

文章编号: 1673-1689(2011)04-0556-05

低聚壳聚糖与葡萄糖和麦芽糖的美拉德反应 及其衍生物的抗氧化性能

孙涛, 陈春红, 谢晶, 梁齐

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

摘要: 低聚壳聚糖(COS)作为氨基供体分别与提供羰基的葡萄糖和麦芽糖进行美拉德反应(氨基与羰基的物质质量比均为 3:1),考察了反应过程中吸光度和荧光值的变化。醇沉法提取低聚壳聚糖美拉德反应衍生物 CG 和 CM。对两种衍生物进行红外表征和相对分子质量测定,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:抗氧化能力强弱次序为 $CG > CM > COS$,即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,且 CG 的抗氧化活性优于 CM,表明与单糖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; 美拉德反应; 葡萄糖; 麦芽糖; 抗氧化性

中图分类号: R 284; Q 539; TS 202.3

文献标识码: A

Maillard Reaction between Chitosan Oligosaccharide and Glucose/ Maltose and the Antioxidant Activity of the Derivatives

SUN Tao, CHEN Chun-hong, XIE Jing, LIANG Qi

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Maillard reaction was occurred by heating chitosan oligosaccharide (COS) with glucose and maltose separately (the ratio of $-NH_2$ and $-OH$ was 3:1). The absorbance and fluorescence were determined during the reaction. Two kinds of chitosan oligosaccharide derivatives were extracted, named CG and CM. Chitosan oligosaccharide derivatives were characterized by FTIR and their molecular weight was determined by GPC. Their antioxidant activity was investigated by employing various established in vitro systems, such as superoxide/ $1,1$ -diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging and reducing power. The results showed two kinds of the chitosan oligosaccharide derivatives showed strong antioxidant activity compared with chitosan oligosaccharide. The antioxidant activity was found to be in the order of $CG > CM > COS$, which indicated that the derivatives prepared by monosaccharide had the better antioxidant activity.

Key words: chitosan oligosaccharide, Maillard reaction, glucose, maltose, antioxidant activity

收稿日期: 2010-06-04

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, 工学博士, 副教授, 主要从事多糖改性及生物功能研究。

Email: taosun@shou.edu.cn

美拉德反应是多指发生在食品加工和贮存过程中还原糖的羰基与蛋白质、氨基酸及一些含氮化合物的氨基产生的一系列复杂反应的集合,在反应过程中也会产生一些小分子化合物,如色素和荧光物质,使得体系的光吸收特征(包括紫外和可见)及荧光特征增强。美拉德产物具有一定的抗氧化性能,其中某些物质的抗氧化活性可以与食品中常用的抗氧化剂相媲美^[1]。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^[2]。糖的结构和种类会影响美拉德反应发生的速率,一般而言,单糖的反应速度要大于双糖^[3]。

低聚壳聚糖的抗氧化作用日益受到广泛关注,由于含有大量游离氨基,壳聚糖可以作为氨基的供应体与还原糖发生美拉德反应。还原糖中,单糖和双糖易于发生美拉德反应,但美拉德产物的性质有所差别^[4]。作者以美拉德反应作为低聚壳聚糖改性的手段,分别与葡萄糖和麦芽糖反应,制得低聚壳聚糖衍生物,考察了两种衍生物对 $O_2^{\cdot-}$ 、DPPH的清除能力以及还原能力,为低聚壳聚糖的改性和天然高效抗氧化剂的开发提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

低聚壳聚糖: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: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;970CRT荧光分光光度计;EQUNOX55傅立叶红外-拉曼光谱仪;Waters 515型凝胶色谱仪;IFFM 2D型流动注射化学发光分析仪。

1.3 低聚壳聚糖衍生物的制备

称取壳聚糖20.0 g两份,分别加入葡萄糖和麦芽糖各6.67 g,使得壳聚糖氨基和葡萄糖以及麦芽糖的羰基物量比为3:1。用200 mL的二次蒸馏水溶解,在80℃下回流反应,考察反应过程中吸光度以及荧光值的变化。反应8 h后,产物经多次醇纯,直至检测产物中无葡萄糖和麦芽糖的存在,烘干得壳聚糖衍生物CG和CM。

1.4 测试表征

红外光谱在EQUNOX55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500~4 000 cm^{-1} ,分辨率为0.8 cm^{-1} 。

产物的相对平均分子质量及其分布采用GPC法测定。GPC测试条件如下:流动相:0.1 mol/L 硝酸钠水溶液;监测器:Waters 2410示差折光监测器;柱子:Ultrahyrogel 500,120 串连;温度:40℃;标准物质为:葡聚糖。

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 浓度为 1.5×10^{-3} mol/L的鲁米诺溶液用pH=10.20的0.05 mol/L Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 缓冲溶液配制,浓度为0.1 mol/L的邻苯三酚储备液用 1×10^{-3} mol/L的盐酸配制,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^[5]。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 在装有2.0 mL的浓度为 1×10^{-4} mol/L DPPH无水乙醇溶液的比色管中,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 ^[6]。

清除率= $(1 - (A_i - A_j)/A_0) \times 100\%$ 。

1.5.3 还原能力的测定 还原能力根据文献[7]测定并稍做改进。取2.0 mL不同浓度的样品,加入pH=6.60的0.2 mol/L磷酸缓冲液和质量分数1%铁氰化钾溶液各2.5 mL,混匀,50℃水浴20 min后迅速冷却,加入2.5 mL体积分数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质量分数0.1%的三氯化铁溶液,静置10 min后在700 nm处测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 吸光度的变化

图1和2描述了低聚壳聚糖分别与葡萄糖、麦芽糖反应过程中的紫外-可见吸收光谱图。由图可知,在278 nm处吸收峰有明显增加,表明有新的物质生成并不断积累,且与葡萄糖反应的体系增幅较大,表明该体系物质积累较快。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。羟甲基糠醛是美拉德反应的标示物,在280 nm左右存在特征吸收峰^[8]。

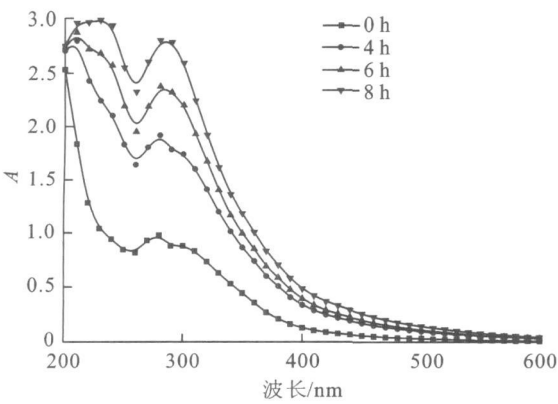


图 1 低聚壳聚糖与葡萄糖美拉德反应过程中吸光度的变化

Fig. 1 UV-Vis absorbance of Maillard reaction with glucose

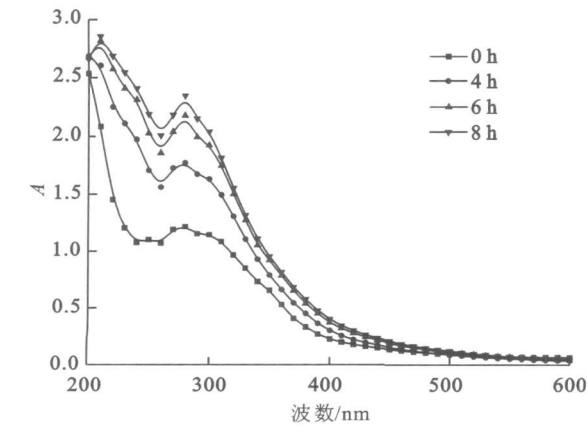


图 2 低聚壳聚糖与麦芽糖美拉德反应过程中吸光度的变化

Fig. 2 UV-Vis absorbance of Maillard reaction with maltose

2 2 荧光值的变化

图 3 和 4 描述的是在美拉德反应过程中, 两种体系在 343 nm 的激发波长和 435 nm 发射波长下测得的荧光值变化趋势。随着反应的进行, 体系的荧光强度明显增高, 这表明具有荧光性质的美拉德产物的产生和积累, 且与葡萄糖反应的体系在反应前期荧光值增幅较大, 表明该物质积累较快。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^[9], 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^[10]。

2 3 低聚壳聚糖衍生物的测试表征

图 5 是低聚壳聚糖及其衍生物(CG 与 CM) 的红外光谱图。壳聚糖及两种衍生物在 1 100 cm⁻¹ 附近都有 3 个较强的多糖特征吸收峰, 分别是 1 037

cm⁻¹、1 085 cm⁻¹、1 155 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^[11]。壳低聚糖在 1 622、1 516 和 1 381 cm⁻¹ 附近的吸附带, 分别归因于酰胺 I (C=O)、自由氨基(-NH₂) 和酰胺 III^[12]。图中显示低聚壳聚糖美拉德衍生物在 1516 cm⁻¹ 的峰较低聚壳聚糖有明显降低, 表明了自由氨基的减少; 同时, 在 1155 和 896 cm⁻¹ 处的吸收峰, 分别归因于 G-O 伸缩振动和 β-D-氨基葡萄糖结构, 当加入葡萄糖进行美拉德反应后, 该处吸收峰渐渐降低, 表明壳聚糖的糖单元发生了变化^[4]。

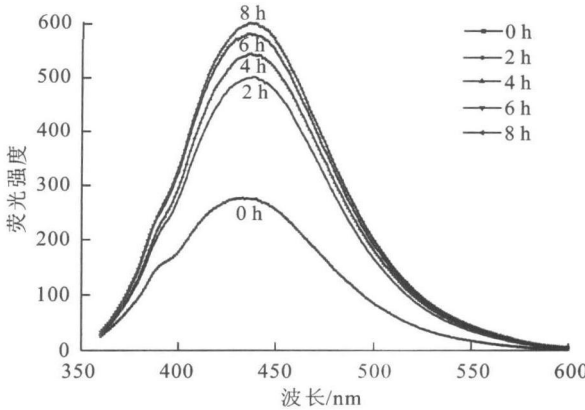


图 3 低聚壳聚糖与葡萄糖美拉德反应的过程中荧光值的变化

Fig. 3 Fluorescence absorbance of Maillard reaction with glucose

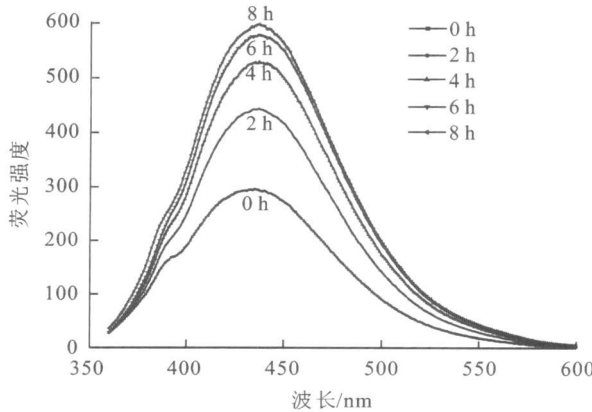


图 4 低聚壳聚糖与麦芽糖美拉德反应的过程中荧光值的变化

Fig. 4 Fluorescence absorbance of Maillard reaction with maltose

采用 GPC 法, 测得样品低聚壳聚糖的相对分子质量为 8 190, 低聚壳聚糖衍生物 CG 和 CM 的相对分子质量分别为 11 800 和 9 880。美拉德衍生物的相对分子质量较低聚壳聚糖都有所增加, 表明壳低聚糖分子中的游离氨基酸和还原糖基团相互反应形成了更大的分子。

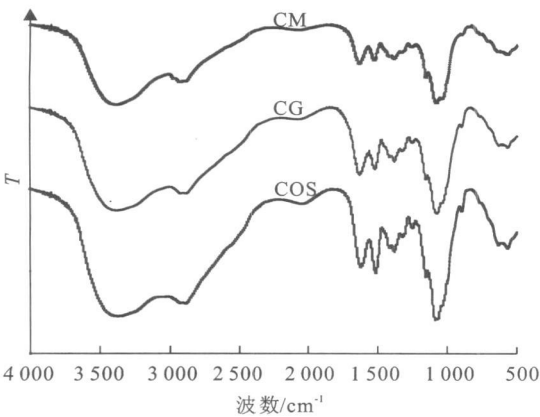


图 5 低聚壳聚糖及 3 种低聚壳聚糖美拉德衍生物的红外光谱图

Fig. 5 FTIR spectra of COS, CG and CM

2.4 超氧阴离子自由基 O₂^{·-} 清除

图 6 描述了低聚壳聚糖及其衍生物对 O₂^{·-} 的清除效果。两种衍生物 CG 和 CM 对于 O₂^{·-} 的清除能力均随着浓度的增加, 其 IC₅₀ (对自由基清除率为 50% 时所需要的自由基清除剂浓度) 分别为 0.077 和 0.092 mmol/L, 而低聚壳聚糖的 IC₅₀ 为 0.196 mmol/L, 可见两种衍生物对 O₂^{·-} 的清除能力优于低聚壳聚糖, 且 CG 的清除能力优于 CM。研究表明, 低聚壳聚糖对 O₂^{·-} 的清除活性可能与其分子中的活性羟基和氨基有关^[13], 低聚壳聚糖作为氨基的供体与提供羰基的葡萄糖和麦芽糖发生美拉德反应, 与低聚壳聚糖相比, 其活性氨基含量下降, 但其衍生物对 O₂^{·-} 的清除能力有所提升。相比麦芽糖, 低聚壳聚糖与葡萄糖生成的衍生物对 O₂^{·-} 清除能力更强, 这可能是由于低聚壳聚糖是大分子物质, 分子链较长, 当壳聚糖的氨基与两种糖的羰基物质质量比相同时, 葡萄糖作为单糖, 分子较小, 易于进攻壳聚糖的羰基, 使得衍生物具有更好的抗氧化活性。

2.5 对 DPPH 自由基的清除

图 7 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, CG、CM 和 COS 的 IC₅₀ 分别为 0.026、0.051 以及 0.144 mmol/L, 即抗氧化能力 CG > CM > COS。这一结果同样与对 O₂^{·-} 的清除结果相仿。

2.6 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, 阻断了 Fe²⁺ 向 Fe³⁺ 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^[14]。如图 8 所示, 在浓度为 0.20 mmol/L 时, COS、CG 和 CM 的吸光度分别为 0.328、0.865 和 0.625, 还原

能力强弱顺序为 CG > CM > COS, 这与前面的结果保持一致。

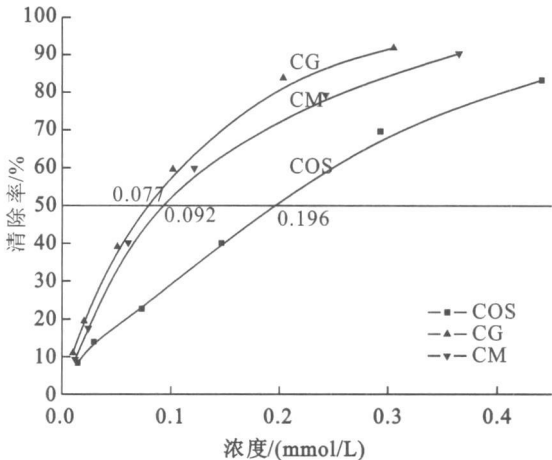


图 6 低聚壳聚糖及两种美拉德衍生物对 O₂^{·-} 的清除能力

Fig. 6 Scavenging activity of COS, CG and CM on superoxide radicals

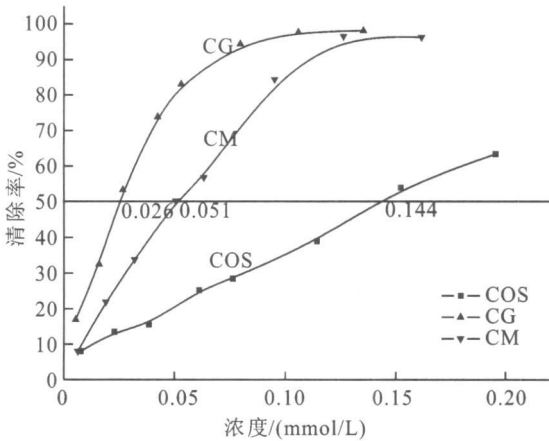


图 7 低聚壳聚糖及两种美拉德衍生物对 DPPH 的清除能力

Fig. 7 Scavenging activity of COS, CG and CM on DPPH radicals

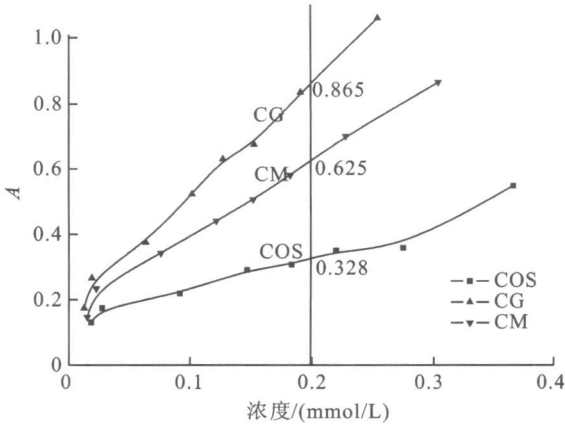


图 8 低聚壳聚糖及两种美拉德衍生物的还原能力

Fig. 8 Reducing power of COS, CG and CM

3 结 语

作者以美拉德反应为低聚壳聚糖的改性手段,分别与葡萄糖和麦芽糖反应来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 $O_2^{\cdot-}$ 、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,故可以认为美拉德反应是低聚壳聚糖改性的有效手段;低聚壳聚糖

与葡萄糖美拉德反应的衍生物抗氧化性更强,这可能是由于单糖的分子较双糖小,更易于向氨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一定的参考依据。

参考文献(References):

- [1] Wagner K H, Derkits S, Herr M, et al. Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model[J]. **Food Chem**, 2002, 78: 375– 382.
- [2] 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 Jian-quan. Study on the progress of maillard reaction products[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2009, 35(4): 141– 145. (in Chinese)
- [3] 付莉, 李铁刚. 简述美拉德反应[J]. 食品科技, 2006, 12: 9– 11.
FU Li, LI Tie-gang. Reviews on maillard reaction[J]. **Food Science**, 2006, 12: 9– 11. (in Chinese)
- [4] Umemura K, Kawai S. Modification of chitosan by the Maillard reaction using cellulose model compounds[J]. **Carbohydr Polym**, 2007, 68: 242– 248.
- [5] 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: 530– 533.
YAO Qian, SUN Tao, XU Yi-xia. Preparation of chitosan oligosaccharide derivatives and their antioxidant activity[J]. **Natural Product Research and Development**, 2008, 20: 530– 533. (in Chinese)
- [6] 许钢. 红薯中黄酮提取及抗氧化研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 22– 27.
XU Gang. Studies on the extracting and antioxidant activities of flavonoids in sweet potatoes[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(4): 22– 27. (in Chinese)
- [7] Yen G C, Chen H Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. **J Agric Food Chem**, 1995, 43: 27– 32.
- [8] Moralew F J, Romero C, Jimenez-perez S. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation[J]. **J Agric Food chem**, 1997, 45: 1570– 1573.
- [9] Silvia B, Matiacevich M, Pilar B. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction[J]. **Food Chemistry**, 2006, 95: 423– 430.
- [10] 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 Chem**, 2007, 100: 669– 677.
- [11] 银旭红, 孙涛, 姚倩, 等. 低聚壳聚糖 Zn(II) 配合物清除 DPPH 活性的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 329– 331.
YIN Xu-hong, SUN Tao, YAO Qian, et al. DPPH scavenging activity of chitosan oligosaccharide zinc complexes[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3): 329– 331. (in Chinese)
- [12] QIN Cai-qin, DU Yi-min, XIAO Ling, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity[J]. **Int J Biol Macromol**, 2002, 31: 111– 117.
- [13] XIE Wen-ming, XU Pei-xin, LIU Qing. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives[J]. **Bioorg Med Chem Lett**, 2001, 11: 1699– 1701.
- [14] Jing H, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of casein sugar Maillard reaction products[J]. **Food Chem Toxicol**, 2002, 40: 1007– 1015.