

星点设计效应面法优化染料木苷的酶解工艺

于海帅*

(吉林工业职业技术学院质量系, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:** 优选染料木苷的酶解工艺。**方法:** 利用超微粉碎技术过筛制备不同粒径的染料木苷原料, 采用纤维素酶将其水解, 制备染料木素。以染料木素转化率为指标, 通过单因素试验考察粉酶解时间、温度、粒径及 pH 对酶解工艺的影响, 响应面法优化染料木苷超微粉酶解制备染料木素的工艺。**结果:** 染料木苷超微粉酶解反应最佳条件为反应介质 pH 5.5 乙酸-乙酸钠缓冲液, 温度 49 °C, 反应时间 11 h, 酶与底物比 1:1。转化率(96.47 ± 1.12)%, 比普通粉染料木苷转化率高了 1.84 倍。**结论:** 采用纤维素酶水解染料木苷超微粉制备染料木素的方法简单、酶解时间显著缩短, 适用于规模化生产。

[关键词] 染料木苷; 超微粉碎; 染料木素; 纤维素酶; 星点设计效应面法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0059-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070059

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Technology of Genistin by Central Composite Design-Response Surface Methodology

YU Hai-shuai*

(Department of Quality, Jilin Vocational College of Industry and Technology, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enzymatic hydrolysis technology of genistin. **Method:** Materials of genistin with different size were prepared by ultrafine grinding technology, then genistin was hydrolysed by cellulase to get genistein. With the conversion rate of genistein as index, single factor tests were used to investigate effects of enzymatic hydrolysis time, temperature, size and pH on enzymatic hydrolysis technology, and then, preparation technology of genistein was optimized by central composite design response surface methodology, which was enzymatic from genistin ultrafine powder. **Result:** Optimum technology conditions to get genistein through enzymatic hydrolysis genistin ultrafine powder were as followings: pH 5.5 acetic acid and sodium acetate anhydrous buffer as reaction medium, temperature 49 °C, reaction time 11 h and ratio of substrate-enzyme 1:1. Under these conditions, the conversion rate of genistein was (96.47 ± 1.12)%, which comparing with genistin ordinary powder, the conversion rate increased 1.84 folds. **Conclusion:** This method of enzymatic hydrolysis genistin ultrafine powder by cellulase to obtain genistein was simple, efficiency and suitable for modern large-scale production.

[Key words] genistin; ultrafine grinding; genistein; cellulase; central composite design response surface methodology

染料木素是一种天然的酪氨酸激酶和大豆代谢物, 被称为植物雌激素, 具有保护心肌、抗氧化和抑制炎症的效果^[1-2]。目前多从大豆中提取染料木

素, 但大豆中含植物蛋白和油脂较多, 故得到高纯度的染料木素较为困难, 且工艺复杂、成本高。与一般提取方法相比, 生物酶解法用于制备中药活性成分时, 具有简便、专一、产物不易变性等优点^[3], 已成为当今中药领域的研究热点之一。目前, 相当多的酶解反应底物难溶于水^[4], 溶出速率很低, 不能与酶有效接触, 导致反应效率低下, 这已成为一个亟待

[收稿日期] 20121108(020)

[通讯作者] *于海帅, 硕士, 讲师, 从事中药化学方向研究, Tel: 13844631856, E-mail: yhsjilin@163.com

解决的难题。

超微粉碎技术将固体物质粉碎成直径 $< 10 \mu\text{m}$, 可使粉末颗粒均匀, 松密度及比表面积均显著提高, 从而提高有效成分的溶出量, 易于工业规模生产^[5-6]。近年来, 已有利用 β -糖苷水解酶制备染料木素的报道^[7], 但由于染料木苷溶解度低, 导致酶解时间过长, 因此可尝试采用超微粉碎技术促进溶出, 提高酶解反应速率。本实验选用超微粉染料木苷为原料, 利用纤维素酶水解染料木苷制备染料木素, 通过星点设计进行试验优化^[8], 为酶解法规模化制备染料木素开辟新途径。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), AV 300 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司, 溶剂为氘代 DMSO), QLM-90K 型气流磨(浙江上虞市和力粉体有限公司)。染料木苷、染料木素对照品(批号分别为 XC101223, XC110221, 泽朗科技有限责任公司), 纤维素酶(北京拜尔迪生物科技有限责任公司), 甲醇为色谱纯, 水为高纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同粒径染料木苷的制备 将固体染料木苷原料药研磨过筛制备得 24 目粗粉, 65 目普通粉及 100 目细粉。将普通粉经气流磨(缓冲压力 0.65 MPa, 研磨压力 0.45 MPa, 30 Hz)进一步粉碎, 过 300 目筛即得超微粉^[9]。

2.2 样品溶液的制备 精密称取不同粒径染料木苷及纤维素酶适量, 加入不同溶液, 置于恒温气浴振荡锅中, 转速 $(140 \pm 5) \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 于设定时间点取出。涡旋震荡 30 s, 使其混合均匀, 精密吸取转化后混悬液 0.1 mL, 用甲醇稀释, 摇匀, 即得。

2.3 染料木素转化率的测定 精密吸取酶解后混悬液适量, 用甲醇稀释, 摇匀, 于 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 以下式计算转化率。

$$\text{转化率} = [CV / (m \times M_1 / M_2)] \times 100\%$$

式中 C 为染料木素质量浓度, V 为体积, m 为染料木苷质量, M_1 为染料木素相对分子质量, M_2 为染料木苷相对分子质量。

2.4 染料木素含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取染料木素对照品 5.36 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容, 储存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中, 备用。

2.4.2 色谱条件 ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.5% 冰乙酸

(40:60), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 260 nm, 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样体积 20 μL 。

2.4.3 线性关系考察 精密吸取染料木素对照品储备液, 分别加甲醇稀释成系列质量浓度 (0.053 6, 0.026 8, 0.013 4, 0.006 7, 0.003 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的对照品溶液, 按上述色谱条件进样, 得回归方程 $Y = 1.647 \times 10^5 X - 84.325$ ($r = 0.999\,6$), 线性范围 0.003 4 ~ 0.053 6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.4 精密度试验 精密吸取染料木素对照品溶液, 重复进样 6 次, 分别测定峰面积。结果 RSD 1.42%, 说明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 精密量取同一染料木素对照品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时进样, 测定峰面积。结果 RSD 2.77%, 说明对照品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.6 重复性试验 按 2.2 项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 依次进样测定含量, 结果 RSD 1.65%, 表明该方法重复性好。

2.4.7 加样回收率试验 精密吸取已知含量的酶解产物 1 mL, 精密加入对照品溶液 1 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 平行 5 份, 分别进样测定, 计算平均加样回收率 97.46%, RSD 102.58%。

2.5 单因素试验考察

2.5.1 粒径 精密称取不同粒径染料木苷 50 mg, 各加入纤维素酶 50 mg, 混匀, 分别加 pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液 10 mL, 置于恒温气浴振荡锅 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 3 h 后取出, 测定转化率 ($n = 3$)。结果表明, 随染料木苷粒径的减少, 转化率显著增加, 最佳酶解反应的粒径为超微粉。

2.5.2 酶用量 精密称取染料木苷超微粉 50 mg, 加入质量浓度分别为 0.57, 1.09, 5.13, 10.06 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纤维素酶(同体积), 溶于 pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液 10 mL 中, 置于恒温气浴振荡锅 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 3 h 后取出, 测定转化率。结果表明随酶用量的增加, 转化率增加, 最佳酶解比例 1:1。

2.5.3 酶解 pH 精密称取染料木苷超微粉 50 mg, 纤维素酶 50 mg, 混匀, 共 7 份, 依次加入 pH 为 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液和 pH 7.0 纯水溶液 10 mL, 置于恒温气浴振荡锅 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 3 h 后取出, 测定转化率。结果表明最佳酶解 pH 5.0。

2.5.4 酶解温度 取染料木苷超微粉 50 mg, 加入 pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液 10 mL 和纤维素酶 50 mg, 置于恒温气浴振荡锅, 分别在 25, 37, 50, 60 $^\circ\text{C}$

条件下反应 3 h 后取出,测定染料木素含量。结果表明随温度升高,转化率增加,于 50 ℃ 时达峰值,之后将随温度的升高而降低,确定最佳酶解温度 50 ℃。

2.5.5 酶解时间 取染料木苷超微粉 50 mg,加入 pH 5.0 乙酸-乙酸钠缓冲液 10 mL 和纤维素酶 50 mg,置于恒温气浴振荡锅,分别于 50 ℃ 反应 1,2,3,4,5,6,7 h,测定转化率。结果表明随酶解时间的延长,染料木素含量逐渐升高。

2.6 星点设计试验 在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 设计原理,选取影响超微粉染料木苷酶解制备染料木素的主要影响因素 pH,温度和时间进行优化组合,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 染料木苷超微粉酶解工艺星点设计试验因素水平

水平	X_1 时间/h	X_2 温度/℃	X_3 pH
+1	6	30	4
0	10	50	5
-1	14	70	6

表 2 染料木苷超微粉酶解工艺星点设计试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	转化率/%
1	10	30	6	53.11
2	14	70	5	60.97
3	10	70	4	23.27
4	10	30	4	26.61
5	10	70	6	48.68
6	6	70	5	38.28
7	14	30	5	64.68
8	6	50	4	26.73
9	14	50	4	40.96
10	6	50	6	40.51
11	6	30	5	35.16
12	14	50	6	78.52
13~17	10	50	5	94.35

由以上结果可知,最佳反应条件为反应介质 pH 5.5,温度 49 ℃,反应时间 11 h。响应曲面模型的回归方程式和显著性统计通过 Statistica 7.0 (Statsoft Inc) 软件进行计算和分析处理,相关系数的显著性通过 Student t 检验和 P 值进行分析。使用响应面模型参数评价试验结果,表明符合多项回归。模型匹配度好,无异常值。方差分析表明模型可进行预测,且预测值与实际值高度匹配。此外,标准分析揭

示了失和项无显著性,而模型 R^2 表明模型有足够的准确度,同时多项回归方程可较好地代表模型。标准分析表明所选各因素均对染料木苷超微粉酶解工艺具有显著性影响;采用程序 Design-Expert7.0.0 软件对响应值与各因素进行多项回归拟合得回归方程,消除掉不显著的影响系数,确定模型可表达为 $Y = 94.35 + 13.06X_1 - 1.05X_2 + 12.91X_3 - 1.71X_1X_2 + 5.95X_2X_3 - 17.91X_1^2 - 26.67X_2^2 - 29.76X_3^2$ 。根据回归分析结果作响应曲面图(图 1~3)。

表 3 回归方程方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
回归模型	11 831.20	14	1 314.58	911.01	<0.000 1
残差	10.10	14	1.44		
失和项	6.48	3	2.16	2.39	0.209 4
纯误差	3.62	4	0.90		
R^2	0.999 1				

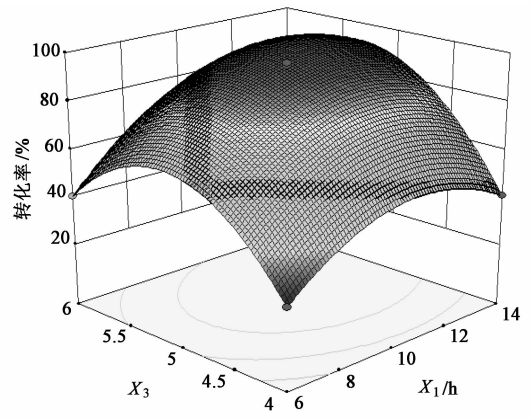


图 1 时间和温度对染料木素转化率的响应面影响

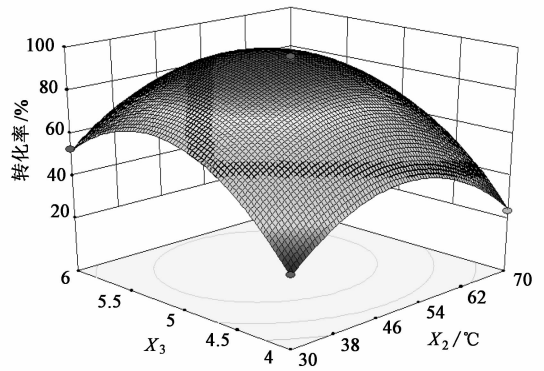


图 2 时间和 pH 对染料木素转化率的响应面影响

2.7 验证试验 根据软件模拟最佳转化条件为时间 11 h,温度 49 ℃,pH 5.5,转化率预测值 96.99%,按预测的最佳工艺条件制备 3 批样品,测得平均转化率 $(96.47 \pm 1.12)\%$ ($n = 3$),说明该工

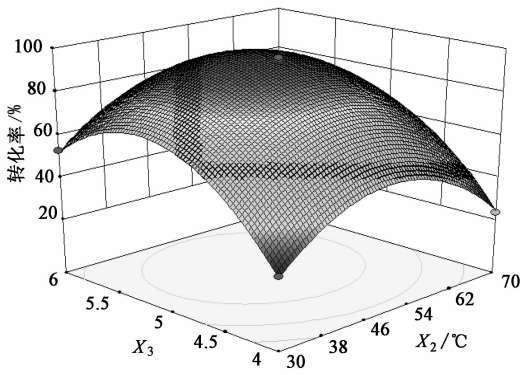


图 3 温度和 pH 对染料木素转化率的响应面影响

艺稳定性、重复性良好。与预测值比较误差很小,说明运用响应面法优化得到的模型参数准确可靠。而相同条件下,普通粉酶解的转化率(33.87 ± 3.29)%,与之相比超微粉的转化率提高了 1.84 倍。

2.8 染料木素的纯化和结构鉴定 将酶解产物溶于乙醇中,超滤,除去不溶性杂质,滤液浓缩,放冷析晶,抽滤,得到的晶体用少量无水乙醇洗涤,干燥,得淡黄色针晶。取适量晶体用甲醇溶解,外标法计算纯度 >98%。

通过¹H-NMR,¹³C-NMR 分析,¹H-NMR(400 MHz,DMSO-d₆) δ:12.94(1H,s,5-OH),10.31(1H,s,7-H),9.90(1H,s,4'-OH),8.29(1H,s,2-H),7.36(2H,d,J=8.5 Hz,2',6'-H),6.82(2H,d,J=8.5 Hz,3',5'-H),6.37(1H,d,J=2.0 Hz,8-H),6.22(1H,d,J=2.0 Hz,6-H)。¹³C-NMR(100 MHz,DMSO-d₆) δ:180.1(C-4),164.9(C-7),164.2(C-5),157.5(C-4'),157.3(C-9),153.8(C-2),130.1(C-2',6'),121.7(C-1'),115.0(C-3',C-5'),104.4(C-10),98.9(C-6),93.5(C-8)。光谱数据与文献报道^[10]一致,可确定此化合物为染料木素。

3 讨论

酶解反应具有简便、专一、产物在酶解过程中不易变性和对环境污染少等优点,但部分底物溶解度小,溶出速率低,是酶解应用中的关键限速步骤。近年国内外研究表明,超微粉碎作为植物药提取前处理的新方法,可增加药材的比表面积,显著增加中药中活性成分或活性组份的溶出度增加,提高提取效率^[11],与此同时也为其他研究提供的新的思路。本

实验首次尝试将超微粉碎技术应用于生物转化行业,通过超微粉碎显著增加反应底物比表面积,促进难溶性底物溶出,从而提高酶解效率,简便快速地制备染料木素。文中通过星点设计对酶解工艺进行优化,并对最优反应条件进行预测,结果表明响应面分析的优化结果与实际值相吻合,且对试验结果的预测具有一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] 胡志苹,黄志华,吴亮亮,等.染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):164.
- [2] 睦荣燕,王万辉,连磊凡,等.染料木素对 Iso 致心肌肥厚大鼠的抗氧化及抑制炎症反应作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,18(19):175.
- [3] Xia Q, Xu D J, Huang Z G, et al. Preparation of icaraside II from icariin by enzymatic hydrolysis method [J]. Fitoterapia, 2010, 81(5):437.
- [4] 贾东升,贾晓斌,薛璟,等.蜗牛酶转化淫羊藿苷制备淫羊藿苷元的研究[J].中国中药杂志,2010,35(7):857.
- [5] 申玲玲,杜光,郭俊浩.超微粉碎对中药活性成分溶出度的影响[J].中国医院药学杂志,2011,31(14):1213.
- [6] 杨丰云,付廷明,郭立玮,等.响应面分析法优化湿法超微粉碎地龙蛋白的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):33.
- [7] 张永忠,李木子,孙艳梅,等.“Amano”β-糖苷酶水解大豆异黄酮技术的研究[J].食品科学,2008,29(5):254.
- [8] 何礼,韩瑞伟,唐晓飞,等.正交设计联用星点设计-效应面法优化染料木素胶束制备工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):12.
- [9] 姚秋萍,马亚丽,李健,等.超微粉碎技术对油菜花粉中槲皮素和山奈素溶出率的影响[J].食品科学,2009,30(6):43.
- [10] 张良,张玉奎,陈艳,等.射干叶中异黄酮类化学成分的研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(1):69.
- [11] 袁清照,张水寒,杨璞,等.超微粉碎技术在枳术丸中的应用及其溶出影响研究[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):10.

[责任编辑 全燕]