

文章编号:1673-1689(2008)06-0077-05

鸡腿蘑发酵液中抑制非酶糖糖基化 反应活性物质的分离及分析

丁重阳^{1,2,3}, 陆兆新^{1*}, 吕凤霞¹, 王玉红^{2,3}, 别小妹¹, 章克昌^{2,3}

(1. 南京农业大学 食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 以体外非酶糖基化抑制率为主要检测指标, 对鸡腿蘑发酵液中抑制非酶糖基化反应具有较高活性的物质进行了初步的分析与分离, 经过 AB-8 大孔树脂和 C18 反相柱的多次分离, 获得一种具有高非酶糖基化反应抑制活性物质鸡腿蘑素(Comatin), 经 HPLC-MS 分析其相对分子质量为 168。在 2 mg/mL 质量浓度条件下, 体外非酶糖基化抑制率达到 95.86%, 半抑制质量浓度 IC_{50} 为 0.39 mg/mL, 体外实验初步分析鸡腿蘑素可能与蛋白质某一位点结合, 且这种结合是在己二醛与牛血清白蛋白结合之后。

关键词: 鸡腿蘑; 非酶糖基化; 液体发酵; 糖尿病

中图分类号: TS 201.2

文献标识码: A

Separation of a Bioactive Substance Inhibiting Non-enzymatic Glycation from *Coprinus comatus* Fermentation Broth

DING Zhong-yang^{1,2,3}, LU Zhao-xin^{2*}, LU Feng-xia¹,
WANG Yu-hong^{2,3}, BIE Xiao-mei¹, ZHANG Ke-chang^{2,3}

(1. School of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Comatin, exhibit high inhibition percentage on the non-enzymatic glycation (NEG) reaction, was obtained from the *Coprinus comatus* fermentation broth, and absorbed by macroporous resin and then separated with C18 reversed-phase chromatography. Its molecular weight was 168 determined by HPLC-MS. Furthermore, in vitro experiment showed that the IC_{50} of Comatin on inhibition the NEG reaction was 0.39 mg/mL, and also found that Comatin could combine with Amadori products to change their structure and finally attenuate their fluorescence intensity.

Key words: *Coprinus comatus*; non-enzymatic glycosylation; liquid fermentation; diabetic mellitus

收稿日期: 2008-05-29.

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA10Z346).

作者简介: 丁重阳(1975-), 男, 江苏南通人, 副教授, 工学博士, 主要从事生物资源方面的研究. Email: biding@163.com

* 通讯作者: 陆兆新(1957-), 男, 江苏无锡人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物技术、酶工程方面的研究. Email: fmb@njau.edu.cn

糖尿病是一种常见多发的慢性代谢性疾病,高血糖引起的一系列代谢紊乱是造成糖尿病血管病变的主要因素。多年来的研究表明,其是通过多种途径介导的,其中蛋白质非酶糖基化(non-enzymatic glycation, NEG)是主要因素之一^[1-2],该反应最终可形成一系列不可逆的糖基化终产物(Advanced glycosylation end products, AGEs)^[3]。在糖尿病患者体内,随着 AGEs 反应的发生和加速,会导致胶原蛋白发生交联耦合、心室隔膜增厚及动脉硬化,从而引起一系列病理生理改变^[4]。因此,抑制和减少 AGEs 的形成也是近年来糖尿病研究的热点问题。

鸡腿蘑(*Coprinus comatus*),学名毛头鬼伞,被联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)确定为具“天然、营养、保健”3种功能为一体的16种珍稀食用菌之一^[5]。现代研究表明,鸡腿蘑具有降低血糖、防止肝损伤、抗肿瘤、提高机体免疫力等功效^[6-8]。但是,这些鸡腿蘑保健功能主要与哪些代谢产物有关,除了少数鸡腿蘑多糖在提高机体免疫^[9]和抗肿瘤功效^[10]方面的研究报道外,尚无其它报道。作者以体外非酶糖基化抑制率为主要检测指标,对鸡腿蘑发酵液中对非酶糖基化反应具有较高抑制活性的物质进行了初步的分析与分离。

1 材料与方法

1.1 菌种与材料

鸡腿蘑(*Coprinus comatus*)由江南大学生物工程学院生物资源实验室筛选保藏。

牛血清白蛋白(BSA):中国医药(集团)上海化学试剂公司生产;己二醛(质量分数30%):中国医药(集团)上海化学试剂公司提供;玉米粉与麸皮均为市售,过40目筛;其余试剂均为国产分析纯试剂。

650-60型荧光分光光度计:日本Hitachi公司产品;Waters 2690液相色谱仪,Waters 996二极管阵列检测器:Waters公司产品;Masslynx 4.0工作站。

1.2 培养基

1)斜面培养基:综合PDA培养基。

2)种子培养基(g/L):葡萄糖20,玉米粉15,麸皮5,KH₂PO₄2,MgSO₄·7H₂O3,酵母膏2,玉米浆5。

3)发酵培养基(g/L):葡萄糖10,玉米粉15,麸皮10,KH₂PO₄2,MgSO₄·7H₂O3。

1.3 体外非酶糖基化抑制实验

将BSA、己二醛和NaN₃分别按10、12、2 mg/mL溶于pH 7.4、0.2 mol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄缓冲液(PBS)中。取1 mL上述PBS,分别加入1 mL待测物溶液,以蒸馏水为空白,振荡混匀,37℃避光孵育15 d,而后定容至10 mL待测。

采用荧光分光光度计测定,激发波长370 nm,狭长5 nm,发射波长440 nm,狭长6 nm。各测试物对非酶糖基化反应的抑制作用以抑制率表示,计算公式如下:

$$Q = \frac{n_1 - n_2}{n_1} \times 100\%$$

式中:Q为抑制率; n_1 为空白管荧光强度; n_2 为药物干预管荧光强度。

每个样品平行测定3次,用Excel软件,结果用Mean±SD表示,组间差异经t检验。

1.4 发酵液AB-8型大孔树脂分离

将鸡腿蘑发酵液在3 000 r/min下离心20 min,取上清液抽滤,滤液上AB-8型大孔吸附树脂柱,滤液吸附结束后,分别用10倍柱体积的超纯水以及体积分数20%、40%、60%、80%和100%的乙醇溶液洗脱,分别收集。其中将吸附过程中收集的发酵液以及水洗脱过程收集的洗脱液合并,将60%、80%和100%洗脱过程收集的洗脱液合并,这样共得4个粗分离组分,分别编号为CC00,CC20,CC40,CC60。

2 结果与讨论

2.1 发酵液中抑制NGE反应活性成分的分步

为了进一步确定培养液中的生物活性成分的分布情况,首先对鸡腿蘑发酵上清液和菌丝体抽提液进行了比较。取100 mL发酵液,离心分离后获得上清液和菌丝体,将菌丝体按常规方法进行热水抽提,将抽提液离心去除残渣,浓缩定容至100 mL。经测定,发酵上清液和菌丝体抽提液对体外非酶糖基化的抑制率分别为(75.1±0.5)%和(31.6±1.7)%,这表明具有高抑制活性的代谢产物被分泌到胞外。

将发酵上清液用AB-8型大孔树脂初步分离的4个组分浓缩,冷冻干燥后用超纯水配制成一定浓度的溶液进行体外抑制率实验。从表1可以看出,CC20的抑制效果最佳,CC40次之。虽然CC60在2 mg/mL质量浓度下抑制率达到50%以上,但其得率太低,这也表明该组分并不是鸡腿蘑在发酵过程中获得的主要代谢产物。

虽然CC00组分得率相对较高,但是抑制效果不佳。由于AB-8大孔树脂不能吸附多糖和蛋白质,因此这两类物质主要集中在CC00组分中,由此

可以推断,鸡腿蘑发酵液在抑制非酶糖基化反应方面具有高活性的物质是非多糖和非蛋白质类物质。

2.2 CC20 及 CC40 的进一步分离

在大孔树脂初步分离的基础上对 CC20 和 CC40 进行进一步的分离,采用实验室自装的低压层析柱(26 mm×50 cm,上海华美实验仪器厂制造),C18 填料,甲醇-水梯度洗脱,体积流量 2.0

mL/min,浙江智达 N2000 色谱工作站。分离之前的预实验(高压液相-二极管阵列)表明,CC20 和 CC40 所含物质在 280 nm 左右均有一明显的吸收峰,因此采用紫外检测器,波长为 280 nm。

通过进一步分离,CC20 和 CC40 分别分离得到 6 组和 8 组组分,其分离图谱见图 1,2。对这 14 种组分进行体外抑制率实验,结果见表 2。

表 1 发酵上清液各初分离组分得率及其 NGE 反应抑制率

组分		NEG 反应抑制率/%		
		2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL
CC00	1.022	32.29±1.78	18.35±1.62	7.11±0.65
CC20	0.435	79.73±1.04**	58.05±0.20	37.13±1.72
CC40	0.156	57.44±1.03△△	34.42±1.07	15.79±1.62
CC60	0.043	50.35±0.25	30.87±0.43	15.93±1.96

** P<0.01 与 CC40 和 CC60 比较;△△ P<0.01 与 CC60 比较

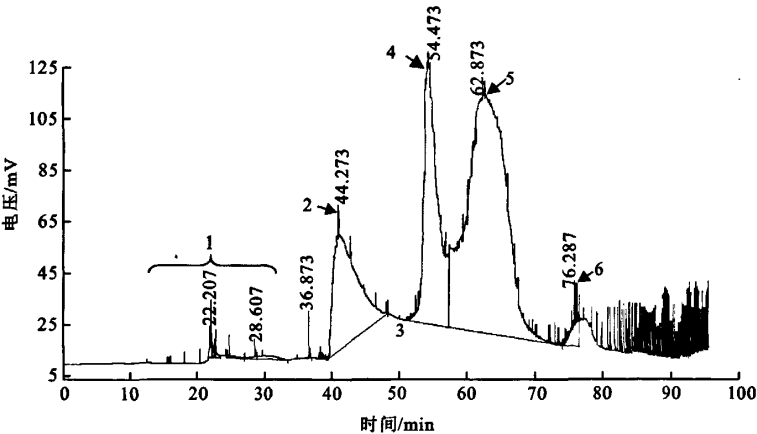


图 1 CC20 分离图谱
Fig. 1 LC chromatogram for CC20 separation

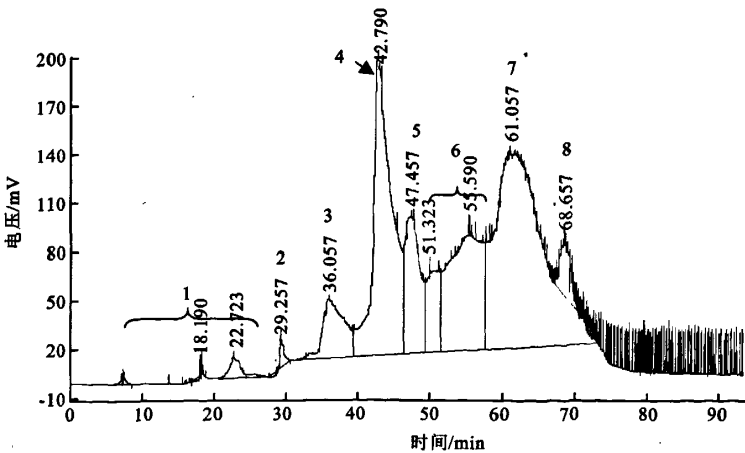


图 2 CC40 分离图谱
Fig. 2 LC chromatogram for CC20 separation

表 2 CC20 和 CC40 各分离组分得率及其 NEG 反应抑制率
Tab.2 The NEG reaction inhibition percentage of these ingredients in CC20 and CC40

组分		NEG 反应抑制率/%		
		2 mg/mL	1 mg/mL	0.5 mg/mL
CC20	CC201	11.81±1.07	3.98±1.13	1.99±1.07
	CC202	22.90±0.89	10.10±0.99	4.27±1.62
	CC203	51.21±5.21	33.00±1.13	17.21±0.74
	CC204	66.05±1.81	46.80±0.65	26.74±0.99
	CC205	95.86±0.12**	82.84±0.55	60.53±2.05
	CC206	48.79±1.86	28.16±0.65	8.25±2.96
CC40	CC401	40.56±1.03	21.67±0.85	8.05±0.28
	CC402	56.75±0.34	41.05±1.73	15.27±0.85
	CC403	51.28±0.49	29.89±1.14	16.58±2.53
	CC404	58.10±0.34	36.62±1.03	22.00±1.03
	CC405	75.81±1.03	49.26±0.49	27.59±2.74
	CC406	86.14±0.42△△	69.05±0.15	48.77±1.30
	CC407	66.47±2.08	41.05±1.03	23.48±4.86
	CC408	48.93±1.99	26.77±1.24	6.24±0.57

** P<0.01 与 CC20 中的其它组分比较; △△ P<0.01 与 CC40 中的其它组分比较。

从表 2 中可以看出,CC20 的第 5 个组分 CC205 的抑制活性最高,其在 2 mg/mL 质量浓度下的抑制率达到 95.86%,也是所有组分中惟一在 0.5 mg/mL 质量浓度下抑制率超过 50%的组分,因此有必要对其进行再次的纯化,并将其命名为鸡腿蘑素(Comatin)。

另一个值得关注的是,除了鸡腿蘑素(Comatin)以外,CC204、CC405、CC406、CC407 也同样表现出较好的抑制活性,这提示鸡腿蘑发酵液中存在一种以上的具有抑制非酶糖基化反应活性的物质。

2.3 鸡腿蘑素的分离纯化

鸡腿蘑素(Comatin)的分离纯化采用实验室自装的中压层析柱(15 mm×40 cm,上海华美实验仪器厂制造),C18 填料,甲醇-水梯度洗脱,体积流量 1.0~1.6 mL/min(浙江智达 N2000 色谱工作站)。经过两次分离纯化,将收集的鸡腿蘑素经高压液相色谱检测,得到单一对称峰,说明经两次分离后达

到色谱纯(见图 3)。经 HPLC-MS 分析,鸡腿蘑素相对分子质量为 168,见图 4。

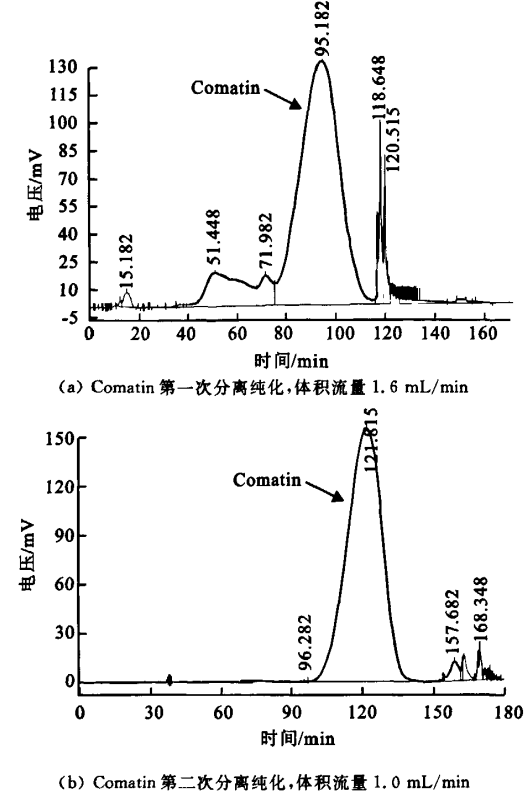


图 3 鸡腿蘑素分离纯化图谱

Fig. 3 LC chromatogram for Comatin separation and purification

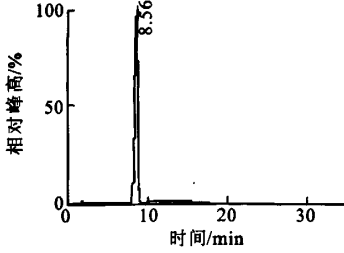


图 4 鸡腿蘑素 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatogram of Comatin

2.4 鸡腿蘑素质量浓度与抑制率的关系

在 0~3 mg/mL 范围内考察了鸡腿蘑素质量浓度对非酶糖基化反应抑制率的关系,见图 5,在 0~1.2 mg/mL 范围内,鸡腿蘑素的抑制活性与其质量浓度呈明显的依赖关系,其对非酶糖基化抑制作用的半抑制质量浓度 IC₅₀ 为 0.39 mg/mL。

2.5 鸡腿蘑素与非酶糖基化反应体系作用方式的研究

按文献[11]稍作修改,将己二醛与牛血清白蛋白分开配制,然后按 3 种方式:1) 己二醛 + 牛血清白蛋白;鸡腿蘑素;2) 己二醛 + 鸡腿蘑素;牛血清白蛋白

白;3) 鸡腿蘑素 + 牛血清白蛋白;己二醛。37 ℃ 反应 3、7、13 d,再分别与相应的另一种溶液混合再反应,总共反应时间为 15 d,测定抑制率见表 3。

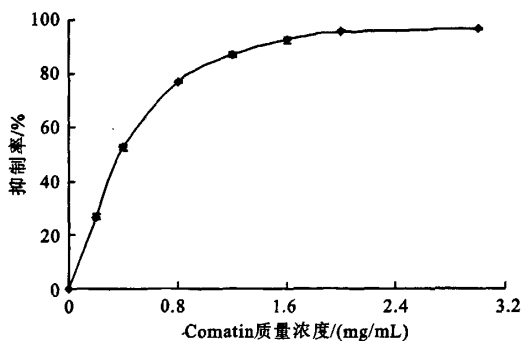


图5 鸡腿蘑素对非酶糖基化反应抑制曲线

Fig. 5 The inhibitory effect of Comatin on NEG reaction

结果显示,己二醛与牛血清白蛋白先反应抑制率最高;其次为牛血清白蛋白与鸡腿蘑素先反应再与己二醛反应,鸡腿蘑素先与己二醛反应再与白蛋白反应抑制率最低。说明鸡腿蘑素可能与蛋白质某一位点结合,且这种结合是在己二醛与牛血清白蛋白结合之后。

表3 鸡腿蘑素与非酶糖基化反应体系作用方式比较

Tab. 3 Interaction model between Comatin and NEG reactive system

反应顺序	抑制率/%		
	3 d	8 d	13 d
己二醛+牛血清白蛋白;鸡腿蘑素	72.41±0.40	69.60±1.15	45.22±1.01
己二醛+鸡腿蘑素;牛血清白蛋白	72.33±1.28	43.46±1.82	26.39±0.63
鸡腿蘑素+牛血清白蛋白;己二醛	74.59±1.08	56.53±0.66	28.50±0.77

3 结 语

通过 AB-8 大孔树脂和 C18 反相柱的多次分离,获得一种具有高非酶糖基化反应抑制活性物质鸡腿蘑素(Comatin),经 HPLC-MS 分析,相对分子质量为 168。其在 2 mg/mL 质量浓度下,体外非酶糖基化抑制率达到 95.86%,半抑制质量浓度 IC₅₀ 为 0.39 mg/mL,体外实验初步分析鸡腿蘑素可能与蛋白质某一位点结合,且这种结合是在己二醛与牛血清白蛋白结合之后。鸡腿蘑素的具体化学结构及其活性机理正在进一步的研究中。

参考文献(References):

- [1] 宁正祥, 战宇, 高建华. 二氢杨梅素葡萄糖苷的合成及对糖尿病的疗效[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6): 92-94. NING Zheng-xiang, ZHAN Yu, GAO Jian-hua. Synthesis of ampelopsis-7-O- α -D-glucopyranoside and its curative effect to diabetes[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(6): 92-94. (in Chinese)
- [2] Katsuya Ishihara, Kae Tsutsumi, Shiho Kawane, et al. Interaction between the polyol pathway and non-enzymatic glycation on aortic smooth muscle cell migration and monocyte adhesion[J]. *Life Science*, 2004, 76: 445-459.
- [3] Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complication[J]. *N Engl J Med*, 1988, 318: 1315-1321.
- [4] Chun H K, Ohnishi Y, Shindo K, et al. Biotransformation of flavone and flavanone by *Streptomyces lividans* cells carrying shuffled biophenyl dioxygenase genes[J]. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 2003, 21: 113-121.
- [5] 刘艳芳, 杨焱, 张劲松, 等. 鸡腿蘑菌株筛选及深层发酵培养基的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(2): 14-17. LIU Yan-fang, YANG Yan, ZHANG Jin-song, et al. Screening of *Coprinus comatus* strains and optimization of the submerged fermentation medium[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(6): 92-94. (in Chinese)
- [6] Bailey C J, Susan L Turner, Jakeman K J, et al. Effect of *Coprinus comatus* on plasma glucose concentrations in mice [J]. *Planta Medica*, 1984(50): 525-526.
- [7] Byeung H L, Hyun J K, Jong S C, et al. Inhibitory effect of *Coprinus comatus* ethanol extract on the liver damage in benzo(a)pyrene-treated mice[J]. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 1999, 28(6): 1364-1368.
- [8] Hyun J K, Byeung H L, OK M K, et al. Antimutagenic effect of the fruiting body and the mycelia extracts of *Coprinus comatus*[J]. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 1999, 28 (2): 452-457.
- [9] 李师鹏, 安利国, 张红梅. 鸡腿蘑多糖对昆明小鼠血清溶菌酶活性影响的研究[J]. 中国食用菌, 2001, 20(4): 36-38. LI Shi-peng, AN Li-guo, ZHANG Hong-mei. The enhancement of the polysaccharide from *Coprinus comatus* on activity of serum lysozyme in Kunming mice[J]. *Edible Fungi of China*, 2001, 20(4): 36-38. (in Chinese)
- [10] 崔旻, 张红建, 安利国. 鸡腿蘑多糖对肿瘤生长的抑制作用[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(3): 287-290. CUI Min, ZHANG Hao-jian, AN Li-guo. Tumor growth inhibition by polysaccharide from *Coprinus comatus*[J]. *World China J Digestol*, 2002, 10(3): 287-290. (in Chinese)
- [11] Hauh-Jyun, Candy Chen, Anthony Cerami. Mechanism of inhibition of advanced glycosylation by aminoguanidine in vitro [J]. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1993(12): 732-742.

(责任编辑:李春丽)