

微波辅助酶催化甜菊苷的转苷和水解

万会达

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 分别研究了微波辅助 α -环糊精转移酶(α -CGTase)催化甜菊苷(St)转苷, 和 β -半乳糖苷酶催化 St 水解的反应。实验表明, 微波能够加速来源于 *Paenibacillus macerans* JFB05-01 的 α -CGTase 催化 St 转苷反应, 催化效率提高了 21.7 倍; 但微波对 β -半乳糖苷酶催化 St 的水解反应的影响较小。 α -CGTase 的加酶量为 1 000 U/g 时, 反应 1 min, St 的转化率高达 71.6%, St-Glc 1 的产率为 23.7%。

关键词: 微波; 甜菊苷; 转苷; 水解

中图分类号: Q684; O629.13; Q556.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)12—1338—06

Microwave-Assisted Enzymatic Transglycosylation and Hydrolysis of Stevioside

WAN Huida

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Chemical and Materials Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Microwave-assisted enzymatic transglycosylation and hydrolysis of stevioside (St) were investigated using α -cyclodextrin glucanotransferase (α -CGTase) and β -galactosidase, respectively. Microwave irradiation could accelerate the transglycosylation of St using α -CGTase extracted from *Paenibacillus macerans* JFB05-01, and the catalytic efficiency was increased by 21.7 folds. However, little effect was observed when microwave irradiation was applied to the enzymatic hydrolysis of St using β -galactosidase. With 1 000 U/g of α -CGTase was loaded, the conversion of St could reach as high as 71.6% after 1 min and the yield of St-Glc 1 was 23.7% correspondingly.

Keywords: microwave, stevioside, transglycosylation, hydrolysis

甜菊糖是一类从甜叶菊叶子中提取的高甜度、低热值甜味剂, 是一种非常理想的蔗糖替代品, 被誉为世界“第三类糖源”^[1]。同时其还兼具生物活性和药用价值, 可以辅助治疗高血压、高血糖、糖尿病, 预防动脉硬化、龋齿, 也有消炎、抗菌、抗癌和增

强免疫力等功效^[2-4]。甜菊糖主要由 9 种甜味成分组成, 均含有相同的苷元——四环二萜类化合物甜菊醇(steviol), 仅 C19 和 C13 位上连接不同数量的葡萄糖基或鼠李糖基^[5]。甜菊糖中含量最高的为甜菊苷(13-[(2-O- β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl])

收稿日期: 2015-05-04

基金项目: 无锡市科技支撑计划——社会发展(CSE01N1239); 江南大学青年自主科研课题(1042050205141410)。

作者简介: 万会达(1984—), 男, 江苏盐城人, 工学博士, 副教授, 主要从事生物催化研究。E-mail: huidawan@jiangnan.edu.cn

oxy]kaur-16-en-18-oic acid, β -D-glucopyranosyl ester, stevioside, St)。甜菊糖虽然优点众多,但也存在缺陷,亟需解决,首当其冲就是后苦涩味。与精制、复配、加入掩盖剂等手段相比,酶催化转苷法可以从分子层面上去除后苦涩味^[6]。分子结构中糖基位置、数目、种类三者共同决定甜菊糖的甜味特质,C13 槐糖基是甜味的主要功能基团。对甜度和甜味有利的连接糖基种类的顺序是:果糖基>葡萄糖基>鼠李糖基或半乳糖基>其他疏水性分子基团^[7]。此外利用糖基水解酶可以选择性催化水解甜菊糖结构中已有的糖基,可以得到多种自然界中稀有次级苷,如悬钩子苷、异甜菊醇等,次级苷可以进一步衍生化,合成其他功能性糖苷^[8-9]。

微波是一种波长介于 1 mm~1 m 的电磁波。微波辐射(Microwave Irradiation, MI)作为一种加热方式,具有均匀、快速、高效等特点,已在提取、干燥、冶金、消解、灭菌、化学等领域中广泛应用^[10-13]。与常规加热(Conventional Heating, CH)相比,微波辐射不

仅能减少催化剂用量,加快反应速度,甚至改变选择性^[14-16]。这可以归结为热效应和非热效应:热效应是指微波辐射使反应物温度升高,从而加快反应速度的现象;非热效应是指除加热使温度升高带来的影响以外,MI 对某些反应具有提高平衡转化率、减少副产物、改变产物选择性等无法用单纯的致热效应来解释的其它效应^[17]。如微波辐射下,嘧啶被选择性合成 6-取代蝶呤,而在常规加热下产物则以 7-取代蝶呤为主^[18]。微波辐射也能促进糖苷酶催化糖苷合成或水解反应,如在 300 W 下,来源于 *Pyrococcus furiosus* 的 β -葡萄糖苷酶催化 oNPG,水解活性提高了 2.3 万倍^[19-20]。

已有的研究大多是使用家用微波炉或是在类似工作原理的微波反应器中进行,均为非连续多模微波辐射,微波场密度低,功率分布不均匀,导致实验重现性差,非热效应不明显。本文初探了单模连续微波辐射辅助 3 种糖苷酶分别催化甜菊苷水解和转苷反应,如图 1 所示。

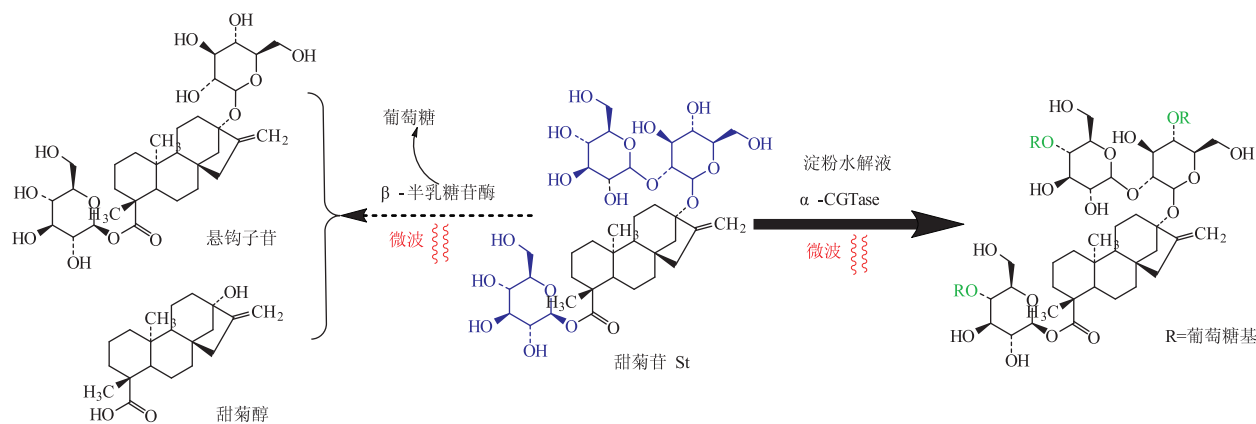


图 1 微波辅助糖苷酶催化甜菊苷水解和转苷反应图示

Fig. 1 Schematic illustration of microwave-assisted enzymatic transglycosylation and hydrolysis of stevioside

1 试剂与仪器

甜菊苷(纯度 95%, HPLC), 购于 GLG 生命科技集团; 甜菊苷标准品(纯度 98.5%, HPLC), 由常州市牛塘化工厂有限公司惠赠; 悬钩子苷标准品(纯度 98.2%, HPLC), 由广西师范大学陈全斌课题组惠赠; 甜菊醇标准品(纯度 98.5%, HPLC), 作者所在实验室自制; 来源于 *Bacillus Subtilis* 的 α -中温淀粉酶(4 000 U/g), 购于无锡雪梅酶制剂有限公司; 来源于软化类芽孢杆菌 *Paenibacillus macerans* JFB05-01 的 α -CGTase(187 U/mL), 来源于 *Sulfolobus* sp. 的 β -半乳糖苷酶(770 U/mL), 来源于 *Aspergillus* sp. 的 β -

半乳糖苷酶(14 kU/g), 由江南大学吴敬课题组提供; 玉米淀粉, 购于作者所在地超市; 邻硝基苯酚(oNP, 纯度 99%), 购于上海晶纯生化科技股份有限公司; 邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(oNPG, 纯度 99%), 购于上海宝曼生物科技有限公司; 有机纯试剂(AR), 购于中国医药(集团)上海化学试剂公司; 乙腈(色谱纯), 购于美国 J.T. Baker 公司; 超纯水, 作者所在实验室自制。

Discover 微波反应器, 购于美国 CEM 公司; WSC21070A 空气压缩机, 购于上海慧驰机电有限公司; HZ-8812S-B 往复式水浴摇床, 购于太仓市华利达实验设备有限公司; D-2000 Elite 日立 HPLC, 购

于天美(中国)科学仪器有限公司;DKB-501A 超级恒温水槽,购于上海森信实验仪器有限公司;81-2型磁力搅拌器,购于上海司乐仪器有限公司;紫外可见分光光度计,购于北京普析通用仪器有限公司;2695型液相色谱仪(二极管阵列检测器996),MALDI SYNAPT QToF MS液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪,购于美国Waters公司。

2 实验方法

2.1 酶活测定

α -CGTase 环化酶活的测定:用磷酸缓冲液(pH 6.0, 50 mmol/L)将酶液稀释一定倍数;在 5 mL 的离心管中加入 980 μ L 麦芽糊精溶液(质量分数 1%),放入 40 $^{\circ}$ C 水浴锅中恒温 10 min;加入 20 μ L 稀释到一定倍数的酶液,反应 10 min 后加入 1 mL HCl (1 mol/L)终止反应;10 min 后向反应液中加入 1 mL 甲基橙显色(0.1 mmol/L,缓冲液配制同上),室温静置 15~20 min 后用分光光度计在 505 nm 测定吸光度,根据标准 α -CD 标准曲线计算酶活。空白对照:先加入 1 mol/L 的 HCl 终止反应,而后再加酶液,其他条件相同。 α -CGTase 酶活定义:每分钟释放 1 μ mol α -CD 所需要的酶量定义为 1 个酶活单位。

来源于 *Aspergillus* sp. 的 β -半乳糖苷酶酶活测定:在 5 mL 的离心管中加入 1.8 mL 醋酸缓冲液(pH 4.6),再加入 100 μ L 稀释 100 倍的酶液(空白不加酶),37 $^{\circ}$ C 下预热 10 min;加入 oNPG (20 mmol/L)底物 100 μ L,计时反应 10 min;加入 1 mL Na_2CO_3 (1 mol/L)终止反应;在 420 nm 处测定其吸光度,根据邻硝基苯酚 oNP 标准曲线($y=0.229 \times \text{OD}$ 值, $R^2=0.9992$)计算酶活。酶活(U)定义为在上述反应条件下每分钟生成 1 μ mol oNP 所需要的酶量。

来源于 *Sulfolobus* sp. 的 β -半乳糖苷酶酶活测定:将缓冲液替换成 pH 6.0、50 mmol/L 的磷酸缓冲液,80 $^{\circ}$ C,其他测定条件同上。

2.2 微波辐射辅助甜菊苷的转苷反应

称取 2 g 淀粉加入 100 mL 水调成糊状,放入 90 $^{\circ}$ C 水浴中不断搅拌,直至成糊。将烧杯放入 70 $^{\circ}$ C 水浴中恒温后加入 2 mL α -淀粉酶液(4 U/mL)不断搅拌,液化 30 min。煮沸 3 min 灭活,冷却后定容至 100 mL。离心后上清液备用,沉淀为未溶解的淀粉,恒质量计算淀粉水解液的真实浓度。分别移取 10 mL St 溶液(20 mg/mL)和 10 mL 淀粉水解液(20 mg/mL)

于圆底烧瓶中,放入微波反应器;选择恒温模式,在一定温度下预热 30 min 后,改成恒定功率模式(20 W),加入 α -CGTase (10 U/g)后反应 1 min,并通过同步冷却控制温度恒定;将反应液煮沸灭除酶活,离心取上清液;HPLC 测定甜菊苷的含量,计算 St 转化率。

常规加热采用水浴加热,其他反应条件同上。

2.3 微波辐射辅助甜菊苷的水解反应

移取 10 mg/mL St 溶液于圆底烧瓶,放入微波反应器;选择恒温模式,在一定温度下预热 30 min,设定微波加热模式,加入 β -半乳糖苷酶 100 U/g,反应数分钟;取样作 HPLC 分析,计算 St 转化率。

常规加热采用水浴加热,其他反应条件同上。所有实验均做 3 次平行。

2.4 产物分析

LC-MS 分析转苷产物(St-Glc)组成^[21];根据 HPLC 计算 St 转化率和转苷产物产率:色谱柱为氨基柱(APS-2 HYPERSIL, 250 mm $\times$ 4.6 mm, Thermo, United States),检测波长 210 nm;乙腈/水梯度洗脱: $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=75:25$ (2 min)到 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=50:50$ (25 min),体积流量 1 mL/min。St 转化率

$$\alpha_s = ((C_0 - C_t) / C_0) \times 100\%,$$

式中: C_0 表示 St 初始质量浓度(mg/mL), C_t 表示 t h 时反应混合物中 St 的质量浓度(mg/mL)。根据 HPLC 外标曲线计算 St 的浓度。转苷产物的产率根据峰面积归一化计算得到。

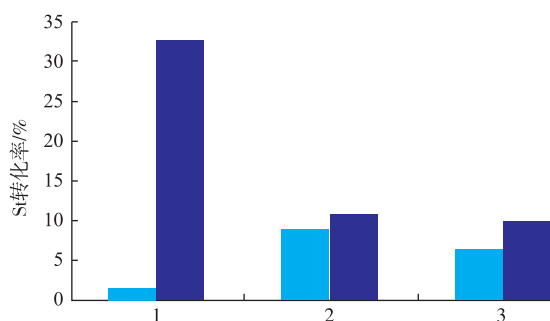
水解产物分析:色谱柱为 C18 柱,检测波长为 210 nm;乙腈/水梯度洗脱: $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=15:85$ (2 min)到 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=81:18$ (25 min),体积流量 1 mL/min;根据外标曲线求得悬钩子苷及甜菊醇产率。

3 结果与讨论

3.1 微波辐射对糖苷酶催化甜菊苷反应的作用

恒定功率和温度,考察 3 种糖苷酶催化 St 转苷和水解反应。来源于 *Paenibacillus macerans* JFB05-01 的 α -CGTase 催化 St 的转苷反应^[21],来源于 *Aspergillus* sp. 的 β -半乳糖苷酶可以催化 St 水解制备悬钩子苷^[9],来源于 *Sulfolobus* sp. 的 β -半乳糖苷酶可以催化 St 水解制备甜菊醇^[22]。相同条件下,与常规加热相比,微波功率为 15 W 时,来源于 *Paenibacillus macerans* JFB05-01 的 α -CGTase 催化

St 的转化率提高了 21.7 倍,1 min St 的转化率达 32.6%(图 2)。而其他两种 β -半乳糖苷酶在 MI 下并没有表现出较高的催化活性,MI 下反应 1 min,未检测出产物;延长反应时间至 0.5 h 后与相同条件下 CH 相比,St 的转化率仅提高 1%~3%。



注:15 W; 1. 来源于 *Paenibacillus macerans* JFB05-01 的 α -CGTase,60 $^{\circ}\text{C}$,淀粉水解液 15 mg/mL,St 10 mg/mL,15 U/g,1 min; 2. 来源于 *Aspergillus* sp. 的 β -半乳糖苷酶,55 $^{\circ}\text{C}$,St 10 mg/mL,5.25 kU/g,0.5 h; 3.来源于 *Sulfolobus* sp. 的 β -半乳糖苷酶,75 $^{\circ}\text{C}$,St 40 mg/mL,0.5 h。■ CH, ■ MI。

图 2 微波辐射辅助糖苷酶催化甜菊苷转苷和水解反应
Fig. 2 Microwave-assisted enzymatic transglycosylation and hydrolysis of stevioside

更换其他两种 MI 模式,继续考察来源于 *Sulfolobus* sp. 的 β -半乳糖苷酶催化 St 水解反应。图 3(a)为恒温模式(时间延长至 2 h);图 3(b)表示恒定功率下升温模式(从 25 $^{\circ}\text{C}$ 升至 75 $^{\circ}\text{C}$)。由图 3 可知,MI 对来源于 *Sulfolobus* sp. 的 β -半乳糖苷酶催化水解反应的加速作用仍然较弱。

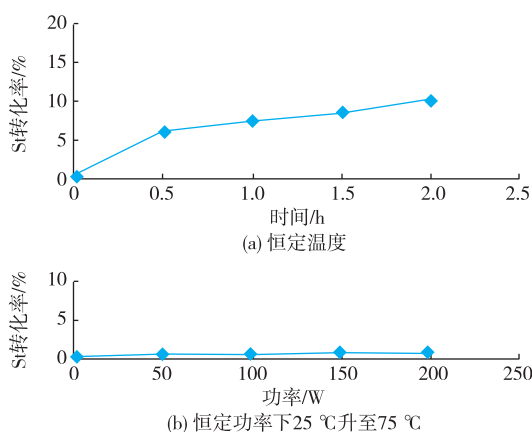
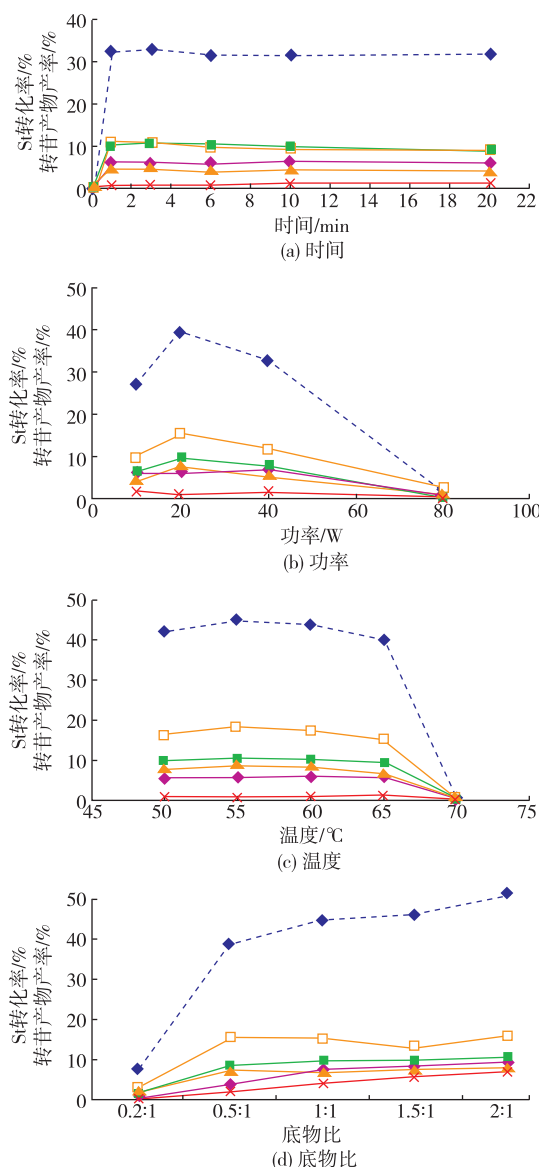


图 3 微波辐射辅助来源于 *Sulfolobus* sp. 的 β -半乳糖苷酶催化甜菊苷的水解反应

Fig. 3 Hydrolysis of stevioside using the β -galactosidase from *Sulfolobus* sp. under microwave irradiation

3.2 微波辅助 α -CGTase 催化甜菊苷的转苷反应

如图 4 所示,虚线表示 St 的转化率,实线表示各种转苷产物的产率;图 4(a)是 60 $^{\circ}\text{C}$,10 W,淀粉水解液 10 mg/mL,St 10 mg/mL,10 U/g;图 4(b)是 60 $^{\circ}\text{C}$,淀粉水解液 10 mg/mL,St 10 mg/mL,10 U/g,1 min;图 4(c)是 20 W,淀粉水解液 10 mg/mL,St 10 mg/mL,10 U/g,1 min;图 4(d)是 20 W,55 $^{\circ}\text{C}$,St 10 g/mL,10 U/g,1min;图 4(e)是 20 W,55 $^{\circ}\text{C}$,淀粉水解液 10 mg/mL,St 10 mg/mL,10 U/g,pH 5.0 50 mmol/L 醋酸缓冲液,pH 6~8 50 mmol/L 磷酸缓冲液;图 4(f)是 20 W,55 $^{\circ}\text{C}$, m (淀粉水解液): m (St)=1:1,10 U/g;图 3(g)是 20 W,55 $^{\circ}\text{C}$,淀粉水解液 10 mg/mL,St 10 mg/mL,1 min。



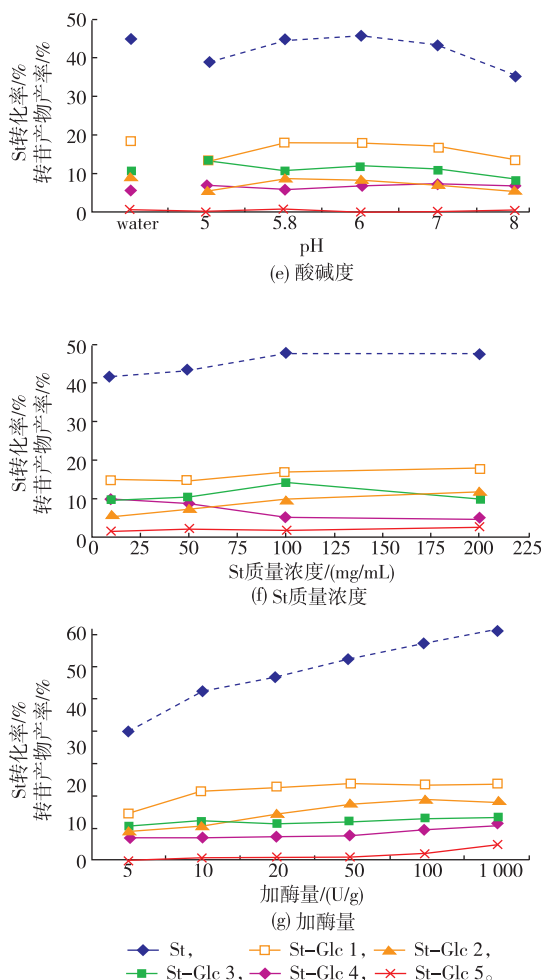


图4 微波辐射下 α -CGTase催化St转苷反应条件优化
Fig. 4 Optimal reaction conditions for stevioside transglycosylation with α -CGTase under microwave irradiation

以St转化率和产物中味质最佳的St-Glc 1为指标(Glc表示葡萄糖基,数字表示转苷个数),优化微波辅助 α -CGTase催化St转苷反应。反应1 min,转苷反应基本达到平衡,见图4(a);高功率和高温均会降低催化效率,使 α -CGTase活性受到抑制或失去,最佳功率和温度分别为20 W和55 $^{\circ}$ C,见图4(b)(c)。最优条件下,1 min,20 W,55 $^{\circ}$ C, m (淀粉水解液): m (St)=1:1,以水为溶剂,St初始底物质量浓度最高可达200 mg/mL,加酶量为10 U/g时,最终St转化率为52.5%,St-Glc 1的产率为21.5%;当加酶量为1 000 U/g,反应1 min,St的转化率高达71.6%,St-Glc 1的产率为23.7%。与CH相比,达到相同转化率的反应时间大大缩短,说明MI下更能促进高转苷产物的生成。

4 结语

本文初探了连续微波辐射对糖苷酶催化St的转苷和水解反应的影响。微波辐射能够提高来源于*Paenibacillus macerans* JFB05-01的 α -CGTase催化St转苷反应的效率。20 W,反应1 min,55 $^{\circ}$ C, m (淀粉水解液): m (St)=1:1,以水为溶剂,St初始底物质量浓度最高可达200 mg/mL,加酶量为10 U/g St时,转化率为52.5%,St-Glc 1的产率为21.5%;当加酶量为1 000 U/g,反应1 min St的转化率高达71.6%,St-Glc 1的产率为23.7%。与CH模式下相比,达到相同转化率的反应时间大大缩短,说明微波辐射下更能促进高转苷产物的生成。

参考文献:

- [1] Gonzalez C, Tapia M, Perez E, et al. Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review[J]. *Fruits*, 2014, 69(2): 127-141.
- [2] Brahmachari G, Mandal L C, Roy R, et al. Stevioside and related compounds-molecules of pharmaceutical promise: a critical overview[J]. *Archiv Der Pharmazie*, 2011, 344(1): 5-19.
- [3] Sharipova R R, Strobykina I Y, Mordovskoi G G, et al. Antituberculosis activity of glycosides from *Stevia rebaudiana* and hybrid compounds of steviolbioside and pyridinecarboxylic acid hydrazides [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2011, 46(6): 902-905.
- [4] Nie Y K, Wang Z Y, Lin J, et al. Stevioside protects LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Inflammation*, 2013, 36(1): 242-250.
- [5] Xu Z W, Li Y Q, Wang Y H, et al. Production of β -fructofuranosidase by *Arthrobacter* sp. and its application in the modification of stevioside and rebaudioside A[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2009, 47(2): 137-143.
- [6] Li S, Li W, Xiao Q Y, et al. Transglycosylation of stevioside to improve the edulcorant quality by lower substitution using cornstarch hydrolyzate and CGTase[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2-3): 2064-2069.

- [7] 王德骥. 再论甜菊糖苷的甜度、甜味和苦涩后味的成因机理[J]. 食品工业科技, 2010(5):417-420.
WANG Deji. Review of the cause of the mechanism of Sweetness, sweet and bitter after-taste of stevioside [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2010(5):417-420. (in Chinese)
- [8] Khattab S N, Massoud M I, Jad Y E S, et al. Production and physicochemical assessment of new stevia amino acid sweeteners from the natural stevioside[J]. **Food Chemistry**, 2015, 173:979-985.
- [9] Wan H D, Tao G J, Kim D, et al. Enzymatic preparation of a natural sweetener rubusoside from specific hydrolysis of stevioside with β -galactosidase from *Aspergillus* sp[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, 2012, 82:12-17.
- [10] Peng Z, Hwang J Y. Microwave-assisted metallurgy[J]. **International Materials Reviews**, 2015, 60(1):30-63.
- [11] Tan Y P, Chan E W C. Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and *Piper betle*[J]. **Food Bioscience**, 2014, 6:17-23.
- [12] 成向荣, 王伟, 施用晖, 等. 甘露寡糖中间体的微波辅助合成[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(1):21-27.
CHENG Xiangrong, WANG Wei, SHI Yonghui, et al. Microwave assisted synthesis of mannose oligosaccharide intermediates[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(1):21-27. (in Chinese)
- [13] 王婧杰, 陈玉霞, 穆立蕾. 紫椴花多糖的微波提取及体外抗氧化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(3):321-329.
WANG Jingjie, CHEN Yuxia, MU Liqiang. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from *tilia amurensis* rupr. flowers[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(3):321-329.
- [14] Loupy A, Perreux L, Liagre M, et al. Reactivity and selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction mechanisms[J]. **Pure and Applied Chemistry**, 2001, 73(1):161-166.
- [15] Favretto L, Nugent W A, Licini G. Highly regioselective microwave-assisted synthesis of enantiopure C_3 -symmetric trialkanolamines[J]. **Tetrahedron Letters**, 2002, 43(14):2581-2584.
- [16] Marwah P, Marwah A, Lardy H A. Microwave induced selective enolization of steroidal ketones and efficient acetylation of sterols in semisolid state[J]. **Tetrahedron**, 2003, 59(13):2273-2287.
- [17] 夏咏梅, 孙诗雨, 方云, 等. 微波辐射-酶耦合催化(MIECC)反应[J]. 化学进展, 2007(Z1):250-255.
XIA Yongmei, SUN Shiyu, FANG Yun, et al. Microwave irradiation-enzyme coupling catalysis [J]. **Progress in Chemistry**, 2007(Z1):250-255. (in Chinese)
- [18] Goswami S, Adak A K. The first microwave-assisted regiospecific synthesis of 6-substituted pterins [J]. **Tetrahedron Letters**, 2002, 43(46):8371-8373.
- [19] Kamerke C, Pattky M, Huhn C, et al. Synthesis of UDP-activated oligosaccharides with commercial β -galactosidase from *Bacillus circulans* under microwave irradiation[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, 2012, 79:27-34.
- [20] Young D D, Nichols J, Kelly R M, et al. Microwave activation of enzymatic catalysis [J]. **Journal of the American Chemical Society**, 2008, 130(31):10048-10049.
- [21] 万会达, 夏咏梅. 脱苦甜菊糖的酶法制备[J]. 食品与发酵工业, 2012(8):42-46.
WAN Huida, XIA Yongmei. Enzymatic debittering of steviol glycosides [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2012(8):42-46. (in Chinese)
- [22] Chen J M, Xia Y M, Wan H D, et al. A complete specific cleavage of glucosyl and ester linkages of stevioside for preparing steviol with a β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus* [J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, 2014, 105:126-131.