

# 双歧杆菌 22-5 胞外多糖结构分析

李伟欣, 陈 倩, 李平兰\*, 吴广枫, 程 静  
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘 要** 本实验主要对双歧杆菌22-5胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)结构进行了研究,单糖组成及红外检测信息提示,该EPS主要含有木糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖和岩藻糖,有羧基且部分成盐,存在吡喃糖环内醚结构;GC-MS结果显示,EPS中含有大量的D-葡萄糖和D-半乳糖,其中D-半乳糖以4位连接为主,葡萄糖多为2,3,4,6连接;高碘酸氧化和史密斯降解后产物经GC检测进一步验证,该EPS不含1→,1→6键型,可能具有1→4、1→4,6和1→2、1→2,6连接,支链中可能含有葡萄糖和半乳糖;刚果红实验证明其可能具有螺旋结构。

**关键词**: 双歧杆菌; 胞外多糖; 多糖; 结构

## Structural Study on Exopolysaccharide Produced by *Bifidobacterium* 22-5

LI Wei-xin, CHEN Qian, LI Ping-lan\*, WU Guang-feng, CHENG Jing  
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** *Bifidobacterium* 22-5 from centenarians' faeces produces an exopolysaccharide containing Xyl, Gal, Glu, Ara, Rha and Fuc. Infrared spectroscopy revealed that it contained pyranose, possessing the carboxyl group and a certain amount of carbonoxlate, and even the cycle ether. In addition, based on GC-MS, methylation analysis, NaIO<sub>4</sub> oxidation and Smith degradation, the primary structure was elucidated. EPS was identified as a polymer containing 4-linked D-galactose. D-glucose partially took the form of the 2, 3, 4, 6 connection, and 1-4 or 1-4, 6 and 1-2 or 1-2, 6 linkages, having neither 1-6 nor 1-linkages. Besides, D-glucoses and D-galactose may be as highly branched parts of the chain. It was also showed that the EPS may have the configure of helix in the Congo red test.

**Key words** bifidobacterium; exopolysaccharide; polysaccharide; structure

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0267-05

多糖结构是其发挥生物活性的基础,结构与功能之间具有决定与被决定的关系。多糖结构中的每一个因素对其生物活性都有不同程度的影响。

多糖的结构层次与蛋白质基本相似,分为一级、二级、三级和四级。其中,一级结构变化较大,研究较为成熟,到目前为止,已经建立的分析方法主要有化学法、物理法和生物法,例如,酸水解、高碘酸氧化、Smith降解、甲基化反应、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、红外光谱法(IR)、核磁共振谱法(NMR)、质谱法(MS)、酶化学方法等<sup>[1]</sup>;二、三、四级结构又合称为高级结构(又称构象),在很大程度上取决于一级结构,对其研究较为困难,除了常

见的X-射线衍射等技术手段外,多处于探索阶段。

多糖的结构常因单糖构型、羟基取代情况、糖基化方式、分支度、相邻单糖基糖链位置的不同而不同,结构的多变性使其成为生物体内重要的信息载体。多糖结构描述通常包括分子量范围、单糖组成、单糖构型、糖苷键构型、连接位点、重复单元,甚至是空间构型。

对于分子量较大的多糖,其结构研究多停留在一级结构层面,且往往不能得到令人满意的结果,因此,探索用更为有力的研究手段成为今后发展的重要方向。

本课题组研究的是分离自长寿老人肠道的一株双歧杆菌22-5所产的胞外多糖(EPS),前期已经对其纯度、分子量及理化特性进行了研究,证明该EPS是一种组分

收稿日期: 2007-11-30

基金项目: 国家“863”资助项目(2008AA10Z324);北京市自然科学基金项目(5072025)

作者简介: 李伟欣(1981-),女,硕士研究生,研究方向为食品微生物与食品生物技术。E-mail: lwx419163@163.com

\* 通讯作者: 李平兰(1964-),女,教授,博士,研究方向为益生菌及其生物活性代谢产物的理论与应用。

E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

单一的不含游离核酸和蛋白质的多糖物质, 分子量为  $1.1 \times 10^5$ D, 偏酸性, pH 6.5, 易溶于水, 难溶于有机溶剂, 是一种热不可逆凝胶, 黏度受 EPS 浓度、温度影响明显, 在 pH 4.0~10.0 之间稳定, 离子强度对其影响不大。本实验主要对其一级结构进行分析并初步探讨螺旋结构, 对其进行酸水解-IC、IR 扫描、GC-MS 测定、高碘酸氧化与史密斯降解等检测分析, 得到该 EPS 单糖组成、官能团、单糖连接方式等基本结构信息, 通过刚果红显色实验初步获得其螺旋结构的信息, 进而为深入研究其结构及构效关系打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与设备

#### 1.1.1 菌种

双歧杆菌由中国农业大学食品科学与营养工程学院微生物教研组提供, 分离自广西巴马长寿老人肠道。

#### 1.1.2 试剂

单糖标准品(岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖标准品( $\geq 99\%$ )) Sigma 公司; 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、 $\text{BaCO}_3$ 、DMSO、 $\text{CHCl}_3$ 、TFA、甲醇、NaOH、 $\text{NaBH}_4$ 、HAC、无水吡啶、乙酸酐、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、He、 $\text{NaIO}_4$ 、乙二醇、刚果红、蒸馏水、双蒸水。

#### 1.1.3 仪器与设备

SCL-1300 型垂直流洁净工作台、WFJ UV-2100 型分光光度计、平凡牌 TGL-20M 高速冷冻离心机、SL-N(高精度 LED 显示)电子天平、AL-9908S 溶剂过滤器、Shodex KS-805 sugar column、SEDEX 75 蒸发光散射检测器、DIONEX-2500 离子色谱仪、PA20 色谱柱、NEXUS-470 FT-IR、Agilent 4890 气相色谱仪、HP-5 色谱柱、氢火焰离子(FID)检测器、Tu-1901 双光束紫外可见分光光度计。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 双歧杆菌 EPS 的制备<sup>[2]</sup>

双歧杆菌活化 2 代, 2% 接种量( $8.4 \times 10^6$ CFU/ml)接种于产糖优化培养基中, 37℃ 恒温培养 24h; 将发酵液减压蒸发至原体积 1/3, 6000r/min 离心 10min; 发酵上清液浓缩后加入 3 倍体积 95% 乙醇, 4℃ 沉淀过夜, 6000r/min 离心 10min, 蒸馏水溶解, Sevag 法除蛋白(EPS: Sevag 试剂=1:2, 氯仿:正丁醇=4:1), 8000~14000D 孔径透析袋对去离子水透析 48h, Sepharose CL-6B 分子筛凝胶过滤(加样量 4ml, 样品浓度 4.0g/L, 洗脱液 0.05% NaCl, 流速 30ml/h, 收集速度 15min/管), 收集滤液, 冷冻干燥后即得 EPS 纯品干粉, 经 HPLC 及 UV 扫描, 测得其已达色谱分析纯。通过 HPLC 扫描分析, 根据洗脱时间对 Dextran T 系列标准品分子量常用对数作标准曲线, 分析得到该 EPS 的分子量约为  $1.1 \times 10^5$ D。

#### 1.2.2 EPS 单糖组成测定

准确称取 EPS 纯品干粉及单糖标准品岩藻糖、鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖各 4.9mg, 加入 200 $\mu$ l 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  静置, 添加 800 $\mu$ l 蒸馏水, 100℃ 恒温水解 2.5h, 冷却后定容至 2ml, 水解液以固体  $\text{BaCO}_3$  中和, 4000r/min 离心 10min 除去杂质, 将上清液稀释 10 倍并过滤后进行检测。

检测条件: 色谱仪为 DIONEX-2500 离子色谱仪; 色谱柱为 PA20 糖柱(4 $\mu$ m, 4.6  $\times$  250mm); 检测器为 SEDEX75 蒸发光散射检测器; 流动相为 10mmol/L NaOH 溶液; 工作参数: 常温、流速 0.4ml/min, 样品浓度 10 $\mu$ g/ml, 进样量 10 $\mu$ l, 进样间隔 10min。

#### 1.2.3 EPS 红外光谱测定

取 EPS 纯品干粉 1mg, KBr 压片, 400~4000 $\text{cm}^{-1}$  区间(NEXUS-470 FT-IR)进行红外扫描。

#### 1.2.4 EPS GC-MS 测定<sup>[3]</sup>

取 7mg EPS 纯品干粉真空干燥 1h, 加入 2ml DMSO, 超声溶解 2min, 快速加入 100mg 干燥 NaOH 粉末, 密封, 超声溶解 10min, 加入 0.8ml  $\text{CH}_3\text{I}$ , 室温, 避光, 搅拌反应 3h。加 2ml 蒸馏水中止反应, 氯仿萃取甲基化多糖(3  $\times$  3ml), 合并萃取液。用水洗涤氯仿层, 减压蒸干即得甲基化多糖。重复 3~5 次, IR 检测甲基化程度, 至甲基化完全。

在甲基化多糖中加入 1ml 2mol/L 三氟乙酸(TFA)溶液, 120℃ 水解 1h。浓缩水解液, 减压蒸干后得部分甲基化单糖。将上述单糖溶于 1ml 0.05mol/L NaOH 中,  $\text{NaBH}_4$  室温还原 1h。加入 50ml HAC 中和, 减压蒸干。在上述样品中加入无水吡啶和乙酸酐各 0.4ml, 100℃ 反应 1h, 减压蒸干后加入 0.1ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶解, 进行 GC-MS 分析。

检测条件: 色质联机为 Agilent 19091S-433 GC/HP-5MS; 色谱柱为 HP-5MS 色谱柱(0.25mm  $\times$  30m  $\times$  0.25 $\mu$ m); 流速为 1.0ml/min; 载气为  $\text{He}_2$ ; 进样口温度为 250℃; 离子源温度为 230℃; 色谱柱升温程序为 90℃  $\xrightarrow{10^\circ\text{C}/\text{min}}$  260℃。

#### 1.2.5 EPS 高碘酸氧化及史密斯降解<sup>[4]</sup>

将 10mg EPS 纯品干粉置于 25ml 容量瓶中, 加入 30mmol/L  $\text{NaIO}_4$  12.5ml, 定容, 使  $\text{NaIO}_4$  最终浓度为 15mmol/L。于 20℃ 下避光氧化, 按一定时间间隔取样(4、12、24、48、72、120、168、240、264h, 每次取样 200 $\mu$ l, 稀释 250 倍), 以蒸馏水为空白测定 223nm 处吸光度( $A_{223}$ ), 直到  $A_{223}$  恒定, 氧化反应完成。加 1ml 乙二醇终止反应, 高碘酸氧化结束。为避免发生超氧化反应, 溶液 pH 应控制在 3~5, 且须在低温、避光处进行操作。

取 2 ml 氧化液, 以溴甲酚紫作指示剂, 用 0.004734 mol/L (已用邻苯二甲酸氢钾标定) NaOH 滴定甲酸生成量。

以溴甲酚蓝为指示剂, 按表 1 所示过程进行操作, NaIO<sub>4</sub> 毫摩尔数为横坐标, 223 nm 处吸光度为纵坐标, 绘制 NaIO<sub>4</sub> 消耗量标准曲线。取 2 ml 氧化液, 测定其 A<sub>223</sub> 值, 对照标准曲线得出 NaIO<sub>4</sub> 实际消耗量。

表 1 高碘酸钠标准曲线的方案设计

Table 1 Design of stand curve of NaIO<sub>4</sub> concentration

管号	0	1	2	3	4	5
高碘酸钠(ml)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	4.0
蒸馏水(ml)	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	0
A <sub>223</sub>	各取 0.1 ml, 定容至 25 ml, 在 223 nm 处测定吸光度					

注: 高碘酸钠溶液浓度 30 mmol/L。

将乙二醇处理后的溶液透析 48 h, 浓缩后加入 NaBH<sub>4</sub> 还原过夜。用 50% 的 HAc 中和至 pH6~7, 透析 24 h。取 1/3 体积透析液浓缩, 真空干燥后进行 GC 分析, 剩余部分加入等体积的 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25℃ 水解 40 h, 用 BaCO<sub>3</sub> 中和至 pH6, 过滤, 滤液透析 48 h, 袋外透析液真空干燥后进行 GC 分析, 袋内部分用无水乙醇醇析, 6000 r/min 离心 10 min, 上层清液及沉淀干燥后分别进行 GC 分析。

乙酰化衍生处理: 将上述处理后 EPS 用 2 mol/L 三氟乙酸(TFA) 溶液, 120℃ 水解 1 h, 减压蒸干, 放入可密封试管中, 添加无水吡啶和乙酸酐各 400 μl, 封管后 100℃ 恒温反应 1 h, 旋转蒸发后用 100 μl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶解, GC 检测。

检测条件: 气谱仪为 Agilent 4890 气相色谱仪; 色谱柱为 HP-5 色谱柱 (0.53 mm × 15 m × 1.5 μm); 检测器为氢火焰离子(FID) 检测器; 载气为 He<sub>2</sub>; 色谱柱升温程序为 60℃  $\xrightarrow{15^\circ\text{C}/\text{min}}$  260℃; 进样口温度为 250℃; 检测器温度为 280℃; 其他参数: 流速 1 ml/min, 进样量 1 μl, 进样间隔 10 min。

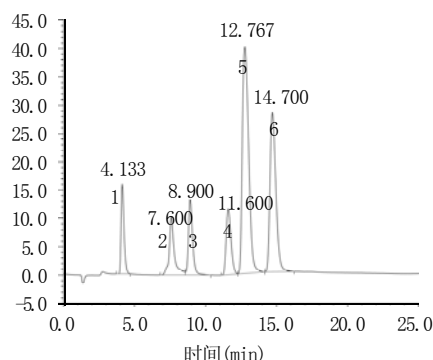
## 2 结果与分析

### 2.1 EPS 单糖组成测定

如图 1 和图 2 所示, EPS 单糖组成较为复杂, 主要含有木糖(Xyl)、半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glu)、阿拉伯糖(Ara), 除此之外, 还含有少量的鼠李糖(Rha)和岩藻糖(Fuc)。木糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖和岩藻糖绝对含量的摩尔比为 10.2:7.1:5.8:4.3:2.7:1.6。

### 2.2 EPS 红外光谱测定

由图 3 可知, EPS 的多糖特征吸收峰出现在 3426.7、2923.4、2923.4、1380.8、770.3 cm<sup>-1</sup>, 其中, 3600~3200 cm<sup>-1</sup> 处的一组宽峰是 O-H 伸缩振动, 吸收峰很强; 3400 cm<sup>-1</sup> 以下吸收峰表明 EPS 中存在分子间氢键; 3200~



1. 岩藻糖; 2. 鼠李糖; 3. 阿拉伯糖; 4. 半乳糖; 5. 葡萄糖; 6. 木糖。

图 1 单糖标样 IC 检测图谱

Fig.1 Chromatograms of standard monosacchrides on IC

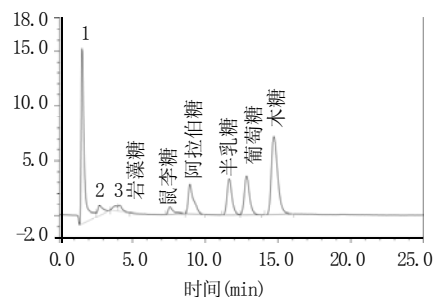


图 2 单糖 IC 检测图谱

Fig.2 Chromatograms of monosacchrides on IC

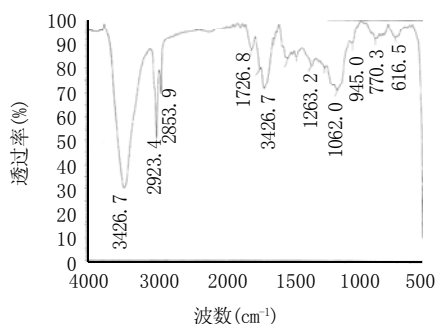


图 3 EPS 红外光谱图

Fig.3 IR spectra of EPS

2800 cm<sup>-1</sup> 为 C-H 伸缩振动区, 吸收峰较弱, 该区域两组吸收峰是糖类的特征峰; 1250~950 cm<sup>-1</sup> 出现的宽峰是吡喃糖环醚键和羟基的伸缩振动(1062.0 处也属于 -OH 伸缩振动区) [4]。

综合元素分析结果可知, EPS 在 1726.8、1662.4、1627.7、1445.8、1263.2 cm<sup>-1</sup> 处有吸收, 证明多糖中存在羧基, 与 EPS pH6.5 的理化性质相一致; 1550.5 处有吸收, 即部分羧基以羧酸盐的形式存在; 1161.0、1062.0、945.0 和 770.3 cm<sup>-1</sup> 为吡喃糖环特征吸收峰, 其中, 1161.0、945.0 cm<sup>-1</sup> 处存在环内醚振动吸收 [5]。

### 2.3 EPS GC-MS 测定

由图4和表2分析可知, EPS 中含有大量的D-葡萄糖和D-半乳糖, 二者比例大概为4:1, 其中D-半乳糖以4位连接为主, D-葡萄糖多为2, 3, 4, 6连接, 也有1, 2, 3, 4, 6连接, 由此推测, 该EPS 可能具有较为复杂的空间结构。

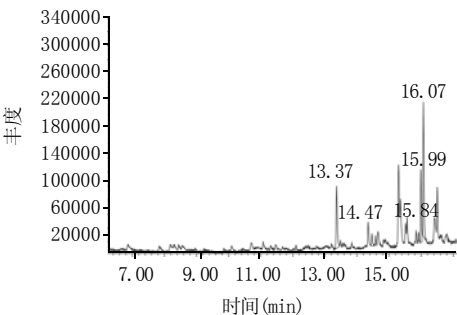


图4 EPS GC-MS 总离子流图谱  
Fig.4 Chromatogram of EPS on GC-MS total ion flow

2.4 EPS 高碘酸氧化及史密斯降解

高碘酸钠标准曲线见图5, EPS 高碘酸氧化过程中吸光度变化见表3。据图5及表3结果进行计算, 得到高碘酸总耗量(见表4)。平均1mol EPS 消耗高碘酸498.464mol, 若假设EPS 为均一葡聚糖, 则根据分子量计算可知, EPS 中至少含有632个糖苷键, 因此可初步断定该EPS 中含有大量不被高碘酸氧化的键型。

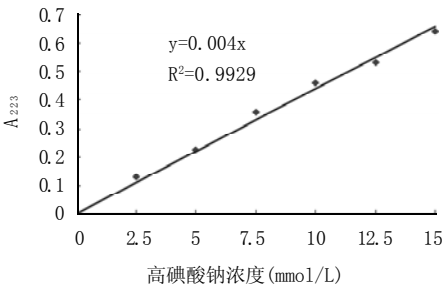


图5 高碘酸钠标准曲线  
Fig.5 Standard curve of NaIO<sub>4</sub> concentration

表3 EPS 高碘酸氧化过程中吸光度变化  
Table 3 Variety of absorbance of EPS in periodic oxidation

	0h	12h	24h	48h	72h	120h	168h	240h	264h
A <sub>223</sub>	0.665	0.632	0.618	0.602	0.593	0.591	0.585	0.588	0.588

对溶液进行NaOH 滴定发现, 溶液中不含有甲酸。

由表4和表5可知<sup>[6]</sup>: (1) EPS 高碘酸氧化后无甲酸生成, 说明其中不存在1→, 1→6键型, 端基残糖非1位连接; (2) Smith降解前未检出木糖、阿拉伯糖、鼠李糖和岩藻糖, 说明这些糖均为可氧化键型; 相反, 检出半乳糖和葡萄糖, 说明这两种糖中含有不被高碘酸氧化键型, 即1→3、1→2, 3、1→2, 4、1→3, 4、1→3, 6、1→2, 3, 4连接; (3) Smith降解后检出赤鲜醇, 说明有产赤鲜醇键型, 即1→4、1→4, 6连接; 检出甘油, 说明有产甘油键型, 即1→2、1→2, 6键型; (4) 袋内外清液均检出半乳糖和葡萄糖, 说明二者不被氧化的键型位于主链末端或支链上或是间隔排列在能被高碘酸氧化的键型之间; (5) 袋内无醇析沉淀说明主链被完全氧化, 或不被高碘酸氧化的键型非连续排列。

综合高碘酸氧化和Smith降解的分析结果可知, 该EPS 不含1→, 1→6键型, 含有1→4或1→4, 6以及1→2或1→2, 6连接, 主链不存在连续排列的不可氧化键型, 支链中可能具有不可氧化键型的葡萄糖和半乳糖, 其余单糖均以可氧化型连接存在。

表4 EPS 消耗高碘酸根及生成甲酸量的消长  
Table 4 Consumption of periodic acid and the formation of formic acid

反应时间(h)	EPS (×10 <sup>-5</sup> mmol)	高碘酸总耗量(mmol)	甲酸生成量(mmol)
264	8.787	0.0438	0.000

2.5 EPS 刚果红实验

双歧杆菌EPS 的刚果红实验曲线见图6。在浓度范围为0.00~0.40mol/L的NaOH溶液中, 刚果红+EPS 的最大吸收波长较刚果红有所升高, 证明EPS 可能具有螺

表2 EPS GC-MS 结果分析  
Table 2 Analysis of EPS on GC-MS

出峰编号	甲基化单糖	离子碎片	保留时间(min)	对应连接方式	匹配度
1	1, 5脱水-2, 3, 6-三甲基-4-乙酰-D-半乳糖醇	45, 74, 87, 97, 103, 117, 129, 143, 171, 203	13.367	4-连接-D-半乳糖	56.89
2	1, 5脱水-3, 4-二甲基-2, 6-二乙酰-D-葡萄糖醇	45, 71, 74, 84, 87, 99, 117, 124, 130, 143	14.464	2, 6-连接-D-葡萄糖	49.56
3	2-甲基-1, 3, 4, 6-四乙酰-D-葡萄糖醇	45, 73, 81, 98, 103, 109, 143, 157, 169, 186	15.841	1, 3, 4, 6-连接葡萄糖	53.77
4	1-甲基-2, 3, 4, 6-四乙酰-D-葡萄糖醇	45, 57, 98, 109, 115, 140, 157, 169, 200, 242	15.990	2, 3, 4, 6-连接-D-葡萄糖	61.59
5	2, 3, 4, 6-四乙酰-D-葡萄糖醇	45, 69, 74, 81, 87, 103, 115, 127, 145, 157, 169, 200, 243	16.070	2, 3, 4, 6-连接-D-葡萄糖	66.30

表5 高碘酸氧化及史密斯降解产物分析

Table 5 Analysis of products from periodic oxidation and Smith degradation

	木糖	半乳糖	葡萄糖	阿拉伯糖	鼠李糖	岩藻糖	甘油	赤藓醇
降解前清液	—	+	+	—	—	—	+	—
袋外清液	—	+	+	—	—	—	+	+
Smith降解								
袋内上清	—	+	+	—	—	—	+	—
袋内沉淀	—	—	—	—	—	—	—	—

注：+ 表示被检出；— 表示未被检出。

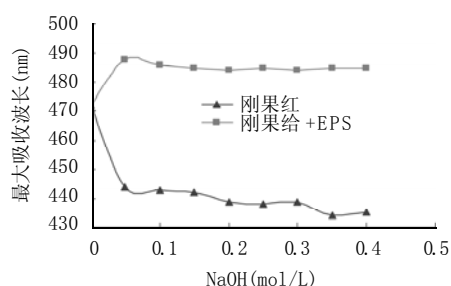


图6 EPS 对刚果红最大吸收波长的影响

Fig.6 Variety of maximum absorption wavelength of congo red by EPS

旋结构。

### 3 结论

由于大分子多糖的结构信息复杂，很难通过一两种检测方法获得较为完整的信息。衍生和降解大分子物质是近年来比较常用的分析多糖结构的辅助手法<sup>[7]</sup>，虽然糖的衍生化方法能提高EPS挥发性和热稳定性，但对于分子量较大的多糖来说，质谱法用于结构解析仍然具有一定的局限性，有些碎片不易检出，因此，只能得到部分组成信息，还须与其他结构分析手段联用。Gamian A等<sup>[8]</sup>采用FAB-MS分析从*Hafnia alvei*中得到的4个寡糖组分；Shen X等人<sup>[9]</sup>已将ESI-MS用于衍生化和非衍生化多糖的测定。ESI-MS易与HPLC、CE等技术联用，大大提高了工作效率以及灵敏度和精确度。

本实验通过酸水解-IC、IR扫描、GC-MS测定、高碘酸氧化与史密斯降解等手段对双歧杆菌22-5 EPS的一级结构分析，证明该EPS由木糖、半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖和岩藻糖6种单糖组成，其单糖摩尔

比依次为10.2 : 7.1 : 5.8 : 4.3 : 2.7 : 1.6。红外检测发现，该EPS含有羧基并部分成盐，以吡喃糖环为主，并且存在环内醚结构；GC-MS结果显示，EPS中含有大量的D-葡萄糖和D-半乳糖，其中D-半乳糖以4位连接为主，葡萄糖多为2, 3, 4, 6连接；EPS高碘酸氧化和史密斯降解后产物经GC测定发现，其不含1→，1→6键型，可能含有1→4、1→4, 6和1→2、1→2, 6连接，主链中不存在连续排列的不可氧化键型，支链中可能含有不可氧化键型的葡萄糖和半乳糖，其余单糖均以可氧化型连接存在。可见，该EPS为一种组成较为复杂的杂多糖。

具有螺旋构象的多糖与刚果红可形成络合物，其结合部位主要存在于单股螺旋部分，络合物的最大吸收波长较刚果红向长波偏移。研究表明，许多β-1, 3-葡聚糖具有三股螺旋结构，可与刚果红可发生颜色反应。刚果红实验中，刚果红+EPS的最大吸收波长较刚果红的最大吸收波长升高，结合前面研究结果推测，该EPS可能具有螺旋结构。

虽然张翼仲认为非β-1, 3-葡聚糖或其它多糖不能发生此颜色反应<sup>[10]</sup>，但也有研究报道α-构型的多糖能与刚果红发生颜色反应，因此，要确定EPS是否具有螺旋结构，还需借助X-射线衍射或圆二色谱检测的方法进行更为深入的研究。

### 参考文献：

- [1] 高小荣, 刘培勋. 多糖结构分析研究进展[J]. 天津药学, 2003, 15(6): 67-70.
- [2] 欧阳清波, 李平兰, 李伟欣, 等. 双歧杆菌22-5胞外多糖(EPS)的分离、纯化及纯度鉴定[J]. 食品工业与发酵, 2005, 31(6): 127-130.
- [3] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [4] FEDONENKO Y P, KONNOVA O N, ZATONSKY G V, et al. Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1[J]. Carbohydrate Research, 2004, 339: 1813-1816.
- [5] 郭振楚. 糖类化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 106-180.
- [6] 刘东波, 张丽萍. 玉米芯酸提水溶性多糖CCCp的分离纯化和结构研究[J]. 分子科学学报, 2005, 21(2): 50-54.
- [7] 邓成华. 虎奶多糖及其衍生物的结构和生物活性研究[D]. 武汉: 华中理工大学, 2000.
- [8] GAMIAN A, ULRICH J, DEFAYE J, et al. Structural heterogeneity of the sialic-acid-containing oligosaccharides from the lipopolysaccharide of *Hafnia alvei* strain 2 as detected by FAB-MS studies[J]. Carbohydr Res, 1998, 314: 201-209.
- [9] SHEN X, PERREAU T. Electrospray ionization mass spectrometry of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives of neutral and N-acetyl-lated oligosaccharides[J]. J Mass Spectrom, 1999, 34: 502-510.
- [10] 张丽萍, 张翼仲. 金顶侧耳多糖及其化学修饰产物水溶液构象的圆二色谱法测定[J]. 生物化学杂志, 1994, 10(5): 633-635.