

# 薯蓣皂苷水解酶的发酵及粗酶的性质研究

赵玉婷<sup>1</sup>, 徐增莱<sup>2</sup>, 戴传超<sup>1,\*</sup>, 汪琼<sup>2</sup>, 田林双<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097;

2. 江苏省中科院植物研究所, 南京中山植物园, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 将前期筛选到的一株产薯蓣皂苷水解酶的曲霉接种于添加薯蓣皂苷的产酶诱导培养基中, 上 5L 发酵罐 25℃ 培养。结果表明: 残糖在 4d 后接近 0, 酶活力在 6d 达到最大, 达到 3385.14U/L。菌丝生物量和菌丝中积累的皂苷元总量也在 6d 达到最大。此时发酵液中薯蓣皂苷元含量为 360μg/L, 菌丝中薯蓣皂苷元含量为 2285.28μg/g, 菌丝生物量为 5.15g/L。对酶的最适反应条件研究表明, 50℃, 10g/L 皂苷底物, pH5.0 时酶活力最大, 酶解反应最佳时间为 18h。该菌产生的酶有望代替酸水解工艺生产薯蓣皂苷元。

**关键词:** 薯蓣皂苷水解酶; 曲霉; 发酵; 酶性质; 薯蓣皂苷元

## Study on Fermentation and Properties of Crude Enzyme Hydrolysing Dioscin

ZHAO Yu-ting<sup>1</sup>, XU Zeng-lai<sup>2</sup>, DAI Chuan-chao<sup>1,\*</sup>, WANG Qiong<sup>2</sup>, TIAN Lin-shuang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-sen, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** A strain of *Aspergillus* sp. which could produce dioscin hydrolyzing enzyme was inoculated into medium adding elicitors of total saponin and cultured at 25 °C in 5 L fermentor. The results showed that the reducing sugar got near to zero at 4 d and enzyme activity got highest at 6d (3385.14 U/L). The biomass and the total diosgenin get highest at 6d. At the time, the diosgenin at the filtered liquid and mycelia got 360 μg/L and 2285.28 μg/g respectively. The highest biomass got 5.15 g/L. Enzymatic reaction conditions were optimized: the optimum temperature and pH for the enzyme were determined as 50 °C and 5.0 respectively. The enzymatic activity was the highest with saponin of 10 g/L. The best time of enzymatic reactions was 18 h. The enzyme hydrolysis of the dioscin would substitute the acid hydrolysis hopefully in the future.

**Key words** dioscin hydrolyzing enzyme *Aspergillus* sp.; fermentation; properties of enzyme; diosgenin

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)08-0269-04

药用植物盾叶薯蓣中的生理活性物质皂苷类成分, 主要有两种存在形式—游离型的苷元和结合型的糖苷。糖苷形式的皂苷不具有最佳的生理活性状态, 糖苷水解后生成的苷元即薯蓣皂苷元才具有更高的活性。它具有雌激素作用, 是合成多种甾体激素和甾体避孕药比较理想的前体, 世界各国生产的甾体激素 60% 以上以它为原料<sup>[1]</sup>, 在薯蓣根茎中含量一般为 2% 左右<sup>[2]</sup>, 所以需要将糖苷水解成苷元形式才能被利用。目前我国的薯蓣皂苷元的工业生产主要采用酸水解法, 造成环境的污染和资源的浪费, 酶水解的方法具有条件温和<sup>[3-4]</sup>、高专一性、高效性和无污染等特点, 而且薯蓣中的淀粉和纤维素不会被破坏, 加以利用可以提高生产薯蓣皂苷元的附加产值。因此获得高活性的薯蓣皂苷水解酶就具有重

要意义。

目前获得皂苷水解酶主要有两种途径, 一是从植物中直接提取<sup>[5-6]</sup>, 二是通过微生物发酵<sup>[7-8]</sup>。我们在前期研究中, 筛选获得一株产薯蓣皂苷水解酶的曲霉, 该酶可以将薯蓣皂苷上糖基水解, 产生皂苷元(另文发表)。本实验研究该菌在 5L 罐中产酶和产皂苷元规律, 并对粗酶液的性质进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)根茎: 产自陕西省白河县, 经江苏省中科院植物研究所徐增莱副研究员鉴定。

收稿日期: 2007-05-22

\*通讯作者

基金项目: 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放项目(KJS03079)

作者简介: 赵玉婷(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究。

曲霉：由本实验室从盾叶薯蓣根茎清洗液中分离纯化得到并保存。

底物：总皂苷从盾叶薯蓣根茎中提取。

薯蓣皂苷元标准品：由江苏省中科院植物研究所制备，经HPLC法检测纯度>99%。

## 1.2 培养基

产酶培养基(g/L)：葡萄糖5，蛋白胨6， $K_2HPO_4$  1， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5，KCl 0.5， $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01，水溶性薯蓣总皂苷2，自然pH。

## 1.3 皂苷元提取及含量测定方法

### 1.3.1 发酵液中皂苷元提取及含量测定方法

取100ml发酵液，用100ml石油醚萃取后取上清液浓缩至干后再用2ml甲醇溶解，即可用作HPLC分析。

### 1.3.2 菌丝中皂苷元提取及含量测定方法

将摇瓶发酵液用滤纸过滤得到菌丝，用5ml石油醚萃取0.1g菌丝后取2ml上清液蒸干后再用2ml甲醇溶解，即可用作HPLC分析。

## 1.4 发酵罐条件

5L发酵罐培养，25℃，搅拌200r/min，通气量1.5~3m<sup>3</sup>/min，压力0.7kg/cm<sup>2</sup>条件下培养8d后放罐。

## 1.5 粗酶液的提取

取一环活化菌种，接入装有100ml液体种子培养基的250ml锥形瓶，28℃，140r/min摇瓶培养3d，按10%接种量将种子液加入产酶基础培养基(装液量100ml/250ml锥形瓶)中，25℃，140r/min培养6d后将液体发酵培养基经滤纸过滤，发酵液即为粗酶液。

## 1.6 皂苷酶活力的测定

以产物还原糖为指标，用DNS(3,5-二硝基水杨酸)法间接测定胞外发酵液总酶活。

粗酶液总酶活测定方法及定义如下：

取1%的皂苷底物溶液(用pH7.2的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制)1ml与1ml粗酶液混匀，置45℃下保温30min，然后用1.5mlDNS终止反应，沸水浴5min，然后迅速冷却，蒸馏水稀释至25ml，混匀，同时以用DNS失活的酶液作对照，在540nm下测还原糖生成量<sup>[9]</sup>。

酶活力定义：在上述条件下，45℃下1ml酶液每小时水解薯蓣皂苷产生1mg还原糖所需酶量，定义为一个酶活力单位(U)。

## 1.7 皂苷酶性质的研究

### 1.7.1 温度对酶活的影响

分别在20、30、40、50、60和70℃下，其余条件不变，按照酶活力测定方法测定皂苷酶活力，以确定酶的最适反应温度。

### 1.7.2 pH对酶活的影响

分别用pH值分别为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0和

8.0的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液，其余条件不变，按照酶活力测定方法测定皂苷酶活力，以确定酶的最适反应pH值。

### 1.7.3 底物浓度对酶活的影响

以浓度分别为0.5、1、2、5和10g/L的薯蓣总皂苷作为底物，其余条件不变，按照酶活力测定方法测定皂苷酶活力，研究底物浓度对酶活性的影响。

## 1.8 薯蓣皂苷的酶解

取5g薯蓣总皂苷配成10mg/ml底物溶液(用pH5.0的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制)，分别取10ml上述溶液到三角瓶中，加入20ml粗酶液，充分混匀，置于50℃的水浴锅里依次酶解反应1、4、8、18h后，用30ml石油醚萃取酶反应液，所得上清液浓缩至干后用2ml甲醇溶解，同时用水代替粗酶液作对照，即可用作HPLC和TLC分析。

## 1.9 分析方法

### 1.9.1 薄层层析(TLC)分析方法

采用硅胶G自制成硅胶薄板，展开剂为石油醚：乙酸乙酯=7:3，层析板在110℃下活化后进行薄层层析分析，用10%  $H_2SO_4$ 在110℃下加热显色。样品酶解反应温度50℃，pH5.0，底物浓度10g/L，点样量为10μl。

### 1.9.2 高效液相色谱(HPLC)分析方法

色谱条件：RP-HPLC高效液相色谱仪为：Agilent1100seriesHPLC检测仪，色谱柱为Agilent ZorbaxSB-C<sub>18</sub>柱(5μm，4.6×250mm)，流动相：乙腈和水(经超声浴抽气30min)，0~28min，60%~100%；28~36min，100%；36~37min，100%~60%，流速：1ml/min，紫外检测器，检测波长：210nm，柱温：25℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵罐发酵

将菌种接种于含有皂苷的产酶培养基后，上5L发酵罐，每隔2d测菌丝生物量、发酵液中的残留还原糖量、pH、皂苷酶活力以及菌丝中的皂苷元含量，培养8d，各指标变化如图1所示。

从图1可看出：残糖在4d后接近0，为0.11g/L；薯蓣皂苷水解酶活力在此时剧烈增加，第6d达到最大，为3385.14U/L(3.38U/ml)。菌丝生物量和菌丝中积累的总皂苷元也在6d达到最大。在4~6d时由于菌丝的剧烈增长，6d时单位重量菌丝内的皂苷元含量反而比4d时略有下降。6d后，虽然溶液中薯蓣皂苷水解酶仍然保持较高活力，但是菌丝中皂苷元已经不再增加。图1还表明，当残糖量下降接近0时，酶活力和皂苷元含量才显著提高，说明菌丝要先消耗掉葡萄糖，然后才产

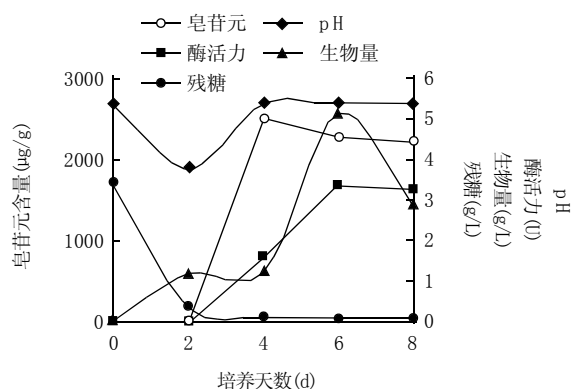


图1 皂苷发酵罐各跟踪指标

Fig.1 Indexes of fermentor with total saponin

生水解酶, 并产生苷元。在发酵过程中 pH 基本不变, 保持在 5.4, 只是第 2d 由于呼吸作用, 降为 3.8。综合以上结果, 我们认为第 6d 为最佳发酵时间。此时发酵液中薯蓣皂苷元含量为 360 μg/L, 菌丝中薯蓣皂苷元含量为 2285.28 μg/g, 菌丝生物量为 5.15g/L。该菌水解后得到的薯蓣皂苷元主要富集在菌丝上, 而不是在发酵液中。

## 2.2 皂苷酶性质的研究

### 2.2.1 温度对酶活的影响

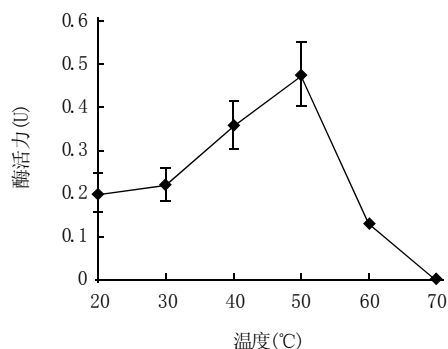


图2 酶的最适作用温度

Fig.2 Optimum temperature of hydrolase

从图 2 可以看出, 反应温度在 50 °C 以下时, 皂苷酶活力随温度的升高而增强, 50 °C 时酶活性最高, 但反应温度高于 50 °C 后, 酶活力随之急剧降低。该皂苷酶作用的最适作用温度为 50 °C。

### 2.2.2 pH 对酶活的影响

由图 3 中可以看出, pH < 4 或 pH > 6 时皂苷酶活性较弱, 在 pH 3.0~8.0 范围内对酶活性进行比较, 结果表明酶的最适反应 pH 值为 5.0。

### 2.2.3 底物浓度对酶活的影响

结果如图 4 所示, 底物浓度在 5 g/L 以下时, 酶活力变化不大, 维持在 0.2~0.3U 左右, 而当底物浓度达

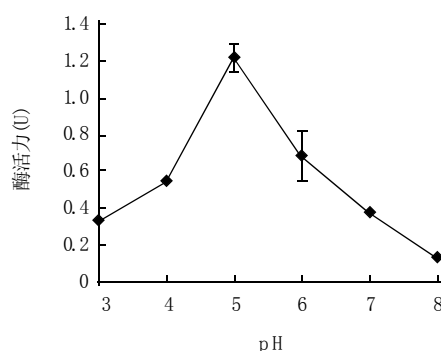


图3 酶的最适作用 pH

Fig.3 Optimum pH values of hydrolase

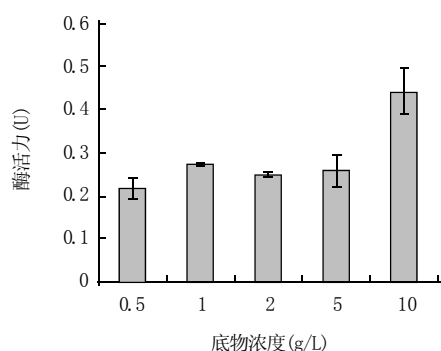


图4 酶的最适底物浓度

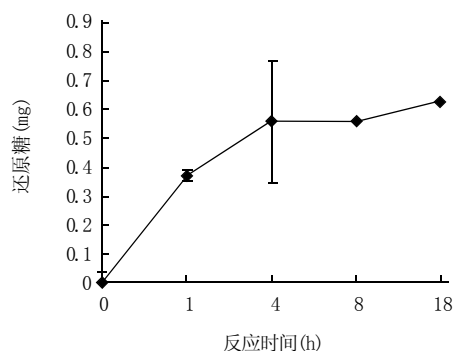
Fig.4 Optimum concentration of substrate of hydrolase

到 10g/L 时, 酶活力显著升高, 所以采用 10g/L 的皂苷作为最适浓度。

## 2.3 薯蓣皂苷的酶解

### 2.3.1 酶反应时间曲线

根据前面的最适反应条件, 在不同时间下进行酶解反应, 得到酶解反应液的还原糖及皂苷元含量变化曲线。如图 5 所示, 随着酶解反应时间的延长, 还原糖含量和皂苷元含量都呈上升趋势, 皂苷酶是一种糖苷酶, 酶解时水解掉皂苷上的糖苷键变为糖基部分和皂苷元。随着酶反应时间延长, 皂苷元含量变多, 糖基含量也随之变多, 18 h 达到最大。



a. 还原糖含量变化曲线

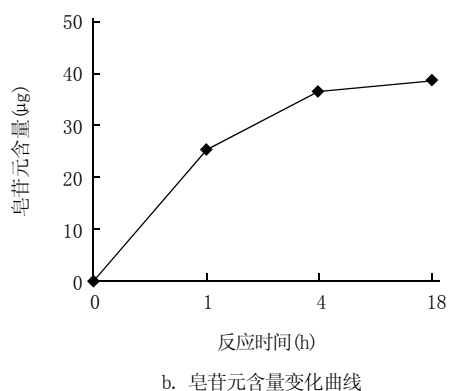
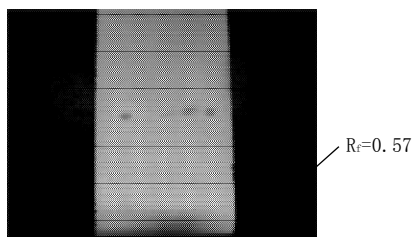


图5 酶反应时间曲线

Fig.5 Time curves of enzymatic reaction

### 2.3.2 酶解产物 TLC 结果

通过对不同反应时间样品的 TLC 分析发现, 4h 时, 皂苷元斑点开始出现, 8h 时, 皂苷元产量增加, 18h 时皂苷元斑点略为加深, 与 HPLC 结果一致, 如图 6 所示。由此确定酶解反应最佳时间为 18h。



1. 薯蓣皂苷元标准品; 2. 酶解 1h; 3. 酶解 4h; 4. 酶解 8h; 5. 酶解 18h。

图6 不同时间酶解产物的 TLC 图谱

Fig.6 TLC chromatogram of enzymatic products in different time

## 3 讨论

将曲霉菌株接种于产酶培养基中, 上发酵罐培养, 再研磨菌丝来提取皂苷元, 上罐各跟踪指标结果表明: 皂苷酶的产生与皂苷元的含量几乎是同步的。残糖量逐步下降, 说明菌丝要先消耗掉葡萄糖后, 才能产生皂苷水解酶, 从而利用总皂苷产生薯蓣皂苷元。发酵罐的皂苷元产量与酸水解工艺一般产率 1%~2% 相比并不高, 但是避免了强酸的使用, 有利于环境保护。

为了改进酸水解法提取工艺, 有报道用复合酶法来提取盾叶薯蓣中的薯蓣皂苷元<sup>[10]</sup>, 来减少环境污染, 提高综合利用程度, 但还是避免不了酸的加入。金凤燮等采用皂苷酶来水解人参皂苷, 得到了稀有皂苷<sup>[7]</sup>, 还发明了酶法水解穿山龙薯蓣类皂苷糖基制备低糖基薯蓣皂苷的方法<sup>[11]</sup>, 但他只是从胞外发酵液中提取酶来水解

底物皂苷, 并没有充分利用菌丝体本身来得到产物皂苷元, 本实验表明该菌株水解产生的薯蓣皂苷元主要富集在菌丝上。本实验最终想得到的产物是薯蓣皂苷元, 它是非极性的, 而发酵液是水溶性的, 其中的苷元含量有限, 苷元可能会被吸附到菌丝细胞膜或细胞间。真菌细胞膜上有甾醇类物质, 结构与皂苷元相似, 都是甾体, 可能苷元成分被吸附在细胞膜上, 作为受体与甾醇类物质接合。所以可以直接从菌丝中提取皂苷元产物。这实际上也涉及到酶的作用, 只是产物皂苷元可能更多地被菌丝富集。有研究者利用真菌菌丝干细胞来提取人参皂苷水解酶, 表明菌丝中也可能产生胞内酶<sup>[8]</sup>。

对粗酶的最适反应条件研究表明, 50℃, 10g/L 皂苷底物, pH5.0 时酶活力最大, 与以往报道的人参皂苷酶最适反应温度和 pH 一致<sup>[7, 12]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 宋发军. 甾体药物源植物薯蓣属植物中薯蓣皂苷元的研究及生产状况[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(3): 89-90.
- [2] 谢彩侠, 高山林, 朱丹妮, 等. 盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元不同提取方法的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(1): 23-25.
- [3] TSONG-RONG Y, CHUN-LIEH L. Purification and characterization of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC31494 [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(6): 965-970.
- [4] SANYAL A, KUNDU R K, DUBE S, et al. Extracellular cellulolytic enzymesystem of *Aspergillus japonicus* II: Purification and characterization of an inducible extracellular  $\beta$ -glucosidase [J]. Enzyme Micro Technol, 1988, 10: 97-99.
- [5] ZHANG C, YU H, BAO Y, et al. Purification and characterization of ginsenoside- $\alpha$ -arabiofuranase hydrolyzing ginsenoside Rc into Rd from the fresh root of *Panax ginseng* [J]. Process Biochem, 2002, 37: 793-798.
- [6] ZHANG C, YU H, BAO Y, et al. Purification and characterization of ginsenoside- $\beta$ -glucosidase from ginseng [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49: 795-798.
- [7] YU Hong-shan, LIU Hai, ZHANG Chun-zhi, et al. Purification and characterization of gypenoside- $\alpha$ -1-rhamnosidase hydrolyzing gypenoside-5 into ginsenoside Rd [J]. Process Biochemistry, 2004, 39: 861-867.
- [8] SU Jin-huan, XU Jian-he, LU Wen-ya, et al. Enzymatic transformation of ginsenoside Rg3 to Rh2 using newly isolated *Fusarium proliferatum* ECU2042 [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 38: 113-118.
- [9] 王义甫, 何艳玲, 孔令娜, 等. 关于饲用复合酶测定方法的探讨[J]. 饲料博览, 2004(3): 39-41.
- [10] 刘国际, 罗娜, 陈俊英, 等. 不同酶法酶提取薯蓣皂苷元的研究[J]. 郑州大学学报: 工学版, 2005, 26(4): 48-50.
- [11] 金凤燮. 酶法水解薯蓣类皂苷糖基制备低糖基薯蓣皂苷的方法 CN1483834 A[P]. 2004, 35(2): 166. 中华人民共和国国家知识产权局发明专利公开说明书.
- [12] YU Hong-shan, GONG Jin-mei, ZHANG Chun-zhi, et al. Purification and characterization of ginsenoside- $\alpha$ -L-rhamnosidase [J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(2): 175-178.