

· 综述 ·

## 酶工程技术在中药活性成分获得中的研究进展

许明淑<sup>1\*</sup>, 郭兰萍<sup>2</sup>, 赵无恙<sup>1</sup>, 杨光<sup>2</sup>

(1. 山东大学威海分校海洋学院, 山东 威海 264209; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 探讨酶工程技术应用于中药研究的现状及问题。方法: 查阅酶工程技术提取中药活性成分的文献, 并对其归纳、分析和总结。结果: 酶工程在中药破壁提取, 中药有效成分的定向提取, 酶转化获高活性成分已在多种中药研究中展开, 提示通过酶工程技术获得高活性物质是经济便利的中药提取方法。结论: 为酶转化中药活性物质研究的进一步发展提出参考依据。

[关键词] 酶转化; 高活性物质; 中药提取

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)10-0195-04

### Progress in Preparation by Enzyme Engineering Technology for Highly Active Substances from Traditional Chinese Medicines

XU Ming-shu<sup>1\*</sup>, GUO Lan-ping<sup>2</sup>, ZHAO Wu-yang<sup>1</sup>, YANG Guang<sup>2</sup>

(1. Marine College, ShanDong University at Weihai, Weihai 264209, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To summarize the recent development on the utilization of enzyme engineering technology in obtaining active ingredients from traditional Chinese medicines. **Method:** The published articles on extracting active ingredients from traditional Chinese medicines by enzyme engineering technology were reviewed and analyzed. **Result:** The enzymatic lysis of cell wall for the extraction of substances, the directional extraction of active substances, and the enzymatic transformation of substances with low or no activity to highly active substances have been carried out with various traditional Chinese medicines, indicating that the enzymatic method is economically efficient and convenient in the production of highly active substances from traditional Chinese medicines. **Conclusion:** This study will provide a reference for the further research and development of enzymatic extraction and transformation of active substances from traditional Chinese medicines.

**[Key words]** enzymatic transformation; active substances; extraction of Chinese medicines

次生代谢产物被认为是中药起效的物质基础, 包括萜类、生物碱、黄酮类, 香豆素类, 皂苷类等, 甚至包括某些多糖类、脂类、蛋白质及多肽类。这些活性物质是植物在长期进化中形成的, 不仅对植物体的防御, 生长, 调节等功能具有广

泛的生理作用, 而且这些次生代谢产物对人体机能的调节也起到重要作用。尤其化学合成药物的研究到达瓶颈阶段时, 天然活性产物的提取和筛选显得更重要。

但是中药有效成分的含量较低, 需要大量的植物提取和纯化才能得到。现在中药有效成分的提取多采用有机溶剂提取法, 一般将植物先用水或乙醇加热提取, 然后再按照不同的极性分成若干个部分, 每部分再按照不同的极性用柱色谱或薄层色谱法分离。该方法步骤繁杂, 且效率较低, 很多化合物在反复操作过程中损失。而且有机溶剂提取还会带来严重的环境污染, 提取过程不仅对操作者身体造成严重伤害, 而且产生大量废旧试剂难于处理。

[收稿日期] 20100226(003)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2006CB504700); 国家中医药管理局行业专项(200707014)

[通讯作者] \* 许明淑, 博士, 讲师, 从事酶法提取中药活性成分研究, Tel: 0631-5688303, E-mail: xms@sdu.edu.cn

酶工程技术(enzyme engineering technology)是利用生物酶、含酶细胞器或细胞作为生物催化剂来完成需要的重要化学反应,是新兴的生物技术(Biotechnology)之一,与细胞工程,发酵工程,基因工程等共同构成生物技术的核心内容。酶工程技术具有反应特异性高、快速、高效、反应条件温和且易于控制等优点,可应用于医药、食品、化学工业、诊断分析和检查等各个领域里。近些年来由于酶工程技术的研究深入,在相关领域已先后出现了酶工程应用的报道<sup>[1-2]</sup>,然而在中药研究领域酶工程技术应用的文章报道较少。本文就酶工程技术应用于中药有效成分的提取、分离和纯化以及获得中药高活性物质的研究,以阐明生物酶法获得中药活性成分的可能性及其工业前景。

### 1 酶工程技术破解细胞壁获得中药成分研究

酶工程技术在中药提取分离工艺的应用最早,按其使用酶进行提取分离的目的不同。可以分为破壁提取和定向提取。

由于植物和真菌的细胞外层都含有细胞壁,细胞壁往往成为阻止中药有效成分溶出的关键壁垒。而借助于酶工程,可以实现针对细胞壁的破坏和消解,从而使得细胞有效成分更加的容易溶出,提高提取效率。纤维素酶,果胶酶等,具有定向的分解细胞壁,提高有效物质的溶出率的特点,在中药有效物质提取中具有广泛的应用前景。

例如,银杏叶黄酮类化合物属于色素类物质,多存在于植物细胞的液泡当中,随着植物的干燥,黄酮类化合物会附着在植物细胞壁上。根据银杏叶黄酮类化合物在植物中的存在状态和化学性质,2003年王晖等<sup>[3]</sup>提出用细胞壁分解酶法来强化其提取过程,结果表明银杏叶总黄酮提取率提高到2.01%。Hong Liu等<sup>[4]</sup>人在2009年从菊科植物水飞蓟中黄酮类成分水飞蓟宾,用纤维素酶破坏植物细胞壁,并用正交设计法获得最佳酶提条件下所得结果比传统工艺高出123.6%。2009年Yuangang Zu等人在从红豆杉和三尖杉针叶提取紫杉醇成分,采用破坏植物细胞壁的纤维素酶提取方法,提取率比传统方法提高至3.01倍,并且用扫描电子显微镜观察提取过程,说明了酶辅助提取红豆杉有效成分是既经济又友好于环境的方法<sup>[5]</sup>。2008年Yu-Jie Fu等从木豆中提取木犀草素等成分时,发现采用果胶酶破坏植物细胞壁提取效果最好,其得率是比传统工艺提高至2.5倍<sup>[6]</sup>。

### 2 酶工程技术在中药活性物质改造中的应用

中药的成分极为复杂,同一个母核通过不同的加成反应,如异构化、糖基化、酯化等,往往形成复杂的单体结构,而各个单体结构由于脂溶性等性质的差异,其活性差异比较大。因此,在中药提取中,最理想状态就是相同母核结构的物质均能转化为所需的单体结构。酶工程通过一系列的定向酶促反应,可以实现相关结构向指标成分转化,从而提高目标物质的得率。

如最初1981年时Dreessen等人对番泻苷和芦荟苷药理作用进行了研究。其中芦荟的主要成分是芦荟苷,番泻叶的主要成分为番泻苷,都是具致泻作用的蒽醌苷类物质的前体

物质,2种成分被吸收后体内生物酶作用下被降解为苷元成分才显现其生物活性<sup>[7]</sup>。接着发现芦荟里的芦荟苷成分在葡萄糖醛酸生物酶作用下被降解为芦荟大黄酸蒽酮,才显出其致泻能力,番泻苷的降解为大黄酸蒽酮的时候致泻能力最强。即中药芦荟和番泻叶的有效成分在体内生物酶作用下获得了更高活性物质<sup>[8-9]</sup>。Riitta puupponen-pimi等在提取越橘汁液时也发现,提取过程里如采用果胶酶等进行辅助提取不仅促进其酚类物质提取速率,更有趣的结果是利用酶法提取出的酚类物质的抗菌效果和抗氧化性质优于过去传统提取方法的提取物<sup>[10]</sup>。逐步人们开始提取具转化作用的生物酶,并尝试改造中药原有成分。

中药某些活性成分显著,但在植物中的含量极微,通过酶的定向改造可以提高该类物质的得率,甚至产生新的有效成分。随着酶工程技术研究的深入,利用该类技术进行进行中药有效成分修饰的报道也不断增加,其中皂苷类、黄酮类和多糖类中药的研究居多。

### 2.1 酶工程技术在皂苷及苷类成分物质活性改造中的应用

大量研究表明,利用酶工程技术进行中药有效成分修饰,不仅方便快捷,而且可以避免有机化工方法带来的毒性和污染。1986年起T. Muro和T. Akao等用微生物和动物肝脏中分离出水解甘草皂苷的-葡萄糖醛酸苷酶,而该酶作用下中药甘草的大部分水解产物为高药理活性的甘草皂苷<sup>[11-12]</sup>更有利于被机体吸收利用;到2003年吴少杰等人对甘草皂苷进行进一步的改造,利用糖降解酶在最佳条件下获得甘草皂苷元产率达23.7%,他们采用的液体发酵法中,还可以将未转化的甘草皂苷可用50%乙醇洗脱而循环利用,由此得出简洁方便的甘草皂苷元的生产途径<sup>[13]</sup>。

国内酶转化获得高活性成分最为成功的是人参的研究。人参的有效成分是皂苷类成分,其中人参皂苷Rh<sub>2</sub>等稀有成分具有抑制各种癌细胞生长、诱导分化和抗转移癌细胞功效<sup>[14-15]</sup>,不但对人体无毒性、而且具有较高的保健功能,是医药、保健食品、化妆品和人参制品的优良添加剂。但人参Rh<sub>2</sub>的结构复杂,在红参和野山参中只有十万分之几,化学方法提取难度大、污染大、收率低。2002年金凤燮等<sup>[16]</sup>采用皂苷酶处理人参中常见组分Rb, Rc, Rd等二醇类皂苷生产出Rh<sub>2</sub>等稀有皂苷<sup>[17-18]</sup>,经过酶处理生产Rh<sub>2</sub>等人参稀有皂苷其转化率在60%以上,其效率比从红参中提取率提高了500~700倍。金凤燮等人还对中药薯蓣进行酶辅助提取研究,薯蓣皂苷是其有效成分,如采用霉菌培养产生的葡萄糖苷酶液,酶法水解糖基制备低糖基薯蓣苷时加入产酶诱导物,其中薯蓣皂苷的产率也见有明显提高,可知酶辅助法是比较传统方法更简便获得活性成分的方法<sup>[19]</sup>。

最近几年来,利用微生物培养的酶液辅助提取中药的研究越来越多。如白头翁提取白头翁皂苷糖基过程里加入粗酶液制备低糖基白头翁皂苷<sup>[20]</sup>。肖丽丽等利用微生物产的糖苷酶,水解黄芪总皂苷,改变其糖链结构制出高活性次生黄芪皂苷,产品得率为75.38%<sup>[21]</sup>。在这一领域中寻找新酶

来源的研究也逐步开展。冯冰等在 2005 年找出了能水解甾体皂苷碳-3 位糖链末端糖基的酶,可以制备甾体皂苷的去糖基衍生物。他们利用新月弯孢霉培养用其中生物酶作用,对双糖基的重楼皂苷、重楼皂苷进行酶转化,其转化物用波谱方法鉴定结果是单糖基皂苷,如薯蓣皂苷元-3-O-D-吡葡萄糖苷等,反应机理是甾体皂苷碳-3 位糖链末端的鼠李糖被微生物酶水解而成,这是首次从新月弯孢霉里培养出降解甾体皂苷能力的糖转苷酶的培养研究<sup>[22]</sup>。

**2.2 酶工程技术在黄酮类成分物质活性改造中的应用** 银杏总黄酮类物质是有效成分,具有抗心血管疾病的效用,不同的黄酮物质有不同的药理活性和工业上加工特点,用酶法进行黄酮类物质间的转化也是近期研究新动向<sup>[23-24]</sup>。银杏的代表性黄酮苷元成分是槲皮素,很多人对此成分进行生物酶法改造研究。1991 年高根芳春等<sup>[25]</sup>用转苷酶对银杏黄酮苷元进行糖基转移获得槲皮素苷,所得的槲皮素苷抗肿瘤、抗血栓活性远强于槲皮素<sup>[26]</sup>。Mingshu Xu 在 2006 年用 *spirizyme plus* 糖苷酶和 *suhong475* 糖苷酶等几种酶,将槲皮素转为槲皮素糖苷,不仅用 HPLC 和 MS 法检测出产物分子量,并且对其反应过程的酶动力学进行了探讨,开始了酶转化中药活性物质的机制研究<sup>[27]</sup>。

王园园等 2005 年用 *Streptomyces griseus* ATCC 13273 菌株里的生物酶对柚皮苷,橙皮苷,黄芩苷及木犀草素进行转化研究,经过分离鉴定得到的转化产物有柚皮素-7-O-葡萄糖苷,柚皮素,橙皮素,黄芩素、黄芩素-6-甲氧醚和柯伊利素等。此转化过程中涉及到两类酶反应即糖苷水解和甲基化反应,得出结论 *S. griseus* 产生的 L-鼠李糖苷酶对底物有特异选择性, -D-葡萄糖苷酶的选择性不强,甲基转移酶仅对黄酮类化合物的特异位点进行甲基化<sup>[28]</sup>。

实践证明出酶法水解黄酮苷制备其苷元克服了传统提取技术存在的对苷破坏性大、高污染、特异性差等缺点。大豆中含有的大豆异黄酮是植物雌激素,可促进性激素、生长因子的分泌,具有改善妇女绝经期综合征、预防骨质疏松和癌症等活性<sup>[29]</sup>。研究发现大豆异黄酮苷元的生理活性远高于大豆异黄酮苷,但大豆中苷元含量很低。为了得到高活性的大豆异黄酮苷元,2001 年苏志国等<sup>[30]</sup>在提取过程中采用糖基降解酶水解大豆异黄酮苷制备其苷元。

**2.3 酶工程技术在多糖类成分物质活性改造中的应用** 在中药多糖类活性成分里其糖链数目降低,其药理活性反而增高。J Guan 等在 2010 年利用葡聚糖酶,阿拉伯糖内切酶,木聚糖酶,半乳聚糖酶,纤维素酶,糖苷酶,淀粉酶和果胶酶等多种酶对 9 种中药,如人参,灵芝,三七,西洋参,冬虫夏草,北冬虫夏草(蛹虫草),紫灵芝,黄芪,当归等其中活性成分进行糖链降解研究,并用 HPLC 等手段检测出用酶解是有效获得药效佳的低糖链有效方法<sup>[31]</sup>。

**3 酶工程技术在降低中药提取物有毒物质毒性中的应用**

中药安全性与中药的有效性同等重要,近年来由于重大用药安全事件的频发,人们对用药安全的关注也普遍提高。

其中黄曲霉毒素和农药残留是带来中药用药安全隐患的重要因素。黄曲霉毒素是黄曲霉菌属黄曲霉菌、寄生曲霉菌产生的代谢物,剧毒,同时还有致癌、致畸、致突变的作用,是目前发现的化学致癌物中最强的物质之一。中药材采收、加工、储存、运输不当均可导致黄曲霉毒素的产生。黄曲霉毒素解毒酶(Aflatoxin-de-toxiczyme, ADTZ)的发现,使得利用酶工程技术可以有效降低黄曲霉毒素的毒性,该研究虽处于起步阶段,但随着黄曲霉毒素解毒酶结构研究的深入,该技术将拥有良好的前景<sup>[32]</sup>。另外,利用酶工程,可以改变中药中某些化合物的结构而起到降毒的作用,比如利用生物工程对毒性较强的喜树碱进行转化,使之成为低度性的 10-羟基喜树碱的成功例子已经出现<sup>[33]</sup>。

**4 酶工程技术在中药中应用存在的问题**

**4.1 酶工程技术应用的价格问题** 由于酶工程技术在生产实际中存在价格较高或酶反应的条件较苛刻,药厂很少使用此方法。酶工程技术应用于中药有效成分的提取、分离和纯化仍然存在着障碍。酶法用于中药研究不短时间,多停留在实验室阶段,只有少数的中成药应用到生产实际里,如研究时用纤维素酶、果胶酶等对植物来源的中药细胞壁进行破坏,提高提取系统的澄清度、或改变动物药材的质地等过程里<sup>[34]</sup>。但是随着研究的深入,酶的获得方式越来越多样化,在不远的将来,通过发酵技术,甚至人工合成,可以大大降低酶制剂的生产成本。酶工程技术应用的价格问题也会自然消失。

**4.2 酶工程技术与其他方法的联合应用问题** 酶工程技术不可能解决所有中药中存在的问题,酶工程技术作为一个新兴技术必须与其他技术联合应用才能发挥其最大优势。而现阶段,对酶工程技术的应用研究尚不深入,对酶工程技术与其他中药传统方法,如加热回流,水提醇沉等方法如何衔接,如何配套使用,尚需要进一步开展研究才能解决。

总之,酶工程技术以其定向,高效,无污染的特殊优势,在中药的破壁提取,中药有效成分的定向提取,中药有效成分的修饰转化,中药毒性物质的减毒增效等多个方面拥有广泛的应用前景。酶工程技术可以做中药提起的新方法在中药研究及生产中广泛应用。

## [参考文献]

- [1] 王荣辉,韦航,韦朝英,等. 酶制剂在食品工业的应用[J]. 大众科技, 2009, 121(9): 107.
- [2] 赵熙,粟本文,郑红发,等. 生物技术在茶叶加工领域的研究进展[J]. 茶叶科学技术, 2009, 1: 1.
- [3] 王晖,刘佳佳. 银杏黄酮的酶法提取工艺研究[J]. 中药材, 2003, 26(12): 18.
- [4] Liu Hong, Du Xueling, Yuan Qipeng. Optimisation of enzyme assisted extraction of silybin from the seeds of *Silybum marianum* by box-behnen [J]. *Exper Design Phytochem Anal*, 2009, 20(3): 475.
- [5] Yuangang Zu, Ying Wang. Enzyme-assisted extraction of

- paclitaxel and related taxanes from needles of *Taxus chinensis*[ J ]. *Separation and Purification Technol*, 2009, 68(5) : 238.
- [ 6 ] Fu Yu-Jie, Liu Wei, Zu Yuan-Gang. Enzyme assisted extraction of luteolin and apigenin from pigeonpea [ *Cajanus cajan*( L. ) Millsp. ] leaves [ J ]. *Food Chem*, 2008, 111(4) : 508.
- [ 7 ] Drees en M, Eyssen H, Lemli J. The metabolism of sennosides A and B by the intestinal microflora: *in vitro* and *in vivo* studies on the rat and the mouse [ J ]. *J Pharm Pharmacol*, 1981, 33(10) : 679.
- [ 8 ] Akao Tkao, Che Q M, Kobashi K, et al. A purgative action of barbaloin is induced by *Eubacterium* sp. Strain BAR, a human intestinal anaerobe, capable of transforming barbaloin to aloe emoin anthron [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19(1) : 136.
- [ 9 ] Yang L, Akao T, Kobashi K, et al. Purification and characterization of a novel sennoside-hydrolyzing beta-glucosidase from *Bifidobacterium* sp. Strain SEN, a human intestinal anaerobe [ J ]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19(5) : 705.
- [ 10 ] Riiitta puupponen-pimi, Liisa Nohynek, Sabine ammann. Enzyme-Assisted Processing Increases Antimicrobial and Antioxidant Activity of Bilberry [ J ]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(1) : 681.
- [ 11 ] T Muro. Purification and some properties of glycyrrhizic acid from *Aspergillus niger* [ J ]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50:687.
- [ 12 ] T Akao. Hydrolysis of glycyrrhizin by  $\beta$ -glucuronidase of animal ivers [ J ]. *Biochem Pharm*, 1991, 41: 1025.
- [ 13 ] 吴少杰, 杨丽娟. 甘草皂苷生物转化的研究 [ J ]. *中草药*, 2003, 34(6) : 13.
- [ 14 ] 赵越, 苏适. 人参皂苷 Rh 2 抗肿瘤作用的研究 [ J ]. *微生物学杂志*, 2003, 23: 61.
- [ 15 ] Jie Liu, Jun Shiono. 20 ( R ) -Ginsenoside Rh<sub>2</sub>, not 20 ( S ), is a selective osteoclastogenesis inhibitor without any cytotoxicity [ J ]. *Bio Org Med Chem Letts*, 2009, 19(4) : 3320.
- [ 16 ] 金凤燮. 酶法改变人参皂苷糖基制备稀有人参皂苷的方法 [ P ]. CN 1229086A.
- [ 17 ] Zhang Chunzhi, Yu Hongshan. Purification and characterization of ginsenoside-a-arabinofuranase hydrolyzing ginsenoside Rc into Rd from the fresh root of *Panax ginseng* [ J ]. *Process Biochem* 2002, 37(5) : 793.
- [ 18 ] Hong shan Y U, Chunzhi ZHANG, Mingchun LU. Purification and Characterization of New Special Ginsenosidase Hydrolyzing Multi-Glycisides of Protopanaxadiol Ginsenosides, Ginsenosidase Type I [ J ]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(2) : 231.
- [ 19 ] 金凤燮. 酶法水解薯蓣类皂苷糖基制备低糖基薯蓣皂苷的方法 [ P ]. CN 1483834 A.
- [ 20 ] 金凤燮. 酶法水解白头翁皂苷糖基制备低糖基白头翁皂苷的方法 [ P ]. CN 1483832 A.
- [ 21 ] 肖丽丽, 吴晓倩, 鱼红闪. 黄芪皂苷生物转化物质的分离提取 [ J ]. *大连轻工业学院学报*, 2006, 25(2) : 86.
- [ 22 ] 冯冰, 马百平, 等. 新月弯孢霉对重楼皂苷的生物转化 [ J ]. *中草药*, 2005, 36(7) : 978.
- [ 23 ] 丰飞, 金伟东, 吴翔. 银杏叶提取物对动脉粥样硬化大鼠斑块及血脂水平影响 [ J ]. *亚太传统医药*, 2009, 5(10) : 10.
- [ 24 ] 植松大辅, 刘芳. 银杏叶提取物 [ J ]. *日本医学介绍*, 2005, 26(3) : 133.
- [ 25 ] 高根芳春. 酶法提取银杏叶中黄酮类化合物 [ P ]. 日本: 31991: 98592.
- [ 26 ] Guan J, Li S P. The Effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer [ J ]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52(4) : 673.
- [ 27 ] M -sxu, M -f luu, X -h. xig Characteristics of quercetin transglycosidation catalyzed by *Penicillium decumbens* glycosidase [ J ]. *Food and Bioproducts Processing*, 2006, 84(3) : 1.
- [ 28 ] 王园园, 刘吉华. *Streptomyces griseus* ATCC 13273 对 4 种黄酮生物转化的初步研究 [ J ]. *药物生物技术*, 2005, 12(5) : 308.
- [ 29 ] 毛峻琴, 宓鹤鸣. 大豆异黄酮的研究进展 [ J ]. *中草药*, 2000, 31: 61.
- [ 30 ] 田晶, 苏志国. 酶法改变大豆皂苷糖基的研究 [ J ]. *食品科学*, 2001, 22: 14.
- [ 31 ] JGuan, S P Li. Discrimination of polysaccharides from traditional Chinese medicines using saccharide mapping—Enzymatic digestion followed by chromatographic analysis [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51: 590.
- [ 32 ] 刘大岭, 姚冬生, 黄炳贺, 等. 黄曲霉毒素解毒酶的固定化及其性质的研究 [ J ]. *生物工程学报*, 2003, 19(5) : 603.
- [ 33 ] 郭继强, 朱殿生, 谭慧. 假单胞菌转化喜树碱的初步研究 [ J ]. *食品科技*, 2010, 35(1) : 42.
- [ 34 ] 冯青然, 陈燕军. 中药提取工艺研究进展 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2003, 9(7) : 43.

[ 责任编辑 蔡仲德 ]