

文章编号:1009-038X(2003)06-0031-04

超高水溶性麦芽糖基 β -环糊精的生物反向合成

周 博, 方 燕, 常 辉, 杭 锋, 曹新志, 徐学明

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 以麦芽糖、 β -环糊精为原料, 采用普鲁蓝酶生物反向合成得到超高水溶性的麦芽糖基(α -1 $\rightarrow$ 6) β -环糊精. 试验测定, 在 pH 4.0~4.2, 温度 58~60 $^{\circ}\text{C}$, 酶量 220~308 U/g β -CD, 麦芽糖与 β -环糊精的摩尔比为 7:1~8:1, 反应时间 35~38 h 的条件下, 环糊精转化率可达到 40% 以上.

关键词: 麦芽糖基(α -1 $\rightarrow$ 6) β -环糊精; 普鲁蓝酶; 反向合成

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

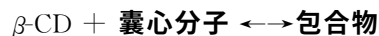
Synthesis of Highly Soluble Maltosyl(α -1 $\rightarrow$ 6) β -Cyclodextrin Through the Reverse Reaction of Pullulanase

ZHOU Bo, FANG Yan, CHANG Hui, HANG Feng, CAO Xin-zhi, XU Xue-ming
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Maltosyl β -Cyclodextrin was synthesized from maltose and β -cyclodextrin in a reverse reaction using pullulanase. More than 40% of maltosyl β -cyclodextrin was obtained under the following conditions: molar ratio of maltose to β -cyclodextrin 7:1 to 8:1, the amount of pullulanase 220~308 U/g β -cyclodextrin, the pH 4.0~4.2, and the reacting temperature 58~60 $^{\circ}\text{C}$, respectively.

Key words: maltosyl (α -1 $\rightarrow$ 6) β -cyclodextrin; pullulanase; reverse reaction

β -环糊精 (β -Cyclodextrin, β -CD) 作为食品添加剂具有无毒、无味、在人体内易水解为葡萄糖分子的特点. 在食品加工和保存过程中, β -CD 与食品中的某些分子形成包合物, 增加了这些成分的抗氧化、抗光照能力及热稳定性^[1,2]. β -CD 还用于去除食品中的不良味道或有害成分. 包合作用是在水溶液中进行的可逆过程, 壁材和囊心的摩尔比大于或等于 1. 反应过程可表示为



由于 β -CD 分子中 C_2 和 C_3 羟基之间易形成分子内氢键, 使其形成的包合物具有低水溶性的特点, 这一特性限制了 β -CD 的应用. 如同淀粉、纤维素通过化学改性可以得到新的理化性质的改性化合物一样, β -CD 也可以通过酶的作用将葡萄糖或麦芽糖基等亲水化合物与环糊精以 α -1 $\rightarrow$ 6 糖苷键相连, 以增加其水溶性. 水溶性 β -CD 在水相中具有很高的溶解度, 反应中可包合的囊心分子浓度也相应增高, 从而得到更好的包合效果, 应用领域也更大. 目前

收稿日期: 2003-05-01; 修回日期: 2003-07-05.

作者简介: 周博(1982-), 女, 辽宁瓦房店人, 动物科学本科生.
万方数据

已有许多改性后的高水溶性 β -CD 的应用实例,如 1996 年 Kevin 等采用的 β -CD 及羟丙基 β -CD 加入果蔬汁中取代二氧化硫、VC 等防止果汁发生酶促褐变的化合物. 实验表明,通过调整羟丙基 β -CD 在果汁中的浓度可以完全阻止或减缓酶促褐变的发生,而普通 β -CD 却无法达到这一效果. 但是,以化学方法合成的羟丙基为主的高水溶性 β -CD 的开发,因其安全性令人担忧而使其在食品、医药等领域的应用受到了一定限制. 因此开发安全的高水溶性 β -CD 已成为当今研究的一大热点.

本实验采用酶法合成麦芽糖基(α -1 $\rightarrow$ 6) β -环糊精,该产品在安全性和高水溶性方面都比较理想,具有更广阔的前景. 实验涉及的麦芽糖基(α -1 $\rightarrow$ 6) β -环糊精的合成途径是国外目前研究中认为最有前途和价值的方法,但任何有关本产品合成方法的研究在国内尚未见报道.

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

1.1.1 试剂 普鲁蓝酶:无锡杰能科生物有限公司(酶活单位均为该公司内部制定单位,1 000 U/mL)生产;麦芽糖(简作 Mal,分析纯):中国医药集团上海化学制剂公司生产; β -环糊精(分析纯):上海化学试剂站中心化工厂生产;甲醇、无水乙醇、无水乙醚等均为分析纯.

1.1.2 仪器 101A-2 型干燥箱:上海市实验仪器总厂制造;JB-3 型定时恒温磁力搅拌器:上海雷磁新泾仪器有限公司制造;超级恒温水浴锅:上海市实验仪器总厂制造;HL-2 恒流泵:上海市新无线电厂制造;DBS-100 电脑全自动部分收集器:上海市沪西分析仪器厂制造;日立 655A-12 液相色谱仪:日本日立株式会社制造;K-2301 示差检测器:德国 KNAUER 公司;柱:Mark NH₂ 柱;Lichrospher C18 柱.

1.2 实验方法

在一定条件下得到的反应液,经沸水加热 5 min 灭酶(不断搅拌),加 40 mL 水,降低粘度,再加 475 mL 乙醇并过滤,除去不溶物(主要为酶蛋白). 滤液直接经 HPLC 检测分析麦芽糖基(α -1 $\rightarrow$ 6) β -环糊精的含量.

2 结果与讨论

2.1 测定方法的比较

分别用日立 655A HPLC NH₂ 柱和 C18 柱检

测,与标样比较,所得图谱见图 1~4.

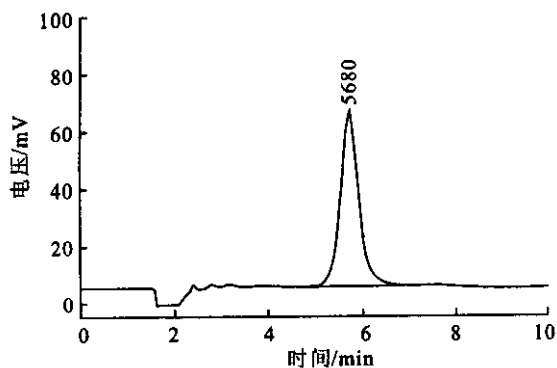


图 1 麦芽糖基 β -环糊精标样(NH₂ 柱)

Fig. 1 Standard Sample of Mal β -CD (Column NH₂)

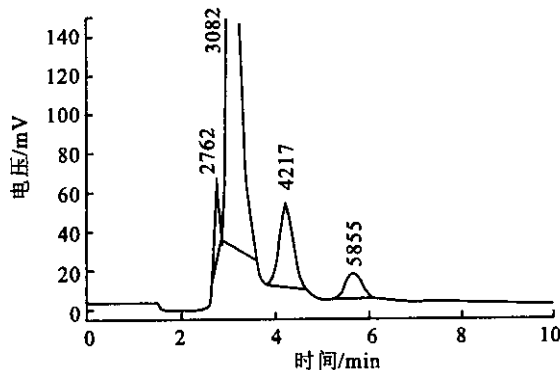


图 2 反应样品(NH₂ 柱)

Fig. 2 Sample (Column NH₂)

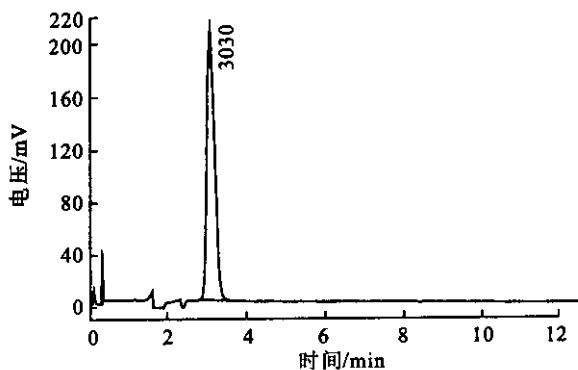


图 3 麦芽糖基 β -环糊精标样(C18 柱)

Fig. 3 Standard Sample of Mal β -CD (Column C18)

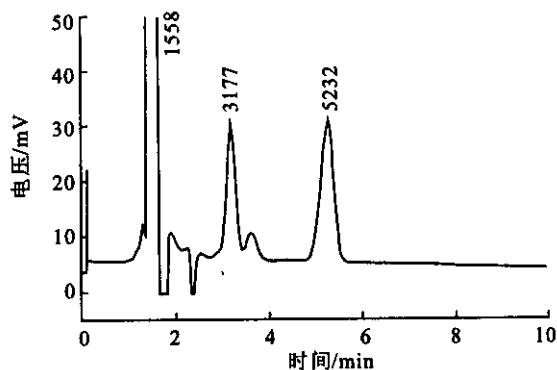


图 4 反应样品(C18 柱)

Fig. 4 Sample (Column C18)

从分离效果与峰的形状可见,C18 柱的检测效

果好于 NH_2 柱,因此,实验中以下各结果均由 C18 柱测定。

2.2 反应条件对产物得率的影响

影响 Mal- β -CD 合成的主要因素为 pH、反应温度、加酶量、麦芽糖与 β -环糊精的摩尔比及反应时间。为了提高合成物得率,作者对上述各因素分别作了单因素实验,并用 Aligent HP1100 HPLC (C18 柱, $V(\text{CH}_3\text{OH}) : V(\text{H}_2\text{O}) = 1 : 9$, 体积流量 0.5 mL/min, 每次进样 25 μL) 对实验结果进行了测定。

2.2.1 pH 对 Mal- β -CD 得率的影响 在麦芽糖与 β -CD 摩尔比为 6 : 1、普鲁蓝酶量 0.5 mL (220 U/g β -CD)、反应温度为 72 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,分别将反应体系 pH 控制在 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 进行试验,反应 24 h,结果见图 5。

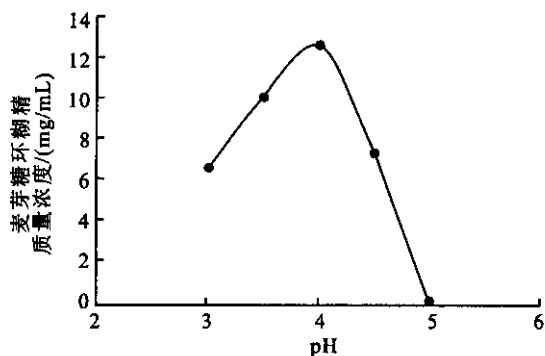


图 5 反应 pH 对 Mal- β -CD 得率的影响

Fig. 5 Effects of the pH on Mal- β -CD Formation

由图 5 可见,该反应的最适 pH 为 4.0,与普鲁蓝酶的最适 pH (4.2 左右)基本吻合。pH 过低或过高都将影响酶的活性。

2.2.2 反应温度对 Mal- β -CD 得率的影响 Mal 与 β -CD 摩尔比为 6 : 1,经 0.5 mL (220 U/g β -CD) 普鲁蓝酶催化,在 pH4.0 缓冲液中,于 55, 57, 60, 62, 65 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行 5 组实验,反应 15 h,检测结果见图 6。

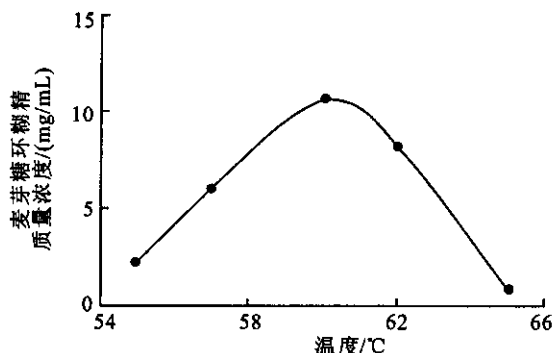


图 6 反应温度对 Mal- β -CD 得率的影响

Fig. 6 Effects of Temperature on Mal- β -CD Formation

由图 6 可见,反应最适温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,与普鲁蓝

酶的最适温度(55~60 $^{\circ}\text{C}$)相符。

2.2.3 加酶量对 Mal- β -CD 得率的影响 Mal 与 β -CD 摩尔比为 6 : 1,在温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 4.0 的缓冲液中,经 0.25, 0.40, 0.50, 0.70, 1.00 mL (220 U/g β -CD) 普鲁蓝酶催化,进行 5 组反应,反应时间 15 h,检测结果见图 7。

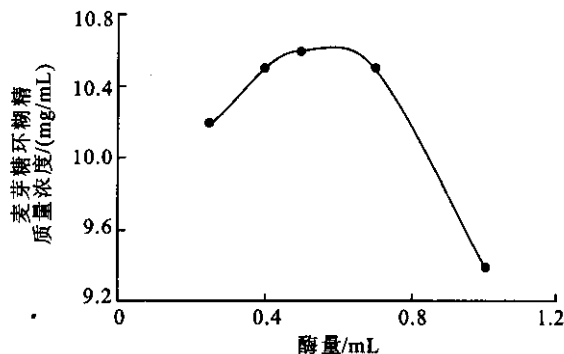


图 7 反应加酶量对 Mal- β -CD 得率的影响

Fig. 7 Effects of the Enzyme Amount on Mal- β -CD Formation

由图 7 可见,反应最适加酶量为 0.45 mL/g β -CD,即 450 U/g β -CD,增加加酶量使酶的切糖苷键作用较连接作用增强快,因而不利于该反应的进行。

2.2.4 Mal 与 β -CD 摩尔比及底物浓度对 Mal- β -CD 得率的影响 分别将 Mal 与 β -CD 摩尔比为 4 : 1, 6 : 1, 8 : 1, 9 : 1, 10 : 1,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 4.0 的条件下,经 0.5 mL (220 U/g β -CD) 普鲁蓝酶催化,平行进行 5 组实验,反应 15 h,检测结果见图 8。

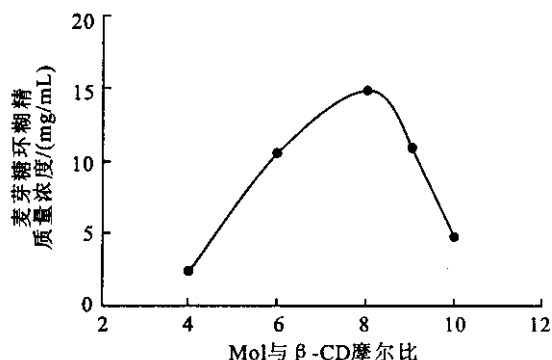


图 8 反应 Mal 与 β -CD 摩尔比对 Mal- β -CD 得率的影响

Fig. 8 Effects of the ratio of Maltose vs β -CD Molar on Mal- β -CD Formation

图 8 表明,反应的最佳 Mal 与 β -CD 摩尔比为 8 : 1,这与底物浓度对酶的催化反应速率的影响^[3]相矛盾,可能是由于浓度的提高,在 Mal- β -CD 得率提高的同时使普鲁蓝酶水解 Mal- β -CD 的速度加快。由于这两者相互作用,使得 Mal- β -CD 得率与底物浓度的关系有最佳值。

2.2.5 反应时间对 Mal- β -CD 得率的影响 将麦芽糖与环糊精(8 : 1,摩尔比),在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 4.0 的条件下,经 0.5 mL (220 U/g β -CD) 普鲁蓝酶催化,在 12, 27, 35, 40, 50, 56 h 分别取样测定,结果见图 9。

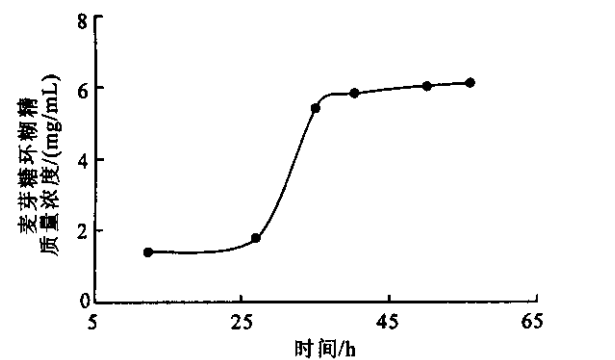


图 9 反应时间对 Mal-β-CD 得率的影响

Fig. 9 Effects of Reaction Time on Mal-β-CD Formation

图 9 表明,35 h 后 Mal-β-CD 得率基本不变. 实际操作中可取拐点处 35 h 为最适反应时间,这样既保证了较高麦芽糖基 β-环糊精的得率,又降低了操作成本,具有实际应用价值.

2.3 响应面分析

上述单因素试验表明,在温度、底物摩尔比、加酶量及反应时间因素中,对反应利率影响较大的是温度、底物摩尔比、加酶量. 为了进一步提高反应得率,优化反应条件,以上述 3 个因素为条件进行响应面分析试验,其因素试验表及试验结果见表 1,2.

表 1 响应面分析因素水平

Tab. 1 RSA Factor Level

水平	因素		
	底物摩尔比 A (Mal /β-CD)	反应温度 B	加酶量/mL C
-1	7 : 1	55	0. 25
0	8 : 1	60	0. 50
1	9 : 1	65	1. 00

表 2 响应面分析结果

Tab. 2 RSA Result

序号	A	B	C	产物得率/%
1	-1	-1	0	46. 36
2	-1	0	-1	46. 06
3	-1	0	1	41. 06
4	-1	1	0	48. 40
5	0	-1	-1	37. 85
6	0	1	1	34. 63
7	0	1	-1	40. 64
8	0	-1	1	45. 96
9	1	0	-1	43. 44
10	1	0	1	35. 65
11	1	1	0	32. 58
12	1	-1	0	33. 50
13	0	0	0	44. 02
14	0	0	0	44. 08
15	0	0	0	44. 90

注:试验反应时间 35 h, 底物中保持 β-环糊精浓度不

变,为 0. 2 mol/mL

2.3.1 时间和温度对麦芽糖基环糊精得率的影响

由图 10 分析得知,麦芽糖与环糊精的最佳摩尔比范围是 7~8 , 最适温度为 58~60 ℃,这与单一因素分析所得的结果基本相符.

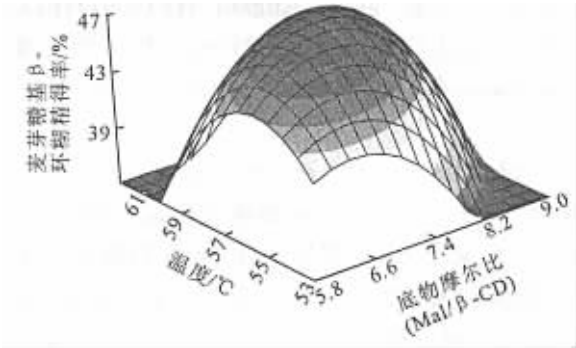


图 10 时间和温度对麦芽糖基环糊精得率的影响

Fig. 10 Effects of Time and Temperature on Mal-β-CD Formation

2.3.2 酶及麦芽糖与环糊精的摩尔比对麦芽糖基环糊精得率的影响

由图 11 分析得知,最佳的麦芽糖与环糊精的摩尔比范围是 7~8 , 最佳的酶量为 0. 5~0. 7 mL,这与单一因素分析所得的结果基本相符.

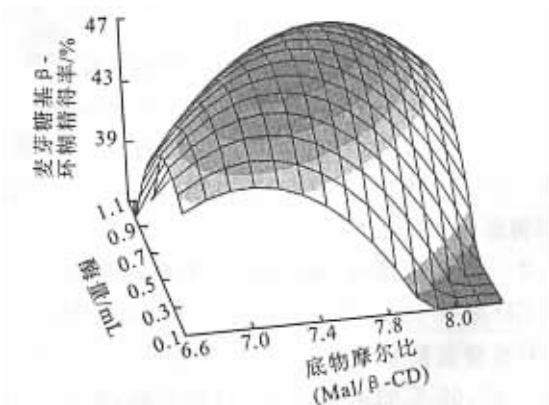


图 11 酶及麦芽糖与环糊精的摩尔比对麦芽糖基环糊精得率的影响

Fig. 11 Effects of Enzyme Amount and Molar Ratio of Maltose and β-CD on Mal-β-CD Formation

综合图 10,11 响应面图可知,反应最佳条件范围:麦芽糖与环糊精的摩尔比为 7~8,酶量为 220~308 U /g β-环糊精,温度 58~60 ℃,此时麦芽糖基 β-环糊精得率达到 49% 左右.

3 结 论

1) 采用 HPLC C18 柱,在洗脱液 V(甲醇): V(水)=90 : 10,体积流量 0. 5 mL/min 的条件下能很好地分离检测.

(下转第 88 页)

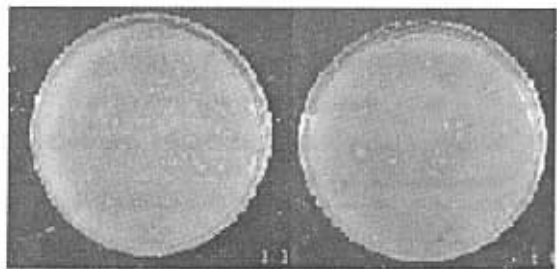


图 1 分离培养基上涂布产生透明圈的菌落

Fig. 1 Transparent zones on the selective medium of hemicellulose

观察透明圈时,若菌苔直径过大则菌落间 D/d 值的差距不大,不利于筛选;菌苔直径过小时,由于部分菌株尚未达到产酶高峰期且不易准确测量菌苔直径,因此会增大筛选误差。所以观察透明圈和挑取菌株应选在菌种的产酶高峰期或对数生长期。筛选本菌种时菌苔直径以 2 mm 为宜。

作者与国内其他以半纤维素为选择性碳源制

参考文献:

- [1] 袁其朋,张怀. 絮凝脱色在低聚木糖分离纯化中的应用[J]. 食品与发酵工业,2002,28(2):58—61.
- [2] 关宏,翟丽萍,何士敏,等. 低聚木糖生产用木聚糖酶的制备和测定[J]. 齐齐哈尔大学学报,2001,17(2):9—11.
- [3] 周世宁,路勇军,杜扬. 木聚糖降解菌的筛选和木聚糖酶性质的研究[J]. 中山大学学报,1996,33(1):91—96.
- [4] 禹慧明,林勇,徐有良,等. 木聚糖酶高产菌株选育[J]. 工业微生物,2002,32(1):43—44.
- [5] Ebringerová A, Hromádková Z. Effect of ultrasound on the extractability of corn bran hemicelluloses[J]. Ultrasonics Sonochemistry,2002,9:225—229.
- [6] 王宜磊,邓振旭. 透明圈法快速筛选半纤维素分解菌[J]. 生物技术,2000,10(1):37—39.
- [7] 邵佩兰,徐明,朱晓红. 影响玉米芯木聚糖提取的因素探讨[J]. 宁夏农学院学报,2002,23(2):56—57.
- [8] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal Chem,1959,31(3):426—428.
- [9] Khan A W. Enzyme Microb[J]. Technol,1986,8:373—377.
- [10] 王丽丽,莫卫民,卢耀平,等. 毛竹水解制取木糖[J]. 浙江化工,1996,27(2):27—31.
- [11] Gil Garrote, Herminia Domínguez, Juan Carlos Parajo. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis[J]. Process Biochemistry,2001,36:571—578.
- [12] 邵佩兰,徐明,李海峰,等. 碱法提取玉米芯木聚糖的研究[J]. 宁夏农学院学报,2000,21(4):47—49.
- [13] 杨瑞金,许时婴,王璋. 酶法生产低聚木糖过程中纤维素和木聚糖—木质素复合物结构的变化[J]. 中国粮油学报,2001,16(6):43—46.

(责任编辑:杨 萌)

(上接第 34 页)

2) 显著的影响因素:麦芽糖与 β -环糊精的摩尔比

3) 实验条件优化结果: pH 4.0~4.2, 温度 58

备分离培养基的报道相比,关键在于增加了对玉米芯的高温蒸煮步骤及改进了所提取半纤维素向培养基中添加的方式。改进后的培养基可产生出较常规方法更明显、与酶活对应性更强的透明圈。另外制备其它产木聚糖酶菌种如曲霉的分离培养基时,用文中半纤维素的提取及添加方式同样收到了较好的效果。对选择性碳源的探讨可用于多种产木聚糖酶菌种分离培养基的制备。

在低聚木糖生产上游工程中,用作者介绍的半纤维素分离培养基可方便、实用、有效的初步筛选出优良产木聚糖酶菌株,从而大大提高菌种的筛选效率。

半纤维素分子的存在状态是决定提取率及微生物利用效果的重要因素,不同条件下半纤维素分子结构的变化需作进一步研究来指导半纤维素的提取和利用。

~60℃,酶量 220~308 U/g β -CD,麦芽糖与 β -环糊精的摩尔比为 7:1~8:1,反应时间 35~38 h。

参考文献:

- [1] Takanori Shirashi. Synthesis of maltosyl(1→6) β -cyclodextrin through the reverse reaction of thermostable *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase[J]. Agric Biol Chem, 1989,53(8):2181—2188.
- [2] 魏众述. 生物化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996. 34.
- [3] 魏众述. 生物化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996. 138.

(责任编辑:杨 勇)