

## 基于与 $\alpha$ -丙氨酸/天冬酰胺美拉德反应的 低聚壳聚糖衍生物的抗氧化性能研究

孙涛<sup>1,2</sup>, 朱云<sup>1</sup>, 谢晶<sup>1</sup>, 薛斌<sup>1</sup>, 周冬香<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海, 201306; 2. 上海海洋大学 海洋科学研究院, 上海, 201306)

**摘要:** 研究低聚壳聚糖(COS)与  $\alpha$ -丙氨酸/天冬酰胺(低聚壳聚糖的羰基与氨基的物质质量比均为 4:1)的美拉德反应。醇沉法提取与  $\alpha$ -丙氨酸/天冬酰胺反应 8、16 h 以及 24 h 的低聚壳聚糖衍生物, 分别记为: CA-8、CA-16、CA-24、CN-8、CN-16 以及 CN-24。对衍生物进行红外表征, 并研究其对超氧阳离子  $O_2^-$ 、DPPH 自由基的清除能力以及还原能力。结果显示: 美拉德反应后低聚壳聚糖衍生物抗氧化能力得到显著提高。抗氧化能力强弱次序为 CA-8>CN-8、CA-16>CN-16、CA-24>CN-24, 即随着反应时间增加, 低聚壳聚糖与  $\alpha$ -丙氨酸美拉德反应的衍生物抗氧化性始终更强, 表明与小分子氨基酸进行美拉德反应制得的壳聚糖衍生物具有更好的抗氧化性。

**关键词:** 低聚壳聚糖,  $\alpha$ -丙氨酸, 天冬酰胺, 美拉德反应, 抗氧化性能

**中图分类号:** Q539 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)05-0531-06

## The Antioxidant Activity of the Chitosan Oligosaccharide Derivatives by Maillard Reaction Between Chitosan Oligosaccharide and $\alpha$ -alanine/Asparagine

SUN Tao<sup>1,2</sup>, ZHU Yun<sup>1</sup>, XIE Jing<sup>1</sup>, XUE Bin<sup>1</sup>, ZHOU Dongxiang<sup>1</sup>

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

**Abstract:** In this study, six kinds of the chitosan oligosaccharide derivatives, named CA-8, CA-16, CA-24, CN-8, CN-16 and CN-24 were prepared though Maillard reaction by heating chitosan oligosaccharide and  $\alpha$ -alanine/asparagine (the ratio of carbonyl group and amino group was 4:1) at different time. Then, the antioxidant activity of those derivatives was investigated with superoxide anion radical/1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and reducing power and index. The results indicated that the chitosan oligosaccharide derivatives exhibited more strong antioxidant activity than that of chitosan oligosaccharide. Furthermore, the derivatives from chitosan oligosaccharide with  $\alpha$ -alanine had the better antioxidant activity than that of the derivatives prepared by chitosan oligosaccharide and asparagine. The reason is that the derivatives prepared by chitosan oligosaccharide and amino acid with the smaller molecule had the better antioxidant activity.

收稿日期: 2011-06-27

基金项目: 上海市生物医药和农业科技领域重点科技项目(08391911500); 2009 年上海市优秀学科带头人计划(09XD1402000); 上海市教委重点学科建设项目(J50704)。

作者简介: 孙涛 (1970-), 女, 黑龙江依兰人, 理学博士, 副教授, 主要从事多糖的改性及生物功能的开发。E-mail: taosun@shou.edu.cn

**Key words:** chitosan oligosaccharide,  $\alpha$ -alanine, asparagines, Maillard reaction, antioxidant activity

美拉德反应是在食物中发生的主要反应之一,它由还原性糖、醛或酮的羰基部分和氨基酸、蛋白质或任何含氮化合物的胺基缩合产生。其产物结构复杂、种类繁多,与反应时间、温度以及参与反应的糖和氨基酸等有很大关系<sup>[1]</sup>。研究表明,氨基酸的结构和种类会影响美拉德反应产物的自由基清除能力<sup>[2]</sup>。

低聚壳聚糖可以作为羰基的供应体与氨基酸发生美拉德反应。本文研究了低聚壳聚糖与  $\alpha$ -丙氨酸和天冬酰胺的美拉德反应,制得低聚壳聚糖衍生物,考察了其对于  $O_2^{\cdot-}$ 、DPPH 的清除能力以及还原能力,为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%,脱乙酰度约为70%,凝胶色谱测定其相对分子质量为9370),购自浙江金壳生物化学有限公司;鲁米诺, DPPH, 购自 Sigma 公司;  $\alpha$ -丙氨酸, 天冬酰胺, 购自国药集团(沪试);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产品;970CRT 荧光分光光度计:南京昕航科学仪器有限公司产品;EQUINOX55 傅立叶红外-拉曼光谱仪:德国布鲁克公司产品;IFFM 2D 型流动注射化学发光分析仪:西安瑞迈科技有限公司产品。

### 1.3 低聚壳聚糖衍生物的制备

称取低聚壳聚糖 30.0 g 两份,分别加入  $\alpha$ -丙氨酸 0.6525 g/天冬酰胺 1.4516 g,使得低聚壳聚糖羰基和  $\alpha$ -丙氨酸/天冬酰胺的氨基物量比均为 4:1。用 300 mL 的二次蒸馏水溶解,在 80 °C 下回流反应,经过反复醇沉,制得与  $\alpha$ -丙氨酸/天冬酰胺反应 8、16 以及 24 h 的低聚壳聚糖衍生物,分别记为:CA-8、CA-16、CA-24、CN-8、CN-16 以及 CN-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  $cm^{-1}$ 。

### 1.5 抗氧化性能测定

**1.5.1 对超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$  的清除** 用 pH=10.20 的 0.05 mol/L  $Na_2CO_3$ - $NaHCO_3$  缓冲溶液配制浓度为  $1.5 \times 10^{-3}$  mol/L 的鲁米诺溶液,用  $1 \times 10^{-3}$  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  $1 \times 10^{-4}$  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<sup>[3]</sup>。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  $O_2^{\cdot-}$ 。

**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  $1 \times 10^{-4}$  mol/L DPPH 无水乙醇溶液,再加入不同浓度的样品溶液 2.0 mL,室温下避光静置半小时,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 =  $[1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$ <sup>[4]</sup>。

**1.5.3 还原能力的测定** pH=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,置于 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 3000 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<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 低聚壳聚糖美拉德衍生物的测试表征

Maillard 反应产物比较复杂,一般都会生成类黑精、还原酮及一系列含 N、S 的杂环化合物。低聚壳聚糖与  $\alpha$ -丙氨酸/天冬酰胺发生美拉德反应,产物经过反复醇沉,可以洗去芳香类、杂环类等一系列小分子,红外表明,醇沉所得产物具有 COS 的特

征结构,故初步认定为低聚壳聚糖衍生物。

图1是低聚壳聚糖及其衍生物(反应24 h)的红外光谱图。壳聚糖及两种衍生物在 $1100\text{ cm}^{-1}$ 附近都有3个较强的多糖特征吸收峰,分别是 $895$ 、 $1085$ 以及 $1155\text{ cm}^{-1}$ ,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<sup>[3]</sup>。低聚壳聚糖在 $1621$ 、 $1515$ 和 $1381\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸附带,分别归因于酰胺I( $\text{C}=\text{O}$ )、自由氨基( $-\text{NH}_2$ )和酰胺III<sup>[6]</sup>。且CA和CN在 $1621$ 、 $1515$ 和 $1381\text{ cm}^{-1}$ 的峰较低聚壳聚糖有所增强或降低,表明了酰胺I( $\text{C}=\text{O}$ )、自由氨基( $-\text{NH}_2$ )和酰胺III的改变<sup>[7]</sup>,即低聚壳聚糖在美拉德反应后结构发生了改变。

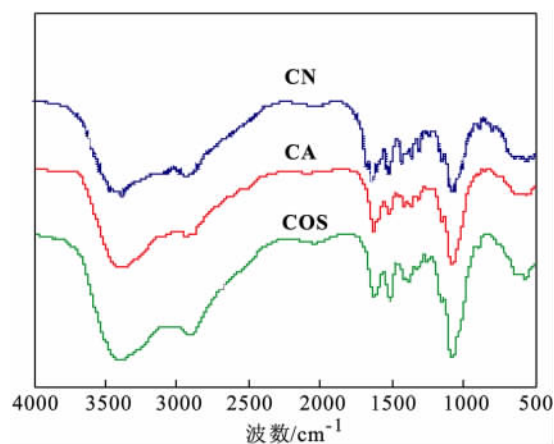


图1 低聚壳聚糖以及两种低聚壳聚糖美拉德衍生物(反应24 h)的红外图

Fig. 1 FTIR spectra of COS, CA-24 and CN-24

## 2.2 超氧阴离子自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除

超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有一定的毒副作用,由多种生物反应和光化学反应产生,它还能分解形成更强的活性氧物质,如单线态氧和羟自由基,导致脂质过氧化。邻苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化,释放出 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,生成有色的产物。当有自由基清除剂存在时,可清除 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,阻止有色产物的积累<sup>[3]</sup>。

图2、3、4描述了低聚壳聚糖及其衍生物对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除效果。六种衍生物CA-8、CA-16、CA-24、CN-8、CN-16以及CN-24对于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力均随着浓度的增加,且对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力均优于低聚壳聚糖。

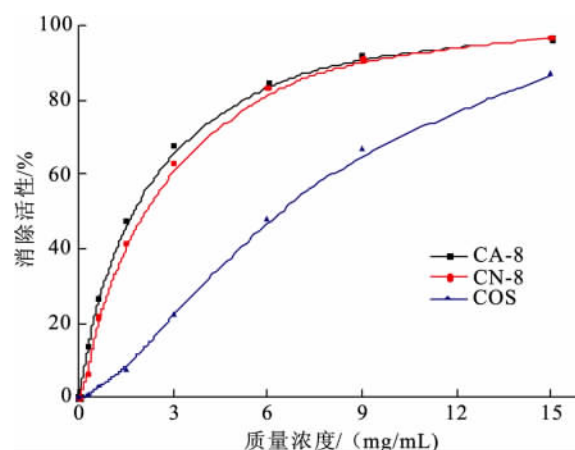


图2 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应8 h)对超氧阴离子的清除能力

Fig. 2 Scavenging activities of COS, CA-8, CN-8 on superoxide anion

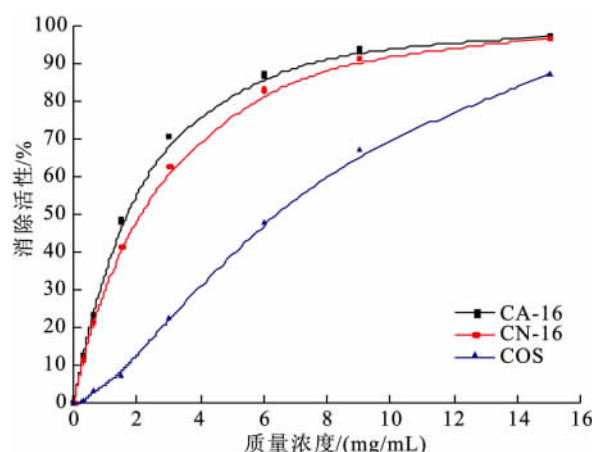


图3 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应16 h)对超氧阴离子的清除能力

Fig. 3 Scavenging activities of COS, CA-16, CN-16 on superoxide anion

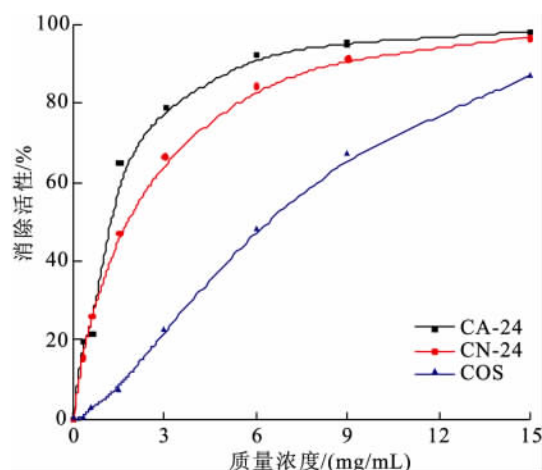


图4 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应24 h)对超氧阴离子的清除能力

Fig. 4 Scavenging activities of COS, CA-24, CN-24 on superoxide anion

研究表明,低聚壳聚糖对  $O_2^{\cdot-}$  的清除活性可能与其分子中的活性羟基和氨基有关<sup>[8]</sup>。低聚壳聚糖与  $\alpha$ -丙氨酸/天冬酰胺发生美拉德反应,纯化后得到的低聚壳聚糖衍生物 CA 与 CN,保留了低聚壳聚糖活性基团,故两种衍生物具有抗氧化活性。相比天冬酰胺,低聚壳聚糖与  $\alpha$ -丙氨酸生成的衍生物 CA 对  $O_2^{\cdot-}$  清除能力更强。这可能是由于当低聚壳聚糖的羰基与两种氨基酸的氨基物质质量比相同时, $\alpha$ -丙氨酸分子较小,易于进攻壳聚糖的羰基,可能使得衍生物具有更好的抗氧化活性。

### 2.3 对 DPPH 自由基的清除

DPPH 在有机溶剂中是一种稳定的自由基,其结构中含有 3 个苯环,氮原子上有 1 个孤对电子,其乙醇溶液呈紫色,在 517 nm 附近有强吸收。当 DPPH 溶液中加入自由基清除剂时,孤对电子被配对,吸收消失或减弱。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<sup>[4]</sup>。

由图可知,反应时间不同的 6 种低聚壳聚糖衍生物 DPP 自由基的清除能力均优于低聚壳聚糖,即抗氧化能力  $CA-8 > CN-8 > COS$ 、 $CA-16 > CN-16 > COS$ 、 $CA-24 > CN-24 > COS$ 。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<sup>[9]</sup>。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。这与对  $O_2^{\cdot-}$  的清除效果保持一致。

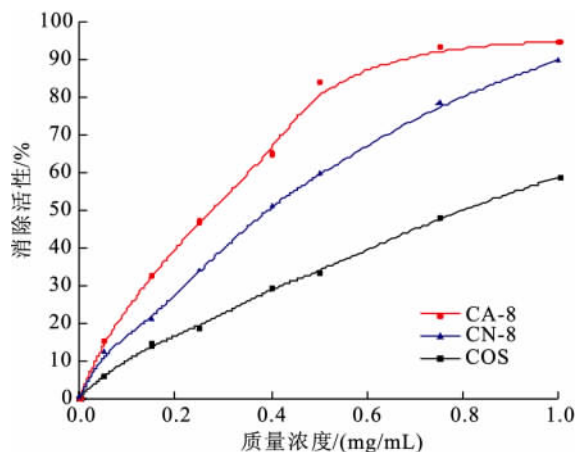


图 5 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应 8 h)对 DPPH 的清除能力

Fig. 5 Scavenging activities of COS, CA-8, CN-8 on DPPH radicals

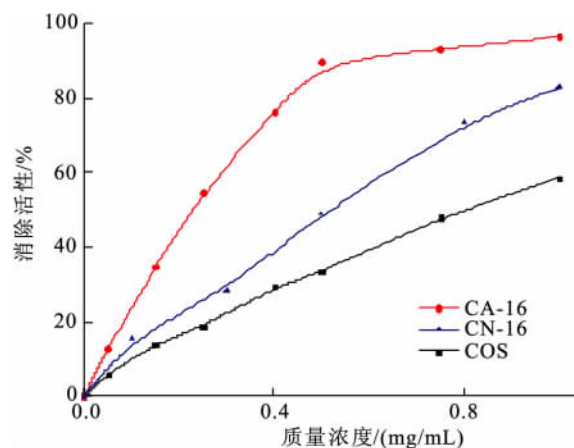


图 6 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应 16 h)对 DPPH 的清除能力

Fig. 6 Scavenging activities of COS, CA-16, CN-16 on DPPH radicals

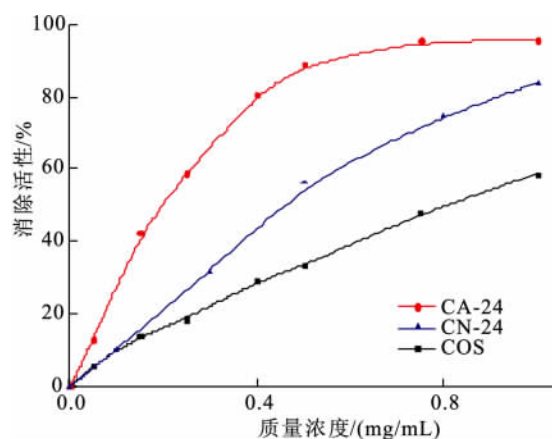


图 7 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应 24 h)对 DPPH 的清除能力

Fig. 7 Scavenging activities of COS, CA-24, CN-24 on DPPH radicals

### 2.4 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<sup>[10]</sup>。

图 8、9、10 描述了低聚壳聚糖及其衍生物对 DPPH 自由基的清除能力。由图可知,6 种低聚壳聚糖衍生物对 DPPH 自由基的清除能力均优于低聚壳聚糖,即抗氧化能力  $CA-8 > CN-8 > COS$ 、 $CA-16 > CN-16 > COS$ 、 $CA-24 > CN-24 > COS$ 。这与前面结果保持一致。

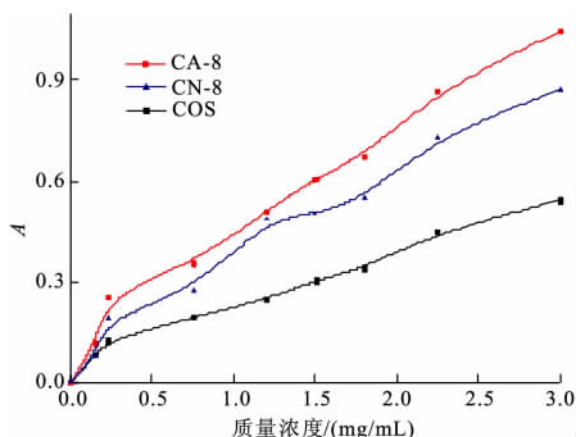


图8 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应8 h)的还原能力测定

Fig. 8 Reducing power of COS, CA-8, CN-8

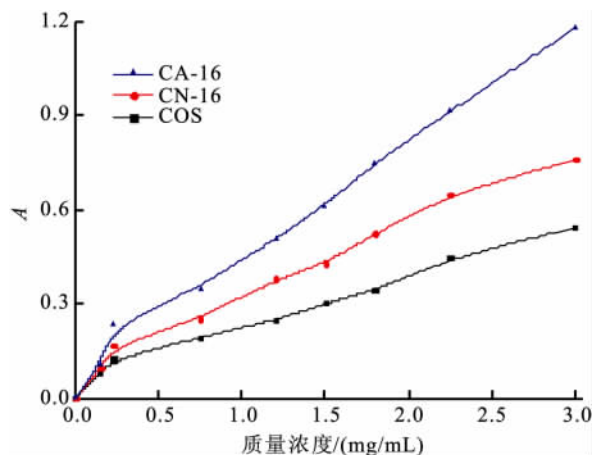


图9 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应16 h)的还原能力测定

Fig. 9 Reducing power of COS, CA-16, CN-16

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3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。

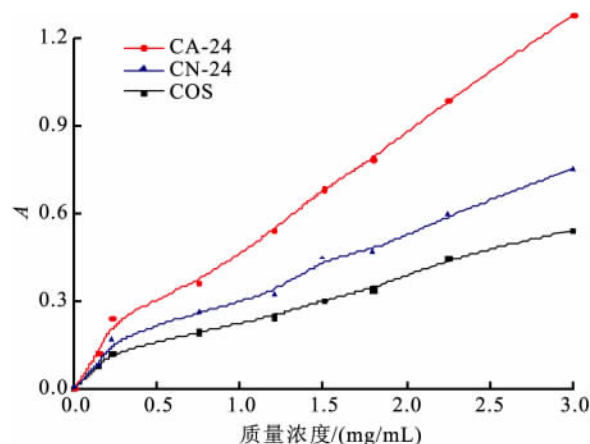


图10 低聚壳聚糖及其美拉德衍生物(反应24 h)的还原能力测定

Fig. 10 Reducing power of COS, CA-24, CN-24

### 3 结语

本实验研究了低聚壳聚糖与 $\alpha$ -丙氨酸和天冬酰胺的美拉德反应,并检测了低聚壳聚糖及其衍生物对 $O_2^{\cdot-}$ 、DPPH的清除能力以及还原能力。结果显示,6种低聚壳聚糖衍生物的抗氧化性均优于低聚壳聚糖,故可以认为美拉德反应是低聚壳聚糖改性的有效手段;随着反应时间增加,低聚壳聚糖与 $\alpha$ -丙氨酸美拉德反应的衍生物抗氧化性始终优于低聚壳聚糖与天冬酰胺美拉德反应的衍生物,这可能是由于 $\alpha$ -丙氨酸的分子较天冬酰胺小,更易于向羰基进攻发生美拉德反应,生成的衍生物抗氧化性能也更强。表明低聚壳聚糖与葡萄糖的美拉德反应是提高抗氧化性更有效的手段,其机理还有待进一步研究。本研究为制备天然、安全、高效的抗氧化剂提供了很好的思路。

### 参考文献(References):

- [1] 龚平, 阚建全. 美拉德反应产物性质的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 141-145.  
Gong Ping, Kan Jianquan. Study on the Progress of Maillard Reaction Products[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(4): 141-145. (in Chinese)
- [2] 张凌燕, 李倩, 尹姿. 3种氨基酸和葡萄糖美拉德产物的物理化学特性及抗氧化活性的研究[J]. 中国食品学报, 2008, 8(3): 12-22.  
Zhang Lingyan, Li Qian, Yin Zi. Physiochemical Properties and Antioxidant Activity of Three Glucose-amino Acid Model Maillard Reaction Products[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(3): 12-22. (in Chinese)

Chinese)

- [ 3 ] 姚倩, 孙涛, 徐轶霞. 壳聚糖/壳寡糖衍生物的制备及其抗氧化性能研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 188—191.
- YAO Qian, SUN Tao, XU Yixia. Preparation of chitosan/chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activities[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2): 188—191. ( in Chinese)
- [ 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-picrylhydrazyl[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1998, 62(6): 1201—1204.
- [ 5 ] Yen Gowchin, Chen Huiyin. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1995, 43(1): 27—32.
- [ 6 ] Qin Caiqin, Du Yumin, Xiao Ling, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2002, 31(1—3): 111—117.
- [ 7 ] Umemura K, Kawai S. Modification of chitosan by the Maillard reaction using cellulose model compounds[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2007, 68(2): 242—248.
- [ 8 ] Xie Wenming, Xu Peixin, Liu Qing. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2001, 11(13): 1699—1701.
- [ 9 ] 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.
- [10] 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.

## 科技信息

### 台湾地区增订咖啡中赭曲霉毒素 A 的限量标准

2012 年 4 月 19 日, 台澎金马特别关税区发布 G/SPS/N/TPKM/255 号通报, 修订“食品中真菌毒素限量标准”第三条, 增订了烘焙咖啡豆、咖啡粉及速溶咖啡中赭曲霉毒素 A 的限量规定为 5 ppb 以下。该通报的批准和生效日期待定, 评议截至期为 2012 年 6 月 11 日。

[信息来源] 食品伙伴网. 台湾地区增订咖啡中赭曲霉毒素 A 的限量标准[EB/OL]. (2012—4—23). <http://www.foodmate.net/news/guonei/2012/04/204440.html>

### 美国食品药品监督管理局公布纳米技术指南草案

据美国食品药品监督管理局(FDA)消息, 4 月 20 日美国 FDA 就食品与化妆品企业使用纳米技术应该注意的事项公布了 2 份行业指南草案。两份行业指南草案一份涉及食品行业, 名为《行业指南: 对重大生产过程变化后的评估, 包括新兴技术, 关于食品配料与食品接触材料的安全性与管理状况, 包括色素类食品配料》, 另一份则涉及化妆品行业, 名为《化妆品种纳米材料的安全性》。

食品行业指南草案规定, 食品生产企业在以下 4 种情况发生时, 应该考虑生产过程中的变化是否构成重大变化, 这包括: 影响到食品物质的特性; 影响到食品物质的使用安全性; 影响到食品物质的使用法规状况或; 需要提交材料报 FDA 审批。

[信息来源] 食品伙伴网. 美国食品药品监督管理局公布纳米技术指南草案[EB/OL]. (2012—4—21). <http://www.foodmate.net/news/yujing/2012/04/204327.html>