

红曲霉液体培养法制备姜黄素的工艺优化

潘婕*, 申莉娟, 徐戡

(中北大学化工与环境学院, 太原 030051)

[摘要] 目的: 优选红曲霉液体培养法制备姜黄素的工艺条件。方法: 以天然姜黄为原料, 姜黄素得率为指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验考察发酵时间、料液比、营养比和发酵液 pH 对制备工艺的影响。结果: 最佳制备工艺为发酵时间 5 d, 料液比 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 营养比 1/6, 发酵液 pH 4, 姜黄素得率达 0.43%。结论: 优选的制备工艺稳定可行、效率高。

[关键词] 红曲霉; 姜黄素; 液体培养; 发酵; 显著性

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)15-0051-03

[doi] 10.11653/syfj2013150051

Optimization of Preparation Technology for Curcumin by Monascus Liquid Culture Method

PAN Jie*, SHEN Li-juan, XU Kan

(School of Chemical Engineering and Environment, North University of China, Taiyuan 030051, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of curcumin by monascus liquid culture method. **Method:** With natural *Curcuma longa* as raw materials and yield of curcumin index, based on single-factor tests, effect of solid-liquid ratio, fermentation time, nutrition ratio and pH of fermentation broth on preparation technology was investigated by orthogonal test. **Result:** Optimum preparation technology was as following: solid-liquid ratio of $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, fermentation time 5 d, nutrition ratio 1/6, pH of fermentation broth 4. Yield of curcumin was up to 0.43%. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible with high efficiency.

[Key words] monascus; curcumin; liquid culture; fermentation; significant

姜黄味辛、苦, 性温、无毒, 具有活血行气、通经止痛之功效, 主要生物活性成分为姜黄素类化合物和挥发油。姜黄素具有抗氧化性、防癌、抗病毒、抗感染和抗淀粉样等活性^[1]。该成分常用提取方法包括碱水提取、酶提取、表面活性剂协同提取等^[2], 尚无利用微生物法制备姜黄素的研究。本实验采用红曲霉^[3]制备姜黄素, 在微生物发酵过程中, 通过调控微生物代谢条件^[4], 在单因素试验基础上, 通过正交试验优选姜黄素的制备工艺, 为探究姜黄素及其转化产物的制备提供新思路。

1 材料

HPX-9052 MBE 型数显电热培养箱(上海苏达), UV757CRT 型紫外-可见分光光度计(上海精科), ZF-6 型三用紫外线分析仪(江苏其林贝尔), X-5 型显微熔点测定仪(巩义予华), CG10-2.4A 型高速离心机(杭州艾普), AUX 120 型电子分析天平(日本岛津), TENSOR 27 型红外色谱仪(德国 BRUKER)。

姜黄素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 6823-9802), 红曲霉菌(*Monascus purpureus* Went., 经本校杨静博士鉴定为子囊菌纲散囊菌目红曲科红曲属真菌), 姜黄(仁和大药房, 经本校马雪梅博士鉴定为姜科姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥块茎)。斜面培养基^[5]: $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母膏(生化试剂级), $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖(分析纯), 10

[收稿日期] 20121121(003)

[通讯作者] 潘婕, 硕士, 助教, 从事天然药物的生物转化及药物载体研究, Tel: 0351-3923391, E-mail: panjie3561475@163.com

$g \cdot L^{-1}$ 蛋白胨(生化试剂级), 2% 琼脂(食品级); (培养全营养) 发酵培养基^[5]: $9 g \cdot L^{-1}$ 大米粉(食品级), $0.2 g \cdot L^{-1} MgSO_4$ (分析纯), $0.2 g \cdot L^{-1} NaNO_3$ (分析纯), $0.1 g \cdot L^{-1} KH_2PO_4$ (分析纯)。

2 方法与结果

2.1 姜黄素的制备 称取姜黄块茎适量, 粉碎, 过 60 目筛, 向粉末中加入培养基, 灭菌, 接入菌种, 摇床培养, 培养液预处理后用乙酸乙酯浸提, 经 $0.22 \mu m$ 微孔滤膜滤过, 浓缩, 即得姜黄素粗品, 待测。

2.2 姜黄素含量测定 采用分光光度法^[6]。称取姜黄素对照品适量, 溶于乙酸乙酯中, 制成 $0.001 g \cdot L^{-1}$ 对照品溶液, 以乙酸乙酯为空白对照, 于 $400 \sim 450 nm$ 进行扫描, 确定姜黄素在 $419 nm$ 处有最大吸收。配制质量浓度分别为 $1, 2, 3, 4, 5 mg \cdot L^{-1}$ 的姜黄素对照品溶液, 于 $419 nm$ 处测定吸光度(A), 以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $Y = 0.1266X + 0.0075 (R^2 = 0.9991)$, 表明姜黄素在 $1 \sim 5 mg \cdot L^{-1}$ 线性关系良好。

2.3 单因素试验考察

2.3.1 培养液 pH 姜黄素在酸性条件下易出现沉淀, 而在碱性条件下呈可溶状态^[7]。分别向 pH 3.0, 4.0, 5.0 的发酵培养液(50 mL) 中加入姜黄粉末 0.10 g, 灭菌后接入红曲霉菌, 置 $30 \text{ }^\circ C$ 摇床上于 $70 r \cdot min^{-1}$ 培养 3 d, 结果表明培养液 pH 4.0 时姜黄素得率最高。

2.3.2 料液比 调节培养液 pH 4.0, 分别向 50 mL 发酵培养液加入姜黄粉末 0.05, 0.1, 0.15 g, 灭菌后接入红曲霉菌, 按 2.3.1 项下条件进行摇床培养, 结果表明料液比 $1 g \cdot L^{-1}$ 时姜黄素得率最高。

2.3.3 营养比 调节培养液 pH 4.0, 料液比 $1 g \cdot L^{-1}$, 分别在发酵培养液全营养的 1/2, 1/4, 1/6 配比下接入红曲霉, 按 2.3.1 项下条件进行摇床培养, 结果表明营养比 1/4 时姜黄素得率最高。

2.3.4 发酵时间 调节培养液 pH 4.0, 按 $1 g \cdot L^{-1}$ 料液比加入姜黄粉末, 按营养比 1/4 于无菌条件下接入红曲霉菌, 置 $30 \text{ }^\circ C$ 摇床上于 $70 r \cdot min^{-1}$ 分别培养 2, 4, 6 d, 结果表明培养 4 d 时姜黄素得率最高。

2.4 正交试验优选 在单因素试验基础上, 选取发酵时间、料液比、营养比和发酵液 pH 为考察因素, 姜黄素得率为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验^[8-10], 优化红曲霉法制备姜黄素类化合物的发酵条件, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2。

直观分析表明, 各因素对制备工艺的影响顺序

表 1 红曲霉液体培养法制备姜黄素的工艺优选正交试验因素水平

| 水平 | A 发酵时间 /d | B 料液比 / $g \cdot L^{-1}$ | C 营养比 | D 发酵液 pH |
|----|-----------|--------------------------|-------|----------|
| 1 | 3 | 1 | 1/2 | 3.0 |
| 2 | 4 | 2 | 1/4 | 4.0 |
| 3 | 5 | 3 | 1/6 | 5.0 |

表 2 红曲霉液体培养法制备姜黄素的工艺优选正交试验

| No. | A | B | C | D | 姜黄素得率/% |
|-------|------|------|------|------|---------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.30 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.21 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.10 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.40 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.15 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.13 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.41 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.23 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.16 |
| K_1 | 0.20 | 0.37 | 0.22 | 0.20 | |
| K_2 | 0.23 | 0.20 | 0.26 | 0.25 | |
| K_3 | 0.27 | 0.13 | 0.22 | 0.24 | |
| R | 0.07 | 0.14 | 0.04 | 0.05 | |

为 $B > A > D > C$ 。确定最优方案为 $A_3B_1C_3D_2$, 即发酵时间 5 d, 料液比 $1 g \cdot L^{-1}$, 营养比 1/6, 发酵液 pH 4.0。

3 讨论

微生物转化具有区域和立体选择性强、反应条件温和、操作简单、成本低廉等优点, 能完成一些化学方法难以实现的反应, 常被用于天然产物的化学修饰, 以获得一些结构更合理或活性更好的系列类似物或新先导化合物^[11-12]。在微生物发酵培养过程中, 通过调控微生物代谢条件, 使微生物利用姜黄中糖、脂、氨基酸等营养物质进行发酵, 获得安全无污染、高纯度的姜黄素。通过对产物进行 TLC 分析^[13]发现, 除有姜黄素外, 还有去甲基姜黄素、双去甲基姜黄素及待鉴定的新物质。

[参考文献]

- [1] 徐国钧, 徐珞珊. 常用中药材品种整理和质量研究 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994: 369.
- [2] 李湘洲, 张炎强, 旷春桃, 等. 姜黄色素的生物活性和提取分离研究进展 [J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29(3): 190.

均匀设计优选维药行气那尼花颗粒挥发油的 β -环糊精包合工艺

南京¹, 刘承¹, 叶晓川^{1,2*}, 刘焱文^{1,2*}

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065;

2. 湖北省中药资源与中药化学重点实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的: 优化行气那尼花颗粒中挥发油的 β -环糊精(β -CD)包合工艺。方法: 采用饱和水溶液法制备行气那尼花颗粒挥发油 β -CD 包合物。以挥发油包合率和包合物收得率为综合评价指标, 采用均匀试验考察挥发油与 β -CD 的比例、包合温度、包合时间对包合工艺的影响。应用 XRD, DSC, IR, UV 及 TLC 对制备的包合物进行表征。结果: 最佳包合工艺为挥发油与 β -CD 比例 1:11, 包合温度 60 °C, 包合时间 1 h, 挥发油包合率达 96.84%。表征试验证实, 挥发油 β -CD 包合物已经形成。结论: 行气那尼花挥发油 β -CD 包合物制备工艺稳定可行, 可推广于产业化应用。

[关键词] 行气那尼花颗粒; 挥发油; β -环糊精包合物; 均匀设计试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0053-04

[doi] 10.11653/syjf2013130053

Optimization of Inclusion Technology for Volatile Oil from Xingqi Na'nihua Granules by Uniform Design

NAN Jing¹, LIU Cheng¹, YE Xiao-chuan^{1,2*}, LIU Yan-wen^{1,2*}

(1. Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Hubei Province Key Laboratory of Resources Science and Chemistry

[收稿日期] 20130130(010)

[第一作者] 南京, 本科, 从事中药资源开发研究, Tel: 18986192352, E-mail: 1211189781@qq.com

[通讯作者] * 叶晓川, 博士, 研究员, 硕导, 从事中药药效物质基础及质量评价, Tel: 027-88920834, E-mail: yxxcc1965@163.com;

* 刘焱文, 教授, 博导, 从事中药药效物质基础及质量评价, Tel: 027-88920834, E-mail: ywliu2008@163.com

- [3] 程东庆, 潘佩蕾, 周芳美, 等. 红曲霉菌对姜黄素的微生物转化及产物自由基清除和抗脂质氧化作用的研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(7): 517.
- [4] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 89.
- [5] 姚汝华, 周世水主编. 微生物工程工艺原理[M]. 9版. 广州: 华南理工大学出版社, 2005: 76.
- [6] 彭清忠, 陈玲, 易浪波, 等. 内生真菌对姜黄素的微生物转化[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(2): 196.
- [7] 刘焕云. 姜黄色素稳定性的研究[J]. 食品工业, 2000(3): 22.
- [8] 林维宣主编. 试验设计方法[M]. 大连: 大连海事大学出版社, 1995: 36.
- [9] 胡正芳, 李除夕, 贾树田, 等. 正交试验法优选红曲中洛伐他汀的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 53.
- [10] 叶伟兵, 赵琦, 陈健媚, 等. 正交试验法优选板翘解毒颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 47.
- [11] Loughlin W A. Biotransformation in organic synthesis[J]. Biore-source Technol, 2000, 74(1): 49.
- [12] Kumari G N K, Masilamani S, Ganesh M R. Microbial transformation of zaluzanin[J]. Phytochem, 2003, 62(5): 1101.
- [13] 李元波, 殷辉安, 周燕霞, 等. 纤维素酶预处理法提取郁金中姜黄素的研究[J]. 广州化学, 2004, 29(3): 18.

[责任编辑 全燕]