

胆南星发酵菌种的分离鉴定与复合菌种发酵初探

施宇¹, 刘晓峰², 单丽倩¹, 高慧^{1*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁医药职业学院, 沈阳 110000)

[摘要] 目的:对胆南星发酵过程中的微生物进行分离与鉴定,筛选优势菌种并对胆南星复合菌种发酵进行探索,以解决胆南星杂菌发酵工艺产品质量及稳定性不易控制的问题。方法:取胆南星发酵过程中的深层培养物进行菌种分离与纯化,运用细菌、真菌多相鉴定检测方法及全自动微生物分析系统,比对DNA序列,鉴定微生物,将分离鉴定出的菌种分别进行纯种发酵并筛选优势菌种,将筛选出的优势菌种进行复合菌种发酵探索,比较复合菌种发酵胆南星与传统发酵胆南星的指标成分含量差异。采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-QqQ-MS/MS)对传统发酵胆南星和复合菌种发酵胆南星中的指标成分进行含量测定,流动相0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2 min,35%~45%A;2~10 min,45%~48%A;10~12 min,48%~100%A;12~12.01 min,100%~35%A;12.01~15 min,35%~65%A),流速0.35 mL·min⁻¹,采用电喷雾电离源(ESI),负离子采集模式,扫描方式为多反应监测(MRM)模式,采集范围 m/z 50~1 000。结果:从胆南星深层培养物中共分离鉴定了8种微生物,筛选出肠球菌属 *Enterococcus* sp.(厌氧)和铅黄肠球菌 *E. casseliflavus* 是胆南星发酵过程中的优势菌种,以二者作为复合菌种发酵制得的胆南星与传统发酵法样品比较,游离型胆酸中的鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸和猪胆酸质量分数分别增加1.76、0.06、0.19 mg·g⁻¹,结合型胆酸中的甘氨鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、甘氨猪去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、甘氨猪胆酸、牛磺猪胆酸含量较传统发酵胆南星分别降低0.63、0.23、0.26、0.16、0.03、0.04 mg·g⁻¹。结论:复合菌种(肠球菌属和铅黄肠球菌)发酵能够使胆南星发酵更加完全,缩短发酵周期,并能够提高产品的质量及其稳定性。

[关键词] 胆南星; 发酵工艺; 菌种鉴定; 中药炮制; 优势菌种; 胆酸; 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-QqQ-MS/MS)

[中图分类号] R22;R28;R943.1;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)17-0150-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212450 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211209.2240.004.html>

[网络出版日期] 2021-12-13 13:39

Isolation and Identification of Arisaema Cum Bile Fermentation Strain and Preliminary Investigation on Its Compound Strain Fermentation

SHI Yu¹, LIU Xiaofeng², SHAN Liqian¹, GAO Hui^{1*}

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Liaoning Vocational College of Medicine, Shenyang 110000, China)

[Abstract] **Objective:** In order to solve the problem that the quality and stability of Arisaema Cum Bile in the fermentation process with hybrid bacteria were not easy to control, the microorganism in the fermentation process of Arisaema Cum Bile was isolated and identified, the dominant strains were screened and the fermentation process of Arisaema Cum Bile with compound bacteria was investigated. **Method:** The submerged culture during the fermentation process of Arisaema Cum Bile was taken out for strain separation and purification. Bacteria and fungi multiphase identification and detection methods and automatic microbial analysis system were used to analyze and compare DNA sequences and identify microorganisms. The isolated and

[收稿日期] 2021-08-28

[基金项目] 国家发改委中医药行业专项(201507004-03);国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-ZY-45)

[第一作者] 施宇,在读硕士,从事中药炮制传统理论研究,E-mail:497580710@qq.com

[通信作者] *高慧,博士,教授,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-85890155,E-mail:gaohuitcm@163.com

identified strains were respectively inoculated and fermented. After screening the dominant strains, a preliminary exploration of compound strain fermentation were carried out. The contents of index components in Arisaema Cum Bile fermented by compound strain and traditional Arisaema Cum Bile were compared by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS). Mobile phase was 0.1% formic acid acetonitrile solution (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-2 min, 35%-45%A; 2-10 min, 45%-48%A; 10-12 min, 48%-100%A; 12-12.01 min, 100%-35%A; 12.01-15 min, 35%-65%A), the flow rate was set at 0.35 mL·min⁻¹. The mass spectrographic analysis employed electrospray ionization (ESI), negative ion acquisition mode and multiple reaction monitoring (MRM) scanning mode were adopted to collect information, the collection range was *m/z* 50-1 000. **Result:** Eight microorganisms were isolated and identified from the submerged culture of Arisaema Cum Bile. Among them, *Enterococcus* sp. (anaerobic) and *E. casseliflavus* were selected as the dominant strains in the fermentation process. Compared with the traditional fermentation method, the contents of chenodeoxycholic acid, hyodeoxycholic acid and hyocholic acid in free cholic acid increased by 1.76, 0.06, 0.19 mg·g⁻¹, respectively. In bound cholic acid, glycochenodeoxycholic acid, taurochenodeoxycholic acid, glycohyodeoxycholic acid, taurohyodeoxycholic acid, glychoyocholic acid, taurine porcine cholic acid decreased by 0.63, 0.23, 0.26, 0.16, 0.03, 0.04 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** Arisaema Cum Bile with compound strain fermentation (*Enterococcus* sp. and *E. casseliflavus*) can be fermented more completely, the fermentation cycle can be shortened, and the quality and stability of products can be improved.

[Keywords] Arisaema Cum Bile; fermentation process; strain identification; traditional Chinese medicine processing; dominant strain; bile acid; ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS)

胆南星为制天南星的细粉与牛、羊或猪胆汁经加工而成,或为生天南星细粉与牛、羊或猪胆汁经发酵加工而成^[1]。天南星炮制成胆南星,性由温转凉,味由苦、辛转苦、微辛,功效由温化寒痰转为清热化痰,且毒性降低,是炮制改变药性最典型的例子。本课题组前期对胆南星的传统发酵工艺进行了研究,对比了不同胆汁及其制成的胆南星清热、抗惊厥、治疗急性肺损伤、镇静催眠作用及胆酸类成分的差异^[2-3],并根据胆南星发酵过程中结合型胆汁酸发生裂解得到游离型胆汁酸的变化,以3种游离型胆汁酸为指标性成分制订了传统发酵胆南星的质量标准^[4]。

胆南星的制备属于传统的发酵法炮制^[5],发酵过程主要是有机物通过微生物和酶的作用转化为其他物质的过程,依靠微生物的生长代谢来实现,属杂菌发酵,但是其环境及基质中的微生物种类复杂,造成胆南星的质量稳定性难以控制。因此,在对胆南星传统制备方法、胆南星炮制原理研究的基础上,本课题组拟对胆南星发酵过程中的微生物进行分离与鉴定,以筛选优势菌种并对胆南星复合菌种发酵进行探索。

目前,有关胆南星发酵过程中菌种的研究报道

仅有根据显微鉴别初步认为胆南星发酵成品中所含微生物为杆菌^[6],尚无对于胆南星复合菌种发酵的研究。本实验基于细菌、真菌多相鉴定检测方法及全自动微生物分析系统对胆南星深层培养物(距离液面10 cm以下)进行菌种的分离纯化与鉴定,将分离鉴定出的菌种依次进行纯种发酵工艺对比,筛选出2种优势菌种进行复合菌种工艺研究,并选择14种胆酸成分含量为指标评价复合菌种发酵效果,为胆南星复合菌种发酵工艺的深入研究奠定基础。

1 材料

ACQUITY UPLC H-CLASS型超高效液相色谱仪与Xevo TQD型质谱仪(美国Waters公司),DG250型厌氧工作站(英国Don Whitley Scientific公司),VITEK型全自动微生物鉴定系统(法国梅里埃生物制品有限公司),3K15型台式离心机(美国Sigma公司),L96G型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司),Milli-Q Integral型纯水/超纯水一体化系统(美国Millipore公司),MS105DU型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FA1004B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),SW-CJ-1F型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),YXQ-LS-75S1型立式压力蒸汽灭菌器、

BSP-150型生化培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司),H1712412型恒温恒湿箱、1710817型生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司),DM500型光学显微镜(德国Leica公司)。

东北天南星采自辽宁省本溪市,经辽宁省药品检验检测院王维宁教授鉴定为天南星科植物东北天南星 *Arisaema amurense* 的干燥块茎;猪胆汁购自辽宁省大连市础明肉联厂,牛肉膏蛋白胨培养基(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号20170802),大豆酪蛋白琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司,批号HB7026-9),猪去氧胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号100087-201411,纯度>99.7%),牛磺猪去氧胆酸对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号17121804,纯度>98%),鹅去氧胆酸、去氧胆酸、胆酸、甘氨胆酸对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号分别为A0221AS、WKQ16010504、WKQ16060602、J0115AS,纯度均>98%),甘氨猪去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为Y2407K23300、V27FTK10217,纯度均≥98%),甘氨猪胆酸、牛磺胆酸、牛磺猪胆酸、甘氨鹅去氧胆酸、6-酮-甘氨猪去氧胆酸、猪胆酸对照品[自制,经高效液相色谱法(HPLC)测定,纯度均≥98%],乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 菌种的分离鉴定

2.1.1 菌悬液的制备 按前期确定的发酵工艺制备胆南星样品^[7]。分别于发酵后第3、5、7、10、22、25、30天取出距上表面10 cm以下的发酵样品,称取发酵样品1.0 g,放入盛有99 mL无菌水的锥形瓶中,充分振摇,使菌液分散,逐级稀释,制成质量浓度处于 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。

2.1.2 胆南星发酵过程中菌种的分离纯化、计数与保存 取上述菌悬液,采用平板涂布分离法,置生化培养箱、厌氧培养箱中进行菌种分离纯化,观察菌种的形态,对发酵过程中微生物的种类、数量进行统计分析,观察菌群的动态变化。反复纯化菌种,直至显微镜下观察细胞的特征均匀一致,将纯菌种接种到斜面固体培养基中,置4℃冰箱保存备用。

2.1.3 胆南星发酵过程中菌种的鉴别 分别利用FMIC-QO01-001微生物学检测细菌多相鉴定检测方法、QO-03-02微生物菌种分子生物学鉴定操作规程、FMIC-QO01-017微生物学检测细菌 *gyrB* 基因鉴

定检测方法、FMIC-QO01-002微生物学检测细菌16S rDNA鉴定检测方法、FMIC-QO01-003真菌多相鉴定检测方法、FMIC-QO01-009丝状真菌 *benA* 基因鉴定检测方法对所分离的菌种进行鉴别。用全自动微生物鉴定系统进行鉴定,根据革兰染色、形态学观察结果,以及后面的基因序列发育树比对结果,选择相应的VITEK BCL鉴定卡、VITEK GN鉴定卡、VITEK GP鉴定卡或VITEK ANC鉴定卡对相应菌种进行生理生化特征分析。在形态学鉴定时,将菌株接种至适宜培养基,36℃培养24 h,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[8]对菌种进行观察。在分子生物学鉴定时,利用16S rDNA序列分析,用通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增细菌16S rDNA基因片段。结果根据基于局部比对算法的搜索工具(BLAST)和EzTaxon^[9]进行16S rDNA基因序列相似性比对。根据比对结果,选取所需的参照模式菌种及其16S rDNA基因序列,采用BioEdit 7.2.6.1进行多序列比对,系统进化矩阵根据Kimura-2^[10]模型估算,用MEGA5.0^[11]采用邻接法进行聚类分析并构建系统进化树^[12],进行1 000次的重复取样,通过自展值(bootstrap value)分析来评估系统进化树拓扑结构的稳定性^[13]。

2.2 复合菌种发酵新工艺

2.2.1 优势菌种的筛选 根据菌群的动态变化及菌种鉴别结果,结合本课题组前期将鉴定出的各菌种分别进行胆南星纯种发酵的含量测定结果,共同筛选出优势菌种,进行复合菌种发酵研究。

2.2.2 复合菌种发酵样品的制备 称取天南星粉末(过五号筛,下同)500 g,加入胆汁约500 mL(每100 mL猪胆汁加菌液5 mL,菌液由分离菌种中菌P肠球菌属和菌B铅黄肠球菌按比例1:1混合),置温度32℃、相对湿度80%的恒温恒湿培养箱中发酵15 d,置蒸制容器中蒸1 h至透,趁热切成1.5~2 cm的小块,晒至黑褐色,即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取猪去氧胆酸、胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、猪胆酸、6-酮-甘氨猪去氧胆酸、甘氨鹅去氧胆酸、甘氨胆酸、甘氨猪去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、牛磺胆酸、甘氨猪胆酸、牛磺猪胆酸对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为80.0、114.0、160.0、108.0、112.0、120.0、88.0、14.2、114.0、380.0、124.0、100.0、92.0、146.0 mg·L⁻¹的混合对照品储备液。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密称取胆南星粉末

0.2 g,置于具塞锥形瓶中,加入甲醇10 mL,超声(功率200 W,频率40 kHz)30 min,于室温下放至恒重,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.5 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相选择0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)进行梯度洗脱(0~2 min, 35%~45%A; 2~10 min, 45%~48%A; 10~12 min, 48%~100%A; 12~12.01 min, 100%~35%A; 12.01~15 min, 35%~65%A),流速0.35 mL·min⁻¹,柱

温35 °C,进样量5 μL。

2.2.6 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子采集模式,毛细管电压3 kV,离子源温度150 °C,脱溶剂气流速900 L·h⁻¹,脱溶剂气温度450 °C,锥孔气流速150 L·h⁻¹。扫描方式为多反应监测(MRM)模式,扫描范围 *m/z* 50~1 000,其他质谱参数见表1。使用MassLynx 4.1软件进行超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-QqQ-MS/MS)的数据采集和处理,MRM色谱图见增强出版附加材料。

表1 胆南星中14种化合物的质谱参数及线性关系

Table 1 Mass spectrum parameters and linear relationship of 14 compounds in Arisaema Cum Bile

化合物	<i>t_R</i> /min	<i>m/z</i>	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	回归方程	<i>r</i>	线性范围/mg·L ⁻¹	定量限/μg·L ⁻¹
猪去氧胆酸	4.47	391.35~345.49	80.0	34.0	$Y=25\ 067X+2\ 257.9$	0.999 4	0.22~4.40	8.80
胆酸	4.12	407.31~343.42	78.0	30.0	$Y=2\ 408.1X+4\ 200.4$	0.999 5	0.16~3.25	8.13
鹅去氧胆酸	8.04	391.35~345.49	80.0	34.0	$Y=5\ 537.9X+920.54$	0.999 2	0.42~8.45	19.17
去氧胆酸	8.85	391.35~345.49	80.0	34.0	$Y=3\ 741.1X+68.826$	0.999 9	0.26~16.90	10.40
猪胆酸	3.55	407.31~343.42	78.0	30.0	$Y=10\ 575X+110.15$	0.999 6	0.20~7.80	2.17
6-酮-甘氨酸猪去氧胆酸	3.01	446.39~74.10	68.0	34.0	$Y=9\ 998.1X+1\ 340.8$	0.999 4	0.17~6.60	1.65
甘氨酸鹅去氧胆酸	4.41	448.41~74.10	74.0	36.0	$Y=7\ 134.9X+1\ 131.2$	0.999 3	0.49~9.85	4.93
甘氨酸胆酸	2.74	464.40~74.10	76.0	38.0	$Y=57\ 819X+4\ 483.4$	0.999 1	0.15~3.00	0.75
甘氨酸猪去氧胆酸	2.77	448.41~74.10	74.0	36.0	$Y=9\ 643.4X+652.74$	0.999 5	0.16~3.15	3.15
牛磺鹅去氧胆酸	2.83	498.39~80.14	100.0	65.0	$Y=2\ 210.5X+223.69$	0.999 8	0.55~21.90	6.84
牛磺猪去氧胆酸	1.60	498.39~80.14	100.0	65.0	$Y=7\ 196.9X+2\ 433.4$	0.999 8	0.68~27.20	2.72
牛磺胆酸	1.74	514.39~80.14	100.0	66.0	$Y=2\ 615.2X+70.046$	0.999 8	0.27~10.60	5.30
甘氨酸猪胆酸	2.20	464.40~74.10	76.0	38.0	$Y=3\ 991.9X+233.63$	0.999 4	0.14~2.80	5.60
牛磺猪胆酸	1.25	514.39~80.14	100.0	66.0	$Y=6\ 928.5X+233.51$	0.999 9	0.22~8.90	2.22

2.2.7 方法学考察 精密吸取2.2.3项下对照品溶液,用甲醇稀释成系列质量浓度的对照品溶液,按2.2.5和2.2.6项下条件测定,以各对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程。精密吸取2.2.4项下同一供试品溶液,按2.2.5和2.2.6项下条件连续进样6次,计算胆南星中14种成分峰面积的相对标准偏差(RSD)。精密吸取2.2.4项下同一供试品溶液,分别于制备后0、2、4、6、8、10、12、24 h按2.2.5和2.2.6项下条件测定,计算胆南星中14种成分峰面积的RSD。精密称取6份胆南星样品粉末0.2 g,按2.2.4项下方法制备供试品溶液,按2.2.5和2.2.6项下检测条件测定,计算胆南星中14种成分平均质量分数的RSD。精密称取6份已知指标成分含量的胆南星粉末0.1 g,加入相当于样品量50%、100%和150%共3个水平的对照品储备液,按2.2.4项下方法制备供试品溶液,按2.2.5和2.2.6项下条件测定,计算加样回收率。

2.2.8 样品测定 取胆南星样品,按2.2.4项下方法制备供试品溶液,每个样品平行3份,按2.2.5和2.2.6项下条件测定,计算胆南星样品中14种胆汁酸类成分的含量。

3 结果

3.1 胆南星发酵过程中菌种的计数及菌群的动态变化 从胆南星的深层培养物中分离纯化出14个菌种,在鉴定前暂时命名为菌A~菌H和菌M~菌R。菌A、菌B的菌落数量逐渐降低,菌M的菌落在5 d后开始出现,菌落数量逐渐升高;菌N菌落在5 d后出现,菌落数量先降低后升高,菌P的菌落数量有逐渐增多的趋势;菌R、菌Q的菌落数量不稳定,其余菌种菌落的数量变化不明显。见图1和图2。

3.2 菌种鉴别

3.2.1 形态学鉴定 利用大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)等鉴别菌落的宏观与微观形态及描述,选择菌P和菌B为例,菌P的菌落宏观形态为菌落白色,

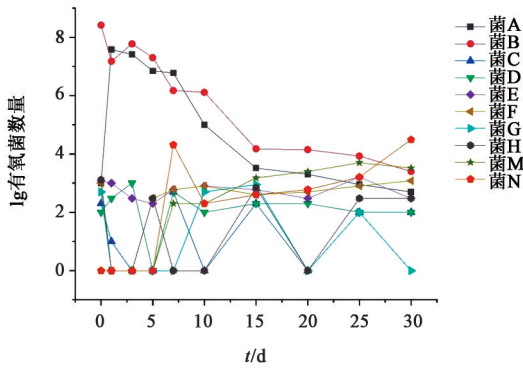


图1 不同发酵天数胆南星有氧菌菌种数量变化情况
Fig. 1 Changes in number of aerobic bacteria in Arisaema Cum Bile with different fermentation days

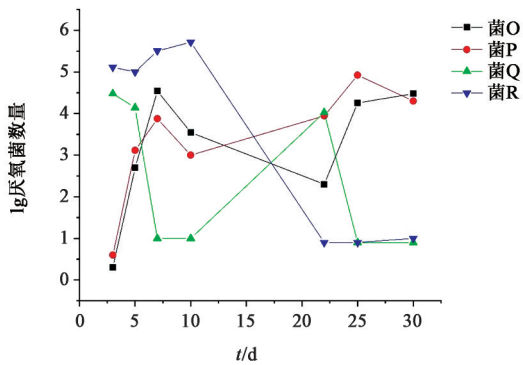


图2 不同发酵天数胆南星厌氧菌菌种数量变化情况
Fig. 2 Changes in number of anaerobes in Arisaema Cum Bile with different fermentation days

圆形,凸起,不透明,边缘整齐;微观形态为菌体呈球状,直径 $0.5\sim 0.8\ \mu\text{m}$,单个、成对或成堆排列,革兰氏阳性。菌B的菌落宏观形态为菌落浅黄色,圆形,表面湿润,不透明,边缘整齐;微观形态描述为菌体呈椭球状, $0.4\sim 0.6\ \mu\text{m}\times 0.6\sim 1.2\ \mu\text{m}$,单个或成对排列,革兰氏阳性。见图3和图4。

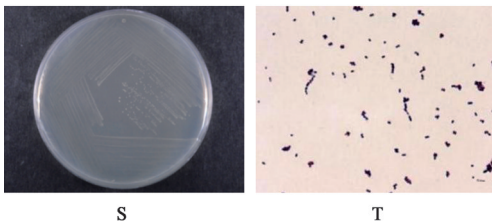


图3 菌B的宏观形态(S)与微观形态(T)
Fig. 3 Macromorphology (S) and micromorphology (T) of bacterium B

3.2.2 分子生物学鉴定 结合细菌生理生化鉴定结果、16S rDNA序列分析和系统发育分析,鉴定出菌A为肠杆菌属 *Enterobacter* sp.;菌B为铅黄肠球菌 *Enterococcus casseliflavus*;菌D为高地芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis*;菌I为蜡样芽孢杆菌 *B. cereus*;

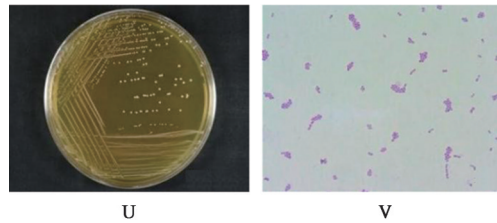


图4 菌P的宏观形态(U)与微观形态(V)
Fig. 4 Macromorphology (U) and micromorphology (V) of bacterium P

菌J为微杆菌属 *Microbacterium* sp.;菌L为百岁兰曲霉 *Aspergillus welwitschiae*;菌M为黄曲霉菌 *A. flavus*;菌P为肠球菌属 *Enterococcus* sp.,见图5和图6。

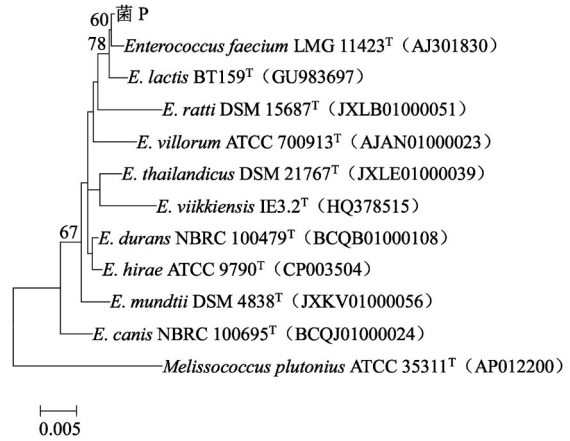


图5 菌P与相关种的16S rDNA序列系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequence of bacterium P and related species

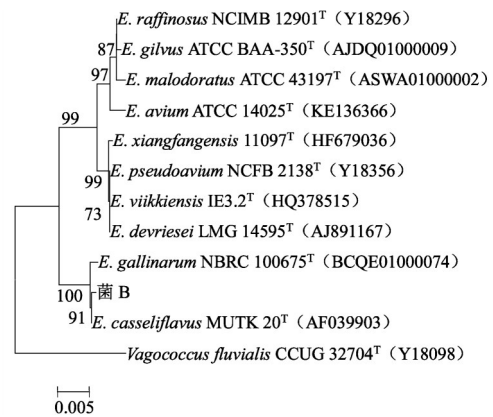


图6 菌B与相关种的16S rDNA序列系统发育树
Fig. 6 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequence of bacterium B and related species

3.3 复合菌种发酵工艺

3.3.1 优势菌种的筛选 优势菌种为肠球菌属 *Enterococcus* sp.(厌氧)和铅黄肠球菌 *E. casseliflavus*。

3.3.2 方法学考察 各成分质量浓度在一定范围

内线性关系良好,见表1。精密度试验结果显示,猪去氧胆酸、胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、猪胆酸、6-酮-甘氨酸猪去氧胆酸、甘氨酸鹅去氧胆酸、甘氨酸胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸猪胆酸、牛磺猪胆酸日间测定的峰面积RSD分别为0.9%、3.0%、1.5%、1.6%、2.1%、1.5%、1.1%、0.8%、0.8%、1.9%、0.6%、2.3%、2.9%、1.8%;日内测定的峰面积RSD分别为0.8%、3.0%、1.5%、1.6%、2.2%、1.5%、1.1%、0.8%、0.8%、1.9%、0.6%、2.3%、2.9%、1.8%,表明该仪器精密度良好。稳定性试验结果显示,24 h内上述14种游离型胆酸成分峰面积的RSD分别为2.8%、3.0%、1.8%、2.6%、2.9%、2.9%、2.2%、2.4%、1.7%、3.0%、2.7%、2.5%、2.2%、2.6%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。重复性结果显示,上述14种游离型胆酸成分的平均质量分数分别为1.44、0.09、6.53、0.07、1.61、0.84、3.04、0.13、1.30、1.19、0.58、0.30、0.13、0.24 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD分别为3.7%、3.3%、3.8%、3.5%、3.5%、2.7%、3.2%、3.6%、3.5%、3.4%、3.1%、3.3%、3.6%、3.6%,表明该方法重复性良好。加样回收率试验结果显示,各成分的加样回收率处于98.13%~100.63%,RSD 0.7%~2.5%,表明该方法准确可靠。

3.3.3 UPLC-QqQ-MS/MS测定胆南星复合菌种发酵工艺的胆酸类成分含量 胆南星中14种成分的含量见表2。结果表明复合菌种发酵胆南星中3种游离型胆酸(鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸和猪胆酸)的质量分数较传统发酵胆南星分别增加1.76、0.06、0.19 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,结合型胆酸(甘氨酸鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、甘氨酸猪胆酸、牛磺猪胆酸)的含量较传统发酵胆南星分别降低0.63、0.23、0.26、0.16、0.03、0.04 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,说明复合菌种发酵在相同时间内能够使发酵更加完全。

4 讨论

胆南星是传统发酵曲剂,历史悠久,疗效确切。因其发酵工艺属传统杂菌发酵,受环境中菌种的影响很大,因此不同地域、不同季节生产的胆南星发酵周期不同,产品质量差异较大,造成胆南星产品质量的稳定性不易控制。现代发酵机制研究表明,传统发酵过程中微生物体系复杂,有些微生物对中药有效成分的含量有很大影响^[14-16]。本文借鉴现代发酵工业的发酵方式,对胆南星复合菌种发酵工艺进行研究,既可保证胆南星发酵制品的品质,又可缩短发酵时间。

表2 胆南星中胆酸类成分的含量测定(n=3)

Table 2 Content determination of cholic acids in Arisaema Cum Bile(n=3) %

成分	传统发酵 15 d	复合菌种发酵 15 d
猪去氧胆酸	0.144	0.150
胆酸	0.009	0.010
鹅去氧胆酸	0.653	0.829
去氧胆酸	0.007	0.005
猪胆酸	0.161	0.180
6-酮-甘氨酸猪去氧胆酸	0.084	0.060
甘氨酸鹅去氧胆酸	0.304	0.241
甘氨酸胆酸	0.013	0.010
甘氨酸猪去氧胆酸	0.130	0.104
牛磺鹅去氧胆酸	0.119	0.096
牛磺猪去氧胆酸	0.058	0.042
牛磺胆酸	0.030	0.025
甘氨酸猪胆酸	0.013	0.010
牛磺猪胆酸	0.024	0.020

目前,关于胆南星发酵过程中菌种的分离鉴定鲜有报道,本研究基于对胆南星传统发酵工艺的研究,据《圣济总录》^[17]载:“黄牛胆内浸三宿焙,牛胆煮一伏时暴干”,初步判断胆南星传统发酵中存在厌氧环境,并结合曾对表层样品进行菌种分离的前期工作,确定本研究的样品采用距离发酵物上表面10 cm以下的培养物,即深层样品,既能够包含需氧菌,也能包含厌氧菌。从胆南星深层样品中分离鉴定到8个菌种,分别为肠杆菌属、铅黄肠球菌、高地芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、微杆菌属、百岁兰曲霉、黄曲霉菌、肠球菌属。将这8个菌种进行纯种发酵实验,选择3种游离型胆酸含量作为评价发酵程度的指标,最终筛选出肠球菌属(厌氧)和铅黄肠球菌作为复合菌种研究的优势发酵菌株。本研究采用复合菌种发酵法,运用UPLC-QqQ-MS/MS技术,以14种胆酸类成分含量作为指标性成分,结果表明在胆南星中加入肠球菌属和铅黄肠球菌进行复合菌种发酵,能够使胆南星中的游离型胆酸(鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸和猪胆酸)含量增加,结合型胆酸中甘氨酸鹅去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、甘氨酸猪去氧胆酸、牛磺猪去氧胆酸、甘氨酸猪胆酸、牛磺猪胆酸等含量降低,表明复合菌种发酵工艺在相同发酵时间内能够使发酵更完全,缩短发酵时间。

通过对胆南星发酵过程中的定点采样,绘制菌种数量变化曲线,本文研究发现胆南星发酵过程中微生物种类及数量呈现交替变化,同时与本课题组

前期对猪胆汁单独发酵过程中的菌种分离鉴别进行对照,发现胆南星发酵过程分离得到的菌种类少于胆汁单独发酵,如菌I、菌J、菌L为胆汁单独发酵中的菌种,推测是由于天南星的毒性能够起到菌种筛选作用,使胆南星传统自然发酵过程中杂菌的数量显著降低。后续将继续完善复合菌种发酵胆南星的发酵工艺,探究优势菌种肠球菌属(厌氧)和铅黄肠球菌在胆南星炮制过程中的作用。本文研究结果有助于建立胆南星炮制新工艺,缩短发酵时间,避免胆南星传统杂菌发酵工艺中存在的弊端,提高胆南星的质量及其稳定性,为推进胆南星微生物发酵新工艺的应用提供科学依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:273-274.
- [2] 崔亚晨,单丽倩,单国顺,等. 猪牛羊胆汁及其制成的胆南星药效作用对比研究[J]. 中药材,2021,44(3):586-592.
- [3] 崔亚晨,单丽倩,刘晓峰,等. 不同胆汁及其制成的胆南星对LPS诱导的急性肺损伤大鼠保护作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(1):125-132.
- [4] 陈江宁,单国顺,刘晓瑜,等. 胆南星辅料成分分析及其清热作用[J]. 中国现代中药,2016,18(7):837-840.
- [5] 江云,高慧,任玉珍. 中药发酵技术[M]. 北京:中国中医药出版社,2020:133-134.
- [6] 唐思园. 胆南星发酵炮制工艺研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
- [7] 刘晓峰,崔亚晨,单国顺,等. 胆南星中胆酸类成分含量测定及发酵前后含量比较[J]. 中国现代中药,2019,21(3):375-379.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:349-350.
- [9] KIM O S, CHO Y J, LEE K, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. Int J Syst Evol Microbiol,2012,62(Pt3):716-721.
- [10] KIMURA M. The neutral theory of molecular evolution[J]. Am J Hum Genet,1985,37(1):224-226.
- [11] TAMURA K. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mol Biol Evol,2011,28(10):2731-2739.
- [12] SAITOU N, NEI M. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol,1987,4(4):406-425.
- [13] FELSENTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution,1985,39(4):783-791.
- [14] 胡佳莉,刘林,李钟,等. 黄精发酵过程中有效成分含量与色泽的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(15):169-176.
- [15] 林王敏,翁倩倩,邓爱平,等. 淡豆豉的发酵工艺沿革及过程控制概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(11):222-232.
- [16] 艾素,汤伟,郭若琳,等. 微生物发酵中草药及其活性物质的研究进展[J]. 中国中药杂志,2019,44(6):1110-1118.
- [17] 赵佶. 圣济总录[M]. 北京:人民卫生出版社,1962:189-190.

[责任编辑 刘德文]