

微生物发酵制备鼠李糖最佳条件的研究

李祖义 李江云 徐国梁 施邑屏

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

关键词 鼠李糖脂, 水解作用, 鼠李糖

分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0116-19

L-鼠李糖(6-脱氧-L-甘露糖)在有机合成中,常作为一种起始物质参与合成具有光学活性的有机化合物,是许多药物的重要中间体。目前国内外制备商品鼠李糖均采用较落后的提取方法,其原料来源于栎树皮中的栎皮苷,柑橘果皮中柚皮苷等。这类物质可水解得到鼠李糖。由于原料供应无切实保证,生产中还产生毒性的芳香类副产品,且提取需采用有毒的溶剂等原因,因此此法缺乏大规模生产的价值^[1,2]。

鼠李糖的另一种来源是由植物或微生物产生的含鼠李糖的多糖水解得到^[3~5],这种方法也有许多缺点。例如,多糖中含有除鼠李糖外的其它糖类使水解后不易分离,多糖的粘度高而给微生物发酵带来困难,并且微生物释放到胞外的多糖夹杂有蛋白质而增加了纯化步骤。另一种制备鼠李糖较为简易的方法,就是由细菌发酵得到鼠李糖脂,该糖脂经水解,就能得到鼠李糖。

本实验室用假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)利用糠油作为碳源,经发酵后得到2种结构的鼠李糖脂 R₁ 和 R₂(见图1)^[6]。

本文研究了发酵罐培养假单胞菌产生鼠李糖脂,该糖脂经水解后得到鼠李糖,用核磁共振和质谱等对其结构进行测定,并探讨了各种水解条件。

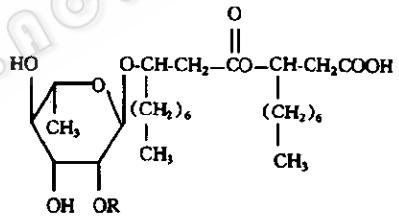


图1 鼠李糖脂的结构式

R = H(R₁); R = 鼠李糖苷(R₂)

1 材料与方 法

1.1 菌株及培养条件

1.1.1 菌株: 本实验室从土壤中分离获得, 鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)

1.1.2 培养基见文献[7]

1.1.3 培养方法: 种子培养见文献[7]。发酵罐培养: 在10L BioFlo IV 发酵罐(New Brunswick Scientific Co. U.S.A)中装5L上述培养液, 温度30℃, 搅拌速度500r/min。并用2mol/L NaOH调节pH, 通风按体积1:1, 以糠油作为碳源培养80h。

1.2 分析测定方法

1.2.1 菌体干重、糖脂的提取及定性定量测定见文献[6, 7]。

1.2.2 鼠李糖脂的水解和鼠李糖的定量测定: 将鼠李糖脂溶于1 mol/L 硫酸水溶液, 120℃保温水解一定时间。水解结束。用乙酸乙酯抽提除去β-羟基羧酸。水解液用国产717阴离子树脂中和, 除去

SO₄²⁻ 离子,再用 3% 活性炭脱色。水溶液中的鼠李糖含量用苔黑酚定量测定^[8]。

1.2.3 鼠李糖化学结构的测定: 水解后得到结晶鼠李糖和 β -羟基羧酸。质谱检测,采用快原子轰击法 (FAS-MS),质谱仪为 VGQUATTRO, GS/MS/MS。核磁共振 (¹H NMR 和 ¹³C NMR) 采用 BRUKER, WM-300 型。旋光度测定,将 2% 鼠李糖水溶液于 PERKIN-ELMER, 241MC, Polarimeter 上测定旋光度。

高压液相色谱检测鼠李糖: 仪器,日本岛津 LC-64,用氨基柱在乙腈:水(85:10)作为流动相,由示差检测,流速为 1 mL/min,温度为 30℃。

2 结果与讨论

2.1 鼠李糖脂的生产

2.1.1 菌体生长曲线与鼠李糖脂的关系: *Pseudomonas sp.* 在 10 L BioFol IV 发酵罐中培养 80 h,中间分批补加糠油,总投油量为 10%。从图 1 可以看出,该菌培养到 80h,菌体浓度为 15g/L,鼠李糖脂可达 22g/L。

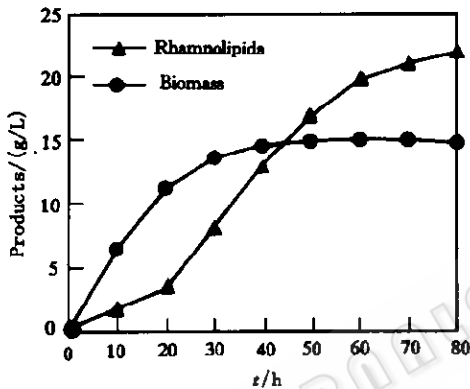


图2 菌体生长曲线和鼠李糖脂产量

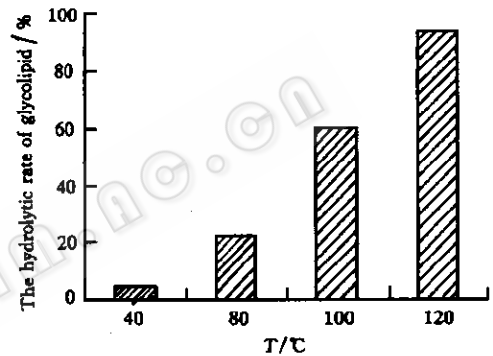


图3 温度对鼠李糖脂水解率的影响

2.2 鼠李糖脂水解条件研究

2.2.1 温度对鼠李糖脂水解率的影响: 2% 的鼠李糖脂水溶液,在 1 mol/L 硫酸浓度下,分别于不同温度下水解 2 h。水解液中 β -羟基羧酸用乙酸乙酯抽提除去,然后用比色法测定溶液中鼠李糖的含量,不同温度对水解率影响结果见图 3。

从图可以看出随着水解温度的升高,水解率上升较快,至 120℃ 时水解率已达 93%。在 125℃ 以上的温度水解,由于部分糖被破坏而不宜采用。

2.2.2 时间对鼠李糖脂水解率的影响: 2% 的鼠李糖脂水溶液,在硫酸浓度 1 mol/L, 120℃ 条件下,水解不同时间取样。其水解率见图 4。可以看出 1.5h 水解基本完全,水解 4.5h 后水溶液中的鼠李糖含量略有减少且溶液颜色呈深棕色。这是由于水解时间过长糖被部分破坏而引起。

2.2.3 鼠李糖脂浓度对其水解率的影响: 分别从 2.5% 到 20% 配制 7 种不同浓度的鼠李糖脂水溶液,在硫酸 1 mol/L, 120℃ 条件下各水解 2h,结果见图 5。糖脂浓度的增加对水解率无明显影响。糖脂浓度从 2.5% 增加到 20% 时,水解率仅下降 8% 左右。因此工业化时,可采用较高的糖脂浓度进行水解。

2.2.4 鼠李糖的分离纯化与结晶: 水解后的鼠李糖水溶液用乙酸乙酯除去 β -羟基羧酸后,用 717 阴离子树脂中和,再用 3% 活性炭脱色。此水溶液经减压浓缩至一定体积,用自然结晶法(4℃)得到白色鼠李糖结晶。3 批不同浓度水解液结晶法得率见表 1。而水解液用冷冻干燥法得到的鼠李糖粉末得率可达 95% 以上,但其杂质含量相应也高,纯度约 75% ~ 90% 左右。结晶法得到的鼠李糖得率只是水解液中含量的 78% 左右,鼠李糖含量可达 98% 左右(见表 1)。

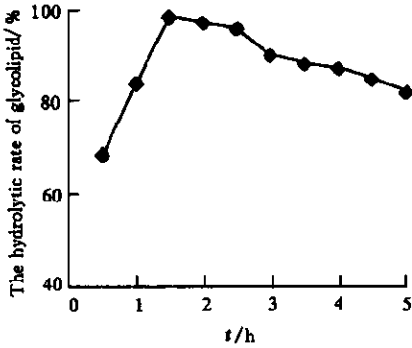


图4 时间对鼠李糖脂水解率的影响

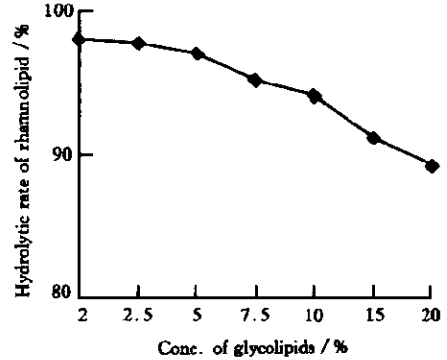


图5 鼠李糖脂浓度对水解产率的影响

表1 结晶法鼠李糖得率

Rhamnose content/g*	Crystal weight/g	Yield/%	Purity/%	Appearance
2.09	1.36	65	99.1	White crystal
9.10	6.46	71	98.2	White crystal
13.70	9.45	69	97.8	White crystal

* Colorimetric determined value of 100mL hydrolytic solution

2.3 水解产物鼠李糖的结构测定

2.3.1 鼠李糖的熔点与比旋光度: 结晶法得到的鼠李糖熔点为 93~95℃, 与 Aldrich 公司样品相同。以 2% 浓度鼠李糖水溶液在比旋光度计上测得比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +5.9^\circ \rightarrow +8.75^\circ$ 。

2.3.2 高压液相色谱检测鼠李糖: 分别用标准鼠李糖及其他不同单糖在上述条件下进行检测, 水解后得到的鼠李糖样品的出峰时间与标准鼠李糖相同, 为 6.188 分。

2.3.3 质谱与核磁共振: 用快原子轰击质谱(FAB-MS)对水解产物鼠李糖结晶进行测定, 出现明显的 $187[M + Na]^+$ 分子离子峰。此外水解产物 β -羟基癸酸的 FAB-MS 图上, 出现 $189[M + 1]^+$, $359[2M + 1]^+$ 的分子离子峰。

1H NMR(D_2O), 81.27(CH_2-), 83.2-4.1(2'H, 3'H, 4'H, 5'H), 84.81(β 型, 1'H), 85.1(α 型, 1'H), ^{13}C NMR(D_2O) 817.6(CN_3-), 869(α 型, 5'C), 872.7(β 型, 5'C), 870.8(α 型, 3'C), 871.6(α 型, 2'C), 872.2(β 型, 2'C), 873(α 型, 4'C), 873.5(β 型, 1;C), 894.3(β 型, 1'C), 894.8(α 型, 1'C), 868.7(β 型, 4'C)。

以上分析数据证实我们所获得的水解产物是 L-鼠李糖。采用本方法获得的鼠李糖, 按鼠李糖脂分子结构(图 1) $R_1:R_2 = 1:1$ 计算可得到 40% 左右的鼠李糖。这样每升发酵液可获得 8.8 克的鼠李糖。此外, 本法除可获得主产物鼠李糖外, 还能得到副产物 β -羟基癸酸, 它也是一种有潜在用途的化工原料。

参 考 文 献

- [1] C. F. Walton. *J. Am. Chem. Soc.*, 1921, 43:127.
- [2] C. N. Pulley, H. W. V. Loescke. *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, 61:175.
- [3] C. C. Lin, L. E. Casida. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, 47:427.
- [4] N. Kaplan, E. Rosenberg. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44:1335.
- [5] N. Sar E. Rosenberg *Currents Microbiol.*, 1983, 9:309.
- [6] 李祖义, 徐水珍, 李江云. 化学学报, 1988, 46:264~268.

- [7] 李祖义, 许兴妹, 李江云. 生物工程学报, 1986, 2(2): 62~66.
- [8] R. L. Whistler, J. N. BeMiller. Methods in Carbohydrate Chemistry, New York, London: Academic Press, 1980, Vol. 1, pp. 95~96.

Studies on Optimum Conditions of Preparation of Rhamnose by Microbial Fermentation

Li Zuyi, Li Jiangyun, Xu Guoliang, Shi Yiping

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract Rhamnolipid as a biosurfactant was produced by a strain of *pseudomonas sp.* cultured in a 10L stirring fermentor for 80 h. The yield of rhamnolipid was 22g/L. Rhamnolipid was hydrolyzed in 1 mol/L sulfuric acid at 120°C for 1.5 h to obtain the highest yield of rhamnose which was over 95%. After removing lipid by organic solvent and ions by ion-exchange resin, pure rhamnose was obtained through crystallization at yield of about 70%. The chemical structure of hydrolysis products determined by NMR and MS was rhamnose and β -hydroxydecanoic acid.

Key words Rhamnolipids, hydrolysis, rhamnose © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>