

聚合度 11-15 大环糊精的分离

杨成¹, 刘书磊¹, 王水兴^{2*}

(1. 南昌大学环境与化学工程学院, 江西 南昌 330031;

2. 南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 利用 α -糖基转移酶催化玉米淀粉制备了纯度约为 46% 的大环糊精。同时利用 Bio-Gel P-4 (Fine, 45 ~ 90 μm) 柱层析对大环糊精进行初步分离, 通过硅胶 (200 ~ 300 目) 柱层析进一步分离, 用薄层色谱法和高效液相法对分离液进行鉴别和纯度分析, 分别得到纯度为 92.4%、90.2%、86.7%、84.5%、85.3% 的 11-15 单一聚合度大环糊精。

关键词: 大环糊精; 分离; 柱层析

中图分类号: TS236.9

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2014)12-0054-04

Isolation of cycloamylose with degree of polymerization between 11 and 15

YANG Cheng¹, LIU Shu-lei¹, WANG Shui-xing^{2*}

(1. School of Environment and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China;

2. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Cycloamylose with the purity about 46% is prepared by catalyzing the corn starch using α -glycosyltransferase. Preliminary separation of obtained cycloamylose is performed by Bio-Gel P-4 (Fine, 45-90) column chromatography. Silica gel is used to further purify the cycloamylose. TLC and HPLC are used to identify the separation process and analyze the purity of the resulting cycloamylose. It shows that the purity of cycloamylose with single degree of polymerization between 11 and 15 is 92.4%, 90.2%, 86.7%, 84.5% and 85.3%, respectively.

Key words: cycloamylose; separation; column chromatography

大环糊精是 9 个及以上的 $D-(+)$ -吡喃葡萄糖通过 $\alpha-1,4$ 糖苷键连接而成的环状麦芽多聚糖的总称, 由 $4-\alpha$ -糖基转移酶作用于直链淀粉产生, Freudenberg (1948) 首次发现并报道^[1]。近年来, 陆续发现了聚合度 (Degree of Polymerization, DP) 从 9 到几百的大环糊精, 并对其制备、分离、结构和功能、应用等方面进行了研究^[2-5]。

大环糊精在水中的溶解度均很高, 大部分溶解度都在 100 g/100 mL 以上, 但是也有少部分大环糊精的溶解度偏低, 如 CD_9 、 CD_{10} 、 CD_{14} 、 CD_{26} , 他们的溶解度分别为 8.19、2.82、2.30、22.4 g/100 mL^[6]。因此, 在大环糊精的制备、分离过程中, 很难通过结晶的方法获得大量的大环糊精, 尤其很难分离得到单一聚合度的大环糊精。另外, 由于大环糊精结构非常相近, 利用有机溶剂也不能将其单一聚合度的大环糊精分开。近年来研究发现, 可利用薄层色谱^[7-8]、高效液相色谱^[9]、高效阴离子交换色谱^[10-12]和毛细管电泳^[13]分离得到大环糊精, 但分离量非常有限, 不能满足对大环糊精日益增长的需

求。如 Michael 等^[14]利用颗粒度分别是 40 μm 和 47 μm 的聚丙烯酰胺凝胶将聚合度低于 60 的低聚糖分离开来, 使用的是低于 400 目的 Bio-Gel P-4 和 P-6 凝胶, 洗脱过程是在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下以水为流动相进行的, 该方法虽然不能分离得到单一聚合度的大环糊精, 但对大环糊精的分离提供了有力的依据。笔者采用聚丙烯酰胺凝胶柱和硅胶柱对大环糊精进行分离。

1 材料与仪器

1.1 实验材料与试剂

正丁醇、冰乙酸、浓硫酸 (均为分析纯), 天津市永大化学试剂有限公司生产; 乙腈、甲醇 (均为 HPLC 级), 天津市永大化学试剂有限公司生产; 蒽酮 (分析纯), 上海试剂三厂生产。

0.22 μm 微孔滤膜, 上海市新亚净化器件厂生产; 大孔柱层析硅胶 (200 ~ 300 目)、硅胶板 G, 青岛海洋化工厂分厂生产; Bio-Gel P-4 (Fine, 45 ~ 90 μm), BioRad 公司生产。

收稿日期: 2014-07-04

基金项目: 江西省教育厅资助项目 (GJJ11290)

作者简介: 杨成 (1987-), 男, 硕士生, 365366050@qq.com; 王水兴 (1965-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为生物转化与分离的研究, 通讯联系人, 271055528@qq.com。

1.2 实验仪器设备

层析柱 3 根(20 cm × 1.2 cm i. d.、70 cm × 1.2 cm i. d.、100 cm × 1.2 cm i. d.),上海厦美生化发展有限公司生产;BSZ-自动部分收集器、HL-2 恒流泵,上海沪西分析仪器厂有限公司生产;超纯水净化系统,Aquelix 5 型,Millipor 公司生产;旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;HB-ⅢA 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司生产;DZ-88 电热恒温真空干燥箱,上海跃进医疗器械厂生产;高效液相系统,12000 型,Agilent 公司生产;Eclipse XDB-C18 柱(5 μm;4.6 mm × 250 mm i. d.)、Spherisorb NH₂ 柱(5 μm;4.6 mm × 250 mm i. d.),大连依利特科学仪器有限公司生产。

2 实验方法

2.1 大环糊精的制备

在 α-糖基转移酶的作用下催化玉米淀粉反应,用酶量 20.8 U/g 淀粉,在 37.5℃ 下反应 10.3 h,反应结束沸水浴 20 min 终止反应,冷却至室温后加入一定量 β-淀粉酶和普鲁兰酶除去未反应的淀粉,50℃ 反应 5 h 后沸水浴 20 min 终止反应,6 000 g 离心 20 min 去除沉淀。将上清液旋转蒸发浓缩至适当体积后,向反应液中加入 5 倍体积的无水乙醇,4℃ 静置过夜,6 000 g 离心力离心 20 min,收集沉淀,之后将沉淀用少量无水乙醇洗涤 2 遍并离心,真空干燥,即得大环糊精粗品。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶柱层析

Bio-Gel gels 是由丙烯酰胺单体和 *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺在催化剂的作用下聚合形成的多孔凝胶,对于有一定大小差异的分子有很好的分离效果。凝胶柱的制备按照 Michael Jone 的方法^[15]。称取一定量的 Bio-Gel P-4 凝胶于三角瓶中,用超纯水将其悬浮室温溶胀 8 h,将上层悬浮的极细颗粒倒掉,加入适量超纯水,静置,倾倒,如此反复数次,直到没有悬浮的极细颗粒为止。将凝胶悬液真空脱气 20 min,之后用自动沉降法装柱到所需的高度。装柱完毕接上恒流泵在一定流速下平衡 12 h。层析柱为 100 cm × 1.2 cm i. d.、70 cm × 1.2 cm i. d. 各 1 根串连,凝胶装填高度分别为 95 cm 和 65 cm,总有效柱高为 160 cm,2 根凝胶柱之间用长 20 cm 的细管连接。

称取一定量的大环糊精粗品溶于超纯水,配制 0.2 g/mL 水溶液,用 0.22 μm 的混合纤维素酯微孔滤膜过滤。取 200 μL 大环糊精溶液上样,恒流泵

控制流速为 0.1 mL/min,超纯水为流动相在室温下洗脱,采用部分收集器每 5 min 收集 1 管,用 0.2% 的蒽酮-浓硫酸试剂确定收集的起始点和终点。收集结束后用高效液相色谱分析分离效果。

2.3 硅胶柱层析分离

称取适量柱层析硅胶于烧杯中,加入适量流动相与硅胶充分搅拌均匀,之后用超声波进行 10 min 脱气处理并不断搅拌,将处理完毕的硅胶悬浮液用自然沉降法进行湿法装柱,层析柱为 20 cm × 1.2 cm i. d.,有效柱高为 18 cm。

量取经蒽酮-浓硫酸法测得的聚合度 11-15 的大环糊精水溶液 0.1 g,旋转蒸发至适当体积后加入 0.3 g 柱层析硅胶,继续旋转蒸发至恒重。称取 0.1 g 处理过的样品用适量流动相悬浮后上样。以 $V(\text{正丁醇}):V(\text{冰乙酸}):V(\text{水})=5:5:3$ 为流动相,恒流泵控制流速为 0.12 mL/min,在室温下进行洗脱,采用部分收集器每 5 min 收集 1 管,利用收集液点硅胶板显色确定收集的起始点和终点。收集结束后用高效液相色谱分析分离效果。

2.4 分离效果的检测

分别用薄层色谱法和高效液相法对柱层析收集液进行鉴别和纯度分析,以期找到聚合度 11-15 的单一聚合度大环糊精。

薄层色谱法的操作条件如下:以 $V(\text{正丁醇}):V(\text{冰乙酸}):V(\text{水})=5:5:3$ 为展开剂, $V(\text{浓硫酸}):V(\text{甲醇})=1:1$ 为显色剂,展开 3 次后喷雾显色,130℃ 烘烤 5 min。

高效液相色谱法的操作条件如下:Agilent G1362A 示差折光检测器(RID),Eclipse XDB-C18 柱(5 μm;4.6 mm × 150 mm i. d.)与 Spherisorb NH₂ 柱(5 μm;4.6 mm × 250 mm i. d.)通过 4 cm 的细管串联,柱温为 30℃,以 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=60:40$ 为流动相,上样量为 20 μL,流速为 1 mL/min。

3 结果分析

3.1 大环糊精粗品

反应液经 β-淀粉酶和普鲁兰酶消化处理后呈微黄色,煮沸离心之后可除去大部分变性蛋白,向浓缩液中加入 5 倍体积的无水乙醇后即出现少量沉淀,在 4℃ 低温下沉淀进一步增加,过夜离心,将洗涤 2 遍(以除去大环糊精中的水分,便于真空干燥)后的沉淀真空干燥即得大环糊精粗品,呈微黄色,经称重后计算得大环糊精的回收率约为 46%。

用高效液相法对大环糊精产品进行分析,结果

显示该产品中 β -环糊精含量最高,从 γ -环糊精开始随着聚合度的增加其含量逐渐降低,结果如图 1 所示。

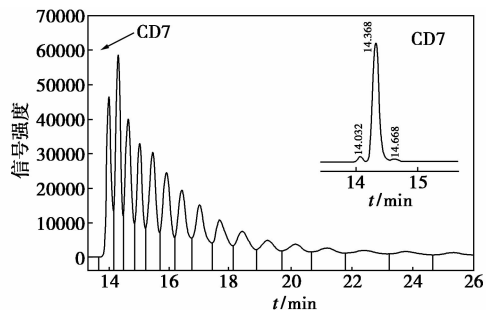


图 1 大环糊精产物和 β -环糊精标准品的 HPLC 图谱

3.2 聚丙烯酰胺凝胶柱层析

将分离收集到的洗脱液进行真空浓缩,浓缩至一定浓度后用 HPLC 分析其纯度,分离效果如表 1

表 1 大环糊精的纯度

大环糊精	CD11	CD12	CD13	CD14	CD15
纯度/%	71.0	68.3	66.9	66.1	66.5

所示,HPLC 的分析图如图 2 所示。由表 1 可以看出,随着聚合度的变大,环糊精的纯度呈下降的趋势,这主要是由于聚合度较小的环糊精在分离过程中走过了更长的路径,使得其能够得到更好的分离;而高聚合度的环糊精则由于所经过的路径较短,分离效果也有所下降。

3.3 硅胶柱层析分离

将收集到的洗脱液真空干燥,再用适量蒸馏水溶解(柱层析流动相影响 HPLC 分析),之后用 HPLC 分析其纯度,分离效果如表 2 所示,HPLC 的分析图如图 3 所示。由表 2 可以看出,随着聚合度的变大,环糊精的纯度呈下降的趋势,主要是由于聚合度大的环糊精极性更高,需要更长的分离时间,这就容易造成拖尾而影响分离效果。

表 2 大环糊精的纯度

大环糊精	CD11	CD12	CD13	CD14	CD15
纯度/%	92.4	90.2	86.7	84.5	85.3

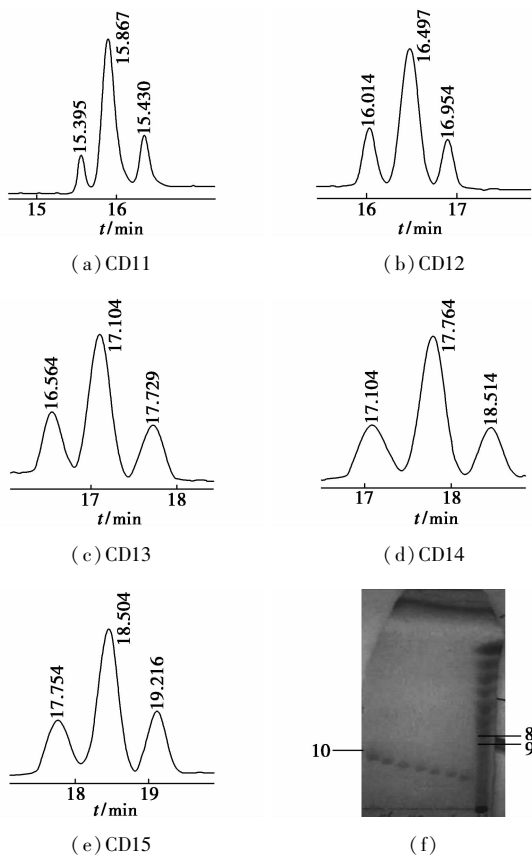


图 2 HPLC 检测 Bio-Gel P-4 柱分离效果 (a~e) 及 TLC 检测 Bio-Gel P-4 柱分离效果(f)

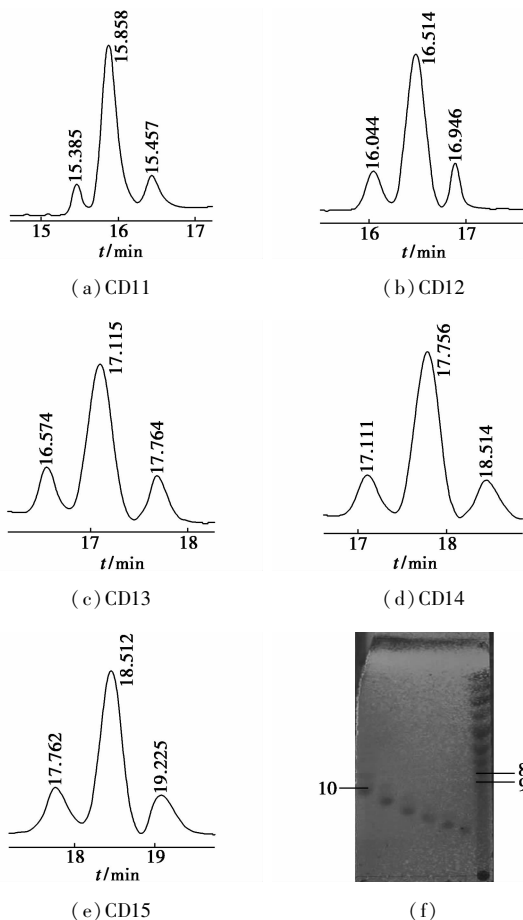


图 3 HPLC 检测硅胶柱分离效果图(a~e) 及 TLC 检测硅胶柱分离效果图(f)

4 结论

在大环糊精制备过程中,采用沸水浴灭活,离心除蛋白,5 倍体积乙醇沉淀,经真空干燥后制得大环糊精粗品,其回收率约为 46%,其产率低的主要原因是由于大环糊精的溶解度高,同时加入乙醇后溶液体积较大所致。

用一根有效柱高为 160 cm × 1.2 cm i. d. 的 Bio-Gel P-4 柱分离可得到纯度 66% ~ 71% 的大环糊精单体(DP 11-15),由于聚丙烯酰胺凝胶柱层析属于排阻层析,当样品经过凝胶时小分子所走的路径更长,后被洗脱出来,大分子先被洗脱出来,并且随着大环糊精聚合度的增大其相对分子质量也增大,所以聚合度低的环糊精得到更好的分离。而聚合度高的环糊精所经过的路程较短,分离效果也下降。另外,由于 1.2 cm 的柱子较细,其壁效应比较明显,这在一定程度上影响了分离效果,2 根柱子之间的细管在一定程度上也会降低分离效果。用一根 18 cm × 1.2 cm i. d. 的硅胶柱分离可得到纯度 84% ~ 92% 的大环糊精单体(DP 11-15),使用硅胶作为层析填料,根据物质在硅胶上吸附能力不同而得到分离,一般情况下极性大的物质更容易被吸附,后被洗脱下来,而极性小的物质不易被吸附,则先被洗脱下来,但由于聚合度大的环糊精极性高,在分离时容易造成拖尾而影响分离效果,这使得聚合度越大的环糊精分离效果越差。另外,由于相邻聚合度环糊精之间仅相差 1 个葡萄糖残基,而这相对于聚合度 > 10 的环糊精来说影响不足总量的 10%,同时随着聚合度的增大,相邻聚合度环糊精之间的极性相差逐渐变小,这也是造成高聚合度环糊精更难分开的原因,如果降低流动相极性会提高分离效果,但是考虑到大环糊精在酸性溶液中的半衰期较短,若能将乙酸用其他试剂代替更好。

参考文献

[1] Ueda H. Physicochemical properties and complex formation abilities of large-ring cyclodextrins[J]. Journal of Inclusion Phenomena and

Macrocyclic Chemistry, 2002, 44(12): 53-56.

- [2] Takaha T, Yanase M, Takata H, et al. Potato D-enzyme catalyzes the cyclization of amylase to produce cycloamylose, a novel cyclic glucan[J]. J Biol Chem, 1996, (271): 2902-2908.
- [3] Terada Y, Fujii Y, Takaha T, et al. Thermus aquaticus ATCC 33923 amyloamylase gene cloning and expression and enzyme characterization: Production of cycloamylose[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(3): 910-915.
- [4] Kamasaka H, Sugimoto K, Takata H, et al. Bacillus stearothermophilus neopullulanase selective hydrolysis of amylose to maltose in the presence of amylopectin[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(4): 1658-1664.
- [5] Machida S, Ogawa S, Xiaohua S, et al. Cycloamylose as an efficient artificial chaperone for protein refolding[J]. FEBS Lett, 2000, (486): 131-135.
- [6] 王金鹏. 4- α -糖基转移酶环化活性定向控制及其大环糊精产物的分离及应用研究[D]. 江苏: 江南大学, 2011.
- [7] 窦永泽, 林端方, 崔汉钧. 环糊精纸层析量斑定量分析法[J]. 工业微生物, 1988, 18(3): 36-38.
- [8] Kinalekar M S, Kulkarni S R, Vavia P R. Simultaneous determination of α , β and γ -cyclodextrins by LC[J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000, 22(4): 661-666.
- [9] Frijlink H W, Visser J, Drenth D F H. Determination of cyclodextrins in biological fluids by high-performance liquid chromatography with negative colorimetric detection using post-column complexation with phenolphthalein[J]. Journal of Chromatography (Biomedical Application), 1987, 415: 325-333.
- [10] 张斌, 夏永振, 范仲学, 等. 利用高效阴离子色谱快速检测筛选环糊精糖基转移酶生产菌[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(5): 95-98.
- [11] Okabe M, Tsuchiyama Y, Okamoto R. Development of a cyclodextrin production process using specific adsorbents[J]. Bioprocess Technol, 1993, 16: 109.
- [12] Sato M, Watanabe M, Nagano H. Selective degradation of β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin by co-digestion using a CGTase from Bacillus ohbensis and α -glucosidase for efficient α -cyclodextrin recovery[J]. Biotechnol Lett, 1994, 16: 703-708.
- [13] 边英奎, 张立臣. 环糊精及其衍生物在毛细管电泳中的研究进展[J]. 黑龙江环境通报, 2012, (2): 49-51.
- [14] Michael J, Jurgen S, et al. Gel chromatography of oligosaccharides up to dp60[J]. Journal of Chromatography A, 1982, 247: 281-288.
- [15] John M, Schmidt J, Wandrey C, et al. Gel chromatography of oligosaccharides up to DP 60[J]. Journal of Chromatography A, 1982, 247(2): 281-288. ■

浙江力普被认定为专利示范企业

浙江力普粉碎设备有限公司立足自身拥有的粉碎设备特色技术优势,开发出行业领先的纳米碳酸钙分散粉碎生产线。该公司日前被绍兴市科技局、经信委认定为“2014年绍兴市专利示范企业”,有效期3年。其开发的纳米级碳酸钙粉碎成套生产线能耗低、噪声

小,产出的纳米碳酸钙的粒径分布均匀,核心技术已申请7项国家专利保护。整条生产线集粉碎、分级、集料、除尘于一体,处于封闭状态下完成,不会产生粉尘污染,清洁环保,实现纳米钙的规模化生产,使碳酸钙产业向纳米级转型升级提供了技术装备支撑。(吴红富)