

发酵法改进蒺藜皂甙提取工艺的研究

钟桂芳, 时国庆, 赵新萍, 马庆一

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 本文探讨了皂甙三氯乙酸封管水解和丁酮内标与紫外扫描结合法用于微生物发酵法改进蒺藜皂甙的提取。实验结果表明, 经微生物发酵后再醇提工艺中的皂甙产率为单纯醇提工艺中皂甙产率的 2.28 倍。皂甙水解的最佳条件为: 使用 15%三氯乙酸水溶液, 以丁酮为内标, 封管 120 °C 反应 1 h, 产物用正己烷萃取, 在 207 nm 处读取吸光值。实验证明发酵法可明显提高蒺藜皂甙的提取率, 而三氯乙酸封管水解法作为一种简便、可靠的分析方法, 在皂甙研究领域具有良好的应用前景。

关键词: 蒺藜; 甙体皂甙; 发酵; 三氯乙酸封管水解; 紫外扫描

中图分类号: O629.13; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)05-0043-03

Improvement of the Extraction of Tribulus Terrestris via Pre-fermentation

ZHONG Gui-fang, SHI Guo-qing, ZHAO Xin-ping, MA Qing-yi

(School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The hydrolysis of saponins in sealed tube with trichloride acetic acid using butanone as internal standard and monitoring with UV scanning were firstly applied in the extraction of Tribulus Terrestris Saponins via pre-fermentation. The results showed that the extraction rate of Steroidal saponins via microorganism fermentation was 2.28 times higher than that without pre-fermentation. The optimal concentration of Trichloride acetic acid, internal standard, temperature for sealed tube and reaction time for the hydrolysis of Tribulus Terrestris saponins were 15%, butanone, 120 °C and 1 h, respectively. The most suitable extracting solvent was found to be n-hexane. Results showed that the extract rate of steroidal saponins was greatly improved after microorganism's fermentation. And the saponins hydrolysis in sealed tube with trichloride acetic acid was shown to be a simple and reliable monitoring method with promising application prospect.

Key words: Tribulus terrestris; Steroidal saponins; fermentation; Trichloride acetic acid; ultraviolet scan

蒺藜是一种常见中草药, 其所含甙体皂苷具有增强性功能、抗衰老和治疗心血管疾病的作用。国外已开发了增强性功能的“Tribustan”和“Vitanone”及软化血管的“Tribusaponin”等制剂。国内常用它治疗许多肝、肾及心血管疾病, 并用其茎叶为原料开发出“心脑血管舒通”等治疗心血管疾病的药物^[1-3]。

蒺藜皂甙的提取通常采用水提、醇沉后再用正丁醇萃取的方法, 但其得率往往很低^[4,5], 本文尝试采用微生物发酵辅助手段改进其提取工艺, 并使用三氯乙酸封管水解与紫外扫描结合法跟踪筛选过程, 以实现整个提取工艺最大限度的优化。

1 试验材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

蒺藜: 新鲜干燥, 购于郑州中药城, 经河南中医学院鉴定为中药刺蒺藜; 麸皮; 黑曲霉 (AS.3.4309):

收稿日期: 2007-01-19

作者简介: 钟桂芳, 女, 讲师, 研究方向为食品生物技术

通讯作者: 马庆一教授

购于中科院微生物所; 木霉菌株由本校微生物实验室提供; 756MC 紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); ZFQ85A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理及试剂配制

粉碎至 40 目蒺藜粉, 加入 3 倍量 (W/V) 石油醚在 60 °C 回流提取 1 h, 抽滤, 滤液弃去, 滤渣在 80 °C 下烘干备用。

黑曲霉 (AS.3.4309) 与木霉菌株均制成种子斜面, 28 °C 恒温培养 3 d, 用无菌蒸馏水刮下, 制成孢子悬浮液后备用。

15%三氯乙酸-1%丁酮: 三氯乙酸 15 g, 丁酮 1 mL, 蒸馏水定容至 100 mL。

1.2.2 标准曲线绘制

1.2.2.1 丁酮标准曲线绘制

取 8 支比色管, 分别加入 3 mL 正己烷和 10 μL、20 μL、30 μL、40 μL、50 μL、60 μL、70 μL、80 μL

丁酮，于 268 nm 处读取吸光度值，结果如表 1，曲线如图 1。

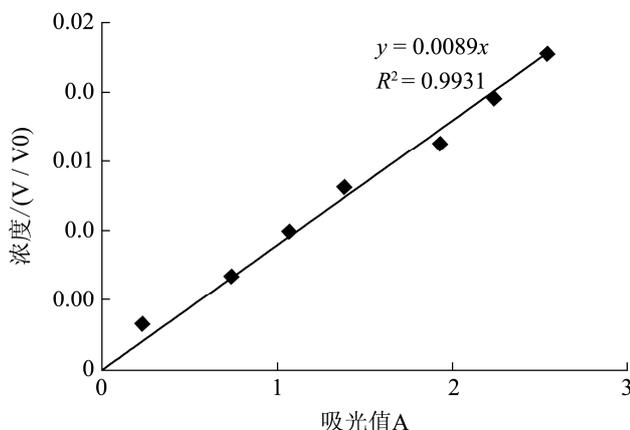


图 1 丁酮浓度标准曲线

1.2.2.2 皂甙元标准曲线绘制

皂甙元经过发酵后其糖基会有所变化，单纯用质量法考察皂甙元提取率是不确切的。这就需要皂甙元进行水解，以避免糖键对其影响，准确表征皂甙元提取率。本试验选取三氯乙酸对皂甙元进行水解。

2 g 蒺藜粉，用 70%乙醇(料液比 1:10, m/v)回流提取 2 次，每次 2 h 抽滤，合并滤液，定容至 200 mL 取 1 mL 蒸干，用 1 mL 15%三氯乙酸-1%丁酮溶液转入玻璃管，封管，120 °C 水解 1 h，小心打开封管，勿使液体损失，1 mL 正己烷萃取，测干重，另取定容后的液体同样操作得到 1 mL 正己烷萃取液^[6,7]。

取 5 支比色管，分别加入 3 mL 正己烷和 40 μL、60 μL、80 μL、100 μL、120 μL 正己烷萃取液，在 207 nm 波长测吸光值，结果如表 1，曲线如图 2，因此可计算出 K=6.1。

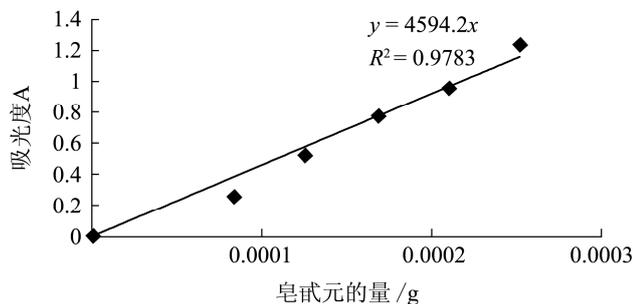


图 2 皂甙元标准曲线

表 1 不同浓度皂甙元己烷溶液对应的吸光值

样品体积/μL	40	60	80	100	120
皂甙元浓度/(g/mL)	0.084	0.126	0.168	0.21	0.252
皂甙元吸光度	0.309	0.520	0.648	0.762	0.955
丁酮吸光度	0.051	0.085	0.106	0.125	0.157

1.2.3 微生物发酵

取 6 个 250 mL 三角瓶，分别加入处理好的蒺藜粉 30 g 和 60 mL 水。在 11.05 kg/cm²、121.3 °C 下灭菌 20 min。无菌条件下接种不同孢子悬浮液，28 °C 下发酵 3 d，同样操作发酵 6 d。发酵后乙醇提取，提取液取 1/15 定容至 200 mL，取 1 mL 蒸干，用 1 mL 的 15% 三氟乙酸-1%丁酮溶液转入玻璃管，封管水解。按下式计算提取率提高倍数。

$$X = A / (K * A^0)$$

A: 皂甙元吸光度, A⁰: 丁酮吸光度

取 6 个 250 mL 三角瓶，分别加入 10 g 麸皮、20 g 蒺藜粉、30 mL 水，在 11.05 kg/cm²，121.3 °C 下灭菌 20 min。无菌条件下接种不同孢子悬浮液，28 °C 下，发酵 3 d，同样操作发酵 6 d。发酵后乙醇提取，提取液取 1/10 定容至 200 mL，取 1 mL 蒸干，用 1 mL 的 15%三氟乙酸-1%丁酮溶液转入玻璃管，封管水解。计算提取率提高倍数。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线绘制

图 1 和图 2 可知两者在一定浓度范围内均符合朗伯-比尔定律，因此丁酮可作测定皂甙元理想的内标物质。1 mL 的正己烷萃取 2 g 蒺藜粉后干燥称量得皂甙元 2.1 mg。

2.2 发酵时间、接种量及辅料对皂甙元得率的影响

皂甙元通过糖基与纤维素结合而存在于细胞壁中，细胞壁比较坚韧，很难将皂甙元从植物原料中彻底分离提取出来。生物法提取蒺藜皂甙元主要是利用黑曲霉和木霉的复合酶系^[8,9]，使皂甙元从细胞壁的结合中游离出来。本实验主要考察在其他发酵条件均相同的情况下，辅料添加及不同接种量对生物法蒺藜皂甙元提取率的影响，结果如表 2、3、4、5 所示。

表 2 不加麸皮发酵 3d 的情况

原料名称	吸光度		A/A ⁰	X(提取率提高倍数)
	丁酮/A ⁰	皂甙元/A		
10%黑曲霉	0.078	0.723	6.52	1.07
30%黑曲霉	0.107	1.088	7.18	1.18
10%木霉	0.125	0.939	6.38	1.04
30%木霉	0.098	0.904	7.14	1.17
10%(黑曲霉+木霉)	0.037	0.275	7.43	1.22
30%(黑曲霉+木霉)	0.045	0.397	8.82	1.45

从表 2 可知，接种量为 30%的皂甙元相对产率大于 10%的接种量，黑曲霉与木霉混合接种大于单个菌种，黑曲霉与木霉混合接种量为 30%的皂甙元相对产率最高是空白样的 1.45 倍。主要原因是适当增加接种

量,亦即增加了发酵体系中的菌体细胞致使纤维素酶、果胶酶等的含量增多,蒺藜细胞壁破碎度变大,使更多的皂甙元从植物细胞里游离出来。

表3 不加麸皮发酵6d的情况

原料名称	吸光度		A/A ⁰	X(提取率 提高倍数)
	丁酮/A ⁰	皂甙元/A		
10%黑曲霉	0.1608	1.669	7.39	1.21
30%黑曲霉	0.117	1.538	8.22	1.35
10%木霉	0.107	1.244	7.61	1.25
30%木霉	0.186	1.538	8.27	1.36
10%(黑曲霉+木霉)	0.134	1.885	8.89	1.46
30%(黑曲霉+木霉)	0.142	1.997	9.78	1.60

由表3可知,接种量为30%的皂甙元相对产率大于10%的接种量,黑曲霉与木霉混合接种大于接单个菌种。

表4 发酵3d的情况($m_{\text{麸皮}}:m_{\text{蒺藜}}:v_{\text{自来水}}=1:2:3$)

原料名称	吸光度		A/A ⁰	X(提取率 提高倍数)
	丁酮/A ⁰	皂甙元/A		
10%黑曲霉	0.257	1.538	8.12	1.33
30%黑曲霉	0.261	1.770	8.91	1.46
10%木霉	0.272	1.595	7.26	1.19
30%木霉	0.223	1.699	9.00	1.47
10%(黑曲霉+木霉)	0.235	2.046	11.69	1.92
30%(黑曲霉+木霉)	0.160	1.596	12.60	2.06

由表4可知,加麸皮发酵3d后,接种量为30%的皂甙元相对产率大于10%的接种量,黑曲霉与木霉混合接种大于单个菌种,黑曲霉与木霉混合接种量为30%的皂甙元相对产率最高,是空白样的2.06倍。

表5 发酵6d的情况($m_{\text{麸皮}}:m_{\text{蒺藜}}:v_{\text{自来水}}=1:2:3$)

原料名称	吸光度		A/A ⁰	X(提取率 提高倍数)
	丁酮/A ⁰	皂甙元/A		
10%黑曲霉	0.260	1.959	10.23	1.68
30%黑曲霉	0.141	1.133	11.01	1.80
10%木霉	0.279	1.770	10.62	1.74
30%木霉	0.146	1.222	11.05	1.81
10%(黑曲霉+木霉)	0.257	1.699	11.97	1.96
30%(黑曲霉+木霉)	0.145	1.699	13.91	2.28

由表5可知,加麸皮发酵6d后,接种量为30%的皂甙元相对产率大于10%的接种量,黑曲霉与木霉混合接种大于接单个菌种,黑曲霉与木霉混合接种量为30%的皂甙元相对产率最高,是空白样的2.28倍。

对比表2和表3、表4和表5可知:(1)发酵6d的皂甙元相对产率大于发酵3d,主要原因是随着发酵

时间延长,酶产率增加,酶解作用时间也相对延长,致使更多的皂甙元从植物细胞里游离出来;(2)原料中添加麸皮后进行发酵提取皂甙元相对产率比不加麸皮的要高。这可能是因为麸皮含有的营养物质促进菌体生长,麸皮所含的纤维素和半纤维素对酶的合成具有诱导作用,使产酶增加。另外,固体发酵的主要原料麦麸有合适的松适度而利于通气,较大的表面积特别适合于好气性微生物的生长。

3 结束语

中国具有世界上最丰富的皂甙资源,而甾体皂甙元具有广阔的药用前景。在皂甙元的提取上,本文采用生物发酵法辅助提取的方法,较传统的醇提法有很大的改进。同时证明了采用发酵法可以明显提高蒺藜皂甙的提取率,而三氯乙酸封管水解法作为一种简便、可靠的分析跟踪方法,在皂甙生产研究领域具有良好的应用前。

鉴于蒺藜皂甙在健身、抗疲劳等方面的突出作用。蒺藜皂甙有望成为调节内分泌功能因子的研究领域中的一颗新星。本论文的研究成果为皂甙功能因子的研究提供了可靠的实验基础。

参考文献

- [1] 张健,李俊.蒺藜提取物的药理研究进展[J].中医药研究,1989,6:56-57
- [2] 蔡利锋,景凤英,张建国等.蒺藜化学成分的研究[J].药学学报,1999,34(10):759-761
- [3] Yna Wang, Kazuhiro, Ohtani et al. Phytochemistry[J].1997, 145 (4):811-817
- [4] 徐雅娟,金京珠等.刺蒺藜果实中两种甾体皂甙的分离与鉴定[J].中草药,2000,31(2):90-91
- [5] 涂光忠,马立斌等.蒺藜草中一种新的六糖甾体蒺藜草一种新的六糖甾体皂甙结构的 NMR 研究[J].高等学校化学学报,2002,23(4):600-604
- [6] 黄金文,蒋山好等.蒺藜甾体皂甙元化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2003,15(2):101-103
- [7] 张健,李芳.蒺藜甾体皂甙的测试[J].中医药研究,2000,(4): 48-49
- [8] 余小斌 具润谟.里氏木霉 Rut C-30 液态发酵法生产纤维素酶[J].无锡轻工业大学学报 1998,17(2):6-10
- [9] Hunzhi ZHANG, Hongshan Yu, Yongming Bao. Purification and Characterization Ginsenoside- β -Glucosidase[J]. Chem. Pharm. bull,49(7):795-798

