

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 86-87.
- [2] 王 兵, 王亚新, 赵红燕, 等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 215-218.
- [3] 李海华, 青 梅, 于 娟, 等. 甘草的研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 37(2): 199-204.
- [4] 徐建军, 马清河, 李海齐, 等. 甘草酸提取工艺研究[J]. 新疆中医药, 2013, 31(1): 40-43.
- [5] 朱中佳, 熊富良, 张雪琼, 等. 甘草总皂苷的提取纯化工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(2): 341-343.
- [6] 黄明进, 王文全, 沈寿茂. 甘草总黄酮和总皂苷成分的提取工艺及其含量分析[J]. 中国现代中药, 2010, 12(4): 24-27.
- [7] 田彦芳, 万海同, 朱紫焯, 等. 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺[J]. 中草药, 2016, 47(7): 1118-1125.
- [8] 叶 静, 肖美添, 汤须崇, 等. HPLC-ELSD法测定甘草中3种甘草皂苷的含量[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(4): 368-370.
- [9] 方诗琦, 瞿其扬, 仲欢欢, 等. 甘草中5种三萜皂苷的同时测定及主成分分析[J]. 中成药, 2016, 38(2): 336-341.
- [10] 李玉山. 甘草酸提取纯化工艺的研究进展[J]. 化学试剂, 2016, 38(5): 428-432.
- [11] 张 卉, 赵婷婷, 戴柳江, 等. 半仿生-酶法提取甘草中甘草酸的工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(9): 969-972.
- [12] Shabkhiz M A, Eikani M H, Sadr Z B, *et al.* Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root[J]. *Food Chem*, 2016, 210: 396-401.
- [13] 任桂玲, 李沈明, 郭艳玲, 等. 逆向连续循环低温提取金莲花口服液工艺研究[J]. 中草药, 2014, 45(14): 2022-2026.
- [14] 虞 立, 张宇燕, 杨洁红, 等. R语言多目标优化养阴通脑颗粒组方中3种黄酮类指标成分提取工艺[J]. 中草药, 2015, 46(8): 1156-1160.
- [15] 张 超, 韩 丽, 杨秀梅, 等. BP神经网络结合正交试验优化苦参方中荆芥挥发油的提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(1): 70-74.
- [16] Pernía-Espinoza A V, Ordieres-Meré J B, Martínez-de-Pisón F J, *et al.* TAO-robust backpropagation learning algorithm[J]. *Neural Netw*, 2005, 18(2): 191-204.

黄姜中薯蓣皂苷元提取工艺的优化

赵国强, 王常高, 林建国, 杜 馨, 蔡 俊*

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 发酵工程教育部重点实验室, 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430068)

摘要: 目的 优化黄姜中薯蓣皂苷元的提取工艺。方法 先优化自然预发酵的温度(45、52、62℃)和时间(12、24、36 h)。再以纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶酶量为影响因素, 薯蓣皂苷元得率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。结果 最佳自然预发酵条件为45℃发酵24 h, 52℃发酵12 h, 62℃发酵36 h; 最佳提取条件为纤维素酶酶量50 U/g, 木聚糖酶酶量100 U/g, 果胶酶酶量120 U/g, 薯蓣皂苷元得率0.845%, 比恒温自然发酵下提高了69%。结论 该方法稳定可行, 可用于提取黄姜中薯蓣皂苷元。

关键词: 黄姜; 薯蓣皂苷元; 提取

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)09-1834-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.014

Extraction optimization for diosgenin from *Dioscorea zingiberensis*

ZHAO Guo-qiang, WANG Chang-gao, LIN Jian-guo, DU Xin, CAI Jun*

(Ministry of Education Key Laboratory for Fermentation Engineering; Hubei Provincial Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation; School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

收稿日期: 2017-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(31401807)

作者简介: 赵国强(1992—), 男, 硕士生, 研究方向为发酵过程优化与放大。E-mail: 1144104685@qq.com

*通信作者: 蔡 俊(1968—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为发酵工程。E-mail: caijun@mail.hbut.edu.cn

KEY WORDS: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; diosgenin; extraction

黄姜学名盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, 别名火头根, 是薯蓣科薯蓣属植物, 为我国特有物种, 也是中药西制的原料药材^[1-2], 利用其根状茎可提取具有药理活性的薯蓣皂苷元^[3], 该成分主要存在于黄姜根茎中^[4], 是合成甾体类激素的主要原料中间体, 以其为原料合成的肾上腺皮质激素、性激素、孕激素和蛋白质类激素类药物多达300种, 享有“激素之母”的美誉^[5-6], 在抗皮肤衰老、抗癌症方面也具有重要作用。资料显示^[7], 中国近年来薯蓣皂苷元的年产量约为3000吨, 占世界总产量的60%, 其中2/3用于出口, 有着广阔的国际市场空间。

黄姜中除了含有皂素外, 还含有40%淀粉、50%纤维素以及其他成分^[8]。皂素是薯蓣属植物中皂苷的配基, 主要以皂苷形式存在^[9], 被黄姜细胞壁中大量的木质纤维素、半纤维素、果胶质等物质包裹^[10]。目前, 工业生产一直采用 Rothrock 等^[11]首创的直接酸水解法, 即预发酵、酸解、提取生产工艺^[5], 存在资源利用率低、收率低、污染严重等问题, 严重抑制了相关产业的发展^[12]。

国内外对如何提高该成分得率进行了大量研究^[13-21], 所得出的优化条件也不尽相同。本实验主要研究自然预发酵温度、时间组合及外加酶预发酵对薯蓣皂苷元提取率的影响, 并优化了提取条件, 以期为其工业化生产提供依据和指导。

1 材料与仪器

1.1 材料 黄姜(竹溪创艺皂素有限责任公司)。
1.2 仪器与试剂 纤维素酶(武汉新华扬生物股份有限公司, 活力单位3500 U/mL); 木聚糖酶(武汉新华扬生物股份有限公司, 活力单位49000 U/mL); 果胶酶(武汉新华扬生物股份有限公司, 活力单位8000 U/mL)。SHB-III A 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); DNP-9052 电热恒温培养箱(上海精宏公司); DZTW 调温电热套(北京市永光明公司); 电热干燥箱(重庆银河公司)。

2 方法

2.1 流程 取适量新鲜黄姜, 洗净捣碎后进行预发酵处理, 将处理好的粉碎物转移至圆底烧瓶中, 加入1 mol/L 硫酸回流水解6 h, 用热水将滤渣抽滤至中性, 烘箱中105℃下烘干, 滤渣粉碎成粉末, 石油醚索氏提取, 提取液浓缩、结晶, 用石油

醚洗涤后置于烘箱中烘干至恒重, 即得。

2.2 自然预发酵条件优化 取新鲜黄姜洗净晾干, 加水粉碎, 进行自然预发酵, 温度分段控制为45、52、62℃, 发酵总时间为72 h, 调节不同温度段的发酵时间进行自然发酵, 以58℃恒温自然发酵72 h作为对照, 见表1。

表1 自然预发酵条件

Tab. 1 Natural spontaneous fermentation conditions

编号	时间/h		
	45℃	52℃	62℃
1	12	24	36
2	12	36	24
3	24	12	36
4	24	36	12
5	36	12	24
6	36	24	12

2.3 加酶预发酵 在确定的最佳自然发酵(不加酶或菌种)条件基础上, 先添加不同用量外源酶, 再进行分段控温发酵, 检测不同外源酶对薯蓣皂苷元得率的影响。

2.3.1 纤维素酶酶量 在黄姜中加入0、10、50、90、130、170 U/g 纤维素酶, 进行分段控温发酵, 最后检测薯蓣皂苷元得率。

2.3.2 木聚糖酶酶量 在黄姜中加入0、20、60、80、100、120 U/g 木聚糖酶, 进行分段控温发酵, 最后检测薯蓣皂苷元得率。

2.3.3 果胶酶酶量 在黄姜中加入0、40、80、120、160、200 U/g 果胶酶, 进行分段控温发酵, 最后检测薯蓣皂苷元得率。

2.3.4 多酶协同作用优化 在单酶试验的基础上, 采用正交试验对3种酶的添加量进行优化, 以薯蓣皂苷元得率为评价指标。

3 结果

3.1 自然预发酵条件优化 由表2可知, 在3号组合(45℃24 h、52℃12 h、62℃36 h)下薯蓣皂苷元得率最高, 为0.61%, 与对照组(0.5%)相比提高了22%, 表明分段控温有利于发挥不同酶各自的最佳作用。

表2 薯蓣皂苷元得率测定结果

Tab. 2 Results of diosgenin yield determination

组号	对照	1	2	3	4	5	6
皂苷元得率/%	0.50	0.58	0.51	0.61	0.48	0.55	0.59

3.2 加酶预发酵条件优化

3.2.1 纤维素酶酶量 纤维素酶能降解黄姜中的纤维素,破坏细胞壁^[22],促进皂苷的释放,从而提高薯蓣皂苷元的得率。将不同量纤维素酶加入黄姜中,在“2.2”项最佳条件下进行分段控温发酵,结果见图1,可知当纤维素酶添加量为90 U/g原料时,皂苷元得率最高,为0.751%。

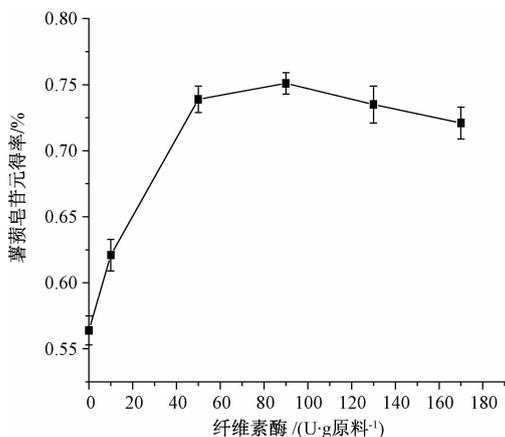


图1 纤维素酶酶量对薯蓣皂苷元得率的影响

Fig. 1 Effect of cellulase amount on diosgenin yield

3.2.2 木聚糖酶酶量 将不同量木聚糖酶加入黄姜中,在“2.2”项最佳条件下进行分段控温发酵,结果见图2。由图可知,薯蓣皂苷元得率随酶量增大而增大,在80 U/g原料时最高,为0.753%;再增大酶量,得率反而减小。

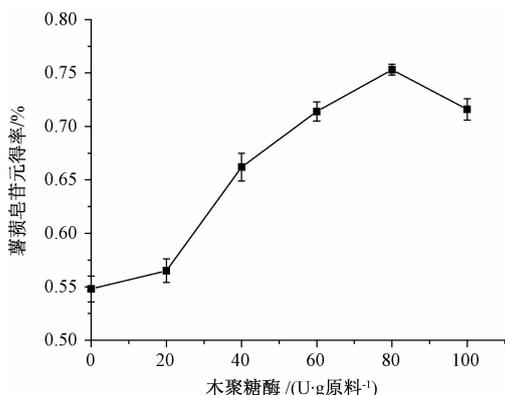


图2 木聚糖酶酶量对薯蓣皂苷元得率的影响

Fig. 2 Effect of xylanase amount on diosgenin yield

3.2.3 果胶酶酶量 果胶酶可分解果胶质,有利于促进黄姜皂苷释放,从而提高薯蓣皂苷元得率。将不同量果胶酶加入黄姜中,在“2.2”项最佳条件下进行分段控温发酵,结果见图3。由图可知,当果胶酶酶量为80 U/g原料时,薯蓣皂苷元得率最高,为0.84%。

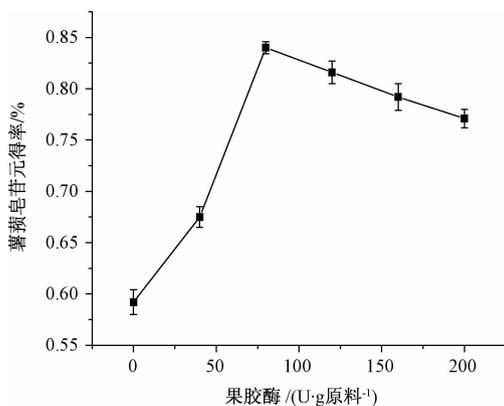


图3 果胶酶酶量对薯蓣皂苷元得率的影响

Fig. 3 Effect of pectinase amount on diosgenin yield

3.2.4 多酶协同作用优化 因素水平见表3,试验设计和结果见表4,方差分析见表5。由表4可知,3种酶对薯蓣皂苷元得率的影响程度依次为纤维素酶(A) > 木聚糖酶(B) > 果胶酶(C);由表5可知,因素A对薯蓣皂苷元得率有显著影响($P < 0.05$),而B、C影响不显著($P > 0.05$)。理论最优组合为 $A_2B_4C_4$,即纤维素酶50 U/g原料、木聚糖酶100 U/g原料、果胶酶120 U/g原料,而实际最优条件组合为 $A_3B_4C_2$ (实验号12),即纤维素酶90 U/g原料、木聚糖酶100 U/g原料、果胶酶40 U/g原料,将两者进行3次对比实验,发现 $A_2B_4C_4$ 得率(0.845%)比 $A_3B_4C_2$ (0.794%)高,故最终选择前者。

表3 因素水平

Tab. 3 Factors and levels

水平	因素		
	A 纤维素酶/ (U·g原料 ⁻¹)	B 木聚糖酶/ (U·g原料 ⁻¹)	C 果胶酶/ (U·g原料 ⁻¹)
1	0	0	0
2	50	60	40
3	90	80	80
4	130	100	120

4 讨论

提取得率偏低是薯蓣皂苷元生产面临的主要问题,而通过预发酵处理,利用黄姜自身内源性或外加酶的作用可促进其游离或释放,从而提高得率。目前,工业上主要是利用内源性酶的作用,采用恒定温度(58℃)进行预发酵处理,但黄姜自身含多种内源性酶,且不同酶的最适作用温度不尽相同,因此采用变温发酵有利于分别发挥不同酶的最佳作用,提高该成分最终得率,本实验结果也证明了这一点。

表4 试验设计与结果

Tab. 4 Design and results of tests

试验号	因素			薯蓣皂苷元 得率/%
	A	B	C	
1	1	1	1	0.556
2	1	2	2	0.530
3	1	3	3	0.623
4	1	4	4	0.722
5	2	1	2	0.684
6	2	2	1	0.666
7	2	3	4	0.807
8	2	4	3	0.724
9	3	1	3	0.677
10	3	2	4	0.686
11	3	3	1	0.674
12	3	4	2	0.840
13	4	1	4	0.634
14	4	2	3	0.659
15	4	3	2	0.672
16	4	4	1	0.683
\bar{K}_1	0.608	0.638	0.645	—
\bar{K}_2	0.720	0.635	0.681	—
\bar{K}_3	0.719	0.694	0.671	—
\bar{K}_4	0.662	0.742	0.712	—
R	0.112	0.107	0.067	—

表5 方差分析

Tab. 5 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
截距	7.340	1	7.340	3151.836	0.000
A	0.035	3	0.012	4.967	0.046
B	0.031	3	0.010	4.483	0.056
C	0.009	3	0.003	1.341	0.347
误差	0.014	6	0.002	—	—
总和	7.429	16	—	—	—

尽管黄姜自身含有各种内源性酶,但其含量是有限的,故通过添加各种外源酶来加强作用,可进一步提高薯蓣皂苷元得率。本研究通过一系列筛选,最终选取对其得率有明显提高作用的纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶,并通过单因素试验和正交试验优化其酶量。

今后,本课题组将对薯蓣皂苷元提取过程中的淀粉水解及增加还原糖得率进行优化,以期进一步提高其最终得率,从而为相关工业化生产提供指导。

参考文献:

[1] Huang W, Zhao H, Ni J, et al. The best utilization of *D. zingiberensis* C. H. Wright by an eco-friendly process[J]. *Biore-source Technol*, 2008, 99(15): 7407-7411.
[2] 林向阳. 盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元提取工艺的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2006.

[3] 程鹏, 赵华章, 付东康, 等. 黄姜加工废水处理技术研究进展[J]. *南水北调与水利科技*, 2009, 7(6): 36-41.
[4] 佟玲, 张胜科, 李锦, 等. 酶解法提取薯蓣皂素的工艺研究[J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 2003, 31(2): 81-83.
[5] 王悦, 晁芳芳. 黄姜皂素的清洁生产工艺研究及资源综合利用[J]. *咸阳师范学院学报*, 2012, 27(2): 35-37.
[6] 黄诗铨, 张希. 中国黄姜生产的现状及对策[J]. *世界农业*, 2003(9): 49-50.
[7] 周雯. 穿龙薯蓣、黄姜薯蓣中皂甙提取, 纯化及检测方法的研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2008.
[8] 李江浩, 葛台明. 黄姜皂素提取工艺研究进展[J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2014, 45(3): 476-480.
[9] 向纪明, 李金灿. 黄姜中提取薯蓣皂素的新工艺研究[J]. *安康学院学报*, 2003, 15(1): 56-59.
[10] 魏蜜. 微生物法清洁生产黄姜皂素新技术及工程化研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
[11] Rothrock J W, Hammes P A, Mcaleer W J. Isolation of diosgenin by acid hydrolysis of saponin[J]. *Ind Eng Chem*, 1957, 49(2): 186-188.
[12] 李耀辰, 周旋, 刘超, 等. 黄姜皂素清洁生产工艺试验研究[J]. *环境科学与技术*, 2008, 31(1): 136-138.
[13] Liu L, Dong Y S, Qi S S, et al. Biotransformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin by *Trichoderma harzianum* [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2010, 85(4): 933-940.
[14] Liu L, Dong Y S, Xiu Z L. Three-liquid-phase extraction of diosgenin and steroidal saponins from fermentation of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. *Process Biochem*, 2010, 45(5): 752-756.
[15] Peng Y, Wang Y, Yang Z, et al. Content increase of spirostanol saponins during enzymatic hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2010, 49(17): 8279-8281.
[16] Zhu Y, Huang W, Ni J. A promising clean process for production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. *J Clean Prod*, 2010, 18(3): 242-247.
[17] Zhu Y L, Ni J R, Huang W. Process optimization for the production of diosgenin with *Trichoderma reesei* [J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2010, 33(5): 647-655.
[18] Zhu Y L, Huang W, Ni J R, et al. Production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* tubers through enzymatic saccharification and microbial transformation [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2010, 85(5): 1409-1416.
[19] 钟桂芳, 刘径羽, 番攀, 等. 复合酶法提取薯蓣皂素的研究[J]. *中国酿造*, 2013, 32(5): 62-66.
[20] 王昌利, 张振光, 杨景亮, 等. 超声提高薯蓣皂甙得率的实验研究[J]. *中成药*, 1994, 16(4): 7-8.
[21] 王新军, 韩菊, 魏福祥. 薯蓣皂甙元提取方法的研究进展[J]. *河北工业科技*, 2006, 23(5): 317-320.
[22] 乔振杰. 盾叶薯蓣中薯蓣皂甙元提取工艺的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.