

大鲵低聚糖肽性质初步研究

冯叙桥¹ 曲敏¹ 于新莹² 李伟^{2,3,*} 王文莉² 佟长青^{2,4} 孔亮⁵ 金桥²

(1.沈阳农业大学食品学院,辽宁沈阳 110161;

2.大连海洋大学食品工程学院,辽宁大连 116023;

3.张家界(中国)金驰大鲵生物科技有限公司,湖南张家界 427400;

4.东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心,东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室,黑龙江哈尔滨 150040;

5.大连海洋大学海洋环境工程学院,辽宁大连 116023)

摘要:采用化学方法对大鲵低聚糖肽的氨基酸组成、糖组成及糖肽连接方式进行了初步研究。结果表明,大鲵低聚糖肽含蛋白量为 80.01%、总糖含量为 15.15%。其含有的氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸及唾液酸分别为 3.39%、0.65%、2.45% 和 0.60%。其氨基酸组成中,苏氨酸的含量最高,达 13.1%,其次是脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、精氨酸、苯丙氨酸等。大鲵低聚糖肽的 β -消旋反应和血凝集反应,表明大鲵低聚糖肽中糖肽键以 O-连接的形式存在。

关键词:大鲵低聚糖肽,氨基酸组成,糖组成, β -消旋反应

Study on properties of glycopeptides from *Andrias davidianus*

FENG Xu-qiao¹ , QU Min¹ , YU Xin-ying² , LI Wei^{2,3,*} , WANG Wen-li² ,
TONG Chang-qing^{2,4} , KONG Liang⁵ , JIN Qiao²

(1.College of Food Science ,Shenyang Agriculture University ,Shenyang 110161 ,China;

2.College of Food Engineering ,Dalian Ocean University ,Dalian 116023 ,China;

3.Jinchi Giant Salamander Biological Technology Co. ,Ltd. ,Zhangjiajie(China) ,Zhangjiajie 427400 ,China;

4.Alkali Soil Natural Environmental Science Center ,Northeast Forestry University/Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field ,Ministry of Education ,Harbin 150040 ,China;

5.College of Marine Environmental Engineering ,Dalian Ocean University ,Dalian 116023 ,China)

Abstract: The amino acid composition ,carbohydrates composition and glucosidic linkage of glycopeptides prepared from *Andrias davidianus* was studied by chemical methods.The results showed the content of soluble proteins and total carbohydrate in glycopeptides were determined as 80.01% and 15.15% ,respectively. The glycopeptides contained 3.39% glucosamine ,0.65% glucuronic acid ,2.45% galacturonic acid and 0.60% sialic acid.Amino acid composition of glycopeptides from *Andrias davidianus* was rich in threonine ,proline ,alanine , leucine , arginine and phenylalanine , lacking in tryptophan. According to β - elimination reaction and hemagglutination ,the linkage between the polysaccharide moiety and peptide of glycopeptides might belong to O-glucosidic linkage.

Key words: glycopeptides of *Andrias davidianus*; amino acid composition; carbohydrates composition; β -elimination reaction

中图分类号:TS201

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2012)06-0128-04

大鲵(*Andrias davidianus*)是现存个体最大的两栖动物,属国家二类保护动物。在我国广泛分布,主要产于长江、黄河及珠江中上游支流的山溪河流中,尤以四川、湖北、湖南、贵州、陕西等省为多^[1]。大鲵营养价值高,含有优质蛋白质和丰富的氨基酸、微量

元素。其机体中含有 50 多种天然生物活性物。这些生物活性物在食用、药物、化妆品、健康食品等方面具有独特的研发价值^[2]。本实验室从大鲵体表黏液中制备出大鲵低聚糖肽,通过小鼠抗疲劳实验,发现其具有抗疲劳功能^[3]。大鲵低聚糖肽还具有良好的吸湿性和较强的抗紫外线活性^[4]。本文对大鲵低聚糖肽的氨基酸组成、糖组成及糖肽连接方式进行了初步研究,以期为以后研究大鲵低聚糖肽活性提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期:2011-06-27 * 通讯联系人

作者简介:冯叙桥(1961-),男,教授,研究方向:食品质量与安全。

基金项目:国家自然科学基金(31071612);国家自然科学基金(21075012);

湖南省科学计划厅科技计划项目(2010FJ6096);张家界市科技局科技计划项目(2010ZD019)。

表1 大鲈低聚糖肽的基本组成

Table 1 The composition of glycopeptides from *Andrias davidianus*

成分 含量(%)	总糖 15.15	总蛋白 80.01	氨基葡萄糖 3.39	葡萄糖醛酸 0.65	半乳糖醛酸 2.45	唾液酸 0.60
-------------	-------------	--------------	---------------	---------------	---------------	-------------

大鲈低聚糖肽 2010年11月由辽宁省水产品加工及综合利用重点开放实验室制备; 吡啶、无水乙醇、四硼酸钠、间羟基联苯、乙酰丙酮、对-二甲苯甲醛、无醛乙醇、间苯二酚、硫酸铜、乙酸丁酯-丁醇(体积比4:1)、盐酸、浓硫酸等试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 大鲈低聚糖肽基本组成测定 准确称取0.5g大鲈低聚糖肽,于100mL容量瓶中定容,制得大鲈低聚糖肽溶液,备用。

1.2.1.1 蛋白含量测定 采用Follin-酚法^[5]。取大鲈低聚糖肽溶液20 μ L,置于干净的试管内,加5mL Follin甲液,置于25 $^{\circ}$ C水浴中10min后,加入0.5mL Follin试剂乙,继续水浴30min,于500nm处测量吸光值。

1.2.1.2 糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[6]。取0.1mL大鲈低聚糖肽溶液,加入1mL 6%苯酚溶液后,加5mL H₂SO₄静置20min,于490nm处测量吸光值。

1.2.1.3 盐酸氨基葡萄糖含量测定 采用乙酰丙酮法^[7]。取大鲈低聚糖肽溶液0.5mL,置于干燥的具塞比色管中,加水至5.0mL,然后加1.0mL乙酰丙酮溶液,摇匀,于沸水浴中加热25min,取出,冷却。加对-二甲苯甲醛溶液1.0mL,摇匀,60 $^{\circ}$ C水浴1h,放置冷却,于525nm处测量吸光值。

1.2.1.4 半乳糖醛酸含量测定 采用硫酸吡啶法^[8]。取大鲈低聚糖肽溶液1.0mL,置于干燥的具塞比色管中,冰水浴中加入四硼酸钠-硫酸溶液5.0mL,混匀后,沸水浴加热20min,取出后立即冷却至室温,加0.15%吡啶溶液0.2mL,摇匀,在室温下保持2h,在530nm处测量吸光值。

1.2.1.5 葡萄糖醛酸含量 采用间羟联苯法^[9]。取大鲈低聚糖肽溶液0.5mL,加入试管中,置冰水浴中,加入4.5mL四硼酸钠-硫酸溶液,继续冷却,充分振荡,将试管置于沸水浴中加热10min,立即放入冰水浴中冷却,加入0.05mL 0.15%间羟基联苯溶液,充分振荡,静置20min,在525nm处测量吸光值。

1.2.1.6 唾液酸含量测定 采用间苯二酚法^[10]。取大鲈低聚糖肽溶液1.0mL,置于干净的试管内,加间苯二酚-盐酸溶液(分别量取2%间苯二酚溶液2.5mL,0.1mol/L硫酸铜溶液62.5 μ L,25%盐酸溶液20mL,加水稀释至25mL,混匀。实验前4h内配制)1mL,沸水浴30min,取出置冰浴3min,加乙酸丁酯-丁醇液(乙酸丁酯-丁醇的体积比4:1)2mL,充分混匀,室温放置10min,在580nm处测量吸光值。

1.2.2 大鲈低聚糖肽氨基酸组成分析 将大鲈低聚糖肽干燥至恒重,取一定量样品在6mol/L盐酸中,在110 $^{\circ}$ C条件下消化24h,脱酸后,用水定容至5mL,在氨基酸自动分析仪上测定样品中氨基酸的组成。

1.2.3 β -消旋反应测定糖肽键连接方式 准确称取大鲈低聚糖肽样品5mg,溶于3mL蒸馏水中,然后将

样品溶液分成两等份,各1.5mL。其中一份加入1.5mL蒸馏水;另一份加入1.5mL 0.4mol/L NaOH溶液,反应2h后,两份溶液分别在200~400nm范围内进行紫外光谱扫描,得到 β -消除反应前后紫外扫描图^[11]。

1.2.4 血细胞凝集法测定糖肽键连接方式 采用专一性识别-Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr结构的凝集素(CAL,海绵凝集素),进行三组B型红细胞凝集实验。第一组在红细胞悬液中加入凝集素;第二组红细胞悬液;第三组在红细胞悬液中加入凝集素和大鲈低聚糖肽。室温孵育30min后,显微镜下观察红细胞凝集现象。

1.2.5 红外光谱测定 取一定量的大鲈低聚糖肽干粉与KBr混合压片,在400~4000cm⁻¹范围内进行红外光谱扫描。

2 结果与分析

2.1 大鲈低聚糖肽基本组成分析

经化学分析方法测定大鲈低聚糖肽的基本组成,结果见表1。大鲈低聚糖肽中总糖含量为15.15%,总蛋白含量为80.01%。其中盐酸氨基葡萄糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸和唾液酸含量分别为3.39%、0.65%、2.45%和0.60%。葡萄糖醛酸具有抗肿瘤、抗凝血、增强机体免疫力的作用,是刺参酸性粘多糖的主要成分^[12]。唾液酸具有提高人体免疫力、抗痴呆、提高记忆力和智力的作用,是燕窝的主要功能成分^[13]。因此,组成大鲈低聚糖肽的糖成分对人体具有保健功能。

大鲈低聚糖肽的氨基酸组成见表2。由表2可知,大鲈低聚糖肽中所含的18种氨基酸中除色氨酸未测出外,人体其它7种必需氨基酸(苏氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸)和组氨酸(婴儿所必需的氨基酸)的含量均较高。其中必需氨基酸中苏氨酸含量最为丰富,高达13.1%。其次是天冬氨酸/酰胺(Asx)和谷氨酸/酰胺(Glx)分别为11.2%和12.5%。而丝氨酸含量最低为0.2%。

精氨酸为人体半必需氨基酸,有良好的降血压作用。苯丙氨酸是人体肾上腺素、甲状腺和黑色素合成的原料。组氨酸对婴幼儿也属于必需氨基酸,在新生儿及儿童生长发育期起着非常重要的作用。它具有抗溃疡和促进细胞再生的作用,幼儿缺乏组氨酸将导致贫血^[14]。由此可见,大鲈低聚糖肽具有潜在的多种保健功能。

2.2 大鲈低聚糖肽键特征分析

β -消旋反应是一种鉴定糖肽键中是否存在O-连接糖肽键的常用方法,O-连接糖肽键在碱作用下很容易断裂。糖肽键在用碱处理时,与O-糖肽键连接的丝氨酸生成 α -氨基丙烯酸,苏氨酸生成 α -氨基丁烯酸,这种不饱和氨基酸的形成,在240nm波长处紫外吸收增强^[15]。其 β -消旋反应前后大鲈低聚

糖肽的紫外吸收图谱如图1。由图1可见,在240nm处 β -消旋反应后大鲵低聚糖肽的紫外吸收显著增强,说明大鲵低聚糖肽中存在O-连接糖肽键。

表2 大鲵低聚糖肽氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of glycopeptides from *Andrias davidianus*

氨基酸	摩尔百分含量(%)	氨基酸	摩尔百分含量(%)
苏氨酸 Thr	13.1	苯丙氨酸 Phe	4.7
丝氨酸 Ser	0.2	组氨酸 His	2.6
脯氨酸 Pro	8.9	赖氨酸 Lys	5.3
甘氨酸 Gly	2.4	精氨酸 Arg	6.5
丙氨酸 Ala	8.5	甲硫氨酸 Met	2.5
缬氨酸 Val	5.7	半胱氨酸 Cys	1.2
异亮氨酸 Ile	3.6	天冬氨酸/酰胺 Asx	11.2
亮氨酸 Leu	8.0	谷氨酸/酰胺 Glx	12.5
酪氨酸 Try	3.1	色氨酸 Trp	-

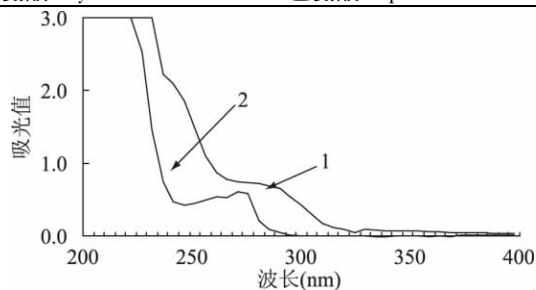


图1 大鲵低聚糖肽 β -消除反应前后紫外扫描图

Fig.1 The glycopeptides UV spectrum before and after β -elimination reaction

注:1. β -消旋反应;2.未进行 β -消旋反应。

从图2-A可以看出,在血红细胞中加CAL,血红细胞出现凝集现象。因为血细胞表面受体与凝集素结合。图2-B为对照组,血红细胞未发生凝集现象。图2-C为在血红细胞中加CAL,同时加入大鲵低聚糖肽,可以看出血红细胞未发生凝集现象。这是因为大鲵低聚糖肽与凝集素结合,阻碍了凝集素与血红细胞表面受体的结合。这从另一方面证明了大鲵低聚糖肽中存在O-连接糖肽键。

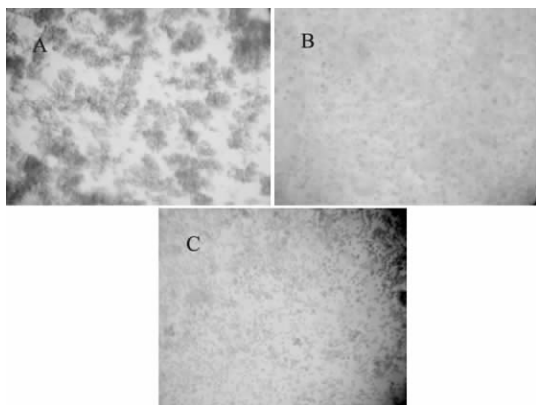


图2 血红细胞凝集现象测定

Fig.2 Assay of hemagglutination

注:A.加入凝集素;B.不加凝集素;
C.加入大鲵低聚糖肽与凝集素。

2.3 大鲵低聚糖肽红外光谱分析

从大鲵低聚糖肽红外光谱看(图3),3275.2、1653.3、1454.9 cm^{-1} 显示结构中存在酰胺官能团;3063.8 cm^{-1} 显示有咪唑环官能团;2962.3、1402.3 cm^{-1} 为羟基特征峰。红外光谱图反映了蛋白质结构中的肽键、咪唑环以及糖链上的羟基。

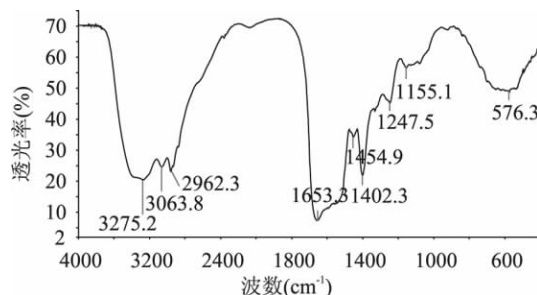


图3 大鲵低聚糖肽的红外图谱

Fig.3 FT-IR spectrum of glycopeptides from *Andrias davidianus*

3 结论

对大鲵低聚糖肽含有的氨基酸进行了研究,发现它的氨基酸种类较丰富,其中必需氨基酸中苏氨酸含量最为丰富。对它的糖组成进行的研究表明,它的糖成分基本组成为氨基糖、酸性糖以及中性糖等。同时,发现大鲵低聚糖肽中存在O-连接糖肽键。具有O-连接糖肽键的糖肽,往往具有免疫活性,因此大鲵低聚糖肽在保健食品开发方面具有重要价值。

参考文献

- [1] 伦峰,潘开宇.大鲵的生物学特性与人工养殖技术[J].信阳农业高等专科学校学报,2010,20(3):114-116.
- [2] 金立成.娃娃鱼的经济价值市场前景与保护[J].农业科技通讯,2003(4):26-27.
- [3] 李伟,于新莹,佟长青,等.大鲵黏液酶解产物的制备及其抗疲劳作用研究[J].食品工业科技,2011,32(6):146-148,151.
- [4] 王睿,李伟,孔亮,等.大鲵糖肽润肤霜的制备及性能评价[J].广州化工,2011,39(6):47-49.
- [5] 张龙祥,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1997.
- [6] Dubois M, Gilles KA, Hamilton IK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analyt Chem, 1956, 28: 350-356.
- [7] 韩宝芹,位晓娟,房子,等.羧甲基壳聚糖中氨基葡萄糖含量测定方法的研究[J].中国海洋大学学报,2004,34(5):811-815.
- [8] 王文平,郭祀远,李琳,等.野木瓜多糖中糖醛酸含量测定[J].食品科学,2007(10):84-86.
- [9] 许会生,张铁军,赵广荣,等.一种测定酸性多糖尿中糖醛酸和中性糖含量的改良方法[J].食品工业科技,2007,28(7):197-199.
- [10] 王冰清,曾繁霞.间苯二酚显色法测定重组人红细胞生成素原液中唾液酸含量[J].辽宁医药,2003,18(2):19-21.
- [11] Zhang Y, Liu WT, Li GY, et al. Isolation and characterization of a novel pepsin-soluble collagen from the skin

胡桃醌抑制细菌生长作用的研究

吴朝霞^{1,2}, 金楠¹, 张敏¹, 张旋¹

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866;

2. 沈阳农业大学营养、质量与安全研究所, 辽宁沈阳 110866)

摘要:目的: 以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为研究对象, 探讨胡桃醌对微生物不同阶段生长及形态特征的影响, 为胡桃醌抑菌机理的研究奠定基础。方法: 采用紫外分光光度计和平板计数法绘制生长曲线, 通过透射电镜观察菌体形态特征的变化。结果: 大肠杆菌的迟缓期和对数期受到胡桃醌的抑制作用明显; 处于对数期的金黄色葡萄球菌对胡桃醌的抑制作用更为敏感。透射电镜的结果表明, 最低抑菌浓度下的胡桃醌作用大肠杆菌 2h, 菌体即出现细胞质壁分离现象, 细胞质分布不均匀; 8h 后, 细胞壁破坏严重, 内容物流出。胡桃醌作用金黄色葡萄球菌 4h, 菌体细胞吸水膨胀, 部分细胞隔膜已被破坏。8h 后, 菌体互相粘连, 细胞与细胞间的界限变得模糊。结论: 胡桃醌的抑菌效果主要表现在细菌生长的对数期, 并可能通过破坏菌体的细胞壁或细胞膜结构来抑制细菌的生长。

关键词: 胡桃醌, 大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, MIC, 细菌形态

Study on the effect of juglone on inhibiting bacterial growth

WU Zhao-xia^{1,2}, JIN Nan¹, ZHANG Min¹, ZHANG Xuan¹

(1. Food Science College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Institute of Food Nutrition, Quality and Safety of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Objective: The effect of juglone on *S.aureaus* and *E.coli* growth in different stages and morphological characteristics were studied, so as to discover the antibacterial mechanism of juglone. Method: The UV spectrophotometer and enumeration platecount method were used to determine cell growth curves. Observations of bacteria morphological characteristics were conducted by Transmission electron microscopy (TEX). Result: The result showed that the growth of *E.coli* in lag phase and log phase were obviously influenced by juglone. While for *S.aureaus*, its growth in log phase was more sensitive to juglone. Result from observation by TEX showed that the cytoplasm was concentrated and the cell was plasmolysed 2 hours after adding juglone to cultivative medium at minimum inhibition concentration (MIC). The cell wall was damaged seriously and the contents were leaked out after 8 hours. While for *S.aureaus*, the cells absorbed water to expand, and part of the cell membrane was destroyed 4 hours after adding juglone to cultivative medium at MIC. Eight hours later, bacterial were adherent and boundaries tended to be illegible. Conclusion: It was suggested that juglone might influence bacterial growth at logarithmic stage. Also, it might inhibit growth of bacteria through damaging cell wall or cell membrane.

Key words: juglone; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; MIC; bacteria morphological

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)06-0131-04

胡桃醌(5-羟基-1,4-萘醌)是从核桃楸中提取出来的一种萘醌类活性物质,具有明显抑菌和抗癌作用^[1-5]。同时对害虫^[6]、微生物^[7]等显示卓越的影响,其生物活性探讨也倍受注目^[8-9]。胡桃醌的抗菌

活性可应用于天然防腐剂方面^[10]。目前,国内对胡桃醌的研究内容包括胡桃醌检测方法、抑菌作用、抑制植物病原菌的生长、杀虫、杀螨、抗肿瘤、对某些人类病原菌的作用效果及机理、安全性等方面。该物质对食品中常见细菌和真菌的作用机理研究报道的很少,其抑菌防腐的机理仍不明确。本研究将以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌做为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的代表进行抑制细菌生长作用的研究,为

收稿日期: 2011-06-28

作者简介: 吴朝霞(1971-),女,副教授,研究方向: 食品营养、天然产物研究。

基金项目: 辽宁省科学技术基金项目(20102195)。

of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2007, 103: 906-912.

[12] 刘桂敏, 赵秀梅, 陈菊娣, 等. 刺参酸性粘多糖的质量标准及稳定性研究[J]. 河北医药, 2004, 26(5): 398-399.

[13] 冯婷玉, 薛长湖, 孙通, 等. 燕窝中唾液酸的 DAD/FLD 串

联 HPLC 测定方法研究[J]. 食品科学, 2010(8): 233-236.

[14] 武履青. 开发氨基酸营养保健剂提高国民健康素质[J]. 中国制药信息, 2010, 26(6): 38-40.

[15] 任国艳, 李八方, 侯玉泽, 等. 海蜇头糖蛋白基本组成及结构[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7): 121-125.