DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260302006
引用格式: 臧琪琪, 王文璇, 李红艳, 等. 响应面法优化泡叶藻专用复合酶体系构建工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(9): 32–42.
ZANG QQ, WANG WX, LI HY, *et al*. Optimization of the construction process of a specialized composite enzyme system for *Ascophyllum nodosum* by response surface methodology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(9): 32–42. (in Chinese with English abstract).

响应面法优化泡叶藻专用复合酶体系构建工艺

臧琪琪[1,2], 王文璇[3], 李红艳[2,4], 孙元芹[2,4], 李 晓[2,4], 王 颖[2,4*], 刘天红[2,4*]

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266404; 2. 山东省海洋科学研究院, 青岛 266104; 3. 中国科学院大学海洋学院, 青岛 266400; 4. 青岛市水产生物品质评价与利用工程研究中心, 青岛 266104)

摘 要: 目的 研究褐藻胶裂解酶的最佳应用条件, 构建针对泡叶藻(*Ascophyllum nodosum*)的专用复合酶制剂最佳工艺。**方法** 通过控制变量法确定褐藻胶裂解酶的最适条件, 从褐藻胶裂解酶的最适条件出发, 以泡叶藻为研究对象, 以纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶作为复配酶, 通过泡叶藻酶解响应面实验, 获得泡叶藻复合酶制剂的最佳工艺条件, 以该条件对不同地理群体的泡叶藻(秘鲁、智利、法国)进行酶解, 以褐藻寡糖提取率为指标进行分析验证该复合酶制剂对不同来源的泡叶藻的降解作用, 比较酶解产物褐藻寡糖提取率及固体转化率, 验证该复合酶制剂的酶解效果。**结果** 褐藻胶裂解酶的最佳应用条件为加酶量 0.50%, pH=7.5, 作用时间 18 h, 酶解温度 45 ℃, 泡叶藻专用复合酶制剂最佳工艺条件为纤维素酶 1.82%, 果胶酶 1.2%, 木瓜蛋白酶 1.5%, 褐藻胶裂解酶 0.6%, 料液比 1:25 (g:mL), 酶解温度 45 ℃, pH=7.22, 作用时间 18 h, 在此条件下, 褐藻寡糖提取率为 14.46%。**结论** 通过利用本研究复合酶制剂对不同来源的泡叶藻的降解作用分析, 发现该复合酶制剂对不同来源的泡叶藻均具有有效降解作用且该复合酶制剂酶解效果要高于现有市售商业复合酶制剂。本研究构建的复合酶可直接酶解泡叶藻制备褐藻寡糖, 实现了海藻资源的直接利用, 为低成本制备功能性褐藻寡糖及相关农用生物制品的开发提供一了种新思路与技术参考。

关键词: 泡叶藻; 海藻酸钠; 褐藻胶裂解酶; 复合酶制剂; 褐藻寡糖

Optimization of the construction process of a specialized composite enzyme system for *Ascophyllum nodosum* by response surface methodology

ZANG Qi-Qi[1,2], WANG Wen-Xuan[3], LI Hong-Yan[2,4], SUN Yuan-Qin[2,4], LI Xiao[2,4], WANG Ying[2,4*], LIU Tian-Hong[2,4*]

(1. *College of Food Science and Engineering*, *Ocean University of China*, *Qingdao* 266404, *China*; 2. *Marine Science Research Institute of Shandong Province*, *Qingdao* 266104, *China*; 3. *College of Marine Sciences*, *University of Chinese Academy of Sciences*, *Qingdao* 266400, *China*; 4. *Municipal Engineering Research Center of Aquatic Biological Quality Evaluation and Application*, *Qingdao* 266104, *China*)

收稿日期: 2026-03-02
基金项目: 山东省重点研发计划项目(2023CXGC010414, 2022SFGC0101)
第一作者: 臧琪琪(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为海藻酶制品研发。E-mail: zangqiqi@stu.ouc.edu.cn
***通信作者:** 王颖(1971—), 女, 硕士, 研究员, 主要研究方向为海洋生物制品研发。E-mail: food_rc@sina.com
刘天红(1982—), 女, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为海洋生物活性物质制备。E-mail: oucthl@126.com

ABSTRACT: Objective To study the optimal application conditions for alginate lyase and construction the optimal process for a specialized composite enzyme preparation targeting *Ascophyllum nodosum*. **Methods** The optimal reaction conditions of alginate lyase were determined by the control variable method. Based on these optimal conditions, *Ascophyllum nodosum* was selected as the research material, and cellulase, pectinase and papain were used for composite enzyme preparation. The optimal technological parameters for compound enzymatic hydrolysis of *Ascophyllum nodosum* were obtained via response surface methodology. Under the optimized conditions, *Ascophyllum nodosum* from different geographical populations (Peru, Chile and France) were subjected to enzymatic hydrolysis. Using the extraction rate of alginate oligosaccharides as the evaluation index, the degradation capacity of the compound enzyme preparation against seaweed from different origins was analyzed. By comparing the extraction rate of alginate oligosaccharides and the solid conversion rate of enzymatic hydrolysis products, the hydrolysis efficiency of the composite enzyme preparation was verified. **Results** The optimal application conditions for the alginate lyase were an enzyme dosage of 0.50%, pH 7.5, reaction time 18 h and hydrolysis temperature 45 ℃. The optimal process conditions for the composite enzyme preparation of *Ascophyllum nodosum* enzymatic hydrolysis were cellulase 1.82%, pectinase 1.2%, papain 1.5% and alginate lyase 0.6%, solid-liquid ratio was 1:25 (g:mL), with an enzymatic hydrolysis temperature of 45 ℃, pH 7.22 and a reaction time of 18 h. Under these conditions, the extraction rates of alginate oligosaccharides was 14.46%. **Conclusion** By analyzing the degradation effects of the composite enzyme preparation from this study on *Ascophyllum nodosum* from different sources, it is found that this composite enzyme preparation effectively degrades *Ascophyllum nodosum* from various sources, and its enzymatic efficacy surpasses that of commercially available composite enzyme preparations on the market. The composite enzyme preparation constructed in this study can directly enzymolyze *Ascophyllum nodosum* to prepare alginate oligosaccharides, realizing the direct utilization of seaweed resources. It provides a new idea and technical reference for the low-cost preparation of functional alginate oligosaccharides and the development of related agricultural biological products.

KEY WORDS: *Ascophyllum nodosum*; sodium alginate; alginate lyase; composite enzyme preparation; alginate oligosaccharides

0　引　言

褐藻富含褐藻胶、岩藻糖等多种生物活性多糖[1], 在食品[2]、药品[3]及饲料[4]等领域具有广泛的应用潜力。泡叶藻(*Ascophyllum nodosum*), 属褐藻门(Phaeophyta)、圆子纲(Cyclosporeae)、墨角藻目(Fucales)、墨角藻科(Fucaceae), 又称岩衣藻, 是一种生长在潮间带的大型海藻, 主要长于北大西洋沿岸[5]。因其含有丰富的褐藻胶、多酚、岩藻聚糖硫酸酯和泡叶藻聚糖等活性物质, 具有抗氧化[6]、抗肿瘤[7]、调节免疫[8]等多种生物活性, 是目前研究的热点。泡叶藻褐藻胶的含量占其藻体多糖的 79%[9], 是海藻工业的重要原料, 常用于大规模生产碘、胶、醇[10]。

褐藻寡糖是褐藻胶的降解产物, 通常是指聚合度(degree polymerization, DP)在 2~10 之间, 由 *β-D*-甘露糖醛酸(M)和 *α-L*-古罗糖醛酸(G)通过 *β*-1,4 糖苷键连接形成二元线型嵌段化合物[11]。褐藻寡糖具有抗菌、抗氧化、促进植物生长等多种生物活性, 在农业、生物医药及食品工业中具有巨大的应用潜力[12], 其 DP (2~10)是影响其活性的关键。褐藻胶裂解酶通过 *β*-消除反应裂解褐藻胶糖苷键, 是制备褐藻寡糖的关键酶[13]。因其来源广泛、酶活力高、专一性强、反应条件温和, 在实际生产过程中具有广泛的应用前景[14–17]。褐藻含有纤维素、果胶等结构复杂的褐藻多糖, 单一褐藻胶裂解酶无法实现褐藻高效降解, 通过与纤维素酶、果胶酶等复配进一步提升褐藻降解效果, 但目前有关海藻原料特性的专用复合酶研发较为滞后, 市场上缺乏适配海藻原料的专用复合酶, 导致无法实现直接降解海藻制备褐藻寡糖, 制约了海藻资源的高值化利用。

本研究针对泡叶藻的结构特性, 利用褐藻胶裂解酶与纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶共同构建专用复合酶体系, 实现由褐藻直接提取褐藻寡糖, 提升海藻的降解速率和寡糖的产量, 拓展褐藻寡糖在食品、医药、生物医学等领域的应用范围和潜力, 以推动我国海藻资源的深度开发与高值化利用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泡叶藻(分别来自智利、法国、秘鲁, 青岛聚大洋藻业集团有限公司)。

褐藻寡糖标准品(纯度 99%, 酶法制备, DP=2~4, 南宁汉河生物科技股份有限公司); 褐藻胶裂解酶(实验室异源表达获得); 海藻酸钠(泡叶藻来源, 青岛海之林生物科技开发有限公司); 纤维素酶(400 U/mg)、果胶酶(50000 U/g)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)(上海源叶生物科技有限公司); 商用复合酶(褐藻胶裂解酶: 12000 U/g, 蛋白酶: 90000 U/g, 半纤维素酶: 160000 U/g, 青岛某生物股份有限公司); 碳酸氢铵(色谱纯)、Tris、盐酸、硫酸钠、硫酸铜、硫酸钾、硼酸、氢氧化钠(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

Superdex^{TM} Peptide 柱 G10/300 (10 mm×300 mm, 13 μm, 美国思拓凡公司); UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津公司); U3000 高效液相色谱仪、VERSA STAR pH 计(美国赛默飞世尔科技公司); GM-0.33A 隔膜真空泵(天津津腾实验设备有限公司); CR21N 低温冷冻离心机(日本日立公司); CPA225D 十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; DRHH-2 数显恒温水浴锅(上海双捷实验设备有限公司); Kjeltec 8400 全自动蛋白测定仪、Soxtec 8000 全自动脂肪测定仪(丹麦 FOSS 公司); FD-1A-50+真空冷冻干燥机[博医康(北京)仪器有限公司]。

1.3 泡叶藻成分检测

1.3.1 泡叶藻基本成分检测

水分按照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》测定, 灰分按照 GB 5009.4—2016《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》测定, 粗蛋白质按照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》测定, 粗脂肪按照 GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》测定, 不溶性膳食纤维与可溶性膳食纤维按照 GB 5009.88—2014《食品安全国家标准 食品中膳食纤维的测定》测定。

1.3.2 泡叶藻藻酸盐含量测定

泡叶藻 60 ℃烘干, 粉碎过 80 目筛, 参照 SC/T 3405—2018《海藻中褐藻酸盐、甘露醇含量的测定》进行测定。

1.4 酶解产物检测方法

1.4.1 定性分析

准确称取褐藻寡糖标准品 50 mg(精确至 0.1 mg), 用 10 mL 0.1 mol/L 碳酸氢铵溶液充分振荡溶解, 过 0.22 μm 聚醚砜微孔滤膜, 上机定性分析。色谱柱: Superdex^{TM} Peptide 柱 G10/300 (10 mm×300 mm, 13 μm); 流动相: 0.1 mol/L 碳酸氢铵溶液; 流速: 0.4 mL/min; 进样量: 20 μL; 紫外检测器波长: 235 nm, 时间: 60 min。采用面积归一化法得到寡糖聚合度及相对含量。

1.4.2 定量分析

参考 T/GXAF 0013—2023《复合肥料 褐藻寡糖含量的测定 分光光度计法》进行褐藻寡糖含量测定, 做如下改动。配制质量浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的褐藻寡糖标准工作溶液, 以超纯水作参比, 在 235 nm 波长测量吸收值(Abs), 得标准工作曲线。将酶解后样品 8000 r/min 离心, 用水定容至 50 mL, 取 1 mL 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后溶液, 用水稀释至 25 mL, 在 235 nm 波长处, 测定吸光值, 根据标准曲线计算得出褐藻寡糖的含量, 设置 3 个平行组。

1.4.3 固体转化率测定

酶解产物离心取沉淀真空冷冻干燥, 称取质量, 计算固体转化率。计算如公式(1)所示:

$$\text{固体转化率}/\%=\frac{M-M'}{M}\times 100\% \tag{1}$$

式中: M'为实验酶解残渣真空冷冻干燥后质量, g; M 为实验所用泡叶藻粉质量, g。

1.5 褐藻胶裂解酶酶解条件建立

实验前期确定褐藻胶裂解酶最适温度为 45 ℃, 因此在 45 ℃下考察酶解时间 6~24 h、添加量 0.1%~2.5%及 pH=6~8 对 1%海藻酸钠酶解效果。计算如公式(2)所示:

$$\text{海藻酸钠酶解率}/\%=\frac{x}{X}\times 100\% \tag{2}$$

式中: x 为实验提取得到寡糖含量, g; X 为实验所用海藻酸钠质量, g。

1.6 单因素实验

1.6.1 不同酶对泡叶藻酶解效果的影响

取泡叶藻粉 1 g, 褐藻胶裂解酶 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%(酶、藻粉质量比, 下同)在料液比为 1:20 (g:mL)、pH=7.5、45 ℃酶解 18 h; 取泡叶藻粉 1 g, 纤维素酶 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%, 果胶酶、木瓜蛋白酶分别为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%, 在其他酶解条件为: 料液比为 1:20 (g:mL)、褐藻胶裂解酶 0.5%、pH=7.5、45 ℃酶解 18 h。

1.6.2 不同料液比对泡叶藻酶解效果的影响

取泡叶藻粉 1 g, 料液比设为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 (g:mL), 在其他酶解条件为: 0.5%褐藻胶裂解酶、2%纤维素酶、1%果胶酶、1%木瓜蛋白酶, pH=7.5、45 ℃酶解 18 h。

1.6.3 不同酶解时间对泡叶藻酶解效果的影响

取泡叶藻粉 1 g, 设酶解时间 16、18、20、22、24、48 h, 在其他酶解条件为: 0.5%褐藻胶裂解酶、2%纤维素酶、1%果胶酶、1%木瓜蛋白酶, pH=7.5、45 ℃、料液比 1:20 的条件下酶解。

酶解结束后升温至 90 ℃、10 min 灭酶, 按 1.4 测定酶解产物中褐藻寡糖分子量分布、相对含量及提取率。其中褐藻寡糖提取率计算公式如(3)所示:

$$褐藻寡糖提取率/\%=\frac{m}{M}\times 100\% \quad (3)$$

式中: m 表示酶解液中寡糖含量, g。

1.7　响应面实验设计

根据 Box-Benhnken 设计原则[18], 以纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶、裂解酶、酶解 pH 和料液比的最适水平为自变量, 以褐藻寡糖含量为响应值进行 6 因素 3 水平实验, 并绘制 3D 响应面图。

1.8　复合酶制剂实际应用效果表征

1.8.1　不同地理群体泡叶藻酶解产物分析

收集 3 种不同地理群体泡叶藻(智利、秘鲁、法国), 根据 1.7 响应面实验设计所得最优条件进行实验, 并以褐藻寡糖提取率与固体转化率为表征指标与单一褐藻胶裂解酶、商业化复合酶制剂进行酶解效果比较。

1.8.2　复合酶制剂与商业化复合酶制剂实际应用效果比较

以泡叶藻粉为原料分别进行酶解实验, 以褐藻寡糖得率及固体转化率为表征指标, 进行实际酶解效果比较。

1.9　数据处理

本研究所有指标均设 3 次平行重复, 数据以平均值±标准偏差表示。响应面实验用 Design-Expert 13 软件构建二次回归模型, 数据整理、制表由 Microsoft 2019 系列软件完成, 各类图表采用 Origin 2024 软件绘制。数据经异常值检验(剔除偏离平均值 3 倍标准差以上数据), 确保结果可靠。

2　结果与分析

2.1　泡叶藻成分

不同褐藻成分如表 1 所示。由表 1 可知, 实验用泡叶藻的总膳食纤维含量最高, 其次是灰分和藻酸盐, 粗脂肪含量较低。与文献[19]相比粗脂肪含量偏低, 而粗蛋白和灰分含量偏高, 推测可能是受泡叶藻采集季节、地理位置等物候学因素影响。与其他大型褐藻(海带[20]、鼠尾藻[21]、铜藻[21]等)比较发现, 泡叶藻不溶性膳食纤维含量远高于鼠尾藻和铜藻。基于泡叶藻组成成分分析结果, 结合其高纤维、高蛋白的特点, 选取纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶作为复配酶与褐藻胶裂解酶进行下一步酶解实验。

表 1　不同褐藻的成分(g/100 g, 干重)

Table 1　Composition of different brown algae (g/100 g, dry weight)

样品	水分	灰分	粗蛋白	粗脂肪	可溶性膳食纤维	不溶性膳食纤维	藻酸盐
泡叶藻	9.46±0.14	39.43±1.31	9.66±0.17	1.53±0.04	8.54±0.33	32.14±2.16	27.5±0.98
泡叶藻[19]	11.08±0.53	30.89±0.06	8.70±0.07	3.62±0.17	—	—	—
海带[20]	—	37.40	10.70	0.70	—	—	—
鼠尾藻[21]	—	27.00	19.10	2.30	—	19.60	—
铜藻[21]	—	24.80	14.40	1.80	—	18.50	—

注: —表示未报道。

2.2　褐藻胶裂解酶对泡叶藻来源海藻酸钠最佳酶解条件研究

2.2.1　不同加酶量对海藻酸钠酶解效率的影响

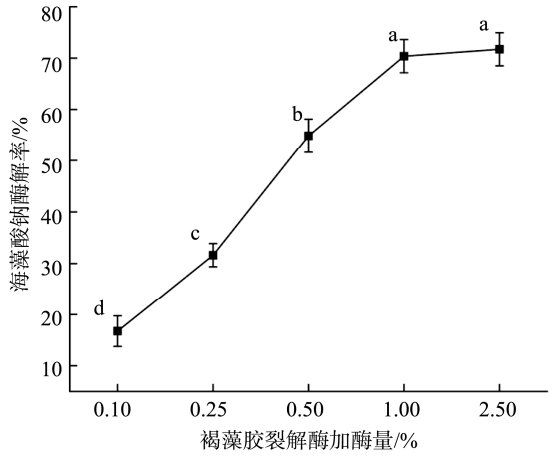
由图 1 可知, 海藻酸钠酶解率与酶添加量成正相关, 随着加酶量不断增加, 酶解率呈上升趋势。但当加酶量达到 1.00%后, 酶解率增加缓慢, 与 2.50%加酶量基本呈持平状态, 继续增加酶量对海藻酸钠酶解率不产生显著影响。由图 2 可知, 随加酶量不断增加至 1.00%后, 海藻酸钠完全分解, 海藻酸钠已基本转化为 DP=2~8 褐藻寡糖, 由此可以说明此褐藻胶裂解酶对泡叶藻来源的海藻酸钠具有显著酶解效果, 当加酶量达到 0.50%时, 酶解产物中 DP=6~8 的寡糖含量开始下降, 当加酶量为 2.50%时酶解产物主要集中在二糖至五糖, 根据 YIN 等[22]开展的聚焦于分子量较低(DP=2~4)的褐藻寡糖组分对踝关节肿胀的抑制活性研究及 PENG 等[23]关于不同褐藻寡糖组分的安全性及其对大豆种子的影响等研究可以发现 DP 与褐藻寡糖的生物活性之间存在一定相关性。综合选取 0.25%、0.50%、1.00%加酶量条件, 延长反应时间继续探究最适加酶量。

2.2.2　酶解时间对海藻酸钠酶解效率的影响

由图 3 可知, 随着时间的不断增加, 加酶量为 0.50%时, 海藻酸钠酶解率呈现先上升后下降的趋势, 并于 18 h 达到最大值, 且 0.50%加酶量的海藻酸钠酶解率始终高于 0.25%加酶量, 而加酶量 1.00%时, 延长作用时间对海藻酸钠酶解率的影响甚微, 且加酶量 0.50%条件下作用 18 h 可达到与 1.00%添加量接近的提取效果。结合图 4 可知, 加酶量为 0.50%, 作用时间 18 h 时, 海藻酸钠分解完全, 得到系列 DP 为 2~8 的褐藻寡糖。随作用时间的延长, 六糖含量呈现下降趋势, 褐藻寡糖集中在三糖至五糖之间。因此, 选取褐藻胶裂解酶最适加酶量 0.50%, 作用时间 18 h 进行 pH 条件探讨。

2.2.3　pH 对海藻酸钠酶解效率的影响

由图 5 可知, 随着 pH 的增加, 海藻酸钠酶解率不断升高, pH=7.5 时达到最高, 为 72.39%, pH=6.0 和 pH=9.0 条件下, 酶解率均低于 40%, 结合图 6 可知, pH=8.0 时, 仅有少



注: 不同字母表示组间具有显著性差异(P<0.05), 图 5、7 同。

图 1 加酶量对海藻酸钠酶解率的影响

Fig.1 Effects of enzyme dosage on the enzymatic hydrolysis efficiency rate of sodium alginate

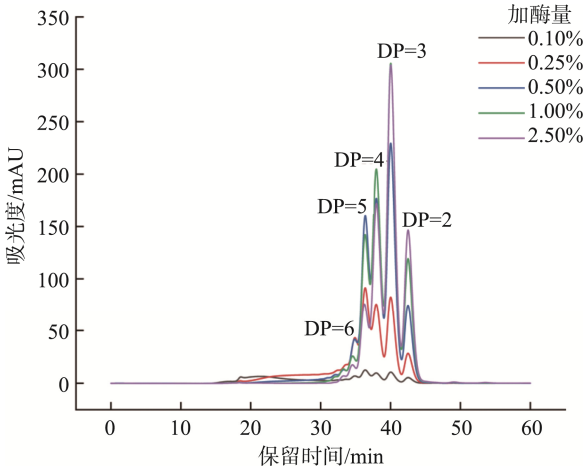
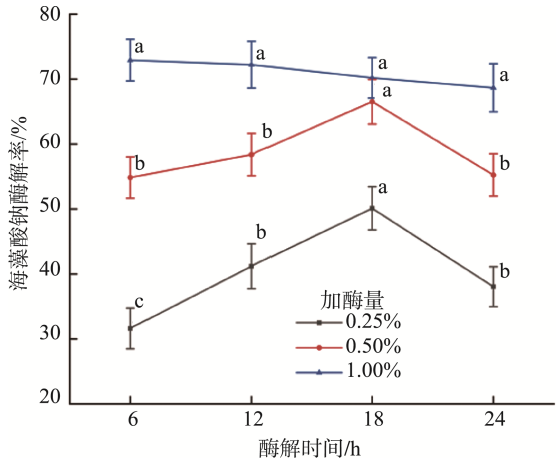


图 2 不同加酶量下酶解产物高效液相色谱图

Fig.2 High performance liquid chromatogram of enzymatic hydrolysate at different enzyme dosages



注: 同一加酶量下不同小写字母表示不同酶解时间差异显著(P<0.05)。

图 3 酶解时间对海藻酸钠酶解率的影响

Fig.3 Effects of enzymatic hydrolysis time on the enzymatic hydrolysis efficiency rate of sodium alginate

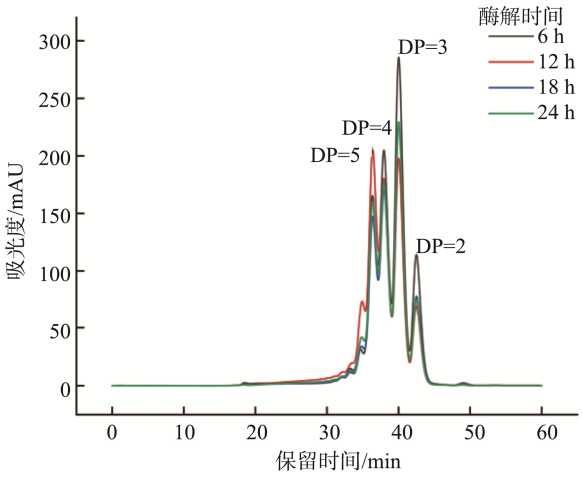


图 4 0.50%加酶量下不同酶解时间酶解产物高效液相色谱图

Fig.4 High performance liquid chromatogram of enzymatic hydrolysate at different enzymatic hydrolysis times with 0.50% enzyme dosage

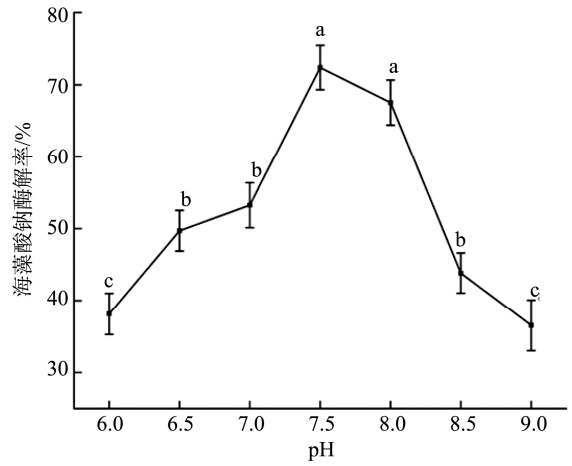


图 5 pH 对海藻酸钠酶解率的影响

Fig.5 Effects of pH on the enzymatic hydrolysis efficiency rate of sodium alginate

量海藻酸钠被酶解为小分子寡糖, 其余海藻酸钠仍以大分子多糖形式存在(图 6, 保留时间为 20 min)。这表明在碱性较为显著的条件下, 褐藻胶裂解酶活性会受到影响, 从而导致酶解率降低。因 pH 是影响褐藻胶裂解酶酶解效率的重要因素之一, 故选择 pH=7.5 作为后续响应面实验的一个中心点。

由图 2、4、6 可知, 随着加酶量和作用时间的增加, 泡叶藻海藻酸钠进一步得到酶解, 最终形成聚合度集中、相对含量高的系列寡糖, 这对定向专一制备褐藻寡糖, 提高其生物活性与利用率具有显著帮助。有研究表明, 酶解法制备的褐藻寡糖中的三糖具有促进大麦根生长的活性[24], 五糖对于骨肉瘤细胞的生长具有明显的抑制作用[25]。同时, DP 对抗氧化活性也有显著影响, XING 等[26]对褐藻寡糖聚合度及其抗氧化能力进行探究, 得出 DP 越低, 褐藻寡糖的抗氧化活性越高的结论。因此, 实验所得酶解条件有利于制备得到抗氧化活性高(DP=2~6)的褐藻寡糖。由图 6 可以发现 pH 对褐藻寡糖聚合度并没有产生较大影响, 结合图 5 发现在 pH=7.5 的条

件下，酶解率最高。综上，褐藻胶裂解酶对泡叶藻海藻酸钠最佳酶解条件为：加酶量 0.50%、pH=7.5、酶解时间 18 h、酶解温度 45 ℃，海藻酸钠酶解率可达 72.39%，DP 为 2~8。

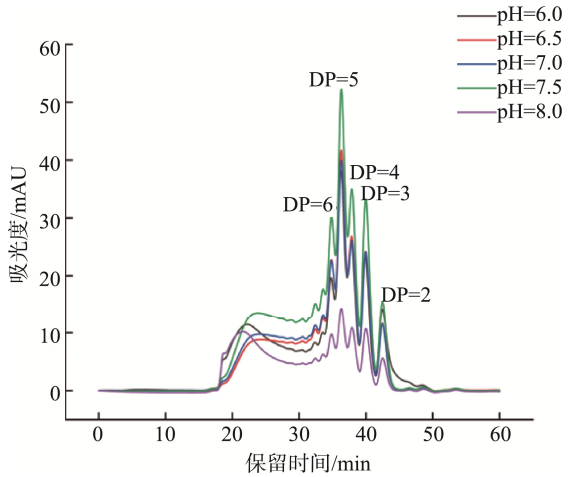


图 6　不同 pH 下酶解产物高效液相色谱图

Fig.6　High performance liquid chromatogram of enzymatic hydrolysate at different pH

2.3　单因素实验结果

基于 2.2.1 实验结果，选择 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%褐藻胶裂解酶添加量对泡叶藻酶解进行单因素实验，结果由图 7A 发现褐藻寡糖提取率随褐藻胶裂解酶的增加而升高，但当褐藻胶裂解酶添加量超过 0.5%时，褐藻寡糖提取率不再有明显升高，可能是泡叶藻细胞壁结构导致褐藻胶裂解酶不能再进一步降解，因此选择褐藻胶裂解酶 0.5%加酶量作为响应面实验的中心点之一。

褐藻寡糖提取率随纤维素酶添加量的增加(图 7B)，在 1.0%~2.0%之间呈显著上升趋势，但高于 2.0%后，褐藻寡糖提取率随之下降，可能是由于过量纤维素酶造成了褐藻寡糖的过度降解，故选取纤维素酶 2.0%添加量作为响应面实验的中心点之一。

褐藻寡糖提取率随果胶酶添加量的增加，呈现先上升后下降的趋势，在添加量 1.0%处达到最高值(图 7C)，果胶酶能降解细胞壁中的果胶成分，释放胞内褐藻寡糖，在 0.5%~1.0%添加量时，果胶酶不足，酶与底物接触不充分，因此增加酶量可提高褐藻寡糖提取率，当果胶酶添加量超过 1.0%时，褐藻寡糖提取率随加酶量的增加而降低，可能是酶过量导致部分褐藻寡糖被进一步降解为单糖或小分子。因此，选择果胶酶 1.0%添加量作为响应面实验的中心点之一。

木瓜蛋白酶添加量对于褐藻寡糖提取率的影响如图 7D 所示，其变化趋势与果胶酶基本一致，均呈现先上升后下降的趋势，故选取木瓜蛋白酶 1.0%添加量作为响应面实验的中心点之一。

料液比对褐藻寡糖提取率的影响如图 7E 所示，随料液比的增加，褐藻寡糖提取率呈上升趋势，并于 1:25 (g:mL)时达最大值，当料液比上升至 1:30 (g:mL)时褐藻寡糖提取率略微下降。这表明料液比过高或者过低都会对酶解效果产生影响，过低时可能造成体系过于黏稠，从而阻止寡糖向外扩散，过高时底物已耗尽或达平衡，继续稀释并不会再提高褐藻寡糖提取率，且料液比为 1:20、1:25、1:30 (g:mL)时，褐藻寡糖提取率相差甚微。综合实际生产考虑，故将料液比 1:20 (g:mL)作为响应面实验的中心点之一。

由图 7F 可知褐藻寡糖提取率在 16~18 h 间明显上升，18~24 h 之间寡糖提取率变化略有起伏，但基本呈上升趋势，

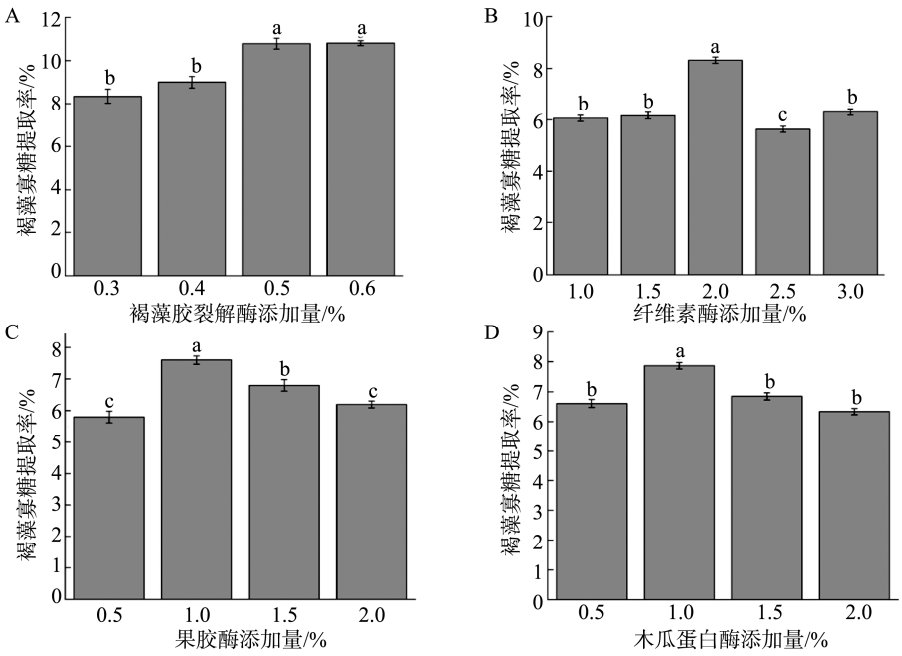


图 7　不同因素对褐藻寡糖提取率的影响

Fig.7　Effects of different factors on the extraction rates of alginate oligosaccharides

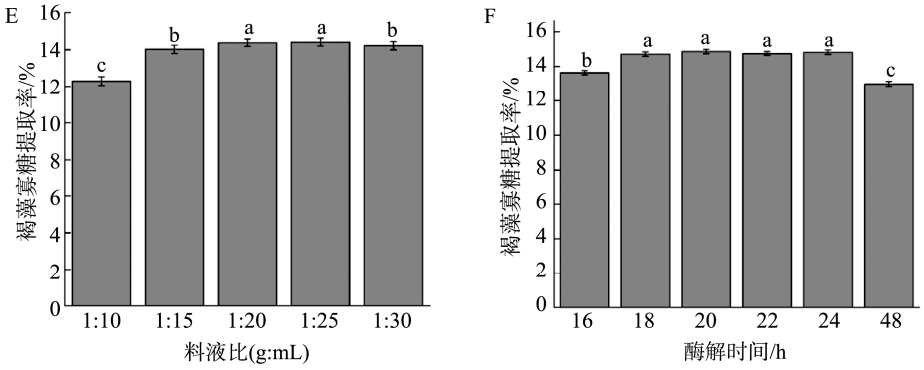


图 7(续) 不同因素对褐藻寡糖提取率的影响

Fig.7 Effects of different factors on the extraction rates of alginate oligosaccharides

24 h 后寡糖提取率明显下降, 酶解时间的长短会影响酶的酶活, 大部分酶的酶活随酶解时间的增加而降低, 在褐藻寡糖提取率增加不明显的情况下, 综合考虑时间与能耗成本及酶活性等因素, 最终确定 18 h 为最佳酶解时间。

2.4 响应面优化

2.4.1 响应面实验设计及结果

根据单因素实验所得结果, 建立 6 因素 3 水平的响应面实验条件, 其实验因素与水平值如表 2 所示。

表 2 Box-Behnken 实验设计的因素和水平

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken experimental design

因素	–1	0	1
A(纤维素酶添加量)/%	1.5	2.0	2.5
B(果胶酶添加量)/%	0.5	1.0	1.5
C(木瓜蛋白酶添加量)/%	0.5	1.0	1.5
D(褐藻胶裂解酶添加量)/%	0.4	0.5	0.6
E(料液比)(g:mL)	1:15	1:20	1:25
F (pH)	7.0	7.5	8.0

2.4.2 回归方程拟合及方差分析

对响应面实验所得数据进行分析, 可得到拟合的二次多项式回归方程:

$$Y=0.095-2.473\times10^{3}A-1.842\times10^{3}B+7.048\times10^{4}C-1.594\times10^{3}D+6.885\times10^{3}E-1.990\times10^{3}F-3.125\times10^{3}AB-3.559\times10^{4}AC-7.607\times10^{3}AD+7.258\times10^{3}AE-1.021\times10^{3}AF+0.016BC-2.366\times10^{3}BD-3.425\times10^{3}BE+7.225\times10^{4}BF+1.134\times10^{3}CD+2.938\times10^{3}CE+7.661\times10^{4}CF+4.315\times10^{3}DE-3.869\times10^{4}DF-2.185\times10^{3}EF-9.203\times10^{3}A^{2}+0.012B^{2}+0.016C^{2}+2.660\times10^{3}D^{2}+0.015E^{2}-4.719\times10^{3}F^{2}$$

通过软件 Design Expert 13 计算该模型的回归系数及其方差分析, 结果见表 3。回归模型的 *P* 为 0.0216 (*P*<0.05), 表明该模型有意义。失拟项 *P* 为 0.151 (*P*>0.05), 则该模型中预测结果可靠。模型的信噪比 7.779>4, 证明模型的拟合精度高, 实验数据可取。

通过 *F* 验证法显示, *BF* 交互项、*AB* 交互项, 二次项 B^2、C^2、E^2 以及 *E* 对褐藻寡糖提取量具有显著影响, 其显著性排序为: *BF*>*AB*。

表 3 回归系数及显著性检验

Table 3 Regression coefficients and significance test

方差来源	平方和	自由度	均方差	*F*	*P*
模型	0.012	27	4.62E-04	2.240	0.0216
A	1.47E-04	1	1.47E-04	0.710	0.4067
B	8.14E-05	1	8.14E-05	0.390	0.5355
C	1.19E-05	1	1.19E-05	0.058	0.8120
D	6.10E-05	1	6.10E-05	0.300	0.5915
E	1.14E-03	1	1.14E-03	5.510	0.0268
F	9.51E-05	1	9.51E-05	0.460	0.5034
AB	9.26E-04	1	9.26E-04	4.480	0.0439
AD	7.81E-05	1	7.81E-05	0.380	0.5438
BC	4.18E-06	1	4.18E-06	0.020	0.8880
BF	1.97E-03	1	1.97E-03	9.540	0.0047
CD	1.03E-05	1	1.03E-05	0.050	0.8250
CF	9.39E-06	1	9.39E-06	0.045	0.8328
DE	1.49E-04	1	1.49E-04	0.720	0.4034
EF	3.82E-05	1	3.82E-05	0.190	0.6706
A^2	8.71E-04	1	8.71E-04	4.220	0.0500
B^2	1.41E-03	1	1.41E-03	6.810	0.0148
C^2	2.56E-03	1	2.56E-03	12.390	0.0016
D^2	7.28E-05	1	7.28E-05	0.350	0.5578
E^2	2.30E-03	1	2.30E-03	11.160	0.0025
F^2	2.29E-04	1	2.29E-04	1.110	0.3019
残差	5.37E-03	26	2.06E-04		
失拟项	4.91E-03	21	2.34E-04	2.550	0.1510
纯误差	4.58E-04	5	9.15E-05		
总离差	0.018	53			

2.4.3 交互作用分析

如图 8A 所示, *AB* 交互作用显著, 响应面发生弯曲, 表明纤维素酶和果胶酶之间存在显著交互作用, 与方差分析结果一致; 由图 8B 可知, *BF* 交互作用等高线呈椭圆形, 说明果胶酶和 pH 交互作用显著, 且 pH 在轴向等高线变化较为稀疏, 果胶酶在轴向等高线变化较为密集, 所以果胶酶对于寡糖提取率影响较大。

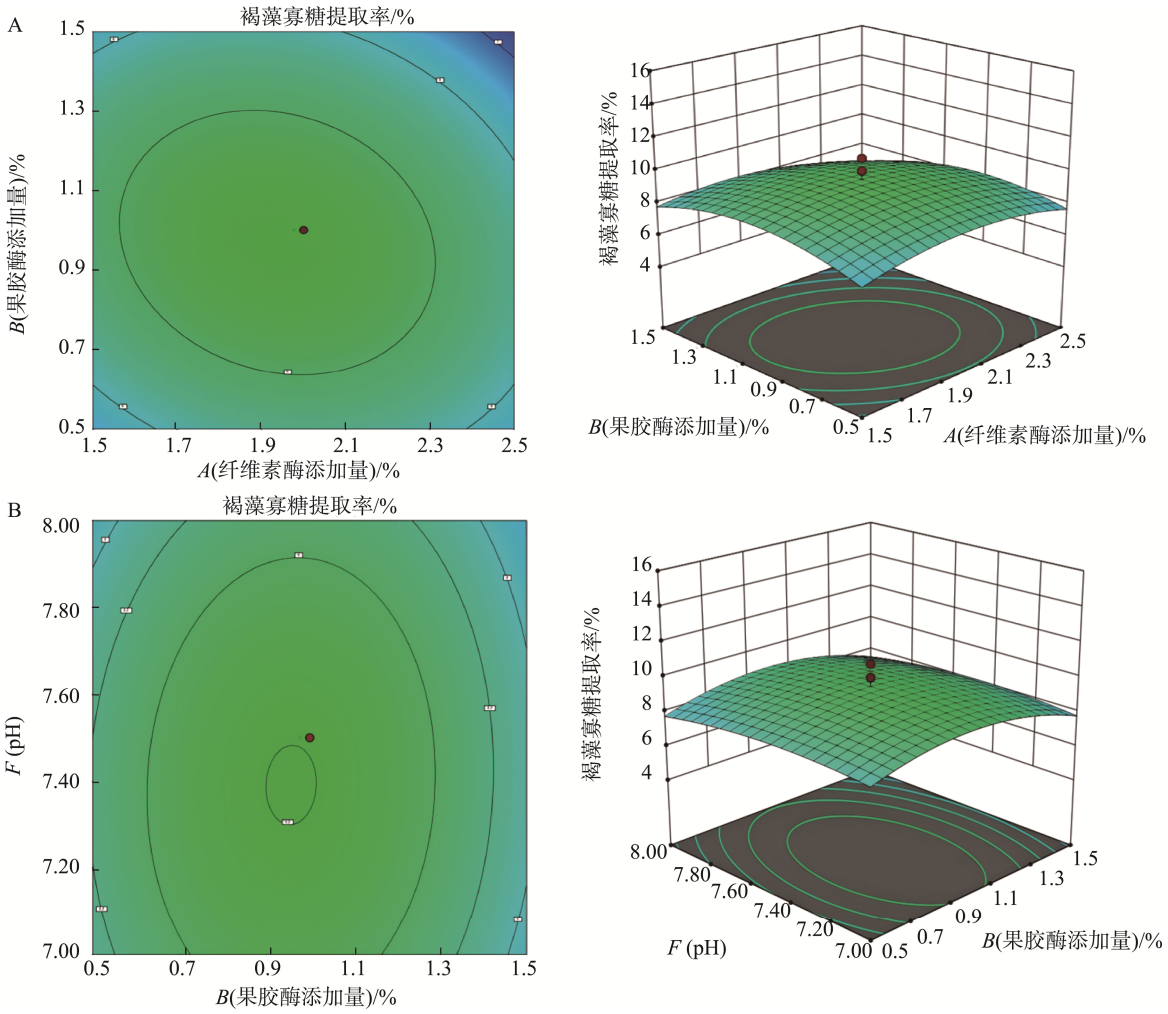


图 8　纤维素酶添加量(A)、pH (B)与果胶酶添加量交互作用等高线图与 3D 图

Fig.8　Contour and 3D plots of the interaction among amount of cellulase added (A), pH (B) and amount of pectinase added

综上，各酶类间具有交互作用，其中以纤维素酶和果胶酶之间的相互作用最为显著; pH 和各酶之间具有交互作用，其中以果胶酶和 pH 之间交互显著。通过数据分析，得到最优工艺条件：褐藻胶裂解酶 0.6%，纤维素酶 1.82%，果胶酶 1.2%，木瓜蛋白酶 1.5%，料液比为 1:25 (g:mL)，pH=7.22，温度为 45 ℃，反应时间为 18 h，此时褐藻寡糖提取率为 14.46%。

2.4.4　结果验证

按照响应面优化实验结果进行 3 次酶解提取验证实验，并计算其寡糖含量及寡糖提取率，3 次实验寡糖提取率分别为 15.23%、16.82%、15.99%，此时泡叶藻褐藻寡糖提取率平均值为 16.01%，相对平均偏差为 3.36%，表明该方法重复性良好。

2.5　复合酶制剂实际应用效果表征

2.5.1　不同地理群体泡叶藻酶解产物分析

如图 9 所示，不同地理群体泡叶藻均能被有效酶解，寡糖提取率排序为：秘鲁泡叶藻(15.80%)>法国泡叶藻(15.00%)>智利泡叶藻(14.50%)。如图 10A 所示，酶解得到

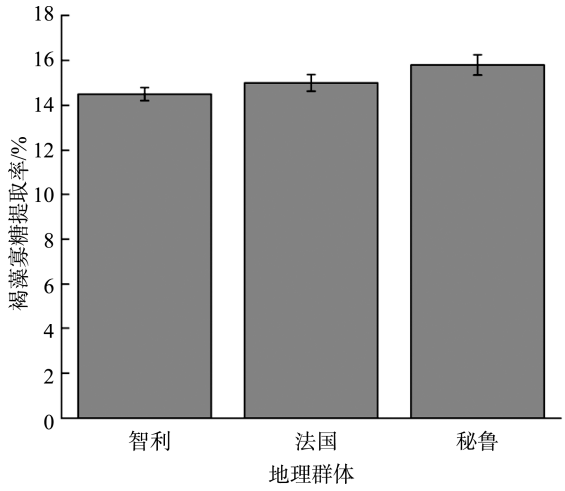


图 9　不同地理群体泡叶藻褐藻寡糖提取率

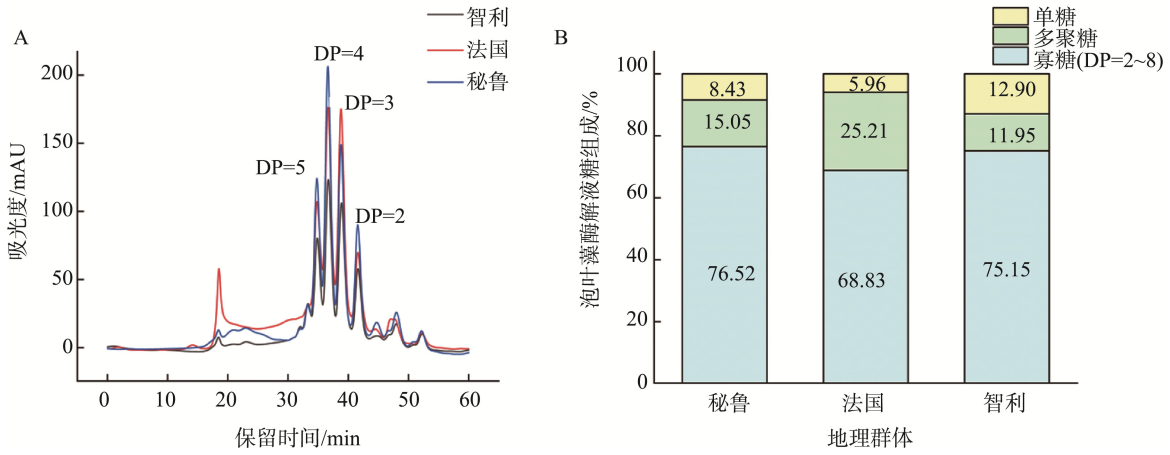
Fig.9　Extraction rates of alginate oligosaccharide from different geographical populations of *Ascophyllum nodosum*

DP 为 2~8 的系列褐藻寡糖，除法国泡叶藻具有少量未彻底酶解的多聚糖产物外，秘鲁泡叶藻与智利泡叶藻均被较好地酶解。这表明，不同地理群体泡叶藻因其气候、生

长环境的差异，同一复合酶制剂对其提取效果也存在一定差异。因此，在实际应用中需根据原料特性与酶制剂进行适配性调整。对所得酶解寡糖相对含量进行进一步分析，结果如图 10B 所示。其中，秘鲁泡叶藻寡糖(DP=2~8)相对含量最高，为 76.52%，其次为智利泡叶藻，寡糖相对含量为 75.15%，法国泡叶藻的寡糖相对含量为 68.83%。

2.5.2 复合酶制剂与商业化复合酶制剂实际应用效果比较

如图 11A 所示，复合酶制剂与商业化复合酶制剂相比，复合酶制剂的褐藻寡糖提取率要高于商用复合酶制剂，证明该复合酶制剂达到现有市场销售产品水平，下一步可继续优化配方提高褐藻寡糖提取率。进一步对固体转化率进行测定与分析，结果如图 11B 所示，结合图 11A 发现在不同酶类下，泡叶藻的固体转化率与褐藻寡糖提取率具有相互统一的结论，褐藻寡糖提取率高的酶类，固体转化率也高。本研究复配复合酶工艺条件下的泡叶藻酶解效果优于本次研究所用商业化复合酶制剂，且高于单一褐藻胶裂解酶。



注: A. 高效液相色谱图; B. 百分比堆积柱状图。

图 10 不同地理群体泡叶藻酶解产物多糖组成

Fig.10 Polysaccharide composition of enzymatic hydrolysate of different geographical populations of *Ascophyllum nodosum*

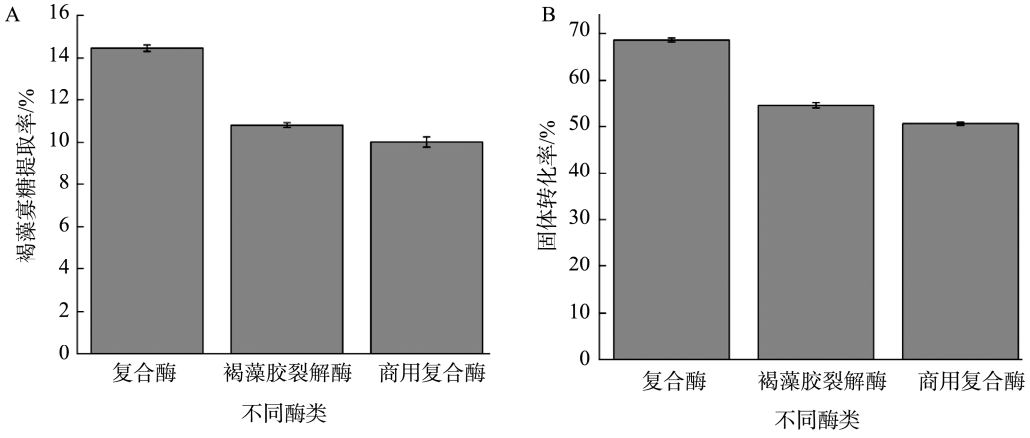


图 11 不同酶类的褐藻寡糖提取率(A)及固体转化率(B)

Fig.11 Extraction rate of alginate oligosaccharide (A) and solid conversion rate (B) with different enzymes

3 讨论与结论

3.1 讨 论

目前泡叶藻相关研究主要集中在营养、聚糖提取与活性研究中[27]，缺少复合酶制剂研发相关研究。与海带、马尾藻等褐藻相比，泡叶藻细胞壁中褐藻胶与纤维素、果胶的交联结构更为紧密，且含有较高比例的酚类化合物[9]，单一酶法难以高效释放褐藻寡糖。因此，开发针对泡叶藻细胞壁结构特点的复合酶体系具有重要的研究价值与应用前景。与其他褐藻提取寡糖对比，杨洁茹等[28]利用酶解法对海带中褐藻寡糖进行提取，得率为 3.25 mg/mL，本研究中复合酶法提取的泡叶藻褐藻寡糖提取率为 14.46%(统一单位后大致为: 5.79 mg/mL)，推断产生如此差异的原因除泡叶藻自身褐藻胶含量与结构同海带有较大差距外，复合酶的协同作用机制也是本研究中褐藻寡糖提取率有较大提升的关键因素。李燕妹等[29]利用超声辅助酶法提取功能性

寡糖, 在提取料液比为 1:30 (g:mL), 超声提取温度为 50 ℃条件下反应 1.5 h, 多糖产率为 12.02%, 经除杂与优化, 寡糖提取率为 2.38%, 与之相比, 本研究复合酶法增加了复配酶种类, 纤维素酶和果胶酶首先作用于泡叶藻细胞壁中的纤维素-果胶复合网络, 破坏细胞壁的完整性, 暴露出被包裹的褐藻胶, 为褐藻胶裂解酶提供更多可及位点, 有效提升了褐藻寡糖提取率。鲍青云等[30]利用纤维素酶辅助提取泡叶藻聚糖, 在液料比 1:30 (mL:g)、酶解 2 h、温度 50 ℃条件下进行提取, 多糖提取率为 14.65%±0.73%, 表明加入酶类能够增加褐藻多糖提取率, 进而提升褐藻寡糖得率。

3.2 结　论

本研究通过建立褐藻胶裂解酶酶解泡叶藻来源海藻酸钠的最优酶解工艺后引入复配酶类, 构建了针对泡叶藻酶解的复合酶体系: 纤维素酶 1.82%, 果胶酶 1.2%, 木瓜蛋白酶 1.5%, 褐藻胶裂解酶 0.6%, 料液比 1:25 (g:mL), 酶解温度 45 ℃, pH=7.22, 作用时间 18 h, 寡糖得率为 14.46%。且该复合酶对不同地理群体(秘鲁、智利、法国)泡叶藻均有较好的酶解效果, 寡糖提取率分别为: 15.80%(秘鲁)、15.00%(法国)、14.50%(智利)。根据实验结果, 本研究构建的泡叶藻复合酶体系在寡糖提取率上优于市售现有复合酶, 具有较高商业价值, 应用前景广阔。值得一提的是, 本研究所用商用复合酶制剂在其使用说明里指出, 其酶解底物为海带, 推测这可能是其针对泡叶藻酶解效率较低的原因, 不同海藻的细胞壁结构、多糖组成、与物理致密性等差异极大, 通用酶无法实现高效、彻底、稳定的酶解, 只有针对底物特性定制化复合酶, 才能最大化降解率。下一步, 可通过继续优化酶制剂配方及酶解工艺, 进一步提高褐藻寡糖提取率, 同时也可开展针对其他褐藻的酶解工艺研究。

参考文献

[1] 王丹丹. 两类内切型褐藻胶裂解酶可变的底物降解模式研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
WANG DD. Studies on the variable alginate-degrading modes of two types of endolytic alginate lyases [D]. Ji'nan: Shandong University, 2018.

[2] 郭辽朴, 李洪军. 褐藻胶生物活性及在食品中应用的研究进展[J]. 四川食品与发酵, 2007(6): 9–12.
GUO LP, LI HJ. New progress in the research on bioactivities and applicayion of alginate [J]. Sichuan Food and Fermentation, 2007(6): 9–12.

[3] 王鑫绣. 褐藻胶裂解酶的性质鉴定与热稳定性改造[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
WANG XX. Characterization of novel alginate lyaseand its thermostability modification [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.

[4] 王小涵. 弧菌褐藻胶裂解酶的表征及应用潜力分析[D]. 济南: 山东大学, 2023.
WANG XH. Characterization and application potential analysis of the alginate lyases from *Vibrio* [D]. Ji'nan: Shandong University, 2023.

[5] KADAM SU, ÁLVAREZ C, TIWARI BK, *et al*. Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum* [J]. Food Research International, 2016, 99(3): 1021–1027.

[6] 虞娟, 林航, 高炎, 等. 泡叶藻多糖的提取及其抗氧化活性研究[J]. 广东化工, 2016, 43(14): 18–20.
YU J, LIN H, GAO Y, *et al*. Extraction and antioxidant activities of polysaccharides from *Ascophyllum nodosum* [J]. Guangdong Chemical Industry, 2016, 43(14): 18–20.

[7] ABU R, JIANG Z, UENO M, *et al*. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 458(4): 727–732.

[8] NA YS, KIM WJ, KIM SM, *et al*. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens* [J]. International Immunopharmacology, 2009, 10(3): 364–370.

[9] 李红艳, 李晓, 王颖, 等. 泡叶藻的营养成分分析及评价[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 118–124.
LI HY, LI X, WANG Y, *et al*. Chemical analysis and nutritional assessment of *Ascophyllum nodosum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 118–124.

[10] NAKAYASU S, SOEGIMA R, YAMAGUCHI K, *et al*. Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown alga *Ascophyllum nodosum* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(4): 961–964.

[11] 刘明志, 龙明鑫, 杨婷, 等. 褐藻酸寡糖的制备及其在生猪养殖中的应用研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2024, 45(6): 58–63.
LIU MZ, LONG MX, YANG T, *et al*. Research progress on the preparation of alginate oligosaccharides and their application in pig breeding [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2024, 45(6): 58–63.

[12] CAO SS, LI Q, XU YX, *et al*. Evolving strategies for marine enzyme engineering: Recent advances on the molecular modification of alginate lyase [J]. Marine Life Science & Technology, 2021, 4(1): 1–11.

[13] OGURA K. Diversity and ecological roles of alginate lyases in marine and human microbial ecosystems [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2025, 89(10): 1409–1417.

[14] 崔永燕, 杨敏, 刘楠, 等. 褐藻胶寡糖的酶法定向制备及其结构-功能关系的研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(10): 320–329.
CUI YY, YANG M, LIU N, *et al*. Research progress on the directed enzymatic preparation and structure-function relationship of alginate oligosaccharides [J]. Food Science, 2024, 45(10): 320–329.

[15] YANG J, CUI DD, CHEN DW, *et al*. Purification and characterization of a novel endolytic alginate lyase from *Microbulbifer* sp. SH-1 and its agricultural application [J]. Marine Drugs, 2020, 18(4): 184–184.

[16] 刘以晴, 马月云, 刘宗浩, 等. 褐藻胶寡糖的制备、分离及表征研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 456–468.
LIU YQ, MA YY, LIU ZH, *et al*. Review on preparation, separation and characterization of alginate oligosaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 456–468.

[17] ANJANA K, ARUNKUMAR K. Brown algae biomass for fucoxanthin, fucoidan and alginate; update review on structure, biosynthesis, biological

activities and extraction valorisation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 280(2): 135632.

[18] BOOTH GB, HUNTER WG. Statistics for experi-menters: An introduction to design, data analysis, and model building [J]. Journal of the American Statistical Association, 1979, 74(367): 731.

[19] LORENZO JM, AGREGÁN R, MUNEKATA PES, *et al*. Proximate composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata* [J]. Marine Drugs, 2017, 15(11): 360.

[20] 姚海芹, 王飞久, 刘福利, 等. 食用海带品系营养成分分析与评价[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 95–98.
YAO HQ, WANG FJ, LIU FL, *et al*. Chemical analysis and nutritional assessment of new varieties of *Saccharina japonica* [J]. Food Science, 2016, 37(12): 95–98.

[21] 詹冬梅, 王翔宇, 辛美丽, 等. 三种马尾藻的营养组成分析[J]. 广西科学院学报, 2016, 32(3): 221–225.
ZHAN DM, WANG XY, XIN ML, *et al*. Nutritional constituents of three kinds of *Sargassum* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2016, 32(3): 221–225.

[22] YIN CY, LYU QQ, DONG ZS, *et al*. Well-defined alginate oligosaccharides ameliorate joint pain and inflammation in a mouse model of gouty arthritis [J]. Theranostics, 2024, 14(8): 3082–3103.

[23] PENG Q, ZHANG MM, GAO L, *et al*. Effects of alginate oligosaccharides with different molecular weights and guluronic to mannuronic acid ratios on glyceollin induction and accumulation in soybeans [J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(5): 1850–1858.

[24] TOMODA YUK, ADACHI T. Promotion of barley root elongation under hypoxic conditions by alginate lyase-lysate [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(1): 202–203.

[25] CHEN JY, HU Y, ZHANG LR, *et al*. Alginate oligosaccharide DP5 exhibits antitumor effects in osteosarcoma patients following surgery [J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8. DOI: 10.3389/fphar.2017.00623

[26] XING MC, CAO Q, WANG Y, *et al*. Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides [J]. Marine Drugs, 2020, 18(3): 144.

[27] 何萍萍, 韦敬柳乙, 姜泽东, 等. 泡叶藻聚糖低分子质量降解片段组成特征及其体外免疫诱导活性[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 139–145.
HE PP, WEI JLY, JIANG ZD, *et al*. Composition and in *vitro* immunostimulatory activity of low-molecular-mass fractions of chemically degraded ascophyllan from *Ascophyllum nodosum* [J]. Food Science, 2019, 40(11): 139–145.

[28] 杨洁茹, 沈照鹏, 江晓路, 等. 酶法提取海带成分分析[J]. 食品科技, 2019, 44(7): 277–282.
YANG JR, SHEN ZP, JIANG XL, *et al*. Analysis of the components of kelp extract after enzymolysis [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(7): 277–282.

[29] 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]. 渔业研究, 2018, 40(6): 458–468.
LI YM, LV F, XU YN, *et al*. Optimization of ultrasonic-assisted cellulose extraction technology for *Ulva lactuca* functional oligosaccharide [J]. Journal of Fisheries Research, 2018, 40(6): 458–468.

[30] 鲍青云, 韦敬柳乙, 姜泽东, 等. 响应面法优化纤维素酶辅助从泡叶藻中提取泡叶藻聚糖的工艺[J]. 过程工程学报, 2018, 18(3): 632–638.
BAO QY, WEI JLY, JIANG ZD, *et al*. Optimization of cellulase assisted extraction conditions for sulfated polysaccharide (ascophyllan) from *Ascophyllum nodosum* by response surface methodology [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2018, 18(3): 632–638.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)