



## Exploratory study of pigment extraction from *Curcuma longa* L. by solid-state fermentation using five fungal strains

## Estudio exploratorio de la extracción de pigmentos de *Curcuma longa* L. por fermentación en estado sólido utilizando cinco cepas fúngicas

M. Fernanda Andrade-Damián, Diana B. Muñiz-Márquez, Jorge E. Wong-Paz, Fabiola Veana-Hernández, Carlos Reyes-Luna, Pedro Aguilar-Zárate\*

Departamento de Ingenierías. Tecnológico Nacional de México, Campus Instituto Tecnológico de Ciudad Valles. Carretera al Ingenio Plan de Ayala Km. 2, Ciudad Valles, San Luis Potosí. C.P. 79010. Mexico.

\*Corresponding author

E-mail address: [pedro.aguilar@tecvallés.mx](mailto:pedro.aguilar@tecvallés.mx) (P. Aguilar-Zárate)

Article history:

Received: 20 January 2019 / Received in revised form: 27 March 2019 / Accepted: 4 May 2019 / Published online: 1 July 2019.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.3.1>

### ABSTRACT

*Curcuma longa* L. is an aromatic spice native from Southeast Asia, being curcumin its main phytochemical, which has been extracted by various methods (e.g. maceration, Soxhlet, ultrasound, microwave etc.). *C. longa* L. rhizome has applications in the food and pharmaceutical industries. The objective of the present work was to explore the extraction of pigments from turmeric assisted by solid-state fermentation (SSF) using fungal strains. Three grams of dry material with 70% humidity of the rhizome were used as a support supplemented with Czapek-Dox medium for the growth of *Aspergillus niger* GH1 and PSH, *Aspergillus oryzae* DIA-FM, *Aspergillus* sp. ITV, and *Aspergillus terreus* ITV. The fermentation conditions were 25 °C for 240 h, measuring the radial growth every 24 h and quantifying the curcumin content at the end of the fermentation. The results obtained showed the growth capacity of each strain on the plant material. *A. niger* GH1 and PSH had the highest growth rate (0.039 h<sup>-1</sup> and 0.036 h<sup>-1</sup>, respectively)

as well as the greatest capacity to release curcumin (58.42 and 58.21 mg/g). The SSF is a feasible method for the extraction of curcumin using *Aspergilli* strains.

**Keywords:** *Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* PSH, bis-demethoxycurcumin, curcumin, demethoxycurcumin.

## RESUMEN

*Curcuma longa* L. es una especia aromática originaria del sudeste asiático, su rizoma tiene aplicaciones en las industrias de alimentos y farmacéutica debido a que su principal fitoquímico es la curcumina, la cual se ha extraído por diversos métodos (maceración, Soxhlet, ultrasonido, microondas etc.). El objetivo del presente trabajo fue explorar la extracción de pigmentos de la cúrcuma asistida por fermentación en estado sólido (FES) empleando cepas fúngicas. Se utilizaron 3 g de material seco con 70% de humedad del rizoma como soporte suplementado con el medio Czapek-Dox para el crecimiento de *Aspergillus niger* GH1 y PSH, *Aspergillus oryzae* DIA-FM, *Aspergillus* sp. ITV, y *Aspergillus terreus* ITV. Las condiciones de fermentación fueron 25 °C por 240 h, midiendo el crecimiento radial cada 24 h y cuantificando a tiempo final el contenido de curcumina. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de crecimiento de cada cepa sobre el material vegetal, siendo *A. niger* GH1 y PSH las que tuvieron mayor velocidad de crecimiento ( $0.039\text{ h}^{-1}$  y  $0.036\text{ h}^{-1}$ , respectivamente) así como la mayor capacidad para liberar curcumina (58.42 y 58.21 mg/g). La FES es un método útil para la extracción de curcumina utilizando cepas del género *Aspergillus*.

**Palabras clave:** *Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* PSH, curcumina, bis-demetoxicurcumina, demetoxicurcumina.

## 1. INTRODUCCIÓN

La cúrcuma (*Curcuma longa* L.) es una planta de la familia Zingiberaceae originaria del sudeste asiático (Kocaadam & Şanlıer, 2017). Es una especia aromática utilizada principalmente para dar color y sabor picante a los platillos. Esta planta se ha cultivado en diferentes regiones del planeta debido a su fácil adaptación a condiciones climáticas y de suelo (Hossain & Ishimine, 2005). Esta planta es cultivada en pequeña escala en la región de la Huasteca Potosina, donde se cumplen las condiciones medioambientales y de suelo apropiadas para el desarrollo del cultivo.

La cúrcuma, en su rizoma contiene fitoquímicos que proporcionan el color característico amarillo-naranja. Los principales fitoquímicos encontrados en el rizoma de la cúrcuma son la curcumina di-feruloilmetano con fórmula química (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) y los curcuminoides demetoxicurcumina y bi-demetoxicurcumina (Zorofchian Moghadamtousi et al.,

2014). La curcumina y los curcuminoides son reconocidos como seguros por la FDA (Food and Drug Administration), por lo tanto, sus aplicaciones son diversas principalmente en el área de alimentos y farmacéutica (Patil *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2014).

Los procesos de extracción de curcumina son muy variados e incluyen procesos asistidos por Soxhlet, microondas, maceración, dióxido de carbono supercrítico, digestión, ultrasonido, y extracción enzimáticamente asistida. Dentro de los métodos convencionales para la extracción de curcumina, el Soxhlet es el método más utilizado. Sin embargo, presenta los inconvenientes de requerir tiempo (12 horas de extracción), energía (para el calentamiento de los sistemas), son demasiado laboriosos y utilizan una gran cantidad de solventes orgánicos (Kiamahalleh *et al.*, 2016; Kurmudle *et al.*, 2013; Mandal, Mohan *et al.*, 2008; Nabati *et al.*, 2014; Wakte *et al.*, 2011).

La extracción de compuestos bioactivos por fermentación en estado sólido (FES), es también una alternativa interesante que se puede explorar. La FES se define como el proceso de fermentación en ausencia o casi ausencia de agua libre, sin embargo, los sustratos pueden poseer suficiente humedad para promover el crecimiento y metabolismo de los microorganismos (Aguilar-Zárate *et al.*, 2018; Aguilar *et al.*, 2008). Los sustratos sólidos usados en FES son principalmente productos naturales obtenidos de la agricultura o residuos de la industria agroalimentaria (Mussatto *et al.*, 2012). Esta tecnología permite obtener extractos con alta actividad biológica y elimina la toxicidad asociada a los solventes orgánicos. La aplicación de la FES representa una alternativa real para la recuperación de fitoquímicos (Martins *et al.*, 2011). El uso de la FES para la extracción de curcumina y curcuminoides no ha sido suficientemente explorado, debido a que no existen reportes en literatura que presenten información relacionada.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo se centró en desarrollar un estudio exploratorio para la extracción de pigmentos de la cúrcuma por fermentación en estado sólido utilizando cinco cepas fúngicas con la intención de seleccionar la cepa con la mejor adaptación al medio de cultivo y con la capacidad de extraer la mayor cantidad de pigmentos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Obtención de *Curcuma longa* L**

El rizoma de *Curcuma longa* L. fue obtenido del mercado local de Ciudad Valles, San Luis Potosí. Se deshidrató en un desecador Nesco FD-1018A (Gardenmaster Food Dehydrator, USA) a temperatura de 115°F durante 24 h. Posteriormente el material se pulverizó en una Licuadora Profesional (Oster BPST02-Negro, México). Se obtuvo un tamaño de partícula aproximado de 1 mm. Posteriormente se conservó en una bolsa con cierre hermético, protegido de la luz.

### **2.2. Microorganismos**

Se utilizaron 5 cepas fúngicas para llevar a cabo la fermentación: *Aspergillus niger* GH1, *Aspergillus niger* PSH, *Aspergillus oryzae* DIA-MF obtenidas de la colección de microorganismos del Departamento de Investigación en Alimentos (DIA) de la Universidad Autónoma de Coahuila, *Aspergillus* sp. ITV y *Aspergillus terreus* ITV, aisladas de rizomas de cúrcuma e integradas a la colección de microorganismos del Laboratorio de Investigación de Alimentos del Instituto Tecnológico de Ciudad Valles. Las cepas fueron activadas en agar papa dextrosa (Bioxon) en cajas Petri e incubadas a 30°C por 72 h.

### 2.3. Fermentación en estado sólido

Para el desarrollo del bioproceso, se utilizaron placas de Petri de 60 por 15 mm como fermentadores. Por cada reactor, se utilizaron 12 g de material húmedo (70% de humedad). Para ajustar la humedad se utilizó el medio Czapek-Dox con la siguiente composición (g/100 mL): sacarosa, 5; NaNO<sub>3</sub>, 0.3; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05; KCl, 0.05; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1; FeSO<sub>4</sub>, 0.001. El medio fue esterilizado a 121°C por 15 min.

Los biorreactores se inocularon empleando un explante de agar papa dextrosa de 1 cm<sup>3</sup> ubicándolo en el centro de la placa. Los biorreactores inoculados con los cinco microorganismos se incubaron a 25°C por 240 h. Los ensayos fueron elaborados por triplicado.

### 2.4. Evaluación del crecimiento radial

El crecimiento de los microorganismos fue evaluado tomando lectura del crecimiento radial cada 24 h. Los datos obtenidos de la medición del crecimiento radial fúngico se modelaron utilizando la ecuación logística Verlhust-Pearl (Aguilar-Zárate *et al.*, 2018; Gatto *et al.*, 1988) para calcular las velocidades de crecimiento.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[ 1 - \frac{X}{X_{max}} \right] X$$

Donde  $\mu$  es el crecimiento específico máximo y  $X_{max}$  (crecimiento máximo en mm) es el valor de equilibrio para  $X$  donde  $dX/dt=0$ . La solución a la ecuación anterior se presenta en seguida:

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 - ((X_{max} - X_0)/X_0)e^{-\mu t}}$$

Donde  $X_0$  se refiere al valor de  $X$  cuando  $t=0$ . Los valores del error al cuadrado fueron minimizados considerando los valores de  $X_0$ ,  $X_{max}$  y  $\mu$ .

## 2.5. Obtención de extractos fermentados y cuantificación de curcumina

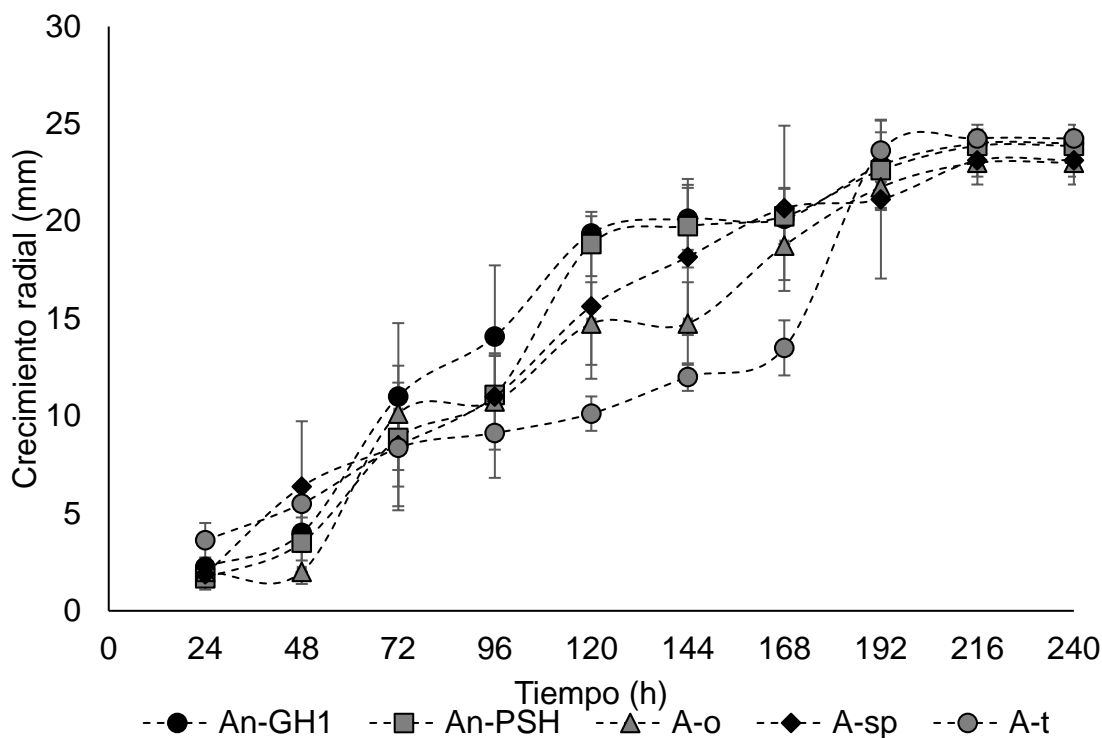
Para la obtención de los extractos, el material fermentado se homogenizó con etanol al 70% añadiendo 19 mL del solvente por cada biorreactor. Posteriormente se obtuvieron los extractos de cada microorganismo por compresión mecánica. El contenido de curcumina se obtuvo midiendo la absorbancia de los extractos en un espectrofotómetro de luz visible (GoDirect Vernier, USA) a 425 nm y comparando los resultados con un estándar de curcumina (Sigma-Aldrich, No. de catálogo C1386).

## 2.6. Análisis estadístico

Para comparar las medias de la velocidad de crecimiento y la absorbancia, fueron analizados mediante la prueba Tukey con una significancia de ( $p < 0.05$ ), con el paquete estadístico Statistica 7 (Statsoft, OK, USA).

## 3. RESULTADOS

Las cinco cepas fúngicas se hicieron crecer sobre el material vegetal (rizoma de la cúrcuma) suplementado con el medio Czapek-Dox. La medición del crecimiento radial se presenta en Fig. 1. Las cepas aisladas del material vegetal (*Aspergillus* sp. y *A. terreus*) mostraron rápido crecimiento durante las primeras 48 h. Sin embargo, el caso particular de *A. terreus*, a partir de las 72 h su crecimiento fue más lento. Un comportamiento similar se observó con *A. oryzae*, el cual tuvo crecimiento rápido durante las primeras 72 h de cultivo, posterior a ese tiempo su crecimiento fue más lento. Las cinco cepas probadas mostraron la capacidad para invadir el material vegetal, sin embargo, fue necesario establecer la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) como uno de los parámetros para hacer la selección de las cepas con la mejor capacidad de adaptación al medio de cultivo. Por lo tanto, los datos experimentales fueron modelados empleando la ecuación de Verlhust-Pearl. Como se muestra en la Tabla 1, *A. niger* GH1 fue la cepa con la mayor velocidad de crecimiento, seguida por *A. niger* PSH, sin observarse diferencias significativas entre ellas (Tukey  $p < 0.05$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas entre *A. oryzae* y *Aspergillus* sp. El microorganismo con menor velocidad de crecimiento fue *A. terreus*.



**Fig. 1.** Crecimiento radial de las 5 cepas fúngicas sobre *Curcuma longa* L. An-GH1, *A. niger* GH1; An-PSH, *A. niger* PSH; A-o, *A. oryzae* DIA-MF; A-sp, *Aspergillus* sp. ITV; A-t, *A. terreus* ITV.

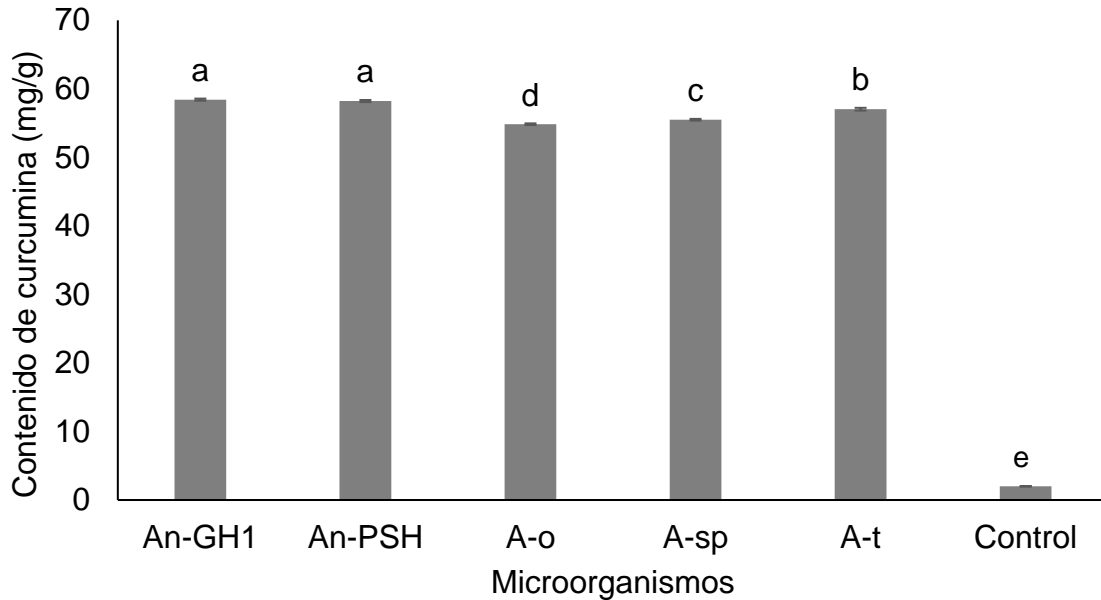
**Tabla 1.** Velocidad de crecimiento de las cinco cepas probadas.

Microorganismo	$\mu$ (mm h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<i>Aspergillus niger</i> GH1	0.039 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.98
<i>Aspergillus niger</i> PSH	0.036 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.98
<i>Aspergillus oryzae</i> DIA-MF	0.025 ± 0.007 <sup>ab</sup>	0.95
<i>Aspergillus</i> sp. ITV	0.027 ± 0.005 <sup>ab</sup>	0.98
<i>Aspergillus terreus</i> ITV	0.015 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.93

Con letras iguales no existe diferencia significativa de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

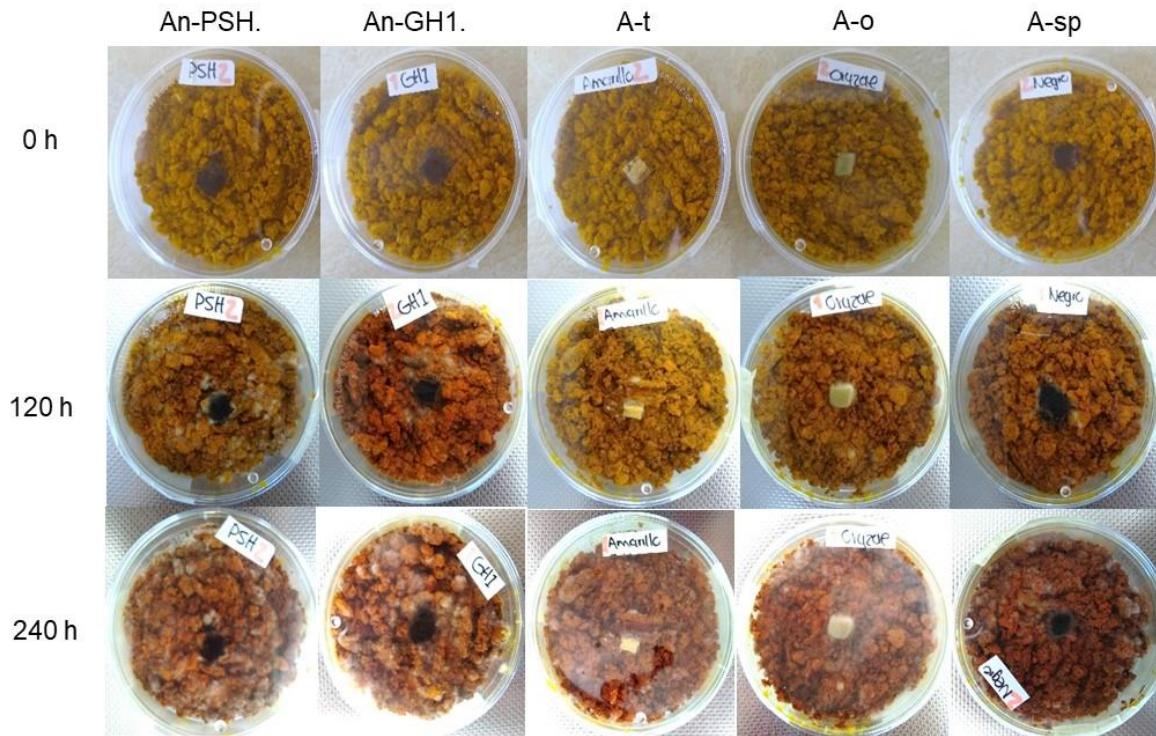
Como se puede apreciar, de las cinco cepas probadas, cuatro no presentaron diferencias significativas. Por lo tanto, fue necesario hacer una evaluación de la cantidad de curcumina liberada a tiempo final por cada uno de los microorganismos (Fig. 2). De esta manera, se encontró que tanto *A. niger* GH1 y PSH fueron las cepas capaces de liberar la mayor cantidad de curcumina (58.42 y 58.21 mg/g, respectivamente), sin mostrar diferencias significativas entre ellas

(Tukey  $p < 0.05$ ). El microorganismo que mostró menor capacidad para liberar curcumina fue *A. oryzae* DIA-MF con un rendimiento de 54.83 mg/g de material fermentado.



**Fig. 2.** Contenido de curcumina liberada por cada una de las cepas fúngicas. An-GH1, *A. niger* GH1; An-PSH, *A. niger* PSH; A-o, *A. oryzae* DIA-MF; A-sp, *Aspergillus* sp. ITV; A-t, *A. terreus* ITV y control sin fermentar. Letras iguales indican que no existe diferencia significativa (Tukey  $p < 0.05$ ).

La Fig. 3 muestra el crecimiento de las cepas de *A. niger* PSH y GH1, mismas que presentaron mejor crecimiento comparado con el resto de los microorganismos.



**Fig. 3.** Crecimiento micelial en el proceso de liberación de pigmentos de *C. longa* por fermentación en estado sólido.

#### 4. DISCUSIÓN

Las cepas de *A. niger* PSH y GH1 mostraron crecimiento similar. Estos microorganismos han sido reportados como capaces de crecer bajo condiciones de estrés propiciada por la presencia de fitoquímicos (Aguilar *et al.*, 2018; Ascacio *et al.*, 2016; Buenrostro *et al.*, 2014; De la Cruz *et al.*, 2015).

Como se mencionó previamente, tanto *A. niger* GH1 y PSH han sido reportadas como microorganismos con la capacidad de crecer en medios ricos en fitoquímicos, y han presentado capacidad para liberarlos o degradarlos (Aguilera *et al.* 2008; Robledo *et al.* 2008; Chavez *et al.* 2017; Aguilar *et al.* 2017). Las cepas de *A. niger* son reportadas como seguras por la FDA (Food and Drug Administration), por lo que es aceptado su uso en las industrias de alimentos y farmacéuticas.

En la literatura no se encontró información relacionada con la liberación de curcumina y curcuminoides por fermentación en estado sólido utilizando cepas fúngicas del género *Aspergillus*. Diversos autores han reportado la extracción de curcumina utilizando tecnologías convencionales y alternativas. Por ejemplo, Zhan *et al.* 2011, desarrollaron un estudio comparativo para evaluar la eficiencia de la extracción asistida por ultrasonido y la extracción en columna cromatográfica de alta eficiencia. Los autores obtuvieron rendimientos de 12.44 mg/g utilizando ultrasonido y de 20.95 mg/g utilizando extracción en columna cromatográfica.



El uso de ultrasonido combinado con temperatura puede ser una herramienta eficiente para la extracción de curcumina. Shirsath *et al.* 2017 obtuvieron un rendimiento de 20.95 mg de curcumina por g de material vegetal. Emplearon una frecuencia de ultrasonido de 22 kHz durante 1 h, etanol como solvente y una temperatura de 55 °C. Si bien la fermentación en estado sólido en el presente trabajo involucró un periodo de fermentación de 240 h, el proceso involucra un menor uso de energía y solventes. Cabe destacar que el proceso aún puede ser optimizado.

Las cepas fúngicas probadas tuvieron la capacidad de crecer sobre el material vegetal del rizoma de *Curcuma longa*. Los microorganismos que mostraron una mejor adaptación al medio de cultivo fueron *A. niger GH1* y *PSH*, basados en las velocidades de crecimiento. Estos mismos microorganismos mostraron la mayor capacidad para liberar pigmentos de la cúrcuma (58.42 y 58.21 mg de curcumina/g de material vegetal, respectivamente). La fermentación en estado sólido es una herramienta útil para liberar curcumina del rizoma de *Curcuma longa*. Es necesario desarrollar trabajos de optimización del proceso de fermentación, para mejorar los rendimientos de extracción y acelerar el proceso. Este es el primer reporte de extracción de pigmentos de cúrcuma asistida por fermentación en estado sólido utilizando cepas del género *Aspergillus*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto TecNM 6451.18-P Estudio de la liberación de pigmentos de azafrán (*Curcuma longa*) por fermentación en medio sólido utilizando una cepa fúngica.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Aguilar-Zarate, P. Wong-Paz, J., Buenrostro-Figueroa J., Ascacio J., Contreras-Esquivel J., & Aguilar C. 2018. Ellagitannins: Bioavailability, Purification and Biotechnological Degradation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(15), 1244-1252.

Aguilar-Zárate P., Wong-Paz J. E., Rodríguez-Duran L. V., Buenrostro-Figueroa J., Michel M., Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres E., Ascacio-Valdés J.A., Contreras-Esquivel J.C., & Aguilar, C. N. 2018. On-line monitoring of *Aspergillus niger* GH1 growth in a bioprocess for the production of ellagic acid and ellagitannase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 247, 412–418.

Aguilar C. N., Gutiérrez-Sánchez G., Prado-Barragán L. A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J. L., & Contreras-Esquivel J. C. 2008. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry Biotechnology*, 4, 354–366.

Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan L. A., Favela-Torres E., & Aguilar C. N. 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(2), 189–199.

Ascacio-Valdés J. A., Aguilera-Carbó A. F., Buenrostro J. J., Prado-Barragán A., Rodríguez-Herrera R., & Aguilar C. N. 2016. The complete biodegradation pathway of ellagitannins by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 56(4), 329-336.

Buenrostro-Figueroa J., Ascacio-Valdés A., Sepúlveda L., De la Cruz R., Prado-Barragán A., Aguilar-González M. A., Rodríguez R., & Aguilar C. N. 2014. Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. *Food and Bioproducts Processing*, 92(4), 376–382.

De la Cruz R., Ascacio J. A., Buenrostro J., Sepúlveda L., Rodríguez R., Prado-Barragán A., Contreras J.C., Aguilera A., & Aguilar C. N. 2015. Optimization of Ellagitannase Production by *Aspergillus niger* GH1 by Solid-State Fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(7), 617–631.

Gatto M., Muratori S., & Rinaldi S. 1988. A functional interpretation of the logistic equation. *Ecological Modelling*, 42(2), 155–159.

Chavez-González M. L., Buenrostro-Figueroa J., Durán L. V. R., Zárate P. A., Rodríguez R., Rodríguez-Jasso R. M., Ruiz H.A., & Aguilar C. N. 2017. Tannases. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*.

Hossain M. A., & Ishimine Y. 2005. Growth, yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivated on dark-red soil, gray soil and red soil in Okinawa, Japan. *Plant Production Science*, 8(4), 482–486.

Kiamahalleh M. V., Najafpour-Darzi G., Rahimnejad M., Moghadamnia A. A., & Kiamahalleh M. V. 2016. High performance curcumin subcritical water extraction from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Journal of Chromatography B*, 1022, 191–198.

Kocaadam B., & Şanlıer N. 2017. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2889–2895.

Kurmudle N., Kagliwal L. D., Bankar S. B., & Singhal R. S. 2013. Enzyme-assisted extraction for enhanced yields of turmeric oleoresin and its constituents. *Food Bioscience*, 3, 36–41.

Mandal V., Mohan Y., & Hemalatha S. 2008. Microwave assisted extraction of curcumin by sample–solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(2), 322–327.

Martins S., Mussatto S. I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C. N., & Teixeira J. A. 2011. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29(3), 365–373.

Mussatto S. I., Ballesteros L. F., Martins S. L. F., & Teixeira J. A. (2012). *Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes*. InTech, Rijeka, Croatia.

Nabati M., Mahkam M., & Heidari H. 2014. Isolation and characterization of curcumin from powdered rhizomes of turmeric plant marketed in Maragheh city of Iran with Soxhlet technique. *Quarterly Iranian Chemical Communication*, 2, 236–243.

Patil B. S., Jayaprakasha G. K., Chidambara Murthy K. N., & Vikram A. 2009. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142–8160.

Prasad S., Gupta S. C., Tyagi A. K., & Aggarwal B. B. 2014. Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1053–1064.

Robledo A., Aguilera-Carbo A., Rodriguez R., Martinez J. L., Garza Y., & Aguilar C. N. 2008. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(6), 507–513.

Shirsath S. R., Sable S. S., Gaikwad S. G., Sonawane S. H., Saini D. R., & Gogate P. R. 2017. Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 437–445.

Wakte P. S., Sachin B. S., Patil A. A., Mohato D. M., Band T. H., & Shinde D. B. 2011. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*, 79(1), 50–55.

Zhan P.-Y., Zeng X.-H., Zhang H.-M., & Li H.-H. 2011. High-efficient column chromatographic extraction of curcumin from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 129(2), 700–703.

Zorofchian Moghadamtousi S., Abdul Kadir H., Hassandarvish P., Tajik H., Abubakar S., & Zandi K. 2014. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2014.