

超声辅助复合酶法提取长茎葡萄蕨藻藻渣多糖及其降脂功能

刘忠群¹, 谢晓岑¹, 罗晶晶¹, 谢曦¹, 彭宏², 王蓉¹, 宋彦廷¹, 胡文婷^{1*}

(1. 海南大学药学院, 热带生物资源教育部重点实验室, 海南海口 570228)

(2. 海南多萄纤生物科技有限公司, 海南文昌 571333)

摘要: 该研究探讨了优化超声波辅助复合酶法从长茎葡萄蕨藻藻渣中提取多糖的工艺条件, 并探究其降脂功能。以长茎葡萄蕨藻藻渣为原料, 在单因素试验的基础上, 利用响应面法优化提取多糖的最佳参数; 通过与胆酸盐的结合能力在体外评价长茎葡萄蕨藻藻渣多糖降脂作用; 采用高脂饮食诱导小鼠建立高脂血症模型, 以长茎葡萄蕨藻藻渣多糖灌胃干预, 4周后评价其体内降脂效果。长茎葡萄蕨藻藻渣多糖的最佳提取条件为复合酶(中性蛋白酶:木聚糖酶:纤维素酶=1:1:1)质量分数2.5%, 酶解温度48℃, 酶解时间123 min, 多糖得率可达36.62%, 质量分数为87.20%。长茎葡萄蕨藻藻渣多糖(10 mg/mL)与胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠和甘氨酸胆酸钠结合率分别为86.56%、89.47%、84.26%和64.68%。与模型组比较, 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖(200、400 mg/kg)显著减轻小鼠体质量(11.29%、15.38%), 降低脂肪系数(4.07%、3.18%)及血清中TG(59.87%、68.42%)、TC(28.24%、39.08%)和LDL-C(34.93%、49.28%)水平, 提高HDL-C(52.67%、99.00%)水平。优化得到的超声波辅助复合酶法提取长茎葡萄蕨藻藻渣多糖的条件合理可靠, 所得多糖有较强的结合胆酸盐能力, 对高脂饮食诱导的高血脂症具有预防作用。

关键词: 长茎葡萄蕨藻; 藻渣; 多糖; 胆酸盐; 降脂

文章编号: 1673-9078(2024)11-97-106

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1209

Ultrasound-assisted Enzymatic Extraction of Polysaccharides from Algal Residue of *Caulerpa lentillifera* and Analysis of Their Lipid-lowering Effects

LIU Zhongqun¹, XIE Xiaocen¹, LUO Jingjing¹, XIE Xi¹, PENG Hong², WANG Rong¹, SONG Yanting¹, HU Wenting^{1*}

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources and Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China) (2. Hainan Duo Tao Xian Biotechnology Co. Ltd., Wenchang 571333, China)

Abstract: The optimal conditions for ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the algal residue of *Caulerpa lentillifera* were determined and the lipid-lowering effects of the extracted polysaccharides were

引文格式:

刘忠群, 谢晓岑, 罗晶晶, 等. 超声辅助复合酶法提取长茎葡萄蕨藻藻渣多糖及其降脂功能[J]. 现代食品科技, 2024, 40(11): 97-106.

LIU Zhongqun, XIE Xiaocen, LUO Jingjing, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from algal residue of *Caulerpa lentillifera* and analysis of their lipid-lowering effects [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 97-106.

收稿日期: 2023-10-10

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目(322RCS90); 国家自然科学基金青年基金项目(31902418); 海南省自然科学基金面上项目(821MS027)

作者简介: 刘忠群(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物资源开发利用, E-mail: 2250365621@qq.com

通讯作者: 胡文婷(1981-), 女, 博士, 正高级实验师, 研究方向: 海洋生物资源开发利用, E-mail: huwt_0@hainanu.edu.cn

investigated. Single-factor experiments and the response surface methodology were used to optimize the extraction parameters. The *in vitro* lipid-lowering effects of the extracted polysaccharides were evaluated on the basis of their ability to bind with bile acids. Additionally, mice were fed a high-fat diet to induce hyperlipidemia and then administered the extracted polysaccharides via oral gavage for 4 weeks. The optimal conditions for the ultrasound-assisted enzymatic extraction process were an enzyme mass fraction of 2.5% (neutral protease:xylanase:cellulase=1:1:1), an extraction temperature of 48 °C, and an extraction time of 123 min. Under these conditions, the polysaccharide yield was 36.62% and the mass fraction was 87.20%. The binding rates of the extracted polysaccharides with cholic, deoxycholic, taurocholic, and glycocholic acids were 86.56%, 89.47%, 84.26%, and 64.68%, respectively. Compared with the hyperlipidemic mice, the mice treated with 200 or 400 mg/kg of the extracted polysaccharides exhibited significant decreases in body weight (11.29% and 15.38%, respectively), fat indices (4.07% and 3.18%), serum triglyceride levels (59.87% and 68.42%), total cholesterol (28.24% and 39.08%), and low-density lipoprotein-cholesterol (34.93% and 49.28%), as well as significant increases in high-density lipoprotein-cholesterol levels (52.67% and 99.00%). In conclusion, the optimized conditions for the ultrasound-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera* were reasonable and reliable, and the extracted polysaccharides showed good bile acid-binding abilities *in vitro* as well as hyperlipidemia-ameliorating effects in model mice fed a high-fat diet.

Key words: *Caulerpa lentillifera*; algal residue; polysaccharides; bile acids; lipid-lowering effect

长期摄入高热量饮食不仅引发肥胖问题,而且引起机体脂代谢紊乱,是高脂血症的主要发病因素之一^[1]。高脂血症是一种慢性代谢性疾病,表现为血液中脂蛋白代谢异常,能够增加脂肪肝、动脉粥样硬化和心脑血管等疾病发生的风险^[2,3]。对饮食造成的肥胖并发高脂血症的治疗主要包括生活方式干预和药物治疗两方面。然而,目前临床用于降脂的药物主要为化学合成药物,长期服用此类药物容易产生依赖性,可引起肝损伤、肌肉疼痛、胃肠道不适,严重时甚至出现横纹肌溶解等副作用^[4,5]。因此,从天然产物中开发副作用小、有效降脂的活性成分对预防或治疗此类疾病具有重要意义。

长茎葡萄蕨藻(*Caulerpa lentillifera*)俗称“海葡萄”,是蕨藻科(Caulerpaceae)、蕨藻属(*Caulerpa*)中一种可食用大型海藻^[6]。长茎葡萄蕨藻作为高价值的藻类养殖新品种,含有丰富的多糖、蛋白质、膳食纤维、酚类、不饱和脂肪酸、维生素及矿物质^[7,8]。目前长茎葡萄蕨藻的加工应用主要为保健食品和化妆品领域,生产中往往产生大量的藻渣,但是由于没有有效的利用方法,造成资源的严重浪费^[9,10]。研究表明,从藻渣中获得活性物质,不仅可以提高藻渣资源的利用度,减少环境污染,而且增加藻类高价值应用的潜力。多糖作为长茎葡萄蕨藻中主要活性物质之一,具有免疫调节、降糖、抗炎和抗氧化等活性功能^[11-13]。从石莼、海带、多肋藻和雨生红球藻等藻类的藻渣中获得的多糖类活性成分不仅具有抗氧化性、增强免疫、调节血脂等功能,而且生物相容性优异^[14-17]。长茎葡萄蕨藻藻渣中富含多糖

成分,极具开发价值,然而还未见对其提取利用的相关研究报道。根据藻类结构特点,复合酶法提取多糖将相应的生物酶混合使用,能有效降解细胞壁结构、改变细胞膜通透性并水解细胞膜表面附着的蛋白质,有利于多糖从细胞内溶出,具有提取条件温和、低耗能、提取效率高等特点^[18]。超声波辅助提取法通过空化效应和机械作用破坏细胞壁结构,与酶法相结合可起到互相促进的作用,进一步提高多糖得率^[19]。

本研究以长茎葡萄蕨藻藻渣为研究对象,利用复合酶间的协同作用,结合超声波辅助技术,以单因素试验和响应面法优化多糖的提取工艺,进而考察长茎葡萄蕨藻藻渣多糖与胆酸盐的结合能力,并探讨其对高脂血症小鼠的降脂作用,为提高长茎葡萄蕨藻的资源利用效率,开发成为降脂功能食品或药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级昆明种小白鼠,4周龄,雄性,体质量20~22 g,购自于长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号SCXK(湘)2022-0011。在特定的无病原体条件下,饲养于12 h光/12 h暗周期、(24±2)°C温度和55%~60%湿度的环境中。

1.2 主要试剂与仪器

长茎葡萄蕨藻藻渣,海南多萄纤生物科技有限

公司提供; SPF 级实验动物饲料, 广东省医学实验动物中心; 40% 高脂实验饲料, 上海普路腾生物科技有限公司; 葡萄糖、无水乙醇、三氯甲烷、正丁醇、浓硫酸(分析纯), 西陇科学股份有限公司; 纤维素酶(400 U/mg)、中性蛋白酶(800 U/mg)、果胶酶(500 U/mg)、木聚糖酶(食品级)、蒽酮, 上海源叶生物科技有限公司; 甘油三酯(TG)试剂盒、总胆固醇(TC)试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒: 南京建成生物工程研究所。

Centrifuge 5430R 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; U-3900 型紫外分光光度计, 日本日立; 1135P 电子天平, 北京赛多利天平有限公司; EPOCH12 型酶标仪, 美国 BiotekIntruments 公司; HH-2 恒温水浴锅, 江苏科析仪器有限公司; XGQ-2000 电热恒温培养箱: 浙江力辰仪器科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 长茎葡萄蕨藻渣多糖制备工艺流程

长茎葡萄蕨藻渣由新鲜长茎葡萄蕨藻经打浆、提取、压滤获得。将长茎葡萄蕨藻渣 45 °C 烘干, 研磨过 50 目筛, 粉末 -20 °C 保存。以超纯水为溶剂, 固定料液比 1:40 (g/mL), 超声功率 100 W, 以适宜温度、时间和酶用量超声处理 40 min, 100 °C 灭酶 10 min。6 500 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 蒸发浓缩, 加入 3 倍体积无水乙醇, 4 °C 静置过夜, 6 500 r/min 离心 15 min, 沉淀以超纯水复溶, 3 500 Da 透析袋进行透析, 旋转蒸发浓缩, 冻干, 即得长茎葡萄蕨藻渣粗多糖, -80 °C 保存备用。

1.3.2 长茎葡萄蕨藻渣多糖含量测定

参照文献^[20]采用蒽酮-硫酸法, 以葡萄糖为标准品制作标准曲线。以葡萄糖质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得线性方程 $y=11.164x-0.0192(R^2=0.9932)$ 。取同体积多糖溶液, 在 620 nm 处同法显色后测定吸光度, 代入方程即可得多糖质量浓度。长茎葡萄蕨藻渣多糖得率按公式(1)计算。

$$Y=\frac{C \times V \times N}{m} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y ——长茎葡萄蕨藻渣多糖得率, %;

C ——样品稀释液中多糖质量浓度, g/mL;

V ——样品测定液体积, mL;

N ——稀释倍数;

m ——长茎葡萄蕨藻渣粉末质量, g。

1.3.3 单因素试验设计

1.3.3.1 不同复合酶用量对多糖得率的影响

将酶质量分数设置为 0.6%、1.2%、1.8%、2.4%、3.0%, 在酶解温度 50 °C、酶解时间 120 min、超声功率 100 W、料液比 1:40 (g/mL)、超声辅助时间 40 min 的条件下提取长茎葡萄蕨藻渣多糖。

1.3.3.2 不同酶解温度对多糖得率的影响

将酶解温度设置为 25、35、45、55、65、75 °C, 在酶质量分数 2.4%、酶解时间 120 min、超声功率为 100 W、料液比 1:40 (g/mL)、超声辅助时间 40 min 的条件下提取长茎葡萄蕨藻渣多糖。

1.3.3.3 不同酶解时间对多糖得率的影响

将酶解时间设置为 30、60、90、120、150 min, 在酶质量分数 2.4%、酶解温度 45 °C、固定超声功率 100 W、料液比为 1:40 (g/mL)、超声辅助时间 40 min 的条件下提取长茎葡萄蕨藻渣多糖。

1.3.4 响应面试验设计

基于单因素试验结果, 确定各因素自变量范围并对其进行编码, 以长茎葡萄蕨藻渣多糖得率为响应值, 采用 Design Expert Version 13 软件进行 Box-Behnken 中心组合试验设计并分析。

1.3.5 结合胆酸盐能力测定

参考纪慧杰等^[21]的方法制作不同胆酸盐标准曲线: 量取 2 mL 不同浓度胆酸盐溶液, 加入体积分数为 60% 的浓硫酸 6 mL, 70 °C 水浴 20 min, 冷却至室温。在 387 nm 处测定吸光度。横坐标为胆酸盐浓度, 纵坐标为吸光度, 得线性方程: 脱氧胆酸钠线性方程 $y_1=1.7453x_1+0.1364(R^2=0.9966)$; 胆酸钠线性方程 $y_2=0.6853x_2+0.3316(R^2=0.9946)$; 牛磺胆酸钠线性方程 $y_3=0.4947x_3+0.3694(R^2=0.9927)$; 甘氨酸线性方程 $y_4=0.6154x_4+0.428(R^2=0.9957)$ 。

结合胆酸盐的试验方法参考 Li 等^[22]的方法: 取 1 mL 不同质量浓度多糖溶液, 加 1 mL 浓度为 0.01 mol/L HCl 溶液和 3 mL 质量浓度为 10 mg/mL 胃蛋白酶溶液, 在 37 °C 恒温摇床中充分震荡 1 h。以 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调节溶液 pH 值至 6.3 后, 加入 10 mg/mL 的脂肪酶 4 mL (由 pH 值 6.3, 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液配制), 在 37 °C 恒温摇床中震荡 1 h。在每个样品中分别加入 4 mL 浓度为 0.5 mmol/L 的胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸钠和脱氧胆酸钠 (用 pH 值 6.3 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液配制), 继续震荡

20 min 后, 4 000 r/min 离心 20 min。取 2 mL 上清, 加 6 mL 60% 浓硫酸, 70 ℃ 水浴 20 min, 冷却至室温, 387 nm 处测定吸光度, 通过标准曲线计算上清液胆酸盐剩余量, 按公式 (2) 计算胆酸盐结合率。

$$D = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D ——胆酸盐结合率, %;

m_1 ——胆酸盐加入量, mmol;

m_2 ——胆酸盐剩余量, mmol。

1.3.6 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖对小鼠体质量和血脂的影响

1.3.6.1 小鼠高血脂模型动物分组及造模给药

30 只健康的雄性昆明种小白鼠, 经过 7 d 的适应性饲养后随机分为正常对照组、模型组、长茎葡萄蕨藻藻渣多糖低剂量组 (200 mg/kg)、长茎葡萄蕨藻藻渣多糖高剂量组 (400 mg/kg), 阳性药物非诺贝特组 (40 mg/kg), 每组 6 只。试验阶段正常对照组连续给予基础饲料, 模型组和给药组连续饲喂高脂饲料, 同时给药组灌胃给予相应药物, 正常对照组、模型组灌胃等体积的生理盐水。各试验组灌胃 1 次/d, 连续 4 周, 每周称重体质量并记录。

1.3.6.2 试验动物取材

实验周期结束后, 各试验组小鼠禁食 12 h, 摘眼球取血, 静置 30 min, 4 ℃, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清 -20 ℃ 保存备用。颈椎脱臼后剥离附睾周围脂肪称重并记录。

1.3.6.3 脂肪系数检测

根据小鼠体质量及脂肪质量, 按照公式 (3) 计算脂肪系数。

$$F = \frac{m_3}{m_4} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

F ——脂肪系数, %;

m_3 ——脂肪质量, g;

m_4 ——小鼠体质量, g。

1.3.6.4 血清中生化指标测定

将准备好的血清样品按照试剂盒说明书操作, 测定 TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 含量。

1.4 数据统计与分析

试验数据采用 GraphPadPrism 9.5 统计软件处理, 以均值 ± 标准差表示, 利用 t 检验进行比较分析, $P < 0.05$ 为具有显著性意义。

2 结果与讨论

2.1 酶种类筛选

纤维素酶、果胶酶和木聚糖酶可消化藻类的细胞壁, 同时充分保留多糖的结构和活性。藻类的中蛋白含量丰富, 蛋白酶可水解糖蛋白中的蛋白质, 改变细胞膜通透性, 增加多糖的溶出^[23]。分别考察了纤维素酶、果胶酶、木聚糖酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和复合酶 (中性蛋白酶: 木聚糖酶: 纤维素酶 = 1:1:1) 对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的影响。使用单酶进行酶解时, 中性蛋白酶对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的影响最高, 其次为木聚糖酶和纤维素酶。长茎葡萄蕨藻藻渣主要由纤维素物质构成, 其中含有较多的木聚糖成分。刘倩等^[24]通过碱提法对长茎葡萄蕨藻、紫菜、南极冰笋、红皮藻、海带、石莼、浒苔和羊栖菜进行提取, 发现长茎葡萄蕨藻中 β -1,3- 木聚糖含量远高于其他经济藻类。将木聚糖酶、中性蛋白酶和纤维素酶组合成复合酶后, 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖的得率显著高于三种单酶作用效果。Zhang 等^[25]研究了复合酶法超声波提取紫苏籽粕水溶性多糖的工艺优化, 表明使用木瓜蛋白酶、纤维素酶和果胶酶的单酶提取效果低于其组成的复合酶; 从香菇残渣中提取多糖的工艺研究表明, 用纤维素酶、木聚糖酶、 β - 葡聚糖酶组成的复合酶作用效果优于单酶作用效果^[26]。利用复合酶中多酶之间的协同作用能高效获得长茎葡萄蕨藻藻渣中的多糖成分。因此, 选择复合酶提取长茎葡萄蕨藻藻渣多糖。

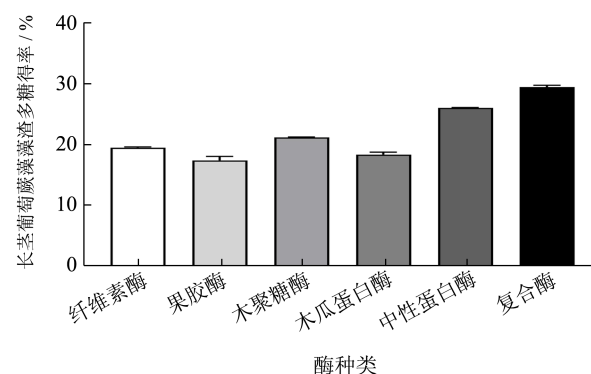


图 1 不同酶对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的影响

Fig.1 Effect of different enzyme on the extraction rate of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera*

2.2 单因素试验结果

2.2.1 复合酶用量对多糖得率的影响

复合酶质量分数对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得

率的影响见图2。长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率在所测复合酶质量分数范围内,呈现先上升后下降的趋势。当复合酶质量分数为2.4%时,其对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖的提取效果最好,得率达到31.34%。继续增加复合酶用量,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率随之下降。增加酶的质量分数可使酶解反应更加完全,溶出的多糖增多;酶的质量分数过高时,酶将与底物产生竞争,导致一定量的酶消耗,使多糖的得率下降^[27]。由此,选取复合酶质量分数以2.4%为宜。

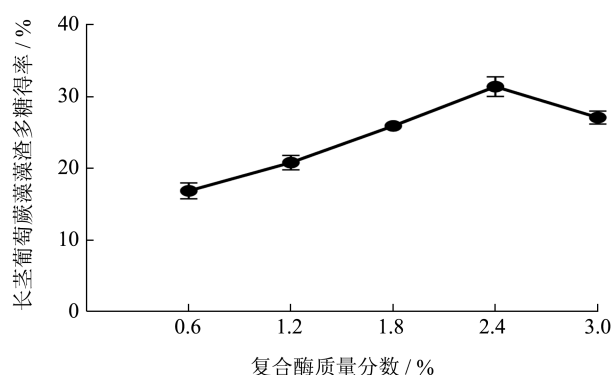


图2 复合酶质量分数对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的影响

Fig.2 Effects of compound enzyme mass fraction on the extraction rate of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera*

2.2.2 酶解温度对多糖得率的影响

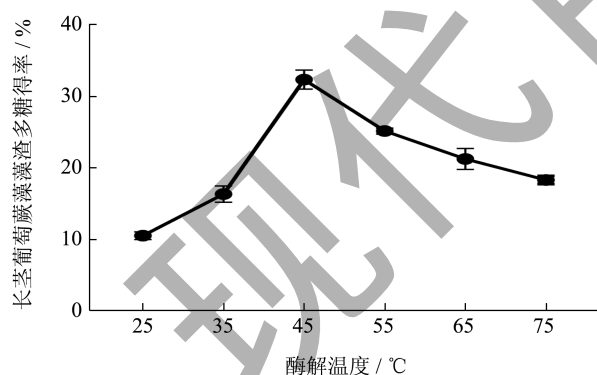


图3 酶解温度对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的影响

Fig.3 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on the extraction rate of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera*

如图3所示,在酶解温度35~45℃内,随着温度的增加,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率急剧上升,达到32.39%;当酶解温度超过45℃后,多糖得率开始下降。这可能是因为,在25~45℃范围内,酶活性随温度升高而增加,多糖的溶解和扩散速率增加,

从而提高多糖得率;而当温度过高,酶的结构受到破坏,酶活性降低,同时高温可能使多糖的结构发生变化,导致多糖得率降低^[28]。因此,酶解温度以45℃为宜。

2.2.3 酶解时间对多糖得率的影响

长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率在酶解时间测定范围内呈现先升后降趋势,结果如图4所示。长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率在120 min处达到最大值为31.94%,继续延长酶解时间,多糖得率开始下降。酶解时间过短时,复合酶酶促反应不充分,所得多糖较少;酶解时间过长会破坏部分多糖的结构导致含量减少,且时间过长也会使杂质溶出^[29]。因此,酶解时间以120 min为宜。

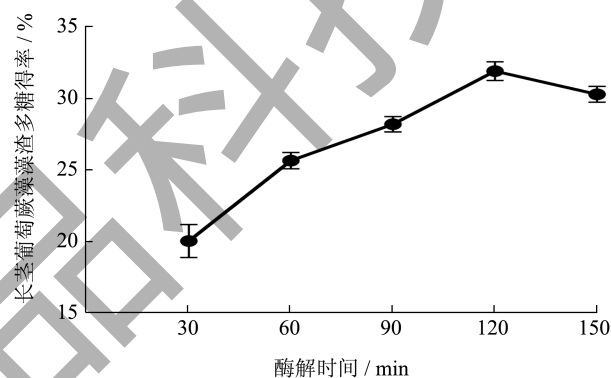


图4 酶解时间对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的影响

Fig.4 Effects of enzymatic hydrolysis time on the extraction rate of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera*

2.3 Box-Behnken响应面优化试验设计

结合单因素试验结果,以A复合酶质量分数、B酶解温度、C酶解时间为自变量,多糖得率Y为响应值,利用Design Expert Version 13软件对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖提取条件进行优化,设计三因素三水平(表1)。

表1 响应面试验因素水平设计

Table 1 Experimental factor level of response surface

水平	因素		
	A 复合酶质量分数 / %	B 酶解温度 / °C	C 酶解时间 / min
-1	1.8	35	90
0	2.4	45	120
1	3.0	55	150

2.4 复合酶提取多糖工艺响应面优化结果

由DesignExpert软件根据Box-Behnken的中

心组合原理设计 17 组试验, 结果如表 2 所示。对表 2 中的试验数据进行二次多项式回归拟合, 得到长茎葡萄蕨藻渣多糖得率 Y 与 A 复合酶用量、B 酶解温度、C 酶解时间的回归模型方程: $Y=33.60+1.35A+2.22B+1.23C+0.804\ 8AB-0.702\ 6AC-0.514\ 4BC-4.23A^2-3.84B^2-4.84C^2$ 。

回归模型方差及结果见表 3, 回归模型 $P<0.000\ 1$, 该模型极显著; 失拟项 $P(0.147\ 0)>0.05$, 失拟项不显著, 表明该模型可信度高; 且模型的相关系数 ($R^2=0.993\ 3$) 可解释模型 99.33% 的变化, 其接近 1, 表明回归方程的拟合度和可信度较高, 说明预测值与试验结果相关性较高。该模型可用于预测长茎葡萄蕨藻渣多糖提取工艺优化的试验。通过分差分析 (表 3) 可知, A 复合酶用量、B 酶解温度和 C 酶解时间对长茎葡萄蕨藻渣多糖得率的影响大小为: $B>A>C$, 即酶解温度对长茎葡萄蕨藻渣多糖得率影响最大, 复合酶用量次之, 酶解时间影响较小。AB、AC 两两间的相互作用对多糖得率具有显著影响 ($P<0.05$), BC 不显著。

表 2 响应面分析试验及结果

Table 2 Response surface methodology and analysis results

试验 序号	因素			Y 多糖 得率/%
	A 复合酶 质量分数/%	B 酶解 温度/℃	C 酶解 时间/min	
1	0	-1	1	24.54
2	-1	1	0	25.15
3	0	0	0	33.87
4	1	0	-1	25.46
5	1	-1	0	24.30
6	0	0	0	34.13
7	0	0	0	33.60
8	0	0	0	33.21
9	0	1	-1	26.33
10	-1	-1	0	22.80
11	0	-1	-1	20.40
12	1	1	0	29.87
13	1	0	1	25.88
14	0	0	0	33.19
15	-1	0	-1	21.76
16	0	1	1	28.41
17	-1	0	1	24.99

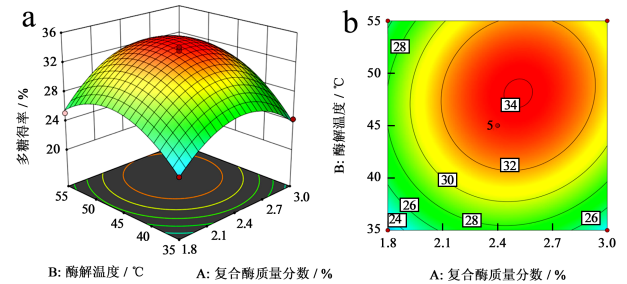
表 3 回归模型方差分析结果

Table 3 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均值	F 值	P 值	显著性
模型	335.44	9	37.27	114.77	<0.000 1	**
A: 复合酶 质量分数	14.64	1	14.64	45.09	0.000 3	**
B: 酶解温度	39.27	1	39.27	120.93	<0.000 1	**
C: 酶解时间	12.17	1	12.17	37.46	0.000 5	**
AB	2.59	1	2.59	7.98	0.025 6	*
AC	1.97	1	1.97	6.08	0.043 1	*
BC	1.06	1	1.06	3.26	0.114 0	
A ²	75.44	1	75.44	232.31	<0.000 1	**
B ²	62.06	1	62.06	191.10	<0.000 1	**
C ²	98.80	1	98.80	304.25	<0.000 1	**
残差	2.27	7	0.324 7			
失拟项	1.60	3	0.553 5	3.17	0.1470	
纯误差	0.672 8	4	0.168 2			
总和	337.71	16				

注: “*” 表示差异显著 ($P<0.05$); “**” 表示差异极显著 ($P<0.01$)。

复合酶质量分数、酶解温度、酶解时间 3 个因素交互作用的响应面图和等高线图见图 5。三维曲线在复合酶质量分数和酶解温度方向的弯曲程度大, 复合酶质量分数与酶解温度等高线图呈椭圆形, 结合方差结果分析, 复合酶质量分数与酶解温度交互作用显著 (图 5a、5b); 三维曲线在复合酶质量分数与酶解时间方向上弯曲程度较大, 等高线图呈椭圆形, 结合方差结果分析, 复合酶质量分数与酶解时间交互作用显著 (图 5c、5d); 三维曲线酶解温度方向弯曲程度大, 酶解时间方向上的曲线则相对平缓, 酶解温度与酶解时间的等高线形状已开始接近圆形, 结合方差结果分析, 酶解温度与酶解时间交互作用不显著 (图 5e、5f); 因此, 两因素间交互作用的影响从大到小排列: $AB>AC>BC$, 与方差分析结果一致。



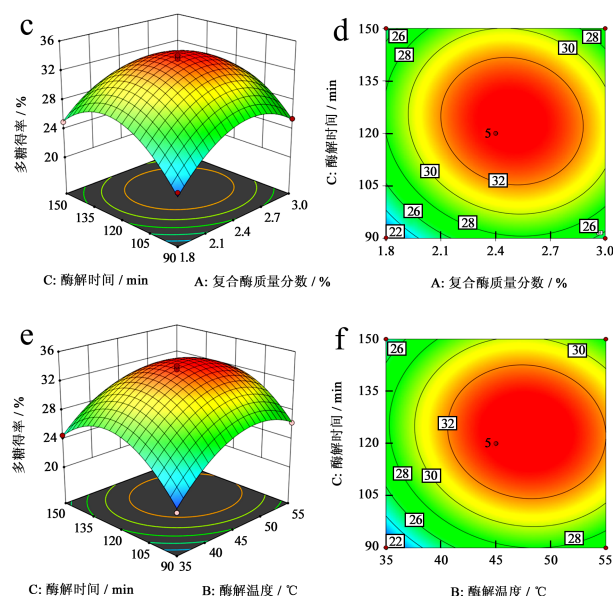


图5 复合酶质量分数、酶解温度、酶解时间之间的交互作用对长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的响应曲面及等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots of the interaction of compound enzyme mass fraction, enzymatic hydrolysis temperature, enzymatic hydrolysis time on the extraction rate of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera*

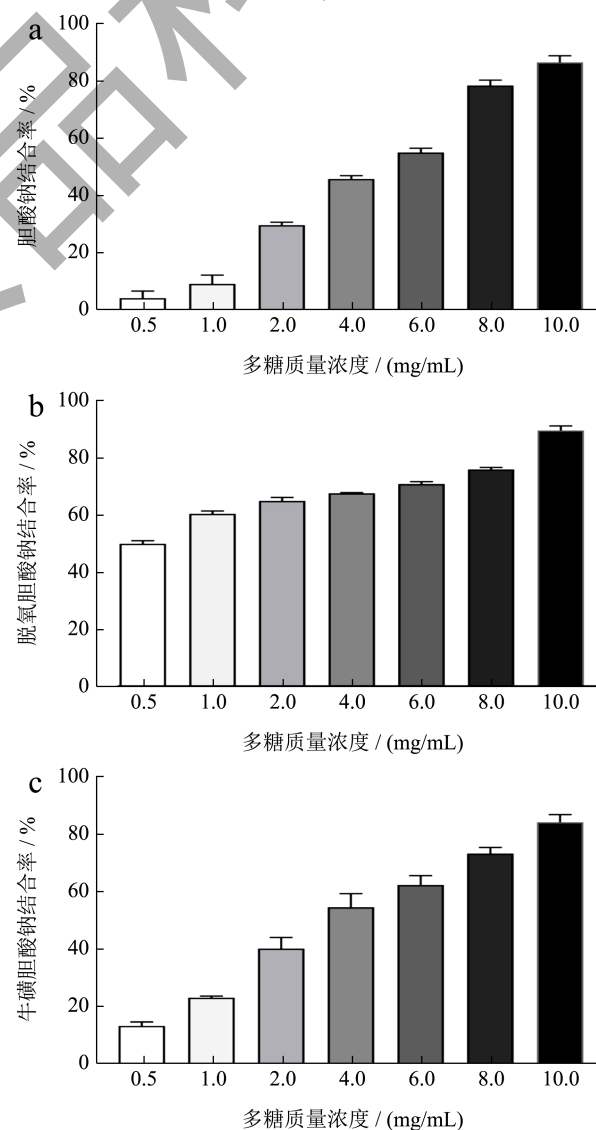
2.5 工艺验证

通过 Design Expert Version 13 软件分析,得到超声辅助复合酶法提取长茎葡萄蕨藻藻渣多糖的最佳条件为:复合酶质量分数 2.51%,酶解温度 48.03 °C,酶解时间 122.97 min,在此条件下,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率的理论值为 36.71%。根据实际情况,将提取条件调整为:复合酶用量 2.5%,酶解温度 48 °C,酶解时间 123 min,三次重复试验,实际得率为 36.62%,接近预测值,说明该模型可以较好的预测长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率。有研究表明,依靠传统的水提醇沉方法不能使长茎葡萄蕨藻中的多糖充分释放,多糖得率仅为 3%~11%^[30,31]。童艳梅等^[32]采用木瓜蛋白酶酶解提取长茎葡萄蕨藻多糖,多糖的得率得到提高,明显优于传统方法的提取效果。本研究利用超声波结合复合酶酶解的方法进行提取,使长茎葡萄蕨藻藻渣中的多糖成分有效释放出来,并且具有酶用量少、反应条件温和等优点。

2.6 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖对胆酸盐结合能力的测定

胆酸盐是肝脏中胆固醇代谢产物胆汁酸衍生物,能够促进脂肪乳化,加快脂肪消化吸收^[22,33,34]。

胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和脱氧胆酸钠是胆酸盐中的主要成分^[33]。由图 6 可知,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖对胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠和脱氧胆酸钠均有一定的结合能力,且随着质量浓度的增加,结合率随之升高。当长茎葡萄蕨藻藻渣多糖质量浓度为 10 mg/mL 时,对四种胆酸盐结合率分别达到 86.56%、89.47%、84.26% 和 64.68%。脂肪摄入与吸收量是影响脂质代谢的重要因素。研究表明,一些天然获得的多糖可以结合胆酸盐,刺激肝脏中胆固醇迅速分解转化为胆汁酸排出体外,从而降低血液中胆固醇的浓度,起到调节血脂水平的作用^[35,36]。唐茹萌等^[37]研究证实从裙带菜中提取的多糖具备吸附牛磺胆酸钠的能力。Gao 等^[38]的研究证明了海带多糖能够在体外吸附胆酸钠、牛磺胆酸钠和甘氨酸胆酸钠。长茎葡萄蕨藻藻渣多糖具有结合胆酸盐的能力,因此可能促进血液中胆固醇的代谢,从而发挥改善血脂代谢障碍的作用。



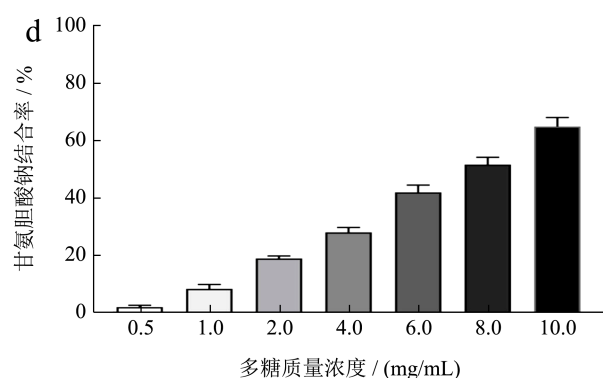


图6 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖与胆酸钠(a)、脱氧胆酸钠(b)、牛磺胆酸钠(c)和甘氨酸胆酸钠(d)的结合能力

Fig.6 Cholic acid (a), deoxycholic acid (b), taurocholic acid (c) and glycocholic acid (d) binding capacity of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera*

2.7 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖对小鼠体质量、脂肪质量及脂肪系数的影响

摄入高脂饮食导致机体能量代谢紊乱,引起脂肪过度堆积形成肥胖,被普遍认为是高脂血症的主要诱发因素^[39,40]。由表4可知,饲养第4周,与正常组相比,模型组小鼠体质量显著大于正常组($P<0.01$),且超过正常组体质量的32.92%,脂肪系数达到5.29%。与模型组相比,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖低剂量组和高剂量组小鼠体质量和脂肪系数均显著低于模型组($P<0.01$),体质量分别减少了11.29%和15.38%,脂肪系数分别降低至4.07%和3.18%。

表4 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖对小鼠体质量、脂肪系数的影响
Table 4 Effect of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera* on body weight and fat coefficient of hyperlipidemic mice ($n=6$)

组别	初始体质量/g	最终体质量/g	脂肪系数/%
正常组	21.45±0.86	36.05±2.07	1.96±0.29
模型组	21.29±1.01	47.92±2.02 ^{##}	5.29±0.54 ^{##}
多糖低剂量组 (200 mg/kg)	21.31±1.17	42.51±1.04 ^{**}	4.07±0.60 ^{**}
多糖高剂量组 (400 mg/kg)	21.47±1.09	40.55±1.02 ^{**}	3.18±0.27 ^{**}
非诺贝特组 (40 mg/kg)	21.31±0.95	39.02±1.20 ^{**}	3.72±0.63 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

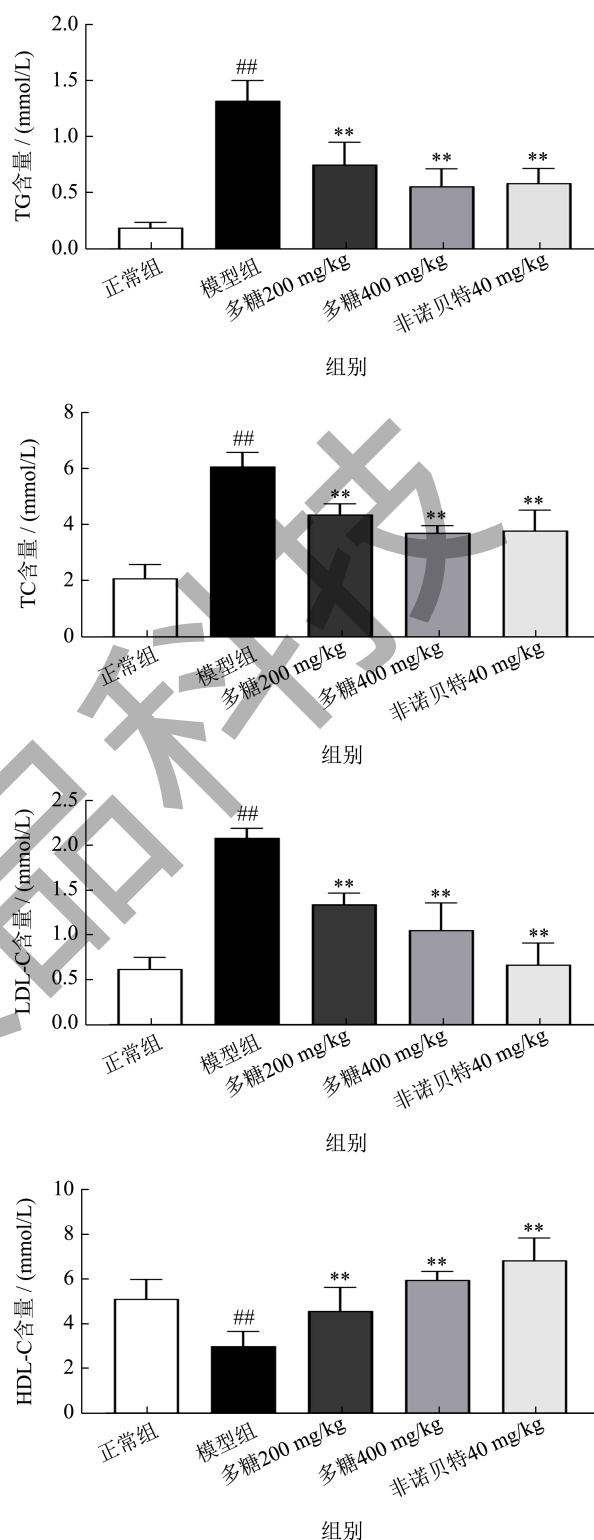


图7 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖对小鼠血清TG、TC、LDL-C和HDL-C水平的影响

Fig.7 Effect of polysaccharides from algal residue of *C. lentillifera* on TG, TC, LDL-C and HDL-C contents in serum of hyperlipidemic mice ($n=6$)

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组组比较,^{**} $P<0.01$ 。

2.8 长茎葡萄蕨藻藻渣多糖干预对高脂饮食小鼠血清血脂的影响

长茎葡萄蕨藻藻渣多糖干预对高脂饮食小鼠血清血脂水平的影响如图7所示,模型组小鼠血清TG、TC、LDL-C含量显著高于正常组($P<0.01$)。与模型组比较,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖低剂量组和高剂量组小鼠血清TC、TG、LDL-C水平均显著降低($P<0.01$),TG含量分别下降了59.87%和68.42%,TC含量下降了28.24%和39.08%,LDL-C含量分别下降了34.93%和49.28%。模型组小鼠血清HDL-C含量显著低于正常组($P<0.01$)。与模型组比较,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖低剂量组和高剂量组小鼠血清HDL-C含量分别显著升高52.67%和99.00%($P<0.01$)。实验结果表明,长茎葡萄蕨藻藻渣多糖具有良好的调节血脂作用。Matanjan等^[41]以长茎葡萄蕨藻干粉饲喂代谢综合征大鼠,4周后大鼠血清中TG和LDL-C降低,分别下降了35.34%和27.78%,HDL-C含量升高了35.63%,但是TC水平无明显改变。本试验中经长茎葡萄蕨藻藻渣多糖干预后,小鼠血清TG、TC、LDL-C和HDL-C水平显著改善。长茎葡萄蕨藻经过加工后剩余的藻渣中含有大量的多糖成分。多糖作为长茎葡萄蕨藻中的主要活性成分之一,可能是其发挥降脂作用的重要物质基础。

3 结论

本研究以长茎葡萄蕨藻藻渣为原料提取其中的多糖成分,在单因素试验结果的基础上,通过Design Expert软件对超声辅助复合酶法提取工艺进行了优化设计,并建立了数学模型,得到了最佳提取工艺条件:复合酶质量分数2.5%,酶解温度48℃,酶解时间123 min,在最优条件下长茎葡萄蕨藻藻渣多糖得率为36.62%,提取工艺参数合理可靠,条件温和,能够从长茎葡萄蕨藻藻渣中有效获得多糖成分。长茎葡萄蕨藻藻渣多糖与胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠和甘氨酸胆酸钠均有较强的结合能力,可以通过吸附胆酸盐加速胆固醇分解转化和排泄实现降脂功能。长茎葡萄蕨藻藻渣多糖对高脂饮食饲喂的高脂血症小鼠有显著的降脂作用,能够减轻过度肥胖,并降低血清中TG、TC、LDL-C水平,提高HDL-C水平,调节血脂代谢。本研究为长茎葡萄蕨藻的高附加值应用提供了参考,为在降脂方面及相关功能性食品的开发提供参考依据。

参考文献

- [1] YANG J, LEE J, KIM Y. Effect of deglycosylated rutin by acid hydrolysis on obesity and hyperlipidemia in high-fat diet-induced obese mice [J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1539.
- [2] JING Y S, MA Y F, PAN F B, et al. An insight into antihyperlipidemic effects of polysaccharides from natural resources [J]. *Molecules*, 2022, 27(6): 1903.
- [3] CHU L, YANG L, LIN L, et al. Chemical composition, antioxidant activities of polysaccharide from Pine needle (*Pinus massoniana*) and hypolipidemic effect in high-fat diet-induced mice [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 125: 445-452.
- [4] THAIPITAKWONG T, ARAMWIT P. A review of the efficacy, safety, and clinical implications of naturally derived dietary supplements for dyslipidemia [J]. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 2017, 17(1): 27-35.
- [5] BERENT T, BERENT R, STEINER S, et al. Statin-induced muscular side effects at rest and exercise-an anatomical mapping [J]. *Atherosclerosis Supplements*, 2019, 40: 73-78.
- [6] 叶启旺.长茎葡萄蕨藻室内水泥池与自然海区养殖对比试验[J].水产养殖,2018,39(3):7-9.
- [7] 张媚健,马钰荣,车馨怡,等.海南长茎葡萄蕨藻营养成分分析及其免疫刺激活性研究[J].食品科技,2019,44(5): 90-96.
- [8] LONG H, GU X, ZHOU N, et al. Physicochemical characterization and bile acid-binding capacity of water-extract polysaccharides fractionated by stepwise ethanol precipitation from *Caulerpa lentillifera* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 654-661.
- [9] 黄钰林,赖惠敏,李宗翰,等.一种具有抑制过敏功能的海葡萄萃取物,制备方法及应用:中国,CN106994135B[P].2021-06-15.
- [10] 朱军,鲍时翔,林勇,等.一种海葡萄汁饮料及其制备的方法:中国,CN106858211A[P].2017-06-20.
- [11] SUN Y, LIU Z, SONG S, ZHU B, et al. Anti-inflammatory activity and structural identification of a sulfated polysaccharide CLGP4 from *Caulerpa lentillifera* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 931-938.
- [12] SHARMA B R, HYUN J K, DONG Y R. *Caulerpa lentillifera* extract ameliorates insulin resistance and regulates glucose metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice via PI3K/AKT signaling pathway in myocytes [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2015, 13(1): 1-10.
- [13] TIAN H, LIU H, SONG W, et al. Polysaccharide from *Caulerpa lentillifera*: extraction optimization with

- response surface methodology, structure and antioxidant activities [J]. *Natural Product Research*, 2021, 35(20): 3417-3425.
- [14] YU S, SUN J, WANG Q, et al. Extraction of bioactive polysaccharide from *Ulva prolifera* biomass waste toward potential biomedical application [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 235: 123852.
- [15] 卢芷虹,林宗毅,崔春,等.柠檬酸提取海带渣中多糖及其抗氧化活性与结构的研究[J].食品工业科技,2012,33(23):93-96.
- [16] 刘旭,曲桂燕,周裔彬,等.泡叶藻及海带藻渣中岩藻聚糖硫酸酯的提取及其抗氧化活性[J].海洋科学,2013,37(12):34-39.
- [17] 付慧,汪秋宽,何云海,等.多肋藻渣膳食纤维对小鼠降血脂作用的研究[J].大连海洋大学学报,2012,27(3):200-204.
- [18] CHEN R, LUO S, WANG C, et al. Effects of ultra-high pressure enzyme extraction on characteristics and functional properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel pectic polysaccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 121: 107016.
- [19] SONG Z, XIONG X, HUANG G. Ultrasound-assisted extraction and characteristics of maize polysaccharides from different sites [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 95: 106416.
- [20] 罗兰心,张静,刘洋,等.响应面法优化酶法提取宁红茶多糖工艺[J].食品研究与开发,2023,44(2):66-72.
- [21] 纪慧杰,朱彩平.石榴皮多糖的提取及组成、体外降脂活性研究[J].食品与发酵工业,2023,49(4):161-168.
- [22] LI Q, DOU Z, DUAN Q, et al. A comparison study on structure function relationship of polysaccharides obtained from sea buckthorn berries using different methods: antioxidant and bile acid-binding capacity [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2024, 13(1): 494-505.
- [23] 程晓芳,袁丹丹,张余慧,等.海带多糖的生理活性及其在食品中的应用研究进展[J].食品工业科技,2019,40(8): 361-367.
- [24] 刘倩,晋文慧,矫浩田,等.长茎葡萄蕨藻中 β -1,3-木聚糖的提取工艺优化及单糖组成分析[J].食品工业科技,2023,44(16):210-217.
- [25] ZHANG H, LI H, NETALA V R, et al. Optimization of complex enzyme-ultrasonic synergistic extraction of water-soluble polysaccharides from *Perilla frutescens* seed meal: purification, characterization and *in vitro* antioxidant activity [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(1): e16201.
- [26] ZHANG Z, YAN M, LI W, et al. Anti-inflammatory activity of polysaccharide from spent substrate of *Lentinula edode* based on extraction of high pressure-complex enzyme [J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2024, 32: 2059-2074.
- [27] 张涵,殷澳,张会佳,等.昆布多糖的复合酶法提取工艺优化及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性[J].食品工业科技,2024,45(3):197-206.
- [28] 李卫,房雷雷,张彦青,等.桔梗多糖的复合酶提取、结构表征及抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2023,44(18): 283-291.
- [29] 项飞兵,熊天涵,胡书,等.复合酶法提取九资河茯苓多糖及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2022,43(9):118-123.
- [30] ZHANG M, ZHAO M, QING Y, et al. Study on immunostimulatory activity and extraction process optimization of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 143: 677-684.
- [31] 董喆.海葡萄(*Caulerpa lentillifera*)多糖的结构和生物活性的研究[D].舟山:浙江海洋大学,2020.
- [32] 童艳梅,陈秀荔,胡庭俊,等.响应面法优化长茎葡萄蕨藻多糖提取工艺及抗氧化活性[J].水产学报,2024,48(1): 166-176.
- [33] HOFMANN A F. Bile acids: trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1403-1418.
- [34] YAN J K, WU L X, QIAO Z R, et al. Effect of different drying methods on the product quality and bioactive polysaccharides of bittergourd (*Momordica charantia* L.) slices [J]. *Food Chemistry*, 2019, 271: 588-596.
- [35] GONG L, ZHANG H, NIU Y, et al. A novel alkali extractable polysaccharide from *Plantago asiatic* L. seeds and its radical-scavenging and bile acid-binding activities [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(2): 569-577.
- [36] GUNNESS P, GIDLEY M J. Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides [J]. *Food & Function*, 2010, 1(2): 149-155.
- [37] 唐茹萌,焦文雅,桑亚新,等.裙带菜多糖体外和体内降血脂活性[J].食品科学,2022,43(1):142-149.
- [38] GAO J, LIN L, SUN B, et al. Comparison study on polysaccharide fractions from *Laminaria japonica*: structural characterization and bile acid binding capacity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(44): 9790-9798.
- [39] WU S J, HUANG W C, YU M C, et al. Tomatidine ameliorates obesity-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2021, 91: 108602.
- [40] VERDUCI E, DI P E, FIORE G, et al. Integrated approaches to combatting childhood obesity [J]. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2022, 78(2): 8-19.
- [41] MATANJUN P, MOHAMED S, MUHAMMAD K, et al. Comparison of cardiovascular protective effects of tropical seaweeds, *Kappaphycus alvarezii*, *Caulerpa lentillifera*, and *Sargassum polycystum*, on high-cholesterol/ high-fat diet in rats [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2010, 13(4): 792-800.