

响应面法优化微生物萃取转化制备L-苯基乙酰基甲醇的工艺

薛迎迎*(连云港中医药高等职业技术学校中医药系,江苏连云港 222007)

中图分类号 R284.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2692-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.28

摘要 目的:优化微生物萃取转化制备L-苯基乙酰基甲醇(L-PAC)的条件。方法:以啤酒酵母萃取制备L-PAC。采用高效液相色谱法测定L-PAC浓度。以L-PAC浓度为响应值,通过Box-Behnken响应面法对苯甲醛、曲拉通(Triton)X-100和葡萄糖用量这3个主要因素进行考察,同时进行验证试验。结果:苯甲醛和Triton X-100之间的交互作用最为显著,最优因素组合为苯甲醛1.1%、Triton X-100 0.14 g/mL、葡萄糖0.028 g/mL;验证试验中L-PAC的平均浓度为28.04 mmol/L(RSD=1.35%, $n=3$),与预测值28.01 mmol/L的相对误差为0.11%。结论:利用响应面法对微生物萃取转化制备L-PAC的条件进行了优化,得到了各因素的最优组合,可为大批量转化制备L-PAC提供有利参考。

关键词 响应面法;微生物萃取转化;L-苯基乙酰基甲醇

Optimization of Extractive Microbial Transformation for Producing L-phenylacetylcarbinol by Response Surface Method

XUE Yingying(Dept. of TCM, Lianyungang Higher Vocational and Technical College of TCM, Jiangsu Lianyungang 222007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the conditions of extractive microbial transformation for producing L-phenylacetylcarbinol (L-PAC). METHODS: HPLC was used to determine the concentration of L-PAC, which was extracted by saccharmyces cerevisiae. Using L-PAC concentration as response value, Box-Behnken response surface design was adopted to investigate the 3 main factors of benzaldehyde, Triton X-100 and glucose dose, and verification test was conducted. RESULTS: The interaction between benzaldehyde and Triton X-100 was the most significant. The optimized combination was as follows as benzaldehyde of 1.1%, Triton X-100 of 0.14 g/mL, glucose of 0.028 g/mL. The average concentration in verification test of L-PAC was 28.04 mmol/L (RSD=1.35%, $n=3$), showing 0.11% relative error with the predicted value of 28.01 mmol/L. CONCLUSIONS: Response surface method has optimized the conditions of extractive microbial transformation for producing L-PAC, obtained optimal combination of each factor, and provided favorable reference for volume-producing L-PAC.

KEYWORDS Response surface method; Extractive microbial transformation; L-phenylacetylcarbinol

- 版.北京:中国医药科技出版社,2015:310-311.
- [2] 孙豪栋,庞晓斌,李继扬.黄芪甲苷生物活性研究进展[J].中国药房,2011,22(7):657-661.
- [3] 周鹏,胡明勋,李浩飞,等.不同品种、产地和种植方式黄芪药材中黄酮类成分的质量分析[J].中国药房,2016,27(18):2575-2578.
- [4] 梁丽娟,屠鹏飞,赵奎君,等.黄芪多糖的药理作用研究进展[J].中国药房,2010,21(43):4113-4116.
- [5] 成金乐,赖智填,彭丽华.中药破壁饮片研究[J].世界科学技术:中医药现代化,2014,16(2):254-262.
- [6] 蒋洁,何舟,黄燕军,等.多指标正交试验法优选桂圆益气补血汤煎煮工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(6):26-29.
- [7] 张金莲,姚冬琴,龚千锋,等.多指标综合加权评分法优选马兜铃蜜制工艺[J].中成药,2012,34(2):321-324.
- [8] 姚卫峰,何睦,蒋叶娟,等.基于多指标加权评分的中药复

- 方二至丸提取工艺研究[J].中成药,2013,35(7):1414-1418.
- [9] 梁瑾,刘小花,任远,等.黄芪药材的HPLC-DAD-ELSD指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(17):70-74.
- [10] 梁瑾,刘小花,任远,等. HPLC-DAD-ELSD法同时测定黄芪中5个成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(2):210-213.
- [11] 苏碧茹,邓慧敏,马宏亮,等. HPLC-DAD-ELSD指纹图谱的化学模式识别用于黄芪质量评价[J].中国中药杂志,2013,38(19):3319-3323.
- [12] 龙建英,黄明华.中药颗粒饮片与传统饮片的比较[J].内蒙古中医药,2007,26(2):50-52.
- [13] 徐浩淇,陈莎,章军,等.西洋参破壁饮片、粗粉与传统饮片中人参皂苷的体外溶出度比较[J].中国中药杂志,2015,40(13):2576-2581.

* 讲师,硕士。研究方向:生物制药。E-mail: 314302095@qq.com

(收稿日期:2016-10-13 修回日期:2016-12-17)
(编辑:刘 萍)

麻黄是我国重要的中药资源之一,用于治疗风寒感冒、胸闷喘咳、风水浮肿、支气管哮喘等病症^[1]。麻黄的主要有效成分是麻黄碱和伪麻黄碱。麻黄碱具有兴奋中枢神经、收缩毛细血管、增强心肌收缩力等功能。近年来,因滥采滥挖导致野生麻黄资源匮乏,使得麻黄碱产量不足,因此开发化学、生物等途径合成麻黄碱及伪麻黄碱的关键中间体 *L*-苯基乙酰基甲醇(*L*-phenylacetylcarbinol, *L*-PAC)具有重要意义。

啤酒酵母在非离子表面活性剂曲拉通 X-100(Triton X-100)溶液中具有较好的生物相容性^[2],可用于在胶束溶液中经微生物萃取转化制备 *L*-PAC。本文采用 Box-Behnken 响应面法,分析底物苯甲醛、表面活性剂 Triton X-100 和辅底物葡萄糖用量 3 个主要因素对 *L*-PAC 生成浓度的影响,以获取最优的转化条件,为大批量转化生产 *L*-PAC 提供有利参考。

1 材料

1.1 仪器

HZQ-Q 全温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司); Waters 600 高效液相色谱仪(HPLC),包括 Waters 600 泵、Waters 486 紫外检测器和 Waters PC 800 工作站(美国 Waters 公司)。

1.2 菌种与试剂

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)购于中国科学院微生物研究所; Triton X-100、*L*-PAC 标准品(美国 Sigma 公司,批号:BFBD20152V、K37218-719,纯度:>98%); 葡萄糖、苯甲醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:20160108、151201,均为分析纯);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 湿酵母细胞的培养

每 100 mL 去离子水中加入葡萄糖 3 g、蛋白胨 2 g、酵母膏 1 g,混匀后用移液管吸取 50 mL 分别装入 250 mL 三角瓶中,纱布密封,置于 30 ℃、200 r/min 振荡器中培养 24 h。培养结束后,将培养液经 2 500 r/min 离心(离心半径:10 cm)5 min,收集湿酵母细胞作为后续微生物萃取转化的催化剂。

2.2 微生物萃取转化

每 100 mL 去离子水中加入蛋白胨 2 g、酵母膏 1 g、七水硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)0.1 g、二水氯化钙($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)0.005 g、乙醛 0.6 mL、湿酵母细胞 8 g 和苯甲醛、Triton X-100、葡萄糖(苯甲醛、Triton X-100 和葡萄糖的用量参考“2.4”项下),用磷酸氢二钠和柠檬酸调节溶液 pH 至 4.8,混匀后用移液管取 10 mL 分别装入 50 mL 三角瓶中,纱布密封,置于 30 ℃、200 r/min 振荡器中微生物萃取转化 8 h。转化结束后,将转化液经 4 000 r/min 离

心(离心半径:10 cm)5 min,取上清液,进样测定。

2.3 *L*-PAC 浓度测定

2.3.1 *L*-PAC 标准溶液的制备 称取 *L*-PAC 标准品 1 g,溶解于 200 mL 无水乙醇中,充分搅拌均匀,制得浓度为 33 mmol/L 的 *L*-PAC 标准溶液,备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 取“2.2”项下上清液 0.5 mL,无水乙醇稀释至 1.5 mL,即得^[3]。

2.3.3 色谱条件与系统适用性 色谱柱:Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(30:70, *V/V*);柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;检测波长:283 nm;进样量:20 μL。在此色谱条件下,分别取空白溶液(不加湿酵母细胞,其余处理同“2.2”项下)、“2.3.1”“2.3.2”项下溶液进样测定。结果,*L*-PAC 保留时间为 9.3 min,分离度>1.5,色谱图见图 1。

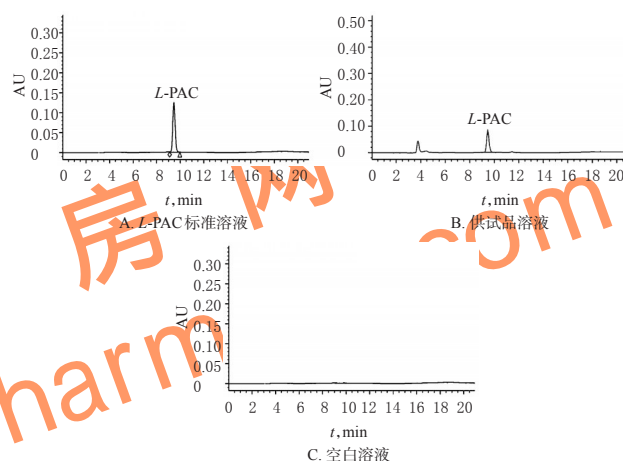


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.4 回归方程与线性范围 分别精密量取 *L*-PAC 标准溶液 4、6、8、10、12、14、16 μL,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以 *L*-PAC 浓度(mmol/L)为横坐标(*x*)、峰面积为纵坐标(*y*)进行线性回归,得回归方程为 $y=70\ 048x$ ($r=0.999\ 6$),表明 *L*-PAC 在 1.298 6~30.793 3 mmol/L 范围内线性关系良好。

2.3.5 方法学考察 按照相关要求进行操作。结果,在重复性试验、稳定性试验和精密度试验中,*L*-PAC 峰面积的 RSD 分别为 1.2% ($n=6$)、0.11% ($n=7$)、0.09% ($n=6$),表明重复性、稳定性和精密度均良好;加样回收率为 98.17%~101.62% (RSD=1.04, $n=6$),表明准确度较好。

2.4 Box-Behnken 响应面法优化 *L*-PAC 转化生成条件

根据预试验结果,选择显著影响 *L*-PAC 浓度的 3 个因素,即底物苯甲醛(X_1)、表面活性剂 Triton X-100(X_2)和辅底物葡萄糖(X_3)用量为考察变量,产物 *L*-PAC 的浓度(Y)为响应值,采用 Box-Behnken 响应面法设计试验方案,其他操作条件同“2.2”项下,共设计 15 组试验。因

素与水平见表1, Box-Behnken设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	$X_1, \%$	$X_2, \text{g/mL}$	$X_3, \text{g/mL}$
-1	0.80	0.10	0.02
0	1.20	0.14	0.03
+1	1.60	0.18	0.04

表2 Box-Behnken设计与结果

Tab 2 Box-Behnken design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	L-PAC, mmol/L
1	-1	-1	0	25.44
2	1	-1	0	2.51
3	-1	1	0	15.68
4	1	1	0	21.61
5	-1	0	-1	18.25
6	1	0	-1	18.18
7	-1	0	1	18.73
8	1	0	1	8.38
9	0	-1	-1	20.74
10	0	1	-1	23.71
11	0	-1	1	10.81
12	0	1	1	21.87
13	0	0	0	27.58
14	0	0	0	26.15
15	0	0	0	26.60

利用 Design Expert 7.0.1 软件对表2中的数据进行二次多元回归拟合, 得到Y对 X_1, X_2, X_3 之间的二次多项回归方程为 $Y=26.78-3.43X_1+2.92X_2-2.64X_3+7.21X_1X_2-2.57X_1X_3+2.02X_2X_3-6.94X_1^2-3.54X_2^2-3.96X_3^2$ 。对上述回归模型进行方差分析, 结果见表3。

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	718.36	9	79.82	40.11	0.000 4	极显著
X_1	94.06	1	94.06	47.26	0.001 0	显著
X_2	68.28	1	68.28	34.31	0.002 1	显著
X_3	55.55	1	55.55	27.91	0.003 2	显著
X_1X_2	208.08	1	208.08	104.55	0.000 2	极显著
X_1X_3	26.40	1	26.40	13.27	0.014 9	显著
X_2X_3	16.39	1	16.39	8.23	0.035 0	显著
X_1^2	177.60	1	177.60	89.24	0.000 2	极显著
X_2^2	46.17	1	46.17	23.20	0.004 8	显著
X_3^2	57.90	1	57.90	29.09	0.003 0	显著
残差	9.95	5	1.99			
失拟项	8.88	3	2.96	5.53	0.156 8	
纯误差	1.07	2	0.53			
总和	728.31	14				
相关系数	0.986 3					
校正决定系数	0.961 7					

注: $P < 0.05$ 为显著, $P < 0.01$ 为极显著

Note: $P < 0.05$ means significant, $P < 0.01$ means very significant

由表3可以看出, 模型方程的 $P=0.000 4 < 0.01$, 说明模型方程极显著, 该试验方法可靠。模型方程失拟项的 $P=0.156 8 > 0.05$, 为不显著, 表明未知因素对试验结

果干扰很小。试验值与模型方程预测值的校正决定系数为0.961 7, 表明该模型能解释96.17%响应值随响应因素的变化, 模型拟合程度较好。对方程中各项进行显著性分析, 一次项、平方项和交互作用项的 P 均小于0.05, 说明这3个因素以及因素之间的相互作用对响应值的影响都是显著的, 其中Triton X-100和苯甲醛的相互作用非常显著($P=0.000 2$)。因此, 所得模型方程能够很好地预测产物L-PAC浓度随各响应因素的变化。

通过 Design Expert 7.0.1 软件绘制出能够反映影响产物L-PAC浓度的3个因素交互作用的三维响应面图和二维等高线图, 结果见图2。

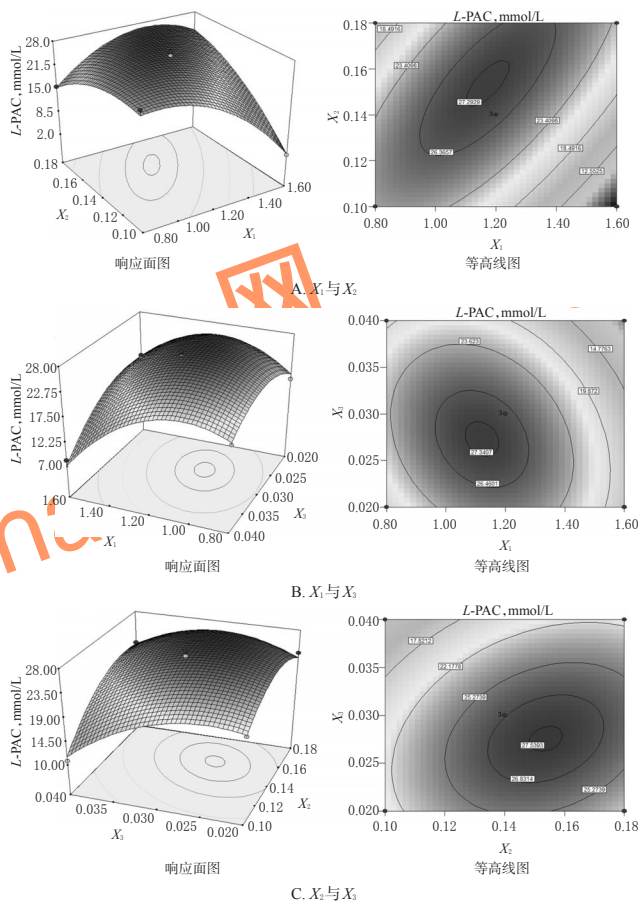


图2 三维响应面图和的等高线图

Fig 2 Corresponding surface and contour map

由图2可知, 若等高线图呈椭圆形则表明两个因素交互作用显著, 若呈圆形则表明交互作用不显著^[4-5]。3个椭圆形的等高线图表明 X_1, X_2, X_3 这3个因素中任意2个因素的交互作用显著, 尤其底物 X_1 和表面活性剂 X_2 的相互作用非常显著。

2.5 最佳条件的确定及验证试验

利用 Design Expert 7.0.1 软件中的优化模块得到最优组合, 即: 苯甲醛用量为1.1%, Triton X-100用量为0.14 g/mL, 葡萄糖用量为0.028 g/mL, 相应L-PAC浓度的模型预测值为28.01 mmol/L。在最优条件下进行微生物转化验证试验, 操作同“2.2”项下, 在转化8 h后, 测

得 *L*-PAC 浓度为 28.04 mmol/L (RSD=1.35%, $n=3$), 与模型预测值 28.01 mmol/L 的相对误差为 0.11%, 表明响应面设计得到的工艺条件是有效、可行的。

3 讨论

通过图 2A、2B 可以看出, 苯甲醛单纯作用时, 其用量较高对 *L*-PAC 的生成有强烈的抑制作用。

图 2B、2C 显示, 随着辅底物葡萄糖用量逐渐升高, 产物 *L*-PAC 浓度先增加后降低, 这与文献[6]报道一致。这是因为酵母在葡萄糖用量高时的代谢以发酵代谢为主, 主要产物是乙醇, 导致细胞转化产物 *L*-PAC 的活性减弱。因此为了得到高浓度的 *L*-PAC, 葡萄糖用量必须适当。

如图 2B 所示, 随着 Triton X-100 用量的增加, 在低苯甲醛浓度时 *L*-PAC 浓度逐渐降低, 在高苯甲醛浓度时 *L*-PAC 浓度逐渐增加。这是由于 Triton X-100 胶束对底物苯甲醛的萃取增溶作用所致。当苯甲醛用量少时, 少量的苯甲醛被增溶到 Triton X-100 胶束中, 降低了底物的利用度, 导致产物 *L*-PAC 浓度降低。模型或毒性测定表明增溶到胶束中的底物利用度只有 20%^[7-9]。当苯甲醛用量多时, 大量的毒性底物对微生物有强烈的抑制作用, 导致 *L*-PAC 浓度很低。随着 Triton X-100 用量增加, 苯甲醛可以被萃取增溶到胶束中, 降低了对微生物的毒性作用, 使产物 *L*-PAC 浓度升高。胶束对底物苯甲醛的增溶一方面可以降低底物对微生物细胞的抑制作用, 有利于反应进行; 另一方面却使底物的利用度降低, 不利于转化反应。所以在胶束溶液中对于一定量的底物存在一个最优的表面活性剂浓度。响应面方法可以使表面活性剂和底物的相互作用很直观地表现出来, 能够有效地优化胶束系统中的萃取微生物转化。

非水介质用于全细胞转化的前提就是具有良好的生物相容性, 但是只有某些非离子表面活性剂对某些特定的微生物才具有生物相容性。非离子表面活性剂溶液的生物相容性是由表面活性剂的分子结构和微生物种类决定的^[10]。Laouar L 等^[2]报道啤酒酵母在 Triton X-100 胶束溶液中保持了稳定的生物活性, 从而使得在 Triton X-100 胶束溶液中萃取微生物转化制备 *L*-PAC 成

为可能。

综上, 本研究填补了国内外相关研究的空白, 而且利用响应面法优化得到的模型方程是有效的, 具有较好的预测性, 这将对以后大批量转化制备 *L*-PAC 提供有利的参考。

参考文献

- [1] 曹道平. 保护鲁西北平原上重要的中药资源[J]. 山东中医杂志, 1991, 10(2): 45.
- [2] Laouar L, Lowe KC, Mulligan BJ, et al. Yeast responses to nonionic surfactants[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18(6): 433-438.
- [3] Rosche B, Sandford V, Breuer M, et al. Biotransformation of benzaldehyde into (R)-phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(3): 309-315.
- [4] 陈凯, 李收, 金凯, 等. Box-Behnken 响应面法优化吡啶美辛固体脂质纳米粒处方[J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3118-3121.
- [5] 雷艳萍, 石晓峰, 刘东彦, 等. 响应面法优化雪松松针中总木脂素的提取工艺[J]. 中国药房, 2016, 27(7): 939-942.
- [6] 薛迎迎, 杨汝德, 齐瀚实, 等. 胶束溶液中微生物萃取转化合成 *L*-苯基乙酰基甲醇条件的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 2-5.
- [7] Guha S, Jaffe P, Peters CA. Bioavailability of mixtures of PAHs partitioned into the micellar phase of a nonionic surfactant[J]. *Environ Sci Technol*, 1998, 32(15): 2317-2324.
- [8] Jang SA, Lee DS, Lee MW, et al. Toxicity of phenanthrene dissolved in nonionic surfactant solutions to *Pseudomonas putida* P2[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2007, 267(2): 194-199.
- [9] Lee HJ, Lee MW, Lee DS, et al. Estimation of direct-contact fraction for phenanthrene in surfactant solutions by toxicity measurement[J]. *J Biotechnol*, 2007, 131(4): 448-457.
- [10] 薛迎迎. 非离子表面活性剂胶束溶液萃取微生物转化的参数优化[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

(收稿日期: 2016-12-02 修回日期: 2017-05-03)

(编辑: 刘明伟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅