

引用格式:

温岚, 朱作华, 陈伟男, 彭源德, 谢纯良. 酸水解联合生物转化对剑麻皂素提取效率的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(4): 111–118.

WEN L, ZHU Z H, CHEN W N, PENG Y D, XIE C L. Effects of the method of acid hydrolysis combining with biotransformation on tigogenin production efficiency in sisal[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2024, 50(4): 111–118.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



酸水解联合生物转化对剑麻皂素提取效率的影响

温岚^{1,2}, 朱作华², 陈伟男³, 彭源德², 谢纯良^{2*}

(1.湖南开放大学应用技术学院, 湖南 长沙 410001; 2.中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙 410205; 3.农业农村部剑麻及制品质量监督检验测试中心, 广东 湛江 524022)

摘要: 以剥制后的剑麻残渣为材料, 筛选对其具有降解功能的菌株, 并对菌株发酵条件进行优化, 建立酸水解联合微生物发酵技术体系, 以提升剑麻皂素提取率。结果表明: 在剑麻渣中分离获得 14 个菌株, 其中黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉对剑麻皂素具有较高的生物转化能力; 对黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉进行发酵, 发酵时间 3 d, 初始 pH 6、发酵温度 30 °C、添加体积分数 0.1% 的吐温-80 时皂素提取率分别达到 42.56、61.70、73.53 mg/g; 在上述条件下, 当添加 1.0 mmol/L Fe²⁺ 时, 对黑曲霉和里氏木霉进行发酵, 皂素提取率分别达到 55.14、89.45 mg/g; 当 Fe²⁺ 添加量为 0.5 mmol/L, 对哈茨木霉进行发酵, 皂素提取率达到 78.64 mg/g; 单独酸水解试验结果表明, 盐酸浓度为 4.5 mol/L, 水解时间为 60 min 时剑麻皂素提取率达到 92.249 mg/g; 采用 1.5 mol/L 盐酸结合黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉发酵对剑麻残渣进行提取, 3 个菌株提取剑麻皂素的提取率分别为 78.70、95.40、107.3 mg/g。综上所述, 采用酸水解联合微生物发酵法提取剑麻皂素, 减少了 2/3 的酸消耗, 且提高了剑麻皂素的提取率。

关键词: 剑麻; 皂素; 生物转化; 酸水解; 里氏木霉

中图分类号: TQ460.38

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)04-0111-08

Effects of the method of acid hydrolysis combining with biotransformation on tigogenin production efficiency in sisal

WEN Lan^{1,2}, ZHU Zuohua², CHEN Weinan³, PENG Yuande², XIE Chunliang^{2*}

(1. Institute of Applied Technology, Hunan Open University, Changsha, Hunan 410001, China; 2. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China; 3. Sisal and its Products quality supervision and Testing Center of MARA, Zhanjiang, Guangdong 524022, China)

Abstract: Using the residue from decorticated sisal as a material, the bacterial strains with degradation capabilities were identified, and the fermentation conditions of the strains were optimized to establish a procedure of an acid hydrolysis combined with microbial fermentation method to improve the extraction rate of tigogenin. The results showed that 14 strains were isolated from sisal residue, among which *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, and *Trichoderma reesei* had a higher biotransformation ability for tigogenin. Single-factor experiments on the fermentation conditions of the above three strains found that the tigogenin extraction rates reached 42.56, 61.70, and 73.53 mg/g, respectively when the fermentation time was 3 days, the initial pH was 6, the fermentation temperature was 30 °C and with 0.1% Tween-80 addition. With addition of Fe²⁺ 1.0 mmol/L, the tigogenin extraction rates of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* reached 55.14 and 89.45 mg/g, respectively. And, with the addition of 0.5 mmol/L Fe²⁺, the tigogenin extraction rate of *Trichoderma harzianum* reached 78.64 mg/g. Separate acid hydrolysis experiments showed that the extraction rate of

收稿日期: 2023-11-02

修回日期: 2024-08-20

基金项目: 财政部、农业农村部国家麻类产业技术体系建设专项(CARS-16); 中国农业科学院麻类研究所科技创新工程重大任务专项(CAAS-ASTIP-2023-IBFC)

作者简介: 温岚(1981—), 女, 重庆人, 博士, 副教授, 主要从事麻类作物遗传育种与生物加工研究, wenlan@hnou.edu.cn; *通信作者, 谢纯良, 博士, 研究员, 主要从事微生物发酵工程与麻类副产物综合利用研究, xiechunliang@caas.cn

tigogenin reached 92.249 mg/g with the condition of 4.5 mol/L hydrochloric acid and 60 minutes. Using 1.5 mol/L hydrochloric acid combined with the fermentation of *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, and *Trichoderma reesei*, the extraction rates of tigogenin of the three strains were 78.70, 95.40, and 107.3 mg/g, respectively. In summary, the acid hydrolysis combined with microbial fermentation method for extracting tigogenin reduced the acid consumption by 2/3 and increases the extraction rate of tigogenin.

Keywords: sisal; tigogenin; biotransformation; acid hydrolysis; *Trichoderma reesei*

剑麻(*Agave sisalana*)是一种具有重要经济价值的硬纤维作物,生态适应性强,能在贫瘠和缺水的环境中生长^[1]。全球剑麻纤维的年产量约 450 万 t^[2],为军工、矿业、航海、建筑等行业提供了重要原材料^[3]。剑麻纤维提取过程中会产生剑麻残渣,这些残渣中含有多种甾体皂苷,包括剑麻皂素、番麻皂素和薯蓣皂素等^[4]。其中,剑麻皂素是最有价值的甾体皂苷之一,是合成 200 多种甾体激素类药物的基本原料,在抗炎、抗肿瘤、抗癌和治疗糖尿病、风湿病和皮肤病等方面应用广泛^[5-8]。

皂苷提取的常用方法有超声辅助提取法、超临界二氧化碳提取法、稀盐酸或硫酸萃取法^[9-11]。稀盐酸萃取法提取皂苷效率最高,但在反应过程中易引起设备腐蚀,产生大量废水,造成环境污染^[12-13]。另外,剑麻皂素在酸提取过程中容易水解为薯蓣皂素,产生 25-spirosta-3,5-dienes、甘油、乙酸等副产物,不仅降低了剑麻皂素的提取率,还增加了后续分离的成本^[14]。

生物转化法是一种行之有效的皂苷提取技术^[15],绿色环保、成本低廉,但其提取效率远低于化学方法的提取效率。近年来,人们开始采用生物与化学相结合的方法从植物中提取皂苷,不仅能够减少化学试剂的使用量,提高皂苷的提取效率,且比化学方法更安全、更环保,比生物方法更高效。研究表明,将多种酶与酸水解结合可以有效提高皂素的提取率^[16],减少废水排放^[17-18]。然而,酶的制备成本高、效率低,限制了该方法的推广应用。微生物可以快速适应周围环境并分泌高活性的生物酶,且可通过代谢解除产物对酶的抑制作用,提高转化效率,比酶制剂更具经济效益^[19]。MI 等^[20]筛选了 1 株具有较强分泌果胶酶能力的短小芽孢杆菌 HR19,并将其与盐酸联合处理姜黄芎,与传统的酸水解工艺相比,该工艺的水、酸和有机溶剂的用量分别降低了 92.5%、97.0%和 97.0%以上,同时薯蓣皂苷元的收率提高了 6.21%。这一结果为剑麻皂素提取工

艺研究提供了有效借鉴。

本研究拟从纤维提取后的剑麻残渣中分离可用于促进皂素释放的微生物菌种,并对其发酵工艺进行优化,探索菌株发酵与酸处理相结合的剑麻皂素提取工艺措施,有望进一步提高微生物处理的效率,为剑麻皂素的清洁生产提供依据和技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

以湛江农垦东方红农场 6 龄剑麻为研究对象,剑麻叶片采用中型剑麻剥麻机加工,收集剥制后的剑麻残渣,用于菌种分离和转化试验。

1.2 菌种分离与鉴定

参照张佳佳等^[21]的方法进行微生物菌株分离。将 1 g 剑麻残渣悬浮于 10 mL 无菌水中,30 °C、180 r/min 摇床培养 12 h。培养结束后,自然沉淀 10 min,取上清液稀释 10 倍,涂布于筛选平板上,自然风干 30 min 后放入恒温生化培养箱中,30 °C 培养 48 h。选取生长状况良好的单菌落于平板中连续传代 3 次以纯化菌种。将纯化后的菌株保存于 30% 甘油中,于 -80 °C 保存备用。

使用 DNA 提取试剂盒(TIANGEN,离心柱形式)对供试菌种进行 DNA 提取。利用真菌和细菌通用引物(ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R(5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3'))对菌种 ITS 和 16S rDNA 序列进行聚合酶链反应(PCR)扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和试剂盒回收后,送至生工生物技术公司(上海)进行测序,并进行在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

1.3 剑麻皂素提取

将剑麻残渣与 50 mL 水混合后以 6 000 r/min 离心 30 min,弃上清。在沉淀中加入 10 mL 石油醚,

超声波辅助提取 20 min, 收集提取物。重复 3 次。然后在 70 °C 下干燥, 去除石油醚和水, 残渣用 50 mL 超纯水溶解。

参照唐昭领等^[22]的方法检测剑麻皂素含量。采用色谱级剑麻皂素标准品(上海雁生生物技术有限公司)配置质量浓度为 1 mg/mL 的标准溶液, 在试管中分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的标准溶液。置于 40 °C 烘箱内挥干溶剂, 冷却后, 在每根试管中加入 0.2 mL 体积分数为 5% 的香兰素-冰醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸溶液。样品在 70 °C 水浴锅中加热 15 min, 然后用冰水冷却。最后, 每管中依次加入 4.8、4.6、4.4、4.2、4.0 mL 冰醋酸, 使其总体积均为 6 mL, 在 540 nm 处测定吸光度。以标准品的浓度为横轴、OD 值为纵轴绘制标准曲线。将所得吸光度代入标准曲线计算剑麻皂素质量。剑麻皂素质量与剑麻残渣质量之比即为剑麻皂素的提取率。

1.4 剑麻皂素释放条件的设置

1.4.1 发酵时间的设置

将 PDA 培养基上 3 个直径为 6 mm 的菌丝块接种到种子培养基中, 于 30 °C 培养 2~3 d, 获得种子溶液。将 10 mL 的种子溶液转移到 100 mL 的发酵培养基(剑麻残渣液)中, 将初始 pH 调节至 6.0, 30 °C、150 r/min 振荡培养, 并于发酵的 1、2、3、4、5 d 取样, 测定发酵液中剑麻皂素提取率, 评估发酵时间对剑麻皂素释放的影响。

1.4.2 初始 pH 的设置

确定适宜的发酵时间后, 将初始 pH 分别设置为 4、5、6、7、8, 发酵 3 d 后, 测定不同初始 pH 下发酵液中的剑麻皂素提取率, 评估初始 pH 对剑麻皂素释放的影响。

1.4.3 发酵温度的设置

确定适宜的发酵时间和初始 pH 后, 将发酵温度分别设置为 25、30、35 °C, 发酵 3 d 后, 测定不同发酵温度下发酵液中剑麻皂素提取率, 评估发酵温度对剑麻皂素释放的影响。

1.4.4 吐温-80 添加量的设置

确定适宜的发酵时间、初始 pH 和发酵温度后, 将吐温-80 体积分数分别设置为 0、0.05%、0.10%、

0.15%、0.20%, 发酵 3 d 后, 测定添加不同体积分数的吐温-80 发酵液后剑麻皂素的提取率, 评估吐温-80 添加量对剑麻皂素释放的影响。

1.4.5 金属离子添加量的设置

确定适宜的发酵时间、初始 pH、发酵温度和吐温-80 添加量后, 分别添加 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 金属离子 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} , 发酵完成后测定添加不同浓度金属离子后发酵液中剑麻皂素的提取率, 评估金属离子对剑麻皂素释放的影响。

1.5 羧甲基纤维素酶活性的测定

1.5.1 葡萄糖标准曲线的绘制

按照赵玉萍等^[23]的方法绘制出葡萄糖标准曲线。

1.5.2 不同发酵时间羧甲基纤维素酶活性的测定

以 3.8 mL 体积浓度为 1% 的羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液作为底物, 加入不同发酵时间下的发酵液 0.2 mL, 在 50 °C 反应 30 min, 加入 1 mL DNS, 1 mL 2 mol/L 的 NaOH, 沸水浴 10 min, 于 520 nm 处测定 OD 值。以 1 mL 发酵液反应 1 min 释放 1 μ mol 葡萄糖所需酶量定义为 1 个酶活性单位(U)。酶活性试验结果为 20 次重复试验的平均值。

1.6 酸水解提取剑麻皂素条件的设置

1.6.1 盐酸溶液浓度的设置

80 °C 下, 分别用 3.0、4.0、4.5、5.0、6.0 mol/L 的盐酸溶液处理剑麻残渣 60 min, 固液比为 1 : 10。随后, 在反应体系中加入 6 mol/L NaOH 来中和酸。以 6 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀, 然后用 10 mL 石油醚提取 3 次, 超声辅助萃取 20 min。最后用超纯水洗涤沉淀物, 在 70 °C 下干燥, 以去除石油醚和水, 用 50 mL 超纯水溶解残渣后测定剑麻皂素提取率。

1.6.2 水解时间的设置

在确定盐酸的最佳浓度后, 80 °C 下, 用最佳浓度的盐酸分别处理剑麻残渣 30、40、50、60、70、80、90 min, 固液比为 1 : 10。随后, 在反应体系中加入 6 mol/L NaOH 来中和酸。以 6 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀, 然后用 10 mL 石油醚提取 3 次, 超声辅助萃取 20 min, 最后用超纯水洗涤沉淀物, 在 70 °C 下干燥, 以去除石油醚和水, 残渣用 50 mL 超纯水溶解后测定剑麻皂素提取率。

1.7 生物转化与酸水解结合进行条件优化

由 1.4 试验可得到提取剑麻皂素的最适宜发酵时间、初始 pH、温度、吐温-80 体积分数和金属离子添加量,在此条件下,分别用 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 的盐酸溶液处理剑麻残渣 60 min,固液比为 1:10。随后,在反应体系中加入 6 mol/L NaOH 来中和酸。以 6 000 r/min 离心 30 min,收集沉淀,然后用 10 mL 石油醚提取 3 次,超声辅助萃取 20 min。最后,用超纯水洗涤沉淀物,在 70 °C 下干燥,以去除石油醚和水,残渣用 50 mL 超纯水溶解后测定剑麻皂素提取率。

1.8 数据处理与分析

所有试验结果均为 3 个重复试验数据的平均值。采用 Graphpad Prism 9.4 软件包对数据进行统计学分析;采用多重范围试验或独立样本 *t* 检验对数据进行显著性差异分析。

2 结果与分析

2.1 剑麻皂素提取微生物的分离鉴定

从剑麻残渣中共获得了 14 株微生物分离株,包括真菌 11 株和细菌 3 株(表 1)。对供试微生物的剑麻皂素生物转化能力进行评价,发现菌株 6、8、9 号处理后样品中的剑麻皂素提取率较高。选择这 3 株分离株进行下一步试验。通过分子鉴定,这 3 株

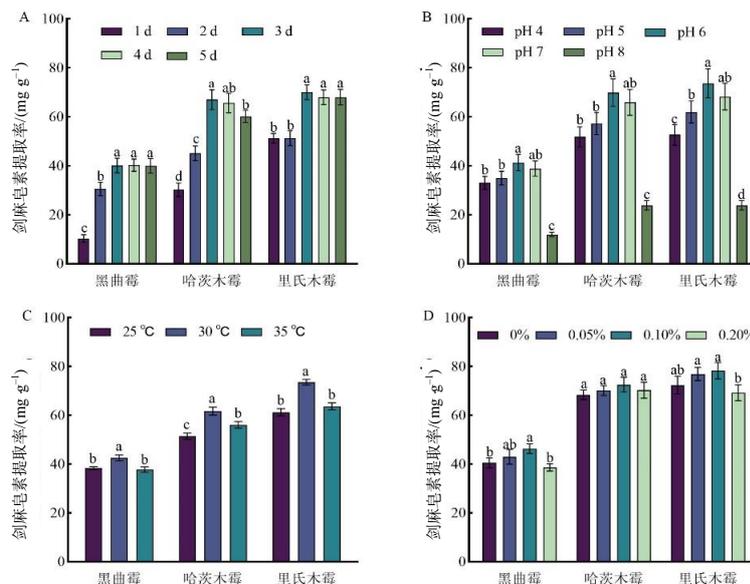
菌株分别被鉴定为黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉。

表 1 不同分离株对剑麻皂素的生物转化效率

Table 1 Bio-conversion efficiency of tigogenin by different isolates		
菌株序号	菌种鉴定	剑麻皂素提取率/(mg g ⁻¹)
1	<i>Candida alcoholic</i> (念珠菌)	10.62
2	<i>Pichia deserticola</i> (毕赤酵母)	7.13
3	<i>Aspergillus niger</i> (黑曲霉)	21.56
4	<i>Candida alcoholic</i> (念珠菌)	11.31
5	<i>Trichoderma koningii</i> (康氏木霉)	30.26
6	<i>Aspergillus niger</i> (黑曲霉)	40.13
7	<i>Trichoderma harzianum</i> (哈茨木霉)	35.44
8	<i>Trichoderma harzianum</i> (哈茨木霉)	67.05
9	<i>Trichoderma reesei</i> (里氏木霉)	70.04
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酿酒酵母)	7.47
11	<i>Bacillus subtilis</i> (枯草芽孢杆菌)	6.86
12	<i>Bacillus subtilis</i> (枯草芽孢杆菌)	7.56
13	<i>Pseudomonas suyunkin</i> (苏云金假单胞菌)	2.14
14	<i>Candida alcoholic</i> (念珠菌)	10.90

2.2 剑麻皂素生物转化条件的优化

从图 1 可以看出,发酵时间、初始 pH 值、温度和吐温-80 体积分数对菌株的剑麻皂素生物转化效率均有影响。整体而言,3 个菌种中,里氏木霉的生物转化效率最高,哈茨木霉的次之,黑曲霉的最低。发酵条件优化结果表明 3 个菌株的最佳发酵



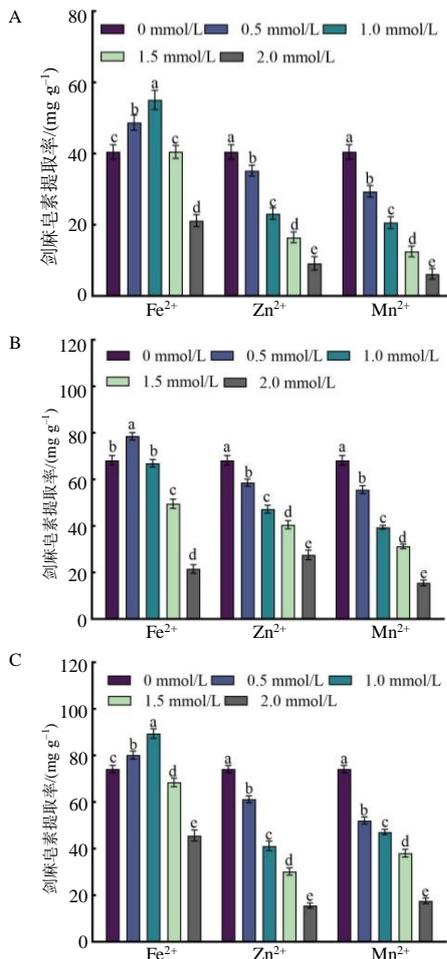
不同字母表示同一菌株不同处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。A 发酵时间; B 初始 pH; C 温度; D 吐温-80 体积分数。

图 1 不同发酵时间、初始 pH、温度及吐温-80 体积分数条件下经 3 个菌株处理的剑麻皂素提取率

Fig. 1 The production of tigogenin by three strains under different fermentation times, initial pH, temperature, and Tween-80

条件参数一致,均为初始 pH6.0、0.10%吐温-80, 30 °C发酵 3 d。与初始培养条件相比,该条件下 3 株菌的生物转化效率均有显著提高,黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉发酵后的剑麻皂素提取率分别为 42.56、61.70、73.53 mg/g。

在 3 种菌株的发酵过程中,加入 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 后,剑麻皂素提取率明显下降(图 2)。而加入一定浓度的 Fe^{2+} 却能够显著促进剑麻皂素的释放,其中黑曲霉和里氏木霉在 Fe^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L 时剑麻皂素的提取率最高,分别为 55.14、89.45 mg/g,比同等条件下未添加金属离子的分别提高了 29%和 21%;而哈茨木霉在 Fe^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时剑麻皂素的提取率最高,为 78.64 mg/g,比同等条件下未添加金属离子时的(73.53 mg/g)提高了 26%。



不同字母表示同一金属离子不同浓度处理结果的差异有统计学意义($P<0.05$)。A 黑曲霉; B 哈茨木霉; C 里氏木霉。

图 2 不同浓度金属离子条件下经 3 个菌株处理的剑麻皂素提取率

Fig. 2 The production of tigogenin by three strains treated with different concentrations of metal ions

2.3 菌种发酵过程中纤维素酶活性

本次试验得出葡萄糖标准曲线的线性回归方程为: $y=0.003\ 794x+0.079\ 76$, $R^2=0.998\ 8$ 。

通过测定菌种发酵过程中发酵液的纤维素酶活性,发现 3 个菌株在发酵 2~5 d 时,纤维素酶活性随着时间延长而增强(表 2)。哈茨木霉和里氏木霉的纤维素酶峰值活性分别为 0.456 7 和 0.672 0 U/mL,剑麻皂素提取率分别为 60.236、68.023 mg/g,而黑曲霉的纤维素酶峰值活性仅为 0.225 3 U/mL,剑麻皂素提取率仅为 40.008 mg/g(图 1-A)。可见剑麻皂素的提取率与微生物分泌的纤维素酶活性密切相关。

表 2 不同发酵时间下 3 种不同菌株处理的发酵液中纤维素酶活性

Table 2 The cellulase activity in fermentation liquid treated by three different strains at different fermentation times

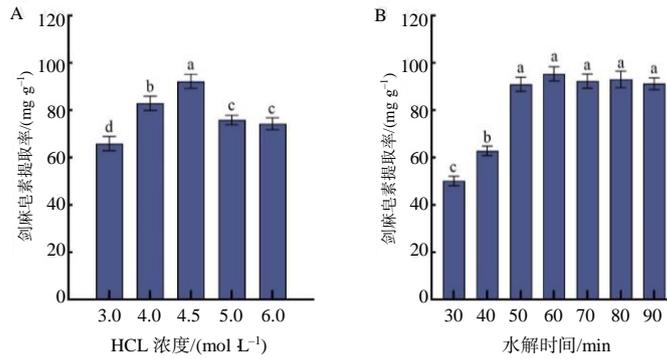
菌种	时间/d	羧甲基纤维素酶活性/(U mL ⁻¹)
黑曲霉	2	(0.070 3±0.001 5)d
	3	(0.098 7±0.005 6)c
	4	(0.132 0±0.007 2)b
	5	(0.225 3±0.006 7)a
	6	(0.115 5±0.008 2)b
	哈茨木霉	2
3		(0.126 1±0.007 6)c
4		(0.233 2±0.016 3)b
5		(0.456 7±0.036 5)a
6		(0.134 2±0.008 2)c
里氏木霉		2
	3	(0.208 5±0.012 5)c
	4	(0.402 0±0.036 1)b
	5	(0.672 0±0.005 3)a
	6	(0.080 5±0.004 3)d

同列不同字母表示同一菌株不同时间处理的差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 酸水解法条件优化

为了更好地与生物发酵法进行比较,对酸水解提取剑麻皂素条件(盐酸浓度和水解时间)进行了优化。从图 3-A 可以看出,当盐酸浓度从 3.0 mol/L 增加到 4.5 mol/L 时,剑麻皂素提取率有明显提高。当盐酸浓度为 4.5 mol/L 时,剑麻皂素提取率达到最大值。随着酸浓度的进一步增加,剑麻皂素的提取率明显降低。图 3-B 表明在 30、40、50、60 min 时剑麻皂素提取率随时间延长而增加,当水解时间延长到 60 min 以上时,剑麻皂素提取率达到最大值且保持平稳;因此,选择了 60 min 作为酸水解的最

佳水解时间。在盐酸浓度为 4.5 mol/L, 水解时间为 60 min 时剑麻皂素提取率达到 92.25 mg/g。



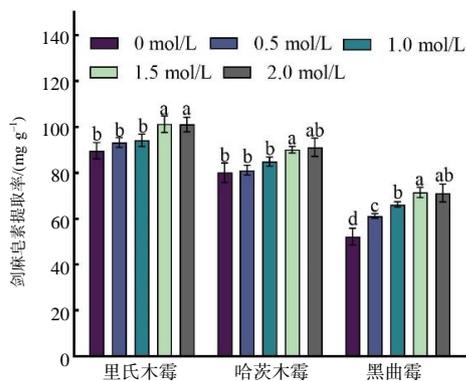
不同字母表示处理间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。A HCl 浓度; B 水解时间。

图3 不同 HCl 浓度和水解时间条件下剑麻皂素的提取率

Fig.3 The production of tigogenin with different HCl concentrations and hydrolysis times

2.5 酸水解联合微生物发酵法条件优化

对酸水解联合微生物发酵工艺条件进行优化, 结果如图4所示。在盐酸浓度为 0、0.5、1.0、1.5 mol/L 时, 剑麻皂素提取率随盐酸浓度的增加而升高, 并在盐酸浓度为 1.5 mol/L 时达到最大值。由黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉发酵后再经 1.5 mol/L 酸处理得到的剑麻皂素提取率分别为 78.7、95.4、107.3 mg/g。当盐酸浓度为 2.0 mol/L 时, 剑麻皂素的提取率与 1.5 mol/L 酸处理的无显著差异。可见, 里氏木霉发酵联合酸水解处理对剑麻皂素的提取率(107.3 mg/g)高于传统酸水解法的(92.25 mg/g)和微生物转化法的(89.45 mg/g), 且联合处理的酸消耗量(1.5 mol/L)仅为传统酸水解(4.5 mol/L)过程中的 1/3, 显著降低了环境污染的风险。



不同字母表示同一菌株不同处理间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图4 不同盐酸浓度下经3个菌株处理的剑麻皂素提取率

Fig.4 The production of tigogenin from three strains treated with different acid concentrations

3 结论与讨论

剑麻皂素的生产技术要点是将植物中的皂苷水解, 切断糖苷键, 粗提苷元, 再进行重结晶^[24]。目前其制备工艺主要是高浓度酸水解法, 处理后的废水对环境污染非常严重^[25]。生物转化(微生物和酶)可以有效促进皂苷类活性物质的释放, 该技术具有清洁、设备成本低、副产品产量低等优点。ZHU^[26]等利用里氏木霉来提取薯蓣皂素, 通过优化发酵工艺条件后, 薯蓣皂素提取率达到了 30.4 mg/g。WANG^[27]等使用菌株 ZG-21 提取剑麻皂素, 经过优化后, 仅发酵 5 h, 剑麻皂素提取率达到 26.7 mg/g。尽管与酸水解方法相比, 发酵法萃取皂素的效率仍然较低, 但该技术仍被认为是目前最环保高效的皂素萃取技术。因此, 筛选剑麻皂素提取效率更高的微生物, 对其发酵工艺条件进行优化仍然是剑麻皂素提取方向的研究热点^[28]。本研究中, 以剑麻剥制后的残渣为材料, 分离筛选出 3 种具有高效剑麻皂素转化能力的微生物, 被鉴定为黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉。对这 3 种菌的发酵工艺条件进行优化, 结果表明发酵时间 3 d, 初始 pH 6、发酵温度 30 °C 更利于剑麻皂素的生物释放。由于剑麻细胞壁中含有大量木质纤维素, 阻碍剑麻皂素的释放, 纤维素酶能够降解细胞壁组分, 使被包裹皂苷充分释放, 进而提升皂素提取率^[29]。本研究结果表明当哈茨木霉和里氏木霉分泌的纤维素酶活性强于黑曲霉时, 其剑麻皂素的提取率也高于黑曲霉的, 由此可见剑麻皂素的提取率与微生物分泌的纤维素酶活性密切相关。

研究^[30]表明吐温-80 具有与细胞膜相似的结构,可以提高细胞膜的通透性,从而促进水解酶的分泌。本研究中,添加体积分数 0.1%的吐温-80 可提高剑麻皂素释放量,其可能与纤维素酶分泌量增加有关。在发酵时间 3 d,初始 pH 6、发酵温度 30 °C 和吐温-80 添加浓度为 0.1%时,黑曲霉、哈茨木霉和里氏木霉发酵后的剑麻皂素提取率分别为 42.56、61.70、73.53 mg/g。在微生物生长过程中,不同浓度、不同金属离子的加入都可能会改变菌体生长和代谢途径。崔向月^[31]通过添加金属离子对内生菌 SYt1 发酵产皂素进行优化,最终薯蓣皂素提取率达到 167.35 mg/L,比发酵条件优化前提高了 3.01 倍。本研究中,黑曲霉和里氏木霉在 Fe²⁺浓度为 1.0 mmol/L 时剑麻皂素的提取率分别达 55.14、89.45 mg/g,哈茨木霉在 Fe²⁺浓度为 0.5 mmol/L 时剑麻皂素的提取率达 78.64 mg/g,分别比未添加金属离子的提高了 1.29、1.21、1.26 倍,达到了预期效果。

本试验中,对酸水解提取剑麻皂素条件(盐酸浓度和水解时间)进行了优化,结果表明在单因素试验中,盐酸浓度为 4.5 mol/L,水解时间为 60 min 时剑麻皂素提取率可达 92.25 mg/g,远远高于生物提取法的提取率。

为了兼顾剑麻皂素提取工艺的高效和环境友好需求,笔者进行了酸水解联合微生物发酵法提取剑麻皂素试验,结果发现,里氏木霉发酵联合酸水解处理对剑麻皂素的提取率达 107.3 mg/g,高于传统酸水解法的提取率(92.249 mg/g)和微生物转化法的提取率(89.45 mg/g),且酸消耗量仅为 1.5 mol/L,为传统酸水解的 1/3。综上所述,本研究为剑麻皂素的清洁生产提供了一种新方法,为该产业绿色、高效开发提供了理论参考。

参考文献:

- [1] 李二莉. 剑麻两种新病害病原鉴定、药剂敏感性测定及双重 PCR 检测体系建立[D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- [2] UPPAL N, PAPPU A, PATIDAR R, et al. Synthesis and characterization of short sisal fibre polyester composites[J]. Bulletin of Materials Science, 2019, 42(3): 132.
- [3] SANTOS J D G, ESPELETA A F, BRANCO A, et al. Aqueous extraction of pectin from sisal waste[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1997–2001.
- [4] ZHOU Y F, WANG L L, CHEN L C, et al. Enrichment and separation of steroidal saponins from the fibrous roots of *Ophiopogon japonicus* using macroporous adsorption resins[J]. RSC Advances, 2019, 9(12): 6689–6698.
- [5] BAJ A, KAEWNOK N, RIVAS-LOAIZA J A, et al. A simple four-step synthesis of the potato alkaloid demissidine from the common saponin tigogenin[J]. Chemistry-A European Journal, 2023, 29(20): 2203314.
- [6] CZAJKOWSKA-SZCZYKOWSKA D, OLCHOWIK-GRABAREK E, SĘKOWSKI S, et al. Concise synthesis of E/F ring spiroethers from tigogenin. Carbaanalogues of steroidal saponins and their biological activity[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2022, 224: 106174.
- [7] NADARAIA N, BARBAKADZE N, MULKIJANYAN K, et al. Synthesis of some novel nitrogen-containing 5 α -steroids based on tigogenin[J]. Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences, 2021, 15(3):65–71.
- [8] MICHALAK O, KRZECZYŃSKI P, CIEŚLAK M, et al. Synthesis and anti-tumour, immunomodulating activity of diosgenin and tigogenin conjugates[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 198: 105573.
- [9] 张莉, 李元祥, 向德轩. 黄精皂苷的结构特点及皂苷的提取工艺研究进展[J]. 怀化学院学报, 2022, 41(5): 14–18.
- [10] 周学永, 牛艳, 杨利艳, 等. 藜麦糠皮皂苷提取技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(2): 258–265.
- [11] 张金凤, 郭丽, 柴云雷. 山药皮中皂甙的提取工艺优化研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2840–2845.
- [12] CHANG Y, WANG S Q, XU J Y, et al. Optimization of extraction process of *Dioscorea nipponica* Makino saponins and their UPLC-QTOF-MS profiling, antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2023, 16(4): 104630.
- [13] 王俊, 覃佑康, 曹志恒, 等. 剑麻皂素工业化制备技术研究进展[J]. 广西科学, 2020, 27(2): 182–187.
- [14] PENG Y E, YANG Z H, WANG Y X, et al. Pathways for the steroidal saponins conversion to diosgenin during acid hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright[J]. Chemical Engineering Research and Design, 2011, 89(12): 2620–2625.
- [15] ZHAO Y, JIANG T C, HAN B Q, et al. Preparation of some metabolites of timosaponin BII by biotransforma-

- tion *in vitro*[J]. *Process Biochemistry*, 2015, 50(12): 2182–2187.
- [16] MACEDO E P, CERQUEIRA C L O, SOUZA D A J, et al. Production of cellulose-degrading enzyme on sisal and other agro-industrial residues using a new Brazilian Actinobacteria strain *Streptomyces* sp. SLBA-08[J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2013, 30(4): 729–735.
- [17] 雷攀, 杨光义, 杜士明, 等. 生物酶预处理-醇提酸解法提取盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的工艺[J]. *医药导报*, 2016, 35(4): 389–393.
- [18] ZHENG W, ZHENG Q, XUE Y Y, et al. Influence of rice straw polyphenols on cellulase production by *Trichoderma reesei*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(6): 731–738.
- [19] 马宗敏, 段绪红, 秦梦, 等. 微生物发酵技术在中药苷类生物转化中的应用进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(5): 858–864.
- [20] WEI M, BAI Y, AO M Z, et al. Novel method utilizing microbial treatment for cleaner production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright(DZW)[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 549–555.
- [21] 张佳佳, 李会, 李恒, 等. 高效转化黄姜皂苷为薯蓣皂苷元菌株的筛选及转化条件优化[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(6): 848–852.
- [22] 唐昭领, 莫建光, 黄艳. 响应面优化香草醛-冰醋酸-高氯酸法测定金花茶叶中总皂甙产量[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(13): 99–103.
- [23] 赵玉萍, 杨娟. 四种纤维素酶酶活测定方法的比较[J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(3): 116–118.
- [24] 沈晖, 赵丛丛, 岳玉琴, 等. 薯蓣皂素清洁化生产工艺与传统酸水解法的比较[J]. *食品工业*, 2012(6): 35–37.
- [25] 龙庚, 刘存芳. 薯蓣皂苷元的提取及生物活性研究进展[J]. *广州化工*, 2015, 43(20): 22–23.
- [26] ZHU Y L, HUANG W, NI J R, et al. Production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* tubers through enzymatic saccharification and microbial transformation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(5): 1409–1416.
- [27] WANG Y C, LI X, SUN H, et al. Biotransformation of steroidal saponins in sisal(*Agave sisalana* Perrine) to tigogenin by a newly isolated strain from a karst area of Guilin, China[J]. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 2014, 28(6): 1024–1033.
- [28] SHI J G, ZENG G M, YUAN X Z, et al. The stimulatory effects of surfactants on composting of waste rich in cellulose[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(11): 1121–1127.
- [29] 喻书诚, 喻家欣, 魏蜜, 等. 不同水解酶组合对黄姜细胞壁降解和皂苷释放量的影响及其结构特征分析[J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(6): 603–610.
- [30] 李谔. 表面活性剂对同步糖化发酵中玉米芯纤维素降解特性的影响[D]. 武汉: 湖北大学, 2015.
- [31] 崔向月. 内生 *Bacillus licheniformis* SYt1 5 L 小罐发酵增效因子的筛选、发酵工艺优化以及金属离子对皂素产量影响的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳正