

黄姜皂素生产工艺中的发酵机理与条件优化

李江浩^{1,2}, 葛台明^{1,2*}, 洪岩³, 王焰新^{1,2}, 王理³

¹湿地演化与生态恢复湖北省重点实验室 中国地质大学;

²中国地质大学环境学院, 武汉 430074; ³竹溪创艺皂素有限公司, 十堰 442300

摘要: 传统上将黄姜皂素生产工艺中, 粉碎后、水解前的处理过程称为“发酵”。该步骤对黄姜皂素的得率具有重要影响, 然而学术界对发酵机理的认识存在误区。我们通过一系列对比实验, 证实了这一过程并非真正意义上的微生物发酵, 而是黄姜体内的酶在特定条件下所催化的复杂的生化反应, 是植物应对环境胁迫而引发的次生代谢产物的变化。通过对发酵过程中 pH 值变化的监测发现, 旧的发酵工艺过程中常伴有 H⁺ 生成, 而优化后的发酵过程可不伴随明显的 pH 值变化, 表明该生化反应过程中并无 H⁺ 释放。在对发酵机理认识的基础上, 我们依据影响生化反应的关键因素, 优化了发酵工艺参数。应用新发酵工艺后, 黄姜皂素的得率稳定在 0.8% 左右, 相比传统工艺提高了大约 11%, 发酵耗时也由原来的 72 h 缩短至 12 h。

关键词: 黄姜皂素; 发酵机理; 工艺优化

中图分类号: Q946.83/Q599

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.031

Fermentation Mechanism of Diosgenin Production and Optimization of the Fermentation Conditions

LI Jiang-hao^{1,2}, GE Tai-ming^{1,2*}, HONG Yan³, WANG Yan-xin^{1,2}, WANG Li³

¹ Hubei Key Laboratory of Wetland Evolution and Ecological Restoration, China University of

Geosciences; ² School of Environmental Studies, China University of Geosciences,

Hubei Wuhan, 430074, China; ³ Zhuxi Chuangyi Diosgenin Co., Ltd., Hubei Shiyan, 442300, China

Abstract: At present, the process between rhizome grinding and diosgenin hydrolysis is generally called "fermentation". Fermentation strongly influences the extraction efficiency of diosgenin, but the mechanism is unknown. Experiments were designed to verify whether the process was a true fermentation process by microbe or a biochemical reaction process (s) of the rhizomes when they were crashed. The results showed that the process (s) was a very complex biochemical process (s) catalyzed by the endo-enzyme (s) only when the rhizome tissue were damaged, and meant that the principle of the so called fermentation was in fact the transformation of secondary metabolite when the plant suffered environment stress (es). Based on this result, the processing parameters were optimized according to the factors that affected the biochemical reactions. With these new parameters, the processing time was significantly shortened from 72 hours to 12 hours, and the final yielding rate of diosgenin was as high as 0.8%, which was 11% higher than that of the old method. At the same time, changes of pH were only observed during traditional fermentation process, but not observed during new process, indicating that the dioscin transformation did not accompany with the production of H⁺.

Key words: diosgenin; fermentation mechanism; optimization of fermentation conditions

黄姜皂素又称薯蓣皂苷元, 属于甾体皂苷元^[1,2], 由薯蓣皂苷水解后得到, 是目前世界上合成 300 多种甾体激素和避孕药物的重要原料, 被誉为“激素之母”。目前, 生产中常用的黄姜皂素提取工艺均源自 Rothrok 的“先水解后萃取的分离方法”^[3]。生产实践中发现, 将粉碎后的黄姜料堆放

一段时间可显著提高黄姜皂素的最终得率, 并将这一堆放过程命名为“预发酵”或“发酵”^[4]。由于学术界及产业界对这一发酵现象的生物学原理不甚了解, 不同实验室和企业对该环节工艺参数的优化结果未达成共识, 发酵处理方法也不尽相同。如: 有自然发酵法、酶解法、微生物发酵法等等^[5]。发酵过程中常常因不同的认识而添加各种各样的添加物, 以期提高发酵的效果, 如添加一些微生物或微生物

制剂、各种酶制剂,甚至添加一些植物激素(如2,4,5-三氯苯氧乙酸、吲哚乙酸)^[6-8]。

黄姜皂素生产过程中的另一个问题是大量酸性废水导致的环境污染问题^[9]。虽然一些新工艺,如王焰新等发明的SRMH生产工艺能有效将末端废水COD值降到国家标准以下(300 mg/L)^[10],但从另一方面考虑,既然发酵处理能显著影响黄姜皂素的提取效率,通过探索发酵的机理、提高发酵的效果不仅能提高皂素企业的经济效益,也能间接起到减少排污、保护环境的目的。本文报道了我们对黄姜皂素提取工艺中发酵机理的探索和条件优化。

1 材料与方法

1.1 材料

黄姜根茎由竹溪创艺皂素有限责任公司提供。该根茎于黄姜正常采收季节,取自湖北省十堰市竹山县,该县是黄姜的主要种植区。

1.2 仪器与试剂

培养箱、恒温干燥箱、粉碎机、电子天平、真空泵、索氏提取器、圆底烧瓶、筒携式高压灭菌锅、75%酒精、EDTA-Na₂溶液(pH7.0)、浓硫酸(98%)、水浴锅。所有试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 试验处理

1.3.1 发酵机理探索

为了探明黄姜皂素提取过程中的发酵步骤是微生物的作用,还是黄姜体内自身的生物酶的作用,我们进行了如下工作。称取1200 g黄姜,随机分为6等份,分别作如下处理,并对6组处理共计进行了5次完整的重复试验:

A:负对照组——杀灭微生物、灭活黄姜自身生物酶的发酵试验:将黄姜清洗后,置于高压灭菌锅内120℃灭菌20 min。用75%的乙醇对粉碎机具(九阳豆浆机)进行浸泡(15 min)和擦洗,以杀灭表面附着的微生物,然后在无菌条件下粉碎,并加入灭菌水,37℃发酵72 h。该处理作为既无微生物,又无黄姜自身酶作用的负对照组。

B:去除微生物的发酵试验:将黄姜用自来水彻底清洗,然后用纯净水清洗3到5次,再用无菌水清洗3到5次,最后用75%酒精溶液短时清洗作表面消毒,以去除黄姜表面附着的微生物。接着按上法在无菌条件下粉碎并加入无菌水,37℃发酵72 h,以探索去除微生物后发酵的效果。

C:杀灭微生物的发酵试验:将黄姜清洗后,置

于高压灭菌锅内120℃灭菌20 min,无菌条件下粉碎并加入无菌水,同时加入少量无菌条件下制备的新鲜黄姜汁(内含黄姜细胞中的酶)并混匀,37℃发酵72 h,以探索在A处理的基础上加入黄姜内源酶对发酵的影响。

D:灭活黄姜自身酶的发酵试验:将黄姜清洗后,置于高压灭菌内120℃灭菌20 min,然后粉碎,加入洗姜水(其中含有与正对照组相同的微生物),37℃发酵72 h,以探索在A处理的基础上,外源微生物对发酵的影响。

E:抑制生物酶的发酵试验:EDTA能通过螯合金属离子(掩蔽金属离子)而抑制以金属离子为辅基的酶的活性。前期预备实验结果表明,向黄姜粉碎物中添加浓度为2、25、50、75和100 mmol/L的EDTA,37℃发酵72 h时,2 mmol/L的EDTA没有显示出抑制效应,皂素得率为0.71%,与不添加EDTA、37℃发酵72 h的对照组(皂素得率0.72%)无统计学差异, $P > 0.05$;25 mmol/L浓度处理组开始显现出抑制效应,皂素得率为0.61%,与对照存在显著差异, $P < 0.05$;当EDTA浓度 ≥ 50 mmol/L时,皂素得率稳定在0.41%~0.43%之间而不出现继续下降的趋势,三种浓度(50、75和100 mmol/L)处理的皂素得率均与对照组存在极显著差异($P < 0.01$),且三组处理之间无显著差异($P > 0.05$)。因此,选定50 mmol/L的EDTA作为酶抑制剂。将黄姜清洗后,粉碎,加入终浓度为50 mmol/L的EDTA-Na₂,37℃发酵72 h。从而验明发酵作用是否由黄姜内源酶引起;

F:正对照组——常规发酵:将黄姜用自来水清洗后粉碎,37℃发酵72 h。该对照即为黄姜皂素提取过程中的常规发酵法。

各处理结束后,在实验室按常规检验流程检测皂素的提取率,具体流程见“1.3.3 试验流程”。

1.3.2 发酵条件优化

在初步探明了发酵机理后,我们进行了发酵条件的优化,具体试验安排如下。

1.3.2.1 最优发酵pH值的探索

pH值是影响微生物繁殖和酶促反应的重要因素。目前的文献报道中,最优发酵pH值的记载很少,对于pH值的探索也比较少,只有王悦等^[11]报道了最优pH值为6,但文献并没有说明调节pH值的时间和具体方法。目前国内黄姜企业常用的发酵条件是,在自然pH条件下37℃发酵72 h,因此,最

优 pH 值的探索均在 37 ℃ 条件下进行,发酵料的 pH 值采用广泛 pH 试纸测定。

为了详细研究发酵最优 pH 值,设计了两种调节 pH 值的方式,以探索发酵料的 pH 值对皂素提取得率的影响:一是动态调节,即从发酵开始直至结束,每间隔 12 h 调节一次,使发酵料的 pH 值分别稳定在 4.0、5.0、6.0 和 7.0 左右;二是一次性调节,即分别在发酵的 0、24、48、72 h 的时间点上,对发酵料的 pH 值进行一次性调节,并分别设置两组试验,分别将 pH 值调整为 5.0 和 6.0。

1.3.2.2 发酵温度和时间的优化

除实际生产中应用较多的 37 ℃ 发酵 72 h 外,目前文献报道的发酵条件还有 40 ℃ 16 h^[12], 40 ℃ 24 h^[4] 和 60 ℃ 48 h^[11]。为探明黄姜皂素生产的最佳发酵温度和发酵时间,我们选用 37 ℃ 发酵 72 h 作为对照,首先固定发酵时间为 12 h,以黄姜皂素的最终得率作为考核指标,通过改变发酵温度(45 ~

75 ℃,每隔 5 ℃ 设置一组试验),优化最佳发酵温度。在确定了最佳温度后,仍以 37 ℃ 发酵 72 h 作为对照,最终得率作为考核指标,将发酵了温度固定在最佳温度,通过改变发酵时间来探索最佳发酵时间。同时,由于合作企业技术人员通过生产实践发现,黄姜粉碎物在 58 ℃ 左右发酵时的效果通常优于 37 ℃ 发酵 72 h 的效果,因此,同时也针对 58 ℃ 优化了最佳发酵时间。

1.3.2.3 1,000 kg 黄姜规模的生产试验

在完成实验室参数优化工作后,利用所得出的优化参数和湖北省十堰市竹溪县竹溪创艺皂素有限公司的生产设备,进行了两次生产试验,每次试验均使用了不少于 1,000 kg 的鲜黄姜原料,以验证优化参数的生产效果。

1.3.3 试验流程

实验室提取黄姜皂素的实验流程见图 1。

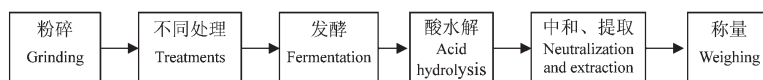


图 1 实验室提取黄姜皂素的实验流程

Fig. 1 Flow chart of diosgenin extraction in laboratory

酸水解:将发酵好的黄姜用浓硫酸(H^+ 终浓度为 2 mol/L)在圆底烧瓶中煮沸水解 6 h;中和:将水解物水洗中和至 pH6.0 左右烘干;提取:将烘干的水解物在索氏提取器中用汽油提取 4 h,最终提取物彻底干燥后称重。

1.4 得率的计算方法

用下述公式计算皂素的得率^[13]。

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{黄姜皂素质量}(\text{g})}{\text{黄姜质量}(\text{g})}$$

2 结果与分析

2.1 发酵过程的机理探索

我们通过对发酵过程中是否存在微生物,或者黄姜自身酶与否被抑制或灭活,检测这些处理对黄姜皂素得率的影响,来验证微生物和黄姜自身的

表 1 发酵前处理对黄姜皂素得率的影响

Table 1 Effect of different treatments before fermentation on the yield of diosgenin

重复试验 No.	处理 Treatments					
	A 负对照 Negative control	B 无菌水洗涤 + 酒精消毒 surface sterilized rhizome	C 高压灭菌 + 鲜姜汁 Autoclaved rhizome + rhizome sap	D 高压灭菌 + 微生物 Autoclaved rhizome + washing waste water	E EDTA- Na_2 treated rhizome	F 正对照 Positive control
1	0.463	0.700	0.734	0.455	0.443	0.702
2	0.532	0.693	0.730	0.520	0.456	0.704
3	0.411	0.687	0.720	0.415	0.437	0.714
4	0.482	0.702	0.716	0.472	0.434	0.720
5	0.453	0.697	0.704	0.446	0.445	0.698
$\bar{x} \pm s$	0.468 \pm 0.044	0.696 \pm 0.006	0.721 \pm 0.012	0.462 \pm 0.039	0.443 \pm 0.009	0.708 \pm 0.009

酶对发酵过程的影响,结果汇总于表1。

表1中,A组为既无微生物、又无黄姜内源酶的负对照组,而F组为常规发酵法,作为正对照。正、负对照组之间的差异经*t*检验,达到了极显著的程度($P < 0.01$),表明杀灭微生物、灭活黄姜体内的酶以后,发酵过程受到了极大的抑制。

由B组结果可知,在去除黄姜根茎表面微生物后,37℃发酵72h黄姜皂素得率和正对照组(F组)基本一致,*t*检验, $P = 0.068 > 0.05$,没有显著差异;B组得率和负对照组(A组)比较,经*t*检验, $P < 0.01$,差异极显著。说明发酵过程中微生物对黄姜皂素得率没有影响。

C组与正对照($P = 0.126 > 0.05$)、负对照($P < 0.01$)的对比结果也同样验证了发酵过程中微生物对黄姜皂素得率没有影响这一结论。由表1还可看出,C组的平均得率比F组高大约0.01%,这是由于C组加入新鲜姜汁的同时也带入了额外的薯蓣皂苷的原因,而且C组相对于F组的皂素增量也大致上与加入的鲜姜汁的量相吻合。

D组处理的黄姜皂素得率与负对照A组结果基本一致,*t*检验, $P = 0.08 > 0.05$,说明两组之间没有显著差异;同时,与正对照F组比较, $P < 0.01$,两者差异极其显著,表明在没有黄姜自身生物酶存在的情况下,即便添加外源微生物,对发酵过程也不起作用。

E组与F组(正对照)黄姜皂素得率对比显示,E组比正对照组得率明显降低,*t*检验, $P < 0.01$,两组差异极显著。EDTA是一种常用的金属离子螯合剂,能掩蔽溶液中的许多金属离子,从而使得许多依赖金属离子作为辅基的酶失去活性,因而,EDTA能广泛抑制各种需要金属离子作为辅基的酶的活性。上述实验结果表明,用EDTA抑制了酶的活性之后,黄姜皂素得率显著降低。E组与A组(负对照)对比并没有显著差异($P = 0.221 > 0.05$),同样说明了在发酵过程中,黄姜自身的生物酶对于通过发酵提升黄姜皂素的最终得率具有重要作用。

综合表1的结果可以得出:黄姜皂素生产工艺中的发酵过程其实是黄姜细胞中内源酶在特定条件下所催化的次级代谢产物转变的过程,而不是传统意义上说的微生物发酵过程。为了表述方便,下文仍将黄姜皂素生产过程中的这一阶段称作“发酵”。

2.2 黄姜发酵条件参数的优化

2.2.1 发酵料 pH 值的优化

2.2.1.1 不同发酵温度下 pH 值的变化

监测了37℃发酵72h过程中发酵料pH值的变化,发现发酵料的pH值呈逐渐下降趋势(图2),说明在薯蓣皂苷转化的同时,发酵料中也伴随着H⁺的生成。58℃发酵72h过程中,发酵料pH值也呈现逐渐下降趋势,但降幅没有37℃大。70℃发酵8、12和16h过程中,发酵料pH值并没有出现明显变化。

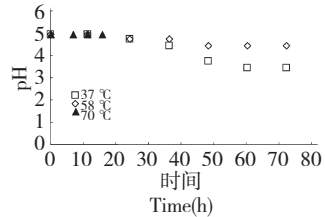


图2 不同发酵温度黄姜发酵料 pH 随时间变化

Fig. 2 pH changes with time at different fermentation temperatures

进一步的实验结果表明,70℃发酵过程中,以发酵12h的皂素得率最高(详见下述表3)。综合3种温度发酵条件下,发酵料pH值的变化可以发现,pH值的变动与最终得率并无直接关系,表明皂素的形成与H⁺的释放之间并没有直接的因果关系。

2.2.1.2 动态调节发酵料 pH 值

pH值是影响酶促反应的重要因素,为探明最优发酵pH值,调节发酵料的初始pH值为4.0、5.0、6.0和7.0,并每12h调节一次,使pH值维持在设定的初始值,黄姜皂素最终得率见图3。

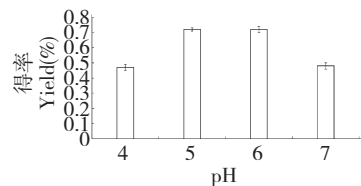


图3 不同发酵 pH 下黄姜皂素得率(37℃,72h)

Fig. 3 The diosgenin yield under different fermentation pH at 37℃ for 72 h

由图3显示的结果可以看出,维持发酵料pH值分别为4.0、5.0、6.0和7.0时,黄姜皂素最终的得率呈现“两头低、中间高”的变化趋势。当pH值为4.0或7.0时,黄姜皂素的最终得率明显低于维持发酵料pH值在5.0或者6.0时的最终得率,而pH值为5.0或6.0时的最终得率差别不大。因此,

发酵最佳 pH 值大约在 5.0 和 6.0 之间。同时,我们做了多次 pH5.0 和 6.0 的对比试验,发现两个 pH 值下,黄姜皂素的最终得率没有明显差别(结果未公布)。

pH5.0~6.0 大约是黄姜粉碎后,体系的自然 pH 值,因此可以得出,发酵的最佳 pH 值也就是黄姜粉碎料的自然 pH 值。

2.2.1.3 一次性调节发酵料 pH 值

为了进一步探明发酵过程中 pH 值调节的最佳时间,我们分别在发酵的 0、24、48、72 h 调节发酵料的 pH 值至 5.0 和 6.0,皂素最终得率见图 4。

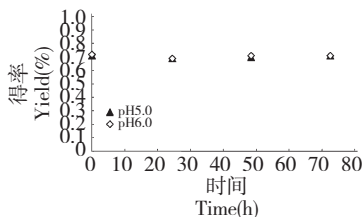


图 4 在不同时间点调节发酵料 pH 为 5.0 和 6.0 黄姜皂素的得率(37 °C)

Fig. 4 The diosgenin yield by adjusting fermentation material pH to 5.0 or 6.0 at the different times at 37 °C

图 4 的结果显示,如果在发酵过程中只对发酵料进行一次 pH 调节,无论在发酵的那个时间点进行调节,对最终黄姜皂素的得率基本没有影响。这一结果提示我们,无需对发酵料的初始 pH 值进行调节,只要应用发酵料的自然 pH 值条件进行发酵即可。

2.2.2 发酵温度与时间的优化

探明最佳发酵 pH 值后,我们以 37 °C 发酵 72 h 作为对照,进一步探索了最佳发酵温度和时间的关系。首先固定发酵时间为 12 h,以黄姜皂素的最终得率作为考核指标,选取发酵温度范围为 45 ~ 75 °C,每隔 5 °C 设置一组试验,优化最佳发酵温度。共计进行了 7 次完整的试验,各处理及对照组的黄姜皂素最终得率(%)及其标准差见表 2。由表 2 的结果可见,随着发酵温度的升高,黄姜皂素的最终得率不断提高,直至发酵温度达到 70 °C 时,最终得率达到最大值(0.798 ± 0.007),且与对照组的差异达到极显著水平($P < < 0.01$)。当继续提高发酵温度至 75 °C 时,皂素的最终得率迅速降低至最低值(0.559 ± 0.009),同样与对照组的差异达到了极显著水平($P < < 0.01$)。表明发酵时间为 12 h 的情况下,发酵的最佳温度应该在 70 °C 左右。

确定了最佳发酵温度后,仍然以 37 °C 发酵 72 h 作为对照,最终得率作为考核指标,将发酵了温度固定在最佳温度(70 °C),通过改变发酵时间来探索最佳发酵时间。累计进行了 14 次完整的试验,各处理及对照组的黄姜皂素最终得率及其标准差见表 3。

由表 3 所示结果可以发现,相比 37 °C 发酵 72 h,在 70 °C 温度下发酵 12 h,黄姜皂素得率可稳定在 0.8% 左右,皂素的最终得率大约提高了 11%。 t 检验, $P < < 0.01$,两组的差异达到了极显著水平。然而,70 °C 条件下,发酵 8 h 和 16 h 的得率均低于对照($P < < 0.01$)。表明 70 °C 条件下,8 h 发酵不充分,而 16 h 则发酵过度。上述两组结果与 12 h 对比的 t 检验, $P < < 0.01$,差异均达到了极显著水平,表明发酵温度在 70 °C 时的最佳发酵时间为 12h。

表 2 不同发酵温度对黄姜皂素得率的影响

Table 2 Effect of different fermentation temperatures on the yield of diosgenin

重复 Replication	温度组别 Temperature(°C)							对照 Control 37 °C、72 h
	45	50	55	60	65	70	75	
1	0.570	0.612	0.620	0.633	0.669	0.800	0.555	0.693
2	0.572	0.599	0.623	0.630	0.675	0.806	0.562	0.688
3	0.550	0.603	0.625	0.629	0.673	0.787	0.567	0.692
4	0.566	0.602	0.619	0.630	0.634	0.802	0.543	0.688
5	0.580	0.603	0.624	0.633	0.672	0.790	0.567	0.702
6	0.572	0.608	0.630	0.630	0.668	0.799	0.555	0.693
7	0.580	0.612	0.635	0.632	0.677	0.803	0.568	0.685
$\bar{x} \pm s$	0.570 ± 0.010	0.606 ± 0.005	0.625 ± 0.006	0.631 ± 0.002	0.667 ± 0.015	0.798 ± 0.007	0.559 ± 0.009	0.692 ± 0.006

表3 70 °C 不同发酵时间对黄姜皂素得率的影响

Table 3 Effects of different fermentation times on the yield of diosgenin at 70 °C

重复 Replication	处理 Treatments			对照 Control 37 °C72h
	70 °C8 h	70 °C12 h	70 °C16 h	
1	0.529	0.809	0.491	0.741
2	0.429	0.797	0.488	0.733
3	0.587	0.771	0.515	0.684
4	0.580	0.795	0.599	0.694
5	0.532	0.785	0.513	0.726
6	0.530	0.808	0.522	0.736
7	0.512	0.800	0.531	0.712
8	0.499	0.802	0.501	0.724
9	0.502	0.811	0.521	0.703
10	0.521	0.804	0.512	0.728
11	0.523	0.790	0.512	0.688
12	0.509	0.809	0.492	0.680
13	0.499	0.790	0.527	0.693
14	0.513	0.798	0.505	0.685
$\bar{x} \pm s$	0.519 ± 0.037	0.798 ± 0.011	0.516 ± 0.027	0.709 ± 0.022

在 58 °C 条件下(表 4),发酵 72 h 的皂素得率高于 48 h, *t* 检验, $P = 0.01 < 0.05$, 两组差异显著, 说明 58 °C 发酵 48 h 并未达到最佳发酵条件; 同时对比 58 °C 和 37 °C 下发酵 72 h 的皂素得率, 前者大约比后者提高了 8.7%, $P = 0.05$, 表明二者存在较大差异。

表4 58 °C 不同发酵时间对黄姜皂素得率的影响

Table 4 Effects of different fermentation times on the yield of diosgenin at 58 °C

重复 Replication	处理 Treatments		对照 Control 37 °C72 h
	58 °C48 h	58 °C72 h	
1	0.687	0.803	0.746
2	0.687	0.808	0.736
3	0.639	0.762	0.685
4	0.649	0.735	0.694
$\bar{x} \pm s$	0.666 ± 0.025	0.777 ± 0.035	0.715 ± 0.030

综合上述结果表明, 发酵温度和发酵时间对黄姜皂素得率有显著影响, 70 °C 发酵 12 h 的得率最高。在此发酵条件下, 皂素的得率相比 37 °C 发酵 72 h 和 58 °C 发酵 72 h 分别提高了大约 11% 和 2.7%。比较 70 °C 发酵 12 h 与 58 °C 发酵 72 h 的发酵结果可以发现, 虽然差异并未达到显著水平, 但前

者可显著缩短发酵时间, 从而对于提高生产企业设备的运转效率、减低设备运转能耗等具有重要意义。因此, 经过优化试验可以得出, 黄姜皂素发酵的最佳发酵条件为 70 °C 发酵 12 h。

2.2.3 1,000 kg 黄姜规模的生产试验

在完成了上述实验室的探索与参数优化工作后, 我们分别进行了 2 次大规模的生产试验, 每次黄姜的用量均不少于 1,000 kg, 发酵条件为: 直接在发酵料自然 pH 值条件下, 70 °C 发酵 12 h。2 次生产试验的结果表明, 黄姜皂素的最终得率均在 0.8% 左右, 印证了我们实验室的结果。

3 讨论

黄姜皂素是几乎所有甾体类激素药物合成的起始原料, 然而, 黄姜中的薯蓣皂苷含量并不是很丰富, 乐观估计在 1% ~ 4% 之间^[14-16]。现有的提取工艺仅能提取其中的 0.7% 左右的皂素^[15]。受自然地理条件的限制, 黄姜资源十分有限, 且由于黄姜皂素化学结构十分复杂, 很难进行化学合成^[15,17], 因此, 尽可能地提高黄姜皂素提取得率是提高资源利用效率的重要途径, 也是保护黄姜资源、减少环境污染的重要举措。

黄姜皂素生产过程中的发酵环节对黄姜皂素的

最终得率具有重要影响,这一认识源自生产实践中的经验,并已成为黄姜皂素生产企业的普遍做法^[4,16,18-20]。然而,对这一过程机理的认识尚存在不少误区^[16]。本研究首次揭示了在黄姜皂素生产的发酵过程中,微生物对黄姜皂素的最终得率没有贡献,而黄姜细胞中的内源酶对黄姜皂素的最终得率具有重要影响。

黄姜皂素是一种典型的次生代谢产物。次生代谢产物多是一些有毒有害的物质,能抑制病原微生物生长、防止或减少动物的取食,或对动物产生毒害等^[20,21]。因此,次生代谢产物的形成和积累是植物长期进化过程中形成的一种防御机制。当植物遇到逆境胁迫时,如病菌感染或动物取食等,就会启动这种防御机制,从而防止病菌感染,或阻止动物取食等^[20,21]。我们对发酵机理的研究发现,发酵过程中微生物对黄姜皂素的最终得率并没有影响,因此,黄姜皂素生产过程中的发酵环节其实并不是真正意义上的发酵。该环节之所以能提高黄姜皂素的最终得率,是因为黄姜皂素生产过程中的粉碎工艺可以看做是一种对黄姜根状茎施加的机械损伤胁迫,相当于动物取食对其造成的损伤,因而触发其体内次生代谢产物(黄姜皂苷)变化的过程,是黄姜在长期进化过程中所形成的一种防御机制。因此,在黄姜皂素生产工艺中,这一过程相当于“后熟”的过程。这一结论对于指导我们正确优化发酵的工艺参数具有重要意义。

发酵料在 37 ℃ 和 58 ℃ 条件下的发酵过程都伴随着 pH 值的下降(图 2),因此,在薯蓣皂苷转化的同时,黄姜发酵料中伴随着 H⁺ 的生成。由于目前对黄姜皂素提取过程中的详细化学过程了解不多,依据基本的化学知识可以有如下合理推测:由于 pH 值的下降是伴随提取过程的,因此 H⁺ 的产生可能在一定程度上抑制薯蓣皂苷的转化。这种抑制作用可能由下列两种原因所导致:一是薯蓣皂苷的生成和 H⁺ 的生成是同一化学反应(或者相互偶联的化学反应)的两个产物,H⁺ 的积累将不利于化学平衡向着皂苷转化的方向偏移;另一种可能是偏酸性的环境抑制了薯蓣皂苷的转化生成所需酶的活性。然而通过调节发酵料的 pH 值并没有明显提高黄姜皂素得率。同时,在 70 ℃ 条件下发酵 8、12 h 和 16 h,发酵料并没有明显的 pH 值变化,因而推断薯蓣皂苷在发酵过程中的转化和 H⁺ 的生成是由两个不同的生化反应所控制的。

关于发酵条件的优化已有一些报道,如:汤兴利等报道发酵温度 40 ℃,发酵 16 h 为最佳发酵条件^[12]。乔振杰等报道在温度 40 ℃,发酵 24 h 为最佳发酵条件^[4]。王悦等报道在 pH 6.0、温度 60 ℃ 发酵 48 h 为最适发酵条件^[11]。我们在对发酵过程的生物学机理的新认识的基础上,通过实验室的小规模预研究和实际生产对比发现,在 70 ℃ 下发酵 12 h 的皂素得率最高,这一研究结果在竹溪创艺皂素有限责任公司的生产实践中得到了验证。相比前人的研究结果,我们的发酵时间最短,这能大大提高生产企业设备的运转效率,而且 12 h 的发酵也非常便于企业根据实际生产进度作出合理的安排。

4 结论

黄姜皂素生产工艺中的“发酵”过程是黄姜细胞内的酶所催化的复杂生化反应过程,发酵期间微生物不起作用。旧的发酵工艺过程中常伴有 H⁺ 生成,而优化后的发酵过程可不伴随明显的 pH 值变化,表明该生化反应过程中并无 H⁺ 释放。最适合工业化生产的发酵条件为:发酵料的初始 pH 值为 5.0~6.0,70 ℃ 发酵 12 h。

致谢:本研究获得了竹溪创艺皂素有限公司的支持和帮助,特此表示感谢。

参考文献

- Xu CJ (徐成基). Chinese Dioscorea Resources (中国薯蓣资源). Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2000.
- Zhang MZ (张美珍). Flora of China (中国植物志), Volume 16. Beijing: Science Press, 1992.
- Rothrock JW. Extraction method of diosgenin from dioscorea vegetable. *Ind Eng Chem*, 1957, 49: 186.
- Qiao ZJ (乔振杰), Li XM (李向民), Xu GX (徐桂新). Optimization of spontaneous fermentation and acid hydrolysis of extracting diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis*. *Acta Agric Boreali-occident Sin* (西北农业学报), 2006, 15: 212-215.
- Li Y (李燕), Ma JL (马俊林), Hu J (胡菊), et al. Comparison of different pretreatment methods for saponin extraction. *Chem Eng Equip* (化学工程与装备), 2011, 8: 33-34.
- Tong L (佟玲), Zhang SL (张胜科), Li J (李锦), et al. Extracting sapogenins from *Dioscorea zingiberensis* through enzymatic hydrolysis. *J Shanxi Normal Univ, Nat Sci* (陕西师范大学学报, 自科版), 2003, 31(2): 81-83.
- Zhao SS (赵书申), Liu WL (柳卫莉). Fermentation of *D.*

- zingiberensis W. Asp. Niger and the structure of diosgenin. *J Wuhan Univ, Nat Sci* (武汉大学学报, 理学版), 1988, 2: 93-98.
- 8 Zhu YL (朱余玲), Huang W (黄文), Liu W (刘葳), et al. Diosgenin extracting from *Dioscorea zingiberensis* Wright by compound microorganisms fermentation method. *S-to-N Water Trans Water Sci Tech* (南水北调与水利科技), 2009, 7: 442-446.
 - 9 Yang ZH (杨志华), Wang YX (王焰新), Hong Y (洪岩), et al. Cleaner production technology for reducing pollution in diosgenin extraction from *Dioscorea zingiberensis*. *Environ Sci Tech* (环境科学与技术), 2007, 30: 53-55.
 - 10 Wang Y, Liu H, Bao J, et al. The saccharification-membrane retrieval-hydrolysis (SMRH) process; a novel approach for cleaner production of diosgenin derived from *Dioscorea zingiberensis*. *J Clean Prod*, 2008, 16: 1133-1137.
 - 11 Wang Y (王悦), Chao FF (晁芳芳). The green production technology of extracting diosgenin and comprehensive utilization of resources. *J Xianyang Normal Univ* (咸阳师范学院学报), 2012, 27(2): 35-37.
 - 12 Tang XL (汤兴利), Xu ZL (徐增莱), Xia B (夏冰), et al. Optimization of spontaneous fermentation and acid hydrolysis of extracting diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis*. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 2004, 13(3): 35-37.
 - 13 Huang JP (黄娟萍). Turmeric saponin gravimetric method existence question and the reason analysis. *Friend Sci Amateurs* (科学之友), 2013, 8: 27-28.
 - 14 Li YH (李勇慧). Exploring genetic diversity of *Dioscorea zingiberensis* and diosgenin content. Shanxi: Shanxi Normal University (陕西师范大学), MSc. 2007.
 - 15 Wu CC (吴成昌), Tian J (田杰), Dai JF (戴军发). Study on sustainable development of *Dioscorea zingiberensis*. *Environ Sci Tech* (环境科学与技术), 2005, 28(2): 95-97.
 - 16 Li JH (李江浩), Ge TM (葛台明). Progress of diosgenin cleaning production. *The Earth* (地球), 2013, 8: 302.
 - 17 Pan HL (潘鹤林), Chen C (陈晨), Shang LR (商利容). Research on clean production process for diosgenin. *Fine Chem* (精细化工), 2010, 27: 504-508.
 - 18 Tang XL (汤兴利), Xu ZL (徐增莱), Xia B (夏冰), et al. Progress of diosgenin extraction and testing method. *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27: 877-880.
 - 19 Zhao XD (赵旭东), Zhao Y (赵艺). Research progress of the technology of pollution-free production of diosgenin from yam. *Environ Sust Dev* (环境与可持续发展), 2008, 3: 47-48.
 - 20 Chen H, Li QJ, Shu GW, et al. Study on the extraction of diosgenin from yam. *Nat Prod Rec Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 866-868.
 - 21 Gao WW (高微微), Tong JM (佟建明), Guo SX (郭顺星). Advances in ecological functions of plant secondary metabolites. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2006, 41: 961-964.
 - 22 Jia MH (贾明慧), Zhang H (张辉), Zhang AH (张爱华), et al. Research progress on plant secondary metabolites in field of pesticide development in China. *China Plant Prot* (中国植保导刊), 2012, 32(3): 15-18.
-
- (上接第 551 页)
- 24 Tomás-Barberán FA, Wollenweber E. Flavonoid aglycones from the leaf surfaces of some Labiatae species. *Plant Syst Evol*, 1990, 173: 109-118.
 - 25 Miyazawa M, et al. Antimutagenic activity of polymethoxyflavonoids from *Citrus aurantium*. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 5239-5244.
 - 26 Juvale K, et al. Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *Eur J Med Chem*, 2013, 67: 115-126.
 - 27 Okuyama S, et al. 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. *Neurochem Int*, 2014, 70: 30-38.
 - 28 Sae WC, et al. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124: 576-580.
 - 29 Kurowska EM, Manthey JA. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 2879-2886.
 - 30 Saito T, Abe D, Sekiya K. Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357: 371-376.
 - 31 Azuma T, et al. Antimutagenic and α -glucosidase inhibitory effects of constituents from *Kaempferia parviflora*. *Food Chem*, 2011, 125: 471-475.