

红曲霉与何首乌双向发酵体系的探索

谢炎福, 韩建明, 杜苗苗, 张优仪
(洛阳师范学院, 河南 洛阳 471022)

[摘要] 目的:分析红曲霉与何首乌双向液体发酵形成的药性基质主要活性成分,优选双向发酵工艺条件。方法:采用紫外-可见全波长扫描法和紫外分光光度法进行定性和定量分析,以二苯乙烯苷、结合蒽醌、游离蒽醌和莫纳可林 K 含量为评价指标,在单因素试验基础上,通过正交试验考察红曲霉接种量、何首乌添加量和发酵时间对红曲霉与何首乌双向液体发酵工艺的影响。结果:基质中二苯乙烯苷、结合蒽醌和总蒽醌含量呈下降趋势,而游离蒽醌含量上升,双向发酵最佳工艺条件为何首乌用量 5%,发酵温度 28 ℃,接种量 6%,发酵时间 7 d。二苯乙烯苷、结合蒽醌、游离蒽醌、莫纳可林 K 质量分数分别为 37.84, 0.89, 1.54, 0.41 mg·g⁻¹。结论:何首乌对红曲霉的生长及其次级代谢产物莫纳可林 K 的积累具有促进作用,红曲霉降低了何首乌中结合蒽醌的含量,提高了何首乌的药用价值。

[关键词] 红曲霉; 何首乌; 双向发酵; 二苯乙烯苷; 莫纳可林 K

[中图分类号] R283.6; R284.1; TQ920.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0017-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080017

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150225.1611.008.html>

[网络出版时间] 2015-02-25 16:11

Exploration of Co-fermentation System of Polygoni Multiflori Radix and Monascus XIE Yan-fu, HAN Jian-ming, DU Miao-miao, ZHANG You-yi (Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze main active compositions of drug-containing medium composed by monascus and Polygoni Multiflori Radix after fermentation and optimize its fermentation technology. **Method:** Qualitative and quantitative analysis were established by UV-visible full wavelength scanning method and ultraviolet spectrophotometry, based on single factor tests, with yields of monacolin K, free-anthraquinone, stilbene glucoside and combined-anthraquinone as indexes, orthogonal test was adopted to investigate effects of fermentation time, amounts of monascus and Polygoni Multiflori Radix on fermentation technology. **Result:** Contents of stilbene glucoside, combined-anthraquinone and total anthraquinone showed a downward trend, but free-anthraquinone showed an upward trend. Optimum fermentation conditions were as follows: Polygoni Multiflori Radix amount of 5%, fermentation temperature at 28 ℃, monascus amount of 6%, fermentation time of 7 d. Yields of stilbene glucoside, combined-anthraquinone, free-anthraquinone and monacolin K were 37.84, 0.89, 1.54, 0.41 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** Polygoni Multiflori Radix has a promoting process on growth of monascus and its secondary metabolites of monacolin K, but monascus reduces the content of combined-anthraquinone in Polygoni Multiflori Radix, which improves medicinal value of Polygoni Multiflori Radix.

[Key words] monascus; Polygoni Multiflori Radix; co-fermentation; stilbene glucoside; monacolin K

红曲霉能产生红曲色素、莫纳可林 K 及 γ -氨基丁酸等生物活性成分,具有很高的保健及药用价值^[1]。何首乌具有益气补血、黑发延年、抗衰老、增强免疫力等功效^[2],其生物活性成分主要为二苯乙

烯苷和蒽醌类物质。生品何首乌由于含有较高的结合蒽醌,服用会产生一定的肝毒性,故 2010 年版《中国药典》要求对其进行炮制后方能使用、传统炮制方法为黑豆汁清蒸或煮制,操作工艺繁琐、时间长、

[收稿日期] 20140707(020)

[基金项目] 河南省自然科学基金项目(142102110173);洛阳师范学院应用基金项目(2012-10001410)

[第一作者] 谢炎福,实验师,从事微生物发酵研究, Tel:18538835172, E-mail:xyf@lynu.edu.cn

有益成分损失量大。

中药发酵结合了生物转化技术和中药炮制学,利用微生物的多种酶系,降解、转化药材中有毒和有害物质,甚至会产生新活性成分,达到了提高药效、节省药物用量、提高疗效的目的。庄毅^[3]利用灵芝对黄芪进行发酵,在国内提出了菌质的概念;赵锐等^[4]采用肠道细菌对苷类、黄酮类等活性成分进行生物转化获得了成功;王明君等^[5]利用朱红密孔菌转化香草酸生成香草醛,转化率达 57.5%;杜晨晖等^[6]使用米根霉对何首乌进行发酵,将何首乌中大黄素转化为大黄素吡喃葡萄糖苷,降低了何首乌的泻下作用。但这些研究偏重于微生物对中药成分的影响,而关于中药对微生物的影响则较少涉及。

红曲霉和何首乌在药性机制上具有一定的相似性,红曲霉能产生淀粉酶、葡萄糖苷酶、纤维素酶等酶系,具有对中草药活性成分进行转化、修饰及产生新活性物质的巨大潜力,能有效破除植物类中药细胞壁和果胶类物质形成的物理屏障,使有效活性成分溶出,还可水解结合蒽醌中糖苷键,转化为无毒性的游离蒽醌。与红曲霉和何首乌分别入药相比,将两者共同构建双向发酵体系产生的药性菌质更能得到优势互补的功效^[7]。在前期中药筛选的基础上,本实验利用何首乌作为红曲霉发酵的药性基质,探讨红曲霉发酵何首乌的可行性,通过单因素试验和正交试验优选发酵条件,为红曲霉与何首乌双向发酵体系的研究提供参考。

1 材料

UV2000 型紫外分光光度计(日本岛津公司),DHP-9052 型恒温培养箱(上海申贤恒温设备厂),K5600 型超微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司)。何首乌(购自洛阳医药城,经洛阳师范学院植物研究室王育娜教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* 的块根,60 ℃ 烘干至恒重,粉碎过 120 目筛备用),红曲霉(自制,经紫外、化学诱变获得),二苯乙烯苷、莫纳可林 K 及蒽醌系列对照品(郑州三鑫化学试剂有限公司,批号分别为 130803-201308,130605-201304,120807-201308),水为无菌水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 发酵种子液和发酵培养基的制备 将活化的红曲霉斜面孢子用水洗,倒入含 0.05% 聚山梨酯-80 生理盐水的锥形瓶中(预先装入数十粒玻璃珠),在摇床上震荡,充分打散孢子,制成 10^6 个/mL 孢子悬液,得红曲霉种子液。发酵培养基^[8]配方为葡萄糖 10

g,何首乌粉 30 g,硝酸钠 3 g,酵母提取物 1 g,磷酸氢二钾 1 g,七水合硫酸镁 0.5 g,氯化钾 0.5 g,七水合硫酸亚铁 0.01 g,pH 5.6,加水定容至 1 L。

2.2 发酵过程 将发酵培养基 80 mL 装入 250 mL 锥形瓶中,于 121 ℃ 高压灭菌 15 min,冷却后接入 6% 预先制好的红曲霉孢子悬液,在 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,30 ℃ 摇床上培养 3 d,降低温度至 28 ℃ 继续培养一定时间,隔天定时带瓶称定质量,计算各项指标。

2.3 评价指标的检测与分析

2.3.1 红曲霉质量 参照文献[9]中的氨基葡萄糖法,略有改动。

2.3.2 红曲色素的去除^[10] 将锥形瓶中发酵液连同残渣一起倒入培养皿中,60 ℃ 烘干,研磨,将研磨的粉末用 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 3 h,合并提取液,浓缩,在装有氧化铝的柱上色谱,除去红曲色素,收集层析液,浓缩至约 80 mL,置于 100 mL 量瓶中,用 75% 乙醇定容至刻度,备用。

2.3.3 莫纳可林 K 含量^[11] 将 2.3.2 项下得到的层析液进行适当稀释,于 236 nm 处测定吸光度(A),计算莫纳可林 K 的含量。

2.3.4 何首乌总蒽醌含量^[12-13] 取适量 2.3.2 项下层析液,减压回收乙醇至无醇味浸膏,取 0.05 g,加入 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 40 mL,超声振荡 10 min 至完全溶解,用三氯甲烷回流 2 h,反复 3 次,合并溶液,用水洗涤至水层为中性,弃去水,回收三氯甲烷,融入含 0.5% 乙酸镁的甲醇溶液中,置于 25 mL 量瓶中,加含 0.5% 乙酸镁的甲醇溶定容至刻度,于 510 nm 处测定 A,计算总蒽醌含量。

2.3.5 游离蒽醌含量 取 2.3.4 项下醇浸膏 0.05 g,用三氯甲烷回流 2 h,反复 3 次,合并溶液,回收三氯甲烷,融入含 0.5% 乙酸镁的甲醇溶液中,置于 25 mL 量瓶中,加含 0.5% 乙酸镁的甲醇溶液定容至刻度,于 510 nm 处测定 A,计算游离蒽醌含量。

2.3.6 二苯乙烯苷含量^[14] 取 2.3.5 项下游离蒽醌提取步骤中的残渣,用 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 3 h,合并提取液并移至 100 mL 量瓶中,用 95% 乙醇定容至刻度,以 95% 乙醇为空白,于 322 nm 处测定 A,计算二苯乙烯苷含量。

2.4 综合评分的计算^[15-16] 要求最大值的指标,分数 = [(指标值 - 指标最小值) / (指标最大值 - 指标最小值)] × 权重;当指标值低于最小值时,得 0 分,当指标值高于最大值时得 1 分。要求最小值的指标,分数 = (指标最大值 - 指标值) / (指标最大值 - 指标最小值) × 权重;当指标值高于

最大值时得 0 分,当指标值低于最小值时得 1 分。二苯乙烯苷、结合蒽醌、游离蒽醌及莫纳可林 K 最大值分别为 41.83,2.00,2.26,0.80 mg·g⁻¹,最小值依次为 7.0,0,1.0,0.1 mg·g⁻¹,权重分别为 0.4,0.3,0.2,0.1。

2.5 发酵前后成分的变化 发酵过后,发酵液的颜色由黄褐色转为红紫色。特别吸收峰在约 220 ~ 570 nm 物质变化较大,在 180 nm 和 375 nm 处吸收峰消失,附近产生了新的吸收峰。说明在发酵过程中,红曲霉和何首乌存在着复杂的双向作用,有些物质含量下降,被红曲霉分解利用为自身代谢需要,有些被转化生成新的物质或成为新的活性成分。红曲色素和莫纳可林 K 在 228,238,246 nm 处会产生吸收峰^[17],有可能在 236 nm 附近产生的新吸收峰为莫纳可林 K 或莫纳可林 K 和红曲色素的叠加峰。

2.6 发酵条件的单因素试验考察

2.6.1 发酵时间 30 ℃ 发酵 3 d 后,28 ℃ 继续培养 8 d,其他培养条件同 2.2 项,考察不同发酵时间时发酵基质中活性成分含量的影响。结果显示随着发酵时间的延长,红曲霉生物量呈增长趋势,游离蒽醌先增长后降低,而二苯乙烯苷、结合蒽醌和总蒽醌呈现降低的趋势。赵荣华等^[18]认为结合型蒽醌质量分数 < 2.09 mg·g⁻¹ 时,何首乌的毒性即得以去除,在保证结合蒽醌大量降解的情况下应适时终止发酵,以免二苯乙烯苷大量损耗,确定发酵时间 7 d。

2.6.2 何首乌加入量 30 ℃ 发酵 3 d 后,28 ℃ 继续培养 4 d,加入质量分数分别为 0,1%,2%,3%,4%,5% 的何首乌至培养基中,其他条件同 2.2 项。结果表明随着何首乌添加量的增大,红曲霉、莫纳可林 K 和游离蒽醌质量分数均呈先增加后降低的趋势,何首乌中总蒽醌、结合蒽醌、二苯乙烯苷则呈增加趋势。当何首乌添加量为 4% 时,二苯乙烯苷和

游离蒽醌得到了最大程度保留。

2.6.3 接种量 30 ℃ 发酵 3 d 后,28 ℃ 继续培养 4 d,何首乌添加量 4%,将质量分数分别为 0,3%,6%,9%,12% 的红曲霉接入培养基,其他条件与 2.2 项相同。结果发现随着红曲霉接种量的增大,何首乌中二苯乙烯苷、总蒽醌、结合蒽醌含量呈降低趋势,而红曲霉、莫纳可林 K 和游离蒽醌质量分数则先增加后降低。因为接种量增大,菌体代谢旺盛,会分泌大量胞外酶类,有利于发酵基质的利用和菌体的生长;但接种量过大,会导致发酵液过于黏稠,影响溶氧含量和产物合成。综合各项因素,当接种量为 6% 时,各项指标均较为理想。

2.7 正交试验优选 在单因素试验基础上,选择接种量、发酵时间、何首乌用量为考察因素,以二苯乙烯苷、结合蒽醌、游离蒽醌及莫纳可林 K 质量分数的综合评分为指标,选用 L₉(3⁴) 正交表安排试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对发酵体系的影响顺序为 A > B > C。因素 A, B 对发酵体系具有显著性影响,因素 C 则无显著性影响。各因素水平间,除发酵时间 1 和 2,3 和 2 以及接种量 1 和 2 水平之间有显著差异外,其余因素水平间均无显著差异,确定最佳发酵条件组合为 A₂B₂C₃,即发酵时间 7 d,接种量 6%,何首乌用量 5%。按优选的工艺条件进行验证试验,结果二苯乙烯苷、结合蒽醌、游离蒽醌、莫纳可林 K 质量分数分别为 37.84,0.89,1.54,0.41 mg·g⁻¹。

3 讨论

双向发酵过程中,何首乌中蒽醌、二苯乙烯苷的含量和红曲霉的生长存在密切关系,红曲霉对 3 种营养成分的利用顺序可能为葡萄糖、蒽醌、二苯乙烯苷。红曲霉在葡萄糖存在的情况下,优先利用培养基中葡萄糖作为碳源和能量来源,葡萄糖将要耗尽

表 1 红曲霉与何首乌双向液体发酵工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of co-fermentation process of monascus and Polygoni Multiflori Radix

No.	A 发酵时间 /d	B 接种量 /%	C 何首乌用量 /%	二苯乙烯苷 /mg·g ⁻¹	结合蒽醌 /mg·g ⁻¹	游离蒽醌 /mg·g ⁻¹	莫纳可林 K /mg·g ⁻¹	综合得分 /分
1	5	3	3	39.23	1.24	0.93	0.12	0.476
2	5	6	4	38.62	0.96	1.29	0.26	0.588
3	5	9	5	36.77	1.03	1.06	0.18	0.508
4	7	3	5	41.38	1.24	1.16	0.28	0.560
5	7	6	3	32.96	0.55	1.63	0.46	0.667
6	7	9	4	31.91	0.42	1.57	0.50	0.671
7	9	3	4	30.63	0.79	1.25	0.55	0.557
8	9	6	5	29.04	0.71	1.37	0.64	0.582
9	9	9	3	19.76	0.25	1.31	0.64	0.535

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	0.019	0.009	36.866	<0.05
B	0.010	0.005	19.732	<0.05
C	0.005	0.003	10.469	>0.05
D(误差)	0.001	0.000		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

时红曲霉大量合成葡萄糖苷酶和其他酶类。在发酵初期,红曲霉生长微弱,处于停滞期,何首乌中蒽醌和二苯乙烯苷的含量变化较小;随着红曲霉生物量的提高,分解结合蒽醌中的糖苷键,转化为游离蒽醌,分解的糖类作为自身能量代谢来源;随着发酵过程的深入,红曲霉进一步将游离蒽醌分解利用,造成游离蒽醌和总蒽醌的减少,同时二苯乙烯苷也会由于红曲霉的分解作用得以降解。故在结合蒽醌得到较大转化前提下,应适时终止发酵,以免主要药性成分的损失。经过灭菌后,游离蒽醌含量会稍有增加,而总蒽醌、结合蒽醌和二苯乙烯苷含量则稍有减少,说明高压灭菌起到了和发酵类似的效果,这和赵荣华等^[18]研究结果一致。

适量何首乌对红曲的生长及其有效活性成分莫纳克林 K 的产生具有促进作用,这可能是由于何首乌含有多糖、卵磷脂、脂肪等有效成分,刺激了红曲霉的代谢活动。莫纳克林 K 总体呈增加趋势,但发酵初期含量基本检测不出,其产量高峰出现时间延后于红曲霉生物量的产量高峰,说明莫纳克林 K 是红曲霉的次生代谢产物,只有当红曲霉菌丝量增加至平稳期后该成分才大量合成。试验过程中发现,添加了何首乌的发酵组红曲霉生物量及莫纳克林 K 的含量高于未添加何首乌的空白组,但空白组更早产生了红曲色素,出现了颜色变化,这可能是由于空白组葡萄糖消耗完后未得以补充,红曲色素是次级代谢产物,往往在红曲霉即将停止生长时才会大量产生,也有可能是红曲霉对何首乌的添加有一个逐渐适应的过程。适量添加何首乌对于红曲霉的生长和次级代谢产物莫纳克林 K 的积累具有促进作用,红曲霉以何首乌作为药性基质显著降低了后者中结合蒽醌的含量,同时增高了游离蒽醌的含量,使二苯乙烯苷损失减少。红曲和何首乌双向发酵相互影响,有可能对现有成分进行了生物转化或产生了新活性成分。

[参考文献]

[1] Endo A. Compactin (ML-236B) and related compounds

as potential cholesterol lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase [J]. J Med Chem, 1985, 28(4): 401-405.

[2] 苏玮,郭群.何首乌的现代药理研究概况[J].中草药,1997,28(2):119-121.

[3] 庄毅.菌质——中药的一个新领域[J].中药新药与临床药理,1992,3(2):49-51.

[4] 赵锐,邢增涛,李向高,等.肠内细菌对天然药物的化学修饰[J].吉林农业大学学报,1998,20(2):103-110.

[5] 王明君,郑璞,孙志浩,等.微生物转化香草酸生产香草醛[J].食品与发酵工业,2004,30(2):43-47.

[6] 杜晨晖,海青山,闫艳,等.微生物发酵炮制何首乌机理的初步研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(2):212-215.

[7] 王兴红,李祺德,曹秋娥.微生物发酵中药应成为中药研究的新内容[J].中草药,2001,32(3):267-272.

[8] 吴根福.发酵工程实验指导[M].北京:中国农业大学出版社,2006:168.

[9] 陈云.红曲霉固态发酵及形态解析[D].天津:天津轻工业学院,2003.

[10] 张小茜,周富荣,石济民.高效液相色谱法测血脂康胶囊及红曲中洛伐他汀的含量[J].中国中药杂志,1997,22(4):222-224.

[11] 田洁,乔明武,左秀凤,等.红曲发酵谷物麸糠提取 Lovastatin 的研究[J].现代食品科技,2006,22(3):112-114.

[12] 高言明,陈海云,吴小宇.醋酸镁-甲醇分光光度法测定何首乌中蒽醌类化合物的含量[J].微量元素与健康研究,2004,21(2):41-42.

[13] 李卫先,张琦,王国仁,等.炮制时间对何首乌中有效成分的影响[J].中国中医药咨讯,2011,3(23):48-49.

[14] 许彩虹,籍保平,李博,等.四种炮制方法对何首乌有效成分的影响[J].食品科学,2004,25(6):84-88.

[15] 胡容峰,朱家璧,彭代银,等.综合评分法优化复方丹参口腔速溶片制剂处方[J].中国中药杂志,2006,31(5):380-382.

[16] 田源红,张丽艳,杨玉琴,等.综合评分法优化黑豆汁炖何首乌炮制工艺[J].时珍国医国药,2007,18(3):549-551.

[17] 文镜,顾晓玲,常平,等.双波长紫外分光光度法测定红曲中洛伐他汀(Lovastatin)的含量[J].中国食品添加剂,2000(4):11-17.

[18] 赵荣华,赵声兰,毛晓健,等.何首乌蒸制后结合型蒽醌含量与泻下作用相关性研究[J].时珍国医国药,2008,19(11):2654-2655.

[责任编辑 刘德文]