la thellungiana Wolff. On the basis of spectral analysis (UV, IR, MS, ^1H NMR, ^1H - ^1H COSY, ^{13}C NMR, ^1H - ^{13}C COSY, DEPT), they were identified as erythro-5-n-pentyl-4-hydroxy tetrahydrofuran-2-one (I) and threo-5-n-pentyl-4-hydroxy tetrahydrofuran-2-one (II).

Key words *Pimpinella thellungiana* Wolff. erythro-5-n-pentyl-4-hydroxy tetrahydrofuran-2-one
threo-5-n-pentyl-4-hydroxy tetrahydrofuran-2-one

甜菊糖苷的结构修饰研究

I. α -葡萄糖基-甜菊糖苷的酶促合成研究

南开大学微生物学系(天津 300071) 佟树敏*
南开大学甜菊糖厂 蒋谷人 刘东

摘要 以玉米淀粉为材料,利用酶促修饰方法有效地将淀粉水解下来的葡萄糖基接枝到甜菊糖苷分子上,获得高甜度、无异味的 α -葡萄糖基-甜菊糖苷。甜度达到蔗糖的150倍。与日本同类产品比较, α -葡萄糖基-甜菊糖苷的转化率是其1.8倍。该项研究对于甜菊糖苷的深入研究具有理论和应用价值。

关键词 甜菊糖苷 酶促修饰 α -葡萄糖基-甜菊糖苷 α -糊精转移酶

甜味剂是人类生活所必需的。以往习惯食用的蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖等甜味剂,人体吸收后能产生大量的热能,使热量过剩,从而导致肥胖病、高血压、冠心病、脑血栓、糖尿病等病症。因此,世界各国人民越来越倾向于使用高甜度、低热值的天然甜味剂。

甜菊糖苷是从菊科植物甜叶菊 *Stevia rebaudiana* Bertoni 叶中提取出来的高甜度混合物,其甜度一般为蔗糖的200倍,溶解性、热稳定性、化学稳定性、非褐变性均佳,且高甜度、低热值、安全无毒,可在食品、饮料、医药、化妆品等行业中与其他甜味剂、有机酸、有机碱等混合使用。但美中不足的是当其单独使用时,有苦味、涩味,因而在使用中受到了影响。现已发现。当甜菊糖苷配基以鼠李糖基作为配糖体时,其甜菊糖苷即具有特殊的苦味、涩味,如何改良甜菊糖苷的品质,是众多学者的研究热点,改造甜菊糖苷的分子通常有化学修饰法和酶促修饰法两类,酶促修饰法不引入任何化学试剂,省去了繁杂

的纯化精制过程,食用安全可靠,我们采用酶促修饰法,合成新的 α -葡萄糖基-甜菊糖苷,是去除了异味的高甜度、低热值的天然甜味剂。

1 仪器与材料

1.1 仪器:721光电比色计;上海分析仪器厂;THZ88-I型多用途台式恒温振荡器;低温高速离心机:日立;高压液相色谱仪:美国Waters 510。

1.2 材料: β -环糊精葡萄糖基转移酶(β -cyclodextrin glycosyl transferase)自制产品; α -淀粉酶(α -amylase):酶制剂厂产品; β -淀粉酶(β -amylase):酶制剂厂产品;玉米淀粉:红旗淀粉厂产品;甜菊糖苷:南开大学甜菊糖厂产品;S-8吸附树脂:南开大学高分子所产品。

2 方法

2.1 β -环糊精葡萄糖基转移酶(CGTase)活性测定

2.1.1 原理:CGTase是一种多功能酶,同

* Address: Tong Shumin, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin

时具有水解淀粉为糊精、使小分子糊精环化、使葡萄糖基转移的能力。根据它所催化产生的 β -环糊精因失去了还原性末端而不能被 β -amylase 水解为葡萄糖,因而当与同等重量的淀粉对照组对比时,经 CGTase 催化生成部分 β -环糊精(β -CD)后的溶液用 β -amylase 水解,所生成的葡萄糖一定比对照组减少,此减少的量即为生成 β -CD 的量,每毫升酶液在 40 °C 时与淀粉溶液保温 2 h,所生成的 β -CD 的 mg 数即为该酶的活性单位,通常比它的环化酶活性小 10 倍,但此方法更直接地显示了它的环化能力。

2.1.2 试剂配制:

a) 0.2% 马铃薯淀粉溶液(现配现用); b) β -amylase 稀释至 2 万单位/mL; c) 0.02 mol/L pH6.5 磷酸缓冲液; d) 0.02 mol/L pH6.5 磷酸缓冲液; e) 3,5-二硝基水杨酸溶液配制:

甲液:称取 6.9 g 结晶酚,溶于 15.2 mL 10% 的 NaOH 溶液中,并用水稀至 69 mL,再加入 6.9 g 亚硫酸氢钠。

乙液:称取 225 g 酒石酸钾钠溶于 300 mL 10% 的 NaOH 溶液中,再加入 880 mL 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。

将甲、乙二液混合,在室温下放至 7 d~10 d 后使用。

2.1.3 CGTase 酶活测定方法:根据 3,5-二硝基水杨酸法绘制葡萄糖标准曲线,取 5 支大试管分别加入 1 000 μ g/mL 标准葡萄糖液及蒸馏水,得到从 100 μ g/mL 至 800 μ g/mL 标准管。分别吸取上述不同浓度的葡萄糖溶液 0.5 mL(空白用 0.5 mL 水),3,5-二硝基水杨酸试剂 0.5 mL,混合均匀,在沸水浴上加热 5 min,取出后用水冷却,加入 5 mL 蒸馏水,摇匀,用 721 分光光度计于 540 nm 处比色测定,以吸光度 OD 值为纵坐标,以葡萄糖毫克数为横坐标,作出标准曲线(比色杯厚度 1 cm)。

a) 配制 0.1% 的马铃薯淀粉溶液; b) CGTase 活性稀释 200 倍; c) 见表 1 顺序加样操作。

表 1 CGTase 酶活性测定操作程序

试剂	调 0 用	对照	测定 1	测定 2
0.1% 马铃薯淀粉	水 0.5 mL	水 0.5 mL	水 0.5 mL	水 0.5 mL
稀释 200 倍 CGTase	水 0.1 mL	水 0.1 mL	水 0.1 mL	水 0.1 mL
pH 6.5 磷酸缓冲液	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
40 °C 保温 2 h 100 °C 煮沸 10 min 冷却至室温				
pH 7.5 磷酸缓冲液	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
β -amylase(200 倍)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
50 °C, 反应 30 min 后				
3,5-二硝基水杨酸试剂	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

沸水浴中加热 5 min,取出后用水冷却,加入 2.4 mL 水摇匀,用 721 分光光度计于 540 nm 比色测定,测得 OD 值在葡萄糖标准曲线中查到葡萄糖的毫克数,乘稀释倍数,再乘 5 即得 CGTase 的活性单位。

2.2 CGTase 对淀粉水解下来的葡萄糖基向甜菊糖分子接枝实验^[4]

a) 称取玉米淀粉 30 g 用 30 mL 冷水调匀,缓慢倒入 80 mL 沸水中成糊状物。

b) 加入 0.005 mL α -amylase(1 500 U/mL),在 70 °C 水浴中液化 30 min。

c) 糊状物中加入溶解好的 2 g 甜菊糖同时加入活性为 320 U/mL 以上的 CGTase 4 mL,于 50 °C 恒温摇床上反应 48 h,速度为 180 次/min。

d) 反应后于沸水浴中 10 min,灭活。用高速冷冻离心机,4 °C、10 000 r/min,离心 10 min,弃上清液。沉淀分别用 87%、95% 乙醇各洗一遍,合并两次洗出液,离心弃沉淀。

e) 离心得到的上清液上 S-8 吸附树脂柱,水洗,再用 70% 乙醇洗,洗脱液蒸去乙醇,真空浓缩即得 α -葡萄糖基-甜菊糖苷,简称转化糖^[2]。

f) 洗沉淀的乙醇溶液,加热除乙醇,加水稀释,上 S-8 吸附树脂柱,洗出液真空浓缩,获得高纯度的转化糖。

2.3 高压液相色谱仪对转化糖的测定

a) 称取转化糖 60 mg 溶于 2 mL 水中作为测定样品; b) 称取甜菊糖 40 mg 溶于 2 mL 水中作为对照样品; c) 称取日本山阳国策产转化糖 60 mg 溶于 2 mL 水中作为参照样品。

3 结果

3.1 β -CGTase 的环化酶活性测定:酶液稀

释 200 倍,比色前反应液再稀释 5 倍,实验数据见表 2。

表 2 β -CGTase 环化酶活性测定数据

序号	OD 值	糖含量 (μg)	酶活 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0.27	0.235	235
2	0.135	0.345	345
3	0.137	0.340	340
4	0.230	0.295	295
5	0.155	0.330	330

3.2 CGTase 对甜菊糖苷的转化

玉米淀粉 $\xrightarrow{\text{CGTase}}$ 糊精 + 葡寡聚糖 + 葡萄糖

甜菊糖苷 + 葡萄糖 + 葡寡聚糖 $\xrightarrow{\text{CGTase}}$

α -葡寡聚糖-甜菊糖苷

剩余的玉米淀粉、糊精、葡寡聚糖、灭活的酶蛋白等由高速冷冻离心机除去,如有色素和小分子物质,可通过上 S-8 吸附树脂柱除去,转化糖苷用 70% 乙醇洗脱、浓缩、干燥后称重,并配成 20 mg/mL ~ 30 mg/mL 的溶液,进行高压液相色谱仪测定,其结果见表 3。

表 3 HPLC 各成分含量的百分比(根据各峰面积)

样品	非糖	双糖 Steviolbi	Dulc	Stevi	Rebau	CRebau	A 转化糖
甜菊糖苷	32.3	4.1	4.5	44			12.7
样品 1	24.5	5.24	12.9	9.9	5.8	5.9	35.5
样品 2	21	20.5	10.8	7	1.9	3.9	34.5
日本样品	36.5	6.1	5.1	17.2	5.4	5.2	24.5

转化糖苷和 Rebaudioside A 无苦涩味,比较甜美柔润。由上表可见:

对照样品甜菊糖苷中转化糖式 + A : S =

$$(0 + 12.7) : 44 = 0.29 : 1;$$

样品 1 中转化糖苷 + A : S = (35.5 + 5.9) :

$$9.9 = 4.18 : 1;$$

样品 2 中转化糖苷 + A : S = (34.5 + 3.9) :

$$7 = 5.49 : 1;$$

日本样品转化糖苷 + A : S = (24.5 + 5.2) :

$$17.2 = 1.73 : 1。$$

从上列数据表明,经转化后好糖的含量分别是日本样品的 2.4 倍、3.2 倍,根据液相

色谱图谱可见各吸收峰值的位置与我们转化糖的位置一致,图形相似,各成分基本相同。

4 讨论

4.1 反应底物是粗提甜菊糖苷,是多种成分的混合物,无需精制;所使用的玉米淀粉,价廉易购。反应经 CGTase 催化,在常压 50 °C 下一次反应完成。与化学转化相比,不加入任何化学试剂,在分离精制时,无需繁杂的过程和设备,操作比较简便。转化产品是安全无毒的天然食品,进一步放大实验后,本转化法可望用于工业生产。CGTase 国内已有生产,易购。

4.2 甜菊糖苷经 CGTase 催化生产 α -葡萄糖基-甜菊糖苷,原甜菊糖 A 苷 : S 苷 = 0.28 : 1。在转化糖中,(A 苷 + 转化糖苷) : S 苷 = 4.18 ~ 5.49 : 1。即在转化糖中,甜美柔润的好糖比转化前增加了 11 倍 ~ 14 倍。

4.3 将本实验产品与日本山阳国策精糖株式会社生产的 α -葡萄糖基-甜菊糖苷进行比较,二者液相色谱图各峰图形相似。但在日本的转化糖苷中(A 苷 + 转化糖) : S 苷 = 1.73 : 1。本实验的转化糖中,(A 苷 + 转化糖) : S 苷 = 4.18 ~ 5.49 : 1,分别比日本产品高 2.4 倍 ~ 3.2 倍。

4.4 转化糖经 α -amylase(即 α -葡萄糖淀粉酶)水解得 α -葡萄糖基和甜菊糖苷,该酶只专一水解 α -葡萄糖苷键,由此证明转化糖苷即为 α -葡萄糖基-甜菊糖苷。

参考文献

- 1 朱 俭,等. 生物化学实验. 上海:上海科技出版社, 1981:1
- 2 J P 昭 57-5663(1982)
- 3 J P 昭 57-86264(1982)
- 4 淡家林,等. 微生物学报,1984;24(1):80

(1998-03-23 收稿)

Structural Modification of Stevioside

1. Studies on the Enzymic Synthesis of α -Glucosyl-Stevioside

Tong Shumin(Department of Microbiology,Nankai University,Tianjin 300071)

Jiang Guren and Liu Dong(Stevioside Plant,Nankai University,Tianjin 300071)

Abstract The very sweet α -glucosyl-stevioside without peculiar smell can be synthesized by enzyme

promoted modification of stevioside, when the glucosyl group hydrolyzed from corn starch can be incorporated into the stevioside molecule. The sweetness of the α -glucosyl-stevioside formed is about 150 times that of sucrose. The rate of transformation is 1.8 times as compared with similar product reported elsewhere abroad. The present study provided a basis for the further study of stevioside both in theory and practice.

Key words stevioside enzymic modification α -glucosyl stevioside α -dextrin transferase

紫芝与赤芝挥发性成分的研究[△]

广州中医药大学中药资源研究室(510407) 丁平 徐鸿华 徐新春

灵芝为多孔菌科真菌灵芝(赤芝)*Ganoderma lucidum* (W. Curt. Fr) Karst. 及紫芝 *G. japonicum* (Fr.) Lloyd 的干燥子实体^[1], 是一种珍贵的中药材, 临床主要治疗肝病、胃溃疡、高血压、神经衰弱等。在过去的 20 年里, 灵芝的研究在药理作用、化学成分、临床应用等方面取得了很大进展, 其中所含化学成分较为复杂, 目前较明确地认为灵芝多糖是灵芝扶正固本的主要成分之一^[2]。此外, 尚含有 150 多种三萜类化合物^[3], 生物碱类、多种酶类、多肽、甾类、树脂、氨基酸等^[4,5,6]、非极性部分^[7]。另外, 还有一些文献^[6,8]报道灵芝含有挥发油, 尚未见具体报道灵芝所含挥发油的内容。为此, 我们在进行椴木栽培灵芝及其产品开发过程中, 对此内容进行了研究, 并对不同产地椴木栽培的赤芝进行了对比, 现将研究结果报道如下。

1 样品

紫芝 *Ganoderma japonicum* (Fr.) Lloyd 1 个样品, 为市售; 赤芝 *G. lucidum* (W. Curt. Fr) Karst. 3 个样品, 分别为广州(广州中医药大学实验地)、浙江、广东揭阳以椴木栽培的灵芝子实体, 共计 4 个样品, 以上样品经徐鸿华教授鉴定。

药材粗粉经水蒸气蒸馏、乙醚提取、无水硫酸钠脱水后得到挥发性成分, 为白色至浅黄色固体物。

2 GC-MS 实验条件

仪器: Incoe-50 GC-MS-DS (美国 Finigan 公司), DB-5 石英毛细管柱(30 m×0.5 mm) 50℃恒温 2 min 后, 以 5℃/min 速率程序升温至 220℃, 再恒温 20 min, 载气: He, 柱前压 98 kPa, 线速度 30 cm/min, 分流比 40:1。电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 离子源温度 170℃, 加速电压 40 kV, 扫描速度 1.5 s/dec, 扫描范围 30~500 质量单位。

3 结果与讨论

3.1 4 个样品, 按样品来源不同得到 4 类不同气相色谱图, 共得到 45 个峰, 鉴定了 31 个成分。用归一化法计算出有关组分的含量, 结果见表 1。

表 1 紫芝及不同产地赤芝挥发性成分含量测定结果(%)

峰号	化合物名称	紫芝 (广州)	赤芝 (浙江)	赤芝 (揭阳)	赤芝
1	α -庚烯醛(Z)	0.08			
2	辛醛	0.32	0.30		
3	己酸	1.53	2.61		1.76
4	α -辛烯醛(E)	0.14			0.10
5	庚酸	0.25			0.17
6	壬醛	0.60	0.64		0.51
7	2-壬烯醛	0.05			
8	辛酸	0.77	0.56		0.53
9	2-癸酮	0.09			
10	癸醛	0.15	0.12		0.10
11	2-癸烯醛(E)	0.28	0.29		0.23
12	壬酸	1.24	0.85	0.38	0.43
13	2-十一烯酮	0.23			0.08
14	2-十一烯醛	0.24			0.20
15	癸酸	0.38			0.10
16	8-羟基辛酸	0.47	0.28		0.47
17	2,6-二叔丁基对甲酚			0.14	
18	十一碳酸	0.19			
19	十二碳酸	0.78	0.43	0.36	0.31
20	反异槐香素		0.32		
21	柏木烯醇	0.38		0.38	0.13
22	壬二酸	0.17	1.62		
23	Z-3-萘本内酯			0.13	
24	十四碳酸异构体	0.13			
25	十四碳酸	2.44	2.62	2.62	2.85
26	非	0.13			
27	十五碳酸异构体	0.78			
28	十五碳酸	6.09	10.07	5.66	10.65
29	十五碳酸乙酯			0.11	
30	十八碳醛	0.22			
31	十六酸异构体	0.26			
32	9-十六碳烯酸	1.49	3.28	5.28	1.93
33	十六碳酸	46.63	49.70	32.30	48.01
34	十六酸乙酯			0.27	
35	十七碳酸	0.97			0.25
36	十八碳烯酸		13.86		
37	9,12-十八碳二烯酸(2,2)			26.88	
38	9-十八碳烯酸	14.68		19.63	17.04
39	十八碳酸		0.32		0.45

△广东省科委资助项目 9773003-02-01