

微生物发酵提高油茶粕中黄酮类物质提取率的研究

刁欢*, 孙方方, 朱华燕, 刘洁, 余伟群

安徽新华学院药学院, 合肥 230088

摘要:以油茶粕为原料,研究微生物固态发酵对油茶粕中黄酮提取率的影响。采取单因素和正交试验,研究发酵时间、发酵温度、菌种接种量、摇床转速对油茶粕中黄酮提取率的影响。单因素试验结果表明,发酵温度 30 °C、发酵时间 4 d、接种量为 3 mL 以及摇床转速 180 rpm 时发酵效果较好;再选择其中影响较大的因素,设计三因素三水平的正交试验,确定各因素水平的优劣。实验结果表明,最佳发酵工艺为 $A_2B_2C_2$,在该工艺条件下黄酮提取量最高为 0.386%,较未发酵对照组(0.219%)提高了 76.3%。

关键词:油茶粕;微生物发酵;黄酮;提取率

中图分类号: Q814.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.9.004

Microbial Fermentation Promote Extraction Rate of Flavonoids from Camellia Meal

DIAO Huan*, SUN Fang-fang, ZHU Hua-yan, LIU Jie, YU Wei-qun

Anhui Xinhua University College of Pharmacy, Hefei 230088, China

Abstract: The effect of microbial solid fermentation on the extraction rate of flavonoid was investigated using camellia meal as raw material. The influence of fermentation time, fermentation temperature, inoculation amount, shaking speed on the extraction rate of flavonoids from camellia meal was studied by single factors and orthogonal experiments. The single factor experiment results showed the optimal condition was fermentation temperature of 30 °C, fermentation time of 4 d, inoculation amount of 3 mL and shaking speed of 180 rpm. Then the three factors and three levels of orthogonal experiment was designed by choosing the three greater influencing factors to determine the different effects of each factor and each level. The orthogonal experiments results showed that the optimal fermentation process was $A_2B_2C_2$, and the highest extraction rate of flavonoids was 0.386% under the optimal process which increased by 76.3% compared with the unfermented control group (0.219%).

Key words: camellia meal; microbial fermentation; flavonoids; extraction rate

油茶是我国南方丘陵地区所特有的一种油料作物,油茶粕是油茶经榨油后的残渣,是一种营养价值较高的榨油工业副产品,每年约有 70 万吨。油茶粕中含有 0.5% ~ 7% 的粗脂肪、10% ~ 20% 的蛋白质、15% ~ 25% 的纤维素、30% ~ 40% 的糖类物质^[1]。黄酮类化合物一般指两个具有酚羟基的苯环通过中央 3 个碳原子连接而成的一系列化合物,它是植物的一类次生代谢产物,具有抗氧化、延缓衰老和抵抗癌症^[2]、抗菌消炎^[3,4] 以及预防肥胖和糖

尿病^[5] 等众多作用。近年来有研究表明,油茶粕、油茶籽、油茶叶等部位中均含有黄酮类有效成分^[6-8]。然而绝大多数的油茶粕作为填塘剂或者直接废弃,既造成了环境污染,也导致资源浪费。目前有研究表明,微生物可合成黄酮类物质,或者改善合成途径等^[9,10]。本研究以油茶粕为原料,选择操作简便、耗能低、投资少的微生物固态发酵途径,以黄酮提取量为指标,研究发酵时间、发酵温度、转速、接种量等单因素对油茶粕中黄酮含量影响,再通过正交试验,确定最佳发酵工艺,提高油茶粕中黄酮类物质含量,增加油茶粕的资源利用率。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

油茶粕购买于皖西大别山山区,血粉购买于南

收稿日期: 2016-04-20 接受日期: 2016-07-04

基金项目: 2015 国家星火计划(2015GA710052); 2014 国家级创新创业训练项目(201412216001); 省级质量工程项目(2015ckjh115); 2015 国家级大创(201512216017、201512216017); 2015 省级创新创业训练项目(AH201512216003、AH201512216004)

* 通讯作者 Tel: 86-551-65872716; E-mail: 532045301@qq.com

宁饲料市场;葡萄糖(AR)、硝酸钠(AR)磷酸氢二钾(AR)、氯化钾(AR)购自国药集团化学试剂有限公司;琼脂(AR)购于 Solarbio 公司;蔗糖(AR)购自广东省精细化学品工程技术研究中心;芦丁对照品购自上海哈灵生物科技有限公司。

1.2 菌种与培养基

1.2.1 菌种

本研究采用黑曲霉对油茶粕进行发酵,菌种来源于合肥学院微生物实验室。

1.2.2 培养基

活化培养基(PDA 培养基):马铃薯提取液 1000 mL,葡萄糖 20.0 g,pH 自然。种子培养基采用液态 PDA 培养基,不加琼脂,115 ℃ 湿热灭菌 20 min。发酵培养基,称取油茶粕 10 g,血粉 2 g,磷酸氢二钾 0.016 g,硫酸镁 0.008 g 混匀置于 50 mL 锥形瓶中,加蒸馏水 16 mL,搅拌均匀,制成固态发酵培养基。121 ℃,20 min 灭菌。

1.2.3 菌种活化

挑取斜面保存菌体,于 50 mL 的液体 PDA 培养基中进行菌种活化,30 ℃ 150 rpm 振荡培养时间 24 h,得到活化菌液。

1.2.4 菌种扩增

分别取上述活化菌液于 100 mL 的种子培养基中以 1:10 比例进行 3 次的逐次菌种数量扩增,在 30 ℃ 150 rpm 振荡培养 72 h 为工作种子菌种液。

1.3 实验仪器

FA2004 型电子天平(上海民侨精密科学仪器有限公司);梨形分液漏斗(上海鼎杰生物科技有限公司);DZF-6020 型真空干燥箱(上海三发科技仪器有限公司);ZJ-TG16-WS 型高速离心机(北京同德创业科技有限公司);RE52CS 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);HH-2 型数显恒温水浴锅(常州市华普达教学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 黄酮提取方法

2.1.1 供试品溶液的制备

精密称取干燥的油茶粕粗粉 0.5 g,然后放置于 50 mL 圆底烧瓶中,加入 70% 乙醇 10 mL,回流提取 1.5 h,提取 2 次,趁热减压抽滤,合并滤液,于 60 ℃ 减压浓缩至干,加无水乙醇适量,超声处理使溶解,放冷,加无水乙醇定容至 25 mL。

2.1.2 对照溶液的制备

120 ℃ 干燥至恒重的芦丁为对照品,精密称取 10 mg,然后放置于 50 mL 量瓶中,加入适量无水乙醇,超声使其溶解,放冷,补加无水乙醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 标准曲线绘制

向 10 mL 量瓶中分别加入 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 的芦丁标准品,然后加入 0.1 mol/L 三氯化铝溶液 2 mL,再加无水乙醇定容至刻度,摇匀,充分显色 15 min,于 421 nm 处测定吸光度(A),以加入芦丁对照品溶液 0 mL 的溶液为空白对照。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,得芦丁标准曲线 $y = 10.959x + 0.0250$ 。

2.1.4 样品测定

精密量取适量供试品溶液,按 2.1.3 项方法测定吸光度值,计算黄酮含量。试验过程中每组样品只作单次提取,但测两次吸光度值并取平均值。提取油茶籽黄酮提取率 = 油茶籽中提取黄酮类物质的总质量/提取原料油茶籽干重 × 100%。测定对照组(未经发酵的油茶粕)中黄酮含量为 0.219%。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 接种量考察

按照发酵温度为 28 ℃、发酵时间为 5 d,转速 150 rpm,接种前对菌种预处理,并测定黑曲霉的孢子数约为 10^7 个/mL,选取 5 个接种量进行单因素试验,分别接种 1、2、3、4、5 mL,按照 2.1 提取和测定黄酮。

2.2.2 发酵时间考察

按照发酵温度为 28 ℃、接种量为 3 mL,转速 150 rpm,发酵 7 d,每天同一时间取样,并按照 2.1 提取黄酮。

2.2.3 发酵温度考察

按照接种量为 3 mL、发酵天数为 5 d,转速 150 rpm,选取 5 个培养温度进行单因素试验,发酵温度设定 26、28、30、32、34 ℃,按照 2.1 提取和测定黄酮。

2.2.4 摇床转速考察

按照接种量为 3 mL、发酵天数为 5 d,发酵温度 28 ℃,选取 5 个培养箱转速进行单因素试验,设定梯度转速 120、150、180、210、240 rpm,按照 2.1 提取和测定黄酮。

2.3 正交试验设计

在单因素试验基础上,考察发酵温度、发酵时

间、摇床转速 3 个因素对油茶粕总黄酮得率的影响, 采用 $L_9(3^3)$ 正交设计, 因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平 Levels	(A) 发酵温度 Fermentation temperature (°C)	(B) 发酵时间 Fermentation time (d)	(C) 转速 Shaking speed (rpm)
1	28	3	150
2	30	4	180
3	32	5	210

3 结果与分析

3.1 单因素试验结果

由“2.2”项单因素试验考察, 接种量对黄酮提取率的影响的结果如图 1(A), 由图可知, 当接种量 1~3 mL 时, 随着接种量的增加, 黄酮的提取率呈增加趋势, 最高达 0.368%; 但是接种量 4 mL 以后, 随

着接种量的增加, 黄酮的提取率呈现出下降的趋势; 菌种接种量是相对于发酵量而言的, 在发酵量一定的条件下, 增加菌种的接种量, 会使提取率有所提高, 而随着接种量的一直增加, 达到近似之前的接种量和发酵量的比例时, 便不会有所提高。因此本着节约资源, 充分利用的原则, 本实验接种量范围是 2~4 mL。

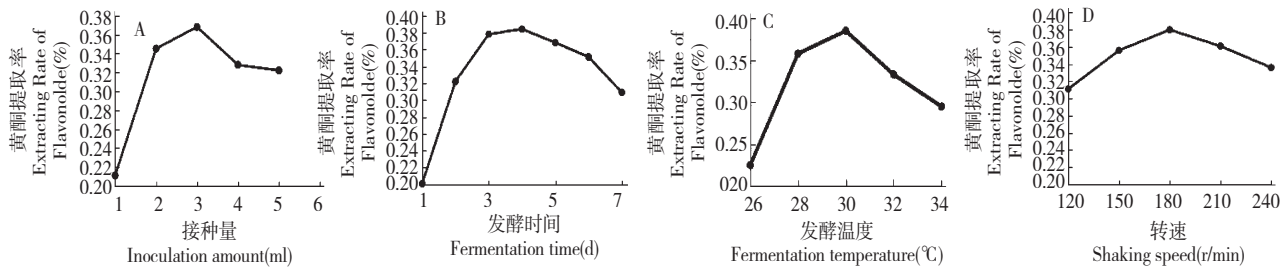


图 1 接种量(A)、发酵时间(B)、发酵温度(C)、转速(D)对黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of inoculation amount (A), fermentation time (B), fermentation temperature (C) and shaking speed (D) on the extraction rate of flavonoids

图 1(B) 为不同发酵时间对黄酮提取率试验结果影响, 由图可以看出发酵 1~4 d, 随着发酵天数的增加, 黄酮的提取率有所增加, 最高达 0.384%; 但是发酵天数达到 5 d 以后, 随着发酵天数的增加, 黄酮的提取率有所下降。发酵时间是发酵过程中的一个重要因素, 如果发酵时间过短, 微生物产生酶的性能不能得到很好的发挥; 相反发酵时间过长, 培养基所能提供的营养不足和细胞衰亡, 有可能会使产酶的性能下降, 影响产量。因此本实验较适宜的发酵天数为 3~5 d。

图 1(C) 为不同发酵温度对黄酮提取率试验结果影响, 从图可以看出, 当发酵温度 26~30 °C 时, 随着发酵温度的提高, 黄酮的提取率增加, 最高达 0.385%; 但是发酵温度达到 32 °C 时, 随着发酵温度的增加, 黄酮的提取率呈现出明显的下降趋势。微生物的生长和代谢产物的生成, 都需要各种酶来催

化。温度是保证酶活性的条件之一^[13,14]。温度升高, 反应速度加快。但是与此同时, 酶也很容易因为受热而失去活性, 最终会影响物质的产量。因此本试验最佳的发酵温度范围是 28~32 °C。

图 1(D) 为不同发酵温度对黄酮提取率试验结果影响, 从图可以看出, 当振荡培养箱转速从 120 rpm 升至 180 rpm 时, 总黄酮的提取率呈上升趋势, 当转速为 180 rpm 时, 总黄酮的提取率最高, 为 0.380%; 当转速继续升高时, 提取率呈下降趋势, 说明当转速为 180 rpm 时, 培养基中的含氧量最适合菌种的发酵生产, 所以产物含量达到最高。

3.2 正交试验结果

研究最佳发酵工艺, 在单因素试验的基础上, 设计了三因素、三水平的正交实验, 采用 $L_9(3^3)$ 方案设计, 以得出固态发酵法提高油茶粕中黄酮含量的最佳发酵条件。正交试验结果见表 2。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of the orthogonal experiments

实验号 No.	因素 Factors			
	(A) 发酵温度 Fermentation temperature (°C)	(B) 发酵时间 Fermentation time (d)	(C) 转速 Shaking speed (rpm)	黄酮提取率 Extraction rate of Flavonoids (%)
1	1	1	1	0.371
2	1	2	2	0.386
3	1	3	3	0.347
4	2	1	2	0.385
5	2	2	3	0.383
6	2	3	1	0.346
7	3	1	3	0.323
8	3	2	1	0.329
9	3	3	2	0.328
k_1	1.104	1.079	1.046	
k_2	1.114	1.098	1.099	
k_3	0.98	1.021	1.053	
R	0.134	0.077	0.053	

根据正交试验结果确定各因素水平的优劣,最佳试验方案是 $A_2B_2C_2$; 因素影响程度的主次依次为 $A > B > C$ 。最佳发酵条件为发酵温度 30 °C、发酵时间 4 d、摇床转速为 180 rpm,最佳发酵工艺下黄酮提取率最高为 0.386%。

4 讨论与结论

本文研究了利用黑曲霉对油茶粕进行固态发酵,以黄酮提取率为指标,采用单因素试验与正交试验相结合,得到最佳发酵条件:发酵温度 30 °C、发酵时间 4 d、摇床转速 180 rpm,最佳发酵工艺下黄酮提取率最高为 0.386%,较未经发酵的对照组(0.219%)提高了 0.167%,增幅 76%。在微生物生态系统中,微生物群落的代谢产物可影响生态系统的部分功能,黑曲霉在其生长的过程产生一些酶类,再经酶促反应,可将一些植物组织细胞壁的纤维结构,甚至将其大分子分解掉,减少提取传质阻力,有效释放黄酮等活性成分^[11]。目前已有报道表明微生物发酵能明显提高甘草黄酮的提取率,且混菌发酵效果优于单菌^[12]。未见微生物直接发酵油茶粕提取黄酮的报道,所以本研究具有首创性。此研究开拓了油茶粕新利用途径,对油茶粕的综合开发具有首创意。同时将微生物发酵技术应用于中药材有效成分提取,也比较有研究价值,为中药的开发利用开辟新的方向,对于提高药物疗效、降低药物毒性

等作用具有一定价值。

参考文献

- Deng GL(邓桂兰),Peng CY(彭超英),Lu F(卢峰). Study on the comprehensive utilization of oil-tea cake. *Sichuan Food Ferment* (四川食品与发酵),2005,16(3):41-44.
- Liu HL, Jiang WB, Xie MX. Flavonoids: recent advances as anticancer drugs. *Recent Patents Anti-Cancer Drug Discov*, 2010,5:152-164.
- Forkmann G, Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12: 155-160.
- Romagnolo DF, Selmin OI. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr*, 2012, 31:206-238.
- Leonard E, Yan Y, Fowler Z L, et al. Strain improvement of recombinant *Eherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Molecul Pharm*, 2008, 5:257-265.
- Chen HX(陈虹霞), Wang CZ(王成章), Ye JZ(叶建中), et al. Isolation and identification of flavonoid glycosides from *Gamellia oleifera* Abel. Cake. *Chem Ind Forest Prod* (林产化学与工业), 2011, 31(1):13-16.
- Wang HQ(王华清). Studies on isolation and identification of flavonoids from Tea (*Camellia sinensis*) seed and its antioxidant activity. Nanjing: Nanjing Normal University, MSc. 2012.