

[文章编号] 1003—4684(2019)05-0114-04

# 黄姜皂素生产中发酵条件探究

蒋园园<sup>1</sup>, 吴正奇<sup>2</sup>, 周明喆<sup>1</sup>, 万端极<sup>1</sup>

(1 湖北工业大学土木建筑与环境学院, 湖北 武汉 430068;

2 湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 通过在黄姜发酵过程中添加氯化钙, 探究  $\text{Ca}^{2+}$  作为激活剂对黄姜皂素得率的影响。以黄姜皂素得率为考察指标, 在单因素试验的基础上, 利用正交试验对黄姜发酵条件进行优化。结果表明, 最适发酵条件为:  $\text{CaCl}_2$  添加量 0.3%、pH 为 5.5、发酵温度 60 °C、发酵时间 48 h。在此条件下黄姜皂素得率为 0.825%, 高于自然发酵的得率 0.692%。

[关键词] 钙离子激活; 黄姜; 皂素得率; 发酵

[中图分类号] TS201.2

[文献标识码] A

黄姜, 学名盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright), 是薯蓣皂素含量最高的植物<sup>[1]</sup>。黄姜皂素又称薯蓣皂苷元, 是薯蓣属植物薯蓣苷的水解产物, 其与甾体类激素药物结构药物相似, 是合成甾体激素的重要基础原料, 被医药界称为“药用黄金”, 药用价值高, 具有广阔的应用前景<sup>[2]</sup>。目前, 在黄姜皂素工业化生产中普遍采用先发酵后水解的方法, 相比直接水解, 黄姜皂素提取率有明显提高。一般认为发酵的作用是促进黄姜皂素前体物质转化为黄姜皂素, 从而提高黄姜皂素的得率, 但对发酵机理并没有统一的理论认识<sup>[3,4]</sup>。发酵的方式通常有自然发酵、酶解发酵、微生物发酵等<sup>[5]</sup>, 李江浩等<sup>[2]</sup>发现“发酵”过程与黄姜细胞内源酶活性密切相关, 通过添加 EDTA 作为金属离子螯合剂, 能明显抑制黄姜内源酶活性, 从而降低黄姜皂素得率。而钙离子一般是酶的激活剂, 因此, 本实验通过添加氯化钙对黄姜进行预处理, 以  $\text{Ca}^{2+}$  作为酶激活剂, 研究在发酵过程中  $\text{Ca}^{2+}$  对黄姜皂素提取率的影响, 并对发酵条件进行优化, 从而达到降低生产成本, 提高黄姜皂素的提取率的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

黄姜根茎 湖北竹溪县购; 黄姜皂素标准品 北

京世纪奥科生物技术有限公司; 浓硫酸(98%)、石油醚(30 °C~60 °C)、氯化钙等均为分析纯试剂。

### 1.2 主要仪器与设备

戴安 UltiMateTM300 高效液相色谱、打浆机、ZXFD-B5040 恒温鼓风干燥箱、索氏提取器、电子分析天平、TDL-5-A 离心机、SYZ-B 型石英亚沸高纯水蒸馏器、ST2100pH 计、DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器。

### 1.3 实验方法

1.3.1 黄姜皂素提取流程 鲜黄姜→打浆→发酵→过滤、水洗→滤渣酸水解→中和、过滤、水洗、烘干→石油醚索氏提取→浓缩、结晶、脱色→黄姜皂素。

1.3.2 发酵方式的选择 称取一定量的鲜黄姜, 在发酵温度为 60 °C、时间为 48 h、pH 为 5.5 条件下, 分别进行自然发酵和添加 0.5% 氯化钙发酵, 按照 1.3.1 的工艺流程进行提取, 考察不同发酵方式对黄姜皂素得率的影响。

1.3.3 发酵条件优化的单因素实验 取一定量的鲜黄姜, 打浆。在发酵时间为 48 h、pH 为 5.0、氯化钙添加量为 0.5% 的条件下, 分别调节发酵温度为 45、50、55、60、65 和 70 °C, 研究不同发酵温度对黄姜皂素得率的影响。在最佳发酵温度下, 控制 pH 为 5.0, 氯化钙添加量为 0.5%, 分别发酵 12、24、36、48、60 和 72 h, 分析不同发酵时间对黄姜皂素得率

[收稿日期] 2019—06—05

[第一作者] 蒋园园(1993—), 女, 河南尉县人, 湖北工业大学硕士研究生, 研究方向为现代分离技术

[通信作者] 万端极(1953—), 男, 湖北宜昌人, 湖北工业大学教授, 研究方向为循环利用, 清洁生产, 膜技术集成技术工业企业工艺改造

影响。在最佳发酵温度和最佳发酵时间下,添加 0.5%氯化钙,分别调节发酵液 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 和 7.0,研究 pH 对黄姜皂素得率影响。在最佳发酵温度、最佳发酵时间和最佳 pH 值条件下,向发酵液中分别添加 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%氯化钙,以黄姜皂素得率为指标,分析氯化钙添加量对黄姜皂素得率的影响。所有实验组别均按照 1.3.1 所述工艺流程进行。

1.3.4 发酵条件优化的的正交试验 在以上单因素试验的基础上,以发酵时间、发酵温度、发酵 pH 和氯化钙添加量为正交试验的因素,以黄姜皂素得率为指标,设计 4 因素 3 水平正交试验,优化黄姜皂素生产工艺的的发酵条件,筛选出最佳发酵条件组合。因数水平表如表 1 所示。

表 1 因素水平表				
水平	因素			
	A	B	C	D
1	55	36	5.0	0.2
2	60	48	5.5	0.3
3	65	60	6.0	0.4

A 为发酵温度,℃;B 为发酵时间,h;C 为 pH 值;D 为 CaCl<sub>2</sub>添加量,%

1.4 检测与分析方法

1.4.1 黄姜皂素含量测定 精密称取 12.5 mg 黄姜皂素标准品,采用甲醇并配制成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液,用 0.45 μm 有机滤膜过滤,制备标准溶液。将标准溶液分别稀释成浓度为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 mg/mL 溶液,备用。参考肖婉娜等<sup>[6]</sup>建立的黄姜皂素高效液相色谱检测条件:色谱柱:Waters 5C<sub>18</sub>-MS- II 色谱柱(4.6×250 mm);流动相:乙腈-水(80 : 20);流速:1.0 mL/min;检测波长:203 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL,进行检测并绘制标准曲线。黄姜皂素标准曲线线性方程为  $y=273.23x-4.6482(R^2=0.9974)$ ,表明该方法在 0.05~0.4 mg/mL 线性良好。

1.4.2 黄姜皂素得率计算 采用甲醇对得到的黄姜皂素进行溶解,按照 1.4.1 建立的检测条件进行检测。按下式计算黄姜皂素的得率。

$$\text{黄姜皂素得率}\%=\frac{C\times V\times n}{1000\times m}\times 100\%$$

式中:C 为进样液中黄姜皂素浓度,mg/mL; n 为稀释倍数;V 为溶解液体积,mL;m 为黄姜的质量,g。

2 结果与分析

2.1 不同发酵方式对黄姜皂素得率的影响

由表 2 可以看出,在发酵过程中添加氯化钙,黄姜皂素的得率显著高于自然发酵后黄姜皂素的得

率。由于金属离子可以改变发酵途径中关键酶的活性,从而改变发酵产物的量<sup>[7]</sup>。部分金属离子对酶有激活作用,Ca<sup>2+</sup> 是大多酶促反应的激活剂<sup>[8]</sup>,因此,添加 Ca<sup>2+</sup> 可以促进黄姜自身中以金属离子为辅基的生物酶的活性,提高黄姜皂素得率。

表 2 不同发酵方式黄姜皂素得率

重复试验	黄姜皂素得率/%	
	自然发酵	添加氯化钙发酵
1	0.672	0.839
2	0.694	0.828
3	0.705	0.832
平均得率/%	0.690	0.833

2.2 发酵条件单因素试验

2.2.1 发酵温度对黄姜皂素得率的影响 由图 1 可知,随着发酵温度的提高,黄姜皂素的得率呈现先上升后下降的趋势。这可能是由于,在 45~60℃ 范围内,随着温度的升高,钙离子提高了黄姜皂素内源酶的活性<sup>[9]</sup>,促进了黄姜皂素前体物质转化为黄姜皂素;当温度达到 60℃ 时,得率达到最高值为 0.83%,而当温度继续升高,黄姜皂素内源酶变性失活,从而得率降低。

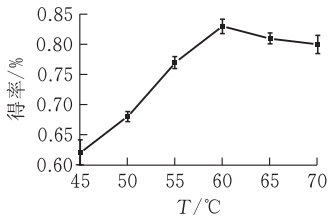


图 1 发酵温度对黄姜皂素得率的影响

2.2.2 发酵时间对黄姜皂素得率的影响 由图 2 可知,黄姜皂素得率随发酵时间的增大而增大,最后趋于稳定。所以,比较适宜的发酵时间为 48 h。若发酵时间再延长,则发酵液中微生物增多,会使发酵液产生臭味,不利于实验的进行。

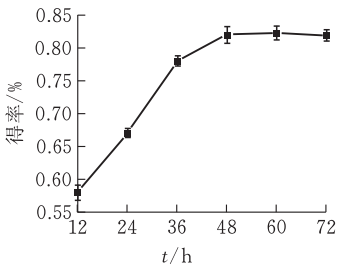


图 2 黄姜皂素得率随发酵时间延长的变化

2.2.3 发酵的 pH 对黄姜皂素得率的影响 由图 3 可知,随着发酵液 pH 的增大,黄姜皂素得率呈先上升后下降的趋势。当 pH 从 4.0 增大至 5.5 时,得率不断增大;当 pH 为 5.0 时达到最大值为 0.82%;当 pH 继续增大至 7.0 时,得率逐渐降低,这可能是由于过高的 pH,不利于黄姜皂素内源酶的结构稳定,

易导致其变性,降低了黄姜皂素前体物质转化为黄姜皂素的能力。所以,pH 为 5.5 左右是黄姜皂素内源酶适宜的 pH。

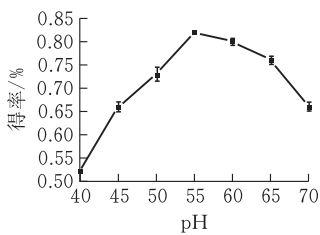


图 3 pH 值对黄姜皂素得率的影响

**2.2.4 CaCl<sub>2</sub> 添加量对黄姜皂素得率的影响** 由图 4 可知,在发酵过程中随着 CaCl<sub>2</sub> 添加量的增多,黄姜皂素得率逐渐增加,当添加量达到 0.3%后,得率基本保持稳定。CaCl<sub>2</sub> 添加量在 0.3%时,黄姜内源酶活性最强,同时 Ca<sup>2+</sup> 对纤维素酶、蛋白酶、植酸酶等具有一定的促进作用<sup>[8]</sup>,在发酵过程中促进淀粉、纤维素的降解从而释放出被包裹的黄姜皂苷,增大黄姜皂素得率,降低生产成本。

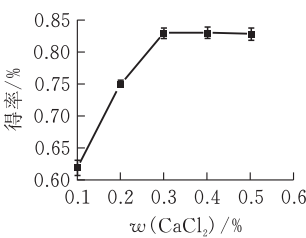


图 4 CaCl<sub>2</sub> 添加量对黄姜皂素得率的影响

2.3 发酵条件的正交试验

根据表 1 设计的因素进行 L<sup>9</sup>(3<sup>4</sup>) 正交试验,对黄姜皂素发酵条件进行优化,正交试验的结果如表 3 所示。

表 3 正交试验结果					
试验号	因素				水解度/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.738
2	1	2	2	2	0.816
3	1	3	3	3	0.803
4	2	1	2	3	0.821
5	2	2	3	1	0.783
6	2	3	1	2	0.792
7	3	1	3	2	0.808
8	3	2	1	3	0.774
9	3	3	2	1	0.768
K <sub>1</sub>	0.786	0.789	0.768	0.763	
K <sub>2</sub>	0.799	0.791	0.802	0.805	
K <sub>3</sub>	0.783	0.788	0.798	0.799	
R	0.016	0.003	0.034	0.042	
主次顺序	D>C>A>B				
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	
优组合	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>				

由表 3 可知,CaCl<sub>2</sub> 添加量对黄姜皂素得率的影响最为显著,说明钙离子对内源酶具有明显的激活

作用。其他因素对黄姜皂素得率的影响的主次顺序为 pH、发酵温度、发酵时间,最优的发酵组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即 CaCl<sub>2</sub> 添加量 0.3%、pH 为 5.5、发酵温度 60℃、发酵时间 48 h。在此条件下,黄姜皂素的得率最高。由于最优条件未出现在正交试验表中,因此对该条件进行三组平行验证实验,黄姜皂素得率为 0.825%。

3 结论

1) 发酵过程中添加 Ca<sup>2+</sup> 可影响黄姜皂素的得率,将其与自然发酵的方式对比,发现,添加 Ca<sup>2+</sup> 发酵可以促进黄姜皂素得率的增加。

2) 在黄姜发酵过程中添加氯化钙的最适发酵条件为:CaCl<sub>2</sub> 添加量 0.3%、pH 为 5.5、发酵温度 60℃、发酵时间 48 h。各因素对得率的影响大小顺序为:CaCl<sub>2</sub> 添加量>pH>发酵温度>发酵时间。

[ 参 考 文 献 ]

[1] 史振霞,李红. 黄姜的研究利用现状[J]. 陕西农业科学, 2005(2): 52-55.

[2] 李江浩,葛台明,洪岩,等. 黄姜皂素生产工艺中的发酵机理与条件优化[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(3): 521-528.

[3] Tang-Xing Li, Lai Xu-Zeng, Bing Xia, et al. Optimization of spontaneous fermentation and acid hydrolysis of extracting diosgenin from the rhizome of Dioscorea zingiberensis[J]. Journal of Plant Resources & Environment, 2004, 13(3): 212-213.

[4] 汤兴利,徐增莱,夏冰,等. 盾叶薯蓣皂素提取工艺及检测方法研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(11): 877-880.

[5] Li Yan, Ma Jun-Lin, Ju Hu, et al. Comparison of different pretreatment methods for saponin extraction[J]. Chemical Engineering & Equipment, 2011(8):33-34.

[6] 肖婉娜,李欣,赖家良,等. 超声辅助复配酶法制备黄姜中薯蓣皂素[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(16): 121-125.

[7] 郑维发,项小燕,陈才法. 不同培养基和三种金属离子对桦褐孔菌培养菌丝体的羊毛甾醇和麦角甾醇积累的影响[J]. 菌物学报, 2008, 27(1): 126-139.

[8] 陈乃松,杨志刚,崔惟东,等. 酶制剂体外酶解豆粕中抗营养因子的研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(4): 663-668.

[9] 李发永,呼世斌,郑志伟,等. 黄姜皂素生产废渣固态发酵纤维素酶产酶条件优化及酶学特性初探[J]. 西北农业学报, 2007, 16(6): 277-281.

# Study on Fermentation Conditions in the Production of Turmeric Saponin

JIANG Yuanyuan<sup>1</sup>, WU Zhengqi<sup>2</sup>, ZHOU Mingzhe<sup>1</sup>, WAN Duanji<sup>1</sup>

(1 School of Civil Engin.,Architecture and Environment ,Hubei Univ.of Tech.,Wuhan 430068,China ;  
2 School of Biological Engin.and Food Sci.,Hubei Univ.of Tech.,Wuhan 430068,China )

**Abstract:** The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the yield of turmeric saponin was investigated by adding calcium chloride during the turmeric fermentation. Based on the single factor experiments, the fermentation conditions for turmeric were optimized according to the orthogonal experimental results. It was indicated that the optimal conditions for turmeric fermentation were as follows:  $\text{CaCl}_2$  addition of 0.3%, pH of 5.5, fermentation temperature of 60 °C and fermentation time for 48 h. Under these conditions, the yield of turmeric saponin reached up to 0.825% which was higher than 0.692% at of natural fermentation.

**Keywords:** calcium ion activation ; turmeric ; yield of saponin; fermentation

[责任编辑：裴 琴]

(上接第 107 页)

# Application Analysis of High Pressure Rotary Jet Grouting Pile in River Embankment Reinforcement

YIN Xiaobo

(School of Civil Engin.,Architecture and Environment ,Hubei Univ.of Tech.,Wuhan 430068,China )

**Abstract:** High-pressure jet grouting pile is one of the most widely used methods in foundation treatment. Taking the foundation treatment project of Donggang (Tangxun Lake to Qingling River Channel) in Wuhan City as an example, the characteristics of mud stratum in this area are analyzed in detail. Based on the comparative analysis of the three reinforcement schemes, the treatment technology of high-pressure jet grouting pile is optimized. The construction process of high-pressure rotary jet grouting pile is, Taking a specific project as an example, analyzed in detail from the aspects of construction process, construction parameters and key technology. Finally, the rationality of the treatment scheme is verified by testing and analyzing the quality of the pile body and the settlement of the foundation after the treatment. In view of the constraints of the construction area, this method has solved the problems of the conventional pile foundation covering a wide area, the inconvenience of construction machinery movement and the complexity of geology, and provided reference for similar engineering applications.

**Keywords:** high pressure jet grouting pile; reinforcement engineering; soft soil foundation

[责任编辑：裴 琴]