

海绵 *Hyrtios erectus* 抗氧化产物超声提取工艺优化及其抗氧化活性分析

刘书伟, 沈梦霞, 王燕, 张田田, 武天明

Ultrasonic-Assisted Extraction Optimization of Antioxidant Products from *Hyrtios erectus* and Its Antioxidant Activity

LIU Shuwei, SHEN Mengxia, WANG Yan, ZHANG Tiantian, and WU Tianming

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022070373>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

响应面法优化紫山药中原花青素超声提取工艺及抗氧化性研究

Optimization of ultrasonic-assisted extraction of procyanidins from purple yam by response surface methodology and antioxidant activity

食品工业科技. 2017(13): 181-185 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.13.034>

杨树口蘑多糖的超声波辅助提取工艺及其抗氧化活性

Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Tricholoma populinum*

食品工业科技. 2018, 39(5): 180-184 <https://doi.org/>

胭脂果多糖提取工艺优化及其抗氧化活性分析

Optimization of Extraction Process of Polysaccharide from *Padus napaulensis* and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2020, 41(4): 139-145 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.04.024>

响应面法优化结香花总黄酮提取工艺及其抗氧化活性

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Edgeworthia chrysantha* Lindl. by Response Surface Analysis and Its Antioxidant Activities *in Vitro*

食品工业科技. 2020, 41(19): 192-197 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.030>

赤水白茶总黄酮超声辅助提取工艺优化及其抗氧化活性

Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction of Total Flavonoids from Chishui White Tea and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2020, 41(17): 206-211,218 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.034>

响应面优化维吾尔调和茶提取工艺及抗氧化活性

Optimization of extraction technique of Uighur medicinal tea by response surface methodology and its antioxidant activity

食品工业科技. 2018, 39(9): 159-163,169 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.09.028>



刘书伟, 沈梦霞, 王燕, 等. 海绵 *Hyrtios erectus* 抗氧化产物超声提取工艺优化及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(9): 236–243. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070373

LIU Shuwei, SHEN Mengxia, WANG Yan, et al. Ultrasonic-Assisted Extraction Optimization of Antioxidant Products from *Hyrtios erectus* and Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(9): 236–243. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070373

· 工艺技术 ·

海绵 *Hyrtios erectus* 抗氧化产物超声提取工艺优化及其抗氧化活性分析

刘书伟, 沈梦霞, 王 燕, 张田田*, 武天明
(海南热带海洋学院生态环境学院, 海南三亚 572022)

摘要: 为探索海绵动物抗氧化提取物的提取工艺及提取物的抗氧化活性, 以 *H. erectus* 海绵乙醇提取物的 DPPH 自由基清除率为响应值, 分别考察超声温度、超声时间和超声功率 3 个影响因素, 通过 Box-Behnken 响应面设计确定最佳超声提取工艺。以该工艺提取物为实验材料, 分析其对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 和 •OH 的清除效果, 通过构建 H₂O₂ 氧化损伤模型研究提取物对氧化损伤 L02 细胞的活力和对 H₂O₂ 氧化应激胞内 ROS 含量的影响。结果表明: 可操作的最佳工艺为超声温度 57 °C, 超声时间 60 min, 超声功率 490 W, 在此条件下, 提取物 DPPH 自由基清除率为 61.98%±1.52%, 与预测值 62.16% 吻合度较好, 该提取物对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 和 •OH 具有良好的清除效果, 提取物处理组细胞活力均显著高于模型组 ($P<0.05$), 且细胞内 ROS 荧光强度均极显著低于模型组 ($P<0.01$)。总之, 该工艺提取物具有较广泛的抗氧化活性, 对 H₂O₂ 氧化损伤的 L02 细胞具有保护作用, 该研究可为抗氧化食品添加剂的研发提供理论支撑。

关键词: 响应面, 海绵动物, 抗氧化, 自由基, 活性氧

中图分类号: TS202.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)09-0236-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022070373



本文网刊:

Ultrasonic-Assisted Extraction Optimization of Antioxidant Products from *Hyrtios erectus* and Its Antioxidant Activity

LIU Shuwei, SHEN Mengxia, WANG Yan, ZHANG Tiantian*, WU Tianming

(College of Ecology and Environment, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China)

Abstract: To explore the process of extraction and antioxidant activity of products from marine sponge, three influencing factors, ultrasonic temperature, ultrasonic time, and ultrasonic power were investigated respectively taking DPPH radicals scavenging rate of ethanol extracts from *H. erectus* as the response value, and the optimal ultrasonic-assisted extraction process was determined by Box-Behnken design. The extract obtained from *H. erectus* by the best ultrasonic-assisted process was detected for antioxidant activity, which included the scavenging effect on DPPH radicals, ABTS⁺ and •OH. The effects of the extract on viability of oxidative damage L02 cells and content of intracellular ROS were detected by constructing a cell model of H₂O₂ induced oxidative damage. The results showed that the optimized process conditions were as follows: Ultrasonic temperature was 57 °C, ultrasonic time was 60 min, and ultrasonic power was 490 W. Under these conditions, the DPPH scavenging rate of the extract was 61.98%±1.52%, which agreed well with the predicted value of 62.16%. The extract showed good scavenging effects on DPPH radical, ABTS⁺ and •OH. The cell viability of treated groups was significantly higher than that of the model group ($P<0.05$), and the intensity of intracellular ROS fluorescence was significantly lower than that of the model group ($P<0.01$). In general, the product from *H. erectus* had a wide range of

收稿日期: 2022-08-02

基金项目: 三亚市农业科技创新项目 (2019NK12); 海南省自然科学基金项目资助 (221MS049, 321RC589, 423MS052); 海南省科技项目资助 (ZDYF2022XDNY172)。

作者简介: 刘书伟 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品和药品资源开发, E-mail: hnlsw@163.com。

* 通信作者: 张田田 (1986-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品和药品资源开发, E-mail: zhangtiantian2011@163.com。

antioxidant activity, and it had a protective effect on H_2O_2 induced oxidative damage in L02 cells. This study provides theoretical support for the research and development of antioxidant food additives.

Key words: response surface; marine sponge; anti-oxidation; free radical; reactive oxygen species (ROS)

海绵属于多孔动物门,是最原始的多细胞动物,营固着生活,广泛分布在热带、温带和极地地区^[1],目前已发现的海绵有 9000 多种^[2]。海绵是仅次于珊瑚礁的第二大底栖生物群落,具有丰富的生物多样性^[3],被认为是天然产物的重要来源^[4]。据报道,从海洋无脊椎动物中分离出的 15000 多种海洋天然产物中 30% 以上来自海绵^[5-6],显著高于其他海洋动物、陆生植物和微生物^[7-8],为新药研制提供了大量高活性的先导化合物,目前海绵已成为海洋生物中研究最活跃的领域之一^[9]。海绵天然产物主要包括生物碱^[10-11]、聚酮类化合物、萜类化合物^[12]、肽类、芳烃类、类萜类、大环内酯类、类固醇类和卤代化合物^[13]等物质,以上物质表现出丰富的化学多样性^[3],并且显示了较好的生物活性,如抗氧化活性^[14]、抗菌活性^[3]、抗癌活性^[15]、抗病毒活性^[16]、抗炎活性^[17]和防污活性^[18]等。

海绵天然产物抗氧化活性突出,研究发现 *H. erectus* 海绵提取物对 DPPH 自由基、超氧阴离子和羟基自由基具有较强的抗氧化活性^[19],*Dysidea area-ria* 海绵中的 Dysiarenon 化合物通过抑制 5-LOX/NF- κ B/MAPK 信号通路发挥抗氧化作用^[20],海绵动物中酚类、胶原蛋白等物质是海绵中的主要抗氧化成分^[21-22],海绵天然产物的抗氧化活性已成为海绵活性研究的一个重要方面^[23]。超声辅助提取法因其效率高而被广泛应用于提取天然产物^[24],本研究采用超声辅助法以抗氧化活性为响应值优化提取海绵天然产物,是针对抗氧化活性开展的工艺优化探讨,避免了传统优化工艺强调提取物得率而无法获取高活性物质的弊端。目前,海绵天然产物提取主要以乙醇或甲醇浸提为主^[25],对海绵动物活性物质的提取工艺优化鲜有报道。

Hyrtios 属海绵已被证明是次生代谢产物的丰富来源,*H. erectus* 海绵作为 *Hyrtios* 属海绵中的重要成员,具有较高的研究价值^[26],本实验以 *H. erectus* 海绵为原料,针对其抗氧化活性,采用 Box-Behnken 响应面设计优化提取工艺条件,并对最佳工艺提取产物的抗氧化活性进行分析验证,旨在探讨具有抗氧化特征的海绵天然产物的提取工艺,为后续研究源于海绵动物的抗氧化食品添加剂提供依据,也为特定活性天然产物的提取提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

海绵动物材料为 *H. erectus* 采自海南省陵水黎族自治县新村瀉湖及其新城镇附近海域;石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、硫酸亚铁、过硫酸钾、 H_2O_2 、水杨酸钠、无水乙醇 分析纯,西陇科学股份有限公

司;DPPH、ABTS⁺•、 V_C 分析纯,合肥巴斯夫生物科技有限公司;人肝细胞系 L02 细胞 中国科学院上海细胞库;RPMI1640 培养基 美国 GIBCO 公司;杭牛血清 中国天津市 TBD 公司;CCK-8 上海东仁化学科技有限公司;细胞内 ROS 检测试剂盒 美国 Sigma-Aldrich 公司。

SpectraMax M2e 多功能酶标仪 美国 Molecular Devices;UV-5100 紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司;RE311 旋转蒸发仪、DKL410C 烘箱 雅马拓科技贸易有限公司;JM-38D-40 超声设备 深圳洁盟清洗设备有限公司;HHS-21-6 水浴锅 上海博讯实业有限公司;D180 二氧化碳培养箱 深圳市瑞沃德生命科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海绵抗氧化产物提取工艺 海绵抗氧化产物提取参考 Swantara 等^[27]的方法并稍作改动,将采集的海绵动物清洗后置于 50 °C 烘箱内烘干至恒重,粉碎过 20 目筛,放置-20 °C 冰箱保存备用。取 1.000 g 海绵样品,以 70% 乙醇为提取溶剂,设置料液比为 1:10^[28],提取液以 6000 r/min 离心 10 min,取上清液浓缩干燥得 *H. erectus* 粗提取物。

1.2.2 单因素实验 以 *H. erectus* 提取物的 DPPH 自由基清除率为响应值,依次考察超声温度、超声时间和超声功率三个单因素对海绵动物乙醇提取物 DPPH 自由基清除率和得率的影响^[29]。固定超声时间 60 min 和超声功率 300 W 不变,考察超声温度分别为 30、40、50、60、70 °C 时对海绵动物乙醇提取物 DPPH 自由基清除率和得率的影响;固定超声温度 50 °C 和超声功率 300 W 不变,考察超声时间分别为 50、60、70、80、90、100 min 时对海绵动物乙醇提取物 DPPH 自由基清除率和得率的影响;固定超声温度 50 °C 和超声时间 60 min 不变,考察超声功率分别为 200、300、400、500、600、700 W 时对海绵动物乙醇提取物 DPPH 自由基清除率和得率的影响。

1.2.3 响应面试验设计与模型验证 根据单因素实验结果,以 DPPH 自由基清除率为响应值开展三因素三水平响应面试验,对所得结果进行多项式回归拟

表 1 Box-Behnken 设计的因素与水平
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	编码	水平		
		-1	0	1
超声温度(°C)	A	40	50	60
超声时间(min)	B	50	60	70
超声功率(W)	C	400	500	600

合及方差分析检验,得出各变量最佳参数,按照最佳参数进行验证实验以检验响应面分析的可靠性,因素水平见表1。

1.2.4 粗提物得率的测定 粗提物得率以 1.000 g 海绵样品所提取的粗提物质量与海绵样品质量 (1.000 g) 的百分比表示,计算公式如下:

$$\text{得率}(\%) = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中, m_1 为粗提物质量(g), m_0 为海绵样品质量(g)。

1.2.5 自由基清除率测定 DPPH 自由基清除率测定:测定方法参考文献 [30-31],取 3 mg 粗提物溶于无水乙醇并定容 3.0 mL,加入浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 自由基乙醇溶液 3.0 mL,振荡混匀,室温下避光反应 30 min,于波长 517 nm 处测定吸光度。DPPH 自由基清除率公式为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中, A_0 为 DPPH 自由基+乙醇的吸光度, A_1 为样品+DPPH 自由基+乙醇的吸光度, A_2 为样品+乙醇的吸光度。

ABTS⁺·清除率测定:测定方法参考文献 [32],将等体积 $7.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 溶液与 $2.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸钾溶液混匀,避光反应 16 h 得到 ABTS 自由基贮备液。用 95% 乙醇对贮备液进行稀释,使其在波长 734 nm 处的吸光值为 0.070 ± 0.02 ,于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光平衡 30 min 后得 ABTS⁺·工作液。取 0.5 mg 提取物加入 1 mL ABTS⁺·工作液(即 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 4 min,测定波长为 734 nm 的吸光值。ABTS⁺·清除率公式为同式(2),式中, A_0 为 ABTS⁺·+乙醇的吸光度, A_1 为样品+ABTS⁺·+乙醇的吸光度, A_2 为样品+乙醇的吸光度。

·OH 清除率测定:参考文献 [33],将 2 mg 样品加水至 2 mL,再加入 1.4 mL $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$,然后加入 0.6 mL $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸钠和 2 mL $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下恒温水浴 1 h。以去离子水为参比溶液,在 510 nm 下测定吸光度。·OH 清除率公式同式(2),式中, A_0 为空白对照液的吸光度, A_1 为样品测定管的吸光度, A_2 为样品本底管的吸光度。

上述 3 种自由基清除率均以 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 V_C 为阳性对照^[32]。

1.2.6 H_2O_2 诱导 L02 细胞氧化损伤模型和 L02 细胞活力测定 参照杜毅超等^[34]的方法并稍作改进,取对数期终浓度为 $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ L02 细胞 100 μL 加入 96 孔板,5% CO_2 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 12 h 使细胞贴壁,弃培养基,加入 100 μL 无血清培养基继续培养 4 h,弃培养基,然后加入 100 μL 终浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 无血清培养基,继续培养 4 h,即为氧化损伤模型组。样品组将 100 μL 无血清培养基替换为 100 μL 含浓度为 0.125、0.25、0.5、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提取

物的无血清培养基,其他处理与氧化损伤模型相同,空白组除未加 H_2O_2 外,其他处理与氧化损伤模型组相同。样品组、模型组和空白组采用 CCK-8 检测细胞在 450 nm 波长处的 OD 值,计算细胞相对活性,计算公式如下:

$$\text{细胞活性}(\%) = \frac{A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{式(3)}$$

式中, A_0 为空白组的吸光度, A_1 为样品的吸光度。

1.2.7 L02 细胞内 ROS 测定 参照杜毅超等^[34]的方法并稍作改进,按照 1.2.5 方法处理提取物组(提取物终浓度分别为 0.125、0.25、0.5、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、模型组和对照组,并将 96 孔板更换为 24 孔板,每孔加入的溶液扩大到 5 倍。严格按照细胞内 ROS 检测试剂盒说明书进行操作,记录各组细胞的荧光强度。

1.3 数据处理

每个实验重复 3 次取平均值,结果以平均值±标准差表示。采用 Design Expert 8.0.6 软件建立回归模型,开展方差分析(F 检验)和模型回归分析。实验数据利用 Microsoft Excel 2010 软件进行统计和作图,采用 SPSS 19.0 软件进行显著水平分析。

2 结果与分析

2.1 单因素结果分析

2.1.1 超声提取温度的考察 图 1 显示,随着超声温度的升高,提取物对 DPPH 自由基的清除率以及粗提物得率均呈现先升高再降低的趋势,其中超声温度在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 时清除率达到峰值,峰值为 $55.14\% \pm 4.92\%$,分析认为超声提取的温度对提取物的抗氧化活性有影响,温度过高,可能破坏提取物的结构^[32],反而清除率降低,因此,最佳超声温度选择 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

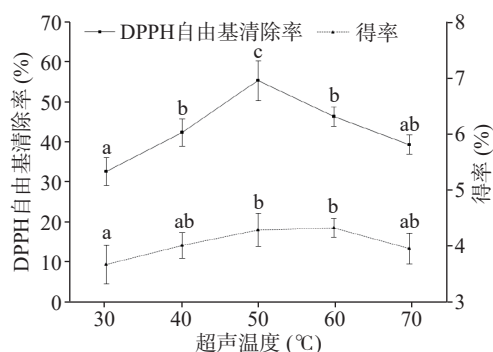


图 1 超声温度对 DPPH 自由基清除率和粗提物得率的影响
Fig.1 Effect of ultrasonic temperature on the scavenging rate of DPPH free radical and yield of crude extract

注:图中不同小写字母表示差异显著 $P < 0.05$,图 2~图 3 同。

2.1.2 超声提取时间的考察 图 2 显示,超声时间对提取物的抗氧化活性和得率的影响均呈现迅速达到峰值,然后逐渐降低的特征,在超声提取时间为 60 min 时,提取物对 DPPH 自由基的清除率和得率均出现峰值,清除率峰值为 $55.02\% \pm 2.13\%$,得率峰值为 $4.28\% \pm 0.23\%$,分析认为由于超声波“空化效应”能促使活性物质的析出,当超声时间延长时,提取

物的活性增强, 得率增大, 但是超声时间过长, 超声波的机械振动可能影响活性成分的结构或者造成物质分解, 导致提取物的活性和得率反而降低^[35-37]。随着超声时间的变化, 两个指标变化趋势相似, 且峰值出现的时间相同, 因此, 最佳超声时间选择 60 min。

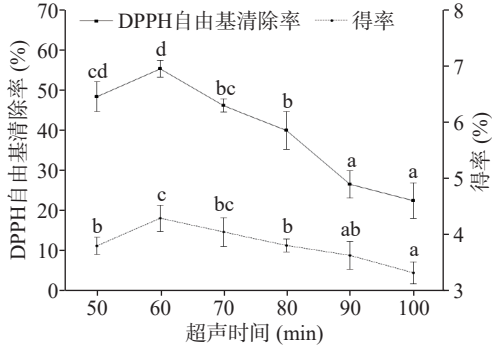


图 2 超声时间对 DPPH 自由基清除率和粗提物得率的影响
Fig.2 Effect of ultrasonic time on the scavenging rate of DPPH free radical and yield of crude extract

2.1.3 超声提取功率的考察 图 3 显示, 随着超声功率的提高, 提取物活性迅速增强, 在 300~500 W 之间维持较高的水平, 并在 500 W 时达到峰值 60.35%±3.96%, 然后呈现下降趋势。提取物得率先逐渐升高再降低, 在 600 W 时达到峰值 6.71%±0.11%。分析认为随着超声功率的增加, 超声波的“空化效应”增强, 破坏细胞壁的能力增强, 有利于活性成分的析出, 得率增加, 但当超声功率继续提高时, 机械振动可能会改变活性成分的结构, 甚至促进物质分解, 从而降低提取物的活性和得率^[37-39]。此外, 从清除率和得率的峰值对应的超声功率可看出提取物得率最高时, 提取物活性却不是最强, 如果以得率为响应值优化提取海绵天然产物, 其抗氧化活性非最佳。因此, 最佳超声功率选择 500 W。

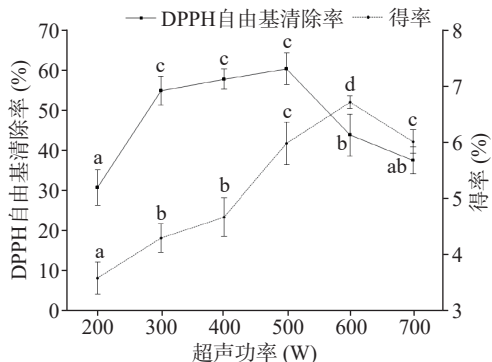


图 3 超声功率对 DPPH 自由基清除率和粗提物得率的影响
Fig.3 Effect of ultrasonic power on the scavenging rate of DPPH free radical and yield of crude extract

2.2 响应面结果分析

2.2.1 响应面法试验方案与结果 响应面法试验的因素水平取值由单因素实验得出, 各因子和水平情况见表 1。依据 Box-Behnken 设计原理进行了 17 次试验 (见表 2)。

表 2 Box-Behnken 试验设计结果

Table 2 Results of Box-Behnken experiments design

试验号	A 超声温度	B 超声时间	C 超声功率	Y DPPH 自由基清除率 (%)
1	0	1	-1	48.08±2.25
2	0	1	1	41.69±2.59
3	-1	-1	0	38.82±2.41
4	1	-1	0	46.31±1.70
5	0	0	0	62.03±1.11
6	1	1	0	41.65±1.25
7	-1	1	0	42.76±2.21
8	0	0	0	61.80±1.26
9	1	0	-1	45.36±1.59
10	0	-1	1	44.22±2.50
11	-1	0	-1	46.01±3.34
12	1	0	1	44.31±1.01
13	0	0	0	61.79±1.70
14	0	0	0	61.98±2.82
15	-1	0	1	37.47±1.33
16	0	-1	-1	47.49±2.13
17	0	0	0	62.09±3.15

2.2.2 回归方程与方差分析 采用 Design Expert 8.0.6 统计软件对表 2 试验结果进行多元回归分析获得多元二次回归模型: $Y=61.94+1.57A-0.33B-2.41C-2.15AB+1.87AC-0.78BC-10.82A^2-8.74B^2-7.83C^2$ 。表 3 显示, 该回归模型的 P 值小于 0.0001, 达到极显著的水平, 说明错误实验概率非常小; 模型的失拟项 P 值为 0.1323, 没有达到显著水平 ($P>0.05$), 说明模型与实验拟合程度较好, 模型建立合理; 模型的决定系数 $R^2=0.9998$, 表明 DPPH 自由基清除率的实际值与预测值之间拟合度较好; 模型的校正决定系数 $R^2_{adj}=0.9995$, 说明有 99.95% 的超声提取条件可以用该模型进行分析解释, 即方程拟合回归效果好。变异系数 CV 值为 0.4%, 小于 10%, 进一步说明模型拟合度高, 实验可行, 可以用于优化海绵动物提取物的超声提取工艺。

表 3 回归模型方程的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression model equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P	显著性
回归模型	1297.09	9	144.12	3800.45	<0.0001	**
A-超声温度	19.75	1	19.75	520.82	0.0001	**
B-超声时间	0.88	1	0.88	23.32	0.019	*
C-超声功率	46.32	1	46.32	1221.46	<0.0001	**
AB	18.49	1	18.49	487.58	<0.0001	**
AC	14.03	1	14.03	369.84	<0.0001	**
BC	2.43	1	2.43	64.17	<0.0001	**
A ²	492.73	1	492.73	12993.24	<0.0001	**
B ²	321.28	1	321.28	8472.16	<0.0001	**
C ²	258.32	1	258.32	6811.96	<0.0001	**
残差	0.27	7	0.038	-	-	-
失拟项	0.19	3	0.064	3.43	0.1323	N
净误差	0.074	4	0.019	-	-	-
总离差	1297.36	16	-	-	-	-

$R^2=0.9998, R^2_{adj}=0.9995$

注: *代表 $P<0.05$, **代表 $P<0.01$, N 代表差异无统计学意义, “-”表示无此项。

回归模型方差分析如表3所显示,回归模型中一次项 A、C 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对清除率的影响均达到极显著水平 ($P < 0.01$), B 项达到显著水平 ($P < 0.05$); 交互项 AB、AC、BC 对清除率影响达到极显著水平 ($P < 0.01$); 失拟项差异不显著 ($P > 0.05$)。根据表3中三因素的 F 值, 得出 A、B、C 三因素对 DPPH 自由基清除率的影响主次顺序为 $C > A > B$, 即超声功率影响最大, 超声温度次之, 超声时间最小。

2.2.3 交互作用分析 通过响应面软件生成因素交互作用的 3D 曲面图和等高线图, 能直观地看出各因素两两交互作用对 DPPH 自由基清除率的影响。响应曲面的坡度及等高线的偏离程度可反映两两因素间的交互作用, 响应面坡度越陡, 表明二者间的交互作用越显著, 对 DPPH 自由基清除率影响较大, 反之越平缓则影响越小。图4显示, 在超声功率一定的情况下, 超声温度和超声时间的 3D 曲面图走势较明显, 等高线偏离也较明显, 两因素的交互作用对 DPPH

自由基清除率影响显著, 与表3中 AB 项的 P 值小于 0.0001 相符, 差异极显著 ($P < 0.01$); 在超声温度一定的情况下, 超声时间和超声功率的 3D 曲面图走势较明显, 等高线偏离也较明显, 但略小于 AB 的 3D 图走势和等高线的偏离, 两因素的交互作用对 DPPH 自由基清除率影响显著, 与表3中 AC 项的 P 值小于 0.0001 相符, 差异极显著 ($P < 0.01$); 在超声温度一定的情况下, 超声时间和超声功率的 3D 曲面图走势较明显, 等高线偏离明显, 两因素的交互作用对 DPPH 自由基清除率影响显著, 与表3中 BC 项的 P 值小于 0.0001 相符, 差异极显著 ($P < 0.01$)。根据以上数据及图示, 对各因素综合评价分析, 各因素交互项的交互强弱顺序为: $AB > AC > BC$, 并且 AB、AC、BC 交互作用均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

通过两因素交互作用的 3D 曲面图的分析可以发现, 表3中的数据与图4的 3D 曲面图及等高线图相符, 图表一致。

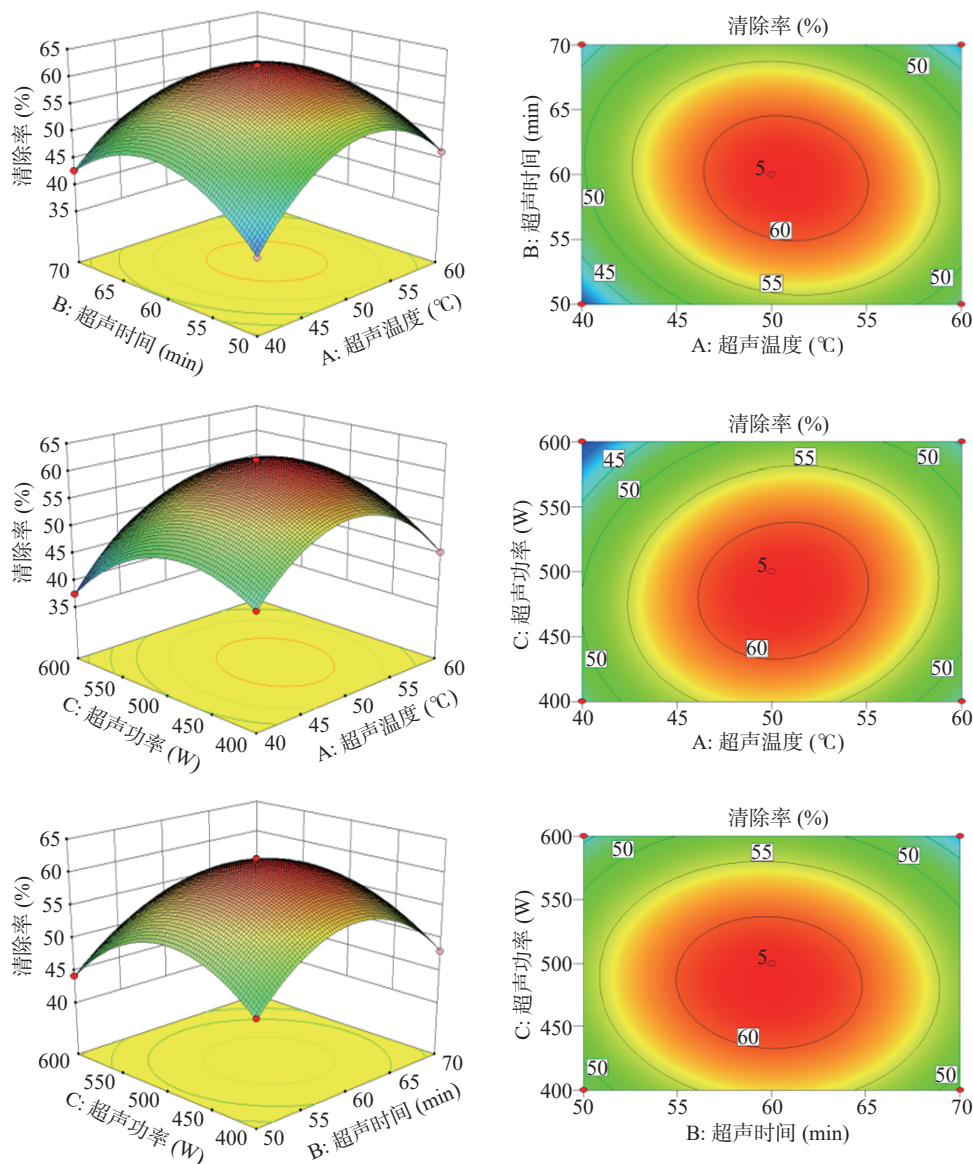


图4 各因素交互作用对 DPPH 自由基清除率的响应面和等高线图

Fig.4 Response surface and contour figures of the interaction effects of various factors on the scavenging rate of DPPH free radicals

2.2.4 最佳提取工艺及验证实验 利用 Design Expert 统计软件对模型方程求解, 预测的超声提取最优条件分别为 56.62 °C、59.80 min、485.55 W 时, 其响应值 DPPH 自由基清除率最大为 62.16%。考虑工艺参数的实际可操作性, 将超声温度、超声时间和超声功率分别修改为 57 °C、60 min、490 W。通过 3 次重复实验, 实际测得提取物 DPPH 自由基清除率为 61.98%±1.52%, 与模型预测值 62.16% 吻合度较高, 说明该模型有较高的可信性和有效性。

2.3 最佳提取工艺条件下的提取物抗氧化活性分析

2.3.1 抗氧化提取物对 3 种自由基的清除效果 如图 5 所示, 在上述优化工艺条件下制备的提取物不仅对 DPPH 自由基具有良好的清除效果, 清除率为 61.98%±1.52%, 对 ABTS⁺ 和 ·OH 也表现出较好的清除效果, 清除率分别为 59.79%±2.73%、54.26%±6.54%, 与 Utkina 等^[40] 报道的海绵提取物对 ABTS⁺ 最高抑制率 60% 吻合。尽管与 V_C 对照相比还有差距, 但作为粗提取物对 3 种自由基的清除率均超过 50%, 反映出该提取工艺所提取的粗提取物具有良好的抗氧化能力。

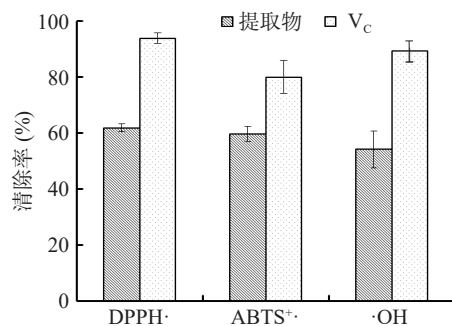


图 5 提取物对 3 种自由基的清除效果

Fig.5 The scavenging effect of the extract on three free radicals

2.3.2 抗氧化提取物对 H₂O₂ 氧化损伤 L02 细胞活力的影响 活性氧(ROS)是机体氧化代谢产生的性质活泼的含氧化合物, 正常细胞通过特殊的机制维持氧化物与抗氧化物之间的平衡, 细胞内 ROS 处于较低水平^[41], 当 ROS 过量时会引发氧化应激, 破坏肝细胞的蛋白、脂质及 DNA, 进而破坏细胞结构, 导致肝脏的结构及功能发生异常^[34], 本研究构建 H₂O₂ 氧化损伤人正常肝细胞 L02 细胞模型, 通过细胞活力反映提取物对 L02 细胞保护作用。图 6 显示, 提取物组 4 个不同浓度对 H₂O₂ 氧化损伤均有不同程度地减弱, 细胞活力均显著 ($P < 0.05$) 高于模型组, 且 0.25、0.5、1.0 mg·mL⁻¹ 三个处理与模型组差异达到极显著水平 ($P < 0.01$), 但各处理的细胞活力均低于空白对照, 说明提取物对氧化损伤的肝细胞具有保护作用。

2.3.3 抗氧化提取物对 H₂O₂ 氧化应激 L02 细胞内 ROS 的影响 采用 DCFH-DA 探针进一步分析抗氧化提取物对 H₂O₂ 氧化应激 L02 细胞内 ROS 水平

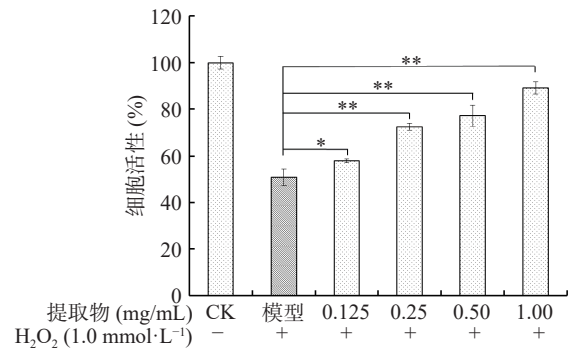


图 6 提取物对 H₂O₂ 氧化损伤 L02 细胞活力的影响

Fig.6 Effects of extracts on the viability of L02 cells damaged by H₂O₂ oxidation

注: *表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$); +表示添加, -表示未添加; 图 7 同。

的影响, 利用荧光染料 DCFH-DA 可以穿过细胞膜并在细胞内水解生成 DCFH, DCFH 被细胞内 ROS 氧化生成荧光物质 DCF^[42], 再用多功能酶标仪在指定波长(激发波长 488 nm、发射波长 525 nm)处测定吸光度, 根据 DCF 的荧光强度, 定量检测细胞内活性氧水平。图 7 显示, 模型组 L02 细胞内 ROS 荧光强度最强, 反映出细胞内氧化和抗氧化失衡严重; 未添加 H₂O₂ 和抗氧化提取物的空白对照组, ROS 荧光强度较低, 细胞处于正常状态; 与模型组比较, 提取物的 4 个浓度处理 L02 细胞内 ROS 荧光强度均极显著低于模型组 ($P < 0.01$), 且随着提取物浓度的升高, 细胞内 ROS 荧光强度降低。此外, 提取物浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的处理细胞内 ROS 荧光强度低于 CK 组。

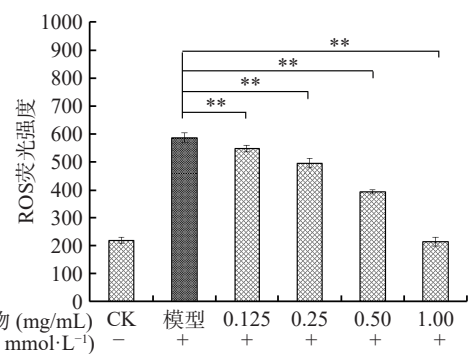


图 7 提取物对 H₂O₂ 氧化应激 L02 细胞内 ROS 的影响

Fig.7 Effect of extracts on reactive oxygen species in L02 cells with H₂O₂-induced oxidative damage

3 结论

本实验通过响应面优化超声辅助提取海绵抗氧化成分, 最佳提取工艺为超声温度 57 °C, 超声时间 60 min, 超声功率 490 W, 在此条件下, 提取物 DPPH 自由基清除率为 61.98%±1.52%, 与预测值 62.16% 吻合度较好。体外抗氧化实验表明, 海绵提取物对 DPPH 自由基、ABTS⁺ 和 ·OH 具有良好的清除效果, 并且, 可显著提高氧化损伤模型 L02 细胞活力 ($P < 0.05$), 极显著降低细胞内的 ROS 水平 ($P < 0.01$), 对人肝氧化损伤具有显著的保护作用。总之, 该工艺以

抗氧化活性为响应值,针对天然产物特定功能开展的工艺优化探索,提高了目标提取物的精准性,而且工艺操作简单,安全可靠,可为抗氧化食品添加剂的开发提供理论支撑。

参考文献

- [1] UKOWIAK M. Utilizing sponge spicules in taxonomic, ecological and environmental reconstructions: A review[J]. *Peer J*, 2020, 8(2): e10601.
- [2] PAUL V J, FREEMAN C J, AGARWAL V. Chemical ecology of marine sponges: New opportunities through “-Omics” [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2019, 59(4): 765–776.
- [3] ANTENEH Y S, YANG Q, BROWN M H, et al. Antimicrobial activities of marine sponge-associated bacteria[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 171.
- [4] EI-DEMERDASH A, ATANASOV A G, HORBANCUK O K, et al. Chemical diversity and biological activities of marine sponges of the genus *Suberea*: A systematic review[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(2): 115.
- [5] DATTA D, TALAPATRA S N, SWARNAKAR S. Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-An overview[J]. *Int Lett Nat Sci*, 2015, 34: 42–61.
- [6] MARIEKE K DIRK M, RENE W. Towards commercial production of sponge medicines[J]. *Mar Drugs*, 2009, 7(4): 787–802.
- [7] SIMMONS T L, ANDRIANASOLO E, MCPHAIL K, et al. Marine natural products as anticancer drugs[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(2): 333.
- [8] NEWMAN D J, CRAGG G M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials[J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(8): 1216–1238.
- [9] CARROLL A R, COPP B R, DAVI S, et al. Marine natural products[J]. *Nat Prod Rep*, 2019, 36: 122–173.
- [10] ZHU J Y, LIU Y, LIU Z J, et al. Bioactive nitrogenous secondary metabolites from the marine sponge genus *Haliclona*[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(12): 682.
- [11] NADAR V M, MANIVANNAN S, CHINNAIYAN R, et al. Review on marine sponge alkaloid, aaptamine: A potential anti-bacterial and anti-cancer drug[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2022, 99: 103–110.
- [12] ZHANG B, ZHANG T, XU J Z, et al. Marine sponge-associated fungi as potential novel bioactive natural product sources for drug discovery: A review[J]. *Mini Rev Med Chemistry*, 2020, 20: 1966–2010.
- [13] CHENG M M, TANG X L, SUN Y T, et al. Biological and chemical diversity of marine sponge-derived microorganisms over the last two decades from 1998 to 2017[J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 853.
- [14] SYAMSUDIN A, AWIK P D N, SRI N, et al. Cytotoxic and antioxidant activities of marine sponge diversity at pecaron bay pasir putih situbondo East Java, Indonesia[J]. *J Phar Res*, 2013, 6(7): 685–689.
- [15] ZHANG H W, ZHAO Z P, WANG H. Cytotoxic natural products from marine sponge-derived microorganisms[J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(3): 68.
- [16] CAMPOS P E, PICKON E, MORIOU C, et al. New anti-malarial and antimicrobial tryptamine derivatives from the marine sponge *Fascaplysinopsis reticulata*[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(3): 167.
- [17] KIM Y A, JI Y K, KIM N H, et al. Isoquinolinequinone derivatives from a marine sponge (*Haliclona* sp.) regulate inflammation *in vitro* system of intestine[J]. *Mar Drugs*, 2021, 19(2): 90.
- [18] TINTILLIER F, MORIOU C, PETEK S, et al. Quorum sensing inhibitory and antifouling activities of new bromotyrosine metabolites from the polynesian sponge *Pseudoceratinan* sp.[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(5): 272.
- [19] MUTHIYAN R, MAHANTA N, NAMBIKKAIRAJ B, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of a methanol extract from the marine sponge *Hyrtios erectus*[J]. *Phcog Mag*, 2018, 14: 534–540.
- [20] HU T Y, ZHANG H, CHEN Y Y, et al. Dysiarenone from marine sponge *Dysidea arenaria* attenuates ROS and inflammation via inhibition of 5-LOX/NF- κ B/MAPKs and upregulation of Nrf-2/OH-1 in RAW 264.7 macrophages[J]. *J Inf Res*, 2021, 14: 587–597.
- [21] GINER R M, RÍOS J L, MÁÑEZ S. Antioxidant activity of natural hydroquinones[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 343.
- [22] SUNARWIDHI A L, ROSYANTARI A, PRASEDYA E S, et al. The correlation between total protein content and antioxidant activity of collagen isolated from a marine sponge *Stylissa flabelliformis* collected from North Lombok Indonesia coast[C]//IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2021, 913(1): 012103.
- [23] OOGARAH P N, RAMANJOOLOO A, ROVISHAM J, et al. Assessing antioxidant activity and phenolic content of marine sponges from mauritius waters[J]. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2020, 12: 123–131.
- [24] AFSHARI K, SAMAVATI V, SHAHIDI S A. Ultrasonic-assisted extraction and *in-vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 74: 558–567.
- [25] 张红军. 三种西沙海绵化学成分和生物活性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009. [ZHANG H J. Chemical constituents and bioactivities of three marine sponges from Paracel Islands[D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2009.]
- [26] YOUSSEF D T A. Hyrtioerectines A-C, Cytotoxic Alkaloids from the red sea sponge *Hyrtios erectus*[J]. *Journal of Natural Products*, 2005, 68(9): 1416–1419.
- [27] SWANTARA I M D, RITA W S, HERNINDY R A. Isolation and phytochemical test of anticancer isolate of sponge *Hyrtios erecta*[J]. *Jhsm Unud J*, 2017, 1: 16–20.
- [28] AL-MASSARANI S M, EL-GAMAL A A, AL-SAID M S, et al. Studies on the red sea sponge *Haliclona* sp. for its chemical and cytotoxic properties[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2016, 12(46): 114.
- [29] 陈江艳, 王维滔, 董益阳, 等. 响应面优化蒲公英橡胶草菊糖提取工艺及其 MALDI-TOF MS 分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(1): 205–212. [CHEN J Y, WANG W T, DONG Y Y, et al. Op-

timization of extraction of inulin from *Taraxacum kok-saghyz* Rodin by response surface methodology and its MALDI-TOF MS analysis[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(1): 205–212.]

[30] 钱燕芳,石晨莹,陈贵堂. 桑葚多糖超声提取、脱色工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(16): 201–210.

[QIAN Yanfang, SHI Chenying, CHEN Guitang. Optimization of ultrasound-assisted extraction and decolorization process of polysaccharides from *Mori fructus* and its antioxidant activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(16): 201–210.]

[31] 叶兆伟,叶润,赫丁轩,等. 息半夏多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(1): 90–98. [YE Z W, YE R, HAO D X, et al. Optimization of polysaccharide extraction from *Xi Pinellia ternate* by response surface methodology and its antioxidant activity[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(1): 90–98.]

[32] 常国立,房祥军,陈明,等. 杨梅核多酚提取优化及体外抗氧化和降血糖活性研究[J]. *食品科技*, 2022, 47(1): 212–218.

[CHANG G L, FANG X J, CHEN M, et al. Extraction optimization and *in vitro* antioxidant and hypoglycemic activity of polyphenols from *Myrica rubra* kernel[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(1): 212–218.]

[33] AATI H N, EL-GAMAL A, KAYSER O. Chemical composition and biological activity of the essential oil from the root of *Jatropha pelargonifolia* Courb. native to Saudi Arabia[J]. *Saudi Pharm J*, 2019, 27(1): 88–95.

[34] 杜毅超,张浩,黄治伟,等. 芹菜素对 H₂O₂ 诱导人肝细胞 L02 氧化损伤模型的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(5): 1077–1081. [DU Y C, ZHANG H, HUANG Z W, et al. Effect of apigenin on H₂O₂-induced oxidative injury in human hepatocytes L02[J]. *J Clin Hepatol*, 2020, 36(5): 1077–1081.]

[35] LIC, YANG F, HUANG Y, et al. Comparison of hydrodynamic and ultrasonic cavitation effects on soy protein isolate functionality[J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 265: 109697.

[36] YE L, ZHU X, WEI X. Damage characteristics and surface description of near-wall materials subjected to ultrasonic cavitation[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 67: 105175.

[37] 罗维巍,李双,刁全平,等. 响应面法优化超声提取酸浆宿萼中叶黄素的工艺及抗氧化活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(1): 62–68. [LUO W W, LI S, DIAO Q P, et al. Optimization of ultrasonic extraction process for lutein from calyx of *Physalis* by response surface methodology and its antioxidant capacity study[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(1): 62–68.]

[38] 杨秋明,宋江峰,李大婧,等. 响应面法优化超声波提取南瓜皮叶黄素的工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(1): 149–155. [YANG Q M, SONG J F, LI D J, et al. Optimization of ultrasonic extraction process for lutein from pumpkin peel by response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(1): 149–155.]

[39] GUO H, CHENG J, MAO Y, et al. Synergistic effect of ultrasound and switchable hydrophilicity solvent promotes microalgal cell disruption and lipid extraction for biodiesel production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 343: 126087.

[40] UTKINA N K. Antioxidant activity of zyzzyanones and makaluvamines from the marine sponge *Zyzya fuliginosa*[J]. *Natural Product Communications*, 2013, 8(11): 1551–1552.

[41] 崔素萍,陈丹,穆秋霞,等. 细胞氧化应激的危害及抗氧化应激的研究进展[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2022, 34(4): 74–79, 133. [CUI S P, CHEN D, MU Q X, et al. Harm of cellular oxidative stress and research progress of anti-oxidative stress[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2022, 34(4): 74–79, 133.]

[42] 蔡瑾,闫然,王梦亮,等. 二氢槲皮素对大肠杆菌的抑菌作用机理[J/OL]. *食品科学*: 1–14 [2022-09-26] DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220512-148. [CAI J, YAN R, WANG M L, et al. The mechanism of antimicrobial action of dihydroquercetin against *Escherichia coli*[J]. *Food Science*, 1–14 [2022-09-26] DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220512-148.]