干贝多糖的蛋白质脱除方式对抗氧化活性的影响

王思婷[1]，薛 蕊[1]，李欣怡[1]，赵前程[1,2,3]，李智博[*1,2,3]

（1. 大连海洋大学 食品科学与工程学院，辽宁 大连 116023；2. 辽宁省水产品分析检验及加工技术科技服务中心，辽宁 大连 116023；3.辽宁省水产品加工及综合利用重点实验室，辽宁 大连 116023）

摘要：为比较蛋白质脱除方式对干贝多糖的组成、结构和抗氧化活性的影响，对热水辅助超声法提取的干贝柱多糖采用碱酶法、稀碱法、三氯乙酸（TCA）法、*D*-葡萄糖酸-*δ*-内酯（GDL）法4种方式脱蛋白质，并比较脱蛋白质后4组多糖的多糖质量分数、单糖组成、氨基酸组成、三螺旋结构、微观结构及体外抗氧化活性。结果表明：TCA组多糖的质量分数最高，可达（74.83±0.57）%，4组多糖的单糖组成均以葡萄糖为主；GDL组总氨基酸质量分数、极性氨基酸质量分数与非极性氨基酸质量分数较高；碱酶组和GDL组多糖具有三螺旋结构；稀碱组多糖致密光滑，其余3组多糖疏松多孔。综合来看，碱酶组多糖的质量分数较高且抗氧化活性较好。不同的蛋白质脱除方式会影响干贝多糖的组成和抗氧化活性。

关键词：干贝；多糖；工艺优化；蛋白质脱除方式；抗氧化

中图分类号：TS 254.1　**文章编号：**1673-1689(2021)08-0062-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.08.008

Effect of Deproteinization Methods of Polysaccharide from Dried Adductor Muscle on Antioxidant Activities

WANG Siting[1]，*XUE Rui*[1]，*LI Xinyi*[1]，*ZHAO Qiancheng*[1,2,3]，*LI Zhibo*[*1,2,3]

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Liaoning Provincial Aquatic Products Analyzing, Testing and Processing Technology Scientific Service Centre, Dalian 116023, China; 3. Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Utilization of Liaoning Province, Dalian 116023, China)

Abstract: In order to compare the effects of deproteinization methods on the composition, structure and antioxidant activity of the dried adductor muscle polysaccharides, four deproteinization methods were applied to the polysaccharides extracted by hot water-assisted ultrasound method, including enzymatic hydrolysis, dilute alkali pretreatment, trichloroacetic acid (TCA) method and *D*-glucono-δ-lactone (GDL) method. The polysaccharide content, monosaccharide composition, amino acid composition, triple helix, microstructure and antioxidant activity *in vitro* of the four deproteinization groups were compared. The results showed that the polysaccharide content of TCA group was the highest, reaching (74.83±0.57)%. The monosaccharide composition of polysaccharides in the four groups was mainly glucose. The total amino acid content, polar amino acid content and non-polar amino acid content were higher in the GDL group. The polysaccharides of alkali-enzyme

收稿日期：2020-09-21

基金项目：辽宁省科技重大专项计划项目（2020JH1/10200001）；国家“十三五”重点研发计划项目（2018YFD0901004）。

*** 通信作者：**李智博（1979—），女，博士，副教授，主要从事食品生物技术研究。E-mail：zhibo9800@163.com

group and GDL group were in triple helix structure. The polysaccharides of dilute alkali group were dense and smooth, while polysaccharides of the other three groups were loose and porous. Comprehensively, the polysaccharide content of alkali enzyme group was higher and the antioxidant activity was better. Different deproteinization methods could affect the composition and antioxidant activity of polysaccharides extracted from adductor muscle.

Keywords: dried scallop adductor muscle, polysaccharide, extraction optimization, deproteinization methods, antioxidant activity

海湾扇贝(*Argopecten irradians*)是一种重要的经济类海洋贝类。海湾扇贝柱富含多种营养成分,蛋白质、脂肪、糖类质量分数分别占 14.03%,1.20%和 3.07%,其中的总糖质量分数显著高于岩扇贝(1.9%)、虾夷扇贝(1.79%)及栉孔扇贝(0.45%)[1],极具开发价值。据报道,扇贝多糖具有抗肿瘤、提高免疫力、抗氧化和抗凝血等活性[2-4],已经成为重要的功能食品资源。

由于扇贝不易贮藏,干制成为扇贝储藏的主要手段。由于多糖与蛋白质相连,而海洋贝类普遍具有高蛋白质的特性[5],热加工干制过程会加速两者的结合,提取的多糖成分通常会含有蛋白质杂质。为减轻蛋白质对多糖结构和生物活性研究的干扰,脱蛋白质具有重要的意义。目前较普遍的蛋白质脱除方法如:TCA 法、Seveage 法、酶法等,其中,Seveage 法不适合食品加工行业。现阶段对于扇贝多糖脱蛋白质的研究多集中于多糖得率和蛋白脱除率上,如李雪梅等[2]采用乙醇沉淀法结合 TCA 法脱除海湾扇贝多糖的蛋白质,脱除率达 90%以上;刘禹等[6]的研究表明,一种新兴的 *D*-葡萄糖酸-*δ*-内酯(GDL)蛋白质脱除法,对虾夷扇贝多糖的蛋白质脱除率可达 99%,效果优于 TCA 法。

蛋白质脱除方法在不同程度上都会影响到多糖的含量、得率或者活性,目前,关于蛋白质脱除方式对多糖结构、活性的影响鲜有报道。作者对干贝多糖进行不同方式的脱蛋白质处理,并比较了蛋白质脱除方式对干贝多糖结构和抗氧化活性的影响,以期找出干贝多糖的最佳脱蛋白质方法,为研究干燥过程对干贝多糖的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验原料为海湾鲜扇贝,由大连玉洋集团有限公司提供,鲜贝柱于 50 ℃下烘干,自制为干贝柱,粉碎备用。

木瓜蛋白酶(1×10^5 u/g)、碱性蛋白酶(2×10^5 u/g):上海瑞永生物科技有限公司产品;氢氧化钠(分析纯):沈阳市联邦试剂厂产品;三氯乙酸(TCA):天津市科密欧化学试剂有限公司产品;浓硫酸(分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品;*D*-葡萄糖酸-*δ*-内酯(GDL):阿拉丁试剂(上海)有限公司产品;过氧化氢(分析纯)、水杨酸(分析纯):北京化学试剂有限公司生产产品;$FeSO_4\cdot7H_2O$(分析纯):天津市大茂化学试剂厂产品;苯酚、无水乙醇(分析纯):新光化工试剂厂产品;二苯基苦味肼基自由基(DPPH):梯希爱(上海)化成工业发展有限公司产品。

1.2 仪器与设备

PAL-1 便携式折光仪:日本 ATAGO 公司产品;XH-C 漩涡混匀仪:常州越新仪器制造有限公司产品;SYNERGY HI 酶标仪:美国伯腾仪器有限公司产品;UDK152 全自动凯氏定氮仪:意大利 VELP 公司产品;DY-200-BZ 空气浴振荡摇床:厦门德仪设备有限公司产品;高效液相色谱仪:安捷伦科技有限公司产品;L-8900 型氨基酸自动分析仪:日本 HITACHI 公司产品;GI21M 湘仪离心机:上海医疗器械有限公司手术器械厂产品;FD-1 型冷冻干燥机:北京博医康实验仪器有限公司产品;Lambda 25 紫外-可见分光光度计:美国 PerkinElmer 公司产品;Sigma300 扫描电子显微镜:卡尔蔡司(上海)管理有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 干贝粗多糖的提取 精确称取适量干贝柱粉,以液料体积质量比为 40 mL:1 g 加入去离子水,在 80 ℃下热水浸提 4 h 后超声 9 min。过滤滤渣,调整浸提液固形物质量分数至 10%,添加质量分数 2%的木瓜蛋白酶进行酶解,酶解时间 3 h、温度

57.8 ℃、pH 7.1。离心取上清液,加入体积分数95%乙醇至乙醇最终体积分数为75%,4 ℃静置12 h后,离心取沉淀,挥醇后冻干,得干贝粗多糖(DAMP)。将DAMP配制成质量浓度为50 mg/mL的粗多糖溶液备用。

1.3.2 碱酶法蛋白质脱除 参照韩莹等的方法[7]并略做改进。将粗多糖溶液pH值调至10,加入碱性蛋白酶使酶质量分数为2%,于50 ℃酶解3 h,沸水浴10 min灭酶,4 000 r/min离心10 min,收集上清液,醇沉后冷冻干燥。

1.3.3 稀碱法蛋白质脱除 参照陈利华等的方法[8]并略做改进。60 ℃下用0.1 moL/L的NaOH溶液提取3 h,4 000 r/min离心10 min,收集上清液,醇沉后冷冻干燥。

1.3.4 TCA法蛋白质脱除 参照李雪梅等的方法[2]并略做改进。将质量分数2%的TCA溶液与一定体积的粗多糖溶液等体积混合,震荡反应3 h,4 000 r/min离心10 min,收集上清液,醇沉后冷冻干燥。

1.3.5 GDL法蛋白质脱除 参照刘瑀等的方法[6]并略做改进。向粗多糖溶液中加质量分数2%的GDL溶液,使GDL的终质量分数达到0.3%~0.5%。置于45 ℃的恒温水浴锅中反应3 h,4 000 r/min离心10 min,收集上清液,醇沉后冷冻干燥。

1.3.6 蛋白质脱除率及多糖损失率的计算 采用苯酚-硫酸法[9]测定多糖,采用凯氏定氮法[10]测定蛋白质质量分数,测定3组平行取平均值。蛋白质脱除率及多糖损失率的计算公式如下:

$$蛋白质脱除率(\%)=\frac{(X_0-X_1)}{X_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中:X_0为脱蛋白质前样品中蛋白质量分数;X_1为脱蛋白质后样品中蛋白质量分数。

$$多糖损失率(\%)=\frac{(m_0-m_1)}{m_0}\times 100\% \quad (2)$$

式中:m_0为脱蛋白质前样品提取物质量;m_1为脱蛋白质后样品提取物质量。

1.3.7 单糖组成分析 采用PMP柱前衍生高效液相色谱法测定脱蛋白质纯化后多糖的单糖组成,具体操作参考文献[11]。

1.3.8 氨基酸组成分析 使用氨基酸自动分析仪测定氨基酸种类与含量,氨基酸质量分数以mg/g表示。具体操作参考文献[12]。

1.3.9 刚果红试验 参照陈杨扬等的方法[13]并略做改进。称取多糖样品各1 mg,加入1 mL蒸馏水和80 μmol/L刚果红溶液2 mL,充分混匀后加入NaOH,使各组NaOH终浓度分别为0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L,并用紫外全波段扫描,记录不同NaOH浓度下的最大吸收波长。

1.3.10 扫描电镜分析 参照Wang等的方法[14]并略做改进。取适量经蛋白脱除的多糖样品,镀上导电金粉后将其放置于扫描电镜下观察。工作条件:加速电压15 kV,观测倍数分别选用200、1 000、10 000倍。

1.3.11 DPPH自由基清除能力的测定 参照Odeleye等的方法[15]并略做改进。将待测样品配制为30 mg/mL的样液,用无水甲醇依次稀释成2、4、6、8、10 mg/mL梯度。将2 mL样液与2 mL 0.16 mmol/L DPPH-甲醇溶液(6.31 mg/dL)混合均匀。以VC作阳性对照,室温下避光静置30 min后于517 nm下用酶标仪测定吸光值。每个浓度梯度进行3组平行试验。DPPH清除率计算方式为:

$$DPPH自由基清除率(\%)=(1-\frac{(A_1-A_2)}{A_0})\times 100\% \quad (3)$$

式中:A_0为无水甲醇代替样品的测得吸光度值;A_1为样品溶液的测得吸光度值;A_2为无水甲醇代替DPPH测得的吸光度值。

1.3.12 羟基自由基清除能力的测定 参照Liu等的方法[16]并略做改进。将待测样品配制为30 mg/mL的原液,依次稀释成2、4、6、8、10 mg/mL的溶液。将1 mL样液与1 mL 9 mmol/L $FeSO_4$溶液、1 mL 9 mmol/L的水杨酸-乙醇溶液和1 mL 8.8 mmol/L的H_2O_2溶液混合均匀,37 ℃水浴30 min,以VC作阳性对照于510 nm下测吸光值,清除率按下式计算:

$$羟基自由基清除率(\%)=(1-\frac{(A_4-A_5)}{A_3})\times 100\% \quad (4)$$

式中:A_3为去离子水代替样品的测得吸光度值;A_4为样品溶液的测得吸光度值;A_5为去离子水代替H_2O_2溶液测得的吸光度值。

1.3.13 数据处理 实验结果以(平均值±标准偏差)表示,实验数据采用SPSS Statistics 17.0软件进行单因素ANOVA分析,显著性水平设定为0.05。

2 结果与分析

2.1 干贝多糖蛋白质脱除的结果

本实验中,在多糖提取物不被显著降解的条件

下去除结合的蛋白质,以提高多糖的质量分数是十分必要的。1.3.1 中得到的 DAMP 的多糖质量分数为(53±0.58)%,蛋白质质量分数为(39.09±0.88)%。经 4 种蛋白质脱除方式处理后,多糖质量分数、蛋白质脱除率和多糖损失率见表 1。多糖质量分数由高到低分别为:TCA 法>稀碱法>碱酶酶解法>GDL 法。其中,TCA 组多糖质量分数显著高于其他 3 组。蛋白质脱除率及多糖损失率由高至低依次为:TCA 法>稀碱法>碱酶法>GDL 法。结合多糖质量分数、蛋白脱除率与多糖损失率分析可得,TCA 法脱蛋白质最有效,但多糖损失严重;DAMP 经稀碱法与酶解法处理后,多糖质量分数无显著差别,但稀碱组蛋白质脱除率及多糖损失率显著高于酶解组;经 GDL 法处理后,多糖质量分数及蛋白质脱除率均显著低于其他方式,多糖损失率也最少。

表 1　蛋白质脱除方式对干贝多糖质量分数、蛋白质脱除率及多糖损失率的影响

Table 1　Effects of deproteinization methods on polysaccharides content, protein removal rate and polysaccharide loss rate from dried adductor muscle

脱蛋白质方式	多糖质量分数/%	蛋白质脱除率/%	多糖损失率/%
碱酶法	65.14±0.64^{b}	56.79±0.93^{c}	23.43±1.09^{c}
稀碱法	65.30±0.55^{b}	74.42±0.80^{b}	35.08±1.23^{b}
TCA 法	74.83±0.57^{a}	86.36±1.01^{a}	46.61±0.94^{a}
GDL 法	62.51±0.71^{c}	27.42±0.67^{d}	15.33±0.87^{d}

小写字母不同表示差异显著(P<0.05),下同。

2.2　单糖组成分析

由表 2 可知,碱酶组多糖含有 Man、GlcN、GalUA、Glc、Gal、Arb;稀碱组多糖含有 GlcN、Glc、Gal;TCA 组多糖含有 GlcN、GalUA、Glc;GDL 组多糖含有 Man、GlcN、Rha、GalUA、Glc。不同蛋白质脱除方式所得多糖的单糖组成略有差别,稀碱组和碱酶组多糖中的半乳糖醛酸在碱性环境中生成半乳糖,而 TCA 法和 GDL 法多糖中检测到半乳糖醛酸,未检测到半乳糖。各组数据中,葡萄糖质量分数均最高。据报道,海湾扇贝多糖组分为中性多糖和酸性多糖[2],与本实验结果一致。

表 2　干贝多糖各组单糖质量分数

Table 2　Monosaccharide contents of polysaccharides removed from dried adductor muscle

%

组别	甘露糖 Man	氨基葡萄糖 GlcN	鼠李糖 Rha	半乳糖醛酸 GaIUA	葡萄糖 Glc	半乳糖 Gal	阿拉伯糖 Arb
碱酶组	0.17±0.05	0.55±0.01	—	1.02±0.13	97.89±1.30	0.20±0.02	0.17±0.01
稀碱组	—	0.52±0.11	—	—	99.20±0.51	0.28±0.01	—
TCA 组	—	0.33±0.06	—	1.29±0.08	98.38±0.78	—	—
GDL 组	0.19±0.02	0.61±0.00	0.13±0.01	1.35±0.20	97.72±0.29	—	—

注:未检测出以“—”表示,下同。

2.3　氨基酸组成分析

为了明确不同脱除方式处理的扇贝多糖中残留蛋白质的情况,以及这些蛋白质与抗氧化活性之间的关系,对 4 种方式脱蛋白后的干贝多糖进行了氨基酸组成分析,结果显示:干贝多糖中的总氨基酸质量分数为 15~160 mg/g,碱酶组和稀碱组均检测出 16 种氨基酸,TCA 组和 GDL 组均检测出14 种氨基酸,可见氨基酸种类齐全。由表 4 可知,碱酶组的亲水氨基酸及极性氨基酸质量分数较高,非极性氨基酸及必需氨基酸质量分数较低,疏水性氨基酸质量分数最低;稀碱组的疏水氨基酸质量分数较低,其他 4 种氨基酸质量分数均最低;TCA 组的疏水性氨基酸、非极性氨基酸与必需氨基酸质量分数最高,亲水性氨基酸与极性氨基酸质量分数较低;GDL 组的亲水性氨基酸和极性氨基酸质量分数最高,疏水性氨基酸、非极性氨基和必需氨基酸质量分数较高。

2.4　刚果红试验分析

由图 1 可知,在氢氧化钠的浓度为 0~0.1 mol/L 时,对照组(刚果红)的最大吸收波长逐渐减小,GDL 组和碱酶组多糖与刚果红结合生成的络合物的最大吸收波长随 NaOH 浓度的增大红移明显发生,表明 GDL 组和碱酶组多糖存在三螺旋结构;TCA 组和稀碱组多糖不具有三螺旋结构[13],可能是

表 3　干贝多糖的氨基酸组成

Table 3　Amino acid composition of polysaccharides removed from dried adductor muscle

mg/g

氨基酸	碱酶组	稀碱组	TCA 组	GDL 组
天冬氨酸 (Asp)	16.35±0.67	13.53±0.49	3.24±0.32	30.45±2.21
苏氨酸 (Thr)	—	0.78±0.05	—	—
丝氨酸(Ser)	2.56±0.24	0.97±0.03	—	—
谷氨酸(Glu)	13.72±0.29	4.85±0.46	4.35±0.28	39.83±1.36
脯氨酸(Pro)	2.69±0.14	2.29±0.19	1.44±0.04	4.05±0.37
甘氨酸(Gly)	5.91±0.51	3.76±0.15	—	—
丙氨酸(Ala)	1.95±0.12	0.62±0.09	0.81±0.05	8.07±0.43
胱氨酸(Cys)	0.35±0.03	—	0.17±0.01	0.81±0.01
缬氨酸(Val)	1.00±0.07	0.46±0.01	0.74±0.02	3.37±0.25
蛋氨酸(Met)	0.33±0.04	0.06±0.00	0.27±0.01	2.84±0.10
异亮氨酸(Ile)	1.80±0.05	1.64±0.14	0.53±0.01	4.96±0.70
亮氨酸(Leu)	1.87±0.38	1.44±0.29	1.19±0.06	9.43±0.66
酪氨酸(Tyr)	1.42±0.25	0.79±0.02	0.73±0.04	3.07±0.23
苯丙氨酸(Phe)	1.03±0.20	0.82±0.13	0.92±0.06	3.33±0.18
赖氨酸(Lys)	12.73±0.51	2.22±0.17	2.36±0.25	24.25±2.08
组氨酸(His)	1.51±0.22	1.26±0.09	1.07±0.10	3.35±0.11
精氨酸(Arg)	10.84±0.72	0.66±0.15	1.73±0.33	21.58±1.55
总氨基酸	76.06±4.44	35.15±2.46	19.55±1.58	159.39±10.24

表 4　不同蛋白质脱除方式的多糖中氨基酸分类与质量分数

Table 4　Classification and content of amino acids in the components of polysaccharide prepared by different deproteinization

%

组别	疏水性氨基酸	亲水性氨基酸	极性氨基酸	非极性氨基酸	必需氨基酸
碱酶组	9.79±0.73^{d}	76.05±1.09^{b}	72.51±1.07^{b}	13.33±0.71^{d}	24.23±0.18^{b}
稀碱组	14.82±0.64^{c}	70.58±0.53^{d}	64.07±0.62^{c}	21.34±0.73^{b}	20.94±0.79^{c}
TCA 组	22.40±0.80^{a}	72.58±0.89^{c}	65.22±1.29c	29.77±1.19^{a}	29.36±0.33^{a}
GDL 组	16.94±0.24^{b}	77.49±0.16^{a}	74.95±0.23^{a}	19.48±0.31^{c}	28.45±0.61^{a}

疏水性氨基酸包含 Phe、Leu、Ile、Val、Tyr、Met；亲水性氨基酸包含 Lys、Arg、His、Asp、Glu、Pro；极性氨基酸包含 Lys、Arg、His、Asp、Glu；非极性氨基酸包含 Pro、Phe、Leu、Ile、Val、Tyr、Met；必需氨基酸包含 Thr、Val、Ile、Leu、Phe、Lys。不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

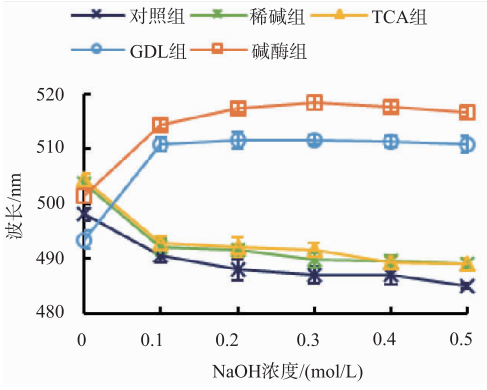


图 1　4 种蛋白质脱除方式的多糖–刚果红络合物在不同碱浓度中的最大吸收波长

Fig. 1　Maximum absorption wavelength of polysaccharide–Congo red complex extracted by four deproteinization methods under various concentration of NaOH

DAMP 在碱液、酸液处理过程中，维持稳定三螺旋结构作用的分子内、分子间氢键受到破坏，导致三螺旋结构变性[17]。

2.5　扫描电镜分析

如图 2 所示，碱酶组多糖放大 200 倍时，呈不规则块状，且有碎屑状粗多糖散落，疏松多孔；放大粗糙面至 1 000 倍时，表面凹凸不平，散布致密圆形孔径；10 000 倍下，多糖表面略粗糙，有裂纹。稀碱组多糖放大至 200 倍时，呈大小不一的不规则片状，表面光滑；1 000 倍下，多糖切面平整；10 000 倍时，多糖表面稍有圆形凸起和凹陷，棱角清晰。TCA 组多糖放大至 200 倍，呈大小、形状不一的块状；1 000 倍条件下，多糖碎片上有条形沟纹和孔洞；放大至 10 000 倍时，观察到孔洞深浅不一，比较光滑，并呈直线排列于沟纹凹陷中。GDL 组多糖在 200 倍

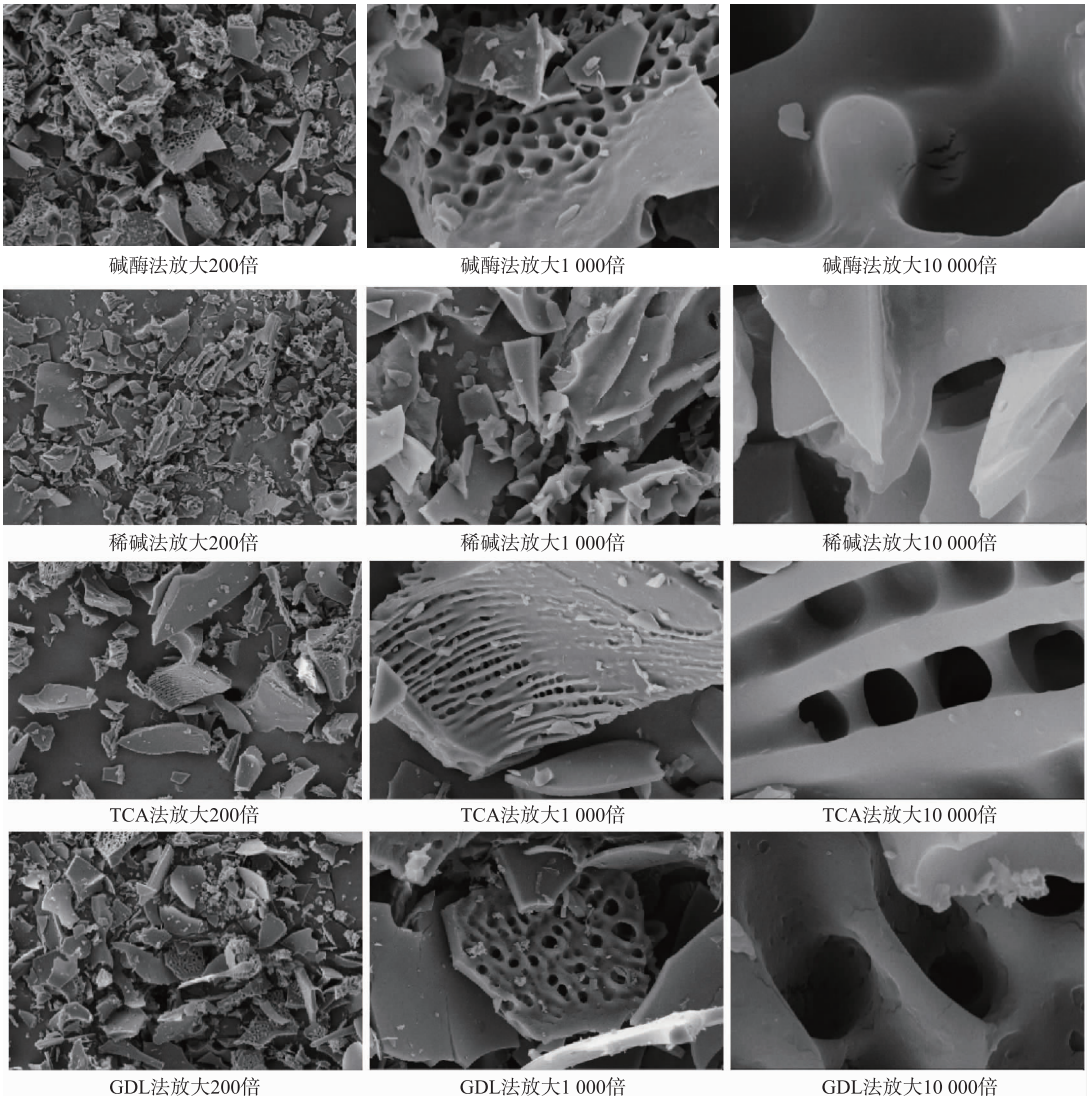


图 2　不同蛋白质脱除方式的粗多糖表面结构

Fig. 2　Surface structures of crude polysaccharides purified by different deproteinization methods

条件下,呈不规则片状;放大粗糙面至 1 000 倍下,多糖表面有裂纹,不平整,有大小不一的圆孔;10 000 倍条件下,观察到圆孔内粗糙不平整,有疏散的细孔。由图 2 可知,稀碱组多糖较光滑致密,分子排列较整齐,说明稀碱组多糖分子间相互作用较强[18],其余 3 组多糖较疏松,多孔。所有多糖分子间隙均较大,可能是干贝柱多糖分子间的斥力导致分子之间有一定的距离。

2.6　体外抗氧化能力分析

如图 3 所示,未脱蛋白的 DAMP 与 4 种蛋白质脱除方式得到的干贝多糖均有一定清除 DPPH 自由基的能力,但除了 GDL 组多糖,其他组多糖的 DPPH 自由基清除能力都不及 VC。经 GDL 法纯化的多糖显示出明显的 DPPH 自由基清除能力,并呈剂量依赖关系。当多糖质量浓度为 10 mg/mL 时,GDL 组多糖的 DPPH 自由基清除率为 80.56%。不同蛋白脱除方式对干贝多糖清除羟基自由基能力的影响见图 4,稀碱组多糖显示出明显的羟基自由基清除能力,并呈剂量依赖关系。当多糖质量浓度为 10 mg/mL 时,稀碱组多糖的羟基自由基清除率为 93.64%,比较接近 VC 的清除能力(10 mg/mL,99.73%)。碱酶组及 GDL 组多糖的羟基自由基清除能力优于 TCA 组多糖,可见,干贝多糖的抗氧化活性与多糖含量并不相关,而是与单糖组成、空间构

象等诸多因素有关[19]。

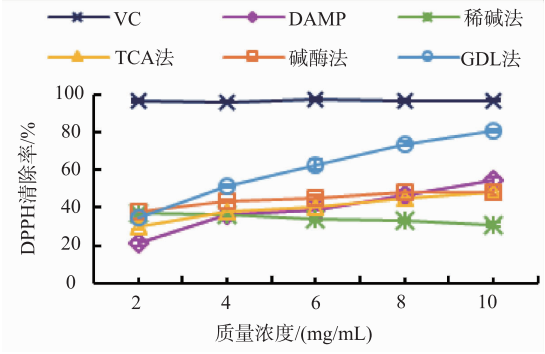


图 3　不同蛋白质脱除方式对干贝多糖清除 DPPH 自由基的影响

Fig. 3　Effects of different deproteinization methods on the scavenging activities of polysaccharides from dried adductor muscle on DPPH radicals

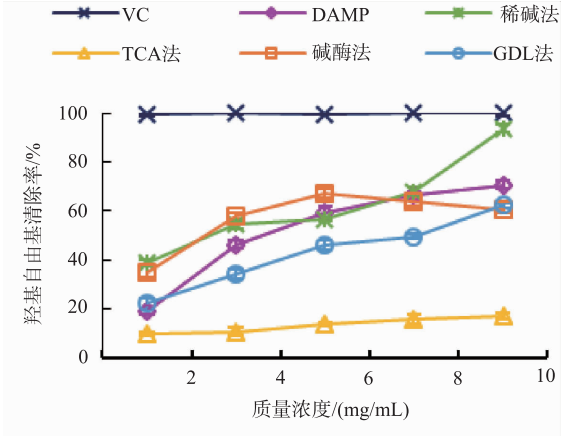


图 4　不同蛋白质脱除方式对干贝多糖清除羟基自由基的影响

Fig. 4　Effects of different deproteinization methods on the scavenging activities of polysaccharides from dried adductor muscle on hydroxyl radicals

DAMP 的抗氧化活性不高，可能是贝柱干燥过程中，水分的蒸发使水分子与贝柱多糖中的分子间氢键断裂，引起多糖空间结构的破坏，进而影响抗氧化活性[20]。TCA 组多糖对 DPPH 自由基及羟基自由基的清除能力均不理想，可能在 TCA 法脱蛋白质过程中，糖苷键在酸性条件下断裂，造成多糖含量检测偏高但活性较低。丰富的氨基酸与生理活性有紧密的联系，总氨基酸含量与抗氧化活性呈正相关[21]，TCA 组多糖总氨基酸含量不高，这与体外抗氧化试验结果一致。稀碱组多糖表现出良好的羟基自由基清除能力，但 DPPH 自由基清除能力最弱，可见不同抗氧化活性与干贝多糖结构关系的联系不尽相同。可能由于稀碱组多糖中的基团容易提供质子氢与羟基自由基反应[22]。稀碱组多糖含有较多的 Asp 和 Glu，Asp 和 Glu 具有抗氧化能力，因此推测稀碱组多糖较强的羟基自由基清除能力可能也与其含有的氨基酸有关[23]。GDL 组多糖中，疏水性氨基酸、极性氨基酸与非极性氨基酸含量较高，葛晓鸣等[24]研究发现，疏水性氨基酸在 DPPH 自由基的清除中起到决定性的作用，而极性氨基酸和非极性氨基酸可通过协同作用促进 DPPH 自由基的清除，因此 GDL 组多糖表现出良好的自由基清除活性。聚糖链的构象与其生物活性密切相关[25]，GDL 组及碱酶组多糖的抗氧化活性较好，也可能是其含有的三螺旋结构对多糖活性产生影响。有研究表明，分子间氢键作用是三螺旋结构刚性的主要动力[26]。据报道，刚性三螺旋结构具有抗肿瘤活性及免疫活性[27]，三螺旋葡聚糖与其他生物活性间的关系还待进一步研究。

3　结　语

不同蛋白质脱除方式的多糖组分、结构和抗氧化活性不同。TCA 法脱蛋白效果最显著，脱蛋白质后多糖质量分数提高至(74.83±0.27)%，蛋白质脱除率为(86.36±1.01)%，但多糖抗氧化活性和总氨基酸含量最低，单糖组成简单，不具有三螺旋结构，适用于以干贝多糖结构研究为目的的纯化。GDL 法脱蛋白质的效果次于其他 3 种方式，脱蛋白质后多糖质量分数提高至 (62.51±0.71)%，蛋白质脱除率为(27.42±0.67)%，但综合来看多糖抗氧化活性高于其他组多糖，总氨基酸质量分数最高，单糖组成丰富，具有三螺旋结构，该方法比较适合于获取具有较好抗氧化活性的干贝多糖研究。碱酶法脱蛋白效果与稀碱法无显著差别，但其总氨基酸含量高于稀碱组，单糖组成较稀碱组丰富，且具有三螺旋结构，多糖活性高于稀碱组多糖，稍次于 GDL 组多糖。作者希望获得高含量高活性的多糖组分，故选择碱酶法脱蛋白质。

参考文献:

[1] 曹善茂,王昊,陈炜,等. 岩扇贝闭壳肌营养成分的分析及与中国3种扇贝的比较[J]. 大连海洋大学学报,2016,31(5):544-550.
[2] 李雪梅,李丽梅,陈辉,等. 海湾扇贝多糖的纯化、分离及抗肿瘤活性研究[J]. 中国食品学报,2016,16(7):121-127.
[3] 宋苏阳,孙黎明,朱蓓薇,等. 扇贝性腺多糖提取物的抗氧化及免疫调节活性[J]. 食品科学,2012,33(5):248-251.
[4] SONG S,WANG L L,WANG L L,et al. Structural characterization and anticoagulant activity of two polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* viscera[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2019,136:579-585.
[5] 杨大俏,王锦旭,李来好,等. 海洋生物多糖多肽联产制备技术的研究现状[J]. 中国渔业质量与标准,2019,9(2):1-8.
[6] 刘瑀,方志强,刘宇馨,等. 虾夷扇贝多糖提取及纯化方法的优化[J]. 食品科学,2017,38(18):208-213.
[7] 韩莹,曲有乐. 紫贻贝多糖酶法制备工艺研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2016,35(5):395-402.
[8] 陈利华,王欣,成家杨. 硅藻类粗多糖生物剂的制备及其对 Cd^{2+} 的吸附性能[J].环境科学研究,2018,31(8):1439-1449.
[9] 闫景坤. 抗氧化新型冬虫夏草胞外多糖的制备、结构与溶液特征研究[D]. 广州:华南理工大学,2010.
[10] WANG H L,PAMPATI N,MCCORMICK W M,et al. Protein nitrogen determination by kjeldahl digestion and ion chromatography[J]. **Journal of Pharmaceutical Sciences**,2016,105(6):1851-1857.
[11] YAN J K,WANG Y Y,QIU W Y,et al. Purification,structural characterization and bioactivity evaluation of a novel proteoglycan produced by Corbicula fluminea[J]. **Carbohydrate Polymers**,2017,176:11-18.
[12] 刘娜,岳冬,鲁博,等. 黄果番茄果实部分风味品质及氨基酸组成分析[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(10):1081-1087.
[13] 陈杨扬,李娇,王向红,等. 滑子菇多糖的结构及体外生物活性探究[J]. 中国食品学报,2019,19(6):68-73.
[14] WANG L C,LIU Q D,LIU R,et al. Characterizations and microsphere formulation of polysaccharide from the marine clam (*Mactra veneriformis*)[J]. **Carbohydrate Polymers**,2013,92(1):106-113.
[15] ODELEYE T,LI Y,WHITE W L,et al. The antioxidant potential of the New Zealand surf clams[J]. **Food Chemistry**,2016,204:141-149.
[16] LIU X,SUN Z L,ZHANG M S,et al. Antioxidant and anti hyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. **Carbohydrate Polymers**,2012,90(4):1664-1670.
[17] 刘青业,许小娟. 三螺旋多糖的链结构与功能研究进展[J]. 功能高分子学报,2016,29(02):134-152.
[18] 梁涛,张静,张力妮,等. 碱提杏鲍菇多糖 PEAP-1 的结构初探及形貌观察[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(9):951-956.
[19] 刘玉婷,李井雷. 多糖体外抗氧化活性研究进展[J]. 食品研究与开发,2019,40(6):214-219.
[20] 刘继婷,鲁晓丽,张自萍. 不同处理方法对贺兰山紫蘑菇多糖抗氧化活性的影响[J]. 食品科学,2015,36(4):6-10.
[21] 张智猛,万书波,戴良香,等. 不同类型花生品种籽仁部位抗氧化能力及功能成分研究[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(6):741-747.
[22] 姚亚平,曹炜,陈卫军,等. 不同品种荞麦提取物抗氧化作用的研究[J]. 食品科学,2006,27(11):49-52.
[23] 李汉洋,李建杰,王帅,等. 核桃多肽的抗氧化活性及其分子量、氨基酸组成特性研究[J]. 食品工业科技,2018,39(13):1-7,13.
[24] 葛晓鸣,顾伟,徐永健. 海马水解蛋白的氨基酸组成与抗氧化能力的关系[J]. 核农学报,2019,33(2):322-329.
[25] LI Q Y,ZHANG L M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources[J]. **Carbohydrate Polymers**,2008,76(3):349-361.
[26] ZHANG L,LI X L,XU X J,et al. Correlation between antitumor activity,molecular weight,and conformation of lentinan[J]. **Carbohydrate Research**,2005,340(8):1515-1521.
[27] HE P F,ZHANG A Q,ZHANG F M,et al. Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus* sclerotia[J]. **Carbohydrate Polymers**,2016,152:222-230.