

[研究简报]

麦芽糖基(α -1 \rightarrow 6) β -环糊精的 酶法合成和结构鉴定

崔波^{1,2}, 金征宇¹

(1. 江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 无锡 214036;

2. 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 济南 250353)

关键词 β -环糊精; 麦芽糖基(α -1 \rightarrow 6) β -环糊精; 地衣芽孢杆菌普鲁蓝酶

中图分类号 O624, TS245

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)02-0283-03

环糊精(β -环糊精最为常用)在食品、医药、农药、精细化工、分析检测、超分子化学等领域都具有十分广泛的用途. 但其低溶解性能影响了应用. 通过环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.

麦芽糖基(α -1 \rightarrow 6) β -环糊精[maltosyl(α -1 \rightarrow 6) β -cyclodextrins, Mal- β -CD]是 β -环糊精的一种衍生化产物^[1]. 它在水中的溶解度为 151 g/100 mL, 大大高于其对应的 β -环糊精的溶解度(1.85 g/100 mL^[2]). Mal- β -CD等环糊精的衍生物及其改性产物目前已成为国内外开发和研究的热点^[3-7]. Mal- α -CD的合成已有报道, 但产率都少于5%^[8]. 本实验采用地衣芽孢杆菌普鲁蓝酶合成 Mal- β -CD, 反应产物体系成分简单, 易于分离, Mal- β -CD的转化率可达到56%, 在国内外尚未见报道.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器 Agilent 1000Series 高效液相色谱仪, Alltech ELSD 2000ES 蒸发光散射检测器, Hypersil NH₂ 柱(4.6 mm \times 250 mm), 流动相: 乙腈-水(体积比 60:40), 流速 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L; Nicolet Nexus FTIR spectrometer 傅里叶变换红外光谱仪, Thermo Electron Corporation, 采用 KBr 压片; 美国 Bruker 公司 AV-400 核磁共振波谱仪, 以 TMS 为内标, D₂O 为溶剂, 在 25 $^{\circ}$ C 测定; API3000 串联质谱仪, 美国 ABI 公司.

地衣芽孢杆菌普鲁蓝酶, 广州裕立宝公司提供; 普鲁蓝, Mal- β -CD 标准品, Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 酶活测定 酶活参考 Keiko Iwaki 方法^[9]测定.

1.3 Mal- β -CD 的合成方法 以一定摩尔比的麦芽糖和 β -环状糊精为原料, 加热溶解, 冷却, 在设定的底物浓度、温度和适宜的反应体系 pH 值下, 加入定量的地衣芽孢杆菌酶普鲁蓝酶, 反应一段时间, 整个反应体系的体积为 50 mL. 反应结束后将反应混合液在 100 $^{\circ}$ C 灭酶 15 min, 稀释 10 倍后, 离心(10000g, 15 min), 取上清液, 采用 HPLC 法测定上清液中 Mal- β -CD 的浓度.

为确定不同的反应条件对 Mal- β -CD 产量的影响, 在固定其它条件不变的情况下, 分别考察温度(30~80 $^{\circ}$ C)、酶的浓度(50~300 U/g β -CD)、麦芽糖和 β -环状糊精的摩尔比(4~20:1)、底物质量分数(40%~85%)、反应体系 pH 值(3.5~5.5)及反应时间(24~84 h)对 Mal- β -CD 产量的影响, 确定了最佳反应条件.

1.4 Mal- β -CD 的分离及纯化 将离心上清液先经过凝胶过滤柱 Sephadex G-25(1.2 cm \times 80 cm)分离,

收稿日期: 2006-04-04.

基金项目: 江苏省自然科学基金(批准号: BK2004018)和山东省自然科学基金(批准号: Y2005B11)资助.

联系人简介: 金征宇(1960年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事食品新资源开发和碳水化合物研究.

E-mail: zjin088@yahoo.com.cn

流速为 10 mL/h, 用 2.5 mL/管收集洗脱液. 将分离得到的不同组分合并浓缩后, 再通过 Bio-gel P2 柱 (1.6 cm × 120 cm) 进一步纯化. 以水为洗脱剂, 流速为 30 mL/h. 用硫酸酚法测定每管收集液中的总糖浓度, 做出色谱图.

2 结果与讨论

2.1 温度的影响 随着反应体系温度的升高, Mal- β -CD 的产量也不断升高, 当反应温度为 70 °C 时, 产量达到最高. 反应温度超过 80 °C, 普鲁蓝酶变性失活, 产量开始下降, 表明反应的最适温度是 70 °C.

2.2 反应体系 pH 值的影响 反应体系 pH = 4.0 时比 pH = 3.5 时的产量有所提高, 但差别不显著; 产量在 pH = 4.5 时达到最高, 然后随着 pH 值的升高产量开始下降. 反应最适 pH 值为 4.5.

2.3 加酶量的影响 随着加酶量的增加, Mal- β -CD 的产量也在增加, 当加酶量达到 250 U/g β -CD 时, 产量随着加酶量的变化不再显著变化. 因此反应体系中的加酶量以 250 U/g 为宜.

2.4 底物摩尔比的影响 随着麦芽糖与 β -环糊精摩尔比的增加, Mal- β -CD 的产量也显著增加, 在 12:1 ~ 16:1 时达到最大, 然后随摩尔比的增加产量又开始变小. 最佳摩尔比以 12:1 ~ 16:1 为宜.

2.5 底物质量分数的影响 随着底物质量分数的增加, Mal- β -CD 的产量迅速增加, 在底物质量分数为 80% 时达到最高. 当底物质量分数达到 85% 时, 由于反应体系中底物不能充分溶解, 底物与酶无法混合均匀, Mal- β -CD 的产量降低. 因此, 底物的质量分数以 80% 为宜.

2.6 反应时间的影响 随着反应时间的增加, Mal- β -CD 的产量不断增加. 当反应时间达到 60 h 时, 反应达到平衡. 时间大于 60 h 后, Mal- β -CD 的产量无明显增加. 最佳反应时间以 60 h 为宜.

采用上述最佳优化条件, Mal- β -CD 的转化率可以达到 56%.

2.7 Mal- β -CD 的分离及纯化 反应产物离心所得上清液经 Sephadex G-25 柱分离后得到 2 个峰, 经过 HPLC 分析, 第一个较小的峰为 Mal- β -CD 和 β -CD 的混合物, 第二个峰为麦芽糖和葡萄糖的混合物. 将第一个峰收集到的组分合并浓缩, 再次经过 Bio-gel P2 凝胶过滤柱, 得到 C 和 D 两种组分. 经过 HPLC 分析, 组分 C 为 Mal- β -CD. 将组分 C 浓缩干燥后经 HPLC 测定纯度为 99.34%.

2.8 红外光谱分析 Mal- β -CD 和 β -CD 的红外光谱无明显区别, 都含有糖类的特征峰 3414 和 2928 cm^{-1} . 其中 1156 和 1079 cm^{-1} 为吡喃糖环内醚的 C—O—C 伸缩振动和吡喃环的 C—O—H 伸缩振动. 833 cm^{-1} 为吡喃糖的 α 型 C—H 弯曲振动的特征峰, 表明所含糖全都为 α 构型. 945, 703 和 576 cm^{-1} 是包括 α -1,4 在内的环糊精骨架振动. 这些共同特征说明 Mal- β -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.

2.9 质谱分析 在电喷雾质谱正离子谱中, 分离产物与 Na^+ , NH_4^+ 及 H^+ 分别形成两种加合离子 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 和 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 以及准分子离子 $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 分别为 1482.2, 1477.1 和 1460.0, 产物的分子量为 1459, 与理论计算所得到的 Mal- β -CD 的分子量一致.

2.10 核磁分析 在 ^{13}C NMR 谱中, 环糊精主环 (图 1) 中葡萄糖残基 (A ~ G) 的 C1、与环糊精主环以 α -1,6 连接的葡萄糖残基 H 的 C1 和与 H 以 α -1,4 连接的支链葡萄糖残基 I 的 C1 信号的化学位移 δ 分别在 101.28 ~ 101.43, 98.12 和 99.45 处. 葡萄糖残基 (A ~ G) 和 H 的 C4 的化学位移 δ 分别为 80.60 ~ 81.14 和 77.05; 糖残基 I 的 C4 由于远离主

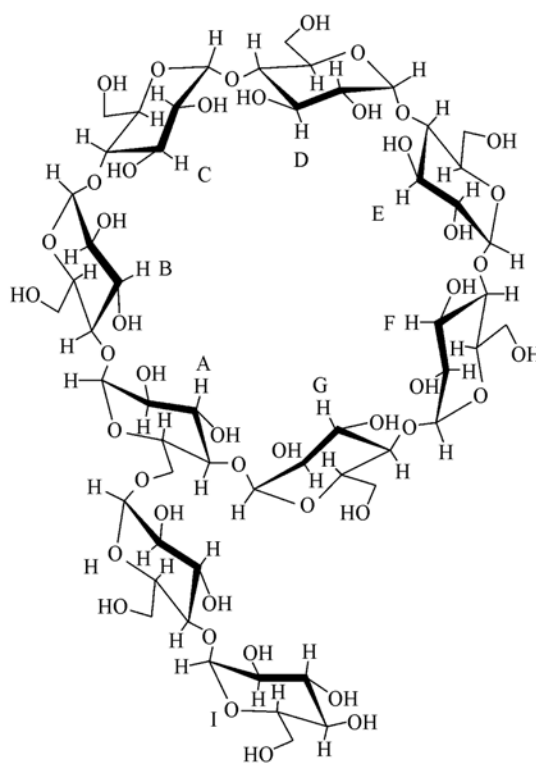


Fig. 1 Structure of Mal- β -CD

环, 化学位移在形空间 δ 68.79 处. 葡萄糖残基 A 的 C6 化学位移 δ 66.70 相对其它糖残基 C6 化学位移 δ 59.85 发生漂移, 证明侧链接在 A 上. 在 ^1H NMR 谱中, 葡萄糖残基(A~G), H 和 I 的 H1 的化学位移 δ 分别为 5.06, 4.94 和 5.36, 其强度积分比为 7:1:1, 即 3 种连接方式的糖残基的摩尔比为 7:1:1.

在 HMBC 谱中, 葡萄糖残基 A~G 之间的一个残基的 C1 与另外一个的 H4 产生耦合峰(δ 101.39, 3.58), 而 A~G 之间的一个葡萄糖残基的 C4 与另外一个残基的 H1 产生耦合峰(δ 80.79, 5.06), 表明 C1 与 H4 相连, 而 C4 与 H1 相连, 这与环糊精的主环糖残基以 α -1,4 首尾的连接方式相符. 糖残基 A 的 C6 与糖残基 H 的 H1 产生耦合峰(δ 66.70, 4.94), 表明 A 的 C6 与 H 的 H1 是相连的, 与 Mal- β -CD 结构中 A-H 之间的 α -1,6 糖苷键的连接方式相符. 耦合峰(δ 77.05, 5.36)表明糖残基 H 的 C4 与糖残基 I 的 H1 是相连的, 这也与 Mal- β -CD 结构中糖残基 H 和 I 之间的连接方式相符. 证明所合成的样品为 Mal- β -CD.

参 考 文 献

- [1] Sumio K., Yoshimichi Y., Shigetaka O. . Carbohydr. Res. [J], 1987, **159**: 303—313
- [2] Junchi A., Yasuhito T., Susumu H., *et al.* . Carbohydr. Res. [J], 1984, **131**: 175—179
- [3] ZHANG Qiang(张强), LIU Yu(刘育). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(3): 458—461
- [4] ZHOU Ai-Ling(周爱玲), WANG Xiu-Ling(王秀玲), HUANG Jun-Min(黄君岷), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(9): 1610—1614
- [5] Noriko A., Koji H., Katsuhiko M., *et al.* . Biosci. Biotech. Biochem. [J], 2000, **64**(4): 731—734
- [6] Yasuyo O., Kyoko K., Sumio K. . Carbohydr. Res. [J], 1994, **254**: 1—13
- [7] Noriyasu W., Kazutaka Y., Wakako T., *et al.* . J. Ferment. Bioeng. [J], 1997, **83**(1): 43—47
- [8] Shiraiishi T., Kusano S., Tsumuraya Y., *et al.* . Agric. Biol. Chem. [J], 1989, **153**: 2181—2188
- [9] Keiko I., Hidetsugu F. . Agric. Biol. Chem. [J], 1981, **45**(12): 2683—2688

Enzymatic Synthesis and Identification of Maltosyl(α -1 \rightarrow 6) β -cyclodextrin

CUI Bo^{1,2}, JIN Zheng-Yu^{1*}

(1. Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education,
Southern Youngtze University, Wuxi 214036, China;

2. College of Food and Biological Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250353, China)

Abstract Cyclodextrins are widely used for various purposes and limited because of its low solubility. Branched cyclodextrins have attracted more and more attention because of their many advantages such as higher solubility in water. In this study a new method for synthesizing maltosyl(α -1 \rightarrow 6) β -cyclodextrin with a high yield was described. Mal- β -CD was synthesized through the reverse reaction of *Bacillus licheniformis* pullulanase and identified. The factors which affect the formation of maltosyl(α -1 \rightarrow 6) β -cyclodextrin were studied and the optimum conditions were obtained as follows: 250 U/g β -CD of enzyme amount, molar ratio of maltose to β -CD 12:1—16:1, a substrate mass fraction of 80%, the pH of reaction mixture 4.5, reaction temperature 70 °C and reaction time 60 h respectively. The product was separated by Sephadex G25 column and further purified by Bio-gel P-2 column. Maltosyl(α -1 \rightarrow 6) β -cyclodextrin was identified by IR, ESI-MS and NMR. It was proved to be an effective method to synthesize maltosyl(α -1 \rightarrow 6) β -cyclodextrin by using *Bacillus licheniformis* pullulanase. The yield of Mal- β -CD was about 56% under the optimal conditions.

Keywords β -Cyclodextrins; Maltosyl(α -1 \rightarrow 6) β -cyclodextrin; *Bacillus licheniformis* pullulanase

(Ed.: H, J, Z)