

菊苣根多糖酶法辅助双水相提取工艺优化及其降脂活性研究

周 敏*, 韩 青, 李彩凤

江苏食品药品职业技术学院 制药工程学院, 淮安 223005

摘 要: 本研究旨在优化菊苣根多糖 (chicory root polysaccharides, CRP) 的酶法辅助双水相提取工艺, 并评估其降脂活性。研究采用 Box-Behnken 设计与响应面法对提取工艺进行优化, 考察纤维素酶添加量、果胶酶添加量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数和聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 质量分数对 CRP 得率的影响。结果表明, 纤维素酶添加量、果胶酶添加量、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数和 PEG 质量分数对多糖得率均有显著影响。优化后的最佳提取条件为: 纤维素酶添加量 2.00%, 果胶酶添加量 2.00%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数 18.00%, PEG 质量分数 15.00%, 在此条件下多糖得率可达 32.78%。此外, 本研究还发现 CRP 能够有效减少脂肪化 HepG2 细胞内脂质沉积, 降低总胆固醇和甘油三酯含量, 表明其具有良好的降脂活性。

关键词: 菊苣根多糖; 酶法辅助双水相提取; 响应面法; 降脂活性

中图分类号: R284.2; R285 文献标识码: A

Optimization of enzyme-assisted aqueous two-phase extraction process for chicory root polysaccharides and its hypolipidemic activity

ZHOU Min*, HAN Qing, LI Cai-feng

Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, School of Pharmaceutical Engineering, Huai'an 223005, China

Abstract: This study aims to optimize the enzyme-assisted aqueous two-phase extraction process of chicory root polysaccharides (CRP) and evaluate its lipid-lowering activity. The research employs the Box-Behnken design and response surface methodology to optimize the extraction process, examining the effects of the amounts of cellulase and pectinase added, the mass fraction of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and the mass fraction of polyethylene glycol (PEG) on the yield of CRP. The results indicate that the amounts of cellulase, pectinase, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mass fraction, and PEG mass fraction all significantly affect the yield of polysaccharides. The optimized extraction conditions are: cellulase amount of 2.00%, pectinase amount of 2.00%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mass fraction of 18.00%, and PEG mass fraction of 15.00%, under which the yield of polysaccharides can reach 32.78%. Additionally, this study found that CRP can effectively reduce lipid deposition in fatty HepG2 cells, decreasing total cholesterol and triglyceride levels, indicating their good lipid-lowering activity.

Key words: chicory root polysaccharides; enzymatic assisted aqueous two-phase extraction; response surface methodology; lipid-lowering activity

菊苣 (*Cichorium intybus* L.), 作为菊科菊苣属的多年生草本植物, 自古以来在传统医学中便以其独特的药食两用价值而备受重视^[1, 2]。菊苣不仅在维吾尔族和蒙古族的药材中占有重要地位, 含有丰富的生物活性物质, 包括多糖、甙类、鞣质、萜类等, 这些成分赋予了菊苣一系列药理作用, 如清热解毒、利尿消肿、健胃等^[3, 4]。特别值得一提的是菊苣多糖, 它在现代医学研究中显示出了降血糖、抗肿瘤、延缓衰老、抗疲劳、促进钙和磷吸收等广泛的

实用性和健康益处^[5]。菊苣多糖的这些特性不仅为其在功能性食品和药品开发中提供了广阔的应用前景，而且其安全性和有效性也使其成为婴儿营养补充剂的理想选择，作为益生元促进胃肠道微生物的平衡。

食品工业中，菊苣多糖已经成为一种广泛应用的功能性原料。它的用途涵盖了各种焙烤食品、糖果制品、乳制品、饮料以及各类调味料等领域。菊苣多糖具有独特的理化特性，能够发挥多种有益作用，如增稠、保水、改善质地等。随着人们对健康饮食的关注度不断提高，菊苣多糖凭借其天然、营养丰富特点，在食品加工中的应用前景也越来越广阔。在食品工业中，菊苣多糖的应用已经扩展到了焙烤食品、糖果、乳制品、饮品及调味料等多个方面^[6]。它不仅可以作为巧克力制品的代糖品，还可以作为乳品、肉品及冰淇淋的油脂替代品，这不仅丰富了食品的口感和营养，也为追求健康饮食的消费者提供了更多选择^[7]。菊苣多糖作为一种具有多重保健功效的天然成分，其在保健饮品、功能性食品及特殊药物的研发中扮演着重要角色，显示其在食品工业中的广泛应用潜力和重要价值^[8,9]。然而，传统的菊苣多糖提取方法，如热水浸提法、酸碱法等，存在效率低、成本高、环境污染等问题，这些限制因素严重阻碍了菊苣多糖的进一步开发与应用^[10]。

为克服这些限制，本研究拟开展菊苣根多糖（chicory root polysaccharides, CRP）的酶法辅助双水相提取工艺。该方法通过结合酶法的高选择性和双水相法的高纯度优势，旨在实现 CRP 的高效、温和提取^[11]。本研究应用 Box-Behnken 设计与响应面法（response surface methodology, RSM）对 CRP 的提取工艺进行全面优化。这一优化过程将结合双水相技术与酶的协同作用，以寻找最佳的操作条件，从而提升多糖的提取效率和产率^[12]。通过这种方法，我们期望能够显著提高 CRP 的得率和纯度，同时保持其结构与生物活性不受破坏。此外，本研究还将对 CRP 的降脂活性进行评估，以期揭示其在促进人类健康方面的潜力，并为其在食品工业和医药领域的应用提供坚实的科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菊苣根（批号：20230315，黄石市润生农业科技发展有限公司，经新疆医科大学徐海燕教授鉴定为菊科（Compositae）菊苣属（*Cichorium*）植物菊苣（*Cichorium intybus* L.）的根；纤维素酶和果胶酶（批号：20230416、20230517，上海源叶生物科技有限公司）；(NH₄)₂SO₄、聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）、苯酚、硫酸亚铁、无水乙醇、氯仿和正丁醇（分析纯，批号：20230618PQR、20230719、20230820VWX、20230921、20231022、20231123G、20231224，南京晚晴化玻仪器有限公司）；人肝癌细胞 HepG2（批号：20240105，中国科学院上海细胞库）；DMEM 高糖培养基、1%青霉素-链霉素双抗和胎牛血清（批号：20240205P、20240305RS、20240405TUV，上海道鹏生物科技有限公司）；二甲基亚砜、CCK-8 和 RIPA 细胞裂解液（批号：20230505、20230605、20230224，北京索莱宝科技有限公司）；总胆固醇（total cholesterol, TC）和甘油三酯（triglycerides, TG）测定试剂盒（批号：GR20240805F、

GR20240905I, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

HERA·Cell 150i 型 CO₂ 培养箱 (赛默飞世尔科技有限公司); R502B 旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); UV-1900PC 紫外可见分光光度计 (上海皓缇仪器有限公司); Multiskan FC 酶标仪 (赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 CRP 提取工艺

1.2.1.1 原料预处理

对菊苣根进行彻底清洗, 去除表面泥土和杂质。清洗后的菊苣根切成薄片, 用蒸馏水浸泡 1 h, 自然晾干。切片放置在恒温培养箱中, 保持 60 °C 的温度干燥至质量稳定。粉碎干燥后的菊苣根, 使用 60 目的筛网进行过筛, 以获得均匀细致的菊苣根粉末^[13]。

1.2.1.2 酶法辅助双水相提取 CRP

取菊苣根粉末, 与蒸馏水按 1 : 25 比例混合。加入纤维素酶和果胶酶, 在 50 °C 水浴中振荡 160 min。终止反应后, 在沸水浴中灭活 10 min。加入 PEG 和 (NH₄)₂SO₄, 混匀后以 5 000 r/min 离心 10 min, 收集下层提取液用于后续试验。

1.2.2 单因素试验

为了确定酶法辅助双水相提取 CRP 的最佳工艺参数, 选择纤维素酶添加量、果胶酶添加量、(NH₄)₂SO₄ 质量分数和 PEG 质量分数作为主要工艺参数进行研究。

1.2.2.1 CRP 提取工艺中纤维素酶添加量的影响

保持果胶酶添加量 2%、(NH₄)₂SO₄ 质量分数 18%、PEG 质量分数 25% 不变, 通过改变纤维素酶添加量进行试验, 并计算不同纤维素酶添加量 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%) 下 CRP 的得率。

1.2.2.2 CRP 提取工艺中果胶酶添加量的影响

在固定纤维素酶添加量为 2%、(NH₄)₂SO₄ 质量分数为 18%、PEG 质量分数为 25% 的情况下, 通过调整果胶酶的添加量进行试验, 并计算不同果胶酶添加量 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%) 下 CRP 的得率。

1.2.2.3 CRP 提取工艺中 (NH₄)₂SO₄ 质量分数的影响

在纤维素酶和果胶酶添加量分别为 2%, PEG 质量分数为 25% 的情况下, 通过调整 (NH₄)₂SO₄ 的质量分数进行试验, 并计算不同 (NH₄)₂SO₄ 质量分数 (12%、15%、18%、21%、24%) 下 CRP 的得率。

1.2.2.4 CRP 提取工艺中 PEG 质量分数的影响

在纤维素酶和果胶酶添加量分别为 2%, (NH₄)₂SO₄ 质量分数为 18% 的情况下, 通过调整 PEG 的质量分数进行试验, 并计算不同 PEG 质量分数 (10%、15%、20%、25%、30%) 下 CRP 的得率。

1.2.3 响应面试验

基于单因素试验结果,依据 Box-Behnken 试验设计原理,进行 4 因素 3 水平的优化设计(见表 1),以 CRP 得率为响应值,优化提取工艺。

表 1 响应面因素水平设计

Table 1 Design of response surface factors and levels

水平 Level	因素 Factor			
	A: 纤维素酶添加量 Cellulase dosage (%)	B: 果胶酶添加量 Pectinase dosage (%)	C: (NH ₄) ₂ SO ₄ 质量分数 (NH ₄) ₂ SO ₄ mass fraction (%)	D: PEG 质量分数 PEG mass fraction (%)
-1	1.5	1.5	15	10
0	2	2	18	15
1	2.5	2.5	21	20

1.2.4 菊苣根粗多糖的制备

使用旋转蒸发器浓缩菊苣根提取液至原体积的 1/3,随后添加无水乙醇至终浓度 80%,静置 24 h 后 4 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀。使用蒸馏水溶解沉淀,按照体积比 1:1 加入氯仿正丁醇混合液(氯仿:正丁醇=4:1),振荡 20 min 后 4 000 r/min 离心 20 min。收集最上层溶液置于透析袋(截留量 3 500 kDa)中 4 °C 透析 48 h。透析液浓缩后再次添加无水乙醇至终浓度 80%,静置 24 h 后,经 4 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀^[14,15]。冷冻干燥后得到菊苣根粗多糖粉末,使用苯酚-硫酸比色法、考马斯亮蓝法和间羟基联苯法分别测得菊苣根粗多糖含有中性糖 42.13% ± 5.17%,糖醛酸 32.11% ± 3.22%,蛋白质比例为 1.26% ± 0.12%。

1.2.5 多糖含量测定

采用苯酚-硫酸法对 CRP 进行含量测定,通过测定 490 nm 处的吸光度并对照标准曲线来定量,按照公式(1)计算 CRP 得率。

$$W=(C \times V \times N) / M \times 100\% \quad (1)$$

在公式中: W 表示 CRP 得率,%; C 表示根据吸光度值计算出的 CRP 溶液质量浓度,mg/mL; N 表示溶液稀释倍数; V 表示多糖溶液体积, mL; M 表示菊苣根样品取样量, mg。

1.2.6 CRP 对 HepG2 细胞脂质代谢的影响

1.2.6.1 HepG2 细胞培养

HepG2 细胞在 T25 培养瓶中复苏,并使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养。培养条件为 5% CO₂、37 °C 和饱和湿度。在经过 1:3 传代三次之后,使用 0.25%胰酶-EDTA 进行消化处理。随后,使用含 5% FBS 的 DMEM 缓冲液对细胞进行重悬,并将细胞密度调整至 2 × 10⁵ 个/mL,以进行后续的试验操作。在 12 孔板中,每孔接种 1 mL 细胞悬液;在 96 孔板中,每孔接种 100 μL 细胞悬液。

1.2.6.2 CRP 细胞毒性试验

将 CRP 溶解在无血清的 DMEM 培养基中,通过系列稀释制备不同浓度的工作溶液(0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 mg/mL)。使用 CCK-8 法检测 CRP 对 HepG2 细胞的细胞毒性。

1.2.6.3 CRP 对 FFAs 诱导的脂肪堆积模型的影响

在 96 孔板中接种细胞并过夜培养, 将 HepG2 细胞分为正常组 (control, Con)、模型组 (model, Mod)、CRP 低剂量组 (CRP in low dose, CRP-L, 0.2 mg/mL)、CRP 中剂量组 (CRP in middle dose, CRP-M, 0.4 mg/mL)、CRP 高剂量组 (CRP in high dose, CRP-H, 0.8 mg/mL), 除 Con 组以外按棕榈酸钠-油酸钠试剂盒说明建立游离脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 诱导的脂肪堆积模型, 使用含有不同浓度 CRP 的 DMEM (含有 1% BSA, 但不包含血清) 孵育细胞 24 h, 并进行后续试验。

1.2.6.4 油红 O 染色检测脂肪堆积

在 CRP 处理后, 进行油红 O 染色以观察脂肪堆积情况。12 孔板完成试验后, 弃培养基, PBS 洗涤 3 次, 加入 4%多聚甲醛溶液室温固定 4 h。双蒸水洗 3 次。加入油红 O 染色液, 室温作用 20 min, 双蒸水洗 3 次, 加入苏木素复染 3 min。双蒸水洗 6 次。水封后在显微镜下观察脂肪滴的染色情况。

1.2.6.5 生化指标检测

在 96 孔板中完成 CRP 处理后, 去除培养基, PBS 洗涤 3 次, 用细胞裂解液裂解细胞 (冰浴)。收集所有细胞裂解液, 于 4 °C, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。进行蛋白定量后, 根据试剂盒检测方法, 检测各组细胞中 TC 和 TG 含量。

1.3 数据处理

本研究中试验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。当方差分析结果显示差异显著时, 进一步采用最小显著差异法进行多重比较。所有统计分析采用 SPSS 22.0 软件完成, 差异显著性检验采用双尾检验。

2 结果与分析

2.1 CRP 提取单因素试验结果分析

2.1.1 纤维素酶添加量对 CRP 得率的影响

在单因素试验中, 我们发现纤维素酶的添加量对 CRP 的得率有显著影响。如图 1 所示, 当纤维素酶添加量从 0.5%逐步增加至 2.0%时, 得率随之上升, 达到最大值 ($26.71\% \pm 4.20\%$)。然而, 当纤维素酶添加量继续增加时, 得率开始下降。这一现象可能归因于纤维素酶在较低浓度时能有效破坏细胞壁, 促进多糖释放; 而过高的酶浓度可能导致多糖的过度水解, 降低提取效率^[14]。

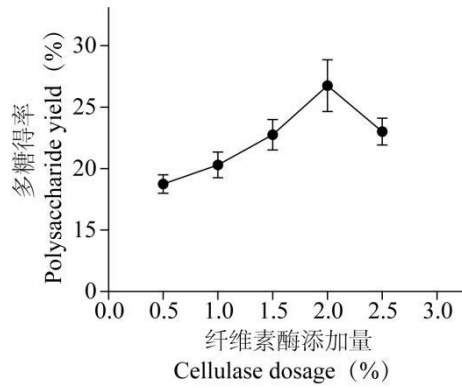


图 1 纤维素酶添加量对 CRP 得率的影响

Fig. 1 Effect of cellulase addition amount on the yield of CRP

2.1.2 果胶酶添加量对 CRP 得率的影响

果胶酶的添加量同样对 CRP 得率有重要影响。如图 2 所示，随着果胶酶添加量的增加，得率先是上升，当添加量为 2.0% 时，得率达到最高（ $26.11\% \pm 2.77\%$ ）。进一步增加果胶酶的添加量会导致得率下降。这可能是由于适量的果胶酶能够有效水解果胶，增强细胞壁的破坏，促进多糖的释放；过量的果胶酶可能导致多糖结构的破坏，影响提取效果^[15]。

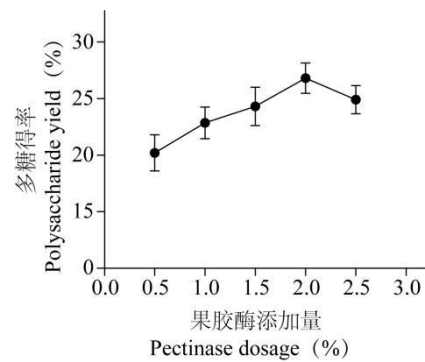


图 2 果胶酶添加量对 CRP 得率的影响

Fig. 2 Effect of pectinase addition amount on the yield of CRP

2.1.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数对 CRP 得率的影响

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数对 CRP 得率的影响也非常明显。如图 3 所示，当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数从 12% 增加至 18% 时，得率逐渐增加，并在 18% 时达到最高（ $27.02\% \pm 2.85\%$ ）。继续提高 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数会导致得率降低。这可能是由于适宜的盐浓度增强了多糖的沉淀效果，而过高的盐浓度可能降低了多糖的溶解度，影响了提取效率^[16]。

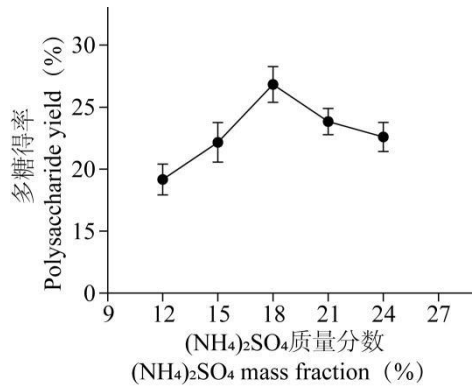


图 3 (NH₄)₂SO₄ 质量分数对 CRP 得率的影响

Fig. 3 Effect of (NH₄)₂SO₄ addition amount on the yield of CRP

2.1.4 PEG 质量分数对 CRP 得率的影响

PEG 质量分数对 CRP 的得率也起着关键作用。如图 4 所示,随着 PEG 质量分数的增加,得率逐渐上升,在 PEG 质量分数为 20%时,得率达到最大值 26.88% ± 3.74%。当 PEG 质量分数超过 20%后,得率开始减少。这可能是由于适量的 PEG 增加了溶液的黏度,有助于多糖的分离;而过高的 PEG 质量分数可能增加了体系黏度,降低了多糖的分配效率^[17]。

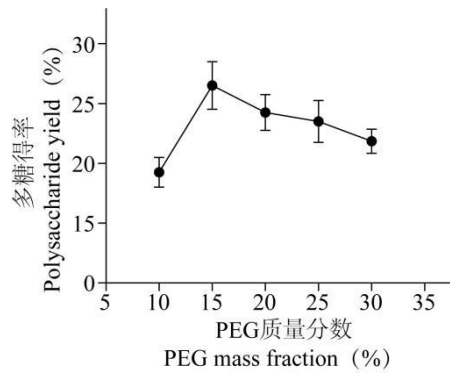


图 4 PEG 质量分数对 CRP 得率的影响

Fig. 4 Effect of PEG mass fraction addition amount on the yield of CRP

2.2 响应面优化提取条件结果

2.2.1 模型的建立与显著性检验

在本研究中,我们通过四因素三水平试验设计对 CRP 提取工艺进行了优化。自变量包括纤维素酶添加量 (*A*)、果胶酶添加量 (*B*)、(NH₄)₂SO₄ 质量分数 (*C*) 和 PEG 质量分数 (*D*),响应值设定为 CRP 得率 (*Y*)。确定 CRP 最佳提取工艺参数,响应面试验设计及结果见表 2。

表 2 响应面分析设计及结果

Table 2 Design and results of the response surface analysis

试验号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>Y</i> 多糖得率
Experiment number					Polysaccharide yield (%)
1	1	0	0	-1	24.26

2	0	0	1	1	25.91
3	0	0	0	0	29.97
4	1	-1	0	0	22.57
5	0	0	0	0	30.51
6	0	1	0	1	27.86
7	-1	0	0	-1	21.57
8	1	0	-1	0	26.37
9	0	1	0	-1	24.77
10	0	0	-1	-1	20.66
11	0	1	1	0	26.74
12	0	-1	0	1	22.06
13	1	0	0	1	26.51
14	-1	0	0	1	24.06
15	-1	0	-1	0	22.37
16	0	0	0	0	29.63
17	0	1	-1	0	24.26
18	0	0	1	-1	25.63
19	0	0	0	0	31.49
20	-1	1	0	0	23.77
21	1	0	1	0	26.37
22	0	-1	0	-1	20.89
23	0	-1	1	0	25.49
24	0	0	0	0	30.6
25	-1	-1	0	0	22.46
26	0	-1	-1	0	22.26
27	0	0	-1	1	24.14
28	-1	0	1	0	22.94
29	1	1	0	0	26.57

用 Design Expert 12.0 软件对表 2 的数据进行多元回归分析，结果见表 3，得到 CRP 得

率 与 因 素 间 的 回 归 方 程 ：
 $y=30.44+1.29A+1.52B+1.09C+1.06D+0.67AB-0.14AC-0.06AD-0.18BC+0.48BD-0.8CD-3.18A^2-3.19B^2-2.76C^2-3.37D^2$ 。

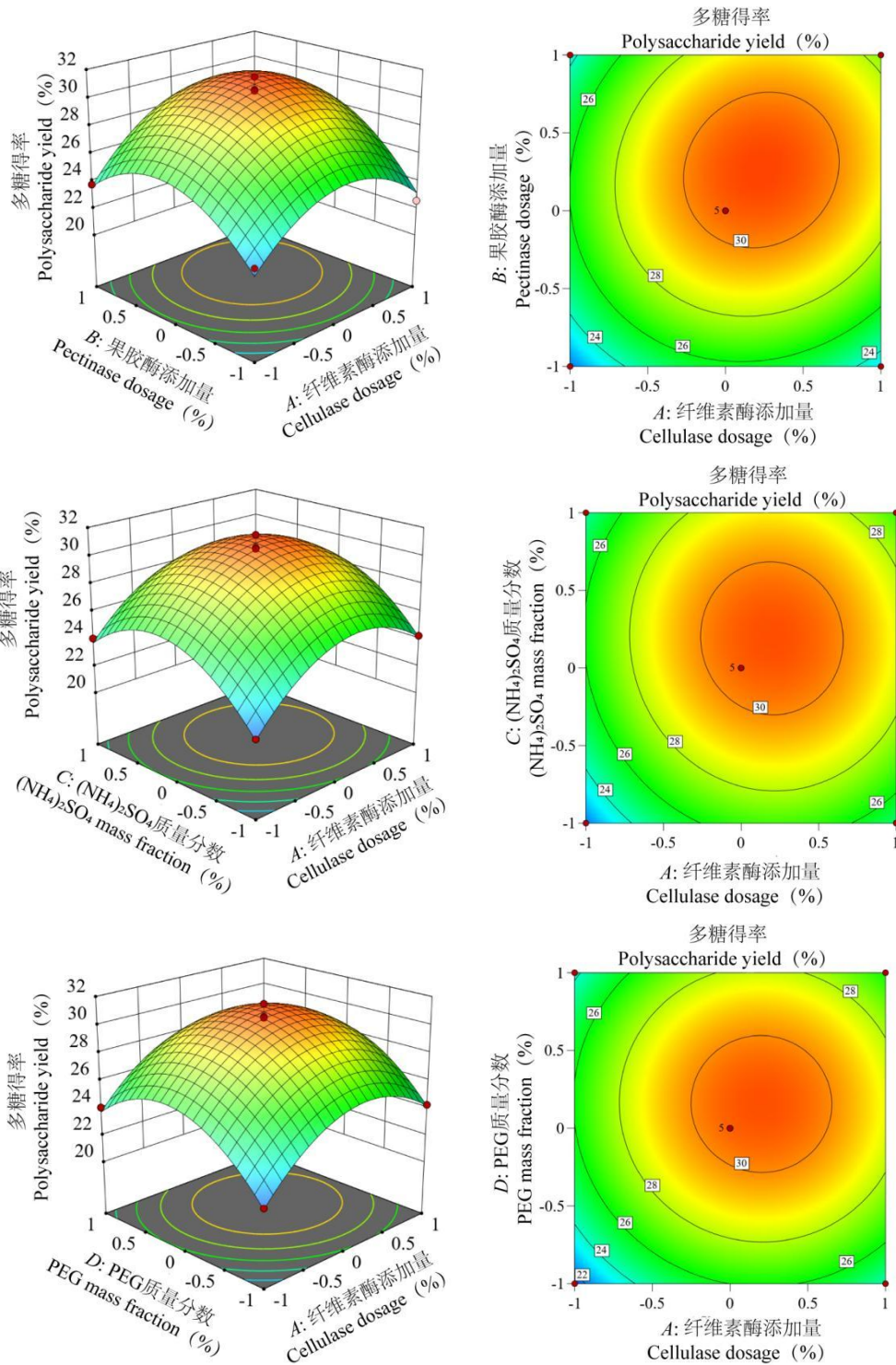
表 3 CRP 得率回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis of the regression model for the yield of CRP

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
模型 Model	244.275 1	14	17.448 2	15.004 7	<0.000 1	**
A	19.969 2	1	19.969 2	17.172 7	0.001 0	**
B	27.724 8	1	27.724 8	23.842 2	0.000 2	**
C	14.126 7	1	14.126 7	12.148 4	0.003 6	**
D	13.568 1	1	13.568 1	11.668 0	0.004 2	**
AB	1.809 0	1	1.809 0	1.555 7	0.232 8	—
AC	0.081 2	1	0.081 2	0.069 9	0.795 4	—
AD	0.014 4	1	0.014 4	0.012 4	0.913 0	—
BC	0.140 6	1	0.140 6	0.120 9	0.733 2	—
BD	0.921 6	1	0.921 6	0.792 5	0.388 4	—
CD	2.560 0	1	2.560 0	2.201 5	0.160 0	—
A ²	65.576 8	1	65.576 8	56.393 3	<0.000 1	**
B ²	66.197 0	1	66.197 0	56.926 7	<0.000 1	**
C ²	49.575 7	1	49.575 7	42.633 1	<0.000 1	**
D ²	73.538 9	1	73.538 9	63.240 4	<0.000 1	**
残差 Residual	16.279 9	14	1.162 8	—	—	—
失拟项 Lack of fit	14.269 9	10	1.427 0	2.839 8	0.163 2	—
纯误差 Pure error	2.010 0	4	0.502 5	—	—	—

在本研究中，通过响应曲面图分析深入探讨了不同提取因素交互作用对 CRP 得率的影响（图 5）。分析结果表明，纤维素酶添加量与果胶酶添加量的交互作用，以及纤维素酶与

(NH₄)₂SO₄质量分数的交互作用对多糖得率具有影响。相反，纤维素酶添加量与 PEG 质量分数，果胶酶添加量与 PEG 质量分数，PEG 质量分数与(NH₄)₂SO₄质量分数，以及 PEG 质量分数与(NH₄)₂SO₄质量分数之间的交互作用对得率的影响则不明显。这些圆形等高线暗示了各因素之间的交互作用对多糖得率的贡献较小。因此，可以通过优化显著影响因素的水平，如调整果胶酶和 PEG 的添加量，以及它们与(NH₄)₂SO₄的组合，来提高 CRP 的提取效率。



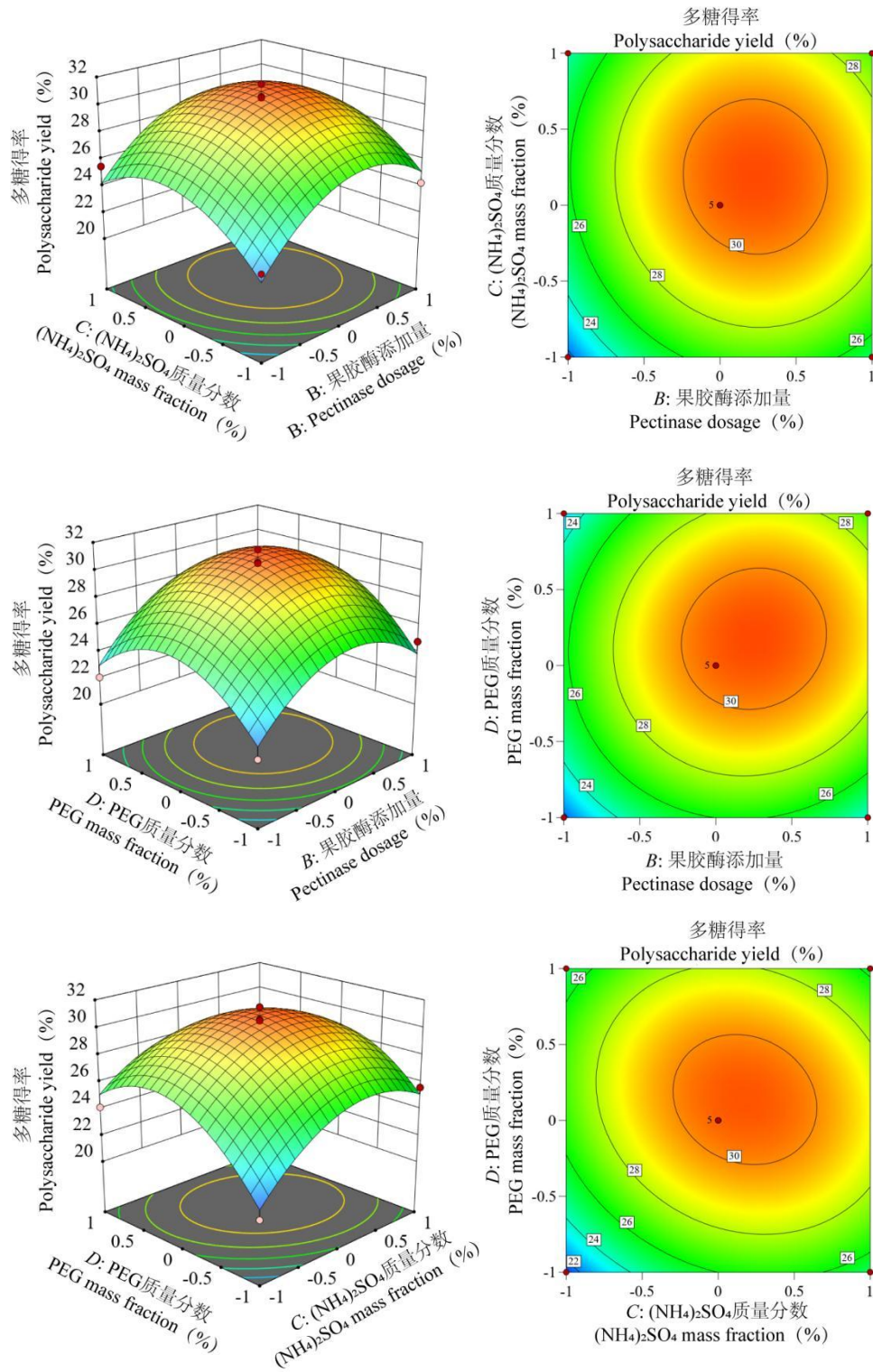


图 5 各因素交互作用对 CRP 得率的影响

Fig. 5 Effect of the interaction of various factors on the yield of CRP

2.2.2 CRP 提取条件的优化、预测及试验验证

在本研究中，采用 Design Expert 12.0 软件对所建立的多元线性回归模型进行了参数优化，旨在确定 CRP 提取的最优工艺条件。通过软件分析获得的预测结果显示，当纤维素酶添加量为 2.13%，果胶酶添加量为 2.12%， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的质量分数为 18.41%，以及 PEG 的质

量分数为 14.87%时，理论上可实现最高的 CRP 得率，预测值为 33.05%。

鉴于操作的实用性和精确性考量，对上述预测条件进行了微调，确定了更为适宜的试验条件：纤维素酶添加量 2.0%，果胶酶添加量 2.0%， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数 18.0%，PEG 质量分数 15.0%。在此试验条件下，重复三次后的 CRP 得率分别为 32.69%、33.13%、32.51%，其平均值 32.78%与原始预测值相比存在 0.82%的偏差。该微小偏差的存在于可接受范围内，表明所建立的数学模型具有较高的预测精确度。

2.3 CRP 对 HepG2 细胞存活率的影响

如图 6 所示，随着 CRP 浓度的递增，HepG2 细胞的存活率呈现下降趋势。特别是在 1.6 mg/mL 和 3.2 mg/mL 的较高浓度下，细胞存活率的显著降低 ($P<0.05$)，说明 CRP 在高浓度时对 HepG2 细胞的潜在毒性效应^[18,19]。然而，在 0.8 mg/mL 浓度以下，HepG2 细胞的存活率高于 90%，表明 CRP 对 HepG2 细胞具有较高的细胞相容性。基于此结果，选定 0.2、0.4、0.8 mg/L 的 CRP 用于后续调节脂质活性检测。

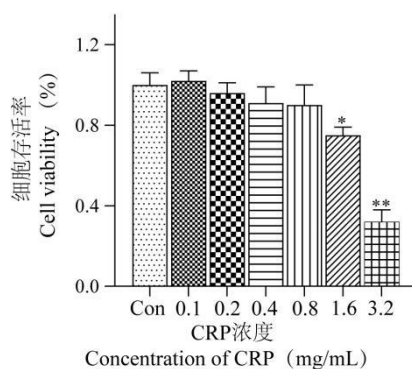


图 6 CRP 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig. 6 Effect of CRP on the viability of HepG2 cells

注：与 Con 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

Note: Compared with Con group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.4 CRP 对脂肪化 HepG2 细胞脂质沉积的影响

本研究采用油红 O 染色法评估 CRP 对脂肪化 HepG2 细胞内脂质沉积的影响。如图 7 和 8 所示，与未处理的空白对照组相比，经 FFAs 处理的 HepG2 细胞中观察到显著增多的脂滴，证实了脂肪化细胞模型的成功建立。与模型组相比，CRP 干预组在不同剂量下均能显著减少细胞内的脂滴数量，其中高剂量组的降脂效果尤为显著。进一步的定量分析显示，CRP 能有效减少 FFAs 诱导的 HepG2 细胞内脂质积累 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

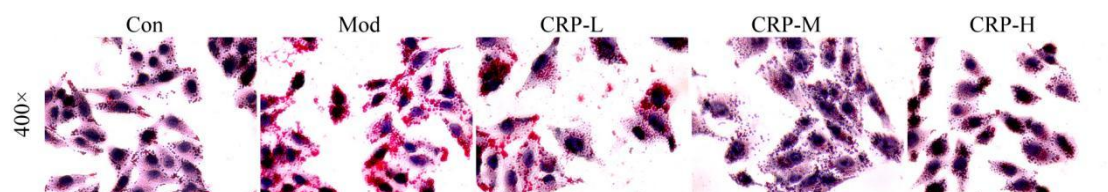


图 7 CRP 对 HepG2 细胞油红 O 染色的影响

Fig. 7 Effect of CRP on Oil Red O staining in HepG2 cells

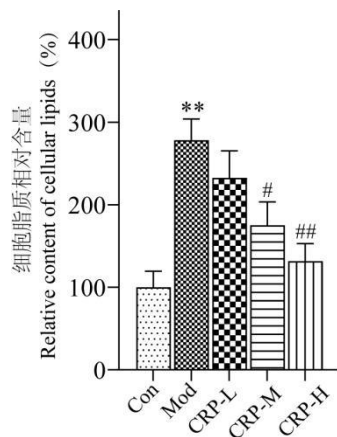


图 8 CRP 对 HepG2 细胞脂质含量的影响

Fig. 8 Effect of CRP on lipid content in HepG2 cells

注：与 Con 组相比，** $P < 0.01$ ；与 Mod 组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，下同。

Note: Compared with Con group, ** $P < 0.01$; Compared with Mod group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, the same below.

2.5 CRP 对脂肪化 HepG2 细胞内 TC、TG 含量的影响

肝细胞内的脂质主要储存为 TC 和 TG 的形式^[20]。本研究通过生化分析方法评估 CRP 对脂肪化 HepG2 细胞内 TC 和 TG 含量的影响。结果如图 9 所示，其中与空白对照组相比，FFAs 诱导的模型组细胞内的 TC 和 TG 含量均显著增加 ($P < 0.05$)，证实了脂肪化模型的建立。与 FFAs 诱导的模型组相比，CRP 中剂量组和高剂量组均能显著降低细胞内的 TC 和 TG 含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，其中高剂量组的降低效果更为显著。

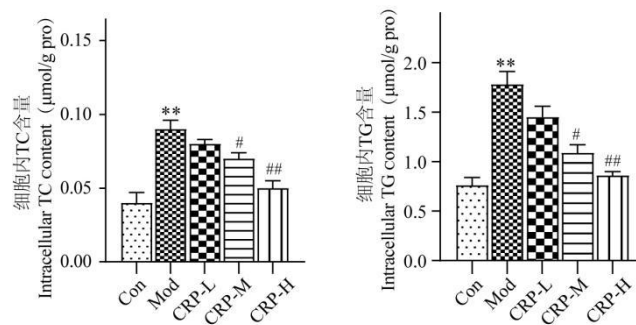


图 9 CRP 对脂肪化 HepG2 细胞内 TC、TG 含量的影响

Fig. 9 Effect of CRP on the levels of TC and TG in HepG2 cells

3 讨论与结论

单因素试验结果表明，适量的纤维素酶和果胶酶能够有效破坏细胞壁，促进多糖的释放，从而提高得率。而过高的酶浓度可能导致多糖的过度水解，反而降低了提取效率。适宜的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度有助于多糖的沉淀和分离，但过高的盐浓度会降低多糖的溶解度。同样地，适量的 PEG 能增加溶液黏度，促进多糖的分离，但过高的 PEG 浓度会过度增加体系黏度，影响多糖的分配。这些结果与已有研究报道相吻合^[13]。响应面分析结果进一步揭示了各因素及其交互作用对多糖得率的影响。纤维素酶添加量与果胶酶添加量的交互作用，以及纤维素酶与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量分数的交互作用对多糖得率具有显著影响。这可能是因为这些因素共同

作用于细胞壁的破坏和多糖的释放过程。相反,其他因素组合的交互作用对得率的影响较小。因此,通过优化这些显著影响因素的水平,如调整果胶酶和 PEG 的添加量,以及它们与 (NH₄)₂SO₄ 的组合,可以进一步提高 CRP 的提取效率。

通过优化,确定的最佳提取条件为:纤维素酶添加量 2.00%,果胶酶添加量 2.00%,(NH₄)₂SO₄ 质量分数 18.00%,PEG 质量分数 15.00%。在这些条件下,CRP 的得率达到了 32.78%。与传统提取方法相比^[21],本研究所采用的酶法辅助双水相法在提取效率和温和条件方面展现出显著优势。此外,对 CRP 的生物活性进行了评估。研究发现,在脂肪化 HepG2 细胞模型中,CRP 能有效减少脂质沉积,降低 TC 和 TG 含量。这些结果揭示了 CRP 在调节脂质代谢的潜在功效,为开发新型功能性食品和药物提供了科学依据。

参考文献

- 1 Wu C,Cong XJ,Gao Y,et al.Current status and prospect of research on chicoric acid[J].China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2021,36:7234-7238.
- 2 Jiang ZH,Zhu JX,Zhang WZ.Optimization of phosphorylation of polysaccharides from chicory (*Cichorium intybus* var. *foliosum* Hegi) by response surface method[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2023,44:200-206.
- 3 Fu AY,Wang QN,Wu YL,et al.*In vitro* antioxidant activity and anti-fatigue effect of chicory polysaccharide [J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2018,39:1-5.
- 4 Cani PD,Neyrinck AM,Maton N,et al.Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet:involvement of glucagon-like peptide-1[J].Obes Res,2005,13:1000-1007.
- 5 Shoaib M,Shehzad A,Omar M,et al.Inulin:Properties,health benefits and food applications[J].Carbohydr Polym,2016,147:444-454.
- 6 Illippangama AU,Jayasena DD,Jo C,et al.Inulin as a functional ingredient and their applications in meat products[J].Carbohydr Polym,2022,275:118706.
- 7 Hughes RL,Alvarado DA,Swanson KS,et al.The prebiotic potential of inulin-type fructans:a systematic review[J].Adv Nutr,2022,13:492-529.
- 8 Tawfick MM,Xie H,Zhao C,et al.Inulin fructans in diet:role in gut homeostasis,immunity,health outcomes and potential therapeutics[J].Int J Biol Macromol,2022,208:948-961.
- 9 Wu Y,Zhou F,Jiang H,et al.Chicory (*Cichorium intybus* L.) polysaccharides attenuate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease via AMPK activation[J].Int J Biol Macromol,2018,118:886-895.
- 10 Liang SY.Isolation purification structure characterization and hypoglycemic activity of polysaccharides from chicory root[D].Tianjin:Tianjin University of Science & Technology(天津科技大学),2022.

- 11 Zhu F C,Luo SL,Zheng X,et al.Enzyme-assisted extraction of polysaccharides of Ta-pieh Mountains *Bletilla striata* and its activities study[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:1389-1395
- 12 Peng CY,Liao LM.Study on optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from loquat leaf by center combination design[J].China Food Addit(中国食品添加剂),2021,32(12):9-15.
- 13 Wang XS,Wu Q,Wu D,et al.Cellulase-based extraction and antioxidant activity of polysaccharide from *Cyperus esculentus*[J].Food Res Dev(食品研究与开发),2023,44:102-107.
- 14 Li J,Chase HA.Applications of membrane techniques for purification of natural products.Biotechnol Lett,2010,32:601-608.
- 15 Rastall RA.Functional oligosaccharides:application and manufacture[J].Annu Rev Food Sci Technol,2010,1:305-39.
- 16 Feng L,Luo SB,Guligena P,et al.Optimization of extraction process of total triterpenoids from *Crataegus songarica* by response surface methodology and its purification process[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2024,45:196-204.
- 17 Zheng YN,Cai X,Deng AP.Optimization of microwave assisted aqueous two phase extraction of lily polysaccharides and its structure characterization[J].Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2023,45:4102-4108.
- 18 Tian L,Liu CY,Han J,et al.Progress on the structural characteristic and biological activity of Polygonati Rhizoma polysaccharides[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:519-530
- 19 Liu WH,Yang C,Zhang GP,et al.Analysis of the role of TGF- β /Smad pathway in the apoptosis of hepatocarcinoma cells induced by *Sargassum fusiforme*[J].Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis(中西医结合肝病杂志),2023,33:996-999.
- 20 Wang C,Dai XY,Gong LH,et al.Effects of emodin on lipid metabolism in zebrafish with hyperlipidemia[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:1873-1879.
- 21 Ma L,Xue S,Zhu JF,et al.Assay of chicory polysaccharides in chicory root[J].Guide J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报),2019,25:63-65.

收稿日期: 2024-07-31 接受日期:

基金项目: 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究重大项目(23KJA350001)

*通信作者 E-mail: zhoumin2891@163.com