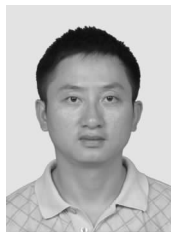


虎杖固体发酵生产白藜芦醇工艺条件优化研究



WANG Wei

王 卫, 李小沛, 曾柏全, 黎继烈, 姚跃飞

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004)

摘 要: 应用黑曲霉固体发酵法酶解虎杖中的虎杖苷,以提高从虎杖中获取白藜芦醇的得率。分别对固体堆积发酵条件:菌龄、温度、接种量、水料比进行单因素分析,并采用正交法对 4 因素进行组合优化,实验结果表明,最优工艺条件为:温度 40 ℃,水料比 2:1(g:g),接种量 1%,菌龄 40 h;此条件下,发酵 48 h,虎杖中白藜芦醇得率提高到 1.48%,是未固体发酵虎杖中白藜芦醇的 4.35 倍。

关键词: 白藜芦醇;虎杖;虎杖苷;正交试验;固体堆积发酵

中图分类号:TQ351

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2011)06-0091-04

Optimized Biotransformation Technology of Polydatin from *Polygonum cuspidatum* by Solid State Fermentation to Produce Resveratrol

WANG Wei, LI Xiao-pei, ZENG Bo-quan, LI Ji-lie, YAO Yue-fei

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: Based on the solid state hydrolysis of polydatin by β -glucosidase in *Aspergillus niger*, the yield of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. increase. Using the content of resveratrol from *P. cuspidatum* as an evaluation standard, four factors were chosen in the solid state fermentation. They are cell age, temperature, inoculum size and ratio of water to material as the observation factors. The influencing factors of the fermentation technology of polydatin biotransformation from *P. cuspidatum* were studied by using univariate and $L_9(3^4)$ orthogonal test. The optimum fermentation technology of polydatin transformation from *P. cuspidatum* was as follows: temperature at 40 ℃, ratio of water to material 2:1, a inoculum size in 1% and a cell age at 40 h. The experimental results showed that after solid state fermentation in 48 h, the yield of resveratrol from *P. cuspidatum* increased to 1.48% and was 4.35 times of the resveratrol content in the raw *P. cuspidatum*.

Key words: resveratrol; *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc; polydatin; orthogonal test; solid state fermentation

虎杖系蓼科植物虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)的根茎和根,能散瘀定痛、祛风利湿、止咳化痰等,其有效活性成分为二苯乙烯类和蒽醌类化合物,前者主要是白藜芦醇及其糖苷,后者主要是大黄素及其糖苷。白藜芦醇具有抑制肿瘤、抗氧化、抗自由基、抗血栓、抗过敏、抗动脉粥样硬化和具有冠心病、缺血性心脏病、高血脂症的防治作用,白藜芦醇已被列为抗心血管、抗癌最有前途的药物之一^[1-2]。干燥虎杖根茎中白藜芦醇的质量分数仅为 0.1%~0.2%,而虎杖苷质量分数为 2%左右,如何高效转化虎杖苷为白藜芦醇成为研究热点。苏文强等^[3]采用碱提酸沉淀法从虎杖中提高分离白藜芦醇的纯度,但酸碱处理会造成环境污染,降低产量。向海艳等^[4]及吕之尧等^[5]研究组分别用添加生物酶的方式促进虎杖苷转化为白藜芦醇,增加提取物中白藜芦醇含量,宋欣等^[6]利用 β -葡萄糖苷酶酶解作用使白藜芦醇产率提高 4 倍,但添加生物酶法也存在制备、纯化酶工序繁杂,成本较高,而且虎杖本身成分复杂,有活性成分,也有大量的植物纤维、淀粉、蛋白质等非活性成分,单一的 β -葡萄糖苷酶受这些非活性成分影响难以深入到植物内部。此外,非活性成分还影响细胞中活性成分的有效浸出。曹庸^[7]、杨庆利等^[8]报道了利用筛选的产酶微生物在浸没培养中将虎杖中非活性营养成分分解,支持微

收稿日期:2011-03-03

基金项目:中南林业科技大学青年科学研究基金(07036B)

作者简介:王 卫(1976-),男,湖南益阳人,讲师,硕士,主要从事于微生物菌种选育及发酵工艺优化研究;

E-mail: wanderwish@126.com。

生物生长、繁殖,并转化虎杖苷为白藜芦醇,使其含量提高10~20倍,但其过程操作及设备要求高,基础建设投入大,且虎杖需要预粉碎,不利于推广应用。微生物固体堆积发酵相对而言,不需添加贵重设备,也无较大环境污染,易于在原料产地推广应用。为了更深入地研究固体发酵生物转化虎杖苷的技术特点,本研究通过单因素和正交试验寻找最佳生物转化固态发酵工艺条件及显著影响因素,以为固体发酵法将虎杖中虎杖苷转化成白藜芦醇工艺的产业化提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

虎杖(虎杖苷1.63%,白藜芦醇0.34%)购自长沙医药市场;白藜芦醇标准品由湖南怀化华光生物工程有限公司提供。固体发酵菌株:黑曲霉(β -葡萄糖苷酶产生菌,本实验室保藏)^[9]。

无水乙醇、甲醇、石油醚、乙醚、乙酸乙酯等均为市售分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种扩大培养 培养液以查氏培养基为基础,去掉其中部分葡萄糖,加0.5%粒径小于0.3 mm的虎杖粉,高压灭菌。接入菌种后,30℃,120 r/min下培养一定时间,无菌过滤后,按设定的接种量(湿菌丝与虎杖的质量比)接入虎杖中固体发酵。

1.2.2 发酵方法及发酵条件优化 将无菌过滤所得的湿菌丝与适量水及虎杖根茎(约为1 cm左右小段)混匀后,恒温下进行堆积发酵。根据相关文献报道^[10],选取堆积发酵中4要素:菌龄、温度、水料比(g:g,下同)、接种量,先采用单因素分析,确定各因素最适范围,再采用4因素3水平的正交组合设计进行试验,以获取堆积发酵最佳因素组合,提高虎杖苷生物转化率。

1.2.3 白藜芦醇提取与分析方法 先称取通风干燥发酵好的虎杖,加入定量的乙醇,恒温浸提过夜,抽滤。白藜芦醇含量采用反相高效液相色谱法303 nm下测定^[11-13]。

2 结果与分析

2.1 堆积发酵条件单因素试验

菌株堆积发酵转化虎杖中虎杖苷条件主要有:温度、接种量、接种菌龄、发酵水料比等。以白藜芦醇含量为指标,对影响转化条件分别作单因素分析。

2.1.1 温度的影响 将接种量、菌龄、水料比分别固定为2%、36 h、2:1,发酵温度设定为30、40、50、60℃4个梯度,进行堆积发酵。每隔6 h取样分析虎杖内虎杖苷转化白藜芦醇的情况,数据整理后,发酵温度与白藜芦醇转化关系见图1。

由图1可知:发酵前期虎杖苷转化速度随发酵温度上升而加快,转化程度也随之提高,但温度高于40℃时,白藜芦醇含量在30 h达到峰值后逐步下降,应该是高温下杂菌或白藜芦醇自身的降解所导致。因扩大堆积发酵时,局部可能因生物代谢产热较高,发酵温度难以均匀,故此实验采用发酵温度为40℃,以确保获得稳定的虎杖苷转化量。

2.1.2 菌龄的影响 菌龄不同的菌株体内酶系发育情况不同,适应环境的能力也不同,因此有必要讨论菌龄对虎杖转化过程的影响。将接种量、温度、水料比分别固定为2%、40℃、2:1,菌龄设定为24、36、48、60 h 4个梯度,进行堆积发酵。每隔6 h取样分析虎杖苷转化白藜芦醇的情况,结果见图2。

对于霉菌液体培养而言,发酵24 h左右往往是菌株对数生长前期,而发酵60 h则菌体内积累一定有机酸,进入次级代谢初期。不同发酵生理时间因培养基配比及发酵条件变化,略有出入。当用菌龄为24 h菌株发酵,最大白藜芦醇质量分数仅为0.75%,而用菌龄为60 h菌株发酵,菌内酶系浓度虽然高,但菌繁殖速度慢,导致转化程度低于菌龄为36和48 h的菌。综合菌繁殖和菌产酶能力,最终选择将菌龄为48 h的菌接种入虎杖进行堆积发酵。

2.1.3 接种量的影响 将菌龄、温度、水料比分别固定为48 h、40℃、2:1,发酵接种量设定为1%、2%、3%、4% 4个梯度,进行堆积发酵。每隔6 h取样分析虎杖内虎杖苷转化白藜芦醇的情况,数据

整理后,接种量与白藜芦醇转化关系见图3。

接种量在堆积发酵过程的影响如同液体浸没发酵,即接种量小,则发酵迟滞期延长,对发酵而言意味着生产强度降低和发酵染菌风险提高;但接种量过大,意味着作为种子培养增加,成本也增加,因此本系统中适宜的接种量选择为2%。

2.1.4 水料比的影响 将接种量、温度、菌龄分别固定为2%、40℃、48h,发酵水料比为1.8:1、2:1、2.2:1、2.5:1 4个梯度,进行堆积发酵。每隔6h取样分析虎杖内虎杖苷转化成白藜芦醇的情况,结果见图4。

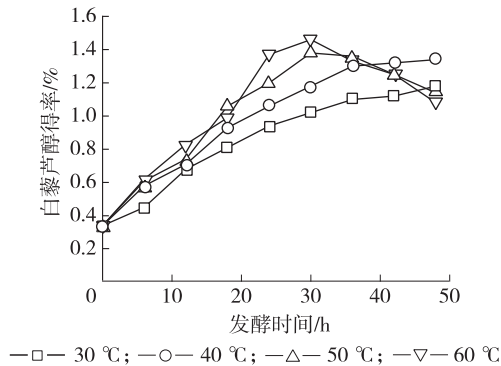


图1 不同发酵温度对虎杖苷转化的影响

Fig.1 Effect of different fermentation temperature on the polydatin biotransformation

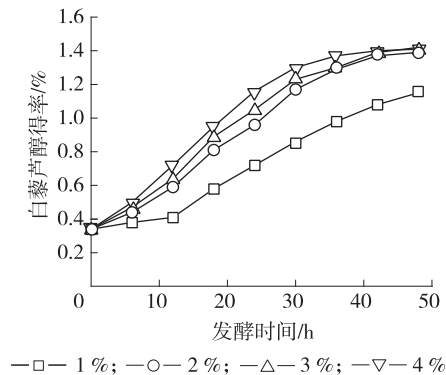


图3 不同接种量对虎杖苷转化的影响

Fig.3 Effect of different inoculums size on the polydatin biotransformation

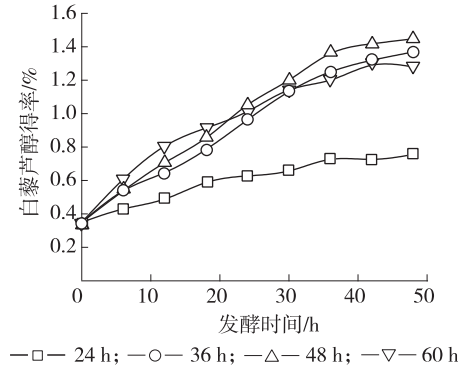


图2 不同菌龄菌株对虎杖苷转化的影响

Fig.2 Effect of different fungus age on the polydatin biotransformation

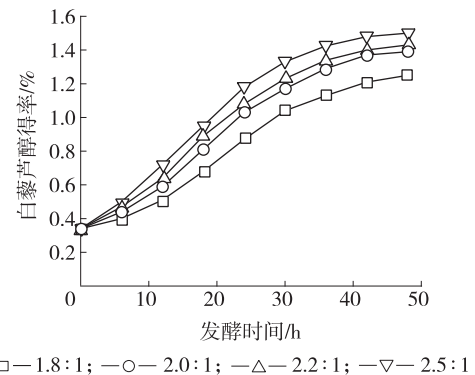


图4 不同发酵水料比对虎杖苷转化的影响

Fig.4 Effect of different fermentation humidity on the polydatin biotransformation

发酵过程水活度增加,即水料比提高,有助于菌体生长和外泌酶的扩散,因此水料比增加能够加快虎杖苷的酶解和提高白藜芦醇得率;但另一方面,水料比提高却增加白藜芦醇提取过程的能耗,使分离纯化过程成本上升。因而在堆积发酵时,水料比必然有一最适值。通过图4可知:当水料比由1.8:1提高至2:1时,发酵产白藜芦醇得率提高幅度较大;而进一步提高水料比时,白藜芦醇得率增幅减缓。故此,将水料比设定为2:1,虎杖固体发酵转化较为理想。

2.2 正交试验

为研究各因素对虎杖固体堆积发酵酶解虎杖苷效果的交互影响,在考察单因素试验结果基础上,依1.2.2节方法安排正交试验,试验结果及极差分析见表1。

由表1可知,4因素对虎杖苷生物转化率的显著性主次顺序为:温度>水料比>接种量>菌龄,可以得出最佳固态发酵条件为A₂B₂C₁D₁。水料比以及温度的变化对固体发酵过程虎杖苷转化率有较大的影响,而接种量和菌龄对虎杖苷转化率影响不太显著。因此,温度和水料比的最适条件分别为40℃和2:1,考虑生产成本,选择接种量和菌龄分别为1%和40h。

表1 正交试验极差分析结果
Table 1 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

序号 No.	A 水料比(g:g) water to material	B 温度/℃ temp.	C 菌龄/h fungus age	D 接种量/% inoculum size	白藜芦醇得率/% resveratrol yield
1	1.5:1	35	40	1	1.19
2	1.5:1	40	48	2	1.32
3	1.5:1	45	56	3	1.27
4	2.0:1	35	48	3	1.30
5	2.0:1	40	56	1	1.48
6	2.0:1	45	40	2	1.43
7	2.5:1	35	56	2	1.28
8	2.5:1	40	40	3	1.41
9	2.5:1	45	48	1	1.38
k_1	1.260	1.256	1.343	1.350	
k_2	1.403	1.403	1.333	1.343	
k_3	1.356	1.360	1.343	1.327	
R	0.143	0.147	0.010	0.023	

依上述优化工艺条件进行稳定性实验,重复实验6批次,平均白藜芦醇得率为1.48%,相对标准误差(R_{RSD}) = 0.43%,虎杖苷转化率稳定。发酵后虎杖50%甲醇水提取液(10 g/L)的HPLC见图5。

3 结论

固体发酵具有投资少,环境污染小,易推广等优点。本研究以提高从虎杖中获取白藜芦醇量为目的,对虎杖固体堆积发酵的工艺条件进行优化,通过相应的单因素和正交分析,确定在微生物转化虎杖过程中最优工艺条件:温度为40℃,水料比为2:1,接种量为1%,菌龄为40h,发酵48h后,白藜芦醇得率为1.48%,是未发酵虎杖原料白藜芦醇得率的4.35倍,并对优化工艺条件的稳定性进行了考察,虎杖苷转化率稳定。

参考文献:

- [1] LIU J N, TSAI S H. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol[J]. Proc Natl Coun ROC; B, 2005, 23(3): 99-106.
- [2] OLAS B, WACHOWICZ B, SALUK-JUSZAK J, et al. Antioxidant activity of endotoxin-stimulated blood platelets[J]. Cell Biology and Toxicology, 2001, 17: 117-125.
- [3] 苏文强, 杨磊, 李艳杰, 等. 碱提取法从虎杖中分离白藜芦醇的研究[J]. 林产化工通讯, 2004, 38(1): 17-20.
- [4] 向海艳, 周春山, 陈龙胜, 等. 酶法提取虎杖中白藜芦醇新工艺研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(4): 77-80.
- [5] 吕之尧, 郭崇华. 微生物酶法从虎杖中提取白藜芦醇的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 283-286.
- [6] 宋欣, 曲音波, 袁晓华. β -葡萄糖苷酶在转化白藜芦醇苷制备白藜芦醇中的应用: 中国, CN200810014833.8[P]. 2008-09-03.
- [7] 曹庸. 微生物转化虎杖材料提取高纯白藜芦醇的工艺: 中国, CN200610031850.3[P]. 2007-01-17.
- [8] 杨庆利, 张初署, 禹山林, 等. 利用黑曲霉发酵花生根提取白藜芦醇的方法: 中国, CN200810147435.3[P]. 2009-01-28.
- [9] 龚云杰, 王卫, 曾柏全, 等. 产纤维素酶微生物发酵转化虎杖提高白藜芦醇收率的研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(9): 190-193.
- [10] 田天丽, 沈竟, 徐萌萌, 等. 虎杖中虎杖苷的微生物发酵转化研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(2): 437-440.
- [11] 杨汉荣, 李来生, 陈雄泉. 高效液相色谱法测定虎杖中白藜芦醇、白藜芦醇苷和游离大黄素[J]. 理化检验: 化学分册, 2008, 44(3): 234-236.
- [12] 曹庸, 于华忠, 张敏, 等. HPLC法测定虎杖白藜芦醇的含量及其稳定性研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(2): 61-64.
- [13] 雷勇, 曹庸, 陈雪香, 等. 虎杖不同组织部位及其愈伤组织中白藜芦醇含量的测定[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(增刊): 109-112.

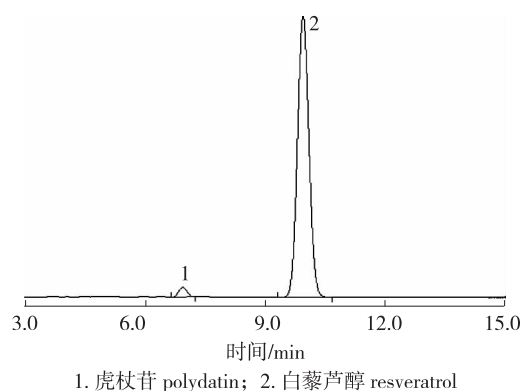


图5 虎杖中虎杖苷转化白藜芦醇的HPLC分析
Fig. 5 HPLC analysis of the transformation product of polydatin