

β -甘露聚糖酶催化水解栀子苷 制备京尼平

何招燚, 薛露, 汤怡, 郭辉*, 钱俊青
(浙江工业大学药学院, 浙江杭州 310014)

摘要:京尼平是一种环烯醚萜类天然生物交联剂,具有降血糖、调血脂、保肝利胆等生物活性。天然存在的京尼平较少,且质量分数约为0.005%~0.01%。采用 β -甘露聚糖酶催化水解栀子苷制备京尼平的工艺路线,通过单因素实验、正交实验确定了 β -甘露聚糖酶水解栀子苷的最佳工艺条件:pH为4.5,温度为50℃,底物与酶质量比例1:2,时间为1h,产率高达84.49%,纯度达到80%以上。该方法安全、快速、可靠,是一种生产京尼平的新途径。

关键词: β -甘露聚糖酶;栀子苷;京尼平;催化

中图分类号:R932

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)08-0129-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2016.08.031

Biosynthesis of genipin from gardenoside catalyzed by β -mannan enzyme

HE Zhao-yi, XUE Lu, TANG Yi, GUO Hui*, QIAN Jun-qing

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: Genipin is an important bio-crosslinking agent with multiple physiological activities. The content of genipin in nature is rare (0.005% - 0.01%). In this study, β -mannan enzyme is used to catalyze the hydrolysis of geniposide into genipin. The optimal hydrolysis conditions are determined as follows by single-factor and orthogonal experiment: 4.5 of pH, 50°C of temperature, 1:2 mass ratio of substrate and enzyme and 1 hour of hydrolytic time. The yield of genipin can reach 84.49% with purity above 80%. This method is a safe and high-efficient way to produce genipin.

Key words: β -mannan enzyme; geniposide; genipin; catalysis

京尼平是一种环烯醚萜类物质,无毒,易溶于乙醇、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂^[1]。京尼平在抗肿瘤、抗炎、抗癌、抗血栓及治疗糖尿病等方面疗效显著,具有很多新型的、重要的药理价值,在注射剂开发等方面具有很好的应用前景^[2]。同时,京尼平作为一种新型的生物交联剂被应用于生物材料中,不仅能形成稳定的交联制品,而且具有细胞毒性小,生物相容性好,抗降解能力强和应用领域广泛等优点,是非常有前途的交联材料^[3]。目前,制备京尼平的方法主要是酶解法,利用 β -葡萄糖苷酶水解京尼平苷生成昔元京尼^[4-6],如图1所示。但 β -葡萄糖苷酶价格昂贵,不利于实际大规模生产。 β -甘露聚糖酶是一种半纤维素水解酶,能将异甘露聚糖和甘露聚糖中的 β -1,4-D-甘露糖苷键催化水解^[7]。笔者采用 β -甘露聚糖酶直接实现京尼平的制备,并对产

物的性质和结构进行了鉴定。

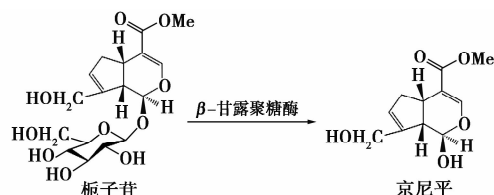


图1 β -甘露聚糖酶水解栀子苷制备京尼平路线

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

栀子苷(质量分数为98%);京尼平,成都曼思特生物科技有限公司生产; β -甘露聚糖酶,武汉千润生物工程有限公司生产; α -淀粉酶,上海楷洋生物技术有限公司生产;可溶性淀粉,南通市云峰淀粉有限公司生产;乙醇、甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、醋

收稿日期:2016-01-21

基金项目:浙江省自然科学基金(Y16C020005)

作者简介:何招燚(1990-),男,硕士生,研究方向为药学,13758196976@163.com;郭辉(1974-),男,博士,副教授,研究方向为植物源大宗产品活性功能成分(血糖、血脂)提取分离工艺研究及产品开发,通讯联系人,0571-88320903,gh635@163.com。

酸钠,均为分析纯;乙腈,色谱纯;硅胶板,青岛海洋化工厂分厂生产。

1.2 实验仪器

THZ-82A 水浴恒温振荡器,金坛市江南仪器厂生产;R-201 旋转蒸发仪,上海申生科技有限公司生产;分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司生产;高效液相色谱仪,Agilent Technologies 生产。

1.3 栀子苷与京尼平的检测方法

将栀子苷与京尼平配制成不同质量浓度溶液(5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),用 HPLC 进行检测,色谱条件:Agilent 高效液相色谱仪;色谱柱为 Eclipse XDB-C18(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm);柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为 238 nm;流动相: $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=15:85$;流速为 1 mL/min;进样量为 10 μL 。栀子苷标准曲线方程为 $y=11.777x+10.935$, $R^2=0.9992$;京尼平标准曲线方程为 $y=20.303x+40.714$, $R^2=0.9994$ 。

1.4 实验方法

1.4.1 京尼平制备工艺

精密称取 50 mg 栀子苷,分别加入到含一定量酶的 5 mL 醋酸缓冲溶液中,于恒温振荡器下水浴震荡,将反应液转入圆底瓶,于旋蒸仪旋干,用 1 mL 甲醇溶解,用 HPLC 进行产物分析。

1.4.2 京尼平抑制酶分解糖类作用的研究

通过 α -淀粉酶酶活的变化判断京尼平对酶分解糖类作用的影响。取编号为 A、B、C、D 4 个 25 mL 三角瓶,分别加入 2% 可溶性淀粉 5 mL 与 pH 4.6 的醋酸缓冲液 2.5 mL, A 组和 B 组不加京尼平, C 组和 D 组加入一定量的京尼平,使其质量浓度为 100 mg/L,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 10 min。A 组和 C 组加入 α -淀粉酶 20 mg, B 组和 D 组加入失活的 α -淀粉酶 20 mg,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 10 min,反应结束后立即沸水浴加热 5 min,使 α -淀粉酶失活。取 4 组反应液 5 mL 于三角瓶中,加入 0.05 mol/L 碘液 10 mL,缓慢加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 5 mL,摇匀后将 4 组放置在暗处,15 min 后滴加 2 mol 浓硫酸 2 mL。指示剂为 0.5% 可溶性淀粉溶液,用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠溶液滴定至蓝色消失。记录 0.1 mol 硫代硫酸钠溶液消耗的体积:含酶样品(X)、空白对照(Y)实验反复进行 3 次。1 mg 酶每分钟催化水解 2% 淀粉溶液成 1 μmol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。则:

$$\text{酶活}(\text{U}/\text{mL}) = (Y - X) \times 10^{-3} \times (0.1/2) \times (8/5) \times 106 \times (1/20) \times (1/10) \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 单因素分析

2.1.1 酶种的筛选

精密称取 50 mg 栀子苷,分别加入到含 100 mg β -甘露聚糖酶、 α -淀粉酶、糖化酶的 pH 4.5 的 5 mL 醋酸缓冲溶液中,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡 1 h,将反应液转入圆底瓶,用旋蒸仪旋干,用 1 mL 甲醇溶解,进行定性分析,对照组为未加酶的栀子苷溶液。结果如表 1 所示。

表 1 酶种筛选结果

酶种	β -甘露聚糖酶	α -淀粉酶	糖化酶
产率/%	80.26	0	9.87
SD	0.23	0	0.31

由表 1 可知,加 β -甘露聚糖酶组京尼平产率较高,糖化酶组产率很少,而 α -淀粉酶组没有产率,由此可知, β -甘露聚糖酶在栀子苷转化为京尼平的过程中催化专一性较强。所以,选用 β -甘露聚糖酶为催化剂。

2.1.2 pH 的考察

精密称取 50 mg 栀子苷,加入到含 100 mg β -甘露聚糖酶的 pH 分别为 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 的 5 mL 醋酸缓冲溶液中,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴震荡 1 h,将反应液转入圆底瓶,用旋蒸仪旋干,用 1 mL 甲醇溶解,进行定性分析,对照组为未加酶的栀子苷溶液。结果如表 2 所示。

表 2 pH 筛选结果

pH	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
产率/%	49.27	79.35	82.76	68.12	6.02
SD	0.24	0.47	0.33	0.18	0.17

由表 2 可知,当反应溶液 pH 为 4.5 时,京尼平的产率最高,pH 高于或低于 4.5 会导致酶活性被抑制,影响产率,因此,最优反应 pH 为 4.5。

2.1.3 时间的考察

精密称取 50 mg 栀子苷,加入到含 100 mg β -甘露聚糖酶的 pH 为 4.5 的 5 mL 醋酸缓冲溶液中,分别于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中震荡 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,将反应液转入圆底瓶,用旋蒸仪旋干,用 1 mL 甲醇溶解,进行定性分析,对照组为未加酶的栀子苷溶液。结果如表 3 所示。

表3 时间筛选结果

时间/h	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
产率/%	74.62	85.31	75.63	62.93	50.41
SD	0.21	0.17	0.43	0.28	0.46

由表3可知,反应时间为1 h时,京尼平的产率最高,反应时间过长会导致副反应的发生(京尼平与酶蛋白交联产生蓝色素),所以反应时间不易过长。

2.1.4 温度的考察

精密称取50 mg 栀子苷,加入到含100 mg β -甘露聚糖酶的pH为4.5的5 mL醋酸缓冲溶液中,分别于40、45、50、55、60℃水浴中震荡1 h,将反应液转入圆底瓶,用旋蒸仪旋干,用1 mL甲醇溶解,进行定性分析,对照组为未加酶的栀子苷溶液。结果如表4所示。

表4 温度筛选结果

温度/℃	40	45	50	55	60
产率/%	76.81	79.48	82.56	51.34	35.65
SD	0.51	0.57	0.23	0.29	0.36

由表4可知,温度过低会抑制酶的活性,温度过高会导致酶失活,影响京尼平的产率,所以,最佳反应温度为50℃。

2.1.5 加酶量的考察

精密称取50 mg 栀子苷,加入到含10、25、50、100、250 mg β -甘露聚糖酶的pH为4.5的5 mL醋酸缓冲溶液中,分别于50℃水浴中震荡1 h,将反应液转入圆底瓶,用旋蒸仪旋干,用1 mL甲醇溶解,进行定性分析,对照组为未加酶的栀子苷溶液。结果如表5所示。

表5 酶量筛选结果

加酶量	5:1	2:1	1:1	1:2	1:5
产率/%	47.39	58.85	75.56	83.42	89.07
SD	0.42	0.27	0.53	0.20	0.26

由表5可知,酶量越多越易于反应的发生,但考虑到成本问题,选用底物与酶的质量比例为1:2作为最优加酶量。

2.2 栀子苷转化京尼平正交实验

以京尼平转化率为指标,选取pH、温度、酶量、时间4因素和3水平制成正交表并进行正交试验检测,考察各因素对实验结果的影响,因素水平表如表

6所示;按表6中设计的正交实验方案进行工艺优化,结果如表7、表8所示。

表6 正交实验因素水平表

因素	A pH	B 温度/℃	C 底物与酶质量比例	D 时间/h
1	4.0	45	2:1	0.5
2	4.5	50	1:1	1.0
3	5.0	55	1:2	1.5

表7 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	产率/%
1	1	1	1	1	24.01
2	1	2	2	2	70.88
3	1	3	3	3	78.99
4	2	1	2	3	65.94
5	2	2	3	1	75.46
6	2	3	1	2	55.51
7	3	1	3	2	84.33
8	3	2	1	3	55.91
9	3	3	2	1	48.89
极差	7.677	9.324	34.450	20.787	
因素主次顺序	C > D > B > A				
优水平	A ₂	B ₂	C ₃	D ₂	
优组合	A ₂ B ₂ C ₃ D ₂				

表8 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A(误差)	91.497	2	1.000	19.000	
B	135.668	2	1.483	19.000	
C	1780.636	2	19.461	19.000	*
D	748.948	2	8.185	19.000	

由正交实验结果和方差分析可以看出,极差越小说明该因素影响越小,A因素影响下极差较小,且偏差平方和以及F比均较小,说明A因素对实验结果影响较小,可以判断其为次要影响因素,A因素可视为误差,在实验过程中可以简单考虑该因素对实验的影响。C因素对京尼平产率影响较大,显著性较高,为主要影响因素,实验过程中需要严格把控。综合实验结果得出,各因素对京尼平产率的影响程度为C > D > B > A。以京尼平产率为指标,由正交实验结果确定最佳工艺条件为A₂B₂C₃D₂,即底物与酶质量比1:2,时间为1 h,pH为4.5,温度为50℃。

2.3 最佳工艺的验证

精密称取 50 mg 栀子苷加入到含 100 mg β -甘露聚糖酶的 pH 为 4.5 的 5 mL 醋酸缓冲溶液中,于 50℃ 水浴中震荡 1 h,稀释至 50 mL,取其中的 0.5 mL 用甲醇定容至 5 mL,用高效液相色谱仪检测反应液的出峰情况,重复 3 次,结果如表 9 所示。

表 9 最佳条件验证

实验号	栀子苷峰面积	京尼平峰面积	产率/%	平均产率/%
1	24.7	1024.8	83.21	
2	25.1	1087.8	88.54	84.49
3	23.3	1007.3	81.73	

在 pH 为 4.5,温度为 50℃,底物与酶质量比为 1:2,时间为 1 h 的优化条件下与正交实验 9 组实验相比,产率最高,纯度较高,为(83.89 ± 0.20)%,水解工艺合理。

2.4 产物结构分析

称取 1 g 栀子苷,加入到含 2 g β -甘露聚糖酶的 pH 为 4.5 的 100 mL 醋酸缓冲溶液中,于 50℃ 水浴中震荡 1 h,将反应液转入分液漏斗,用 50 mL 乙醚反复萃取 3 次,浓缩后加入少量脱脂棉吸附蓝色素。使用胶头滴管吸取清液转入烧杯中,于通风橱中挥干,得到白色结晶物,取少量白色结晶物进行核磁共振分析。样品核磁共振数据为:¹HNMR (500 MHz, CD₃OD-*d*₄), δ : 6.66 (s, H-3), 5.02 (s, H-7), 3.98 (d, *J* = 8.4 Hz, H-1), 3.49 (d, *J* = 14.4 Hz, H-10), 3.40 (d, *J* = 14.4 Hz, H-10), 2.90 (s, -OCH₃), 2.33 (m, H-5), 2.01 (1H, m, H-6), 1.68 (m, H-9), 1.23 (1H, m, H-6)。通过与文献 [8] 中的数据比较,反应产物为京尼平。京尼平具

有降糖活性,将京尼平作为抑制剂,考查其对 α -淀粉酶活性的抑制作用,结果发现抑制作用不显著,可能存在其他机理来产生降糖活性,需进一步探讨。

3 结论

β -甘露聚糖酶水解栀子苷制备京尼平具有价格便宜,产率较高,反应迅速,产物纯度较高等优点。通过单因素和正交实验,得出 β -甘露聚糖酶催化栀子苷水解制备京尼平工艺最优条件为:pH 为 4.5,反应温度为 50℃,底物与酶质量比为 1:2,反应时间为 1 h,产率为 84.49%,纯度达到 80% 以上。

参考文献

- [1] 霍蕾,苏建,沈竞,等.京尼平的微生物转化研究[J].天然产物研究与开发,2008,20:70-73.
- [2] 万丽花,姚忠,倪芳,等.两相体系中 β -葡萄糖苷酶催化栀子苷水解制备京尼平[J].化工学报,2014,65(9):3583-3591.
- [3] 杨秩舜,张彤,于筛成.京尼平的研究进展及其药理价值[J].中成药,2011,33(1):130-133.
- [4] 梁华正,廖夫生,彭玲西,等.氨基酸为显色剂比色法测定京尼平的含量[J].天然产物研究与开发,2006,18:467-470.
- [5] Butler M F, Ng Y F, Pudney P D A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2003, 41(24):3941-3953.
- [6] Muzzarelli R A A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(1):1-9.
- [7] 赵月菊,薛燕芬,马延和. β -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望[J].微生物学报,2009,49(9):1131-1137.
- [8] 付岩师.微生物发酵法生产京尼平的研究[D].北京:北京化工大学,2011. ■

巴斯夫与美克合资聚四氢呋喃装置在新疆投产

7月6日,巴斯夫与新疆美克化工股份有限公司合资兴建的聚四氢呋喃新生产装置在新疆维吾尔自治区库尔勒市正式投产,开始为国内客户提供产品。新装置年产能 5 万 t,由巴斯夫与美克的合资企业巴斯夫美克化工制造(新疆)有限责任公司负责运营。

2016年1月,巴斯夫与美克的 BDO(1,4-丁二醇)装置在库尔勒基地建成投产。该装置年产能为 10 万 t,由美克与巴斯夫的另一家合资企业美克美欧化学品(新疆)有限责任公司负责运营。

聚四氢呋喃主要用于生产面向各种纺织品的氨纶弹性纤维,包括泳衣、运动装、内衣和外套等。此外,还是生产 TPU(热塑性聚氨酯)的基础原料,TPU 可用于生产软管、薄膜和电缆护套。其它应用包括热塑性聚酯酯、聚醚酰胺和聚氨酯浇注弹性体等,多用于生产滑板和直排轮滑鞋滚轮等。

巴斯夫全球聚四氢呋喃年产能为 35 万 t,在中国上海和韩国蔚山都运营着聚四氢呋喃生产装置。此外,巴斯夫还在美国的盖斯马和德国的路德维希港拥有聚四氢呋喃生产装置。(张华)