

不同处理方式对红肉中N-羟乙酰神经氨酸解离的影响

蒋芸, 付浩, 冯昌雨, 吴剑荣*

(江南大学生物工程学院 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 应用不同方法处理红肉(猪肉与牛肉), 研究能够有效解离红肉中N-羟乙酰神经氨酸(N-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)的预处理方式。将红肉通过水煮、微波加热和有机酸腌制等不同方式进行处理, 利用酸水解法释放红肉中的两种唾液酸成分Neu5Gc和N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac), 经1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧苯(1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene, DMB)衍生化后用高效液相色谱检测其含量; 另外还采用 β -半乳糖苷酶水解红肉, 再测定水解液中的Neu5Gc和Neu5Ac。结果表明: 沸水浴处理红肉后其Neu5Gc和Neu5Ac都有一定程度的解离, 水煮时间越长, 红肉中Neu5Gc和Neu5Ac解离效果越好, 且猪肉中的Neu5Gc相比牛肉的更容易水煮解离。采用微波炉高温处理红肉也能够解离Neu5Gc, 但是解离率不超过70.0%, 且处理时间影响较小; 而Neu5Ac的解离率都低于Neu5Gc。红肉通过不同的弱有机酸腌制处理后Neu5Gc和Neu5Ac解离率差别不大, 且醋酸腌制处理后Neu5Gc解离效果较好。另外, β -半乳糖苷酶能有效解离猪肉中Neu5Gc, 水解时间越长, 解离率越高。对于牛肉, Neu5Gc解离率最高为84.0%, 解离效果不如猪肉。

关键词: 红肉; N-羟乙酰神经氨酸; N-乙酰神经氨酸; 唾液酸

Effects of Different Treatments on N-glycolylneuraminic Acid Dissociation in Red Meat

JIANG Yun, FU Hao, FENG Changyu, WU Jianrong*

(Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education,
School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this work, different approaches were tested to find the most efficient one to remove n-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) from red meat (pork and beef). The red meats were treated with cooking in hot water, heating by microwave oven and pickling with organic acid. Then the residual Neu5Gc and N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in the red meat was liberated with acetic acid and determined by high performance liquid chromatography (HPLC) after 1,2-diamino-4,5-methene-dioxy benzene (DMB) derivatization. In addition, the red meat was hydrolyzed by β -galactosidase and the hydrolysate was determined for Neu5Gc and Neu5Ac. As a result, treatment with boiling water could remove both Neu5Gc and Neu5Ac to some extent. They could be removed more effectively with longer-term treatment by boiling water and the Neu5Gc in pork was easier to remove than that in beef. Microwave heating could also remove the Neu5Gc in red meat, while the dissociation rate was lower than 70.0% and the treatment time had no significant influence. The dissociation rate of Neu5Ac was lower than that of Neu5Gc. After pickling with different organic acids, the dissociation rate of Neu5Gc and Neu5Ac in red meat showed no difference and the treatment with acetic acid could work better for Neu5Gc removal. In addition, hydrolysis by β -galactosidase could remove the Neu5Gc in pork more efficiently. The longer the hydrolysis time was, the higher the dissociation rate of Neu5Gc was. With regard to beef, the highest dissociation rate was only 84.0%, which was lower than that in pork.

Key words: red meat; N-glycolylneuraminic acid; N-acetylneuraminic acid; sialic acid

中图分类号: TS251.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123 (2015) 12-0052-06

doi: 10.15922/j.cnki.rlyj.2015.12.010

收稿日期: 2015-11-26

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划重点项目(2011BAD23B04); 江苏省自然科学基金项目(BK2011158)

作者简介: 蒋芸(1983—), 女, 中级实验师, 硕士, 研究方向为发酵工程与糖工程。E-mail: jyjcpao@163.com

*通信作者: 吴剑荣(1976—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为发酵工程与糖工程。E-mail: kinowu@jiangnan.edu.cn

近年来,肉类的消费在我国迅速增长,尤其是红肉和加工肉,已经有大量流行病学资料显示,红肉及其加工肉类的过多摄入易引发癌症^[1],最新流行病学研究发现,吃红肉的人群患结肠癌、乳腺癌、冠心病等慢性病的危险性增高^[2]。这与红肉中含有一种特殊的唾液酸成分——*N*-羟乙酰神经氨酸(*N*-glycolylneuraminic acid, Neu5Gc)密切相关。由于*N*-羟乙酰神经氨酸的摄入使机体内产生*N*-羟乙酰神经氨酸的抗体,引起抗原响应和炎症,进而引发癌症^[3-4]。已有证据证明,Neu5Gc在结肠癌、成视网膜细胞瘤、乳腺癌和黑色素瘤组织中的水平有所升高^[5-10]。但目前关于Neu5Gc引发癌症的具体原因并没有定论。

唾液酸是一类神经氨酸的衍生物,是含有9个碳原子并具有吡喃糖结构的酸性氨基酸^[11],广泛存在于脊椎动物组织及少数微生物中,通常以低聚糖、糖脂或者糖蛋白的形式存在^[12-13]。唾液酸种类有50多种,主要的3种结构为:*N*-乙酰神经氨酸、*N*-羟乙酰神经氨酸和3-脱氧-*D*-甘油-*D*-半乳壬酮糖(又名脱氨神经氨酸)(2-keto-3-deoxy-*D*-glycero-*D*-galacto-nononic acid, KDN)^[14]。唾液酸的衍生物基本都是上述3种核心成分的乙酰化、巯基化、甲基化、酯化和内酯化产物。

N-乙酰神经氨酸和*N*-羟乙酰神经氨酸是自然界存在的两种唾液酸的主要物质,是构成神经节苷脂中鞘糖脂的主要成分^[15]。Neu5Gc常存在于糖蛋白和糖脂的糖基化末端,在大多数后口动物的非神经组织和体液中普遍存在,包括棘皮动物和脊椎动物^[16]。大多数哺乳动物,包括与人类相近的类人猿都能自身合成Neu5Gc,但健康人体不能合成^[17]。这也从进化上使得人类和其他动物区别开^[18]。也是由于猿猴、黑猩猩、猪等含有较多Neu5Gc,他们的器官如果移植到人体就产生强烈的排异作用。人体内主要的唾液酸形式是Neu5Ac,约占整个唾液酸家族的99%以上,少以游离形式存在,多连接在细胞膜表面的糖蛋白、糖脂或寡糖末端,且其分子结构具有多样性,参与细胞识别、信号转导、肿瘤发生、受精等多个生理过程^[19]。

人体能够合成Neu5Ac,却不能合成Neu5Gc,人体中Neu5Gc主要是通过食物摄入在体内积累^[20-21]。来自于饮食及其他代谢物转化而来的Neu5Gc可以以糖基复合物的形式出现于上皮细胞或一些癌组织中^[22]。Neu5Gc作为人类某些癌症疾病中的一种特异性标志物^[23],主要作为抗原存在。美国加州大学圣迭戈分校大学教授Varki^[24]多年研究发现作为非人类唾液酸,Neu5Gc的摄入使机体内产生识别Neu5Gc的抗体,促进慢性炎症发生,从而刺激肿瘤生长。肉类尤其是红肉和加工肉类是人体Neu5Gc的重要来源途径,可使Neu5Gc在体内堆积,增加癌症的风险^[25]。另外红肉中还含有Neu5Ac,对普通人来说是可有

可无的,而孕产妇由于婴儿发育或者喂奶^[26],需要大量Neu5Ac,因此我们看到这些妇女经常喝肉汤和骨头汤。如果有办法能在烹饪前通过预处理,把部分Neu5Gc解离出去,就能减少发生癌症的危险。

不同红肉中Neu5Gc含量各不相同,并且同种红肉经过不同方式处理后其含量也不同。美国Varki^[27]发现猪肉中Neu5Gc含量为25.5 μg/g,牛肉中为30.1 μg/g。而Chen等^[28]报道猪肉中Neu5Gc含量为5.6 μg/g,牛肉中为30.3 μg/g。到目前为止,研究食物中唾液酸含量的报道较多,但还没有相关文献报告通过某种预处理方法可以降低红肉中的Neu5Gc含量。因此,可以借鉴日常红肉烹饪方式,采取预处理方式降低Neu5Gc摄入量,从而为人们合理膳食提供实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红肉(猪肉和牛肉)均从菜市场购买。

Neu5Ac、Neu5Gc标准品、1,2-二氨基-4,5-亚甲基二氧苯(1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene, DMB、甲醇、乙腈(色谱纯) 美国Sigma公司;硫酸、冰醋酸、亚硫酸钠、硫代硫酸钠、2-巯基乙醇(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Breeze 2型高效液相色谱仪、2475型荧光检测器 美国Waters公司;InertSustain C₁₈色谱柱 日本岛津公司;3K15型高速冷冻离心机 美国Sigma公司;Amicon Ultra-4/15离心超滤管 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测条件

色谱柱为InertSustain C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温30℃,荧光检测器激发波长373 nm、发射波长448 nm,流动相为甲醇-乙腈-超纯水(7:8:85, V/V),流速为0.9 mL/min,进样体积10 μL。

DMB衍生液配制:8 mmol/L DMB、1.5 mol/L冰醋酸、0.25 mol/L硫代硫酸钠、0.25 mol/L亚硫酸钠、0.8 mmol/L 2-巯基乙醇。

衍生条件:90 μL样品或标准品中加入10 μL DMB衍生液,50℃避光衍生150 min,冷却至室温后分析。

1.3.2 不同方式处理红肉样品

1.3.2.1 弱有机酸结合NaCl腌制处理红肉

取3份红肉,每份1 g切成肉丁,分别加入体积分数为1.5%乳酸溶液、1.5%醋酸溶液、1.5%柠檬酸溶液(各溶液均含0.2 g NaCl)。将样品放置在冰箱冷藏室中腌制24 h,弃掉腌制液,并用水清洗样品,以除去样品中有机酸,得到待测样品。

1.3.2.2 微波炉加热处理红肉

取3份红肉, 每份1 g切成肉丁, 加入10 mL水, 在微波炉中分别加热5、10、15 min。弃掉试管中水, 得到待测样品。

1.3.2.3 水煮加热处理红肉

取6份红肉, 每份1 g切成肉丁, 加入10 mL水, 在沸水浴中加热10、20、30、45、60 min。弃掉试管中的水, 得到待测样品。

1.3.2.4 β -半乳糖苷酶水解处理红肉

取1 g红肉切成肉丁, 加入10 mL水, 均质机处理成均匀肉浆, 加入1%半乳糖苷酶(以质量分数计), 37 °C恒温水浴处理不同时间(0.5、1、2、5、10 h), 15 000 r/min离心去固形物, 上清液用0.45 μ m膜过滤, 真空干燥, 再溶解于1 mL超纯水中, 加入0.2 mL 0.1 mol/L NaOH在37 °C条件下脱乙酰处理30 min, 精确吸取处理后的溶液90 μ L, 加入10 μ L DMB衍生液于50 °C避光衍生150 min, 冷却后待测。

1.3.3 空白对照中Neu5Gc和Neu5Ac含量的测定

分别取1 g新鲜猪肉和牛肉样品, 按1.3.2节各种方式处理红肉空白对照(除 β -半乳糖苷酶水解处理红肉)。加入10 mL 2 mol/L醋酸, 均质机处理成肉浆, 80 °C水解3 h, 15 000 r/min离心去固形物, 上清液用0.45 μ m膜过滤, 真空干燥除去醋酸, 再溶解于1 mL超纯水中, 加入0.2 mL 0.1 mol/L NaOH在37 °C条件下脱乙酰处理30 min。精确吸取处理后的溶液90 μ L, 加入10 μ L DMB衍生液于50 °C避光衍生150 min, 冷却后待测。

1.3.4 红肉样品中Neu5Gc、Neu5Ac解离率测定

经过不同方式处理后红肉样品中Neu5Gc、Neu5Ac解离率分别按式(1)、(2)计算:

$$\text{Neu5Gc解离率}/\% = C_2/C_1 \quad (1)$$

$$\text{Neu5Ac解离率}/\% = C_4/C_3 \quad (2)$$

式中: C_1 、 C_3 分别为空白对照红肉样品中Neu5Gc和Neu5Ac的含量/%; C_2 、 C_4 分别为不同方式预处理后红肉样品中Neu5Gc和Neu5Ac的含量/%。

1.3.5 标准品线性实验

精确称取0.032 5 g Neu5Gc和0.030 9 g Neu5Ac标准品, 分别溶解于100 mL超纯水中, 配成1 mmol/L Neu5Gc、1 mmol/L Neu5Ac标准品溶液。分别取浓度为1 mmol/L的两种标准溶液5、10、20、30、40 μ L按照表1配成待衍生的混合液, 衍生后HPLC检测, 不同浓度标准品进样2次。以2次峰面积的平均值为横坐标, 标准品的浓度为纵坐标绘制标准曲线, 计算标准曲线方程。

表1 唾液酸标准曲线数据

Table 1 Standard curve data for sialic acid

Neu5Gc (Neu5Ac) / μ L	超纯水/ μ L	DMB/ μ L	Neu5Gc浓度/(μ mol/L)	Neu5Ac浓度/(μ mol/L)
5	80	10	50	50
10	70	10	100	100
20	50	10	200	200
30	30	10	300	300
40	10	10	400	400

2 结果与分析

2.1 Neu5Gc、Neu5Ac标准品的液相色谱检测

2.1.1 Neu5Gc、Neu5Ac标准品色谱图

利用唾液酸在酸性条件下能与DMB衍生液生成较强荧光信号的DMB衍生物^[29], 采用HPLC检测红肉中Neu5Gc、Neu5Ac含量。Neu5Gc、Neu5Ac标准品色谱图如图1所示, Neu5Gc的保留时间为12.627 min, Neu5Ac的保留时间为16.150 min, 色谱峰分离效果较好。由于荧光对杂质很敏感, 因此在实验过程中对样品的纯度和实验操作要求较高。

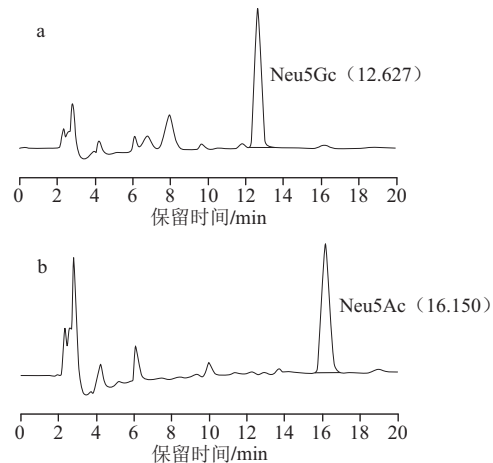


图1 Neu5Gc (a) 和Neu5Ac (b) 标准品溶液的色谱图

Fig.1 Chromatograms of standard solutions of Neu5Gc (a) and Neu5Ac (b)

2.1.2 线性关系考察

考察测定方法的线性关系, 在标准唾液酸的范围内, Neu5Gc、Neu5Ac标准品浓度(mmol/L)与峰面积具有良好的线性关系: Neu5Gc含量标准曲线为 $y=0.000\ 4x+29.554\ 0$, $R^2=0.995\ 6$; Neu5Ac含量标准曲线为 $y=0.000\ 7x+7.5216$, $R^2=0.999\ 4$ 。

2.2 空白对照中Neu5Gc、Neu5Ac的含量

空白对照中Neu5Gc、Neu5Ac进行HPLC测定, 峰面积如图2所示。按外标法计算其含量, 新鲜猪肉中Neu5Gc含量为 $(35.00\pm2.41)\ \mu\text{g/g}$, Neu5Ac含量为 $(110.00\pm3.10)\ \mu\text{g/g}$; 新鲜牛肉中Neu5Gc含量为 $(19.00\pm1.25)\ \mu\text{g/g}$, Neu5Ac含量为 $(90.00\pm2.68)\ \mu\text{g/g}$ 。

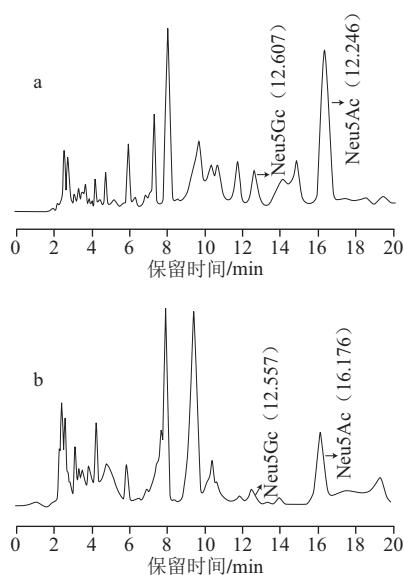


图2 猪肉(a)和牛肉(b)空白基质质谱图

Fig.2 Chromatograms of matrix blank of pork (a) and beef (b)

2.3 不同处理方式对红肉中Neu5Gc、Neu5Ac解离的影响

2.3.1 水煮对红肉中Neu5Gc、Neu5Ac解离的影响

水煮是非常普通的猪肉烹调方式。为探究水煮是否能解离出Neu5Gc, 本研究控制红肉的水煮时间, Neu5Gc、Neu5Ac的解离情况如图3所示。

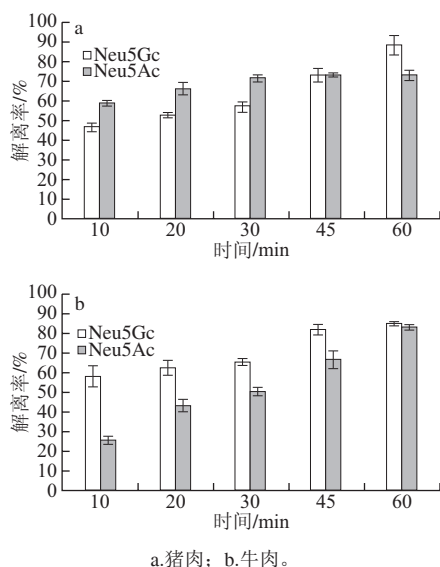


图3 水煮对红肉中唾液酸解离的影响

Fig.3 Effect of cooking in hot water on the dissociation of sialic acid in red meat

由图3可知, 随着水煮时间的延长, 红肉中Neu5Gc、Neu5Ac解离率都逐渐增多。猪肉水煮30 min后Neu5Ac解离率变化不大, 但Neu5Gc一直呈上升趋势, 并且在60 min解离率高达88.4%; 而牛肉中Neu5Gc解离率

从水煮处理10 min的58.0%增加到45 min的80.0%, 但在45 min后解离率变化不大, Neu5Ac的解离则随着水煮时间的延长增加比较明显。因此, 水煮时间越长, 红肉中非人类唾液酸Neu5Gc解离越多。但在实际烹调中, 水煮处理时间过长也影响肉的营养保留。

2.3.2 微波炉加热处理对红肉中Neu5Gc、Neu5Ac解离的影响

微波炉是常见的厨房烹调设备。本研究尝试用微波炉加热处理红肉, Neu5Gc、Neu5Ac解离情况如图4所示。

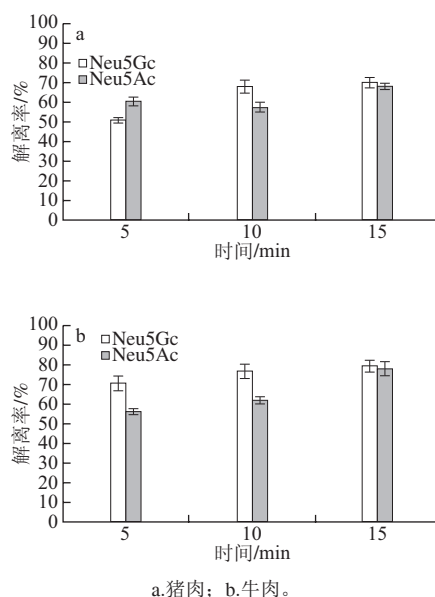


图4 微波炉处理对红肉中唾液酸解离的影响

Fig.4 Effect of microwave heating on the dissociation of sialic acid in red meat

由图4可知, 微波炉处理和水煮一样也能解离出Neu5Gc, 处理5 min后, Neu5Gc解离率超过50.0%。随着微波炉加热时间的延长, 猪肉中非人类唾液酸Neu5Gc解离率逐渐增多, 但是处理10 min与15 min的Neu5Gc解离率变化不大(70%左右), 而Neu5Ac在微波炉加热时解离率在55.0%~70.0%范围波动。在牛肉中Neu5Gc解离情况变化不大, 但解离率都在70.0%以上, 对于Neu5Ac, 随着微波炉加热时间越长, Neu5Ac解离率增大, 但是都低于Neu5Gc的解离率。由于微波炉的加热原理是通过水分子运动产生热量, 因此处理红肉时, 糖链末端的唾液酸可能会受到水分子的攻击从而脱落下来。

2.3.3 有机酸腌制对红肉中Neu5Gc、Neu5Ac解离的影响

一些有机酸如醋酸、柠檬酸和乳酸是食品饮料中的常见配料。前期研究发现唾液酸在酸性环境中容易从糖链上解离。为探究不同有机酸对红肉中唾液酸解离的影响, 模拟厨房肉类腌制过程, Neu5Gc、Neu5Ac解离情况如图5所示。

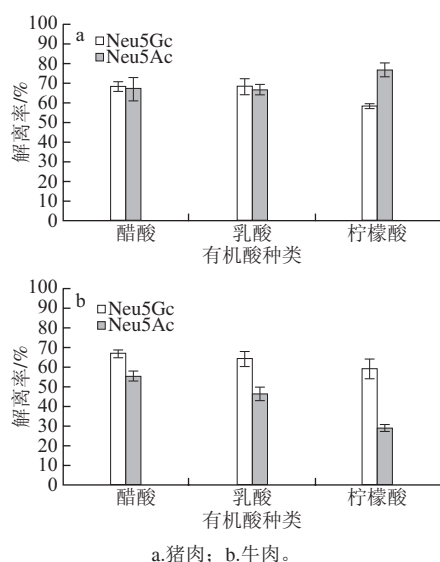


图5 有机酸腌制处理对红肉中唾液酸解离的影响

Fig.5 Effect of pickling with organic acid on the dissociation of sialic acid in red meat

由图5可知,猪肉在有机酸腌制的情况下,60.0%以上唾液酸解离出来。其中,醋酸和乳酸对猪肉中Neu5Gc解离效果较好,在柠檬酸处理后,猪肉中Neu5Ac解离率比较大。牛肉通过有机酸腌制后,牛肉中Neu5Gc解离情况变化不大,对于Neu5Ac,醋酸腌制后解离效果最好,其次为乳酸和柠檬酸。在3种有机酸腌制中,醋酸结合氯化钠腌制对牛肉中非人类唾液酸Neu5Gc解离效果最好。因此,红肉在经过有机酸处理后也可以解离部分Neu5Gc,但是,有机酸腌制处理需要放冰箱过夜,处理方法相对时间比较长。

2.3.4 β -半乳糖苷酶处理对红肉中Neu5Gc、Neu5Ac解离的影响

β -半乳糖苷酶是一种商业化的食品用酶,可以水解含有半乳糖苷的物质,红肉中的唾液酸主要连接在半乳糖上。以一定量的 β -半乳糖苷酶处理猪肉,解离情况如图6所示。随着 β -半乳糖苷酶处理时间延长,猪肉中Neu5Gc和Neu5Ac解离率都逐渐增大,说明水解时间越长,猪肉中唾液酸解离出来的越多。在处理10 h后,Neu5Gc和Neu5Ac几乎完全解离出来。同样,用 β -半乳糖苷酶处理牛肉,牛肉中Neu5Gc和Neu5Ac解离率总体也呈上升趋势。对于Neu5Gc,水解1 h的解离率反而下降,这可能是酶处理牛肉块时,由于空间位阻造成的误差;水解5 h后,Neu5Gc解离率变化较小,在82.0%左右。对于Neu5Ac,水解1 h后其解离率就变化不大。说明相比 β -半乳糖苷酶对猪肉中唾液酸解离效果良好,牛肉纤维较大可能不利于酶完全发挥其作用。

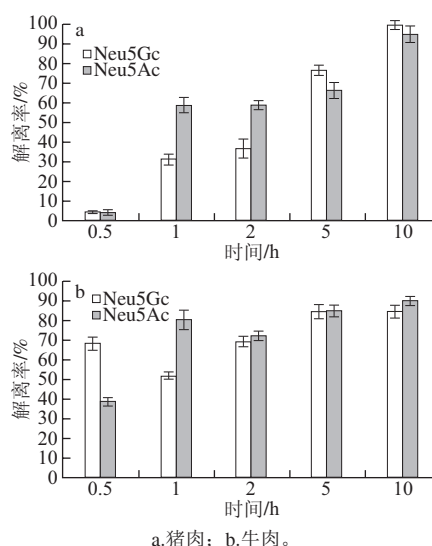


图6 β -半乳糖苷酶处理对红肉中唾液酸解离的影响

Fig.6 Effect of hydrolysis by β -galactosidase on the dissociation of sialic acid in red meat

3 结论

本研究选择红肉中典型的肉类——猪肉和牛肉进行唾液酸含量的检测。空白对照实验发现猪肉中Neu5Gc含量为35.00 $\mu\text{g/g}$, Neu5Ac为110.00 $\mu\text{g/g}$;牛肉中Neu5Gc含量为19.00 $\mu\text{g/g}$, Neu5Ac为90.00 $\mu\text{g/g}$ 。牛肉中的Neu5Gc平均含量低于猪肉。

研究了水煮、微波炉加热、有机酸腌制和半乳糖苷酶水解处理猪肉和牛肉中非人类唾液酸解离的影响。通过不同的加工方式处理红肉发现,猪肉水煮时间越长,从猪肉中解离出来的非人类唾液酸Neu5Gc越多,解离率最高达88.4%。而牛肉通过水煮60 min后,Neu5Gc的解离率达到85.0%;红肉经过微波高温加热处理其Neu5Gc的解离效果变化不大,15 min后猪肉中的Neu5Gc解离率为70.0%,而牛肉达到了79.0%。采用不同的有机酸处理发现,猪肉和牛肉在醋酸中解离效果最好,解离率分别为68.3%和66.7%。 β -半乳糖苷酶能有效解离猪肉中Neu5Gc,水解时间越长,解离率越高;对于牛肉,Neu5Gc的解离效果不如猪肉。因此,食用红肉最好是通过长时间的水煮,尽可能除去红肉中Neu5Gc的含量。对于猪肉和牛肉进行其他方式的处理(烟熏、风干等)以及其他红肉的加工处理还需做进一步地探讨。

参考文献:

- [1] 刘沛,王舒,李变荣.血清唾液酸在恶性肿瘤诊断中的临床应用[J].检验医学与临床,2012,9(6): 687-688.
- [2] SHIGETA S. Recent progress in antiviral chemotherapy for respiratory syncytial virus infections[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2000, 9(2): 221-235.



- [3] HEDLUND M, PADLER-KARAVANI V, VARKI A N M, et al. Evidence for a human-specific mechanism for diet and antibody-mediated inflammation in carcinoma progression[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of Sciences, 2008, 105(48): 18936-18941.
- [4] 范杏丹, 李红卫. 红肉、*N*-羟乙酰神经氨酸与癌症关系的研究[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 326-329.
- [5] 盛湘越. 唾液酸酶法在细菌性阴道病诊断中的临床应用价值[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34(12): 1758-1759.
- [6] 翟丽霞, 李迎春. 血清唾液酸在肝癌患者诊治中的应用价值[J]. 山西医药杂志, 2014, 43(1): 28-31.
- [7] 杨思诗, 罗力, 胡丽华. 血清唾液酸检测在血液疾病诊治中的应用价值[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(2): 103-105.
- [8] 陈晓玲, 武锦彪, 俞倩, 等. 2型糖尿病及其并发症患者血清唾液酸检测意义[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(2): 159-161.
- [9] 杜艳丽. 参芎葡萄糖联合单唾液酸四己糖神经节苷脂治疗缺血性脑中风的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2013, 8(8): 151-152.
- [10] 朱其聪, 罗荣城. 骨唾液酸蛋白与恶性肿瘤骨转移[J]. 癌症进展, 2013, 11(4): 333-336.
- [11] INOUE Y, INOUE S. Diversity in sialic acid and polysialic acid residues and related enzymes[J]. Pure and Applied Chemistry, 1999, 71(5): 789-800.
- [12] 吴剑荣, 詹晓北, 郑志永, 等. 聚唾液酸与唾液酸的研究进展[J]. 生物加工过程, 2007(1): 20-26.
- [13] MALIAKAL M A, RAVINDRANATH M H, IRIE R F, et al. An improved method for the measurement of total lipid-bound sialic acids after cleavage of alpha-2,8-sialic acid linkage with vibrio cholerae sialidase in the presence of cholic acid, SDS and Ca²⁺[J]. Glycoconjugate Journal, 1994, 112: 905-910.
- [14] LOFLING J C, PATON A W, VARKI N M, et al. A dietary nonhuman sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome[J]. Kidney International, 2009, 76(2): 140-144.
- [15] 陈鸿军, 丁铲. *N*-羟乙酰神经氨酸研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(4): 64-68.
- [16] VARKI A, CUMMINGS R, ESKO J, et al. Essentials of glycobiology[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 249-252.
- [17] HEDLUND M, TANGVORANUNTAKUL P, TAKEMATSU H, et al. *N*-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution[J]. Molecular and Cellular Biology, 2007, 27(12): 4340-4346.
- [18] 李宏越, 柳鹏福, 史吉平, 等. 唾液酸的生理功能、应用及其生产方法[J]. 食品工业科技, 2014(3): 363-368.
- [19] 魏冬旭, 江连洲, 王辰, 等. 唾液酸生物活性及其应用的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2011(7): 64-68.
- [20] TANGVORANUNTAKUL P, GAGNEUX P, DIAZ S, et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100, 21: 12045-12050.
- [21] BARDOR M, NGUYEN D H, DIAZ S, et al. Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(6): 4228-4237.
- [22] PADLER-KARAVANI V, YU H, CAO H Z, et al. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease[J]. Glycobiology, 2008, 18(10): 818-830.
- [23] REUTTER W, TAUBER R. Turnover of plasma membrane glycoproteins from liver and hepatoma[J]. Gann Monograph on Cancer Research, 1983, 29: 59-65.
- [24] VARKI A. Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(Suppl 2): 8939-8946.
- [25] 王宝林, 刘波, 陈玲, 等. 流感病毒唾液酸受体在人、小鼠、鸡及鸭气管和肺组织分布的定性与定量分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 42(5): 383-389.
- [26] KARIM M, WANG B. Is sialic acid in milk food for the brain?[J]. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 2006, 18(1): 1-11.
- [27] VARKI A. Sialic acids in human health and disease[J]. Trends in Molecular Medicine, 2008, 14(8): 351-360.
- [28] CHEN Y, PAN L L, LIU N, et al. LC-MS/MS quantification of *N*-acetylneuraminic acid, *N*-glycolylneuraminic acid and ketodeoxynonulosonic acid levels in the urine and potential relationship with dietary sialic acid intake and disease in 3-to5-year-old children[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 111: 332-341.
- [29] LIN S L, INOUE S, INOUE Y. Acid-base properties of the reaction product of sialic acid with fluorogenic reagent, 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene(DMB)[J]. Carbohydrate Research, 2000, 329(2): 447-451.