

酶法制备 1-磷酸葡萄糖合成条件的响应曲面法优化

王晓娟, 靳利娥, 畅芬芬, 阎果兰

太原理工大学化学化工学院, 山西 太原 030024

王晓娟, 靳利娥, 畅芬芬, 等. 酶法制备 1-磷酸葡萄糖合成条件的响应曲面法优化. 生物工程学报, 2013, 29(1): 107–110.
Wang XJ, Jin LE, Chang FF, et al. Optimization of enzymatic preparation of glucose 1-phosphate by response surface methodology. Chin J Biotech, 2013, 29(1): 107–110.

摘要: 以葡萄糖为原料, 三聚磷酸钠为磷酸化试剂, 马铃薯磷酸化酶为催化剂, 制备 1-磷酸葡萄糖。利用 Box-Behnken 实验设计原理, 采用三因素三水平的响应面分析法, 以产物含量为响应值考察温度、物料比 (葡萄糖/三聚磷酸钠)、时间 3 个因素影响。采用氢核磁共振波谱仪对产品进行了分析。结果表明, 马铃薯磷酸化酶制备葡萄糖磷酸酯的最佳工艺条件为: 温度 35 °C, 葡萄糖与三聚磷酸钠物料比为 1.35 : 1 (mol/mol), 时间 19 h。

关键词: 马铃薯磷酸化酶, 1-磷酸葡萄糖, 响应曲面法

Optimization of enzymatic preparation of glucose 1-phosphate by response surface methodology

Xiaojuan Wang, Li'e Jin, Fenfen Chang, and Guolan Yan

College of Chemical Engineering and Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

Abstract: With glucose as substrate, sodium tripolyphosphate as the phosphorus acylating agent, and phosphorylase of *Solanum tuberosum* as the catalyst, glucose 1-phosphate was synthesized. Based on a three-level, three-variable Box-Behnken experimental design, response surface methodology was used to evaluate the effects of temperature, molar ratio of glucose to sodium tripolyphosphate and time on the production. The structure of the product was confirmed by ¹H NMR spectra. The results show that the optimum conditions were as follows: temperature 35 °C, molar ratio of glucose to sodium tripolyphosphate 1.35:1 and time 19 h.

Keywords: phosphorylase of *Solanum tuberosum*, glucose 1-phosphate, response surface methodology

葡萄糖磷酸酯具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌和免疫调节剂等生物活性, 人们已将其作为药物应用于临床^[1-2]。目前合成葡萄糖磷酸酯方法有化学法^[3-7]

和生物酶法^[8]。其中化学法存在选择性低、产物不单一等缺点, 而酶的专一性使许多用化学法需多步合成的反应可一步完成。目前对葡萄糖磷酸酯合成

Received: November 2, 2012; **Accepted:** November 30, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 51174144), Shanxi Province Science and Technology Development Program (No. 2011032110392).

Corresponding author: Li'e Jin. Tel/Fax: +86-351-6014476; E-mail: lej2003@163.com

国家自然科学基金 (No. 51174144), 山西省科学技术发展计划项目 (No. 2011032110392) 资助。

大多以淀粉为原料酶催化合成。但由于淀粉在热的碱性环境中易分解,而使得磷酸化产物复杂、纯度不高,对合成条件仅进行单因素优化^[9-10]。响应曲面法是以回归模型作为函数估算的工具,是一种优化反应条件的有效方法^[11-13]。为了提高产物的纯度,使产物单一,本实验以葡萄糖为底物,具有选择性较强的三聚磷酸钠为磷酸化试剂,马铃薯磷酸化酶为催化剂,合成 1-磷酸葡萄糖,以产物含量为标准响应曲面法优化合成条件,获得最优的合成工艺参数。寻找出了一条可信度高,试剂残留较少,纯度高的葡萄糖磷酸酯合成工艺路线。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

实验使用试剂均为分析纯;马铃薯 *Solanum tuberosum* 购于农贸市场。Bruker Biospin GmbH 核磁共振仪(德国),UV-9100 紫外可见分光光度计(北京瑞利)。

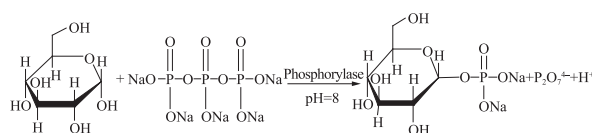
1.2 方法

1.2.1 制备 1-磷酸葡萄糖

磷酸化酶的提取:称 150 g 预冷 24 h 的马铃薯,粉碎,匀浆,按照文献[14]提取磷酸化酶。双缩脲法测定其蛋白含量为 77.93 mg/mL。

1-磷酸葡萄糖制备过程:将三聚磷酸钠和葡萄糖及提取的磷酸化酶混合,调 pH 为 8, 30 °C~40 °C 反应 12~24 h 煮沸,冷却,离心弃沉淀;上清液按照文献[14]进行粗制和精制得产物。

反应方程式如下:



1.2.2 1-磷酸葡萄糖磷含量的测定

按照文献[14]采用钼蓝标准曲线法,以标准磷含量(μg)为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘标准曲线,并测定 1-磷酸葡萄糖的纯度。得到标准曲线

方程为: $Y=0.0486X-0.00043$; $R^2=0.99968$ 。磷含量 $P(\%)$ 和产物含量 $W(\%)$ 计算公式如下:

$$P(\%)=(m_1-m_2)\times n/(m\times 10^6)\times 100$$

$$W(\%)=P(\%)/0.06607$$

式中 m_1 : 样品的磷含量(μg), m_2 : 对照磷含量(μg), m : 样品质量(g), n : 稀释倍数, 0.06607 表示每毫升 1-磷酸葡萄糖纯品磷含量。

1.2.3 响应曲面实验设计

实验考察单因素影响,选择了 pH,在此基础上根据响应面软件分析提供的模型,设温度、物料比(葡萄糖/三聚磷酸钠)、时间三因素分别为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 ,产物含量为响应值,设计三因素三水平的实验,考察其交互影响,实验因素与水平的取值见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Variables and levels of the three-variable, three-level Box-Behnken design

Level	X_1 (°C)	X_2 (mol/mol)	X_3 (h)
1	40	2:1	24
0	35	1.5:1	18
-1	30	1:1	12

2 结果与分析

2.1 响应曲面法优化制备工艺条件

利用 Minitab14 软件^[15]设计实验并进行试验,测定的各因素条件下产物含量见表 2。

对试验数据进行回归分析,得到产物含量在反应温度(X_1)、物料比(X_2)和反应时间(X_3)各因素条件下的二次多项回归模型为:

$$Y=68.0567-4.845X_1-4.635X_2+5.0875X_3-37.2633X_1^2-6.7283X_2^2-9.0733X_3^2+0.38X_1X_2-3.86X_1X_3+1.705X_2X_3$$

对该模型方程进行方差分析, $F=33.62>F_{0.05}(9,2)=10.38$, $P=0.001<0.01$, $R^2=0.984$,说明模型拟合程度良好,可用该模型预测制备 1-磷酸葡萄糖的工艺条件。Box-Beknhen 试验设计,得到各个因素对产物含量的交互影响的响应曲面图见图 1(A: 温度-时间, B: 时间-物料比, C: 温度-物料比)。

表 2 Box-Beknhen 试验设计及结果

Table 2 Experimental conditions and results of Box-Behnken design

Run	X_1	X_2	X_3	$W(\%)$
1	0	0	0	68.71
2	-1	1	0	26.94
3	1	-1	0	20.43
4	0	-1	-1	56.46
5	1	0	1	17.25
6	-1	0	-1	18.47
7	0	1	1	51.46
8	1	1	0	18.77
9	0	0	0	68.41
10	0	-1	1	64.17
11	1	0	-1	15.74
12	-1	0	1	35.42
13	-1	-1	0	30.12
14	0	1	-1	36.93
15	0	0	0	67.05

由图 1A 可看出,温度对产物含量的影响较强,温度过高和过低时产物含量均较低,当温度为 35 °C 时产物含量最高,与温度对产物含量相比,时间的改变对产物含量的影响不明显。当物料比在 1.35 :

1 (mol/mol), 时间在 19 h 附近可获得较高的产物含量 (图 1B)。当温度为 35 °C, 物料比为 1.35 : 1 (mol/mol)附近时可获得较高的产物含量 (图 1C)。

利用 Minitab14 软件的 Response Optimizer 优化的工艺条件: 温度 35 °C、时间 19 h、物料比 1.35 : 1, 在此条件下按照模拟方程计算出产物含量的预测值为 69.62%。为验证所得结果的可靠性,按照上述优化条件重复试验 3 次,测得的平均产物含量为 68.06%,与预测值相比,其相对误差为 2.29%。优化的 1-磷酸葡萄糖合成工艺参数和文献[6]相比,具有使用的温度低、选择性强、产物较纯、低毒的特点。

2.2 核磁共振波谱

图 2 为以氘代水 (纯度 99.9%) 为溶剂,频率为 600.13 MHz, Bruker Biospin GmbH 共振仪测试产物 ^1H NMR 图。由图 2 可知,质子数比大约为 5 : 2 : 1 : 3, 分别为产品糖环上的 5 个 H, 和 3 个羟基的 3 个 H, C_6 上的 2 个 H 和羟基的 1 个 H。结果与 Spectral Database for Organic Compounds 数据库一致,且符合反应后的糖环结构,环上仅有一个羟基被取代。表明产物单一,合成了 1-磷酸葡萄糖。

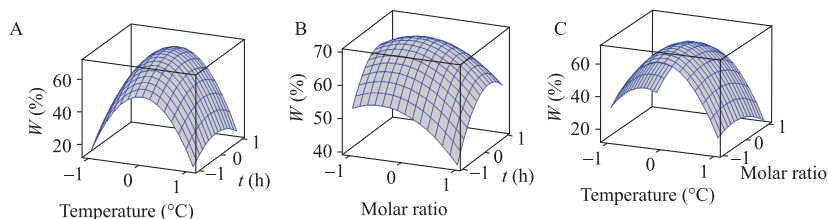


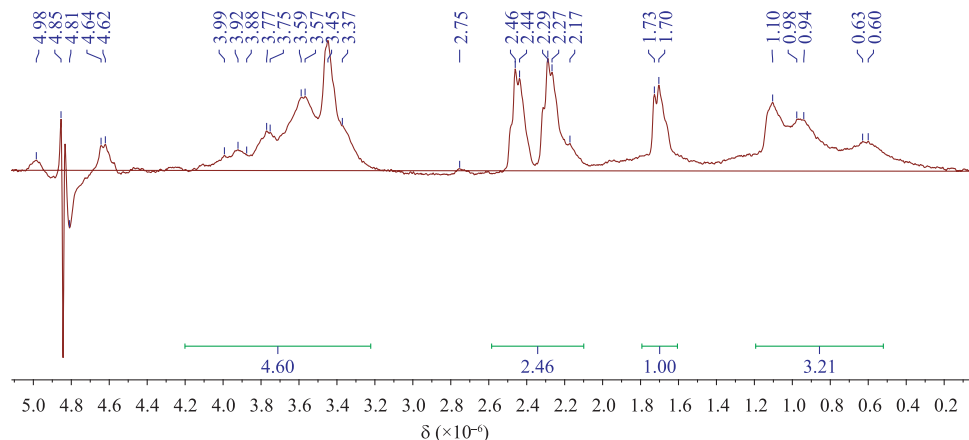
图 1 各因素对产物含量的交互影响响应曲面图

Fig. 1 Response surface of the effect on product contents about interactive influence. (A) Temperature-Time. (B) Time-Molar ratio. (C) Temperature-Molar ratio.

3 结论

利用响应曲面法对马铃薯磷酸化酶催化合成 1-磷酸葡萄糖酯的条件进行了优化。Minitab 软件对合成过程的影响因素进行了分析。考察了温度、物料比、时间的交互影响,并对模型进行了验证。采

用核磁共振仪对产物的结构进行了分析。确定了最佳合成条件是: 温度 35 °C, 葡萄糖与三聚磷酸钠物料比为 1.35 : 1 (mol/mol), 时间 19 h。经验证,实验值与方程预测值较为接近,因此,响应曲面法优化 1-磷酸葡萄糖的合成工艺参数准确可靠,纯度较高,可达 68.06%。核磁谱图也反映了产物单一。

图2 ^1H NMR 谱图Fig. 2 ^1H NMR spectra.

REFERENCES

- [1] Chen XM, Tian GY. Advances in studies on phosphorylation of polysaccharides. *Chin J Org Chem*, 2002, 22(11): 835–839 (in Chinese).
陈晓明, 田庚元. 多糖磷酸酯化的研究进展. *有机化学*, 2002, 22(11): 835–839.
- [2] Skaff DA, Kim CS, Tsai HJ, et al. Glucose 6-phosphate release of wild-type and mutant human brain hexokinases from *Mitochondria*. *J Biol Chem*, 2005, 280(46): 38403–38409.
- [3] Williams DL, McNamee RB, Jones EL, et al. A method for the solubilization of a (1→3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Res*, 1991, 219(14): 203–213.
- [4] Hu M, Hu WW, Xie BJ. Studies on esterification reaction of phosphate onto konjac glucomannan. *Res Dev*, 1990, 2(2): 8–14 (in Chinese).
胡敏, 胡慰望, 谢笔钧. 魔芋葡甘聚糖磷酸酯化反应的研究. *天然产物研究与开发*, 1990, 2(2): 8–14.
- [5] Inoue H, Nakayama H, Tsuhako M. A one-step phosphorylation of D-aldohehexoses and D-aldoheptoses with inorganic cyclo-triphosphate. *Carbohydr Res*, 2000, 324: 10–16.
- [6] He CB, Tang FX, Xiong HJ. Preparation and characteristics of phosphate monoesters of sweet potato starch. *J Fujian Agri Forest Univ: Nat Sci Ed*, 2009, 38(4): 412–416 (in Chinese).
何传波, 汤凤霞, 熊何健. 甘薯淀粉磷酸单酯的制备及特性. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2009, 38(4): 412–416.
- [7] Suflet DM, Chitanu GC, Desbrières J. Phosphorylated polysaccharides. 2. Synthesis and properties of phosphorylated dextran. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82: 1271–1277.
- [8] Song F, Guan Z, Raetz CR. Biosynthesis of undecaprenyl phosphate-galactosamine and undecaprenyl phosphate-glucose in *Francisella novicida*. *Biochemistry*, 2009, 48: 1173–1182.
- [9] Li Y. Study on the reaction of phosphate with starches. *Appl Chem Ind*, 2010, 39(8): 1201–1205 (in Chinese).
李秩. 糖的磷酸化反应研究. *应用化工*, 2010, 39(8): 1201–1205.
- [10] Meiczinger M, Dencs J, Marton G, et al. Investigation of reactions occurring at starch phosphorylation. *Ind Eng Chem Res*, 2005, 44: 9581–9585.
- [11] Sharma S, Malik A, Satya S. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05. *J Hazard Mater*, 2009, 164(2/3): 1198–1204.
- [12] Yuan C, Jin ZY. Optimization of hydroxypropyl- β -cyclodextrin preparation process by response surface method. *Food Sci*, 2007, 28(3): 147–150 (in Chinese).
袁超, 金征宇. 响应面法优化羟丙基- β -环糊精制备工艺. *食品科学*, 2007, 28(3): 147–150.
- [13] Chen MJ, Chen KN, Lin CW. Optimization on response surface models for the optimal manufacturing conditions of dairy tofu. *J Food Eng*, 2005, 68(4): 471–480.
- [14] Zhang LX, Zhang TF, Li LY. *Biological Experiment Method and Technology*. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1997: 9–10 (in Chinese).
张龙翔, 张庭芳, 李令媛. *生物实验方法和技术*. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 9–10.
- [15] Liu BG, Peng JH, Wan RD, et al. Optimization of preparing V_2O_5 by calcination from ammonium metavanadate using response surface methodology. *Trans Nonferrous Met Soc China*, 2011, 21: 673–678.

(本文责编 陈宏宇)