

原位生物转化法提高槐角中染料木素的含量

陈翔¹, 王萍萍², 吴霞², 陈才军¹, 李彬¹, 梅建凤^{2*} (1.舟山市食品药品检验检测研究院, 浙江 舟山 316021; 2.浙江工业大学药学院, 杭州 310014)

摘要: 目的 开发一种生物转化工艺, 将槐角中的槐角苷等糖苷转化为活性更高的染料木素, 从而提高槐角的中药使用价值。方法 用米根霉(*Rhizopus oryzae*)LJH3 菌株的粗酶液生物转化处理槐角, 考察料液比、体系 pH、槐角粒径大小和转化时间对提高槐角中染料木素含量的影响。结果 米根霉 LJH3 的粗酶液转化处理槐角后染料木素含量显著提高。在较优的转化条件下, 即料液比 5 : 100, 体系 pH 5.0, 槐角粒径 0.2 mm, 30 °C 条件下转化 32 h, 染料木素含量提高到 36.3 mg·g⁻¹, 较未转化时的含量提高了 14.5 倍。结论 利用米根霉 LJH3 的粗酶液原位生物转化槐角的转化工艺具有方法简单和产率高的优点, 有较好的工业化应用价值。

关键词: 染料木素; 槐角苷; 槐角; 生物转化; 米根霉

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)18-2201-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.18.005

引用本文: 陈翔, 王萍萍, 吴霞, 等. 原位生物转化法提高槐角中染料木素的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(18): 2201-2205.

Improvement of Genistein Content in Sophorae Fructus by *in Situ* Biotransformation

CHEN Xiang¹, WANG Pingping², WU Xia², CHEN Caijun¹, LI Bin¹, MEI Jianfeng^{2*} (1.Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan 316021, China; 2.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a biotransformation process to improve the medicinal value of the Chinese herb Sophorae Fructus by converting sophoricoside and other glycosides into genistein. **METHODS** Sophorae Fructus was treated by biotransformation using crude enzyme from *Rhizopus oryzae* LJH3. The effects of substrate-enzyme solution ratio, pH, particle size of substrate and conversion time on improving the content of genistein in Sophorae Fructus were investigated. **RESULTS** The content of genistein in Sophorae Fructus was significantly improved after it was treated with crude enzyme from *Rhizopus oryzae* LJH3. The optimum biotransformation conditions were as followings: substrate-enzyme solution ratio 5 : 100, pH 5.0, particle size of substrate 0.2 mm, temperature 30 °C and time 32 h. Under these conditions, the content of genistein in the biotransformed Sophorae Fructus increased to 36.3 mg·g⁻¹, which was 14.5 times higher than that in the untreated one. **CONCLUSION** The process by *in situ* biotransformation of Sophorae Fructus using crude enzyme from *Rhizopus oryzae* LJH3 has the advantages of simple operations and high productivity, which shows the potential application in the pharmaceutical industry.

KEYWORDS: genistein; sophoricoside; Sophorae Fructus; biotransformation; *Rhizopus oryzae*

槐角为我国传统中药材, 是豆科植物槐 (*Sophora japonica* L.) 的干燥成熟果实(完整的豆荚)。槐角是历版中国药典均收录的中药品种, 也是槐角丸、地榆槐角丸、脏连丸等中成药的主要组分, 对治疗冠心病、高血压、脑血管栓塞等病症疗效显著^[1]。

槐角的主要药效成分为槐角苷, 又名槐苷、槐黄苷、染料木素葡萄糖苷等, 中国药典 2015 年版要求槐角干燥品中, 槐角苷含量不得 < 3.0%^[2]。除

了含有槐角苷之外, 槐角还含有染料木苷、槐角双苷、染料木素-7-双葡萄糖苷和染料木素-7,4'-双葡萄糖苷等, 这些糖苷的苷元都是染料木素^[3]。染料木素又称染料木黄酮、染料木因和金雀异黄素等, 属于异黄酮类化合物, 它结构与雌二醇类似, 因此有植物雌激素之称, 具有抗炎、抗生育和预防骨质疏松症等疗效^[4]。近年来不少学者对染料木素的生物活性进行了研究, 发现其还具有抗氧化、降血脂、抗肿瘤和抗辐射等功效^[5-6], 作为

基金项目: 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(2018014)

作者简介: 陈翔, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0580)2031172
Tel: (0571)88871029 E-mail: mrion@zjut.edu.cn

E-mail: cx_1983@163.com *通信作者: 梅建凤, 男, 博士, 副教授

药品或保健品的应用日趋广泛。

目前,染料木素的生产方法是从槐角和大叶千斤拔等植物中提取,其在槐角中的含量仅为 $2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右^[7],致使生产成本较高。槐角中含有多种染料木素的糖苷,且含量较高,特别是槐角苷,这些糖苷可以水解转化为染料木素,已有文献报道采用酸水解^[8-10]、酶转化^[11-13]或微生物转化^[14]槐角或其提取物,染料木素提取率可以显著提高。但是,酸水解专一性差,容易破坏苷元的结构,导致产物收率不高;而利用商品糖苷酶(如淀粉酶、纤维素酶或 β -葡萄糖苷酶等)转化处理槐角,只能转化少数种类的染料木素糖苷,且存在成本高的缺点;微生物转化处理槐角,因菌体产生多种糖苷酶,可以将几种染料木素糖苷都转化为染料木素,而且微生物产生的多糖水解酶对槐角组织结构水解,从而有利于染料木素的释放和溶出。Feng等^[14]利用固定化黑曲霉(*Aspergillus niger*)和酵母细胞转化槐角,槐角中染料木素从 $0.55\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 提高到 $18.95\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,提高了34.45倍。用固定化微生物细胞生物转化槐角,优点是固定化细胞可以重复利用,但细胞的固定化限制了酶的扩散,酶与颗粒性底物不能充分接触而影响转化效率,所以该研究的槐角苷转化率仅有47.04%(槐角中的槐角苷从 $46.94\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 降低至 $22.08\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。本研究用从槐角的微生物富集培养物中分离的米根霉(*Rhizopus oryzae*)LJH3菌株粗酶液生物转化处理槐角,优化了转化工艺条件。经转化的槐角中,染料木素含量显著提高,且转化工艺具有方法简单和产率高的优点,有较好的工业化应用价值。

1 材料与仪器

1.1 仪器

LC-20AD型高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司);LS-B50L型高压蒸汽灭菌锅(上海华线医用核子仪器有限公司);SW-CJ-1B型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);SPX-250B型生化培养箱(上海博迅实业有限公司);ZHWY-2102型恒温振荡培养箱(上海智城分析仪器有限公司);AS3120B型超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 材料

菌种:米根霉(*Rhizopus oryzae*)LJH3,从槐角粉的微生物富集培养物中分离^[15],保藏于广东省

微生物菌种保藏中心,保藏编号:GDMCC No:60145。

中药饮片槐角购自安徽亳州药材市场,产地为河北保定,经舟山市食品药品检验检测研究院郑国平主任中药师鉴定为豆科植物国槐(*Sophora japonica* L.)的干燥成熟果实。槐角苷和染料木素(西安沃森生物科技有限公司,批号:20170708,20170439;纯度均 $\geq 98\%$)。其他试剂均为市售分析纯、色谱纯或生化试剂。

1.3 培养基

平板培养基:马铃薯 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;种子培养基:酵母浸粉 $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,蛋白胨 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,麦芽糖 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 6.0;产酶培养基:酵母浸粉 $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,蛋白胨 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,麦芽糖 $11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH 7.0。

2 方法

2.1 米根霉产酶培养

米根霉LJH3接种于平板培养基,28℃培养48h;挑取菌丝接种50 mL种子培养基,于30℃、200 r·min⁻¹恒温振荡培养24h得种子液;移取5 mL种子液接种至100 mL产酶培养基,于30℃、200 r·min⁻¹恒温振荡条件培养3d。培养液经布氏漏斗过滤除去菌体,澄清的滤液即为粗酶液。

2.2 生物转化方法

取100 mL粗酶液于250 mL三角烧瓶中,加入按实验设计料液比的槐角(粉碎后过80目筛,粒径0.2 mm左右),塑料膜封口,于30℃、200 r·min⁻¹条件下转化一定时间。转化结束后,转化液经布氏漏斗过滤,滤饼85℃烘干,待染料木素含量分析。

2.3 分析方法

染料木素的含量采用HPLC分析,具体操作为:1 g槐角粉于20 mL的甲醇中,于室温,40 kHz,100 W条件下超声提取30 min,过滤得甲醇提取液。依据提取液中染料木素含量的高低,用甲醇作适当倍数稀释,经0.22 μm 微孔滤膜过滤后HPLC分析。HPLC分析条件:色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm),柱温为室温;体积比60:40的甲醇和水等度洗脱,流速0.8 mL·min⁻¹,检测波长260 nm,进样量20 μL 。由相同分析条件下的染料木素浓度—峰面积标准曲线,计算被测槐角中的染料木素的含量。

3 结果与分析

3.1 不同方法处理槐角后染料木素含量比较

5 g 的槐角粉加入到 100 mL 的蒸馏水(阴性对照)、2.5 mol·L⁻¹ 盐酸水溶液或米根霉 LJH3 粗酶液中, 30 °C、200 r·min⁻¹ 条件下转化 24 h 后, HPLC 分析槐角粉中染料木素含量, 结果见图 1。

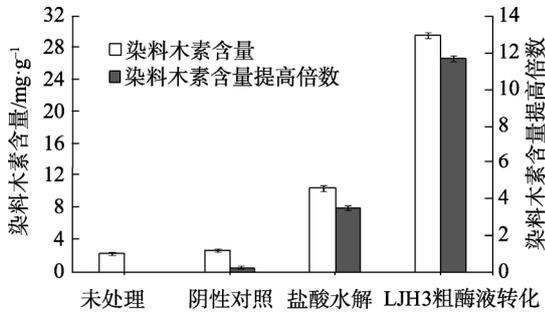


图 1 不同方法水解处理槐角后染料木素含量比较
Fig.1 Comparison of genistein content in Sophorae Fructus hydrolysed by different methods

由图 1 可知, 在蒸馏水环境中, 槐角中染料木素含量没有显著变化; 在 2.5 mol·L⁻¹ 盐酸环境中水解, 染料木素含量显著增加, 由未处理时的 2.34 mg·g⁻¹ 提高到 10.3 mg·g⁻¹, 提高了 3.4 倍; 相比之下, 经米根霉 LJH3 粗酶液转化后的槐角, 染料木素含量则提高到 29.5 mg·g⁻¹, 提高了 11.6 倍。结果表明米根霉 LJH3 发酵制备的粗酶液可以很好地将槐角中的槐角苷转化为染料木素。

3.2 料液比对提高染料木素含量的影响

100 mL 的米根霉 LJH3 粗酶液中加入 1~5 g 的槐角粉, 即料液比(g : mL)分别为 1 : 100, 2 : 100, 3 : 100, 4 : 100 和 5 : 100。30 °C、200 r·min⁻¹ 转化 24 h 后, HPLC 分析槐角粉中染料木素含量, 结果见图 2。

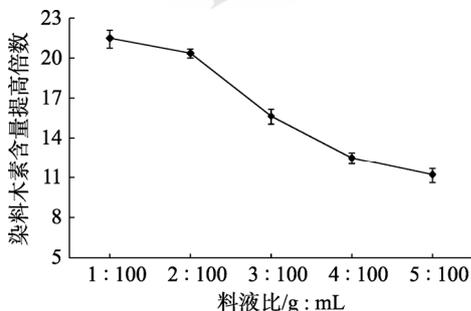


图 2 料液比对提高染料木素含量的影响
Fig.2 Effects of the substrate-enzyme solution ratio on increasing the genistein content

由图 2 可见, 随着料液比的增大, 染料木素含量提高的倍数逐渐降低, 在料液比为 1 : 100 时, 槐角中染料木素的含量可以提高 21.5 倍, 料液比提高到 5 : 100 时, 染料木素的含量可以提高 11.2 倍, 虽然高料液比时转化染料木素的含量提高的幅度偏低, 但是从转化工艺的效率来看, 高料液比的方法具有更高的生产效率, 所以选择 5 : 100 的料液比做进一步工艺优化。

3.3 槐角粒径大小对提高染料木素含量的影响

槐角粉碎成不同粒径大小, 其中 7.0~10.0 mm 的粒径为槐角豆荚从种粒间切断。5 g 不同粒径大小的槐角加入 100 mL 的米根霉 LJH3 粗酶液中, 30 °C、200 r·min⁻¹ 转化 24 h 后, HPLC 分析槐角粉中染料木素含量, 结果见图 3。

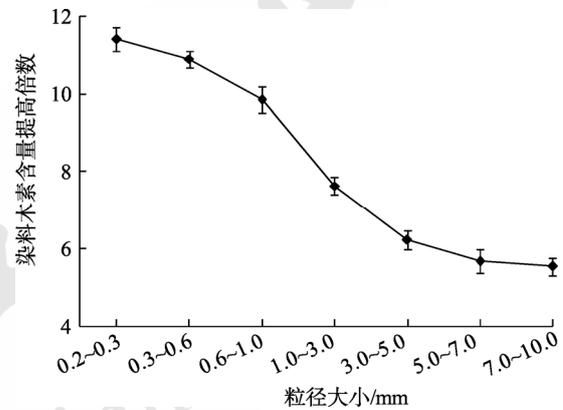


图 3 槐角粒径大小对提高染料木素含量的影响
Fig.3 Effects of the Sophorae Fructus sizes on increasing the genistein content

随着槐角粒径的增加, 染料木素含量提高的倍数逐渐降低, 槐角的粒径越小, 有利于底物与酶的接触, 所以转化率越高。所以选择 0.2 mm 槐角粒径做进一步工艺优化。从槐角种粒间切断(即粒径为 7.0~10.0 mm)后直接进行原位生物转化, 经过 24 h 后, 虽然染料木素含量只提高了 5.54 倍, 但可以基本保持槐角的外形, 如作为中药饮片使用将更加方便。

3.4 体系 pH 对提高染料木素含量的影响

米根霉 LJH3 发酵制备的粗酶液 pH 在 6.0 左右, 不一定是适合槐角原位生物转化的适宜 pH。用 pH 缓冲剂调节米根霉 LJH3 粗酶液的 pH 至 4.0~7.0, 5 g 槐角粉加入 100 mL 不同 pH 的粗酶液中, 30 °C、200 r·min⁻¹ 转化 24 h 后, HPLC 分析槐角粉中染料木素含量, 结果见图 4。

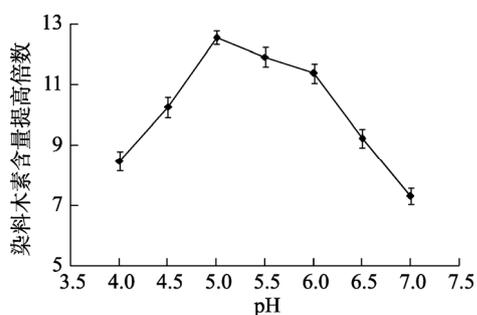


图4 转化体系 pH 对提高染料木素含量的影响
Fig. 4 Effects of conversion system pH on increasing the genistein content

由图4可见,转化体系 pH 为 5.0 时,槐角中染料木素含量提高的倍数最高,过高或过低的 pH 均不利于转化。

3.5 转化时间对提高染料木素含量的影响

提高料液比后,延长转化时间能提高产物的得率。在转化体系料液比 5 : 100,槐角粒径 0.2 mm, pH 5.0, 30 °C 条件下,米根霉 LJH3 的粗酶液转化处理槐角,染料木素含量提高倍数的时间曲线见图 5。

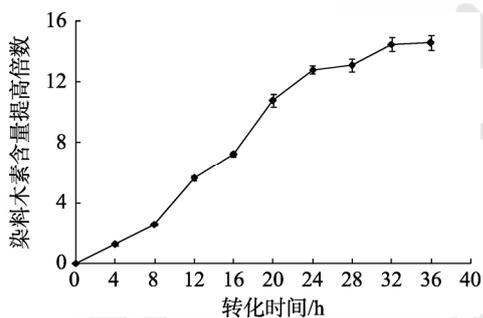


图5 转化时间对提高染料木素含量的影响
Fig.5 Effects of conversion time on increasing the genistein content

由图5可见,在料液比为 5 : 100,转化 32 h 时,染料木素含量达到最高值,达到了 $36.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,较未转化时的 $2.34 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高了 14.5 倍。

染料木素对照品、未经生物转化和经生物转化(料液比 5 : 100)槐角粉的 HPLC 分析图谱见图 6。可以看出,未经转化的槐角粉中,染料木素的含量较低,经转化后,染料木素的含量大幅度提高,而它的糖苷含量已经降至较低。HPLC 分析表明未经转化的槐角中槐角苷的含量为 $64.7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,经转化后的槐角中的染料木素含量为 $36.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,由此计算得槐角苷的摩尔转化率达到 89.9%。

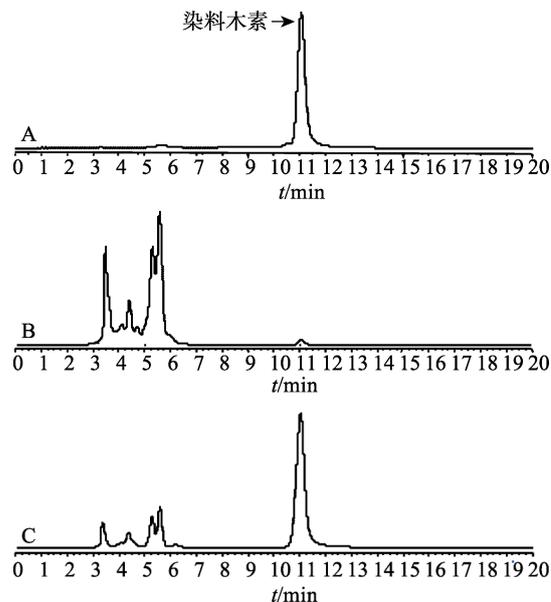


图6 染料木素对照品(A)、未经生物转化(B)和经生物转化(C)的槐角 HPLC 图
Fig.6 HPLC chromatograms of standard genistein(A), Sophorae Fructus without(B) and with biotransformation(C)

4 结论

染料木素在医疗和保健领域的开发价值潜力巨大,经济有效的生产方法是满足市场需求的前提,现有从槐角等植物中直接提取法,收率低,原料不能充分利用。本研究采用原位生物转化法处理槐角,槐角经过粉碎,或者简单的切断基本保持外形,用米根霉 LJH3 发酵的粗酶液处理,其中的槐角苷等染料木素糖苷转化为染料木素,含量可以从原料的 $2.34 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 提高到 $36.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,提高了 14.5 倍,槐角苷的摩尔转化率达到 89.9%。经过转化处理的槐角,如作为中药饮片使用,基于染料木素的疗效将更显著;如作为染料木素提取生产的原料,产率将大幅提高,从而降低生产成本。

REFERENCES

- [1] 钱梦焯,潘五九,王伟明.槐角新药的研究进展[J].黑龙江中医药,2017,46(3):44-46.
- [2] 中国药典.一部[S].2015:355.
- [3] 张玉千.微生物转化槐角和虎杖中生物活性物质的研究[D].南京:南京师范大学,2012.
- [4] SINGH A F R. The chemistry and pharmacology of genistein [J]. Nat Prod J, 2016, 6(1): 3-12.
- [5] CAI B, YE S, WANG Y, et al. Protective effects of genistein on $A\beta_{(25-35)}$ -induced PC12 cell injury via regulating CaM-CaMKIV signaling pathway [J]. China J Chine Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(3): 571-576.

- [6] YU L H, LIU K, LIU B L. Studies on pharmacological effect of genistein [J]. *Pharm Clin Res(药学与临床研究)*, 2010, 18(3): 299-302.
- [7] CHEN X, ZHENG G P, YU Z G. Simultaneous assay of isoflavones in Fructus Sophorae by QAMS [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2013, 33(11): 1904-1909.
- [8] 周丽. 葛根异黄酮的提取、纯化及水解工艺的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [9] GAO X Y, LI B, YIN H L, et al. Extraction conditions of genistein from Fructus Sophorae [J]. *Anhui Med Pharm J(安徽医药)*, 2013, 17(2): 193-195.
- [10] UTKINA E A, ANTOSHINA S V, SELISHCHEVA A A, et al. Isoflavones daidzein and genistein: Preparation by acid hydrolysis of their glycosides and the effect on phospholipid peroxidation [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2004, 30(4): 385-390.
- [11] ZHANG Y Z, LI M Z, SUN Y M, et al. Study on hydrolysis of soybean isoflavones by β -glycosidas "Amano" [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2008, 29(5): 254-258.
- [12] YU H D, ZHANF Z H, JIA X B, et al. Preparation of genistein from genistin-HP- β -CD by enzymatic hydrolysis method [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2013, 48(3): 208-212.
- [13] 刘东锋, 张翼, 杨成东. 一种从槐角中制备染料木素的方法: 中国, 01760488A [P]. 2010-06-30.
- [14] FENG C, JIN S, XIA X X, et al. Effective bioconversion of sophoricoside to genistein from Fructus Sophorae using immobilized *Aspergillus niger* and yeast [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2015, 31(1): 187-197.
- [15] 刘姜华. 微生物转化槐角苷制备染料木素的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.

收稿日期: 2019-08-21

(本文责编: 曹粤锋)

中国现代应用药学
http://www.chinjmap.com