

研究简报

添加表面活性剂对 α -熊果苷发酵的影响

韦 祎, 张淑荣, 刘春巧, 张 鹏

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

关键词: α -熊果苷; 黄单胞菌; 表面活性剂

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2007) 09-2352-05

Effect of surfactants on α -arbutin production by *Xanthomonas* BT-112

WEI Yi, ZHANG Shurong, LIU Chunqiao, ZHANG Peng

(School of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical
Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The effect of different surfactants on α -arbutin bio-catalytic synthesis by *Xanthomonas maltophilia* BT-112 was investigated. Tween80 was the best when compared with different kinds of surfactants at different concentrations and times of surfactant addition. Experimental results showed that the suitable conditions were as follows: adding $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Tween80 during the 12 hours from the start of fermentation, fed-batch in three times, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ every time. Under the conditions mentioned above, the product yield reached 96.2% against hydroquinone and increased by 3.53% and hydroquinone concentration reached $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and increased by 25.0% as compared with the case without adding surfactant. The fermentation period was 36 h, 25% less than the case without adding surfactant.

Key words: α -arbutin; *Xanthomonas*; surfactant

引 言

熊果苷属于氢醌苷类化合物, 化学名称为 4-羟基苯-D-吡喃葡萄糖苷, 能抑制黑色素的生成, 具有美白作用^[1]。熊果苷有 α -熊果苷和 β -熊果苷两种同分异构体, 研究发现 α -熊果苷的美白效果是 β -熊果苷的 10 倍以上, 而且 α -熊果苷直接抑制酪氨酸酶活性, 不抑制人体细胞^[2-3]。显然, α -熊果苷是一种更高效、更安全的美白剂。

α -熊果苷一般只能通过不同的微生物的酶进行糖转移反应, 让一分子的葡萄糖和一分子的氢醌结合形成单一的 α -熊果苷^[4]。目前, 关于 α -熊果苷的生产报道主要有日本的 Toshiyuki^[5] 和国内的刘春巧^[6], 但是都存在对苯二酚耐受度不够高、反应时间较长等问题。本实验在黄单胞菌 BT-112 发酵过程中加入表面活性剂, 改善细胞膜通透性, 加快物质传递运输, 从而提高了菌体对对苯二酚的耐受度并缩短了反应周期, 降低了原料成本, 提高了生产效率, 具有重要的现实意义。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及仪器

1.1.1 菌株 嗜麦芽黄单胞菌 (*Xanthomonas maltophilia*) BT-112, 由本实验室筛选鉴定^[7]。

1.1.2 材料及仪器 α -熊果苷标准品和 β -熊果苷标准品为 Sigma 公司提供; 其他为分析纯试剂。HZQ-F 全温振荡培养箱, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; 高效液相色谱, 日本岛津 LC-10ATVP。

1.1.3 培养基 发酵培养基: 蔗糖 50 g · L⁻¹、蛋白胨 10 g · L⁻¹、无水 MgSO₄ 0.5 g · L⁻¹、K₂HPO₄ · 3H₂O 2 g · L⁻¹、CaCl₂ · 2H₂O 0.05 g · L⁻¹、ZnCl₂ 0.01 g · L⁻¹、FeCl₂ · 4H₂O 0.1 g · L⁻¹、Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.05 g · L⁻¹、维生素 B₁ 0.02 g · L⁻¹、维生素 B₁₂ 0.05 g · L⁻¹、烟酸 0.001 g · L⁻¹、对氨基苯甲酸钠 0.002 g · L⁻¹、pH 7.0; 斜面培养基: 发酵培养基加 15 g · L⁻¹ 琼脂。

1.1.4 表面活性剂 Tween20、Tween40、Tween60、Tween80、Tween85、Span20、Span40、Span60、CTAB、Brij58、Dimethyl siloxane、Sophorose lipid、Polyester 330、Triton X-100、SDS 和 lecithin。

1.2 方法

1.2.1 反应条件 在 100 ml 锥形瓶中加入 15 ml 液体培养基, 于 0.1 MPa、121℃ 灭菌 20 min。把菌种斜面用生理盐水配成菌悬液接种于锥形瓶中, 在 30℃、130 r · min⁻¹ 摇床中培养 48 h, 然后在发酵液中加入对苯二酚和蔗糖, 于 35℃、180 r · min⁻¹ 摇床中反应。在发酵过程中添加不同种类、不同浓度的表面活性剂, 以不添加表面活性剂的空白作对照。

反应式为



对苯二酚转化率为

$$X = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\%$$

式中 M_1 为加入到发酵液中对苯二酚的量, mmol · L⁻¹; M_2 为反应后发酵液中剩余对苯二酚的量, mmol · L⁻¹。

1.2.2 菌浓的测定 菌浓用在 660 nm 波长下分光光度计检测的吸光度 OD₆₆₀ 表示。

1.2.3 产物的分析 取 1 ml 发酵液, 4200 r · min⁻¹ 离心 20 min。上清液用孔径 0.22 μ m 的微滤膜过滤后用高效液相色谱检测。色谱柱为 YWG2C18 柱 (416 mm × 25 cm), 柱温 25℃; 流动相为水: 甲醇 (体积比 95:5), 流速 1 ml · min⁻¹; 紫外检测器, 检测波长 280 nm。

2 结果与分析

2.1 不同表面活性剂和浓度对反应的影响

表面活性剂种类繁多且性质各不相同, 它们一方面具有改善细胞膜通透性, 减少氧及营养物质进入细胞的传递阻力, 加快物质传递运输的能力; 另一方面对微生物有毒性和杀菌作用^[8]。因此, 一般发酵液中表面活性剂的浓度在 0.1~10 g · L⁻¹ 之间^[9-10]。在反应开始时添加不同种类和不同浓度的表面活性剂, 结果如表 1。

表 1 表面活性剂对黄单胞菌产 α -熊果苷转化率的影响
Table 1 Effect of surfactant on α -arbutin conversion efficiency by *Xanthomonas* BT-112/%

Surfactant	Surfactant concentration/g · L ⁻¹				
	0.1	0.5	1	5	10
Tween20	82.3	89.6	92.2	75.7	70.7
Tween40	81.5	88.6	89.4	78.1	72.6
Tween60	80.2	88.1	89.6	74.3	70.9
Tween80	80.5	90.7	94.1	88.5	75.7
Tween85	88.1	91	92.3	80.9	74.6
Span20	86.1	87.5	88.2	78.3	71.7
Span40	81.5	88.2	89.3	79.4	71.6
Span60	88.4	89.9	93.1	82.6	78.7
CTAB	76.2	77.4	79.3	74.8	71
Brij58	82.5	87.2	89.3	84.2	80.7
dimethyl siloxane	81.9	84.6	85.8	83.4	79.6
sophorose lipid	82	83.8	85.9	82.8	80.6
polyester 330	80.8	81.7	85.4	83.4	80.8
Triton X-100	78.9	81.6	84.4	77.6	75.1
SDS	71.4	73.5	75.7	76.1	72.3
lecithin	87.4	89.3	90.3	86.5	84.1
blank			92.8		

由表 1 可见, 某些非离子型表面活性剂对反应有一定的促进作用, 这主要是因为不同类型的表面活性剂性质不同, 对微生物所产生的毒性也不同。一般来说阳离子表面活性剂对生物的毒性较大 (如 CTAB); 非离子表面活性剂毒性小, 对生物的影响也较弱; 阴离子表面活性剂 (如 SDS) 的毒性和杀菌力介乎两者之间^[8]。对于黄单胞菌的影响也表现出了相同的特点。关于表面活性剂促进生物转化

的作用机制,分析其原因是:加入表面活性剂对微生物细胞膜影响最大,表面活性剂会影响胶束的形成^[11],改变细胞膜的稳定性。破坏细胞膜的结构,失去活性,从而改变了细胞膜通透性。

总的来说,Tween80 效果最好,首先它是非离子表面活性剂,对菌体的毒性最小;并且还是水溶性长链脂肪酸的酯类物质,可影响微生物细胞的膜通透性^[12]。故表面活性剂选定为 Tween80,并进一步试验其浓度大小对转化率的影响,结果见图 1。

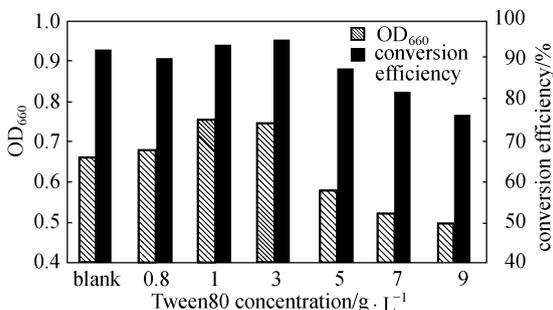


图 1 不同浓度的 Tween80 对发酵的影响
Fig. 1 Effect of different concentration of Tween80 on fermentation

由图 1 可见,当 Tween80 添加浓度为 3 g · L⁻¹时,对苯二酚转化率最高,达到 94.9%,此时的菌浓也比空白高,即 3 g · L⁻¹的 Tween80 没有抑制菌体生长。从图 1 中还可以明显看到,当浓度大于 5 g · L⁻¹时,Tween80 对细胞生长有一定的抑制作用,浓度越高抑制作用越大,底物的转化率也随之下降。因此,不同浓度的 Tween80 对菌体生长和产物得率产生不同的影响。常天俊等^[9]曾报道过 0.5 g · L⁻¹和 1 g · L⁻¹的 Tween80 对出芽短梗霉生长和多糖生产的影响不同,本实验也证明了这个结论。

2.2 不同时间加入 Tween80 对反应转化率的影响

因为表面活性剂具有改变细胞膜通透性和杀菌两重作用,不同的加入时间直接影响菌体的生长代谢。因此,试验不同加入表面活性剂的时间对发酵转化率的影响有重要意义,结果如图 2 所示。

从图 2 中可以看到,在进入反应阶段前 6 h,菌体浓度比较低,此时加 Tween80 影响细胞膜的正常合成,使其结构变得松散,不利于细菌的生长;在反应开始的 12 h 以内加 Tween80 对转化率都有一定的促进作用,转化率最高的是在发酵 12 h 加入 Tween80,达到 95.6%。因此,只有当细

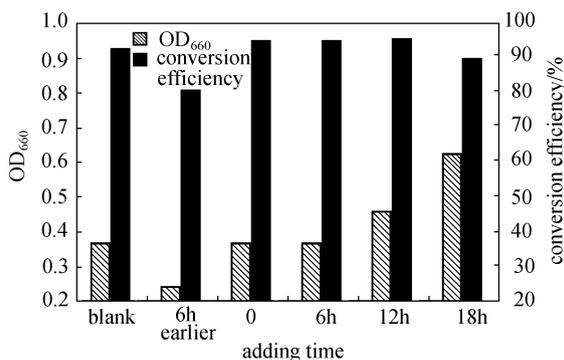


图 2 不同时间加入 Tween80 对发酵的影响
Fig. 2 Effect of different time to add Tween80 on fermentation

菌菌体达到一定数量且比较壮实的时候,菌体才能耐受住表面活性剂。所以添加 Tween80 的最佳时间范围是反应开始的 12 h 以内。

2.3 分批添加 Tween80 对反应的影响

Tween80 有杀菌作用,而且其杀菌强度与其浓度呈正比。根据文献 [9-10],浓度为 0.1~10 g · L⁻¹的表面活性剂对微生物生长的抑制作用较小。为了降低 Tween80 对菌体的抑制,通过总添加量不变而分批加入来降低发酵液中 Tween80 的浓度,从而把 Tween80 对菌体伤害度降到最小。试验不同的添加次数对反应的影响,结果如图 3 所示。

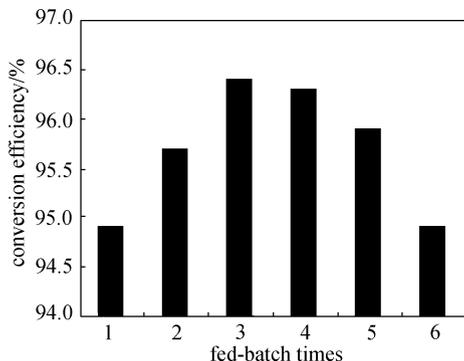


图 3 分批添加 Tween80 对反应的影响
Fig. 3 Effect of Tween80-fed-batch on fermentation

由于在发酵 12 h 以内加 Tween80 对反应有促进作用,所以在这个时间范围内考察不同添加量、添加时机对发酵的影响。实验发现,分批添加 3 次,即每 4 h 加一次,每次浓度为 1 g · L⁻¹时转化率最高,达 96.4%。继续增加添加次数转化率下降,因为分批添加次数太多,每次加的浓度就很低,对细胞膜通透性的影响不明显,所以确定添加

次数为3次最好, 每次 Tween80 浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 加入 Tween80 对菌体耐受对苯二酚的影响

由于对苯二酚具有杀菌作用, 所以当发酵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。比较发酵液中添加 Tween80 和空白时对苯二酚转化率, 试验出其最高耐受浓度, 结果如图 4。

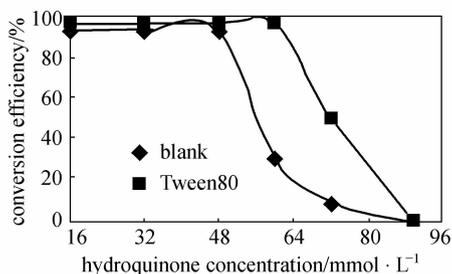


图 4 加入 Tween80 对菌体耐受对苯二酚的影响

Fig. 4 Effect of Tween80 on hydroquinone concentration

镜检发现, 在空白样中, 当反应体系的对苯二酚浓度超过 $48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 78% 的菌体死亡, 使菌体催化能力降低, 所以菌体对苯二酚的最大耐受度为 $48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而在分批添加 Tween80 的情况下, 菌体对苯二酚的最大耐受度为 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 此时转化率达 96.2%。

2.5 加入 Tween80 对发酵时间的影响

加入 Tween80 使菌体细胞膜的通透性增大, 其结构变得松散, 大分子物质的透过率增大, 使得底物可以快速、大量进入细胞内, 加速了底物的转化, 缩短了反应时间。

从图 5 可知, 加入 Tween80 后达到最高转化率的时间为发酵 36 h, 比空白的 48 h 减少了 12 h。因此缩短了发酵周期, 降低发酵的能量消耗, 节约成本。

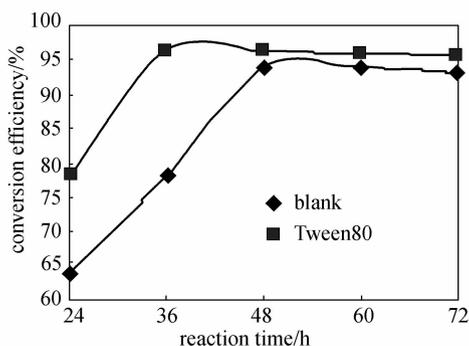


图 5 加入 Tween80 对反应时间的影响

Fig. 5 Effect of Tween80 on reaction time

3 结 论

通过对在黄单胞菌 BT-112 催化合成 α -熊果苷反应中添加表面活性剂的研究, 确定了最佳反应条件: 加入 Tween80 对 α -熊果苷的生物合成最有利, 其最适添加量为 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最适添加时间为发酵初期, 即从加底物开始至发酵 12 h 左右, 分批添加 3 次, 每次浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。菌体对对苯二酚的最大耐受度为 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应时间 36 h。在此条件下, 96.2% 的对苯二酚转化为 α -熊果苷, 产物浓度较空白高约 27.6%, 且发酵周期缩短了 12 h。

References

- [1] Li Anliang (李安良), Yang Shuqin (杨淑琴), Guo Xiuru (郭秀茹), Zeng Haiyang (曾海艳), Wang Weiwei (王薇薇). Progress of α -arbutin. *China Surfactant Detergent & Cosmetics* (日用化学工业), 2000, **30** (2): 62-65
- [2] Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T. Syntheses of arbutin- α -glycosides and comparison of their inhibitory effects with those of α -arbutin and β -arbutin on human tyrosinase. *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, **51** (7): 798-801
- [3] Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K, Kuriki T. Inhibitory effects of α -arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004, **27** (4): 510-514
- [4] Kitao Satoshi, Sekine Hiroshi. α -D-glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *leuconostoc mesenteroides* and production of α -arbutin. *Biochem.*, 1994, **58** (1): 38
- [5] Jun K, Toshiyuki S, Keishiro Y, Taknoru T, Susumu S, Kohtaro K, Kuniki K. Enzymatic synthesis of α -arbutin by α -anomer-selective glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701. *Biosci. Bioeng.*, 2002, **93**: 328-330
- [6] Liu Chunqiao (刘春巧), Zhang Shurong (张淑荣), Zhang Peng (张鹏). Biocatalytic synthesis of α -arbutin by *Xanthomonas* BT-112. *Chinese Journal of Catalysis* (催化学报), 2006, **27** (4): 361-364
- [7] Liu Chunqiao (刘春巧), Zhang Shurong (张淑荣), Zhang Peng (张鹏). Mutation breeding of *Xanthomonas maltophilia* for the synthesis of α -arbutin. *Journal of Beijing University of Chemical Technology* (北京化工大学学报), 2006, **33** (4): 13-16

- [8] Chen Rongqi (陈荣圻). Chemistry of Surfactant and Application (表面活性剂化学及应用). Beijing: Beijing Textile Industry Press, 1990: 41
- [9] Chang Tianjun (常天俊), Pan Wenwei (潘文维), Hu Daowei (胡道伟), Yang Ying (杨英). Influence of the pullulans yield by surfactant. *Biotechnology* (生物技术), 2006, **16** (1): 55-57
- [10] Liu Jun (刘军), Chen Xiangdong (陈向东), Dai Xuan (戴玄), Tang Bing (唐兵), Peng Zhenrong (彭珍荣). Effect of surfactant on the production of thermophilic protease from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Microbiology* (微生物学杂志), 2004, **24** (6): 58-59
- [11] Yan Shixiang (阎世翔). *Cosmetics Science* (化妆品科学). Beijing: Scientific Literature Press, 1998: 307-314
- [12] Reese E T, Maguire A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 1969, **17**: 242-245

信息与交流

《生物质化学工程》征订启事

《生物质化学工程》(双月刊)是国家新闻出版总署和国家林业局科技司批准的、由原《林产化工通讯》杂志改版的、面向国内外公开发行的全国生物质化工行业内的技术类刊物。是《中国学术期刊(光盘版)》、“中国期刊网”、“中文科技期刊数据库”、“万方数据—数字化期刊群”全文收录期刊、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊,《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊。

本刊坚持认真执行国家的有关方针政策,为经济建设服务、为促进我国生物质化工产业的发展服务。重点报道木质生物质资源相关领域的研究成果、产品开发、生产管理和国内外研究动向方面的论文,以促进我国生物质化工产业的发展。坚持以刊登新技术、新工艺、新设计、新设备、新材料为主要内容的办刊方针,突出技术类期刊的特点,注重稿件的时效性。主要有研究报道、综述评论、专题讲座等栏目,以及国外信息、国内简讯、市场行情等小栏目。具体内容包括可再生的木质森林资源的化学转化、热转化、热化学转化和生物转化及松香、松节油、胶粘剂、制浆造纸、木材热解、活性炭、木材水解、栲胶、紫胶、森林资源、香精香料、日用化工等方面的内容。

适于从事林业、农业、森工、能源、生物质工程、林产化学工业、轻工、化工、环保、食品、土产、商检、外贸等行业从事科研、教学、生产、经营、设计工作等相关人士阅读。

欢迎积极投稿、踊跃订阅或来人来函联系广告业务!

订阅办法: 邮局发行,邮发代号 28-205,单月 25 日出版。每册定价 6.00 元,全年 36.00 元。亦可直接向本刊编辑部订阅。

地址: 210042 南京市锁金五村 16 号 林产化工研究所内

银行信汇户名: 中国林业科学研究院林产化学工业研究所 **账号:** 4301012509001028549

开户行: 工商银行南京板仓分理处 **电话:** (025) 85482492 **传真:** (025) 85482493

http: //lchg.chinajournal.net.cn **E-mail:** lchg@chinajournal.net.cn