

文章编号:1671-6833(2005)04-0048-03

# 不同酶法酶提取薯蓣皂苷元的研究

刘国际, 罗娜, 陈俊英, 曹文豪, 雒廷亮

(郑州大学化工学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**研究了复合酶法提取薯蓣皂苷元的酶解条件, 同时比较研究了复合酶法、纤维素酶法、淀粉酶法、糖化酶法的提取效果, 实验结果表明:纤维素酶法产品纯度最高;复合酶法产品收率最高, 在酶解条件方面具有时间短、温度低等特点。最后确定复合酶法为最佳方法, 提取薯蓣皂苷元的最佳酶解条件为:酶解时间为 16 h, 酶解温度 35℃, 酶解 pH 值 5.0, 每克黄姜用酶量为 0.04 g。

**关键词:**酶; 薯蓣皂苷元; 提取; 复合酶

**中图分类号:** R 284.2

**文献标识码:** A

## 0 引言

近年来, 酶法在中草药活性成分提取方面应用不少。中草药含有纤维素及淀粉, 将活性成分“包裹”与“屏蔽”起来, 这对活性成分的释出产生很大的干扰作用, 用酶降解纤维素及淀粉有利于活性成分的释出。

薯蓣皂苷元, 为合成甾体激素类药物和甾体避孕药的重要化工原料<sup>[1]</sup>, 在黄姜中是以薯蓣皂苷的形式存在的, 是薯蓣皂苷的配基, 薯蓣皂苷水解可得薯蓣皂苷元。黄姜除含有皂苷外还含有 40% 的淀粉和 50% 的纤维素等化学成分。目前, 文献上已有用单酶法<sup>[2~4]</sup>降解纤维素或淀粉的研究, 在此基础上作者提出同时降解纤维素和淀粉的复合酶法, 研究了其酶解条件, 并对纤维素酶法、淀粉酶法、糖化酶法的提取效果进行了比较研究, 从而确定最佳酶解方法, 希望对实际生产提供一定的理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、仪器

黄姜购自河南南阳; 纤维素酶(无锡星达生物工程有限公司, 活力单位 1 000 U/g); 淀粉酶(无锡星达生物工程有限公司, 活力单位 1 000 U/g); 糖化酶(无锡星达生物工程有限公司, 活力单位 1 000 U/g); 复合酶(上述纤维素酶、淀粉酶按质量比 1:1 混合); 石油醚, 沸程 60~90℃; 高氯酸,

70%~72%; 其他试剂均为分析纯。

UV-2102PC 型紫外可见分光光度计, 上海分析仪器总厂; PHS-3S 型 pH 计, 上海理达公司; 电子恒温水浴锅, 上海医疗器械五厂; SENCOR 系列旋转蒸发器, 上海申生科技有限公司; TDL-5-A 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; HZ-8811K 恒温振荡器, 太仓市科教器材厂; AB 204-N 电子天平, METTLER TOLEDO 公司; 旋片式真空泵。

### 1.2 实验方法

将黄姜洗净、烘干、粉碎后, 称取 10 g 的黄姜粉末, 置于一定的 pH 值缓冲溶液中, 分别加入一定量的酶, 于一定温度下恒温反应一定时间酶解后, 90℃ 酶灭活 10 min, 离心分离, 取滤渣烘干, 用 2.5 ml/L HCL 在 90℃ 恒温水浴中水解 5 h, 过滤, 烘干滤饼, 用石油醚(加入少量活性炭)于 90℃ 恒温水浴中索氏提取 8 h 后, 过滤得滤液, 挥干并回收溶剂, 得白色粉末, 重结晶粉末, 得白色针状晶体, 即为薯蓣皂素产品, 称重, 实验流程如图 1 所示。

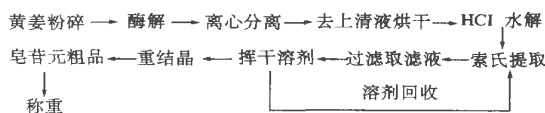


图 1 实验流程简图

Fig. 1 Flow chart of experiment

(1) 复合酶法: 用正交实验研究复合酶法的最佳酶解条件, 确定影响酶解效果的几个因子分

收稿日期: 2005-06-29; 修订日期: 2005-09-24

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(0523020300)

作者简介: 刘国际(1963-), 男, 河南南阳人, 郑州大学教授, 博士生导师, 主要从事化学反应工程方面的研究。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

别为:酶用量(A)、酶解PH值(B)、酶解温度(C)和酶解时间(D),酶解影响因子水平安排如表1所示.

表 1 因子水平安排  
Tab .1 Affecting factors and levels

因子	水平 1	水平 2	水平 3
A/g	0.2	0.4	0.6
B/pH	4.5	5.0	5.5
C/℃	35	40	45
D/h	8	16	24

(2) 淀粉酶法:淀粉酶法的酶解条件:时间为24h,温度为40℃,pH值为5.0,酶用量0.4g.

(3) 糖化酶法:糖化酶法的酶解条件:时间为24h,温度为50℃,pH值为5.6,酶用量为0.4g.

(4) 纤维素酶法:纤维素酶法的酶解条件:时间为24h,温度为40℃,pH值为5.0,酶用量为0.4g.

采用重量法<sup>[3]</sup>确定收率,所制薯蓣皂苷元粗品质质量除以黄姜粉末的质量即为薯蓣皂苷元收率.

## 2 薯蓣皂苷元的纯度鉴定

### 2.1 标准曲线的建立

准确称取105℃干燥至恒重的薯蓣皂苷元标准品3.9mg,加石油醚于25mL容量瓶中定容,混均,作0.159g/L标准品备用.按文献<sup>[9]</sup>方法采用紫外分光光度法检测,以样品浓度C为纵坐标,吸光值A为横坐标作线形回归得方程: $C=0.158\,008\times A+0.001\,126$ ;  $R^2=0.999\,3$ ,其线性范围为 $1.56\times10^{-6}\sim10.92\times10^{-6}$ g/L.

### 2.2 薯蓣皂苷元纯度的计算

按标准曲线方程的线性范围,准确称取新工艺下制备的薯蓣皂苷元产品5.0mg,于25mL容量瓶中配制成浓度为C<sub>1</sub>的样品溶液,取0.5mL检测吸光度A,重复三次实验取平均值A,利用标准曲线方程计算出薯蓣皂苷元溶液实际浓度C<sub>0</sub>,C<sub>0</sub>除以C<sub>1</sub>即为薯蓣皂苷元纯度.

## 3 结果与讨论

### 3.1 复合酶法实验结果

本文选用了L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)的正交表安排酶解实验,其实验结果如表2所示.

从正交实验结果分析可知,酶解初始pH值、温度、时间和酶用量对薯蓣皂苷元收率的影响程度大小先后顺序为:酶解初始pH值>酶解温度

>酶用量>酶解时间,理论上酶解最优条件为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>,从表中9种组合可以看出,最佳组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>,比较A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>与A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>,发现A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>条件下收率高于A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>,所以确定最优条件组合为:酶解初始pH值为5.0、温度35℃、时间16h和每克黄姜用酶量为0.04g.

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 实验设计表及实验结果  
Tab .2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) and experimental results

序号	A	B	C	D	收率/%
1	1	1	1	1	1.287
2	1	2	2	2	1.358
3	1	3	3	3	1.088
4	2	1	2	3	1.167
5	2	2	1	1	1.495
6	2	3	3	2	1.358
7	3	1	3	2	1.297
8	3	2	1	3	1.469
9	3	3	2	1	0.712
K <sub>1</sub>	3.733	3.751	4.251	3.494	
K <sub>2</sub>	4.020	4.322	3.237	4.013	
K <sub>3</sub>	3.478	3.158	3.743	3.724	
R	0.542	1.164	1.014	0.519	

在最佳工艺条件下进行了重现性实验,实验结果见表3,平均收率为1.51%.

表 3 重现性实验结果

Tab .3 Result of experimental repeatability			
序号	黄姜/g	皂苷元产量/g	收率/%
1	10	0.150 6	1.506
2	10	0.151 3	1.513
3	10	0.151 1	1.511

从表中可以看出,本实验确定的最佳工艺条件稳定性可行.

### 3.2 不同酶法实验结果比较

糖化酶法、淀粉酶法、纤维素酶法、复合酶法的实验结果见表4.

表 4 不同酶解方法比较表

Tab .4 Result of comparative experiments						
方法	A/g	B/pH	C/℃	D/h	收率/%	纯度/%
糖化酶法	0.4	5.0	50	24	1.06	69.87
淀粉酶法	0.4	5.0	40	24	1.17	70.73
纤维素酶法	0.4	5.0	40	24	1.23	71.68
复合酶法	0.4	5.0	35	16	1.51	70.15

表中的数据表明:从产品收率来看,复合酶法提取效率最高,纤维素酶次之,糖化酶最差;从产品纯度来看,纤维素酶法效果最佳,淀粉酶次之,糖化酶效果最差;从产品收率和纯度综合比较,纤维素酶法最佳;从酶解条件来看,复合酶法较其他

几种酶法具有温度低、时间短等优点.

4 结 论

( 1) 确定复合酶法提取黄姜中薯蓣皂苷元最佳酶解工艺条件为:酶解时间为 16h,酶解温度为 35℃,酶解 pH 值为 5.0,每克黄姜用酶量为 0.04g.

( 2) 纤维素酶法与其他几种酶法相较,产品纯度最高且产品收率也较高;复合酶法与其他相关提取方法比较,薯蓣皂苷元收率明显提高且纯度理想,在酶解条件方面还具有时间短、温度低等优点.综合比较,复合酶法较其他酶法具有一定优势.且本实验所选用的酶为粗制品,价格廉价,有助于薯蓣皂苷元大规模化生产.

参考文献:

[ 1] 彭司勋. 药物化学[M]. 北京:化学工业出版社.

[ 2] 周雨丝,朱 迟,陈思礼,等.应用糖化酶改良法提取黄姜皂素[J].湖北农业科学,2003,( 5):91~93.

[ 3] 佟 玲,张胜利. 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):81~82.

[ 4] 韩凤梅,姚向明. 盾叶薯蓣纤维素酶酶解工艺研究[J]. 化学与生物工程,2004,( 6):26~27.

[ 5] 石艳霞. 银屑灵冲剂中薯蓣皂苷元的重量测定[J]. 中医药动态,1993,9( 增刊):77~79.

[ 6] 王 俊,杨克迪. 分光光度法测定薯蓣皂苷元[J]. 分析实验室,2004,23( 1):97~100.

Study on Several Enzyme Methods of Extracting Diosgenin

LIU Guo -ji , LUO Na , CHEN Jun -ying , CAO Wen -hao , LUO Ting -liang

(School of Chemical Engineering ,Zhengzhou University , Zhengzhou 450002,China)

**Abstract :** The conditions of enzymatic hydrolysis of extracting diosgenin by complex enzyme method are studied , At the same time ,the comparative experiments are done among complex enzyme method ,cellulase method ,amylase method and glucoamylase method . The experimental results show that :compared with other methods the purity of diosgenin by cellulase method is the highest ;the yield of diosgenin extracted by complex enzyme is observably higher than other methods ;besides these ,complex enzyme method still has some characteristics in conditions of enzymatic hydrolysis such as little time ,low temperature and so on . Finally , complex enzyme method is determined as the best method of extracting diosgenin and its best conditions are determined as :hydrolysis temperature is 35℃ ,pH of the solution is 5.0,the time of enzymatic hydrolysis is 16h and the amount of enzymatic hydrolysis is 0.04g per dioscorea zingiberensis .

**Key words :** enzyme ; diosgenin ; extracting ; complex enzyme method