

黑曲霉发酵法辅助提取瞿麦黄酮及抗氧化活性研究

高晗, 郭东会*, 张显忠, 郭亚新 (泰山医学院生命科学院, 山东泰安 271016)

摘要 [目的]研究瞿麦黄酮的不同提取方法及抗氧化活性。[方法]采用黑曲霉固体发酵法、液体发酵法分别辅助提取瞿麦黄酮,与超声提取瞿麦黄酮得到总黄酮含量进行比较。通过测定瞿麦黄酮对羟基自由基、DPPH 自由基的清除作用,对其抗氧化活性进行研究。[结果]黑曲霉固体发酵法得到的瞿麦黄酮含量高于液体发酵法,两者均高于超声提取的瞿麦黄酮含量。瞿麦黄酮的提取物对羟基自由基、DPPH 自由基有良好的清除作用,其 IC_{50} 值分别为 0.065 和 0.046 g/L。[结论]该研究为瞿麦黄酮的开发与利用提供了新方法。

关键词 黑曲霉;发酵;瞿麦黄酮;抗氧化

中图分类号 S567.23*9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)32-0142-02

Study on Extraction of Flavonoids from *Dianthus superbus* Assisted with *Aspergillus niger* Fermentation and Its Antioxidant Activity
GAO Han, GUO Dong-hui*, ZHANG Xian-zhong et al (College of Life Science, Taishan Medical University, Tai'an, Shandong 271016)

Abstract [Objective] The research aimed to study the different extraction methods of flavonoids from *Dianthus superbus* and its antioxidant activity. [Method] *Aspergillus niger* solid fermentation and liquid fermentation were used to assist the extracting of flavonoids from *Dianthus superbus*, and the content of them were compared with that by the ultrasonic extraction method. Its antioxidant activity of flavonoids from *Dianthus superbus* was analyzed by measuring the scavenging action of flavonoids on hydroxyl radical and DPPH radical. [Result] The content of flavonoids by *Aspergillus niger* solid fermentation was higher than that of liquid fermentation, both of them were higher than that of ultrasonic extraction. The extract of flavonoids from *Dianthus superbus* had good scavenging effect on hydroxyl radical and DPPH radical. The IC_{50} of scavenging hydroxyl radical and DPPH radical were 0.065 and 0.046 g/L, respectively. [Conclusion] The study provides a new method for the development and utilization of flavonoids from *Dianthus superbus*.

Key words *Aspergillus niger*; Fermentation; Flavonoids from *Dianthus superbus*; Antioxidant

瞿麦(*Dianthus superbus*)为石竹科草本植物,别名野麦、巨句麦等^[1],具有利尿通淋、破血通经的作用^[2]。瞿麦的化学成分主要为黄酮类和皂苷类物质。有文献报道从瞿麦的地上部分分离得到 8 种黄酮化合物以及环肽类化合物^[3-4]。有关研究表明,黄酮具有抗氧化、抗癌、降血压、调血脂等药理作用,对人类的衰老、肿瘤和农业发展具有重要的意义。近年来,对于总黄酮的提取方法有浸提提取法^[5]、超声提取法^[6]、超临界流体萃取法^[7]、微波提取法、酶提取法^[8]等,而有关发酵法辅助提取瞿麦黄酮的研究鲜见报道。该法通过微生物发酵法产生复合酶制剂并以之分解植物细胞壁中的木质素、纤维素等大分子物质促进有效成分的浸出,较其他方法简单、更有价格的优势。该试验采用微生物发酵法辅助提取瞿麦黄酮优化其提取工艺,分析其抗氧化活性为瞿麦资源的开发与利用提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试材 瞿麦购自安国市旭芳中药材经营有限公司,粉碎,过 60 目筛,60 °C 烘烤至质量恒定后备用。黑曲霉由泰山医学院生命科学院微生物实验室提供。芦丁由中国药品生物制品检定所提供。DTT 购自 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 V-5100 可见分光光度计,购自上海元析仪器有限公司;KQ-600VDV 型双频数控超声波清洗器,购自昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 瞿麦黄酮提取方法的优化。

基金项目 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510439065)。
作者简介 高晗(1993—),女,山东聊城人,本科生,专业:生物制药。
*通讯作者,助理实验师,硕士,从事微生物生理生化研究。
收稿日期 2017-09-20

1.3.1.1 黑曲霉固体发酵法辅助提取瞿麦黄酮。固体发酵培养基^[9]:瞿麦 10.0 g、麸皮 10 g、蒸馏水 35 mL,121 °C 灭菌 20 min。将黑曲霉接入固体发酵培养基,于 37 °C、150 r/min 恒温振荡摇床培养 5 d。向培养后的瞿麦固体发酵瓶中加入 65 mL 60% 乙醇,30 °C、45 Hz、功率为 50%,超声提取 50 min。4 层纱布过滤后,60% 乙醇将液体定容至 100 mL,即为黑曲霉固体发酵瞿麦中的提取液,放入冰箱备用。

1.3.1.2 黑曲霉液体发酵法辅助提取瞿麦黄酮。液体发酵培养基^[10]:瞿麦 10.0 g、蛋白胨 2.0 g、葡萄糖 0.4 g、NaCl 1.0 g、蒸馏水 100 mL,121 °C 灭菌 20 min。将黑曲霉接入液体发酵培养基,于 37 °C、150 r/min 恒温振荡摇床培养 5 d。30 °C、45 Hz、功率为 50%,超声提取 50 min。3 000 r/min,离心 10 min,取上清。60% 乙醇将上清定容至 100 mL,即为黑曲霉液体发酵瞿麦中的提取液,将提取液放入冰箱备用。

1.3.1.3 超声提取瞿麦黄酮。称取瞿麦 10 g,加 100 mL 60% 乙醇,30 °C、45 Hz、功率为 50%,超声提取 50 min。3 000 r/min,离心 10 min,取上清。用 60% 乙醇将离心后的上清定容至 100 mL,即为瞿麦黄酮的提取液,将提取液放入冰箱备用。

1.3.2 黄酮浓度的测定。

1.3.2.1 不同浓度芦丁溶液的测定^[11]。称取芦丁标准样品 10 mg,用少量的 60% 乙醇溶解后,置 50 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇稀释至刻度,即为 0.2 g/L 的芦丁标准溶液。精密量取芦丁标准液 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别于 10 mL 容量瓶中,各加入 5% 的亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀放置 10 min,加入 10% 三氯化铝 0.3 mL 摇匀,放置 10 min,加入 1 mol/L 的氢氧化钠 2 mL,分别用 60% 乙醇稀释至刻度,摇匀,放置 10 min,于 510 nm 处测其吸光度。

1.3.2.2 黄酮含量的测定^[12]。分别将以上 3 种黄酮提取液

1 mL 加入 10 mL 容量瓶中,其他操作步骤按照“1.3.2.1”方法进行。最终计算 3 种黄酮提取液的黄酮含量 $E(\text{mg/g})$ 。

$$E = A \times C \times V \times 10^{-3} / W$$

式中, A 为样品液测黄酮稀释的倍数, C 为回归方程中求得的黄酮量(mg/L), V 为定容体积(mL), W 为样品重量(g)。

1.3.3 瞿麦黄酮的抗氧化活性研究。

1.3.3.1 瞿麦黄酮对羟基自由基的清除作用^[13]。在 10 mL 试管中依次加入 9 mmol/L Fe^{2+} 1 mL、8.8 mmol/L H_2O_2 1 mL, 摇匀,静置 10 min;取不同浓度的样品溶液 2 mL,摇匀,静置 10 min,再加入 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL,摇匀,静置 30 min,于 510 nm 处测其吸光值,其清除率计算公式为:

$$Q = \left(1 - \frac{A_x - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中, Q 为羟基自由基的清除率(%); A_0 为空白对照品溶液的吸光度值; A_x 为加入不同黄酮浓度样品的溶液吸光度值; A_j 为不加水杨酸的吸光度值。

1.3.3.2 瞿麦黄酮对 DPPH 自由基的清除作用^[14]。取不同黄酮含量的样品 1 mL,与 0.5 mol/L 的 DPPH 溶液 0.25 mL 混合,加乙醇至 10 mL,在暗处 37 °C 放置 20 min,于 517 nm 处测其吸光度,以乙醇为空白调零。黄酮对 DPPH 自由基的清除率的计算公式为:

$$I = \left(1 - \frac{A_x - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中, I 为 DPPH 自由基的清除率(%); A_0 为空白对照品溶液的吸光度值; A_x 加入不同黄酮浓度样品的溶液吸光度值; A_j 为不加 DPPH 的吸光度值。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉发酵法辅助优化提取瞿麦黄酮的条件 按“1.3.2.1”方法操作,用分光光度法获得以芦丁浓度为横坐标、吸光度为纵坐标所得的标准曲线回归方程为: $Y = 8.98x + 0.027 (R^2 = 0.998)$ 。根据回归方程计算 3 种不同方法提取瞿麦黄酮的含量如图 1 所示。

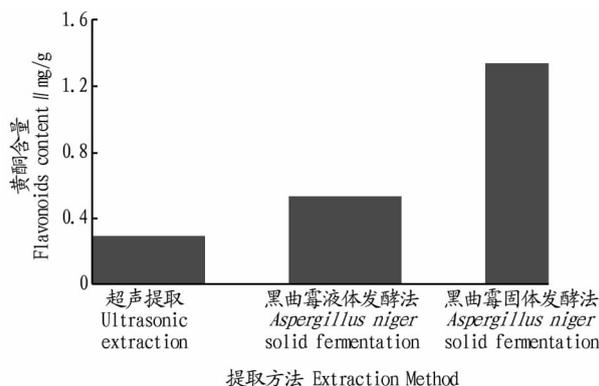


图 1 3 种不同方法提取瞿麦黄酮的比较

Fig. 1 The comparison of three different methods to extract flavonoids from *Dianthus superbus*

从图 1 可以看出,黑曲霉固体发酵法辅助提取瞿麦黄酮得到的黄酮含量高于液体发酵法,黑曲霉发酵法辅助提取瞿麦黄酮得到的黄酮含量高于普通的超声提取。黑曲霉固体

发酵法辅助提取瞿麦黄酮得到的总黄酮含量达 1.334 mg/g。此方法比廖志雄等^[15]的超临界流体萃取法高出 0.680 mg/g。此方法同时也为其他植物中黄酮的提取提供了理论依据。

2.2 瞿麦黄酮的抗氧化活性研究

2.2.1 瞿麦黄酮对羟基自由基的清除作用。由图 2 可知,瞿麦黄酮提取液对 Fenton 体系产生的羟基有很好的清除作用,随着瞿麦中黄酮提取液浓度的增加,对羟基自由基的清除能力也随之增强。通过统计学软件 SPSS 19.0 求出清除羟基自由基 IC_{50} 值为 0.065 g/L。表明瞿麦黄酮对清除羟基自由基具有较好的效果,有良好的抗氧化作用。

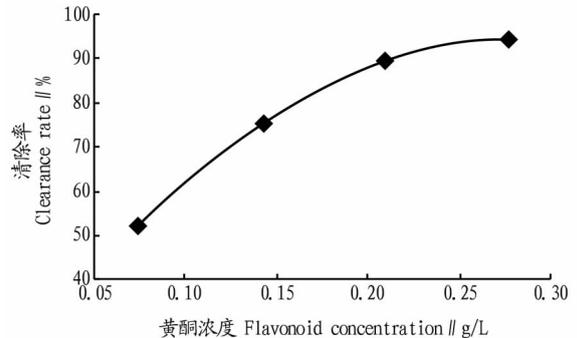


图 2 瞿麦黄酮对羟基自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging effect of flavonoids from *Dianthus superbus* on hydroxyl radicals

2.2.2 瞿麦黄酮对 DPPH 自由基的清除作用。由图 3 可知,在低黄酮浓度 0.05 ~ 0.20 g/L 时,随着瞿麦黄酮浓度的增加对 DPPH 自由基清除能力随之提高,但黄酮浓度到 0.20 g/L 之后对 DPPH 自由基的清除能力趋于平缓。通过统计学软件 SPSS 19.0 求出清除 DPPH 自由基 IC_{50} 值为 0.046 g/L。表明瞿麦黄酮具有较强的清除 DPPH 自由基的活性。

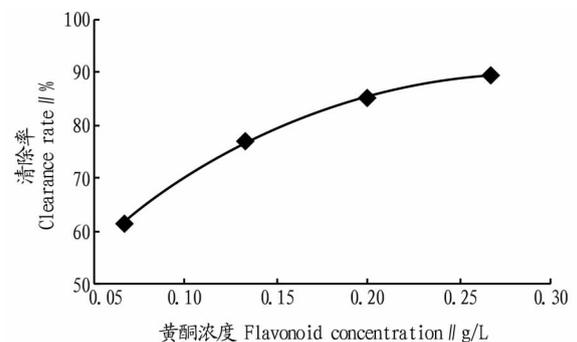


图 3 瞿麦黄酮对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 3 Scavenging effect of flavonoids from *Dianthus superbus* on DPPH radicals

3 结论

该研究采用黑曲霉发酵法辅助提取瞿麦黄酮,不仅提高了黄酮的得率,还降低了生产成本。对比固体发酵和液体发酵 2 种方法发现,固体发酵优于液体发酵,无论是液体发酵还是固体发酵均高于不用发酵直接超声提取的瞿麦总黄酮含量;黑曲霉固体发酵法得到的总黄酮含量达 1.334 mg/g。

(下转第 220 页)

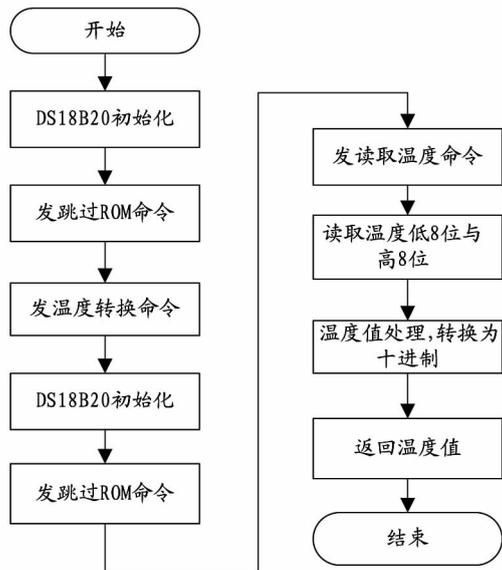


图 11 温度读取流程

Fig. 11 Flow of reading temperature

4 结语

在硬件设计时,结合生菜温度控制的特点,选用高级单片机 STM32F103zet6 为主控制器,其功能强大,可以同时挂载数十个温度传感器,能够扩大温度的测量范围,内部的延

时相当准确,极大提高了设计的速度与准确性;在软件设计时,以 keil5 为编程软件,选用 C 语言为编程语言,增加了程序的可移植性,为后期的二次开发提供了便利。该系统采用 PID 算法作为温度控制的核心算法,它是一种带反馈的控制系统,可以使温度的控制更加快速、平稳与准确。从整体的设计特点来看,硬件设计简单明了,尽量避免使用过多的辅助硬件,降低了设计的复杂程度,为后期的维修也带来了极大的便利,软件设计上采用 PID 算法提高了系统的抗干扰能力。

参考文献

- [1] 张玉峰. 基于单片机的蔬菜大棚温度控制系统设计[J]. 农机化研究, 2010, 32(3): 150-153.
- [2] 江绍春, 包君. 基于单片机的蔬菜大棚温度控制系统研究设计[J]. 农机化研究, 2012, 34(9): 150-153.
- [3] 李振东. 蔬菜温室大棚温度控制系统[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 1-57.
- [4] 梁万用, 王凯. 蔬菜大棚温湿度智能控制系统设计[J]. 安徽农业科学, 2009, 35(19): 9138-9139.
- [5] 黎运宇, 孔德荣. 基于单片机 AT89S52 的蔬菜塑料大棚恒温控制系统[J]. 广西民族师范学院学报, 2016, 33(3): 17-19.
- [6] 贝克. CMOS 集成电路设计手册[M]. 朱万经, 张徐亮, 张雅丽, 译. 北京: 人民邮电出版社, 2014.
- [7] 金凤莲. 模拟电子技术基础实验及课程设计[M]. 北京: 清华大学出版社, 2009.
- [8] 马骏. 蔬菜大棚温度电控系统的模糊控制研究[J]. 中国农机化学报, 2015, 36(1): 128-131.
- [9] 段乃侠. 蔬菜温室大棚温度控制系统的设计[J]. 机械设计与制造工程, 2015, 44(12): 52-55.

(上接第 143 页)

通过微生物发酵方法提取黄酮比传统方法超声提取更有优势。瞿麦黄酮对清除羟基自由基具有较好的效果,对 DPPH 自由基有一定的清除能力,表明瞿麦黄酮具有很好的抗氧化作用,这为瞿麦的进一步开发提供了有利依据。关于瞿麦黄酮的结构还待进一步研究。

参考文献

- [1] 李兴广, 高学敏. 瞿麦水煎液对小鼠妊娠影响的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(6): 40-42.
- [2] 李建军, 涂裕英, 佟菊贞, 等. 瞿麦等 12 味利水中药体外抗泌尿生殖道沙眼衣原体活性检测[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 628-629.
- [3] 廖志雄, 余建清. 瞿麦中总黄酮的含量测定[J]. 医药导报, 2006, 25(5): 472-473.
- [4] 刘晨, 张凌挥, 杨柳, 等. 瞿麦药理学研究概况[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(33): 20387-20388.
- [5] 阳崇德, 张秀贤. 大黄素的药理研究进展[J]. 中国药业, 2003, 12(3): 78-79.
- [6] 郭立杰, 蔡骏. 大黄素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2008,

35(8): 605-608.

- [7] GOEL R K, DAS GUPTA G, RAM S N, et al. Antiulcerogenic and anti-inflammatory effects of emodin, isolated from *Rhannus triquetra wall* [J]. *India J Exp Biol*, 1991, 29(3): 230-232.
- [8] SHI Y Q, FUKAI T, SAKAGAMI H, et al. Cytotoxic and DNA damage-inducing activities of low molecular weight phenols from rhubarb [J]. *Anticancer research*, 2001, 21(4A): 2847-2853.
- [9] 戴四发, 贺淹才. 黑曲霉产纤维素酶系各组分特性及酶解条件[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2001, 22(1): 65-69.
- [10] 牛丽亚, 刘宛玲, 肖建辉, 等. 黑曲霉发酵法提取麦胚黄酮工艺的研究[J]. 食品工业, 2015, 36(11): 1-3.
- [11] 高光跃, 冯毓秀, 秦秀芹. 山楂类果实的化学成分分析及其质量评价[J]. 药理学学报, 1995, 30(2): 138-143.
- [12] 王晓, 张红侠, 王其亮, 等. 酶法提取山楂叶中总黄酮的研究[J]. 工艺技术, 2002, 23(3): 37-39.
- [13] 黄红英, 邓斌, 蒋刚彪. 苦竹叶总黄酮的超声提取及其抗氧化研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1443-1445.
- [14] 勾明玥, 刘梁, 郭春枝. 采用 DPPH 法测定 26 种植物的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 148-150.
- [15] 廖志雄, 余建清. 瞿麦中总黄酮的含量测定[J]. 医药导报, 2006, 25(5): 472-473.

科技论文写作规范——结果

利用图、表及文字进行合乎逻辑的分析。务求精练通顺。不需在文字上重复图或表中所具有的数据, 只需强调或阐述其重要发现及趋势。

科技论文写作规范——工作单位

在圆括号内书写作者的工作单位(用全称)、城市名及邮政编码。若为外国的工作单位, 则加国名。多个作者不同工作单位时, 在名字的右上角分别加注“1”“2”, 和地址前注“1.”“2.”。