

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0242-05

α-熊果苷生物合成研究进展

朱星桐^{1,2}, 张文立^{1,2}, 沐万孟^{1,2*}¹江南大学食品科学与技术国家重点实验室; ²江南大学食品安全国际联合实验室, 无锡 214122

摘要:熊果苷是一种天然化合物存在于多种植物中,由葡萄糖和对苯二酚通过 β -糖苷键连接而成,因对人体酪氨酸酶活性具有强烈抑制作用,在药妆工业中被用作强效皮肤增白剂。 α -熊果苷是熊果苷的同分异构体,其糖苷键为 α 构型,美白效果比熊果苷高10倍以上。 α -熊果苷的生产可通过酶促合成或微生物合成来实现。本文综述了 α -熊果苷的生物合成方法,包括微生物合成和酶法合成,并简述了其固定化研究和纯化工艺。

关键词: α -熊果苷; 转糖基酶; 酪氨酸酶抑制剂

中图分类号:Q81

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.039

Recent Advances on the Biosynthesis of α -Arbutin

ZHU Xing-tong^{1,2}, ZHANG Wen-li^{1,2}, MU Wan-meng^{1,2*}¹ State Key Laboratory of Food Science and Technology;² International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Arbutin was a natural compound found in a variety of plants, which was made up of glucose and hydroquinone linked by β -glycosidic bonds. Due to its strong inhibitory effect on human tyrosinase activity, it was widely used as a powerful skin lightening agent in the cosmeceutical industry. α -Arbutin was an isomer of arbutin, with 10 times higher whitening effect than that of arbutin. The production of α -arbutin could be achieved by enzymatic synthesis or microbial synthesis. In this paper, the biosynthesis methods of α -arbutin, including microbial synthesis and enzymatic synthesis, and its immobilization and purification process were reviewed.

Key words: α -arbutin; transglycosylase; tyrosinase inhibitor

熊果苷(对-羟基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷)是对苯二酚的天然葡萄糖苷,由葡萄糖和对苯二酚通过 β 糖苷键连接而成,存在于多种自然浆果植物中,如蓝莓、酸果蔓、马郁兰和大多数梨种^[1,3]。熊果苷具有一定的生理功能,其中最重要的是对酪氨酸酶活性具有强烈的抑制作用,因而在药妆行业中被用作一种强效的皮肤增白剂^[4]。熊果苷可以从果皮和各种植物的叶子中提取^[1,3,5],也可以用植物细胞培养方法生物合成^[6,7]。

α -熊果苷(对-羟基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷)是熊果苷的同分异构体,其糖苷键为 α 构型,是一种天然活性成分,在动植物及微生物细胞中广泛存在。 α -熊果苷也是一种酪氨酸酶抑制剂。Kazuhisha等人通过人黑素瘤细胞实验和人皮肤模型实验,发现 α -熊果苷能有效抑制黑色素合成且没有细胞毒

性^[8,9]。此外,与熊果苷相比, α -熊果苷能更加有效地抑制酪氨酸酶活性。 α -熊果苷对人类酪氨酸酶的50%抑制浓度(IC_{50})为2.0 mM,而熊果苷高于30 mM^[8,10]。 α -熊果苷可通过微生物或微生物酶进行生物合成。

就稳定性方面而言, α -熊果苷在基本环境条件下稳定性较好。化妆品的基础原料,如甘油、硫酸铜、脂肪醇聚醚-20等也不会对其稳定性产生影响^[11]。此外,与熊果苷相比,在不同温度条件下, α -熊果苷表现出比熊果苷更好的热稳定性能,具有更好的安全性。当温度达到60℃时,熊果苷溶液中检测到少量分解产物对苯二酚,对苯二酚具有一定毒性,接触皮肤则会对皮肤细胞产生毒害作用,而 α -熊果苷在40~100℃温度条件范围内均未发现有对苯二酚检出^[12]。

α -熊果苷因其较优的美白效果和稳定性安全性越来越受到人们的关注,本文着重概述了 α -熊果苷的生物合成方法,并简述了其固定化研究和纯化工艺。

1 α -熊果苷生物合成

α -熊果苷的生物合成主要包括两个方面,一个 是微生物合成,另一个是酶法催化对苯二酚转糖基化反应合成。

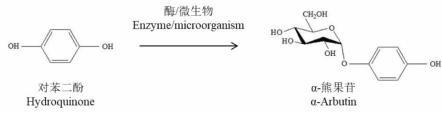


图 1 对苯二酚及 α -熊果苷间的生物转化

Fig. 1 Biotransformation between hydroquinone and α -arbutin

1.1 微生物合成

α -熊果苷可以通过微生物进行合成。早些年,有研究者培养了大约 600 株从土壤中分离的微生物,并筛选出了一株高产对苯二酚糖基化酶菌株——枯草芽孢杆菌 X-23,并鉴定该酶为胞外 α -淀粉酶^[13]。

2002 年,野油菜黄单胞菌 WU-9701 的冻干全细胞被发现可用于从麦芽糖和对苯二酚生物合成 α -熊果苷,摩尔转化率为 93%^[14]。2006 年,吴等人构建了 α -熊果苷生成酶在大肠杆菌上的表面展示,将来自野油菜黄单胞菌 BCRC12608 的转糖苷酶基因与表面锚定基序的截短基因融合,用于生产 α -熊果苷,摩尔转化率为 83.4%,相同条件下的野生菌株摩尔转化率仅为 16%^[15]。来自野油菜黄单胞菌 BCRC12608 和野油菜黄单胞菌 WU-9701 的 α -熊果苷的转糖苷酶均被鉴定为 α -葡萄糖苷酶^[14]。

2013 年,刘等人通过诱变育种筛选高产 α -熊果苷的微生物菌株,筛选出了 α -熊果苷生产力比亲本强 15 倍的阴性突变嗜麦芽黄单胞菌 BT-112,摩尔转化率为 93.6%^[16]。之后,刘等人优化了嗜麦芽黄单胞菌 BT-112 发酵条件,研究对比了几种补料分批方法,其中溶解氧控脉冲补料分批方法显示较好的效果,摩尔转化率为 94.5%^[17]。

1.2 酶促合成

除微生物合成外, α -熊果苷还可以通过酶促转糖基化进行有效的生产。目前,至少有 7 种不同的微生物酶可以被用于 α -熊果苷的生物合成。它们都用对苯二酚作为受体底物,但不同的酶可能适用不同的葡萄糖基供体底物。结果见表 1。

1.2.1 供体底物为蔗糖的酶

蔗糖磷酸化酶(EC 2.4.1.7)能催化蔗糖和磷酸盐可逆转化为果糖和葡萄糖-1-磷酸。它是 GH13

家族的糖基转移酶,除磷酸解外还能催化转糖基化反应^[18]。蔗糖磷酸化酶是第一种用于研究 α -熊果苷酶促合成的酶。1994 年,Kitao 和 Sekine 通过肠膜明串珠菌蔗糖磷酸酶研究酚类化合物的糖基化,发现该酶能够将葡萄糖基转移到 23 种化合物上,且对对苯二酚表现出较高的转化效率,优化后的摩尔转化率约 65%^[19]。

葡聚糖蔗糖酶(EC 2.4.1.5)能催化蔗糖转化为葡聚糖并释放果糖。作为 GH70 家族的酶,它能催化三种反应,聚合、水解和转糖基反应^[20]。2009 年,肠膜明串珠菌葡聚糖蔗糖酶被用于 α -熊果苷的生物合成。优化反应条件后,摩尔转化率为 0.4%^[21]。

淀粉蔗糖酶(EC 2.4.1.4)能催化 α -葡萄糖基从蔗糖转移至 α -葡聚糖的非还原末端以产生 α -(1,4)-葡聚糖。它是 GH13 家族的成员,能够催化从蔗糖到适当的糖基受体底物的转糖基反应^[22]。来自地热球菌的淀粉蔗糖酶被用于生物合成 α -熊果苷,但转化率极低(仅 1.3%),添加 L-抗坏血酸防止对苯二酚氧化后,产率高达 90%^[23]。纤维单胞菌来源的淀粉蔗糖酶在不添加 L-抗坏血酸的情况下能有效地产生 α -熊果苷,转化率为 44.7%^[24]。

蔗糖异构酶(EC 5.4.99.11)能催化分子内转糖基化,将葡萄糖和果糖之间的 α -1,2 键重排成 α -1,6 键,催化蔗糖异构化为异麦芽酮糖^[22]。2011 年,周等人使用对苯二酚和蔗糖作为底物通过欧文氏菌蔗糖异构酶生产 α -熊果苷。野生型的摩尔转化率为 33.2%。在催化袋中进行定点诱变后,相同的反应条件下,变体 F185I, F321I 和 F321W 的摩尔转化率分别为 72.2%, 87.25% 和 88.2%^[25]。

1.2.2 供体底物非蔗糖的酶

α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)能催化淀粉内部 α -1,4-糖苷键的水解,并将淀粉转化为葡萄糖、麦芽糖和短链寡糖。它是 GH13 家族的成员,一些 α -淀粉酶对淀粉水解产物和作为糖基受体的非碳水化合物显示出糖基转移活性^[26]。1994 年,Nishimura 等人从 600 株土壤微生物中筛选出枯草芽孢杆菌 X-23。当麦芽三糖,麦芽五糖和可溶性淀粉作为糖基供体时,该 α -淀粉酶催化下的 α -熊果苷摩尔产率分别为 22.4%, 24.8% 和 32.4%^[13]。

环糊精糖基转移酶(EC 2.4.1.19)能催化淀粉和线性麦芽糖糊精的分解生成环糊精。它是 GH13 的成员,能催化四种反应,环化、偶联、歧化和水

解^[4]。其歧化活性被用于各种碳水化合物和非碳水化合物的转糖基化。2013年,来源于高温厌氧菌的环糊精糖基转移酶被用于 α -熊果苷的生产。当使用 α -环糊精和麦芽糖糊精作为供体底物时,摩尔产率分别为23.3%和21.2%。此外,环糊精糖基转移酶和淀粉葡萄糖苷酶的两步酶促反应体系可提高摩尔产率至30%^[27]。通过经分子改造的厌氧分支杆菌来源的环糊精糖基转移酶和淀粉葡萄糖苷酶的两步酶法反应催化合成 α -熊果苷,最优反应条件下的转化率达40%^[28]。

α -葡糖苷酶(EC 3.2.1.20)能催化 α -1,4键的水解,其底物偏好麦芽糖,麦芽三糖和麦芽四糖。它对一些碳水化合物和非碳水化合物具有转糖基化活性。来自野油菜黄单胞菌WU-9701的对苯二酚 α -糖基转移酶被纯化并鉴定,显示出典型的 α -葡糖苷酶性质。获得编码基因并克隆到大肠杆菌中进行表达,重组酶被证明是 α -葡萄糖苷酶^[29]。Prodanovic等人用来自面包酵母的 α -葡萄糖苷酶产生 α -熊果苷,摩尔转化率为4.6%。优化反应条件后,转化率提高到28%^[30]。

表1 不同酶催化生产 α -熊果苷比较

Table 1 Comparison of different enzymes for the production of α -arbutin

酶 Enzyme	供体底物 Donor	微生物来源 Microbial source	摩尔转化率 Molar conversion rate	参考文献 Reference
蔗糖磷酸化酶 Sucrose phosphorylase	蔗糖 Sucrose	肠膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	~65%	19
葡聚糖蔗糖酶 Dextranucrase		肠膜明串珠菌 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.4%	21
淀粉蔗糖酶 Amylosucrase		地热球菌 <i>Deinococcus geothermalis</i>	90%	23
蔗糖异构酶 Sucrose isomerase		欧文氏菌 <i>Eruvnia rhabontica</i>	33.2%	25
α -淀粉酶 α -Amylase	可溶性淀粉 Soluble starch	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> X-23	32.4%	13
	麦芽五糖 Maltopentaose		24.8%	
	麦芽三糖 Maltotriose		22.4%	
	麦芽糖 Maltose		9%	
环糊精糖基转移酶 Cyclodextrin glycosyltransferase	α -环糊精 α -cyclodextrin	高温厌氧菌 <i>Thermoanaerobacter</i> sp	23.3%	27
	麦芽糊精 Maltodextrin		21.7%	
	麦芽三糖 Maltotriose		20.0%	
	麦芽糖 Maltose		15.7%	
α -葡萄糖苷酶 α -Glucosidase	麦芽糖 Maltose	野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	93%	14

2 固定化研究及纯化工艺

2.1 固定化研究

由于反应底物对苯二酚有较强的杀菌作用,因此在微生物发酵生产 α -熊果苷的过程中,对苯二酚会对菌体产生伤害,从而影响反应效果。有研究采取用底物固定化的方法,控制发酵体系中对苯二酚的浓度,以减轻对苯二酚对菌体的伤害,将对苯二酚

固定在H107树脂上,利用嗜麦芽黄单胞菌进行发酵反应,固定化后最大摩尔转化率为93.5%,比游离状态产率高526%^[31,32]。

此外,在酶法合成方面,近期,有研究利用磁性壳聚糖微球固定化环糊精糖基转移酶来催化合成 α -熊果苷。优化固定化条件后,与游离酶相比,环糊精糖基转移酶的热稳定性有所提高。并且,重复催化反应5次之后,转化率仍能达到初始转化率的

46.3%^[33]。

2.2 纯化工艺

2013年,刘等人用大孔树脂吸附色谱法对嗜麦芽寡糖发酵液中的α-熊果苷进行分离,在探究多种树脂后发现极性大孔吸附树脂S-8表现出最佳的吸附和解吸能力,α-熊果苷被有效地分离,纯度可达97.3%,回收率为90.9%^[34]。

2017年,杨等人研究了酶法生产α-熊果苷的纯化工艺,分三步进行纯化,首先用乙醇发酵去除反应液中的大部分糖类杂质,其次用活性炭纤维吸附分离α-熊果苷,最后用甲醇-乙酸乙酯混合溶剂重结晶精制。经高效液相色谱检测,最终α-熊果苷纯度可达99%以上,收率达80%^[35]。

3 结论

α-熊果苷作为一种强力皮肤增白剂越来越受关注。它可通过酶促反应或微生物转化合成。在未来,寻找新型的酶和对α-熊果苷合成酶进行分子修饰以改善底物特异性和提高产率具有一定的研究前景。在微生物合成方面,可尝试各种重组表达系统来提高α-熊果苷合成酶的表达水平,深入研究发酵工程以提高总发酵酶活,通过工程微生物进一步优化生产过程。此外,探索优化固定化方法和纯化工艺也将促进和推动α-熊果苷的合成和生产。

参考文献

- Cho JY, et al. Recovery of arbutin in high purity from fruit peels of pear (*Pyrus pyrifolia*, Nakai) [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2011, 20:801-807.
- Lukas, B, et al. Arbutin in marjoram and oregano [J]. *Food Chem*, 2010, 121:185-190.
- Pop C, et al. Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania [J]. *Not Bot Horti Agrobo*, 2009, 37:129-132.
- Han R, et al. Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32:415-428.
- Lee BD, et al. Purification of arbutin extracts from asian pear peel by supercritical fluid extraction and solvent extraction using *AmberliteTM XAD-4TM* [J]. *Ab Pap Am Chem Soc*, 2009, 238:308.
- Piekoszewska A, et al. Arbutin production in *Ruta graveolens* L. and *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32:223-229.
- Kwiecień I, et al. Arbutin production via biotransformation of hydroquinone in in vitro cultures of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott [J]. *Acta Biochim Pol*, 2013, 60:865-870.
- Sugimoto K, , et al. Development of α-arbutin: production at industrial scale and application for a skin-lightening cosmetic ingredient [J]. *Tigg*, 2007, 19:235-246.
- Sugimoto K, et al. Inhibitory effects of α-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27:510-514.
- Sugimoto K, et al. Syntheses of arbutin-α-glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of α-arbutin and arbutin on human tyrosinase [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51:798-801.
- Ruan JW(阮佳威), et al. Effects of base materials of cosmetics on whitening efficacy and stability of α-arbutin [J]. *China Sur Deterg Cosme*(日用化学工业), 2015, 46:51-54.
- Liu YT(刘有婷). Study on the whitening mechanism, compatibility and stability of α-arbutin [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology(北京化工大学), 2012.
- Nishimura T, et al. Acceptor specificity in the glucosylation reaction of *Bacillus subtilis* X-23 α-amylase towards various phenolic compounds and the structure of kojic acid glucoside [J]. *J Ferment Bioeng*, 1994, 78(1):37-41.
- Kurosu J, et al. Enzymatic synthesis of α-arbutin by α-anomer-selective glucosylation of hydroquinone using lyophilized cells of *Xanthomonas campestris* WU-9701 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 93:328-330.
- Wu PH, et al. Surface display of transglucosidase on *Escherichia coli* by using the ice nucleation protein of *Xanthomonas campestris* and its application in glucosylation of hydroquinone [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95:1138-1147.
- Liu CQ, et al. Screening of high α-arbutin producing strains and production of α-arbutin by fermentation [J]. *World J Microbiol Biot*, 2013, 29:1391-1398.
- Liu C, et al. Feeding strategies for the enhanced production of α-arbutin in the fed-batch fermentation of *Xanthomonas maltophilia* BT-112 [J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2014, 37:325-329.
- Sugimoto K, et al. Sucrose phosphorylases catalyze transglycosylation reactions on carboxylic acid compounds [J]. *Biologia*, 2008, 63:1015-1019.
- Kitao S, et al. α-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from and production of α-arbutin [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 58:38-42.
- Naessens M, et al. *Leuconostoc* dextranucrase and dextran: production, properties and applications [J]. *J Chem Technol*

- Biot*, 2010, 80: 845-860.
- 21 Seo ES, et al. Synthesis and characterization of hydroquinone glucoside using *Leuconostoc mesenteroides* dextranase [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2009, 45: 355-360.
 - 22 Tian Y, et al. Amylosucrase as a transglucosylation tool: From molecular features to bioengineering applications [J]. *Bio-technol Adv*, 2018, 36: 1540.
 - 23 Seo DH, et al. High-yield enzymatic bioconversion of hydroquinone to α -arbutin, a powerful skin lightening agent, by amylosucrase [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2012, 94: 1189-1197.
 - 24 Wang Y, et al. Identification of an α -(1,4)-glucan-synthesizing amylosucrase from *Cellulomonas carbonis* T26 [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 2110-2119.
 - 25 Zhou X, et al. Sucrose isomerase and its mutants from *Erwinia rhamontici* can synthesize α -arbutin [J]. *Protein Pept Lett*, 2011, 18: 1028-1034.
 - 26 Alina M, et al. Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritima* α -amylase [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2010, 46: 331-337.
 - 27 Sindhu Mathew, et al. Regioselective glycosylation of hydroquinone to α -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp [J]. *Biochem Eng J*, 2013, 79: 187-193.
 - 28 Zhang WL(张文蕾), et al. Optimization of conditions for production of α -arbutin by cyclodextrin glucosyltransferase and its molecular modification [J]. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2017, 43(6): 49-53.
 - 29 Sato T, et al. Purification, characterization, and gene identification of an α -glucosyl transfer enzyme, a novel type α -glucosidase from *Xanthomonas campestris* WU-9701 [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2012, 80: 20-17.
 - 30 Prodanovi? R, et al. Transglucosylation of hydroquinone catalysed by α -glucosidase from baker's yeast [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2005, 35: 142-146.
 - 31 Liu CQ., et al. Toward a cost-effective method for α -arbutin production by using immobilized hydroquinone as a glucosyl acceptor [J]. *Proc Biochem*, 2013, 48: 1447-1452.
 - 32 Wang XP(王秀捧), et al. The biosynthesis of α -arbutin by *Xanthomonas maltophilia* BT-112 [J]. *Microbio China*(微生物学通报), 2007, 34: 417-420.
 - 33 Zhang H(张欢), et al. Synthesis of α -arbutin with cyclodextrin glycosyltransferase immobilized by magnetic chitosan microspheres [J]. *Mod Chem Ind*(现代化工), 2017, 37: 98-102.
 - 34 Chunqiao L, et al. Isolation of α -arbutin from *Xanthomonas CGMCC 1243* fermentation broth by macroporous resin adsorption chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 925: 104-109.
 - 35 Yang XK(杨祥开), et al. Technology for separating and purifying α -arbutin from enzymatic synthesis [J]. *J Huazhong Agric Univ*(华中农业大学学报), 2017, 36(3): 57-62.

(上接第 221 页)

- 7 Cumano A, Paige CJ, Iscove NN, et al. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver [J]. *Nature*, 1992, 356: 612-615.
- 8 Horton SJ, Walf-Vorderwülbecke V, Chatters SJ, et al. Acute myeloid leukemia induced by MLL-ENL is cured by oncogene ablation despite acquisition of complex genetic abnormalities [J]. *Blood*, 2009, 113: 4922.
- 9 Rodriguez-Perales S, Cano F, Lobato MN, et al. MLL, gene fusions in human leukaemias: in vivo modelling to recapitulate these primary tumourigenic events [J]. *Int J Hematol*, 2008, 87(1): 3-9.
- 10 Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 823.
- 11 Mulloy JC, Cammenga J, Berguido FJ, et al. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34 + hematopoietic cells using a single genetic element. [J]. *Blood*, 2003, 102: 4369-4376.
- 12 Krivtsov AV, Feng Z, Armstrong SA. Transformation from committed progenitor to leukemia stem cells [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2009, 1176: 144-149.
- 13 Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1617-1628.
- 14 Somervaille TCP, Matheny CJ, Spencer GJ, et al. Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 129-140.
- 15 Benz C, Copley MR, Kent DG, et al. Hematopoietic Stem Cell Subtypes Expand Differentially during Development and Display Distinct Lymphopoietic Programs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 273.
- 16 Godfrey L, Kerry J, Thorne R, et al. MLL-AF4 binds directly to a BCL-2 specific enhancer and modulates H3K27 acetylation [J]. *Exp Hematol*, 2017, 47: 64-75.