

嗜麦芽黄单胞菌游离细胞催化合成 α -熊果苷

王秀捧 张淑荣 刘春巧 刘春颖 张 鹏*

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)

摘要 研究了利用嗜麦芽黄单胞菌 BT-112 (*Xanthomonas maltophilia* BT-112) 游离细胞生物催化合成 α -熊果苷, 系统探讨了温度、对苯二酚浓度、对苯二酚与蔗糖摩尔比、反应时间、转速、细胞浓度、磷酸缓冲溶液 pH 值和浓度对反应转化率的影响。最佳反应条件为: 反应温度为 25℃, 菌体对对苯二酚的最大耐受度为 30mmol/L, 蔗糖和对苯二酚的摩尔比为 20:1, 反应时间为 45h, 摇床转速为 160r/min, 细胞浓度为 85g/L, 磷酸缓冲溶液浓度为 25mmol/L, pH 值为 8.0。在此条件下 α -熊果苷转化率高达 86.7%(以对苯二酚计算)。

关键词 α -熊果苷, 黄单胞菌, 发酵, 生物催化

中图分类号: TQ658.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0417-04

The Biosynthesis of α -arbutin by *Xanthomona maltophilia* BT-112

WANG Xiu-Peng ZHANG Shu-Rong LIU Chun-Qiao LIU Chun-Ying ZHANG Peng*

(The College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

Abstract α -arbutin is biosynthesized by whole cell method with *Xanthomona maltophilia* BT-112. The conditions for cell biosynthesized α -arbutin are investigated as follows: temperature, 25℃; concentration of hydroquinone, 30mmol/L; mol ratio of sucrose and hydroquinone, 20:1; time course of α -arbutin biosynthesis, 45 hours; rotational speed, 160r/min; concentration of *Xanthomona maltophilia* BT-112, 85g/L; concentration of K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer solution, 25mmol/L; pH of K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer solution, 8.0. Under the above optimal conditions, the maximum of molar conversion yield based on the amount of hydroquinone supplied reaches 86.7%.

Key words α -Arbutin, *Xanthomona maltophilia*, Fermentation, Biocatalyst

α -熊果苷(α -Arbutin)属氢醌苷化合物, 化学名为 4-羟基苯基- α -D-吡喃葡萄糖苷, 具有显著的抑制酪氨酸酶活性, 减少酪氨酸酶在皮肤中的沉积, 对皮肤有漂白、防色变和祛斑的功效, 是一种新兴的无刺激、无过敏、配伍性强的天然美白活性物质^[2,3]。在利用人体黑色素细胞比较 α -熊果苷与 β -熊果苷效果的实验中, Kazuhisa 等^[6,7]发现 α -熊果苷的美白效果是 β -熊果苷的 10 倍以上, 而且 α -熊果苷的美白机理是直接抑制酪氨酸酶活性, 不抑制人体细胞^[8], 然而相同浓度的 β -熊果苷却对人体细胞出现了抑制, 对使用者有一定的副作用。所以 α -熊果苷是一种更高效、更安全的美白剂^[4,5]。随着 α -熊果苷作为美白剂被越来越多人接受, 对 α -熊果苷的研究也越来越多。本文使用游离细胞催化法生产 α -

熊果苷在国内是创新的, 与直接利用发酵液相比, 它含杂质少, 减少了分离纯化步骤, 降低了生产成本, 而且解决了化学合成法所得产物多是 α 、 β -熊果苷的混合物导致的产品含量低、分离难的问题。因此游离细胞法生产 α -熊果苷具有重要的现实意义^[1]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *Xanthomonas maltophilia* BT-112, 由本实验室保存。

1.1.2 培养基

斜面培养基: 蔗糖 10g, 蛋白胨 10g, $MgSO_4$ 0.5g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05g, $ZnCl_2$ 0.01g,

* 通讯作者 Tel: 010-64434778, E-mail: zhangpeng@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2006-06-26, 修回日期: 2006-08-15

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, 琼脂 15g, 水定容到 1L, pH7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

发酵培养基 蔗糖 50g, 蛋白胨 10g, MgSO_4 0.5g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, ZnCl_2 0.01g, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, 维生素 B1 0.02g, 维生素 B12 0.05g, 烟酸 0.001g, 对氨基苯甲酸钠 0.002g, 水定容到 1L, pH7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.2 方法

1.2.1 培养方法: 以菌种斜面接种液体培养基, 160r/min, 30℃摇瓶培养 17h。

1.2.2 α -熊果苷的生物合成: 将上述发酵液 4200 r/min离心 30min 收集菌体, 用 25mmol/L 的磷酸缓冲溶液洗涤菌体两次, 加入反应物蔗糖和对苯二酚, 反应 45h。反应方程式:



对苯二酚的转化率:

$$\text{转化率}(\chi) = \text{M}_2/\text{M}_1 \times 100\%$$

其中 M_1 为加入到发酵液中对苯二酚的摩尔量, M_2 为反应后发酵液中熊果苷的摩尔量。

1.2.3 α -熊果苷的检测: 取 1mL 发酵液, 加入 4mL 甲醇, 在 4200r/min 条件下离心 20min。上清液用高效液相色谱检测。色谱柱: YWG-C18 柱, 4.6mm \times 25cm, ID = 5 μ m; 柱温: 25℃; 流动相: $\varphi(\text{H}_2\text{O})$: $\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 95\%:5\%$; 流速: 1mL/min; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 280nm; 进样量: 10 μ L。

1.2.4 数据处理和分析: 以下实验所得数据均重复 3 次, 然后取平均值。

2 结果与讨论

2.1 温度的影响

该反应体系不同温度对反应转化率的影响的实验结果(图 1)表明, α -熊果苷的最适反应温度为 25℃, 此时转化率可达 72.45%。主要有两方面原因, 其一, 一般提高温度有利于提高菌体中酶的活性, 但当反应温度过高时会使菌体及其酶失活, 且对苯二酚的氧化速度加快。分析 40℃时(反应后 45h)对苯二酚的残留量, 按转化率计算理论上对苯二酚应为 26.57mmol/L, 但实际检测为 7.42mmol/L。这说明大部分的对苯二酚不是转化为 α -熊果苷, 而是被氧化了, 结束导致催化能力下降。

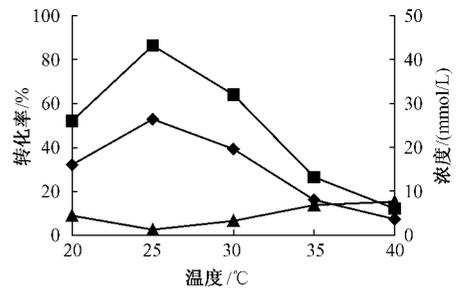


图 1 不同反应温度对反应转化率的影响

■ molar conversion, ▲ concentration of residual hydroquinone, ◆ concentration of arbutin

2.2 缓冲溶液体系 pH 对反应的影响

试验了不同 pH 值的磷酸缓冲溶液反应体系, 其它条件不变, 测定了 pH 值对全细胞催化反应的影响。从图 2 可以看出, 当磷酸缓冲溶液的 pH 值在 8.0 时, 转化率与在发酵液中转化率一样, 这说明黄单胞菌在 pH 值为 8.0 的缓冲溶液中, 酶活性最大, 且残余对苯二酚量最少。

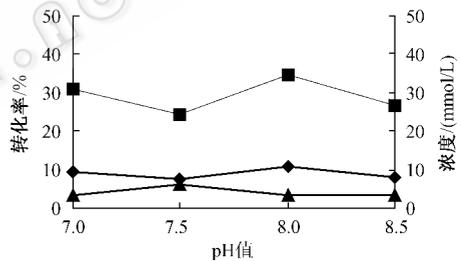


图 2 不同缓冲溶液 pH 值对反应转化率的影响

■ molar conversion, ▲ concentration of residual hydroquinone, ◆ concentration of arbutin

2.3 不同缓冲溶液浓度的选择

缓冲溶液的作用在于保持适宜的 pH 值范围, 同时保持水相中细胞和酶的活性, 使反应能顺利进行下去。通过实验不同浓度的磷酸缓冲溶液 10mmol/L、15mmol/L、20mmol/L、25mmol/L、30mmol/L, 寻找最佳的缓冲溶液浓度。实验结果如图 3 所示, 从图 3 中可以看出, 在缓冲溶液浓度达到 25mmol/L 前, 随着缓冲溶液浓度的逐渐加大, 转化率逐渐增加但增加缓慢。到 25mmol/L 时转化率最大, 为 72.22%。随着缓冲溶液浓度的继续增大, 转化率降低。所以缓冲溶液浓度为 25 mmol/L 最佳。

2.4 对苯二酚浓度对反应转化率的影响

由于对苯二酚具有杀菌作用, 所以当反应液中对苯二酚浓度超过一定量时, 会把菌体杀死, 导致转化率降低。通过比较反应液中不同摩尔浓度的

对苯二酚转化率,寻找最佳的对苯二酚浓度。结果如图4。由图4可知,在开始阶段,反应随着对苯二酚的摩尔浓度增大转化率缓慢降低,但当对苯二酚的浓度超过30mmol/L时,转化率迅速下降,这说明菌体对对苯二酚是有一定的耐受度的。与发酵法相比,耐受度较低。分析其原因,可能是发酵法产生的黄原胶对菌体有保护作用。所以对苯二酚的最佳摩尔浓度为30mmol/L,即菌体对苯二酚的最大耐受度为30mmol/L,此时转化率高达76.08%,每升反应液中含有 α -熊果苷6.2g。

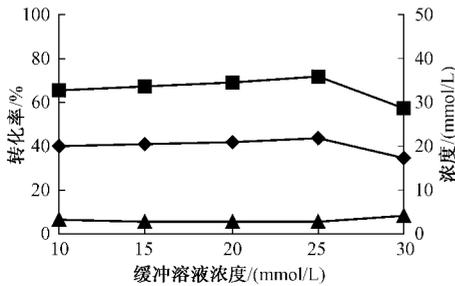


图3 不同缓冲溶液浓度对反应转化率的影响

■ molar conversion, ▲ concentration of residual hydroquinone, ◆ concentration of arbutin

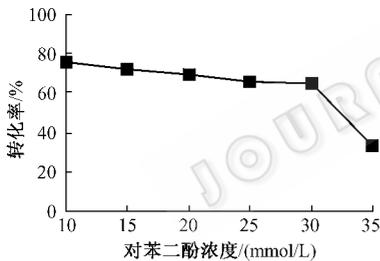


图4 不同对苯二酚浓度对反应转化率的影响

■ molar conversion

2.5 反应物不同摩尔比对反应转化率的影响

根据反应动力学原理,增加一种反应底物的量可以相对提高另一种物质的转化率。本实验的反应底物蔗糖与对苯二酚的理论摩尔比为1:1,通过增加蔗糖的量来提高对苯二酚的转化率,从而相对提高 α -熊果苷的产量。

本研究试验了不同的蔗糖与对苯二酚摩尔比,如图5所示。实验结果发现,随着对蔗糖和苯二酚摩尔比的增加,反应转化率迅速加大,当摩尔比增加为20时,反应转化率达到最大值。再加大蔗糖与对苯二酚摩尔比,转化率基本不变,因而最佳蔗糖与对苯二酚摩尔比为20:1。

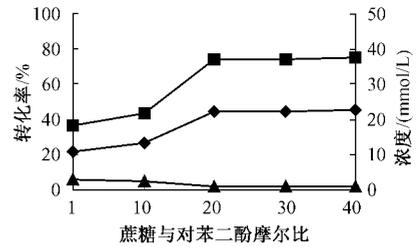


图5 蔗糖与对苯二酚不同摩尔比对反应转化率的影响

■ molar conversion, ▲ concentration of residual hydroquinone, ◆ concentration of arbutin

2.6 反应时间的选择

试验了不同反应时间对转化率的影响。如图6所示。从图6中可以看出,随着反应时间的延长,反应转化率相应增加,随着反应时间的继续延长,反应转化率逐渐下降,反应45h后菌体自溶。

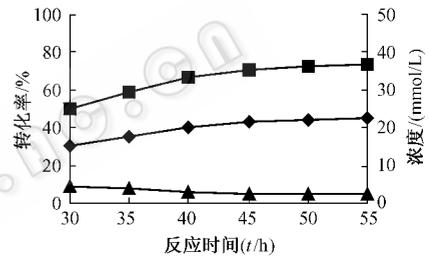


图6 不同反应时间对反应转化率的影响

■ molar conversion, ▲ concentration of residual hydroquinone, ◆ concentration of arbutin

2.7 摇床转速的确定

游离细胞反应摇床转速的大小直接关系到溶氧及代谢物的传质速度。且黄单胞菌是兼性好氧菌,所以转速太小或太大都会对反应转化率起到负面的影响。本研究试验了不同反应转速对转化率的影响,如图7所示。从图7可以看出,当转速为160r/min时,反应转化率达到最大。此时转化率为77.68%。

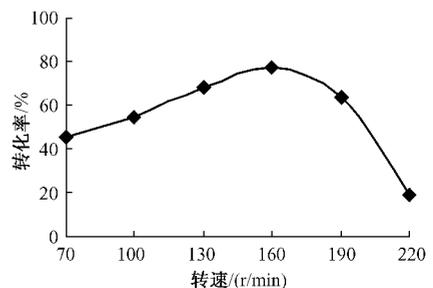


图7 不同转速对反应转化率的影响

■ molar conversion

2.8 不同细胞浓度对转化率的影响

不同的细胞浓度对该反应转化率影响很大,从理论上讲细胞浓度越大,相当于菌体中的酶量越大,也就是反应催化剂量越大,在其它反应条件不变的条件下,则反应转化率就越大。本文试验了不同量的菌体(1L发酵液菌体湿重约为8g,本文以湿菌体为基准计算)对反应转化率的影响。实验结果如图8所示。从图8中可以看出,在菌体浓度达到85g/L之前,随着菌体量的加大,反应转化率增加较迅速,当菌体浓度达到85g/L后,随着菌体量的继续增大,反应转化率增加较缓慢。综合考虑,取菌体浓度85g/L较合适。

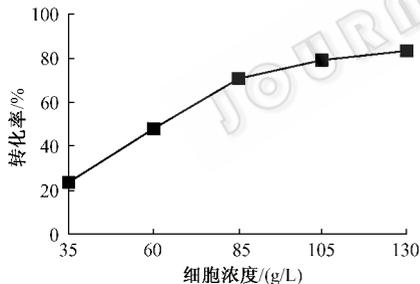


图8 不同细胞浓度对反应转化率的影响

■ molar conversion

3 结论

本文主要研究细胞催化法生产熊果苷的最佳条件,得出最佳反应条件:温度25℃,对苯二酚浓度30mmol/L,蔗糖和对苯二酚摩尔比为20:1,反应时间为45h,转速为160r/min,细胞浓度为85g/L,缓冲溶液为pH8.0、25 mmol/L的磷酸缓冲溶液,此时, α -熊果苷转化率达86.7%(以对苯二酚计算)。

参考文献

- [1] 邱立友,王明道,戚原成,等.微生物学通报,2006,33(2):58~62.
- [2] 周桦,吴晓芳,张晓炜,等.中国公共卫生,2002,18(5):584.
- [3] 姚斌,沈晓兰,潘亚菊.中国现代应用药学杂志,2005,22(1):32~33.
- [4] 刘锋,江涛,任素梅.日用化学工业,2004,34(4):242~244.
- [5] Kazuhisa S, Takahisa N, Koji N, et al. ChemPharmBull, 2003, 51(7):798~801.
- [6] Kazuhisa S, Takahisa N, Koji N, et al. Biol Pharm Bull, 2004, 27(4):510~514.
- [7] Funayama M, Arakawa H, Yamamoto R, et al. Seihutsu kogaku kaishi, 1997, 25(3):177.
- [8] JunKurosu, Toshiyuki S, Keishiro Y, et al. BiosciBioeng, 2002, 93:328~330.