



华夏英才基金学术文库

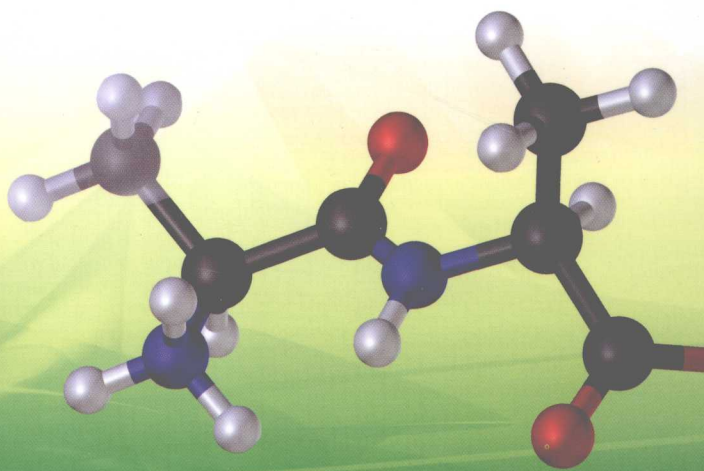
海藻糖

21世纪的新型糖类

Trehalose

a Novel Sugar in the New Century

黄日波 主编 蒙健宗 陈宇 副主编



化学工业出版社



华夏英才基金学术文库

目录 (CONTENTS)

第一章 海藻糖的发现与命名 1

第二章 海藻糖的结构 2

第三章 海藻糖的性质 3

第四章 海藻糖的生理功能 4

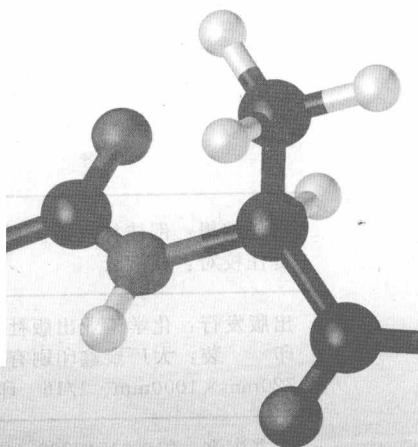
海藻糖

21世纪的新型糖类

Trehalose

a Novel Sugar in the New Century

黄日波 主编 蒙健宗 陈宇 副主编



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

海藻糖: 21 世纪的新型糖类/黄日波主编. —北京: 化学工业出版社, 2009. 5

ISBN 978-7-122-04962-9

I. 海… II. 黄… III. 海藻-食糖-基本知识 IV. TS245.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 027126 号

责任编辑: 邵桂林 孟 嘉
责任校对: 顾淑云

装帧设计: 韩 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 14 字数 292 千字 2010 年 4 月北京第 1 版第 1 次印刷

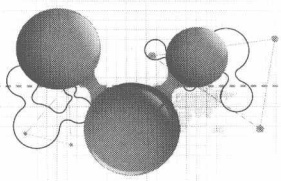
购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 49.00 元

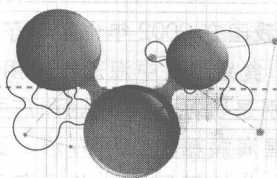
版权所有 违者必究



序

人们早已知道，海藻糖最重要的生物学功能是对生物体具有优良的抗逆保护作用，这种作用是熊虫等隐生生物在高温脱水、低温冷冻等恶劣环境条件下仍然能够保持生命状态的重要因素。尽管海藻糖抗逆保护作用的机理仍有待阐明，但海藻糖以优良的抗干燥、抗高温、抗冷冻特性，已经成为疫苗、蛋白质药物、酶、活体组织和细胞的生物活性保存的重要保护剂。海藻糖对酸和热的高度稳定性、防止淀粉老化和蛋白质变性、抑制脂肪酸败、矫味矫臭功能、高玻璃化转变温度、低吸湿性、低甜度、非致龋性等特性，也使人们对海藻糖在加工食品中保持食品新鲜风味的功能具有很高的期待。因此，海藻糖的大规模制造方法受到广泛关注，世界各国的许多机构和科研人员均开展了大量的研究，先后发展了天然生物提取法、微生物发酵法、转基因植物法等生产方法。黄日波教授从1993年开始开发微生物发酵法生产海藻糖技术，随后又紧跟国际潮流，开展酶转化法生产技术的研发，在本世纪的头一年取得了重大突破，进而于2002年在我国首次实现了酶法海藻糖的产业化。更为重要的是，在海藻糖合成酶的分子改造过程中，黄日波教授创造性地提出了蛋白质半理性设计的思路，为今后工业酶的分子改造提供了另一种可选择的方法。在本书中也以海藻糖合成酶为例，对蛋白质的分子进化的理论和实践进行了探讨，相信会对从事该领域工作的读者有所裨益。此外，本书对海藻糖在生物制剂、化妆品、食品中的应用方法作了详细的介绍，对广泛的应用开发技术人员乃至普通消费者都具有指导和借鉴意义。

(中国工程院院士、南京工业大学校长 欧阳平凯)



前言

海藻糖是一种安全、稳定的天然糖类，在自然界中许多可食用动植物及微生物体内都广泛存在，如人们日常食用的蘑菇类、蜂蜜、海藻类、酵母发酵食品中都含有含量较高的海藻糖，有些甚至含有占干重高达 20% 的海藻糖。海藻糖是由两个葡萄糖分子以 $\alpha, \alpha-1, 1$ -糖苷键构成的非还原性糖，自身性质非常稳定。海藻糖最令人称奇的生物学功能是优良的抗逆保护作用，许多在逆性环境如干燥脱水、高温、冷冻、高渗等状态下表现出非凡耐受力的生物物种，都与它们体内合成、积累大量海藻糖有直接的关系。如生活在峭壁岩石中的卷柏，干旱缺水时，它的枝叶枯萎、蜷缩起来，进入了“假死”状态，当得到雨水滋润时，它就大量吸水，枝叶舒展，又“复活”过来；中国东北的林蛙，冬季严寒下会被冻成一枝蛙形冰棍，但第二年春天到来，气温回升，林蛙身体解冻，心脏恢复跳动，又变得活泼异常。海藻糖在自然界中扮演了如此重要的角色，人们毫不吝惜地将它赞誉为 21 世纪的“生命之糖”、“梦幻之糖”、“神奇之糖”。海藻糖通过保护生物膜、蛋白质等大分子不被变性失活，来维持生命体的生命过程和生物特征。外源性的海藻糖对生物体和生物膜、蛋白质等大分子同样具有突出的保护作用，使得海藻糖可作为生物和医学领域的活性大分子的优良保护剂，代替过去常用的血浆白蛋白作为疫苗、蛋白质药物、活菌制剂、血液制品、淋巴细胞、活体组织等生物活性物质的稳定剂。海藻糖独特的功能特性还能在食品加工领域大显身手，如对酸和热的高度稳定性、防止淀粉老化和蛋白质变性、抑制脂肪酸败、矫味矫臭功能、高玻璃化转变温度、低吸湿性、低甜度、非致龋性等。近年来还在动物试验中发现了海藻糖具有防治骨质疏松症、亨廷顿舞蹈症等作用，进一步扩展了海藻糖的应用范围。

1990 年意大利的 Lama 等人在世界上首次发现来自嗜热菌——硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 的酶能够以淀粉为出发原料，在较高反应温度下直接转化生成海藻糖，宣告了酶转化法大规模制造海藻糖时代的到来。1995 年，日本率先推出了酶法海藻糖产品，自此，海藻糖不仅在医药卫生、化妆品和美容行业，而且在食品业的大规模应用也成为现实。到 2006 年，全世界海藻糖已有 3 万吨以上的年生产量和消费量。在海藻糖主要生产和消费国日本，添加海藻糖的食品已经达到了 6000 多种，几乎涵盖了整个食品领域，海

藻糖已进入了千家万户。我国在 2002 年也实现了酶法生产海藻糖的产业化，引发了生物制剂、化妆品、食品加工中海藻糖应用的热潮。

为了使社会各界，特别是食品加工企业和广大消费者更好地了解海藻糖的特性和功用，更好地掌握海藻糖的应用方法，长期从事海藻糖生产和应用研究的黄日波教授研究组，总结了国内外关于海藻糖生产和应用的资料，编写成书，包括海藻糖的结构、性质和功能，海藻糖的生产方法，海藻糖的应用三章，供广大读者参阅，希望对从事海藻糖生产、应用研究的技术人员及广大消费者能有所帮助。

参与编写本书的作者，都在广西大学生命科学与技术学院工作和学习过，都先后参与海藻糖的发酵法、酶法生产技术研究和应用研究，具有丰富的理论知识和实践经验。这些作者是：

黄日波 广西大学，广西科学院

蒙健宗 广西大学

陈 宇 广西大学

齐向辉 江苏大学

韦旭钦 南宁中诺生物工程有限责任公司

李昭华 中国科学院生物物理研究所

朱绮霞 广西科学院

周礼圆 广西壮族自治区人民医院

张云光 南宁中诺生物工程有限责任公司

马少敏 南宁中诺生物工程有限责任公司

陈发忠 南宁中诺生物工程有限责任公司

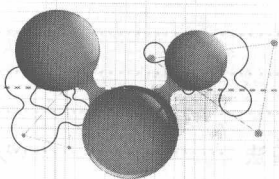
韦 航 广西大学

全书的插图由王荣辉绘制。衷心感谢以上作者为本书付出的辛勤劳动。

由于本书编写时间有限，难免有不足之处，请广大读者批评指正。

黄日波

2009 年 12 月



目 录

第 1 章 海藻糖的结构、性质和功能	1
1.1 海藻糖的发现	1
1.2 海藻糖在自然界的分布和含量	3
1.3 海藻糖的化学结构	4
1.4 海藻糖的一般性质	5
1.5 海藻糖的分析方法	6
1.5.1 蒽酮比色法	7
1.5.2 纸层析法	7
1.5.3 薄层层析法	8
1.5.4 DNS 比色法	8
1.5.5 高效液相色谱 (HPLC) 法	9
1.6 海藻糖的生物学功能	12
1.6.1 作为生物体的结构组分	12
1.6.2 作为贮存碳源和提供能量的物质	13
1.6.3 作为逆性环境下起重要保护作用的应激代谢物	13
1.7 海藻糖的抗逆保护作用机理	16
1.8 海藻糖的应用前景	20
1.9 海藻糖的耐受性和安全性	21
1.9.1 海藻糖的消化吸收和耐受性	21
1.9.2 海藻糖的安全性	23
参考文献	28
第 2 章 海藻糖的生产方法	31
2.1 天然生物提取法	31
2.2 微生物发酵法	33
2.3 化学合成法	34
2.4 基因工程法	34

2.5 酶转化法	35
2.5.1 磷酸化酶法	35
2.5.2 双酶法	37
2.5.3 海藻糖合成酶法	47
2.6 新型海藻糖合成酶的发现和酶分子改造	55
2.6.1 新型海藻糖合成酶基因克隆和新酶鉴定	55
2.6.2 海藻糖合成酶的分子改造	62
2.7 海藻糖的质量标准	69
参考文献	71
第3章 海藻糖的应用	74
3.1 海藻糖在医药领域的应用	74
3.1.1 治疗用途	74
3.1.2 生物活性保护剂	90
3.1.3 其他辅料用途	105
3.2 海藻糖在化妆品领域的应用	109
3.2.1 海藻糖在化妆品中的功效	109
3.2.2 海藻糖在化妆品中的应用	116
3.3 海藻糖在食品加工领域的应用	118
3.3.1 低甜度	121
3.3.2 低吸湿性和保水性	131
3.3.3 防止褐变反应	135
3.3.4 高玻璃化转变温度	142
3.3.5 防止淀粉老化	146
3.3.6 防止蛋白质变性	169
3.3.7 矫味作用	177
3.3.8 海藻糖保持蔬菜、肉类的组织稳定和保鲜作用	181
3.3.9 抑制脂质氧化变质	187
3.3.10 持久稳定的能量来源	189
3.3.11 海藻糖在家庭中的使用方法	191
3.4 海藻糖在农业领域的应用	196
参考文献	198
附录	205

第1章

海藻糖的结构、性质和功能

1.1 海藻糖的发现

海藻糖 (trehalose), 旧称茧蜜糖、漏芦糖、蘑菇糖 (菌糖、蕈糖, mycose)。海藻糖这一化合物公认是首先由 Wiggers 在 1832 年发现的, 他在研究黑麦的麦角菌 (ergot) 时, 让溶液静置一段时间之后, 发现在容器壁上形成一些无色、略带甜味、无还原性的晶体, 并认为这是一种新的糖的结晶体, 当时 Wiggers 称它为 muttrkornzucker, 意思是麦角糖 (ergot suger), 但 Wiggers 没有做进一步的研究。1858 年 Mitscherlich 在蘑菇抽提物中分离到一种非还原性二糖, 并命名为蘑菇糖 (mycose); 同年, Berthelot 从中东得到一些茎虫蛹壳, 这是各种昆虫留在树叶上的分泌液, 干燥后可以作为甜味剂, 从中提取出的虫茧蜜 (trehala manna) 中, 也分离到一种非还原性二糖, 将其命名为茧蜜糖 (trehalique glucose, trehalose), 海藻糖的英文名称 trehalose 就来源于这种伊拉克沙漠的 “trehala manna”。Berthelot 对茧蜜糖的理化性质作了详细研究, 认识到茧蜜糖 (trehalose) 和蘑菇糖 (mycose) 性质非常相似; 而 Muntz 认为两者就是同一种物质; Leiboeitz 也发现这种黏稠的虫茧蜜, 其干重的 30%~45% 是茧蜜糖。也有人认为海藻糖的英文名称来源于圣经, 在《旧约全书》中的《出埃及记》里记载, 先知摩西带领其族人出走埃及到以色列的四十年的旅途中, 就是靠摩西乞求上帝耶和华赐予他们的食物来度过饥荒。这种食物是一些长在荒野上的无叶植物的甘露 (trehala manna), 含有大量海藻糖, 它类似面包, 有蜜的甜味, 至今仍长在以色列的土地上。后来发现, 茧蜜糖 (trehalose) 广泛存在于各种海藻和地衣中, 所以中文又称之为海藻糖。

人们对海藻糖的兴趣起初来源于自然界中的隐生生物现象。自然界中存在着一类隐生生物 (cryptobiotic hiddenlife), 这类生物在极端干燥的条件下能脱去体内 99% 的水分, 并维持数年乃至数十年以上而不死亡, 处在生理学上的假死状态, 一旦条件适宜它们又可复活。蘑菇、干酵母、缓步类动物和卷柏植物等都是典型的隐生生物。科学家们对这些隐生生物的研究表明, 这种假死后复活现象与其体内存在高浓度的海藻糖密切相关。大量的研究表明, 许多生物物种在胁迫环境下, 如饥饿、高温、冷冻、干燥、高渗透压、辐射、有毒物质等环境, 表现出的非凡抗逆耐

受力与体内的海藻糖含量有直接的关系。

最常见的例子是家庭中发面用的干酵母粉，在加水几分钟后干酵母细胞即可复活，并能利用面粉中的物质进行代谢活动进行发面。这些酵母菌在脱去细胞内90%水分成为干酵母时，细胞并没有因脱水而失去生命力，复水后仍能继续生长繁殖。在长期饥饿条件下，酵母的存活率依赖于细胞内海藻糖的含量。

新西兰著名昆虫学家 kleinpaste 在搜寻世界上最顽强的生存者过程中曾得出结论：世界上生命力最顽强的动物非常非常小，它就是缓步类动物，如轮虫、熊虫和线虫等。之所以得出这样的结论，是人们发现了熊虫和轮虫等具有耐高温、抗严寒、抗辐射的特殊本领。1827年，英国科研人员在非洲采回两只轮虫蛆（一种缓步类动物）制成标本，放在干燥的盒子里。到了1950年的一天，大英博物馆的一位工作人员在搬运这个标本盒时，无意中把清洁用水洒到标本上，不料两只轮虫蛆竟慢慢地蠕动起来。干燥的昆虫标本竟然能复活，一时成了英国报刊的特大新闻。熊虫这种只有在显微镜下才能观察到的无脊椎动物（0.1~1.2mm长），一般在潮湿的环境下生活，淡水、湿土、树干、岩山以及水分充足的青苔和地衣，都是它们栖身的所在。一旦水分不够，熊虫则脱水进入隐生状态。20世纪20年代，德国佛莱堡大学的科学家把处在隐生状态的熊虫分别放在150℃和-200℃的环境达数分钟，结果发现不论是哪种情况下，只要恢复常温并给予水分，熊虫就会再度开始缓慢地步行。熊虫亦能承受57万伦琴的X射线，也就是说，熊虫的抗辐射能力是人类的千倍之多。日本神奈川大学的科学家也曾试验，将进入隐生状态的熊虫放进密封的容器里，再将该容器放入盛满水的高压水箱中，逐渐地将压力提到600MPa，相当于最深的马里亚纳海沟的水压的6倍，是绝大多数生物、包括细菌所能承受的压力极限的两倍。就这样，那些参加试验的熊虫绝大部分都安然无恙，经受住了这种对许多动物来说简直不可想象的考验。脱水的动物如何能把生命隐藏起来而不死亡呢？科学家发现，熊虫进入隐生状态的脱水过程进行得非常缓慢，首先熊虫会把身体卷成桶形，将容易失水的表皮层隐藏起来，缩小水分蒸发的面积从而放慢脱水的速度。正是缓慢的脱水过程将使熊虫有机会重新整理身体内部的结构，以便制造大量的碳水化合物，特别是甘油和海藻糖等保护物质。甘油和海藻糖可以取代水，紧紧黏附在生命的基本物质核酸和蛋白质上，海藻糖还能保护细胞膜，使细胞在脱水时免遭破坏。熊虫可将体内含水量降至2%以下，以休眠状态存在，此休眠期可长达10年以上，期间熊虫遇到水分充足时，数分钟内便可吸水恢复行动，开始摄食。

卷柏是一种矮小的蕨类植物，可做药用草药，其枝叶很像柏树，生在怪石嶙峋的岩石缝中，干旱无水时会卷曲、枯萎蜷缩成一团，看似毫无生机。但只要有雨露滋润，就会重新伸展枝叶，恢复成满眼的翠绿，外观上和正常植株难以区分。人们发现干枯的卷柏草药保存几年后再放入水中时，干枯的卷柏还可“复活”。因此，它又有九死还魂草、万年青、长生草等美名。对这种植物的糖代谢进行的研究表明，在生长期的卷柏中存在两种主要的糖类——蔗糖和海藻糖，约占干重的14%，其中海藻糖是主要成分，占其中的90%。

轮虫、熊虫和卷柏之所以能在看似干枯死亡的情况下长期存活，这同其他隐生生物一样，是海藻糖帮助有机体在假死状态下生存的结果。

20 世纪 80 年代末期，一组英国生物学家到非洲的撒哈拉沙漠进行科学考察，将一簇完全干枯、一点即燃的灌木取来热咖啡。次年该小组又重回故地，却惊奇地发现，上次未拔完的枯死灌木竟然长出幼嫩的小枝。好奇的英国人将其带回英国研究，结果发现这种灌木的组分与其他植物的大同小异，但海藻糖的含量异常的高。

一些蛙类等生物能在严寒条件下生存，重要的原因也在于其体内海藻糖对细胞的保护作用。中国东北森林中的林蛙（哈士蟆，*Rana chensinensis*），冬季严寒下会被冻成一枝蛙形冰棍。当第二年春天到来，气温回升，林蛙身体解冻，心脏恢复跳动，它弹动四肢，又活泼异常了。加拿大动物学家研究发现，林蛙冻不死的奥妙，关键也在于体内存在大量的海藻糖，使严寒时只是细胞外的水分结冰，而细胞内的水分却很少冻结。

许多研究发现，存在于细胞浆内的海藻糖含量会依外界环境的变化而不同，当细胞处于饥饿、干燥、高温、高渗透压及有毒物质等胁迫环境时，细胞内海藻糖含量迅速上升。由此认为，海藻糖是细胞中典型的一种应激代谢物。隐生生物能在干燥或冷冻条件下生存下来，被认为是在冻结、干燥、高渗透压等严酷的环境下产生的海藻糖，对细胞膜、蛋白质和 DNA 等发挥了应激保护功效。海藻糖在自然界中扮演了如此重要的角色，人们毫不吝惜赞誉之词。如英国著名的《自然》，在 2000 年 7 月发表了对海藻糖进行评价的专文，文中提到，“对许多生命体而言，海藻糖的有与无，意味着生命或者死亡（For some organisms, it is the difference between life and death）”。

1.2 海藻糖在自然界的分布和含量

过去相当长时间内人们一直认为海藻糖是一种稀有的糖类，因为它只能从一些隐生生物和虫茧蜜中提取到相对多的量，而这两种来源本身在自然界中就十分稀少。有人推论，如果海藻糖存在于蘑菇等高等真菌中，它也可能存在于较低等的生物中。这一推论直到 1929 年在酵母菌提取液中观察到海藻糖结晶才得以证实。随后发现在自然界的微生物中广泛存在，动植物中包括海藻和其他藻类植物、一些维管植物、无脊椎动物等也发现有海藻糖的存在。Elbein 总结了各种生物中海藻糖的含量分布，指出近百余种植物、藻类、真菌、酵母、细菌和无脊椎动物如虾、昆虫、线虫等中都含有一定量的海藻糖。特别是在酵母、霉菌等真菌中，含量可高达生物体干重的 20% 以上。许多蕨类植物如 *Selaginella epidophylla*, *Botrychium lunaria* 等中可分离到海藻糖；大多数维管植物中海藻糖的含量非常低，仅在 *Apicaccac* 几个种的成熟果实中存在；一些抗旱性被子植物如 *Myrothamnus flabeliifolius* 的叶片中也发现海藻糖的存在；在高等植物中只发现一种称为“复活树（*Selaginella lapidophylla*）”的树木中存在有海藻糖。植物体中海藻糖的含量低的原因可能是海藻糖酶的存在，有实验使用海藻糖酶的抑制剂有效素 A（validamycin A）后发现植物体内海藻糖的积累量增加。在动物界，海藻糖首先在昆虫的血液、淋巴

组织，以及昆虫的蛹和幼虫中发现；线虫 *Ascaris lumbricoides* 的虫卵中海藻糖含量高达 8%（干重）。高等动物中没有发现有海藻糖的存在，而在哺乳动物的肠腔和肾脏等器官中发现存在专一性水解海藻糖的海藻糖酶。

人们日常食用的很多食物中海藻糖含量很丰富，如蜂蜜（0.1%~1.9%）、米林酒（1.3%~2.2%）、雪利酒（10~391mg/L）、啤酒酵母（0.01%~5.0%）、面包酵母（15%~20%）和蘑菇（8%~17%）等，人们日常食用的一些食品中海藻糖的含量如表 1-1 所示。

表 1-1 日常食品中海藻糖的含量（干重）

食品种类	糖类	海藻糖
面包	6.3%	0.12%
干酵母	13.2%	11.6%
香菇	24.5%	11.5%
灵芝	22.0%	10.4%
蘑菇	23.0%	10.0%
滑菇	25.5%	23.0%
日本米酒	3.4%	67mg/kg
啤酒	1.6%	240mg/kg
红葡萄酒	0.16%	44mg/kg
白葡萄酒	1.8%	72mg/kg
酒糟	10.8%	0.37%
大豆	11.5%	110mg/kg
黄豆芽	0.54%	5.4mg/kg
纳豆	4.9%	150mg/kg
裙带菜	3.5%	<0.1mg/kg
海带	4.9%	<0.1mg/kg
羊栖菜	2.7%	0.27%
斑节虾	0.95%	0.47%
蜂蜜	79%	<5mg/kg

1.3 海藻糖的化学结构

1930 年 Brederick 首先采用化学方法论证了海藻糖的化学结构，它是由两个吡喃型葡萄糖单体以 $\alpha, \alpha\text{-}1,1\text{-}$ 糖苷键连结而成的双糖，化学名称为 $\alpha\text{-D}$ -吡喃葡萄糖基- $\alpha\text{-D}$ -吡喃葡萄糖苷（ $\alpha\text{-D-glucopyranosyl-}\alpha\text{-D-glucopyranoside}$ ），分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，分子结构的 Haworth 式如图 1-1 所示。

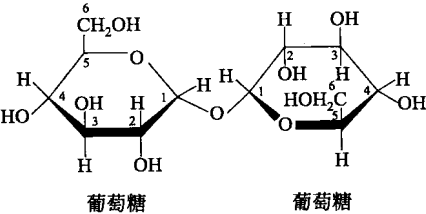
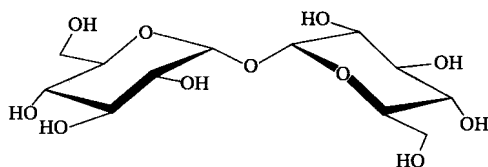


图 1-1 海藻糖分子的 Haworth 式

利用核磁共振技术对海藻糖化学结构的研究表明，海藻糖分子存在一种简单的双折轴对称结构，在水溶液中，两个椅式构象的葡萄糖分子通过糖苷键的氧原子形成对称的空间结构，如图 1-2 所示。

图 1-2 α,α -海藻糖的对称结构

由于这种对称，两个相同的吡喃葡萄糖基不仅在物理上相互平衡，而且其化学活泼性也难以区别。海藻糖是由两个相同的吡喃葡萄糖基通过它们的环状半缩醛羟基连接而成，因此理论上存在有三种空间同分异构体，即 α,α -海藻糖 (α,α -1,1-键)、 α,β -海藻糖 (α,β -1,1-键，又名新海藻糖，neotrehalose) 和 β,β -海藻糖 (β,β -1,1-键，又名异海藻糖，isotrehalose)。其中只有 α,α -海藻糖在自然界中以游离状态存在，即通常所说的海藻糖。新海藻糖和异海藻糖在自然界中很少存在，仅在蜂蜜、蜂王浆和魏浸出汁中发现有少量新海藻糖，在淀粉生产葡萄糖的废糖蜜中含有异海藻糖，利用化学合成也可以得到新海藻糖和异海藻糖。

实际上，由两个吡喃葡萄糖基以 α -糖苷键连结而成的双糖有五种，分别为海藻糖 (α -1,1-糖苷键)、曲二糖 (α -1,2-糖苷键)、黑曲二糖 (α -1,3-糖苷键)、麦芽糖 (α -1,4-糖苷键) 和异麦芽糖 (α -1,6-糖苷键)。这五种双糖中只有海藻糖分子结构对称，无半缩醛基，既无还原性也无变旋光性。海藻糖的 α,α -1,1-糖苷键具有远低于其他糖苷键的能量，如另一种非还原性双糖蔗糖的糖苷键具有 27kcal/mol 的能量，而海藻糖的 α,α -1,1-糖苷键仅具有 1kcal/mol 能量，因此海藻糖不易被水解，即使在 pH3.5 的酸性条件下，于 100℃ 加热 24 小时，海藻糖仍可保存 99% 以上。这种特殊的分子结构赋予了海藻糖分子极强的稳定性，是天然二糖中最稳定的分子，也是海藻糖具有奇异的生物学功能的分子基础。

1.4 海藻糖的一般性质

目前使用的商品海藻糖，有含二分子结晶水的结晶海藻糖 (CAS 6138—23—4) 和不含结晶水的无水海藻糖 (CAS 99—20—7)，其一般性质如下。

(1) 密度 结晶海藻糖 1.512g/cm³。

(2) 熔点 结晶海藻糖 97℃，于 130℃ 失水；无水海藻糖 210.5℃。

(3) 溶解热 结晶海藻糖 57.8kJ/mol，无水海藻糖 53.4kJ/mol。

(4) 旋光度 $[\alpha]_D^{20} +199^\circ$ (5% 水溶液)。

(5) 溶解度 海藻糖易溶于水、热乙醇、冰醋酸，不溶于乙醚、丙酮。海藻糖在水中的溶解度随温度变化较为明显，如表 1-2 所示。

表 1-2 海藻糖的溶解度

温度/℃	10	20	30	40	50	60	70	80	90
溶解度/(g/100g)	55.3	66.9	86.3	109.1	140.1	184.1	251.4	365.9	602.9
饱和浓度/%	35.6	40.8	46.3	52.2	58.3	64.8	71.5	78.5	85.8

(6) 渗透压 海藻糖的渗透压与麦芽糖的渗透压相近，如表 1-3 所示。

表 1-3 海藻糖的渗透压/mosm/kg

浓度/%	5	10	20	30
海藻糖	193	298	690	1229
麦芽糖	195	299	676	1221

(7) 吸湿性 结晶海藻糖在相对湿度 92%以下时无吸湿性；无水海藻糖在相对湿度 35%~75%时具有吸湿性，在相对湿度 75%~92%时含水量保持稳定。

(8) 黏度 海藻糖具有相对低的黏度，25℃时，40%的海藻糖溶液黏度也不高于 5.7 厘泊（cP）。海藻糖溶液的黏度变化如图 1-3 所示。

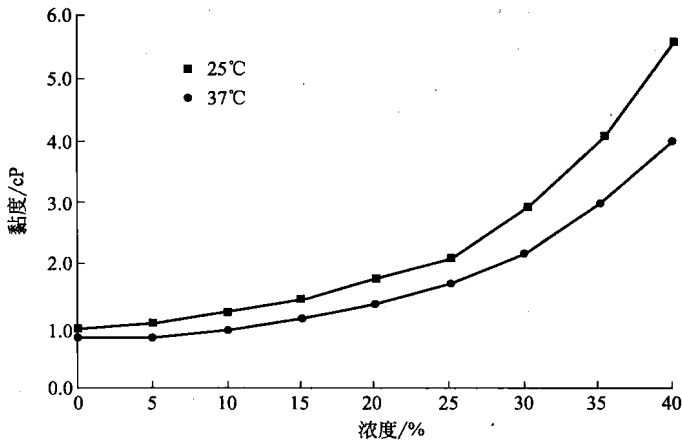


图 1-3 海藻糖的黏度

(9) 玻璃化转变温度 海藻糖具有双糖中最高的玻璃化转变温度，115℃。

(10) 水溶液的 pH 稳定性 >99% (pH3.5, 100℃, 24h)。

(11) 水溶液的热稳定性 >99% (120℃90min)。

(12) 美拉德 (Maillard) 反应 和甘氨酸 100℃反应 90min，不呈色；和聚蛋白胨 120℃反应 90min，不呈色。

(13) 甜度 相当于蔗糖的 45%。

(14) 消化性 经口摄取可在小肠中消化吸收。

1.5 海藻糖的分析方法

用于海藻糖定量分析的方法有许多种，如蒽酮比色法、DNS 比色法、纸层析法、薄层层析法、高效液相色谱法等。由于海藻糖主要是从酵母等含量丰富的微生物中提取，以及利用酶法由淀粉或淀粉水解物转化而制备，生产过程的中间产物和制成品中除了海藻糖以外，还含有不同含量的其他糖类，如麦芽糖、葡萄糖、寡糖等，海藻糖的定量分析往往是分离和分析过程的结合。可以根据分析样品中含有的

各种糖成分的复杂程度和含量多寡，选择合适的定量分析方法。

1.5.1 蒽酮比色法

蒽酮比色法是目前常用的定糖方法，其原理是糖类（包括多糖）在硫酸作用下，脱水生成糠醛或羟甲基糠醛，然后蒽酮与糠醛或羟甲基糠醛经脱水缩合，产生蓝绿色糠醛衍生物，颜色的深浅即可作为定量的依据。但这种方法是非特异性的，会受到其他可与蒽酮试剂反应的物质的干扰，如糖原、葡萄糖等。如果选择了合适的提取方法，可以得到比较单一的含海藻糖的组分，就可以用蒽酮比色法。值得注意的还有，尽管蒽酮方法很便宜，但可能由于有干扰物存在的关系，往往测得的值偏大，不宜用于制成品的含量分析，常常作为层析分离之后的定量方法用在筛选等常规步骤中。

1.5.2 纸层析法

纸层析是一种古老的分析手段，但目前仍在生物化学特别是在糖类的分析中广泛应用。建立纸层析分析方法的关键是选择合适的展开剂和显色剂。国外文献推荐了六种可用于海藻糖分析的展开剂，它们是：正丁醇：醋酸：水=4：1：2（体积比，下同），正丁醇：乙醇：丙酮：水=5：4：3：2，醋酸乙酯：甲酸：醋酸：水=30：7.5：7.5：5，正丁醇：醋酸：水=5：1：2，正丁醇：甲酸：水=75：15：10，酚水的上层饱和液。为了用纸层析酵母提取液中的糖类物质，将海藻糖、糖原和葡萄糖分开，有研究者改进了展开剂系统和显色剂。采用的展开剂是正丁醇：丙酮：水：醋酸=10：6：6：2，海藻糖在此展开剂中的 R_f 值为 0.25。改进的显色剂由 A 液和 B 液组成，A 液：AgNO₃ 的水-丙酮饱和溶液（水：丙酮=1：20），B 液：将 1g NaOH 晶体溶于 100g 乙醇水溶液中（乙醇：水=1：1）。

纸层析进行海藻糖定性定量分析的方法如下。

（1）配制标准品溶液 将海藻糖标准品配成浓度为 10mg/ml 的水溶液。

（2）在长 25cm，宽 3cm 的层析滤纸条上，于起始线（起始线距滤纸末端 5cm）上分别用海藻糖标准品和提取液相距 1cm 点样，点样量为 10~100 μ g，斑点直径不得超过 5mm，越小越好。点样吹干后，置于含有展开剂的层析缸中饱和数分钟，然后在室温下上行展开到距起始线 18cm 的前沿线上。取出层析滤纸自然风干后，先在滤纸条上均匀喷上显色剂 A 液，晾干后再均匀喷上显色剂 B 液，并将滤纸条于暗处放置 10min，棕黄色的底色上就会显示出棕黑色的糖斑点。如样品中有与海藻糖标准品 R_f 值相同的斑点，表明样品有海藻糖成分。

（3）纸层析定量分析海藻糖时，将风干后的滤纸条从中间剪开，带标准品参照点的一半喷雾显色，以确定海藻糖斑点的准确位置。然后将带测量点的另一半滤纸条上与此标准品斑点对应的部分剪下。将剪下的含有海藻糖的滤纸条剪成碎片，放入盛有 0.1mol/L 的盐酸溶液的 10ml 容量瓶中洗脱 20h，其间每隔 6h 摇匀一次。将此洗脱液用蒽酮法测定海藻糖浓度。

1.5.3 薄层层析法

薄层层析法以硅胶为固定相，正丁醇-吡啶-水为展开剂可将样品中各组分很好地分离开，是一种操作简单、快捷、灵敏度高、准确可靠的测定方法。对于菌种筛选、培养及提取过程中大量的海藻糖快速定性定量测定工作，用薄层层析法测定是十分便利的。

操作方法

(1) 薄层扫描条件

硅胶板的制备：采用湿法制板。调浆剂 0.1mol/L 的磷酸二氢钠和硅胶 G 在研钵中混合研磨后，均匀涂布于干净的玻璃板（10cm×20cm）上，自然晾干，使用前 105℃ 活化 30min。

点样：将各标准糖配成 1% 的溶液，点样量为 2μl。点样点距离板底 1.5cm，点样斑点直径控制在 3~5mm，样品间距 1.5cm。

展开：正丁醇：吡啶：水=6：4：1 为展开剂，室温展开。待展开剂前沿走至距板顶 2cm 时，取出，自然晾干。

显色：用喉头喷雾器将 20% 的硫酸-甲醇溶液均匀喷至板上，置于 105℃ 烘箱内加热 10min，使显色。

(2) 标准曲线的绘制 分别吸取 10mg/ml 的标准糖溶液 0.5μl, 1.0μl, 2.0μl, 3.0μl, 4.0μl, 5.0μl，点于同一块硅胶版上，用正丁醇：吡啶：水=6：4：1 为展开剂，20% 的硫酸-甲醇溶液为显色剂。以标准糖的检测量为横坐标，斑点的积分面积为纵坐标绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。

(3) 样品的测定 首先求出样品液在硅胶板上的斑点的积分面积，再根据回归方程计算出海藻糖的含量。

1.5.4 DNS 比色法

在酶法转化淀粉生产海藻糖时，经 α-淀粉酶和糖化酶处理的海藻糖中间样品，其主要成分仅为海藻糖和葡萄糖，因此可运用工业中常用的还原糖测定方法——DNS（3,5-二硝基水杨酸）法分别测出其中还原糖和总糖的量，再计算出非还原糖——海藻糖的含量。葡萄糖等还原糖能将 DNS 的硝基还原为氨基，生成的氨基化合物在过量的氢氧化钠碱性溶液中呈橘红色，在 540nm 处有最大吸收，其光密度值与葡萄糖含量成正比。该方法操作简单、成本低廉，可用于酶法海藻糖生产过程中中间产物的检测。

操作方法

(1) DNS 试剂的配制 182g 酒石酸钾钠溶于 500ml 蒸馏水中，加热，趁热加入 63g 3,5-二硝基水杨酸（DNS）和 262ml 浓度为 2mol/L 的 NaOH 溶液，溶解后，加入 0.5g 苯酚和 5.0g 无水亚硫酸钠，蒸馏水定容至 1000ml 即得。该溶液需避光保存。

(2) 标准曲线的制作 无水葡萄糖经 110℃ 干燥至恒重，准确称取 98.89mg，

蒸馏水溶解并定容至 100ml, 其浓度为 0.9889mg/ml。以该溶液为基准液, 取数支试管进行 2~10 倍系列稀释。分别取稀释液 0.5ml, 加入 DNS 试剂 0.5ml, 混合均匀后, 沸水浴 5min, 取出立即加入 4ml 蒸馏水, 冷却后于 540nm 处, 测定各管的光密度值。以 OD_{540} 对葡萄糖浓度绘制标准曲线。

(3) 还原糖的测定 将稀释样品直接以 DNS 法测定光密度值, 根据葡萄糖标准曲线, 计算出还原糖的量。

(4) 总糖的测定 取带塞刻度试管, 吸取稀释液 0.5ml, 分别加入 6mol/L 盐酸 3ml, 沸水浴 30min, 用饱和氢氧化钠溶液中和试管中的反应液, 蒸馏水稀释至刻度, 混合均匀, 吸取其中 0.5ml 溶液, DNS 法测定光密度值。同样根据标准曲线, 计算出其总糖的量。

海藻糖的量按如下公式计算:

$$\text{海藻糖} = (\text{总糖} - \text{还原糖}) \times 342/360$$

除了可以利用盐酸将海藻糖分解为葡萄糖外, 也可以利用对海藻糖具有特异性分解作用的海藻糖酶将一分子海藻糖分解成二分子葡萄糖, 然后再利用 DNS 法测定所产生的葡萄糖, 从而定量测定海藻糖。酶-DNS 法测定海藻糖的程序如下。

样品处理 → 测定酶处理前葡萄糖浓度 (C_1) → 酶法分解海藻糖 → 测定酶处理后葡萄糖浓度 (C_2) → 计算增加的葡萄糖浓度 ($C_2 - C_1$) → 换算成海藻糖的含量。

操作方法

(1) 标准曲线绘制 吸取 1mg/ml 葡萄糖标准溶液 (按梯度取用, 分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6ml), 分别与 DNS 进行显色, 测定其光密度值, 绘制标准曲线。

(2) 测定酶处理前葡萄糖浓度 (C_1) 称取 100mg 海藻糖样品溶解于 100ml 水中, 吸取样品稀释液 1ml, 加入 1ml 5% 苯酚水溶液, 再加入 5ml 浓硫酸, 摇匀。10min 后, 放入 25℃ 水浴中 20min, 以试剂空白调零, 在 540nm 波长下测定光密度值, 与标样做对照求出样品中葡萄糖的含量。

(3) 酶法水解海藻糖 取一洁净试管加入 0.1% 海藻糖溶液 0.25ml, 海藻糖酶 (trehalase) 0.025U 及 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH5.6) 0.25ml, 混合均匀后迅速放入 37℃ 水浴中反应, 反应完毕即加入 0.5ml DNS 显色剂, 沸水浴中煮 5min, 以流动水冷却后再加 4ml 蒸馏水摇匀。同时以蒸馏水代替海藻糖作一对照, 在 540nm 处读其光密度值。取 1ml 水解后的溶液, 以 DNS 法测定酶处理后的葡萄糖浓度 (C_2)。

(4) 结果计算

$$C_G = C_2 - C_1$$

$$C_T = 0.95C_G$$

式中, C_T 为海藻糖浓度 ($\mu\text{g/ml}$); C_G 为增加的葡萄糖浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。

1.5.5 高效液相色谱 (HPLC) 法

在海藻糖的生产过程中, 发酵液、酶反应液中除了主要成分海藻糖外, 还会有