

鲍鱼脏器碱提多糖制备工艺及对L929细胞H₂O₂氧化损伤的修复活性

吴启赐, 林志超, 潘晓明, 薛钰, 黄家福, 潘裕添

Preparation Process of Alkali-extracted Polysaccharides from Abalone Viscera and Its Repair Activity against H₂O₂ Oxidative Damage in L929 Cells

WU Qici, LIN Zhichao, PAN Xiaoming, XUE Yu, HUANG Jiafu, and PAN Yutian

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023120072>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应面法优化固相酸水解鲍鱼脏器多糖工艺

Optimization of Solid Phase Acid Hydrolysis of Polysaccharide from Abalone Viscera by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2020, 41(11): 171-176 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.11.026>

北虫草多糖提取工艺优化及其细胞氧化损伤保护作用

Optimization of Extraction Process of *Cordyceps militaris* Polysaccharide and Its Protective Effect on Cellular Oxidative Damage

食品工业科技. 2020, 41(13): 141-147 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.023>

鲍鱼内脏蛋白的提取及水解肽的抗氧化活性研究

Extraction of Visceral Protein and Antioxidant activity of Hydrolytic Peptides of the Abalone

食品工业科技. 2019, 40(8): 136-144 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.08.024>

矢车菊素-3-O-葡萄糖苷对H₂O₂诱导细胞氧化损伤的保护作用

Protective Effects of Cyanidin-3-O-glucoside on H₂O₂-induced Oxidative Damage in Cells

食品工业科技. 2019, 40(6): 273-278 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.046>

巫山神茶对H₂O₂诱导293T细胞氧化损伤的改善作用

Protective Effect of Wushanshencha on Oxidative Damage of 293T Cells Induced by Hydrogen Peroxide

食品工业科技. 2020, 41(4): 92-98,126 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.017>

响应面法优化多汁乳菇多糖提取工艺及抗氧化活性研究

Optimization of extraction process of polysaccharides from wild *Lactarius volemus* by response surface method and investigation of antioxidant activity

食品工业科技. 2017(11): 55-60 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.11.002>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

吴启赐, 林志超, 潘晓明, 等. 鲍鱼脏器碱提多糖制备工艺及对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤的修复活性 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 204–211. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120072

WU Qici, LIN Zhichao, PAN Xiaoming, et al. Preparation Process of Alkali-extracted Polysaccharides from Abalone Viscera and Its Repair Activity against H_2O_2 Oxidative Damage in L929 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 204–211. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120072

· 工艺技术 ·

鲍鱼脏器碱提多糖制备工艺及对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤的修复活性

吴启赐¹, 林志超^{1*}, 潘晓明², 薛 钰¹, 黄家福¹, 潘裕添^{1*}
(1. 闽南师范大学菌物产业工程技术中心, 福建漳州 363000;
2. 萌得尔 (厦门) 生物科技有限公司, 福建厦门 361000)

摘要:目的: 优化鲍鱼脏器碱提多糖 (Alkali-extracted abalone viscera polysaccharides, Aavp) 提取工艺, 并研究纯化 Aavp 对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤的预防和修复作用, 以期对鲍鱼脏器碱提多糖的开发及应用提供参考。方法: 通过热碱提醇沉法获得鲍鱼脏器碱提粗多糖, 并利用响应面法优化提取工艺, 最后分析纯化 Aavp 对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤的预防和修复能力。结果: 鲍鱼脏器碱提粗多糖最佳提取工艺条件为: 料液比 1:150 g/mL, 提取时间 2 h, 提取温度 70 °C, 在此条件下, 鲍鱼脏器碱提粗多糖得率为 8.57%。在 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤预防试验中, 不同剂量的纯化 Aavp (20、50 和 100 μ g/mL) 对 L929 细胞氧化损伤均具有极显著的预防作用 ($P<0.001$), 但没有表现出剂量效应, 其中中剂量组 (50 μ g/mL) 的细胞存活率最高 (71.94%±3.08%), 略优于阳性对照的维生素 E 组, 但无显著性差异。在修复试验中, 不同剂量的纯化 Aavp (20、50 和 100 μ g/mL) 对 L929 细胞氧化损伤均具有极显著的修复效果 ($P<0.001$), 并呈现剂量效应, 而高剂量组 (100 μ g/mL) 的细胞存活率最高 (90.93%±1.17%), 略高于阳性对照的维生素 E 组 (87.96%±3.05%)。结果表明鲍鱼脏器碱提多糖对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤具有出较好的预防和修复作用。结论: 鲍鱼脏器碱提多糖具有一定的 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤修复能力。

关键词: 鲍鱼脏器, 碱提多糖, 响应面优化, 氧化损伤

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)13-0204-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023120072

本文网刊:



Preparation Process of Alkali-extracted Polysaccharides from Abalone Viscera and Its Repair Activity against H_2O_2 Oxidative Damage in L929 Cells

WU Qici¹, LIN Zhichao^{1*}, PAN Xiaoming², XUE Yu¹, HUANG Jiafu¹, PAN Yutian^{1*}

(1. Engineering Technological Center of Mushroom Industry, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China;

2. Mendel (Xiamen) Biotechnology Co., Ltd., Xiamen 361000, China)

Abstract: Objective: The extraction process of alkali-extracted abalone viscera polysaccharides (Aavp) was optimized, and the preventive and repair effects of purified Aavp on H_2O_2 oxidative damage on L929 cells were studied to provide a reference for the development and application of Aavps. Methods: Crude Aavp was obtained by hot alkali extraction followed by alcohol precipitation, and its extraction process was optimized by the response surface method. The preventive and repair abilities of H_2O_2 oxidative damage on L929 cells were analyzed. Result: The optimum extraction conditions of

收稿日期: 2023-12-11

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (2020J01822); 福建省科技厅对外合作项目 (2022I0022); 国家科技项目备案 (2021L3027); 闽南师范大学培育项目 (MSPY2022002, MSPY202101)。

作者简介: 吴启赐 (1984-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: wuqiyang168@163.com。

* 通信作者: 林志超 (1978-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 天然产物化学生物学, E-mail: mlin19781122@126.com。

潘裕添 (1969-), 男, 本科, 教授, 研究方向: 天然产物化学生物学, E-mail: pyt1106@mnnu.edu.cn。

crude Aavps were as follows: Solid-liquid ratio of 1:150 g/mL, extraction time of 2 h, and extraction temperature of 70 °C. Under these optimal conditions, the yield of crude Aavp was 8.57%. In the prevention test of H₂O₂ oxidative damage on L929 cells, different doses of purified Aavp (20, 50 and 100 µg/mL) had a significant preventive effect on L929 cell oxidative damage ($P<0.001$) but did not show a dose effect. The cell survival rate of the middle dose group (50 µg/mL) was the highest (71.94%±3.08%), which was slightly better than the positive control vitamin E group but not significant. In the repair test, different doses of purified Aavp (20, 50 and 100 µg/mL) had a significant repair effect on the oxidative damage of L929 cells ($P<0.001$) and showed a dose effect. In contrast, the cell survival rate of the high-dose group (100 µg/mL) was the highest (90.93%±1.17%), slightly higher than that of the positive control vitamin E group (87.96%±3.05%). The results showed that purified Aavp showed an excellent preventive and repair effect on H₂O₂ oxidative damage in L929 cells. Conclusion: Aavp has an ability to repair H₂O₂ oxidative damage of L929 cells.

Key words: abalone viscera; alkali-extracted polysaccharide; response surface optimization; oxidative damage

鲍鱼作为一种美味珍馐,肉质细嫩,营养丰富,蛋白质占总质量 18.92%~21.63%,亦含多糖、维生素和微量元素等营养成分^[1-3]。鲍鱼脏器多糖是一种从鲍鱼内脏中提取的天然活性物质,具有多种生物功能^[4-9]。研究表明,鲍鱼脏器多糖具有显著的免疫调节作用^[5-6],能够增强机体的免疫功能,提高抵抗力,对抗各种病原体。并且,鲍鱼脏器多糖还具有抗肿瘤活性^[10],能够抑制肿瘤细胞的生长和扩散,对预防和治疗癌症具有积极的作用。此外,鲍鱼脏器多糖还能够减轻炎症反应,保护细胞免受氧化损伤,对治疗炎症性疾病和延缓衰老具有重要意义^[11-13]。因此,鲍鱼脏器多糖是一种具有重要价值的生物活性物质,其应用研究可为人类健康和相关产业的发展提供新的思路 and 方向,对鲍鱼脏器多糖的研究具有重要的科学价值和实际意义,值得进一步深入探究。然而,在鲍鱼产业中,鲍鱼可食用部分仅占总质量的 60%~70%^[14-16],这意味着有大部分鲍鱼软组织如脏器等将被废弃,导致环境受到污染,资源被浪费。因此,从鲍鱼脏器中提取多糖可实现鲍鱼废弃资源的有效利用,提升鲍鱼产业价值链,具有重要的经济学价值和意义。

鲍鱼脏器多糖的提取方法有热水浸提、碱水浸提和酶法提取等^[17]。热水浸提提取效率不高,提取时间也较长;酶法成本高,对多糖结构影响大;碱水浸提成本较低,效率也高,但 pH 等条件要严格控制,防止多糖降解^[18-19]。碱水浸提法适合提取海洋生物多糖(酸性多糖)^[20]。但是,碱水浸提的鲍鱼脏器多糖报道鲜有出现。因此,优化碱水浸提的鲍鱼脏器多糖提取率,并探索其对细胞氧化的修复活性,具有一定的研究价值和意义。

本文采用热碱水浸提法提取鲍鱼脏器碱提多糖(Aavp),并对其提取条件进行响应面优化,最后检测其对 L929 细胞氧化损伤的修复能力。本文聚焦于鲍鱼产业经济附加值的提高,利用废弃的鲍鱼脏器资源,为鲍鱼产业的可持续发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) 福建省东山县长盛食品有限公司;成纤维细胞 L929 中国科学院上海细胞库;RPMI Medium 1640、胎牛血清 美国

Gibco 公司;透析袋 MD77(3.5 kDa) 美国 Viskase 公司;CCK-8 试剂盒 美国 Solarbio 公司;硫酸(98%)、苯酚、乙醇、盐酸(37%)、氢氧化钠、氯仿、正丁醇、H₂O₂(30%)等 分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

UV-2102PC 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;Senco R1002B 旋转蒸发仪 上海申生科技有限公司;HF safe 生物安全柜 上海力申科学仪器有限公司;Heracell 240i GP 二氧化碳培养箱 美国赛默飞世尔科技有限公司;Infinite M200PRO 全波长酶标仪 瑞士 TECAN 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鲍鱼脏器碱提多糖提取工艺 采用林志超等^[21]的方法。具体工艺如下:a.鲍鱼脏器冻干粉制备。将鲍鱼脏器上的结缔组织及脂肪组织除去,并对消化道进行清洗,去除食物残渣,匀浆后-20 °C 冷冻 48 h,60 °C 真空冷冻干燥 48 h,再研磨过 30 目筛即得鲍鱼脏器冻干粉。b.鲍鱼脏器脱脂。取冻干粉 10 g,加入 4 倍质量的 95% 乙醇,在 60 °C 下回流 6 h 进行脱脂反应^[22],重复 2 次,过滤并干燥去除乙醇后得脱脂的鲍鱼脏器。c.水溶性鲍鱼脏器多糖制备。取脱脂的鲍鱼脏器 10 g,加入 8 倍质量的超纯水,在 95 °C 下反应 3 h,重复 3 次,过滤得水溶性鲍鱼脏器多糖提取液,滤渣备用。d.鲍鱼脏器碱提粗多糖制备。准确称取一定质量的上述滤渣,在一定温度下,加入一定体积的 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液,经机械搅拌(30 r/min)提取一定时间,重复 2 次,离心(10000 r/min, 20 °C, 10 min),合并上清液。调节上清液至 pH7,经旋转蒸发浓缩至三分之一体积,浓缩液加入 4 倍质量的 95% 乙醇混匀过夜以沉淀多糖,离心(12000 r/min, 20 °C, 15 min),沉淀用少量超纯水溶解,并旋转蒸发去除残余乙醇(60 °C)。再经超滤(5 kDa)浓缩和除盐,Sevage 法去除蛋白质^[23],旋转蒸发去除有机溶剂,按步骤 a 的冻干工艺冻干备用。

1.2.2 多糖含量及多糖得率计算 以葡萄糖为标准品,用苯酚-硫酸法测定多糖含量^[24],其标准曲线回归方程为 $y=0.0125x+0.0625$, $R^2=0.9983$ 。分别按公式(1)和(2)计算多糖含量及多糖得率。

$$D(\%) = \frac{c \times v \times n \times 0.9}{m_1} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中, D: 纯化后冻干粉多糖含量, %; c: 样品溶液多糖浓度, mg/mL; v: 溶液总体积, mL; n: 稀释倍数; m_1 : 鲍鱼脏器多糖冻干粉质量, g; 0.9: 多糖校正系数。

$$G(\%) = \frac{c \times v \times n \times 0.9}{m_2} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中, G: 鲍鱼脏器冻干粉多糖得率, %; c: 样品溶液多糖浓度, mg/mL; v: 溶液总体积, mL; n: 稀释倍数; m_2 : 鲍鱼脏器冻干粉质量, g; 0.9: 多糖校正系数。

1.2.3 单因素实验 杂色鲍脏器冻干粉经过充分水提后, 后续碱提工艺可进一步优化, 提高鲍鱼脏器碱提粗多糖的得率。

1.2.3.1 料液比对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响

设置提取温度 70 ℃, 提取时间 3 h, 考察料液比(分别为 1:50、1:100、1:150、1:200 和 1:250 g/mL)对粗多糖得率的影响。

1.2.3.2 提取时间对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响

设置料液比 1:150 g/mL, 提取温度 70 ℃, 考察提取时间(分别为 1、2、3、4 和 5 h)对粗多糖得率的影响。

1.2.3.3 提取温度对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响

设置料液比 1:150 g/mL, 提取时间 3 h, 考察温度(分别为 50、60、70、80 和 90 ℃)对粗多糖得率的影响。

1.2.4 响应面实验 根据单因素实验的最佳参数, 选取三个影响因素: 料液比(X_1), 提取时间(X_2)和提取温度(X_3), 以粗多糖得率(Y)为响应值, 创建三因素三水平的 Box-Behnken 试验, 并通过对试验结果的回归方差分析, 优化鲍鱼脏器碱提粗多糖的提取工艺参数, 试验因素水平见表 1。

表 1 响应面实验因素和水平
Table 1 Factors and levels of response surface test

水平	因素		
	X_1 料液比 (g/mL)	X_2 提取时间 (h)	X_3 提取温度 (℃)
-1	1:200	1	60
0	1:150	2	70
1	1:100	3	80

1.2.5 鲍鱼脏器碱提粗多糖纯化 采用林志超等^[21]的方法进行纯化: 5 g 鲍鱼脏器碱提粗多糖充分溶解于 40 mL Tris-HCl 溶液(pH7.2, 50 mmol/L), 上 DEAE Sepharos Fast Flow 柱(规格为 Φ 5.0 cm \times 25 cm), 0.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 流速为 2 mL/min, 采用部分收集器收集洗脱液, 检测各收集管的多糖含量并绘制洗脱曲线, 根据洗脱曲线收集含有多

糖的洗脱液, 旋转蒸发浓缩, 再真空冷冻干燥得酸性多糖。取 40 mg 上述酸性多糖样品溶于 1 mL 0.2 mol/L NH_4HCO_3 溶液中, 采用 Sephacryl S-400 HR 柱(规格为 Φ 2.6 cm \times 90 cm)层析纯化, 流速 30 mL/h, 采用部分收集器收集洗脱液, 检测各收集管的多糖含量并绘制洗脱曲线, 根据洗脱曲线收集含有多糖的洗脱液, 旋转蒸发浓缩后, 放入透析袋中(截留分子量为 3.5 kDa), 超纯水透析(4 ℃)至检测不出 Cl^- (AgNO_3 沉淀法^[25]), 真空冷冻干燥(冻干条件同方法 1.2.1 所述)得纯化多糖(命名为纯化 Aavp), 经 HPLC 分析其纯度为 98.66%。

1.2.6 细胞培养 取复苏的 L929 细胞, 选用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 5% CO_2 、37 ℃ 饱和湿度培养箱内培养, 每隔 1 d 换液 1 次^[26]。

1.2.7 L929 细胞氧化损伤模型的建立 参考齐佳等^[27]的方法加以改进: 设空白组(只含培养基, 无细胞)、对照组(只含培养基, 有细胞)和 H_2O_2 处理组(有细胞, 含培养基和浓度分别为 50、100、150、200、250 和 300 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2), 每个浓度设 3 个平行孔。取对数生长期的 L929 细胞, 以 2×10^4 个/孔接种于已加好 RPMI 1640 培养基的 96 孔板中培养。24 h 后, 空白组和对照组换 RPMI 1640 培养基继续培养, H_2O_2 组分别换上含不同浓度 H_2O_2 的 RPMI 1640 培养基继续培养, 24 h 后每孔加入 10 μL CKK-8 试剂, 反应 2 h, 在酶标仪 450 nm 测量各孔吸光度(A)值。按照公式(3)计算细胞存活率。

$$Y(\%) = \frac{A_x - A_0}{A_c - A_0} \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中, Y: 细胞存活率, %; A_0 : 空白组吸光值; A_c : 对照组吸光值; A_x : H_2O_2 处理组吸光值。

1.2.8 多糖对 L929 细胞氧化损伤的预防作用 取对数生长期的 L929 细胞, 接种于 96 孔板中(2×10^4 个/孔), 实验分组为: 空白组(仅接种细胞)、模型组、阳性对照组和给药组。具体方法见表 2。

培养结束后向每孔加入 10 μL CKK-8 试剂, 2 h 后在酶标仪 450 nm 测量各孔吸光度(A)值。按照公式(4)计算细胞存活率。

$$Y(\%) = \frac{A_y - A_0}{A_c - A_0} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中, Y: 细胞存活率, %; A_0 : 培养基吸光值; A_c : 空白组吸光值; A_y : 模型组、阳性对照组或给药组吸光值。

1.2.9 多糖对 L929 细胞氧化损伤的修复作用 取对数生长期的 L929 细胞, 接种于 96 孔板中(2×10^4 个/孔), 实验分组为: 空白组(仅接种细胞)、模型组、阳性对照组和给药组。具体方法见表 3。

培养结束后空白组向每孔加入 10 μL CKK-8 试剂, 2 h 后在酶标仪 450 nm 测量各孔吸光度值。按照公式(4)计算细胞存活率。

表 2 纯化 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤的预防作用
Table 2 Preventive effect of purified Aavp on oxidative damage of L929 cells

组别	第一阶段	第二阶段
空白组	接种细胞于RPMI 1640培养基, 培养24 h	换液, 加RPMI 1640培养基, 培养24 h
模型组	接种细胞于RPMI 1640培养基, 培养24 h	换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂), 培养24 h
阳性对照组	接种细胞于(RPMI 1640培养基+50 μmol/L V _E), 培养24 h	换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂), 培养24 h
低剂量给药组	接种细胞于(RPMI 1640培养基+20 μg/L Aavp), 培养24 h	换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂), 培养24 h
中剂量给药组	接种细胞于(RPMI 1640培养基+50 μg/L Aavp), 培养24 h	换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂), 培养24 h
高剂量给药组	接种细胞于(RPMI 1640培养基+100 μg/L Aavp), 培养24 h	换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂), 培养24 h

表 3 纯化 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤的修复作用
Table 3 Repair effect of purified Aavp on oxidative damage of L929 cells

组别	第一阶段	第二阶段
空白组		换液, 加RPMI 1640培养基, 培养24 h
模型组		换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂), 培养24 h
阳性对照组		换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂ +50 μmol/L V _E), 培养24 h
低剂量给药组	接种细胞于RPMI 1640培养基, 培养24 h	换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂ +20 μg/L Aavp), 培养24 h
中剂量给药组		换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂ +50 μg/L Aavp), 培养24 h
高剂量给药组		换液, 加(RPMI 1640培养基+150 μmol/L H ₂ O ₂ +100 μg/L Aavp), 培养24 h

1.3 数据处理

试验重复三次, 利用 Design Expert 8.0.6 进行数据统计分析, 采用 Origin 2017 软件绘图, SPSS 26.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响
由图 1 可知, 多糖得率随料液比的增大而急剧提高, 这可能因为溶剂大量增加, 使得物料分散更加充分, 传质效率增加。当料液比为 1:150(g/mL)时, 多糖得率达到最高, 为 7.67%。当料液比继续增大, 粗多糖得率出现下降, 但下降的幅度较小, 这可能是因为过多溶剂会使体系的传热功能下降, 不利于多糖的溶出, 导致多糖得率降低^[28]。此外, 提取体系过大也影响粗多糖的后续处理成本, 所以综合考虑, 选取料液比为 1:150(g/mL)。

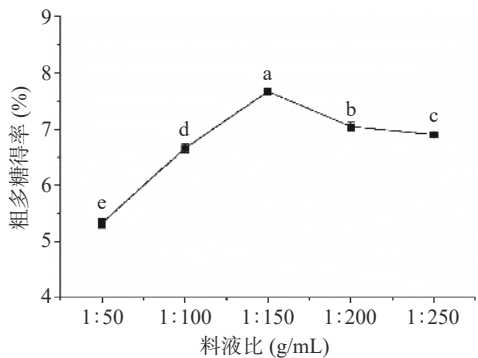


图 1 不同料液比对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响
Fig.1 Effect of different ratios of solid to liquid on the yields of crude Aavp

注: 不同字母表示数据之间差异显著($P<0.05$), 图 2~图 3、图 5 同。

2.1.2 提取时间对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响

如图 2 显示, 随着提取时间的增加, 粗多糖得率先上升后下降, 当提取时间为 2 h 时, 粗多糖得率为最高值 8.15%。这可能是由于当提取时间低于 2 h 时, 增加时间可加强氢氧化钠在物料中的渗透和积累, 进而促进多糖与物料组织连接的氢键断裂; 但随着提取时间继续延长, 部分多糖的结构被破坏, 故导致多糖得率开始降低^[29]。因此综合考虑, 选择提取时间为 2 h。

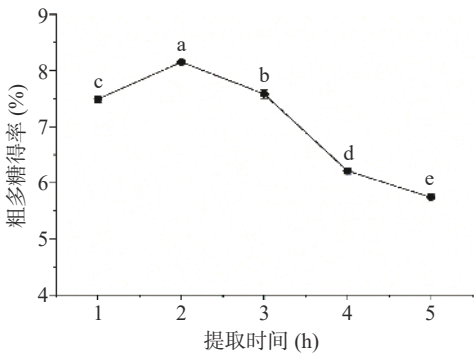


图 2 不同提取时间对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响
Fig.2 Effect of different extraction times on the yields of crude Aavp

2.1.3 提取温度对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响

图 3 可以看出, 温度对多糖得率有较大影响, 随着温度的升高, 分子的热运动加快, 多糖传质效率提高, 因此得率逐渐增加。当温度为 70 ℃ 时, 多糖得率达到最高 8.08%。当温度高于 70 ℃ 时, 多糖得率急剧下降, 这可能是因为高温碱性条件下, 多糖发生裂解, 导致多糖得率下降^[24]。

2.2 响应面优化分析

2.2.1 响应面试验结果 通过单因素实验, 可选取料液比为 1:150 g/mL, 提取时间为 2 h, 提取温度为

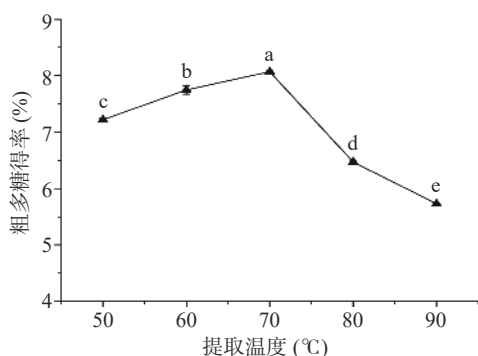


图3 不同提取温度对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的影响

Fig.3 Effect of different extraction temperatures on the yields of crude Aavp

70 °C 为后续响应面分析因素中点。并采用 Box-Behnken Design 进行响应面优化设计, 结果见表 4。

表 4 响应面试验设计及结果

Table 4 Design and the results of response surface experimental

试验号	X ₁ 料液比	X ₂ 提取时间	X ₃ 提取温度	Y 粗多糖得率(%)
1	-1	-1	0	7.57
2	1	-1	0	7.31
3	-1	1	0	7.34
4	1	1	0	7.10
5	-1	0	-1	7.50
6	1	0	-1	7.33
7	-1	0	1	7.48
8	1	0	1	6.94
9	0	-1	-1	7.48
10	0	1	-1	7.31
11	0	-1	1	7.25
12	0	1	1	7.11
13	0	0	0	8.54
14	0	0	0	8.61
15	0	0	0	8.57
16	0	0	0	8.55
17	0	0	0	8.62

2.2.2 模型的建立和显著性检验 根据上述结果分析, 以鲍鱼脏器碱提粗多糖得率为响应值(Y), 得到粗多糖得率对料液比(X₁)、提取时间(X₂)和提取温度(X₃)的回归方程为: $Y=8.58-0.1509X_1-0.0949X_2-0.1056X_3+0.0051X_1X_2-0.0909X_1X_3+0.0097X_2X_3-0.6111X_1^2-0.6366X_2^2-0.6531X_3^2$ 。回归模型的方差分析及显著性分析见表 5。

由表 5 可知, 各试验因子与响应面值的关系中, 因变量和全体自变量之间的决定系数 $R^2=0.9982$, 模型极显著 ($P<0.001$), 失拟项 (F 值为 2.16) 不显著 ($P>0.05$), 说明该试验方法可靠性强, 准确度高。整体来看, 回归模型的拟合程度较好, 可用于鲍鱼脏器碱提粗多糖提取优化的试验设计和结果分析预测。回归模型中, 一次项 (X_1 、 X_2 和 X_3) 和平方项 (X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2) 极显著 ($P<0.001$), 交互项 X_1X_3 较显著 ($P<0.01$), 说明料液比、提取温度和提取时间对多糖得率均有极显著影响, 且显著性顺序为 X_1 (料液比) $>$

表 5 回归模型方差分析

Table 5 ANOVA analysis for response surface regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	6.05	9	0.6720	419.66	<0.0001	***
X ₁	0.1822	1	0.1822	113.78	<0.0001	***
X ₂	0.072	1	0.072	44.99	0.0003	***
X ₃	0.0893	1	0.0893	55.75	<0.0001	***
X ₁ X ₂	0.0001	1	0.0001	0.0643	0.8071	
X ₁ X ₃	0.0331	1	0.0331	20.64	0.0027	**
X ₂ X ₃	0.0004	1	0.0004	0.2338	0.6435	
X ₁ ²	1.57	1	1.57	982.07	<0.0001	***
X ₂ ²	1.71	1	1.71	1065.48	<0.0001	***
X ₃ ²	1.8	1	1.8	1121.52	<0.0001	***
残差	0.0112	7	0.0016			
失拟项	0.0069	3	0.0023	2.16	0.2355	不显著
纯误差	0.0043	4	0.0011			
总离差	6.06	16				

注: 本模型 $R^2=0.9982$, $R^2_{Adj}=0.9958$, $R^2_{Pred}=0.9806$, Adeq Precision=52.5128, C.V.=0.5209%; ***代表极显著, $P<0.001$, **代表较显著, $P<0.01$; *代表显著, $P<0.05$; $P>0.05$, 代表不显著。

X_3 (提取温度) $>X_2$ (提取时间)。

2.2.3 响应曲面分析 根据回归方程, 可获得鲍鱼脏器碱提粗多糖提取工艺的两两因素交互作用的响应面及等高线图, 如图 4 所示。响应面和等高线的形状反映出交互效应的强弱, 圆形表示两因素交互作用不显著, 而椭圆形表示交互作用显著^[29-30]。图 4B 和图 4E 可以看出, 料液比和提取温度交互响应面坡度较陡, 对应的等高线密集, 且呈椭圆形, 说明二者交互作用对粗多糖得率有较显著影响。当提取温度为 70 °C 时, 随着料液比的增加, 鲍鱼脏器碱提粗多糖得率呈现先上升后下降的趋势, 并在接近等高线圆心处达到极值。从图 4A 和图 4C 可知, 虽然提取时间和提取温度/料液比的响应面坡度也较陡, 但对应的图 4D 和图 4F 等高线均为圆形, 说明其交互作用不显著。

2.2.4 最佳工艺的确定及验证 根据响应面优化结果及 Design-Expert V8.0.6.1 软件预测分析, 得到鲍鱼脏器碱提粗多糖最佳提取工艺条件为: 料液比 1:150, 提取时间 1.93 h, 提取温度 69.26 °C。此条件下粗多糖得率预测值为 8.59%。根据实际操作情况 (优化参数修改为: 料液比 1:150, 提取时间 2 h, 提取温度 70 °C) 重复试验 3 次, 测得鲍鱼脏器碱提粗多糖得率平均为 8.57%, 与预测值相差不大, 高于文献报道的高压脉冲电场提取法的多糖得率(3%)^[31] 以及酶法辅助提取的得率(6.5%)^[32], 说明采用响应面优化得到的最佳条件可靠性好。

2.3 纯化 Aavp 修复 L929 细胞 H₂O₂ 氧化损伤

2.3.1 L929 细胞氧化损伤模型的建立 如图 5 所示, 对照组(H₂O₂ 浓度为 0 μmol/L)的细胞存活率为 100%±1.51%, 随着 H₂O₂ 浓度越来越高 (50、100、150、200、250 和 300 μmol/L), L929 细胞的存活率

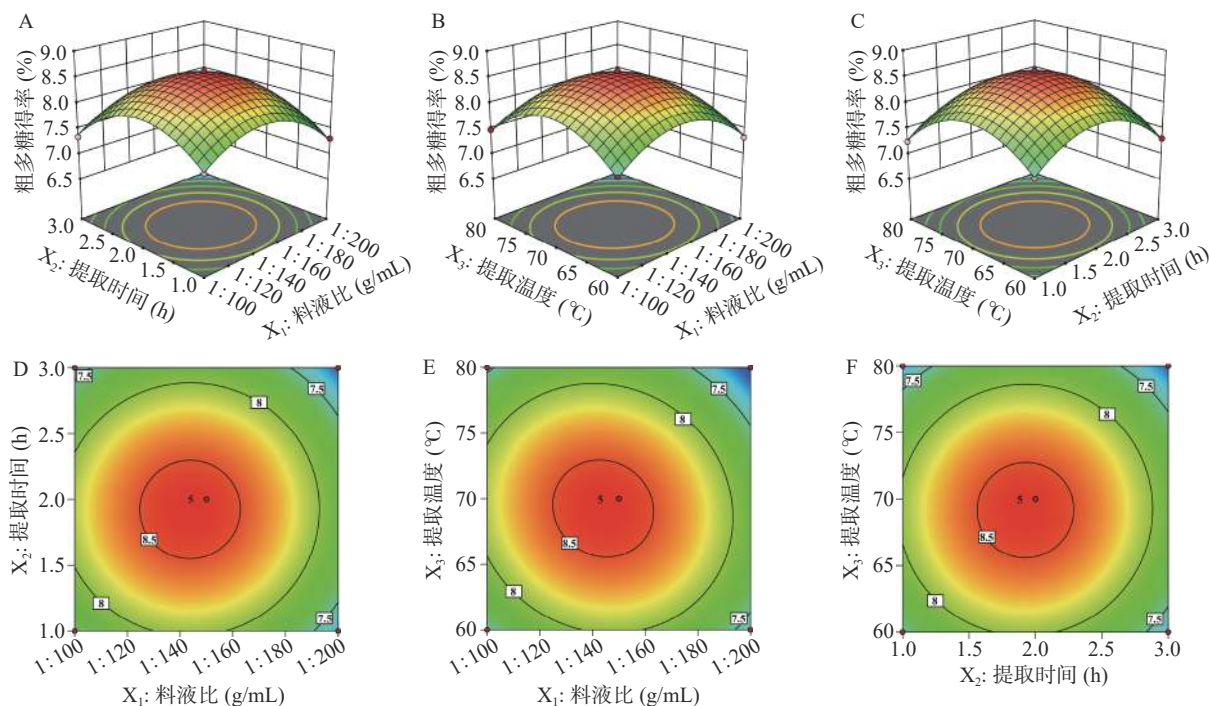
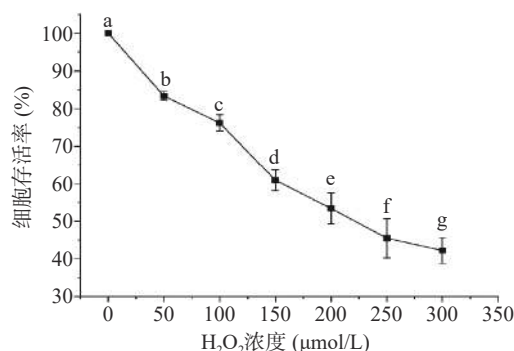


图 4 各因素对鲍鱼脏器碱提粗多糖得率的交互作用响应面和等高线图

Fig.4 Response surface plots and contour plots of the effects of the interaction of various factors to the yields of crude Aavp

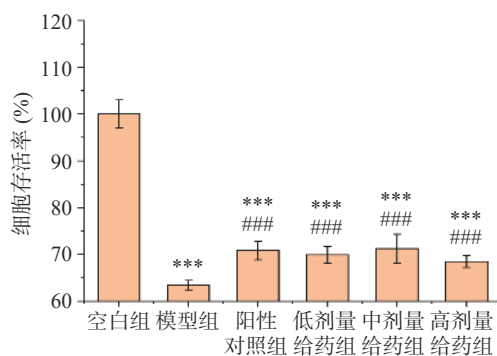
也随之下降,分别为 $83.34\% \pm 1.20\%$ 、 $76.23\% \pm 2.22\%$ 、 $60.90\% \pm 2.81\%$ 、 $53.34\% \pm 4.10\%$ 、 $45.48\% \pm 5.21\%$ 和 $42.22\% \pm 3.42\%$ 。随着 H_2O_2 浓度的上升,细胞也逐步出现形态变圆、漂浮、细胞结构不清等情况。如果 H_2O_2 浓度过低,对细胞存活率影响太小,试验辨识度不大;如果 H_2O_2 浓度过高,则大量细胞出现凋亡甚至死亡,可能导致试验失败。综合考虑,选择 H_2O_2 浓度为 $150 \mu\text{mol/L}$ (此时细胞存活率为 $60.90\% \pm 2.81\%$) 进行后续研究。

图 5 建立 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤模型Fig.5 Establishment the model of H_2O_2 oxidative damage of L929 cells

2.3.2 纯化 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤的预防作用

图 6 显示的是先用维生素 E 或 Aavp 处理,再进行 H_2O_2 氧化损伤的结果。设定空白组细胞存活率为 $100\% \pm 2.98\%$,模型组细胞存活率则为 $63.45\% \pm 1.02\%$,极显著低于空白组 ($P < 0.001$),说明 H_2O_2 对 L929 细胞的氧化损伤模型建立成功。阳性对照组细胞存活率为 $70.82\% \pm 1.99\%$,极显著高于模型组 ($P < 0.001$),说明作为阳性对照的维生素 E,对细胞氧化损

伤具有一定预防作用。低、中和高剂量组细胞存活率分别为 $69.27\% \pm 1.78\%$ 、 $71.94\% \pm 3.08\%$ 和 $66.13\% \pm 1.33\%$ 。与空白组和模型组相比,不同剂量的 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤均具有极显著的预防作用 ($P < 0.001$),但是没有表现出剂量效应;与阳性对照组相比,不同剂量的 Aavp 组并未表现出明显的差异性,但中剂量组效果略优于阳性对照组。

图 6 纯化 Aavp 对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤的预防作用Fig.6 Preventive effect of purified Aavp on H_2O_2 oxidative damage in L929 cells

注: *、#和△分别代表不同剂量药组分别与空白组、模型组和阳性对照组比较,***、###、△△△代表极显著, $P < 0.001$; **、##、△△代表较显著, $P < 0.01$; *、#、△代表显著, $P < 0.05$; 图 7 同。

2.3.3 纯化 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤的修复作用

如图 7 所示,当维生素 E 或不同浓度的纯化 Aavp 与 H_2O_2 同时处理细胞时,阳性对照组细胞存活率为 $87.96\% \pm 3.05\%$,极显著低于空白组 ($100\% \pm 1.99\%$),但极显著高于模型组 ($60.20\% \pm 1.56\%$) ($P < 0.001$),说明作为阳性对照的维生素 E 对 L929 细胞氧化损伤具有修复作用。低、中和高剂量组细胞存

活率分别为 $63.99\% \pm 0.89\%$ 、 $73.24\% \pm 2.92\%$ 和 $90.93\% \pm 1.17\%$ 。与空白组和模型组相比,在试验范围内高、中、低浓度的 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤均具有极显著的修复作用($P < 0.001$),且表现出剂量效应;与阳性对照组相比,低、中剂量组的修复效果明显更差,但高剂量组的细胞修复效果略优于阳性对照组。

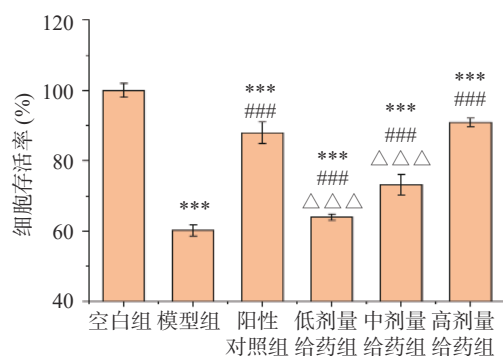


图7 纯化 Aavp 对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤的修复作用
Fig.7 Repair effect of crude Aavp on H_2O_2 oxidative damage in L929 cells

3 结论

本研究通过单因素实验及响应面试验,优化鲍鱼脏器碱提粗多糖的提取工艺,并测试鲍鱼脏器碱提粗多糖对 L929 细胞的 H_2O_2 氧化损伤模型的修复效果。结果显示,鲍鱼脏器碱提粗多糖最佳提取工艺条件为:液料比 1:150,提取时间 2 h,提取温度 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$,该条件下鲍鱼脏器碱提粗多糖得率为 8.57%。纯化 Aavp 对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤具有较好的预防和修复作用。在预防试验中,与模型组相比,不同剂量的 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤均具有极显著的预防作用,但没有表现出剂量效应,其中中剂量组的细胞存活率最高($71.94\% \pm 3.08\%$);与阳性对照组相比,不同剂量的 Aavp 组并未表现出明显的差异性,但中剂量组效果略优于阳性对照组。在修复试验中,不同剂量的 Aavp 对 L929 细胞氧化损伤均具有极显著的修复效果,并呈现剂量效应,而高剂量组的细胞存活率最高($90.93\% \pm 1.17\%$),略高于阳性对照的维生素 E 组($87.96 \pm 3.05\%$);但与阳性对照组相比,低、中剂量组的修复效果明显更差。本研究初步探讨了 Aavp 对 L929 细胞 H_2O_2 氧化损伤修复作用,为 Aavp 后续开发提供了思路。但是, Aavp 对 L929 细胞的修复机制尚未明确,还有待进一步探究。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] SHI L F, HAO G X, CHEN J, et al. Nutritional evaluation of Japanese abalone (*Haliotis discus Hannai* Ino) muscle: Mineral content, amino acid profile and protein digestibility[J]. *Food Research*

International, 2020, 129: 108876.

[2] 何致霖, 张亚秀, 曾介玉, 等. 鲍鱼的营养组成、功能活性及加工现状研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(15): 440–450.

[HE Z L, ZHANG Y X, ZENG J Y, et al. Research progress in nutritional composition, functional activity, and processing status of abalone[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(15): 440–450.]

[3] 廖玉琴, 任中阳, 石林凡, 等. 干制过程中鲍鱼肌肉理化性质和挥发性风味的变化[J]. *食品科学*, 2023, 44(12): 252–261.

[LIAO Y Q, REN Z Y, SHI L F, et al. Changes in physicochemical properties and volatile flavor of abalone muscle during drying[J]. *Food Science*, 2023, 44(12): 252–261.]

[4] 孙冲, 杜阿珠, 姚昱锐, 等. 响应面法优化固相酸水解鲍鱼脏器多糖工艺[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(11): 171–177. [SUN C, DU A Z, YAO Y K, et al. Optimization of solid phase acid hydrolysis of abalone visceral polysaccharides using response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(11): 171–177.]

[5] 陈思远, 萧建斌, 苏经迁. 鲍鱼内脏多糖提取物免疫功能的初步研究[J]. *福建轻纺*, 2023, 30(2): 7–12. [CHEN S Y, XIAO J B, SU J Q. Preliminary study on immune function of abalone visceral polysaccharide extract[J]. *The Light & Textile Industries of Fujian*, 2023, 30(2): 7–12.]

[6] SUN L M, ZHU B W, LI D M, et al. Purification and bioactivity of a sulphated polysaccharide conjugate from viscera of abalone *Haliotis discus Hannai* Ino[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2010, 21(1): 15–26.

[7] ZHU B W, LI D M, ZHOU D Y, et al. Structural analysis and CCK-releasing activity of a sulphated polysaccharide from abalone (*Haliotis discus Hannai* Ino) viscera[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(4): 1273–1278.

[8] LI J L, TONG T, KO D O, et al. Antithrombotic potential of extracts from abalone, *Haliotis discus Hannai* Ino: *In vitro* and animal studies[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2013, 22(2): 471–476.

[9] YANG J F, LI Y H, ZHAO J, et al. Isolation, structural characterization and lymphopoiesis stimulant activity of a polysaccharide from the abalone gonad[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2015, 24(1): 23–30.

[10] 王军玲, 魏配晓, 邱绪建, 等. 鲍鱼肌肉多糖的性质及抗肿瘤活性的初步研究[J]. *食品科学*, 2018, 39(12): 1–9. [WANG J L, WEI P X, QIU X J, et al. Physicochemical properties and antitumor activity of polysaccharides from abalone muscle[J]. *Food Science*, 2018, 39(12): 1–9.]

[11] ZHU B W, ZHOU D Y, LI T, et al. Chemical composition and free radical scavenging activities of a sulphated polysaccharide extracted from abalone gonad (*Haliotis discus Hannai* Ino)[J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(3): 712–718.

[12] LI G Y, CHEN S G, WANG Y M, et al. A novel glycosaminoglycan-like polysaccharide from abalone *Haliotis discus Hannai* Ino: Purification, structure identification and anticoagulant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49(5): 1160–1166.

[13] ZHU B W, WANG L S, ZHOU D Y, et al. Antioxidant activity of sulphated polysaccharide conjugates from abalone (*Haliotis discus Hannai* Ino)[J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(6): 1663–1668.

[14] 陈敏, 高广春, 田新朋, 等. 皱纹盘鲍内脏抗氧化肽的制备及活性分析[J]. *食品科技*, 2022, 47(6): 159–166. [CHEN M, GAO

- G C, TIAN X P, et al. Preparation and activity analysis of antioxidant peptides from the viscera of *Haliotis discus* Hannai[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(6): 159–166.]
- [15] 何晓彤, 王晨, 孙力军, 等. 鲍鱼内脏酶解物可调节肠道菌群及短链脂肪酸缓解小鼠系统低度炎症[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(6): 94–102. [HE X T, WANG C, SUN L J, et al. Enzymatic hydrolysates from abalone viscera can regulate intestinal flora and short chain fatty acids to alleviate low level inflammation in mouse systems[J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(6): 94–102.]
- [16] 刘斌雄, 孙冲, 方婷. 过氧化氢抗坏血酸法制备小分子量鲍鱼脏器多糖工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(17): 5563–5569. [LIU B X, SUN C, FANG T. Study on the preparation of small molecular weight abalone visceral polysaccharides by hydrogen peroxide ascorbic acid method[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(17): 5563–5569.]
- [17] 卓小月, 刘卫红, 杨志勇. 动物源活性多糖提取、纯化和结构鉴定技术的最新进展[J]. 当代化工研究, 2020, 18(3): 44–47. [ZHUO X Y, LIU W H, YANG Z Y. Advances of the animal-original polysaccharides: Extraction, purification and structure identification[J]. Modern Chemical Research, 2020, 18(3): 44–47.]
- [18] 杨茂会, 周欣, 谯政文, 等. 黄精多糖提取、分离纯化及生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(12): 407–416. [YANG M H, ZHOU X, QIAO Z W, et al. Recent advances in *Polygonatum* polysaccharides: Extraction, isolation, purification and bioactivities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(12): 407–416.]
- [19] 董伟, 马生健, 郭俊先, 等. 凉粉草多糖提取、结构特征和生物活性研究[J]. 食品与机械, 2022, 38(11): 168–175. [DONG W, MA S J, GUO J X, et al. Extraction process, structural characteristics and biological activity of *Mesa chinensis* polysaccharide[J]. Food and Machinery, 2022, 38(11): 168–175.]
- [20] 张磊, 王锦旭, 杨贤庆, 等. 海洋动物多糖的研究进展[J]. 食品工业, 2018, 39(1): 211–215. [ZHANG L, WANG J X, YANG X Q, et al. Research progress of marine animal polysaccharides[J]. The Food Industry, 2018, 39(1): 211–215.]
- [21] 林志超, 潘晓明, 吴启赐, 等. 鲍鱼脏器碱提多糖的分离纯化、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 53–60. [LIN Z C, PAN X M, WU Q C, et al. Isolation, purification, structure characterization and antioxidant activity of alkali-extracted polysaccharide from abalone viscera[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 53–60.]
- [22] 莫翠园, 盛丽, 刘若凡, 等. 虎奶菇多糖提取工艺优化、结构鉴定及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2022, 47(9): 156–163. [MO C Y, SHENG L, LIU R F, et al. Extraction process optimization, structure identification and antioxidant activity of *Pleurotus tuberregium* polysaccharide[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(9): 156–163.]
- [23] 徐天, 左邀勋, 林伟泽, 等. 胶网藻多糖分离纯化、化学组成及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(2): 57–65. [XU T, ZUO A X, LIN W Z, et al. Isolation, purification, chemical composition and antioxidant activities of polysaccharides from *Dicetyosphaerium* sp. 1A10[J]. Food Research and Development, 2023, 44(2): 57–65.]
- [24] 魏磊, 王伟, 谢晓阳, 等. 响应面优化博爱赤松茸多糖提取工艺及其抑菌和抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(15): 213–220. [WEI L, WANG W, XIE X Y, et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from *Stropharia rugosoannulata* in Boai county by response surface method and evaluation of their antibacterial and antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 213–220.]
- [25] 刘龙江, 黄遥, 唐芳, 等. 室温化学沉淀法合成纳米氯化银及其表征[J]. 材料导报, 2013, 27(2): 28–30. [LIU L J, HUANG Y, TANG F, et al. Synthesis of nano-AgCl through direct precipitation method at room temperature and its characterization[J]. Materials Reports, 2013, 27(2): 28–30.]
- [26] 董萍, 杨永鹏, 丁克祥, 等. 不同血清浓度及体外培养时间对小鼠成纤维细胞 L929 细胞系生长曲线和细胞形态学的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(11): 2020–2024. [DONG P, YANG Y P, DING K X, et al. The influence of different blood serum concentration and growth time upon the growth curve and the morphological character of *in vitro* cultured L929 cell line of mouse fibroblasts[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2011, 31(11): 2020–2024.]
- [27] 齐佳, 崔艳君, 王广策, 等. 岩藻黄素对 H₂O₂ 诱导 BNL CL₂ 细胞氧化损伤保护作用研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(1): 63–68. [QI J, CUI Y J, WANG G C, et al. Protective effect of fucoxanthin against H₂O₂-induced oxidative damage in BNL CL₂ cells[J]. Periodical of Ocean University of China, 2019, 49(1): 63–68.]
- [28] 黄明浩, 黄泰奇, 邓丽娟. 响应面法优化白英粗多糖提取工艺及其体外抗氧化活性的分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 219–225. [HUANG M H, HUANG T Q, DENG L J. Optimization of *Solanum lyratum* crude polysaccharide extraction process using response surface methodology and analysis of its *in vitro* antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 219–225.]
- [29] 王娜, 刘玉叶, 刘美玲, 等. 响应面优化金丝小枣碱提多糖工艺及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 163–169. [WANG N, LIU Y Y, LIU M L, et al. Optimization of alkali extraction process of 'Jinsixiaozao' polysaccharide by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(7): 163–169.]
- [30] 宋佳敏, 王鸿飞, 孙滕, 等. 响应面法优化金蝉花多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 275–281. [SONG M J, WANG H F, SUN M, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Cordyceps cicadae* by response surface methodology[J]. Food Science, 2018, 39(4): 275–281.]
- [31] 邹文文. 鲍鱼脏器多糖分离纯化、结构分析及抗氧化活性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2013. [ZOU W W. Study on separation and purification, structure analysis and antioxidant activity of abalone viscera polysaccharide[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.]
- [32] 李冬梅. 鲍鱼脏器多糖的提取、分离纯化以及结构的研究[D]. 大连: 大连轻工业学院, 2007. [LI D M. Study on extraction, separation, purification and structure of polysaccharide from abalone viscous[D]. Dalian: Dalian Light Industrial College, 2007.]