

酶解法提取胡芦巴种子中薯蓣皂苷元的工艺研究

张黎明, 张露亿, 杜连祥

(天津科技大学食品科学与生物工程学院, 天津 300222)

摘要: 研究了酶解结合水浸提法从脱脂胡芦巴种子中提取薯蓣皂苷元的工艺。以薯蓣皂苷元的提取率为指标, 优化了该法制备薯蓣皂苷元的工艺条件, 得到以下结论: 与水浸提法相比, 采用酶解法有利于提高皂苷元的提取率; 确定料液比为 1:14, 纤维素酶(每克原料 10U, pH 值 4.6, 45℃) 酶解 6 h 为最佳工艺条件。在此基础上考察了酶解结合水浸提法对皂苷元提取率的影响, 发现酶解后升温至 90~100℃, 保温水浸提 70 min, 可使薯蓣皂苷元的提取率由 83.8% 提高到 92.9%。

关键词: 胡芦巴; 纤维素酶; 薯蓣皂苷元; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-6819(2005)02-0161-04

张黎明, 张露亿, 杜连祥. 酶法提取胡芦巴种子中薯蓣皂苷元的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(2): 161-164

Zhang Liming, Zhang Luyi, Du Lianxiang. Technology for extracting diosgenin from seeds of *Trigonella foenum-graecum* through enzymatic hydrolysis[J]. Transactions of the CSAE, 2005, 21(2): 161-164 (in Chinese with English abstract)

0 引言

酶工程技术用于天然产物有效成分提取的研究始于 20 世纪 90 年代, 由于植物细胞壁主要是由纤维素组成的, 纤维素酶可以催化纤维素 β D-葡萄糖苷键的裂解, 破坏植物细胞壁, 促进植物有效成分的浸出, 因此国内外学者的研究主要集中在利用纤维素酶法提取植物有效成分方面^[1], 已经有纤维素酶法从葛根中提取葛根总黄酮, 从金银花中提取绿原酸和从三七中提取三七总皂苷的报道。张彩霞等^[1]将纤维素酶用于穿山龙的提取, 结果在纤维素酶的作用下, 提高了薯蓣皂苷元的得率。而纤维素酶用于胡芦巴种子中提取薯蓣皂苷元的研究尚未见报道。

胡芦巴 (*Trigonella foenum-graecum* L.) 系豆科蝶形花亚科一年生草本植物, 其种子含有 0.2%~0.8% 的薯蓣皂苷元^[2]。从胡芦巴种子中提取薯蓣皂苷元与从盾叶薯蓣(穿山龙、黄姜等)中提取的工艺有很大的区别, 前者薯蓣皂苷元存在于种子中, 要考虑胡芦巴种子中的豆胶(半乳甘露聚糖)、蛋白质及其它化学成分的综合利用问题, 因此采用先提取总皂苷, 再用酸水解的工艺。而后者皂苷元存在于植物的根茎, 用预发酵、直接酸水解盾叶薯蓣的根茎的方法生产。

薯蓣皂苷元是合成甾体激素的主要原料, 我国主要以穿龙薯蓣和盾叶薯蓣为原料进行生产。由于薯蓣植物生长周期长, 采挖时又会造成薯蓣植物毁灭性破坏, 影响生态环境, 因而胡芦巴植物作为薯蓣皂苷元新资源的研究在国内也得到广泛的关注^[3,4]。胡芦巴在我国黑龙江、吉林、安徽、宁夏、新疆等地种植面积较大, 它作为薯

蓣的补充资源加以开发利用, 不但可以缓解薯蓣皂苷元原料的不足, 而且还可以起到保护环境的作用。

考虑到胡芦巴种子中残留的半乳甘露聚糖会增大提取液粘度, 妨碍薯蓣皂苷元的分离, 胡芦巴总皂苷的提取温度不宜过高, 一般在 40~50℃。而此温度范围正好是纤维素酶活性温度的范围, 纤维素酶可以促进植物有效成分的浸出, 同时还能促进残留半乳甘露聚糖主链 β D-甘露糖苷键的水解, 降低提取液的粘度。因此本文旨在探讨纤维素酶对胡芦巴种子中薯蓣皂苷元浸出的影响。

1 材料与方法

1.1 试验原料、仪器与试剂

脱豆胶胡芦巴豆粉(天津药业集团有限公司提供) 40 目, 在提取薯蓣皂苷元之前, 置于索氏萃取器中, 用石油醚(沸程 60~90℃)作溶剂提取 8 h, 回收石油醚得胡芦巴油及脱脂胡芦巴豆粉; 纤维素酶(天津市利华酶制剂技术有限公司, 酶活力 40000 U·g⁻¹); 标准薯蓣皂苷元(天津药典标准仪器药品开发公司)。710 型紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂); SXFT-IR 型红外光谱仪(美国尼高力仪器公司); 熔点用 XT6 型显微熔点测定仪(北京市科仪电光仪器厂)。

1.2 纤维素酶法提取薯蓣皂苷元的试验

1.2.1 料液比对薯蓣皂苷元提取率的影响

称取胡芦巴豆粉 25 g, 分别按料液比(每克胡芦巴豆粉加水的毫升数)1:8, 1:10, 1:12, 1:14 和 1:16 加水至胡芦巴豆粉中, 热水浴(50℃)中搅拌提取 4 h, 纱布过滤至滤液无固形物, 用 100 mL 去离子水分两次洗涤滤渣, 合并滤液, 真空浓缩至 100 mL。按文献[5]所述方法, 加浓硫酸 2.1 mL, 石油醚 100 mL, 于电热套中回流 4 h 水解薯蓣皂苷, 倾出、冷却、分层, 取石油醚层, 先用碳酸钠溶液洗至中性, 再用蒸馏水洗, 得薯蓣皂苷元的石油醚溶液, 定容于 250.0 mL 容量瓶。测定薯蓣皂苷元的含量, 选择最佳料液比。

收稿日期: 2004-04-19 修订日期: 2004-12-15

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金资助项目(20031210)

作者简介: 张黎明(1963-), 男, 山西清徐人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事生物催化剂在天然资源开发中的应用研究。天津科技大学食品科学与生物工程学院, 300222。Email: zhanglm@d@yahoo.com.cn

1.2.2 纤维素酶最适酶解 pH 值的选取

称取胡芦巴豆粉 25 g, 选择料液比 1:14, 纤维素酶以每克原料 10 U 的量加入, 用 NaAc-HAc 缓冲液调节 pH 值分别为 4.2、4.6、5.0 和 5.5, 热水浴(50℃)中搅拌提取 4 h 后迅速升温至 90~100℃, 保温 10 min, 使酶失活, 室温下纱布过滤至滤液无固形物, 其余按 1.2.1 操作得薯蓣皂苷元, 测定其的含量, 选择纤维素酶的最适 pH 值。

1.2.3 纤维素酶最适酶解温度的选取

称取胡芦巴豆粉 25 g, 选择料液比 1:14, 用 NaAc-HAc 缓冲液调节 pH 值为 4.6, 纤维素酶以每克原料 10 U 的量加入, 分别在 40℃、45℃、50℃ 和 55℃ 热水浴中搅拌提取 4 h 后迅速升温至 90~100℃, 保温 10 min, 使酶失活, 其余按 1.2.2 操作得薯蓣皂苷元, 测定其的含量, 选择纤维素酶的最适酶解温度。

1.2.4 纤维素酶最适作用时间的选取

称取胡芦巴豆粉 25 g, 选择料液比为 1:14, 用 NaAc-HAc 缓冲液调节 pH 值为 4.6, 纤维素酶以每克原料 10 U 的量加入, 于 45℃ 分别酶解 2 h、4 h、6 h、8 h 后迅速升温至 90~100℃, 保温 10 min, 使酶失活, 其余按 1.2.2 操作得薯蓣皂苷元, 测定其的含量, 选择纤维素酶的最适作用时间。

1.2.5 纤维素酶最适酶用量的选取

称取胡芦巴豆粉 25 g, 选择料液比为 1:14, 用 NaAc-HAc 缓冲液调节 pH 值为 4.6, 调节每克原料加入纤维素酶的量分别为 2 U、6 U、10 U、14 U、18 U, 于 45℃ 分别酶解 6 h 后迅速升温至 90~100℃, 保温 10 min, 使酶失活, 其余按 1.2.2 操作得薯蓣皂苷元, 测定其的含量, 选择纤维素酶的最佳酶用量。

1.2.6 酶解法与酶解结合水浸提法两种工艺对薯蓣皂苷元提取效果比较

各取胡芦巴豆粉 25 g, 选择料液比为 1:14, 分别采用酶解法(调节 pH 值为 4.6, 每克原料加入纤维素酶 10 U, 45℃ 酶解 6 h)和酶解结合水浸提法(按纤维素酶解工艺条件酶解后升温至 90~100℃, 保温 10 min 使酶失活, 在该条件下继续浸提 60 min)提取皂苷元, 通过测定皂苷元的含量, 比较两种工艺的提取效果。

以上试验均做 3 次重复, 结果取平均值。

1.3 薯蓣皂苷元的定量测定方法

采用分光光度法^[6]。

1.3.1 标准曲线的绘制

精确称取标准薯蓣皂苷元 25.00 mg, 用少量石油醚溶解, 然后用石油醚定容至 100 mL。分别准确吸取 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80 mL 于磨口具塞试管中, 水浴挥干溶剂, 分别加入新配制 5% 香荚兰醛冰醋酸溶液 0.20 mL, 高氯酸 0.80 mL, 在 70℃ 水浴中加热 15 min, 冰水冷却, 加冰醋酸使其定容至 10.00 mL, 放置 30 min 后, 以不含皂苷元的随行试剂作参比, 用分光光度计在波长 530 nm 处测定其吸光度 A, 绘制浓度(C)与吸光度(A)的标准曲线。结果表明薯蓣皂苷元浓度在 1.00~20.00 mg/L 范围内与吸光度呈良好

线性关系, 得出回归方程为: $A = 0.0169C - 0.0082$, $r = 0.9960$ 。

1.3.2 样品含量测定

准确吸取酶解法或水浸提法所提取的薯蓣皂苷元石油醚溶液 5.00 mL, 水浴挥干溶剂, 按标准曲线绘制方法测定皂苷元的浓度, 然后换算出 25 g 胡芦巴豆粉中皂苷元的提取量。胡芦巴豆粉中皂苷元含量的测定按文献[6]的方法: 即准确称取脱脂胡芦巴豆粉 25.00 g, 酸解, 加饱和石灰水中和至 pH 值等于 7, 过滤后残渣再用蒸馏水洗涤三次, 抽滤, 残渣在 80℃ 下充分干燥, 将干燥后的残渣置索氏萃取器的滤纸筒中, 在萃取器的底部烧瓶中加入适量石油醚及少量活性炭, 加热回流 5 h, 使提取脱色一次完成。滤出活性炭, 用新鲜石油醚洗涤 4~6 次, 以确保活性炭中所吸附的皂苷元完全被洗脱下来。合并滤液及洗涤液, 并用新鲜石油醚定容到 250 mL。按 1.3.1 测定薯蓣皂苷元的含量。皂苷元的提取率为酶解法或水浸提法所得薯蓣皂苷元占胡芦巴豆粉中皂苷元含量的百分数。

1.4 红外光谱分析及熔点测定

薯蓣皂苷元用 KBr 压片, SXFT-IR 型红外光谱仪测定; 熔点用 XT6 型显微熔点测定仪测定(温度计未校正)。

2 结果与讨论

2.1 料液比对薯蓣皂苷元提取率的影响

料液比对薯蓣皂苷元提取率的影响见表 1。由表 1 可知料液比由 L₁ 递增至 L₄ 时, 薯蓣皂苷元的提取率从 27.2% 增加到 50.6%, L₁、L₂、L₃ 和 L₄ 两两间存在显著差异; 而从 L₄ 到 L₅ 时薯蓣皂苷元的提取率增加相对缓慢, 两者之间差异在 $\alpha = 0.01$ 水平不显著, 故本实验选择 1:14 作为最佳料液比。

表 1 料液比对薯蓣皂苷元提取率的影响(重复次数 $n = 3$)
Table 1 Effect of solute mass/solvent volume ratio (g/mL) on the extraction ratio of diosgenin ($n = 3$)

料液比(m/v) /g · mL ⁻¹	皂苷元质量 [*] /mg	提取率 /%	标准偏差 /%
1:8(L ₁)	68.0	27.2eD	1.91
1:10(L ₂)	90.5	36.2dC	1.76
1:12(L ₃)	108.3	43.3cB	2.05
1:14(L ₄)	126.5	50.6bA	2.11
1:16(L ₅)	131.8	52.7aA	1.50

注: * 25.0 g 胡芦巴豆粉所得皂苷元质量, 表 2 至表 5 与此相同; 同列数字后有相同大、小写字母分别表示差异未达到 0.01 和 0.05 的显著水平, 表 2 至表 5 与此相同。

2.2 纤维素酶最适 pH 值的选取

酶解 pH 值对薯蓣皂苷元提取率的影响见表 2 所示。由表 2 中数据可以看出, 与表 1 水浸提法结果相比, 酶解法可以提高薯蓣皂苷元的提取率。在 pH 值 4.6 酶解和 pH 值 4.2、5.0 和 5.5 条件的结果存在极显著差异, 薯蓣皂苷元提取率从 pH 值 4.2 到 4.6 随酶解 pH 值的增加而逐渐增加到最大, pH 值超过 4.6 后开始减小, 当 pH 值为 5.5 时, 提取率递减至 64.7%, 因此选择纤维素酶的最适 pH 值为 4.6。

表 2 酶解 pH 值对薯蓣皂苷元提取率的影响(重复次数 $n = 3$)Table 2 Effect of the pH value of enzymatic hydrolysis on the extraction ratio of diosgenin ($n = 3$)

酶解 pH	皂苷元质量*/mg	提取率/%	标准偏差/%
4.2	147.5	59.0dD	2.22
4.6	210.3	84.1aA	2.09
5.0	195.1	78.0bB	1.87
5.5	161.8	64.7cC	1.46

2.3 纤维素酶最适酶解温度的选取

酶解温度对薯蓣皂苷元提取率的影响见表 3 所示。由表中结果可知, 酶解温度为 40、45、50 和 55 彼此间存在显著性差异, 纤维素酶的最适酶解温度为 45, 在该温度下薯蓣皂苷元的提取率为 83.3%, 而在 40、50 和 55 下酶解提取胡芦巴豆粉中皂苷元的提取率都偏低, 故选择纤维素酶的最适酶解温度为 45。

表 3 酶解温度对薯蓣皂苷元提取率的影响(重复次数 $n = 3$)Table 3 Effect of the temperature of enzymatic hydrolysis on the extraction ratio of diosgenin ($n = 3$)

酶解温度/°C	皂苷元质量*/mg	提取率/%	标准偏差/%
40	130.5	52.2dD	1.96
45	208.3	83.3aA	2.06
50	187.8	75.1bB	1.55
55	165.0	66.0cC	2.26

2.4 纤维素酶最适作用时间的选取

纤维素酶的酶解作用时间与薯蓣皂苷元提取率的关系见表 4, 从表 4 可以看出, 纤维素酶解时间 2 h、4 h、6 h 彼此间存在极显著差异, 从 2 h 变化到 6 h 时, 薯蓣皂苷元的提取率时随酶解时间的增加提取率逐渐增大, 增加幅度较大; 而 6 h 和 8 h 之间差异不显著, 说明纤维素酶作用 6 h 时已经基本发挥作用, 因而选择 6 h 作为纤维素酶的最适作用时间。

表 4 酶解作用时间对薯蓣皂苷元提取率的影响(重复次数 $n = 3$)Table 4 Effect of the time of enzymatic hydrolysis on the extraction ratio of Diosgenin ($n = 3$)

酶解时间/h	皂苷元质量*/mg	提取率/%	标准偏差/%
2	129.0	51.6cC	1.82
4	183.3	73.3bB	2.07
6	202.0	80.8aA	1.43
8	207.5	83.0aA	1.90

2.5 纤维素酶最佳酶用量的选取

纤维素酶的用量对薯蓣皂苷元提取率的影响列入表 5, 从该表所列出的数据可以看出, 纤维素酶的用量为每克胡芦巴豆粉 2U、6U、10U 彼此间存在显著差异, 而用量为每克胡芦巴豆粉 10U、14U、18U 彼此之间无明显差异, 因此说明 10U 纤维素酶是 1 g 胡芦巴豆粉的

最佳酶用量。

表 5 酶用量对薯蓣皂苷元提取率的影响(重复次数 $n = 3$)Table 5 Effect of the amount of cellulase on the extraction ratio of diosgenin ($n = 3$)

酶用量/U · g ⁻¹	皂苷元质量*/mg	提取率/%	标准偏差/%
2	161.3	64.5cC	1.79
6	175.8	70.3bB	1.99
10	206.7	82.7aA	1.65
14	210.3	84.1aA	2.04
18	203.8	81.5aA	1.56

2.6 酶解与酶解结合水浸提两种方法对薯蓣皂苷元提取效果比较

对酶解法与酶解结合水浸提法两种工艺对薯蓣皂苷元提取效果进行比较。本实验采用酶法提取薯蓣皂苷元的方法包括酶促反应和热浸提两个阶段。第一阶段主要作用是酶解植物细胞壁, 大部分中药材的细胞壁是由纤维素构成的, 植物的有效成分往往包裹在细胞壁内, 用纤维素酶可促进 β -D-葡萄糖苷键的水解而破坏植物细胞壁, 进而有利于有效成分的提取; 第二阶段通过热水浸提, 既具有灭酶活的作用, 同时又可增加薯蓣总皂苷的溶出率, 在酶法提取工艺中两个阶段同样重要。从两种方法的皂苷元的提取效果看, 酶解结合水浸提工艺的提取率明显高于单纯酶解, 前者的平均提取率为 92.9%, 标准偏差为 1.32%; 而后者的平均提取率只有 83.8%, 标准偏差为 1.30%, 用 q 检验法进行检验 ($P < 0.01$), 两种方法处理差异极显著, 酶解结合水浸提工艺的提取效果好。

2.7 薯蓣皂苷元的定性分析

用 SXFT-IR 型红外光谱仪测定从胡芦巴豆粉提取的薯蓣皂苷元(KBr 压片), 其结果见图 1。从图 1 可以看出, 红外光谱官能团的特征吸收频率 ν_{\max} , cm^{-1} 3451(OH), 1241, 1051(3β OH, C-5, 6 位双键), 982 和 919 处小于 898 和 865 处的吸收强度(C-25 位为 R 构型, 螺甾烷), 这些都是薯蓣皂苷元的特征峰; 而 1273、1225、1170 和 960 cm^{-1} 处出现的吸收峰在薯蓣皂苷元的标准图谱中不存在; 薯蓣皂苷元标准品的熔点为 202 ~ 204, 而实验测得从胡芦巴种子中得到的薯蓣皂苷元的熔点为 169.5 ~ 179.2, 因此可推断所提取的薯蓣皂苷元中含有杂质。文献报道^[7,8]这些杂质是雅姆、替告和芟托等皂苷元。

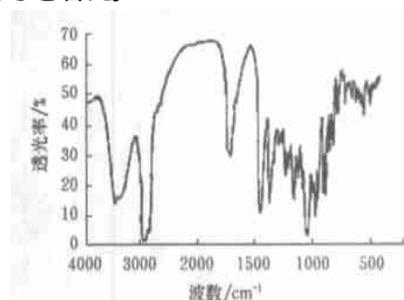


图 1 从胡芦巴豆粉提取的薯蓣皂苷元的红外光谱图

Fig. 1 Infrared absorption spectrum of diosgenin extracted from fenugreek seeds

3 结 论

与单纯水浸提法相比,采用纤维素酶法提取脱脂胡芦巴豆粉中的薯蓣皂苷元,能够提高皂苷元的提取率。纤维素酶作用的最优条件是:料液比 1:14,调节 pH 值 4.5,每克胡芦巴豆粉加纤维素酶 10U,在 45℃ 下酶解 6 h。在加酶提取后提高温度,采用热水浸提可进一步提高薯蓣皂苷元提取率。

[参 考 文 献]

- [1] 潘五九,肖小河,袁海龙,等. 中药生产关键共性新技术研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(4): 361- 367.
- [2] 丁 平. 一种值得研究和开发的资源植物—胡芦巴[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(2): 17- 19.
- [3] 封玉贤,周振起,淡 海,等. 从胡芦巴种子子叶和种皮中制取甾体皂苷元的研究[J]. 西北植物学报, 1997, 17(2): 242- 246.
- [4] 蒋建新,徐嘉生,朱莉伟. 经济植物胡芦巴的发展现状与前景[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(4): 19- 20.
- [5] 都述虎,夏重道,付铁军,等. 穿龙薯蓣总皂甙水解条件的优化[J]. 中成药, 2000, 22(9): 608- 610.
- [6] 陈战国,耿 征,刘谦光,等. 薯蓣皂甙元的分光光度的测定[J]. 分析化学, 1996, 24(2): 227- 229.
- [7] Murakami T, Kishi A, Matsuda H, et al. Medicinal foodstuffs XV II fenugreek seed (3): Structures of new furostanol-type steroid saponins, trigoneosides Xa, Xb, X Ib, X IIa, X IIb, and X IIIa, from the seeds of Egyptian *T. foenum -graecum* L. [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48 (7): 994- 1000.
- [8] Yoshiyuki M, Murakami T, Komatsu H, et al. Medicinal foodstuffs IV fenugreek seed (1): Structures of trigoneosides Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, and IIIb, new furostanol saponins from the seeds of Indian *T. foenum -graecum* L. [J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(1): 81- 87.

Technology for extracting diosgenin from seeds of *Trigonella foenum -graecum* through enzymatic hydrolysis

Zhang Lining, Zhang Luyi, Du Lianxiang

(School of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract A technology for extracting diosgenin from fenugreek seeds was studied by using enzymatic hydrolysis and water extraction methods. To take the extraction ratio of diosgenin as an index, the optimal enzymolysis conditions for improving the yield of diosgenin were investigated. The conclusion can be drawn as follows: compared with the simple water extraction methods, the enzyme treatment was beneficial to increasing yield of diosgenin; and the optimum enzymolysis parameters are: adding 14 times volume of water as much as that of sample and adding cellulase 10U per gram degreased fenugreek seeds, hydrolyzing for 6 h at 45℃ (pH 4.6). The further water-extracting results indicate that the extraction ratio of diosgenin could be increased by 9.1%, when the powdered fenugreek seed was extracted for 70 min at 90~100℃ after being enzyme-hydrolyzed.

Key words: *Trigonella foenum -graecum* L.; cellulase; diosgenin; extraction technology