

# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## Extração Enzimática de Genipina a partir do Jenipapo (*Genipa americana* L.) em Sistema Bifásico Aquoso

Anelise Stein Bellé<sup>1</sup>, Camila R. Hackenhaar<sup>1</sup>, Eliseu Rodrigues<sup>1</sup>, Manuela P. Klein<sup>2</sup> e Plinho F. Hertz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Caixa Postal 15090 - 91501-970, Porto Alegre - RS - E-mail: plinho@ufrgs.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - Rua Sarmiento Leite, 245 - 90050-170

### RESUMO

A genipina é um iridóide de ampla aplicação, tanto na área da saúde como na têxtil e na indústria de alimentos. Neste trabalho foi realizada a extração deste composto a partir de um fruto, jenipapo (*Genipa americana* L.), de vasta distribuição no Brasil. Avaliando quatro preparados enzimáticos comerciais com características celulolíticas, pectinolíticas e glicosídicas e utilizando uma combinação de solventes, em um só sistema, foi possível quantificar e identificar, por HPLC-DADMS, a genipina, obtendo-se um rendimento de 97,33 mg.g<sup>-1</sup>, com um alto grau de pureza, empregando Celluclast® 10 %. Desse modo, foi obtido o maior rendimento já descrito de genipina a partir de um extrato vegetal, mesmo comparando com outros frutos.

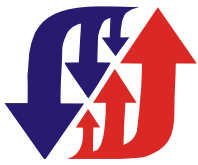
Palavras-chave: genipina, ação enzimática, jenipapo, bifásico.

### INTRODUÇÃO

A genipina está presente naturalmente em alguns vegetais e pode ser extraída através da hidrólise do geniposídeo (Endo & Taguchi 1973). Esta reação é catalisada por  $\beta$ glicosidasas (EC 3.2.1.21) (Itoh-Nashida *et al.*, 1987), na qual o açúcar do geniposídeo é liberado formando a genipina (Djerassi *et al.*, 1960; Fujikawa *et al.*, 1987). O geniposídeo é um iridóide natural e majoritário no jenipapo (*Genipa americana* L.), podendo representar mais de 70 % de seus iridóides totais (Bentes *et al.*, 2014). A genipina e o geniposídeo podem tanto ser encontrados no endocarpo (Renhe *et al.*, 2009) e no mesocarpo do jenipapo (Ramos-de-la-peña *et al.*, 2014), quanto nas folhas e caules da *Tocoyena formosa* (Coelho *et al.*, 2006), nos caules da *Randia spinosa* (Hamerski *et al.*, 2003), na *Castilleja tenuiflora* (Carrillo-Ocampo *et al.*, 2013), na *Bellardia trixago* (Venditti *et al.*, 2013), na *Eucommia ulmoides* (Lee *et al.*, 2014) na *Lampaya medicinalis* (Morales *et al.*, 2014) e nos frutos da *Gardenia jasminoides* (Winotapun *et al.*, 2013).

Tem sido reportado que a genipina possui muitas ações curativas e farmacológicas, como atividade anti-inflamatória (Nam *et al.*, 2010), atividade contra colestase (Goto & Takikawa 2010), efeito antidepressivo (Cai *et al.*, 2015), anticarcinogênico (Feng *et al.*, 2011; N. Wang *et al.*, 2012) e anti-obesidade (Kojima *et al.*, 2011). Além disso, é utilizada em outras áreas, como corante natural azul, através de sua reação com proteínas (Bentes *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012; Touyama *et al.*, 1994), colorímetro de aminoácidos (Lee *et al.*, 2003) e detector de proteínas (Fujikawa *et al.*, 1987), como constituinte de *stents* cardíacos e veículo para liberação de drogas em organismos (Chen *et al.*, 2009; Muzzarelli *et al.*, 2015; Muzzarelli 2009). Uma vez que é capaz de se reticular com proteínas, pode substituir polímeros convencionais utilizados em imobilizações enzimáticas, é uma ótima substituta do glutaraldeído, por exemplo, por ser muito menos tóxica (Feng *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2008). A LD<sub>50</sub> para genipina administrada de forma intravenosa é de 153 mg.kg<sup>-1</sup> e oral, 237 mg.kg<sup>-1</sup> (Chen 2004; Zhu 1998) em camundongos, enquanto que para o glutaraldeído é 15.4 mg.kg<sup>-1</sup> e 100 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Uemitsu *et al.*, 1976).

Existem três técnicas principais para extração da genipina: solventes, ultrassom e ação enzimática; que podem ser utilizadas combinadas ou empregadas em etapas subsequentes. A genipina é mais apolar que o geniposídeo, devido a esta propriedade os solventes orgânicos são os mais usuais para extrair genipina, como acetato de etila e *n*-butanol (Zhou *et al.*, 2005). Este tipo de extração é usualmente conduzida em sistemas bifásicos possuindo inúmeras vantagens: aliviar a inibição pela formação de produto, minimizar possíveis degradações do produto, reduzir custos e *leadtime* evitando processos de *downstream* e assegurar um relativo alto grau de pureza do produto final (Djerassi *et al.*, 1960; Wang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). O ultrassom é utilizado para desestabilizar paredes celulares e facilitar a exposição de componentes celulares internos, comumente aplicado juntamente com outras técnicas, como enzimas e alta pressão hidrostática (Ramos-de-la-



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Peña *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Ramos-dela-Peña, Montañez, *et al.*, 2015). Mas a maior extração de genipina a partir de extratos frutíferos relatada até o momento foi alcançada para *Gardenia jasminoides*, utilizando solventes e enzimas com um rendimento de 58.83 mg.g<sup>-1</sup> (85% de pureza) (Winotapun *et al.*, 2013). A extração enzimática neste caso pode ser tanto empregada para promover o rompimento das paredes celulares quanto para expor alguns componentes de interesse do fruto. Diferentes enzimas livres já foram avaliadas e reportadas, como celulase de *Aspergillus niger* (Winotapun *et al.*, 2013), pectinaesterase de *Aspergillus aculeatus* (Ramos-de-la-Peña *et al.*, 2014; Ramos-de-la-Peña, Renard, *et al.*, 2015),  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium nigricans* (Xu *et al.*, 2008), de *Aspergillus niger* Tiegli (Hua-zheng, 2011), de *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979 (Dong *et al.*, 2014) e de *Aspergillus niger* Au0847 (Peng Wang 2014) e com  $\beta$ -glicosidase de *Trichoderma reesei* imobilizada em um sistema bifásico (Yang *et al.*, 2011).

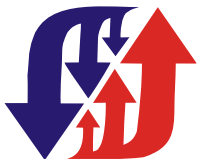
A fruta utilizada nesta pesquisa para extrair a genipina foi o jenipapo. Este fruto é possivelmente originário da Floresta Amazônica e se distribui, atualmente, da região Caribenha (México) ao Centro da América do Sul (Chiov *et al.*, 2003). No nordeste do Brasil, parte desses frutos é utilizada para produzir bebidas, geleias, marmeladas e sorvetes (Morton, 1987) e o restante, ou a maior parte, é descartado por possuir uma rápida maturação. Devido a sua ampla distribuição no Brasil (de Souza *et al.*, 1999) e as atraentes propriedades da genipina, o presente estudo tem como objetivo investigar o rendimento de genipina por extração enzimática em sistema bifásico aquoso. Com esta finalidade, quatro diferentes preparados enzimáticos comerciais foram testados e a genipina obtida foi quantificada e identificada por HPLC-DAD-MS.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os jenipapos adquiridos foram descascados, picados, congelados, liofilizados, triturados e mantidos sob refrigeração. Os preparados enzimáticos utilizados foram Celluclast®, Pectinex Smash XXL® e Pectinex Ultra Color® (Novozymes, Brazil) e Lallzyme Beta™ (Lallemand, France). *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*p*NPG), *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (*o*NPG), genipina (99 % de pureza) e metanol foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Brasil). Todos os solventes e químicos foram de grau HPLC. Ambas amostras e solventes foram filtrados em membranas (0,22 e 0,45  $\mu$ m, respectivamente).

Foram avaliadas para cada preparado as atividades de celulase total, pectinase total e  $\beta$ -glicosidase. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry, 1951). A atividade total de pectinase foi mensurada através da hidrólise da pectina (grau de esterificação de 75 %): 100  $\mu$ L preparado enzimático diluído em tampão citrato de sódio, 0,05 M e pH 5,0 (tampão A), 900  $\mu$ L de solução de pectina (1 g.L<sup>-1</sup>, no mesmo tampão), conduzida a 40 °C durante 2 min. Quantificado pelo método de DNS e detectado em espectrofotômetro a 540 nm (Miller, 1959). A atividade de celulase total foi determinada usando papel filtro Whatman® N°1, seguindo método de Ghose (Ghose, 1987): 100  $\mu$ L do preparado diluído em tampão A, 900  $\mu$ L do mesmo tampão contendo 50 mg do substrato, incubado a 50 °C por 2 min e quantificado da mesma forma que para pectinase total. Uma unidade de pectinase ou de celulase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de grupo redutores por minuto, nas condições prescritas. A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi mensurada utilizando *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*p*NPG), seguindo o trabalho de Parry e colegas (Perry *et al.*, 2001): 120  $\mu$ L de tampão A, 80  $\mu$ L de *p*NPG (4 mg.mL<sup>-1</sup>) e 50  $\mu$ L do preparado enzimático diluído no mesmo tampão. Após, a mistura foi incubada a 37 °C por 2 min e a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de tampão carbonato de sódio (0.5 M e pH 12,0). A quantificação foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm e a atividade calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de liberação do *p*-nitrofenil ( $\epsilon$ = 13 L.mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, pH 10,0). Uma unidade de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu$ mol de *p*NPG por minuto nas condições descritas acima. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

A extração da genipina foi realizada em batelada, em erlenmeyers de 10 mL. Na primeira etapa os preparados foram utilizados a 5 % (m/v). A reação foi composta de 100 mg do jenipapo, 1,5 mL do preparado em tampão A e 1,5 mL de acetato de etila, incubado a 37 °C nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min. Após foram centrifugadas (3000 g) por 5 min, a fase orgânica foi coletada, seca com nitrogênio gasoso, ressuspendidas em metanol 45 % (v/v), filtradas e diluídas para posterior quantificação da genipina. A extração também foi avaliada na ausência de enzimas, na presença do acetato de etila somente nos 30 min finais (até 180 min), nas condições



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de 1 e 10 % para as duas enzimas mais eficientes na extração a 5 % (até 180 min) e com melhor preparado a 20 % (até 480 min). Ambos os experimentos foram conduzidos em duplicata. A genipina presente nas amostras foi analisada em HPLCAD-MS com coluna C18 Atlantis® T3, Metanol:Água (45:55, v/v) como fase móvel (0.9 mL.min<sup>-1</sup>) e 29 °C (Xu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014), monitorando a 238 nm em um t<sub>R</sub> de ~8 min.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise das atividades dos preparados (Tabela 1) mostra que ambos possuem as atividades declaradas pelos fornecedores, sendo que Lallzyme Beta® é a que possui maior teor de proteína em sua formulação.

Tabela 1. Atividades enzimáticas dos preparados comerciais testados

Preparado comercial	Enzima declarada	Proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	Pectinase (U.mL <sup>-1</sup> )	Celulase (U.mL <sup>-1</sup> )	β-glicosidase (U.mL <sup>-1</sup> )
Celluclast®	celulase	275,99 ± 1,49	638,41 ± 15,96	2038,39 ± 163,53	62,40 ± 1,92
Pectinex Smash®	pectinase	111,72 ± 1,91	774,49 ± 42,83	228,95 ± 16,66	9,17 ± 0,81
Pectinex Ultra Color®	Enzimas pectolíticas	106,24 ± 2,62	1126,66 ± 6,23	939,77 ± 43,61	23,49 ± 0,47
Lallzyme Beta®*	pectinase e β-glicosidase	457,13 ± 3,74	41868,16 ± 4485,37	23198,96 ± 1627,51	95,19 ± 1,92

\* Lallzyme Beta®: proteína em mg mL<sup>-1</sup>, atividades em U.g<sup>-1</sup>.

Celluclast® e Lallzyme Beta® são os que possuem maior atividade celulolítica, enquanto que Pectinex Smash®, Ultra Color® e Lallzyme Beta® possuem maior poder pectolítico e Celluclast® e Lallzyme Beta® são as que têm maior atividade de β-glicosidase.

Após distinguir as atividades enzimáticas dos preparados foi realizada a extração com as enzimas a 5 % (Figura 1a).

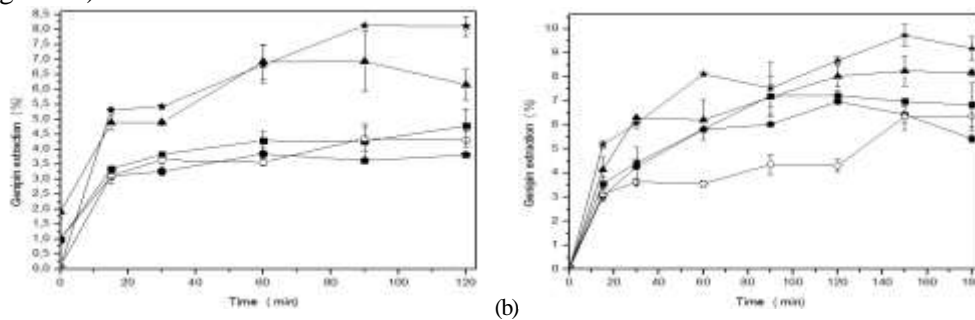
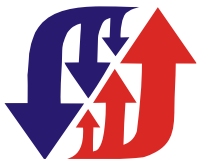


Figura 1. (a) Extração da genipina com os preparados enzimáticos a 5 %: Celluclast® (★), Lallzyme Beta™ (▲), Pectinex Smash® (■), Pectinex Ultra Color® (●) e na ausência de enzimas (○). (b) Melhores preparados para extração de genipina em diferentes concentrações: Celluclast® 10 % (★), Lallzyme Beta™ 10 % (▲), Celluclast® 1 % (■), Lallzyme Beta™ 1 % (●) and without enzyme (○).

A maior extração de genipina com preparados a 5 % foi verificada utilizando Celluclast® e Lallzyme Beta®, nos tempos de 90 min, sendo 81,38 e 69,35 mg<sub>genipina</sub>.g<sub>jenipapo</sub><sup>-1</sup>, respectivamente. Quando avaliados em diferentes concentrações (Figura 1b), ambos extraíram mais quando usadas a 10 % em um tempo de 150 min, 97,33 e 82,52 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente. O melhor preparado até o momento, Celluclast®, foi testado a 20 %, porém não mostrou maiores resultados e o teste utilizando acetato de etila somente no final da extração não se mostrou mais eficaz do que o método proposto. Através do HPLC foi verificada alta pureza do composto, aproximadamente 98 %.

### CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a utilização de celulasas e β-glicosidasas são essenciais para extração da genipina e que até o momento este trabalho mostra a melhor extração de genipina, 97,33 mg.g<sup>-1</sup>, verificada na bibliografia atual, quando comparado com extrações partindo de um extrato vegetal. Futuramente, se pretende avaliar a influencia do pH e temperatura na extração, imobilizar uma enzima utilizando quitosana e a genipina extraída e comparar a resistência entre filmes de quitosana/genipina e quitosana/glutaraldeído.



# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bentes ADS, de Souza H a. L., Amaya-Farfan J, Lopes AS, de Faria LJG. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. *J Food Sci Technol* 2014;52:3919–24.
- Cai L, Li R, Tang W, Meng G, Hu X, Wu T. Antidepressant-like effect of geniposide on chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats by regulating the hypothalamus – pituitary – adrenal axis. *Eur Neuropsychopharmacol* 2015;25:1332–41.
- Carrillo-Ocampo D, Bazaldúa-Gómez S, Bonilla-Barbosa JR, Aburto-Amar R, Rodríguez-López V. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules* 2013;18:12109–18. doi:10.3390/molecules181012109.
- Chen JK. Chinese Medical Herbology and Pharmacology. Art Med Press 2004 e 2009:1336.
- Chiov T. Seed leaflet: *Genipa americana* L. Embrapa, Danida For Seed Cent 2003:20–1.
- Coelho VPD, Agra MDF, Barbosa MRDV. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Rev Bras Farmacogn* 2006;16:170–7. doi:10.1590/S0102-695X2006000200007.
- de Souza AF, de Andrade ACS, Ramos FN, Loureiro MB. Ecophysiology and morphology of seed germination of the neotropical lowland tree *Genipa americana* (Rubiaceae). *J Ecol* 1999;15:667–80.
- Djerassi C, Gray JD, Kincl FA. Naturally occurring oxygen heterocyclics. IX. Isolation and characterization of genipin. *J Org Chem* 1960;25:2174–7.
- Dong Y, Liu L, Bao Y, Hao A, Qin Y, Wen Z, et al. Biotransformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* to genipin by *Trichoderma harzianum* CGMCC 2979. *Cuihua Xuebao/Chinese J Catal* 2014;35:1534–46.
- Endo T, Taguchi H. The Constituents of *Gardenia jasminoides*, geniposide and genipin-gentiobioside. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1973;21:2684–8.
- Feng Q, Cao H, Xu W, Li X, Ren Y, Du L. Apoptosis induced by genipin in human leukemia K562 cells: involvement of c-Jun N-terminal kinase in G<sub>0</sub>/M arrest. *Acta Pharmacol Sin* 2011;32:519–27.
- Fujikawa S, Yokota T, Koga K, Kumada JI. The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized  $\beta$ -glucosidase on calcium alginate gel. *Biotechnol Lett* 1987;9:697–702.
- Ghose TK. Measurement of Cellulase Activities. *Pure Appl Chem* 1987;59:257–68.
- Goto H, Takikawa H. Effect of genipin on cholestasis induced by estradiol-17 $\beta$ -glucuronide and lithocholate-3-O-glucuronide in rats. *Hepatol Res* 2010;40:524–9.
- Hamerski L, Furlan M, Silva DHS, Cavalheiro AJ, Eberlin MN, Tomazela DM, et al. Iridoid glucosides from *Randia spinosa* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 2003;63:397–400.
- Hou YC, Tsai SY, Lai PY, Chen YS, Chao PDL. Metabolism and pharmacokinetics of genipin and geniposide in rats 2008;46:2764–9. Itoh-Nashida T, Hiraiwa M, Uda Y. Purification and properties of beta-D-glucosidase (linamarase) from the butter bean, *Phaseolus lunatus*. *J Biochem* 1987;101:847–54.
- Kojima K, Shimada T, Nagareda Y, Watanabe M, Ishizaki J, Sai Y, et al. Preventive Effect of Geniposide on Metabolic Disease Status in Spontaneously Obese Type 2 Diabetic Mice and Free Fatty Acid-Treated HepG2 Cells. *Biol Pharm Bull* 2011;34:1613–8.
- Lee S-W, Lim J-M, Bhoo S-H, Paik Y-S, Hahn T-R. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Anal Chim Acta* 2003;480:267–74.
- Lee G-H, Lee M-R, Lee H-Y, Kim SH, Kim H-K, Kim H-R, et al. *Eucommia ulmoides* Cortex, Geniposide and Aucubin Regulate Lipotoxicity through the Inhibition of Lysosomal BAX. *PLoS One* 2014;9:e88017.
- Li L, Guo Y, Zhao L, Zu Y, Gu H, Yang L. Enzymatic Hydrolysis and Simultaneous Extraction for Preparation of Genipin from Bark of *Eucommia ulmoides* after Ultrasound, Microwave Pretreatment 2015:18717–31.
- Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing sugar. *Anal Chem* 1959:426–8.
- Morton JF. Genipap (*Genipa americana* L.). *Fruits Warm Clim* 1987:441–3.
- Muzzarelli R a. a. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr Polym* 2009;77:1–9. Muzzarelli R, El Mehtedi M, Bottegoni C, Aquili A, Gigante A. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Mar Drugs* 2015;13:7314–38.
- Nam KN, Choi Y-S, Jung H-J, Park GH, Park J-M, Moon S-K, et al. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. *Int Immunopharmacol* 2010;10:493–9.
- Peng Wang and GZGGZZHLLWJD. Purification and Characterization of a  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus niger* and Its Application in the Hydrolysis of Geniposide to Genipin. *J Microbiol Biotechnol* 2014;24:788–94.
- Ramos-de-la-peña AM, Renard CMGC, Wicker L, Montañez JC, García-cerda LA, Contreras-esquivel JC. Ultrasonics Sonochemistry Environmental friendly cold-mechanical / sonic enzymatic assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana*) 2014;21:43–9. Ramos-de-la-Peña AM, Montañez JC, Reyes-Vega M de la L, Hendrickx ME, Contreras-Esquivel JC. Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing. *LWT - Food Sci Technol* 2015;63:1347–50.
- Ramos-de-la-Peña AM, Renard CMGC, Montañez JC, Reyes-Vega M de la L, Contreras-Esquivel JC. Ultrafiltration for genipin recovery technologies after ultrasonic treatment of genipap fruit. *Biocatal Agric Biotechnol* 2015;4:11–6.
- Renhe IRT, Stringheta PC, Silva FF, de Oliveira TV. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. *Pesqui Agropecu Bras* 2009;44:649–52.
- Touyama R, Kenichiro I, Yoshio T, Masahiko Y, Takeshi I, Nobuharu M, et al. Studies on the BLue Pigments Produced from Genipin and Methylamine II On the formation Mechanisms of Borwnish Red intermediated leading to the Blue Pigment Formation. *Chem Pharm Bull* 1994;42:1571–8.
- Uemitsu, N, Kawasaki, H, Furuhashi, T, Miyoshi, K, Ohtaka T, Nomura A, Hasegawa T S, Y NM. Acute and subacute toxicity studies and local irritation study of glutaraldehyde. *Oyo Yakuri* 1976;12:1–32.
- Venditti A, Serrilli AM, Bianco A. Iridoids from *Bellardia trixago* (L.) All. *Nat Prod Res* 2013;27:1413–6.
- Wang SC, Lee SC, Hung CH, Liao HJ, Huang CM, Tsai TH. Using orthogonal arrays to obtain efficient and reproducible extraction conditions of geniposide and genipin in gardenia fruit with liquid chromatography-mass spectrometry determinations. *J Food Drug Anal* 2011;19:486–94.
- Wang XS, Wu YF, Dai SL, Chen R, Shao Y. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Ultrason Sonochem* 2012;19:1155–9.
- Winotapun W, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T. One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. *Enzyme Microb Technol* 2013;53:92–6. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.05.001.
- Xu M, Sun Q, Su J, Wang J, Xu C, Zhang T, et al. Microbial transformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis into genipin by *Penicillium nigricans*. *Enzyme Microb Technol* 2008;42:440–4.
- Yang D, Zhou M, Wei W, Zhu H, Fan X. SHORT COMMUNICATION Preparation of a genipin blue from egg protein and genipin 2012;26:765–9.
- Yang Y, Zhang T, Yu S, Ding Y, Zhang L, Qiu C, et al. Transformation of Geniposide into Genipin by Immobilized  $\beta$ -Glucosidase in a TwoPhase Aqueous-Organic System 2011:4295–304.
- Zhou T, Fan G, Hong Z, Chai Y, Wu Y. Large-scale isolation and purification of geniposide from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 2005;1100:76–80.
- Zhu Y-P. Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and Applications. Amsterdam Harwood Acad Publ 1998:706.