



用气相色谱法研究土壤芽孢杆菌产生的胞外多糖*

李凤珍 胡连生 潘星时

(中国科学院林业土壤研究所, 沈阳)

气相色谱法已广泛应用于生物材料中单糖组分和生物高聚物结构的研究^[1-3]。微生物产生的胞外多糖的单糖组分差异很大, 本文在于通过气相色谱条件的对比, 选择了一种合适的气相色谱条件, 以便分离和定量测定一般常见于土壤中的芽孢杆菌的胞外多糖中的中性糖组分。

材料与方 法

1. 仪器: 采用日本岛津 GC-5A 型气相色谱仪。氢火焰离子化鉴定器, $\phi 3 \times 300$ mm 的椭圆型玻璃管柱。

2. 试剂: ①三甲基硅烷化试剂: 双[三甲基硅烷基]乙酰胺[Bis-(trimethylsilyl) acetamide], 三甲基氯硅烷(trimethylchlorosilane)和吡啶。②三氟乙酰化试剂: 三氟乙酸酐和乙酸乙酯。③糖类: 选用的标准单糖有 D-赤藓糖、L-鼠李糖, D-核糖, L-岩藻糖, D-阿拉伯糖, D-木糖, D-甘露糖, D-葡萄糖, D-果糖和 D-半乳糖, 多糖有菊糖。

3. 芽孢杆菌胞外多糖的制备: 供试菌株: 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 498; 396; 106; 393 四株, 巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*) 136 一株, 多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*) 510 一株, 均系本所菌种保藏组提供。

培养基成份(g/100ml): 葡萄糖 4, 酵母膏 0.5, 碳酸钙 0.3。

将上述菌株进行液体培养。30℃ 振荡培养 5 天后, 离心取上清液, 加入 4 倍体积 95% 乙醇沉淀, 离心取沉淀重溶于水中, 加入 0.5 倍体

积的氯仿和正丁醇(5:2)溶液、振摇、反复去蛋白, 取上层多糖液, 透析 2—4 天, 加入 4 倍体积丙酮沉淀, 干燥得多糖制品。

4. 单糖三甲基硅烷化衍生物的制备: 取单糖或干燥的多糖水解释物溶于 0.5ml 吡啶中, 加入 0.1 ml 双[三甲基硅烷基]乙酰胺和 0.05 ml 三甲基氯硅烷, 充分混合后, 供气相色谱用。

5. 单糖三氟乙酰化衍生物的制备: 取单糖水溶液或中和后的多糖水解液, 加入 10mg 硼氢化钠, 反应 2 小时, 加入少许醋酸, 通过 732 型离子交换柱, 将流出液减压浓缩至干, 然后反复用甲醇蒸发去硼酸, 充分干燥, 加入 1:1 的乙酸乙酯和三氟乙酸酐, 室温反应 15 分钟后, 供气相色谱分析用。

结 果 和 讨 论

(一) 挥发性衍生物的选择及气相色谱条件

糖类是一种挥发性较差的化合物, 在用气相色谱法分析各种单糖时, 必须先将糖类转变为挥发性衍生物。在制备糖类挥发性衍生物中, 目前采用最广泛的是将单糖转变为三甲基硅烷化衍生物^[1]。制备这种衍生物的方法比较简单, 在室温下几分钟便可完成。但由于异构物(anomer)的存在, 一种单糖同时出现几个峰(图 1), 在气相色谱分析时, 往往出现峰的彼此重叠, 因而不利于进一步定量分析。

另一种制备糖类挥发性衍生物的方法, 是

* 参加工作的还有李琦、杨建秋同志。

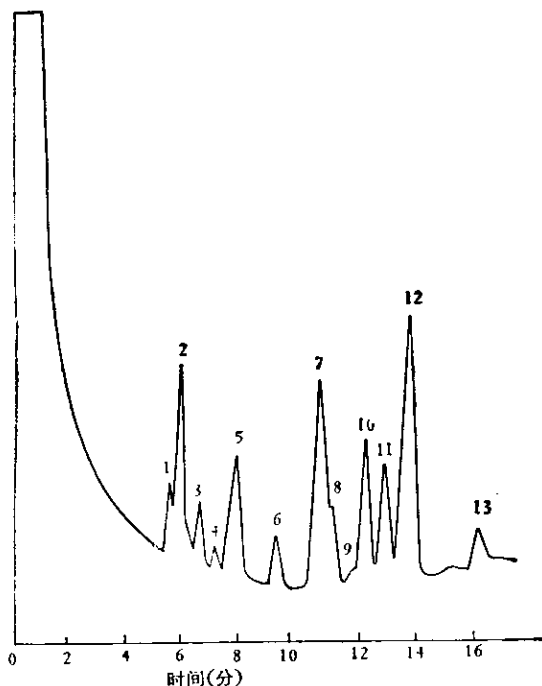


图1 混合单糖三甲基硅烷化衍生物的气相色谱图

峰1, 2, 3, 4-阿拉伯糖, 峰2, 5-鼠李糖, 峰5, 6-木糖, 峰7-果糖, 峰7, 12-甘露糖, 峰8, 10, 12-半乳糖, 峰9, 11, 13-葡萄糖

色谱柱: $\phi 3 \times 300$ mm 玻璃柱, 固定液: 1% XF-1105, 担体: Chromosorb W-AW-DMCS (60-80 目), 程序升温, 150—200°C (3°C/分)。

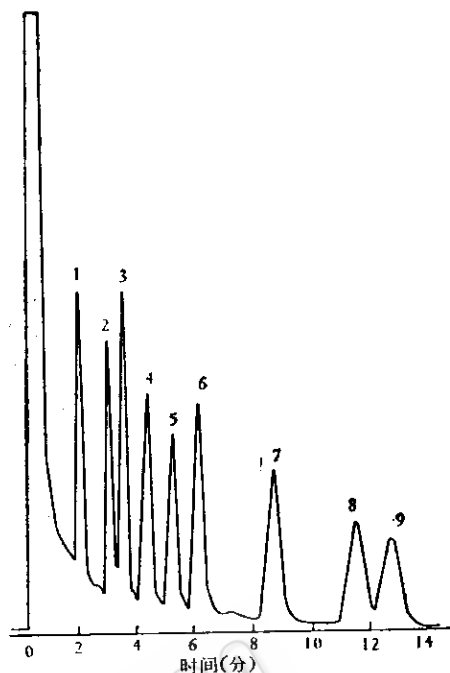


图2 混合单糖三氟乙酰化衍生物的图谱

峰1-赤藓糖, 峰2-鼠李糖, 峰3-核糖, 峰4-岩藻糖, 峰5-阿拉伯糖, 峰6-木糖, 峰7-甘露糖, 峰8-葡萄糖, 峰9-半乳糖。

色谱柱: $\phi 3 \times 300$ mm 玻璃柱, 固定液: 1% XF-1105, 担体: Chromosorb W-AW-DMCS (60-80 目), 柱温: 144°C, 气化, 检测器温度: 250°C, 氢气流量: 50 ml/分, 空气流量: 0.9 L/分, 载气(氮气)流量: 60 ml/分。

将糖类还原成糖醇后, 再制成三甲基硅烷化衍生物, 此时各种单糖在色谱图上都出现单一峰, 但葡萄糖和甘露糖, 半乳糖和果糖的保留时间很接近, 彼此峰形重叠, 难于分开, 虽曾采用不同的固定液(如10% 聚乙二醇-20M; 3% SE-30; 3—5% SE-52; OV-17 和 OV-210 混合柱, 1% XF-1105 等), 以及改变柱温或程序升温等, 都未能使之分开。由于这些糖都是微生物胞外多糖中常见的组份, 因此这一方法不太适用于分析微生物胞外多糖的组份糖。

还有一种制备糖类挥发性衍生物的方法, 是先将单糖用硼氢化钠还原成糖醇后, 再用乙酸乙酯和三氟乙酸酐作用, 制成三氟乙酰化衍生物^[2,4]。各种单糖醇的三氟乙酰化衍生物, 在色谱图上也只出现单一峰。通过各种色谱条件比较, 确定以1% XF-1105/chromosorb W-AW-DMCS 色谱柱较好, 在恒温条件下便可使赤藓

表1 各种单糖三氟乙酰化衍生物的相对保留时间及校正因子(以木糖为内标)

糖 类	相对保留时间	校正因子
赤 藓 糖	0.36	1.22
鼠 李 糖	0.53	1.05
核 糖	0.60	0.80
岩 藻 糖	0.73	1.00
阿拉伯糖	0.87	0.98
木 糖	1.00	1.00
甘 露 糖	1.40	1.01
葡 萄 糖	1.85	1.16
半 乳 糖	2.02	1.11

糖, 鼠李糖, 核糖, 岩藻糖, 阿拉伯糖, 木糖, 甘露糖, 葡萄糖, 半乳糖明显分开(图2)。各种单糖的相对保留时间及校正因子见表1。

利用三氟乙酰化衍生物分析各种单糖时, 果糖的三氟乙酰化衍生物, 在气相色谱图上出现两个峰, 而且这两个峰的相对保留时间与甘

露糖和葡萄糖的峰接近,能使这三种糖的定量测定相互产生干扰。考虑到果糖对酸水解极不稳定的特点,我们用果糖和果聚糖(菊糖)进行不同浓度的酸水解试验,发现当酸浓度超过1N时,果糖开始破坏。在同一水解条件(100℃水解4小时)下,0.1N硫酸不破坏果糖,1N硫酸破坏果糖35%,2N硫酸破坏90%以上,采用菊糖的水解试验也同样证明。0.5N硫酸水解时,果糖破坏39.3%,1N硫酸破坏73.6%,2N硫酸破坏94.5%。对于其他单糖,虽然在2N硫酸水解6小时,也不被破坏(见表3和表4),回收率均在90%以上。因此我们认为,在用气相色谱法测定微生物胞外多糖时,先采用弱酸(0.1N硫酸)水解多糖,使果糖游离,而其他单糖则不解链(图3),以及果糖的三甲基硅烷化衍生物在气相色谱图上出现单一峰(图1峰7)的这些特点,进行果糖的定量测定。其他单糖的定量测定,则采用强酸(2N硫酸)作用6小时,使果糖破坏,然后将其他单糖还原为糖醇后,制备成三氟乙酰化衍生物,再进行气相色谱分离定量测定(图2)。

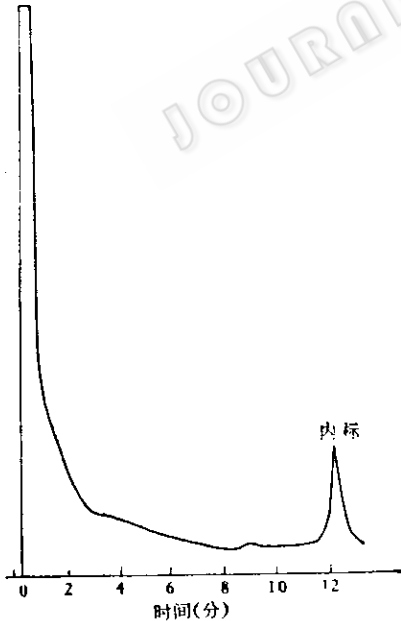


图3 *B. subtilis* 498胞外多糖0.1N硫酸水解后的三甲基硅烷化衍生物的气相色谱图
气相色谱条件:与图1相同,内标-甘露糖。

(二) 芽孢杆菌胞外多糖组份糖的定量测定

取两份多糖制品,一份用于测定果糖,用

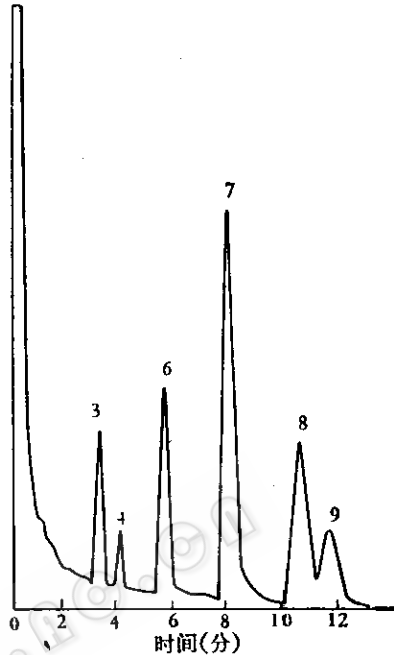


图4 *B. megaterium* 136胞外多糖的中性糖三氟乙酰化衍生物图谱

峰3-核糖,峰4-岩藻糖,峰6-木糖(内标),
峰7-甘露糖,峰8-葡萄糖,峰9-半乳糖,
气相色谱条件:与图2相同。

表2 加至 *B. subtilis* 498胞外多糖中的各种单糖回收率

糖 类	胞外多糖中 含量 (mg)	加入量 (mg)	GLC测出量 (mg)	回收率 (%)
鼠李糖	0	0.315	0.306	97.2
	0	0.630	0.621	98.5
核 糖	0	0.288	0.250	90.0
	0	0.576	0.570	98.9
岩藻糖	0	0.315	0.264	87.6
	0	0.630	0.610	96.3
阿拉伯糖	0	0.288	0.251	93.3
	0	0.576	0.556	95.3
甘露糖	2.943	0.346	3.192	97.1
	2.943	0.692	3.569	98.2
葡萄糖	0.422	0.346	0.739	96.2
	0.422	0.692	1.121	100.6
半乳糖	0	0.346	0.350	101.9
	0	0.692	0.710	101.8

表 3 加至 *B. megaterium* 136 胞外多糖中的各种单糖回收率

糖 类	胞外多糖中 含量 (mg)	加入量 (mg)	GLC测出量 (mg)	回收率 (%)
赤藓糖	0	0.235	0.217	94.3
	0	0.470	0.442	94.0
鼠李糖	0	0.315	0.281	89.3
	0	0.630	0.652	103.5
核 糖	0.274	0.288	0.582	103.6
	0.274	0.576	0.864	101.6
岩藻糖	0.198	0.315	0.520	101.4
	0.198	0.630	0.890	107.5
阿拉伯糖	0	0.288	0.260	90.3
	0	0.576	0.540	93.8
甘露糖	2.321	0.346	2.80	105.0
	2.321	0.692	3.10	102.9
葡萄糖	1.309	0.344	1.77	107.1
	1.309	0.692	2.23	111.4
半乳糖	0.724	0.346	1.17	109.3

0.1N 硫酸水解,先用纸层析定性,然后将水解液转变为三甲基硅烷化衍生物,再进行气相色谱测定。另一份样品用 2N 硫酸水解,将水解液转变为三氟乙酰化衍生物。再用气相色谱测定除果糖以外的其他单糖。

分析结果表明, *B. subtilis* 498、106、393、396 产生的胞外多糖均含有甘露糖和葡萄糖,其克分子比分别为 3.4:0.5, 6.5:0.4, 4.6:0.4, 4.8:0.5。 *B. megaterium* 136 的胞外多糖组份含有甘露糖、葡萄糖、核糖、岩藻糖和半乳糖(图 4),其克分子比为 2.7:1.5:0.4:0.3:0.8。 *B. polymyxa* 510 产生的胞外多糖含有甘露糖、葡萄糖和半乳糖,其克分子比为 2.5:2.0:0.8。

(三) 方法准确度

回收率: 将一定量的各种单糖加至 10mg

B. subtilis 498 和 *B. megaterium* 136 的多糖样品中,然后按前述方法水解,还原,制成三氟乙酰化衍生物,进行气相色谱分离,测定含量,计算其回收率,结果列于表 2 和表 3。

从表 2 和表 3 看出,各种单糖的回收率是令人满意的,一般波动于 90—110% 之间。

结果重现性: 我们重复取样,按前述操作进行气相色谱测定,然后进行统计学处理,结果见表 4。

表 4 微生物胞外多糖组份糖重复测定结果的统计学分析

微 生 物	糖 类	平均含量 (%)	n	σ_s	CV
<i>B. megaterium</i> 136	核 糖	2.74	6	0.072	2.63
	岩藻糖	1.98	8	0.040	2.01
	甘露糖	23.21	6	0.156	0.67
	葡萄糖	13.09	6	0.481	3.65
	半乳糖	7.24	8	0.144	1.99
<i>B. subtilis</i> 498	甘露糖	29.43	8	0.493	1.68
	葡萄糖	4.22	8	0.146	3.46

n = 重复测定次数 σ_s = 标准偏差

CV = 变差系数 = $\frac{\text{标准偏差}}{\text{平均浓度}}$

从表 4 结果看出,按我们建立的用气相色谱测定微生物胞外多糖组份糖的分析方法,结果是可靠的,重现性良好,变差系数对于核糖,岩藻糖,甘露糖,葡萄糖,半乳糖分别为 2.63, 2.01, 0.67—1.68, 3.46—3.65 和 1.99%。

参 考 文 献

- [1] Sweeley, C. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**: 2497—2507, 1963.
- [2] 船越育雄,山科郁男: 生化学实验讲座(4), 糖質の化学(下),日本生化学会编, p. 317—353, 1976.
- [3] Clamp, R. et al.: *Method of Biochemical Analysis*, **19**: 229—344 1971.
- [4] Niedermeier, W.: *Analytical Biochemistry*, **40**: 466—475, 1971.