

石莼多糖及其寡糖结构、制备及活性的研究进展

唐天城, 朱本伟*, 姚忠, 孙芸, 熊强

(南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211816)

摘要: 石莼多糖是石莼属海洋绿藻细胞壁的主要成分, 其复杂的结构和单糖组成赋予了各种生物活性, 如抗病毒、抗炎症、抗凝血、抗氧化等。但是提取得到的石莼多糖的分子量较大, 存在溶解度低, 生物利用率差等缺点, 这很大程度上限制了石莼多糖的高值化开发与有效利用。通过降解石莼多糖得到的低分子量的寡糖产物, 即石莼寡糖, 不仅能够非常好地保留石莼多糖的多种生物活性, 还能够有效地解决溶解度低、生物利用率差等问题。因此, 石莼寡糖的制备与活性研究成为海洋生物资源开发研究领域的热点。目前, 石莼寡糖主要是通过化学法, 物理法和酶法三种降解方式制备得到的。该研究对石莼多糖的化学组成、结构、提取、纯化和降解制备寡糖的方法进行了综述, 并对石莼寡糖的生物活性研究进展进行了总结与展望, 为石莼多糖及其寡糖的研究提供理论基础并以为海洋藻类资源的高值化开发与有效利用提供参考。

关键词: 石莼多糖; 提取; 纯化; 结构; 寡糖; 活性

文章编号: 1673-9078(2023)05-340-353

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.5.0648

Research Progress on the Structure, Preparation and Activity of *Ulva* Polysaccharides and Oligosaccharides

TANG Tiancheng, ZHU Benwei*, YAO Zhong, SUN Yun, XIONG Qiang

(College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

Abstract: *Ulva* polysaccharide is the main component of the cell wall of *Ulva* marine green algae, and its complex structure and monosaccharide composition endow itself with various biological activities such as anti-virus, anti-inflammatory, anti-coagulation and antioxidant effects. However, the extracted *Ulva* polysaccharide has a highmolecular weight, low solubility and poor bioavailability, which greatly limits the high-value development and effective utilization of *Ulva* polysaccharide. *Ulva* oligosaccharide, a low-molecular-weight oligosaccharide obtained by degrading *Ulva* polysaccharide, can not only retain well various biological activities of *Ulva* polysaccharide, but also effectively solve the problems of low solubility and poor bioavailability. Therefore, the preparation and activity studies of *Ulva* oligosaccharides have become a hot spot in the field of marine biological resources development research. At present, *Ulva* oligosaccharides are mainly prepared by three degradation methods: chemical method, physical method and enzymatic method. In this paper, the chemical composition, structure, extraction and purification of *Ulva* polysaccharide, and its degradation to prepare *Ulva* oligosaccharides, are reviewed. The research progress on the biological activities of *Ulva* oligosaccharides is summarized and prospected, which provides a theoretical basis for the research of *Ulva* polysaccharides and oligosaccharides, and a reference for high-value development and effective utilization of marine algae resources.

Key words: ulvan; extraction; purification; structure; oligosaccharide; activity

引文格式:

唐天城,朱本伟,姚忠,等.石莼多糖及其寡糖结构、制备及活性的研究进展[J].现代食品科技,2023,39(5):340-353.

TANG Tiancheng, ZHU Benwei, YAO Zhong, et al. Research progress on the structure, preparation and activity of *Ulva* polysaccharides and oligosaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(5): 340-353.

收稿日期: 2022-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601410); 宿迁市科技计划项目(L201906)

作者简介: 唐天城(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋寡糖的制备及活性评价, E-mail: tangtiancheng@njtech.edu.cn

通讯作者: 朱本伟(1987-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 海洋寡糖的制备及活性评价, E-mail: zhubenwei@njtech.edu.cn

自 21 世纪初以来, 韩国济州岛东海岸经常爆发绿潮等生态性灾害, 而石莼是形成绿潮的主要藻类之一。石莼 (*Ulva* sp.) 属于绿藻门石莼科石莼属, 常见的石莼种类有石莼 (*Ulva prolifera*)、孔石莼 (*Ulva pertusa*)、扁石莼 (*Ulva compressa*) 等^[1]。石莼的营养价值很高, 其蛋白质含量约为 15%~20%, 脂肪含量较低(约占 0.9%)且多为不饱和脂肪酸(约占 57.9%)。

因而常作为食品加工原料出现在餐桌上,深受消费者的喜爱^[2]。石莼多糖是存在于石莼科藻类植物细胞壁中主要的水溶性硫酸化多糖。研究发现,石莼多糖主要由鼠李糖、木糖、艾杜糖醛酸、葡萄糖醛酸和少量半乳糖组成,其单糖组成和硫酸化程度会随着石莼的种类、收获季节、栽培方法、生长环境和提取方法而存在差异^[3-5]。石莼多糖作为石莼的主要活性成分,具有多种生物活性,例如免疫调节^[6]、抗炎^[7]、抗凝剂^[8]、抗肿瘤^[9]、抗氧化^[10]、抗高脂^[11]、促进植物生长^[12]等。因此,石莼多糖在生物医药,化妆品,食品,保健品和其他行业有潜在的应用前景^[13-16]。然而,目前提取得到的石莼多糖的分子量较大,存在溶解性差、生物利用率低等缺陷,这阻碍了石莼多糖资源的高值化开发和利用。相反地,石莼多糖通过降解后得到的石莼寡糖不仅很好地保留了原有多糖的生物活性,还使得难溶解、生物利用率低等缺陷得到了很好地改善,这让制备石莼寡糖并对其生物活性进行研究成为海洋生物资源开发研究领域的热点^[17]。

目前,与石莼多糖和寡糖相关的研究报道不断增加,但尚未有相关论文对目前的研究进展进行完善地总结和讨论。本文对石莼多糖的化学组成、结构、提取、纯化和活性研究报道进行了系统总结,并就石莼寡糖的制备方法和寡糖的活性研究进行了综述和分析。在论文的结尾,对目前石莼多糖开发和利用中存在的主要问题、技术瓶颈和各个领域的应用前景进行了分析和展望,为推动石莼多糖这类海洋绿色生物资源的有效利用提供理论基础和研究依据。

1 石莼多糖的化学组成

石莼多糖的化学组成会受到作为提取来源的石莼种类、收获季节以及石莼多糖的提取方法和纯化方法等的影响,因此其组成较为复杂^[18,19]。Kidgella等^[20]对叶片状石莼(*U. australis*、*U. rigida*、*U. sp. B*和*Ulva sp.*)和丝状石莼(*U. flexuosa*、*U. compressa*、*U. prolifera*和*U. ralfsii*)的组成糖成分进行了分析,结果发现叶片状石莼与丝状石莼来源的多糖在单糖组成上存在较大的差异。其中来源于叶片状石莼的多糖中主要由鼠李糖构成(约占49 mol%),其次是葡萄糖醛酸(约占23.83 mol%)而木糖和艾杜糖醛酸的比例随着石莼种类的不同而不同。来源于丝状石莼的多糖存在较大差异,来源于*U. prolifera*和*U. flexuosa*的多糖中鼠李糖的含量可达56 mol%和60 mol%。相反地,来源于*U. ralfsii*和*U. compressa*的多糖中鼠李糖的含量约占43 mol%。而艾杜糖醛酸的比例丝状石莼的多糖(约占7 mol%)普遍低于叶状石莼的多糖(约占14 mol%)。

除此之外,来自*U. rigida*的多糖中艾杜糖醛酸的含量最高,达到18 mol%。而来源于养殖*U. ralfsii*的多糖中半乳糖的比例达到16 mol%,远超过其他石莼物种的多糖。Samarasinghea等^[21]对不同时间收获的石莼的单糖组成进行了分析,发现石莼多糖的主要组成单糖没有差别,但不同种类单糖含量的差异较大。例如,6月份收获的石莼多糖中鼠李糖、木糖、半乳糖、葡萄糖和糖醛酸的干物质含量分别为3.65、0.43、0.41、0.32和0.62 g/100 g;而8月份采集的石莼多糖中鼠李糖、木糖、半乳糖、葡萄糖和糖醛酸的干物质含量分别为0.84、0.33、0.22、0.75和1.92 g/100 g。可以很明显地发现8月份收获的石莼多糖仅在葡萄糖和糖醛酸的含量上大于6月份收获的石莼多糖。此外,Olsson等^[3]研究了栽培条件(如温度、辐照度、pCO₂、氮和磷酸盐)对石莼单糖成分的影响时,发现较低的硫酸盐浓度和高温可以促进单糖含量地增加,而提高辐照度和温度可以提高鼠李糖和艾杜糖醛酸的浓度。Guidara等^[22]分别通过酸提取(CA)和酶化学法(EE)从*Ulva lactuca*中提取石莼多糖并对它们的单糖成分进行了分析,结果表明酸提取获得的石莼多糖CA1中鼠李糖和木糖的含量高于酶化学法提取的石莼多糖EE,而EE中糖醛酸和葡萄糖的含量高于CA1。以上研究结果表明石莼多糖的化学组成会随着石莼种类、生长环境、收获时间和提取方法的不同而有所差异,在其他藻类多糖的成分分析中也普遍的存在这种现象^[23]。

2 石莼多糖及其寡糖的结构

由于石莼多糖的单糖组成复杂,单糖间的连接方式不同以及基团修饰的复杂多样,分枝结构存在等,石莼多糖结构的复杂性远超褐藻胶、卡拉胶和琼胶多糖等其他藻类多糖^[24,25]。Lahaye等^[1]对来源于*U. rigida*的石莼多糖的结构进行研究,从加那利群岛的样本中确定了 $\Delta(1\rightarrow4)\alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } 2\text{S } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ 、 $\Delta(1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } (1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ 、 $\Delta(1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } 2\text{S } (1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } (1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ 、 $\Delta(1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ 和 $\Delta(1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ 这六种结构,还从布列塔尼样本发现了 $\Delta(1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-GlcA } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ 、 $\Delta(1\rightarrow4) \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } 2\text{S } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ 、 $\Delta(1\rightarrow4) [\beta\text{-D-GlcA } (1\rightarrow2)] \alpha\text{-L-Rha } 3\text{S } (1\rightarrow4) \beta\text{-D-Xyl } (1\rightarrow4) \text{L-Rha } 3\text{S}$ (20)和 $\Delta(1\rightarrow4) [\beta\text{-D-GlcA}$

(1→2)] α -L-Rha3S (1→4) β -D-Xyl2S(1→4)_L-Rha3S 四种结构以及相同的寡聚糖结构 Δ (1→4)_L-Rha 3S 和 Δ (1→4) α -L-Rha 3S (1→4) β -D-Xyl (1→4)_L-Rha 3S, 其中 Δ 是指非还原端的不饱和糖醛酸 4-脱氧-L-苏氨酸-4-异吡喃糖醛酸。从不同的石莼样本中发现石莼多糖的主要二糖重复结构是 A_{3s} [(1→4) β -D-GlcA (1→4)- α -L-Rha 3S (1→)] 和 B_{3s} [(1→4) α -L-IdoA (1→4)- α -L-Rha 3S (1→)]。此外, 对这些结构进行分析发现其中存在 U_{3s} [(1→4) β -D-Xyl (1→4)- α -L-Rha 3S(1→)] 和 $U_{2's,3s}$ [(1→4) β -D-Xyl 2S (1→4)- α -L-Rha 3S(1→)] 两种重复二糖单元。Thanh 等^[26]从 *Ulva lactuca* 中提取得到高度纯化的石莼多糖并通过 IR, NMR, SEC-MALL 和 ESIMS 的方法对其结构进行分析, 研究发现提取得到的石莼多糖中存在 A_{3s} [(1→4)- β -D-GlcA-(1→4)- α -L-Rha3S-(1→)] , $GlcA-(1→2)-Xyl$ 和 $GlcA-(1→2)-Rha$ 的重复二糖单元,

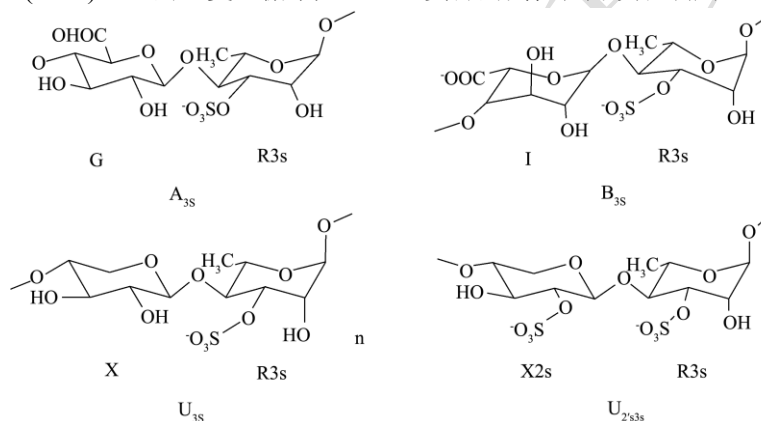


图1 石莼多糖中主要的二糖单元

Fig.1 The main disaccharide unit of ulvan

3 石莼多糖的提取、纯化及寡糖的制备

目前报道的关于提取和纯化石莼多糖的方法很多, 根据提取和纯化的工艺, 可以将提取方法归纳为如下三大类, 即溶液提取法、物理辅助提取法和酶辅助提取法^[28], 石莼多糖的纯化方法也可归结为三大类, 即透析, 超滤和柱层析法, 其中柱层析法又可以分为离子交换色谱法和凝胶过滤色谱法^[29]。

3.1 石莼多糖的提取方法

石莼多糖的提取方法与其他藻类多糖的提取方法非常类似, 主要是采用热水提取法以及在此基础上的溶液提取法、物理辅助提取法和酶辅助提取法^[30]。部分提取方法、石莼多糖来源及产率见表1。

3.1.1 溶液提取法

溶液提取法主要包括热水提取法和化学提取法。热水提取法是利用多糖在水中的溶解度会随着温度的

升高而增大来提取多糖, 是一种传统的多糖提取方法, 其中料液比、热水温度、提取时间、提取次数等因素均对多糖的产率有影响。Pankiewicz 等^[31]按照料液比 1:30 的比例在 75~85 °C 的热水浴中搅拌提取 7 h, 离心、过滤富含多糖的上清液后浓缩, 多糖产率为 16.23%。Wahlström 等^[32]按照料液比 1:10 先与 70% 的乙醇混匀后在室温以 300 r/min 提取 8 h, 离心得到多糖的沉淀物并用乙醇洗涤三次。然后按照料液比 1:16 加入超纯水的热混合物中以 90 °C, 750 r/min 提取 3 h, 收集上清液并以 1:14 的料液比重复提取两次后冷冻干燥, 石莼多糖的产率为 11%。Chen 等^[33]按照料液比 1:20 的比例在 90 °C 的水浴中提取 3 h, 离心浓缩后使用 95% 的乙醇进行醇沉再用 95% 的乙醇反复洗涤三次, 并在 50 °C 的真空烤箱中干燥 1 h 到恒重, 产率为 17.8%。Gaio 等^[34]选用料液比 1:10 的比例在 90~100 °C 的热水中提取 1 h, 重复一次, 回收上清液并在 1 体积混合水/乙醇 1:1 (V/V) 中沉淀, 多糖产率为 7%。

Klongklaewad 等^[35]按照料液比 1:100 在高压灭菌器中煮沸 90 min, 过滤固体残留物保留上清液并冻干, 多糖产率为 15.2%。Chi 等^[27]选用料液比 1:30 在 100 °C 的热水回流提取 2 h, 离心提取上清液, 浓缩并在纤维素膜中透析后采用 95% 的乙醇进行醇沉, 多糖产率为 11.27%。Paulertab 等^[17]选用料液比 1:40 的比例在 110 °C 的高压热水提取 1 h, 回收水提液浓缩后通过乙醇进行沉淀, 产率可达 19.5%。同样地, Toskasa 等^[36]选用料液比 1:20, 130 °C 的高压热水提取 30 min, 过

滤回收热水溶液。浓缩热水溶液后用 $\varphi=95\%$ 的乙醇进行醇沉, 再用 $\varphi=95\%$ 的乙醇反复洗涤三次, 然后在 80 °C 下干燥, 其平均产率可达 24.3%。传统的热水提取法存在提取时间较长, 产率较低的问题, 通过高压的方式可以很大程度的提高其产率, 并大大缩短提取时间。但是, 过高的温度会使得石莼多糖发生自降解的现象^[37]。因此, 根据需要合理优化石莼多糖的热水提取方案, 有助于石莼多糖的后续研究。

表 1 提取石莼多糖所用的方法汇总

Table 1 The summary of methods for extraction of ulvan

提取方法	多糖来源	产率	文献
热水提取	<i>Ulva intestinalis</i>	15.2%	[35]
热水提取	<i>U. clathrata</i>	11.27%	[27]
热水提取	<i>U. Rigida</i>	24.3%	[36]
热水提取	<i>U. fasciata</i>	19.5%	[17]
热水提取	<i>U. pertusa</i> Kjellm	17.8% \pm 0.6%	[33]
热水提取	<i>U. lactuca</i>	11% \pm 3%	[32]
热水提取	<i>Cladophora glomerata</i>	16.23%	[31]
热水提取	<i>U. Rigida</i>	7%	[34]
热水提取	<i>U. rotundata</i>	21.5%	[47]
酸提取	<i>U. lactuca</i>	32.67%	[38]
酸提取	<i>U. lactuca</i>	13.06%	[46]
酸提取	<i>U. lactuca</i>	18% \pm 2%	[32]
酸提取	<i>U. ohnoi</i>	8.1% \pm 1.0%	[39]
酸提取	<i>U. ohnoi</i> 、 <i>U. tepida</i> 、 <i>U. prolifera</i>	3.5%、3.9%、6.7%	[40]
草酸钠提取	<i>U. ohnoi</i>	4.3% \pm 0.5%	[39]
酶辅助提取	<i>U. pertusa</i> Kjellm	25.3% \pm 1.3%	[33]
酶辅助提取	<i>U. armoricana</i>	35.3% \pm 0.3%	[45]
超声波辅助提取	<i>U. pertusa</i> Kjellm	20.6% \pm 1.2%	[33]
超声波辅助提取	<i>U. lactuca</i>	28.07%	[41]
微波辅助提取	<i>U. ohnoi</i> 、 <i>U. meridionalis</i>	36.5% \pm 3.1%、40.4% \pm 3.2%	[48]
微波辅助提取	<i>U. prolifera</i>	36.38% \pm 0.94%	[43]
酶和化学联合提取	<i>U. lactuca</i>	17.14%	[46]
超声波和酶辅助提取	<i>U. pertusa</i> Kjellm	26.7% \pm 0.9%	[33]

在热水提取法的基础上, 通过调节提取液的 pH 值可以改进石莼多糖的提取工艺。Yaich 等^[38]采用料液比为 1:16.7 的酸提取法提取石莼多糖, 通过多因素多水平实验优化 pH 值、提取温度以及提取时间三个因素, 得到了最佳的提取工艺, 即 pH 值为 2、提取温度 90 °C、提取时间 3 h, 该工艺下石莼多糖的产率为 32.67%。Wahlström 等^[32]按照料液比 1:25 加入 0.01 mol/L HCl (pH 值 2) 中, 加热到 90 °C 提取 4 h。离心回收上清液, 先透析 48 h, 后使用乙醇对透析液进行醇沉, 收集沉淀部分并冷冻干燥。石莼多糖的产

率为 18%。Glasson 等^[39]将经过前处理的石莼加入 1 L 0.05 mol/L HCl 中, 加热至 85 °C 提取 1 h 后进行真空过滤, 用 1 mol/L NaOH 将 pH 值调至 7, 然后浓缩并冷冻干燥, 多糖的产率为 8.1%。Christopher 等^[40]对三种不同来源的石莼 *U. ohnoi*、*U. tepida* 和 *U. prolifera* 按照料液比 1:25 的比例加入 0.05 mol/L 的通过 1 mol/L NaOH 调整 pH 值为 2 的 HCl 溶液中 37 °C 提取 3 h, 过滤回收提取物, 然后将提取物真空过滤, 超滤浓缩和透析后冷冻干燥, 多糖的最终产率分别为 3.5%、3.9% 和 6.7%。除了通过 HCl 进行提取, Christopher

等^[39]还尝试了用草酸钠对石莼多糖进行提取,但是其产率仅为 4.3%,且蛋白质的含量较 HCl 提取的含量更高。化学提取法与热水提取法相比,同样是通过提高温度和延长提取时间来提高石莼多糖的产率,但是其提取条件更为苛刻。这样不仅不利于工业化生产,产生的酸碱废液还会大大提高生产过程中的环境维护成本。

3.1.2 物理辅助提取法

物理辅助提取法主要是通过物理的方式破坏石莼细胞壁结构,使得多糖更加容易从细胞中提取出来,从而缩短提取时间,提高多糖的产率。Chen 等^[33]采用超声波辅助方法提取石莼多糖,按照料液比 1:20 的比例混合,先通过超声波处理 30 min,随后在 90 °C 的水浴中提取 2.5 h,产率为 20.6%。冯学珍等^[41]优化了超声波辅助提取石莼多糖的方法,发现按照料液比 1:50, pH 值 8.0 在 70 °C 下超声 40 min,其产率可达 28.07%。而 Tsubaki 等^[42]按照料液比 1:20 混匀后,采用微波辅助技术在 100 °C 至 180 °C 提取石莼多糖。当温度在 160 °C 时,石莼多糖的产率达到 40.4% ± 3.2% (*U. meridionalis*) 和 36.5% (*U. ohnoi*)。Yuan 等^[43]按照料液比 1:20 在 0.01 mol/L 氯化氢溶液中混合,并在 120 °C 下接受 15 min 的微波辐照,其多糖产率为 36.38%。通过物理辅助提取的方法,极大地破坏了石莼的细胞壁,使得再通过热水提取的效率大大提高。尤其是微波辅助提取法,其产率大概是传统热水提取法的 2~3 倍。

3.1.3 酶辅助提取法

酶辅助提取法是在热水提取法的基础上,结合酶技术提高多糖产率的一种新方法。在反应前加入能够降解石莼细胞壁中纤维素,半纤维素和果胶的纤维素酶和果胶酶,通过破坏细胞壁的结构从而释放更多的石莼多糖^[44]。Chen 等^[33]按照 1:20 的料液比并加入 1 mol/L HCl 将溶液的 pH 值调整为 4.5,先用纤维素

酶与混合物在 50 °C 水浴反应 2.5 h,后将温度提高至 90 °C,30 min 以灭活酶,石莼多糖的产率为 25.3%。Hardouin 等^[45]在石莼和超纯水的混合物中加入包含蛋白酶,纤维素酶等六种酶的酶制剂在 50 °C 下反应 3 h,加热至 90 °C,15 min 以灭活酶。其多糖产率达到了 35.3%。显而易见,利用酶的高效性和温和性能大大降低反应所需要的温度和 pH 值,使得反应环境更加温和。此外,酶辅助提取法的产率相对于溶液提取法更高,能够更加充分地利用海洋生物质资源,是一种能够有效利用石莼多糖这类海洋绿色生物质资源的方法。

综上所述,石莼多糖主要的提取法都是基于热水提取法,通过在不同阶段加入不同的辅助技术而衍生出各种各样的提取方法,但是各种方法都存在一些优点与不足。Yaich 等^[46]尝试结合了酶辅助提取法与溶液提取法并将其与溶液提取法进行了对比。结果表明两种方法地有机结合,使得石莼多糖的产率从溶液提取法的 13.06% 提高至 17.14%。同样地,Chen 等^[33]通过将超声波辅助提取与酶辅助提取相结合,并与热水提取,酶辅助提取和超声波辅助提取进行对比,研究结果发现超声波和酶联合提取的产率高于其他三种提取方法,其产率为 26.7%。因此,通过有机地结合不同的提取方法,能够达到提高石莼多糖产率,降低提取成本的目的,从而促进石莼多糖的后续研究。

3.2 石莼多糖的纯化方法

通过热水提取等方法获得的粗石莼多糖含有蛋白质和其他小分子等非多糖杂质,需要通过进一步地纯化以得到可用于结构和活性研究的高纯度多糖样品。石莼多糖的分离纯化方法主要有透析、超滤和柱层析法三种,其中柱层析法又分为离子交换柱层析和凝胶柱层析两种方法。

表 2 纯化石莼多糖所用的分离方法汇总

Table 2 The summary of methods for purification of ulvan

纯化方法	分离介质	流动相	流速/(mL/min)	文献
离子交换柱层析	Q Sepharose XL	0~2 mol/L NaCl	5.0	[40]
离子交换柱层析	Q Sepharose XL	0~2 mol/L NaCl	20.0	[7]
离子交换柱层析	DEAE-Sepharose	0~1 mol/L NaCl	10.0	[52]
凝胶柱层析	HiTrap QFF	0~2 mol/L NaCl	2.0	[53]
凝胶柱层析	HiTrap QFF	0~2 mol/L NaCl	2.0	[27]

透析主要是利用膜的选择透过性,通过适当截留分子量的透析袋将盐和低分子量的杂质从提取的石莼多糖粗品中去除以达到纯化的目的。同样地,超滤也是利用相同的原理将粗提取物中的盐以及小分子溶质

透过膜分离出来,在此基础上还能够对其进行浓缩从而减少实验步骤以降低多糖损失。超滤的透析管和膜过滤器都有各种过滤孔径或截留分子量(MWCO)。用于石莼多糖的 MWCO 范围介于 3.6~12 ku 之间^[49,50]。

对于透析,孔径的选择基于石莼多糖的分子大小,然而,对于超滤的孔径选择既基于石莼多糖分子的大小,也取决于洗脱量(随着孔径的减小而降低)。为了平衡洗脱量与孔径的影响,一般选择~10 ku MWCO^[39,40,51]。

许多石莼多糖的提取物中杂质含量很高,仅仅通过透析和超滤很难得到进一步的精制和分级。由于石莼多糖是水溶性阴离子多糖,适合通过离子柱层析法或者凝胶柱层析法进行进一步的纯化。Glasson 等^[40]使用离子交换层析柱 Q Sepharose XL,以 NaCl 为流动相来源于 *U. ohnoi*、*U. tepida* 和 *U. prolifera* 的石莼多糖以 5.0 mL/min 的流速 0~2 mol/L 的浓度进行梯度洗脱和纯化,最终的多糖产率为 1.45%、1.29% 和 2.8%。Kidgell 等^[7]先通过阴离子交换色谱将蛋白质脱去,然后使用离子交换层析柱 Q Sepharose XL,以 NaCl 为流动相来源于 *U. ohnoi* 的石莼多糖以 20.0 mL/min 的流速 0~2 mol/L 的浓度进行梯度洗脱和纯化。Li 等^[52]使用离子交换层析柱 DEAE-Sepharose 对青岛 *U. pertusa* 来源的石莼多糖进行纯化,分别以 0、0.5 和 1 mol/L 的 NaCl 作为流动相逐步洗脱得到 3 个完全分离的多糖组分。除此之外,Chi 等^[27,53]利用 HiTrap Q FF 凝胶,使用 NaCl 作为流动相从 *U. clathrata* 中提取的石莼多糖以 2.0 mL/min 的流速,0~2 mol/L 的浓度进行梯度洗脱和纯化。通过柱层析的方法可以获得多个完全分离的组分,从而为后续的活性研究以及作用机制的研究提供高度纯化的多糖原料。

3.3 石莼寡糖的制备方法

降解的石莼多糖,也称为石莼寡糖,具有更好的生物利用率和更高的溶解度^[54]。因此,石莼寡糖的降解制备越来越受到关注。根据石莼寡糖的制备方法,可以归为化学降解法、物理降解法和酶法三大类。

3.3.1 化学法制备石莼寡糖

化学降解法主要是通过具有强酸性或强氧化性的化学试剂破坏石莼多糖中的糖苷键从而制备石莼寡糖。冯学珍等^[55]以广西北部湾海域收获的 *Ulva lactuca* L 提取石莼多糖,按照料液比 1:15 的比例加入 2 mol/L 三氟乙酸(TFA) 2 mL 在 110 °C 的温度下水解 2 h。孙西峰等^[56]用 H₂O₂ 氧化降解石莼多糖,在 60 °C 的温度下反应 2 h,其寡糖产率为 65.1%。另外,许雅楠等^[57]采用硫酸降解石莼多糖,获得了最佳降解石莼多糖的工艺条件:0.3 mol/L 硫酸、降解温度 95 °C、多糖浓度 7 mg/mL、降解时间 1 h 和料液比 1:30,石莼寡糖的产率为 50.94%。

3.3.2 物理法制备石莼寡糖

物理降解法制备石莼寡糖的研究相对较少,仅有

李燕妹等^[58]采用二次正交旋转组合设计优化超声辅助酶法提取石莼寡糖,其中纤维素酶仅用来破坏石莼的细胞壁结构,获得的最优组合为:纤维素酶添加量 430 U/g、提取料液比 1:30、超声提取温度 50 °C、超声提取时间 1.5 h,最终的寡糖的产率为 2.38%。Yu 等^[59]通过微波对石莼多糖进行热降解制备石莼寡糖。除此之外,Simona 等^[37]的研究表明石莼多糖在高温的热水溶液中会自水解,通过控制最佳的温度自水解可以回收最初存在于多糖中的 78.7% 的稀有糖鼠李糖,以及葡萄糖醛酸和没有显著比例的其他降解产物。物理降解法需要提供大量能量来破坏石莼多糖中的糖苷键以制备石莼寡糖,存在和化学法一样的反应条件苛刻和处理时间较长的问题。

3.3.3 酶法制备石莼寡糖

相比于化学法和物理法降解石莼多糖,酶法降解石莼多糖具有反应条件温和、产物特异性好等优点,受到了研究者的广泛关注。目前,主要用于降解石莼多糖的酶是 PL24、PL25、PL28 和 PL40 家族的石莼多糖裂解酶,这是一种专一性降解石莼多糖的酶。如表 3 所示,来源于 *Alteromonas* sp. LOR 的 LOR_107^[60]、来源于 *Alteromonas* sp. (AsPL) 的 AsPL^[61]、来源于 *Pseudoalteromonas* sp. strain PLSV 的 PLSV^[62]、来源于 *Catenovulum maritimum* 的 Uly1^[63]、来源于 *Alteromonas* sp. LOR 的 LOR_29^[64]、来源于 *Formosa agariphila* KMM 3901 的 FaUL^[65]和来源于 *Formosa agariphila* KMM 3901^T 的 FaPL28^[66]的石莼多糖裂解酶在 30 至 45 °C 之间活性最高。来自 *Pseudoalteromonas* sp. PLSV 的 PLSV_3875^[60]、来源于 *Alteromonas* sp. A321. ALT3695 的 ALT3695^[67]和 *Nonlabens ulvanivorans* NLR42 的 NLR42^[68]在 50 °C 表现出最佳活性,而来源于 *Thalassomonas* sp. LD5 的 TsUly25B^[69]的最适温度达到了 60 °C。此外,石莼多糖裂解酶的最适 pH 值都是介于 7.5~9 之间,在弱碱性环境下表现出高催化活性,这可能是海洋细菌对弱碱性海水环境的适应性进化^[66]。Ulaganathan 分别对 PL24、PL25 和 PL28 家族石莼多糖的结构和降解机制进行研究,结果发现石莼多糖裂解酶主要是通过 β 消除机制切割硫酸化鼠李糖(Rha3S)和甘露糖醛酸(GluA)或艾杜糖醛酸(IdsA)之间的 β -(1 \rightarrow 4)-糖苷键,并产生 2 个和 4 个程度聚合(Dp)的寡糖^[70-72]。这也是几乎所有石莼多糖裂解酶对石莼多糖的降解产物都是 DP2 和 DP4 的偶数寡糖的原因。此外, β 消除机制还可以很好地保留石莼多糖中稀有糖结构的特性来降解石莼多糖,为石莼多糖的高值化开发奠定基础。此外,除了能够专一性降解石莼多糖的石莼多糖裂解

酶之外, 还有来源于 *Formosa agariphila* KMM 3901 的 Cdf79930, 一种具有广谱活性的裂解酶^[73]和同样来源于 *Formosa agariphila* KMM 3901 的脱水酶

P29_PDnc^[74], 可以参与石莼多糖的降解。为石莼多糖的酶法降解提供了不同的思路。

表 4 不同来源石莼多糖裂解酶的性质

Table 4 The properties of ulvan lyase from different sources

来源	PL 家族	最适 pH 值	最适温度/℃	产物	文献
<i>Alteromonas</i> sp. LOR	PL24	8.0	40	DP2, DP4	[60]
<i>Alteromonas</i> sp. (AsPL)	PL24	8.5	40	DP2, DP4	[61]
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain PLSV	PL24	8.0	35	DP2	[62]
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV	PL24	8.0	50	DP2, DP4	[60]
<i>Catenovulum maritimum</i>	PL24	9.0	40	DP2	[63]
<i>Alteromonas</i> sp. LOR	PL25	7.5	45	DP2	[64]
<i>Alteromonas</i> sp. A321. ALT3695	PL25	8.0	50	DP2, DP4	[67]
<i>Thalassomonas</i> sp. LD5	PL25	9.0	60	DP2, DP4	[69]
<i>Nonlabensulvanivorans</i> NLR42	PL28	9.0	50	DP2, DP4	[68]
<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	PL28	8.5	45	DP2	[65]
<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901 ^T	PL28	8.5	29.5	DP2	[66]

4 石莼多糖及其寡糖的生物活性

4.1 石莼多糖的生物活性

近年来, 随着石莼多糖的提取和纯化技术不断地发展, 越来越多的研究者对不同提取过程获得的石莼多糖活性开展了研究。目前的研究已发现石莼多糖具有抗病毒、抗炎症、抗氧化、抗凝剂、免疫调节、诱导植物防御等生物活性。

4.1.1 抗病毒活性

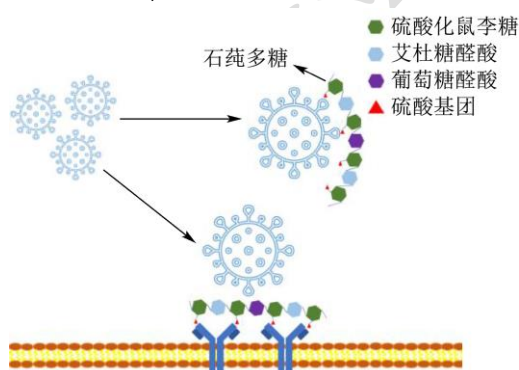


图 2 石莼多糖的抗病毒机理

Fig.2 Anti-viral mechanism of ulvan

Shefer 等^[75]评估了分别通过草酸铵 (AOx 方案) 和盐酸 (HCl 方案) 提取获得的石莼多糖的抗病毒 SARS-CoV-2 活性, 研究结果表明通过 AOx 方案提取获得的石莼多糖能够保护 VERO E6 细胞免受 SARS-CoV-2 的细胞病变作用, 其抑制效果是 HCl 方案的 11.3 倍。Chi 等^[76]通过热水提取的石莼多糖与石莼多糖裂解酶降解得到的低分子量石莼寡糖对水泡性

口炎病毒的抗病毒活性进行了研究。结果表明, 石莼多糖能够显著抑制水泡性口炎病毒的感染和复制。Hardouinab 等^[45]评估了酶法辅助提取制备石莼多糖的抗单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) 活性, 结果表明糖酶混合物和外切-1,3 (4)- β -葡聚糖酶辅助提取获得的石莼多糖 C1 和 C4 的分离多糖馏分 C1_p 和 C4_p 对 HSV-1 具有活性。通过对不同提取方案获得的石莼多糖分析发现, 石莼多糖的抗病毒活性主要取决于石莼多糖带负电的硫酸基团与病毒包膜糖蛋白相互作用或与细胞表面受体结合, 从而防止病毒进入宿主细胞(图 2)^[77]。此外, 分子量和电荷也会影响石莼多糖的抗病毒活性。

4.1.2 抗氧化活性

Chen 等^[33]通过不同的提取方法制备石莼多糖, 并分别对它们的抗氧化活性进行了评估。研究结果表明相对于热水提取, 超声波提取和超声波酶辅助提取, 酶辅助提取得到的石莼多糖具有更好的 DPPH 自由基清除能力。SulastriEvi 等^[78]评估了盐酸提取获得的石莼多糖制备的水凝胶的抗氧化活性, 研究表明随着石莼多糖浓度的增加, 石莼多糖薄膜对羟基自由基的抑制作用不断提高。Yuan 等^[43]分析了微波辅助提取得到的石莼多糖的抗氧化活性, 研究结果发现石莼多糖表现出 27.6% 的 DPPH 自由基清除能力, 68.6% 的 ABTS⁺ 自由基清除能力和较好的还原活性。Li 等^[52]以昆明小鼠为实验对象, 通过热水提取的石莼多糖 (U), 纯化后的石莼多糖 (FU) 和高硫酸基团含量的纯化石莼多糖 (HFU) 分别喂食来评估石莼多糖的抗氧化活性。研究结果表明, 体外试验中 FU 和 HFU 清除羟基自由基的能力都高于 Vc。而在体内试验中发现, 不同浓度

的 HFU 组能够显著增加过氧化氢酶 (CAT), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 并降低丙二醛 (MDA) 水平。这些结果表明石莼多糖在体外具有很好的清除 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的能力, 而在体内会通过影响 CAT, GSH-Px 和 SOD 的活性来达到抗氧化活性的目的。然而, 需要进一步研究石莼多糖影响体内抗氧化酶表达的机制, 以确定所涉及信号通路。

4.1.3 抗高脂活性

Sathivela 等^[79]使用热水提取得到的粗石莼多糖喂食成年雄性白化病大鼠来评估其抗高脂活性, 结果表明石莼多糖能够显著抑制血清甘油三酯、游离脂肪酸和总胆固醇水平的急性升高, 同时能显著降低高密度脂蛋白 (HDL), VLDL 水平并对低密度脂蛋白 (LDL) 的升高有平行抑制作用。Qi 等^[11]评估了经过硫酸化处理的通过热水提取得到的石莼多糖 (HU) 和未经过硫酸化处理的石莼多糖 (U) 对昆明小鼠的抗高脂活性, 研究结果表明 U 和 HU 都具有抗高脂活性。但是相对于 U 喂养组, HU 喂养组的抗高脂活性更好, 三酰甘油 (TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 浓度分别显著下降了 28.1% 和 28.4%。Li 等^[80]评估了热水提取获得的石莼多糖 (U) 和纯化的石莼多糖 (F1 和 F2) 的抗高脂活性, 研究结果表明剂量 ≥ 250 mg/kg 的 F1 (平均分子量为 190 ku) 能够显著降低 LDL-C 的水平和提高高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 的水平, 而分子量相对较小的 F2 (平均分子量为 83 ku) 能够显著降低血清胆固醇 (TC) 和 TG 的水平。此外, 纯化的石莼多糖具有更好的抗高脂活性。这些结果表明石莼多糖的抗高脂活性似乎由多种机制并行运作, 其平衡取决于石莼多糖的结构特征。这为优化抗高脂补充剂提供了可能, 以进行更有针对性的应用。

4.1.4 抗癌活性

Abd-Elatef 等^[81]通过热水提取获得的石莼多糖对预防 Wistar 大鼠乳房致癌活性进行了研究, 结果表明石莼多糖不仅能够增加肿瘤抑制蛋白 p53 的表达和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST), GPx, CAT 的酶活性, 还能显著降低血清 TNF- α 和 No 水平。Shao 等^[82]评估了热水提取获得的石莼多糖通过部分脱硫后对 DLD 肠癌细胞生长的抑制作用, 研究结果表明大分子量脱硫的样品 DS-UFP₃ 在 4 mg/mL 的剂量时表现出的抑制作用最高。石莼多糖的抗癌活性似乎是通过多种途径发挥作用, 包括促进癌细胞凋亡、减少癌细胞增殖和刺激先天免疫反应等。

4.1.5 免疫调节活性

Klongklaewad 等^[35]评估了热水提取制备的石莼

多糖对太平洋白虾的免疫调节和抗病毒活性, 发现石莼多糖对免疫相关基因 (抗脂多糖因子 (ALF)、原酚氧化酶 (proPO)、SOD、谷氨酰胺转移酶 (Trans)、溶菌酶 (Lyso)、C-型凝集素 (Clectin) 和脂多糖和 β -13-葡聚糖结合蛋白 (LGBP)) 的表达起到了不同程度的促进作用, 并对黄头病毒 (YHV) 有很好的预防作用, 大大降低了其死亡率和病毒载量。Fernández-D ázde 等^[6]对草酸钠提取的石莼多糖的免疫调节活性进行了评估, 研究结果发现石莼多糖能够刺激巨噬细胞内活性氧的增加。Harikrishnan 等^[83]评估了石莼多糖对露斯塔野鲮的免疫调节活性, 研究发现 50 mg/kg 石莼多糖添加量能够很好地提升吞噬 (PC) 活性, 呼吸爆发 (RB) 活性, 替代补体活性 (ACP/ACH₅₀), 活性血清溶菌酶 (Lyz) 的酶活和血清总免疫球蛋白 M (IgM) 水平。此外, 石莼多糖还能促进抗氧化相关基因 (SOD、GPx、自然杀伤细胞增强因子 β (NKEF- β) 基因等) 和抗炎相关基因 (toll 样受体 22 (TLR22)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等) 的表达。石莼多糖可以通过促进免疫相关基因的表达, 提升 PC、RB 和 ACP/ACH₅₀ 的活性达到免疫调节剂的作用。

4.1.6 植物防御活性

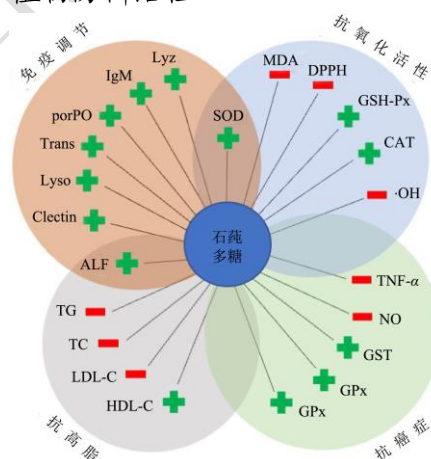


图3 石莼多糖的生物活性机制

Fig.3 Putative mechanisms related to the biological properties of ulvan

石莼多糖在植物保护方面也有不错的作用。Shomron 等^[84]评估了热化学提取的石莼多糖对鲜食葡萄防御反应机制的诱导活性进行了研究, 研究结果表明从 *Ulva rigida* 提取得到的石莼多糖能够提高活性氧和过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和几丁质酶的酶活性, 从而起到减少鲜食葡萄腐烂的作用。Borba 等^[85]研究了热水提取获得的石莼多糖诱导小麦对小麦酵母菌的抗性, 发现石莼多糖虽然不能直接起到抗真菌的作用, 但是可以通过诱发效应激活编码 PR 蛋白的基因

(PR-2 和 PR-3)、ROS 代谢 (OXO) 和基于八十烷基通路 (LOX 和 AOS)。然而, 石莼多糖的应用会受到大分子量带来的生物利用率差, 溶解度低等问题。Paulert 等^[86]评估了热水提取的石莼多糖调节欧芹和罗勒中的免疫调节活性, 研究表明石莼多糖可以增加欧芹和罗勒中水杨酸 (SA)、水杨酸 β -葡萄糖苷 (SAG) 和脱骨酸 (ABA) 的水平, 此外还能增加了罗勒中的茉莉酸 (JA) 积累。石莼多糖表现出作为生

物诱导剂的显著活性和作为启动剂的能力, 增强了植物健康和抵抗力。

总之, 石莼多糖的生物活性, 如抗病毒、抗氧化、抗癌症、抗高脂和免疫调节, 与其基本生物活性密切相关, 对植物的防御机制也有一定的调节作用。值得注意的是, 石莼多糖的生物活性与其分子量、结构特征和组成密切相关 (图 3)。

表 3 不同提取方法获得的石莼多糖活性汇总

Table 3 Activity summary of ulvans obtained by different extraction methods

多糖来源	提取方法	生物活性	文献
<i>U. rigida</i> , <i>U. lactuca</i>	草酸铵提取	抗病毒 SARS-CoV-2 活性	[75]
<i>U. armoricana</i>	酶辅助提取	抗单纯疱疹病毒 1 型和抗氧化活性	[45]
<i>U. pertusa</i>	热水提取	抗水泡性口炎病毒活性	[76]
<i>U. prolifera</i>	微波辅助提取	抗氧化活性	[43]
<i>U. pertusa</i>	酶辅助提取	抗氧化活性	[33]
<i>U. lactuca</i>	氯化氢提取	抗氧化活性	[78]
<i>U. pertusa</i>	热水提取	抗氧化活性和抗高脂活性	[52]
<i>U. lactuca</i>	热水提取	抗过氧化和抗高脂活性	[79]
<i>U. pertusa</i>	热水提取	抗高脂活性	[11]
<i>U. pertusa</i>	热水提取	抗氧化和抗高脂活性	[80]
<i>U. lactuca</i>	热水提取	预防 Wistar 大鼠乳房致癌	[81]
<i>U. fasciata</i>	热水提取	对 DLD 癌细胞的抑制作用	[82]
<i>U. ohnoi</i>	草酸钠提取	免疫调节活性	[6]
<i>U. intestinalis</i>	热水提取	免疫调节和抗黄头病毒 (YHV) 活性	[35]
<i>U. rigida</i>	热水提取	对鲜食葡萄的防御反应机制的诱导活性	[84]
<i>U. fasciata</i>	热水提取	保护和诱导对真菌的抵抗力	[85]
<i>U. intestinalis</i>	热水提取	调节欧芹和罗勒中的代谢物和激素平衡	[86]

4.2 石莼寡糖活性

目前, 关于石莼寡糖活性的相关研究和报道在不断增多, 但是文献报道的较为零散, 而且由于石莼寡糖结构的复杂性, 相关活性的机制及寡糖的构效关系尚未确定。Chi 等^[76]评估了通过 PL25 家族的石莼多糖裂解酶制备的不同分子量石莼寡糖对水泡性口炎病毒 (VSV) 的抗病毒活性, 结果表明 100 μ L/mL 较低分子量的降解石莼寡糖具有和未降解的石莼多糖相似的抗病毒活性。在与天然多糖活性相似的情况下, 低分子量多糖更有利于补充剂和药物的开发。Li 等^[87]研究了通过酶法制备的石莼寡糖的抗炎性肠病 (IBD) 的作用, 研究表明 50 mg/kg 的石莼寡糖开始对 IBD 表现出保护作用, 浓度在 100~120 mg/kg 的石莼寡糖保护作用最佳。此外, 石莼寡糖能够减少右旋糖酐硫酸钠 (DSS) 对结肠上皮组织损伤。Tabarsa 等^[88]研究发现低分子量和高硫酸基团成分的石莼寡糖能够

有效地增殖 RAW264.7 巨噬细胞, 这表明低分子量的寡糖具有更好的生物利用率。并刺激 RAW264.7 细胞释放大量一氧化氮、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-10 和 IL-12 细胞因子, 具有温和的免疫调节活性。Carvalho 等^[89]研究了石莼寡糖对人类宫颈癌细胞的细胞毒性, 研究结果发现降解制备的石莼寡糖的存在可以提高石莼多糖的抗癌活性。Berria 等^[14]用 *U. armoricana* 纯化获得的低分子量 (4.4 ku) 石莼寡糖 (5~500 μ g/mL) 处理的猪肠上皮 (IPEC-1) 细胞系增加了 mRNA 和细胞因子的蛋白质表达 (例如 CCL20、IL-8 和 TNF- α)。Qi 等^[90]采用 H₂O₂ 氧化法降解制备不同分子量的石莼寡糖, 其研究发现, 相对于高分子量的石莼多糖, 降解的石莼寡糖具有更高的抗氧化活性。孙西峰等^[56]考察了 H₂O₂ 氧化法制备的石莼寡糖的保湿活性, 发现降解的石莼寡糖一样具有较好的保湿活性。Yu 等^[59]在雄性 Wistar 大鼠模型上对石莼寡糖的抗高脂活性进行研究, 结果发现石莼寡糖喂养的大鼠 HDL 胆固醇的增

加和 TG 的减少分别达到 2.0 倍和 46.4%。这表明降解制备的石莼寡糖对与糖尿病相关的高脂血症比未降解的石莼多糖更有益。Paulert 等^[17]考察了酸水解法制备石莼寡糖的诱导双子叶植物的氧化爆发活性, 研究结果表明低分子量石莼寡糖可以像石莼多糖一样具有影响植物生长的活性, 并且其诱导活性不需要酸性硫酸化。这一发现弥补了高分子量多糖由于溶解度或高粘度而难以在常规农业环境中应用的问题。Aboura ħhaa 等^[91]评估了石莼多糖和石莼多糖裂解酶降解制备的石莼寡糖对苹果防御相关反应和腐烂的影响, 研究结果表明石莼寡糖能够完全抑制水果上蓝色和青色霉菌的生长。此外, 石莼寡糖相对于石莼多糖能够更好的刺激苹果的免疫调节系统, 如抗氧化相关酶的激活、苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、过氧化物酶 (POD) 和多酚氧化酶 (PPO) 活性的增强等。目前对于石莼寡糖活性的研究较为粗浅, 这也是由于石莼多糖的结构过于复杂, 而且尚未有适当的方法获取精细结构确定的寡糖来研究寡糖的构效关系。

5 结论与展望

随着石莼多糖的制备工艺不断的优化, 从石莼中提取出来的石莼多糖的比例在不断提高。从传统提取方法 7%~24.4% 的较低产率^[33,34,36], 到酶辅助提取方法和微波辅助提取方法达到的 35.3%^[45]和 40.4%^[48]的较高产率。此外, 通过纯化获得高纯度的石莼多糖对其结构及活性的研究起到关键作用。正如 Glasson 等^[40]通过纯化的不同来源的石莼多糖对石莼多糖的单糖组成和结构进行分析, 并对纯化石莼多糖的体内和体外抗氧化活性及酶的抑制活性进行分析, 其结果具有更高的置信度。通过酶法制备石莼寡糖的方法相对于化学法和物理法具有更温和的反应条件, 更高的反应效率以及产生非还原端具有不饱和键的寡糖^[92]。此外, 石莼多糖及其寡糖丰富的生物活性使得其在食品、医药、化妆品和其他领域具有潜在的应用前景。

然而, 与其他海洋硫酸多糖卡拉胶和岩藻多糖相比, 对石莼多糖结构和生物特性的研究仍处于早期阶段。一方面, 石莼多糖的高值化开发仍受到规模化制备工艺技术不成熟和纯度较低的影响, 即无法实现工业化生产高纯度的石莼多糖。另一方面, 石莼多糖的物理化学性质和生物活性的关系以及生物活性的作用机理仍然不明晰。这是因为高度精细化的结构-功能特性以及完全表征的石莼多糖对高度精确目标的活性的相关研究还比较匮乏。而石莼寡糖作为石莼多糖的降解产物, 保留了石莼多糖的各种生理活性和其他优良特性。虽然高效降解石莼多糖的工具酶石莼多糖裂解

酶已被发现并取得了一定的研究成果, 但是报告的酶仍然无法满足工业应用的需求, 部分原因是缺乏序列信息、稳定性和活性低下。因此, 对于工业应用, 迫切需要高活性和优异稳定性的石莼多糖裂解酶及其完整的序列信息。此外, 精确分析石莼多糖和寡糖的精细结构对于研究石莼多糖和寡糖的构效关系、促进石莼多糖的高值化开发和有效利用具有重要的推动作用。未来, 随着工业化生产高纯度石莼多糖的实现, 越来越多优秀生化特性石莼多糖裂解酶的发现以及石莼多糖及寡糖的的构效关系的明晰, 石莼多糖这类丰富的绿色海洋生物质资源能够得到更为充分的利用。

参考文献

- [1] M Lahaye, A Robic. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds [J]. *Biomacromolecules*, 2007, 8: 1765-1774.
- [2] C Taboada, R Millán, I Míguez. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida* [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2010, 90: 445-449.
- [3] J Olsson, G B Toth, A Oerbekke, et al. Cultivation conditions affect the monosaccharide composition in *Ulva fenestrata* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32: 3255-3263.
- [4] Q Wang, S Dong, X Tian, et al. Effects of circadian rhythms of fluctuating temperature on growth and biochemical composition of *Ulva pertusa* [J]. *Hydrobiologia*, 2007, 586: 313-319.
- [5] J T Kidgell, M Magnusson, R De Nys, et al. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function [J]. *Algal Research*, 2019, 39: 101422.
- [6] Catalina Fernández-Dáz, Olivier Coste, Erik-jan Malta. Polymer chitosan nanoparticles functionalized with *Ulva ohnoi* extracts boost *in vitro* ulvan immunostimulant effect in *Solea senegalensis* macrophages [J]. *Algal Research*, 2017, 26: 135-142.
- [7] J T Kidgell, C R K Glasson, M Magnusson, et al. The molecular weight of ulvan affects the *in vitro* inflammatory response of a murine macrophage [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 839-848.
- [8] C Faggio, M Pagano, A Dottore, et al. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides [J]. *Natural Product Research*, 2016, 30: 1934-1937.
- [9] L S Costa, G P Fidelis, S L Cordeiro, et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2010, 64: 21-28.

- [10] H Qi, Y Sun. Antioxidant activity of high sulfate content derivative of ulvan in hyperlipidemic rats [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 76: 326-329.
- [11] H Qi, L Huang, X Liu, et al. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87: 1637-1640.
- [12] S Shefer, M Lebediker, A Finkelshtein, et al. Ulvan crude extract's chemical and biophysical profile and its effect as a biostimulant on *Arabidopsis thaliana* [J]. Algal Research, 2022, 62: 102609.
- [13] S M Samah, A H Hadear. Potential using of ulvan polysaccharide from *Ulva lactuca* as a prebiotic in synbiotic yogurt production [J]. Journal of Probiotics & Health, 2019, 07.
- [14] M Berri, M Olivier, S Holbert, et al. Ulvan from *Ulva armoricana* (Chlorophyta) activates the PI3K/Akt signalling pathway via TLR4 to induce intestinal cytokine production [J]. Algal Research, 2017, 28: 39-47.
- [15] 任淑静,罗静如,F Bussy,等.石莼绿藻提取物能够增强仔猪的抗病能力[J].国外畜牧学(猪与禽),2020,40(9):82-87.
- [16] 林盛杰,刘德海.向文洲.石莼提取物应用护肤品功效研究[J].广东化工,2016,43(14):29-30,28.
- [17] R Paulert, F Brunel, R L J Melcher, et al. The non-sulfated ulvanobiuronic acid of ulvans is the smallest active unit able to induce an oxidative burst in dicot cells [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 270: 118338.
- [18] M Shanmugam, B K Ramavat, K H Mody, et al. Distribution of heparinoid-active sulphated polysaccharides in some Indian marine green algae [J]. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 2001, 30: 222-227.
- [19] A Robic, J F Sassi, P Dion, et al. Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the brittany coast1 [J]. Journal of Phycology, 2009, 45(4): 962-973.
- [20] J T Kidgell, S M Camachan, M Magnusson, et al. Are all ulvans equal? A comparative assessment of the chemical and gelling properties of ulvan from blade and filamentous *Ulva* [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 264: 118010.
- [21] M B Samarasinghe, M E van der Heide, M R Weisbjerg, et al. A descriptive chemical analysis of seaweeds, *Ulva* sp., *Saccharina latissima* and *Ascophyllum nodosum* harvested from Danish and Icelandic waters [J]. Animal Feed Science and Technology, 2021, 278: 115005.
- [22] M Guidara, H Yaich, S Benelhadj, et al. Smart ulvan films responsive to stimuli of plasticizer and extraction condition in physico-chemical, optical, barrier and mechanical properties [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 714-726.
- [23] A Benslima, S Sellimi, M Hamdi, et al. The brown seaweed *Cystoseira schiffneri* as a source of sodium alginate: Chemical and structural characterization, and antioxidant activities [J]. Food Bioscience, 2021, 40: 100873.
- [24] E G P Stender, C Dybdahl Andersen, F F̄redslund, et al. Structural and functional aspects of mannuronic acid-specific PL6 alginate lyase from the human gut microbe *Bacteroides cellulosilyticus* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294: 17915-17930.
- [25] B Yang, G Yu, X Zhao, et al. Structural characterisation and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulphated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis* [J]. Food Chemistry, 2011, 124: 50-57.
- [26] T T T Thanh, T M T Quach, T N Nguyen, et al. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 93: 695-702.
- [27] Y Chi, H Li, P Wang, et al. Structural characterization of ulvan extracted from *Ulva clathrata* assisted by an ulvan lyase [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115497.
- [28] 杨莉,陈文宁,郑娟霞,等.海藻多糖的提取,分离纯化及其在食品工业的应用[J].食品工业科技,2021,42(9):365-372.
- [29] 刘欢,陈胜军,杨贤庆.海藻多糖的提取、分离纯化与应用研究进展[J].食品工业科技,2018,39(12):341-346.
- [30] 田鑫,李秀霞,吴科阳,等.海藻多糖提取纯化及生物活性的研究进展[J].食品与发酵科技,2015,51(6):81-85.
- [31] R Pankiewicz, B Łęska, B Messyasz, et al. First isolation of polysaccharidic ulvans from the cell walls of freshwater algae [J]. Algal Research, 2016, 19: 348-354.
- [32] N Wahlström, F Nylander, E Malmhäll-Bah, et al. Composition and structure of cell wall ulvans recovered from *Ulva* spp.along the Swedish west coast [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 233: 115852.
- [33] J Chen, W Zeng, J Gan, et al. Physicochemical properties and anti-oxidation activities of ulvan from *Ulva pertusa* Kjellm [J]. Algal Research, 2021, 55: 102269.
- [34] G Paradossi, F Cavaliere, L Pizzoferrato, et al. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 25: 309-315.
- [35] N Klongklaew, J Praiboon, M Tamtin, et al. Chemical

- composition of a hot water crude extract (HWCE) from *Ulva intestinalis* and its potential effects on growth performance, immune responses, and resistance to white spot syndrome virus and yellowhead virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 112: 8-22.
- [36] G Toskas, R-D Hund, E Laourine, et al. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva rigida* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84: 1093-1102.
- [37] I Podolean, S M Coman, C Bucur, et al. Catalytic transformation of the marine polysaccharide ulvan into rare sugars, tartaric and succinic acids [J]. *Catalysis Today*, 2022, 383: 345-357.
- [38] H Yaich, H Garna, S Besbes, et al. Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca* [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 31: 375-382.
- [39] C R K Glasson, I M Sims, S M Carnachan, et al. A cascading biorefinery process targeting sulfated polysaccharides (ulvan) from *Ulva ohnoi* [J]. *Algal Research*, 2017, 27: 383-391.
- [40] C R K Glasson, C A Luiten, S M Carnachan, et al. Structural characterization of ulvans extracted from blade (*Ulva ohnoi*) and filamentous (*Ulva tepida* and *Ulva prolifera*) species of cultivated *Ulva* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 571-579.
- [41] 冯学珍,伍善广,孔靖,等.超声辅助提取石莼多糖工艺优化及其清除 DPPH 自由基活性研究[J].*中药材*,2013,36(11): 1870-1872.
- [42] S Tsubaki, K Oono, M Hiraoka, et al. Microwave-assisted hydrothermal extraction of sulfated polysaccharides from *Ulva* spp. and *Monostroma latissimum* [J]. *Food Chemistry*, 2016, 210: 311-316.
- [43] Y Yuan, X Xu, C Jing, et al. Microwave assisted hydrothermal extraction of polysaccharides from *Ulva prolifera*: Functional properties and bioactivities [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 181: 902-910.
- [44] H Fernandes, J M Salgado, N Martins, et al. Sequential bioprocessing of *Ulva rigida* to produce lignocellulolytic enzymes and to improve its nutritional value as aquaculture feed [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 281: 277-285.
- [45] K Hardouin, G Bedoux, A-S Burlot, et al. Enzyme-assisted extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxidant extracts from the green seaweed *Ulva armoricana* (Ulvales, Ulvophyceae) [J]. *Algal Research*, 2016, 16: 233-239.
- [46] H Yaich, H Garna, S Besbes, et al. Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 40: 53-63.
- [47] A Robic, C Rondeau-Mouro, J F Sassi, et al. Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77: 206-216.
- [48] M Magnusson, C R K Glasson, M J Vucko, et al. Enrichment processes for the production of high-protein feed from the green seaweed *Ulva ohnoi* [J]. *Algal Research*, 2019, 41: 101555.
- [49] A K Siddhanta, A M Goswami, B K Ramavat. Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters [J]. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 2001, 30: 166-172.
- [50] H Qi, Q Zhang, T Zhao, et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, 37: 195-199.
- [51] A Robic, J F Sassi, M Lahaye. Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74: 344-352.
- [52] B Li, H Xu, X Wang, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of high sulfate content purified polysaccharide from *Ulva pertusa* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 146: 756-762.
- [53] Y Chi, H Li, L Fan, et al. Metal-ion-binding properties of ulvan extracted from *Ulva clathrata* and structural characterization of its complexes [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 272: 118508.
- [54] S Li, Q Xiong, X Lai, et al. Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 2016, 15: 237-250.
- [55] 冯学珍,陈颖,伍善广.石莼多糖的单糖组成成分分析[J].*食品工业科技* 2014,35(7):91-94.
- [56] 孙西峰,刘效磊.不同分子量孔石莼多糖保湿活性的研究[J].*生物技术世界*,2014,2(12):155-156.
- [57] 许雅楠,吕峰,李燕妹.石莼多糖部分降解工艺优化[J].*福建水产*,2019,41(1):42-49.
- [58] 李燕妹,吕峰,许雅楠,等.超声辅助酶法提取石莼功能性寡糖关键工艺优化[J].*福建水产*,2018,40:458-468.
- [59] Y Pengzhan, L Ning, L Xiguang, et al. Antihyperlipidemic

- effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) [J]. *Pharmacological Research*, 2003, 48: 543-549.
- [60] M Kopel, W Helbert, Y Belnik, et al. New family of ulvan lyases identified in three isolates from the *Alteromonadales* order [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291: 5871-5878.
- [61] H-M Qin, D Gao, M Zhu, et al. Biochemical characterization and structural analysis of ulvan lyase from marine *Alteromonas* sp. reveals the basis for its salt tolerance [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 1309-1317.
- [62] H-M Qin, P Xu, Q Guo, et al. Biochemical characterization of a novel ulvan lyase from *Pseudoalteromonas* sp. strain PLSV [J]. *RSC Advances*, 2018, 8: 2610-2615.
- [63] F Xu, F Dong, X-H Sun, et al. Mechanistic insights into substrate recognition and catalysis of a new ulvan lyase of polysaccharide lyase family 24 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87: e00412-00421.
- [64] E Foran, V Buravenkov, M Kopel, et al. Functional characterization of a novel "ulvan utilization loci" found in *Alteromonas* sp. LOR genome [J]. *Algal Research*, 2017, 25: 39-46.
- [65] V R Konasani, C Jin, N G Karlsson, et al. Ulvan lyase from *Formosa agariphila* and its applicability in depolymerisation of ulvan extracted from three different *Ulva* species [J]. *Algal Research*, 2018, 36: 106-114.
- [66] L Reisky, C Stanetty, M D Mihovilovic, et al. Biochemical characterization of an ulvan lyase from the marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102: 6987-6996.
- [67] J Gao, C Du, Y Chi, et al. Cloning, expression, and characterization of a new PL25 family ulvan lyase from marine bacterium *Alteromonas* sp. A321 [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17: 568.
- [68] P Nyvall Colln, J-F Sassi, H Rogniaux, et al. Ulvan lyases isolated from the flavobacteria *persicivirga* *ulvanivorans* are the first members of a new polysaccharide lyase family [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286: 42063-42071.
- [69] D Wang, Y Li, L Han, et al. Biochemical properties of a new polysaccharide lyase family 25 ulvan lyase TsUly25B from marine bacterium *Thalassomonas* sp. LD5 [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20: 168.
- [70] T Ulaganathan, W Helbert, M Kopel, et al. Structure-function analyses of a PL24 family ulvan lyase reveal key features and suggest its catalytic mechanism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293: 4026-4036.
- [71] T S Ulaganathan, M T Boniecki, E Foran, et al. New ulvan-degrading polysaccharide lyase family: structure and catalytic mechanism suggests convergent evolution of active site architecture [J]. *ACS Chemical Biology*, 2017, 12(5): 1269-1280.
- [72] T Ulaganathan, E Banin, W Helbert, et al. Structural and functional characterization of PL28 family ulvan lyase NLR48 from *Nonlabens ulvanivorans* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293: 11564-11573.
- [73] V R Konasani, C Jin, N G Karlsson, et al. A novel ulvan lyase family with broad-spectrum activity from the ulvan utilisation loci of *Formosa agariphila* KMM 3901 [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 14713.
- [74] M Bumgen, T Dutschei, D Bartosik, et al. A new carbohydrate-active oligosaccharide dehydratase is involved in the degradation of ulvan [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 297: 101210.
- [75] R A Shefer S, Chemodanov A, Lebendiker M, et al. Fighting SARS-CoV-2 with green seaweed *Ulva* sp. extract: extraction protocol predetermines crude ulvan extract anti-SARS-CoV-2 inhibition properties in *in vitro* Vero-E6 cells assay [J]. *Peer J*, 2021, 9: e12398.
- [76] Y Chi, M Zhang, X Wang, et al. Ulvan lyase assisted structural characterization of ulvan from *Ulva pertusa* and its antiviral activity against vesicular stomatitis virus [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 157: 75-82.
- [77] M Kim, J H Yim, S-Y Kim, et al. *In vitro* inhibition of influenza A virus infection by marine microalga-derived sulfated polysaccharide p-KG03 [J]. *Antiviral Research*, 2012, 93(2): 253-259.
- [78] E Sulastri, M S Zubair, R Lesmana, et al. Development and characterization of ulvan polysaccharides-based hydrogel films for potential wound dressing applications [J]. *Drug Design Development and Therapy*, 2021, 15: 4213-4226.
- [79] A Sathivel, H R B Raghavendran, P Srinivasan, et al. Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on d-galactosamine induced hepatitis in rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46: 3262-3267.
- [80] W Li, K Wang, N Jiang, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of purified polysaccharides from

- Ulva pertusa* [J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30: 2619-2627.
- [81] G Abdellatef, O M Ahmed, E S Abdelreheim, et al. *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation [J]. Breast Cancer Targets & Therapy, 2017, 9: 67-83.
- [82] P Shao, Y Pei, Z Fang, et al. Effects of partial desulfation on antioxidant and inhibition of DLD cancer cell of *Ulva fasciata* polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 65: 307-313.
- [83] R Hari Krishnan, G Devi, H Van Doan, et al. Efficacy of ulvan on immune response and immuno-antioxidant gene modulation in *Labeo rohita* against columnaris disease [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2021, 117: 262-273.
- [84] A Shomron, D Duanis-Assaf, O Galsurker, et al. Extract from the macroalgae *Ulva rigida* induces table grapes resistance to *Botrytis cinerea* [J]. Foods, 2022, 11: 723.
- [85] M C De Borba, A C Velho, A Maia-Grondard, et al. The algal polysaccharide ulvan induces resistance in wheat against *Zymoseptoria tritici* without major alteration of leaf metabolome [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 1669.
- [86] R Paulert, R Ascrizzi, S Malatesta, et al. *Ulva intestinalis* extract acts as biostimulant and modulates metabolites and hormone balance in basil (*Ocimum basilicum* L.) and parsley (*Petroselinum crispum* L.) [J]. Plants, 2021, 10: 1391.
- [87] Y Li, H Ye, T Wang, et al. Characterization of low molecular weight sulfate *Ulva* polysaccharide and its protective effect against IBD in mice [J]. Marine Drugs, 2020, 18: 499.
- [88] M Tabarsa, S You, E H Dabaghian, et al. Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2018, 26: 599-608.
- [89] M M De Carvalho, M D Nosedá, J C C Dallagnol, et al. Conformational analysis of ulvans from *Ulva fasciata* and their anticoagulant polycarboxylic derivatives [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 599-608.
- [90] H Qi, T Zhao, Q Zhang, et al. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta) [J]. Journal of Applied Phycology, 2005, 17: 527-534.
- [91] E Aboura ĩha, Z El Alaoui-Talibi, R El Boutachfaiti, et al. Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae [J]. Scientia Horticulturae, 2015, 181: 121-128.
- [92] T Ulaganathan, M T Boniecki, E Foran, et al. New ulvan-degrading polysaccharide lyase family: structure and catalytic mechanism suggests convergent evolution of active site architecture [J]. Acs Chemical Biology, 2017, 12: 1269-1280.