

纤维素酶 Umcel9y-1 在银杏叶总黄酮提取中的增效作用

王旭, 王志, 蔡梦宇, 邬艳博, 周育*

(安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 选取银杏叶片为试验材料, 研究纤维素酶 Umcel9y-1 在银杏叶片总黄酮提取中的应用价值。试验结果表明, 0.08 mg·mL⁻¹ 纤维素酶 Umcel9y-1, 在其最适反应条件下 (pH 7.0, 37°C), 处理银杏叶片 1 h、2 h、4 h 和过夜 (12 h), 总黄酮的提取量较对照组分别提高了 20.3%、20.7%、16.8% 和 15.0%。纤维素酶试验组处理 2 h, 总黄酮的提取量可以达到对照组 12 h 提取所得总黄酮量的 97.0%, 纤维素酶 Umcel9y-1 显著缩短了银杏叶总黄酮提取时间。采用超高效液相色谱对 2 种提取方法获得的提取液进行药用成分检测, 发现添加纤维素酶 Umcel9y-1 对中药提取液活性成分没有显著的影响。

关键词: 纤维素酶; 银杏叶; 总黄酮; 提取

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)01-0022-05

Synergized action of cellulase Umcel9y-1 on the extract efficiency of total flavonoid from *Ginkgo biloba* L. leaves

WANG Xu, WANG Zhi, CAI Mengyu, WU Yanbo, ZHOU Yu

(State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Ginkgo leaves were selected as experimental materials to investigate the cellulase Umcel9y-1 synergized action on total flavonoids extraction. Under the optimum reaction conditions (pH 7.0, 37 °C), the extraction yields of total flavonoids increased by 20.3%, 20.7 %, 16.8% and 15% of the corresponding control after the leaves were treated with 0.08 mg·mL⁻¹ Umcel9y-1 for 1 h, 2 h, 4 h and overnight (12 h). The extraction yield of total flavonoids in the 2-hour treatment group reached 97.01% of the overnight-treatment of the control. The results showed the extract efficiency was greatly improved by the addition of cellulase Umcel9y-1. Moreover, the medical ingredients of the extracts were evaluated by Ultra performance liquid chromatography (UPLC), indicating that Umcel9y-1 had no obvious influence on the medical ingredients of the extract compared to the corresponding control.

Key words: cellulase; *Ginkgo* leaf; total flavonoid; extraction

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 为我国特有珍稀植物, 银杏叶制剂是治疗心血管疾病重要的植物性中药。银杏叶主要药用成分是黄酮类和银杏内酯类化合物, 其中总黄酮含量是银杏叶提取物药用有效成分重要指标之一^[1]。黄酮类物质根据其母核化学结构可分为三大类, 即单黄酮类、双黄酮类和儿茶素类^[1-2]。研究发现, 黄酮类化合物能够: (1) 消除自由基, 防止过氧化酯和活性氧造成的动脉硬化; (2) 扩张血管, 增大末梢血流量, 对老年痴呆、高血压、冠心病等疾病有防治作用; (3) 抑制肿瘤细胞生长; (4)

抗菌、抗环腺苷酸乙酯酶活性、抗组胺释放, 具有免疫调节功能等^[3-5]。

传统的银杏叶总黄酮提取工艺包括: 高温浸提、超声破碎和有机溶剂浸提等^[6]。在传统提取工艺基础上添加纤维素酶, 可以有效水解植物细胞壁的纤维组织, 破坏细胞壁完整性, 从而促进植物细胞内有效成分的释放与提取。与传统提取方法相比, 添加纤维素酶可以在相对温和条件下完成有效药用成分快速提取, 减少药用成分损失, 显著缩短提取时间, 提高生产效率^[7-9]。目前, 纤维素酶在中药有效

收稿日期: 2016-07-05

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1608085QC57) 和安徽省杰出青年基金 (1608085J08) 共同资助。

作者简介: 王旭, 实验员。E-mail: wangxu@ahau.edu.cn

* 通信作者: 周育, 教授。E-mail: microbes@ahau.edu.cn

成分提取方面的研究已经比较广泛。例如, 纤维素酶添加在山楂、银杏、竹叶和葛根提取剂中, 可增加总黄酮提取量、提高香菇蛋白提取效率, 以及提高黄柏中小檗碱提取率等^[7-11]。

纤维素酶 Umcel9y-1 为安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室前期从土壤宏基因组中克隆获得的多功能生物酶。生物学活性研究显示, Umcel9y-1 具有高效的葡聚糖内切、外切和糖基转移酶活性, 其高效的葡聚糖内切酶活性和盐离子耐受性显示该酶具有较好的应用前景^[12]。本研究选取银杏叶为试验材料, 研究纤维素酶 Umcel9y-1 对银杏叶总黄酮提取的增效作用, 初步评估该酶在银杏叶总黄酮提取中的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

纤维素酶 Umcel9y-1 (GenBank 号: KR780677/ALA62876) 根据作者所在实验室前期文献中的方法进行超量表达和纯化, 制备得到^[12]。银杏叶片购自杭州同仁堂大药房, 高温烘干备用。芦丁标准品 (UV 含量测定)、槲皮素 (HPLC>98%)、山柰酚 (HPLC>98%) 购自南京替斯艾么中药技术研究所, 异鼠李素 (HPLC>98%) 购自中国药品生物制品检定所 (杭州)。羧甲基纤维素、3, 5-二硝基水杨酸、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇和磷酸盐等试剂均为国药集团化学试剂有限公司分析纯产品。色谱纯甲醇和甲酸购自天津赛孚化学试剂公司。

试验仪器包括: UPLC 色谱仪 (岛津, LC-30A), PCR 扩增仪 (Bio-Rad), 电泳仪 (北京六一), 高速冷冻离心机 (Eppendorf), 超声波细胞破碎仪 (Biosafe), 恒温培养箱 (凯航)。分光光度计 (岛津), 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海博讯), 分析天平 (北京赛多利斯), 数显鼓风干燥箱 (上海博讯), 电热恒温水槽 (上海精宏), 层析缸等。

1.2 研究方法

1.2.1 最适酶促反应条件的摸索 以羧甲基纤维素 (CMC) 为底物, 运用 3, 5-二硝基水杨酸法 (DNS 法) 测定还原型寡糖的生成量^[13], 来研究重组纤维素酶 Umcel9y-1 的最适酶活条件, 空白对照组加入等量缓冲液, 每组 3 个平行试验。具体检测方法为: 在 1.2 mL 1.0% 的 CMC 水溶液中添加 0.8 mL 纤维素酶溶液 ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在设定的反应温度下完成反应。再加入 2.0 mL DNS 试剂, 混匀后沸水中煮 5 min, 加 10 mL 预冷的去离子水作适当稀释,

在 540 nm 波长处检测水解生成的还原糖的浓度。

不同的 pH 值体系: 调整柠檬酸缓冲体系 pH 值为 3.0、4.0 和 5.0; 调整磷酸盐缓冲体系 pH 值为 6.0、7.0 和 8.0; 调整碳酸盐缓冲体系 pH 值为 9.0; 酶促反应温度为 37 °C, 反应时间为 2 h。

不同的酶促反应温度: 分别设置酶促反应温度为 15、25、37、50 和 70 °C, 酶促反应体系的 pH 值为 7.0, 反应时间为 2 h。

1.2.2 芦丁标准曲线的制备 选用芦丁作为总黄酮对照品制定标准曲线^[14]。准确称取芦丁对照品 10 mg, 置于 50 mL 容量瓶内, 加 30% (V/V) 乙醇, 超声使其溶解, 冷却至室温, 定容, 为标准对照液。分别量取芦丁标准对照液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 至 25 mL 容量瓶中, 加入 5% (W/V) 亚硝酸钠溶液 0.3 mL 摇匀, 放置 6 min, 加入 10% (W/V) 硝酸铝溶液 0.3 mL, 放置 6 min, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 4 mL, 用 30% (V/V) 乙醇定容 25 mL, 放置 15 min。取适量反应液置于比色皿, 在 515 nm 波长条件下测定吸光度, 以吸光度 A 为纵坐标, 标准对照品浓度 C 为横坐标, 绘制标准曲线。

1.2.3 银杏叶总黄酮提取率与提取时间分析 向 10 mL 含有 0.8 mg 纤维素酶的 PBS 冲液 (pH 7.0) 中添加 2.0 g 银杏叶片粉末, 在 37 °C 水浴条件下, 分别酶解 1、2、4 和 12 h。分别加入 95% (V/V) 乙醇 20 mL 在 70 °C 下浸提 1 h 后过滤, 收集滤液。用 85% 的乙醇 (V/V) 20 mL 洗涤残渣过滤, 蒸馏乙醇, 残余液用 85% 的乙醇定容至 25 mL。精密吸取 1 mL 用 30% 的乙醇定容于 25 mL, 得供试样品。以下操作步骤与标准曲线制定步骤相同, 以不含纤维素酶的 PBS 缓冲液作为空白组, 每组 3 个平行试验。

1.2.4 银杏叶提取液药用成分分析 参照高媛媛等试验方法作适当修改, 进行银杏叶提取物药用成分分析^[15]。准确称取槲皮素、山柰酚和异鼠李素标准品适量, 分别溶解于 1.0 mL 甲醇, 在 70 °C 条件下水浴 30 min 摇匀, 制得含槲皮素 ($750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 山柰酚 ($750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 异鼠李素 ($375 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的标准品贮备液备用。取槲皮素、山柰酚和异鼠李素标准品贮备液适量, 制得混合标准液, 以甲醇-0.1% 甲酸溶液 (30:70) 适当稀释, 用岛津 UVmini-1240 分光光度计于 200~400 nm 范围内进行扫描, 根据所得的紫外吸收光谱, 确定最佳检测波长为 360 nm。UPLC 色谱检测条件为: 色谱柱 Shim-pack XR-ODS II (3.0 mm×75 mm, 2.2 μm),

柱温 40 °C, 检测波长 360 nm, 进样量 15 μL , 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% 甲酸水溶液。线性梯度洗脱, 洗脱程序: 0~20 min, 70%~65% B; 20~35 min, 65%~60% B; 35~50 min, 60%~50% B; 50~65 min, 50%~45% B; 65~70 min, 45% B。

将添加纤维素酶 Umcel9y-1 的银杏叶提取液和未添加纤维素酶的 PBS 提取液, 按照以上方法进行药用活性成分指纹图谱检测, 分析添加纤维素酶对药用活性成分的影响。

2 结果与分析

2.1 最适酶促反应条件

在最适 pH 值试验中, 发现纤维素酶 Umcel9y-1 的最大酶活力出现在中性的磷酸盐缓冲液试验组中, 确定纤维素酶 Umcel9y-1 的最适 pH 范围在 6.0~7.0 之间, 纤维素酶 Umcel9y-1 在偏酸或偏碱的缓冲液体系中的酶活力, 明显低于其在中性缓冲液体系中的酶活力 (图 1)。

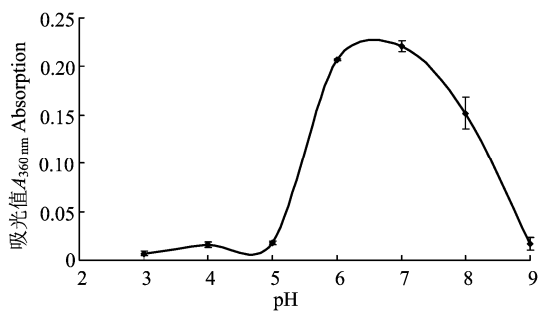


图 1 酶促反应的最适 pH 值

Figure 1 The optimum pH for enzymatic activity

在最适酶促反应温度试验中, 发现纤维素酶

Umcel9y-1 的最适酶促反应温度在 37 °C。如图 2 结果所示, 在酶促反应温度低于 37 °C 条件下, 酶活力随着温度的升高而升高, 在反应温度高 37 °C 条件下, 纤维素酶活力随着温度的升高而逐渐降低, 温度超过 70 °C 时, Umcel9y-1 酶活力基本丧失。因此, 最适反应条件显示, 最佳反应条件为温和的中性体系和室温, 属于温和性纤维素酶。

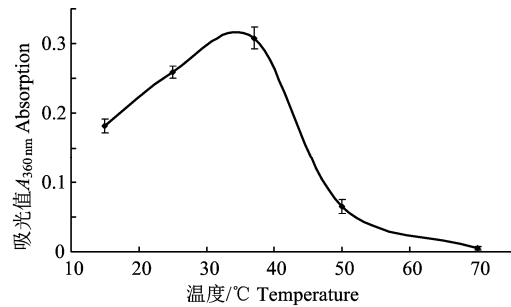


图 2 酶促反应的最适反应温度 / °C

Figure 2 The optimum temperature for enzymatic activity

2.2 不同条件下银杏叶总黄酮提取结果

以芦丁含量为横坐标, 以 515 nm 条件下吸收值为纵坐标, 绘制芦丁标准曲线。按照标准曲线的回归方程计算结果, 待测样品中总黄酮浓度在 0~1.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内, 即符合回归方程式为 $A=0.5436C+0.00725$ ($R=0.999$), 计算待测样品总黄酮含量。在纤维素酶 Umcel9y-1 最适酶促反应条件下, 测定其促进银杏叶总黄酮提取的最佳酶促反应时间。将测定的吸光值带入该回归方程, 计算得出相应的样品总黄酮含量。纤维素酶对银杏叶片总黄酮提取量的提高率按照如下方法计算:

$$\text{提高率} = \frac{\text{试验组含量} - \text{空白组含量}}{\text{空白组含量}} \times 100$$

表 1 纤维素酶对银杏叶片总黄酮提取量的影响

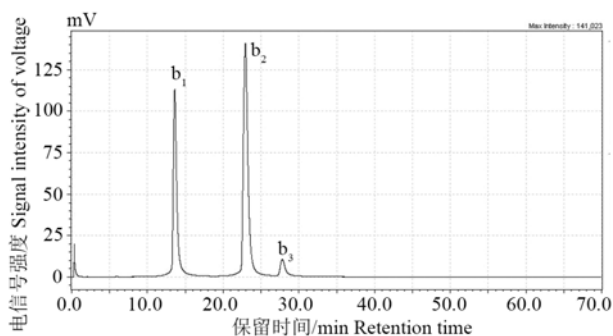
Table 1 The influence of cellulase on the total flavonoid extract yield from *Ginkgo biloba L.* leaves

处理时间/h Time	对照组 Control		试验组 Enzymatic group		提高率/% Improvement
	总黄酮量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Total flavonoid	提取率/% Extract ratio	总黄酮量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ Total flavonoid	提取率/% Extract ratio	
1	8.14±0.11	0.81	9.79±0.01	0.98	20.3
2	9.07±0.20	0.91	10.95±0.31	1.10	20.7
4	10.82±0.14	1.08	12.65±0.18	1.26	16.8
12	11.29±0.09	1.13	12.98±0.49	1.30	15.0

从表 1 提取结果分析发现: 纤维素酶 Umcel9y-1 在 pH 7.0 的缓冲体系中, 37 °C 反应温度条件下, 处理银杏叶片 1、2、4 和 12 h, 总黄酮的提取量较空白对照组分别提高 20.3%、20.7%、16.8% 和 15.0%。王晖等报道一种纤维素酶在酶浓度为 0.125 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 45

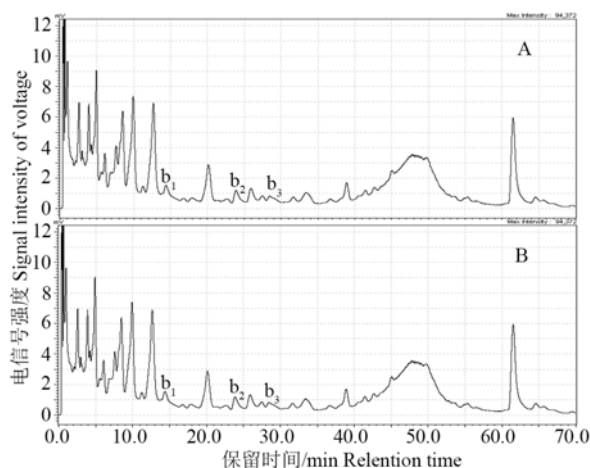
°C, 自然 pH 值, 酶解 2 h, 对银杏总黄酮提取量的提高率为 2.0%^[16]。吴梅林等研究发现, 一种纤维素酶在酶浓度 0.40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 酶作用时间 2 h, 酶解温度为 50 °C, 提取介质 pH 值为 4.5, 提取温度 70 °C 时, 对银杏总黄酮提取量的提高率 18.9%^[17]。相比之

下, 添加 Umcel9y-1 不仅能显著提高银杏叶片总黄酮提取量, 并且整个提取过程不需要加热, 可以在较为温和的条件下完成, 减少了提取过程中的能源成本。本试验中 Umcel9y-1 在酶浓度为 $0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 催化温度 37°C , pH 值为 7.0 缓冲体系中, 酶解 1 h, 对银杏叶总黄酮提取量的提高率为 20.3%。从提取时间、酶添加浓度和反应条件的便利性来看, Umcel9y-1 具有更好的酶解效果。



b1. 槲皮素 Quercetin; b2. 山柰酚 Kaempferol; b3. 异鼠李素 Isorhamnetin

图 3 槲皮素、山柰酚和异鼠李素的混合标准品液相色谱图
Figure 3 The UPLC chromatogram for standard mixture of quercetin, kaempferol and isorhamnetin



b1. 槲皮素 Quercetin; b2. 山柰酚 Kaempferol; b3. 异鼠李素 Isorhamnetin

图 4 两种提取条件下总黄酮类提取物液相色谱图
Figure 4 The UPLC chromatograms for the extracts of total flavonoid by two different extraction methods

本研究中, 用 Umcel9y-1 处理银杏叶 2 h 后的提取试验组, 总黄酮量提取提高率达到最大值。纤维素酶处理 2 h 组, 总黄酮提取量已经达到空白对照 (PBS) 过夜浸提组所获得总黄酮量的 97.0%。不难看出, 使用 Umcel9y-1 可以大大地缩短了银杏叶片的浸提时间。

2.3 2 种方法银杏叶提取液药用成分

首先对槲皮素、山柰酚和异鼠李素标准品单品, 以及三者的混合物标准品, 分别进行液相色谱分析, 得出混合物中各化合物的出峰顺序 (图 3)。3 种化合物的 UPLC 出峰时间依次是: b1 槲皮素, b2 山柰酚, b3 异鼠李素 (槲皮素、山柰酚和异鼠李素单品液相图谱在此忽略)。

将处理时间同为 2 h 的对照组和试验组银杏叶提取物进行液相色谱分析, 结果如图 4 所示。不加酶对照组 (图 4-A) 和试验组 (图 4-B) 的液相色谱峰形图基本一致, 主要药用成分并未发现重要变化。因此, 在提取过程中添加 Umcel9y-1, 对银杏叶提取物的浸提成分没有造成显著影响。在此基础上, 对 2 组图谱中的 b1、b2 和 b3 的峰面积进行了积分比较。分析发现, 试验组中槲皮素、山柰酚和异鼠李素的总含量较对照组增加了 13.9%。3 种药用化合物总量的提高率低于总黄酮提高率的 20.7%, 分析其原因可能是银杏叶片中除槲皮素、山柰酚和异鼠李素之外, 其他黄酮类物质含量增加幅度更高的原因。

3 讨论与结论

本研究对纤维素酶 Umcel9y-1 最适酶促反应条件和在银杏叶总黄酮提取中的应用做了初步的探索。发现 Umcel9y-1 的最适酶促反应 pH 为 6.0~7.0 之间, 最适温度约 37°C 。在中药提取过程中, 随着 Umcel9y-1 处理时间的延长, 提取到的总黄酮含量相应增加, 但是酶处理时间与总黄酮量的提高率并不是严格的正相关性。Umcel9y-1 处理银杏叶粉末 2 h 的总黄酮提高率已达到对照组过夜提取量的 97.0%。由此可见, Umcel9y-1 处理银杏叶片的重要意义, 在于在相对温和的提取条件下, 大大缩短总黄酮的提取时间, 同时不改变银杏叶提取物中的重要药用成分。一般来说, 纤维素酶可以破坏植物细胞壁, 促进内容物的释放^[7-10]。随着酶技术在中草药有效成分提取领域的不断深入, 应用纤维素酶提高植物性中药有效成分的提取率, 将成为充分利用中草药资源的有效途径之一。

参考文献:

- [1] NISHIDA S, SATOH H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract[J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(1): 129-133.
- [2] 马欣. 银杏叶毛细管电泳及色谱联用技术指纹图谱研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [3] GOH L M, BARLOW P J, YONG C S. Examination of

- antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaf infusions[J]. Food Chem, 2003, 82(2): 275-282.
- [4] WANG J, YIN X, WU Y, et al. *Ginkgo biloba* extract suppresses hypertrophy and extracellular matrix accumulation in rat mesangial cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(9): 1222-1230.
- [5] 刘仲则. 中草药黄酮类化合物心血管活性成分概述[J]. 中草药, 1987, 18(4): 34-34.
- [6] 宋丽萍. 银杏叶总黄酮的提取工艺研究[J]. 海峡药学, 2013, 25(6): 37-39.
- [7] 张伟, 张焕新, 施帅. 银杏叶中黄酮类物质的酶法提取研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(7): 48-51.
- [8] 奚奇辉, 李士敏. 纤维素酶在竹叶总黄酮提取中的应用[J]. 中草药, 2004, 35(2): 166-167.
- [9] 邢秀芳, 马桔云, 于宏芬, 等. 纤维素酶在葛根总黄酮提取中的应用[J]. 中草药, 2001, 32(1): 37-38.
- [10] 张欣, 韩增华, 孔祥辉, 等. 酶法提取香菇柄多糖[J]. 生物技术, 1999, 9(1): 21-24.
- [11] 尹蓉莉, 杨军宣, 李化. 黄柏中盐酸小檗碱提取实验方法的改进[J]. 基层中药杂志, 2000, 14(6): 27-29.
- [12] ZHOU Y, WANG X, WEI W, et al. A novel efficient β -glucanase from a paddy soil microbial metagenome with versatile activities[J]. Biotechnol Biofuels, 2016, 9(1): 1-14.
- [13] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化试验方法与技术[M]. 2版. 北京:高等教育出版社, 1997.
- [14] 贲永光, 丘泰球, 李坤平, 等. 纤维素酶法提取黄芪总黄酮的工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2478-2480.
- [15] 高媛媛, 汤道权, 魏雅芹, 等. 银杏叶提取物注射液在木糖醇输液中的稳定性考察[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1648-1650.
- [16] 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): 887-888.
- [17] 吴梅林, 周春山, 陈龙胜, 等. 酶法提取银杏黄酮类化合物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(6): 557-560.