

不同方法处理的浒苔的小鼠体内抗氧化活性比较

董晓静¹, 王鹏¹, 伍彬²

(1. 威海海洋职业学院食品工程系, 山东威海 264300) (2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524025)

摘要:本研究比较了三种不同方法处理的浒苔在小鼠体内的抗氧化作用,在衰老模型小鼠灌胃给予浒苔原粉(EO),浒苔多糖(EP),浒苔超声处理粉末(EU-L)低剂量,浒苔超声处理粉末(EU-H)高剂量分别为300 mg/kg·d, 100 mg/kg·d, 300 mg/kg·d, 350 mg/kg·d, 7周后检测其对小鼠血清、肝脏、脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)含量的影响。结果表明,浒苔产品对小鼠体重增长无影响;其中,血清中CAT含量由模型组的6.90U/mL提高到EP组8.79 U/mL, EU-L组8.31 U/mL, EU-H组9.43 U/mL,与模型组对照差异极显著($p<0.01$), EU-H组小鼠血清、肝和脑组织的SOD、GSH-Px、CAT含量均显著高于模型组($p<0.01$);给予浒苔产品的四组小鼠MDA含量均低于模型组9.94U/mL, 7.88U/mg prot, 6.63U/mg prot ($p<0.05$)。说明,浒苔超声粉高剂量组(EU-H)能够有效提高衰老模型小鼠体内抗氧化酶活性,对衰老小鼠的治愈率达90%以上,效果优于浒苔多糖(EP);而且根据剂量比较,浒苔超声粉(EU)可以剂量依赖性地提高衰老小鼠体内抗氧化能力。

关键词: 浒苔; 抗氧化; 超氧化物歧化酶

文章编号: 1673-9078(2019)08-73-77

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.012

Comparison of Antioxidation Activities in a Mouse Model for Enteromorpha Processed with Different Methods

DONG Xiao-jing¹, WANG Peng¹, WU Bin²

(1. Department of Food Engineering, Weihai Ocean Vocational College, Weihai 264300, China)

(2. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: This study compared the antioxidant effects of three *Enteromorpha* products processed with different processing methods in a mouse model. Aged mice were administrated by gavage with enteromorpha original (EO, 300 mg/kg·d), enteromorpha polysaccharide (EP, 100 mg/kg·d), low dose of enteromorpha ultrasound (EU-L, 300 mg/kg·d) or high dose of enteromorpha ultrasound (EU-H, 350 mg/kg·d). The contents of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) in serum, liver and brain tissues of mice were analyzed after 7 weeks. The results showed that all these enteromorpha products had no effect on the weight gain of the mice. The serum CAT content in model group was 6.90 U/mL, which was significantly ($p<0.01$) lower than to those for the EP group (8.79 U/mL), EU-L group (8.31 U/mL) and EU-H group (9.43 U/mL). The contents of SOD, GSH-Px and CAT in serum, liver and brain tissues of the EU-H were significantly ($p<0.01$) higher than the model group. The MDA contents of the four groups fed with enteromorpha products were lower ($p<0.05$) than that of the model group: 9.94 U/mL, 7.88 U/mg prot, 6.63 U/mg prot ($p<0.05$). These results indicate that EU-H effectively improved the activities of antioxidant enzymes in the aged mouse model with the rate of reversing aging over 90%, showing advantages over EP; According to the comparison on dose, EU could increase the antioxidant effect on aged mice in a dose-dependent manner.

Key words: enteromorpha; antioxidation; SOD

浒苔为大型绿藻,属于绿藻门石莼科。在山东沿海,每年暑期绿潮频繁爆发,大量浒苔聚集海岸,对浒苔的主要治理措施是人工打捞和填埋处理,仍然以“治”为主,浪费大量的人力物力。浒苔营养丰富,是高膳食纤维、低脂肪且富含矿物质和维生素的天然理想

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 威海海洋职业学院校级项目(KY201802)

作者简介: 董晓静(1982-),女,硕士研究生,研究方向: 食品加工技术、化学检测

营养食品原料,含有丰富的多糖、氨基酸、微量元素、粗纤维、粗脂肪等^[1]。已有研究表明,浒苔多糖体外对DPPH、过氧化氢等自由基有很高的消除能力,具有良好的抗氧化功能^[2-4];而且,从浒苔分离出来的蛋白质也有明显的功能特性^[5]。所以,浒苔在多个行业,如农业、食品、工业、医药等行业应用比较广泛。但是,目前的加工利用谈不上真正的深加工,这与浒苔的利用价值尚未达到一定的门槛有关。如果能够进一步挖掘浒苔的利用价值,特别是食品价值,克服开与

发利用的瓶颈,推动浒苔加工的产业化进程,将促进浒苔和绿潮的预防和治理,带来巨大的生态效益与经济收益。

浒苔体内实验结果表明,浒苔多糖能够有效提高鸡的免疫力^[6],浒苔对提高动物生产性能及改善畜产品品质也有明显作用^[7]。浒苔饲料化应用既为消除浒苔危害发挥了作用,又可变害为宝,还可节约粮食资源,对于今后采用科学的方法解决浒苔暴发问题和充分利用浒苔资源具有重要的意义。所以将浒苔降解获得的活性成分作为营养强化剂添加于宠物食品中,具有广阔的应用前景。

本文以三种不同方法处理的浒苔为研究对象,进行体内抗氧化活性对比研究,为浒苔在猫犬类宠物食品中的应用提供重要基础研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

浒苔采集于山东沿海;自然干燥得到浒苔干品贮存;D(+)半乳糖,国药集团化学试剂有限公司,超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,丙二醛(MDA)试剂盒,谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)试剂盒,过氧化氢酶(CAT)试剂盒,蛋白质测定试剂盒,都购自南京建成生物工程研究所;雄性昆明(KM)小鼠合格证号SYCK(粤)由广东医学院动物中心提供。

1.2 主要仪器与设备

ES-500E电子天平,长沙湘平科技发展有限公司;BS110S电子分析天平,德国SARTORIUS公司;722s型分光光度计,上海精密仪器仪表有限公司;KQ-300D数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;FW100型高速万能粉碎机,上海科恒实业发展有限公司;真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司。

1.3 方法

浒苔粉(EO):晾干的浒苔,用超微粉碎机打成粉末,即为浒苔粉。

浒苔多糖(EP)的制备:浒苔干品粉碎后→酶解(在最佳料液比与时间条件下,果胶酶与纤维素酶复配使用)→脱色→双层纱布过滤→离心→上清液→醇沉(95%乙醇)→分离沉淀→洗涤→冷冻干燥得浒苔多糖粗品

浒苔超声粉(EU)的制备:按照前期工艺优化最佳条件,浒苔干品粉碎后,采用超声法辅助柠檬酸8.35%,150 W,酸解0.5 h,用Na₂CO₃调节溶液pH至

中性。将浸提液旋转蒸发浓缩,浓缩液冷冻干燥后得到浒苔超声粉。

1.4 浒苔各产品基本成分测定

总糖含量(蒽酮-硫酸法^[8]);蛋白质含量(考马斯亮蓝法);硫酸基含量(明胶-氯化钡沉淀法);氨基酸含量(将17种氨基酸分别测定求和)。

1.5 D-半乳糖致衰老模型的建立及分组设计

本实验选择实验小鼠作为动物模型,在制作衰老模型的药物上,使用最多的是D-半乳糖所致的亚急性衰老模型,它可以引起心、肝、肾、脑等重要器官的代谢异常。D-半乳糖是一种还原性糖,它可以建立高级甘油最终产物,被习惯用于诱导衰老模型^[9-11]。《保健食品检验与评价技术规范》中,抗氧化功能检验方法要求采用8-12月龄老年小鼠进行试验或通过给予成年小鼠D-半乳糖诱导老化形成进行试验^[12]。

将昆明种小鼠90只适应性饲养3 d,然后随机挑选15只作为空白对照组,其余75只按文献报道的方法建立模型^[13],按200 mg/kg·d腹腔注射D-半乳糖,连续注射28 d。每周称一次体重。28 d之后,从空白对照组和腹腔注射组分别取3只小鼠,眼球取血检测抗氧化酶水平,注射组与空白对照组的差异显著说明建模成功。

1.6 体内抗氧化活性检测指标

建模成功后,将注射组分为空白对照组,模型对照组,Vc对照组,浒苔粉(EO)组、浒苔多糖(EP)组、浒苔超声粉(EU-L)低剂量组和浒苔超声粉(EU-H)高剂量组。其中,三种浒苔产品添加量浒苔原料质量大体相等。每组12只小鼠,每天进行灌胃给药,已有体外实验证明浒苔多糖具有抗氧化活性^[14],以其效果为参照。空白对照组和模型对照组每天灌喂等体积的生理盐水,Vc对照组添加量为2 mg/kg·d,浒苔粉(EO)组、浒苔多糖(EP)组、浒苔超声粉(EU-L)低剂量组和浒苔超声粉(EU-H)高剂量组添加量分别为300 mg/kg·d、100 mg/kg·d、300 mg/kg·d、350 mg/kg·d。7周后,眼球取血,同时取肝脏和脑,检测血清、肝脏及脑中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶的含量,同时测定氧化生成物丙二醛(MDA)的量。

1.7 数据处理

试验数据均用平均值±标准差表示,用SPSS软件对数据进行单因素方差分析,进行多重比较, $p < 0.05$

表示差异显著。

2 结果

2.1 浒苔样品的主要成分

对浒苔粉、浒苔多糖和浒苔超声粉三种浒苔样品主要组成成分进行检测分析, 分析结果见表1。

表1 三种浒苔样品的主要组成成分

Table 1 The composition of three samples of enteromorpha

浒苔三种产品	浒苔粉	浒苔多糖	浒苔超声粉
总糖/%	42.83	93.26	57.62
粗蛋白/%	17.47	-	18.21
纤维素/%	65.81	-	24.74
多糖/%	6.60(得率)	87.47	27.25
硫酸基/%	x	11.52	7.43
氨基酸/%	16.04	0.08	23.13

注: -:未检出, x:未检测。

从表1中可以看出, 浒苔粉和浒苔超声粉的组成纤维素差别较大, 说明超声波辅助酸解能够有效降解纤维素, 三种浒苔样品中纤维素、总糖及粗蛋白在总成分中占80%以上, 浒苔超声粉(EU)中氨基酸含量明显高于浒苔多糖; 经过超声处理, 浒苔中50%以上纤维素可以被降解, 离解出氨基酸含量比原粉稍高, 多糖含量增高明显, 说明经过超声辅助柠檬酸处理可以有效提取及分离多糖、氨基酸等活性成分。

2.2 实验前后小鼠体重的变化比较

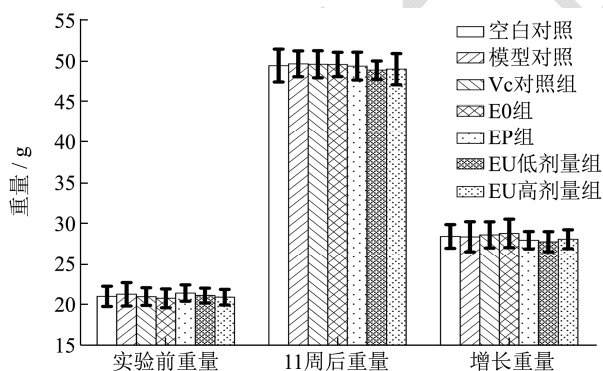


图1 小鼠在实验前及11周后各实验组的体重变化

Fig.1 Weight change of the mice before and after

11-week-experiment ($\bar{x} \pm s$, n=12)

实验前小鼠体重要求均匀, 且在20 g左右。实验前后小鼠体重的变化见图1。

由图1可知, 几组实验小鼠的体重在实验前后基本一致, 组间差异不显著, 说明浒苔三种产品的添加对小鼠的生长、食欲、觅食、消化及其物质代谢不存在显著影响。

2.3 浒苔产品对致衰小鼠SOD水平的影响

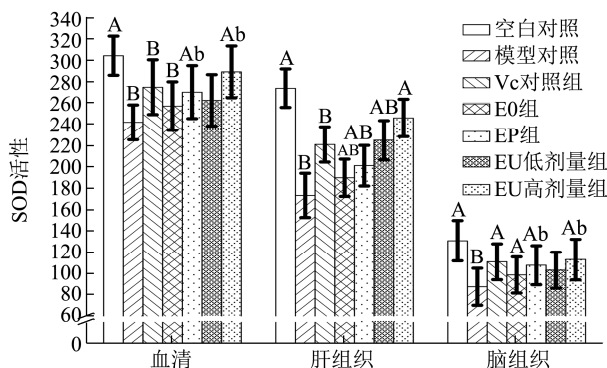


图2 浒苔对D-半乳糖致衰小鼠SOD的影响

Fig.2 Effect of Enteromorpha on the activity of SOD in D-gal induced aging mice (n=12, $\bar{x} \pm s$)

注: a: $p < 0.05$, A: $p < 0.01$ vs模型组; b: $p < 0.05$, B: $p < 0.01$ vs空白组。

三种浒苔产品及Vc参照组对致衰小鼠SOD水平的影响分析结果见图2。

由图2可看出, 与模型组相比, 各组都具有统计学的意义。浒苔超声粉(EU-H)高剂量组血清中SOD含量289.23 U/mL、脑组织中含量达到113.24 U/mg prot; 浒苔多糖(EP)组血清中含量达到270.17 U/mL和脑中组织的SOD含量达107.92 U/mg prot显著高于模型组241.76 U/mL、87.62 U/mg prot, 差异极显著($p < 0.01$), 但与空白组血清中304.42 U/mL, 13.93 U/mg prot比较有差异($p < 0.05$), 说明对衰老的预防效果较好, 而对衰老小鼠的治疗效果较弱, 浒苔超声粉(EU-H)高剂量组, 与空白组差异不显著, 说明高剂量超声浒苔粉末对衰老小鼠的治疗有一定作用; 四组灌胃浒苔产品小鼠肝脏中的SOD含量分别为EO组189.76 U/mg prot, EP组201.06 U/mg prot, EU-L组224.90 U/mg prot, EU-H组245.91 U/mg prot均显著高于模型组173.28 U/mg prot ($p < 0.01$), 与空白组273.89 U/mg prot差异显著, 说明等量条件下浒苔多糖在动物体内对SOD的提高作用弱于浒苔超声粉, 浒苔经过超声处理后, 未进行蛋白及油脂、色素等活性物质脱除处理, 可能部分氨基酸或浒苔中的挥发油、色素等起到协助抗氧化作用^[15,16]。

2.4 对致衰小鼠GSH-Px水平的影响

三种浒苔产品及Vc参照对致衰小鼠GSH-Px水平的影响分析结果见图3。

由图3看出, EU-L和EU-H组小鼠血清中GSH-Px含量分别为15.59 U/mg prot和16.26 U/mg prot, 脑组织中含量11.62 U/mg prot, 12.39 U/mg prot均显著高于模

型组血清和脑组织中9.56 U/mg prot、8.15 U/mg prot 含量 ($p < 0.01$); EO组小鼠血清、肝组织及脑组织中GSH-Px含量分别为10.72 U/mg prot、23.17 U/mg prot, 8.89 U/mg prot都与模型对照组9.56 U/mg prot、22.93 U/mg prot, 8.15 U/mg prot差异不显著; EP组小鼠肝脏中GSH-Px含量28.21 U/mg prot提高明显 ($p < 0.01$), 而血清中和脑组织中含量分别为13.33 U/mg prot, 9.61 U/mg prot与模型组差异不显著; EU-H组血清、脑组织中GSH-Px含量分别为16.26 U/mg prot, 12.39 U/mg prot与空白组17.05 U/mg prot, 13.79 U/mg prot差异不显著, 说明浒苔经过超声处理后相对于浒苔原粉, 对致衰小鼠GSH-Px水平, 有明显提高作用, 动物不能消化吸收的浒苔中的大分子物质成分, 经过超声处理产生的多糖、氨基酸、挥发油等活性物质具有抗氧化作用, 浒苔超声粉对致衰老小鼠的治疗有作用。

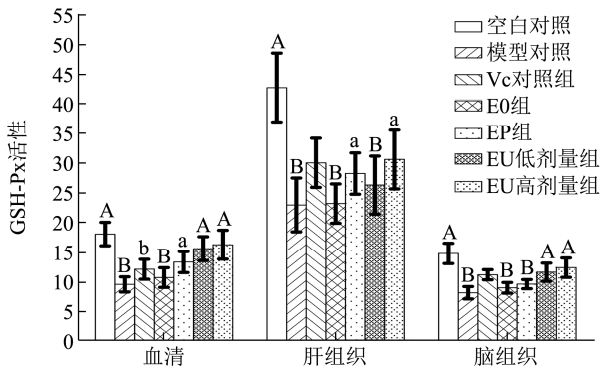


图3 浒苔对D-半乳糖致衰老小鼠GSH-Px的影响

Fig.3 Effect of Enteromorpha on the activity of GSH-Px in D-gal induced aging mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

注: a: $p < 0.05$, A: $p < 0.01$ vs模型组; b: $p < 0.05$, B: $p < 0.01$ vs空白组。

2.5 对致衰老小鼠MDA水平的影响

三种浒苔产品及VC参照对致衰老小鼠MDA水平的影响分析结果见图4。

图4显示, EU-H组小鼠血清中MAD含量8.11 U/mL, EU-L组、EP组小鼠的肝、脑组织中MDA含量分别为6.73 U/mg prot, 5.87 U/mg prot与模型组血清含量6.94 U/mL, 肝组织7.88 U/mg prot, 脑组织6.63 U/mg prot都有差异 ($p < 0.05$), 而EU-L和EU-H两个剂量组肝脏中MDA含量6.56 U/mg prot, 6.16 U/mg prot与空白组5.96 U/mg prot差异不显著, 说明浒苔多糖(EP)和浒苔超声粉高剂量(EU-H)组能有效对抗小鼠血清、肝脏和脑中MDA含量升高, 与Zhongshan等^[17]研究结果一致, 浒苔多糖可以用作体内抗氧化剂, 体内抗自由基效果良好; 而本实验结果表明, 浒苔超声粉高剂量组中的氨基酸含量相对浒苔多糖组含量较高, 可能

多糖与氨基酸协同作用或其他活性成分(色素等)能够起到更好的抗氧化作用^[18]。

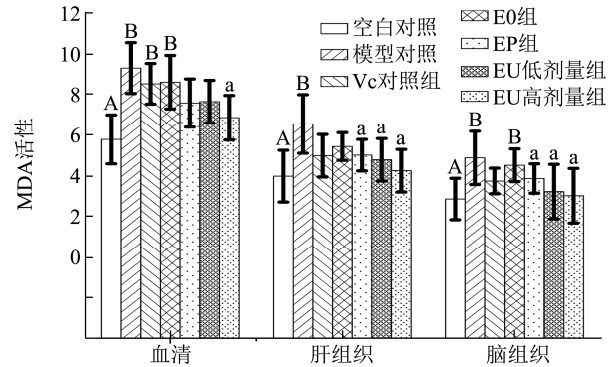


图4 浒苔对D-半乳糖致衰老小鼠MDA的影响

Fig.4 Effect of Enteromorpha on the activity of MDA in D-gal induced aging mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

注: a, $p < 0.05$, A, $p < 0.01$ vs模型组; b, $p < 0.05$, B, $p < 0.01$ vs空白组。

2.6 对致衰老小鼠CAT水平的影响

三种浒苔产品及Vc参照对致衰老小鼠CAT水平的影响分析结果见图5。

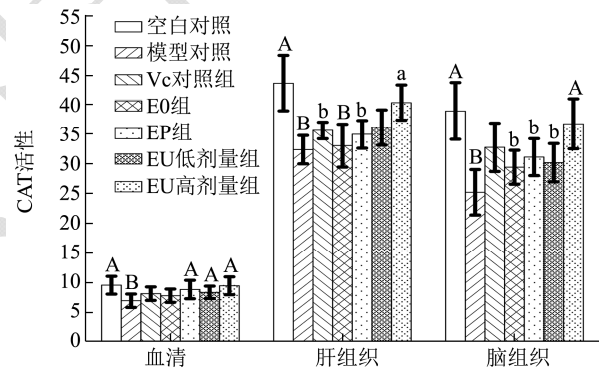


图5 浒苔对D-半乳糖致衰老小鼠CAT的影响

Fig.5 Effect of enteromorpha on the activity of CAT in D-gal induced aging mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

注: a: $p < 0.05$, A: $p < 0.01$ vs模型组; b: $p < 0.05$, B: $p < 0.01$ vs空白组。

由图5看出, 添加浒苔样品的各组血清、肝脏和脑中CAT含量均高于模型组, 其中EU-H、EU-L、EP组的血清中CAT含量分别为9.43 U/mL、8.31 U/mL、8.79 U/mL, 与模型组6.90 U/mL差异显著 ($p < 0.01$), 浒苔超声粉高剂量组(EU-H)脑组织中CAT含量36.76 U/mg prot显著高于模型组25.22 U/mg prot ($p < 0.01$), 浒苔多糖组的血清8.79 U/mL和脑组织中CAT的含量31.12 U/mg prot与空白组9.52 U/mL, 38.93 U/mg prot差异显著, 说明浒苔超声粉和浒苔多糖可提高小鼠血清、肝脏和脑中CAT含量。

3 结论

3.1 体内抗氧化实验结果表明, 浒苔多糖对致衰小鼠体内抗氧化酶有显著的提高作用, 与已有的体外抗氧化作用研究结果一致。同一条件下, 浒苔超声波处理粉体内抗氧化效果优于浒苔粉。因为, 经过超声波辅助酸处理, 破坏了浒苔细胞壁, 原来动物消化不了的纤维素、果胶等大分子被分解为活性小分子, 动物摄入后能被消化吸收, 抗氧化效果更明显; 浒苔超声波处理粉体内抗氧化效果, 也明显优于浒苔多糖, 原因可能是浒苔超声波处理粉中除了多糖具有抗氧化功能性外, 其没有进行脱除脂类、蛋白及色素等操作, 其中的不饱和脂肪酸、氨基酸及色素等, 都可以起到抗氧化作用。

3.2 由于对浒苔体内抗氧化作用机理的研究才刚刚起步, 很多作用机理还停留在猜测阶段, 但是可以肯定的是浒苔的抗氧化作用与其成分及结构有关。本研究可以为浒苔在宠物中的应用提供有效研究, 但是具体各成分作用机理, 还有待进一步的研究与探讨。

参考文献

- [1] 单俊伟, 刘海燕, 马栋, 等. 浒苔的研究与资源化利用进展[J]. 现代农业科技, 2016, 15: 258-260
SHAN Jun-wei, LIU Hai-yan, MA Dong, et al. Research and resource fulization application progress of enteromorpha [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016, 15: 258-260
- [2] Jin-Kyung Kim, Myoung Lae Cho, et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(5): 1050-1058
- [3] Fracassetti D, Costa C, Moulay L, et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*) [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 578-588
- [4] Daniela Fracassetti, Carlos Costa, et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*) [J]. Tomás-Barberán. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 578- 588
- [5] 高玉杰, 吕海涛. 酸法降解浒苔多糖及其清除羟自由基活性研究[J]. 食品科学, 2013, 16(34): 62-66
GAO Yu-jie, LYU Hai-tao. Acid-catalyzed degradation of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and hydroxyl radical scavenging activity of degradation products [J]. Food Science, 2013, 16 (34): 62-66
- [6] 李剑玄. 浒苔蛋白质的分离提取机器功能特性的研究[D]. 武汉: 武汉工学院, 2010
LI Jian-xuan. Study on the extraction and functional properties of *Enteromorpha prolifera* isolate [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2010
- [7] 孙秋艳, 沈美艳, 朱明恩, 等. 浒苔多糖对鸡免疫增强效果的研究[J]. 动物医学进展, 2018, 39(1): 51-55
SUN Yan-qi, SHEN Mei-yan, ZHU Ming-en, et al. Evelopment of a LAMP approach for rapid detection of *Avibacterium paragallinarum* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(1): 51-55
- [8] 许莉莉. 浒苔多糖酶解产物的分离纯化及活性研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013
XU Li-li. Isolation, purification and activity evaluation of enzymatic hydrolysate of *Enteromorpha prolifera* polysaccharide [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2013
- [9] 谭海刚, 梅英杰, 关凤梅, 等. 蒽酮一硫酸法测定酵母中海藻糖的含量[J]. 现代食品科技, 2006, 22(1): 125-126
TAN Hai-gang, MEI Ying-jie, GUAN Feng-mei, et al. Determination of trehalose content by anthrone- sulphuric acid colorimetric method [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22 (1): 125-126
- [10] 李薇, 郝吉, 张浪, 等. 石榴籽油在 D-半乳糖诱导的衰老小鼠体内的抗氧化作用[J]. 中国油脂, 2018, 43(2): 55-59, 64
LI Wei, HAO Ji, ZHANG Lang, et al. Antioxidant activity of *Punica granatum* seed oil on aging model mice induced by D-galactose [J]. China Oils and Fats, 2018, 43 (2): 55-59, 64
- [11] YU H Y, WANG L. Characterization of yogurts made with milk solids nonfat by rheological behavior and nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24 (4): 804-812
- [12] Kalantatria H, Foruozandeha H, Khodayar M J, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Capparis spinosa* L. fractions and quercetin on tertbutyl hydroperoxide-induced acute liver damage in mice [J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2018, 8 (1): 120-127
- [13] 赵凡凡, 周玉枝, 高丽, 等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展[J]. 药学报, 2017, 52(3): 347-354
ZHAO Fan-fan, ZHOU Yu-zhi, GAO Li, et al. Advances in the study of the rat model of aging induced by D-galactose [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2017, 52 (3): 347-354

(下转第 12 页)