

普鲁蓝酶逆向合成麦芽糖基-环状糊精

崔波, 金征宇

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:以麦芽糖和-环状糊精作为底物, 利用酸性普鲁蓝芽孢杆菌普鲁蓝酶的逆向合成作用合成麦芽糖基-环状糊精。产物经纸色谱、HPLC 和 IR 进行鉴定并用纸色谱对其分离纯化。对可能影响麦芽糖基-环状糊精合成的 pH、反应温度、加酶量、麦芽糖与-CD 的摩尔比、底物浓度及反应时间等各因素分别作了单因素实验, 确定最佳反应条件为温度 70℃, pH 值 4.5, 麦芽糖和-环状糊精摩尔比为 12:1, 底物浓度 80%~85%, 加酶量 200U/g-CD, 反应时间 60h。

关键词:麦芽糖; -环状糊精; 麦芽糖基-环状糊精; 普鲁蓝酶

Synthesis of Maltosyl(1-6)-cyclodextrin through the Reverse Reaction of Pullulanase

CUI Bo, JIN Zheng-yu

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Maltosyl(1-6)-cyclodextrin was synthesized from maltose and- cyclodextrin, by using *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. The reaction product was determined by HPLC, IR and paper chromatography. Mal-CD has been separated by paper chromatography. The factors which affect the formation of Mal-CD have been studied and the optimum conditions were got as follows: 200U/g-CD of enzyme, molar ratio of maltose to-CD as 12:1, a substrate concentration of 80%~85%, the pH of reaction mixture as 4.5, reaction temperature at 70℃ and reaction time 60 hours.

Key words: maltose; -cyclodextrin; maltosyl(1-6)-cyclodextrin; pullulanase

中图分类号: TS245.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0128-04

环状糊精是由-D-葡萄糖由六个以上葡萄糖通过-1,4糖苷键连接而成的环状麦芽低聚糖。根据葡萄糖残基的个数, 分别称为-CD、-CD、-CD。环状糊精的空间结构呈中空的圆筒状, 孔穴内径为 6~10Å, 可以与化合物形成包合物。在食品、医药、农药、精细化工等行业都具有十分广泛的用途。环状糊精的应用范围很广泛, 但它也有一些缺点, 其中之一是环状糊精和其包接化合物在水中的溶解性较差, 这在制药和化妆品中的应用中更显突出, 不仅用量受到限制, 如果出现包接化合物沉淀的现象, 还会影响产品的质量。通过环状糊精分子中的羟基反应能制备多种衍生物, 从而扩大分子的亲水区, 改善其溶解性。开发高水溶性的环糊精产品成为近年来国内外研究的一大热点。

麦芽糖基-环状糊精(maltosyl(1-6)-cyclodextrins, Mal-CD)是-环状糊精在其某个葡萄糖残基的第六位碳原子的羟基上偶联两个葡萄糖残基的衍

生化产物^[1], 在水中溶解度为 151g/100ml, 大大高于其对应的-环状糊精的 1.85g/100ml^[2], 如果能实现产业化, 将会对食品、医药、农药、精细化工等行业的发展产生巨大影响。麦芽糖基-环状糊精的应用研究国外已有报道^[3~6]。Mal-CD 等环状糊精的衍生物和改性产物目前已成为国外开发和研究的热点^[7~10]。本实验采用酶法合成麦芽糖基-环状糊精, 较化学合成具有更高的安全性, 在国内尚未见相关报道。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

普鲁蓝酶, 普鲁蓝, Mal-CD 标准品 Sigma 公司; 麦芽糖, 甲醇, -环糊精, 无水乙醇, 硫酸: 分析纯。

1.2 仪器设备

101A-2 型干燥箱 上海市实验仪器总厂; JB-3 型定

收稿日期: 2004-12-31

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2004018)

作者简介: 崔波(1971-), 副教授, 博士研究生, 研究方向食品添加剂和新资源开发。

恒温磁力搅拌器 上海雷磁新泾仪器有限公司; 超级恒温水浴锅 上海市实验仪器总厂; 电子天平 mettler-toledo Group; Waters600 高效液相色谱仪; K-2301 示差折光检测器; Hypersil NH₂ 色谱柱; 傅立叶变换红外光谱仪 Thermo Electron Corporation。

1.3 方法

1.3.1 酶活测定方法

酶活单位定义: 在 pH4.5, 40 °C 条件下, 水解普鲁蓝每分钟产生 1 μmol 相当于葡萄糖的还原力的酶量为一个单位 U。

测定方法参考 Keiko Iwaki^[11] 法。

还原糖的测定采用 Smogyi-Nelson^[12] 法。

1.3.2 Mal- β -CD 的合成

利用麦芽糖和 β -环糊精作为底物, 以普鲁蓝酶作催化剂, 在一定反应条件下, 利用酶的逆向反应合成 Mal- β -CD。对可能影响合成 Mal- β -CD 的 pH、反应温度、加酶量、麦芽糖与 β -CD 的摩尔比、底物浓度及反应时间等各因素分别进行单因素实验, 以确定最佳反应条件, 提高产量。

1.3.3 Mal- β -CD 的检测

上述反应产物经稀释、过滤、定容后采用 HPLC 进行定性和定量。

1.3.4 Mal- β -CD 的分离、纯化

采用 Whatman No.3 滤纸, 展开剂配方为正丙醇-正丁醇-水(5:3:4), 采用下行法展开 12h。吹干后将点有标准品的一侧纸条剪下, 浸入 0.5% 的碘丙酮溶液后吹干显色, 然后将含样品滤纸条对应标准品斑点位置的纸片剪下, 洗脱, 浓缩, 干燥。

2 结果与分析

2.1 检测条件的建立

经过反复实验, 确定高效液相检测条件为: 柱规格 4.6 × 250mm; 流动相乙腈-水(60:40), 流速 1ml/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μl。标准品和反应产物的 HPLC 图谱分别如图 1 和图 2 所示: 根据标准品的保留时间, 可以确定在产物的 HPLC 中保留时间 11.924min 处的物质为 Mal- β -CD。

2.2 Mal- β -CD 的分离纯化

图 3 为反应产物的纸上色谱, 可以看出纸色谱可以将 Mal- β -CD 和 β -CD 分开。因此 Mal- β -CD 的分离纯化按照 1.3.4 所述方法进行。

2.3 红外光谱分析

如图 4, Mal- β -CD 和 β -CD 的红外光谱无明显区别, 除都含有糖类的特征峰 3414cm⁻¹ 和 2928cm⁻¹ 等外, 还都含有 580cm⁻¹ 和 950cm⁻¹ 等 CD 骨架的特征峰^[13], 说明 Mal-

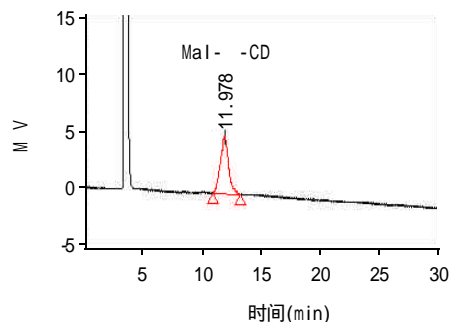


图1 Mal- β -CD 标准品 HPLC 图
Fig.1 HPLC of standard Mal- β -CD

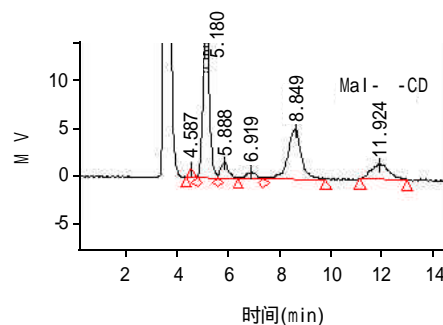


图2 反应产物的 HPLC 图谱
Fig.2 HPLC of reaction product

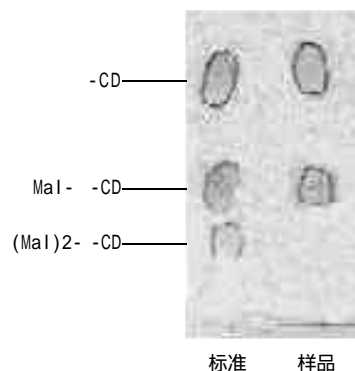


图3 Mal- β -CD 的纸上色谱
Fig.3 Paper chromatography of Mal- β -CD

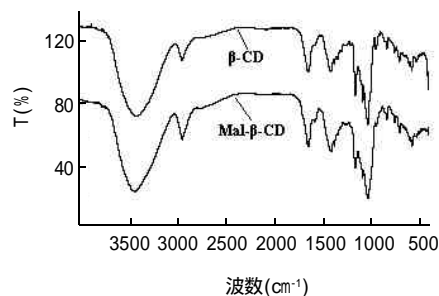


图4 Mal- β -CD 和 β -CD 的红外光谱
Fig.4 IR spectra of Mal- β -CD and β -CD

-CD 结构与 β -CD 极为相似, 仍具有 CD 的环状结构, 是 β -CD 衍生物。

2.4 反应条件对产量的影响

采用 HPLC 对产物进行定量, 研究了 pH、反应温度、加酶量、麦芽糖与 β -CD 的摩尔比、底物浓度及反应时间等各因素对产量的影响。

2.4.1 温度对产量的影响

在加酶量为 200U/g β -CD, 麦芽糖与 β -环糊精摩尔比为 16:1, 底物浓度为 60%, 控制反应体系 pH 值为 4.5, 反应 72h, 分别于 30、40、50、60、70、80 条件下反应, 结果如图 5。

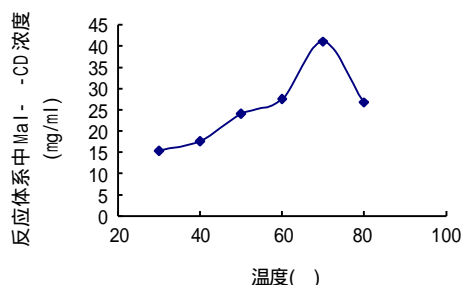


图5 反应温度对 Mal-β-CD 产量的影响

Fig.5 Effects of temperature on Mal-β-CD formation

由图 5 可知, 在反应温度为 70 时产量最高, 所以反应的最适温度可选用 70, 这个温度高于该普鲁蓝酶的最适温度 60。

2.4.2 pH 对产量的影响

在加酶量为 200U/g β -CD, 麦芽糖与 β -环糊精摩尔比为 16:1, 底物浓度为 60%, 控制反应体系温度为 60, pH 值分别为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 条件下反应 72h, 结果如图 6。由图 6 可以看出, 相同条件下在 pH4.5 时产量最高, 这也是该普鲁蓝酶的最适 pH 值。

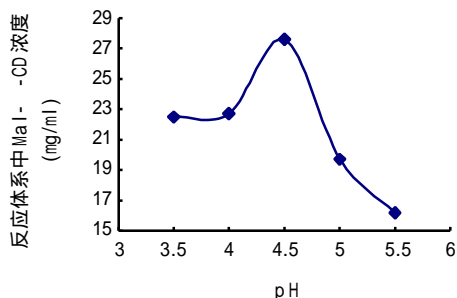


图6 pH 对 Mal-β-CD 产量的影响

Fig.6 Effects of pH on Mal-β-CD formation

2.4.3 加酶量对产量的影响

在麦芽糖与 β -环糊精摩尔比为 16:1, 底物浓度为 60%, 控制反应体系温度为 60, pH 值为 4.5 的条件下, 分别添加普鲁蓝酶 40、80、120、160、200、

240U/g β -CD, 反应 72h, 结果如图 7。

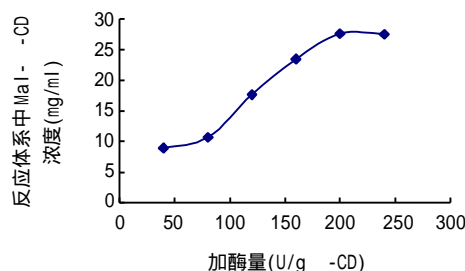


图7 加酶量对 Mal-β-CD 产量的影响

Fig.7 Effects of enzyme amount on Mal-β-CD formation

由图 7 可知, 产量随普鲁蓝酶量增加不断增加, 在酶量达到 200U/g β -CD 时, 随酶量增加, 产量变化不再有明显区别。所以加酶量以 200U/g β -CD 为宜。

2.4.4 麦芽糖和 β -环状糊精摩尔比对产量的影响

在底物浓度为 60%, 加酶量 200U/g β -CD, 控制反应体系温度为 60, pH 值为 4.5 的条件下, 分别使反应体系中麦芽糖与 β -环状糊精摩尔比为 4:1、8:1、12:1、16:1、20:1, 反应 72h, 结果如图 8。由图 8 可以看出, 麦芽糖与 β -环状糊精摩尔比越大, 产量并非越高。当摩尔比增加到一定程度, 反应体系中产物的产量降低。这是因为虽然增大摩尔比可能会使反应平衡向合成麦芽糖基 β -环状糊精的逆反应方向进行, 使接枝率增高, 但由于摩尔比增加后体系中 β -环状糊精的总量减少, 即使转化率增高, 合成的麦芽糖基 β -环状糊精的总量不一定增加, 生产的经济效率变低。因此应控制摩尔比在一定水平。实验中采用 12:1 较宜。

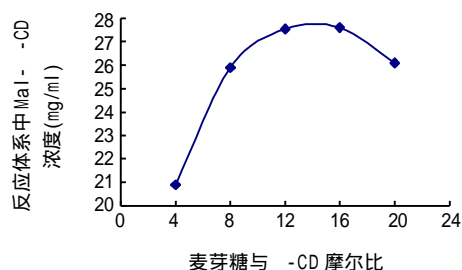


图8 麦芽糖与 β -环状糊精摩尔比对 Mal-β-CD 产量的影响

Fig.8 Effects of the maltose:β-CD molar ratio on Mal-β-CD formation

2.4.5 底物浓度对产量的影响

在加酶量为 200U/g β -CD, 麦芽糖与 β -环糊精摩尔比为 16:1, 控制反应体系 pH 值为 4.5, 温度为 60, 分别使底物浓度为 40%、50%、60%、70%、80%、85%, 在此条件下反应 72h, 结果如图 9。

由图 9 可以看出, 底物浓度越高, Mal-β-CD 的产量越高。这是因为底物浓度增大, 会使反应向合成

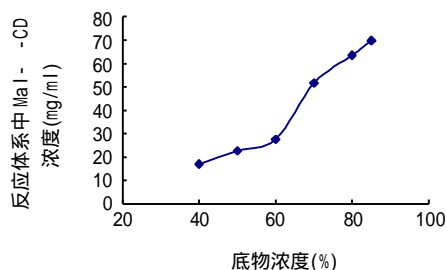


图9 底物浓度对 Mal-α-CD 产量的影响

Fig.9 Effects of substrate concentration on Mal-α-CD formation

Mal-α-CD 的方向进行。超过 85% 时, 由于底物无法完全溶解, 没有再进行试验。

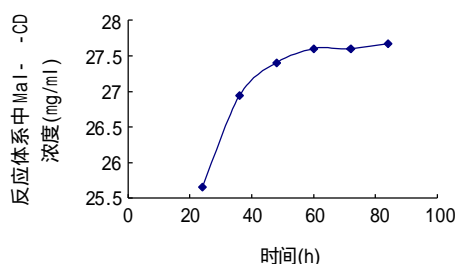


图10 反应时间对 Mal-α-CD 产量的影响

Fig.10 Effects of reaction time concentration on Mal-α-CD formation

2.4.6 反应时间对产量的影响

在麦芽糖与 α-环状糊精摩尔比为 16:1, 底物浓度为 60%, 控制反应体系温度为 60℃, pH 值为 4.5 的条件下, 添加普鲁蓝酶 200U/g α-CD, 分别使反应时间为 24、36、48、60、72、84 h, 结果如图 10。在反应时间为 60 h 时, 反应已经达到平衡, 产量不再增加, 所以反应时间以 60 h 为宜。

3 结论

3.1 Mal-α-CD 的 HPLC 检测条件为: Hypersil NH₂ 柱规格 4.6 × 250mm; 流动相乙腈-水(60:40), 流速 1ml/min, 柱温 30℃, 进样量 10 μl。

3.2 红外检测 Mal-α-CD 具有与 α-CD 相似的环状结构。

3.3 Mal-α-CD 生产的最适反应条件是: 温度 70℃, pH 值 4.5, 麦芽糖和 α-环状糊精摩尔比为 12:1, 底物浓度 80%~85%, 加酶量 200U/g α-CD, 反应时间 60h。在此条件下, 反应体系的 Mal-α-CD 浓度大于 70mg/ml, α-CD 合成 Mal-α-CD 的转化率大于 50%。各因素之间交互效应对合成反应的影响需要进一步实验探讨。

参考文献:

[1] Sumio Kitahata, Yoshimichi Yoshimura, Shigetaka Okada.

Formation of 6-O-maltosyl-cyclomalto-oligosaccharides from maltosyl fluoride cyclomalto-oligosaccharides by pullulanase[J]. Carbohydrate Research, 1987, 159: 303-313.

[2] Junchi Abe, Yasuhiro Takeda, Susumu Hizukuri et al. Isolation and characterization of 6-O-D-glucosyl cyclomaltoheptaose[J]. Carbohydrate Research, 1984, 131: 175-179.

[3] Takeshi Furuta, Hidefumi Yoshii, Takashi Kobayashi, et al. Powdery encapsulation of d-limonene by kneading with mixed powders of α-cyclodextrin and maltodextrin at low water content[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(5): 847-850.

[4] Kevin B Hicks, Rebecca M Haines, Cindy B S Tong, et al. Inhibition of enzymatic browning in fresh fruit and vegetable juices by soluble and insoluble forms of α-cyclodextrin alone or in combination with phosphates[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 2591-2594.

[5] Seiki Tanada, Takeo Nakamura, Naohito Kawasaki et al. Inclusion of volatile organic compounds into natural cyclodextrins and their branched cyclodextrins in the gaseous phase[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1997, 186: 180-184.

[6] Noriko Ajisara, Koji Hara, Katsuhiko Mikuni et al. Effects of branched cyclodextrins on the solubility and stability of terpenes[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(4): 731-734.

[7] Yoshiyuki Sakano, Mutsumi Sano, Tsuneo Kobayashi. Preparation and enzymatic hydrolysis of maltosyl-α-cyclodextrin[J]. Agric Biol Chem, 1985, 49(12): 3391-3398.

[8] Shoichi Kobayashi, Kohichi Nakashima, Masaomi Arahira. Production and some properties of branched cyclomalto-oligosaccharides[J]. Carbohydrate Research, 1989, 192: 223-231.

[9] Yasuyo Okata, Kyoko Koizumi, Sumio Kitahata. Separation and characterization of five positional isomers of trimaltosyl-cyclomaltoheptaose (trimaltosyl-α-cyclodextrin)[J]. Carbohydrate Research, 1994, 254: 1-13.

[10] Noriyasu Watanabe. A novel method to produce branched α-cyclodextrins: pullulanase-glucamylase-mixed method[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997, 83(1): 43-47.

[11] Keiko Iwaki, Hidetsugu. Purification and some properties of debranching enzyme of germinating rice endosperm[J]. Agric Biol Chem, 1981, 45(12): 2683-2688.

[12] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海科学技术出版社, 1987.

[13] 董林芸. 环糊精化学-基础与应用[M]. 科学出版社, 2001.