

低聚壳聚糖的美拉德反应及其衍生物的抗氧化性能研究

孙涛^{1,2}, 朱云¹, 王燕萍¹, 谢晶¹, 薛斌¹

(1.上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 醇沉法制得低聚壳聚糖美拉德反应 8、16 h 以及 24 h 的衍生物, 分别记为 CC-8、CC-16 以及 CC-24。对 3 种衍生物进行红外表征和分子量测定, 并研究其对超氧阴离子 O_2^- 、DPPH 的清除能力以及还原能力。结果显示: 反应体系 pH 呈下降趋势; UV-Vis 光谱在 280 nm 波长处吸收峰有明显增强, 反应 16 h 后增长缓慢; 在 343 nm 的激发波长和 420 nm 发射波长下的荧光强度明显增高, 反应 16 h 后开始下降; 3 种衍生物均保留着低聚壳聚糖的特征吸收峰; 其对 O_2^- 、 \cdot DPPH 的清除能力以及还原能力均得到显著提高, 且 CC-16 抗氧化能力最好。

关键词: 低聚壳聚糖; 美拉德反应; 抗氧化性能

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)05-0065-06

壳聚糖是一种广泛存在于甲壳类动物、昆虫的硬壳以及菌类的细胞壁中的碱性高分子多糖, 且低聚壳聚糖的抗氧化性优于高聚壳聚糖^[1]。低聚壳聚糖具有的降低胆固醇、降血脂、抗肿瘤、抗菌、提高机体免疫功能、调节肠道菌群以及促进药物吸收等生理活性, 在食品行业作为抗菌剂、保鲜剂以及抗氧化剂被广泛关注^[2]。低聚壳聚糖自身含有游离氨基和羧基易发生美拉德反应。

本实验以美拉德反应为低聚壳聚糖的改性手段, 制备低聚壳聚糖衍生物, 检测了反应过程中 pH、吸光度以及荧光值等外在特征的变化, 并且考察了其对于 O_2^- 、DPPH 的清除能力以及还原能力, 旨在研究抗氧化能力与美拉德反应外在特征之间的联系, 以期拓宽低聚壳聚糖的改性和开发天然高效的抗氧化剂提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

低聚壳聚糖(纯度>90%, 脱乙酰度>70%, 凝胶色谱测定其分子质量为 9370 Da), 购自浙江金壳生物化学有限公司; 鲁米诺, DPPH, 购自 Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯, 购自上海化学试剂公司; 抗氧化测试所需溶液由二次蒸馏水配制。

1.2 主要设备和仪器

WFZ UV2000 型紫外分光光度计(上海合利仪器

有限公司); 970CRT 荧光分光光度计(南京昕航科学仪器有限公司); EQUINOX55 傅立叶红外-拉曼光谱仪(德国布鲁克公司); Waters 2410 型凝胶色谱仪(美国 Waters 公司); IFFM 2D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈科技有限公司)。

1.3 低聚壳聚糖的美拉德反应

称取壳聚糖 10.0 g, 用 100 mL 的二次蒸馏水溶解, 在 80℃ 下回流反应, 检测反应过程中 pH、吸光度以及荧光值的变化, 经反复醇沉, 制得壳聚糖反应 8、16 及 24 h 的衍生物, 分别记为: CC-8、CC-16 以及 CC-24。

1.4 测试表征

红外光谱在 EQUINOX55 傅立叶红外-拉曼光谱仪上进行, 采用 KBr 压片法制样, 测定波数范围为 500~4000 cm^{-1} , 分辨率为 0.8 cm^{-1} 。

产物的相对平均分子量及其分布采用 GPC 法测定。GPC 测试条件如下: 流动相: 0.1 mol/L 醋酸钠水溶液; 监测器: Waters 2410 示差折光监测器; 柱子: TOSOH BIOSEP G4000SWXL; 温度: 40 ℃; 标准物质为: 葡聚糖。

收稿日期: 2011-04-26; 修回日期: 2011-07-20

基金项目: “十二五”国家支撑计划项目(2012BAD38B09); 上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)

作者简介: 孙涛(1970-), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 多糖的改性及生物功能的开发, 电话: 021-61900363, E-mail: taosun@shou.edu.cn

1.5 抗氧化性能测定

1.5.1 对超氧阴离子自由基 O_2^- 的清除

用 pH 为 10.20 的 0.05 mol/L Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲溶液配制浓度为 1.5×10^{-3} mol/L 的鲁米诺溶液, 用 1×10^{-3} mol/L 的盐酸配制浓度为 0.1 mol/L 的邻苯三酚储备液, 使用前用去离子水稀释至 1×10^{-4} mol/L。以缓冲液作为溶剂, 配制不同浓度的样品溶液。用流动注射化学发光分析仪依次测定从稀到浓的样品溶液, 读出峰面积^[3]。清除率 = $(A_0 - A_i) / A_0 \times 100\%$ 。其中 A_0 为空白溶液峰面积; A_i 为样品溶液峰面积。经 SOD, 过氧化氢酶及甘露醇检测, 该体系产生的自由基为超氧阴离子 O_2^- 。

1.5.2 对 DPPH 自由基的清除

在比色管中加入 2.0 mL 的浓度为 1×10^{-4} mol/L DPPH 无水乙醇溶液, 再加入不同浓度的样品溶液 2.0 mL, 室温下避光静置 30 min, 在 517 nm 处测量吸光度 A_i 。用去离子水代替样品溶液, 得吸光度 A_0 , 无水乙醇代替 DPPH, 得吸光度 A_j 。清除率 = $[1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$ ^[4]。

1.5.3 还原能力的测定

pH 为 6.60 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液和 1% 铁氰化钾溶液各 2.5 mL, 加入到 2.0 mL 不同浓度的样品溶液中, 混匀, 50 °C 水浴 20 min 后迅速冷却, 加入 2.5 mL 10% 三氯乙酸溶液, 混匀后在 3 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液 2.0 mL, 加入 2.5 mL 去离子水和 0.5 mL 0.1% 的三氯化铁溶液, 静置 10 min 后在 700 nm 处测定其吸光度^[5]。

2 结果与分析

2.1 pH 值的变化

美拉德反应中一般形成一些有机酸, 如甲酸和乙酸^[6-7], 引起体系 pH 下降。图 1 为低聚壳聚糖美拉德反应过程中体系 pH 的变化图。反应体系 pH 值呈下降趋势, 其中反应 8~16 h 之间下降较快, 反应体系 pH 由 4.8 下降到 3.5; 反应 16 h 后 pH 缓慢下降。

2.2 吸光度的变化

图 2 描述了低聚壳聚糖自身美拉德反应过程中的紫外-可见吸收光谱在 280 nm 和 420 nm 处的吸光度。高聚壳聚糖在 280 nm 没有吸光度^[8], 而低聚壳聚糖含有相当多的还原活性基因。在制备低聚壳聚糖的反应中就开始发生并形成有色化合物, 因此最初的低聚壳聚糖也存在 280 nm 处的吸收^[2]。如图所

示, 在 280 nm 处吸收峰有明显增强, 表明美拉德反应过程中生成中间产物^[9], 且反应前 16 h 增幅较大, 其后增加缓慢。在 420 nm 处吸收峰随着反应时间的延长缓慢增强, 表明美拉德反应产物增多^[10-11]。

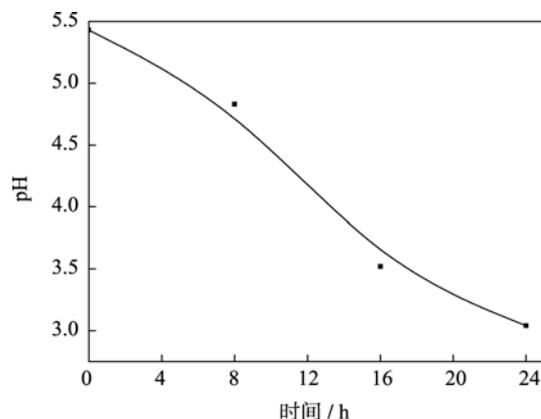


图 1 低聚壳聚糖美拉德反应过程中 pH 的变化
Fig. 1 The pH change of Maillard reaction

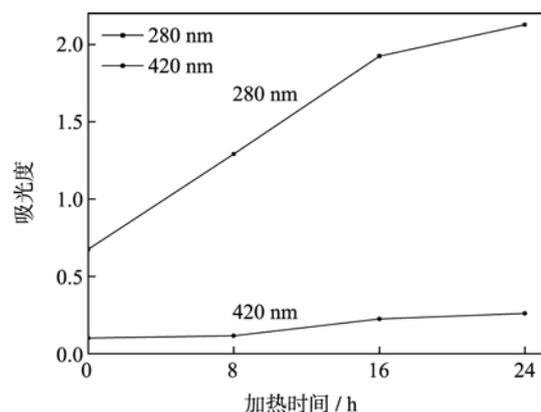


图 2 UV-Vis 在 280 nm 和 420 nm 处的吸光度
Fig. 2 The UV-Vis absorbance at 280 nm and 420 nm

在酸性条件下, 美拉德反应易发生糖的异构和脱水, 产生糠醛类物质^[12]。羟甲基糠醛是在酸性条件下美拉德反应的标示物, 在 280 nm 左右存在特征吸收峰^[13]。紫外-可见吸收在 280 nm 和 420 nm 附近的吸收, 分别代表美拉德中间产物羟甲基糠醛及褐变物质的量^[14], 如图 2 所示, 美拉德反应过程中褐变物质在不断积累。

2.3 荧光值的变化

图 3 描述的是在 343 nm 激发波长和 420 nm 发射波长下体系的荧光强度。如图所示, 反应 16 h 的荧光值达到最大值, 16 h 后开始下降, 这表明具有荧光性质的美拉德产物的产生、积累以及降解。荧光

物质被视为美拉德反应的指示剂,因为它们灵敏地反映了美拉德反应的早期过程,反应后期荧光物质将参与类黑素等大分子的形成,所以随着反应进行,荧光物质的积累会越来越少^[8]。

美拉德初期产物经过脱水、裂变会产生无色的还原酮与荧光物质,此时不饱和的羰基化合物增加,如:糠醛、脱氧邻酮醛糖等。由于产生了一些小分子化合物,这个体系的荧光特性增强,而后会与其他物质聚合生成类黑素,所以在 16 h 后开始下降。

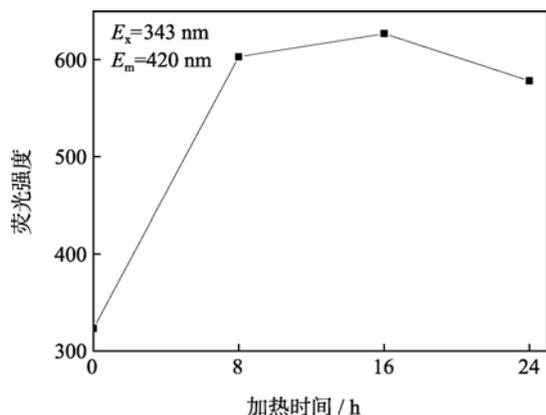


图 3 在激发波长 343 nm 和发射波长 420 nm 处的荧光强度

Fig. 3 The fluorescence intensity of Maillard reaction with E_x at 343 nm and E_m at 420 nm

2.4 低聚壳聚糖美拉德产物的结构表征

图 4 是低聚壳聚糖及其衍生物的红外光谱图。壳聚糖及三种衍生物在 1100 cm^{-1} 附近都有 3 个较强的多糖特征吸收峰,分别是 895 、 1085 cm^{-1} 以及 1155 cm^{-1} , 这些吸收峰都来自壳聚糖主链环状结构,可作为判定低聚壳聚糖及其衍生物存在的特征吸收峰^[4]。低聚壳聚糖在 1621 、 1515 和 1381 cm^{-1} 附近的吸附带,分别归因于酰胺 I(C=O)、自由氨基($-\text{NH}_2$)和酰胺 III^[15]。且 CC-16 和 CC-24 在 1621 、 1515 cm^{-1} 和 1381 cm^{-1} 的吸收峰较低聚壳聚糖有所降低,表明了反应 16 h 后,酰胺 I(C=O)、自由氨基($-\text{NH}_2$)和酰胺的减少^[16],即低聚壳聚糖参与了美拉德反应。

采用 Waters 2410 型凝胶色谱仪,测得样品低聚壳聚糖的分子量为 9370 Da ,美拉德反应制得的低聚壳聚糖衍生物 CC-8、CC-16 和 CC-24 的分子质量分别为 11759 Da 、 11761 Da 和 11895 Da 。美拉德衍生物的分子质量较低聚壳聚糖都有所增加,表明低聚壳聚糖分子自身含有游离氨基和羰基相互反应形成了更大的分子。

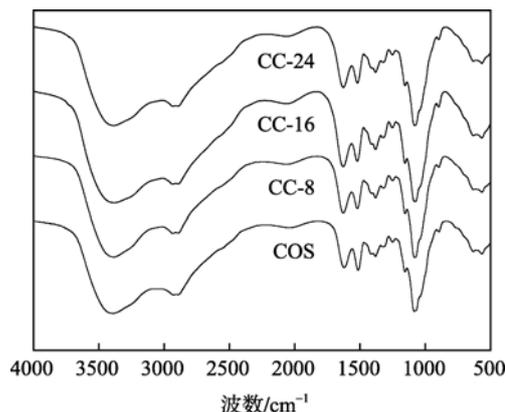


图 4 低聚壳聚糖及三种低聚壳聚糖美拉德衍生物的红外图
Fig. 4 The FTIR spectra of COS, CC-8, CC-16 and CC-24

2.5 超氧阴离子自由基 O_2^- 的清除

低聚壳聚糖对 O_2^- 的清除活性可能与其分子中的活性羟基和氨基有关^[17],在其活性氨基和羟基位置引入取代基之后,所得到的低聚壳聚糖衍生物对 O_2^- 的清除活性下降,因此活性基团的减少会使壳聚糖衍生物对 O_2^- 的清除能力下降^[3]。

图 5 描述了低聚壳聚糖及其衍生物对 O_2^- 的清除效果。其中反应 16 h 的低聚壳聚糖衍生物对 O_2^- 的清除能力最强,其 IC_{50} (对自由基清除率为 50% 时所需要的自由基清除剂浓度)约为 1.30 g/L ,三种衍生物对 O_2^- 的清除能力均优于低聚壳聚糖,其中低聚壳聚糖的 IC_{50} 为 6.48 g/L 。低聚壳聚糖自身的自由氨基与羰基发生美拉德反应,低聚壳聚糖衍生物中活性氮

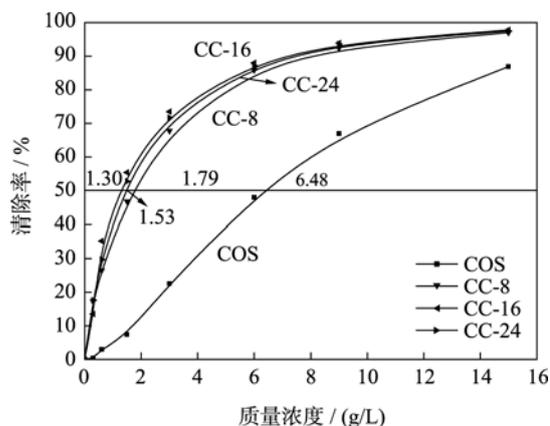


图 5 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物对超氧阴离子的清除能力

Fig. 5 Scavenging activities of COS, CC-8, CC-16 and CC-24 on superoxide anions

基含量下降,但其对 O_2^- 的清除能力在自由氨基减少后却得到提升。

2.6 对 DPPH 自由基的清除

图 6 描述了壳聚糖及其衍生物对 DPPH 自由基的清除能力。由图可知,三种低聚壳聚糖衍生物对 DPPH 的清除能力均优于低聚壳聚糖,即抗氧化能力: $CC-16 > CC-8 > CC-24 > COS$ 。美拉德反应产物对 DPPH 的清除能力与体系的荧光值有一定关系^[18]。本实验表明,壳聚糖衍生物对 DPPH 自由基的清除能力与反应过程中荧光值的变化结果一致。低聚壳聚糖分子链中的活性氨基和羟基可以提供氢与 DPPH 结合,从而达到清除 DPPH 的目的^[4]。这一结果同样显示,虽然经美拉德反应后氨基的含量减少,但低聚壳聚糖衍生物对 DPPH 的清除能力明显增强,与对 O_2^- 的清除结果相仿。

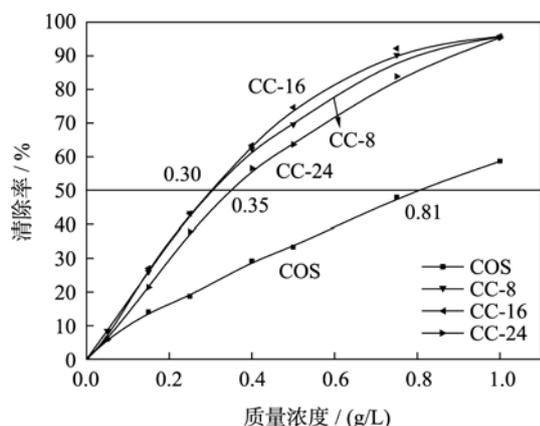


图 6 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物对 DPPH 的清除能力
Fig. 6 Scavenging activities of COS, CC-8, CC-16 and CC-24 on DPPH radicals

2.7 还原能力的测定

还原能力是表示抗氧化物质提供电子能力的重要指标,通过提供电子,阻断 Fe^{2+} 向 Fe^{3+} 的转变,从而表现出一定的还原能力。研究表明,抗氧化活性和还原能力之间存在着密切的关系^[19]。CC-8、CC-16、CC-24 以及 COS 的还原能力如图 7 所示。随着浓度的增加,各样品的吸光度随之增加,即还原能力逐渐增强。在浓度为 2.5 g/L 时, COS、CC-8、CC-16 和 CC-24 的吸光度分别为 0.48、0.83、0.89 和 0.79,即还原能力顺序为 $CC-16 > CC-8 > CC-24 > COS$ 。壳聚糖的还原能力也与其提供电子的活性氨基和羰基有关,美拉德反应后还原能力却因活性基团的减少而增强,这与前面的结果一致。

本文研究表明低聚壳聚糖美拉德反应过程中,随着反应时间的增加,体系 pH 逐渐下降,褐变不断增强,荧光值在反应 16 h 内增长,16 h 后开始下降。低聚壳聚糖美拉德衍生物的抗氧化能力 16 h 的最好。由此可见,低聚壳聚糖美拉德衍生物的抗氧化能力与反应褐变程度没有关系,而与荧光的变化有某种联系。这一理论为荧光值作为美拉德反应生成抗氧化能力的产物监测指标奠定了基础,但其机理还有待进一步研究。

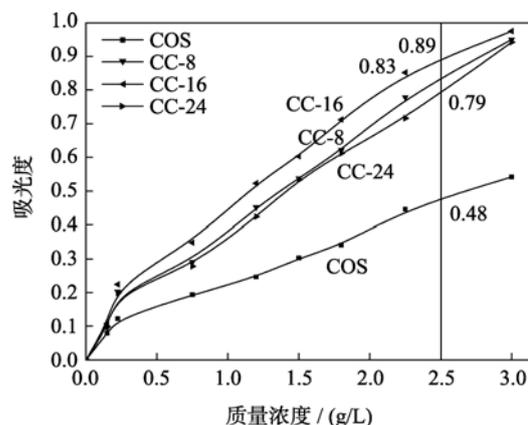


图 7 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物的还原能力测定
Fig. 7 Reducing capacity of COS, CC-8, CC-16 and CC-24

美拉德反应过程中会产生具有抗氧化性的物质,其中某些有抗氧化性的小分子物质可能生成、积累或者挥发,也可能聚合成抗氧化性较好的大分子物质,如类黑素等。通过美拉德反应制备三种低聚壳聚糖衍生物,尽管消耗了活性氨基,但其衍生物的抗氧化性却得到了较大的提升,其机理也有待进一步研究。

3 结论

本实验通过对低聚壳聚糖本身的美拉德反应,制备低聚壳聚糖衍生物,并检测了低聚壳聚糖及其衍生物对 O_2^- 、DPPH 的清除能力以及还原能力,结果显示衍生物的抗氧化性均优于低聚壳聚糖,且反应 16 h 的低聚壳聚糖衍生物抗氧化性能较好。虽然低聚壳聚糖衍生物的活性氨基含量下降了,但其抗氧化性能得到了提升,故认为壳聚糖自身美拉德反应后抗氧化性能得到提高,这为制备天然、安全、高效的抗氧化剂提供了思路。

参考文献:

[1] 尹学琼,林强,张岐,等. 低聚壳聚糖及其金属配合

- 物的抗 O₂⁻ 活性研究[J]. 应用化学, 2002, 19(4): 325-328.
- [2] Zeng L T, Qin C Q, Chi W L, et al. Browning of chitooligomers and their optimum preservation[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(4): 551-558.
- [3] 姚倩, 孙涛, 徐轶霞. 低聚壳聚糖衍生物的制备及其抗氧化性能[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(3): 530-533.
- [4] Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, et al. HPLC Method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picryl-hrazyl[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1998, 62(6): 1201-1204.
- [5] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(1): 27-32.
- [6] Ames J M. Applications of the Maillard reaction in the food industry[J]. Food Chemistry, 1998, 62(4): 431-439.
- [7] Brands C M J, Van Boekel M A J S. Kinetics modeling of reactions in heated monosaccharide-casein systems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(23): 6725-6739.
- [8] Kim D, Petrisor I G, Yen T F. Geopolymerization of biopolymers: A preliminary inquiry[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56(2): 213-217.
- [9] Ajandouz E H, Tchiakpe L S, DalleOre F, et al. Effect of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems[J]. Food Science, 2001, 66(7): 926-931.
- [10] 赵希荣. 壳聚糖与葡萄糖发生美拉德反应的条件及产物的抗氧化性能[J]. 中国食品添加剂, 2004, 25(6): 63-67.
- [11] Sweetie R K, Ramesh C, Arun S. Chitosan glucose complex—A novel food preservative [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 521-528.
- [12] 孙丽平, 汪东风, 徐莹. pH 和加热时间对美拉德反应挥发性产物的影响[J]. 食品工业科技, 2009, 30(4): 122-125.
- [13] Moralew F J, Romero C, Jimenez-perez S. Chromatographic determination of bound hydroxyl methyl furfural as an index of milk protein glycosylation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(5): 1570-1573.
- [14] Wittayachai L, Soottawat B, Munehiko T. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH[J]. Food Chemistry, 2007, 100(2): 669-677.
- [15] Qin C Q, Du Y M, Xiao L, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2002, 31(1-3): 111-117.
- [16] Umemura K, Kawai S. Modification of chitosan by the Maillard reaction using cellulose model compounds[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(2): 242-248.
- [17] Xie W M, Xu P X, Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001, 11(13): 1699-1701.
- [18] Francisco J M, Salvio J P. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence[J]. Food Chemistry, 2001, 72(1): 119-125.
- [19] Jing H, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(7): 1007-1015.

The Maillard reaction of chitosan oligosaccharide and the antioxidative activities of its derivatives

SUN Tao^{1,2}, ZHU Yun¹, WANG Yan-ping¹, XIE Jing¹, XUE Bin¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Apr.,26,2011

Key words: chitosan oligosaccharide; Maillard reaction; antioxidative activity

Abstract: Three kinds of chitosan oligosaccharide derivatives prepared through Maillard reaction by heating chitosan oligosaccharide for 8, 16 and 24 hours were named CC-8, CC-16 and CC-24, respectively. The pH, absorbance and fluorescence were determined during the reaction. Chitosan oligosaccharide derivatives were characterized by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and their molecular weights were determined by Gel permeation chromatograph (GPC). Their antioxidative activity was investigated by employing various established in vitro systems, such as superoxide anion, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging, and their reducing capacity was also studied. The results showed that the pH value of the reaction system decreased during Maillard reaction. The UV-Vis absorbance increased significantly at 280 nm and this increase slowed down after 16 hr. The fluorescence intensity significantly increased with Ex at 343 nm and Em at 420 nm and also slowed down after 16 hr. All the three derivatives kept the characteristic absorption peak of chitosan oligosaccharide. Their antioxidative and reducing capacities were both much stronger than those of the chitosan oligosaccharide and CC-16 has the strongest antioxidative activity.

(本文编辑: 康亦兼)