

利用电子自旋共振技术研究黄海海燕体壁多糖 的体外抗氧化活性

Study on in vitro antioxidant activity of starfish *Asterina pectinifera*
bodywall polysaccharide using electron spin

刘 山^{1,2} 李 楠^{1,2} 傅 卉^{1,2} 许 喆¹ 常思佳¹
LIU Shan^{1,2} LI Nan^{1,2} FU Hui^{1,2} XU Zhe¹ CHANG Si-jia¹
秦 磊^{1,2} 董秀萍^{1,2} 启 航^{1,2}
QIN Lei^{1,2} DONG Xiu-ping^{1,2} QI Hang^{1,2}

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁 大连 116034; 2. 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁 大连 116034)

(1. Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China;

2. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian, Liaoning 116034, China)

摘要:以新鲜黄海海燕体壁为原料,制备粗多糖及精多糖。采用电子自旋共振波谱技术(ESR),检测不同浓度的黄海海燕体壁粗多糖及精多糖对羟基自由基、DPPH 和超氧阴离子的清除能力。结果表明:黄海海燕体壁粗多糖及精多糖对羟基自由基、DPPH 和超氧阴离子的清除能力随浓度升高而增强,黄海海燕体壁粗多糖对 3 种自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 59.56, 27.29, 32.36 mg/mL; 精多糖对 3 种自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 44.96, 13.97, 30.51 mg/mL。在相同多糖干粉浓度下,黄海海燕体壁精多糖对羟基自由基、DPPH 和超氧阴离子的清除能力强于黄海海燕体壁粗多糖。
关键词: 黄海海燕; 多糖; 自由基; 抗氧化活性; 电子自旋共振波谱技术

Abstract: The raw polysaccharide and refined polysaccharide were prepared from the body wall of fresh starfish *Asterina pectinifera*. The scavenging capacity of the raw polysaccharide and refined polysaccharide on hydroxyl radical, DPPH radical and superoxide anion were detected using electron spin resonance (ESR). The result indicated that the polysaccharide from the body wall of fresh starfish *A-*

sterina pectinifera possessed a certain scavenging capacity. And this scavenging capacity was enhanced with concentration rising. The IC_{50} values of three radical scavenging activities of raw polysaccharide were 59.56, 27.29, 32.36 mg/mL and the IC_{50} values of three radical scavenging activities of refined polysaccharide are 44.96, 13.97, 30.51 mg/mL. At the same concentration of polysaccharide powder, the scavenging capacities of refined polysaccharide were stronger than the raw polysaccharide for hydroxyl radical, DPPH and superoxide anion scavenging abilities.

Keywords: *Asterina pectinifera*; polysaccharide; free radical; antioxidant activity; electron spin resonance

黄海海燕(*Asterina pectinifera*)俗称海星,属于棘皮动物门,黄海海燕纲,是海洋中常见的无脊椎动物之一^[1]。在中国沿海,海星蕴藏量比较丰富,其种类多达 100 余种,广泛分布在东海、南海、黄渤海、台湾近海等各大海域^[2]。海星是凶猛的肉食动物,以鲍鱼、扇贝、海胆等海珍品为食,对沿海养殖造成极大危害。但同时海星作为海产废弃物加工再利用的相关研究越来越引起人们的广泛关注。

海星含有的活性物质主要为皂苷、脂类、甾醇类化合物、多糖和胶原蛋白等。海星体壁的酸性粘多糖与哺乳动物结缔组织中的酸性粘多糖相比,除了含有氨基己糖、己糖醛酸和硫酸基外,还含有岩藻糖^[3]。相关研究表明,海星体壁酸性粘多糖具有增强免疫力^[4]、抗凝血^[5]、抗血栓^[6]、降血脂^[7]、降血糖等作用。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(编号:2014AA093602); 辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划(编号:2014001); 国家海洋食品工程技术研究中心立项建设项目(编号:2012FU125X03)

作者简介: 刘山(1990—),男,大连工业大学在读硕士研究生。
E-mail: dlpuls@126.com

通讯作者: 启航
收稿日期: 2015-03-19

多糖具有较好的抗氧化活性。Zhu Bei-wei 等^[8]从鲍鱼性腺中提取硫酸多糖,试验研究表明鲍鱼性腺硫酸多糖具有显著的清除羟基自由基能力。Huang Gang-liang 等^[9]提取黄瓜多糖,试验研究表明黄瓜多糖对超氧阴离子具有很强的清除作用。Yang Meng-tao 等^[10]制备纳米硒牡蛎多糖,试验研究表明纳米硒牡蛎多糖是一种有效的羟基自由基和 DPPH 自由基清除剂。

电子自旋共振技术(electron spin resonance, ESR)又称电子顺磁共振,是在磁场中测量未成对电子^[11],可以探测和识别具有未成对电子的分子,是检测自由基最直接有效的方法^[12],其检测灵敏度高,样品消耗量小,效率高,ESR 是近年来在食品领域新兴的一种检测技术^[13],在黄海燕酸性粘多糖抗氧化研究方面的应用未见报道。本研究拟以新鲜黄海燕体壁为原料分别制备黄海燕粗多糖和精多糖,并应用 ESR 分别检测两种多糖对羟基自由基、DPPH 和超氧阴离子的体外清除作用,以期拓展 ESR 在水产品加工贮藏及生理活性物质领域的应用,旨在为开发具有抗氧化功能的水产食品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黄海燕:大连太平洋海珍品有限公司;
DPPH、嘌呤氧化酶:美国 Sigma-Aldrich 公司;
次黄嘌呤、EDTA-2Na:生工生物工程(上海)股份有限公司;
二甲基吡咯啉氮氧化物(DMPO)、二乙胺三胺五乙酸(DETAPAC):阿拉丁试剂(上海)有限公司;
其余试剂:分析纯,市售。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:AL204 型,赛多利斯科学仪器有限公司;
磁力搅拌机:90-3 型,上海振荣科技仪器有限公司;
台式低速离心机:L550 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;
真空冷冻干燥机:ZKBTES-55 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;
数控超声波清洗器:KQ-250DE 型,昆山市超声仪器有限公司;
紫外可见分光光度计:UV-5200 型,北京普析通用仪器有限责任公司;
漩涡混合器:XW-80 型,上海精科实业有限公司;
荧光酶标仪:M200 型,瑞士 Tecan 公司;
数显恒温水浴锅:HH-4 型,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;
电子顺磁共振波谱仪:A200 型,德国 Bruker Opertics 公司。

1.2 方法

1.2.1 黄海燕体壁粗多糖及精多糖的制备 将黄海燕体壁与内脏分离,冻干体壁,粉碎,过 200 目筛得到体壁干粉。按 1 : 4 (*m* : *V*)的比例加入 0.1 mol/L 的 NaBH₄ 与 NaOH 的混合溶液,于 60 ℃ 搅拌过夜。冷却搅拌过夜后的液体,加三氯乙酸将 pH 值调至 4.0,于 4 000 r/min 离心 15 min;离心后取上清液,调节其 pH 值为 7.0,加入 1 mg 的中性蛋白酶,于 50 ℃ 搅拌过夜;将搅拌过夜后的溶液冷却,于 4 000 r/min 离心 15 min。取上清液加入其体积 1/8 浓度为 5% 的双氧水,于 55 ℃ 条件下保温脱色,直至溶液变为淡黄色;加入 4 倍体积的 95% 乙醇,于 4 ℃ 的层析柜中醇沉,4 000 r/min 离心 15 min。取沉淀溶于适量水中,60 ℃ 水浴加热,使其充分溶解,冻干,得到黄海燕体壁粗多糖。

将黄海燕体壁粗多糖提取液的 pH 值调节至 7.0,加入 0.5 mg 的中性蛋白酶,于 50 ℃ 搅拌过夜。用三氯乙酸调节使 pH 值为 4.0,于 4 000 r/min 离心 15 min。取上清液,加入 4 倍体积 95% 的乙醇,于 4 ℃ 的层析柜中进行醇沉,10 000 r/min 离心 15 min。离心后的沉淀依次用乙醇、丙酮进行洗涤。将洗涤后的固体冷冻干燥,即得到黄海燕体壁精多糖。

1.2.2 多糖含量的测定 采用苯酚—硫酸法^[14],以干基计算。

1.2.3 清除羟基自由基活性的测定 参照文献[13]。

1.2.4 清除 DPPH 自由基活性的测定 参照文献[13]。

1.2.5 清除超氧阴离子活性的测定 参照文献[13]。

1.2.6 统计分析方法 用 SPSS 软件对数据进行统计分析,使用单向方差分析。

2 结果与分析

2.1 粗多糖和精多糖的含量

黄海燕体壁粗多糖经过 2 次酶解、除蛋白、乙醇醇沉等一系列方法纯化后,得到黄海燕精多糖。苯酚硫酸法测得黄海燕体壁粗多糖和精多糖的含量分别为 5.21%, 7.50%。

2.2 对羟基自由基的清除作用

由图 1 可知,ESR 检测到典型的峰高为 1 : 2 : 2 : 1 的加合物特征峰。羟基自由基的 ESR 信号强度(峰高)随着浓度的增大而减小,表明黄海燕体壁粗多糖和精多糖对羟基自由基的清除效果显著增强($P < 0.05$)。在 20 mg/mL 浓度时,精多糖对羟基自由基的清除率为 40.20%,远高于粗多糖的清除率(7.98%)。黄海燕体壁粗多糖和精多糖对羟基自由基清除能力的 IC_{50} 值分别为 59.56, 44.96 mg/mL。按糖含量计,黄海燕体壁粗多糖和精多糖清除羟基自由基的 IC_{50} 分别为 3.10, 3.37 mg/mL,略强于 Jiang Chang-xing 等^[15]报道的青蛤多糖羟基自由的清除活性($IC_{50} = 4.00$ mg/mL)。

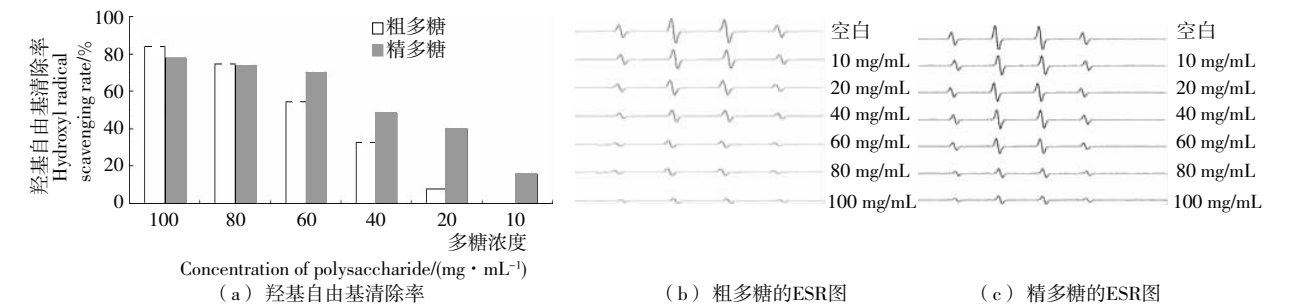


图 1 黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖对羟基自由基的清除作用

Figure 1 The scavenging effect of raw and refined polysaccharide of *Asterina pectinifera* body walls on hydroxyl radical

2.3 对 DPPH 的清除作用

由图 2 可知,黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖都具有一定清除 DPPH 的作用,随着浓度的升高,峰高逐渐降低,清除作用增大($P<0.05$)。对于相同浓度的黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖,精多糖对 DPPH 的清除能力大于粗多糖,在 20 mg/mL 浓度时,清除率分别为 56.98%,39.88%。黄海水域刺参体壁粗多

糖和精多糖对 DPPH 清除能力的 IC_{50} 值分别为 27.29, 13.97 mg/mL。按糖含量计,黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 1.42,1.05 mg/mL。其清除 DPPH 自由基的活性优于文献[16]($IC_{50}=2.00$ mg/mL)和文献[17]($IC_{50}=3.11$ mg/mL)报道的海参多糖的 DPPH 清除活性。

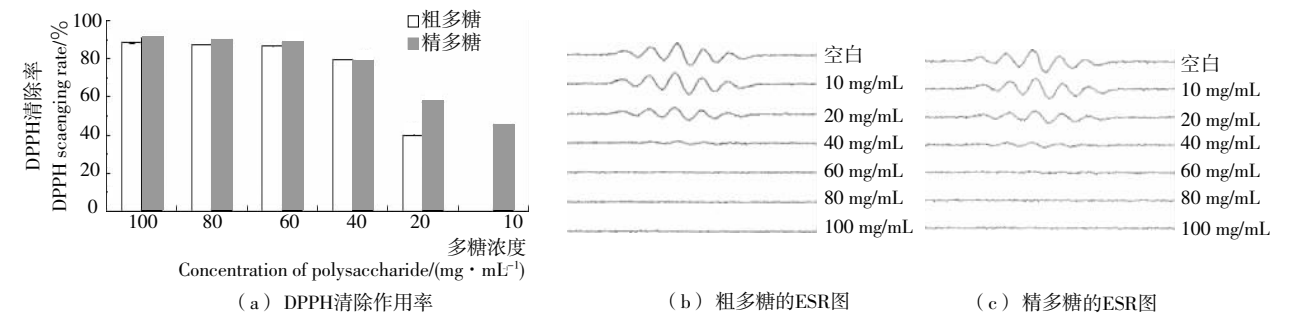


图 2 黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖对 DPPH 的清除作用

Figure 2 The scavenging effect of raw and refined polysaccharide of *Asterina pectinifera* body walls on DPPH

2.4 对超氧阴离子的清除作用

由图 3 可知,随着浓度的升高,ESR 信号强度递减,说明清除超氧阴离子的能力逐渐增强,各浓度间差异显著($P<0.05$)。在 20 mg/mL 浓度时,黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖对超氧阴离子清除率分别为 37.72%,44.27%。黄海

水域刺参体壁粗多糖和精多糖对超氧阴离子清除能力的 IC_{50} 值分别为 32.36,30.51 mg/mL。按纯糖含量计,黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖清除超氧阴离子的 IC_{50} 为 1.68,2.29 mg/mL,其对超氧阴离子的清除活性强于 Liu Xin 等[17]报道的海参多糖清除超氧阴离子的活性($IC_{50}=4.05$ mg/mL)。

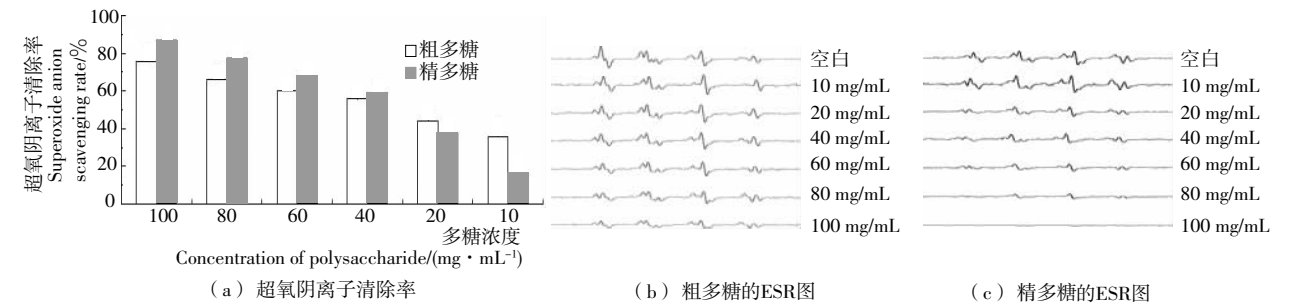


图 3 黄海水域刺参体壁粗多糖和精多糖对超氧阴离子的清除作用

Figure 3 The scavenging effect of raw and refined polysaccharide of *Asterina pectinifera* body walls on superoxide anion

3 结论

刺参体壁精多糖较粗多糖有更好的清除活性,说明黄海水域刺参体壁多糖是很好的抗氧化物质。并且 ESR 是研究体外抗氧化活性的一种重要的分析手段。下一步将对黄海水域

刺参体壁多糖的体内抗氧化活性进行研究。

参考文献

1 李海芳,陈瑶,杨梦甦,等. 棘皮动物天然产物的研究进展[J]. 中国海洋药物,2008, 27(4): 52~59.

2 刘伟,廖玉麟,李新正. 中国海砂海星科(棘皮动物门,海星纲)种类记述[J]. 动物分类学报,2007, 32(1): 234~240.

3 李八方. 海洋保健食品[M]. 北京:化学工业出版社,2008: 41~42.

4 Wei Jian-teng, Wang Shu-xian, Liu Ge, et al. Polysaccharides from Enteromorpha prolifera enhance the immunity of normal mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2014 (64): 1~5.

5 Matsuihiro B, Osorio-Román I O. Torres R. Vibrational spectroscopy characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from sea cucumber *Athyonidium chilensis*[J]. Carbohydrate Polymers,2012, 88(3): 959~965.

6 Chen Shi-guo, Hu Ya-qin, Ye Xin-qian, et al. Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badi-onotus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects,2012, 1 820(7): 989~1 000.

7 Liu Hsi-hsien, Ko Wen-ching, Hu Miao-lin. Hypolipidemic effect of glycosaminoglycans from the sea cucumber *Metriatyla scabra* in rats fed a cholesterol-supplemented diet[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2002, 50(12): 3 602~3 606.

8 Zhu Bei-wei, Wang Li-sha, Zhou Da-yong, et al. Antioxidant activity of sulphated polysaccharide conjugates from abalone (*Haliotis discus hanmai* Ino)[J]. European Food Research and Technology,2008, 227(6): 1 663~1 668.

9 Huang Gang-liang, Cheng Fei, Ding Xiang. Extraction and deproteinization of cucumber polysaccharide with high scavenging ability toward superoxide anion[J]. African Journal of Biotechnol-

ogy,2012, 11(40): 9 649~9 653.

10 Yang Meng-tao, Li Feng, Wang Yu-chao, et al. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of oyster polysaccharides and the antioxidant activity[J]. Applied Mechanics and Materials,2014, 524: 1 143~1 146.

11 赵保路. 电子自旋共振技术在生物和医学中的应用[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,2009:58~59.

12 Falch E, Velasco J, Aursand M, et al. Detection of radical development by ESR spectroscopy techniques for assessment of oxidative susceptibility of fish oils[J]. European Food Research and Technology,2005, 221(5): 667~674.

13 奚倩,赵雅婷,张警予,等. 利用电子自旋共振技术研究海参提取液体外抗氧化活性[J]. 食品与机械,2014,30(5): 36~40.

14 余洋定,启航,李冬梅,等. 果胶酶辅助提取裙带菜孢子叶多糖的工艺条件优化[J]. 食品与机械,2012, 28(1): 175~177.

15 Jiang Chang-xing, Xiong Qing-ping, Gan Dan, et al. Antioxidant activity and potential hepatoprotective effect of polysaccharides from *Cyclina sinensis*[J]. Carbohydrate Polymers,2013, 91(1): 262~268.

16 Zhang Wen-jing, Wang Jing, Jin Wei-hua, et al. The antioxidant activities and neuroprotective effect of polysaccharides from the starfish *Asterias rollestoni*[J]. Carbohydr Polym,2013, 95(1): 9~15.

17 Liu Xin, Sun Zhen-liang, Zhang Mian-song, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1 664~1 670.

(上接第 151 页)

示体系,通过混合指示剂的颜色可清晰准确地鉴别。羊肉为一级鲜肉时,混合指示剂的 pH 大于 7. 50,颜色为紫色、蓝色、青绿色;羊肉为二级鲜肉时,混合指示剂介于 7. 50~6. 80,颜色为淡绿色、黄绿色;羊肉为腐败肉时,混合指示剂的 pH 小于 6. 80,颜色为黄色、浅黄色。

参考文献

1 Kalae P,Krizek M,Pelikanova T,et al. Contents of poly-amines in selected foods[J]. Food Chemistry,2005,90(4):561~564.

2 石亚中,伍亚华,许晖,等. 竹叶黄酮与 V_c、V_E复配对冷却猪肉品质的影响[J]. 食品与机械,2013,29(1):180~183.

3 刘骁,谢晶,林永艳,等. 复合生物保鲜剂对猪肉保鲜的研究[J]. 食品与机械,2011,27(6): 199~203.

4 Bobelyn E, Hertog M, Nicolaim. Applicability of an enzymatic time temperature integrator as a quality indicator for mushrooms in the distribution chain[J]. Postharvest Biology and Technology,2006,42(1): 104~114.

5 王晓原,李军. GM(1,1)模型在区域物流规模预测中的应用[J]. 武汉理工大学学报(交通科学与工程版),2005,29(3):613~615.

6 Rodriguez N, Zaritzky N E. Development of a time-temperature integrator indicator for frozen beef[J]. Food Sci. , 1983,48(5): 1 526~1 531.

7 Wells J H, Singh R P, Noble A C. A graphical interpretation of time-temperature related quality changes in frozen food[J]. Food Sic. ,1987,52(2): 436~439.

8 吴丹. 碱性脂肪酶货架寿命指示体系的开发[D]. 杭州:浙江大学, 2005.

9 宁鹏,费英,徐幸莲,等. 碱性脂肪酶性时间-温度指示卡反应体系的研究[J]. 南京农业大学学报,2009,32(1):115~120.

10 郭素娟,卢士玲,李开雄,等. 基于 TTI 的冷鲜羊肉新鲜度研究[J]. 食品工业科技,2014,35(13):112~116.

11 George Petee Wachtell. Time temperature integrating indicator device and method: US,3965741[P]. 1976—06—29.

12 Ronald J Veitch, Helmut Jakusch, Peter Heilmann. Temperature indicator for deep frozen products: US, 5490476 [P]. 1996—02—13.

13 Sigmund Hoffman. Frozen food thawing indicator: US, 2553369 [P]. 1948—11—16.

14 杨华,娄永红. 国产碱性脂肪酶的测定方法和特性研究[J]. 中国食品学报,2006,6(3): 138~142.

15 秦瑞升,谷雪莲,刘宝林. 不同贮藏温度对速冻羊肉品质影响的实验研究[J]. 食品科学,2007,28(8): 495~497.

16 李利. 不同温度处理对羊肉宰后成熟速度和食用品质的影响[D]. 内蒙古:内蒙古农业大学,2003.

17 罗欣,黄明,朱燕. 电刺激技术在牛肉快速成熟中的应用研究[J]. 农业工程学报,2001,17(6): 127~131.