

杨文婷,江明,朱文婷,等. 酶法提取 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ的工艺优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):303-306.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.087

酶法提取 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ的工艺优化

杨文婷,江明,朱文婷,韦琴

(武汉工商学院环境与生物工程学院,湖北武汉 430000)

摘要:采用纤维素酶法提取曼地亚红豆杉中的 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ(10-DAB),并对酶处理的条件进行优化。以 10-DAB 提取率为指标,考察酶用量、酶处理时间、酶处理温度及 pH 值等因素对提取率的影响,通过单因素试验及响应面试验得出纤维素酶法提取 10-DAB 的最佳条件,并结合实际进行优化。结果得到酶处理最佳条件为:纤维素酶用量 2%、酶处理时间 3 h、酶处理温度 42 ℃、pH 值 5.0,此时 10-DAB 提取率为 0.5297% ± 0.001 067%,与模型预测值 0.533 6% 接近,说明工艺条件稳定,模型可靠。

关键词:曼地亚红豆杉;10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ;纤维素酶;响应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0303-04

10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ(10-deacetylbaicatin Ⅲ,简称 10-DAB)是合成抗癌药物紫杉醇和多西紫杉醇的重要原料^[1-3]。紫杉醇为治疗多种晚期癌症的药物之一,因受到原材料来源的限制,其原料药市场总体呈现供不应求的趋势^[4],其制备方法有多种,而以 10-DAB 作为原料半合成是最具实用价值的方法之一,目前已占紫杉醇原料药总产量的 2/3 以上^[5-6],对于缓解红豆杉资源的短缺具有非常重要的现实意义。10-DAB 主要从红豆杉植株的枝叶中提取,但提取率通常比较低^[7-10],本研究利用纤维素酶对植物细胞壁进行水解,以促进 10-DAB 的溶出^[11-12],并通过响应面试验设计优化酶处理条件,从而确定酶法预处理的最佳条件^[13-15]。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

曼地亚红豆杉(产地江苏);石油醚(30~60 ℃),95%乙醇,二氯甲烷,甲醇,柠檬酸,柠檬酸钠,以上化学试剂均为分析纯;400~800 U/g 纤维素酶(Sanland Chemical Co. LTD),400~800 U/g 果胶酶(Biosharp)。

752 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),KQ-50E 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公

司),YXQ-LS-50S11 酸度计(上海精密科学仪器有限公司) 1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制作 精确称取 10-DAB 标准品 5 mg,定容至 50 mL 容量瓶中,得到 0.1 mg/mL 10-DAB 母液;再分别精确量取该母液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,稀释至 5 mL,于 227 nm 处测定吸光度。

1.2.2 原材料的预处理 将曼地亚红豆杉植株洗净风干,40 ℃ 干燥 72 h,粉碎过 30 目筛,再以 1:5 的比例用石油醚浸渍 6 h,以初步脱脂及色素,阴凉处密封保存备用。

1.2.3 单因素试验 准确称取曼地亚红豆杉粉末 1 g,加入 1% 果胶酶及一定比例纤维素酶,再加入一定 pH 值的缓冲溶液至 20 mL,振荡混匀之后分别于一定温度水浴一定时间,所得样品 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清;以料液比 1 g:30 mL 加入无水乙醇超声处理 30 min,取无水乙醇层去除溶剂,残留物加 15 mL 蒸馏水混悬后用石油醚萃取至醚层接近无色,分液弃醚层,用 10 mL 二氯甲烷萃取,分离二氯甲烷层,通风橱中自然挥干除去溶剂,得干燥提取物^[12];精确量取 10 mL 甲醇溶解,并适当稀释,于 227 nm 处测吸光度。

初步拟定酶处理条件为:纤维素酶用量 2%、提取温度为 40 ℃、pH 值 5.0、酶处理时间 2 h,其他条件不变,改变其中 1 个条件进行单因素试验,酶处理温度分别为 20、30、40、50、60 ℃,酶处理时间分别为 1、2、3、4、5 h,纤维素酶用量分别为 1%、2%、3%、4%、5%、缓冲液 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0。不同 pH 值溶液用不同比例的 0.1 mol/L 柠檬酸溶液和 0.1 mol/L 柠檬酸钠溶液配制,并用酸度计将 pH 值调至所需范围。

1.2.4 响应面试验 根据中心组合设计原理^[13-14],由单因素试验考察的结果选取酶预处理温度(x_1)、酶处理时间

(2);105-108.

收稿日期:2015-07-05

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究项目(编号:B2016337);武汉工商学院校级学术团队基金(编号:XSTD2015003)。

作者简介:杨文婷(1983—),女,湖北仙桃人,硕士研究生,讲师,主要从事天然产物提取及活性研究。Tel:(027)88147093;E-mail:47389578@qq.com。

通信作者:朱文婷,硕士研究生,讲师,主要从事天然产物提取及活性研究。Tel:(027)88147093;E-mail:251558801@qq.com。

2007,35(10):81-86.

[7]杨忆,武海燕,李朋华. 新郑灰枣枣果内生真菌的分离和鉴定[J]. 菌物学报,2015,34(1):164-168.

[8]张晓利,吕雪莲,沈永年,等. PCR-RFLP 和多重 PCR 技术检测常见病原性丝状真菌的实验研究[J]. 中国真菌学杂志,2010,5

[9]秦文彦,程洁,应盛华,等. 可污染食品及饲料的产黄曲霉毒素真菌的多重 PCR 检测[J]. 菌物学报,2007,26(3):448-454.

[10]张平平,王浩然,郭兆彪,等. 多重生物检测技术研究进展[J]. 军事医学,2012,36(9):713-716.

(x_2)、pH 值(x_3)为自变量,利用 Design - Expert 8.0.5 软件,根据 Box - Behnken 模型,以 10 - DAB 提取率为响应值,设计 3 因素 3 水平共 17 组试验,响应面设计的因素与水平见表 1。

表 1 酶法提取 10 - 脱乙酰基巴卡丁Ⅲ的工艺优化因素与水平

水平	x_1 :酶预处理 温度(℃)	x_2 :酶处理时间 (h)	x_3 :pH 值
-1	35	2.5	4.5
0	40	3.0	5.0
1	45	3.5	5.5

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作

以 10 - DAB 浓度为横坐标、吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的方程为 $D = 32.243C - 0.0151$, $r^2 = 0.998$ 。由图 1 可知,10 - DAB 的浓度在 0 ~ 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,线性关系良好。

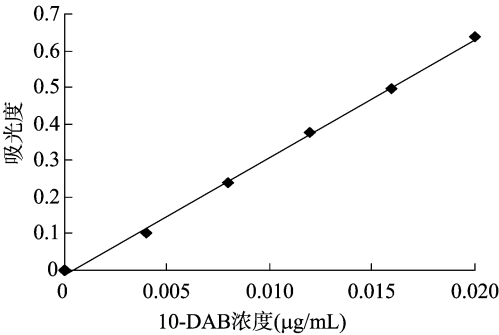


图1 10-DAB的标准曲线

2.2 单因素试验

2.2.1 酶处理温度 由图 2 可知,在 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内,随着温度的升高,10 - DAB 的提取率提高;超过 40 $^{\circ}\text{C}$ 后,10 - DAB 的提取率呈下降趋势。说明纤维素酶的活力在 40 $^{\circ}\text{C}$ 左右较高,10 - DAB 的溶出率较高。温度较高时,10 - DAB 的提取率降低可能是由于 10 - DAB 的热不稳定性,在温度较高的条件下易降解或发生异构化。

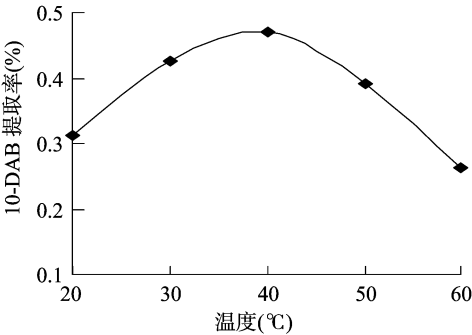


图2 酶处理温度对 10-DAB 提取率的影响

2.2.2 酶处理时间 由图 3 可知,10 - DAB 的提取率随酶预处理时间的延长而升高。酶预处理 3 h 之后,10 - DAB 的提取率增幅变小,酶预处理 5 h 时甚至降低了。表明酶预处理 3 h 时几乎能将 10 - DAB 最大化提取,时间太长反而对提取不利,所以将酶预处理时间控制在 3 h 之内。

2.2.3 纤维素酶用量 由图 4 可知,10 - DAB 的提取率随

纤维素酶用量的增加而升高。在纤维素酶用量达到 2% 之后,10 - DAB 的提取率趋近平缓,说明纤维素酶用量达到 2% 以后,提取率变化不明显。从节约资源的角度考虑,将纤维素酶用量确定为 2%。

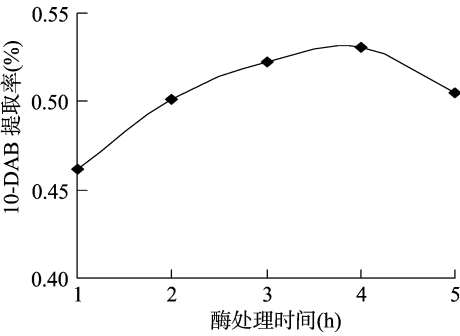


图3 酶处理时间对 10-DAB 提取率的影响

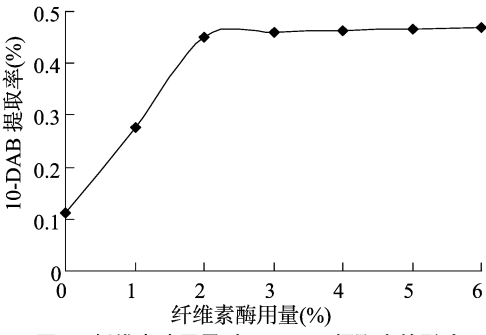


图4 纤维素酶用量对 10-DAB 提取率的影响

2.2.4 pH 值 由图 5 可见,在 pH 值为 4.0 ~ 5.0 范围内,10 - DAB 的提取率随 pH 值的升高而增大;当 pH 值超过 5.0 时,提取率逐渐下降。表明所用酶的最适 pH 值在 5.0 左右。

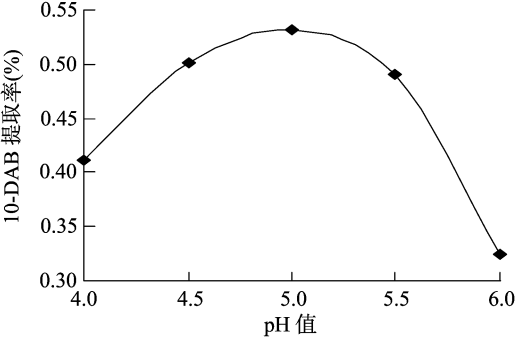


图5 pH 值对 10-DAB 提取率的影响

2.3 响应面试验

根据单因素试验结果,选取酶预处理温度(x_1)、酶处理时间(x_2)、pH 值(x_3)为 3 个因素进行响应面试验设计,因素和水平选取情况见表 1。以 10 - DAB 提取率为响应值,设计响应面试验,结果见表 2。利用 Design Expert 软件,得到 10 - DAB 提取率与 3 个因素关系的回归方程:10 - DAB 提取率 $y = 0.52 + 0.035x_1 - 0.016x_2 + 0.017x_3 + 0.0085x_1x_2 - 0.017x_1x_3 + 0.006x_2x_3 - 0.036x_1^2 - 0.06x_2^2 - 0.088x_3^2$ 。分析结果(表 3)显示,回归模型的 R^2 为 0.982 8,说明此模型能解释 98% 的响应值变化,模型拟合程度良好。由回归模型方差分析结果可知,方程的一次项 x_1 、 x_3 ,二次项 x_1^2 、 x_2^2 、 x_3^2

表 2 酶法提取 10-脱乙酰基巴卡丁Ⅲ的工艺优化
响应面设计方案与结果

试验号	x_1	x_2	x_3	10-DAB 提取率 (%)
1	0	0	0	0.541
2	0	-1	1	0.411
3	0	-1	-1	0.381
4	0	0	0	0.531
5	-1	-1	0	0.421
6	0	0	0	0.509
7	-1	0	-1	0.329
8	-1	1	0	0.381
9	1	-1	0	0.459
10	1	0	1	0.439
11	-1	0	1	0.389
12	0	1	-1	0.329
13	0	0	0	0.516
14	1	0	-1	0.446
15	0	0	0	0.525
16	0	1	1	0.383
17	1	1	0	0.453

对 10-DAB 提取率的影响达极显著水平,一次项 x_2 、交互项 x_1x_3 对 10-DAB 提取率的影响达显著水平。此外还可得出各因素对 10-DAB 提取率影响从大到小依次为酶预处理温度(x_1)>pH 值(x_2)>酶处理时间(x_3)。等高线的形状反映交互因素对提取率的影响是否显著,圆形表明因素交互作用不显著,马鞍形和椭圆形则表示因素交互作用显著。图 6、图 7、图 8 直观地呈现了各因素相互作用的响应面的等高线图和 3D 分析图。从响应面模型的等值线和最高点可以得到,在所选择的范围内存在极值,既是响应面模型的最高点,同样也是等值线最小椭圆的中心点。由此可见,温度、pH 值的交互作用对 10-DAB 提取率的影响最为显著,其显著关系可通过等高线的形状判断,椭圆长轴和短轴长度相差越大,影响越显著;接近圆形,影响不显著。

2.4 验证试验

回归模型拟合出最佳条件为:温度 42.32 ℃、酶处理时间 2.95 h、pH 值 5.03,根据实际情况适当调整为:温度 42 ℃、酶处理时间 3 h、pH 值 5.0,在此条件下,平行试验 3 次,所得 10-DAB 提取率为 0.529 7%±0.001 067%, $RSD=1.51\%$,重复性较好,条件稳定。而理论预测值为 0.533 6%,与实际提取率接近,进一步说明模型可靠、有效。

表 3 回归模型方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.074 000	9	0.008 230 0	44.40	<0.000 1	显著
x_1	0.009 590	1	0.009 590 0	51.73	0.000 2	
x_2	0.001 990	1	0.001 990 0	10.70	0.013 6	
x_3	0.002 350	1	0.002 350 0	12.65	0.009 3	
x_1x_2	0.000 289	1	0.000 289 0	1.56	0.252 0	
x_1x_3	0.001 120	1	0.001 120 0	6.05	0.043 5	
x_2x_3	0.000 144	1	0.000 144 0	0.78	0.407 4	
x_1^2	0.005 330	1	0.005 330 0	28.74	0.001 1	
x_2^2	0.015 000	1	0.015 000 0	82.64	<0.000 1	
x_3^2	0.033 000	1	0.033 000 0	176.15	<0.000 1	
残差	0.001 300	7	0.000 185 0			
失拟误差	0.000 671	3	0.000 224 0	1.43	0.359 2	不显著
纯误差	0.000 627	4	0.000 015 7			
总和	0.075 000	16				

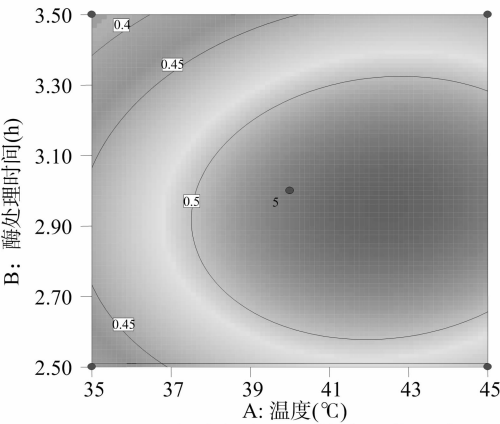
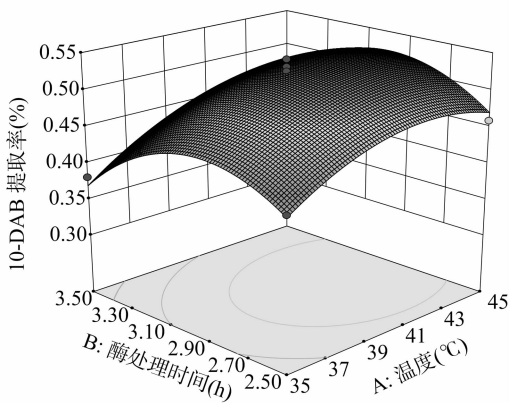


图 6 温度与酶处理时间相互作用对 10-DAB 提取率影响的等高线和响应曲面



3 结论

10-DAB 为合成抗癌药物紫杉醇的重要中间体,主要从

红豆杉枝叶中提取,一般采用有机溶剂提取法、加热回流提取法、超声波法等方法提取,但提取率较低^[8-10,16],而酶法提取具有条件温和、提取率较高等优点,有利于红豆杉资源的充分

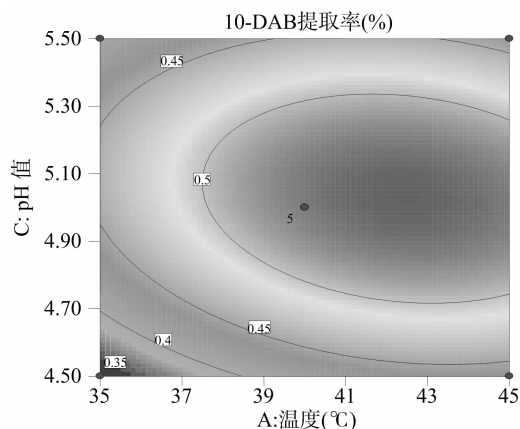


图7 温度与 pH 值相互作用对 10-DAB 提取率影响的等高线和响应曲面

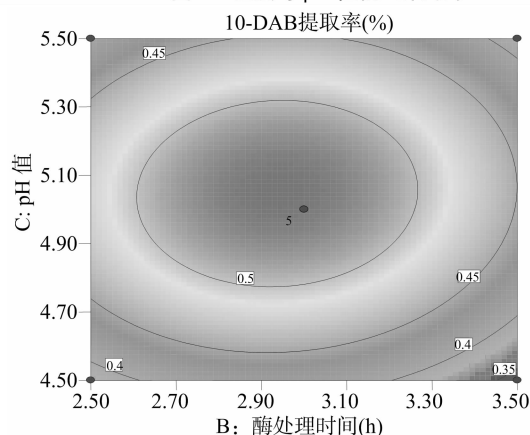
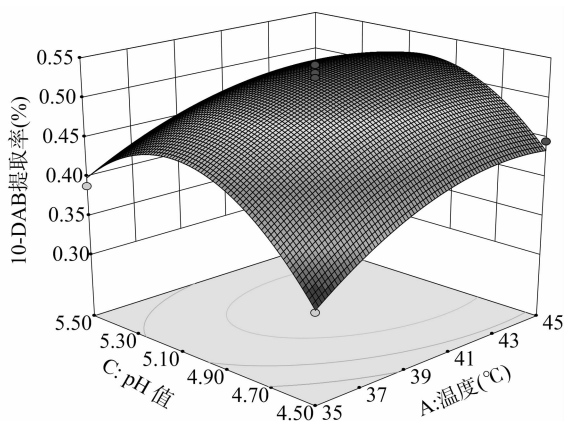
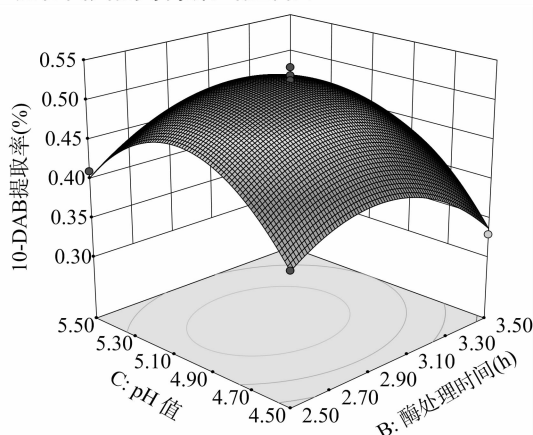


图8 酶处理时间、pH 相互作用对 10-DAB 提取率影响的等高线和响应曲面



利用^[11-12];并利用响应面中的 Box - Behnken 模型优化提取工艺,克服传统的正交设计或均匀设计无法在连续水平上优化工艺参数的缺点^[13-15]。所得最佳工艺条件为:酶处理时间 2.95 h、酶处理温度 42.32 °C、pH 值 5.03、酶用量 2%,在此条件下 10-DAB 的提取率为 0.529 7% ± 0.001 067%,与预测值 0.533 6% 接近。在后续研究中,还可以结合酶的固定化技术,以实现酶的重复利用,以进一步提高该方法在工业上广泛应用的可行性。

参考文献:

- [1] 李双明. 东北红豆杉中 10-DAB Ⅲ 的提取纯化及多西紫杉醇的半合成[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2007.
- [2] 李 鹏,李春香,李 想. 多烯紫杉醇的合成工艺研究[J]. 中国药物化学杂志,2009,19(5):356-360.
- [3] 孙浩岩,黄兴富,唐艳梅,等. 具有实用价值紫杉醇半合成路线概述[J]. 中国民族民间医药,2010,19(13):26-27.
- [4] 张 静. 植物红豆杉的抗癌药用价值研究[J]. 中国药业,2014,23(1):1-3.
- [5] Arnone A, Bava A, Alemani S, et al. Microbial transformation of 10-deacetylbaicatin Ⅲ (10-DAB) by *Curvularia lunata* and *Trametes hirsuta* [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 42(3):95-98.
- [6] 杨 陶,李 明,陈建民. 红豆杉中紫杉烷类化合物制备 10-去乙酰基巴卡亭 Ⅲ [J]. 复旦学报:自然科学版,2004,43(6):1088-1092,1097.
- [7] 洪东风,周文明,李玲玲,等. 多西紫杉醇合成原料 10-脱乙酰基巴卡亭提取工艺研究[J]. 西北农业学报,2007,16(5):227-230.
- [8] 段冬丽. 曼地亚红豆杉中紫杉醇的提取分离工艺及测定研究[D]. 雅安:四川农业大学,2013.
- [9] 吴绵斌,马淑彬. 美丽红豆杉枝叶中抗肿瘤活性成分的提取与分离[J]. 中药材,2006,29(4):329-331.
- [10] 马淑彬,吴绵斌. 南方红豆杉枝叶中 10-脱乙酰基巴卡亭 Ⅲ 的分离与纯化[J]. 中国新药杂志,2006,15(13):1084-1086.
- [11] 王 晓,李林波,马小米,等. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. 食品工业科技,2002,23(3):37-39.
- [12] 王 敏,陆兆新,吕凤霞,等. 响应曲面法优化酶法提取银杏叶总黄酮[J]. 食品科学,2007,28(3):117-121.
- [13] Liyana-Pathirana C, Shahidi F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2005, 93(1):47-56.
- [14] Zhang Z F, Lv G Y, Pan H J, et al. Optimisation of the microwave-assisted extraction process for six phenolic compounds in *Agaricus blazei* Murrill [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(1):24-31.
- [15] Sun Y X, Liu J C, Kennedy J F. Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Codonopsis pilosula* by a central composite design [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3):949-953.
- [16] 张 静. 曼地亚红豆杉枝叶中活性成分的含量测定研究[D]. 郑州:河南中医学院,2011.