

生物催化合成熊果苷的微生物的筛选研究

梁晓夏, 庞宗文, 梁静娟, 汪德保, 陈思名

(广西大学生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005)

摘要: 以麦芽糖和蔗糖为葡萄糖基供体检测了 67 株包括丝状真菌、酵母菌和细菌在内的微生物催化合成熊果苷的能力, 采用高效液相色谱法测定转化液中熊果苷的含量, 利用质谱法和比旋光度测定法分析产物的分子量和构型。结果表明催化合成熊果苷的能力在微生物中是很普遍的, 被检测的微生物中 70% 以上能不同程度催化合成熊果苷, 大多数微生物合成的为 β -熊果苷, 少数微生物合成的为 α -熊果苷。

关键词: 熊果苷; 微生物; 生物合成

中图分类号: TQ920.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)07-0022-05

Screening of Microorganisms Catalyzing the Biosynthesis of Arbutin

LIANG Xiao-xia, PANG Zong-wen, LIANG Jing-juan, WANG De-bao, CHEN Si-ming

(College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The catalytic capability of 67 Strains of mold, yeast and bacteria, for the biosynthesis of arbutin, were investigated. The molecular weight and configuration of arbutin were determined by HPLC, Electron Ionization-Mass Spectrometry and polarimetry. The results indicated that there were more than 70% of microorganisms which could produce enzyme for catalyzing the biosynthesis of arbutin and the superior product were β -arbutin.

Key words: arbutin; microorganism; biosynthesis

熊果苷是国际公认的高效祛斑美白剂^[1]。 β -熊果苷可以通过化学合成法、天然植物提取法、植物细胞培养法和微生物发酵或酶转化法来制备, α -熊果苷一般只能通过微生物发酵转化法或微生物酶催化法制备。化学合成法步骤繁杂, 所得产物大多是 β -熊果苷或 α -熊果苷和 β -熊果苷的混合物, 分离纯化困难。天然植物提取法由于熊果苷含量低、生产成本高而很难实现工业化生产。植物细胞培养法^[2]虽然转化率较高, 但生产周期长, 转化液中熊果苷含量较少, 造成后续分离困难。微生物发酵转化法或微生物酶催化法具有原料较简单, 发酵条件容易控制, 生产周期短, 合成效率高, 生产更符合环保和可持续发展的要求, 发展前景非常乐观。

日本的 Kitao 等^[3]首次实现用 *Leuconostoc mesenteroides* 的蔗糖磷酸化酶转化合成熊果苷以来, 到目前为止已发现 *Bacillus subtilis*^[4]、*Bacillus macerans*^[5]、*Saccharomyces cerevisiae*^[6]、*Rhizopus* sp.^[7] 以及 *Xanthomonas campestris*^[8] 等微生物细胞能转化合成熊果苷。本文对能转化合成熊果苷的微生物进行筛

选, 以期找到能高效生产熊果苷的微生物, 为微生物发酵生产天然熊果苷打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

α -熊果苷标准品和 β -熊果苷标准品均为美国 Sigma 公司提供, 色谱纯甲醇为美国 Fischer 公司提供, 其他为分析纯试剂。

高效液相色谱仪, 日本岛津公司; LC-10AT VP 高压泵; SPD-10A 紫外检测仪; GC-MS/QP5050A 气相色谱-质谱联用仪, 日本岛津公司; 申光 WZZ-1S 型自动旋光仪, 上海精密科学仪器有限公司制造。

1.2 培养基

丝状真菌培养基 (g/L): 木薯淀粉 30, 麸皮 20, pH=6.0。

酵母培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 麦芽糖 30, MgSO₄ 0.5, pH=6.0。

细菌培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 麦芽糖 30, NaCl 0.3, MgSO₄ 0.5, KH₂PO₄ 0.1, pH=7.2。

1.3 培养方法

收稿日期: 2007-04-19

作者简介: 梁晓夏(1979-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为分子微生物

通讯作者: 庞宗文, 副教授

将待筛选的丝状真菌、酵母菌和细菌分别接种于丝状真菌培养基、酵母培养基和细菌培养基中,于 30 °C、160 r/min 的摇床中培养 48 h。

1.4 熊果苷的转化合成方法

将培养好的培养液 1 份与 3 份水混合,加入对苯二酚和麦芽糖或蔗糖,使对苯二酚和糖的终浓度分别为 50 mmol/L 和 150 mmol/L,于 30 °C 和 160 r/min 的摇床中进行转化反应 72 h。

1.5 熊果苷的含量测定

转化反应结束后,取 1 mL 转化液加入 9 mL 甲醇,在 10000 r/min 下离心 5 min,上清液的熊果苷用高效液相色谱法检测,色谱柱 Kromasil C18 柱(4.6 mm×250 cm),柱温 30 °C,流动相为 $V(\text{水}):V(\text{甲醇})=90:10$,流速 1 mL/min,检测波长为 280 nm。

1.6 产物熊果苷的纯化和鉴定

将转化后所得转化液在 8000 r/min 下离心 10 min,上清液减压浓缩 10 倍后上样到弱极性大孔吸附树脂 AB-8 柱,用蒸馏水洗脱进行脱色,流出液经减压浓缩和离心后再经过极性大孔吸附树脂 S-8 柱,用蒸馏水洗脱并分部收集,收集含熊果苷的洗脱液,用高效液相色谱法检测熊果苷的纯度。

熊果苷的分子量采用电子喷雾离子质谱法分析,质谱条件:EI 离子源,电子能量 70 eV,电子倍增器电压 1.5 kV,质量扫描范围 40~550 u,全扫描方式。

熊果苷的构型采用比旋光度法鉴定。

2 结果与讨论

2.1 能催化合成熊果苷的微生物的筛选

以麦芽糖和蔗糖为葡萄糖基供体对保存和新分离的 35 株丝状真菌、13 株酵母菌和 19 株细菌催化合成熊果苷的能力进行了检测,结果见表 1-3。结果表明,催化合成熊果苷的能力在微生物中是很普遍的,从三大类微生物的总体情况看,丝状真菌合成熊果苷的能力最强,其次是细菌,最差的是酵母菌。根据已报道的能催化合成熊果苷的微生物或其酶的情况来看,参与合成熊果苷的酶大多数是淀粉或淀粉降解产物的水解酶,如淀粉酶^[4]、 α -葡萄糖苷酶^[6]、淀粉葡萄糖苷酶^[7]等,大多数丝状真菌尤其是根霉和曲霉能产生这类水解酶,因此合成熊果苷的能力普遍强,酵母菌产生淀粉水解酶的能力普遍差,因而合成熊果苷的能力也普遍差。由于各种微生物所含的酶系不同,催化合成熊果苷的能力也很不相同,其中最强的是 *Rhizopus* sp.

PL22、*Rhizopus* sp. PL24、*Rhizopus* sp. PL25、*Rhizopus* sp. R2、*Aspergillus ficuum* AS3.324、*Aspergillus niger* CICC2169 和 *Aspergillus niger* PL04,它们以麦芽糖为葡萄糖基供体时合成的熊果苷分别为 1.3591、1.8031、1.3628、1.4832、1.5694、0.9241 和 1.3099 g/L 转化液。各种微生物对底物的特异性也不同,有些微生物既能以麦芽糖为底物也能以蔗糖为底物合成熊果苷,而有些微生物只能以麦芽糖为底物合成熊果苷,对于大多数微生物而言,麦芽糖比蔗糖更适合于作为熊果苷的糖基供体。

2.2 微生物合成的熊果苷的鉴定和构型研究

转化液经弱极性大孔吸附树脂 AB-8 柱层析后,产物熊果苷和残留的底物麦芽糖和对苯二酚由于极性较强而被蒸馏水洗脱,而大部分的色素等物质吸附于柱上,因而能较好地脱色,流出液再经过极性大孔吸附树脂 S-8 柱层析后,因熊果苷、底物麦芽糖和对苯二酚的极性不同,用蒸馏水洗脱时极性最强的麦芽糖最先洗出,接着是极性稍弱的熊果苷,最后出来的是极性较弱的对苯二酚,收集含熊果苷的洗脱液即得熊果苷纯品,经高效液相色谱法测定其纯度达 99.99%。

产物高效液相色谱鉴定:转化产物纯品用高效液相色谱分析,通过比较 α -熊果苷标准品、 β -熊果苷标准品与产物的高效液相色谱图发现,有些产物的出峰时间与 α -熊果苷一致,有些则与 β -熊果苷一致。

产物质谱分析鉴定:转化产物纯品经质谱分析发现,所有产物的分子量均为 272,说明产物是羟苯基-葡萄糖苷,而且是由一分子葡萄糖与一分子对苯二酚连接。通过比较 α -熊果苷标准品、 β -熊果苷标准品与产物的质谱图发现,高效液相色谱出峰时间与 α -熊果苷标准品一致的产物的质谱图与 α -熊果苷标准品的质谱图一致,高效液相色谱出峰时间与 β -熊果苷一致的产物的质谱图与 β -熊果苷标准品的质谱图一致。

产物比旋光度鉴定:经过自动旋光仪测定,高效液相色谱出峰时间与 α -熊果苷标准品一致的产物的比旋光度均为 +171° 左右,高效液相色谱出峰时间与 β -熊果苷一致的产物的比旋光度均为 -64° 左右,而 α -熊果苷标准品和 β -熊果苷标准品的比旋光度分别为 +171° 和 -64°。说明有些微生物合成的熊果苷为 α -构型,而有些微生物合成的熊果苷为 β -构型,结果见表 1-表 3。从结果看出,大多数微生物合成的熊果苷为 β -构型,少数微生物如米曲霉合成的熊果苷为 α -构型。

表 1 丝状真菌催化合成熊果苷的能力检测

Table 1 Biosynthesis of arbutin by mold

菌株号	转化液中熊果苷的含量/(g/L)		熊果苷构型
	麦芽糖为葡萄糖基供体	蔗糖为葡萄糖基供体	
<i>Aspergillus ficuum</i> AS3.324	1.5694	1.1138	β -型
<i>Aspergillus fumigatus</i> AS3.3572	0.0695	0	β -型
<i>Aspergillus niger</i> AS3.4309	0.0401	0.0581	β -型
<i>Aspergillus niger</i> CICC2169	0.9241	0.9195	β -型
<i>Aspergillus niger</i> CICC2230	0.3952	0.3083	β -型
<i>Aspergillus niger</i> CICC2269	0.6441	0.5872	β -型
<i>Aspergillus niger</i> SU-16	0.2977	0.3531	β -型
<i>Aspergillus niger</i> PLT69	0	0	
<i>Aspergillus niger</i> PL01	0.4072	0	β -型
<i>Aspergillus niger</i> PL02	0.2232	0.3202	β -型
<i>Aspergillus niger</i> PL03	0.4655	0.4862	β -型
<i>Aspergillus niger</i> PL04	1.3099	0.9903	β -型
<i>Aspergillus oryzae</i> 3.042	0.2603	0	α -型
<i>Aspergillus oryzae</i> 3811	0.4906	0	α -型
<i>Aspergillus oryzae</i> PL11	0.2540	0.0412	α -型
<i>Aspergillus oryzae</i> PL12	0.2622	0	α -型
<i>Mucor</i> sp. PL04	0.2990	0.2750	β -型
<i>Mucor</i> sp. PL05	0.0703	0.0603	β -型
<i>Penicillium</i> sp. PL01	0.4406	0.0405	β -型
<i>Rhizopus oryzae</i> 3866	0.5910	0.1892	β -型
<i>Rhizopus formosensis</i> CICC3121	0	0	
<i>Rhizopus</i> sp. PL21	0.2767	0.2745	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. PL22	1.3591	1.3149	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. PL23	0.1670	0	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. PL24	1.8031	1.5256	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. PL25	1.3628	0.2309	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. PL26	0.1868	0.1817	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. PL27	0.0764	0	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. R2	1.4832	1.6365	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. R3	0.3370	0.0847	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. R4	0.1231	0.6565	β -型
<i>Rhizopus</i> sp. R5	0.1540	0.0842	β -型
<i>Trichoderma koningii</i> AS3.2774	0	0	
<i>Trichoderma koningii</i> AS3.4265	0	0	
Unidentified fungi	0.7746	0.5880	β -型

表 2 酵母菌催化合成熊果苷的能力检测

Table 2 Biosynthesis of arbutin by yeast

菌株号	转化液中熊果苷的含量/(g/L)		熊果苷构型
	麦芽糖为葡萄糖基供体	蔗糖为葡萄糖基供体	
Aureobasidium pullulans XY-22	0	0	
Aureobasidium pullulans XYE-7	0	0	
Candida guilliermondii XY-10	0	0	
Candida tropicalis XY-3	0	0	
Geotrichum candidum GXU08	0	0	
Pichia sp. XY-44	0	0	
Saccharomyces cerevisiae CICC1474	0.2610	0	α -型
Saccharomyces cerevisiae CICC1455	0.2452	0.0081	α -型
Saccharomyces cerevisiae 172	0.0083	0.0290	β -型
Saccharomyces cerevisiae PL01	0.0540	0.0338	β -型
Saccharomyces cerevisiae PL02	0.0863	0	β -型
Unidentified yeast	0	0.0162	β -型

表 3 细菌催化合成熊果苷的能力检测

Table 3 Biosynthesis of arbutin by bacteria

菌株号	熊果苷含量 (g/L 转化液)		熊果苷构型
	麦芽糖为葡萄糖基供体	蔗糖为葡萄糖基供体	
Bacillus cereus CICC10042	0	0	
Bacillus pumilus PLM4	0	0	
Bacillus subtilis CICC10048	0.0343	0.0253	β -型
Bacillus sp. G01-94	0	0	
Bacillus sp. 18	0	0	
Bacillus sp. 900-2	0.1166	0	α -型
Bhalodurans sp. I0s4-18	0.4007	0	α -型
Brevibacterium ketosoreductum CICC10194	0.0032	0.0529	β -型
Brevibacterium lactofermentum CICC10227	0.0137	0.0094	β -型
Brevibacterium sp. JII34	0	0	
Corynebacterium herculis CICC10132	0.0244	0.0683	β -型
Corynebacterium tianjin CICC10234	0.1557	0.1590	β -型
Corynebacterium sp. 7-1b	0.7150	0.0517	α -型
Escherichia coli	0.0092	0.0508	β -型
Pseudoalteromonas ruthenica JIV-49	0	0	
Unidentified coccus 1-2a	0	0	
Unidentified coccus 15-1	0	0	
Unidentified bacterium 3-5	0.0180	0.0301	β -型
Unidentified bacterium 6-5	0.0230	0.0560	β -型

3 结论

对包括丝状真菌、酵母菌和细菌在内的 67 株微生物催化合成熊果苷的能力进行了检测, 结果发现催化

合成熊果苷的能力在微生物中是很普遍的, 被检测的微生物中 70%以上能不同程度催化合成熊果苷, 其中最的是 *Rhizopus* sp. PL22、*Rhizopus* sp. PL24、

(下转第 31 页)