

乌贼墨汁多糖的提取及抗氧化作用研究

孙楠楠, 李和生*, 张丽媛, 雷 静, 郑贤孟

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 研究乌贼墨汁多糖的提取工艺和抗氧化能力。采用单因素试验和正交试验对乌贼墨汁多糖提取条件进行优化, 同时通过乌贼墨汁多糖对清除 DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}$ 和 Fe^{3+} 还原能力的测定考察多糖的抗氧化能力。结果表明, 最佳提取条件为加酶量 4.5%、料水比 1:15(g/mL)、温度 50℃、时间 4h、pH8, 此条件下乌贼墨汁多糖的得率为 3.63%。乌贼墨汁多糖具有一定的抗氧化能力, 且在一定范围内, 墨汁多糖的抗氧化能力与质量浓度呈线性正相关关系, 其中对 DPPH 自由基和 $\cdot\text{OH}$ 的半数清除质量浓度分别为 3.61mg/mL 和 8.06mg/mL。

关键词: 乌贼墨汁; 多糖; 提取; 抗氧化

Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Squid Ink

SUN Nan-nan, LI He-sheng*, ZHANG Li-yuan, LEI Jing, ZHENG Xian-meng

(College of Maritime Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: One-factor-at-a-time method combined with orthogonal array design was employed to optimize enzymatic extraction of polysaccharides from squid ink with alkaline protease. The antioxidant activity of polysaccharides from squid ink was investigated by DPPH and hydroxyl free radical scavenging assays and ferric reducing assay. The optimal conditions for polysaccharide extraction were 4.5% enzyme amount, 1:15 material-to-liquid ratio, 50 °C, pH 8 and 4 h, resulting in a polysaccharide yield of 3.63%. Squid ink polysaccharides had some antioxidant activity. A positive liner correlation between the antioxidant activity and concentration of squid ink polysaccharides was found over the investigated ranges. The The half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) against DPPH and hydroxyl free radicals were 3.61 mg/mL and 8.06 mg/mL respectively.

Key words: squid ink; polysaccharides; extract; antioxidant activity

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0095-05

乌贼是一种营养价值较高的海洋产生物, 乌贼墨可以用于止血, 目前现代临床医学证实它对妇科、外科、内科等多种出血的止血效果显著, 而且有可能通过有效地控制出血使全身机能状况改善^[1], 另外乌贼墨可保护造血干细胞, 有显著促使环磷酰胺所致白细胞降低的回升作用, 可预防大白鼠急性放射病^[2]。乌贼墨可以诱生小鼠肿瘤坏死因子^[3]和细胞毒因子^[4]、降低高脂血症大鼠的血脂^[5]。乌贼墨汁中的肽聚糖具有抗菌作用^[6]、其中的活性多糖在冷藏鱿鱼的保存中具有较好的防腐作用^[7]。乌贼墨汁中的肽聚糖还具有抗肿瘤作用^[8-9], 硫酸化的乌贼墨多糖可抑制肿瘤细胞的生长、侵袭和转移^[10]。本实验对乌贼墨汁多糖的提取条件和其抗氧化能力进行研究, 为乌贼墨汁综合利用的提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金乌贼 宁波庄菜市场。

碱性蛋白酶(20 万 U/g) 南京庞博生物工程有限公司; 96% 乙醇 奥博生物有限公司; 其余试剂皆为分析纯。

1.2 仪器与设备

T6 新悦可见光分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; RE52-2 型旋转蒸发器 上海沪西分析仪器厂; Delta320 型酸度计 梅特勒-托利多仪器有限公司; H2500R-2 型高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; Cary100 型紫外分光光度计 美国 Varian 公司;

收稿日期: 2011-05-24

基金项目: 浙江省科技厅重大攻关项目(2009C03017-3)

作者简介: 孙楠楠(1986—), 女, 硕士研究生, 主要从事食品资源利用研究。E-mail: sunnannan2007@163.com

* 通信作者: 李和生(1960—), 男, 教授, 硕士, 主要从事食品资源利用研究。E-mail: lihesheng@nbu.edu.cn

60SXRTIRO型傅里叶变换红外光谱仪 美国尼高力仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 多糖的提取

参考鲍鱼脏器多糖^[11]及钝顶螺旋藻多糖^[12]的提取条件, 选用碱性蛋白酶酶解蛋白质, 并用三氯乙酸沉淀去除。具体乌贼墨汁多糖的提取方法为: 乌贼墨囊 4℃解冻, 挤出墨汁→加水, 调 pH8 →加碱性蛋白酶解→水浴→100℃灭酶 10min →9000r/min 离心 20min 取上清液→加四分之一体积的 15% 三氯乙酸过夜→9000r/min 离心 20min 取上清液→旋转蒸发浓缩→调 pH7 →加 4 倍乙醇沉淀→冷冻干燥→微黄色多糖样品。

以加酶量、料水比、温度、水浴时间为因素, 以苯酚硫酸法测定的吸光度为考察指标(吸光度与多糖换算回归方程为 $y = 0.0076x - 0.0037$, $R^2 = 0.9991$)^[13], 采用单因素及正交试验法优化提取条件。

$$\text{乌贼墨汁多糖提取率} \% = \frac{\text{提取物中所含的多糖质量}}{\text{原料湿质量}} \times 100$$

1.3.2 光谱分析

1.3.2.1 紫外-可见光吸收光谱

将多糖样品配成 1mg/mL 的溶液, 在波长 190~800nm 范围内进行全波段扫描。

1.3.2.2 红外光谱

溴化钾压片(样品与溴化钾质量之比为 1:200 左右), 在波数 4000~400cm⁻¹ 范围内进行红外扫描。

1.3.3 抗氧化作用的研究

1.3.3.1 清除 DPPH 自由基能力的测定

配制 5 种不同质量浓度的多糖样品。取 2mL 多糖样品加入 2mL 含 0.2mmol/L DPPH 的无水乙醇溶液, 混匀, 常温反应 30min, 在波长 517nm 处测定吸光度(A_i)。将样品换为无水乙醇, 测定吸光度(A_0), 同时, 测定 2mL 样品液和 2mL 无水乙醇混合液的吸光度(A_j)^[14], 计算清除率 I 。

$$I \% = \frac{A_0 - A_i - A_j}{A_0} \times 100$$

1.3.3.2 清除 ·OH 能力的测定

配制 5 种不同质量浓度的多糖样品。依次加入 2.5mmol/L 的邻二氮菲溶液 1mL, pH7.4 的磷酸盐缓冲液 2mL, 多糖样品 1mL, 2.5mmol/L 的硫酸亚铁溶液 1mL, 6%过氧化氢溶液 1mL, 37℃水浴 60min 后, 于波长 536nm 处测定吸光度($A_{\text{样}}$)。同时, 将样品换做蒸馏水测定吸光度($A_{\text{损}}$), 将过氧化氢换做蒸馏水测定吸光度($A_{\text{未}}$)^[14],

计算清除率 I 。

$$I \% = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{损}}}{A_{\text{未}} - A_{\text{损}}} \times 100$$

1.3.3.3 还原能力的测定

测定对 Fe³⁺ 的还原能力^[15-16]。配制 5 种不同质量浓度的多糖样品, 以 3mg/mL 的 VC 作阳性对照。取 2.5mL 多糖样品, 依次加入 pH6.6 的磷酸盐缓冲液 2.5mL, 1% 铁氰化钾 2.5mL, 50℃水浴 20min。再加入 10% 三氯乙酸 2.5mL, 3000r/min 离心 10min, 取 2.5mL 上清液, 加 2.5mL 蒸馏水和 0.5mL 10% 三氯化铁, 混匀, 静置 10min, 于 700nm 处测定吸光度, 吸光度大小与还原能力呈正比。

2 结果与分析

2.1 乌贼墨汁多糖提取条件单因素试验

2.1.1 加酶量对提取率的影响

在料水比 1:10(g/mL)、温度 40℃、时间 2h 条件下, 加酶量分别设为原料质量的 1%、2%、3%、4%、5% 五个水平考察。结果如图 1 所示, 随酶用量的增加, 底物充分反应, 吸光度呈不断上升的趋势, 添加量为 4% 时, 曲线增幅变缓, 因此选用 4% 为此因素的条件。

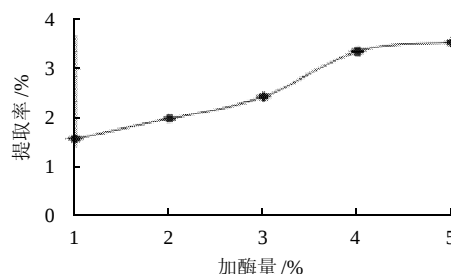


图 1 加酶量对乌贼墨汁多糖提取率的影响

Fig.1 Effect of enzyme concentration on extraction yield of squid ink polysaccharides

2.1.2 料水比对提取率的影响

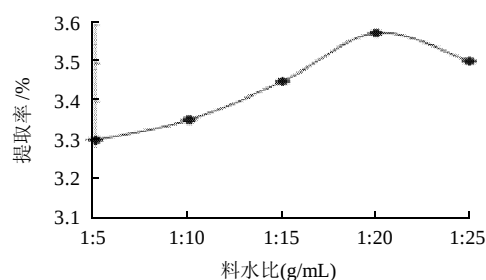


图 2 料水比对乌贼墨汁多糖提取率的影响

Fig.2 Effect of material-to-water ratio on extraction yield of squid ink polysaccharides

在加酶量为原料质量的4.5%、温度40℃、时间2h条件下,料水比(g/mL)分别设为1:5、1:10、1:15、1:20、1:25。结果见图2,当料水比为1:20时,提取效果最好,料水比太低,会使酶的作用浓度减少,影响酶解效率。

2.1.3 温度对提取率的影响

在加酶量为原料质量的4.5%、料水比1:10、时间2h条件下,温度分别设为30、40、50、60、70℃。结果见图3,当温度为50℃时,提取效果最好,超过50℃会对影响酶活力。

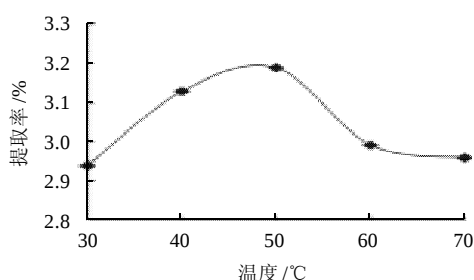


图3 温度对乌贼墨汁多糖提取率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on extraction yield of squid ink polysaccharides

2.1.4 时间对提取率的影响

在加酶量为原料质量的4.5%、料水比1:10、温度40℃条件下,时间分别设为1、2、3、4、5h。当时间为3h时,提取效果最好。说明水浴3h可以将蛋白质水解掉,超过3h变化不大。

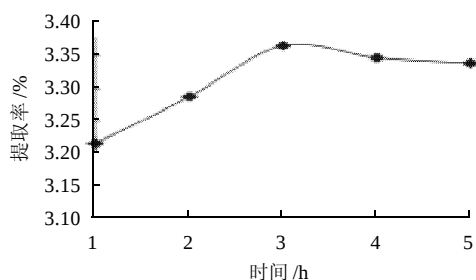


图4 时间对乌贼墨汁多糖提取率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on extraction yield of squid ink polysaccharides

2.2 乌贼墨汁多糖提取条件正交试验优化

选择加酶量、料水比、温度、时间为因素,按 $L_9(3^4)$ 正交进行正交试验,对其酶解条件进行优化。测定9组粗多糖液的吸光度,因素水平见表1,正交试验设计及结果见表2。

表1 乌贼墨汁多糖提取条件正交试验因素水平表

Table 1 Coded levels and corresponding actual levels of the optimization parameters used in orthogonal array design

水平	因素			
	A 料水比(g/mL)	B 加酶量 / %	C 提取温度 / °C	D 提取时间 / h
1	1:15	3.5	45	2
2	1:20	4.0	50	3
3	1:25	4.5	55	4

表2 乌贼墨汁多糖提取条件正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal array design, results and range analysis

试验号	A	B	C	D	多糖提取率 / %
1	1	1	1	1	2.57
2	1	2	2	2	3.46
3	1	3	3	3	3.25
4	2	1	2	3	2.90
5	2	2	3	1	3.01
6	2	3	1	2	3.44
7	3	1	3	2	2.47
8	3	2	1	3	3.50
9	3	3	2	1	3.54
k_1	3.093	2.647	3.170	3.040	
k_2	3.117	3.323	3.300	3.123	
k_3	3.170	3.410	2.910	3.217	
R	0.077	0.763	0.390	0.177	

由表2可知,影响因素排列依次为B(加酶量)>C(温度)>D(时间)>A(料水比)。优化方案: $A_3B_3C_2D_3$ 。其中加酶量为显著因素。但是由于料水比极差较小,考虑成本,选用料水比为1:15。因此最佳提取条件为料水比1:15、加酶量4.5%、温度50℃、时间4h。该条件下乌贼墨汁多糖提取得率为3.63%。

2.3 光谱分析

2.3.1 紫外-可见光吸收光谱分析

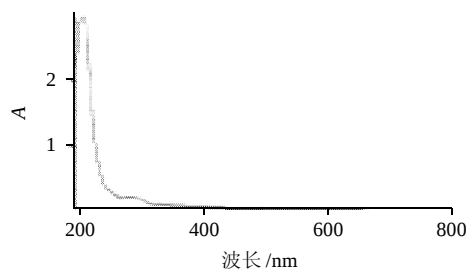


图5 紫外-可见光吸收光谱

Fig.5 UV-Vis scanning spectrum of squid ink polysaccharides

由图5可知,乌贼墨汁多糖在波长201nm处有较强的多糖吸收峰,在波长260nm处无特征吸收峰,说明乌贼墨汁多糖不含核酸,在波长280nm处吸收不明显,说明提取的多糖中,蛋白质含量较低。

2.3.2 红外光谱分析

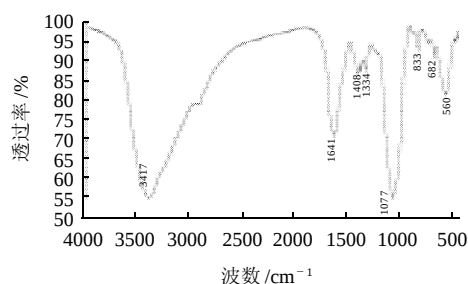


图6 红外光谱

Fig.6 Infrared absorption spectrum of squid ink polysaccharides

红外图谱(图6)显示样品有多糖类物质的特征吸收峰,在 3417cm^{-1} 处出现一个宽峰,是O—H的伸缩振动峰,表明多糖分子存在分子内和分子间的氢键;在 1641cm^{-1} 处的峰是C=O的伸缩振动峰; 1077cm^{-1} 处的峰是糖环C—O伸缩振动峰;而 1408 、 1334cm^{-1} 的峰为C—H的变角振动峰。 833cm^{-1} 处的峰说明主要的单糖组成为 α -构型的吡喃糖。

2.4 乌贼墨汁多糖的抗氧化作用

2.4.1 清除DPPH自由基的能力

乌贼墨汁多糖可以与DPPH自由基中的孤电子配对,使原来的紫色变浅,在波长 517nm 处有最大吸收峰。在质量浓度 $1\sim 5\text{mg/mL}$ 的范围内,乌贼墨汁多糖对清除DPPH自由基的能力随质量浓度增大而增大,且呈良好的线性正相关,其线性相关方程 $y = 12.739x + 4.019$, $R^2 = 0.976$ 。相关系数 $r = 0.987$,查相关系数检测表^[17]可知 $P < 0.01$,线性关系极显著。以清除率为50%时样品的质量浓度值作为评价抗氧化剂的自由基清除能力的指标,即半数清除质量浓度。由线性相关方程可得,多糖样品清除DPPH自由基的半数清除质量浓度值为 3.61mg/mL 。

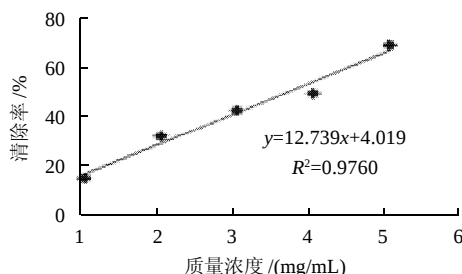


图7 不同质量浓度样品清除DPPH自由基的能力

Fig.7 Dose-dependent scavenging activity of squid ink polysaccharides against DPPH free radicals

2.4.2 清除·OH的能力

·OH能夺取糖类、蛋白质、脂肪等生物分子中

的氧原子,引发机体的损坏。通过Fenton反应生成的·OH可促使邻二氮菲- Fe^{2+} 被氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} ,在 536nm 波长处有最大吸收。墨汁多糖在 $2\sim 10\text{mg/mL}$ 的质量浓度范围内,清除·OH能力是随样品质量浓度增加而不断增加,且呈正相关,线性相关方程为 $y = 3.7345x + 19.897$, $R^2 = 0.9227$, $r = 0.9606$, $P < 0.01$,线性关系极显著。由回归方程得多糖样品清除·OH的半数清除质量浓度值为 8.06mg/mL 。

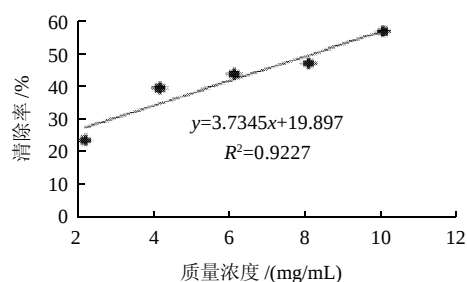


图8 不同质量浓度样品清除·OH的能力

Fig.8 Dose-dependent scavenging activity of squid ink polysaccharides against hydroxyl free radicals

2.4.3 还原能力

墨汁多糖可以将反应体系中的三价铁还原成二价铁,在波长 700nm 处有强吸收,吸光度越大表示还原能力越强。在 $1\sim 5\text{mg/mL}$ 质量浓度范围内线性,线性相关方程 $y = 0.0403x + 0.1059$, $R^2 = 0.9918$, $r = 0.996$, $P < 0.01$,线性关系高度正相关。 3mg/mL 的抗坏血酸的吸光度为2.23,远远大于本样品的最大吸光度0.311。

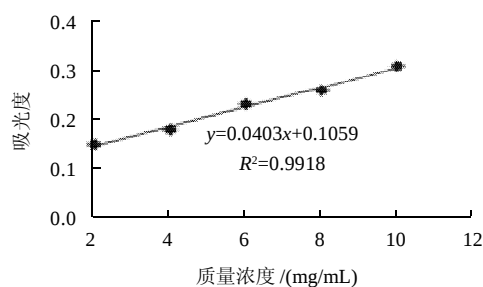
图9 不同质量浓度多糖样品对 Fe^{3+} 的还原能力

Fig.9 Dose-dependent ferric reducing power of squid ink polysaccharides

3 结论

由正交试验结果可知,乌贼墨汁多糖最佳提取条件为加酶量4.5%、料水比1:15、温度 50°C 、时间4h、 $\text{pH}8$,此条件下乌贼墨汁多糖得率为3.63%。其中加酶量为显著因素。紫外-可见光光谱和红外光谱显示样品

有多糖类物质的特征吸收峰,进一步说明提取的物质为多糖。乌贼墨汁多糖具有一定的抗氧化作用,而且在一定范围内,其抗氧化的能力大小与样品质量浓度呈线性正相关趋势,其线性关系极显著。其中对清除DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}$ 的半数清除质量浓度值分别为3.61mg/mL 和8.06mg/mL。与VC 相比,对 Fe^{3+} 的还原能力较弱。研究乌贼墨多糖的抗氧化作用可以作为进一步研究墨汁多糖功能的基础,同时对于开发墨汁保健品、食品添加剂和药物等产品的综合利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 谢光临,吕昌龙,洪明标,等. 乌贼墨促凝血作用机制的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 1994, 23(6): 530-531.
- [2] 雷敏,王静凤,李兆杰,等. 乌贼墨制品对 ^{60}Co γ 辐射损伤小鼠造血功能的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 293-297.
- [3] 赫牲,吕昌龙. 乌贼墨对小鼠肿瘤坏死因子的诱生作用[J]. 中国海洋药物, 1996(1): 10-12.
- [4] 吕昌龙,赫牲. 乌贼墨诱生小鼠细胞毒因子活性的检测[J]. 中国医科大学学报, 1994, 23(4): 322-323.
- [5] 雷敏,王静凤,逢龙,等. 乌贼墨对高脂血症大鼠血脂代谢和抗氧化能力的影响[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(3): 30-33.
- [6] 杜铁平,周培根,卫小怡,等. 乌贼墨抗菌活性的分离与研究[J]. 现代食品科技, 2005, 21(1): 69-71.
- [7] 吴金龙,罗剑秋,刘华忠,等. 乌贼墨多糖对冷藏鱿鱼的防腐保鲜作用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 304-307.
- [8] 王曦. 乌贼墨肽聚糖的抗肿瘤作用[D]. 上海: 第二军医大学, 2005.
- [9] TAKAYA Y, UCHISAWA H, MATSUE H, et al. An investigation of the antitumor peptidoglycan fraction from squid ink[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 17(6): 846-854.
- [10] WANG Subo, CHENG Yanna, WANG Fengshan, et al. Inhibition activity of sulfated polysaccharide of *Sepiella maindroni* ink on matrix metalloproteinase (MMP)-2[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2008, 62(5): 297-302.
- [11] 程婷婷,李冬梅,李韬,等. 鲍鱼脏器多糖提取条件的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(6): 208-210.
- [12] 孙远征,张学成,纪雷. 钝顶螺旋藻多糖提取工艺的研究: 三氯乙酸(TCA)法的正交实验优化[J]. 海洋科学, 2007, 31(4): 42-46.
- [13] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 11-12.
- [14] YEN G G, HSIEH P P. Antioxidative activity and scavenging effects on xylose-lysine Maillard reaction products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1995, 67(3): 415-420.
- [15] OYAIZU M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine[J]. Jap J Nutr, 1986, 44(6): 307-315.
- [16] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARAK, et al. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidant of soybean oil in cyclodextrin emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945-948.
- [17] 韩芝隆. 概率论与数理统计[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 302.