三角帆蚌糖蛋白的盐溶液浸提及抗氧化活性

何晓梅[1,2]，乔德亮[1]，沈涛涛[1]，陈存武[1,2]，韦传宝[1]

（1. 皖西学院 生物与制药工程学院，安徽 六安 237012；2. 植物细胞工程安徽省工程技术研究中心，安徽 六安 237012）

摘要：以三角帆蚌脏器为试验材料，以 NaCl 溶液为提取溶剂，研究三角帆蚌脏器糖蛋白的低温提取、分离及抗氧化活性。通过单因素试验和正交试验，确定三角帆蚌脏器糖蛋白最优提取条件为：提取温度 4 ℃、NaCl 溶液浓度 0.3 mol/L、料液比 1:15、提取时间 9 h。在此条件下，糖蛋白得率（以糖含量计）为（9.259±0.083）%，糖蛋白得率（以蛋白质含量计）为（3.763±0.107）%。提取液经硫酸铵分级沉淀得三个组分糖蛋白粗品。体外抗氧化实验表明，三个组分都具有清除超氧阴离子自由基和羟基自由基的能力，但清除能力不同。10%SDS-PAGE 电泳后经考马斯亮蓝 R250 和 PAS 染色，表明 3 个组分含有不同的糖蛋白谱带。

关键词：三角帆蚌；糖蛋白；盐溶液浸提；抗氧化活性；SDS-PAGE

中图分类号：TS 24　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2015)05—0517—07

Salty Extraction and Antioxidant Activities of Glycoprotein from *Hyriopsis cumingii*

HE Xiaomei[1,2]，*QIAO Deliang*[1]，*SHEN Taotao*[1]，*CHEN Cunwu*[1,2]，*WEI Chuanbao*[1]

（1. College of Biology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an 237012, China;
2. Anhui Province Engineering Technology Research Center of Plant Cell Engineering, Lu'an 237012, China）

Abstract: Hyriopsis cumingii visceral organ and Nacl solution were used as material and extraction liquor to study the hyriopsis cumingii glycoprotein extraction and separation under low temperature and the antioxidant activity. Through single factor experiment and orthogonal experiment, the optimized extraction condition was as below: extraction temperature at 4 ℃, 0.3 mol/L NaCl solution, solid-liquid ratio in 1 ∶ 15, and extraction for 9 h. Glycoprotein extraction rates under optimal condition interms of sugar content and protein content were (9.259 ± 0.083)% and (3.763 ± 0.107)% respectively. Crude glycoprotein sample, that comprises three different components, was obtained, after the extraction liquor was fractionally precipitated by ammonium sulfate. The different component had a different ability to scavenge surperoxide anion radicals and hydroxyl radicals. Crude glycoprotein sample was Electrophoresed by 10%SDS-PAGE and dyed by

收稿日期：2014-02-06

基金项目：国家自然科学基金项目（31271853）；安徽省自然科学基金项目（KJ2013B341，1308085MC33）；省级大学生创新创业项目（AH201410376006）；安徽寿县扶贫开发项目（WXZQ1421）；皖西学院科技创新平台项目（0044013010）。

作者简介：何晓梅（1974—），女，安徽霍山人，理学硕士，讲师，主要从事天然产物研究与开发方面的研究。E-mail：happyzh@wxc.edu.cn

Coomassie Brilliant Blue R250 and PAS,and the result showed the three components contained different glycoprotein bands.

Keywords: *Hyriopsis cumingii*,glycoprotein,salty extraction,antioxidant activities,SDS-PAGE

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*),俗称三角蚌、珍珠蚌等,为我国特有种,广泛分布于安徽、湖北、江西、湖南、浙江、江苏等省大、中、小型湖泊及其周围河流内,尤以我国洞庭湖、鄱阳湖、太湖、洪泽湖等湖泊产量较高[1]。三角帆蚌是我国优良的淡水育珠品种,用它育成的珍珠不仅产量高而且质量好[2]。而其采珠后的脏器,除了少部分被用于饲料外,其余部分都被抛弃。杨文鸽、周海燕等[3-4]分析三角帆蚌蚌肉的营养成分表明,三角帆蚌蚌肉含有丰富的蛋白质、糖类、维生素、必须氨基酸及锰、铁、锌、铜等微量元素,而脂肪含量较低,具有很好的食用价值和开发利用价值。另外,三角帆蚌多糖具有增强免疫力、抗氧化、抗肿瘤、抗菌等作用[5-9]。近年来,随着对水生生物研究的深入和开发技术的提高,对水生生物高值化开发逐渐深入。继水生生物多糖的研究,水生生物糖蛋白成为研究的又一热点。糖蛋白是一类复合糖或一类缀合蛋白质,糖链作为缀合蛋白质的辅基。糖蛋白中糖可以相当均匀地沿蛋白质的多肽链分布,或集中在多肽链的特定区域[10],其中糖链和肽链共同调控生物体的各种生物学活性。已有研究显示,马氏珍珠贝肉、菲律宾蛤仔肉、牡蛎肉、河蚬、海蜇等水生生物糖蛋白具有调节免疫、抗氧化、抗肿瘤等[11-15]生物活性。目前,对三角帆蚌糖蛋白的提取、分离和生物活性研究未见报道。作者通过单因素和正交实验优化出三角帆蚌糖蛋白的最优提取条件,并对其进行初步分离,研究其体外生物活性,旨在为开发高值化的三角帆蚌糖蛋白保健食品或药物提供基础数据和方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三角帆蚌:购自安徽和县养殖场。剥壳后取全脏器,预冷双蒸水洗涤,挤出水后切碎成肉末,再用高速组织捣碎机捣碎成蚌肉糜,分装,于-40 ℃冰柜保存。

牛血清白蛋白:盐城赛宝生物科技有限公司;葡萄糖标准品(≥98%):贵州迪大国家标准物质研究中心;考马斯亮蓝 R250 和低相对分子质量标准蛋白质:上海博谷生物科技有限公司;重蒸酚、Folin-酚试剂、三羟甲基氨基甲烷、盐酸、邻苯三酚、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、邻二氮菲、硫酸亚铁、30%过氧化氢、浓硫酸、碱性品红、偏重亚硫酸钠、高碘酸、活性炭、甲醇、冰乙酸等试剂:均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

JJ-2 组织捣碎机:江苏金坛市亿通电子有限公司;FA2104N 电子分析天平:上海精密科学仪器有限公司;海尔 BC/BD719H 冰柜;GL-21M 高速冷冻离心机:湖南凯达科学仪器有限公司;UV-2000 紫外可见分光光度计:尤尼柯上海仪器有限公司;美国 Virtis 台式 BenchTop Pro 冻干机:德祥科技有限公司;DYCZ-24A 电泳仪:北京六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 糖蛋白提取及初级分离 参照胡雪琼、包郁明等[16-17]的方法,取分装的三角帆蚌肉糜于 4 ℃解冻,进行盐液浸提实验,每种方法重复实验 3 次。技术路线如下:原料解冻→盐溶液浸提→离心(4 ℃、8 000 r/min、20 min),取上清液→硫酸铵分级沉淀(4 ℃过夜)→离心(8 000 r/min、20 min)→沉淀透析 48 h(分别用 $AgNO_3$ 和 $BaCl_2$ 溶液检测 Cl^-和 SO_4^{2-})→聚乙二醇低温(4 ℃)浓缩→-20 ℃冰冻→真空冷冻干燥→糖蛋白粗品。

1.3.2 糖蛋白的检测 NaCl 提取液中含有糖蛋白、糖和蛋白质,本研究计算糖蛋白得率,蛋白质含量测定采用福林酚法[18]。

以牛血清白蛋白为标准物质,制作的标准曲线见图 1。其标准曲线方程为 y=0.908 7x+0.006 7,R^2=0.999 2,蛋白质质量浓度小于 0.5 mg/mL 时线性关系良好。

同蛋白质标准曲线制作方法,取 1 mL 糖蛋白浸提液测定其吸光度 $OD_{500\ nm}$,带入标准曲线方程计算其质量浓度为 $c_{蛋白质}$。

糖蛋白得率(以蛋白质含量计)=($c_{蛋白质}$×V×

$10^{-3})/m$

式中,V 为某一条件下浸提液总体积(mL);m 为某一条件下三角帆蚌肉糜质量(g)。

总糖含量测定采用苯酚-硫酸法[19]。以葡萄糖为标准物质,制作的标准曲线,见图 2。其标准曲线方程为 y=13.765x+0.009 9,R^2=0.999 1,葡萄糖质量浓度小于 0.09 mg/mL 时线性关系良好。

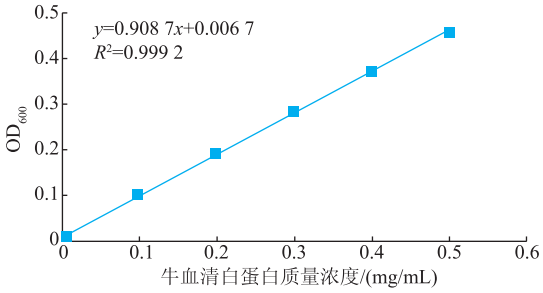


图 1 蛋白质质量浓度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of soluble protein content

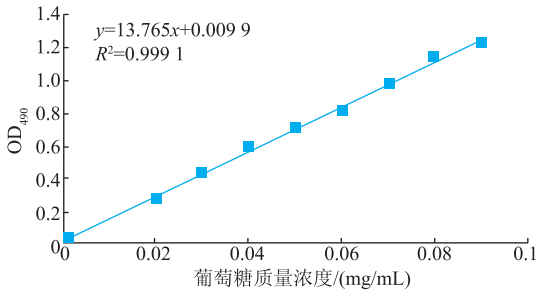


图 2 总糖质量浓度标准曲线

Fig. 2 Standard curve of total sugar content

同总糖质量浓度标准曲线制作方法,取 1 mL 糖蛋白浸提液测定其吸光度 $OD_{490\ nm}$,带入标准曲线方程计算其浓度为 $c_{总糖}$。

糖蛋白得率(以糖质量浓度计)=($c_{总糖}$×V×10^{-3}×0.9)/m

1.3.3 三角帆蚌脏器糖蛋白粗品抗氧化活性

1)超氧阴离子自由基(O_2^-·)清除率的测定:O_2^-·清除率的测定采用邻苯三酚自氧化法[20]。

(O_2^-·)清除率=($V_{对照}$-$V_{样品}$)/$V_{对照}$

式中,$V_{样品}$为样品组邻苯三酚自氧化速率(ΔA/min);$V_{对照}$为对照组邻苯三酚自氧化速率(ΔA/min)。

2)羟基自由基(·OH)清除率的测定:·OH 清除率的测定采用邻二氮菲-Fe^{2+}氧化法[21]。

·OH 清除率=($A_{样品}$-$A_{损伤}$)/($A_{未损伤}$-$A_{损伤}$)

1.3.4 10 g/dL SDS-PAGE 电泳糖蛋白粗品的蛋白质染色和多糖染色

先后配制质量浓度为 10 g/dL 的分离胶和 5 g/dL 的浓缩胶,稳压电泳,溴酚蓝前缘进入分离胶后,电压由 65 V 调到 85 V,直到溴酚蓝前缘离底部 1 cm 停止电泳。蛋白质采用考马斯亮蓝 R-250 染色,糖采用 PAS 染色[22]。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 NaCl 溶液浓度对糖蛋白得率的影响 在料液比 1:12,浸提时间 9 h,浸提温度 4 ℃(以下同)条件下,研究 NaCl 溶液浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mol/L 时对糖蛋白得率的影响,结果见图 3。

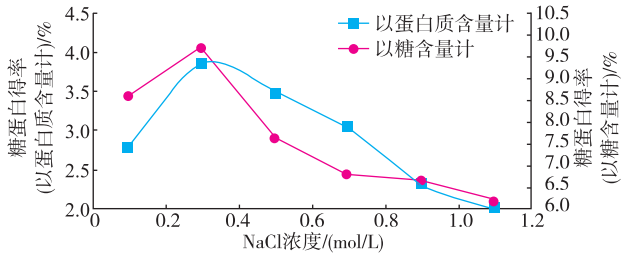


图 3 NaCl 溶液浓度对糖蛋白得率的影响

Fig. 3 NaCl solution concentration on the influence of the extraction rate

当 NaCl 溶液浓度小于 0.3 mol/L 时,糖蛋白得率随浓度的增大而升高。当 NaCl 溶液浓度大于 0.3 mol/L 时,糖蛋白得率呈下降趋势,这可能是由于高盐浓度条件下,细胞会因渗透作用失水,糖和蛋白质不易脱离细胞膜溶到提取液中[23],或者高盐浓度使溶出的蛋白质(包含糖蛋白)产生盐析现象,而在低盐浓度下,蛋白质和糖(包含糖蛋白)较易溶出。由此确定 NaCl 溶液浓度大约在 0.3 mol/L。

2.1.2 料液比对糖蛋白得率的影响 在 NaCl 溶液浓度 0.3 mol/L,浸提时间 9 h 条件下,研究料液比分别为 1:3、1:6、1:9、1:12、1:15、1:18 时对糖蛋白得率的影响,结果见图 4。

当料液比大于 1:12 时,糖蛋白得率随料液比减小而增加。因为随着溶剂量的增加,细胞内外物质形成的浓度差越大,胞内物质扩散越快,浸出物越多,浸提液中糖和蛋白质含量越高。但当料液比小于 1:12 时,即随着溶剂量的继续增加,糖蛋白得率增加缓慢,趋于平衡,可能是由于杂质浸出量的增加,同时,考虑到溶剂量过高,不利于后续浓缩、纯

化等过程。故后续实验选择料液比为 1:12。

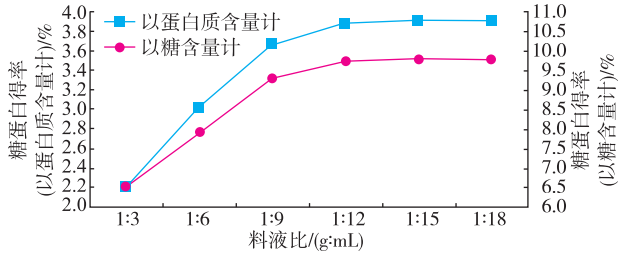


图 4　料液比对糖蛋白得率的影响

Fig. 4　Solid-liquid ratio on the influence of the extraction rate

2.1.3　*提取时间对糖蛋白得率的影响*　在 NaCl 溶液浓度 0.3 mol/L,料液比 1:12 条件下,研究提取时间分别为 3、6、9、12、15、18 h 时对糖蛋白得率的影响,结果见图 5。

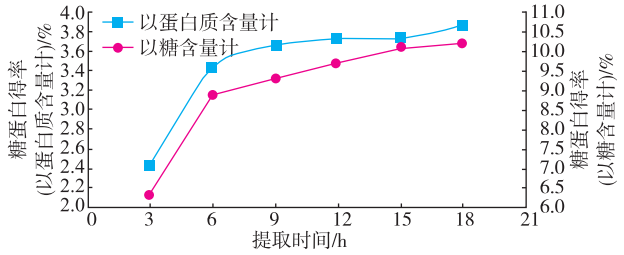


图 5　提取时间对糖蛋白得率的影响

Fig. 5　Extraction time on the influence of the extraction rate

在实验研究的时间范围内，随着时间的延长，糖蛋白得率升高。当提取时间小于 6 h 时,糖蛋白得率升高迅速,9 h 以后趋于平缓,综合考虑效率和得率因素,提取时间宜选择 6 h。

2.1.4　*提取次数对糖蛋白得率的影响*　在 NaCl 溶液浓度 0.3 mol/L,料液比 1:12,提取时间 6 h 条件下,对三角帆蚌脏器进行 3 次浸提,糖蛋白得率见图 6。随着提取次数的增加,总糖蛋白得率增加,但经过一次浸提，糖蛋白得率分别达到 (9.258±0.820)%(以糖含量计)和(3.538±0.764)%(以蛋白质含量计)，其后两次浸提，糖和蛋白质溶出率较低。故后续实验选择一次浸提。

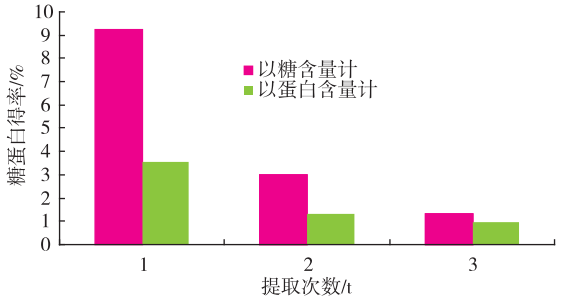


图 6　提取次数对糖蛋白得率的影响

Fig. 6　Extraction times on the influence of the extraction rate

2.2　正交实验的结果及分析

正交实验结果见表 1、表 2。

表 1　正交实验结果

Table 1　Results of orthogonal experiment

实验号	*A* NaCl 浓度/(mol/L)	*B* 料液比/(g/mL)	*C* 提取时间/h	糖蛋白得率(以糖含量计)/%	糖蛋白得率(以蛋白质含量计)/%
1	1(0.1)	1(1:9)	1(3)	6.312	2.013
2	1	2(1:12)	2(6)	7.741	2.642
3	1	3(1:15)	3(9)	8.832	3.325
4	2(0.3)	1	2	7.012	3.254
5	2	2	3	9.813	3.752
6	2	3	1	8.456	3.596
7	3(0.5)	1	3	6.449	2.318
8	3	2	1	6.524	2.658
9	3	3	2	7.785	2.886
K_1	22.885	19.773	21.292		
K_2	25.281	24.078	22.538		
K_3	20.758	25.073	25.094		
$R_{糖}$	4.523	5.300	4.648		
K_1	7.980	7.585	8.267		
K_2	10.602	9.052	8.782		
K_3	7.862	9.807	9.395		
$R_{蛋白质}$	2.740	2.222	1.128		

方差分析结果见表 2。极差($R_{糖}$、$R_{蛋白质}$)分析表明，影响糖蛋白得率(以糖含量计) 因素主次顺序为：料液比>提取时间>NaCl 溶液浓度；影响糖蛋白得率(以蛋白含量计)因素主次顺序为：NaCl 溶液浓度>料液比>提取时间。方差分析结果表明，各因素对糖蛋白得率都不显著。正交实验结果表明，糖蛋白的最优提取条件为 $A_2B_3C_3$，即 NaCl 溶液浓度为 0.3 mol/L、料液比为 1:15、提取时间为 9 h。在此条件下进行 3 次重复实验，糖蛋白得率(以糖含量计)为(9.259±0.083)%，糖蛋白得率(以蛋白质含量计)为(3.763±0.107)%。

表 2　方差分析表

Table 2　Analysis of variance

变异来源	差方和(总糖)	差方和(蛋白质)	均方(总糖)	均方(蛋白质)	F 值(总糖)	F 值(蛋白质)	临界值
因素 1	3.413	1.599	1.706	0.799	7.580	17.638	$F_{0.05}$=19
因素 2	5.290	0.851	2.645	0.425	11.748	9.384	$F_{0.01}$=99
因素 3	2.504	0.212	1.252	0.106	5.561	2.344	

2.3　硫酸铵分级沉淀

在正交实验优化条件下的提取液中加入硫酸铵固体进行分级沉淀 (4 ℃、12 h)，得到三个组分 P1、P2、P3 糖蛋白粗品，结果见表 3。对于相同体积的浸提液，分别加入不同质量的硫酸铵后，P1、P2、P3 得率依次增大；且随着硫酸铵饱和度的增加，P1、P2、P3 三组分中蛋白质和总糖含量也随着增加，且蛋白质得率远远高于总糖得率。沉淀物颜色由乳白色渐变为灰褐色。(P1 组分为饱和度为 0~30%硫酸铵沉淀物；P2 组分为饱和度为 30%~60%硫酸铵沉淀物；P3 组分为饱和度为 60%~90%硫酸铵沉淀物。)

表 3　三角帆蚌脏器糖蛋白的硫酸铵分级沉淀

Table 3　Organ glycoprotein of hyriopsis cumingii by ammonium sulfate precipitation

溶液体积/mL	硫酸铵加入量/g	蛋白质分级范围/%	得率/%	蛋白质得率/%	多糖得率/%
500	82.000	0~30	26.543	25.601	2.125
500	180.500	30~60	43.907	32.005	4.606
500	301.500	60~90	49.562	54.563	5.182

2.4　三角帆蚌脏器糖蛋白抗氧化活性

2.4.1　*清除超氧阴离子自由基能力的分析*　在本实验研究条件下得到的三个不同组分糖蛋白粗品(P1、P2、P3) 对超氧阴离子自由基的清除率见图 7。结果表明，随着质量浓度的增加，其清除率逐渐增加，但在相同质量浓度下，其清除率强弱顺序为：P3>P2>P1，且 P1 组分清除率较 P2、P3 组分清除率弱得多，这可能与不同组分糖蛋白的有效含量有关，当 P3 组分质量浓度为 1 000 μg/mL 时，其清除率达到(82.520±1.320)%。

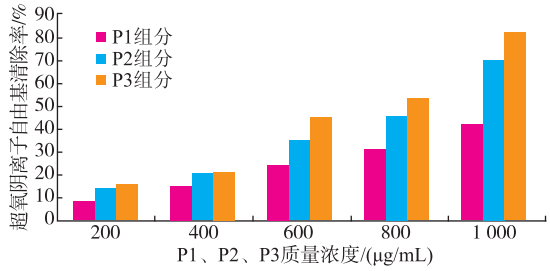


图 7　不同糖蛋白组分清除超氧阴离子自由基能力

Fig. 7　Scavenging activities on superoxide anion radical of glycoprotein from different composition

2.4.2　*清除羟基自由基能力的分析*　图 8 显示了在实验研究质量浓度范围内三个不同组分糖蛋白粗品(P1、P2、P3)对羟基自由基的清除率。在质量浓度小于 600 μg/mL，各组分对羟基自由基的清除率增加比较明显；质量浓度大于 600 μg/mL 时，各组分对羟基自由基的清除能力有增大趋势但较平缓。当 P3 组分质量浓度为 800 μg/mL 时，其清除率达到(51.030±1.290)%。

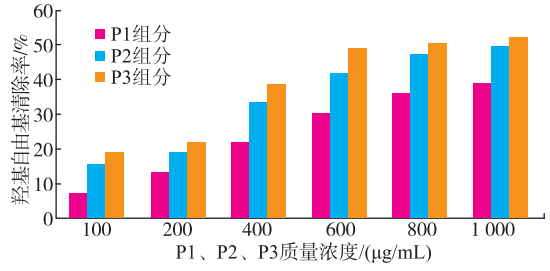
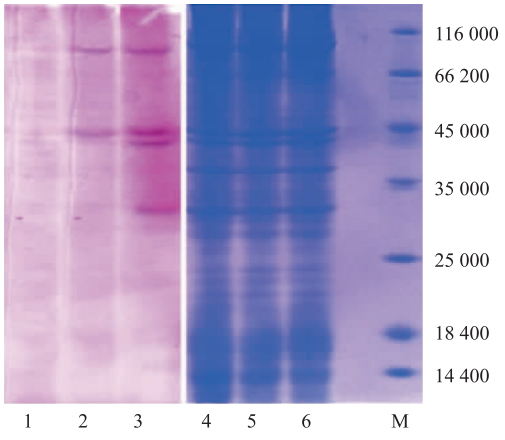


图 8　不同糖蛋白组分清除羟基自由基能力

Fig. 8　Scavenging activities on hydroxyl radical of glycoprotein from different composition

2.5 10 g/dL SDS-PAGE 检测 P1、P2 和 P3 组分

抗氧化性实验表明:相同质量浓度下,P2 和 P3 组分具有较 P1 组分更强的清除自由基(O_2^{-}·、·OH)能力。作者分别称取经真空冷冻干燥的 P1、P2 和 P3 组分各 50 mg 溶于 2.5 mL 蒸馏水中,室温下超声波处理 10 min,然后加入同体积的 2×样品上样缓冲液,煮沸 10 min 后(12 000 r/min 离心 10 min),取 20 μL 电泳,结果见图 9。



(Marker:蛋白质标准品;泳道 1、2、3 依次为组分 P1、P2、P3 PAS 染色;泳道 4、5、6 依次为组分 P3、P2、P1 考马斯亮蓝染色)

图 9 10 g/dL SDS-PAGE 电泳及染色结果

Fig. 9 Results of 10 g/dL SDS-PAGE electrophoresis and staining

组分 P1、P2、P3 经过 10 g/dL SDS-PAGE 电泳后,切胶,其中一部分进行 PAS 染色,另一部分进行考马斯亮蓝染色。结果显示,P3 有 4 条比较明显的 PAS 染色条带与其考马斯亮蓝染色条带位置一致,P2 有 2 条比较明显的 PAS 染色条带与其考马斯亮蓝染色条带位置一致,且 P2 与 P3 有 2 条 PAS 染色条带位置一致,其最大相对分子质量介于 66 200~116 000,另一条带相对分子质量大约为 45 000,P1 组分几乎看不到 PAS 染色条带,其原因可能与 P1 组分中糖蛋白质量浓度较低有关。另外,考马斯亮蓝染色条带 4,5,6 比较显示,P3 蛋白质量浓度高于 P2 和 P1。

3 结 语

以总糖和蛋白质糖蛋白得率为考察指标,通过单因素实验和正交实验确定糖蛋白最优提取条件为:提取温度 4 ℃、NaCl 溶液浓度 0.3 mol/L、料液比 1:15、提取时间 9 h。在此条件下,糖蛋白得率(以糖含量计)为(9.259±0.083)%,糖蛋白得率(以蛋白质含量计)为(3.763±0.107)%。提取液经硫酸铵分级沉淀,离心、透析、浓缩、真空冷冻干燥得 3 个组分糖蛋白粗品,3 个组分中蛋白质和糖含量不同。

体外抗氧化实验表明,3 个组分都具有清除超氧阴离子自由基和羟基自由基的能力,但清除能力不同,在实验研究的质量浓度范围内,60%~90%饱和度的硫酸铵沉淀物抗氧化活性最强,有待进一步研究其组成和结构。

10 g/dL SDS-PAGE 电泳三个组分后经考马斯亮蓝 R250 和 PAS 染色,初步表明 3 个组分含有的糖蛋白谱带不同,且 0~30%饱和度的硫酸铵沉淀物中没有检测出糖蛋白。

参考文献:

[1] 汪桂玲,白志毅,刘晓军,等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报,2014,38(9):1618-1627.
WANG Guiling,BAI Zhiyi,LIU Xiaojun,et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii*[J]. **Journal of Fisheries of China**,2014,38(9):1618-1627.(in Chinese)

[2] 钱名全. 名特水产介绍——三角帆蚌[J]. 湖南农业,2004(8):16.
QIAN Mingquan. Name spy aquatic product introduction-*Hyriopsis cumingii*[J]. **Hunan Agriculture**,2004(8):16.(in Chinese)

[3] 杨文鸽. 三角帆蚌 *Hyriopsis cumingii* 营养成分的分析[J]. 浙江水产学院学报,1997,16(3):201-207.
YANG Wenge. An analysis of the nutrient compositions of the *Hyriopsis cumingii* [J]. **Journal of Zhejiang College of Fisheries**,1997,16(3):201-207.(in Chinese)

[4] 周海燕,刘振华,刘承初,等. 采珠后三角帆蚌肉和外套膜的营养成分分析[J]. 食品工业科技,2006(11):169-173.
ZHOU Haiyan,LIU Zhenhua,LIU Chengchu,et al. Analysis of nutritional components of *Hyriopsis cumingii* meat and mantle after the pearls harvested[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2006(11):169-173.(in Chinese)

[5] Dai Z,Zhang H,Zhang Y,et al. Chemical properties and immunostimulatory activity of a water-soluble polysaccharide from the calm of *Hyriopsis cumingii* Lea[J]. **Carbohyd Polym**,2009,77:365-369.

[6] Qiao D,Ke C,Hu B,et al. Anti-oxidant activities of the poly-saccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. **Carbohyd Polym**,

2009,78:199-204.
[7] Qiao D,Luo J,Ke C,et al. Immunostimulatory activity of the polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. **Int J Biol Macromol**,2010,47:676-680.
[8] 胡健饶,曹明富. 三角帆蚌多糖抑瘤作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2003,20(1):11-13.
HU Jianrao,CAO Mingfu. Inhibitive effects polysacchride from *Hyriopsis cumingii* on tumor ptoliferation:an experimental study [J]. **China JMAP**,2003,20(1):11- 13.(in Chinese)
[9] 乔德亮,何晓梅,韦传宝,等. 三角帆蚌多糖的超声波辅助提取及体外抗菌活性[J]. 食品工业科技,2014(15):72-78.
QIAO Deliang,HE Xiaomei,WEI Chuanbao,et al. Ultrasonic -assisted extraction and in vitro antibacterial activity of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2014(15):72-78.(in Chinese)
[10] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 主编. 生物化学(第三版),北京:高等教育出版社,2002:56.
[11] 李雨哲,任娇艳,赵谋明. 马氏珍珠贝糖蛋白分离纯化及其抗氧化活性的研究[J]. 食品与发酵工业,2010,36(10):30-32.
LI Yuzhe,REN Jiaoyan,ZHAO Mouming. Study on extraction and purification of glycoprotein from and its anti-oxidative properties[J]. **Food and Fermentation Industries**,2010,36(10):30-32.(in Chinese)
[12] 郁迪,杨永芳,王加斌,等. 菲律宾蛤仔糖蛋白提取及体外抗肿瘤活性研究[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2001,30(4):336-339.
YU Di,YANG Yongfang,WANG Jiabin,et al. Study of glycoprotein extracted and purified from *Ruditapes philippinarum* inhibits the growth of tumor cell in vitro [J]. **Journal of Zhejiang Ocean University:Natural Science**,2001,30(4):336-339.(in Chinese)
[13] 冯晓梅, 韩玉谦, 赵志强, 等. 牡蛎中糖蛋白成分的分离纯化及其性质研究 [J]. 天然产物研究与开发,2008,20(4):709-712,716.
FENG Xiaomei,HAN Yuqian,ZHAO Zhiqiang,et al. Isolation,purification and characterization of glycoprotein from oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. **Nat Prod Res Dev**,2008,20(4):709-712,716.(in Chinese)
[14] 杜华英,徐明生,曾婷婷,等. 河蚬糖蛋白体外免疫功能研究[J]. 中国食品学报,2012,12(3):21-27.
DU Huaying,XU Mingsheng,ZENG Tingting,et al. Studies on the immune functions in vitro of glycoprotein from *Corbicula fluminea*[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2012,12(3):21-27.(in Chinese)
[15] 任国艳,梁旺春,詹永献,等. 海蜇头糖蛋白分离纯化及免疫活性研究[J]. 食品科学,2011,32(17):147-150.
REN Guoyan,LIANG Wangchun,ZHAN Yongxian,et al. Purification and immune activity of glycoprotein isolated from jellyfish oral arms[J]. **Food Science**,2011,32(17):147-150.(in Chinese)
[16] 胡雪琼,吴红棉,胡俊辉,等. 超声波辅助提取近江牡蛎糖蛋白的工艺优化[J]. 食品工业科技,2009,30(7):235-240.
HU Xueqiong,WU Hongmian,HU Junhui,et al. Optimization of the ultrasound-assisted extraction technology of glycoprotein from *Crassostrearivularis crould*[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2009,30(7):235-240.(in Chinese)
[17] 包郁明,陶宇,侯虎,等. 鲍鱼脏器糖蛋白超声辅助提取工艺及分离纯化的研究[J]. 食品与发酵工业,2011,37(9):11-15.
BAO Yuming,TAO Yu,HOU Hu,et al. Study on the ultrasound-assisted extraction and purification of abalone visceral glycoprotein[J]. **Food and Fermentation Industries**,2011,37(9):11-15.(in Chinese)
[18] 余瑞元,袁明秀,陈丽蓉. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,2005:236-239.
[19] 张翼伸. 有关糖复合物的分级纯化、结构确定、生物活性的几个问题[J]. 生命的化学,1994,14(6):42-43.
ZHANG Yishen. Several issues on fractionation and purification,structure identify,biological activities of glycoconjugates[J]. **Chemistry of Life**,1994,14(6):42-43.(in Chinese)
[20] 李艳红,刘坚,张涛,等. 酶解鹰嘴豆蛋白制备抗氧化肽工艺优化研究[J]. 农业工程学报,2008,24(1):268-273.
LI Yanhong,LIU Jian,ZHANG Tao,et al. Enzymolysis technology optimization for production of antioxidant peptides from chickpea protein[J]. **Transactions of the CSAE**,2008,24(1):268-273.(in Chinese)
[21] 罗秋水,上官新晨,蒋艳,等. 紫红薯糖蛋白体外抗氧化活性研究[J].江西农业大学学报,2012,34(4):809-813.
LUO Qiushui,SHANGGUAN Xinchen,JIANG Yan,et al. Antioxidant activity of glycoprotein from the purple sweet potato[J]. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**,2012,34(4):809-813.(in Chinese)
[22] 王玉琪,巫光宏,林先丰,等. 多糖和糖蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法的改进[J]. 植物生理学通讯,2009,45(2):169-172.
WANG Yuqi,WU Guanghong,LIN Xianfeng,et al. Improvement of staining method for polyacrylamide and glycoprotein from polyacrylamide gel electrophoresis[J]. **Plant Physiology Communications**,2009,45(2):169-172.(in Chinese)
[23] 梁旺春. 海蜇糖蛋白分离纯化、理化性质及结构特点研究[D]. 洛阳:河南科技大学,2013,20.