

D-塔格糖的分离纯化*

黄闻霞, 沐万孟, 江 波

(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 以化学法合成的 D-塔格糖为原料, 采用 Ca^{2+} 型离子交换层析、阴阳离子交换树脂脱盐脱色的方法分离纯化 D-塔格糖。 Ca^{2+} 型离子交换柱层析条件为: 柱温 70 °C, 流速 1.0 mL/min, 进样体积 20 mL, D-塔格糖回收率达到了 83%, 纯度达到 98%。经强酸性阳离子和弱碱性阴离子交换树脂一次串联脱盐脱色, 脱盐率达 93%, D-塔格糖回收率为 87%。将分离得到的样品浓缩、乙醇结晶获得晶体。通过红外光谱分析, 结果表明, 分离纯化后的产物是 D-塔格糖。

关键词 D-塔格糖, 分离, 纯化, 结晶

D-塔格糖是近年发现的一种具有特殊功能的甜味剂, 甜度与蔗糖相似, 并具有低能量、改善肠道菌群、降低血糖、抗龋齿等功能^[1]。2001 年被美国食品与药物管理局 (FDA) 确定为普遍公认安全食品 (GRAS)^[2], 随后 D-塔格糖在美国被用于健康饮料及酸奶、果汁等产品作为白糖的代用品。

D-塔格糖是 D-半乳糖的酮糖异构体, 自然界中极少存在, 因此, D-塔格糖的大量生产通常通过生物转化^[3]或者化学转化法^[4]获得。这 2 种方法生产 D-塔格糖的直接原料均是 D-半乳糖, 最终反应产物是 D-塔格糖和 D-半乳糖的混合物, D-塔格糖与其他单糖之间的分离方法的建立对于 D-塔格糖的批量生产将具有重要意义。

文献报道, 利用 Ca^{2+} 型离子交换树脂层析可实现许多单糖之间的分离, 例如葡萄糖和果糖^[5], 木糖和木糖醇^[6]等, 其分离的原理主要基于不同单糖成分与 Ca^{2+} 络合程度的差异。本文用 Ca^{2+} 型离子交换树脂柱层析分离 D-塔格糖和 D-半乳糖, 达到较好的效果。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

D-塔格糖标样为 Sigma 公司; DTF-01 Ca^{2+} 型分离树脂、离子交换树脂, 江苏苏青集团; 其他试剂均为分析纯试剂。

高效液相色谱仪器 (Waters2410), Waters 公司;

示差折光检测器, Waters 公司; Sugarpark1 糖柱, Waters 公司; 层析柱、恒流泵、DBS-100 自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; 721E 型可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; 超级恒温水浴, 上海市实验器械厂; Nicolet Nexus 470 型傅立叶变换红外光谱仪, Thermo Electron 公司; ZX98-1 旋转蒸发仪, 上海有机化学研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 D-塔格糖的化学法生成

D-塔格糖的化学合成是以 D-半乳糖为原料, 首先以 0.02 mol/L 的 CaCl_2 为催化剂, 使 20% 的 D-半乳糖与 3 mol/l 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 等体积混合反应 30 min, 生成金属氢氧化物-D-塔格糖复合物中间体沉淀; 离心去除沉淀, 以磷酸中和复合物中间体, 调节 pH 至 5.4, 得到 D-塔格糖与 D-半乳糖的混合物。

1.2.2 DTF-01 Ca^{2+} 型离子交换柱层析

本研究选择离子交换柱为一根长 1 m, 内径为 2 cm 的带有恒温夹套的层析柱。柱内填充处理好的 Ca^{2+} 型分离树脂, 柱体积为 180 mL, 控制不同的柱温 (50、60、70 和 80 °C), 不同的进样量 (10、20 和 30 mL), 不同的洗脱速率 (0.5、0.75 和 1.0 mL/min)。其中 D-塔格糖浓度为 21.80 mg/mL, D-半乳糖浓度为 15.02 mg/mL, 用去离子水洗脱。

1.2.3 离子交换柱脱盐脱色^[7]

在 2 根 $\Phi 25\text{mm} \times 300\text{mm}$ 的玻璃柱中, 分别装填再生好的阴离子交换树脂 313 和阳离子交换树脂 001 * 7。按先阳后阴的方式连接并用去离子水平衡。待树脂平衡后将糖液泵入, 进行脱盐与脱色。控制样品流速 1.0 mL/min, 进样体积 20 mL, 柱体积分别为 50 mL。用去离子水洗脱, 收集样品。

第一作者: 硕士研究生 (江波教授为通讯作者)。

* “十一五”国家 863 资助项目 (2006AA10Z334) 资助。

收稿日期: 2008-02-22, 改回日期: 2008-05-14

1.2.4 薄层层析检测

薄层层析法可检测洗脱样品的单糖组分^[8]。薄层层析条件如下,展开剂: $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{异丙醇}):V(\text{水})=6:3:1$;显色剂为苯胺-二苯胺-磷酸;85℃烘烤 10 min。 D -塔格糖显砖红色, D -半乳糖显蓝色。

1.2.5 D -塔格糖含量的测定

采用半胱氨酸-吡啶法^[9]。

1.2.6 总还原糖含量的测定

3,5-二硝基水杨酸比色法。

1.2.7 HPLC 检测分析

利用高效液相色谱法(HPLC)可定性和定量检测各洗脱样品的 D -塔格糖和 D -半乳糖^[9]。HPLC 条件:色谱柱: Sugarpack1 6.5 mm × 30 mm;流动相:纯水;检测器: Waters 2410 示差折光检测器;柱温:85℃;流速:0.4 mL/min;进样量:10 μL。

1.2.8 红外光谱分析

将收集到的 D -塔格糖样品,真空浓缩到 80 °Be,加入 2 倍体积的乙醇,加热,使其溶解。冷却后,放入晶种,然后放在 4℃ 的冰箱内,结晶 24~48 h。将结晶后得到的 D -塔格糖晶体,在 KBr 中研磨压片,红外光谱分析。

1.2.9 D -塔格糖与 D -半乳糖分离度的定义

总还原糖含量的测定采用 3,5-二硝基水杨酸法, D -塔格糖含量的测定采用半胱氨酸-吡啶法, D -半乳糖含量等于总还原糖含量减去 D -塔格糖含量, D -塔格糖与 D -半乳糖的分离度定义为^[5]:

$$R = \frac{2t_{R1} - t_{R2}}{\Delta t_{1/21} + \Delta t_{1/22}}$$

式中: t_{R1} 为 D -塔格糖的保留时间,min; t_{R2} 为 D -半乳糖的保留时间,min; $\Delta t_{1/21}$ 为 D -塔格糖色谱峰的半峰宽度,min; $\Delta t_{1/22}$ 为 D -半乳糖色谱峰的半峰宽度,min。

2 结果与讨论

2.1 样品制备结果

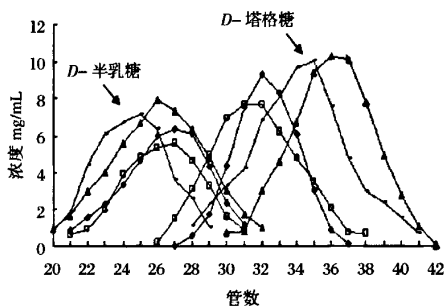
将化学法合成的 D -塔格糖离心 30min,转速为 5 000 r/min,得到 D -塔格糖粗液。经 HPLC 检测分析, D -塔格糖含量 21.80 mg/mL, D -半乳糖含量 15.02 mg/mL。

2.2 D -塔格糖的 Ca^{2+} 型离子交换树脂分离

2.2.1 温度对分离效果的影响

选择柱温分别为 50、60、70 和 80℃,上样体积为

20 mL,以去离子水作流动相,洗脱速率 1.0 mL/min,洗脱样品。利用部份收集器进行收集(每管收集 5 mL),测定 D -塔格糖和 D -半乳糖的含量,绘出分离曲线(见图 1),并计算各温度条件下的分离度。例如图 1,前一个波峰为 D -半乳糖,后一个波峰为 D -塔格糖,图中标 1 的曲线,21~31 管中含有 D -半乳糖,26~38 管中含有 D -塔格糖,26~31 管 2 种糖都含有。图 1 中,当柱温分别为 50、60、70 和 80℃时,分离度分别为 1.846、2.083、3.810 和 3.636。结果显示,随着柱温的增加,分离度增加较显著,并在 70℃时分离度达到最大。这可能因为提高柱温,缩短了组分在柱中的停留时间,使 D -塔格糖和 D -半乳糖的分离效果提高。从分离度和实际操作两方面考虑,选择 70℃为分离的最佳温度。

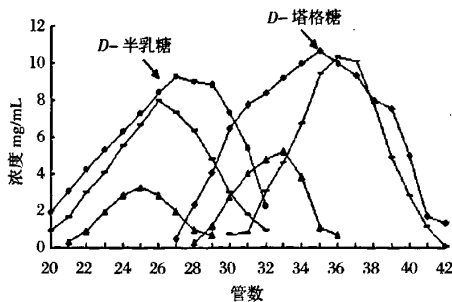


□—柱温 50℃时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线;■—柱温 60℃时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线;▲—柱温 70℃时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线。

图 1 不同柱温时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线

2.2.2 进样体积对分离效果的影响

柱温 70℃时,选择进样体积分别为 10、20 和 30 mL,用去离子水洗脱,洗脱速率为 1.0 mL/min, D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线如图 2 所示。



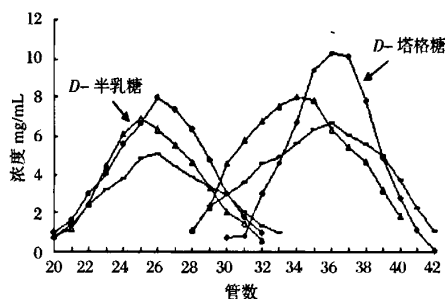
▲—上样体积 10 mL 时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线;■—上样体积 20 mL 时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线;□—上样体积 30 mL 时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线

图 2 不同上样体积时 D -塔格糖和 D -半乳糖分离曲线

当进样体积分别为 10、20、30 mL 时,分离度分别为 4.032、3.810、1.875。可见,进样体积为 10 mL 和 20 mL,其分离度相差不大;而随着进样体积的增加,分离度减小。这是因为上样量增加,加大了分离柱的负荷,2 种糖分离度下降。在不影响分离度条件下,尽可能加大进样体积,故选择 20 mL 进样体积较为合适。

2.2.3 洗脱速率对分离效果的影响

在柱温 70℃ 时,选择进样体积 20 mL,用去离子水洗脱,洗脱速率为 0.5、0.75 和 1.0 mL/min, *D*-塔格糖和 *D*-半乳糖分离曲线如图 3 所示。结果显示,洗脱速率分别为 0.5、0.75 和 1.0 mL/min 时,分离度分别为 3.332、3.535、3.81。分离度随着流速的提高而稍有增加,并在流速 1.0 mL/min 时达到较大值;同时结果显示,流速较低时,*D*-塔格糖的出峰峰形较平滑,而在 1.0 mL/min 时,其出峰较尖锐且对称。因此,选择洗脱速率为 1 mL/min 比较合适。



■—1—洗脱速率 0.5 mL/min 时 *D*-塔格糖和 *D*-半乳糖分离曲线;△—洗脱速率 0.75 mL/min 时 *D*-塔格糖和 *D*-半乳糖分离曲线;●—洗脱速率 1.0 mL/min 时 *D*-塔格糖和 *D*-半乳糖分离曲线

图 3 不同洗脱速率时 *D*-塔格糖和 *D*-半乳糖分离曲线

2.3 离子交换树脂脱盐脱色

收集 2.2 操作中分离出来的 *D*-塔格糖,通过 HPLC 检测,*D*-塔格糖纯度较高,但盐杂质较多。盐分的存在是由于化学生成 *D*-塔格糖过程中添加了较高浓度的盐,而这些盐在 Ca^{2+} 型离子交换柱层析分离过程中,没有和 *D*-塔格糖分离开。选择强酸性阳离子树脂 001*7 和弱碱性阴离子树脂 313 依次串联一次进行脱盐(见图 4、图 5)。*D*-塔格糖样品浓度为 21.80 mg/mL,进样体积为 20 mL,去离子水洗脱。样品中的阴阳离子分别被离子交换树脂吸附,*D*-塔格糖被洗脱,以达到脱盐的目的。获得的样品经过 HPLC 分析,结果显示脱盐率达到了 93%,*D*-塔格糖回收率达到了 87%。另外,离子交换树脂还有脱色

的作用,有色物质被离子交换树脂吸附,使得流出液基本没有颜色。

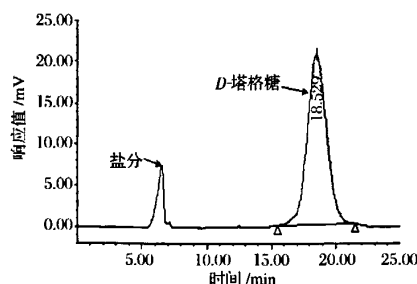


图 4 脱盐前 *D*-塔格糖的 HPLC 图

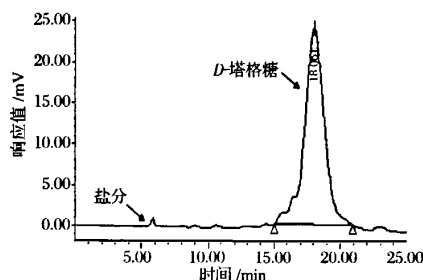
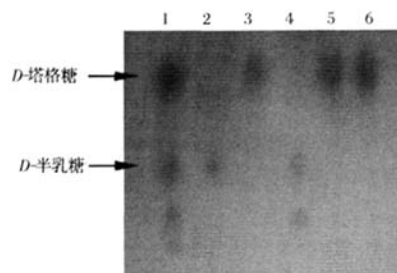


图 5 脱盐后 *D*-塔格糖的 HPLC 图

2.4 *D*-塔格糖的薄层层析分析

薄层层析可以定性和半定量检测 *D*-塔格糖与 *D*-半乳糖等单糖。在薄层层析结果中,*D*-塔格糖和 *D*-半乳糖分别显色为砖红色和蓝色,见图 6。由图 6 可知,经过层析分离,*D*-塔格糖和 *D*-半乳糖基本分开。



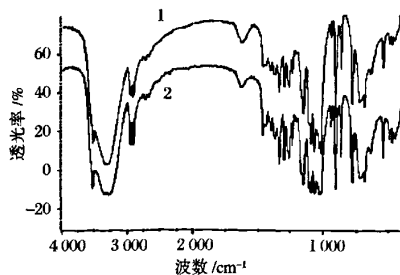
1—原液;2—*D*-半乳糖标样;3—*D*-塔格糖标样;4—柱层析分离收集的 *D*-半乳糖;5—柱层析分离收集的 *D*-塔格糖;6—脱盐后的 *D*-塔格糖

图 6 薄层层析检测单糖组分

2.5 红外光谱分析

将结晶后的 *D*-塔格糖样品和 *D*-塔格糖标样进行红外光谱鉴定,先观察最强的吸收峰位置和形状,然后再顺次检查中等强度峰和弱峰能否对应。从图 7 可以看出,标样和样品具有相同的特征吸收峰,位置和形状基本一致,谱图面貌基本相同,因此可以认

为,分离纯化后的产物是 *D*-塔格糖。



1—纯化样品;2—*D*-塔格糖标样

图7 *D*-塔格糖的傅里叶红外图谱

3 结 论

(1)首次用 Ca^{2+} 型离子交换树脂将化学法合成的 *D*-塔格糖进行了分离纯化。研究表明,柱温、进样体积和流速对 *D*-塔格糖和 *D*-半乳糖的分离度都有较显著的影响。

(2)典型的分离条件为,在内径 2 cm、长度为 1 m 的层析柱中,添加 180 mL DTF-01 型 Ca^{2+} 型分离树脂,选择柱温 70 ℃,流速为 1.0 mL/min,进样体积为 20 mL,*D*-塔格糖和 *D*-半乳糖的分离效果最适合工业生产,分离获得的 *D*-塔格糖纯度为 98%,回收率达到了 83%。

(3)分离后的 *D*-塔格糖可经强酸性阳离子和弱碱性阴离子交换树脂一次串联脱盐,脱盐率达 93%,*D*-塔格糖回收率为 87%。乙醇结晶 *D*-塔格糖,红外光谱对其晶体进行分析,标样和样品具有相同的特征吸收峰,位置和形状基本一致,谱图面貌基本相同。

Study on Separation and Purification of *D*-tagatose

Huang Wenxia, Mu Wanmeng, Jiang Bo

(Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT The technology of separation and purification of *D*-tagatose was established according to the methods of DTF-01 Ca^{2+} cation exchange chromatography, ion exchange resin desalting and bleaching. The optimal Ca^{2+} cation exchange chromatography conditions: column temperature of 70 ℃, the input volume of 20 mL and the flow velocity of 1.0 mL/min, in which the recovery of *D*-tagatose was 83% and its purity reached 98%. Desalting and bleaching with anion and cation exchange resin in series once, 93% salt was desalinated and the recovery of *D*-tagatose was 87%. Then *D*-tagatose was concentrated, and crystal was obtained through ethanol crystallization. From the infrared spectroscopy data, it showed that the crystal was *D*-tagatose.

Key words *D*-tagatose, separation, purification, crystallization

再次验证分离纯化后的产物是 *D*-塔格糖。该工艺操作简单,成本低,分离效果好,可用于产业化生产 *D*-塔格糖。

参 考 文 献

- 1 Levin G V, Zehner L R, Saunders J P. Sugar substitutes: their energy values, bulk characteristics and potential health benefits [J]. *Am J Clin Nutri* 1995,62(116):1~8
- 2 Bertelsen H, Jensen BB, Buemann B. D-Tagatose, a novel lowcalorie bulk sweetener with prebiotic properties [J]. *World Rev Nutr Diet*, 1999,85:98~109
- 3 Zhang H, Jiang B, Pan B. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing D-tagatose [J]. *World J. Microb. Biotech*, 2007, 23:641~646
- 4 Beadle J R, Saunderson J P, Wajada T J. Process for manufacturing tagatose [P]. US, 5002612. 1991-03-26
- 5 刘佐才,候平然.果糖与葡萄糖的分离 [J]. *北京理工大学学报*,2001,21(60):782~785
- 6 钱永,戴军,彭奇均.离子交换树脂层析法分离木糖醇结晶母液 [J]. *离子交换与吸附*,2005,21(2):112~120
- 7 洛铁男,李琳,董爱军,等.离子交换树脂在糖汁脱盐中的应用 [J]. *中国甜菜糖业*,2000,1:3~5
- 8 张华,江波,潘蓓蕾.生物转化生产塔格糖的乳酸菌筛选 [J]. *食品与发酵工业*,2006,32(6):5~7
- 9 翁玮慧,张华,江波.阿拉伯糖异构酶粗酶性质及其生物合成塔格糖的研究 [J]. *食品工业科技*,2006,27(1):158~162