DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2017.10.004

黄酒多糖的分离纯化及理化性质研究

孟祥勇[1,2,3,4]，沈 赤[1,2,5]，毛 健[*1,2,3,4]，姬中伟[1,2,3,4]

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，江南大学，江苏 无锡 214122;2. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122;3. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心,江苏 无锡 214122;4. 国家黄酒工程技术研究中心,浙江 绍兴 312000;5. 绍兴文理学院,浙江 绍兴 312000)

摘要：以绍兴黄酒为原料,采用乙醇沉淀、Sevag 法脱蛋白得到黄酒粗多糖,经 DEAE-Sepharose FF 色谱柱和葡聚糖凝胶 G75 色谱柱对黄酒粗多糖进行分离纯化，并采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)对黄酒多糖的相对分子质量和纯度进行检测,进一步采用紫外光谱、红外光谱以及核磁共振波谱对黄酒多糖组分 CRWP1 的结构特征进行初步解析。结果表明:所得多糖组分为纯度较高的中性多糖组分,其重均相对分子质量为 7 850;主要由主阿拉伯糖、葡萄糖和木糖组成,并含有少量岩藻糖、半乳糖和甘露糖;所得多糖组分 CRWP1 为在 1,3 糖苷键主链上连接有 1,4 糖苷键支链的杂多糖,含有 α 糖苷键构型,并且其单糖残基为吡喃型。

关键词：绍兴黄酒;大分子;相对分子质量;单糖;结构特征

中图分类号:TS 262　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2017)10—1029—07

Isolation, Purification and Physicochemical Properties of Polysaccharides from Chinese Rice Wine

MENG Xiangyong[1,2,3,4]，*SHEN Chi*[1,2,5]，*MAO Jian*[*1,2,3,4]，*JI Zhongwei*[1,2,3,4]

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. National Engineering Research Center of Chinese Rice Wine, Shaoxing 31200, China; 5. Shaoxing University, Shaoxing 31200, China)

Abstract: In this study, Chinese rice wine from Shaoxing region was used to extract polysaccharides, and the protein of crude polysaccharides sample was precipitated by sevag. The isolation, purification of polysaccharides was performed by DEAE-Sepharose Fast Flow and Sephadex G75. Furthermore, the purity and molecular weight were determined by high performance gel permeation chromatography (HPGPC). Ultraviolet spectrum (UV), fourier transform infrared spectrometry (FTIR) and NMR were for determining the structure of CRWP1. It was showed as a single symmetrical peak on high-performance gel-permeation chromatography (HPGPC) and the

收稿日期: 2015-09-02

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102203-06);中央高校基本科研业务费(JUSRP11411)。

作者简介: 孟祥勇(1982—),男,安徽砀山人,工学博士,副教授,主要从食品生物技术研究。E-mail:nelmeng@163.com

***通信作者**: 毛　健(1970—),男,安徽宿州人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail:biomao@263.net

引用本文: 孟祥勇,沈赤,毛健,等. 黄酒多糖的分离纯化及理化性质研究[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(10):1029-1035.

average molecular weight was 7 850 Da. The results showed that CRWP1 was a heteroglycan,which was composed mainly of glucose,arabinose,xylose,and a small quantity of fucose,galactose and mannose. There was one glycosidic configuration (α) in structure of polysaccharides from Shaoxing rice wine,and the glycosidic bond was galactopyranose type. It was also revealed that the structure of polysaccharides from Shaoxing rice wine contained 1,3 glycosidic bonds as the main chain and 1,4 glycosidic bonds as branched chain.

Keywords: Shaoxing rice wine,macromolecule,molecular weight,monosaccharide,structure characteristics

黄酒是以谷物为酿造原料,利用酒药、麦曲中的多种微生物共同酿造而成的一种营养丰富的发酵酒,具体酿造过程包括浸米、蒸煮、前酵、后酵、过滤、煎酒、贮存等步骤[1-2],具有以下显著特点:敞口式、双边发酵、多菌种参与[3-4],目前对黄酒中生物活性成分的研究主要集中在氨基酸[5]、功能性低聚糖、多酚类物质[6]和生物活性多肽[7]等功能性物质。作者在前期研究过程中发现黄酒中含有一定含量的多糖,并且多糖含量因黄酒发酵工艺的不同而表现出一定的差异性。在前期研究中,黄酒原液经浓缩、醇沉、Sevag 试剂去蛋白质、透析以及冷冻干燥等得到粗多糖。虽然醇沉物经初步分离,已去掉部分杂质,但粗多糖中仍有未脱除干净的色素、蛋白质、单糖等物质,并且其所含多糖在分子大小和极性上也存在差异,因此需要在进一步对黄酒粗多糖进一步分离,以为黄酒多糖生物活性的研究提供基础。

与小分子化合物相比,多糖具有相对分子质量大、结构复杂及极性大等特点,因而多糖分离纯化的方法不同于普通化合物的分离纯化。粗多糖的分离纯化一般需要经过除杂、脱色、除蛋白质等步骤,将一些非糖去掉后,然后进一步通过乙醇分级沉淀法、透析法、超滤和膜分离等进一步纯化,其中纤维素离子交换柱层析和葡萄糖凝胶色谱柱层析分别是依据多糖的极性和相对分子质量进行分离。

因此,作者首先将粗多糖中的酸性多糖和中性多糖用 DEAE Sepharose FF 离子交换柱进行分离,然后按相对分子质量大小将多糖用葡聚糖凝胶柱 G75 进行分离,同时采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)测定绍兴黄酒多糖的相对分子质量及纯度、高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法(HPAEC- PAD)测单糖组成、红外光谱和紫外光谱以及核磁共振分析绍兴黄酒多糖的结构,并通过刚果红实验对绍兴黄酒多糖的三维螺旋结构进行测定,以期初步推断其结构,为解释黄酒多糖的对黄酒的风味品质和健康作用的影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

绍兴黄酒粗多糖:实验室自制,乙醇沉淀黄酒多糖,并采用 Sevage 法去除沉淀中的蛋白质,其含有的无机盐、低聚糖等杂质经透析袋透析 72 h 去除,随后进行减压浓缩,冷冻干燥得到黄酒粗多糖。

DEAE 琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶 G75、KBr、单糖标准样:美国 Sigma-Aldrich 公司产品。

1.2 仪器与设备

SY500 旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂产品;Avanti J-26 XP 高速冷冻离心机:美国贝克曼库尔特产品;FreeZone® 冷冻干燥机:美国 Labconco 公司产品;MD99-3 自动液相色谱分离层析仪:上海青浦沪西仪器厂产品;UV2600 紫外可见分光光度计:天美(中国)科学仪器有限公司产品;NEXU S670 智能型傅里叶红外光谱仪:美国尼高利公司产品;ICS-5000 离子色谱仪:美国 Dionex 公司产品;Waters 600 高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品;AVANCEⅢ HD 400 MHz 核磁共振:美国布鲁克公司产品。

1.3 方法

1.3.1 黄酒多糖 DEAE 离子交换柱纯化 参照 Guo 等人[8]的方法,称取 DEAE Sepharose FF 琼脂凝胶填料 100 g,用体积分数 70%的乙醇反复漂洗,抽干后于 2 mol/L 氯化钠溶液中浸泡 3 h,抽干,然后用去离子水洗涤至中性,超声波脱气;将预处理过的 DEAE Seph-arose FF 填料用去离子水悬浮均匀,沿柱壁缓慢加入内径 2.6 cm、柱高 30 cm 的层析柱

内,静置使胶体充分沉淀,以 5 柱体积的去离子水洗涤平衡柱子;取 0.1 g 黄酒粗多糖样品,用超纯水溶解,配成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,过 0.45 μm 滤膜后上 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱,上样量为 10 mL,调节恒流泵的转动速度至洗脱流量为 1.5 mL/min,用部分收集器收集洗脱液,洗脱每 4 min 接收 1 管多糖洗脱液。首先用 300 mL 超纯水洗脱(接收 50 管),再用 0~1 mol/L NaCl(用梯度混合器发生,左边放 150 mL 1 mol/L NaCl 溶液,右边盛放 150 mL 超纯水)洗脱,洗脱至没有多糖检出为止。每隔一管取 0.2 mL 洗脱液检测多糖含量,然后以管数为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制洗脱曲线,根据洗脱峰对分离效果进行判断。洗脱液分别收集,单一峰收集液合并,然后对收集液进行减压浓缩,透析,冻干得黄酒多糖的 DEAE-Sepharose FF 组分。

1.3.2 黄酒多糖葡聚糖 G75 凝胶柱分离　取一定量的葡聚糖凝胶 G75,用约 20 倍凝胶量的去离子水,置于室温下 24 h 进行溶胀,间隙搅拌,以保证凝胶的溶胀完全,以免上柱后流速变慢和凝胶断裂,然后将表面悬浮的小颗粒取出;将层析柱垂直固定于铁架台上,接着将溶胀完全并脱气的葡聚糖凝胶搅拌均匀,沿柱壁缓慢加入内径 2.6 cm、柱高 30 cm 的玻璃柱内,然后静置使填料成分沉淀均匀、致密。装柱后,用去离子水洗涤平衡柱子 24 h;将经过 DEAE 柱分离得到的黄酒多糖组分配制成 5 mg/mL 的水溶液 10 mL,然后将多糖溶液沿柱壁缓慢加 G75 葡聚糖凝胶柱,上样量为 5 mL;用去离子水洗脱,调节恒流泵的转速至洗脱流量为 0.5 mL/min,用部分收集器收集洗脱液,每 10 min 接收 1 管洗脱液。每隔一管取 0.2 mL 洗脱液检测多糖含量,然后以管数为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制洗脱曲线,根据洗脱峰对分离效果进行判断。洗脱液分别收集,单一峰收集液合并,然后对收集液进行减压浓缩,透析,冻干。

1.3.3 多糖纯度和相对分子质量测定　黄酒多糖的相对分子质量和纯度采用高效凝胶过滤色谱法(HPGFC)测定,具体方法参照 Hsu 等人[9],样品溶液经 0.5 μm 微孔膜过滤后,取 15 μL 上高效液相色谱仪。高效凝胶过滤色谱仪的条件为:Waters 600 高效液相色谱仪,410 示差折光检测器,雾化温度 55 ℃,雾化压力 3.06 bar,Ultrahydrogel™ Linear(300 mm×7.8mm)凝胶柱,色谱柱温度为 45 ℃,流动相为 0.1 mol/L $NaNO_3$,流速为 0.96 mL/min。

1.3.4 单糖组成分析　取 2 mg 多糖样品放入薄壁长试管中,加入 4 mL 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)溶液,混匀后于 110 ℃下水解 2 h;然后低于 40 ℃温度下将试管内溶液减压蒸干,接着加入 3 mL 甲醇再次蒸干,重复以上操作 4~5 次,以完全除去 TFA。用超纯水溶解定容至 100 mL 容量瓶,稀释 10 倍后上样测定。色谱条件为:Dionex CarboPac PA20 阴离子交换柱,包括 250 mm×4 mm 分析柱、50 mm×4 mm 保护住;色谱柱温度为 30 ℃;流动相由 A(超纯水)和 B(0.25 mol/L NaOH)组成,其中流动相 B 的比例分别为体积分数 2.0%(0~22.0 min)、2.0%~80.0%(22.0~23.0 min)、80.0%(23.0~30.0 min)、80.0%~2.0%(30.0~31.0 min)、2.0%(31.0~40.0 min);流量为 0.5 mL/min;进样体积为 20 μL。

1.3.5 黄酒多糖三股螺旋结构的测定　黄酒多糖三股螺旋结构的测定参照 You 等人[10],并略作改动。称取 5 mg 黄酒多糖样品,分别加入蒸馏水 2.0 mL 和 80 μmol/L 的刚果红试剂 2.0 mL,然后加入 1.0 mol/LNaOH 溶液,使溶液中 NaOH 浓度分别达到 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5 mol/L,混匀后于 200~800 nm 波长范围内进行紫外可见光谱扫描,并记录最大吸收波长;以蒸馏水替代黄酒多糖溶液,重复以上操作作为对照。以 NaOH 浓度为横坐标,最大吸收波长为纵坐标作图,分析多糖溶液的最大吸收波长与 NaOH 浓度之间的关系。

1.3.6 黄酒多糖紫外-可见光光谱(UV)分析　取 50 mg 纯化后的黄酒多糖置于 25 mL 容量瓶中,用去离子水配制 2.0 mg/mL 黄酒多糖溶液,于 200~400 nm 范围内进行紫外-可见光扫描,判断 260 nm 和 280 nm 处是否存在吸收峰。

1.3.7 黄酒多糖红外光谱分析　将光谱纯 KBr 预先用红外干燥箱干燥,取 100~200 mg,用压片机压成薄片作为空白对照;另取经红外干燥的黄酒多糖样品,与 100~200 mg 光谱纯 KBr 混合,并在玛瑙研钵中轻轻研磨均匀,压成薄片,于 4 000~400 cm^{-1} 处采集红外光谱信息,扫描参数为:32 次扫描、2 cm^{-1} 的分辨率。

1.3.8 黄酒多糖核磁共振分析　黄酒多糖结构分析采用核磁共振法,具体方法参考 Ruthes 等人[11]研究,并略作修改。取多糖样品 60 mg,溶于 1 mL D_2O 以置换 H_2O、冻干,反复置换 3 次,装入核磁管,溶于

D_2O 中(1~0.5 mL),DDS(二甲基硅戊烷磺酸钠)作内标。在室温下用 BRUKERA-V400 型核磁共振仪上进行 ^1H-NMR,^{13}C-NMR,1H-1H 相关谱 (1H-1HCOSY)、异核单量子关系(HSQC)、异核多键相关谱(HMBC)。

2 结果与分析

2.1 黄酒粗多糖的分离纯化

2.1.1 黄酒粗多糖 DEAE-Sepharose FF 色谱柱纯化 由于不同多糖组分所带电荷的不同,其和 DEAE-Sepharose FF 色谱柱固定相中离子交换子的集合能力有所差异,样品溶液流经色谱柱时,不同电荷的多糖被选择性地吸附在固定相上,因而当洗脱液流经色谱柱时,不同电荷量的多糖就被先后洗脱下来,从而实现黄酒多糖的分离纯化。

由图 1 可知,采用醇沉多糖工艺所得粗多糖经 DEAE-Sepharose FF 色谱柱洗脱后可得 3 种黄酒多糖组分:CRWP1、CRWP2 和 CRWP3;由图中洗脱曲线可判断出,最先被去离子水洗脱下来的黄酒多糖组分 CRWP1 为不带电荷的中性多糖,而当洗脱液换为用 0~1 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱时,此时被分离下来的黄酒多糖为酸性多糖。比较洗脱下来的 3 个洗脱峰,其中组分 CRWP1 所占比例达到 91.5%,CRWP2 和 CRWP3 所占比例分别为 5.67% 和 2.83%。从以上分析结果看,CRWP1 为含量最高的黄酒多糖组分,且其活性经初步验证高于其它两个组分,因此以 CRWP1 为目标组分继续进行纯化。

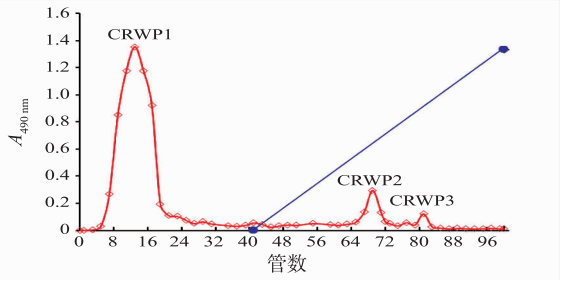


图 1 黄酒多糖 DEAE-Sepharose FF 色谱柱的梯度洗脱曲线

Fig. 1 Stepwise elution curve of crude polysaccharides from Chinese rice wine on DEAE-Sepharose FF chromatography column

2.1.2 黄酒粗多糖葡聚糖凝胶 G75 色谱柱纯化 图 2 为 DEAE-Sepharose FF 色谱柱初步分离得到的黄酒多糖组分 CRWP1 经葡聚糖凝胶 G75 色谱柱的洗脱结果。如图 2 所示,用葡聚糖凝胶 G75 色谱柱对多糖组分 CRWP1 进行洗脱,硫酸苯酚法检测后得到单一对称吸收峰,表明该组分纯度较高。收集合并吸收峰位置洗脱液,将洗脱液透析和冷冻干燥后,得到白色的多糖样品,说明多糖中混有的色素得到了很好的去除。

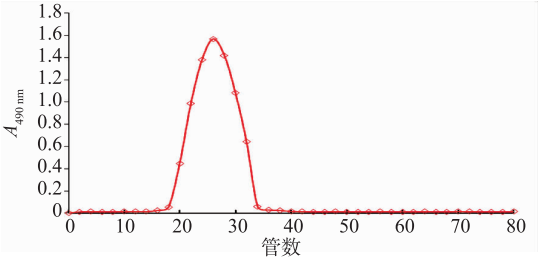


图 2 黄酒多糖组分 CRWP1 的葡聚糖凝胶 G7 色谱柱的洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of CRWP1 on Sephadex G75 chromatography column

2.2 黄酒多糖 CRWP1 的纯度和相对分子质量

图 3 为黄酒多糖的高效凝胶过滤色谱图,通过对图形分析可知,经 DEAE-Sepharose FF 色谱柱和葡聚糖凝胶 G7 色谱柱分离纯化可得到纯度较高的黄酒多糖组分。根据标准分子量葡聚糖绘制的标准曲线,得到黄酒多糖的重均相对分子质量为 7 850。

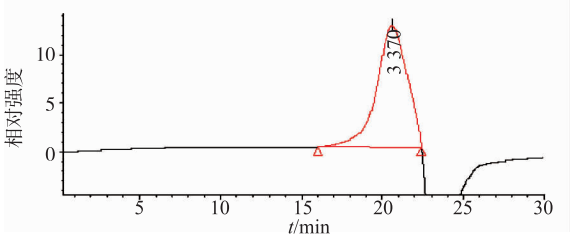
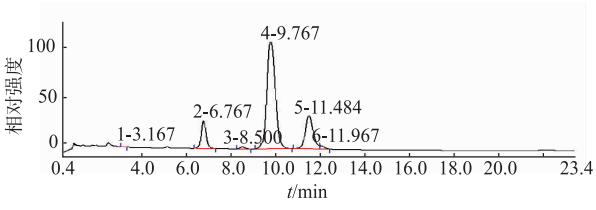


图 3 黄酒多糖组分 CRWP1 的 HPGPC 色谱图

Fig. 3 HPGPC chromatography of CRWP1

2.3 黄酒多糖 CRWP1 的单糖组成

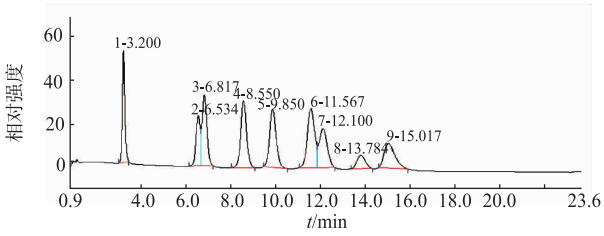
图 4、5 分别给出了混合标样和 CRWP1 的离子色谱图。出峰时间和代表的化合物如表 1 和表 2 所示。



1.岩藻糖;2.鼠李糖;3.阿拉伯糖;4.半乳糖;5.葡萄糖;6.木糖;7.甘露糖;8.果糖;9.核糖

图 4 混合标样的离子色谱图

Fig. 4 HPAEC separation with pulsed -amperometric detection of sugar standard solution



1.岩藻糖;2.阿拉伯糖;3.半乳糖;4.葡萄糖;5.木糖;6.甘露糖

图 5 黄酒多糖样品 CRWP1 样品的离子色谱图

Fig. 5 HPAEC separation with pulsed –amperometric detection of polysaccharide fraction CRWP1

由表 1 和表 2 可知,黄酒多糖组分 CRWP1 各峰保留时间与阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、岩藻糖、半乳糖和甘露糖标准品的保留时间一致,通过进一步分析可知阿拉伯糖、葡萄糖和木糖为 CRWP1 的主要组分,并含有少量岩藻糖、半乳糖和甘露糖。

表 1 单糖标准品的高效阴离子色谱分析

Table 1 Analysis for the spectrum of HPAEC for monos–accharide standards

峰	单糖	出峰时间/min	峰面积
1	岩藻糖	3.20	6.708
2	鼠李糖	6.53	4.806
3	阿拉伯糖	6.82	8.047
4	半乳糖	8.55	9.105
5	葡萄糖	9.85	8.818
6	木糖	11.57	10.097
7	甘露糖	12.10	7.227
8	果糖	13.78	2.582
9	核糖	15.02	6.133
			63.524

表 2 黄酒多糖组分 CRWP1 的高效阴离子色谱分析

Table 2 Analysis for the spectrum of HPAEC for monosaccharide standards

峰	单糖	出峰时间/min	峰面积
1	岩藻糖	3.17	0.015
2	阿拉伯糖	6.77	6.679
3	半乳糖	8.50	0.577
4	葡萄糖	9.77	46.204
5	木糖	11.48	13.090
6	甘露糖	11.97	0.735
7			67.300

2.4 黄酒多糖组分 CRWP1 紫外光谱分析

黄酒多糖组分 CRWP1 的紫外光谱扫描信息如图 6 所示,根据 CRWP1 在 200~600 nm 波长范围内的扫描结果,在 260 nm 和 280 nm 两个位置均为出现明显吸收,说明经 DEAE–Sepharose FF 色谱柱和葡聚糖凝胶 G75 色谱柱分离后得到的黄酒多糖组分 CRWP1 不含核酸和蛋白质。

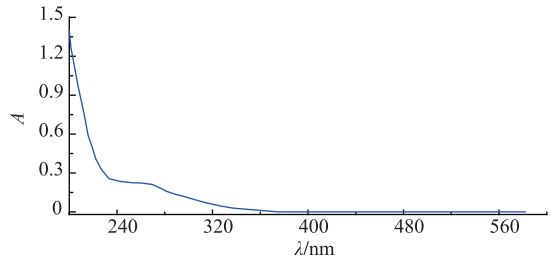


图 6 黄酒多糖组分 CRWP1 的紫外光谱图

Fig. 6 UV spectra of CRWP1

2.5 黄酒多糖组分 CRWP1 红外光谱分析

取干燥后的黄酒多糖 CRWP1 经溴化钾压片后制样,进行红外扫描,其傅里叶变换红外光谱吸收信息如图 7 所示。

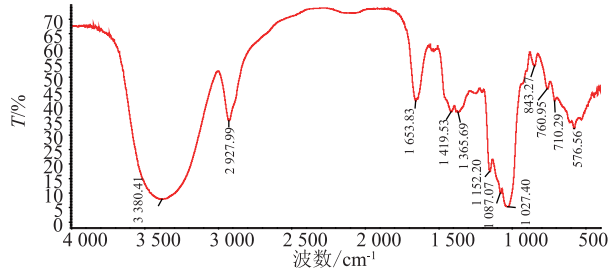


图 7 黄酒多糖组分 CRWP1 的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 7 FT–IR spectra of CRWP1

从图 7 可以看出,多糖组分 CRWP1 在 3 380.41 cm^{-1} 的吸收峰宽而强,表明分子间或分子内存在 O–H 伸缩振动;2 925.99 cm^{-1} 处的吸收峰,说明存在糖类物质的 C–H 键伸缩振动 [12];1 653 cm^{-1} 处的强吸收峰,为–CHO 中的 C=O 伸缩振动特征吸收;1 419 cm^{-1}、1 365.69 cm^{-1} 处存在弱吸收峰,说明存在 C–H 变角振动;1 152.20 cm^{-1}、1 087.07 cm^{-1}、1 027.40 cm^{-1} 有吸收峰,说明存在 β–吡喃糖基 C–O–H 和 C–O–C 中 C–O 引起的振动吸收;843.27 cm^{-1} 存在吸收峰,即为 α–D–Glc 吡喃构型和 β–糖苷键引起的特征吸收;760.95 cm^{-1} 有吸收,说明存在 α–D–木吡喃环的对称伸缩振动。

2.6 黄酒多糖组分 CRWP1 三股螺旋结构

由图 8 可知,当 NaOH 的浓度在 0~0.05 mol/L 范围内变化时,黄酒多糖组分 CRWP1 与刚果红形成的络合物的 λ_{max} 随浓度的增加而增加;当 NaOH 浓度在 0.05~0.5 mol/L 范围内变化时,黄酒多糖组分 CRWP1 与刚果红形成的络合物的 λ_{max} 随浓度的增加而逐渐减小,而为添加黄酒多糖组分 CRWP1 的刚果红溶液的 λ_{max} 随 NaOH 浓度的增加(0~0.5 mol/L)而不断下降。由此说明,在黄酒多糖组分

CRWP1 存在三股螺旋结构，该结构在弱碱性条件下与刚果红形成络合物，使 λ_{max} 增大；但该结构在强碱性溶液中不稳定，当 NaOH 溶液浓度大于 0.05 mo/L 时，三股螺旋结构中的氢键被破坏，从而表现为 λ_{max} 的降低。

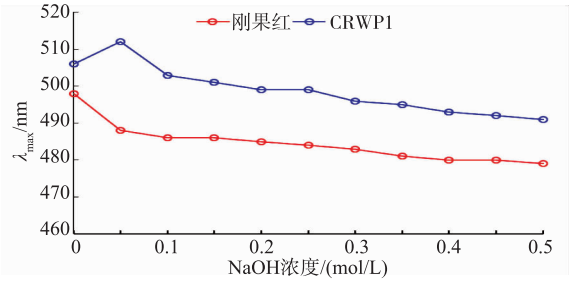


图 8　黄酒多糖组分 CRWP1 在 NaOH 溶液中的 λ_{max}

Fig. 8　Maximum absorption wavelength of mixture of CRWP1 in various concentration of NaOH

2.7　黄酒多糖组分 CRWP1 核磁共振分析

黄酒多糖组分 CRWP1 核磁共振波谱分析如图 9、10 所示。从黄酒多糖组分 CRWP1 的 ^{1}H–NMR 图谱(图 9)分析可知，δ 4.790 处的信号为水分子的信号；在异头氢区的共振区域 δ 5.00~5.40 范围内共有 5 个异头氢的共振峰，分别是 δ 5.181、5.302、5.312、5.333、5.354，其化学位移均大于 4.9，并且在 5.40 处未出现质子信号，说明黄酒多糖组分 CRWP1 为含有 α 型糖残基的吡喃糖[13]。

由图 10 可知，异头碳的共振峰出现在 δ 95.873~99.927，共有 5 个共振峰，说明黄酒多糖组分 CRWP1 是由 5 种单糖残基组成的杂多糖。多糖中同一单糖的位置不同，异头碳的化学位移也会不同；取代基的空间排列对异头碳的化学位移影响较大，与异头碳上垂直键的化学位移相比，平伏键的化学位移处于较高场例如 α–型糖苷异头碳和多数 β–型糖苷异头碳的化学位移分别处于 95~101 和 101~105[14]。

由据图 10 发现，在 δ 95~101 范围内出现共振信号，说明黄酒多糖组分 CRWP1 含有 α 糖苷键构型。一般情况下，可根据 ^{13}C–NMR 检测到的信号将多糖分为呋喃糖、吡喃糖，其中呋喃糖的三位碳和五位碳在 δ 82~84 范围内无信号，而吡喃糖的三位碳和五位碳的化学位移小于 80。同时根据图 10 发现，δ 82~84 范围内未有信号出现，说明黄酒多糖组分 CRWP1 不存在呋喃型结构，因此可以初步确定黄酒多组分 CRWP1 的单糖残基构型为吡喃型[14–15]。未被取代时吡喃糖残基的 C2、C3、C4 化学位移为 70~76，一旦发生取代，其相应位移将移向 76~85；对于 C6(δ60~65)位发生取代后，其位移将移至 67~76。结合图 3~9 可知，黄酒多糖组分 CRWP1 在 76~85 范围内出现信号，即为 C3 位糖苷键取代后的共振峰，说明黄酒多糖组分 CRWP1 存在 1,3 连接糖苷键[16]；在 δ 75.911 处出现的信号为被取代的 C4 糖残基信号，说明黄酒多糖组分 CRWP1 中含有少量 1,4 连接糖苷键。

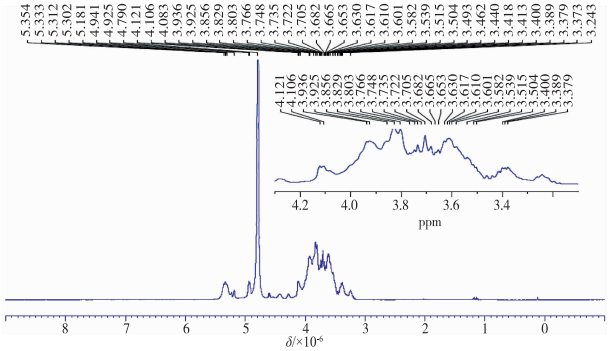


图 9　黄酒多糖组分 CRWP1 的 ^{1}H–NMR

Fig. 9　^{1}H–NMR spectrum of CRWP1

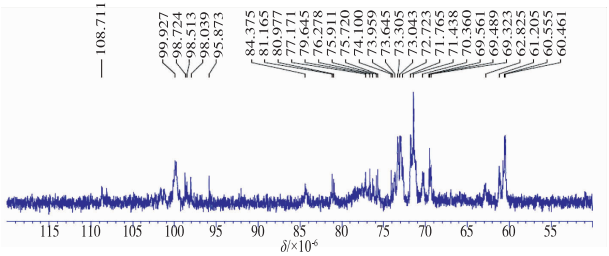


图 10　黄酒多糖组分 CRWP1 的 ^{13}C–NMR

Fig. 10　^{13}C–NMR spectrum of CRWP1

3　结　语

采用 DEAE–Sepharose FF 色谱柱和葡聚糖凝胶 G75 色谱柱对黄酒粗多糖进行分离纯化，得到一种白色的黄酒多糖组分 CRWP1。并且使用 HPGPC 对该组分的纯度和相对分子质量进行测定，其洗脱峰呈单一、对称正态分布，说明经 DEAE–Sepharose FF 色谱柱和葡聚糖凝胶 G7 色谱柱分离纯化得到的黄酒多糖组分 CRWP1 为纯度较高的单一组分，相对分子质量为 7 850；并且经高效阴离子色谱检测证明，CRWP1 主要由阿拉伯糖、葡萄糖和木糖组成，并含有少量岩藻糖、半乳糖和甘露糖；此外，采用紫外光谱、红外光谱以及核磁共振波谱对黄酒多

糖组分 CRWP1 的结构进行分析，结果表明所得多糖组分 CRWP1 为在 1,3 糖苷键主链上连接有 1,4 糖苷键支链的杂多糖，含有 α 糖苷键构型，并且其单糖残基为吡喃型。

参考文献：

[1] FENG Hao，MAO Jian，HUANG Guidong，et al. Study on isolation，identification and biological properties of lactic acid bacteria from the fermentation of Chinese rice wine [J]. **Science and Technology of Food Industry**，2013，34（16）：224-2278.（in Chinese）

[2] HAN Xiao，MAO Jian，HUANG Guidong. Effect of trace ventilation on flavoring substances and free amino acids in chinese rice wine during storage[J]. **Food Science**，2013，34(3)：123-127.（in Chinese）

[3] LUAN Tongqing，LI Zhijun，ZHONG Qiding，et al. Preliminary study of changes of the bacterial community structures during the rice wine fermentation[J]. **Science and Technology of Food Industry**，2013，12(34)：177-180.（in Chinese）

[4] ZHANG Fengjie，XUE Jie，WANG Yijing，et al. Study on biogenic amines formation and influencing factors in Chinese rice wine [J]. **Food and Fermentation Industries**，2013，39(2)：62-68.（in Chinese）

[5] HE S，MAO X，LIU P，et al. Research into the functional components and antioxidant activities of North China rice wine （Ji Mo Lao Jiu）[J]. **Food Science & Nutrition**，2013，4(1)：307-314.

[6] QUE F，MAO L C，PAN X. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds[J]. **Food Research International**，2006，39(5)：581-587.

[7] HAN F L，XU Y. Identification of low molecular weight peptides in Chinese Rice Wine （Huang Jiu）by UPLC-ESI-MS/MS[J]. **Journal of the Institute of Brewing**，2011，117(2)：238-250.

[8] GUO S，MAO W，HAN Y，et al. Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiella tarda*[J]. **Bioresource Technology**，2010，101(12)：4729-4732.

[9] HSU W，HSU T，LIN F，et al. Separation，purification，and α-glucosidase inhibition of polysaccharides from *Coriolus versicolor* LH1 mycelia[J]. **Carbohydrate Polymers**，2013，92(1)：297-306.

[10] YOU L，GAO Q，FENG M，et al. Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities[J]. **Food Chemistry**，2013，138(4)：2242-2249.

[11] RUTHES A C，RATTMANN Y D，CARBONERO E R，et al. Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and Lactarius rufus[J]. **Carbohydrate Polymers**，2012，87(2)：1620-1627.

[12] LI Qingyu，YANG Ying，JIA Linfei，et al. Purification，Structural analysis and antifatigue assay of polysaccharide from *Castanea mollissima* Blume[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2013，32(7)：767-772.(in Chinese)

[13] AGUIRRE M J，ISAACS M，MATSUHIRO B，et al. Characterization of a neutral polysaccharide with antioxidant capacity from red wine[J]. **Carbohydrate Research**，2009，344(9)：1095-1101.

[14] CHEN Y，MAO W，YANG Y，et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus，*Aspergillus versicolor* LCJ-5-4[J]. **Carbohydrate Polymers**，2012，87(1)：218-226.

[15] LIM J M，JOO J H，KIM H O，et al. Structural analysis and molecular characterization of exopolysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Collybia maculata* TG-1[J]. **Carbohydrate Polymers**，2005，61(3)：296-303.

[16] YANG Yanchao，XU Deping. Hypoglycemic effect and structural determination of polysaccharides from barley malt [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2012，31(10)：1087-1092.(in Chinese)