

文章编号:1673-1689(2009)01-0076-05

甘薯水溶性糖蛋白的分离纯化及结构初探

赵梅¹, 于春娣¹, 丁霄霖²

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109; 2. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要: 采用二乙基氨基纤维素 DEAE-52 和葡聚糖凝胶 G100 柱层析法, 从甘薯中分离纯化甘薯糖蛋白, 并对其结构进行了初步探讨。研究表明, 糖蛋白纯品呈白色, 易溶于水; 蛋白质质量分数为 61.2%, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对糖蛋白进行纯度鉴定, 结果显示只有一条谱带。气相色谱分析表明甘薯糖蛋白中糖链部分含有鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖; 红外光谱和 β -消去反应表明: 甘薯糖蛋白中含有 α -糖苷键, 糖苷键类型主要为吡喃型; 糖与蛋白的肽链之间的连接点类型是 O-糖肽键。

关键词: 甘薯; 糖蛋白; 分离; 结构

中图分类号: S 531

文献标识码: A

Studies on Isolation, Purification and Identification of Sweet Potato Glycoprotein

ZHAO Mei¹, YU Chun-di¹, DING Xiao-lin²

(1. School of Food Science and Engineering, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 2 School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, by using DEAE-52 cellulose and Sephadex G100 Column chromatography, sweet potato glycoprotein (SPG) was isolated and purified from sweet potato, then its structure was analyzed. The results indicated; SPG takes on white solid powder and is easily dissolved in water; the content of protein in SPG is 61.2%. S contained in the SPG polysaccharide chain of SDS-PAGE showed one bond. Main monosaccharide were Arabinose, Xylose, Mannose, Glucose and Galactose. The structure of SPG was studied by IR and alkaline β -elimination reaction. It was found that; (1) SPG contains α -glucosidic bonds; (2) the type of the glucosidic bonds was pyranose; (3) the protein was covalently linked with the carbohydrate by O-glycosyl linkage.

Key words: sweet potato, glycoprotein, isolation, structure

糖蛋白(Glycoprotein)是一类由糖类同多肽或蛋白质以共价键连接而形成的结合蛋白^[1]。根据糖基异头碳原子上的羟基与肽链氨基酸残基上的

酰胺基或羟基脱水所形成的糖苷键的不同,可分为 N-糖苷键和 O-糖苷键两大类^[2]。在生物体内它以不同的形式存在而发挥作用,是细胞膜、细胞间

收稿日期:2008-01-14

作者简介:赵梅(1978-),女,山东潍坊人,助理实验师,工学硕士,主要从事农产品加工与贮藏研究。

Email:zhm0601zhao@yahoo.com.cn

基质、血浆、粘液、激素等的重要构成成分^[3]。日本营养学家发现:甘薯含有丰富的粘蛋白,对人体有特殊的保护作用,能保持消化道、呼吸道、关节腔、膜腔的润滑和血管的弹性。由于这种物质可防止脂类物质在动脉管壁上沉积而引起的动脉硬化,防止肝及肾脏等器官结缔组织的萎缩,可以减缓人体器官的老化,提高机体免疫力^[4]。作者研究了甘薯糖蛋白的提取、纯化方法,对糖蛋白的结构进行了初步分析,为后续的研究打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

甘薯:紫罗兰3号,江苏常州产;DEAE-Celulose-52、Sephadex G100;上海华美生物工程公司进口分装;835-50型氨基酸自动分析仪:日立公司产品;GC-14A气相色谱仪Nexus,傅立叶变换红外光谱仪:美国Thurmo Nicolet公司产品;HH-4型数显恒温水浴锅;金坛市顺华仪器有限公司产品;UV-2102 PCS型分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 甘薯粗糖蛋白的制备 新鲜甘薯→清洗→去皮→烘干→粉碎→水浸提→离心分离→上清液醇析→离心→沉淀物溶剂干燥→糖蛋白粗品

1.2.2 甘薯水溶性糖蛋白的纯化 糖蛋白粗品用适量蒸馏水溶解后用Sevage法脱蛋白后经透析浓缩后依次经DEAE-Celulose-52柱层析,0.05、0.1、0.5 mol/L碳酸氢钠溶液阶段洗脱;Sephadex G100柱层析,0.02 mol/L Tris-HCl(pH 7.2)洗脱,洗脱后经检测得一陡峭的大峰,收集此高峰部分冷冻干燥即得糖蛋白纯品^[5]。

1.2.3 甘薯水溶性糖蛋白的纯度鉴定 将过Sephadex G100凝胶过滤后收集所得的甘薯糖蛋白制品进行透析至无盐,并进行浓缩。取200 μL浓缩液加相同体积的2倍样品缓冲液,在100℃沸水中保温3 min。取出冷却后作为实验分析样品。如处理好的样品暂时不用,可放在-20℃冰箱保存较长时间,使用前在沸水浴中加热3 min,以除去亚稳态聚合物。

1.2.4 蛋白质含量的测定 以糖蛋白纯品作样品,采用Folin-酚法^[6-7],以牛血清白蛋白作为标准品。

1.2.5 氨基酸组成分析 分别取20 mg甘薯糖蛋白粗品和纯品于水解管中,然后各加18 mL 6 mol/L的盐酸溶液,抽真空封管,在110℃水解24 h,取

出冷却后,全部转移至50 mL容量瓶中定容至刻度摇匀,用双层滤纸过滤,取滤液1 mL于25 mL烧杯中,在真空干燥器中蒸干(约40℃),将小烧杯取出加入0.02 mol/L盐酸3 mL,在空气中放置30 min,搅拌均匀,用氨基酸分析仪进行氨基酸分析。

1.2.6 糖含量的测定 以糖蛋白纯品作样品,采用苯酚-硫酸法^[8]测定糖蛋白中的糖含量。

1.2.7 中性单糖组成分析 取10 mg冷冻干燥糖蛋白纯品为样品,加入2 mL 2 mol/L H₂SO₄溶液后,抽真空封管。100℃水解12 h。水解液用固体BaCO₃中和,加少量蒸馏水,离心,真空干燥至无水。加入10 mg盐酸羟胺,0.5 mL吡啶溶液,然后放入90℃水浴中反应30 min,取出后冷却至室温,加入0.5 mL醋酸酐溶液,在90℃条件下,继续反应30 min,进行乙酰化,反应物进行气相色谱分析。

1.2.8 红外吸收光谱分析 糖蛋白纯品用KBr进行压片,在400~4 000 cm⁻¹之间用红外光谱仪进行扫描。

1.2.9 紫外吸收光谱 糖链与蛋白质肽链不同的连接方式表现出对碱的稳定性不同^[9],根据这一特征可以对糖链与蛋白质肽链的连接以及糖链本身的结构进行深入研究。将甘薯水溶性糖蛋白样品(4.5 mg/mL)置于0.2 mol/L NaOH-1.0 mol/L NaBH₄溶液中,于45℃反应30 min,测定其紫外吸收光谱,同时测定未用碱处理的相同浓度糖蛋白的紫外吸收光谱。比较所得到的两条曲线。

2 结果与分析

2.1 糖蛋白的一般性质

糖蛋白纯品呈白色,易溶于水,蛋白质质量分数为61.2%,糖质量分数为38.7%。

2.2 DEAE-52纤维素柱层析纯化甘薯水溶性糖蛋白(SPG)

从图1可知,在DEAE-52纤维素层析柱上,甘薯糖蛋白粗品经0.05、0.1、0.5 mol/L碳酸氢钠溶液阶段洗脱后(每20管一个梯度),可得到1个主峰,收集此高峰部分。

2.3 Sephdex G100纯化SPG

图2洗脱曲线表明:第2个峰峰值高,对称性好,分离度好。故合并第2个峰,透析后冷冻干燥得白色固体。

2.4 甘薯糖蛋白的纯度鉴定

甘薯糖蛋白的电泳扫描结果如图3所示,左边的一条谱带为甘薯水溶性糖蛋白纯品,右边的为标准相对分子质量蛋白对照品。从图中可看到甘薯

水溶性糖蛋白纯品只有唯一的一条染色带,表明该纯品为纯度较高的均一组分,其纯度达到生物和理化性质研究要求。

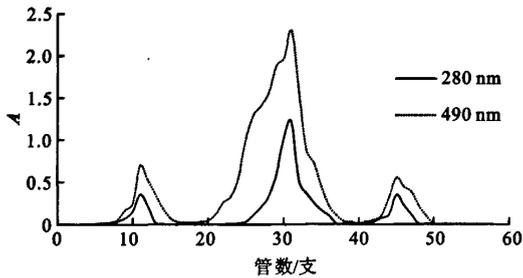


图1 碳酸氢钠溶液进行阶段洗脱所得的洗脱曲线

Fig. 1 Ion exchange chromatogram obtained by phase elution with NaHCO_3 solutions

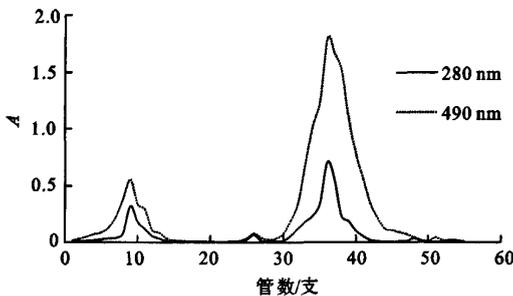


图2 甘薯水溶性糖蛋白在 Sephadex G100 层析柱上的洗脱图

Fig. 2 Elution pattern of SPWSGP on Sephadex G100

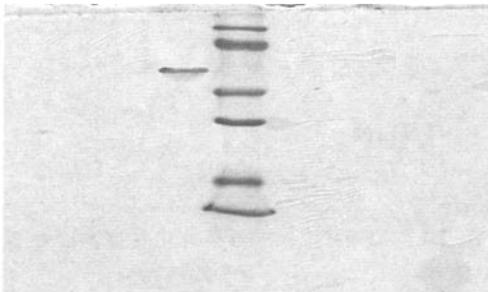


图3 甘薯水溶性糖蛋白电泳扫描图

Fig. 3 The electrophoretogram of SPG

2.5 糖蛋白的氨基酸组成分析

由表1可知,甘薯水溶性糖蛋白几乎含有人体必需的各种氨基酸,其中天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸含量较高。除色氨酸在酸水解时被破坏而没有检测外,甘薯水溶性糖蛋白含有7种必需氨基酸,含量和比例都接近WHO的推荐值。因此,甘薯水溶性糖蛋白是一种优质的植物蛋白质。

2.6 甘薯水溶性糖蛋白的单糖组成分析

标准中性单糖的气相色谱分析结果如图4所

示。主要色谱峰与单糖的对应关系如下:16.967为鼠李糖,18.625为阿拉伯糖,19.508为木糖,24.625为甘露糖,25.758为葡萄糖,26.567为半乳糖,30.117为肌醇。

表1 两种样品的氨基酸自动分析结果

Tab. 1 The results of amino acid analysis of two samples

| 氨基酸 | 甘薯糖蛋白粗品 质量浓度/(mg/mL) | 甘薯糖蛋白纯品 质量浓度/(mg/mL) |
|-------|-------------------------|-------------------------|
| Asp | 5.49 | 7.36 |
| Glu | 6.44 | 1.67 |
| Ser | 2.34 | 3.92 |
| His | 1.17 | 2.03 |
| Gly | 1.76 | 3.53 |
| * Thr | 1.79 | 2.61 |
| Ala | 1.73 | 3.35 |
| Arg | 3.81 | 6.85 |
| Tyr | 2.12 | 3.22 |
| Cys | 5.81 | 6.99 |
| * Val | 2.53 | 4.06 |
| * Met | 2.53 | 8.14 |
| * Phe | 3.18 | 5.1 |
| * Ile | 2.05 | 3.58 |
| * Leu | 3.63 | 6.14 |
| * Lys | 2.81 | 2.92 |
| Pro | 1.99 | 4.41 |
| 总计 | 50.19 | 75.88 |

注: * 为必须氨基酸

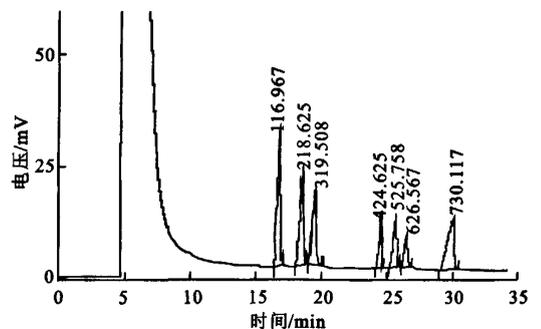


图4 标准中性单糖的气相色谱分析图

Fig. 4 Gas chromatogram of standard neutral monosaccharides

将甘薯水溶性糖蛋白的单糖分析气相色谱图5与图4对照可知,甘薯水溶性糖蛋白的单糖组成共有5种,它们分别是:鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖。这几种单糖的质量比例为 $m(\text{鼠李糖}) : m(\text{阿拉伯糖}) : m(\text{甘露糖}) : m(\text{葡萄糖}) : m$

(半乳糖) = 0.095 : 0.239 : 0.028 : 0.035 : 0.603, 由此可以看出, 甘薯水溶性糖蛋白中的单糖组成主要是半乳糖, 占 60.3%。

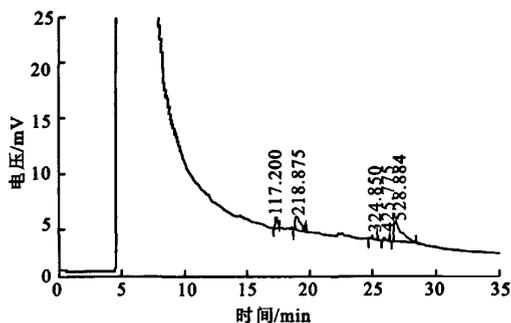


图 5 甘薯水溶性糖蛋白酸水解产物气相色谱分析图谱

Fig. 5 Gas chromatogram of acid hydrolysates of SPWS-GP

2.7 甘薯水溶性糖蛋白的红外光谱分析

红外光谱技术在糖和蛋白质以及糖复合物的研究中得到了长足的发展。特别是在糖复合物中寡糖的研究中具有不可替代的作用。另外, 红外光谱在蛋白质二级结构的研究中也有十分重要的作用, 利用红外光谱可以鉴定蛋白质二级结构是 α -螺旋还是 β -折叠^[10]。图 6 可以明显地看到甘薯糖蛋白的特征吸收峰 (cm^{-1}) 分别在 3 409 ($-\text{OH}$),

2 929、2 961 ($-\text{N}-\text{H}$), 1 647、1 558 ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$), 1 398 ($-\text{C}-\text{C}-$), 1 050 ($-\text{C}-\text{O}-$), 831、702 ($-\text{C}=\text{C}-\text{H}$)。其中, 1 647、1 558 ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$) 为肽链上酰胺基羰基的吸收峰, 3 409 ($-\text{OH}$) 和 1 050 ($-\text{C}-\text{O}-$) 是多糖分子的特征吸收峰, 831 cm^{-1} 附近的吸收峰可表明甘薯糖蛋白中含有 α -糖苷键, 由 1 050 cm^{-1} 附近的吸收峰可推知甘薯糖蛋白的糖苷键类型主要为吡喃型。

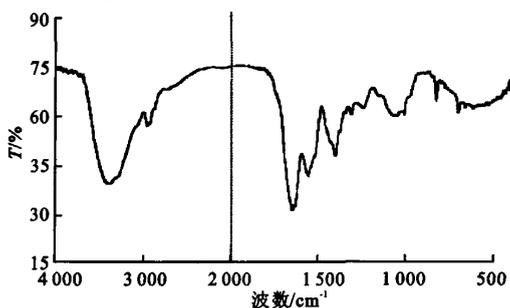


图 6 甘薯水溶性糖蛋白的红外光谱图

Fig. 6 IR spectrum of SPG

2.8 甘薯水溶性糖蛋白的紫外吸收光谱分析

碱性 β -消除反应被广泛应用于阐明糖蛋白的结构, 当糖蛋白受温和的碱处理时, N-糖肽键是稳定的, 而由于糖与蛋白质的丝氨酸和苏氨酸的 β -位羟基之间形成的 O-糖肽键对碱不稳定, 所以会产生 β -消除反应, 形成不饱和氨基酸 (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使样品在 241 nm 波长处的紫外吸收值明显增加, 因此可以利用 β -消除反应判断糖与蛋白肽链之间的连接类型^[11]。

从图 8 可见, 处理后的甘薯水溶性糖蛋白溶液在 241 nm 产生了明显的光吸收, 说明甘薯水溶性糖蛋白中存在 O-糖肽键。

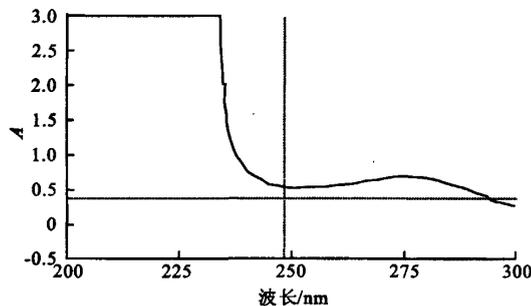


图 7 加 NaOH 前甘薯糖蛋白的紫外扫描曲线

Fig. 7 UV spectrum of SPG (without NaOH)

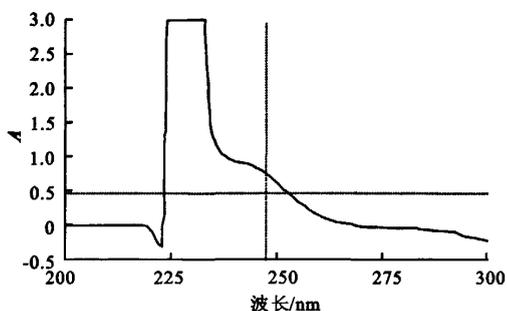


图 8 加 NaOH 后甘薯糖蛋白的紫外扫描曲线

Fig. 8 UV spectrum of SPG (with NaOH)

3 结 语

研究表明, 糖蛋白纯品呈白色, 易溶于水; 蛋白质质量分数为 61.2%。甘薯糖蛋白中糖链部分含有鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖; 红外光谱和 β -消去反应表明: 甘薯糖蛋白中含有 α -糖苷键, 糖苷键类型主要为吡喃型; 糖与蛋白的肽链之间的连接点类型是 O-糖肽键。

参考文献(References):

- [1] 孙册,莫汉庆. 糖蛋白与蛋白聚糖结构、功能和代谢[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2] 韩益飞,徐世清. 糖蛋白的结构与功能[J]. 生物学杂志,2001,18(2):1-3.
HAN Yi-fei, XU Shi-qing. The structure and function of glycoprotein[J]. *The Magazine of Biology*,2001,18(2):1-3. (in Chinese)
- [3] 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京:军事医学出版社,1995.
- [4] Cambie R C, Ferguson L R. Potential functional foods in the traditional mutation research[J]. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*,2003,523-524;109-117.
- [5] 张维杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [6] Jens Sommer-Knudsen. Hydroxyproline-rich pant glycoproteins[J]. *Phyto-chemistry*, 1998,47(4):83-497.
- [7] 周惠明. 小麦胚水溶性提取物中蛋白质的化学物质分析[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术),2003,22(5):30-33.
ZHOU Hui-ming. Chemical properties analysis of the protein in water-soluble extracts from wheat germ[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry(Food Science and Biotechnology)*, 2003,22(5):30-33. (in Chinese)
- [8] Gilles C, Astier J P, Marchis-Mouren G, et al. Crystal structure of pig pancreatic α -amylase isoenzyme II, in complex with the carbohydrate inhibitor acarbose[J]. *Eur J Biochem*,1996, 238:561-569.
- [9] 李锡径. 植物糖蛋白的结构与功能[J]. 植物生理学通报,1983(1):5-9.
LI Xi-jing. Structure and function of plant glycoprotein[J]. *Plant Physiology Communications*,1983(1):5-9. (in Chinese)
- [10] Beeley J G. Glycoprotein and Proteoglycan techniques, as laboratory techniques in biochemistry and molecular biology [M]. New York:Elsevier Amsterdam, 1985.
- [11] Planter J J, Carlson C M. Studes of mucin-type glycoprotein[J]. *Anal Biochem*, 1975,65:153-163.

(责任编辑:朱明)

本刊连续5次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、计算和分析,以及学科专家评审,本刊《食品与生物技术学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2008年版(即第五版)。此前,本刊以连续入编《中文核心期刊要目总览》前4版。

评选核心期刊的工作,是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊(光盘版)电子杂志社、中国农业科学院农业信息研究所等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等个评价指标。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊。