

文章编号:1673-1689(2009)02-0197-04

法夫酵母低聚糖的结构分析

苏丁¹, 陈晓明¹, 徐学明^{*1,2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 法夫酵母发酵生产的低聚糖经高效液相色谱分离纯化后经质谱和核磁共振分析, 结果表明该低聚糖为相对分子质量 504 000 的 β -D-呋喃果糖(2 \rightarrow 6)- α -D-吡喃葡萄糖(2 \rightarrow 1)- β -D-呋喃果糖, 即新科斯糖。

关键词: 法夫酵母; 新科斯糖; 结构; 分析

中图分类号: TQ 926. 4

文献标识码: A

Identification of the Structure of Oligosaccharide Produced from *Xanthophyllomyces dendrorhous*

SU Ding¹, CHEN Xiao-ming¹, XU Xue-ming^{*1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The major and specific Oligosaccharide produced by *Xanthophyllomyces dendrorhous* was purified by liquid chromatography (LC) method. and its structure was further identified by mass chromatography (MS) method associated with nuclear magnetic resonance (NMR) method. The results indicated that the molecular weight of oligosaccharide was 504 000, and its structure was β -D-fructofuranose (2 \rightarrow 6)- α -D-glucopyranose (1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranose, namely called neokestose.

Key words: *Xanthophyllomyces dendrorhous*, neokestose, structure, identification

对于担子菌纲的法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*), 研究主要集中于其发酵生产虾青素的特性, 如高产虾青素的菌株选育^[1]、发酵工艺研究^[2-3]、酵母细胞破壁^[4]、色素提取^[5]及虾青素的功能特性^[6]等, 而对它其他性质的研究报道较少。2000 年 Kilian 等首次就法夫酵母发酵生产新科斯糖进行了报道^[7], 然而, Kilian 对法夫发酵生产新科斯糖的结果并未就该糖的结构进行鉴定论证。有研究认为新

科斯糖具有一般低聚果糖的特性外, 尤其具有优越的增殖双歧杆菌的能力, 在食品、饲料行业的应用前景广泛。作者报道了新科斯糖结构的分析方法。

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

液相色谱仪: HITACHI 655A-12, HITACHA 公司产品; 检测器: Waters 2414 示差折光检测器,

收稿日期: 2008-03-24

基金项目: 国家教育部优秀人才计划项目(NCET-07-0379)。

* 通讯作者: 徐学明(1968-), 男, 江苏苏州人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品添加剂和饲料科学研究。Email: xmxubest@126.com

美国 Waters 公司产品;质谱仪: Waters Platform ZMD 4000, 美国 Waters 公司产品;核磁共振波谱仪: Bruker-av500, 瑞士 Bruke 公司产品;旋转蒸发器: RE-52A, 上海亚荣生化仪器厂产品;冷冻干燥机: LABCONCO, 照生有限公司产品;乙腈: 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 多糖混合液的制备 将发酵液以 3 000 r/min 离心 10 min, 使糖液和菌体分离。将得到的糖液于沸水中煮沸 5 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 除去蛋白质沉淀, 0.45 μm 微孔过滤, 得到多糖混合液。

1.2.2 低聚糖的纯化 以色谱柱 Lichrospher NH_2 为分离柱, 葡萄糖, 蔗糖为参照物, $V(\text{乙腈}): V(\text{水}) = 60:40$ 为流动相, 流量为 1 mL/min, 柱温 35 $^\circ\text{C}$ 的条件下对上述多糖混合液分离纯化, 以示差折光检测器检测出峰情况。

1.2.3 质谱分析条件 离子方式: ESI-, ESI+, 离子源温度: 100 $^\circ\text{C}$, 脱溶剂气温: 250 $^\circ\text{C}$, 质量范围: 100~800 (m/z), 气体体积流量: 4.2 L/h。

1.2.4 核磁共振分析条件 上海有机所 Bruker-av500 核磁共振波谱仪, 溶剂 D_2O 。

2 结果与分析

2.1 低聚糖的纯化

按照 1.2.2 的条件, 对得到的多糖混合液进行

液相层析, 结果见图 1。

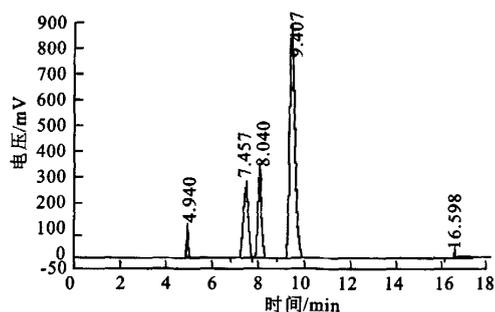


图 1 多糖混合物的液相层析谱图

Fig. 1 Graph of Liquid chromatograph of the mixtures

根据葡萄糖和蔗糖谱图的对照, 图 1 中保留时间为 7.457 min 和 8.040 min 的两个峰分别为葡萄糖和蔗糖, 而保留时间 9.407 min 的峰为发酵所得的低聚糖产物。这个结果表明, 法夫酵母发酵蔗糖所得低聚糖产物相对单一。将收集得到的低聚糖经旋转蒸发浓缩, 冷冻干燥得到白色粉状固体作为质谱和核磁共振分析样品。

2.2 质谱图谱分析

图 2(a), (b) 质谱图分别显示 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}-1]^-$ 的荷质比 (m/z) 分别为 527 000 和 503 000, 由此表明该低聚糖的相对分子质量为 504 000。

2.3 ^{13}C 核磁共振图谱分析

通过对图 3 核磁共振图谱的分析, 得到表 1 中 ^{13}C 核磁共振化学位移和表 2 化学位偏移。

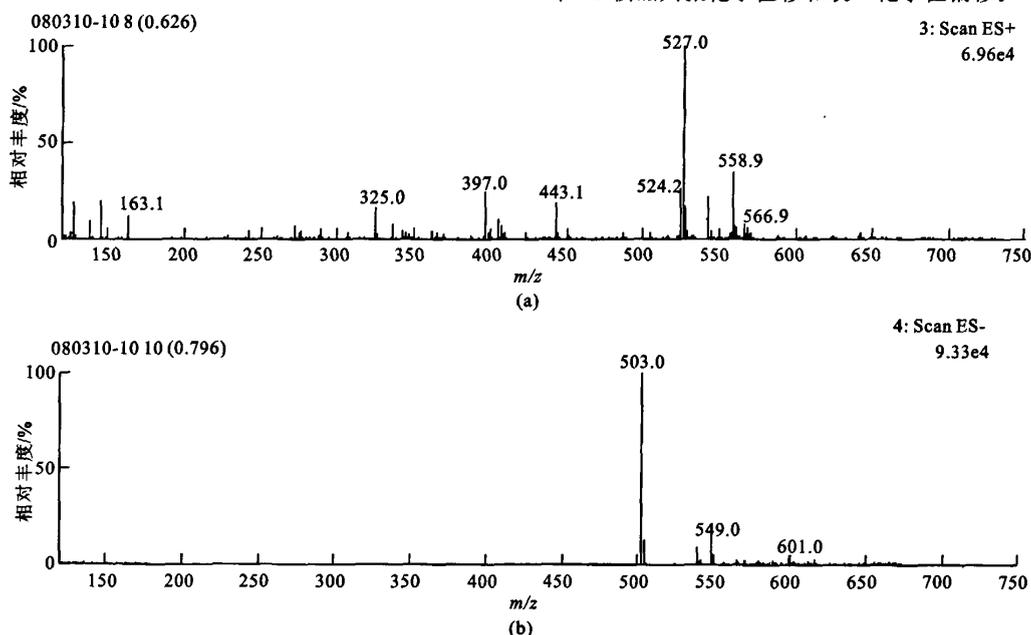


图 2 低聚糖的质谱谱图

Fig. 2 Graph of The MS of the oligosaccharide

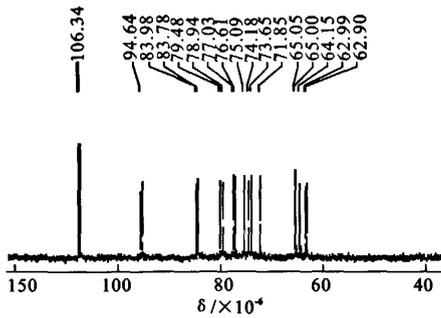


图 3 低聚糖的¹³C核磁共振谱图

Fig. 3 Graph of ¹³C NMR resonances of oligosaccharide

表 1 ¹³C核磁共振化学位移

Tab. 1 ¹³C NMR Chemical shifts (δ) of sucrose and oligosaccharide

基团	原子	δ/10 ⁻⁶	
		蔗糖 ^[8]	法夫酵母低聚糖
α-D-吡喃葡萄糖	C-1	92.9	94.6
	C-2	71.9	76.6
	C-3	73.4	77.0
	C-4	70.0	71.2
	C-5	73.2	73.7
	C-6	61.0	64.2
β-D-呋喃果糖	C-1	62.5	62.9
	C-2	104.5	106.3
	C-3	77.8	79.48
	C-4	75.2	75.5
	C-5	82.2	84.0
	C-6	63.2	65.0
β-D-吡喃果糖	C-1		63.0
	C-2		106.3
	C-3		78.9
	C-4		74.2
	C-5		83.8
	C-6		65.1

表 1 结果表明:低聚糖在 150×10⁻⁶ 以上均无谱线说明无羰基碳,其结构为环状结构。

低聚糖的异头碳部位常在 93×10⁻⁶~105×10⁻⁶ 处呈现¹³C 共振谱线,线数反映结构中单糖的残基数。在样品糖的谱图中,分别在 94.64×10⁻⁶ 和 106.3×10⁻⁶ 处有 3 根谱线(其中 106.3×10⁻⁶ 处为重叠谱线),说明其有 3 个单糖残基,是一个三糖。

万方数据

在还原糖 α-和 β-D-吡喃葡萄糖的特征化学位移出现在 92.9×10⁻⁶ 和 96.7×10⁻⁶, β-D-吡喃果糖和 β-D-呋喃果糖 C-2 的特征化学位移分别为 98.9×10⁻⁶ 和 102.3×10⁻⁶^[8]。以此判断低聚糖的谱图中,94.6×10⁻⁶ 为 α-D-吡喃葡萄糖的异头碳,106.3×10⁻⁶ 为 β-D-呋喃果糖的异头碳。除异头碳外,剩余的碳的化学信号一般出现在 51×10⁻⁶~86×10⁻⁶ 之间。

碳链上如果发生取代,取代位置的碳的化学位移将向低场移动^[9]。低聚糖中 α-D-吡喃葡萄糖的 C-1 和 C-6 的化学位移向低场移动了 1.7×10⁻⁶ 和 2.6×10⁻⁶, β-D-呋喃果糖 C-2 向低场移动。如果葡萄糖的 6 位碳上无取代其-CH₂OH 谱线在 61×10⁻⁶ 处,若有取代,其-CHOH-的谱线在 66×10⁻⁶ 左右。蔗糖中,α-D-吡喃葡萄糖 C-6 的化学位移为 61.0×10⁻⁶, β-D-呋喃果糖 C-1, C-6 为 62.5×10⁻⁶ 和 63.2×10⁻⁶, 低聚糖对应的碳的化学位移为 64.15×10⁻⁶, 62.9×10⁻⁶ 和 65.0×10⁻⁶, 初步判断该低聚糖为新科斯糖。

表 2 ¹³C核磁共振化学位移偏移

Tab. 2 Chemical shifts (Δδ) for ¹³C resonances

样品	×10 ⁶			
	α-D-吡喃葡萄糖		β-D-呋喃果糖	
	C-1	C-6	C-1	C-2
α-D-吡喃葡萄糖	92.9	61.6		
β-D-呋喃果糖				
蔗糖	92.9	61.0	62.5	104.5
		(-0.6)	(-1.1)	(+1.9)
低聚糖	94.64	64.15	62.9	106.3
	(+1.7)	(+2.6)	(-0.7)	(+3.7)
			62.99	106.3
			(-0.6)	(+3.7)

相比较于目前的糖而言,吡喃己醛糖基与吡喃戊醛糖基以(1→n)键位连接时,相连接的碳向低场位移 5×10⁻⁶~9×10⁻⁶, 周围的碳向高场位移 1×10⁻⁶~2×10⁻⁶。如果吡喃己醛糖基与 β-D-呋喃果糖以 2 位连接时,这些碳仅有较小位移。因此,这个原则用于确定 β-D-呋喃果糖的 C-2 的连接位置。

蔗糖 α-D-吡喃葡萄糖的 C-1 的化学位移没有偏移,而 β-D-呋喃果糖的 C-1 和 C-2 向高场和低场移动了 1.1×10⁻⁶ 和 1.9×10⁻⁶。新科斯糖中,α-D-吡喃葡萄糖的 C-1 的化学位移向低场移动了 1.7×10⁻⁶, 而 β-D-呋喃果糖的 C-1 和 C-2 向高场和低场移动了 0.6×10⁻⁶~0.7×10⁻⁶ 和 3.7×10⁻⁶ (表

2)。如果是两个吡喃糖连接, α -D-吡喃葡萄糖的 C-6 的化学位移向低场位移 $5 \times 10^{-6} \sim 8 \times 10^{-6}$, 而低聚糖中 α -D-吡喃葡萄糖的 C-6 的化学位移偏移较小, 与 β -D-吡喃果糖基的 C-2 相连接。因此证实该低聚糖为新科斯特糖。

3 结 语

通过以上分析, 法夫酵母发酵生产的低聚糖的相对分子质量为 504 000, 根据核磁共振谱图分析其为新科斯特糖, 结构见图 4。

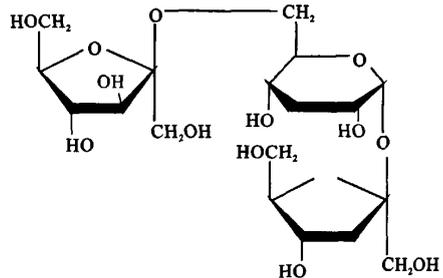


图 4 新科斯特糖分子结构图
Fig. 4 Structure of neokestose

参考文献(References):

- [1] 徐学明, 金征宇, 吕玉华. 虾青素高产突变株的选育[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(5): 22-27.
XU Xue-ming, JIN Zheng-yu, LV Yu-hua. Studies on Astaxanthin-overproducing Mutants of *Phaffia rhodozyma*[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2000, 26(5): 22-27. (in Chinese)
- [2] 徐学明, 金征宇, 刘当慧. 法夫酵母产虾青素的补料发酵[J]. 食品与生物技术学报, 2002, 21(1): 5-9.
XU Xue-ming, JIN Zheng-yu, LIU Dang-hui. Fed-Batch culture of astaxanthin producing strain *phaffia rhodozyma*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2002, 21(1): 5-9. (in Chinese)
- [3] 徐学明, 金征宇, 刘当慧, 等. 法夫酵母产虾青素的摇瓶工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3): 230-235.
XU Xue-ming, JIN Zheng-yu, LIU Dang-hui, et al. Astaxanthin production by *phaffia rhodozyma*[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, 19(3): 230-235. (in Chinese)
- [4] 陈晓明, 徐学明, 金征宇. 法夫酵母的碱法破壁[J]. 淮阴工学院学报, 2000, 9(4): 24-29.
CHEN Xiao-ming, XU Xue-ming, JIN Zheng-yu. Alkali breaking cell wall of *Phaffia rhodozyma*[J]. *Journal of Huaiyin Industry College*, 2000, 9(4): 24-29. (in Chinese)
- [5] 汪洪涛, 徐学明, 金征宇. 法夫酵母色素提取方法的研究[J]. 食品科技, 2003, 11: 54-57.
WANG Hong-yao, XU Xue-ming, JIN Zheng-yu. Study on pigment extraction methods of *phaffia rhodozyma*[J]. *Food Science and Technology*, 2003, 11: 54-57. (in Chinese)
- [6] 徐学明, 陈晓明, 金征宇. 法夫酵母中虾青素的稳定性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(4): 29-36.
XU Xue-ming, CHEN Xiao-ming, JIN Zheng-yu. Stability of astaxanthin from *Xanthophyllomyces dendrorhous* during Storage[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 29-36. (in Chinese)
- [7] Kilian S G, Kritzing SM, Rycroft C, et al. The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000, 18: 637-644.
- [8] Andre D B, Jan V L. The identification by ¹H and ¹³C-nmr spectroscopy of sucrose, l-kestose, and neokestose in mixtures present in plant extracts[J]. *Carbohydrate Research*, 1991, 211: 131-136.
- [9] 王展, 方积年. 高场核磁共振波谱在多糖结构中的应用[J]. 分析化学评述与进展, 2000, 28: 240-247.
WANG Zhan, FANG Ji-nian. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in the structural determination of polysaccharide[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 28: 240-247. (in Chinese)

(责任编辑: 朱明)