



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103695478 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201310720687. 1

(22) 申请日 2013. 12. 24

(71) 申请人 湖南科源生物制品有限公司

地址 410000 湖南省长沙市万家丽中路 81
号华雅花园 1 栋 16 楼

(72) 发明人 刘杉林

(74) 专利代理机构 长沙星耀专利事务所 43205

代理人 龙芳 许伯严

(51) Int. Cl.

C12P 7/22(2006. 01)

C12R 1/645(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法

(57) 摘要

一种白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法, 包括以下步骤:(1) 内生真菌 L1 孢子悬浮液制备;(2) 培养基准备;(3) 发酵。本发明工艺发酵条件简单, 易控制, 酶转化专一性强, 转化率高, 成本低, 对环境友好。

1. 一种白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 内生真菌 L1 孢子悬浮液制备:从内生真菌 L1 PDA 斜面上挑五环菌体于 10ml 生理盐水中,充分震荡;

所述内生真菌 L1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC NO. 4558;

(2) 培养基准备:将新鲜虎杖粉碎至 200 目,按质量比虎杖 1.5wt%、无水乙醇 2 wt%、CMC-Na 2.5 wt%、 NH_4NO_3 0.2 wt%、 Na_2HPO_4 0.06 wt%、 CaCl_2 0.1 wt% 配制发酵培养基,调起始 pH 为 4.5 - 5.5;

(3) 发酵:先将步骤(2)中的培养基经 121°C、30min 湿热灭菌;再将内生真菌 L1 孢子悬浮液,接入起始 pH 4.5 - 5.5 的培养基中,接种量为相当于培养基体积的 5 - 10%,在 250ml 三角瓶中,培养基的装液量为 30mL,在培养条件为温度 26 - 30°C、转速 200 - 220r/min 下,发酵 36 - 60h,即成。

2. 根据权利要求 1 所述的白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法,其特征在于,步骤(3)中,内生真菌 L1 孢子悬浮液的接种量为相当于培养基体积的 9%。

一种白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法,尤其是涉及一种利用微生物法将白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法。

背景技术

[0002] 白藜芦醇是一种天然活性多酚化合物,具有抑制肿瘤、保护心血管、抗氧化、抗自由基等多种药理作用,被列为抗心血管病、抗癌最有前途的药物之一。

[0003] 目前,制备白藜芦醇的方法主要包括:1. 植物提取法,转化率低,成本高。2. 化学合成法,合成步骤繁多,白藜芦醇极易被氧化,反应产率受限制;合成过程所用的许多催化剂和化学试剂都具有一定危害性,环境污染严重。3. 植物细胞培养法,高产细胞株的遗传性状不稳定等原因,难以迅速实现大规模工业化生产。由此可见,上述方法各有利弊。寻找一种转化率高,成本低的白藜芦醇制取方法,已成为目前白藜芦醇生产行业的当务之急。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术的不足,提供一种转化率高,成本低的白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法。

[0005] 本发明解决其技术问题采用的技术方案是:一种白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的方法,包括以下步骤:

(1) 内生真菌 L1 孢子悬浮液制备:从内生真菌 L1 PDA 斜面上挑五环菌体于 10ml 生理盐水中,充分震荡;

所述内生真菌 L1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC NO. 4558 (参见申请号为 201110130127.1 的专利申请文件);

(2) 培养基准备:将新鲜虎杖粉碎至 200 目,按质量比虎杖 1.5wt%、无水乙醇 2 wt%、CMC-Na 2.5 wt%、 NH_4NO_3 0.2 wt%、 Na_2HPO_4 0.06 wt%、 CaCl_2 0.1 wt% 配制发酵培养基,调起始 pH 值为 4.5 - 5.5;

(3) 发酵:先将步骤(2)中的培养基经 121℃、30min 湿热灭菌;再将内生真菌 L1 孢子悬浮液,接入起始 pH 4.5 - 5.5 的培养基中,接种量为相当于培养基体积的 5 - 10% (优选 9%),在 250ml 三角瓶中,培养基的装液量为 30mL,在培养条件为温度 26 - 30℃、转速 200 - 220r/min 下,发酵 36 - 60h,即成。

[0006] HPLC 检测发酵液中白藜芦醇苷和白藜芦醇含量,转化率 $\geq 60\%$,转化后发酵液中白藜芦醇含量 $\geq 30 \mu\text{g/mL}$ 。

[0007] 本发明之微生物法转化白藜芦醇苷为白藜芦醇,先从新鲜虎杖上分离、纯化出内生真菌 L1,然后根据 L1 的生长性质特点,配制特定的培养基,在一定培养条件下通过 L1 转化虎杖白藜芦醇苷为白藜芦醇,确保白藜芦醇的高含量,进而提高白藜芦醇的产量。白藜芦醇苷就是虎杖的组成成分,传统提取只能提取虎杖中的白藜芦醇不能提取白藜芦醇苷,本

发明就是通过转化虎杖中的白藜芦醇苷为白藜芦醇,进而提高产量。

[0008] 本发明工艺发酵条件简单,易控制,酶转化专一性强,转化率高,成本低,对环境友好,是生产制备天然白藜芦醇的最好途径之一;且可实现工业化生产,环境污染小,资源环境友好,是生产天然白藜芦醇高值开发利用的重要途径。

具体实施方式

[0009] 以下结合实施例对本发明作进一步说明。

[0010] 实施例 1

本实施例包括以下步骤:

(1) 内生真菌 L1 孢子悬浮液制备:从内生真菌 L1 PDA 斜面上挑五环菌体于 10ml 生理盐水中,充分震荡;

所述内生真菌 L1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC NO. 4558 (参见申请号为 201110130127.1 的专利申请文件);

(2) 培养基准备:将新鲜虎杖粉碎至 200 目,取 200 目新鲜虎杖粉末 0.45g (虎杖 1.5wt%)、无水乙醇 0.6g (2%)、CMC-Na0.75g (2.5%)、 NH_4NO_3 0.06g (0.2%)、 Na_2HPO_4 0.018g (0.06%)、 CaCl_2 0.03g (0.1%) 配制发酵培养基;调起始 pH 为 5.5;

(3) 发酵:先将步骤(2)中的培养基经 121°C、30min 湿热灭菌;再将 2.7ml 的内生真菌 L1 孢子悬浮液接入 250ml 三角瓶中,所述三角瓶中装有 30ml 起始 pH 5.5 的培养基,再在培养条件为温度 28°C、转速 220r/min 下,发酵 60h,即成。

[0011] HPLC 检测发酵液中白藜芦醇苷和白藜芦醇含量,得白藜芦醇苷转化为白藜芦醇的转化率为 95.6%,转化后发酵液中白藜芦醇含量达 52.533 $\mu\text{g/mL}$,为未发酵的 9.90 倍。

[0012] 实施例 2

本实施例包括以下步骤:

(1) 内生真菌 L1 孢子悬浮液制备:从内生真菌 L1 PDA 斜面上挑五环菌体于 10ml 生理盐水中,充分震荡;

所述内生真菌 L1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC NO. 4558 (参见申请号为 201110130127.1 的专利申请文件);

(2) 培养基准备:取 200 目新鲜虎杖粉末 0.45g (虎杖 1.5%)、无水乙醇 0.6g (2%)、CMC-Na0.75g (2.5%)、 NH_4NO_3 0.06g (0.2%)、 Na_2HPO_4 0.018g (0.06%)、 CaCl_2 0.03g (0.1%) 配制发酵培养基;调起始 pH 为 4.5;

(3) 发酵:先将步骤(2)中的培养基经 121°C、30min 湿热灭菌;再将 1.4ml 的内生真菌 L1 孢子悬浮液接入 250ml 三角瓶中,所述 250ml 三角瓶中装有 20ml 起始 pH 4.5 培养基的 250ml 三角瓶中,再在培养条件为温度 26°C、转速 200r/min 下,发酵 36h 即成。

[0013] HPLC 检测发酵液中白藜芦醇苷和白藜芦醇含量,得白藜芦醇苷转化为白藜芦醇转化率为 60.2%,转化后发酵液中白藜芦醇含量达 33.080 $\mu\text{g/mL}$,为未发酵的 6.23 倍。

[0014] 实施例 3

本实施例包括以下步骤:

(1) 内生真菌 L1 孢子悬浮液制备:从内生真菌 L1 PDA 斜面上挑五环菌体于 10ml 生理盐水中,充分震荡;

所述内生真菌 L1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC NO. 4558 (参见申请号为 201110130127.1 的专利申请文件);

(2) 培养基准备:取 200 目新鲜虎杖粉末 0.45g (虎杖 1.5%)、无水乙醇 0.6g (2%)、CMC-Na0.75g (2.5%)、 NH_4NO_3 0.06g (0.2%)、 Na_2HPO_4 0.018g (0.06%)、 CaCl_2 0.03g (0.1%) 配制成发酵培养基;调起始 pH 为 5.0;

(3) 发酵:先将步骤(2)中的培养基经 121℃、30min 湿热灭菌;再将 3.6ml 的内生真菌 L1 孢子悬浮液接入装有 40mL 起始 pH 5.0 培养基的 250ml 三角瓶中,再在培养条件为温度 28℃、转速 200r/min 下,发酵 48h,即成。

[0015] HPLC 检测发酵液中白藜芦醇苷和白藜芦醇含量,得白藜芦醇苷转化为白藜芦醇转化率为 77.8%,转化后发酵液中白藜芦醇含量达 42.752 u g/mL,为未发酵的 8.06 倍。

[0016] 实施例 4

本实施例包括以下步骤:

(1) 内生真菌 L1 孢子悬浮液制备:从内生真菌 L1 PDA 斜面上挑五环菌体于 10ml 生理盐水中,充分震荡;

所述内生真菌 L1 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC NO. 4558 (参见申请号为 201110130127.1 的专利申请文件);

(2) 培养基准备:取 200 目新鲜虎杖粉末 0.45g (虎杖 1.5%)、无水乙醇 0.6g (2%)、CMC-Na0.75g (2.5%)、 NH_4NO_3 0.06g (0.2%)、 Na_2HPO_4 0.018g (0.06%)、 CaCl_2 0.03g (0.1%) 配制成发酵培养基;调起始 pH 为 4.5;

(3) 发酵:先将步骤(2)中的培养基经 121℃、30min 湿热灭菌;再将 2.7ml 的内生真菌 L1 孢子悬浮液接入装有 30mL 起始 pH 4.5 培养基的 250ml 三角瓶中,再在培养条件为温度 30℃、转速 200r/min 下,发酵 60h,即成。

[0017] HPLC 检测发酵液中白藜芦醇苷和白藜芦醇含量,得白藜芦醇苷转化为白藜芦醇转化率为 76.2%,转化后发酵液中白藜芦醇含量达 41.873 u g/mL,为未发酵的 7.89 倍。