

蝉拟青霉/黄芪双向发酵体系建立及成分研究

赵崇妍¹ 杨芳¹ 屈青松¹ 刘自尧¹ 高鹏飞² 史新元²

(1 北京中医药大学生命科学学院,北京,102488; 2 北京中医药大学中药学院,北京,102488)

摘要 目的:建立蝉拟青霉/黄芪药材、黄芪药渣双向发酵体系,探究发酵过程中有效成分含量变化。方法:选取正交设计法对接种量、发酵温度、湿度进行优化,并采用硫酸-苯酚比色法、 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法及香草醛-高氯酸氧化法对发酵黄芪及黄芪药渣菌质中的多糖、总黄酮、总皂苷的含量进行测定。结果:药材菌质最优发酵条件为温度 26 ℃,湿度 90%,接种比例 3 mL/5 g,药渣菌质最优发酵条件为温度 26 ℃,湿度 80%,接种比例 3 mL/5 g;经发酵后,黄芪药材菌质中多糖、总皂苷含量略减少,而黄酮含量有所增加;黄芪药渣菌质中黄酮、皂苷含量均增加。结论:蝉拟青霉可对黄芪药材和药渣基质进行发酵,且发酵后菌质中有效成分的得率显著增加,增强了黄芪药材的药用价值,并为药渣的处理提供了新的思路。

关键词 蝉拟青霉;黄芪;黄芪药渣;双向发酵;虫草酸;多糖;黄酮;正交设计

Establishment of Bidirectional Fermentation System of *Paecilomyces cicadae*/Astragalus Membranaceus and Study on Its Components

Zhao Chongyan¹, Yang Fang¹, Qu Qingsong¹, Liu Ziyao¹, Gao Pengfei², Shi Xinyuan²

(1 School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract Objective: To establish a bidirectional fermentation system of *Paecilomyces cicadae*/Astragalus membranaceus and Astragalus membranaceus residue, and to explore the content change of active ingredients in fermentation process. **Methods:** The inoculation amount, temperature and humidity were optimized by orthogonal design method, and the contents of polysaccharide, total flavonoids and total saponins were determined by sulfuric acid-phenol colorimetry, $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ colorimetry and vanillin-perchloric acid oxidation method. **Results:** The optimum fermentation conditions of medicinal fungus were temperature 26 ℃, humidity 90%, inoculation ratio 3 mL/5 g. The optimal fermentation conditions of the residues of the fungus were temperature 26 ℃, humidity 80%, inoculation ratio 3 mL/5 g. The contents of polysaccharides and total saponins in Astragalus membranaceus were slightly reduced, while flavonoids content increased. The contents of polysaccharides, flavonoids and saponins in Astragalus membranaceus residue were increased. **Conclusion:** *Paecilomyces cicadae* can ferment Astragalus membranaceus medicinal materials and Astragalus residue, and the yield of effective components increased significantly after fermentation, which enhanced the medicinal value of Astragalus membranaceus, and provided a new idea for the disposal of residues.

Key Words *Paecilomyces cicadae*; Astragalus membranaceus; Astragalus residue; Bidirectional fermentation; Cordycepic acid; Polysaccharide; Flavonoids; Orthogonal design

中图分类号:R283 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.057

黄芪(*Astragalus membranaceus*)是我国用量最大的中药材之一,其活性成分包括黄酮、多糖、皂苷等^[1],具有显著的免疫调节和抗氧化作用^[2-3],在医疗保健领域应用广泛。研究证实黄芪的主要活性物质为黄芪总黄酮^[4]。黄芪药渣中仍含有活性成分,目前药渣的处理方式主要是填埋、堆放、焚烧等,不仅造成环境污染,并造成了资源的浪费^[5]。因此,亟需一种将药渣高效、无害化的处理方式。

双向发酵是将药用真菌与中药材配伍发酵的新

型中药炮制技术^[6]。中药材经药用真菌发酵后,可获得一定的减毒、增效或扩用的效果^[7]。蝉拟青霉(*Paecilomyces Cicadae*)是麦角菌科拟青霉属真菌寄生于蝉的若虫后形成的复合体,即为我国传统中药蝉花^[8],其具有免疫调节和抗肿瘤活性^[9-10],虫草酸是蝉拟青霉中的主要有效成分之一,常用作发酵虫草类真菌菌丝体中活性成分的重要测试指标。我们以蝉拟青霉/黄芪和蝉拟青霉/黄芪药渣为载体,建立双向发酵体系,以虫草酸含量为指标对发酵条件

基金项目:国家自然科学基金项目(81473364)

作者简介:赵崇妍(1994.01—),女,硕士研究生在读,研究方向:中药生物技术研究;E-mail:844825415@qq.com

通信作者:史新元(1974.09—),女,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:中药生物技术,E-mail:xyshi@126.com

进行优化,并测定发酵过程中有效成分含量的变化,以期增强黄芪药材的药用价值,提高黄芪药渣的利用率,并为黄芪药渣的高效处理提供新途径。

1 材料

FW-100 高速粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)、LHS-80HC-II型恒温恒湿培养箱(上海一恒科技有限公司)、UV-2000 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)、高压蒸汽灭菌锅(日本三洋公司)、RJ-LDL-50G 低速大容量多管离心机(北京通辉金胜科技有限公司)。

乙酸铵(生产批号:20130314)、甲酸(SCIENTIFIC, Lot:F80L20)、硝酸铝(生产批号:20120618)、亚硝酸钠(生产批号:20110613)、高碘酸钠(生产批号:20140306)试剂为分析纯,购自北京化工厂;芦丁标准品(北京普天同创生物科技有限公司,生产批号:PCS0724-1,纯度 $\geq 98.0\%$)、虫草酸标准品(上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 99.0\%$)、黄芪甲苷IV标准品(上海中药标准化研究中心,批号:0781-200210)。

蝉拟青霉(编号 cfcc81169)由中国林业微生物保藏中心提供;黄芪饮片由北京康仁堂药业有限公司提供;黄芪药渣是以10倍量的蒸馏水对黄芪饮片进行2次提取,每次2 h^[11],过滤除去提取液后置于烘箱充分干燥所得。将黄芪及其药渣打粉,备用。

2 方法

2.1 蝉拟青霉/黄芪双向发酵体系的建立

2.1.1 菌种活化与液体培养 将蝉拟青霉接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)斜面培养基上,置于27℃、相对湿度80%的恒温恒湿箱活化培养5 d备用。用接种环挑取活化后的蝉拟青霉置于马铃薯葡萄糖液体培养基中,25℃、140 r/min 培养7 d备用。

2.1.2 双向发酵 分别称取粉碎后的黄芪药材及药渣5 g,置于250 mL锥形瓶,加入蒸馏水6 mL 浸湿药材,121℃灭菌30 min 备用。固体发酵瓶接种活化好的液体菌种后置于恒温恒湿箱避光培养。

2.1.3 适应性考察 以蝉拟青霉在基质上的生长状况和对基质的消耗率为指标,判断发酵组合的适应性。若发酵后基质的消耗率在20%左右,从发酵工艺上就可认为此发酵组合的设计是合理可行的^[12]。

消耗率 = (原药材重量 - 干燥发酵后菌质重量) / 原药材重量 $\times 100\%$

2.2 双向发酵工艺的优化

2.2.1 正交设计 以虫草酸为指标,采用三因素三

水平正交试验,对双向发酵体系的接种量、发酵温度及湿度进行优化,因素水平设计见表1。发酵18 d终止,将药材菌质和药渣菌质产物于40℃干燥,粉碎称重。测定发酵后产物的虫草酸含量,进行直观分析和方差分析,选择出最优发酵工艺条件。

表1 正交试验因素与水平表 $L_9(3^4)$

水平	因素		
	a 接种量(mL)	b 温度(℃)	c 相对湿度(%)
1	3	26	70
2	5	28	80
3	7	30	90

2.2.2 虫草酸含量的测定 称取干燥并粉碎后的菌质1.0 g,加蒸馏水20 mL,沸水浴加热回流提取2 h。冷却后离心,取上清液定容至100 mL,即得样品液。采用文献^[13]中的方法绘制虫草酸标准曲线,得回归方程为 $y = 0.010 2x$, $R^2 = 0.999 1$,并测定虫草酸的含量。每份样品平行测定3次,结果取平均值^[13]。

2.3 双向发酵中成分含量的变化研究

取发酵第0、8、10、12、14、16、18、20 d的样品,测定多糖、总糖、总黄酮和总皂苷的含量。

2.3.1 多糖及总糖含量的测定 提取黄芪菌质、黄芪药渣菌质中的粗多糖和总糖^[14-15],并采用硫酸-苯酚比色法测定样品粗多糖和总糖的含量,得回归方程: $y = 14.266x + 0.009 2$, $R^2 = 0.9991$ 。每份样品平行测定3次,取平均值。

2.3.2 总黄酮含量的测定 采用70%乙醇回流提取样品中的总黄酮,并利用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法测定总黄酮含量^[16-17],得回归方程: $y = 6.275x - 0.024 5$, $R^2 = 0.995 7$ 。每份样品平行测定3次,取平均值。

2.3.3 总皂苷含量的测定 采用70%的乙醇回流,并用饱和正丁醇萃取发酵菌质中的总皂苷,采用香草醛-高氯酸氧化法测定发酵前后菌质中总皂苷含量^[18],计算回归方程: $y = 4.555 2x$, $R^2 = 0.991 2$ 。每份样品平行测定3次,取平均值。

2.4 统计学方法 采用SAS 9.2统计软件进行数据处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 双向发酵组合适应性考察 发酵4 d后,药渣菌质上首先长出了较多白色细绒状菌丝体,药材菌质上的菌丝体略少于药渣组,菌丝生长状态良好。发酵第20天,发酵基质表面及底部全部铺满浓密的菌丝体,菌丝颜色开始发黄,此时发酵终止。计算黄

芪药材和药渣在发酵前后的重量变化,得出药材菌质比较未发酵前的消耗率为 28.2%,药渣菌质为 17.0%,所以认为该发酵组合从发酵工艺上是合理可行的。

3.2 双向发酵条件的优化结果 黄芪药材菌质的最优发酵条件为 a1b1c3,即接种量 3 mL/5 g,温度 26 ℃,湿度 90%。影响药材菌质的显著性因素顺序为 b(发酵温度) > c(相对湿度) > a(接种量),因素 a、b、c 均有显著性差异,因素 b 的差异性更为显著,即温度对发酵的影响更大。药渣菌质的最优发酵条件为 a1b1c2,即接种量 3 mL/5 g,温度 26 ℃,湿度 80%。影响药渣菌质的显著性因素顺序为 b(发酵温度) > c(相对湿度) > a(接种量),温度的影响更显著于湿度和接种量。见表 2~3。

表 2 双向发酵药材菌质与药渣菌质正交试验极差

编号	接种量 a (mL)	温度 b (℃)	湿度 c (%)	药材菌质虫 草酸(mg/g)	药渣菌质虫 草酸(mg/g)
1	3	26	70	7.614	2.805
2	3	30	80	6.523	4.175
3	3	28	90	6.513	2.729
4	5	26	80	7.565	3.767
5	5	30	90	6.902	3.367
6	5	28	70	4.386	2.013
7	7	26	90	8.235	2.962
8	7	30	70	6.118	2.107
9	7	28	80	5.657	1.864
k1	6.883	7.805	6.039		
k2	6.867	6.514	6.582		
k3	6.993	5.519	7.217		
R	0.126	2.286	1.177		
k1*	3.236	3.178	2.308		
k2*	3.557	3.216	3.269		
k3*	3.288	2.202	3.019		
R*	0.321	1.014	0.960		

注:k1、k2、k3、R 为药材菌质的 k 值和 R 值,k1*、k2*、k3*、R* 为药渣菌质的 k 值和 R 值

表 3 双向发酵黄芪药材菌质和药渣菌质

正交试验虫草酸含量因素

方差来源	自由度 (DF)	离差平方和 (SS)	均方 (MS)	F	Pr > F
a	2	1.660	0.830	8.250	0.0024
b	2	23.657	11.828	117.630	<.0001
c	2	6.253	3.126	31.090	<.0001
a*	2	3.539	1.769	28.970	<.0001
b*	2	5.225	2.613	42.770	<.0001
c*	2	3.623	1.812	29.660	<.0001

注:a、b、c 为药材菌质各因素,a*、b*、c* 为药渣菌质各因素

3.3 双向发酵过程中成分的含量变化

3.3.1 发酵过程中菌质多糖及总糖含量变化情况 随着发酵的进行,药材菌质与药渣菌质中总糖含量

均降低,且下降趋势逐渐趋于平缓,说明在发酵前期,蝉拟青霉生长迅速,到发酵后期蝉拟青霉的生长进入稳定期,代谢缓慢。见图 1。药材菌质中多糖的含量随发酵时间的推移逐渐下降,而药渣菌质的多糖却在小幅升高后逐渐降低再升高。见图 2。

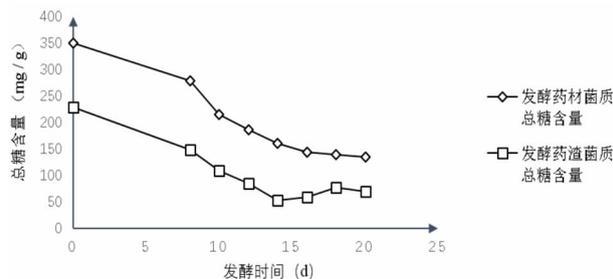


图 1 双向发酵黄芪和黄芪药渣菌质中总糖含量

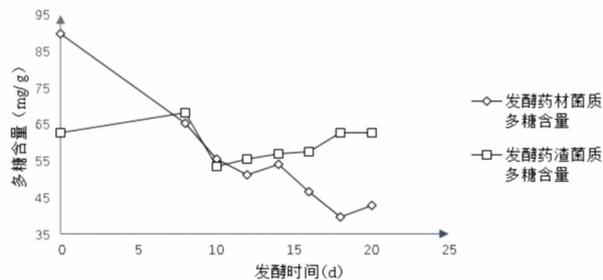


图 2 双向发酵黄芪和黄芪药渣菌质中多糖含量变化

3.3.2 发酵过程总黄酮含量变化情况经蝉拟青霉发酵后,黄芪药材及药渣菌质的总黄酮含量均有提高,在发酵初期,由于菌体生长较快,总黄酮的含量显著上升,发酵后期黄酮含量变化趋于平缓,这可能是由于菌体生长至稳定期所致。见图 3。

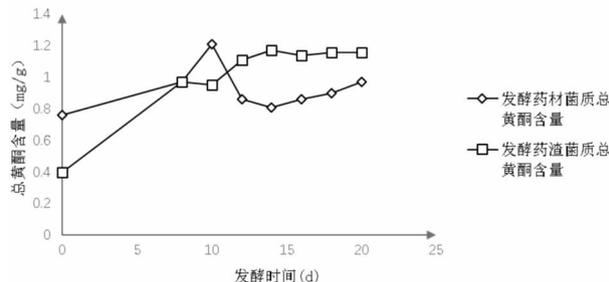


图 3 双向发酵黄芪和黄芪药渣菌质中总黄酮含量变化

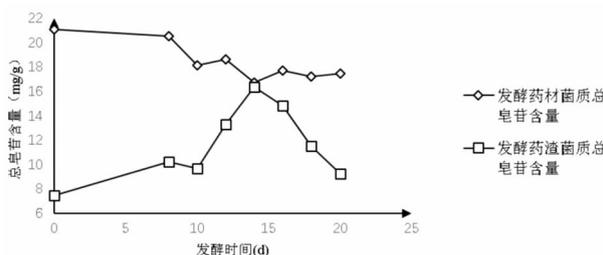


图 4 双向发酵黄芪和黄芪药渣菌质中总皂苷含量变化

3.3.3 发酵过程总皂苷含量变化情况 发酵后药材菌质中的总皂苷含量整体呈平缓的下降趋势;药渣菌质初始总皂苷含量远远低于药材菌质,随发酵

进行皂苷含量先升高后降低。见图4。

综上所述,发酵黄芪药材的最适宜湿度略高于发酵黄芪药渣的湿度,但温度对发酵体系的影响更大,因而在发酵中对温度的精确控制更为重要。

4 讨论

4.1 发酵条件优化 我们以蝉拟青霉对发酵基质的消耗率和生长状况为指标,考察了蝉拟青霉/黄芪双向发酵体系的适应性。结果表明二者的组合合理可行。温度对发酵菌体的生长代谢起到关键作用,正交实验结果表明,温度过高会影响虫草酸产量,该结果与相关报道一致^[19]。另外,双向发酵的黄芪药材菌质和黄芪药渣菌质的最优条件只有湿度有差异,这可能是由于药材和药渣基质的保水能力差异所致。

4.2 成分含量测定 发酵过程中药材菌质和药渣菌质中总糖含量均下降,说明蝉拟青霉可利用黄芪药材及药渣中的糖类物质作为生长所必须的C源。药材菌质与药渣菌质多糖含量变化趋势的差异可能是由于药材基质中初始总糖的含量远远高于药渣基质,其可被蝉拟青霉直接利用的糖类成分较多,而在药渣基质中,蝉拟青霉需不断代谢产生纤维素酶类物质分解其中的纤维素、木质素等物质以维持正常生长。

黄芪中黄酮类化合物主要分为游离苷元和结合型糖苷2大类,是黄芪中分离的抗氧化清除自由基的主要活性成分,具有明显的抗肿瘤、抗损伤和抗突变的作用^[20]。我们通过测定发酵菌质总黄酮的含量,发现经蝉拟青霉发酵后,药材及药渣菌质中总黄酮含量均有提升,且药渣菌质黄酮含量提升幅度远远大于药材菌质。在本研究蝉拟青霉与甘草渣的双向发酵中,发现黄酮含量同样出现了先升高后降低的变化,其可能的原因是蝉拟青霉不仅能合成黄酮类化合物同时还可分解黄酮类化合物。

皂苷极性较大易溶于水,因此发酵初始药材基质中的皂苷含量远高于药渣基质。药渣菌质总皂苷含量在发酵过程中出现的先升高后降低的变化,可能是在双向发酵过程中,黄芪药渣菌质产生的纤维素酶类物质改善了黄芪药渣细胞壁结构,使皂苷提取率大大提升,随着发酵的进行,皂苷又被逐渐分解。

综上所述,该双向发酵体系具有较大的应用价值,双向发酵增强了黄芪药材的药用价值,又为黄芪药渣的再利用提供了可能,同时本方法也可为解决

中药工业所产生的大量草本类中药药渣的处理提供新思路。在后续工作中,还需对发酵过程中具体成分的变化进行分析,为其药效研究奠定基础。

参考文献

- [1] 孙政华, 邵晶, 郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(25): 22-25.
- [2] 房宇, 刘尧. 黄芪的免疫调节作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(7): 208-209.
- [3] 洪海都, 温俊茂, 陈宗俊. 黄芪主要活性成分的药理作用研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(14): 49-50, 69.
- [4] 赵琦, 张军武. 正交试验法优选黄芪中总黄酮提取工艺[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(1): 27-29.
- [5] 杨冰, 丁斐, 李伟东, 等. 中药渣综合利用研究进展及生态化综合利用模式[J]. 中草药, 2017, 48(2): 377-383.
- [6] 庄毅. 药用真菌新型(双向型)固体发酵工程[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 3-6.
- [7] 秦晓瑜, 李冠华. 固态发酵炮制中药材研究进展[J]. 中药材, 2016, 39(3): 691-695.
- [8] 张传博, 王艳丽, 易萌, 等. 江苏省天王镇磨盘山金蝉花分离菌株鉴定及系统发育分析[J]. 广东农业科学, 2013, 40(15): 152-154, 封4.
- [9] Wang H, Zhang J, Sit WH, et al. Cordyceps cicadae induces G2/M cell cycle arrest in MHCC97H human hepatocellular carcinoma cells: a proteomic study[J]. Chin Med, 2014, 9: 15.
- [10] Wang J, Zhang DM, Jia JF, et al. Cyclodepsipeptides from the ascocarps and insect-body portions of fungus Cordyceps cicadae[J]. Fito-terapia, 2014, 97: 23-27.
- [11] 梁军. 黄芪颗粒制作工艺研究[J]. 黑龙江医药, 2012, 25(3): 413-414.
- [12] 邹吉野. 槐耳大黄双向发酵研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [13] 万琴, 丁海龙, 刘兴平, 等. 蛹虫草液体培养优化研究[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(3): 46-51, 55.
- [14] 许会生. 当归多糖和黄芪多糖的提取工艺研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [15] 孔瑞岗, 刘冬, 庞煜敏. 不同产地黄芪中黄芪总糖含量测定[J]. 中兽医医药杂志, 2011, 30(3): 38-39.
- [16] 热孜亚木·吾甫尔, 刘海, 陈卓尔, 等. 天山岩黄芪总黄酮含量的测定及抗氧化活性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(7): 950-953.
- [17] 苏苗, 红梅, 阿拉腾敖日格勒, 等. 雪莲十味片总黄酮提取工艺研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(6): 1088-1090.
- [18] 张萍. 甘肃黄芪和红芪中总皂苷含量测定对比研究[J]. 云南化工, 2017, 44(8): 49-50.
- [19] 王萍, 孙萍, 王言玉. 蝉拟青霉中虫草素提取液的稳定性及酸碱溶解度探究试验[J]. 药学研究, 2016, 35(11): 639-641.
- [20] 张冬青, 汪德清. 黄芪总黄酮生物学活性作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 253-256.