

# 纤维素酶法提取胡芦巴甙体总皂苷 工艺条件的优化

张黎明, 李霞, 徐玮  
(天津科技大学食品科学与生物工程学院, 天津 300222)

**摘要:** 以甙体皂苷元的提取率为指标, 应用  $L_9(3^4)$  正交试验设计优化了胡芦巴种子中甙体皂苷的酶法提取工艺, 实验结果表明, 影响酶法提取甙体皂苷的主次因素为: 酶用量 > 提取温度 > 固液比 > 水解时间。纤维素酶处理能显著提高甙体皂苷的提取率, 加酶后甙体皂苷元提取率的平均值为 83.6%, 而未加酶的结果则为 58.4%。酶法提取新工艺能显著提高胡芦巴甙体皂苷的提取率。

**关键词:** 胡芦巴; 甙体皂苷; 酶处理; 提取工艺

Studies on Extraction Technology of Total Steroidal Saponins from Fenugreek Seeds by Cellulase

ZHANG Li-ming, LI Xia, XU Wei  
(School of Food Science and Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology,  
Tianjin 300222, China)

**Abstract:** Using enzyme-extracting methods, the optimum extraction conditions of steroidal saponins from the of fenugreek seed flour were investigated by orthogonal design with the extracting rate of steroidal saponin as index. The results showed that the factors affecting extraction efficiency of steroidal saponins were as follows: the enzyme dosage > treatment temperature > ratio of solid to liquid (g/ml) > treatment time. The percentage of extraction of steroidal saponin could be obviously raised by enzymic treatment, the average value was 83.6% for enzyme-extracting method and 58.4% for the same condition without cellulase. The extracting percentage of steroidal saponins from fenugreek seeds could be improved by cellulase treatment.

**Key words** *Trigonella foenum-graecum* L; steroidal saponins; enzymic treatment; extraction process

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0157-04

胡芦巴(*Trigonella foenum-graecum* L.)为豆科胡芦巴属植物, 以其干燥成熟的种子入药。它具有温肾、祛寒、止痛等功效。常用于肾虚、小腹冷痛、小肠炎

气、寒湿脚气等。胡芦巴在国外民间常作为滋补品和营养品。从胡芦巴种子中分离得到的胡芦巴豆胶(主要是半乳甘露聚糖)可降低非胰岛素依赖型糖尿病患者的血

收稿日期: 2005-04-15

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, 副教授, 博士, 主要从事生物催化剂在天然资源开发中的应用研究。

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第三册)[M]. 北京: 科学出版社.
- [2] 刘勇明编著. 维吾尔药志(下册)[M]. 新疆: 新疆科技卫生出版社, 1999. 918-922.
- [3] 宋立人. 现代中药学大词典(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 2311-2314.
- [4] 邓泽元, 等. 决明子水溶性多糖提取的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 72-75.

- [5] 傅博强, 等. 茶叶中多糖含量的测定[J]. 食品科学, 2001, 22(11): 69-73
- [6] 李绍平, 等. 蒽酮-硫酸法测定亮菌糖浆中多糖的含量[J]. 中草药, 2002, 33(3): 233-235.
- [7] 尤献民, 等. 老头草中多糖的含量测定[J]. 时珍国药研究, 1997, 8(6): 513.
- [8] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.

糖水平<sup>[1,2]</sup>。其水或醇提取物可使血清极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白降低,初步认为该种子降血脂的主要成分为甾体皂苷。实验表明<sup>[3,4]</sup>,用富含胡芦巴甾体皂苷的提取物喂饲四氧嘧啶诱导的糖尿病狗,通过对其粪便的分析,利用毛细管气相色谱法和质谱分析测出其粪便中含有薯蓣皂苷元、菝葜皂苷元和吉托皂苷元。约有57%的皂苷在消化道内被水解成为皂苷元,说明胡芦巴种子中的皂苷单独或与薯蓣皂苷元一起有降低糖尿病狗的血清总胆固醇的作用。精制的胡芦巴种子提取物(薄层色谱显示含有皂苷)给高胆固醇大鼠喂饲,以30或50g/kg剂量连续4周,血清总胆固醇从26%降至18%,肝胆固醇也有降低的趋势。胡芦巴种子所含甾体成分可明显增加正常大鼠对食物的摄入和转化稳定链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的食物消耗,降低血清总胆固醇的含量,而甘油三酯的含量没有影响。另外薯蓣皂苷元可以抑制胆固醇吸收,降低胆固醇浓度,增加胆汁胆固醇分泌以及增加中性胆固醇的粪便排泄。而且有研究表明薯蓣皂苷元葡萄糖苷在减少小肠胆固醇吸收方面比苷元更有效。因此,以胡芦巴种子为原料分离纯化甾体皂苷作为药用食物的功能性成分,极具有开发应用价值。

已经有文献报道,胡芦巴种子中含有多种甾体皂苷,其中主要是薯蓣皂苷<sup>[5,6]</sup>。目前,从胡芦巴豆粉中提取甾体皂苷常采用水浸提法和有机溶剂提取法。水浸提法成本低,但提取率也低;有机溶剂(如乙醇)提取成本较高。近年来,酶法作为一种提取生物活性成分的新技术的报道日益增多<sup>[7,8]</sup>,为提高水浸提法提取甾体皂苷的提取率,本实验将采用纤维素酶解法提取甾体皂苷,旨在筛选纤维素酶法提取胡芦巴种子中甾体皂苷的工艺条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、材料和仪器

脱豆胶胡芦巴豆粉(40目),天津药业集团有限公司提供。在提取甾体皂苷元之前,置于索氏萃取器中,用石油醚作溶剂提取8h,回收石油醚得胡芦巴油和脱脂胡芦巴豆粉。

试验所用纤维素酶(天津市利华酶制剂技术有限公司,酶活力40000U/g);标准薯蓣皂苷元(天津药典标准仪器药品开发公司);其它试剂香荚兰醛、冰醋酸、高氯酸、石油醚(b.p. 60~90℃)、NaAc、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>均为分析纯。

UV-2550PC型紫外可见分光光度计 日本岛津仪器公司; AB204-S型分析天平 瑞士Mettler Toledo公司; Laborota 4000旋转蒸发仪 德国Heidolph公司; PHSJ-A精密pH计 北京光学仪器厂; SHA-B恒温振荡器 常州国华电器有限公司; LD5-10型低速离心机 北

京医用离心机厂。

### 1.2 甾体皂苷的酶法提取工艺及正交试验设计

纤维素酶法提取胡芦巴种子中甾体皂苷的工艺流程见图1。称取胡芦巴豆粉25.0g,选择一定的固液比(胡芦巴豆粉的质量与水的体积比),用NaAc-HAc缓冲液调节pH值分别为4.5,加入一定量的酶,在一定的温度下酶解一定的时间后迅速升温至90~95℃,保温15min,使酶失活。室温下离心分离固体残渣和滤液,用100ml去离子水洗涤滤渣,合并滤液,真空浓缩至100ml。冷冻干燥,得粗甾体皂苷。

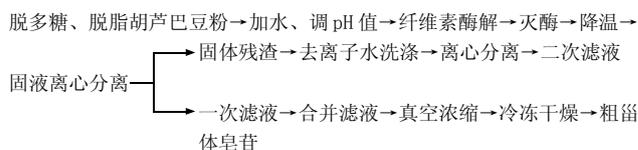


图1 纤维素酶法提取胡芦巴种子中甾体皂苷的工艺流程图  
Fig.1 Flow scheme of extracting steroidal saponins from fenugreek seeds through enzymatic hydrolysis

### 1.3 甾体皂苷元的测定

#### 1.3.1 标准曲线的绘制<sup>[9]</sup>

精确称取标准薯蓣皂苷元对照品25.00mg,用少量石油醚溶解,然后用石油醚定容至100ml。分别准确吸取0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.80ml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0.20ml,高氯酸0.80ml,在70℃水浴中加热15min,冰水冷却,加冰醋酸使其定容至10.00ml,放置30min后,以不含皂苷元的随行试剂作参比,用分光光度计在波长530nm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1.00~20.00mg/L范围内呈良好线性关系,得出回归方程为:  $A=0.0169C-0.0082$ ,  $r=0.9960$ 。

#### 1.3.2 供甾体皂苷元含量测定样品溶液的制备

移取100ml甾体皂苷浓缩液,按文献<sup>[10]</sup>所述方法,加浓硫酸2.1ml,石油醚100ml,于电热套中回流4h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,得甾体皂苷元的石油醚溶液,定容于250.0ml容量瓶。供测定甾体皂苷元含量使用。

#### 1.3.3 甾体皂苷元含量测定

准确吸取酶解法或水浸提法所提取的甾体皂苷元石油醚溶液5.00ml,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25g胡芦巴豆粉中皂苷元的提取量。胡芦巴豆粉中皂苷元的含量按文献<sup>[9]</sup>的方法测定。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。

2 结果与讨论

2.1 酶法提取甾体皂苷条件的正交试验设计及结果

前期的单因素实验已经考察了酶法提取甾体皂苷的料液比(每克胡芦巴豆粉加水的毫升数)、胡芦巴甾体皂苷的提取率与酶解 pH 值、温度、时间和酶用量之间的关系, 这些结果已在文献<sup>[11]</sup>中报道。并针对胡芦巴豆粉的水提取液粘度较大, 其甾体皂苷不容易扩散的特点, 选择纤维素酶作用的最适 pH 值为 4.5, 在此条件下, 选择提取温度、酶解时间、固液比和酶用量为考察因素, 以甾体皂苷元的提取率为考察指标, 应用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计进行试验, 因素的水平安排见表 1。

表 1 因素水平表  
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 提取温度(°C)	B 水解时间(min)	C 固液比(g/ml)	D 酶用量(U/g)
1	40	180	1:12	10
2	45	240	1:14	15
3	50	300	1:16	20

正交试验设计筛选纤维素酶法提取甾体皂苷的条件结果见表 2。由表 2 可以看出, 以甾体皂苷元的提取率为考察指标, 不同的酶解条件对胡芦巴甾体皂苷提取率的影响较明显。由极差分析可知, 影响甾体皂苷提取率各因素的主次关系为: D > A > C > B。故酶解提取甾体皂苷的最佳工艺条件为: A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 即称取脱多糖和脱脂胡芦巴豆粉 25.0g, 固液比 1:14(每 g 原料加入 pH 值为 4.5 的 NaAc-HAc 缓冲液 14ml), 在 45℃ 下酶解 180min, 酶用量每克胡芦巴豆粉 20 活力单位(U/g)。据此条件作验证实验 3 次, 结果甾体皂苷元提取率的平均值为 85.1%。验证试验与正交试验结果基本一致, 说明提取工艺条件基本稳定。

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验结果  
Table 2 Results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test

实验号	A	B	C	D	提取率(%)
1	1	1	1	1	65.4
2	1	2	2	2	69.3
3	1	3	3	3	82.2
4	2	1	2	3	84.1
5	2	2	3	1	78.8
6	2	3	1	2	80.5
7	3	1	3	2	74.9
8	3	2	1	3	80.1
9	3	3	2	1	67.9
K <sub>1</sub>	216.9	224.4	226.0	212.1	T=683.2
K <sub>2</sub>	243.4	228.2	221.3	224.7	
K <sub>3</sub>	222.9	230.6	235.9	246.4	
R	26.5	6.2	14.6	34.3	

2.2 加酶与未加酶提取结果比较

加酶法按照 2.1 所得优化条件进行试验; 未加酶法直接加入一定比例的蒸馏水(没有用 NaAc-HAc 缓冲液调节 pH 值, 也没有加入纤维素酶), 其余条件与加酶法相同。加酶与未加酶提取甾体皂苷元结果见表 3。由表 3 可知, 加酶后甾体皂苷元提取率的平均值为 83.6%, 而未加酶的结果则为 58.4%, 经 t 检验, 两者的对甾体皂苷元的提取率差异具有显著性(p < 0.001)。而且加酶后薯蓣皂苷元的提取率比醇提法的提取率(78.3%)<sup>[12]</sup>还要高。

表 3 加酶与未加酶提取甾体皂苷元的提取率  
Table 3 The extraction ratio of steroidal saponin about enzyme-extracting and water-extracting methods

加酶法	甾体皂苷元提取率(%)	未加酶法	甾体皂苷元提取率(%)
1	85.1	1	60.5
3	83.8	2	58.7
3	82.5	3	55.9
4	84.6	4	57.1
5	81.9	5	59.8

2.3 关于胡芦巴甾体皂苷酶解法提取工艺的讨论

大多数中药材的细胞壁是由纤维素构成, 植物的有效成分往往包裹在细胞壁内; 而纤维素是由 β-D-葡萄糖以 1,4-β 葡萄糖苷键连接, 用纤维素酶酶解可以促进 β-D-葡萄糖苷键的裂解, 破坏植物细胞壁, 有利于植物有效成分的浸出, 还能促进残留半乳甘露聚糖主链(以 1,4-β 甘露糖苷键连接)的降解, 降低提取液的粘度; 而且纤维素酶的最适 pH 值(约 4.5)和豆科植物蛋白质的等电点相重合, 此时蛋白质的溶出量最少, 同样降低提取液的粘度, 因而提高甾体皂苷元的提取率。

在 90~95℃ 的温度下保温一定时间, 既可以使酶失活, 又能达到促进甾体皂苷浸出的目的。

大规模生产胡芦巴甾体皂苷提取物时, 用喷雾干燥代替上述流程中的冷冻干燥, 可以降低生产成本。

本实验没有考虑单纯用 NaAc-HAc 缓冲液调节提取液的 pH 值对甾体皂苷元提取率的影响, 这个问题还有待今后更深入的研究。

参考文献:

- [1] 蒋建新, 安鑫南, 朱莉伟, 等. 食品级胡芦巴胶及其降血糖功效的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 123-125.
- [2] Khatir A M M, 丁霄霖, 方涛. 胡芦巴胶的降血糖疗效[J]. 无锡轻工业大学学报, 1999, 18(1): 16-20.
- [3] 荆宇, 赵余庆. 胡芦巴化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(12): 1146-1149.
- [4] Pierre R P, Yves D S, Dominique M H, et al. Steroid saponins from fenugreekseeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol[J]. Steroids, 1995, 60(10): 675-680.
- [5] Yoshiyuki M, Murakami T, Konatsu H, et al. Medicinal foodstuffs. IV. Fenugreekseed. (1): Structures of trigonoesides Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, and IIIb, new furostanol saponins from the seeds of Indian T. foenum-

# 啤酒酵母中提取核糖核酸的研究

朱俊东, 黄国荣, 糜漫天, 郎海滨  
(第三军医大学营养与食品卫生学教研室, 重庆 400038)

**摘要:** 本实验采用食盐破壁法和高压均质破壁法提取啤酒酵母中的核糖核酸(RNA)。结果表明: 在盐浓度为8%, 温度为121℃, 时间为30min, 沉淀pH2的工艺条件下, RNA提取率为2.21%。高压均质压力为70MPa, 均质3次的工艺条件下, RNA提取率为3.08%。

**关键词:** 啤酒酵母; 食盐; 高压均质; 核糖核酸

Study on Cell Breaking Extraction of Ribonucleic Acid from Brewer Yeast

ZHU Jun-dong, HUANG Guo-rong, MI Man-tian, LANG Hai-bin  
(Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** In this study, two different methods of extracting ribonucleic acid from brewer yeast by using salt and high pressure homogenization for breaking brewer yeast cell wall. The results showed that the extraction rate of RNA was 2.21% by using salt for breaking brewer's yeast cell wall by the conditions: salt concentration 8%, temperature 121℃, time 30 minutes and pH2. The yield rate of RNA is 3.08% by using high pressure homogenization for breaking brewer's yeast cell wall according to the conditions: working pressure 70MPa and 3 times homogenization.

**Key words** brewer yeast; salt; high pressure homogenization; ribonucleic acid

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0160-03

核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)是生命存在的重要物质基础。RNA及其核酸酶分解产物肌苷酸、鸟苷酸、鸟嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸等,在医药、食品、化妆品以及农业等行业中具有重要的用途。此外,近年的一些研究表明RNA具有维持机体免疫功能、抗氧化、提高机体蛋白质和铁的生物利用率、降低胆固醇和抗衰老等多种生理功能<sup>[1,2]</sup>。因此, RNA的开发研究越来越受到重视。

从微生物中提取RNA是工业上最实际和最有效的方

法。酵母中RNA不仅含量高,而且适合于工业化生产。随着我国啤酒行业的日益发展,啤酒厂淘汰的废弃酵母泥不断增多,一些实力雄厚的啤酒厂往往将废弃的酵母泥加工成单细胞蛋白饲料加以出售,但浪费了宝贵的RNA资源,而一些中小型啤酒厂则直接将废弃酵母泥丢弃,这更是巨大的资源浪费,同时还污染环境,特别是对水体污染的后果极为严重。综合利用废弃啤酒酵母泥提取RNA,不仅可以增加经济效益,还能解决环境污染问题。RNA是存在于细胞内的物质,啤酒酵母细

收稿日期: 2005-04-22

作者简介: 朱俊东(1968-),男,副教授,博士,主要从事营养与食品科学的研究。

- graeum* L.[J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(1): 81-87.
- [6] Murakami T, Kishi A, Matsuda H, et al. Medicinal foodstuffs. XVII. Fenugreek seed. (3): Structures of new Furostanol-type steroid saponins, trigoneosides Xa, Xb, XIb, XIIa, XIIb, and XIIIa, from the seeds of Egyptian *T. foenum-graeum* L. [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(7): 994-1000.
- [7] 傅国强, 谢明勇, 周鹏, 等. 纤维素酶法提取茶多糖[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(4): 362-366.
- [8] 邢秀芳, 马桔云, 于宏芬, 等. 纤维素酶在葛根总黄酮提取中的应用[J]. 中草药, 2001, 32(1): 37-38.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 张黎明, 张露亿, 杜连祥. 酶法提取胡芦巴种子中薯蓣皂甙元的工艺研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(2): 161-164.
- [12] 张黎明, 赵玉平, 王海宽, 等. 从中药胡芦巴种子提取薯蓣皂甙元工艺的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 2003, 18(2): 6-8.