

文章编号: 1674-5566(2025)03-0664-10

DOI: 10.12024/jsou.20240404514

## 海洋蔗糖磷酸化酶 Suc75290 催化合成 $\alpha$ -熊果苷的条件优化及纯化工艺

张秋莹<sup>1</sup>, 孙晶晶<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 江承程<sup>1</sup>, 林聪<sup>2</sup>, 郝建华<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部极地渔业可持续利用重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛瑞信天佑生物科技有限公司, 山东 青岛 266315)

**摘要:** 为探究来源于海洋的重组海洋蔗糖磷酸化酶 Suc75290 催化合成  $\alpha$ -熊果苷的条件及其分离纯化条件, 实验采用蔗糖和对苯二酚为底物, 海洋蔗糖磷酸化酶 Suc75290 为催化剂合成  $\alpha$ -熊果苷, 使用大孔吸附树脂 HP20 对反应液中  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚进行分离纯化。结果显示, pH 为 7 的 MES-NaOH 缓冲液、反应温度为 40 °C、最适对苯二酚浓度为 38.5 g/L、蔗糖与对苯二酚摩尔比最佳为 5:1 (蔗糖浓度为 600 g/L)、最适加酶量为 300 U/mL、最适反应时间为 28 h 等 6 个因素是海洋蔗糖磷酸化酶 Suc75290 催化合成  $\alpha$ -熊果苷的最优条件, 对苯二酚的转化率为 96.70%,  $\alpha$ -熊果苷含量为 64.3 g/L (238.7 mmol/L); 采用大孔树脂吸附法分离, 以去离子水作为上样缓冲液, 确定最佳分离条件: 上样体积为 10 mL, 上样流速为 0.5 mL/min, 洗脱液为 30% 乙醇, 洗脱流速 1 mL/min, 经过旋蒸处理后得到 50 mg  $\alpha$ -熊果苷, 纯度为 99.9%。综上, 使用海洋蔗糖磷酸化酶 Suc75290 合成高浓度的  $\alpha$ -熊果苷的条件优化及对  $\alpha$ -熊果苷的分离纯化工艺研究为高纯度  $\alpha$ -熊果苷的开发利用提供了应用基础。

**关键词:** 海洋蔗糖磷酸化酶 Suc75290; 酶法合成;  $\alpha$ -熊果苷; 分离纯化

**中图分类号:** TQ 28; TQ 203.2 **文献标志码:** A

$\alpha$ -熊果苷 ( $\alpha$ -arbutin) 是对苯二酚 (HQ) 的天然糖基化衍生物, 化学名称为 4-羟基苯-D-吡喃葡萄糖苷。研究者发现熊果苷可作为酪氨酸酶的抑制剂, 能阻断多巴以及多巴醌的合成, 从而有效地抑制黑色素的生成, 具有美白作用, 且对皮肤没有刺激性, 毒副作用小, 具有显著抑制酪氨酸酶活性的作用, 是一种新兴的无刺激、无过敏和配伍性强的天然美白活性物质<sup>[1-2]</sup>, 其美白活性是  $\beta$ -熊果苷的十倍<sup>[3]</sup>。除美白特性外, 还有抗氧化、抗菌、抗炎和作为抗癌剂的潜力<sup>[4]</sup>。在小麦和梨等各种植物中发现  $\beta$ -熊果苷,  $\alpha$ -熊果苷和其他熊果苷衍生物是通过化学<sup>[5]</sup>和酶促方法合成的。酶促合成法利用糖基转移酶的转糖基作用, 从中间体如寡糖核苷二磷酸糖脂等物质上切下一个糖基, 然后特异性地转移到受体上, 具有高

度的立体区域选择性, 所以形成的产物特异性较高, 这种方法可以有效地克服一些化学法合成纯度不高、同分异构体较多的缺点, 用来高效合成产物。已报道过的糖基转移酶包含: 环糊精葡萄糖基转移酶<sup>[6]</sup>、淀粉酶<sup>[2]</sup>和蔗糖磷酸化酶<sup>[7]</sup>等。SU 等<sup>[8]</sup>优化了一种新的蔗糖磷酸化酶重组 PeSP 生物合成  $\alpha$ -熊果苷的反应条件,  $\alpha$ -熊果苷的产量为 52.6 g/L, HQ 转化率为 60.9%。在 30 °C 和 pH 7.0 的条件下, 使用 200 U/mL 的 PeSP 以及将蔗糖和对苯二酚以 5:1 的摩尔比反应 25 h, 达到最佳条件。RUDEEKULTHAMRONG 等<sup>[9-10]</sup>将来自 *Thermus* sp. 的 AMase 对  $\alpha$ -熊果苷衍生物的产物回收率高达 83% (24.9 mg/mL)。

蔗糖磷酸化酶 (EC2.4.1.7, Sucrose phosphorylase, SPase) 作为糖基水解酶第 13 家族

收稿日期: 2024-04-23 修回日期: 2024-07-20

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2805101); 青岛市自然科学基金 (23-2-1-185-zyyd-jch); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目 (2023TD71)

作者简介: 张秋莹 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为糖苷类物质的分离制备。E-mail: 13180281702@163.com

通信作者: 郝建华, E-mail: haojh@ysfri.ac.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

(GH13)的一员,具有催化蔗糖和磷酸反应的能力,生成 1-磷酸葡萄糖(Glc-1-P)和 D-果糖(Fructose)。该酶可以利用简单的糖类生成有价值的糖苷、多酚类物质,在食品、化妆品和医药等方面有很大的应用前景。但野生菌生产的 SPase 量较低,还不能满足大规模的工业化生产。实验聚焦于海洋来源的重组蔗糖磷酸化酶 Suc75290,人工合成蔗糖磷酸化酶 Suc75290 基因,并与载体 pET24a 连接转化至大肠杆菌 BL21 中,构建了重组基因工程菌 *E. coli* BL21/pET24a-Suc75290。通过 IPTG 诱导 *E. coli* BL21/pET24a-Suc75290,实现了 Suc75290 在大肠杆菌中的表达,探讨其催化生成  $\alpha$ -熊果苷的条件优化。

酶催化反应液中有多糖和未反应完的底物干扰,因此需要对分离纯化工艺进行优化。大孔吸附树脂为一种有机高聚物吸附剂,具有选择性吸附有机化合物的能力,对多糖基本不予吸附,树脂的吸附能力及其解吸、纯化条件参数因化合物的理化性质的不同而不同。张乐乐等<sup>[11]</sup>采用 3 种型号的大孔树脂对梨渣中熊果苷进行纯化;崔婷婷<sup>[12]</sup>比较了 5 种大孔吸附树脂对熊果苷的纯化效果,筛选适宜提取和纯化工艺,纯度提高了 33.8 倍。LIU 等<sup>[13]</sup>从黄单胞菌 CGMCC 1243 发酵液中分离  $\alpha$ -熊果苷,使用大孔吸附树脂 S-8 最适合纯化,回收率 90.9%,纯度为 97.3%。

实验利用蔗糖和对苯二酚为底物,海洋蔗糖磷酸化酶(Suc75290)为催化剂进行转糖基反应得到  $\alpha$ -熊果苷,对反应进行条件优化。但由于发酵液中大量多糖和底物的干扰,使用大孔树脂 HP20 对熊果苷的吸附及解吸特性作了重点考察,优选出了最适条件分离熊果苷的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和仪器

材料:大孔吸附树脂 HP20,北京绿百草科技发展有限公司;对苯二酚,国药集团化学试剂有限公司; $\alpha$ -熊果苷,北京普西唐生物科技有限公司;无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司;海洋蔗糖磷酸化酶(Suc75290),本实验室自制。层析柱(直径 16 mm,长 1 000 mm),北京瑞达恒辉科技发展有限公司。

仪器:恒温水浴摇床,上海市离心机机械研究所有限公司;Unique20 型纯水仪,厦门锐斯捷水纯化技术有限公司;JY96-IIN 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝科技生物股份有限公司;SW-CJ 超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;HANPING 电子天平,上海精密科学仪器有限公司;GI54DS 高压蒸汽灭菌锅,致微(厦门)仪器有限公司;AKTA explorer 液相色谱蛋白纯化系统,美国通用电气公司;IKA 旋转蒸发仪,艾卡(广州)仪器设备有限公司;Waters2695 液相色谱仪,沃特世科技(上海)有限公司;GL Science C18 (4.6 mm×250 mm),技尔(上海)商贸技术有限公司。

### 1.2 蔗糖磷酸化酶催化合成 $\alpha$ -熊果苷

利用糖磷酸化酶的葡萄糖基转移能力,将一个葡萄糖基转移至受体对苯二酚的酚羟基上生成  $\alpha$ -熊果苷。反应体系:一定量的蔗糖和对苯二酚加入到含有适量酶活力的蔗糖磷酸化酶溶液中,反应体系缓冲液为 MES-NaOH 缓冲液,反应总体积为 10 mL,混匀后密封并避光反应一定时间后,沸水浴 5 min 终止反应。反应简式如图 1 所示。

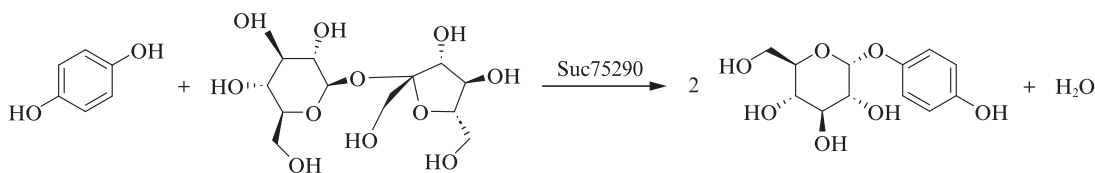


图 1 合成  $\alpha$ -熊果苷反应简式

Fig. 1 Synthesis of  $\alpha$ -arbutin reaction formula

### 1.3 制备 $\alpha$ -熊果苷的条件优化

固定反应液体积 10 mL,通过改变单一条件考察反应液 pH(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、反应温度(20、25、30、35、40、45、

50 °C)、对苯二酚浓度(50、100、150、200、250、300、350、400 mmol/L)、蔗糖与对苯二酚摩尔比(1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1)、加酶量(50、100、150、200、250、300、350、400 U/mL)、反应时

间(4、8、12、16、20、24、28、32、36 h)对催化蔗糖磷酸化酶合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响。

#### 1.4 树脂预处理

首先使用去离子水冲洗大孔树脂 HP20, 去除可能存在的杂质和残留物, 直至流出液清澈为止。然后将 95% 乙醇缓慢地加入到色谱柱中, 充分浸泡大孔树脂不少于 24 h, 最后使用去离子水洗去乙醇。

#### 1.5 大孔树脂分离条件优化

将处理好的大孔吸附树脂 HP20 装柱, 固定大孔吸附树脂 100 mL 于柱中(直径 16 mm, 长 1 000 mm), 通过改变上样流速(0.5、1.0、2.0、3.0 mL/min)、上样体积(5、10、15、20 mL)、上样 pH(4、5、6、7、8)、洗脱液浓度(20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%)、洗脱流速(0.5、1.0、2.0、3.0 mL/min)来分析对 $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚的分离效果。

#### 1.6 回收率与纯度计算

对 $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚进行分离洗脱时, 每 10 mL 对洗脱液进行收集,  $\alpha$ -熊果苷的回收率和纯度计算公式:

$$H_1 = \frac{\sum_1^n (C_n \times V_n)}{N} \quad (1)$$

$$H_2 = \frac{\sum_1^n (C_n \times V_n)}{\sum_1^n (C_i \times V_i)} \quad (2)$$

式中:  $H_1$  为 $\alpha$ -熊果苷回收率, %;  $H_2$  为 $\alpha$ -熊果苷纯度, %;  $C_n$  为 $\alpha$ -熊果苷洗脱第  $n$  管时的质量浓度, g/L;  $V_n$  为 $\alpha$ -熊果苷洗脱第  $n$  管时的体积, L;  $N$  为 $\alpha$ -熊果苷上样反应液的质量, g;  $C_i$  为 $\alpha$ -熊果苷和

对苯二酚洗脱第  $i$  管时的质量浓度, g/L;  $V_i$  为 $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚洗脱第  $i$  管时的体积, L。

#### 1.7 旋蒸处理

将收集的流出液分别旋蒸 30 min, 水浴温度为 40 °C, 压力为 50 mbar, 旋转速度为 100 r/min。

#### 1.8 $\alpha$ -熊果苷检测条件

收集的流出液使用 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤, 随后取 20  $\mu$ L 液体上样。使用 Waters 高效液相系统(HPLC)进行检测, 检测器为 Waters 2695 PDA 检测器, 色谱柱为 GL Science C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm), 流动相为 95:5:1 的水、甲醇、乙酸混合溶液, 检测波长为 280 nm, 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 30 °C。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蔗糖磷酸化酶催化合成 $\alpha$ -熊果苷条件优化

#### 2.1.1 pH 对催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

在 pH 为 6.5~7.5 时,  $\alpha$ -熊果苷的产量较高, 且在反应缓冲液 pH=7.0 时,  $\alpha$ -熊果苷的产量最大, 浓度为 165.5 mmol/L, 对苯二酚的转化率为 81.5%。这表明反应体系在中性条件下更有利于 $\alpha$ -熊果苷的合成。实验结果如图 2 所示, pH=7.0 的缓冲液与 Suc75290 的最适 pH 接近, 这说明在这个 pH 下酶的活性可能达到最佳状态, 有利于催化合成反应的进行。因此, 最终选择缓冲液 pH=7.0 的 MES-NaOH 缓冲液作为催化合成熊果苷的最适 pH 缓冲液是合理的。

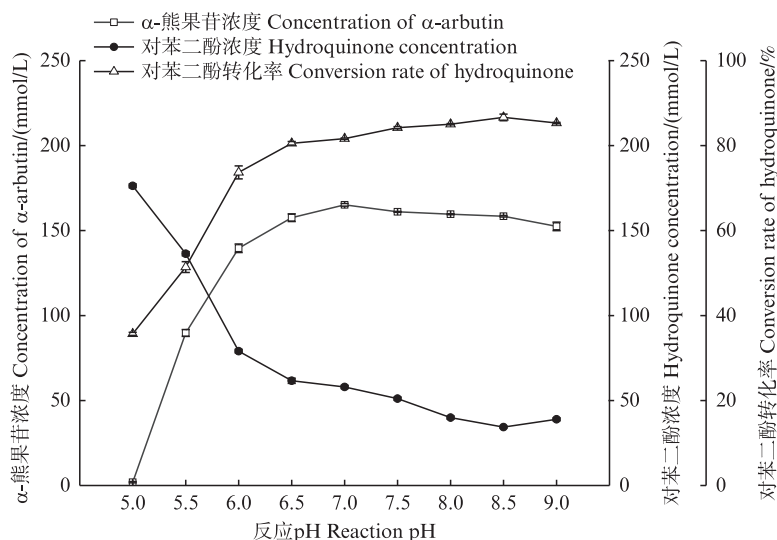


图2 pH 对 Suc75290 催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

Fig. 2 Effect of pH on the synthesis of  $\alpha$ -arbutin catalyzed by Suc75290

### 2.1.2 温度对催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

在一定温度范围内,提高温度通常有利于提高酶的活性,因为温度可以促进酶分子的运动和反应速率。然而,当反应温度过高时,会导致酶分子结构的变性,从而使其催化能力下降,甚至失活。另一方面,随着温度的升高,对苯二酚的氧化速率也会加快,这会导致反应体系中对苯二酚的浓度下降。由于对苯二酚是催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应的底物之一,其浓度的下降会直接影响最终产物  $\alpha$ -熊果苷的产量。不同温度对催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应的影响见图 3。当温度低于 40 °C 时,对苯二酚的转化率和  $\alpha$ -熊果苷的产量随着温度的提高而升高,当温度为 40 °C 时,  $\alpha$ -熊果苷的浓度为 207.5 mmol/L, 对苯二酚转化率为 88.2%, 当温度高于 40 °C 时,由于酶的稳定性较

差,导致对苯二酚转化率和  $\alpha$ -熊果苷产量低,所以确定  $\alpha$ -熊果苷催化反应最适温度为 40 °C。

### 2.1.3 蔗糖与对苯二酚的摩尔比对催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

蔗糖与对苯二酚的摩尔比对催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应有着重要影响。实验结果如图 4 所示,随着供受体比例的增加,即蔗糖与对苯二酚的摩尔比的增加,对苯二酚的转化率和  $\alpha$ -熊果苷的产量也在升高。当蔗糖与对苯二酚的摩尔比为 5:1 时,  $\alpha$ -熊果苷的浓度为 212.5 mmol/L, 对苯二酚的转化率为 86.5%, 当蔗糖与对苯二酚的摩尔比高于 5:1 时,蔗糖浓度的进一步增加并不能继续提高  $\alpha$ -熊果苷的含量,反而会增加反应体系的黏度。因此,可以确定在  $\alpha$ -熊果苷催化反应中,蔗糖与对苯二酚的最佳摩尔比例为 5:1。

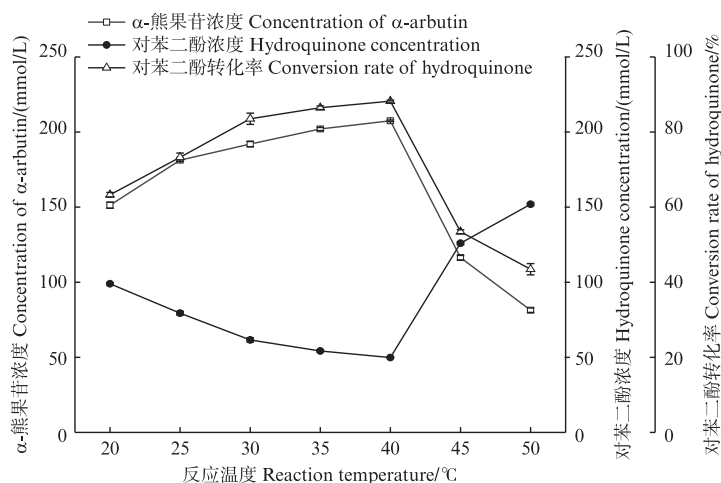


图 3 温度对 Suc75290 催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the synthesis of  $\alpha$ -arbutin catalyzed by Suc75290

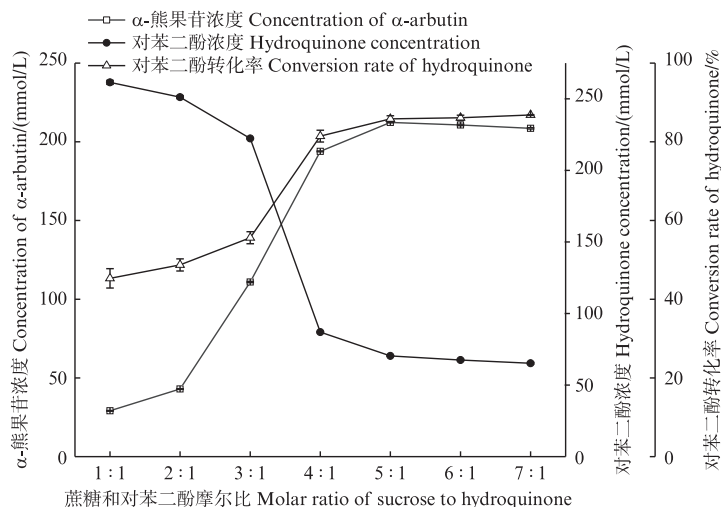


图 4 蔗糖与对苯二酚的摩尔比对 Suc75290 催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应的影响

Fig. 4 Effect of the molar ratio of sucrose to hydroquinone on the synthesis of  $\alpha$ -arbutin from Suc75290



### 2.1.4 对苯二酚的浓度对催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

对苯二酚具有抑制酪氨酸酶活性的特性,同样可能对蔗糖磷酸化酶的活性产生影响。在实验中发现,当缓冲液中对苯二酚的浓度超过一定量时,对苯二酚与酶发生相互作用,导致酶的活性下降。在ZHU等<sup>[14]</sup>研究中,发现底物对苯二酚对黄单胞菌的淀粉蔗糖酶(Amy-1)有显著抑制作用,而产物 $\alpha$ -熊果苷则没有。如图5所示,随着对苯二酚浓度的增加, $\alpha$ -熊果苷的产量逐渐提高。当对苯二酚浓度为350 mmol/L时, $\alpha$ -熊果苷

的产量达到最高值,为218.9 mmol/L,对苯二酚的转化率也达到84.45%。因此,可以确定在催化反应中,对苯二酚的最适浓度为350 mmol/L。

### 2.1.5 反应时间对催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

反应时间对催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应有显著影响。实验结果如图6所示,随着反应时间的增加, $\alpha$ -熊果苷的产量也在增加,但增加速率逐渐减缓。当反应时间达到28 h时, $\alpha$ -熊果苷的产量达到最大值为225.3 mmol/L,对苯二酚的转化率为95.1%。因此,根据实验结果可以确定最佳的反应时间为28 h。

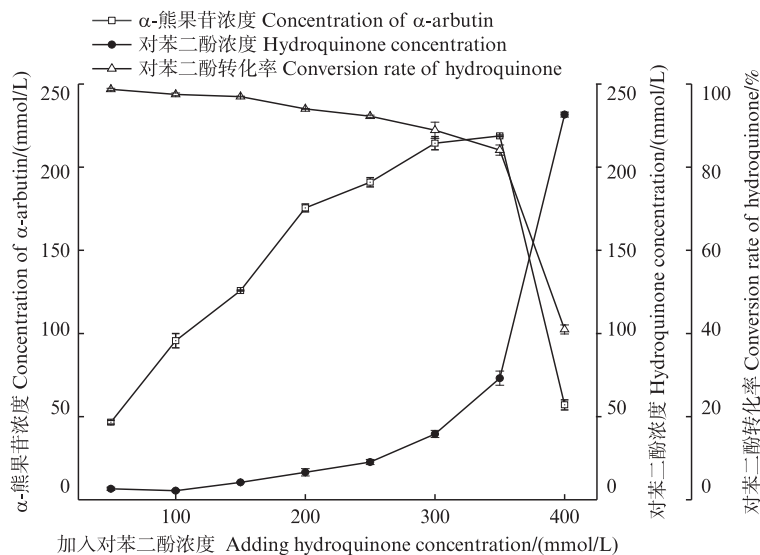


图5 对苯二酚的浓度对Suc75290催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

Fig. 5 Effect of the concentration of hydroquinone on the synthesis of  $\alpha$ -arbutin catalyzed by Suc75290

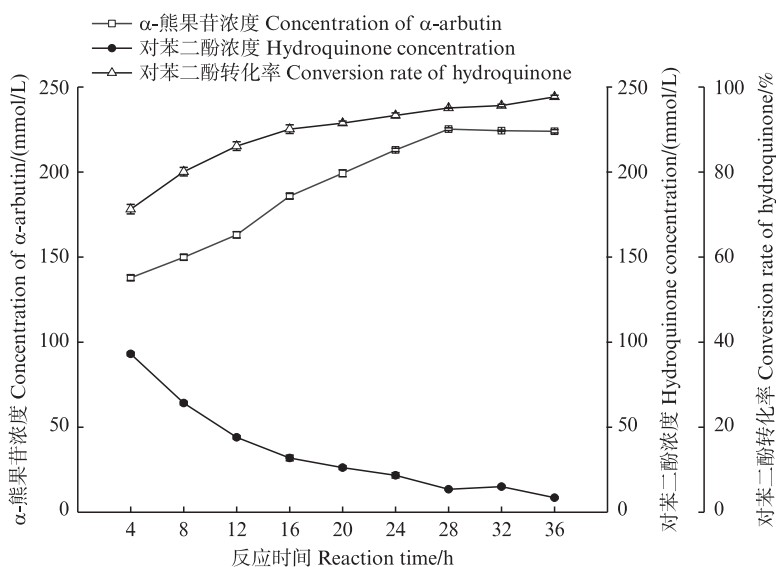


图6 反应时间对Suc75290催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

Fig. 6 Effect of reaction time on the synthesis of  $\alpha$ -arbutin catalyzed by Suc75290

### 2.1.6 加酶量对催化合成 $\alpha$ -熊果苷反应的影响

Suc75290 的加酶量对催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应有重要影响。实验结果如图 7 所示,加酶量不足会导致  $\alpha$ -熊果苷产量不高,这是因为酶作为催化剂在反应中起到关键作用。当加酶量在 100~300 U/mL 时,随着加酶量的增加,对苯二酚的转化率和  $\alpha$ -熊果苷的产量也逐渐升高。在实验中发现,当加酶量达到 300 U/mL 时,达到了最优加酶量, $\alpha$ -熊果苷的浓度达到 238.7 mmol/L,对苯二酚转化率为 96.7%。进一步增加加酶量并不能再提高  $\alpha$ -熊果苷产量和对苯二酚的转化率,这可能是因为反应体系已经饱和,过多的酶不能再增加反应速率。因此,在催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应中,加酶量为 300 U/mL 时为最优加酶量。

## 2.2 大孔吸附树脂分离纯化

### 2.2.1 反应液除糖

大孔树脂的吸附原理依靠它和被吸附的分子(吸附质)之间的范德华引力,通过它巨大的比表面进行物理吸附而工作,使有机化合物根据有吸附力及其分子量大小可以经一定溶剂洗脱分开而达到分离、纯化、除杂、浓缩等不同目的。当反应液中含有蔗糖作为底物时,蔗糖一部分会被利用生成  $\alpha$ -熊果苷,另一部分会水解成果糖和葡萄糖。大孔吸附树脂依靠它和被吸附的分子(吸附质)之间的范德华引力,通过它巨大的比表面进行物理吸附而工作。在图 8 中,HPLC 色谱分析条件:Waters 2410 示差折光检测器;色谱柱:Agilent

ZORBAX NH<sub>2</sub>, 5  $\mu$ m 4.6 $\times$ 250 mm;  $V$ (流动相:乙腈)/ $V$ (水)=80:20,流速 0.8 mL/min,进样量 20  $\mu$ L,柱温 30  $^{\circ}$ C。在洗脱过程中,洗脱液乙醇与已吸附的物质形成竞争关系,因其吸附力的不同及分子量的大小,导致糖类物质优先被洗脱(集中在前 40 mL),随后待分离的其他物质才逐渐被洗脱出来。HATANO 等<sup>[15]</sup>提到使用蒸馏水进行洗脱,以去除残留的蛋白质和糖类物质,提高反应液纯度。

### 2.2.2 上样流速的优化

上样流速对样品回收率产生影响,较慢的上样流速会导致树脂更多地吸附目标样品  $\alpha$ -熊果苷,因此样品的回收率会更高(图 9)。相反,上样流速增加时,流经柱子的尚未被吸附的样品逐渐增多,导致吸附效果降低,从而导致样品的回收率也随之降低。因此,可以得出结论:上样流速越低,吸附效果越好,回收率也会随之增加;反之,吸附效果降低,回收率也会随之降低。

### 2.2.3 上样体积的优化

不同树脂的载样量不同,分离纯化效果也不同,在层析柱中加入树脂 100 mL,为确定 HP20 对反应液的最佳上样体积(反应液中  $\alpha$ -熊果苷的含量为 64.3 g/L),研究了大孔吸附树脂 HP20 对反应液不同上样体积的纯化效果。当上样体积为 5 mL 时,纯度达到 98.1%,回收率 84.8%;当上样体积 10 mL 时,纯度和回收率都达到最高,分别为 99.2% 和 89.3%;逐渐增加上样体积时,回收率和纯度都逐渐降低(图 10)。因此,选择上样体积为 10 mL。

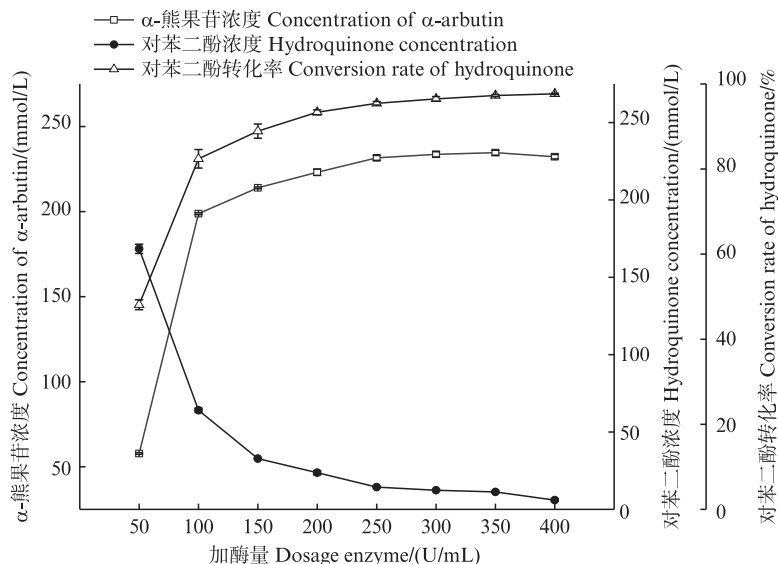
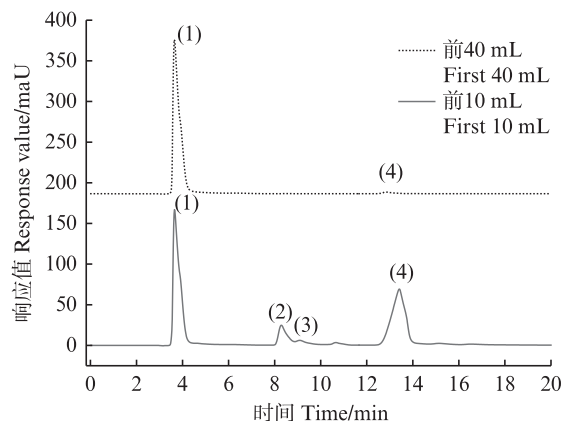


图 7 加酶量对 Suc75290 催化合成  $\alpha$ -熊果苷反应的影响

Fig. 7 Effect of dosage enzyme on the synthesis of  $\alpha$ -arbutin from Suc75290



(1)水;(2)果糖;(3)葡萄糖;(4)蔗糖。

(1)Water; (2)Fructose; (3)Glucose; (4)Sucrose.

图8 洗脱液前10 mL和前40 mL色谱图  
Fig. 8 Chromatogram of the first 10 mL and first 40 mL eluents

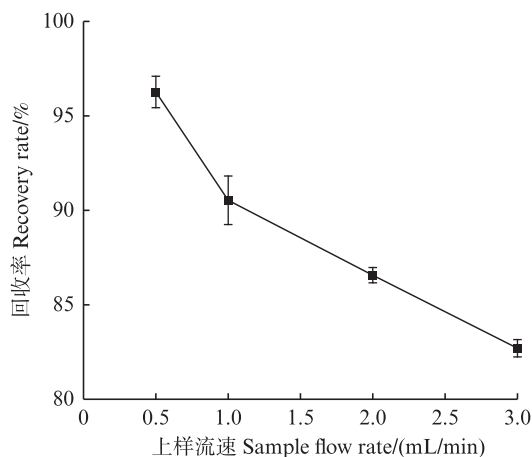


图9 上样流速对α-熊果苷回收率的影响  
Fig. 9 Effect of sample flow rate on the recovery of α-arbutin

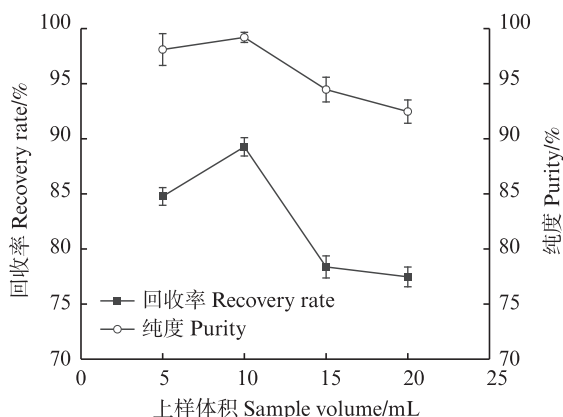


图10 上样体积对α-熊果苷分离纯化的影响  
Fig. 10 Effect of sample volume on separation and purification of α-arbutin

#### 2.2.4 上样反应液pH的优化

HP20树脂的吸附原理依靠它和被吸附的分

子(吸附质)之间的范德华引力。在研究中考虑到α-熊果苷在碱性和强酸性条件下容易分解的特性,测试了不同pH下反应液在树脂上的吸附情况。如图11所示,在不同pH条件下,随着pH的升高,回收率呈现先升高后降低的趋势,在pH为7时达到最高值;同时,纯度也在pH为7时达到最高点。当pH为8时,对苯二酚会发生解离并带有氧负离子,使其极性与α-熊果苷接近,导致两者难以分离。而在反应液的pH小于8时,对苯二酚可能以分子形式存在,其极性较低,使得α-熊果苷和对苯二酚易于分离。因此,在pH为7时,纯度达到99.9%,回收率为89.1%,表现出最佳的分离效果,因此选择在pH为7时进行上样。另外,贺绍祥等<sup>[16]</sup>使用S-8树脂进行分离,发现在pH为1时,对熊果苷、对苯二酚和麦芽糖的分离效果最佳。这些研究结果为选择合适的反应条件和树脂类型提供了重要参考,有助于优化分离纯化过程,提高产物的纯度和回收率。

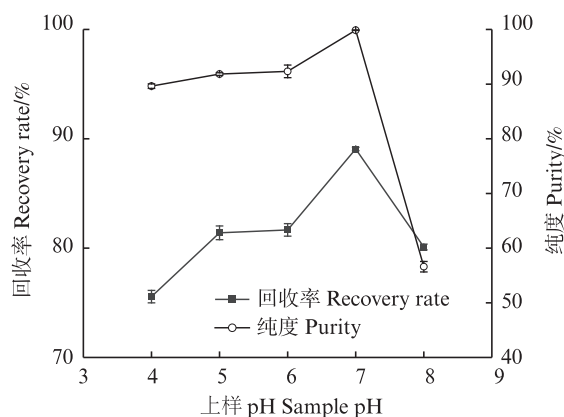


图11 上样pH对α-熊果苷分离纯化的影响  
Fig. 11 Effect of sample pH on separation and purification of α-arbutin

#### 2.2.5 洗脱液浓度的优化

选择不同浓度的乙醇进行洗脱会影响洗脱液的极性,导致对苯二酚被洗脱下来,从而影响α-熊果苷的分离效果。如图12所示,随着乙醇浓度的增加,α-熊果苷的纯度逐渐降低,同时对苯二酚的洗脱率增加,使得两者的洗脱峰重合,分离效果不理想。在此情况下,回收率在30%乙醇时达到最高点,随后逐步降低,50%时到达最低点,之后有所回升。因此,综合考虑最佳洗脱液浓度为30%乙醇。

刘春巧<sup>[17]</sup>研究发现,使用不同浓度的甲醇和乙醇进行洗脱,随着浓度的增加,α-熊果苷的洗脱

率增加,但纯度相对降低。这是因为随着溶剂浓度的增加,溶剂极性减小,导致被洗脱下来的杂质增加,进而降低了目标产物的纯度。考虑到甲醇的毒性,最终选择了25%乙醇进行洗脱。祝上宾<sup>[18]</sup>在梨叶中提取 $\beta$ -熊果苷时,使用40%乙醇作为洗脱液;而在使用20%甲醇、25%乙醇和45%乙酸乙酯作为洗脱液的实验中,发现在25%乙醇溶液下 $\alpha$ -熊果苷的纯度达到最高。这些实验结果表明在洗脱过程中正确选择洗脱液的浓度对于提高目标产物的纯度和回收率至关重要。

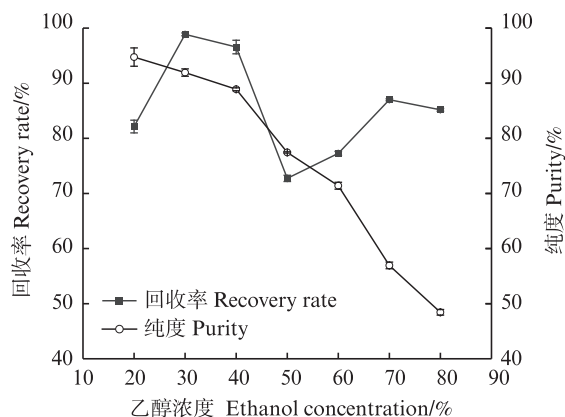


图 12 乙醇浓度对  $\alpha$ -熊果苷分离纯化的影响

Fig. 12 Effect of ethanol concentration on the separation and purification of  $\alpha$ -arbutin

### 2.2.6 洗脱液流速的优化

大孔树脂由于其多孔结构,使用过快的流速会使洗脱液难以进入空隙进行洗脱。在实验中使用30%乙醇进行洗脱时,发现洗脱流速会影响分离效果。如图13所示,在上样流速为0.5 mL/min,上样pH为7,上样体积为10 mL,洗脱液浓度为30%乙醇的基础上,随着流速的增

加,回收率下降,而纯度在前3个流速下都能达到95%以上;在1 mL/min时,纯度达到最高值为98.3%,回收率为89.1%;而在3 mL/min时,纯度达到最低为92.2%,回收率为80.1%。流速的提高会导致洗脱液体积增加,从而影响了洗脱效果,导致分离效果不太理想。最终确定洗脱流速为1 mL/min,这一流速能够在保证较高纯度的同时,使得回收率相对较高,提高了洗脱效果和分离效率。

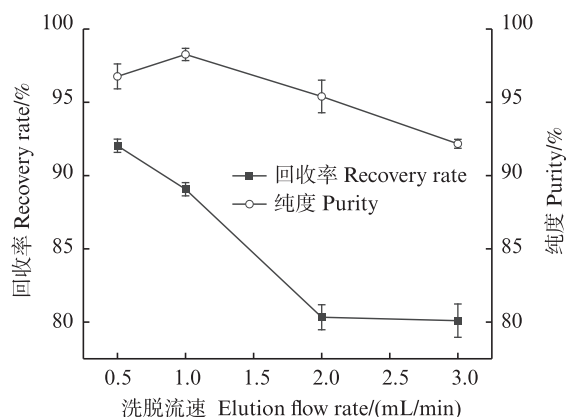


图 13 洗脱流速对  $\alpha$ -熊果苷分离纯化的影响

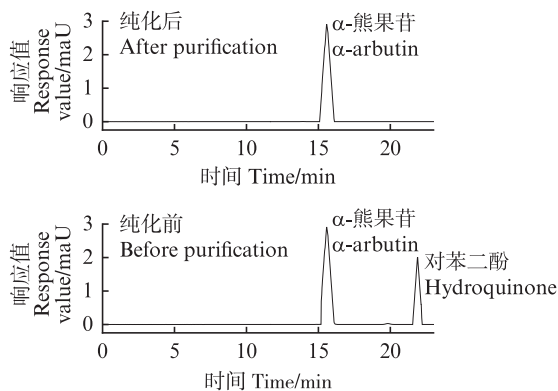
Fig. 13 Effect of elution flow rate on the separation and purification of  $\alpha$ -arbutin

### 2.3 最终结果

将分离液进行旋蒸处理,水浴温度为40 °C,最终收集到50 mg熊果苷,回收率为75.1%,纯度达到99.9%,分离效果较为显著。在李晓玉<sup>[19]</sup>的研究中,使用重组蔗糖磷酸化酶生产 $\alpha$ -熊果苷,经过纯化后的 $\alpha$ -熊果苷的纯度为99.5%。如图14a所示,为旋蒸后的 $\alpha$ -熊果苷粉末,图14b为 $\alpha$ -熊果苷反应液纯化前后高效液相色谱图。



(a)



(b)

图 14  $\alpha$ -熊果苷旋蒸后粉末和纯化前后 HPLC 色谱图

Fig. 14 HPLC diagram of  $\alpha$ -arbutin powder after rotary evaporation and before and after purification



### 3 结论

实验使用蔗糖和对苯二酚为底物,海洋蔗糖磷酸化酶 Suc75290 为催化剂合成  $\alpha$ -熊果苷,探究最适反应条件,最适缓冲液为 pH=7.0 的 MES-NaOH 缓冲液,最适温度为 40 °C,体系中最适对苯二酚浓度为 38.5 g/L,蔗糖与对苯二酚摩尔比最佳为 5:1(蔗糖浓度为 600 g/L),最适加酶量为 300 U/mL,最适反应时间为 28 h。在最佳条件下,对苯二酚的转化率最高为 96.7%, $\alpha$ -熊果苷最高转化率为 68.2%,最高含量为 64.3 g/L (238.7 mmol/L)。

使用大孔吸附树脂 HP20 对  $\alpha$ -熊果苷反应液进行分离纯化的实验过程,将被吸附在树脂上的  $\alpha$ -熊果苷和对苯二酚进行分离纯化,对上样流速、上样体积、上样 pH、洗脱液浓度、洗脱液流速等因素进行优化,并对分离纯化的  $\alpha$ -熊果苷进行旋蒸。利用去离子水作为上样缓冲液进行上样,上样流速为 0.5 mL/min,上样 pH 为 7.0,乙醇作为洗脱液,洗脱液浓度为 30%,洗脱流速为 1 mL/min,上样体积为 10 mL,回收率达到 89.1%,纯度为 99.9%。经过旋蒸处理后得到 50 mg  $\alpha$ -熊果苷,纯度为 99.9%,回收率为 75.1%。这一实验通过合理选择生成和分离纯化  $\alpha$ -熊果苷条件,成功地实现了对  $\alpha$ -熊果苷的高效转化和分离纯化。

作者声明本文无利益冲突。

### 参考文献:

- [1] JULIANO C C A. Spreading of dangerous skin-lightening products as a result of colourism: a review [J]. Applied Sciences, 2022, 12(6): 3177.
- [2] AGARWAL N, RAI A K, SINGH S P. Biotransformation of hydroquinone into  $\alpha$ -arbutin by transglucosylation activity of a metagenomic amylosucrase [J]. 3 Biotech, 2021, 11(8): 362.
- [3] WANG W, GAO Y, WANG W W, et al. Kojic acid showed consistent inhibitory activity on tyrosinase from mushroom and in cultured B16F10 cells compared with arbutins [J]. Antioxidants, 2022, 11(3): 502.
- [4] TAI A, IOMORI A, ITO H. Structural evidence for the DPPH radical-scavenging mechanism of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2017, 25(20): 5303-5310.
- [5] ZHU X T, TIAN Y Q, ZHANG W L, et al. Recent progress on biological production of  $\alpha$ -arbutin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(19): 8145-8152.
- [6] ZHAO S W, ZHOU Q, LONG N B, et al. Preparation and characterization of a novel 3D polymer support for the immobilization of cyclodextrin glucanotransferase and efficient biocatalytic synthesis of  $\alpha$ -arbutin [J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 185: 108519.
- [7] YANG C Y, FAN W M, ZHANG R J, et al. Study on transglucosylation properties of amylosucrase from *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* and its application in the production of  $\alpha$ -arbutin [J]. Catalysts, 2019, 9(1): 5.
- [8] SU R Y, ZHENG W, LI A Q, et al. Characterization of a novel sucrose phosphorylase from *Paenibacillus elgii* and its use in biosynthesis of  $\alpha$ -arbutin [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(1): 24.
- [9] RUDEEKULTHAMRONG P, KAULPIBOON J. Optimization of amyloamylase for the synthesis of  $\alpha$ -arbutin derivatives as tyrosinase inhibitors [J]. Carbohydrate Research, 2020, 494: 108078.
- [10] RUDEEKULTHAMRONG P, KAULPIBOON J. Application of amyloamylase for the synthesis of salicin- $\alpha$ -glucosides as efficient anticoagulant and anti-inflammatory agents [J]. Carbohydrate Research, 2016, 432: 55-61.
- [11] 张乐乐, 楚艳艳, 杨欧, 等. 皇冠梨渣中熊果苷的纯化工艺 [J]. 许昌学院学报, 2023, 42(5): 70-74.
- [12] ZHANG L L, CHU Y Y, YANG O, et al. Optimization of purification process of arbutin from Huangguan Pear Pomace [J]. Journal of Xuchang University, 2023, 42(5): 70-74.
- [13] 崔婷婷. 梨幼果熊果苷提取纯化及抗氧化活性评价研究 [D]. 太原: 山西农业大学, 2022.
- [14] CUI T T. Study on extraction, purification and antioxidant activity evaluation of arbutin from pear fruitlets [D]. Taiyuan: Agricultural University, 2022.
- [15] LIU C Q, ZHANG P, LIU L, et al. Isolation of  $\alpha$ -arbutin from *Xanthomonas* CGMCC 1243 fermentation broth by macroporous resin adsorption chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2013, 925: 104-109.
- [16] ZHU L J, JIANG D, ZHOU Y Y, et al. Batch-feeding whole-cell catalytic synthesis of  $\alpha$ -arbutin by amylosucrase from *Xanthomonas campestris* [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2019, 46(6): 759-767.
- [17] HATANO K I, KIKUCHI S, NAKAMURA Y, et al. Novel strategy using an adsorbent-column chromatography for effective ethanol production from sugarcane or sugar beet molasses [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(20): 4697-4703.
- [18] 贺绍祥, 梁静娟, 庞宗文, 等. 熊果苷分离纯化研究

- [J]. 现代食品科技, 2007, 23(10): 66-68.
- HE S X, LIANG J J, PANG Z W, et al. Study on the separation and purification of  $\alpha$ -arbutin[J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(10): 66-68.
- [17] 刘春巧. 发酵法生产  $\alpha$ -熊果苷及其分离纯化[D]. 北京: 北京化工大学, 2010.
- LIU C Q. Fermentative production and purification of  $\alpha$ -arbutin[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2010.
- [18] 祝上宾. 梨叶中  $\beta$ -熊果苷的提取纯化及其磷脂复合物特性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2021.
- ZHU S B. Extraction and purification of  $\beta$ -arbutin from pear leaves and study on the characteristics of phospholipid complex [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2021.
- [19] 李晓玉. 重组蔗糖磷酸化酶酶学性质表征、应用及热稳定性改造[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- LI X Y. Characterization, application and thermostability engineering of recombinant sucrose phosphorylase [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.

## Optimization of synthesis conditions and purification process of $\alpha$ -arbutin catalyzed by marine sucrose phosphorylase Suc75290

ZHANG Qiuying<sup>1</sup>, SUN Jingjing<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, JIANG Chengcheng<sup>1</sup>, LIN Cong<sup>2</sup>, HAO Jianhua<sup>1</sup>

(1. Key laboratory of Polar Fishery Sustainable Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Qingdao Ruixin Tianyou Biological Technology Co., Ltd, Qingdao 266315, Shandong, China)

**Abstract:** In order to explore the conditions for the catalytic synthesis of  $\alpha$ -arbutin by recombinant marine sucrose phosphorylase Suc75290 from the ocean and its separation and purification conditions, sucrose and hydroquinone were used as substrates, and marine sucrose phosphorylase Suc75290 was used as a catalyst to synthesize  $\alpha$ -arbutin. The macroporous adsorption resin HP20 was used to separate and purify  $\alpha$ -arbutin and hydroquinone in the reaction solution. The results showed that the optimum conditions for the synthesis of  $\alpha$ -arbutin catalyzed by marine sucrose phosphorylase Suc75290 were as follows: MES-NaOH buffer with pH value of 7, reaction temperature of 40°C, optimum hydroquinone concentration of 38.5 g/L, optimum molar ratio of sucrose to hydroquinone of 5:1 (sucrose concentration of 600 g/L), optimum enzyme dosage of 300 U/mL, and optimum reaction time of 28 h. The conversion rate of hydroquinone was 96.70%, and the content of  $\alpha$ -arbutin was 64.3 g/L (238.7 mmol/L). The macroporous resin adsorption method was used for separation, and deionized water was used as the loading buffer. The optimal separation conditions were determined as follows: the loading volume was 10 mL, the loading flow rate was 0.5 mL/min, the eluent was 30% ethanol, and the elution flow rate was 1 mL/min. 50 mg of  $\alpha$ -arbutin was obtained after rotary evaporation, and the purity was 99.9%. In summary, the optimization of the conditions for the synthesis of high-concentration  $\alpha$ -arbutin using marine sucrose phosphorylase Suc75290 and the study on the separation and purification process of  $\alpha$ -arbutin provide an application basis for the development and utilization of high-purity  $\alpha$ -arbutin.

**Key words:** Sucrose phosphorylase Suc75290; enzymatic synthesis;  $\alpha$ -arbutin; separation and purification