

响应面法优化虎杖苷转化为白藜芦醇的工艺条件

王珊珊, 胡萍*, 余少文

(深圳大学 生命科学学院, 材料学院, 深圳市特种功能材料重点实验室, 广东 深圳 518060)

[摘要] 目的:应用响应面优化虎杖苷转化为白藜芦醇的酶解工艺条件,提高活性成分白藜芦醇的含量,为虎杖药材的资源开发提供参考。方法:以白藜芦醇提取量为指标,在单因素试验基础上,通过响应面法考察酶用量、酶解温度、时间及pH对白藜芦醇提取量的影响。使用UV测定白藜芦醇含量,检测波长305 nm。结果:最佳酶解工艺条件为酶用量463 μL ,温度43 $^{\circ}\text{C}$,酶解pH 5.0,酶解时间153 min;白藜芦醇平均提取量16.46 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,与模型预测值16.52 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 偏差较小,是未经酶转化前样品中白藜芦醇含量的3.58倍,是酶水解工艺的1.66倍。结论:通过响应面分析法优选虎杖中虎杖苷转化为白藜芦醇的工艺可行性较好,为降低白藜芦醇的工业化生产成本提供参考。

[关键词] 虎杖; 虎杖苷; 白藜芦醇; 酶解工艺; 响应面分析

[中图分类号] R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0006-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040006

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151229.1129.014.html>

[网络出版时间] 2015-12-29 11:29

Optimization of Conditions for Polydatin Being Transformed into Resveratrol by Response Surface Methodology

WANG Shan-shan, HU Ping*, YU Shao-wen

(Shenzhen Key Laboratory of Special Functional Materials, College of Materials Sciences and Engineering, College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize process of polydatin being transformed into resveratrol by response surface methodology for increasing the content of resveratrol and promoting resource development of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix. **Method:** Considering yield of resveratrol as index, based on single factor experiments, response surface methodology was adopted to optimize transformation process by taking the amount of enzyme, temperature, pH and time as factors. UV was employed to determine the content of resveratrol at 305 nm. **Result:** Optimum technological conditions were as follows: enzyme dosage of 463 μL , temperature at 43 $^{\circ}\text{C}$, pH of 5.0, conversion time of 153 min; yield of resveratrol was 16.46 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, whose deviation was small by comparing with the theoretical value of 16.52 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, which was 3.58 times to before optimization and 1.66 times of the best enzyme hydrolysis process. **Conclusion:** Response surface analysis is suitable for optimizing transformation process of resveratrol, this process is feasible, which is a beneficial reference for reducing industrial production costs of resveratrol.

[Key words] Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix; polydatin; resveratrol; enzymolysis process; response surface analysis

[收稿日期] 20150701(016)

[基金项目] 深圳市基础研究计划项目(JCYJ20140418091413587)

[第一作者] 王珊珊,在读硕士,从事生物化学与分子生物学研究,Tel:13760445107,E-mail:2631329028@qq.com

[通讯作者] *胡萍,副教授,从事生物材料研究,Tel:13922836891,E-mail:huping@szu.edu.cn

虎杖别名斑杖,含白藜芦醇质量分数约 0.1% ~ 0.2%,虎杖苷质量分数约 2%,虎杖苷的含量明显高于白藜芦醇^[1],虎杖苷在肠道中由于糖苷酶的作用可分解为白藜芦醇,从而发挥药理作用。白藜芦醇是一种非黄酮类的酚类物质,存在形式主要为顺式白藜芦醇、反式白藜芦醇。反式异构体的生理活性会比顺势异构体强,在紫外线照射下,反式白藜芦醇可转化成顺式白藜芦醇^[2]。白藜芦醇因其在抗肿瘤、抗癌、抑制血小板聚集、抗炎、抗氧化、保护心血管系统、调节免疫、延缓衰老等方面表现出生物活性^[3-6],已被逐渐开发应用于化妆品、医药、保健品等领域^[7]。

目前,白藜芦醇的主要获取方法有①植物提取法。食用安全,符合“绿色食品”要求,但含量普遍较低,直接提取产率低生产成本低^[8]。②化学合成法。与植物提取法相比,化学合成法产量高,生产成本低,但合成步骤繁多,污染环境^[9]。③植物细胞培养法。利用诱变途径选育高产细胞株,白藜芦醇的产率可提高 1.5 ~ 3.0 倍,但选育的高产细胞株的遗传性状不稳定^[10]。④生物转化法。专一性强、转化酶表达效率高、减少合成步骤、缩短生产周期、副反应少、条件温和和环境友好^[11]。生物转化是利用微生物、植物离体培养细胞或器官、动物细胞及酶等对外源化合物进行结构修饰而获得有价值产物的代谢反应,其本质是利用生物本身所产生的酶对外源化合物进行的催化反应^[12]。本实验利用黑曲霉发酵所得 β -葡萄糖苷酶与工业纤维素酶复合,通过单因素试验考察酶用量、不同酶的比例、酶转化温度、酶转化时间等因素,采用响应面法优化虎杖苷转化为白藜芦醇的工艺条件。

1 材料

ALC-210.3 型电子天平(德国 Sartorius 公司),UVmini-1240 型紫外分光光度计(日本岛津),QE-100 g 型粉碎机(浙江屹立工贸有限公司)。虎杖购自北京同仁堂大药房,经重庆医科大学洪蕾教授鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* 的干燥根茎及根;虎杖苷、白藜芦醇对照品(上海阿拉丁试剂有限公司,批号分别为 21808, D1415005),黑曲霉 HE01 和纤维素酶(湖北立业公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白藜芦醇的含量测定

2.1.1 虎杖苷的制备^[13] 将虎杖饮片切片干燥后,用粉碎机粉碎后过 80 目筛。称取一定量虎杖粉

末,加 20 倍量 60% 乙醇于 40 °C 超声提取 60 min,抽滤,减压浓缩得虎杖苷醇提液,备用。

2.1.2 酶的制备 将黑曲霉置于察式固体平板中 32 °C 恒温培养箱培养 7 d,接着用接种环挑取平板上的单菌落于种子培养基中,32 °C,250 r·min⁻¹ 恒温摇床培养 72 h,吸取适量菌液于发酵培养基中,32 °C,250 r·min⁻¹ 恒温摇床培养 144 h,将发酵液 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液即为粗酶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取虎杖苷醇提液 5 mL 于 50 mL 离心管中,加入乙酸-乙酸钠 10 mL 与一定量酶制剂,按设定的酶用量、酶比、温度、时间及 pH 进行转化,用等体积 95% 乙醇终止酶反应,离心(5 000 r·min⁻¹, 8 min),即得。

2.1.4 检测波长的选择 将白藜芦醇对照品及供试品溶液用紫外分光光度计在 200 ~ 400 nm 进行扫描,发现二者均在 305 nm 附近有最大吸收峰,故选择检测波长 305 nm。

2.1.5 标准曲线的绘制 精密称取白藜芦醇对照品 5 mg,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇定容并摇匀,配成 0.1 g·L⁻¹ 对照品储备液。精密移取储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中。以相应试剂为空白,于 305 nm 处测定吸光度 $A(n=3)$,以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y=0.1652X+0.0201(r=0.9991)$,线性范围 1.0 ~ 8.0 mg·L⁻¹。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 酶用量 精密量取虎杖苷醇提液 5 mL,固定纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶比例 3:2,温度 45 °C, pH 4.5,酶解时间 150 min,酶用量分别为 200, 400, 600, 800, 1 000, 1 200, 1 400 μ L,计算白藜芦醇提取量分别为 11.80, 14.28, 15.81, 12.79, 12.42, 12.73, 12.11 mg·g⁻¹。根据快速平衡学说和稳态学说,在底物与酶分子反应过程中,存在某个平衡点,当酶用量较低时,酶与底物充分结合,继续增加酶用量时,底物与酶的结合程度会加大,反应达到饱和时,酶活性趋于稳定。故选择酶用量 600 μ L。

2.2.2 纤维素酶与黑曲霉发酵得 β -葡萄糖苷酶的配比 精密量取虎杖苷醇提液 5 mL,固定酶用量 600 μ L,温度 45 °C, pH 4.5,酶解时间 150 min,纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶比例分别为 0:1, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1, 1:0。计算白藜芦醇提取量分别为 14.98, 11.53, 14.15, 13.82, 15.74, 15.07, 11.42 mg·g⁻¹。纤维素酶主要作用是破坏细胞壁结构,易于酶分子与虎杖苷接触反应, β -葡萄糖苷酶是将游

离出来的虎杖苷去除葡萄糖结构而转化为白藜芦醇。

2.2.3 酶解温度 精密量取虎杖苷醇提液 5 mL, 固定酶用量 600 μL , 纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶比例 3:2, pH 4.5, 酶解时间 150 min, 酶解温度分别为 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 $^{\circ}\text{C}$ 。计算白藜芦醇提取量分别为 13.27, 15.15, 15.96, 14.52, 13.36, 12.74, 10.16 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。说明随着转化温度的上升, 白藜芦醇提取量增加, 但 $>40^{\circ}\text{C}$ 后, 白藜芦醇提取量降低。主要原因是当温度升高时, 反应速率加快, 有助于酶转化进行, 而当温度过高时, 可能会使部分或全部酶蛋白变性, 影响酶活, 并且白藜芦醇为热敏感性物质, 温度过高易氧化。故选择酶转化温度 40°C 。

2.2.4 酶解 pH 精密量取虎杖苷醇提液 5 mL, 固定酶用量 600 μL , 纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶比例 3:2, 温度 45°C , 酶解时间 150 min, 酶解 pH 分别为 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0。计算白藜芦醇提取量分别为 9.03, 8.96, 9.30, 10.07, 12.47, 10.69, 8.62 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。因为酶对 pH 较敏感, 只在小范围内起作用, 当 pH 过高或过低时, 可破坏酶空间构象, 导致酶活性降低, 从而影响酶活性中心与相关基团的解离作用, 以至于底物转化为产物过程受阻。故选择酶解 pH 5.0。

2.2.5 酶解时间 精密量取虎杖苷醇提液 5 mL, 固定酶用量 600 μL , 纤维素酶与 β -葡萄糖苷酶比例 3:2, 温度 45°C , pH 4.5, 酶解时间分别为 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min。计算白藜芦醇提取量分别为 12.18, 13.36, 14.73, 15.62, 13.36, 10.26, 6.72 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在 150 min 前, 虎杖苷与酶结合需要一定时间, 时间过短, 酶与虎杖苷不能很好的结合, 达不到最佳转化效果, 150 min 后反应比较完全, 随着白藜芦醇的积累, 会加速逆反应的进行, 酶反应速度下降, 且氧化分解也会使产物含量降低。

2.3 响应面分析 在单因素试验基础上, 精密量取 29 份虎杖苷醇提液, 每份 5 mL, 选取酶用量、酶解温度、时间及 pH 为自变量, 以白藜芦醇提取量为响应值, 采用 Box-Behnken 中心组合进行四因素三水平的试验设计。试验安排及结果见表 1, 回归模型的方差分析见表 2。

结果显示模型的 $P < 0.001$, 表明模型对白藜芦醇提取量影响效果极显著。在一次项的检验中, 自变量 A, B 极显著, 自变量 C 显著; 各自变量的交互项均未达到显著水平; 二次项的检验中, A^2, B^2, C^2 均达到了极显著水平, D^2 接近显著水平。相关分析

表 1 虎杖中虎杖苷转化为白藜芦醇工艺响应面试验分析

Table 1 Response surface analysis of polydatin being transformed into resveratrol in Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix

| No. | A 酶用量 / μL | B 温度 / $^{\circ}\text{C}$ | C pH | D 酶解时间 /min | 白藜芦醇提取量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ |
|-----|-----------------------|---------------------------|------|-------------|---|
| 1 | 800 | 35 | 5.0 | 150 | 14.23 |
| 2 | 600 | 40 | 5.0 | 150 | 16.33 |
| 3 | 600 | 35 | 5.0 | 120 | 14.68 |
| 4 | 600 | 40 | 5.5 | 120 | 15.24 |
| 5 | 600 | 35 | 4.5 | 150 | 14.61 |
| 6 | 600 | 45 | 5.0 | 120 | 15.39 |
| 7 | 600 | 45 | 4.5 | 150 | 15.87 |
| 8 | 800 | 40 | 4.5 | 150 | 14.47 |
| 9 | 600 | 45 | 5.5 | 150 | 15.55 |
| 10 | 400 | 40 | 5.0 | 120 | 15.95 |
| 11 | 400 | 40 | 4.5 | 150 | 16.07 |
| 12 | 600 | 40 | 5.0 | 150 | 16.36 |
| 13 | 600 | 45 | 5.0 | 180 | 15.86 |
| 14 | 400 | 40 | 5.5 | 150 | 15.59 |
| 15 | 600 | 40 | 5.0 | 150 | 15.65 |
| 16 | 600 | 40 | 4.5 | 120 | 15.02 |
| 17 | 800 | 40 | 5.0 | 120 | 14.23 |
| 18 | 400 | 40 | 5.0 | 180 | 15.95 |
| 19 | 600 | 40 | 5.5 | 180 | 15.04 |
| 20 | 600 | 40 | 4.5 | 180 | 15.09 |
| 21 | 600 | 35 | 5.0 | 180 | 14.68 |
| 22 | 800 | 45 | 5.0 | 150 | 14.42 |
| 23 | 800 | 40 | 5.0 | 180 | 14.39 |
| 24 | 800 | 40 | 5.5 | 150 | 13.26 |
| 25 | 600 | 40 | 5.0 | 150 | 16.27 |
| 26 | 600 | 40 | 5.0 | 150 | 15.95 |
| 27 | 400 | 45 | 5.0 | 150 | 15.86 |
| 28 | 600 | 35 | 5.5 | 150 | 13.72 |
| 29 | 400 | 35 | 5.0 | 150 | 15.04 |

中, 确定白藜芦醇提取量的回归方程 $Y = 16.11 - 0.79A + 0.50B - 0.23C + 0.042D - 0.16AB - 0.18AC + 0.040AD + 0.14BC + 0.12BD - 0.068CD - 0.063A^2 - 0.58B^2 - 0.62C^2 - 0.37D^2$, 模型的复相关系数 $R^2 = 0.9037$, 表明回归方程对白藜芦醇提取量的预测值与实测值有较好的相关性。失拟性检验分析中, $P > 0.05$, 表明失拟性不显著, 该回归方程无失拟因素存在, 回归方程与实测值能较好地拟合。经响应面优化, 得酶转化虎杖苷的最优工艺为酶用量 463.28 μL , 温度 42.67°C , pH 4.99, 酶解时间

表 2 回归模型的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation

| 方差来源 | SS | f | MS | F | P |
|----------------|-----------------------|----|-----------------------|-------|----------|
| 模型 | 16.87 | 14 | 1.20 | 9.39 | <0.000 1 |
| A | 7.46 | 1 | 7.46 | 58.12 | <0.000 1 |
| B | 2.99 | 1 | 2.99 | 23.30 | 0.000 3 |
| C | 0.62 | 1 | 0.62 | 4.84 | 0.045 1 |
| D | 0.02 | 1 | 0.02 | 0.16 | 0.693 1 |
| AB | 0.10 | 1 | 0.10 | 0.77 | 0.394 1 |
| AC | 0.13 | 1 | 0.13 | 1.04 | 0.325 5 |
| AD | 6.40×10^{-3} | 1 | 6.40×10^{-3} | 0.05 | 0.826 5 |
| BC | 0.08 | 1 | 0.08 | 0.63 | 0.439 5 |
| BD | 0.06 | 1 | 0.06 | 0.43 | 0.522 4 |
| CD | 0.02 | 1 | 0.02 | 0.14 | 0.711 9 |
| A ² | 2.59 | 1 | 2.59 | 20.12 | 0.000 5 |
| B ² | 2.15 | 1 | 2.15 | 16.77 | 0.001 1 |
| C ² | 2.52 | 1 | 2.52 | 19.65 | 0.000 6 |
| D ² | 0.91 | 1 | 0.91 | 7.10 | 0.018 5 |
| 失拟项 | 1.42 | 10 | 0.14 | 1.52 | 0.364 3 |
| 纯误差 | 0.37 | 4 | 0.093 | | |

153.14 min, 白藜芦醇提取量 16.52 mg·g⁻¹, 结合实际工艺情况, 最优工艺改进为酶用量 463 μL, 温度 43 °C, 酶解 pH 5.0, 酶解时间 153 min。

为了更直观地体现 2 个因素交互作用对白藜芦醇提取量的影响, 可令其他因素水平值在中心点 (即编码水平为 0), 通过拟合的响应曲面和等高线图反应各因素间的交互作用, 见图 1。

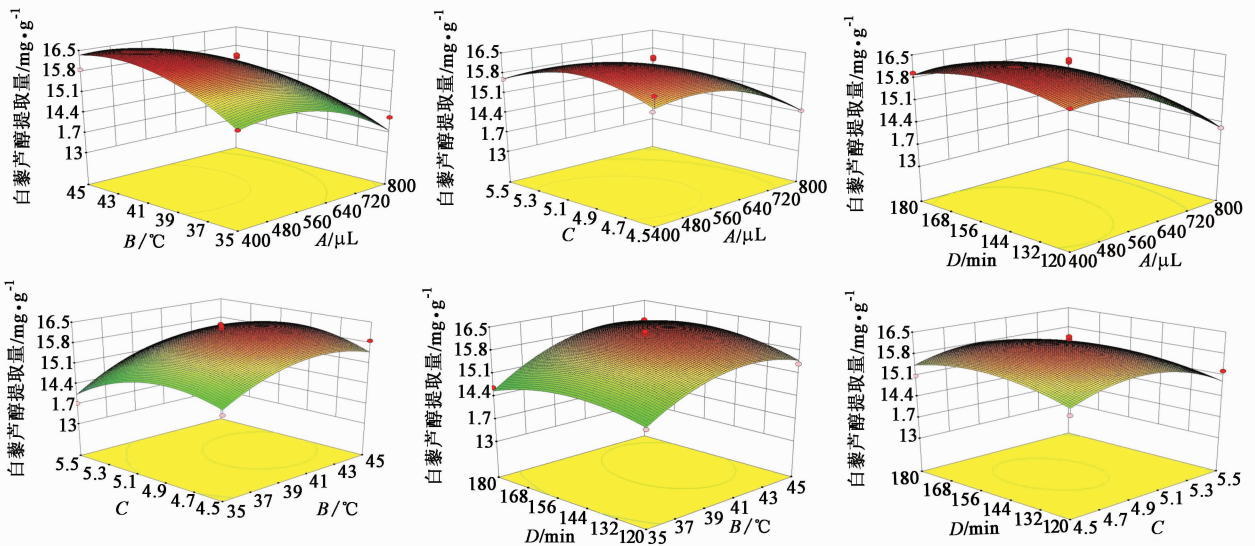


图 1 酶用量、温度、酶解 pH 和时间相互作用对白藜芦醇提取量影响的响应曲面

Fig. 1 Response surfaces of interaction of different factors on yield of resveratrol

2.4 验证试验 精密量取 5 份虎杖苷醇提液, 每份 5 mL, 按优选的酶解工艺将虎杖苷转化为白藜芦醇, 结果白藜芦醇平均提取量 16.46 mg·g⁻¹, 与理论预测值的相对误差 0.36%, 表明响应面法优化的工艺条件稳定可靠。测定未经酶转化前样品、酶转化后样品中白藜芦醇的含量, 结果显示优化后是优化前白藜芦醇含量的 3.58 倍, 是最佳酶水解 (工艺为酶用量 251.39 μL, 温度 45.97 °C, pH 4.39, 酶解时间 132.84 min) 虎杖白藜芦醇提取量的 1.66 倍。

3 讨论

虎杖中白藜芦醇质量分数约 0.2%, 而虎杖苷约 2%, 直接有机溶剂提取, 白藜芦醇提取率较低, 生产成本也高, 而且直接提取难破坏细胞壁, 白藜芦醇不易溶出。本文先超声波提取以得到大量虎杖苷, 再利用工业纤维素酶与黑曲霉 H01 发酵产 β-葡萄糖苷酶复合将虎杖苷转化为白藜芦醇, 显著提高了白藜芦醇含量, 并弥补了纤维素酶中 β-葡萄糖苷酶含量少的缺点, 减少了酶用量并降低了成本, 对复合酶生物转化研究具有一定意义。

传统的四因素三水平正交试验不能给出因素和响应值之间的函数表达式即回归方程, 从而无法找到整个区域上因素的最佳组合和响应面的最优值, 响应面优化从三维空间出发, 最优值精准度更高。本文在单因素试验基础上, 采用响应面法优化虎杖苷转化为白藜芦醇的酶解工艺条件, 最终确定了酶转化工艺条件并验证了回归模型可靠、真实, 表明采用工业酶与实验室发酵酶复合是一条可行

的途径,对降低白藜芦醇的工业化生产成本提供了有益参考。

[参考文献]

[1] 龚云杰,王卫,曾柏全,等.产纤维素酶微生物发酵转化虎杖提高白藜芦醇收率的研究[J].中南林业科技大学学报,2010,30(9):190-201.

[2] 李延华,王伟君,张兰威,等.白藜芦醇的研究现状及应用前景[J].中国酿造,2008,27(7):10-12.

[3] 安梅,周瑾,陈晓宇.白藜芦醇药理学作用的研究进展[J].肿瘤药学,2014,4(4):242-246.

[4] 史丽,刘艳,许现辉.白藜芦醇的生物活性研究进展[J].食品与药品,2006,8(11):5-8.

[5] Caruso F, Tanski J, Villeqas-Estrada A, et al. Structural basis for antioxidant activity of trans-resveratrol; ab initio calculations and crystal and molecular structure [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(24): 7279-7285.

[6] 李洁,熊兴耀,曾建国,等.白藜芦醇的研究进展[J].中国现代中药,2013,15(2):100-108.

[7] 赵鸿宾,陈华国,龚小见,等.酶解法提取虎杖中的白

藜芦醇[J].贵州师范大学学报,2010,28(2):104-106.

[8] 蔡杨柳.白藜芦醇的提取纯化及性能研究[D].北京:北京化工大学,2010.

[9] 王长松,赵莹,赵广荣.微生物合成白藜芦醇的研究进展[J].微生物学通报,2014,41(2):352-357.

[10] Donnez D, Jeandet P, Courot E, et al. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms[J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(12): 706-713.

[11] 牛红军,王芑,杨官娥.微生物转化技术在中药研究中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(18):346-349.

[12] Jin S, Luo M, Wang W, et al. Biotransformation of polydatin to resveratrol in *Polygonum cuspidatum* roots by highly immobilized edible *Aspergillus niger* and *Yeast* [J]. Bioresour Technol, 2013, 136(10): 776-770.

[13] 宋宏新,传娟娟,刘静.虎杖中白藜芦醇的酶法制备[J].西北植物学报,2010,30(12):2550-2554.

[责任编辑 刘德文]