

生物法制备芦荟大黄素的研究

钟桂芳¹, 樊攀², 崔改泵³

- (1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 江苏九旭药业有限公司, 江苏 徐州 221200;
3. 中国农业科学院 农业传媒与传播研究中心, 北京 100081)

摘要: 采用生物法, 利用重组葡萄糖苷酶催化芦荟苷合成芦荟大黄素, 通过单因素试验及均匀试验设计得到了合成芦荟大黄素的最佳工艺条件: 反应时间 4 h, 酶浓度 50 U/mL, 叔丁醇: 水(v/v) = 5:5, 反应温度 43 °C, pH 值 5.2. 该工艺条件下芦荟大黄素转化率为 92.18%.

关键词: 生物法; 芦荟苷; 芦荟大黄素; 重组葡萄糖苷酶

中图分类号: TS201.2; R285.5; Q814.9 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-476X.2015.02.006

Study on biosynthesis of aloe-emodin

ZHONG Gui-fang¹, FAN Pan², CUI Gai-beng³

- (1. College of Food and Bioengineering Zhengzhou University of Light Industry Zhengzhou 450001, China;
2. Jiangsu Jiuxu Pharmaceutical Co. Ltd. Xuzhou 221200, China;
3. Agriculture Media and Communication Research Center, CAAS Beijing 100081, China)

Abstract: Recombinant glucosidase was used to catalysis biosynthesize of aloe-emodin through aloin. Single factor experiment and uniform design were used to optimize the biosynthesize conditions. As the result, the optimal conditons of aloe-emodin's biosynthesis were as following: reaction time 4 h, recombinant glucosidase concentration 50 U/mL, the ratio of tert-butanol and water 5:5 (v/v), reaction temperature 43 °C, and pH value 5.2. Under those conditions, the highest yield was 92.18%.

Key words: biosynthesize; aloin; aloe-emodin; recombinant glucosidase

0 引言

芦荟的主要活性成分是芦荟大黄素, 它能清除人体自由基, 具有抗肿瘤、抗菌、免疫抑制和泻下作用, 以及降脂减肥、去屑和光泽头发等功效^[1-2], 还可以作为重要原料制备治疗关节炎药物——双醋瑞因^[3]. 芦荟苷含 C—C 糖苷键, 非常稳定, 是所有糖苷键中最难水解的, 也是制约芦荟苷转化为芦荟大黄素的难题. 国际上通常采用化学法来断裂该

键, 但该方法存在使用金属试剂或其他有害有毒物质, 且除杂工艺复杂等缺陷^[4-7].

目前, 工业制备芦荟大黄素主要依赖天然提取与化学合成, 关于生物法制备芦荟大黄素的研究很少, 只有牛艳丰等^[8-9]曾筛选细菌来源的生物酶, 用于转化芦荟苷为芦荟大黄素. 生物催化具有条件温和、高效专一、环境友好等特点, 将生物技术应用于芦荟大黄素的生产开发必将为芦荟产业发展带来巨大动力. 本文拟采用生物法, 利用米曲霉来源的

收稿日期: 2015-01-22

基金项目: 河南省教育厅科技攻关项目(102102110044)

作者简介: 钟桂芳(1973—), 女, 湖南省邵阳市人, 郑州轻工业学院讲师, 硕士, 主要研究方向为酶工程.

重组葡萄糖苷酶有效地水解 C—C 糖苷键制备芦荟大黄素,为大规模生物法制备芦荟大黄素奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:芦荟苷标准品(质量分数 >99%)、芦荟大黄素标准品(质量分数 >99%),均购于 SIGMA 公司;甲醇(GR)、叔丁醇(GR)、氢氧化钾(AR),河南华丰试剂公司产;芦荟大黄素样品、葡萄糖苷酶、层析溶剂和显色剂,均由郑州轻工业学院生物实验室制备。

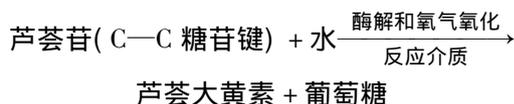
仪器:HJ-3 型磁力搅拌器,常州国华电器有限公司产;HH-S112 型恒温水浴锅,上海医疗器械五厂产;DGX-9243B-2 型电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司产;Waters 高效液相色谱系统、XTerra MS C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm)、Waters 1525 型紫外检测器、Waters 2487 型高压恒流泵,均由美国沃特世(Waters)仪器有限公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC 检测方法 检测条件为:检测波长为 254 nm;流动相为甲醇:0.1% 乙酸水溶液(v/v) = 80:20;进样量为 10 μL;流速为 0.8 mL/min;柱温为 30 °C。

1.2.2 芦荟大黄素标准曲线绘制方法 精确称取芦荟大黄素标准品 50.0 mg,并加入适量乙酸乙酯,超声 10 min 促使其溶解,冷却后,以甲醇定容至 50 mL,配制成 1 mg/mL 的标准溶液。然后配制成浓度分别为 0.1 mg/mL,0.2 mg/mL,0.4 mg/mL,0.6 mg/mL,0.8 mg/mL 的梯度标准溶液。

1.2.3 芦荟大黄素合成及其转化率计算方法 芦荟苷在糖苷酶的作用下转化为芦荟大黄素,其示意反应方程为



称取芦荟苷 5 g 放入 500 mL 圆底烧瓶内,依次加入 65 mL 醋酸缓冲液(20 mmol/L, pH = 5.2),30 mL 叔丁醇和 5 mL 重组葡萄糖苷酶粗酶液,在 50 °C,150 r/min 条件下反应 4 h,反应液用 HPLC 检测。芦荟大黄素转化率的计算公式为

$$\text{芦荟大黄素转化率} = \frac{\text{芦荟大黄素质量} \times 418}{\text{芦荟苷质量} \times 270} \times 100\%$$

1.2.4 芦荟大黄素的分离纯化 反应液在 60 °C 条件下真空干燥,经索氏提取后于 5 °C 放置结晶,抽滤后,滤饼用 10 mL 甲苯洗涤两次,该洗涤液 60 °C 真

空干燥得芦荟大黄素粗品。将浓缩的芦荟大黄素甲苯溶液加入硅胶柱中,乙酸乙酯洗脱。将含有芦荟大黄素的洗脱液合并后,减压浓缩得棕黄色的残渣。利用 HPLC 检测芦荟大黄素纯度。

1.2.5 各实验因素对芦荟大黄素转化的影响 依据芦荟大黄素合成方法,分别在 1 h,2 h,4 h,6 h,8 h,10 h,12 h 时间下取样检测,考察反应时间对芦荟大黄素转化率的影响;调整加酶量,在酶活单位分别为 40 U/mL,45 U/mL,50 U/mL,55 U/mL,60 U/mL 条件下进行合成实验,考察酶浓度对芦荟大黄素转化率的影响;调整叔丁醇浓度,分别在叔丁醇和水的比例(v/v)为 1:9,3:7,5:5,7:3,9:1 条件下进行合成实验,考察叔丁醇浓度对芦荟大黄素转化率的影响;调整反应温度,分别在 30 °C,40 °C,50 °C,60 °C,70 °C 温度下进行合成实验,考察反应温度对芦荟大黄素转化率的影响;在 pH 值分别为 3.6,4.2,5.2,6.2,7.2,8.0 条件下生物合成芦荟大黄素,考察 pH 值对芦荟大黄素转化率的影响。

1.2.6 均匀试验设计 选取反应时间(X_1)、叔丁醇浓度(X_2)及反应温度(X_3)三因素进行均匀设计,考查各因素对芦荟苷水解的影响。根据因素水平(见表 1)按照 $U_5(5^3)$ 表进行均匀试验设计。

表 1 因素水平表

试验号	X_1/h	$X_2(v/v)$	$X_3/^\circ\text{C}$
1	4	1:9	30
2	6	3:7	40
3	8	5:5	50
4	10	7:3	60
5	12	9:1	70

2 结果与讨论

2.1 芦荟大黄素标准曲线

通过 HPLC 测得不同浓度芦荟大黄素对应的峰面积,以浓度对峰面积作图,得芦荟大黄素标准曲线如图 1 所示。

由图 1 可知,芦荟大黄素浓度在 0.1 ~ 0.8 g · L⁻¹ 范围内,其峰面积与浓度呈良好的线性关系: $y = 5 \times 10^7 x + 2 \times 10^6$ (决定系数 $R^2 = 0.9991$)。在此浓度范围内,测定不同样品的峰面积可计算出对应的浓度,其计算公式为

$$\text{芦荟大黄素浓度} = \frac{\text{芦荟大黄素峰面积} - 2 \times 10^6}{5 \times 10^7}$$

采用 HPLC 对芦荟大黄素标准品和芦荟大黄素

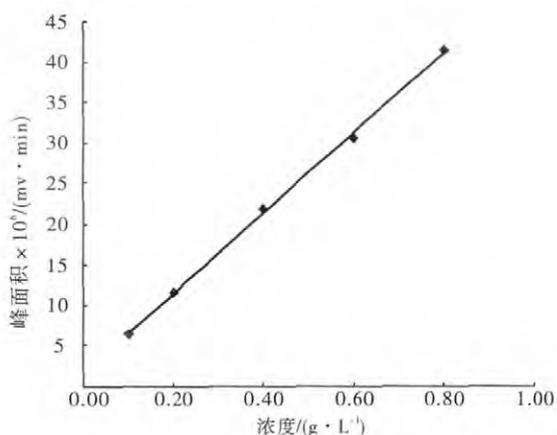


图1 芦荟大黄素标准曲线

反应液纯化后样品进行分析,结果见图2.由图2可知,芦荟大黄素标准品的保留时间为7.092 min,纯化后样品保留时间在7.097 min处有一个明显的峰,判断其为芦荟大黄素,纯化后的芦荟大黄素中基本不含有底物芦荟苷.

2.2 各因素对重组葡萄糖苷酶催化合成芦荟大黄素的影响

2.2.1 反应时间

考察反应时间对芦荟大黄素转化率的影响,结果如图3所示.由图3可知:在4 h范围内,随着反应时间的延长,芦荟大黄素转化率不断升高,二者呈正相关,最高转化率达84.58%;当反应时间超过4 h后,芦荟大黄素转化率变化不明显.因此,为保证芦荟大黄素的产量和工作效率,选择反应时间4 h为宜.

2.2.2 酶浓度

考察酶浓度对芦荟大黄素转化率的影响,结果如图4所示.由图4可知,在40 ~ 50 U/mL范围内,芦荟大黄素转化率与酶浓度呈正相关,随着酶浓度的增加,芦荟大黄素转化率不断升高,最高达86.21%;当酶浓度大于50 U/mL时,芦荟大黄素转化率变化不明显.因此,选择酶浓度50 U/mL为宜.

2.2.3 叔丁醇浓度

考察叔丁醇浓度对芦荟大黄素转化率的影响,结果如图5所示.由图5可知,叔丁醇浓度对葡萄糖苷酶水解芦荟苷影响较大.当叔丁醇:水(v/v) = 5:5时,芦荟大黄素转化率高达84.09%.当叔丁醇浓度减小时,芦荟苷溶解度下降,从而使芦荟大黄素转化率降低;当叔丁醇浓度过高时,叔丁醇会降低葡萄糖苷酶活力,导致芦荟大黄素转化率降低.因此,选择叔丁醇:水(v/v) = 5:5为宜.

2.2.4 反应温度

考察反应温度对芦荟大黄素转化率的影响,结果如图6所示.由图6可知,当反应

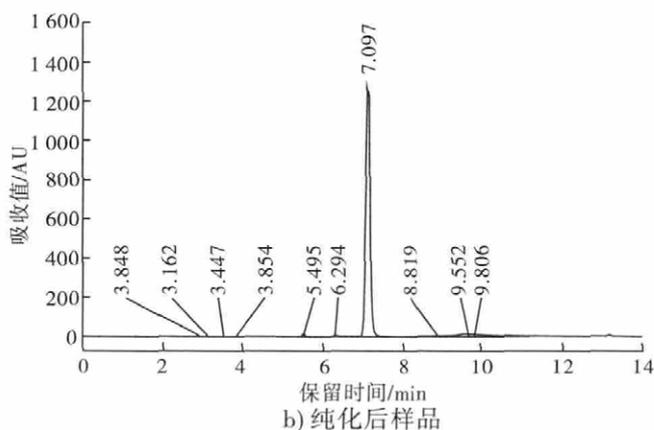
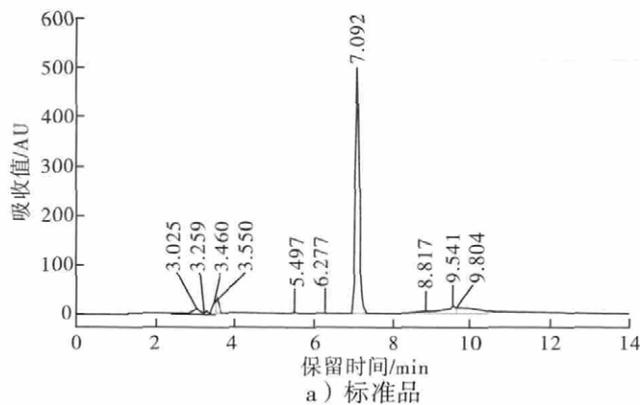


图2 芦荟大黄素 HPLC 谱图

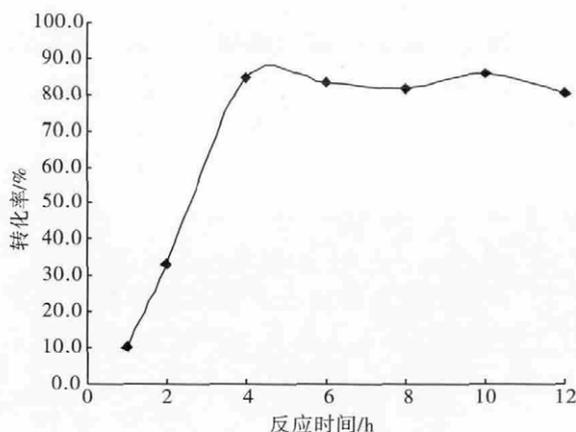


图3 反应时间对芦荟大黄素转化率的影响

温度低于50 ℃时,芦荟大黄素转化率随着温度的升高而升高;当反应温度为50 ℃时,芦荟大黄素转化率最大为85.78%;当反应温度大于50 ℃时,芦荟大黄素转化率迅速降低,原因可能是由于反应温度较高,酶蛋白发生变性,导致其丧失酶活力,影响芦荟苷的水解,从而使芦荟大黄素转化率下降.因此,选择反应温度50 ℃为宜.

2.2.5 pH值

考察pH值对芦荟大黄素转化率的影响,结果如图7所示.由图7可知,当pH值在3.6 ~ 5.2范围内,芦荟大黄素转化率随pH值增大

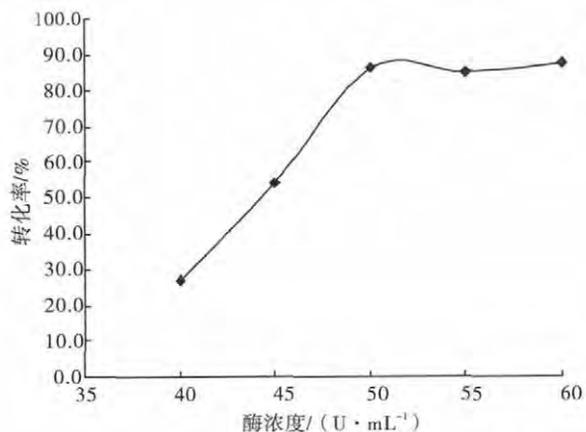


图4 酶浓度对芦荟大黄素转化率的影响

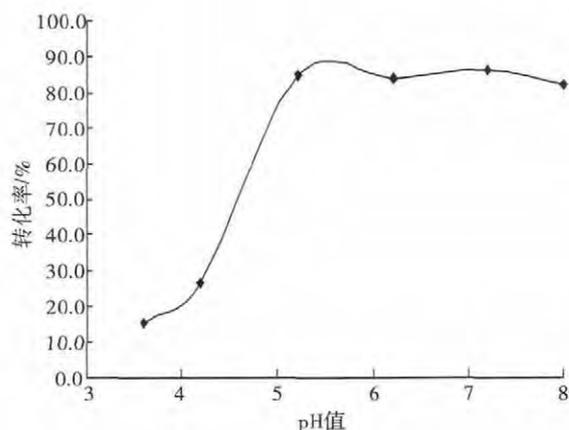


图7 pH值对芦荟大黄素转化率的影响

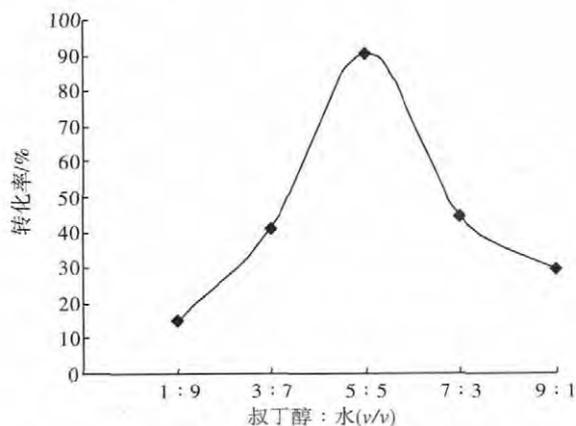


图5 叔丁醇浓度对芦荟大黄素转化率的影响

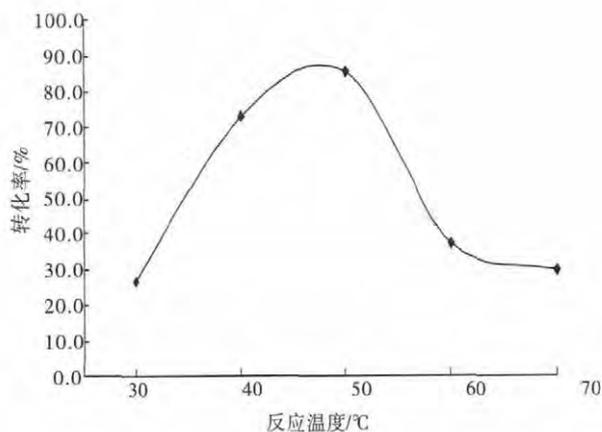


图6 反应温度对芦荟大黄素转化率的影响

而逐渐升高,说明该重组葡萄糖苷酶不耐酸,在强酸条件下,该酶蛋白易发生变性,致使芦荟大黄素转化率较低;当pH值为5.2时,芦荟大黄素转化率达最大为85.08%;当pH值在5.2~8.0范围内,芦荟大黄素转化率变化不明显,说明该重组葡萄糖苷酶适宜在弱酸和弱碱性条件下反应,具有广泛的pH值适应性.因此,选择pH=5.2为宜.

2.2.6 均匀试验 在单因素试验基础上,鉴于反应

时间、叔丁醇浓度及反应温度在一定范围内对芦荟大黄素转化率的影响显著,而酶浓度和pH值对芦荟大黄素转化率的影响则趋于平稳.故在优选最佳工艺时,选择 X_1 、 X_2 及 X_3 三因素进行均匀试验设计,综合考察各因素对葡萄糖苷酶催化合成芦荟大黄素的影响.均匀试验结果见表2.

表2 均匀试验结果

试验号	因素			转化率(Y) / %		
	X_1 / h	X_2 (v/v)	X_3 / °C	观测值	拟合值	拟合误差
1	4	7:3	50	21.23	20.91	0.315 7
2	6	1:9	40	90.95	91.19	-0.236 8
3	8	5:5	30	14.73	15.52	-0.789 3
4	10	9:1	70	8.62	8.65	-0.026 3
5	12	3:7	60	38.02	37.28	0.736 6

利用DPS7.05统计软件对表2试验结果进行拟合,得到芦荟大黄素转化率与酶促反应各因素关系的数学模型: $Y = 120.85 - 29.08X_2 + 2.40X_2^2 - 0.50X_1X_2$.该数学模型的回归系数 $R = 0.999 9$,剩余标准差 $S = 1.149 8$,调整后的相关系数 $R_a = 0.999 4$,表明该模型可以很好地反映芦荟大黄素转化率与各因素之间的关系,可有效预测不同 X_1 、 X_2 及 X_3 条件下芦荟大黄素的转化率. F 值=1118.027,显著水平 $P = 0.022$,表示回归方程显著.

由曲线拟合方程可知,各因素最优组合为:反应时间4h,叔丁醇:水(v/v)=5:5;反应温度为43°C,在此条件下芦荟大黄素得率为92.18%.

3 结论

本文采用生物法,利用米曲霉来源的重组葡萄糖苷酶催化合成芦荟大黄素.经反应时间、叔丁醇

(下转第41页)

卷烟的感官品质.

3 结论

本文利用水提醇沉法对枸杞多糖进行了提取分离,研究了其不同添加量在卷烟中的应用效果及评价.评吸结果表明,枸杞多糖对卷烟香气量、杂气、刺激性、甜度等方面有改善效果,在卷烟中起到掩盖杂气、去除刺激、改善余味的作用.枸杞多糖在卷烟中的适宜添加量为 $(5 \sim 10) \times 10^{-6}$ g.研究了枸杞多糖在不同条件下的热裂解产物,其在热裂解过程中可以释放出小分子的醛类、酮类物质等具有特殊香味的化合物,可以产生花香、烘烤香、甜香、奶香、果香等韵调,这为枸杞多糖及枸杞内在成分在卷烟中的应用提供了参考.

参考文献:

- [1] 黄琳娟,林颖,田庚元.枸杞中免疫活性成分的分离纯化及生理化学性质研究[J].药学学报,2012,33

(7):512.

- [2] Madhukumar M, Muralikrishna G. Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk and wheat bran[J]. Food Chemistry 2010, 118(2):215.
- [3] 蒋万志,张洪泉.枸杞低聚糖在免疫和抗衰老方面的研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(2):5.
- [4] 王建华,张民,甘露,等.枸杞多糖-2的抗羟基自由基氧化作用[J].食品科学,2012,22(1):11.
- [5] 郑勤安,周强,王建军,等.含中草药成分造纸法再造烟叶的制备[J].烟草科技,2004(6):6.
- [6] 王保会,吴键,郭春生,等.烟叶热裂解产物的分析研究[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版,2013,28(2):69.
- [7] 苏东赢.枫槭浸膏热裂解产物分析及其在卷烟中的应用[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版,2013,28(2):41.
- [8] 闫克玉.卷烟烟气化学[M].郑州:郑州大学出版社,2002:2-6.

(上接第29页)

浓度及反应温度等单因素试验及均匀试验设计优化,得到合成芦荟大黄素最佳工艺条件为:反应时间4 h,酶浓度50 U/mL,叔丁醇:水(v/v)=5:5,反应温度43℃,pH值5.2.该工艺条件下芦荟大黄素转化率为92.18%.

参考文献:

- [1] 黄丽英,林新华,陈伟,等.芦荟大黄素、芦荟素清除氧自由基作用的研究[J].中国医院药学杂志,2006,26(1):12.
- [2] 廖志华,谈锋.芦荟的药理作用[J].国外医药:植物药分册,1999,14(4):148.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[K].北京:化

学工业出版社,2000.

- [4] Vittori N, Collins M. Production of rhein and rhein derivatives[P]. US Patent: 5652265, 1997-07-29.
- [5] Carlino S, Di Napoli G. Process for preparing aloe-emodin[P]. US Patent: 7453004, 2008-11-18.
- [6] 卡里诺S,迪纳伯利G.制备芦荟大黄素的方法[P].中国:1010456839,2007-10-17.
- [7] 李建生,梁生旺,郝晓珂,等.大黄素、芦荟大黄素提取方法及其应用[P].中国:1887837,2007-08-03.
- [8] 牛艳丰,寇正福,刘坐镇,等.一种代谢芦荟苷的微生物筛选及其酶学性质初步研究[J].食品工业科技,2012,33(21):184.
- [9] 牛艳丰.代谢芦荟苷微生物的筛选及其酶的反应条件研究与纯化[D].上海:华东理工大学,2013.