• 中药现代化论坛 •

超声波酶促反应在中药和天然产物中的应用

赵余庆¹, 韩颖²

(1. 辽宁省中药现代化工程技术中心, 辽宁 沈阳 110032; 2. 东北大学资源与土木工程学院, 辽宁 沈阳 110004)

摘要:酶作为一种生物催化剂,在适宜的条件下,其催化反应的速度是一般化学催化剂无法比拟的,而且它还具有反应条件温和、有利于简化设备、改善劳动条件和降低成本等优点。但是当酶被提取到细胞外后,其分子构象会发生改变,使生物学活性和稳定性都大为降低。超声波作为一种物理能在低强度及适宜的频率条件下,能够使酶分子的构象正向转化,从而提高酶的活性,加快酶转化反应速度,有利于中药与天然产物中有效成分的转化。

关键词:超声波酶促反应;中药;天然产物;有效成分的转化

中图分类号:R282.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)08-1121-03

Application of enzyme catalytic reaction with ultrasonic wave to Chinese materia medica and natural products

ZHAO Yu-qing¹, HAN Ying²

(1. Liaoning Engineering and Technology Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China; 2. College of Resources and Civil Engineering, Northeast University, Shenyang 110004, China)

Abstract: The enzyme, as a biocatalyst, can not be surpassed in speeding up the reactions by other common chemical catalysts under the suitable conditions and can catalyze the reaction mildly, simplify the facilities needed, improve the work conditions, and reduce the production costs, etc. Those are its advantages mentioned above. But while the enzyme is extracted outside the cells, the molecular conformation may be changed with decreasing its bioactivity and stability seriously. As one type of physical energy, ultrasonic wave with lower intensity and suitable frequency can make the conformation of enzymatic molecular conformation transform positively and the transforming reactions accelerate so as to facilitate the effective constituents of Chinese materia medica and natural products transforming.

Key words: enzyme catalytic reaction with ultrasonic wave; Chinese materia medica; natural product; effective constituent transformation

随着中药现代化高新技术在中药与天然产物研究领域不断的应用和发展,酶技术和超声技术已经成为中药和天然产物中有效成分提取分离的关键技术。近年来的大量研究表明,超声波作为一种物理能,不仅能通过在空化作用中产生的极大压力造成被破碎物细胞壁及整个生物体破裂而使胞内物质释放、扩散及溶解,而且能够使酶分子的构象发生正向转化,从而提高酶的活性,加速酶转化反应,因此,称该过程为超声波酶促反应。酶技术与超声技术的组合应用有利于中药与天然产物中有效成分的转化和中药现代化的实现。

1 酶与超声波

酶的来源十分广泛,一些植物和微生物都可以

作为某些酶的原料。例如,从动物的胰脏中提取胰蛋白酶;从动物胃中提取胃蛋白酶;从木瓜中提取木瓜蛋白酶;从菠萝中提取菠萝蛋白酶^[1,2];从昆虫或微生物(细菌、放线菌、真菌等)的发酵培养液中提取纤维素酶^[3]等。由于酶是在生物细胞内合成并在细胞内行使功能的,一旦脱离其原来的生存环境,其分子构象、反应活性就与在细胞内时不完全相同。因此,人们生产的各种生物酶制剂与生物体内的酶相比,其生物学活性和稳定性已有所改变。为了使酶发挥出高效的转化作用,运用中药现代化技术提取分离的关键技术和手段来提高其转化活性及稳定性具有重要意义。

超声波是物质介质中的一种弹性机械波,作为一

种机械能量形式,超声技术已广泛应用于工业、化学与化工、医疗、食品等领域。近年来超声波在食品加工中的应用更是日趋广泛,并且已经引起了食品技术专家们的普遍关注,致使该技术得到了长足的进步和快速的发展。目前,超声波在食品工艺中常被用于激活细胞的活性、影响酶活性、提高肉制品质量、辅助结晶等,作为一种辅助加工手段,超声波还能用于提取、洗净、解冻、乳化、滤过、干燥及加工过程。

应用较低强度的超声波可提高酶活性,促进酶的转化反应,是一个比较新的研究课题。早期研究认为较高强度的超声波会破碎细胞或导致酶失活,而近几年来研究则表明,在有酶或细胞参与的情况下,一些生化反应过程可以在超声波作用下被激活。一般来说,适宜强度的超声波可以使酶的构象正向转化,提高酶的活性和底物的转化率。同时,超声波还能促进酶与底物分子之间的相互作用,改变反应物的传输机制,加速产酶细胞的新陈代谢过程,并可提高胞内酶的产率。这一特定功率下的声强,称为“临界失活声强”^[4]。

2 超声波酶促反应的机制

酶是生物细胞所产生的生物催化剂,其化学本质是蛋白质,是由氨基酸组成的生物大分子化合物,具有 4 级结构,也具有两性电解质的性质,会受到某些物理因素(加热、声场辐照、紫外线照射等)及化学因素(酸、碱、有机溶剂等)的作用而提高活性或变性失活。利用超声波的物理能量作用于从生物细胞中产生的酶分子,使酶分子的构象发生改变,从而影响其反应活性,是超声波提高酶活性的重要原因之一^[5]。

2.1 超声波声强对酶活性的影响:一般认为,超声辐照声强不宜过高,否则会导致酶失活。但不同种类的酶对超声波声强的选择性不同。有研究表明,只有用较高声强辐照时,酶的活性才能提高。如使用 20 kHz、40 W/cm² 的超声波辐射酵母(在悬浮液状态下)2 h,作为甾醇环化酶可使角鲨烯转化率明显提高,从而可以廉价地合成出克量级的甾醇对映异构体^[6]。

2.2 超声波对微生物代谢活性的影响:细胞膜对细胞的代谢环境具有重要的保护和调节作用,控制着胞外物质的进入和胞内代谢产物的泄出。有研究表明,适当强度的超声波产生的稳态空化作用对细胞的破坏很小,主要可改变细胞膜的通透性,促进可逆渗透,强化反应物进入及生成物离开酶活性中心的过程,从而增加微生物的代谢活性,加速细胞的生长速度,促进有益物质的生成。而且在不破坏酶蛋白质结构的超

声条件下,还可以提高酶活性,促进酶催化反应。这一特性已被广泛应用于天然产物的提取和转化中。如用低功率超声波活化液体营养物质,能够促进藻类细胞的生长,将蛋白质的产量提高 3 倍。这意味着非常规来源(非农业)获取食品的设想有可能实现。此外,最近的研究表明,用超声波辅助生产酸乳酪,能够使总生产时间减少 40%。值得注意的是超声波不仅因此而降低了生产对牛奶来源的依赖,而且还能在某种程度上改善酸乳酪的均匀性和质地^[7]。

3 超声波酶促反应的应用

3.1 超声波对纤维素酶转化灵芝多糖的影响:灵芝多糖不仅具有抗肿瘤作用,而且还有提高机体的免疫力、消除机体内自由基、提高肝脏解毒功能和抗放射、利胆清热、活血化瘀等功能^[8]。灵芝多糖特有的生理活性和药理作用,促使人们对其结构、功能、提取、应用等方面进行了广泛的研究。于淑娟等^[9]以灵芝为底物,加入纤维素酶进行转化研究。用超声波处理后的实验数据表明,超声波促进酶反应的灵芝多糖得率明显多于常规方法,可见超声波可提高纤维素酶转化过程中的反应速率,且符合一般酶反应动力学机制。

3.2 超声波对 TGL (Transglucosidase “A-MANO”)、BZL (Biozymel) 转化异麦芽低聚糖浆中生理活性物质的影响:近年来,异麦芽低聚糖浆原料因其成本低廉而颇受青睐。其除了有低甜度、防止淀粉老化、防结晶、抗热、抗酸性等良好的性能外,它还有低热量、难发酵、防龋齿、改善人体菌群、促进人体有益菌——双歧杆菌增殖等生理功能,是一种双歧杆菌增殖因子^[10]。异麦芽低聚糖中具有生理功能的主要成分为有分枝结构的异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖等,并且主要集中在二糖和三糖;另有研究报道,麦芽低聚糖具有抗菌活性,特别是麦芽三糖能明显地抑制人肠道中寄生的能分泌细菌毒素的产气荚膜梭菌的生长、繁殖,这种细菌毒素能使人长期慢性中毒而致衰老和引起各种内脏疾病和诱发癌症。因此,异麦芽低聚糖浆中二糖和三糖的多少,可作为评价反应效果好坏的主要依据。耿予欢等^[4]研究了在异麦芽低聚糖的制备过程中超声波对游离酶和固定化酶反应的影响。结果表明,超声波处理对游离的 TGL 和 BZL 的酶活性没有明显的影响,而对固定态的 TGL 和 BZL 产生了正向的影响,产物中糖分的组成发生了一定的变化,即单糖(葡萄糖)和四糖及四糖以上组分的质量分数降低了,而二糖和三糖的质量分数相应增高。随超声时间的延长,二糖和三

糖的总质量分数不断增加,由 59.08% 增到 66.80%。由于异麦芽糖浆中生理活性物质主要为二糖和三糖,而合理地控制反应的条件就可以使麦芽糖类有效地向分枝型转化。因此,用超声波处理可改变固定化 TGL 和 BZL 的活性,有利于异麦芽糖浆中生理活性物质的增加。

3.3 超声波酶促反应对糖类物质转化的影响:以 20~40 kHz、10~100 W 的超声波作用于固定化糖化酶,淀粉的转化反应效率可提高 2 倍以上,这一技术已在淀粉生产葡萄糖中得到推广应用^[11]。日本学者研究发现,在没有酵母的情况下,用日本米和酶培养生产葡萄酒和甜食等物料,同时用大于 15 kHz 的超声波辐射,可促进所用物料的糖化,提高其效率^[8]。Ateqad 等^[12]利用 2 MHz、5.2 W/cm² 的超声波处理木瓜蛋白酶时,发现木瓜蛋白酶的活性也有较大幅度的提高。

3.4 超声波对酶转化天然活性成分的影响:人参皂苷 Rh₂、C-K、PPD、PPT 等成分为人参、西洋参、三七等五加科人参属植物中微量存在的稀有皂苷,这些稀有人参皂苷各自都具有特殊的生物活性。药理实验表明,这些人参皂苷除了具有抗肿瘤活性^[13]外,在心血管、免疫调节、抗衰老等方面也有广泛的药理作用^[14]。但这些皂苷在天然植物中量极低,如 Rh₂ 在红参中质量分数仅为 0.001%、人参茎叶中的 Rh₂ 较红参高 10 倍。为了能够大量的获得这些稀有活性皂苷,近年来国内外学者不断的寻找和研究新的方法及转化制备技术。目前最为常用的方法是化学法和生物转化法。笔者曾用 β-葡聚糖苷酶对 7 种植物总皂苷分别进行酶转化^[15,16]和超声波酶促反应研究。试验结果表明,超声 4 h 时 C-K 的生成量相当于未超声酶反应 24 h 时 C-K 的生成量。

超声波能使某些反应的产物专一化。如腺苷与苯基丙氨酸在枯草杆菌蛋白酶的作用下发生酰化反应。在 40 °C,机械搅拌 120 h 得到 3 种产物,比率为 42 : 2 : 24,总产率为 60%;而在超声波作用下,温度为 0 °C,只需 0.5 h,产率就可达 38%,且只有主产物生成。这种转化反应的专一性,更有利于有效物质的制备和分离^[17]。

另有研究报道使用 2.8 W 的超声波,以每 10 min 辐照 5 s 的方式进行周期性处理,可提高由胆甾醇氧化成为胆甾烯酮的产量^[5]。

3.5 超声波对 β-半乳糖苷酶活性的影响:在乳酸菌中,酸奶细菌具有很高的乳糖分解酶活性,乳糖分解酶或 β-半乳糖苷酶是一种胞内酶,通过超声波可使

β-半乳糖苷酶的活性提高几倍,释放出的 β-半乳糖苷酶能部分转化牛乳中的乳糖为葡萄糖和半乳糖。不用超声时,乳糖质量浓度只减少 39%~51%,而加超声作用时,乳糖质量浓度可减少 71%~74%。其转化产物葡萄糖和半乳糖能够被生长缓慢的菌体如嗜酸乳杆菌和双歧杆菌利用^[18]。

3.6 超声波对乙醇脱氢酶和己糖激酶活性的影响:一般相对分子质量小的物质如葡萄糖等通过渗透或活性传递能进入细胞,但磷酸化合物是难以通过细胞膜的。因此,利用啤酒酵母细胞催化生产三磷酸腺苷(ATP)、纤维蛋白(FDP)等核苷或核糖类磷酸化合物,细胞膜的通透性将直接影响酶促反应的速度和催化效率。在利用啤酒酵母细胞酶系进行 ATP 生产中,由于细胞膜的通透性限制,细胞内各种酶的活性一般难以完全地发挥作用。由于超声波可以增强细胞膜的通透性,段学辉等^[19]采用超声波对培养的啤酒酵母细胞进行通透化处理。实验结果显示,经超声波处理的酵母细胞通透性提高十分明显,是溶剂处理效果的数倍。同时,随通透化处理温度的提高,细胞的通透性也会增大,而且上清液中乙醇脱氢酶(ADH)和己糖激酶(HK)的活性随处理温度升高也有所提高。这表明温度对细胞的通透化处理效果有影响,随着细胞透化程度的增大,胞内酶蛋白和核酸物质会出现泄漏。

4 结语

目前,酶制剂在工业、农业、食品和生物医药中的使用越来越广泛。而酶本身是在生物细胞内合成并在细胞内行使功能的,一旦离开细胞内部环境,酶(离体酶)的反应活性降低^[20]。究其原因就是离体酶分子构象与细胞内部酶分子构象不完全相同。所以,在使用酶制剂时就要设法提高酶制剂的反应活性,使之具有较高的转化效率。而在各种提高酶制剂活性的方法中,利用超声波来提高酶反应活性和有效成分的转化效率经上述研究证明是可行的。超声波酶促反应具有高效、廉价、无污染,操作方式简单、技术易推广和应用等特点,可提高酶转化反应速度和天然产物中有效成分转化率,也可作为中药现代化技术应用在中药、天然药物和健康食品的研究及工业生产等领域,这对于实现中药与天然活性产物超声波酶促进反应的工业化生产是一条有效的途径。

References:

- [1] Chen X L, Huang Z L, Qiu T Q. Effect of ultrasound on activities of immobilized enzymes [J]. *Appl Acous* (应用声学), 2002, 21(2): 46-48.

表 1 3 种阴道泡腾片的发泡量、泡沫持续时间和黏附性的比较

Table 1 Comparison of bubble amount, duration of sparkle, and stickiness in three kinds of vaginal effervescent tablets

药品名称	泡沫性状	发泡持续时间	气泡试管内停留时间	泡沫最大体积	试管内药物分布情况
妇炎消泡腾片	气泡细腻、浅棕黄色, 泡沫间空隙细小	约 180 min	约 5 h, 气泡下降至 6 mL 处, 试管中有 多处泡沫空洞	12 mL	药物不分层, 流动不明显, 管壁有均匀黄色药物黏附, 将试管倾斜 90° 无药液流出, 180° 短时间内没有药液和泡沫流出管外
治糜灵泡腾片	气泡开始时较小, 后来较大, 棕褐色, 气泡间空隙较大	约 16 min	约 30 min 时气泡全部消失	16 min	有小块棕褐色药物不均匀的黏附在试管壁上, 试管底部药物有分层现象可以流动, 将试管倾斜 90° 药液流出试管外
洁尔阴泡腾片	气泡开始时较小, 后来较大, 气泡大小不一, 浅棕褐色, 气泡间空隙较大	约 15 min	约 35 min 时气泡全部消失	13 mL	少量棕褐色小块药物不均匀的黏附在试管壁上, 试管底部药物分层可以流动, 将试管倾斜 90° 药液流出试管外

片气泡细腻、泡沫间空隙细小。在发泡持续时间和泡沫维持时间上妇炎泡腾片是治糜灵泡腾片、洁尔阴泡腾片的 10 倍, 差距较大。黏附性方面治糜灵泡腾片、洁尔阴泡腾片很小, 药物发泡完成后 (35 min), 将试管倾斜 90° 药液流出试管外。妇炎消泡腾片 (药物发泡 35 min) 将试管倾斜 90° 无药液流出。180° (倒立) 短时间内没有药液和泡沫流出管外。说明妇炎消泡腾片在泡沫维持时间和黏附性方面较优。

3 讨论

本实验采用试管观测法对比了好炎消泡腾片、治糜灵泡腾片、洁尔阴泡腾片 3 种阴道泡腾片的发泡量、泡沫持续时间和黏附性, 结果表明该方法简单方便, 重复性较好, 特别是对观察阴道泡腾片的有无黏附性有一定的帮助。阴道泡腾片的黏附性虽然在质量控制指标内, 但是对实际临床应用有较大意义, 可以使药物停留在患处时间更长, 不易流出, 更好地保证疗效。另外也可以减少污染衣物, 不妨碍患者的正常生活。

(上接第 1123 页)

[2] Zhu G H, Huang Z L, Xu F C. Effect of ultrasound on the activity and spectrum of fruit bromelain [J]. *Appl Acous* (应用声学), 2003, 22(6): 10-15.

[3] Liu C F, He Z F, Pu H Y, et al. The research of cellulase and its application [J]. *Food Lipid* (粮食与油脂), 2004, 1: 15-17.

[4] Geng Y H, Zhang B S, Gao D W. Study on the effect of ultrasonic wave on the manufacture of isomaltose oligosaccharide [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 1999, 20(1): 14-16.

[5] Qiu T Q, Huang Z L, Liu S S. Effect of sound field on the catalytic vigor and molecular conformation [J]. *Acous Eng* (声学技术), 2000, 19(4): 233-235.

[6] Feng R, Zhao Y Y, Li H M, et al. Study progress of ultrasound applied in biotechnology [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理学进展), 1994, 21(6): 500-503.

[7] Wang W, Zhang S Z, Chen G M. The uses of power ultrasound in food processing [J]. *Pack Food Mach* (包装与食品机械), 2001, 19(5): 12-16.

[8] Feng Y G, Yu S J. A physiological active substance — ganoderma polysaccharids [J]. *J Wuhan Polytech Ind* (武汉工业学院学报), 2002, 3: 19-21.

[9] Yu S J, Gao D W, Min Y G. Study on the kinetics of hydrolysis with cellulase under ultrasonic field [J]. *J Xiamen Univ: Nat Sci* (厦门大学学报: 自然科学版), 1997, 36(3): 424-429.

[10] You X. *Handbook of Manufacture and Application of Starch and Sugar* (淀粉糖品生产与应用手册) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1997.

[11] Wang Q. Application of ultrasound in light and chemical industry [J]. *Light Ind Sci and Technol China Overseas* (中外轻工科技), 1999, 5: 7-8.

[12] Ateqad N. Iqbal [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 1985, 22(3): 190-192.

[13] Hasegawa H, Uchiyama M. Antimetastatic efficacy of orally administered ginsenoside Rb₁ in dependence on intestinal bacterial hydrolyzing potential and significance of treatment with and active bacterial metabolite [J]. *Planta Med*, 1998, 64: 696-700.

[14] Wan J Z, Luo S W. Difference between *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* L. in the chemical constituents, pharmacologic action and clinical application [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 9(5): 391-394.

[15] Jiang B H, Zhao Y Q, Han Y, et al. Isolation and structural determination of enzymatic hydrolysates of the leaves saponins of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2(4): 202-204.

[16] Jiang B H, Han Y, Zhao Y Q, et al. Optimization of enzymatic translation for preparation ginsenoside-C-K in total saponins of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(9): 4-6.

[17] Bremner D H. Recent advances in organic synthesis utilizing ultrasound [J]. *Ultra Sonochem*, 1994, 1(2): 119-124.

[18] Lü J L, Cheng N N. Approaches to improve the viability of probiotic bacteria [J]. *China Dairy Industry* (中国乳业), 2001, 29(6): 31-34.

[19] Duan X H, Ye Q, Zhang S L. Effects of cell permeability on the activity of brewer's yeast of ATP production [J]. *J Nanjing Univ: Eng Technol* (南京大学学报: 工程技术), 2001, 23(3): 86-91.

[20] Zhu G H, Huang Z L, Qiu T Q, et al. Effects of power ultrasound on the reactions catalyzed by enzymes [J]. *Appl Acous* (应用声学), 2001, 20(4): 45-48.