

文章编号:1673-1689(2005)02-0089-04

HPLC法测定玉米浓醪发酵酒精醪液中的纤维二糖和蜜二糖

张梁^{1,2}, 陈蕴¹, 石贵阳^{1,2}, 章克昌^{1,2}

(1. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室,江苏 无锡 214036;2. 江南大学 生物工程学院,江苏 无锡 214036)

摘要: 采用高效液相色谱分析方法分析浓醪发酵酒精醪液中的纤维二糖和蜜二糖. 在分析过程中,对氨基分析柱和碳水化合物分析柱的分离效果、回收率等进行了比较,结果得出碳水化合物分析柱的分析效果比较好,从而初步建立了定性定量分析浓醪发酵酒精醪液中纤维二糖和蜜二糖的方法.

关键词: 浓醪酒精发酵;高效液相色谱;纤维二糖;蜜二糖

中图分类号:S 513

文献标识码:A

Determination of Cellobiose and Melibiose in the Distillate of High-Gravity Ethanol Broth from Corn by HPLC

ZHANG Liang^{1,2}, CHEN Yun¹, SHI Gui-yang^{1,2}, ZHANG Ke-chang^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Cellobiose and melibiose in the distillation of high-gravity ethanol broth from corn were assayed by HPLC method. The separation efficiency and recovery ratios of the process were calculated. The results showed that the analytic effect for detecting the two sugars with Carbohydrate Analysis Column was better than that of NH₂ analytical column. Therefore, the qualitative and quantitative method for detecting cellobiose and melibiose in the distillate of high-gravity ethanol broth was preliminarily developed based on application of Carbohydrate Analysis Column.

Key words: high-gravity ethanol broth; HPLC; cellobiose; melibiose

我国年产发酵酒精约300万t,年副产糟液约4000万t^[1]. 过去酒精工厂多回收利用了稠糟部分,废水大量排放造成了环境的严重污染. 酒精糟液中的有机物很多是可以利用的,近年国家加大了治理

力度,不同原料、不同规模、不同所在的酒精糟采用不同的利用治理方法^[2~4],取得了一定成效,但是问题依然存在. 当前,酒精工业面临两个问题:节能和污染治理. 如果能有效利用酒精糟液中的有用部

收稿日期:2004-10-24; 修回日期:2004-12-10.

基金项目:国家科技部“十五”攻关项目(2001BA501A01)资助课题.

作者简介:张梁(1978-),男,江苏无锡人,发酵工程博士研究生.

分,既能达到节能的效果又能减少排放污染,减轻治理成本,是一举两得的事。

在对酒糟综合利用方面进行研究过程中,对酒糟成分进行必要的分析是很有意义的,同时也是非常必要的。本试验就是在对酒糟清液中含量较高的两种双糖进行有效利用的研究下进行的。以往的研究大多仅对酒糟中总糖、还原糖、粗蛋白、粗脂肪、粗纤维等某一类物质进行总的分析,很少有某一单一组分分析的报告。作者就酒糟清液中的纤维二糖和蜜二糖进行定性定量分析,为后续研究做好必要的基础工作。

对于糖的分析,成熟的方法比较多,如薄层层析法^[5~7]、气相色谱法^[8,9]等,高效液相色谱^[10~12]是由经典的液相柱层析发展而来的,分析速度快,适用范围广,具有很高的检测精度,样品用量少,尤其适用于微量样品的定量和定性检测。因此,作者首选高效液相色谱法进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米(脱胚去皮)购于黑龙江省齐齐哈尔市某农贸市场,粉碎,过40目筛;纤维二糖、蜜二糖购于Sigma公司;色谱纯乙腈为Merk公司产品。

1.2 主要仪器与设备

Agilent 1100 系列(带示差折光检测器), Carbohydrate Analysis Column(4.6 mm×250 mm 5-Micron), ZORBA(NH₂ Analytical(4.6 mm×250 mm 5-Micron), Accu Bond^{II} SPE ODS-C18 Cartridges 为美国 Agilent 公司产品;高速冷冻离心机为 Sigma 公司产品;GNP-9080 恒温培养箱为上海精宏实验设备有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 浓醪酒精发酵 玉米粉按料水比(g:L) 1:2拌料,按照浓醪发酵工艺^[2]进行酒精发酵。

1.3.2 分析样品制备

方法一:蒸除酒精后的浓醪发酵酒精醪液补水至原体积,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液加3倍体积无水乙醇,4℃沉淀2h后3 000 r/min 离心 20 min,水浴蒸除酒精后微孔膜过滤、进样。

方法二:浓醪发酵酒精醪液在10 000r/min 冷冻离心 20 min,用 Agilent 公司的预处理柱过滤后直接进样进行 HPLC 分析。

1.3.3 色谱条件 氨基分析柱:流动相为 V(乙腈):V(水)=80:20,体积流量为 0.8 mL/min,进样 8 μL,柱温 40℃,压力 40 Pa。

碳水化合物分析柱:流动相为 V(乙腈):V(水)=70:30,体积流量为 0.8 mL/min,进样量为 8 μL,柱温 40℃,压力 40 Pa。

1.3.4 相对标准偏差

$$X = \sum X_i/n$$

$$SD = [\sum (X_i - X)^2 / (n-1)]^{0.5}$$

$$RSD(\%) = 100SD/X$$

2 实验结果

2.1 标准曲线的绘制

2.1.1 氨基柱分离 精确称取纤维二糖和蜜二糖样品,用超纯水配制成 1 000 mg/L, 2 000 mg/L, 3 000 mg/L, 4 000 mg/L, 5 000 mg/L 系列标准质量浓度,分别进样,用氨基分析柱分析,根据结果作图 1。

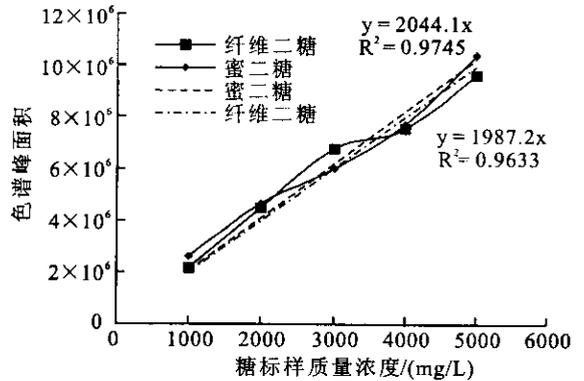


图1 氨基分析柱分离时的纤维二糖、蜜二糖标准曲线
Fig. 1 The standard curve of analyzing cellobiose and melibiose with NH₂ analytical column

2.1.2 碳水化合物分析柱分离 精确称取纤维二糖和蜜二糖样品,用超纯水配制成 200 mg/L, 500 mg/L, 1 000 mg/L, 2 000 mg/L, 3 000 mg/L, 4 000 mg/L, 5 000 mg/L 系列标准质量浓度,分别进样,用碳水化合物分析柱分析,根据结果作图 2。

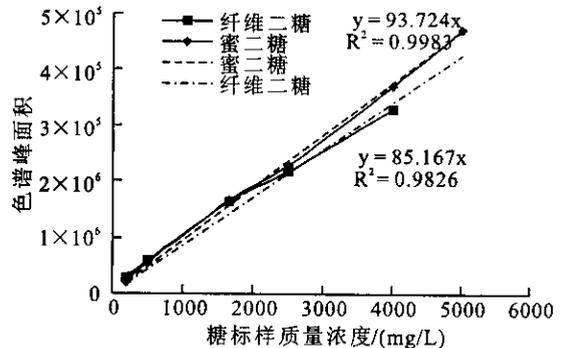
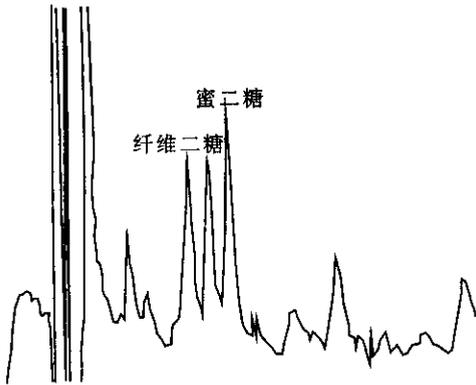


图2 碳水化合物分析柱分离时的纤维二糖标准曲线
Fig. 2 The standard curve of analyzing cellobiose and melibiose with carbohydrate analysis column

由图 1 和图 2 比较可得,用氨基分析柱和碳水化合物分析柱进行分析时,纤维二糖和蜜二糖的分离线性良好。相对用碳水化合物分析柱进行分析时,它们的线性要更好一些。

2.2 分离效果

2.2.1 氨基分析柱的分离效果 精确称取纤维二糖和蜜二糖样品,用超纯水配制成 5 000 mg/L 标准样品,按条件进样,得到纤维二糖、蜜二糖保留时间分别约在 12, 14 min。将玉米浓醪发酵酒精醪液按方法一处理后进样,结果见图 3。纤维二糖和蜜二糖的质量浓度分别为 1 917.68 mg/L, 1 952.25 mg/L。



纤维二糖: $T_R=12.215$; 蜜二糖: $T_R=14.633$

图 3 氨基柱分离玉米浓醪发酵酒精醪液的色谱图

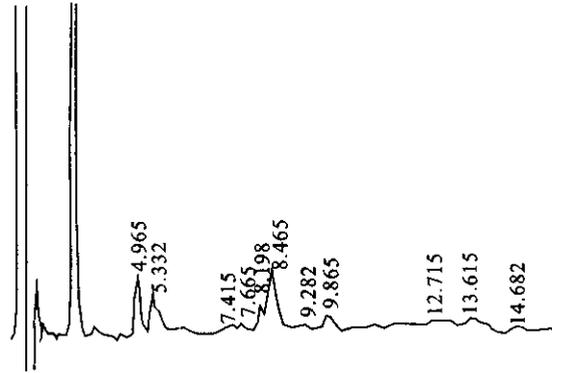
Fig. 3 The chromatographic chart of analyzing mash of high-gravity ethanol broth from corn with NH_2 analytical column

2.2.2 碳水化合物分析柱的分离效果 同样精确称取纤维二糖和蜜二糖样品,用超纯水配制成 5 000 mg/L 标准样品,按条件进样,得到纤维二糖、蜜二糖保留时间分别约在 8, 10 min 左右。将玉米浓醪发酵酒精醪液按方法二处理后进样,结果见图 4。计算得到纤维二糖和蜜二糖的质量浓度分别为 1 258.89 mg/L, 1 025.53 mg/L。

从分离的效果看,用氨基分析柱分离时,表现上纤维二糖和蜜二糖被较好的分开,但似乎有许多其他物质没有被分开,堆积在一起,造成计算值比较大。用碳水化合物分析柱能达到较好的分离效果,灵敏度也比较高。

2.3 回收率实验

2.3.1 氨基分析柱的分离回收率 浓醪酒精经离心后的上清液,加入一定量精确称取的纤维二糖和蜜二糖标准样品,使加入的终质量浓度为 5 000 mg/L,再按方法一继续处理,处理后的样品进样分析,与未加标准样品直接处理的样品进样分析后进行比较,计算回收率(见表 1)。



纤维二糖: $T_R=8.198$; 蜜二糖: $T_R=9.865$

图 4 碳水化合物分析柱分离玉米浓醪发酵酒精醪液的色谱图

Fig. 4 The chromatographic chart of analyzing mash of high-gravity ethanol broth from corn with carbohydrate analysis column

表 1 氨基柱分析醪液时纤维二糖和蜜二糖的回收率

Tab. 1 The recovery ratios of cellobiose and melibiose with NH_2 analytical column

	纤维二糖			蜜二糖		
	1	2	3	1	2	3
回收率/% (X_i)	56.67	64.59	59.55	66.76	63.17	72.11
均值/% (X)	60.27			67.35		
RSD/% ($N=3$)	4.01			4.50		

由表 1 可得,该分析方法的回收率较低,不能够达到很好的分离要求。

2.3.2 碳水化合物分析柱的分离回收率 浓醪发酵酒精醪液在 10 000 r/min 冷冻离心 20 min,加一定量精确称取的纤维二糖和蜜二糖标准样品,用 Agilent 公司的预处理柱过滤后,进样进行 HPLC 分析。结果与未加标准样品直接处理的样品进样分析后进行比较,计算回收率(见表 2)。

表 2 碳水化合物分析柱分析醪液时纤维二糖和蜜二糖的回收率

Tab. 2 The recovery ratios of cellobiose and melibiose with carbohydrate analysis column

	纤维二糖			蜜二糖		
	1	2	3	1	2	3
回收率/% (X_i)	94.55	94.87	94.23	90.75	85.24	88.95
均值/% (X)	94.55			88.31		
RSD/% ($N=3$)	0.32			2.81		

对照表1和表2数据可得,采用方法二处理后用碳水化合物分析柱分离时,其回收率比较好(>85%),相对标准偏差较小,能较好的满足分离要求。

2.4 酒糟经过不同处理方法后的分析结果比较

玉米浓醪发酵醪液按方法一和方法二分别处理后分别进样,用碳水化合物分析柱进行液相分析,通过方法一处理的糟液中测得纤维二糖的质量浓度为854.49 mg/L,通过方法二处理的糟液中测得的纤维二糖质量浓度为1254.63 mg/L。由此可见,方法二的处理方式可能对糟液成分的影响更小,糖的损失较小,更能真实体现其中组成的含量。并且,按方法二处理起来更简单方便。

3 讨论

高效液相色谱是由经典的液相柱层析发展而来的,分析速度快,适用范围广。相对于其它糖的分析方法如薄板层析法、气相测定法等,高效液相分析方法分离时,样品的预处理比较简单,具有很高的检测精度,检测下限低,样品用量少,尤其适用于微量样品的定量和定性检测。

酒精工业经过长时间的发展,已经到了一个相

对完善的地步,对酒精糟液的利用各国也进行了很多研究,但对酒精糟液上清液中各类成分的细致分析,目前还很少有报道。随着酒精工业进一步发展,对酒精糟液的综合利用也将有新的发展,这必然要求对酒精糟液中各组分进行较为详尽的分析,取得第一手资料,以利于方法学的建立。

作者从这一要求出发,结合正在进行的如何有效利用浓醪酒糟清液中的纤维二糖和蜜二糖的研究,比较利用氨基分析柱和碳水化合物分析柱分离分析玉米浓醪发酵酒精醪液中的纤维二糖和蜜二糖的效果。由实验数据可以看到用氨基分析柱分析时,两个糖的含量明显高于碳水化合物分析柱分离结果,初步推断氨基柱良好的分离效果可能是假相。事实上,很可能纤维二糖和蜜二糖之间分开了,但它们与其它组分未能分开,而且出峰时间相同或极其接近,从峰形上没法分辨;而采用碳水化合物分析柱能取得更好的分离效果。同时从线性和回收率结果也可以看出,利用碳水化合物分析柱分析更具可靠性。

通过对不同批次,组分含量不同的样品的分析,都达到了良好的分离的效果,能够满足进一步研究的需要。

参考文献:

- [1] 丁重阳. 玉米原料酒精浓醪发酵及酒糟综合利用生产单细胞蛋白的研究[D]. 无锡:江南大学硕士学位论文,2003.
- [2] 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1995.
- [3] 王程辉. 利用酒精糟液培养苏云金芽孢杆菌的研究[D]. 无锡:无锡轻工大学硕士学位论文,2000.
- [4] 伊守亮. 利用浓醪酒糟发酵生产乳酸链球菌素(Nisin)的研究[D]. 无锡:江南大学硕士学位论文,2004.
- [5] 连宾,郁建平. 红托竹荪多糖的提取分离及组成研究[J]. 食品科学,2004,25(3):43-45.
- [6] 朱桂兰,童群义. 薄层色谱法分离低聚果糖[J]. 食品工业科技,2004,25(1):131-132,123.
- [7] 邵友元,艾金群. TLC法对磷酸己糖和磷酸丙糖的分离鉴定[J]. 湖北工学院学报,1995,10(3):48-51.
- [8] 周欣,王松华. 气相色谱法检测葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖[J]. 海峡药学,2001,13(4):48-49.
- [9] 李小定,荣建华,吴谋成. 灰树花多糖粗品及各级分中单糖组成的气相色谱法测定[J]. 食品科学,2003,24(4):110-113.
- [10] 马丽,覃小林,刘雄民,等. 螺旋藻多糖的纯化和高效液相色谱分析[J]. 化工技术与开发,2004,33(2):29-32.
- [11] Iverson Jahn L, Bueno Martin P. Evaluation of high pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography for quantitative determination of sugars in food[J]. J Assoc of Anal Chem, 1981, 64(1):139-143.
- [12] Nikolov Zivko L, Jakovljevic Jovan B, Boskov Zarke M. High performance liquid chromatographic separation of oligosaccharides using amine modified silica columns[J]. Starch/Staerke, 1984, 36(3):97-100.

(责任编辑:杨萌)