和共同凝血途径发挥作用。

此,可以进一步发掘 HSB 的生物活性,将其开发成低副作用的药品或保健品。

### 3 结论

本研究从多种鱼鳔中选取鲈鱼鳔作为原料提取类肝素,并通过响应曲面对其提取工艺进行优化,得到最佳提取工艺条件为:2709 碱性蛋白酶添加量 5.4 mg/mL,温度 50 °C,时间 20 h,此时鱼鳔类肝素得率是(1.79±0.05)%。该提取物为白色粉末,类肝素含量为(85.25±0.63)%。抗凝血活性测定结果显示,HSB 的抗凝血作用较肝素钠缓和,利于开发和利用其他功能活性。今后将进一步分析鱼鳔类肝素结构特征和探究其他生物活性,以期鱼鳔的高值化利用提供一定的理论依据。

### 参考文献

- [1] 杜同仿, 全世建. 海鲜海产食法便典[M]. 广州: 广东科技出版社, 2008: 121-123.
- [2] PAL G K, NIDHEESH T, GOVINDARAJU K, et al. Enzymatic extraction and characterisation of a thermostable collagen from swim bladder of rohu (*Labeo rohita*) [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 97(5): 1 451-1 458.
- [3] 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 160-166.
- [4] PAL G K, SURESH P V. Physico-chemical characteristics and fibril-forming capacity of carp swim bladder collagens and exploration of their potential bioactive peptides by in silico approaches[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 101(1): 204-205.
- [5] SUO Hua-yi, SONG Jia-le, ZHOU Ya-lin, et al. Induction of apoptosis in HCT-116 colon cancer cells by polysaccharide of *Larimichthys crocea* swim bladder [J]. Oncology Letters, 2015, 9(2): 972-978.
- [6] CHEN Lian-hong, SONG Jia-le, QIAN Yu, et al. Increased preventive effect on colon carcinogenesis by use of resistant starch (RS3) as the carrier for polysaccharide of *larimichthys crocea* swimming bladder [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(1): 17-29.
- [7] JIANG Xian-hong, ZHAO Xin, LUO Hua-li, et al. Therapeutic effect of polysaccharide of large yellow croaker swim bladder on lupus nephritis of mice [J]. Nutrients, 2014, 6(3): 1 223-1 235.
- [8] 凌沛学, 何兆雄, 姬胜利. 肝素[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2015.
- [9] CHAVANTE S F, BRITO A S, LIMA M, et al. A heparin-like glycosaminoglycan from shrimp containing high levels of 3-O-sulfated D-glucosamine groups in an unusual trisaccharide sequence [J]. Carbohydrate Research, 2014, 390(1): 59.
- [10] 吴丽娟, 赵峡, 王伟. 几种海洋类肝素多糖的制备及抗乙肝病毒活性初步研究[J]. 中国海洋药物, 2016, 35(6): 31-37.
- [11] DREYFUSS J L, REGATIERI C V, LIMA M A, et al. A heparin mimetic isolated from a marine shrimp suppresses neovascularization [J]. Journal of Thrombosis & Haemostasis, 2010, 8(8): 1 828-1 837.

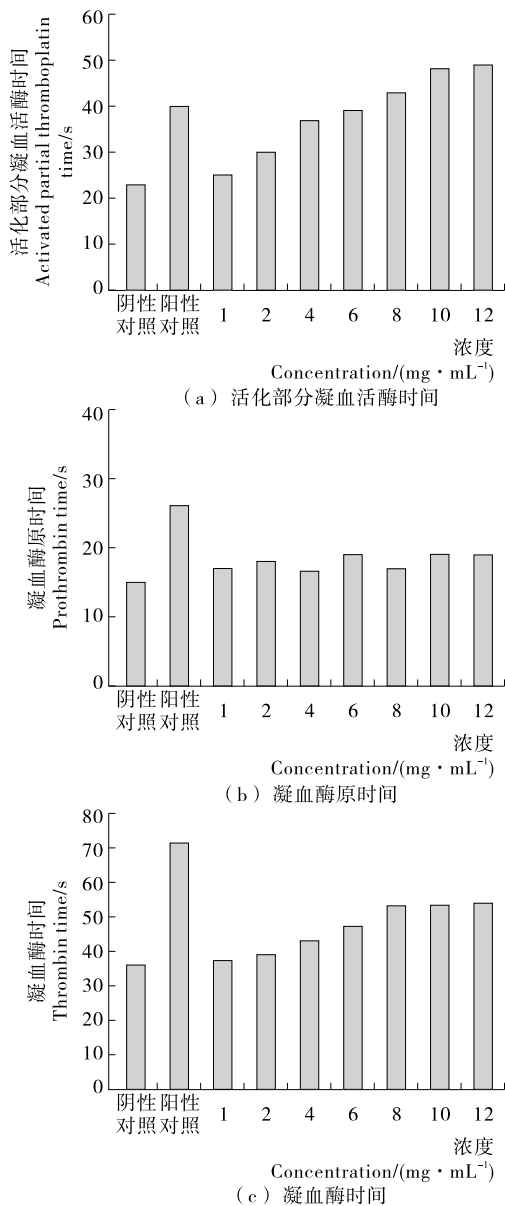


图 10 HSB 抗凝血三项指标

Figure 10 Three indexes of anticoagulant activity of HSB

低抗凝活性的类肝素副作用较小,适合开发其非抗凝活性。如 Giulianna 等<sup>[28]</sup>从海蟹(*Goniopsis cruentata*)中提取一种类肝素,其抗凝活性低,且无出血副作用。Joyce 等<sup>[29]</sup>研究发现,低抗凝肝素比未分级肝素更安全,且有望成为治疗急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征替代药物;有学者<sup>[11-12]</sup>从凡纳滨对虾分离出低抗凝的类肝素化合物,并发现其抗血管生成和抗炎活性较强,且出血性作用不明显。因

(下转第 219 页)

回收率平均值为 47.1%;优化后,设备稳定运行的烟丝回收率平均值提升为 56.1%,同时整丝回收率基本不变,设备运转稳定。长期稳定运行的烟丝平均回收率低于短期试验中最佳结果,说明长期运行工况更为复杂,可能仍有其他影响因素需要综合考察,该工艺过程优化仍存在进一步改进的空间。

### 3 结论

本研究通过响应曲面试验设计对 S400 残烟回收工艺进行了优化,研究了主要工艺参数的影响,充分考虑各因素之间的交互作用,结果表明:① 在考察工艺条件范围内,蒸汽压力对烟丝回收率的影响不显著;② 通过响应变量优化器优化得到的主要工艺参数的优化组合为:带输送机频率 25 Hz, I 级风机频率 53.4 Hz, II 级风机频率 35 Hz;③ 应用优化工艺参数后残烟机稳定运行的烟丝回收率显著改善,由 47.1% 提高到 56.1%。上述研究结果对残烟处理机 S400 的工艺优化提供了重要依据,利于进一步改进卷烟加工过程,促进企业降本增效。但应用优化参数后的烟丝回收率略低于理论预测值,说明该工艺过程优化可能仍存在进一步改进的空间。

#### 参考文献

[1] 马小明. MS-2 型残烟处理机[J]. 烟草科技, 1995(6): 23-25.  
[2] 王慧, 丘琪, 华一昆, 等. TR400 型残次烟支处理机的工艺改

进[J]. 烟草科技, 2001(7): 10-11.

[3] 罗光志. 水湿残烟处理机: 中国, 92226995.5[P]. 1993-05-05.  
[4] 黄毅华. HYT4 型残次烟处理生产线[J]. 轻工机械, 1992(1): 57-58.  
[5] 贾玉鑫, 贾磊. 膨胀式残烟处理机的改进与提高[C]// 烟草机械学术研讨会征集论文汇编: 下册. 北京: 中国烟草学会, 2006: 897-899.  
[6] 宋国华. 一种新型的残烟处理工艺与设备[J]. 烟草科技, 1991(6): 8-9.  
[7] 冯石柱, 盛守义. 高温蒸汽膨胀式处理残烟的尝试[J]. 烟草科技, 1995(2): 6-7.  
[8] 王宏明, 周雁麓. 一种新型的残次烟支纸丝分离装置[J]. 机械设计, 2000(1): 42-43.  
[9] 刘莉莉. 新型残次烟支处理机的研制[J]. 轻工机械, 2003(2): 73-75.  
[10] 娄琦, 李爱景. 降低 FY1115 残烟处理机纸中含丝率[J]. 山东工业技术, 2017, 18(23): 28.  
[11] 张昌柱. S200 型残烟处理机除尘系统的改进[J]. 中国设备工程, 2007(1): 70-72.  
[12] 蔡培良, 李明, 杨剑锋, 等. PROTOS-M5 型卷接机组残烟自动回收分类装置的设计[J]. 烟草科技, 2017, 50(4): 88-92.  
[13] 陈平. 气吹式残烟支烟丝回收机的设计研究[J]. 机械工程师, 2013(8): 38-39.  
[14] 王汉岭. 提高 S200 型废烟回收机回收细长烟支残烟效率[J]. 工业技术, 2012(11): 100-101.

(上接第 157 页)

[12] BRITO A S, ARIMATÉIA D S, SOUZA L R, et al. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16(21): 9 588-9 595.  
[13] ALVES M G D C F, NOBRE L T D B, MOURA G E D D D, et al. Effects of heparinoids from algae on hemostasis and their action on the cycle cell[J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2012, 2(3): 163-168.  
[14] 熊双丽, 金征宇. 硫酸化糖胺聚糖的简易分光光度测定法[J]. 光谱实验室, 2005, 22(6): 1 294-1 297.  
[15] 孙诗清, 孙永军, 张儒. 生物分离实验技术[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 2017: 13.  
[16] 张晓娟, 熊双丽, 周涛. 肝素钠效价测定方法的筛选[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 66-69.  
[17] BITTER T, MUIR H M, 陈祥娥. 一种改进的糖醛酸咪唑反应[J]. 食品与药品, 2010, 12(3): 147-149.  
[18] WAGNER W D. Amore sensitive assay discriminatinggalactosamine and glucosamine in mixture[J]. Analytical Biochemistry, 1979, 94(2): 394-396.  
[19] DODGSON K S, PRICE R G. A note on the determination of the estersulphate content of sulphated polysaccharides[J]. Biochemical Journal, 1962, 84(1): 106.  
[20] 上官新晨, 吴少福, 蒋艳, 等. 不同浓度中性盐、醇溶液对籽粒菟蛋白质溶解度影响研究[J]. 江西农业大学学报, 2000, 22(5): 76-78.  
[21] ARUMUGAM M, SHANMUGAM A. Extraction of heparin and heparin-like substance from marine mesogastropod mollusc

Turritella attenuata (Lamarck, 1779)[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2004, 42(5): 529.

[22] BALAMURUGAN K, NAGAR A. Isolation and Identification of Heparin like Substances from the body Tissue of Conus musculus[J]. International Journal of Pharmtech Research, 2009, 1(4): 1 650-1 653.  
[23] 河北常山生化药业股份有限公司. 肝素钠下脚料制备类肝素工艺: 中国, 201610598231.6[P]. 2016-11-23.  
[24] 杭州惠顺生物科技有限公司. 一种从肝素副产物废蛋白中分离类肝素的方法: 中国, 201510394022.5[P]. 2015-11-11.  
[25] OPOKU G, QIU Xiang-dong, DOCTOR V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of kappa carrageenan[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 65(2): 134-138.  
[26] 文丹丹. 岩藻糖化硫酸软骨素抗凝作用机制及构效关系研究[D]. 广州: 中山大学, 2012: 23-26.  
[27] SAYARI N, BALTI R, MANSOUR M B, et al. Anticoagulant properties and cytotoxic effect against HCT116 human colon cell line of sulfated glycosaminoglycans isolated from the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) shell[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 80: 322-330.  
[28] ANDRADE G P, LIMA M A, DE SOUZA JUNIOR A A, et al. A heparin-like compound isolated from a marine crab rich in glucuronic acid 2-O-sulfate presents low anticoagulant activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 94(1): 647-654.  
[29] GONZALES J N, KIM K, ZEMSKOVA M A, et al. Low anti-coagulant heparin blocks thrombin-induced endothelial permeability in a PAR-dependent manner[J]. Vascular Pharmacology, 2014, 62(2): 63.