

肠膜明串珠菌发酵产物葡聚糖结构的鉴定

廖 威^{1,2} 杨 辉³ 梁海秋³ 周河治³

1(中山大学生命科学院生物防治国家重点实验室 广州 510275)

2(广西职业技术学院 南宁 530227)

3(广西大学食品与发酵工程研究所 南宁 530004)

摘 要 肠膜明串珠菌可以发酵甘蔗汁产生葡聚糖。其发酵产物经离心分离后,上清液用无水乙醇分步沉淀抽提得到葡聚糖样品,然后用气相色谱(GC)、红外光谱(IR)、纸层析和化学方法等对葡聚糖样品进行鉴定。结果表明,肠膜明串珠菌的发酵产物葡聚糖是一种由完全甲基化的无水吡喃葡萄糖单体构成的化合物,糖苷键的 95% 是 α -D-(1,6) 键型,其余为 α -D-(1,3) 和其他键型。

关键词 肠膜明串珠菌 结构鉴定 葡聚糖

葡聚糖是一种完全由 α -D-吡喃葡萄糖单体构成的多糖,其糖苷键的类型和每种类型的数量随不同的葡聚糖而变化^[1],糖苷键的类型有 (1,6)、(1,4)、(1,3)、(1,2) 等 4 种,不同来源的葡聚糖其结构不同^[2]。国内外学者的研究表明,葡聚糖具有免疫抗癌作用,预防高血压、动脉硬化,有助于减肥,并可用作代血浆、凝胶过滤剂、优质凝胶、食用低热葡聚糖添加剂、化妆品、石油助剂、B.T. 杀虫剂的增效剂等,具有广泛的应用价值,有不少研究者致力于葡聚糖高产菌株的选育、工程菌的构建、培养条件优化等。

肠膜明串珠菌是一种可发酵甘蔗产生葡聚糖的细菌,它产生的葡聚糖粘性很强,这也就是蔗糖生产中的压榨工段会产生一团团“蔗饭”的原因。作为我国生产蔗糖的主要地区的广西,每年为此要损失 2.3 ~ 2.5 万 t 的白砂糖^[3]。但另一方面,我们却可以利用这一点,生产有重要应用价值的葡聚糖产品,以提高对蔗糖的综合利用。因此,文中对肠膜明串珠菌的发酵产物葡聚糖进行结构分析,以期为进一步研究其生理功能和开发应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 药 品

葡聚糖标准品(色谱纯,上海生工) KBr (色谱纯)。

1.1.2 仪 器

岛津 GC-16A 气相色谱仪, C-R3A 数据处理机,检测器; Digilab FTS-15C 型傅立叶变换红外光谱仪(FT-TR); LABCONCO 冷冻干燥机; HQL300 柜式恒温摇床; METTER 天平; METTER TOLEDO 320 pH 计; UV-vis 765 紫外分光光度计。

1.1.3 发酵培养基(g/L)

牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 蔗糖 50, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 3, NaCl 1, 琼脂 20, pH 值自然。

1.1.4 菌 种

肠膜明串珠菌菌株(*Leuconostoc Mesenteroides*, GXMY-1), 广西大学食品与发酵工程研究所分离保存。

1.2 方 法

1.2.1 摇瓶发酵葡聚糖

第一作者: 博士研究生, 讲师(周河治教授为通讯作者)。
收稿时间: 2003-02-17

在 250 mL 的摇瓶中,装入 50 mL 接种培养了 20 h 的菌液 10 mL, 25℃, 170 r/min 振动培养 26 h, 发酵液以 7000 r/min 离心, 去菌体, 上清液即可用于提纯。

1.2.2 提纯方法

采用无水乙醇分步沉淀法^[4], 再用透析袋(截留分子量 8000—10000 以上)以蒸馏水透析 2 d, 最后进行冷冻干燥。

1.2.3 物理鉴定法

采用气相色谱、红外光谱和纸层析等方法^[5]。

1.2.3.1 气相色谱

称取冻干的提纯葡聚糖 10 mg, 加入 2 mol/L H_2SO_4 溶液 10 mL, 98℃ 水解至无絮状物, 向水解液中加入 $BaCO_3$, 60℃ 中和至中性, 水解液冻干后做气相色谱。

1.2.3.2 红外光谱

将经透析后冻干得到的葡聚糖样品两份各 1 mL 分别与 100~200 mg 的 KBr 粉末进行研磨, 经压片机压成薄片, 随即上机测定红外光谱。

1.2.3.3 纸层析

将葡聚糖样品 10 mg 加入 5 mL 8 mol/L H_2SO_4 , 5 min 后加水将 H_2SO_4 稀释至 1.5 mol/L, 然后封管置 100℃ 烘箱中水解 6 h, 水解完全后用 $BaCO_3$ 中和后过滤, 适当浓缩, 水解产物与葡萄糖标品对照进行纸层析(新华一号), 以 V(乙酸乙酯): V(吡啶): V(水) = 10:4:3 为展开剂, 以苯胺-邻苯二甲酸为显色剂。

1.2.4 化学鉴定法

采用高碘酸氧化法和 Smith 降解法^[6]。

1.2.4.1 高碘酸氧化法

40 mg 样品 + 0.05 mol/L 高碘酸钠 15 mL, 置暗处 6 d, 反应完全后用标准 UV 法测反应终止液的透光率。

1.2.4.2 Smith 降解法

将高碘酸氧化产物还原后进行酸水解或部分酸水解。由于糖基之间以不同的位置缩合, 用高碘酸氧化后则生成不同的产物, 将氧

化产物用硼氢化钠还原成稳定的多羟基化合物, 经酸水解后用纸层析鉴定水解产物, 由降解的产物可以推断糖苷键的位置。

2 结果与分析

2.1 对产物葡聚糖的提纯

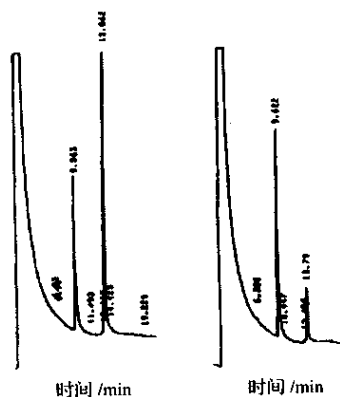
发酵得黄色粘性葡聚糖溶液, 用无水乙醇分步沉淀法抽提, 透析及冻干后得白色片状产品。再次提纯后可用于鉴定。

2.2 鉴定结果

2.2.1 物理鉴定法

2.2.1.1 气相色谱

由图 1 可见, 此糖由葡萄糖单体构成, 标品和样品都在 13.79 min 处出现了葡萄糖吸收峰。



色谱柱温度: 150~210℃, 载气: 高纯氮, 柱内流量 0.5 mL/min, 分流比: 1:80, H_2 : 40 mL/min, 空气 300 mL/min, 尾吹气 30 mL/min, 进样量 5 μ L。

图 1 葡聚糖样品和标准样的气相图谱

2.2.1.2 红外光谱

采用化学纯的葡聚糖标准样品与提纯的葡聚糖比较红外光谱, 从图 2 和图 3 两张红外光谱图的对照来看, 标准品和样品的指纹几乎一致。二者都具备了如下的特征峰: 多糖类有 2 个特征的吸收峰: 一个为 O-H 和 C-H 的伸缩吸收峰, 即 3330cm^{-1} 处有 O-H 的伸缩吸收峰, 2930cm^{-1} 有 C-H 伸缩吸收峰; 另一个为 C-H 的剪切吸收峰在 1330cm^{-1} 处出现。最有说服力的是在 $833\sim 855\text{cm}^{-1}$ 处有吸收峰, 这就能直接证明, 样品为

α -D-葡萄糖吡喃糖,说明发酵提取物是葡聚糖。但因二者含水量的不同,图谱也有所差别。在样品的图谱中有吸收峰出现在 $1647.52 \sim 1631.68 \text{ cm}^{-1}$ 范围内,表明含水量比标准品高。

2.2.1.3 纸层析

水解产物与标准样品葡萄糖的迁移率都是 $R_f = 0.25$ 。结果表明,在相同的位置上显示相同的棕色斑点。

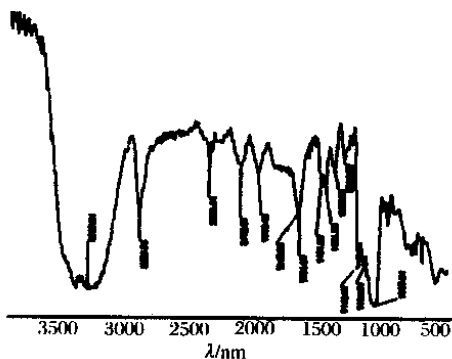


图2 葡聚糖标准样的红外光谱

2.2.2 化学鉴定法

2.2.2.1 高碘酸氧化法

用标准 UV 法测得反应终止液的透光率为 0.268,查表 1 和图 4 计算得平均每个葡聚糖残基消耗 0.49 个分子高碘酸钠,用 0.010 mol/L NaOH 滴定,消耗 NaOH 12.50 mL ,计算得每个残基消耗 0.25 个分子甲酸,由此可以确定葡聚糖样品的糖苷键有 95% 是 α -D-(1,6)糖苷键,其余为 α -D-(1,3)糖苷键和其他键型。

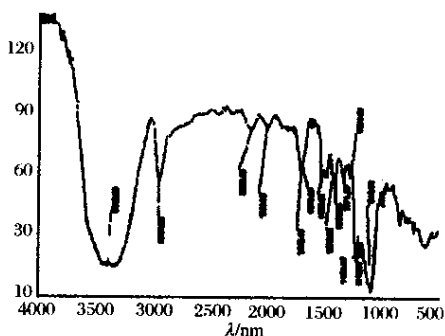


图3 葡聚糖样品的红外光谱

表1 标准溶液的紫外光吸光度

实验编号	1	2	3	4	5	6
高碘酸根(%)	0	3	6	9	12	15
透光率(%)	0.255	0.364	0.471	0.589	0.698	0.785

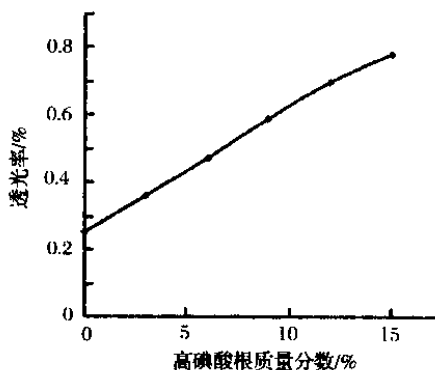


图4 不同浓度高碘酸根的透光率

2.2.2.2 Smith 降解法

检测出 Smith 降解有 2 个点,分配比系数分别为 0.25 和 0.56。而标准样分配比系数为 0.24 和 0.55。样品与标准样分配比系数接近,说明有甘油和葡萄糖产生,由此推断

键型可能分别为 α -D-(1,3)和 α -D-(1,6)糖苷键。

3 结 论

在定性鉴定葡聚糖结构的几种方法中,采用多种方法相互印证。实验表明,用肠膜明串珠菌发酵蔗汁的产物主要为 α -D-(1,6)-葡聚糖。

致谢 本研究得到广西生物技术实验中心红外光谱实验室何熙璞工程师的帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 王京杭,王 强. 国外医学(分子生物学分册), 1997, 19(4):183~187
- 2 李志孝,孟延发等. 药学报, 1997, 32(8):603~606
- 3 Day, Donald F. The Ougar Journal, 1984(3):16~17

- 4 Bao Xingfeng, Fang Jinian. Acta Botanica Sinica, 2001 43(3) 312~315 ~ 67
- 5 张惟杰. 复合多糖生化研究技术(第一版),上海科学技术出版社,1987. 38~49,121~128,65
- 6 张惟杰. 复合多糖生化研究技术(第一版),1987. 163~166

Structure Elucidation of Dextran Fermented by *Leuconostoc Mesenteroieds*

Liao Wei^{1 2} Yang Hui³ Liang Haiqiu³ Zhou Hezhi³

¹ College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou, 510275)

² Guangxi Vocational Technology College, Nanning, 530227)

³ Food and Fermentation Institute of Guangxi University, Nanning, 530004)

ABSTRACT A dextran was obtained from sugarcane juice fermented by *Leuconostoc mesenteroieds*. The dextran sample which was extracted by ethanol precipitation and purified was assayed by gas chromatography(GC), infrared atlas, etc. Results suggested the dextran sample is composed of repeating units with glucose of which is a kind of completely methylation and waterless pyranoglucose. 95% of its glucosidal band is α -D-(1 β); the other is α -D-(1 β) and the like.

Key words *Leuconostoc mesenteroieds*, dextran, structure elucidation



我国啤酒的甲醛含量低对健康无害

天然食品中微量甲醛普遍存在,甲醛是细胞代谢的正常产物,啤酒的自然发酵过程也会产生微量甲醛。在啤酒生产过程中使用甲醛作助滤剂,其成本是用一种无毒无害的吸附剂——PVPP的约1/20。从20世纪60年代开始,甲醛就用于啤酒生产。企业使用无毒害的助滤剂,其中增加的成本,只能靠增加产量,用现代化的管理摊薄成本。

据中国食品发酵工业研究院标准信息部田栖静教授透露,目前正在修订讨论的国家《发酵酒卫生标准》中,新列入的啤酒甲醛残留量指标为 $\leq 2\text{mg/L}$ 。而我国啤酒的甲醛残留量基本上都在限量以下,饮用是安全的。国家食品质量监督检验中心在2002年初检测了19种国产品牌啤酒,其甲醛平均含量为0.31mg/L,消费者完全可以放心饮用。

国家食品质量监督检验中心专家胡国栋教授说,通过对7种国外品牌啤酒(其中4种原产地为国外)样本的测定,其甲醛含量在0.25mg/L,与国产啤酒没有显著差异。甲醛广泛存在于天然食品中,肉类、家禽、鱼和水果中均含微量甲醛,与其他天然食品相比,啤酒中的甲醛含量属于低范畴,比同时参与测定的白酒和果汁样品低半个到一个数量级,因而不应对啤酒甲醛问题做过多渲染。

台湾正式从中国内地的啤酒共有15种,对青岛、燕京、金威、百威、金匙、惠泉、重庆、中华、朝日(中国内地厂)、紫禁城、哈尔滨及三通啤酒等12种样品检测,甲醛含量极低。台湾要求这些企业提供生产过程的报告,目前已有青岛、燕京、金匙、百威、惠泉、三通、金威、紫禁城、哈尔滨、朝日等10种品牌提供生产过程报告,其中有6种品牌已详细说明未添加甲醛。燕京啤酒是属于国宴级的啤酒,获得国际ISO9002品质认证,工厂在1980年设立,引进西德技术及设备,在制程中绝未添加甲醛,且在1992年荣获第三十一届布鲁塞尔国际金奖,饮用安全,台湾主管机关曾亲至大陆制酒工厂参观。

目前我国有部分厂家在其部分品牌中已不再使用甲醛,有的厂则率先在全部生产过程中淘汰甲醛,这种做法应该鼓励。正在修订讨论的国家《发酵酒卫生标准》将限定“甲醛”含量。胡国栋教授则表示,从食品安全和厂家利益考虑,啤酒企业应尽早从生产工艺的研究入手,逐步以更安全的技术取代现有技术,以防止突然出现“禁令”,而导致企业措手不及,这也是适应我国加入WTO后国产啤酒融入国际啤酒业的一项新举措。