

3.57 mg,置1 mL量瓶中,加至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备:取克心疼缓释片,研细,精密称定1.012 g,用50 mL甲醇回流提取2次,每次20 min,挥干甲醇,用水饱和正丁醇溶解后,以0.26 mol/L Na_2CO_3 溶液萃取完全,合并碱液,调pH 2,乙醚萃取,合并乙醚液,挥干乙醚,用甲醇转移至5 mL量瓶中,加至刻度,备用。

2.4 标准曲线的制备:取阿魏酸对照品溶液50、70、100、120、150 μL ,分别置5 mL量瓶中,用甲醇稀释并加至刻度,依次进样。以阿魏酸质量浓度为横坐标,峰面积与迁移时间比值为纵坐标,进行回归,得回归方程为 $Y = 2.4819X - 3.7113$, $r = 0.9997$,线性范围:35.7~107.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5 精密度试验:取71.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿魏酸对照品溶液,重复进样5次,测定峰面积,计算峰面积与迁移时间的比值,计算得其RSD为0.46%。

2.6 重现性试验:精密称取同一批样品5份,制备供试品溶液,计算峰面积与迁移时间的比值,其RSD为1.0%。

2.7 稳定性试验:取供试品溶液,分别在0、2、4、6 h测定峰面积与迁移时间的比值,其RSD为1.5%。表明供试品溶液在6 h内稳定性较好。

2.8 加样回收率试验:取含阿魏酸75.28 mg/g的克心疼缓释片样品5份,各约0.5 g,各加入3.57 mg/mL阿魏酸对照品溶液2.0 mL,制备供试品溶液,测定回收率为98.4%,RSD为3.73%。

2.9 样品测定:吸取供试品溶液10 μL 进样,每批取3份,测定峰面积与迁移时间的比值,按照标准曲线法计算样品中阿魏酸的质量分数,结果见表1。

表1 克心疼缓释片中阿魏酸的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of ferulic acid in Kexinteng Sustained-release Tablet ($n=3$)

批号	阿魏酸/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
200301	75.29
200302	75.81
200303	74.91

3 讨论

3.1 缓冲液pH值的确定:阿魏酸的荷电性随pH的不同而异,pH<7时,阿魏酸以中性分子存在。在毛细管区带电泳模式下,中性组分之间难以分离,这样当缓冲液pH<7时,阿魏酸会与样品中其他中性组分同时出峰,使分离和定量困难。而当pH>7时,阿魏酸以羧酸根阴离子存在,在中性组分之后出峰,易于分离和定量。为使阿魏酸既能迅速出峰,又能与其他峰分离完全,本实验选择缓冲液pH 9.0。

3.2 同存成分的干扰:克心疼缓释片中含有延胡索,其主要成分为总生物碱,为排除其影响,样品处理采用甲醇提取后,挥干甲醇,用水饱和正丁醇溶解后, Na_2CO_3 碱液萃取的办法。实验表明,既不破坏被测成分阿魏酸,又有效排除了同存成分的干扰。

References:

- [1] Huang L S, Guo J X, Liu Y M, et al. Studies on determination of ferulic acid by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26(2): 134-136.
- [2] Sun S R, Huang X, Ren P, et al. Quantitative analysis of ferulic acid in serum after oral administration of decoction of both *Ligusticum chuanxiong* and *Salviae miltiorrhizae* root in patients with blood stasis by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (3): 223-225.
- [3] Fu S P, Wang L X, Zhang F, et al. Determination of ligustrazin and ferulic acid in Si-wu-tang and its related preparations by capillary zone electrophoresis [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2003, 21 (4): 371-374.

利用板蓝根水提醇沉物生产产朊假丝酵母

张丽霞,杜连祥,路福平

(天津科技大学生物工程学院 天津市工业微生物重点实验室,天津 300222)

摘要:目的 以板蓝根的水提醇沉物为原料培养产朊假丝酵母。方法 将原料液化、糖化处理,以此水解液为发酵液进行液态发酵,并对该菌在水解液中的生长特性及发酵条件进行研究。结果 优化后的培养条件为:水解液还原糖含量2.65%,温度28℃,pH值5.5~6.5,接种量9%,装液量100 mL (500 mL三角瓶)。在优化培养条件下培养20 h后,产朊假丝酵母的生长达到稳定期,其活菌数达到 $6.61 \times 10^8/\text{mL}$ 。经检测,干燥后的菌粉中靛玉红达0.45 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。结论 以板蓝根水提醇沉物为原料生产产朊假丝酵母是可行的。

关键词:板蓝根;液态发酵;产朊假丝酵母;靛玉红

中图分类号:R282.15; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)04-0531-04

Liquid fermentation of *Candida utilis* with water extracted — alcohol precipitated wastes of *Radix Isatidis*

ZHANG Li-xia, DU Lian-xiang, LU Fu-ping

(Tianjin Industrial Microbiology Key Laboratory, Institute of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Key words: *Radix Isatidis*; liquid fermentation; *Candida utilis* (Henneb.) Lodd. et V. Rij; indirubin

板蓝根是传统的清热解毒良药,临床上广泛用于治疗多种疾病如流感、腮腺炎、乙脑、肝炎等,是公认的具有较好抗病毒效果的少数中药之一^[1]。板蓝根醇沉物是采用传统的水提醇沉工艺生产板蓝根颗粒过程中产生的泥状沉淀物,其中含有大量的淀粉、多糖及蛋白质等,是微生物可以利用的营养物质,同时也残留一部分药效成分。板蓝根醇沉物一直作为废料被扔掉,不仅污染环境,而且浪费资源。为了使板蓝根资源得到更加充分合理的应用,本实验对板蓝根醇沉药渣进行了分析,并对其采用液态发酵培养产阮假丝酵母,以期对板蓝根的综合利用进行有益的探索。

1 仪器与试药

Biotronik 3020 高效液相色谱仪, WU—875 紫外检测器;往复式摇床、水浴摇床、血球计数板,产阮假丝酵母(中国工业微生物菌种保藏中心),斜面保藏培养基(11°Be 麦芽汁琼脂),摇瓶种子培养基(11°Be 麦芽汁),板蓝根水提醇沉物(天津兴达中药材加工厂),耐高温 α -淀粉酶(1×10^5 U/mL),糖化酶(2×10^4 U/mL)。靛玉红对照品(中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 靛玉红的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件:色谱柱: Spherisorb C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 10 μ m);流动相:甲醇-水(80:20);体积流量:1.0 mL/min;柱温:室温;检测波长:292 nm;进样量:20 μ L。

2.1.2 标准曲线的绘制:称取靛玉红对照品 5.0 mg,加少量氯仿,加热溶解,定容至 50 mL。分别吸取 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置 5 mL 量瓶中,用氯仿稀释至刻度,进样测定。以峰面积对质量浓度进行回归,计算得回归方程为 $Y = 3.08 X - 8.26$, $r = 0.9924$,表明靛玉红在 2.0~16 μ g/mL 与峰面积线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液的制备:称取干燥、粉碎的板蓝根醇沉物及发酵后的菌粉各 25 g,加氯仿 250 mL,回流提取 6 h,经微孔过滤膜滤过,滤液浓缩并定容

至 5 mL,备用。

2.2 板蓝根水提醇沉物的组成:取适量的板蓝根水提醇沉物,采用苯酚-浓硫酸法^[2]测定总糖,菲林试剂法^[3]测定还原糖,微量凯氏定氮法^[3]测定粗蛋白,中性甲醛滴定法^[3]测定 α -氨基氮,重量法^[3]测定含水量, HPLC 法测定靛玉红。结果总糖、还原糖、粗蛋白、 α -氨基氮、水分、靛玉红的质量分数分别为 25.7%、8.5%、6.4%、0.3%、51%、2.53 μ g/g。可见,醇沉物中除水分以外主要为多糖和粗蛋白,还原糖的质量分数只有 8.5%。药效成分靛玉红的质量分数比较高。

2.3 活菌数的测定:用血球计数法^[4]测定。

2.4 板蓝根醇沉物水解液的制备:称取一定量的醇沉物,加水溶解,搅拌均匀,配制成 25% 水溶液。90 $^{\circ}$ C、pH 6.5、加酶量 10 U/g、液化 2 h, 60 $^{\circ}$ C、pH 5.0、加酶量 200 U/g、糖化 4 h,得到含一定还原糖的水解液。经测定水解液中还原糖的质量分数可达 17%,能够满足菌体生长的需要。

2.5 菌种种子液的制备:取活化好的斜面菌种一环接种于种子培养基中,装液量 40 mL/250 mL 三角瓶,于 28 $^{\circ}$ C、150 r/min、培养 16~18 h。在种子培养过程中每隔 2 h 取样 1 次,做出菌株的生长曲线,见图 1。可见,菌种在种子培养基中生长 4 h 后进入对数生长期,18 h 后便进入稳定期。镜检发现菌体细胞呈假丝状,生长旺盛,出芽率高。此时种子液中活菌数达 1×10^8 /mL,因此确定培养 18 h 的种子为最佳接种龄。

2.6 发酵方法:将培养至含活菌数为 1×10^8 /mL、出芽率大于 20%、死亡率不超过 1%、处于对数生长末期的种子培养液以一定的接种量接种于醇沉物水解液中,在一定的温度及转速下振荡培养 24 h,测定其中的活菌数。

2.6.1 水解液中还原糖对菌体生长的影响:将醇沉物水解液配制成体积分数分别为 7.5%、15%、22.5%、30%,进行培养,测定发酵液中的活菌数,结果活菌数分别为 3.68×10^8 、 5.34×10^8 、 5.12×10^8 、 4.87×10^8 /mL。可以看出,当水解液体积分数为

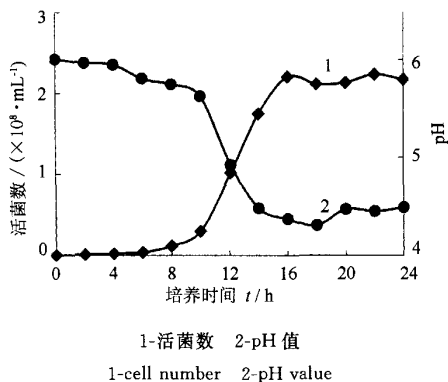


图 1 产朊假丝酵母种子生长曲线
Fig. 1 Growth curve of *C. utilis* seed

15%时,发酵液中活菌数最高,此时发酵液中还原糖质量分数为 2.65%。继续增加水解液体积分数不利于菌体生长。这一现象符合克雷布特效应^[5](the Crebtree effect),即在有氧条件下,较高质量分数的糖抑制酵母菌的呼吸作用,当葡萄糖质量分数大于 5%时,就会使酵母菌细胞中的呼吸酶合成和线粒体形成受到抑制,酵母生长速率明显下降。

2.6.2 培养温度对菌体生长的影响:温度的高低与发酵中的酶反应速率、氧在培养液中的溶解度和传递速率等密切相关,从而影响菌体生长和产物合成。在水解液中,改变培养温度,使其分别在 22、25、28、31、34 ℃下培养,测得活菌数分别为 4.52×10^8 、 5.33×10^8 、 5.64×10^8 、 5.26×10^8 、 4.91×10^8 /mL。该菌的最佳生长温度为 25~28 ℃。

2.6.3 初始 pH 值对菌体生长的影响:在水解液中,将初始 pH 值分别调至 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5,接种进行培养,测得活菌数分别为 4.21×10^8 、 4.83×10^8 、 5.62×10^8 、 5.54×10^8 、 5.67×10^8 /mL。可见,当培养基的初始 pH 值为 5.5~6.5 时,发酵液中活菌数最高。

2.6.4 不同接种量对菌体生长的影响:在水解液中,改变摇瓶接种量,使接种量分别为 3%、6%、9%、12%、15%,测定发酵液中的活菌数,分别为 3.76×10^8 、 5.21×10^8 、 6.17×10^8 、 6.11×10^8 、 5.89×10^8 /mL,结果表明当接种量为 9%时,发酵液中的活菌数最高。

2.6.5 装液量对菌体生长的影响:溶解氧是需氧菌发酵的必备条件,摇瓶装液量直接影响氧的传递。在优化培养基中改变装液量,使装液量分别为 50、75、100、125、150 mL,进行接种培养,测得活菌数分别为 4.36×10^8 、 5.61×10^8 、 5.78×10^8 、 5.23×10^8 、 3.74×10^8 /mL。当装液量为 100 mL 时,发酵液中的

活菌数最高。

2.7 在优化培养条件下菌种的发酵动力学曲线:以 15%醇沉物水解液为发酵培养基、接种量为 9%、初始 pH 6.0、装液量 100 mL、28 ℃下培养,每隔 2 h 测定发酵液中的相关参数,绘制发酵动力学曲线,见图 2。产朊假丝酵母在优化的培养条件下,6 h 进入对数生长期。随着菌体的大量繁殖,发酵液 pH 值迅速下降,还原糖和总糖不断减少,而蛋白的量逐渐增加。在 20 h 左右进入稳定期,还原糖几乎被耗尽,发酵液 pH 值有所上升,此时测得其平均活菌数为 6.61×10^8 /mL,蛋白的质量浓度为 0.838 g/100 mL 发酵液。

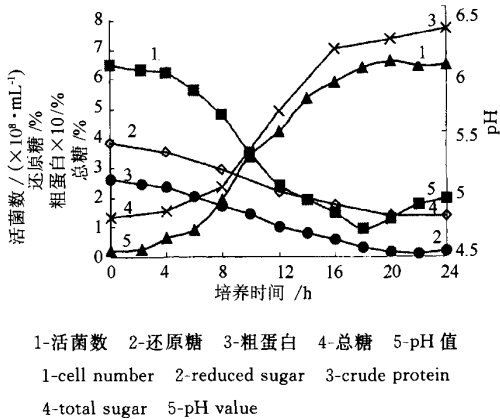


图 2 产朊假丝酵母在优化培养条件下的发酵动力学曲线
Fig. 2 Fermentation kinetic curves of *C. utilis* under optimal conditions

2.8 产品成分分析:将发酵液离心,取沉淀摊平于 35 ℃下鼓风干燥制成菌粉。发酵前后每 100 mL 发酵液中的干物质及各成分的比例见表 1。可见,发酵后的产品中蛋白质比原料提高 105%,总糖在发酵过程中由于菌体生长而大部分被消耗掉,质量分数有所降低。产品中药效成分靛玉红损失较为严重,可能是原料水解及发酵液灭菌过程受热所致。发酵得率为 42.6 g 菌粉/100 g 原料干基。

表 1 产品成分分析

Table 1 Product ingredient analysis				
项目	干重/g	粗蛋白/%	总糖/%	不溶物/%
发酵前	7.35	13.1	52.4	32.8
发酵后	3.13	26.8	10.1	61.7

3 讨论

板蓝根醇沉物为板蓝根颗粒水煎醇沉制备工艺中的遗弃物,其质量与板蓝根颗粒剂前浸膏相当。板蓝根木质部的薄壁细胞中含有大量的淀粉粒,煮沸提取过程中树脂状物、植物蛋白和淀粉粒大量溶出,并进一步糊化。醇沉时,由于大量沉淀物的吸附和包

裹作用,使得醇沉物中留有较大量的靛玉红^[6]。研究表明,板蓝根醇沉物具有明显的清热解毒作用,并对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等的生长均有明显的抑制作用,其作用强度与同剂量板蓝根颗粒剂前浸膏相当^[7]。板蓝根醇沉物中靛玉红的量明显高于板蓝根颗粒剂前浸膏,说明板蓝根醇沉物中含有一定的药理活性物质。

对原料及成品的主要成分进行比较可以看出,产品的含氮量明显高于原料。作为饲料添加剂,既含有大量的蛋白质,菌体中又富含维生素、多种酶及辅助因子等成分,可为动物生长提供丰富的营养。同时,醇沉物经过发酵后有效成分靛玉红的质量分数仍然高达 0.45 $\mu\text{g/g}$,残留的靛玉红也可发挥清热解毒的作用。

醇沉物中的糖分以多糖为主,而多数微生物只能以小分子的单糖、双糖作为碳源,因此需要对其中的多糖进行水解,成为可发酵性糖。多糖水解分为酶水解和酸水解两种,考虑到酸水解条件比较剧烈,温度高,时间长,所需 pH 值在 1.5~1.8,水解结束后调节 pH 值会带入较多的金属离子,不利于菌体的生长,因此选择条件较温和的双酶法进行水解。

高质量浓度的还原糖对酵母菌生长具有抑制作用,应当将发酵液初始还原糖质量浓度控制在 5% 以下。在对数生长后期,随着菌体的大量繁殖,发酵液中还原糖等营养物质被耗尽,有害代谢产物不断积累,使得菌体的生长速率下降。为了提高培养液中的菌体数,可在对数生长后期,采用分批补料或流加

补料的方式,向发酵液中补加还原糖,以延长菌体的对数生长期,从而获得高密度培养液。

我国是中草药种植、生产加工和消费的大国,近年来随着对中药资源开发力度的不断加大,中药材加工产生的废弃物也越来越多。这些药渣中的绝大多数均作为废料被扔掉或烧毁,这其中有尚未提取完全的有效成分及未开发的新用途。本研究中探讨了利用板蓝根醇沉物培养益生菌的方法,不仅有效解决了污染问题,并且使原料资源得到了更充分合理有效的利用,提高了产品的附加值,同时为采用相似工艺进行生产的其他中药的综合利用提供参考。

References:

- [1] Zhang R Z, Zhang Y W. The researching progress of indigowoad root [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (6): 474-476.
- [2] Sun P, Li Y, Gu C Z, et al. Microwave extraction and content determination of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. polysaccharide [J]. *Primary J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 2001, 15 (6): 22-23.
- [3] Tianjin Institute of Light Industry, Wuxi Institute of Light Industry. *Industrial Fermentation Analysis* (工业发酵分析) [M]. 2nd ed. Beijing: China Light Industry Press, 1997.
- [4] Du L X. *Technology of Industrial Microbiology* (工业微生物技术) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1992.
- [5] Sun T S. Controlling factors of microorganic metabolism during fermentation [J]. *Chin Condiment* (中国调味品), 1994 (10): 2-5.
- [6] Huang J, Huang L. Improvement of extraction process of indigowoad root granule [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 1999, 14 (5-6): 381-382.
- [7] Xu Q T, Du G J, Lin H H. Pharmacological study on alcohol deposit of *Radix Isatidis* [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药科学杂志), 2003, 23 (10): 587-589.

桑叶中多糖提取分离工艺的研究

张琳华,高瑞昶,许明丽

(天津大学化工学院,天津 300072)

摘要:目的 优选桑叶多糖提取分离最佳工艺。方法 比较稀酸、稀碱、蒸馏水 3 种提取方法,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,对影响多糖的水提取工艺和醇沉分离工艺的因素水平进行了研究,并比较了不同蛋白去除法对多糖提取分离的影响。结果 桑叶多糖的最佳提取工艺为用 10 倍量蒸馏水在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 2 次,每次 1.5 h。醇沉分离最佳工艺为醇沉时乙醇体积分数 80%,药液浓缩至 1 mL 药液/g 生药,pH 值为 4。用三氯乙酸(TCA)法去除蛋白质的效果优于传统的 Savage 法。结论 优选的桑叶多糖提取分离工艺稳定可行。

关键词:桑叶;多糖;提取分离;正交试验

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)04-0534-04

收稿日期:2004-07-02

作者简介:张琳华(1976—),女,上海人,1999年毕业于四川大学食品科学与工程系,现为天津大学化工学院制药工程专业 2002 级在读硕士,研究方向为药用天然产物的研发。Tel: (022) 27457016 E-mail: elley2001@sina.com.cn