



响应面法优化长茎葡萄蕨藻多糖提取工艺及抗氧化活性

童艳梅^{1,2}, 陈秀荔², 胡庭俊¹, 刘青云^{2,3}, 李强勇^{2,3}, 冯鹏霏²,
杨春玲², 彭敏², 朱威霖², 潘传燕², 曾地刚², 赵永贞^{2,3*}

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西南宁 530005;

2. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西南宁 530021;

3. 广西虾类繁育工程技术研究中心, 广西南宁 530021)

摘要: 为了探究提取长茎葡萄蕨藻多糖的最优工艺及抗氧化活性, 对目前已有的多糖提取方法进行筛选, 并采用单因素实验和响应面实验的方法, 对料液比、提取温度、提取时间、木瓜蛋白酶添加量和提取次数这 5 个因素进行优化。结果显示, 添加木瓜蛋白酶提取长茎葡萄蕨藻多糖的方法最高效便捷, 且当料液比 1:40, 提取温度 50 °C, 提取时间 3 h, 提取次数 2 次, 以及木瓜蛋白酶添加量为 2.0% 时, 长茎葡萄蕨藻多糖提取率相对较高, 可达 41.24%±0.09%。进一步的实验结果显示, 长茎葡萄蕨藻多糖对 DPPH 和 ABTS 自由基均具有良好的清除活性, 其 IC₅₀ 值分别为 2.32 和 0.67 mg/mL。研究表明, 使用优化后的木瓜蛋白酶酶解法能有效提高长茎葡萄蕨藻多糖的提取率, 且长茎葡萄蕨藻多糖具有良好的抗氧化活性。本研究可为长茎葡萄蕨藻多糖的开发利用提供理论基础和参考依据。

关键词: 长茎葡萄蕨藻; 多糖; 木瓜蛋白酶; 响应面法; 抗氧化性

中图分类号: S 985.4⁹

文献标志码: A

长茎葡萄蕨藻 (*Caulerpa lentillifera*) 属于绿藻门 (Chlorophyta) 羽藻目 (Bryopsidophyceae) 蕨藻科 (Caulerpaceae) 蕨藻属 (*Caulerpa*), 是一种多年生大型可食用海藻, 因其直立茎球状体晶莹剔透、圆润饱满似葡萄, 且藻体软嫩多汁, 口感如鱼子酱般丰富, 又有“海葡萄”和“绿色鱼子酱”的美称^[1]。长茎葡萄蕨藻具有丰富的营养成分, 含人体所需的多种氨基酸、维生素、多糖和脂肪酸等, 是最符合人类食用的蕨藻之一^[2]。研究表明, 长茎葡萄蕨藻的粗多糖含量占干重的 34.00%~64.97%^[2-8], 高于绝大部分的可食用海藻, 如马尾藻 (*Scagassum*)、羊栖菜 (*Hizikia fusiforme*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)^[9] 等, 具有较高的经济价值。

目前长茎葡萄蕨藻多糖的提取方式主要有水提取法、碱提取法和超声波辅助提取法等方法, 其提取率为 3.22%~11.30%^[10-14], 表明仍有大量的长茎葡萄蕨藻多糖未被完全提取。王小兵等^[15] 采用速溶剂萃取技术 (ASE) 提取长茎葡萄蕨藻多糖, 多糖提取率能达到 51.03%, 但该方法对仪器条件的要求较苛刻, 成本较高。因此, 研发一种温和、高效、低成本的长茎葡萄蕨藻多糖提取工艺对于促进长茎葡萄蕨藻深加工产业的发展意义重大。

酶解法是近年来使用最为广泛的植物多糖提取方法, 郑朝阳等^[16] 研究表明, 木瓜蛋白酶能水解植物中的游离蛋白质, 减少多糖与蛋白质的结合, 从而有效提高多糖提取率。为此, 本研究将

收稿日期: 2021-10-09 修回日期: 2021-11-15

资助项目: 广西科技计划项目“南美白对虾与长茎葡萄蕨藻工厂化生态共养模式研究”(桂科 AB18221113); 国家虾产业技术体系建设专项 (CARS-48)

第一作者: 童艳梅 (照片), 从事中药免疫药理学研究, E-mail: tongyanmei1996@163.com

通信作者: 赵永贞, 从事遗传育种研究, E-mail: fisher1152002@126.com



木瓜蛋白酶酶解法与目前已有的长茎葡萄蕨藻多糖提取方法进行对比筛选, 确定提取多糖的最佳方法, 并采用单因素和响应面法优化提取工艺, 同时也探究了长茎葡萄蕨藻多糖的抗氧化活性, 以为长茎葡萄蕨藻多糖的开发利用提供理论基础和科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

药物 长茎葡萄蕨藻鲜藻委托杭州牧海食品经营有限公司从越南芽庄购入。

主要试剂 木瓜蛋白酶 (G8431)、1,1-二苯基-2-苦基肼 (DPPH) 标准品 (SD9360)、2,2-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-硫酸) 二铵盐 (SA5340), 北京索来宝科技有限公司。NaOH (天津博迪化工有限公司, 批号: 2019年8月23日)。正丁醇 (天津市富宇精细化工有限公司, 批号: 2020年9月25日)。

主要仪器 恒温水浴锅 (英国, Grant

SUB6), 电磁炉 (九阳, JYC-19BE5), 高速冷冻离心机 (德国艾本德, Centrifuge 5810R), 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂, RE-52AA), 冷冻干燥机 (德国 Christ, ALPHA 1-4 LD plus), 电子天平 (沈阳龙腾电子有限公司, ESJ110-48), 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司, DHG-9240A), 高速度功能粉碎机 (永康市云达机械设各厂, JR-200), 酶标仪 (北京普朗新技术有限公司, DNM-9602G)。

1.2 实验方法

制备长茎葡萄蕨藻粉末 用海水清洗长茎葡萄蕨藻, 然后用蒸馏水再洗涤3次, 并在50℃的烘箱中干燥, 随后粉碎过50目药典筛, 并保存在干燥器中备用, 按药典方法测定水分。

筛选提取方法 根据已有文献公布的研究方法, 分别尝试5种不同的提取方法提取长茎葡萄蕨藻粗多糖 (表1), 根据多糖提取率、成本、便捷及可行性确定用于本研究的基础方法。

表1 五种提取长茎葡萄蕨藻粗多糖方法的简要流程

Tab. 1 Summaries of five methods for extracting polysaccharides from *C. lentillifera*

组别 groups	简要流程 summary	参考文献 reference
1	鲜藻→手动榨汁→醇沉→三层纱布过滤多糖→冷冻干燥	[17]
2	藻粉→60℃水提→浓缩→醇沉→冷冻干燥	[12]
3	藻粉→60℃水提→浓缩→醇沉→sevege试剂除蛋白→冷冻干燥	[14]
4	藻粉→60℃水+0.5%木瓜蛋白酶提取→浓缩→醇沉→冷冻干燥	[18]
5	藻粉→60℃2%NaOH提取→浓缩→醇沉→冷冻干燥	[10]

按上述简要流程, 具体方法如下。

①取308g新鲜长茎葡萄蕨藻 (通过预实验得知10g藻粉=308g鲜藻) 洗净, 手动榨汁得到的长茎葡萄蕨藻汁并加入5倍的95%乙醇, 4℃醇沉12h。3500×g离心15min弃去上层乙醇, 收集沉淀溶解在50mL蒸馏水中, 弃去不溶性杂质, 冷冻干燥36h后收集多糖并称重, 记为组1。

②取10g长茎葡萄蕨藻粉末加入200mL蒸馏水, 在60℃下提取2h。提取结束后3500×g离心15min收集上清液。将上清液置于旋转蒸发器中50℃负压浓缩, 得到10mL浓缩提取液, 加入5倍的95%乙醇, 4℃醇沉12h。3500×g离心15min弃去上层乙醇, 收集沉淀溶解在50mL蒸馏水中, 弃去不溶性杂质, 冷冻干燥36h后收集多糖并称重, 记为组2。

③(多糖提取和醇沉步骤同②), 3500×g离

心15min弃去上层乙醇, 收集沉淀溶解在50mL蒸馏水中, 加入Sevege试剂 (氯仿: 正丁醇为4:1, 体积比, 现配现用), 多糖溶液与Sevege体积比为4:1, 置于分液漏斗中, 剧烈振荡15min, 静置30min, 弃去蛋白质层和有机溶剂层, 重复以上操作, 直至无蛋白质出现。冷冻干燥36h后收集多糖并称重, 记为组3。

④取10g长茎葡萄蕨藻粉末加入200mL蒸馏水, 加入质量浓度为0.5%的木瓜蛋白酶, 在60℃下提取2h, pH为6。提取结束后沸水灭酶5min, 3500×g离心15min收集上清液。将上清液置于旋转蒸发器中50℃负压浓缩, 得到10mL浓缩提取液, 加入5倍的95%乙醇, 4℃醇沉12h。3500×g离心15min弃去上层乙醇, 收集沉淀溶解在50mL蒸馏水中, 弃去不溶性杂质,

冷冻干燥 36 h 后收集多糖并称重, 记为组 4。

⑤取 10 g 长茎葡萄蕨藻粉末加入 200 mL 质量分数为 2% 的 NaOH 溶液中, 在 60 °C 下提取 5 h。提取后 3 500×g 离心 15 min 收集上清液, 将上清液置于旋转蒸发器中 50 °C 负压浓缩, 得到 10 mL 浓缩提取液, 加入 5 倍的 95% 乙醇, 4 °C 醇沉 12 h。3 500×g 离心 15 min 弃去上层乙醇, 收集沉淀溶解在 50 mL 蒸馏水中, 弃去不溶性杂质, 冷冻干燥 36 h 后收集多糖并称重, 记为组 5。

单因素实验 根据预实验结果, 确定使用方法④提取长茎葡萄蕨藻多糖, 即木瓜蛋白酶酶解法。按照上述方法, 探究料液比 (1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50)、提取温度 (30、40、50、60 和 70 °C)、提取时间 (1、2、3、4 和 5 h)、木瓜蛋白酶添加量 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)、提取次数 (1、2、3 和 4 次), 这 5 个因素对长茎葡萄蕨藻多糖提取的影响。

响应面实验 在单因素实验的基础上, 利用响应面分析法对提取工艺进一步优化。根据 Box-Behnken 实验原理, 选择料液比 (A)、提取时间 (B)、提取温度 (C) 为自变量, 长茎葡萄蕨藻多糖的提取率 (Y) 为响应值, 应用 Design-Expert. V 8.0.6 软件进行三因素三水平的响应面实验分析, 得到长茎葡萄蕨藻多糖提取的最佳工艺参数。

多糖标准曲线的绘制 精确称量 10 mg 标准葡萄糖置于 100 mL 容量瓶中定容。取 7 支具塞玻璃试管, 分别加入 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 及 1.0 mL 的葡萄糖溶液, 用蒸馏水补足体积至 1.0 mL, 充分混匀后迅速置于冰浴中冷却 5 min。取出后加入 4 mL 现配的 0.2% 萘酚硫酸溶液, 摇匀, 立即置于沸水浴中煮沸 10 min。取出, 冷却至室温, 在 620 nm 波长下测定 OD 值。以标准葡萄糖含量 (μg) 为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程: $y=0.003 4x+0.084 1$, $R^2=0.999 2$ 。

长茎葡萄蕨藻多糖提取率的测定 将长茎葡萄蕨藻粗多糖溶解于蒸馏水中, 并将浓度调整至适合测定的范围。精确吸取 1.0 mL 于具塞玻璃试管中, 按照绘制标准曲线的方法操作, 每个样品 3 个重复, 在 620 nm 处测定 OD 值, 根据标准曲线计算多糖浓度, 再按照式 (1) 计算长茎葡萄蕨藻样品中的多糖提取率 (D, %):

$$D = N \times V \times n \times L / M \times 100\% \quad (1)$$

式中, N 代表多糖浓度 (g/mL), V 代表待测体积 (mL), n 代表稀释倍数, L 代表多糖得率, M 代表多糖样品的质量 (g)。

长茎葡萄蕨藻多糖对 ABTS 自由基清除能力的测定 取 ABTS 二铵盐 40.7 mg, 加蒸馏水定容至 10 mL, 配置成 7.4 mmol/L 的 ABTS 二铵盐储备液。再取 $K_2S_2O_8$ 7 mg, 加蒸馏水定容至 10 mL, 配置成 2.6 mmol/L 的过二硫酸钾储备液。将上述两种储备液各取 1 mL 混合, 黑暗环境下室温放置 12 h, 用 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液将混合液稀释 10~20 倍, 直至吸光度为 0.70 ± 0.02 , 此溶液即为 ABTS 自由基工作液。精确称取 5 mg 维生素 C 于容量瓶中, 用超纯水溶解后定容至 100 mL, 实验时稀释成浓度为 20.84 μg/mL 的阳性对照溶液。准确吸取不同体积的待测样品溶液于 96 微孔板中, 再加入 100 μL 的 ABTS 工作液, 用纯水补足体积至 200 μL, 振摇 10 s 以充分混匀后静置 6 min。调节酶标仪波长为 734 nm 测吸光度, 记为 A_{sample} ; 空白组以等体积的纯水代替 ABTS 工作液, 记为 A_{blank} ; 对照组以等体积的纯水代替样品溶液, 记为 A_{control} 。清除率计算同式 (2)。

长茎葡萄蕨藻多糖对 DPPH 自由基清除能力的测定 称取 4 mg DPPH 固体试剂, 95% 乙醇溶解并定容至 100 mL, 配为 40 μg/mL 溶液, 避光保存备用。精确称取 5 mg 维生素 C 置于容量瓶中, 用超纯水溶解后定容至 100 mL, 实验时稀释配制浓度为 20.84 μg/mL 的阳性对照溶液。准确吸取不同体积待测样品溶液于 96 微孔板中, 再加入 100 μL 的 DPPH 溶液, 轻轻混匀后用 95% 乙醇补足体积至 250 μL, 避光反应 30 min。调节酶标仪波长 515 nm 测吸光度, 记为 A_{sample} ; 空白组以等体积的纯水代替 DPPH 溶液, 记为 A_{blank} ; 对照组以等体积的纯水代替样品溶液, 记为 A_{control} 。清除率按下式计算:

$$\text{清除率}(\%) = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100\% \quad (2)$$

2 结果

2.1 筛选提取方法

1~5 组长茎葡萄蕨藻多糖提取率分别为 0.72%、2.44%、3.69%、8.55% 和 3.32%, 其中组 4 的提取率最高, 且操作较为简便 (图 1)。因此,

综合提取效率、操作便捷性以及多糖提取率等因素, 确定以组 4 作为提取方法进行工艺优化, 即使用木瓜蛋白酶酶解法提取长茎葡萄蕨藻多糖。

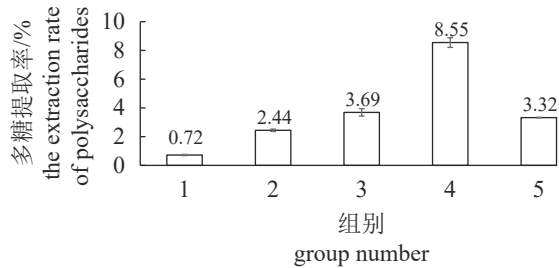


图 1 不同提取方法对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响
1. 鲜藻提取组, 2. 普通水提取组, 3. sevege 试剂处理提取组, 4. 添加木瓜蛋白酶提取组, 5. NaOH 碱提取组。

Fig. 1 Effects of different extraction methods on the extraction rate of polysaccharides from *C. lentillifera*
1. the fresh algae extraction group, 2. the water extraction group, 3. the sevege reagent treatment group, 4. the papain group, 5. the NaOH extraction group.

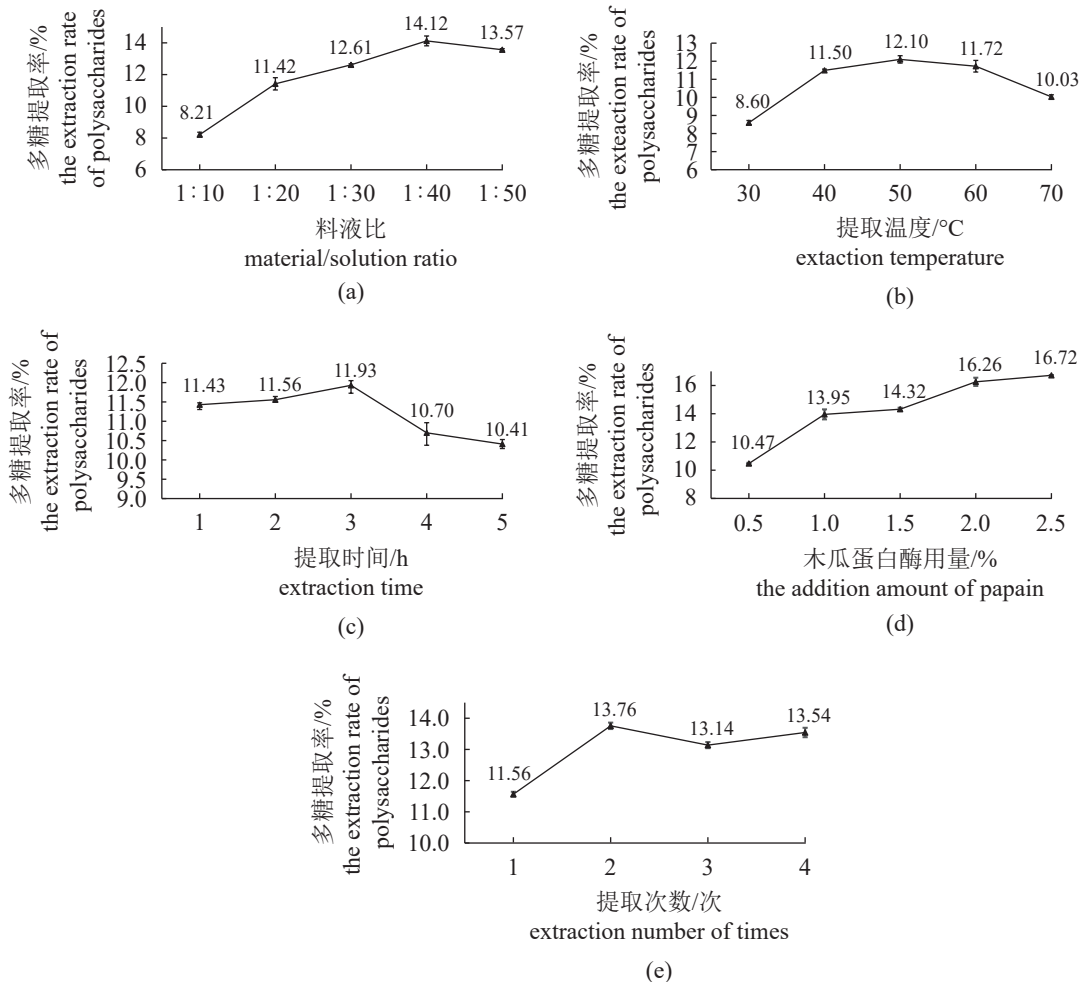


图 2 单因素实验结果

Fig. 2 Single factor test results

添加量达到 2.0% 之后, 多糖提取率趋于平稳, 因此为了控制成本, 确定最佳的木瓜蛋白酶添加量为 2.0%。

提取次数对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响 提取次数提升至 2 次时, 长茎葡萄蕨藻多糖提取率明显增高(图 2-e)。当提取次数大于 2 次后, 多糖提取率略有降低且基本保持不变。因此, 为了节约成本, 提高效率, 提取次数确定为 2 次。

2.3 响应面实验

实验设计及结果 根据单因素实验结果, 确定木瓜蛋白酶添加量为 2.0%, 提取次数为 2 次。随后应用 Design-Expert. V 8.0.6 软件探究料液比、提取温度和提取时间对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响, 实验设计及结果见表 2。

表 2 响应面实验设计及结果

实验编号 test number	A	B	C	多糖提取率/% extraction of polysaccharides
1	1:40	4	40	34.80
2	1:40	3	50	41.00
3	1:50	2	50	36.22
4	1:40	3	50	39.85
5	1:30	3	60	28.29
6	1:50	3	40	36.67
7	1:30	2	50	27.16
8	1:30	3	40	27.95
9	1:40	3	50	43.18
10	1:50	3	60	40.11
11	1:40	3	50	41.05
12	1:40	2	40	34.94
13	1:40	4	60	36.51
14	1:40	3	50	43.06
15	1:30	4	50	26.71
16	1:50	4	50	36.84
17	1:40	2	60	35.36

注: A. 料液比, B. 提取时间(h), C. 提取温度(°C), 下同。
Notes: A. material/solution ratio, B. extraction time (h), C. extraction temperature (°C), the same below.

建立回归方程方差分析 利用 Design-Expert. V 8.0.6 软件对表 2 中的数据进行多元回归拟合, 得到二次项回归方程:

$$Y = 41.63 + 4.97A + 0.15B + 0.74C + 0.27AB + 0.77AC + 0.32BC - 6.02A^2 - 3.87B^2 - 2.35C^2 \quad (3)$$

式中, Y 为长茎葡萄蕨藻多糖提取率, A 、 B 和

C 分别代表料液比、提取时间和提取温度。

方差分析 为了检验长茎葡萄蕨藻多糖提取工艺回归模型的有效性, 对该模型进行方差分析(表 3)。回归模型 $P < 0.0001$, 表明该回归模型具有统计学意义。矫正系数 $R^2(\text{Adj}) = 0.9568$, 表明实验误差小, 准确度高。模型确定系数 $R^2 = 0.9811$, 预测相关系数 $R^2(\text{Pred}) = 0.9506$, 二者的数值接近, 说明偏差在合理范围之内, 实际测量值与预测值的拟合度程度较好, 二者有高度相关性。失拟项 $P = 0.9530 > 0.05$, 结果不显著, 说明选择的模型对该实验的拟合性良好。变异系数 C.V.% 为 3.16%, 反映了模型具有较高的稳定性和可信度。信噪比(Adeq Precisor) 为 17.222, 大于临界值 4, 表明模型的准确度高。以上指标均表明, 可采用该拟合回归方程对长茎葡萄蕨藻多糖的最优提取工艺进行预测和分析。

表 3 响应面二次模型多糖得率的方差和回归系数分析

方差来源 source	平方和 sum of squares	自由度 df	均方 mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 significance
模型 model	467.43	9	51.94	40.37	<0.0001	**
A	197.31	1	197.31	153.37	<0.0001	**
B	0.17	1	0.17	0.14	0.7239	
C	4.37	1	4.37	3.39	0.1080	
AB	0.29	1	0.29	0.22	0.6515	
AC	2.40	1	2.40	1.87	0.2140	
BC	0.42	1	0.42	0.32	0.5874	
A ²	152.67	1	152.67	118.67	<0.0001	**
B ²	63.19	1	63.19	49.12	0.0002	*
C ²	23.28	1	23.28	18.10	0.0038	*
残差 residual	9.01	7	1.29			
失拟项 lack of fit	0.66	3	0.22	0.10	0.9530	
纯误差 pure error	8.35	4	2.09			
总和 total	476.43	16				

注: “*”表示差异显著($P < 0.05$), “**”表示差异极显著($P < 0.01$)。
Notes: “*” indicates significant difference ($P < 0.05$); “**” indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

自变量对多糖提取率的影响程度 该回归模型中的自变量一次项 A 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对长茎葡萄蕨藻多糖提取率有显著影响 ($P < 0.05$)。由 F 值可知, 三个因素对长茎葡萄蕨藻多糖提取

率的影响程度的大小顺序为：料液比>提取温度>提取时间。

响应面分析及验证实验 曲线的走势越陡, 说明该因素对长茎葡萄蕨藻多糖的提取率影响越大, 曲线的走势越平缓则说明该因素对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响越小。对长茎葡萄蕨藻多糖提取率影响最大的因素为料液比, 其次为提取温度和提取时间 (图 3~图 5), 这与表 3 中的分析结果相一致。由回归模型预测的长茎葡萄蕨藻多糖最佳提取工艺参数为料液比 1 : 44.77, 提取温度 60 ℃, 提取时间 3.08 h, 木瓜蛋白酶添加量 2.0%, 提取次数 2 次, 最大提取率预测值为 41.41%。为了方便操作, 将优化的条件改为料液比 1 : 45, 提取温度 60 ℃, 提取时间 3 h, 木瓜蛋白酶添加

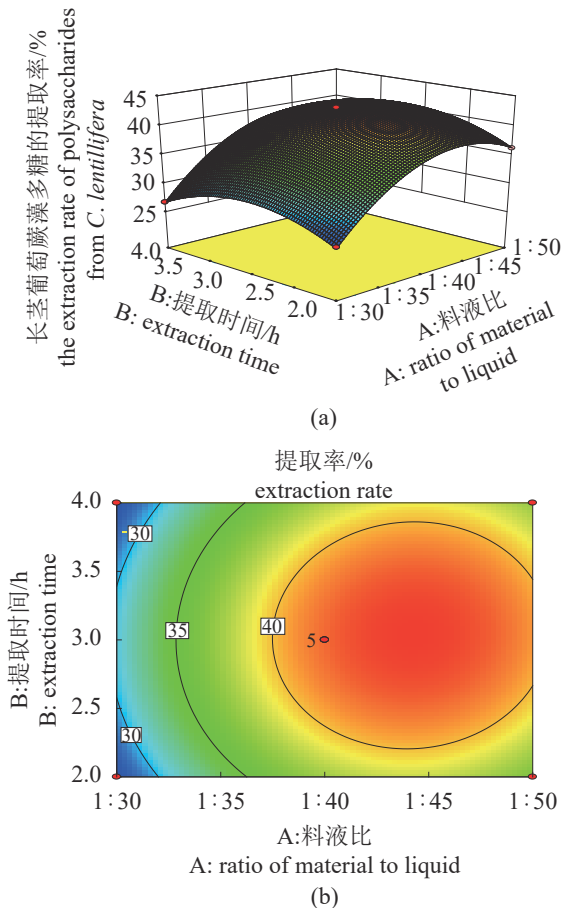


图 3 料液比与提取时间对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响

(a) 响应面图, (b) 等高线图, 下同。

Fig. 3 Effects of material/solution ratio and extraction time on the extraction rate of polysaccharides from *C. lentillifera*

(a) response surface figure, (b) contour figure, the same below.

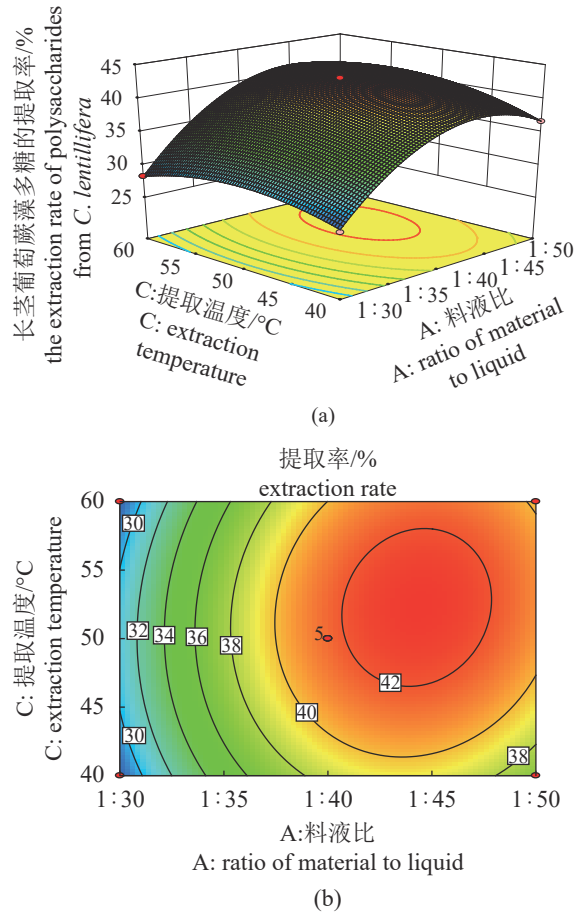


图 4 料液比与提取温度对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响

Fig. 4 Effects of material/solution ratio and extraction temperature on the extraction rate of polysaccharides from *C. lentillifera*

量 2.0%, 提取次数 2 次。在此优化条件下进行 3 次平行实验, 长茎葡萄蕨藻多糖的提取率为 41.24%±0.09%, 这和预测值较接近, 因此该模型可较好地预测和模拟长茎葡萄蕨藻多糖的产率及最佳的提取工艺。

2.4 抗氧化实验

长茎葡萄蕨藻多糖对 DPPH 自由基的清除作用 随着长茎葡萄蕨藻多糖浓度的升高, 对 DPPH 自由基的清除能力也不断增强 (图 6)。当长茎葡萄蕨藻多糖的浓度为 3.00 mg/mL 时, DPPH 自由基的清除率达到 52.98%, 且随着多糖浓度的升高该清除率不再增加, 维生素 C 和长茎葡萄蕨藻多糖的 IC₅₀ 分别为 7.38 μg/mL 和 2.32 mg/mL, 说明长茎葡萄蕨藻多糖对 DPPH 自由基有一定的清除作用, 但清除率较差。

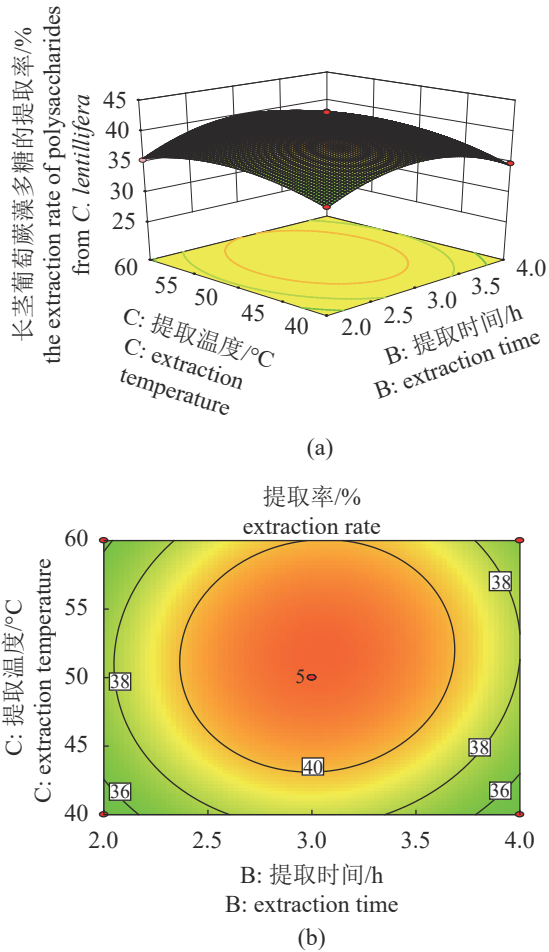


图5 提取时间与提取温度对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响

Fig. 5 Effects of extraction time and temperature on the extraction rate of polysaccharides from *C. lentillifera*

长茎葡萄蕨藻多糖对 ABTS 自由基的清除作用 随着长茎葡萄蕨藻多糖浓度的升高, 对 ABTS 自由基的清除率也不断增加 (图 7)。当长茎葡萄蕨藻多糖浓度为 2.00 mg/mL 时, ABTS 的清除率达到 93.8%, 且不再随多糖浓度的增加而升高, 维生素 C 和长茎葡萄蕨藻多糖的 IC₅₀ 分别为 7.07 μg/mL 和 0.67 mg/mL, 说明长茎葡萄蕨藻多糖对 ABTS 自由基具有较强的清除作用。

3 讨论

植物中的多糖常与蛋白质紧密结合, 因此用传统的水提取法不易完全提取。木瓜蛋白酶是一种含巯基肽链内切酶, 具有蛋白酶和酯酶的活性, 能水解长茎葡萄蕨藻中的游离蛋白和结合蛋白, 减少多糖与蛋白的结合, 增加植物多糖的溶出^[16]。

本研究在前人的实验基础上, 尝试了 5 种不

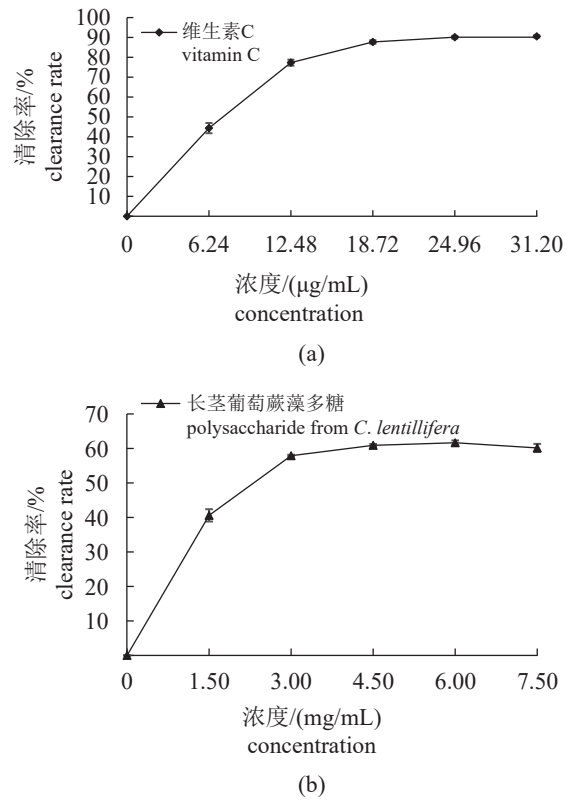


图6 对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 6 Scavenging effect on DPPH free radicals

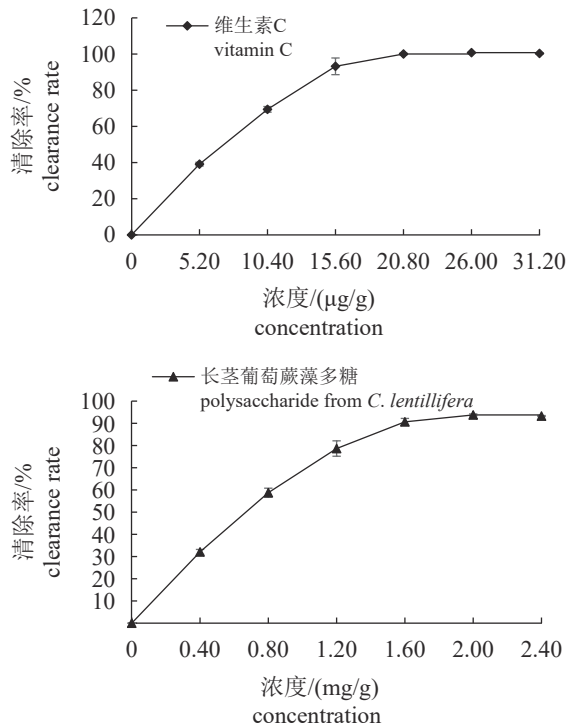


图7 对 ABTS 自由基的清除作用

Fig. 7 Scavenging effect on ABTS free radicals

同的提取方法, 以期探索高效提取长茎葡萄蕨藻多糖的制备工艺。预实验结果表明 (图 1), 组 1 的

长茎葡萄蕨藻多糖提取率仅为 0.72%，这表明采用普通的物理处理方法无法完全破坏植物细胞，大量多糖仍未溶出。组 2 多糖水提取后不经过任何处理，提取率为 2.44%，可能是由于此方法提取的多糖中蛋白质等杂质含量高，导致多糖浓度低，提取率随之下降。组 3 多糖在水提取后采用 sevege 试剂除蛋白，提取率高于组 2，但此法操作过程中蛋白质多出现在两液面交界处，分离时多糖损耗较大，且需要取多糖层多次进行重复实验，操作较为繁琐。组 4 多糖的提取率最高，达到 8.55%，相比于组 3 的 sevege 试剂法，此组添加木瓜蛋白酶能在提取过程中一并水解植物细胞膜中的结合蛋白，从而更大限度地使长茎葡萄蕨藻多糖溶出，且反应温和易操作。长茎葡萄蕨藻多糖是酸性多糖，因此组 5 采用碱提取法，但此法会溶出大量色素，导致多糖浓度降低，故使用此法时需提前将藻粉进行除色素处理。因此，综合提取效率、操作便捷性以及多糖提取率等因素，本研究确定以木瓜蛋白酶酶解法作为长茎葡萄蕨藻多糖的基础提取方法并进行工艺优化。

由式 (1) 可知，多糖提取率主要取决于多糖得率和多糖浓度，因此优化长茎葡萄蕨藻多糖提取工艺需重点从这两方面着手。本研究发现，长茎葡萄蕨藻的含水量可达 96.76%，高含水量的特性导致长茎葡萄蕨藻的干燥藻粉具有一定的吸水性。因此，在单因素优化实验中，过低的料液比会导致长茎葡萄蕨藻藻粉无法完全溶于水中，溶液呈米糊状且接近饱和，多糖可溶出空间变小，从而降低多糖提取率。另一方面，过高的料液比会使杂质含量增高，多糖浓度降低，也不利于提高多糖提取率 (图 2-a)。温度是酶能否充分发挥活性的重要因素，当提取温度达到 50 °C 时，木瓜蛋白酶达到最适作用温度，酶与底物完全接触反应，多糖提取率达到顶峰。温度大于 50 °C 时，酶结构在高温下被破坏，酶活性随着温度的升高而降低，多糖提取率也随之逐渐降低 (图 2-b)。在其他因素固定的情况下，长茎葡萄蕨藻多糖提取率在提取时间为 3 h 时最高，之后随着时间的延长而降低，其原因可能由于提取时间过长而导致多糖结构的改变或者糖苷键的裂解 (图 2-c)。木瓜蛋白酶添加量是控制工艺成本的重要因素之一，当酶用量刚好与反应底物完全结合时，即为酶的最适用量。本次实验中，木瓜蛋白酶添加量达到 2.0% 之后，长茎葡萄蕨藻多糖提取率趋于平稳，

表明木瓜蛋白酶浓度已饱和，即最适添加量为 2.0% (图 2-d)。此外，适当增加提取次数能提高藻粉利用率、降低工艺成本、并大幅提高多糖提取率。当提取次数为 2 次时，长茎葡萄蕨藻多糖提取率明显提高了 2.2%，随后趋于平稳，表明该工艺的最佳提取次数为 2 次 (图 2-e)。

单因素实验进行的前提是假定各因素间没有交互作用，但在实际问题中，各因素相互独立的情况是极为少见的，因此研究因素间的交互作用尤为重要^[19]。考虑到成本与实际可行性，实验将木瓜蛋白酶添加量和提取次数分别固定为 2.0% 和 2 次，并应用 Design-Expert. V 8.0.6 软件探究料液比、提取时间和提取温度三因素间的相互作用。方差分析中模型的 $P < 0.0001$ ，表明本研究建立的回归模型具有统计学意义，且各项系数均反映该模型具有较高的稳定性和可信度。 F 值、响应面图和等高线图的结果显示，料液比对长茎葡萄蕨藻多糖提取率的影响最大，这可能也与长茎葡萄蕨藻藻粉具有吸水的特性有关。通过该回归模型预测的提取长茎葡萄蕨藻多糖最佳工艺为料液比 1 : 45、提取温度 50 °C、提取时间 3 h、木瓜蛋白酶添加量 2.0%，在此条件下，长茎葡萄蕨藻多糖的实际提取率为 41.24%，与理论值相差 0.17%，表明该模型可较好地预测和模拟长茎葡萄蕨藻多糖的产率及最佳的提取工艺。王小兵等^[15]采用 ASE 技术结合正交实验对长茎葡萄蕨藻多糖提取工艺进行优化，发现优化后的多糖提取率可达到 51.03%，高于本实验的实际提取率。究其原因：一是长茎葡萄蕨藻的产地具有差异，王小兵等^[15]采用的实验材料取自海南，而本实验的藻体取自越南芽庄，不同地区的光照、水体盐度等因素具有差异性，从而导致不同地区藻体积累的营养活性物质含量具有差异^[20]。二是两者对鲜藻的干燥方式有差异。有研究表明，在其他因素相同的情况下，冷冻干燥处理的长茎葡萄蕨藻中活性物质的含量明显高于热风干燥处理^[7]。三是两者提取方式有差异。王小兵等^[15]采用的加速溶剂萃取仪能快速地将萃取物从基质活性部位解吸出来，大大提高多糖提取率，但此法需要高温高压的条件，成本高，不利于大规模投产。

此外，本实验还探究了长茎葡萄蕨藻多糖的体外抗氧化活性，发现该多糖对 DPPH 和 ABTS 清除率的 IC_{50} 分别为 2.32 和 0.67 mg/mL，最高清除率分别可达 52.98% 和 93.80%，表明长茎葡萄

蕨藻多糖对 ABTS 的清除作用优于 DPPH。但宋伟康^[10]研究发现, 长茎葡萄蕨藻多糖对 ABTS 自由基的清除作用弱于 DPPH, 与本研究的結果相反, 其原因可能是二者的提取方法有差异, 从而导致多糖产物的活性不同。

综上, 本研究为长茎葡萄蕨藻多糖的开发利用奠定了理论基础, 后续将探究该酶解法提取的长茎葡萄蕨藻多糖的分子结构, 阐明木瓜蛋白酶对长茎葡萄蕨藻多糖结构和活性功能的影响, 以期促进长茎葡萄蕨藻多糖的深度开发利用。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 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.
Ye Q W. Comparative test of indoor cement pond and natural sea area[J]. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(3): 7-9 (in Chinese).
- [2] Nagappan T, Vairappan C S. Nutritional and bioactive properties of three edible species of green algae, genus *Caulerpa* (Caulerpaceae)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(2): 1019-1027.
- [3] 姜芳燕, 宋文明, 杨宁, 等. 海南长茎葡萄蕨藻的营养成分分析及评价[J]. 食品工业科技, 2014, 35(24): 356-359.
Jiang F Y, Song W M, Yang N, *et al.* Analysis and evaluation of nutrient content of *Caulerpa lentillifera*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(24): 356-359 (in Chinese).
- [4] 王波, 郑风荣, 王欣, 等. 长茎葡萄蕨藻和冈村蕨藻的营养成分分析及评价[J]. 营养学报, 2018, 40(5): 515-517.
Wang B, Zheng F R, Wang X, *et al.* Nutritional analysis and evaluation of *Caulerpa lentillifera* and *Caulerpa okamurae*[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2018, 40(5): 515-517 (in Chinese).
- [5] 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.
Zhang M J, Ma Y R, Che X Y, *et al.* Analysis of nutritional components and immunostimulatory activity of *Caulerpa lentillifera* in Hainan Province[J]. *Food Science and Technology*, 2019, 44(5): 90-96 (in Chinese).
- [6] Matanjun P, Mohamed S, Mustapha N M, *et al.* Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21(1): 75-80.
- [7] Nguyen V T, Ueng J P, Tsai G J. Proximate composition, total phenolic content, and antioxidant activity of seagrape (*Caulerpa lentillifera*)[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(7): C950-C958.
- [8] Zhang M J, Ma Y R, Che X Y, *et al.* Comparative analysis of nutrient composition of *Caulerpa lentillifera* from different regions[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2020, 19(2): 439-445.
- [9] 范晓, 韩丽君. 我国常见食用海藻的营养成分分析[J]. 中国海洋药物, 1993, 12(4): 32-38.
Fan X, Han L J. Analysis of nutritional components of common edible seaweed in China[J]. *Chinese Marine Medicine*, 1993, 12(4): 32-38 (in Chinese).
- [10] 宋伟康. 叶托马尾藻及海葡萄多糖的提取、结构、抗氧化性以及藻渣吸附性能研究 [D]. 海口: 海南大学, 2018.
Song W K. Extraction, structure and antioxidant of polysaccharides from *Sargassum carpophyllum* and *Caulerpa lentillifera* and adsorption properties of the seaweed residues to metal ions[D]. Haikou: Hainan University, 2018 (in Chinese).
- [11] Long H R, Gu X Y, 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.
- [12] Zhang M J, Zhao M H, 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.
- [13] 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.
Dong Z. Study on the structure and bioactivity of the polysaccharide from *Caulerpa lentillifera*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2020 (in Chinese).

- [14] Sun Y J, Gong G P, Guo Y M, *et al.* Purification, structural features and immunostimulatory activity of novel polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 314-323.
- [15] 王小兵, 罗蕊琪, 黄勃. 海葡萄蕨藻多糖ASE提取工艺研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(16): 104-106.
Wang X B, Luo R Q, Huang B. Study on ASE extraction technology of polysaccharide from *Caulerpa lentillifera*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(16): 104-106 (in Chinese).
- [16] 郑朝阳, 肖兰华, 覃军. 响应面分析法优化酶提取土茯苓多糖工艺[J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(6): 99-102.
Zheng C Y, Xiao L H, Qin J. Optimization of extracting polysaccharide from rhizoma smilacis glabrae with papain by response surface methodology[J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2018, 16(6): 99-102 (in Chinese).
- [17] 杜枚倩, 邓红, 冯伟勋, 等. 铁皮石斛破壁率与其多糖溶出量的相关性研究[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(2): 137-141.
Du M Q, Deng H, Feng W X, *et al.* Correlation of cell wall-broken rate and polysaccharide dissolution rate of *Dendrobium officinale*[J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2018, 34(2): 137-141 (in Chinese).
- [18] 谢集照, 谭珍妮, 覃福礼, 等. 铁皮石斛多糖酶法提取工艺研究及其对免疫功能的影响[J]. 海峡药学, 2018, 30(4): 18-23.
Xie J Z, Tan Z Y, Qin F L, *et al.* Optimization of polysaccharide extraction technology from dendrobium officinale by enzyme[J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2018, 30(4): 18-23 (in Chinese).
- [19] 武爱龙, 何冰, 吴建阳, 等. 响应面法在植物组织培养中的应用进展[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(17): 21-22, 63.
Wu A L, He B, Wu J Y, *et al.* Progress in the application of response surface methodology in plant tissue culture[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2020, 26(17): 21-22, 63 (in Chinese).
- [20] 童艳梅, 马华威, 胡庭俊, 等. 长茎葡萄蕨藻的组成成分及功能特性研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 400-406.
Tong Y M, Ma H W, Hu T J, *et al.* Research progress in the components and functional characteristics of *Caulerpa lentillifera*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(7): 400-406 (in Chinese).

Response surface methodology-based optimization of extraction process of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera* and their antioxidant activity

TONG Yanmei^{1,2}, CHEN Xiuli², HU Tingjun¹, LIU Qingyun^{2,3}, LI Qiangyong^{2,3},
FENG Pengfei², YANG Chunling², PENG Min², ZHU Weilin²,
PAN Chuanyan², ZENG Digang², ZHAO Yongzhen^{2,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning 530021, China;

3. Guangxi Shrimp Breeding Engineering Technology Research Center, Nanning 530021, China)

Abstract: *Caulerpa lentillifera* is a kind of perennial large edible seaweed, which is also known as "sea grape" because of its upright stem globule glittering and translucent, similar in appearance to grapes. *C. lentillifera* is also one of the most suitable seaweeds for human consumption. It is rich in nutrients and contains a variety of amino acids, vitamins, polysaccharides and fatty acids needed by the human body. Among them, polysaccharide is the most important active component in *C. lentillifera*. According to research, the crude polysaccharide content of *C. lentillifera* accounts for 34.00%-64.97% of its dry weight, which is higher than that of most edible algae, such as *Scagassum*, *Hizikia fusiforme* and *Undaria pinnatifida*. At present, the main extraction methods for polysaccharides of *C. lentillifera* are water extraction, alkali extraction and ultrasonic-assisted extraction, and the extraction rate is 3.22%-11.30%, but there are still a large amount of polysaccharides that remains un-extracted. In order to develop a mild, efficient and low-cost extraction process of polysaccharides from *C. lentillifera*, and to explore the antioxidant activity of the polysaccharide, we screened five existing extraction methods of polysaccharides from *C. lentillifera*. Through single factor experiment and response surface experiment, the ratio of material to solution, extraction temperature, extraction time, amount of papain and extraction times were optimized, and the optimum process parameters were obtained. Polysaccharide concentration was determined by anthrone sulfate method in the experiment. In addition, we investigated the scavenging activity of the polysaccharide on DPPH and ABTS free radicals. The results showed that adding papain is the most efficient method to extract polysaccharides from *C. lentillifera*. The order of the factors affecting the extraction rate of polysaccharide from *C. lentillifera* is as follows: ratio of material to solution > extraction temperature > extraction time, and the ratio of material to solution showed an extremely significant influence on the extraction rate of the polysaccharide ($P < 0.001$). The best extraction parameters after optimization were as follows: ratio of material to solution is 1 : 45, extraction temperature 60 °C, extraction time 3 h, extraction count 2 times, the addition amount of papain 2.0%. Under this condition, the extraction rate of polysaccharides can reach 41.24%±0.09%. In addition, polysaccharides from *C. lentillifera* had good scavenging activities on DPPH and ABTS free radicals, and their IC₅₀ values were 2.32 and 0.67 mg/mL, respectively. This study shows that the optimized papain enzymatic hydrolysis can improve the extraction rate of polysaccharides from *C. lentillifera* effectively, among which the ratio of material solution is the most important factor affecting this method. Besides, the polysaccharides of *C. lentillifera* have good antioxidant activity.

Key words: *Caulerpa lentillifera*; polysaccharide; papain; response surface method; antioxidant resistance

Corresponding author: ZHAO Yongzhen. E-mail: fisher1152002@126.com

Funding projects: Guangxi Science and Technology Plan Project "Research on Industrial Ecological Co-Culture Model of *Litopenaeus vannamei* and *Caulerpa lentillifera*" (GK AB18221113); National Shrimp Industry Technology System Construction Project (CARS-48)