

普鲁兰酶逆向合成麦芽糖基- α -环糊精*

张永伟, 徐学明, 赵建伟, 王金鹏, 金征宇

(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

摘 要 以麦芽糖和 α -环糊精作为底物, 利用普鲁兰酶逆向合成作用合成了麦芽糖基- α -环糊精。用薄层色谱、液-质联用对产物进行了鉴定, 并用薄层色谱对其分离。对影响麦芽糖基- α -环糊精合成的反应物摩尔比(麦芽糖/ α -环糊精)、底物浓度、反应温度、反应时间、加酶量、pH 等因素分别做了单因素实验, 最终确定了反应条件: 反应物摩尔比(麦芽糖/ α -环糊精)为 16:1, 反应时间 24 h, 反应温度为 58 $^{\circ}\text{C}$, 加酶量 400 U/g α -环糊精, pH 4.5。
关键词 麦芽糖- α -环糊精, 麦芽糖, α -环糊精, 普鲁兰酶

环糊精在食品、医药化妆品、分析化学等领域被广泛应用。但是, 母体环糊精一般溶解性较小, 具有一定毒性, 这就大大限制了其应用范围^[1-3]。分支环糊精是环糊精的衍生物, 在环糊精分子的羟基上连有单糖或多糖的残基, 这样可以扩大母体环糊精的亲水性, 改善其溶解性^[4]。近些年, 对天然环糊精进行糖基的侧链修饰的科研工作在国外得到重视并取得进展, 但国内才刚刚起步。

麦芽糖基- α -环糊精(Mal- α -cyclodextrin)是 α -环糊精在其葡萄糖残基的第 6 位碳原子的羟基上偶联 1 个麦芽糖残基的分支环糊精。其在水中溶解度为 43 g/(100 mL), 且无任何毒性与溶血性, 如果能实现产业化生产, 将对食品、医药等行业产生巨大影响。麦芽糖基- α -环糊精的合成与应用研究国外有过报道^[5-6], Naomi 等人用麦芽糖基- α -环糊精与 Caco-2 细胞建立模型, 突出了麦芽糖基- α -环糊精的无毒性^[7]。Fukaya 等人用麦芽糖基- α -环糊精包含一种治疗哮喘的药物, 包含后药物利用率是原来的数十倍^[8], 但是麦芽糖基- α -环糊精相关研究在国内尚未见过相关报道。

本课题组采用酶法合成麦芽糖基- α -环糊精, 并对其进行了简单的分离和结构鉴定, 同时对影响产物产量的各因素进行了研究, 填补了国内麦芽糖基- α -环糊精合成研究的空白, 为解决技术壁垒及国内进行麦芽糖基- α -环糊精合成研究提供数据参考。

第一作者: 硕士(金征宇教授为通讯作者)。

* 国际科技合作项目(2007DFA31120), 江苏省自然科学基金创新学者攀登项目(BK2008003), 食品科学与技术国家重点实验室 2008 年度目标导向项目(SKLF-MB-200804)

收稿日期: 2009-02-05, 改回日期: 2009-04-08

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

普鲁兰酶, 无锡杰能科公司; 普鲁兰、麦芽糖- α -环糊精, 日本 WAKO 公司; 所有化学试剂均为分析纯(AR); 薄层层析硅胶(GF 254), 青岛海洋化工有限公司。

1.2 仪器

101A2 型干燥箱, 上海市实验仪器总厂; JB-3 型磁力搅拌机, 上海雷磁新径仪器有限公司; 恒温水浴锅, 上海市实验仪器总厂; Waters 600 高效液相色谱仪; 紫外检测器 Lichrospher NH₂ (2.1 \times 250 mm), Waters 公司; 质谱仪 Waters Platform ZMD 4000, Waters 公司。

1.3 方法

1.3.1 酶活力的测定

酶活力单位定义^[9]: 特定条件下(pH 4.5, 50 $^{\circ}\text{C}$), 从普鲁兰底物每分钟释放相当于葡萄糖的 1 个还原当量所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

测定方法: 1 mL 原酶液用 50 mmol 的乙酸-乙酸钠缓冲液稀释至 1 000 倍, 取 0.2 mL 酶液与 0.8 mL 质量分数 0.5% 的普鲁兰缓冲液, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 min, 以 Smogyi-Nelson 比色法测还原糖^[10-11]。

最终测定的酶活为 452 U/mL。

1.3.2 麦芽糖基- α -环糊精得率计算

$$\text{得率}/\% = \frac{\text{冻干产品质量}}{\alpha\text{-环糊精质量}} \times 100$$

1.3.3 麦芽糖基- α -环糊精合成

利用麦芽糖和 α -环糊精作为底物, 以普鲁兰酶作为催化剂在一定条件下逆向反应合成 Mal- α -CD。

1.3.4 麦芽糖基- α -环糊精的鉴定

对 1.3.3 合成的反应产物进行 100 ℃ 灭酶 15 min,然后稀释 10 倍,10 000 r/min 离心 30 min,洗脱、浓缩、冷冻干燥得产品。用 0.45 μm 微滤膜过滤,采用液质联用进行对冻干产品定性,采用 ESI-离子方式,离子源温度为 100 ℃,脱溶剂温度 250 ℃,质量范围 200 - 1 500 m/z。

2 结果与分析

2.1 检测条件的建立

经过反复的实验,确定液质联用检测条件为:流动相 V(乙腈):V(水) = 52:48,流速 0.3 mL/min,柱温 35 ℃,进样量为 15 μL,标准品反应产物的液质联用图谱如图 1 所示。麦芽糖基-α-环糊精标准品在 4.24 min 处出峰,样品在 4.25 min 处出峰,出峰时间基本一致。对 4.25 min 出峰的样品物质进行了质谱分析(结果见图 2)。结果显示,分子量是 1 296.3,与标准品分子量一致。液质联用比单纯利用 HPLC 分析保留时间相同更具准确性。

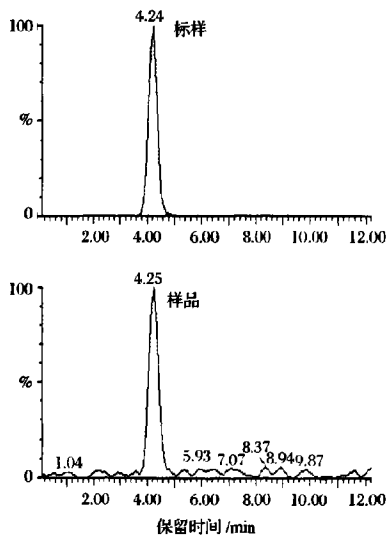


图 1 Mal-α-CD 标准品及反应产物 HPLC 图

2.2 麦芽糖基-α-环糊精的分离

图 3 是反应产物经薄层色谱展开后的色谱图,对比标样可以看出薄层色谱能把 Mal-α-CD 和 α-CD 分开。

2.3 反应条件对产量的影响。

研究了麦芽糖和 α-环糊精的摩尔比、反应时间、反应温度、加酶量、pH 等各因素对产量的影响。

2.3.1 反应物摩尔比(麦芽糖/α-环糊精)对产量的影响

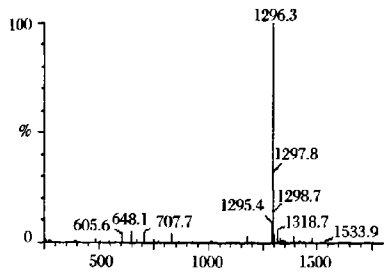


图 2 反应产物负离子质谱图

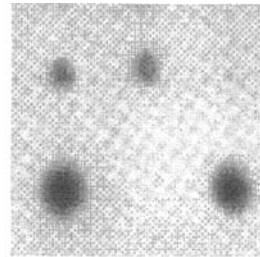


图 3 薄层色谱图(左边是样品 中间是 Mal-α-CD 标准品 右边是 α-CD 标准品)

控制麦芽糖与 α-环糊精摩尔比在 4:1、8:1、12:1、16:1、20:1,反应温度 58 ℃,反应 pH 4.5,加酶量 400 U/g (α-环糊精)条件下,反应 28 h,结果如图 4。由图 4 可以看出,反应物摩尔比控制在一定范围内(麦芽糖/α-环糊精 < 16:1),产物的量有所增加,但是当摩尔比增加到一定程度,反应体系中产物产量增加不明显。因此采用摩尔比 16:1 较合适。

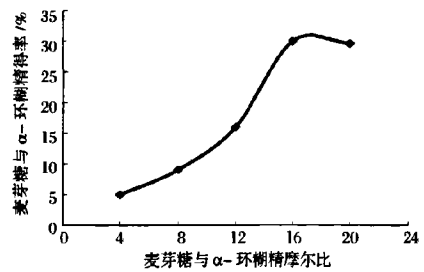


图 4 麦芽糖与 α-环糊精摩尔比对麦芽糖-α-环糊精得率的影响

2.3.2 反应时间对产量的影响

控制麦芽糖与 α-环糊精摩尔比 16:1,温度 58 ℃,pH 4.5 的条件下,加酶 400 U/g (α-环糊精),分别使反应时间为 16、20、24、28 和 32 h,结果如图 5 所示。反应 24 h 后产物达到稳定。普鲁兰酶的逆向合成需要较长时间,但并非越长越好,一是高温长时间反应,酶的催化活力会降低;二是随着底物的消耗,产物的生成速率将明显下降,综合考虑,确定 24 h 为反

应时间。

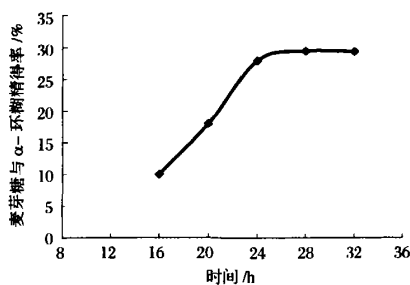


图5 反应时间对麦芽糖-α-环糊精得率的影响

2.3.3 反应温度对产量的影响

选择麦芽糖与α-环糊精摩尔比为16:1, pH 4.5, 加酶量400 U/gα-环糊精, 反应24 h, 在45-65℃时的产量情况, 结果如图6所示。温度在55-60℃时产量较高。温度对产量的影响主要有2点, 一是影响酶的催化活力, 在一定的温度范围内, 温度升高, 酶活力增强, 如果继续上升, 则破坏了酶蛋白的构象, 使得酶活降低, 转化率下降; 二是温度升高, 提高了麦芽糖和α-环糊精的溶解度, 使得反应液的粘度下降, 利于麦芽糖-α-环糊精的合成。为进一步提高产物得率, 选取58℃为最适反应温度。

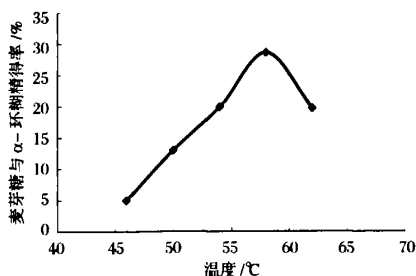


图6 反应温度对麦芽糖-α-环糊精得率的影响

2.3.4 加酶量对产量的影响

控制麦芽糖与α-环糊精摩尔比16:1, 温度58℃, pH 4.5, 分别添加酶100-500 U/g (α-环糊精), 反应24 h, 结果如图7所示。产量随着酶的量增加而不断增加, 在酶量达到400 U/g (α-环糊精)的时候, 随着酶量增加, 产量变化不大, 原因可能是由于加酶量远远大于底物含量使得反应呈现出一级动力学规律, 产物的量只与底物有关而于酶浓度无关^[12]。为保证获得最大底物产量并且节约酶资源, 选加酶量为400 U/g (α-环糊精)。

2.3.5 pH值对产量的影响

在麦芽糖与α-环糊精摩尔比为16:1, 温度58℃, 加酶量400 U/g (α-环糊精), pH分别为3.5、4、

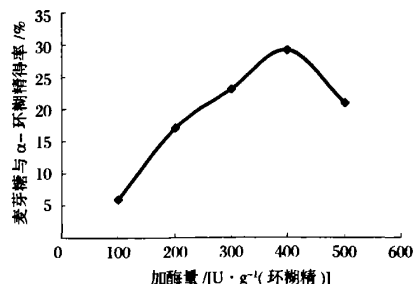


图7 加酶量对麦芽糖-α-环糊精得率的影响

4.5、5.5条件下反应24 h, 结果如图8。由图8可以看出, 反应的最适pH为4.5, 与普鲁兰酶的最适宜pH 4.3-4.5基本一致。

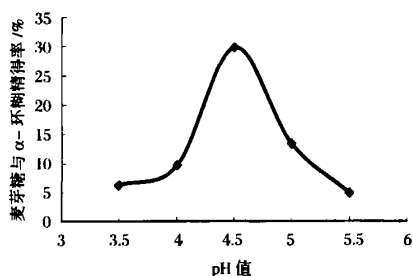


图8 pH对麦芽糖-α-环糊精得率的影响

3 结论

(1) 通过液质联用定性分析, 根据产物与标准品的保留时间的对比, 及对产物分子量的分析, 可以确定反应合成了麦芽糖-α-环糊精。

(2) 制备麦芽糖-α-环糊精的反应条件: 麦芽糖和α-环糊精的摩尔比为16:1, 反应时间24 h, 反应温度为58℃, 加酶量400 U/g (α-环糊精), pH 4.5。各因素之间相互作用对合成反应的影响需要更加深入的探讨。

参考文献

- [1] Hedge A R. Cyclodextrin, Properties and application, Starch hydrolysis products[M]. New York: VCH publishes, 1992: 319-333.
- [2] Szejtli J. Industrial application of cyclodextrin[J]. Inclusion compounds, 1984, 3: 331-390.
- [3] Ajisaka N, Hara K, Mikuni K, et al. Effects of branched cyclodextrins on the solubility and stability of terpenes[J]. Bioscience, Biotechnic Biochemistry, 2000, 64(4): 731-734.
- [4] Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin[J]. Chemistry Review, 1998, 98: 1743-1753.

- [5] Shiraishi T, Kusano S, Tsumuraya Y, et al. Synthesis of maltosyl cyclodextrin the reverse reaction of thermostable *Bacillus acidopulliticus* pullulanase [J]. *Agriculture Biological Chemistry*, 1989, 153: 2181 - 2188.
- [6] Yoshiyuki S, Mutsumi Sano, Tsuneo K. Preparation and Enzymatic Hydrolysis of Maltosyl- α -cyclodextrin [J]. *Agriculture Biological Chemistry*, 1985, 49 (12): 3391 - 3398.
- [7] Fukaya H, Iimura A, Hoshiko K, et al. A cyclosporin A/maltosyl- α -cyclodextrin complex for inhalation therapy of asthma [J]. *Europe Respir Review*, 2003, 22: 213 - 219.
- [8] Naomi O, Hidetoshi A, Fumitoshi H, et al. A Moderate Interaction of Maltosyl- α -cyclodextrin with Caco-2 Cells in Comparison with the Parent Cyclodextrin [J]. *Biological and Pharmaceutical Bull*, 2001, 24(4): 395 - 402.
- [9] Keiko I. Purification and some properties of a β -glucanase of germinating rice endosperm [J]. *Agriculture Biological Chemistry*, 1981, 45(12): 2683 - 2688.
- [10] Koizumi K, Utamura T. Isolation and characterization of branched cyclodextrins [J]. *Carbohydrate Research*, 1986, 153: 55 - 67.
- [11] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术 [M]. 上海: 科学技术出版社, 1987.
- [12] 王璋. 食品酶学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1991.

Synthesis of Maltosyl- α -cyclodextrin Through the Reverse Reaction of Pullulanase

Zhang Yongwei, Xu Xueming, Zhao Jianwei, Wang Jinpeng, Jin Zhengyu

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan

University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Mal (α -1-6) α -cyclodextrin was synthesized from maltose and α -cyclodextrin by using pullulanase. The reaction product was determined by TLC and HPLC-IR. Furthermore, mal- α -cyclodextrin has been separated by TLC. The factors which affect the formation of mal- α -cyclodextrin have been studied and the optimum conditions were introduced as follows: molar ratio of maltose to α -cyclodextrin was 16:1, reaction temperature at 58 °C, 400 U/g α -cyclodextrin, pH 4.5.

Key words maltose- α -cyclodextrin, maltose, α -cyclodextrin, pullulanase

会

讯

2009 中国国际食品安全与质量控制大会暨展览将举办

2009 中国国际食品安全与质量控制大会暨展览将于 2009 年 9 月 23 - 24 日在北京亮马河饭店举行。

“中国国际食品安全与质量控制会议”是由国家质检总局(AQSIQ)主办、由中国出入境检验检疫协会及世界展览服务有限公司共同承办的国际性会议,会议主要涉及:“全球食品安全管理体系及标准”、“食品安全的创新技术”、“食品安全培训和教育的基础设施”、“检查技术的发展”、“食品质量和营养”等多个方面议题。

2008 年有 60 几位国内外食品安全领域的专家、学者出席本次大会,并在大会就不同专题进行发言,其中包括:国家质量监督检验检疫总局总检验师项玉章、联合国粮农组织总干事助理何昌垂、欧洲食品安全局执行主席的特别顾问赫尔曼、国际食品保护协会执行董事戴维萨普、美国农业部副部长雷蒙德、欧盟消保总司司长马德林等官员。

另外,有超过 30 家海内外企业在同期举行的展览会上展示他们的技术、产品和服务。这些公司包括 3M 中国有限公司、GEFANUC 智能设备、SGS 集团(SGS 通标)、爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司、巴斯夫(中国)公司石油化工部、碧迪医疗器械(上海)有限公司、德国莱茵中国集团、帝斯曼(中国)有限公司、杜邦公司、加拿大石油公司、壳牌(中国)有限公司、梅特勒-托利多仪器(上海)、欧陆坊科技集团、全美科技集团、赛默飞世尔科技、上海禾邦认证有限公司、上海美全生物科技有限公司、生物梅里埃中国有限公司、食品安全实验室有限公司、沃特斯、艺康(中国)、盈飞无限管理软件(北京)有限公司、卓缤科技贸易(上海)有限公司、佐腾自动识别系统国际贸易(上海)有限公司、美国西北分析有限公司、InformationMediary 集团、AIB International、ROMERLABS。

联系电话:8610-62771798;联系人:耿慷婷;传真:8610-62771799;邮箱:suting.geng@infoexws.com

地址:北京海淀区清华大学液晶大楼 4504;邮编:100084;网站:www.chinafoodsafety.com