

木糖异构化木酮糖的制取及分离纯化

梁世中

(华南理工大学, 广州 510641)

木下晋一

(日本大阪大学)

提 要

木糖是仅次于葡萄糖的重要生物工程生产基质,但不能直接被包括啤酒酵母在内的绝大多数酵母利用,而其异构体——木酮糖可以被这些微生物代谢。本研究利用木糖异构酶使木糖异构化生成木酮糖,在 50℃ 和初始 pH=8.0 的条件下,木酮糖平衡转化率为 21.6%,且随反应温度升高而增大。应用液相色谱技术使木酮糖与木糖分离,经三级色谱分离,纯木酮糖的精制回收率达 43.8%。

关键词 木糖,异构化,木酮糖,液相色谱,分离纯化

材 料 与 方 法

一、利用木糖异构酶使 D-木糖转化成 D-木酮糖

1. 木糖异构化反应使用下列三种固定化酶

(1) Swetase (日本 NAGASE 生化学株式会社制)

(2) Toyo J020 Glucose Isomerase (日本东洋化学株式会社制)

(3) Sweetzyme Q (NOVO Industries, Denmark)

2. 木糖异构化反应溶液组成

D-木糖 30% (W/V), 固定化酶 3% (W/V), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ 。

此外,还添加 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0.1mol/L) 或添加 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1mol/L) 进行试验。

3. 异构化反应条件

考虑到酶的稳定性,除对比试验采用 40℃ 和 60℃ 反应温度外,其余试验均选定在 50℃ 下进行。初始 pH 为 8.0,恒温水浴摇动 (50r/min) 反应。

地球上存在的可再生资源中,植物纤维物质是最重要的一种。据估算,全球每年植物纤维物质的增殖量高达 1000 亿吨以上,仅我国每年的农业废弃物(包括甘蔗渣、稻草、玉米芯等)即高达 4 亿吨左右。在植物纤维原料水解产物所含的还原糖中,约 30% 是 D-木糖。所以,除了用量最大的葡萄糖外,木糖将是潜在的生物工程产业最重要的原料^[1]。

但是,包括啤酒酵母在内的大多数酵母不能利用木糖^[2],所以在以纤维质水解液或淀粉为原料的酒精发酵和面包酵母培养生产中,大量的木糖被浪费,且污染了环境。如果设法把木糖成分转化成酒精,则可大大提高原料的利用率,降低酒精生产成本,尤其对于开发利用蕴藏量最大的植物纤维质水解液作发酵生产的原料,具有重大的意义和广阔的应用前景。

近年来,用木糖做酒精发酵的研究十分盛行^[3]。因为啤酒酵母虽不能利用 D-木糖,但可直接代谢其异构体——D-木酮糖。所以 D-木酮糖将是十分重要的发酵基质。本研究利用木糖异构酶使 D-木糖异构化生成 D-木酮糖,应用液相色谱分离法分离纯化木酮糖。

二、D-木酮糖的分离纯化

1. 使用离子交换树脂: 阳离子交换树脂 DIAION SKIB, 日本三菱化学工业株式会社制造。使用前使其转变成 Ca^{2+} 型。

2. 色谱柱及分离装置 内径 $0.03\text{m} \times$ 高 0.9m 的玻璃柱, 树脂装填高度为 0.6m 。使用连续自动定量取样装置, 每支取样管分盛量为 5ml 。

3. 分离纯化方法和条件 利用液相色谱分离的区域分割 (Band-cut) 法使木酮糖分离纯化。由于在 50°C 反应温度下, D-木糖异构化成 D-木酮糖的平衡转化率只有 20% 左右, 为了获得浓度更高或纯粹的木酮糖, 必须设法从 D-木糖与 D-木酮糖混合液中把木酮糖分离出来。本研究经三级色谱分离, 使 D-木酮糖分离纯化。首先, 应用玻璃回转真空蒸发装置, 把浓度为 30% 的反应混合糖液浓缩至 60% 左右, 作为第一级色谱分离试样。色谱柱负荷为 10ml 浓糖液, 流动相为无离子纯水, 流量控制在 $3\text{ml}/\text{min}$ 左右。

三、测定方法

木糖和木酮糖的浓度采用高效液相色谱仪 (HPLC) 测定。所用的 HPLC 为 FP-210 型, 检测器为 RI (示差折光仪), 日本东洋曹达株式会社制造, 配以自动记录计算机 (CHROMA-TOPAC, C-R3A 型, 日本岛津制作所制造) 自动记录打印出测定结果。色谱柱为 Cosmosil 10NH_2 ($\phi 4.6 \times 250\text{mm}$)。内标物为葡萄糖。流动相为乙腈水溶液, 其浓度为 $\text{Acetonitrile}:\text{H}_2\text{O} = 70:30(\text{V}/\text{V})$, 使用前必须混合均匀, 并经真空抽滤充分脱气处理, 流动相流速为 $1.0\text{ml}/\text{min}$ 。

木糖和木酮糖混合液的浓度应稀释至 2% 左右, 然后与等体积的 2.0% 葡萄糖标准液混合均匀后作分析试样。

结果与讨论

一、木糖异构化与木酮糖的生成

1. 本试验条件下, 所用的三种异构酶的催化效率大体相同。但 TOYO J020 异构酶的活性最高, 所得的木酮糖转化率也最高, 如图 1 所

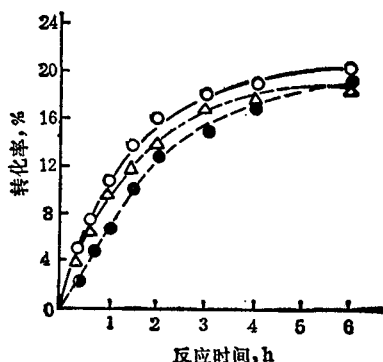


图 1 不同的酶对木糖异构化的影响

○——: TOYO J020 glucose isomerase
△---: Sweetzyme Q
●---: Swetase
○△● 所示均为木糖异构酶商品名称

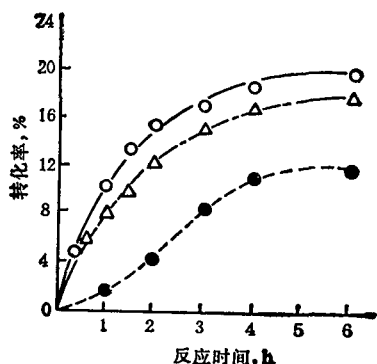


图 2 化学添加剂对异构化反应的影响

●——添加 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 硼酸钠
△——添加 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 氯化钙
○——无添加

示。故其余的试验均使用这种酶。

2. 在 50°C , 初始 $\text{pH} = 8.0$ 的条件下, 最初 2h 异构化反应速率高, 木酮糖的生成量已占平衡转化率的 80% , 如图 2 所示。

从图 2 还可看出, 在本试验条件下, 添加硼酸盐或氯化钙无助于提高异构化速率及木酮糖产率, 相反无添加时的反应速率和转化率均最大。而且, 考虑到木酮糖的分离纯化将采用以离子交换树脂为固定相的液相色谱分离法, 降低反应糖液中的离子或其他杂质的浓度将对维持柱分离效率和延长树脂的使用寿命有利, 所以不宜添加硼酸盐和氯化钙。

3. 温度对异构化反应的影响 在一定的范围内, 异构化反应是可逆反应, 木酮糖产率随温

度升高而增大。在本研究试验条件下, 40℃ 的木酮糖平衡转化率只有 16%, 而在 50℃ 和 60℃ 的反应温度下则分别达到 21.6% 和 25.9%。综合酶稳定性和反应速率, 应选择最佳反应温度。

二、木酮糖的分离纯化

1. 初级分离 木糖溶液异构化反应后, 木酮糖成分占总糖的 20% 左右, 经初级色谱分离, 其流出液的成分变化过程如图 3 所示。由图可知, 若用单级分离则未能获得纯的木酮糖, 所以必须进行二级或三级分离。

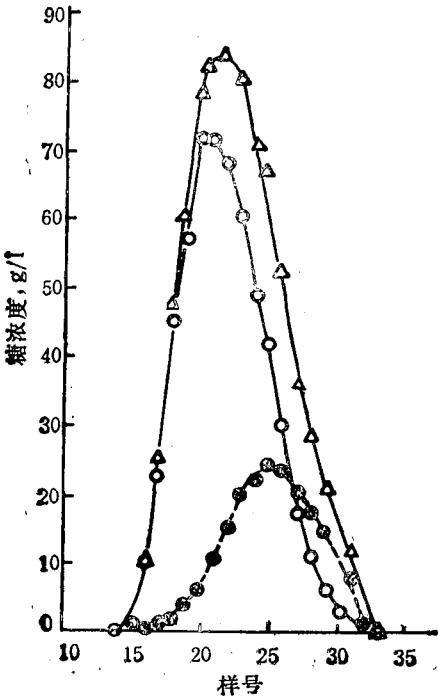


图 3 木糖与木酮糖液相色谱的初级分离
○——木糖 ●——木酮糖 △——总糖

经初级分离的试样, 按 D-木酮糖占总糖的百分比不同而分成五部分, 即: (A) 木酮糖占总糖的 15—30%, (B) 木酮糖占 30—50% 和 (C) 木酮糖占 50—90%, 舍去木酮糖含量不足 15% 的部分, 而木酮糖占 90% 以上部分经浓缩后可直接作发酵培养基。然后把糖液 B 浓缩至 60% 后进行第二级色谱分离。

2. 木酮糖的二级分离 木酮糖含量为 30—50% 的混合浓糖液, 经二级色谱分离后, 可获

得部分的纯木酮糖, 但大部分木酮糖仍和木糖混在一起, 其分离结果如图 4 所示。

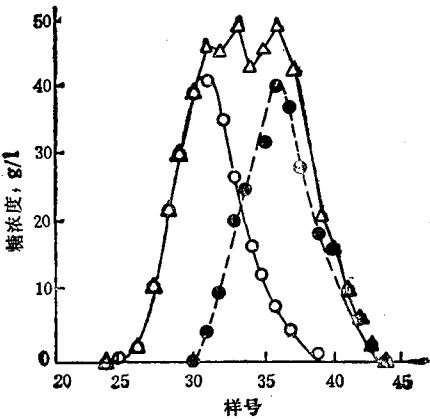


图 4 木酮糖与木糖色谱二级分离
○——木糖 ●——木酮糖 △——总糖

由图 4 可见, 二级分离后仍然可把试样划分为 A, B, C 部分及木酮糖含量小于 15% 和大于 90% 等五部分。取出 C 部分与一级分离所得的 C 部分混合, 浓缩后进行三级分离。

3. 木酮糖的三级分离 木酮糖含量为 50—90% 的 C 糖液经三级色谱分离所得的实验结果如图 5 所示。由此图可知, 从第 36 号样开始, 以后的糖液单含木酮糖, 经浓缩结晶后可得纯的木酮糖, 达到了纯化的目的。当然, 若从酵母发酵酒精或生产单细胞蛋白考虑, 木酮糖纯度可不必达到 100%, 这样可提高生产效率, 降低成本。

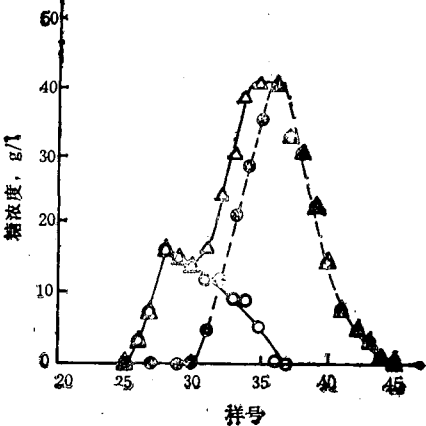


图 5 木酮糖与木糖色谱三级分离
○——木糖 ●——木酮糖 △——总糖

(下转第 302 页)

ESR 峰的存在,从而可以推测,在本实验条件下,敏化 PBN 光解反应主要是尚未转入三重激发态的 H_2TPP 分子。此外,这一实验结果也提示我们,在使用自旋捕捉剂 PBN 研究卟啉类化合物的光生物化学或光疗过程时,应当考虑到卟啉类化合物对 PBN 的光敏作用问题。

参 考 文 献

1 Felix C L *et al.* *Photochem Photobiol*, 1983;37:141

- 2 Richard P *et al.* *Photochem Photobiol*, 1983; 37:287
- 3 Mossoba M M *et al.* *Photochem Photobiol*, 1984; 39:731
- 4 Perkins M J. *Advan Phys Org Chem*, 1980; 17:1
- 5 周建威,徐广智,唐有祺. *物理化学学报*, 1985;1: 1
- 6 Emmons W D. *J Am Chem Soc*, 1957; 79: 5739
- 7 Blum A L *et al.* *J Am Chem Soc*, 1970; 92:1444
- 8 Cannistraro S *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1977; 74:1177
- 9 Cauzzo G *et al.* *Photochem Photobiol*, 1977;25:389

[本文于 1990 年 5 月 28 日收到,9 月 24 日修回]

INVESTIGATION ON THE FREE RADICALS PRODUCED IN THE PHOTOLYSIS OF TETRA-PHENYL-PORPHYRIN IN BENZENE SOLUTION BY ESR METHOD

Zhou Jianwei Chen Dewen Xu Guangzhi

(Institute of Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100080)

ABSTRACT

The active radicals produced from the photolysis of tetra -phenyl-porphyrin(H_2TPP) in benzene have been investigated by spin trapping-ESR technique. The ESR spectrum with 6 lines was detected in the presence of spin trap PBN, it means that spin adduct is $[HTPP-PBN]^{\cdot}$. The ESR signal with 6 lines was quenched by O_2 and NaI, it can be concluded, therefore, that the photolysis process of H_2TPP was accomplished via triplet excited state.

Key words tetra-phenyl-porphyrin, photolysis, ESR, spin trapping, free radical

(上接第 318 页)

综合上述结果可知,采用一次异构化反应和三级色谱分离方法,木酮糖的精制回收率达 43.8%,精制木酮糖对原料木糖的产率为 10.4%。

应用木糖异构酶可使木糖异构化成木酮糖。在 50℃ 和初始 $pH = 8$ 的条件下,平衡异构化率为 20—21.6%;反应温度升高,木酮糖的平衡转化率也随之增大。应用离子交换树脂作固定相的液相色谱法可使木糖与木酮糖分离,经三级分离可得到纯的木酮糖。通过进一

步优选分离性能更佳的离子交换树脂,优化分离工艺,可望使木糖异构化制取木酮糖的工艺实现工业化。

参 考 文 献

- 1 Cheng S G. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 1983; 6: 253
- 2 Slininger P J *et al.* *Enzyme Microb Technol*, 1987; 9 (1): 5
- 3 Kerstin Skoog, Barbel Hahn-Hageral. *Enzyme Microb Technol*, 1988; 10(2): 66

[本文于 1990 年 5 月 8 日收到]