

不同发酵方式对神曲消化酶活力及化学成分的影响

刘晓瑜, 陈江宁, 贾天柱*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:优化神曲发酵工艺,比较不同发酵方式对神曲消化酶活性及化学成分的影响。方法:以淀粉酶、蛋白酶活力和 HPLC 特征图谱为评价指标,对未发酵、恒温恒湿发酵及自然室温发酵神曲进行对比研究,并与市售神曲进行比较;以淀粉酶、蛋白酶活力为指标,通过单因素试验考察发酵相对湿度及药汁加入量。结果:神曲最佳发酵方式以恒温恒湿发酵效果较优,其淀粉酶、蛋白酶活力分别为 $14.768 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $79.467 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$,化学成分与自然发酵和 Z 生品差别不大。与参照图谱相比,相似度除未发酵组 <0.9 外,其余各组均 >0.9 ;最佳发酵相对湿度 80%,麸面中药汁加入量 $0.65 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论:恒温恒湿发酵神曲产生的消化酶活力较高,较自然室温发酵快速、质量可控,为神曲的质量标准制定提供参考依据。

[关键词] 神曲; 发酵工艺; 酶活力; 特征图谱; 淀粉酶; 蛋白酶

[中图分类号] R283.6;R284.1;TQ920.6;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0014-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030014

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1555.014.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 15:55

Effect of Different Fermentation Way on Digestive Enzyme Activity and Chemical Composition of Massa Medicata Fermentata

LIU Xiao-yu, CHEN Jiang-ning, JIA Tian-zhu*

(Chinese Materia Medica Processing Engineering Research Center of Liaoning Province, School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize fermentation process of Massa Medicata Fermentata by investigating its different fermentation way. **Method:** Using the amylase and protease activity combining with HPLC specific chromatogram as the evaluating indicators, unfermentation, constant temperature and humidity fermentation, natural room temperature fermentation of Massa Medicata Fermentata were compared to optimize the best fermentation way, then do comparative study with commercially available Massa Medicata Fermentata (Z raw product). Taking the activity of amylase and protease as indicators, single factor tests were carried out on the fermentation humidity and additive amount of herbal medicine juice to optimize the best process. **Result:** The best fermentation way was constant temperature and humidity fermentation, its activities of amylase and protease were $14.768 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ and $79.467 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, its chemical composition was similar to natural fermentation and Z raw product. Compared with reference chromatogram, the similarity values were all higher than 0.9 except the unfermentation group. The best fermentation humidity was 80% and the best additive amount of herbal medicine juice was 65 mL for 100 g of bran-flour. **Conclusion:** The digestive enzyme activity of Massa Medicata Fermentata fermented with constant temperature and humidity is high, its fermentation speed is faster than the natural room temperature fermentation, its fermentation process is controllable and feasible, which can provide a scientific reference for formulating quality standard of Massa Medicata Fermentata in future.

[收稿日期] 20160426(012)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(20102X09401-304-105A)

[第一作者] 刘晓瑜,在读硕士,从事中药发酵炮制研究,Tel:15104055961,E-mail:liuxy0131@163.com

[通讯作者] *贾天柱,教授,博士生导师,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-85896135,E-mail:jiazh@126.com

[**Key words**] Massa Medicata Fermentata; fermentation process; enzyme activity; specific chromatogram; amylase; protease

神曲又名六神曲、六曲,始载于《药性论》^[1],味甘、辛,性温,具有健脾和胃、消食调中之功效^[2],系由赤小豆、苦杏仁、青蒿、苍耳草、辣蓼等药物混以面粉、麦麸经发酵而制成的曲剂。目前,各地神曲制备工艺不规范,尚无统一标准对其进行质量评定。目前关于神曲制备工艺的研究较少^[3-4],但其可为神曲的发酵机制分析及质量标准制定提供参考依据。

《本草备要》^[5]中记载:“造曲法,以五月五日,六月六日,用白面百斤,赤豆末、杏仁泥、青蒿、苍耳、红蓼汁各三升,以配青龙、白虎、朱雀、玄武、蛇、勾陈六神,通和作饼,生黄衣,晒收。陈者良”。说明古代是在夏季自然室温条件下进行发酵神曲,目前也仍有研究者采用此种方式发酵^[3],但该发酵方式会受季节、温度等诸多外部环境因素的限制;现有些研究者通过恒温恒湿箱进行发酵神曲^[6-7],这种方式不易受外部条件影响,能较好地保证神曲质量;还有些研究认为神曲发酵后会产生真菌毒素,进而影响产品质量而不会发挥临床疗效,因此不需要进行发酵。前期已对神曲制备过程中的配料比、发酵时间、发酵温度等工艺参数进行了考察,在此基础上,本实验采用 HPLC 特征图谱技术对不同发酵方式制得的神曲进行整体化学成分考察,结合消化酶活力指标综合评定神曲不同发酵方式的异同,得出最佳发酵方式,并对发酵相对湿度、药汁加入量 2 个因素进行发酵工艺优化,为神曲的临床疗效发挥及质量标准制定提供参考依据。

1 材料

HWS-080 型恒温恒湿箱(上海精宏实验设备有限公司), e2695-2998 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司), T6 新世纪型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), ZHWY-1102 型双层恒温培养摇床(上海智岩科学仪器有限公司)。

赤小豆、青蒿、苍耳草、辣蓼均购于河北省安国市,麦麸、苦杏仁购于大连民大中药饮片有限公司,均经辽宁中医药大学尹海波教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版相关项下要求;Z 生品神曲购于大连所售饮片质量较优的药房,面粉(沈阳香雪面粉股份有限公司),可溶性淀粉(天津市大茂化学试剂厂),干酪素(国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 神曲样品的制备^[8] 将粉碎过 20 目筛的麦麸、赤小豆、苦杏仁粉末与面粉混匀;青蒿、苍耳草、辣蓼三者干品(用量为鲜品的 1/3)加适量水煎煮约 1 h,过滤后倒入面粉与麦麸、赤小豆、苦杏仁混合的粉末中,面粉-麦麸(3:7)混合物、赤小豆、苦杏仁、青蒿、苍耳草、辣蓼的用量比为 100:4:4:7:7:7,揉搓成颗粒状,置于模具中成型并用粗布包严,将制备所得样品放于恒温恒湿箱中,在 32 ℃ 和一定湿度条件下发酵 3 d 后取出,剥去霉衣,切块,低温干燥,自封袋中贮存,备用。

将另一部分样品置于室温自然环境下进行自然室温发酵。在夏季阴历五月初五或六月初六时制备神曲,原料配料比同上,在包严的粗布上覆盖少许湿纱布以保证样品发酵所需湿度条件,放在托盘中,每块之间留有一定空隙,发酵 3 d,表面长出黄白色霉衣后取出,剥去霉衣,切成小块,低温干燥,贮存备用。未发酵软材放入自封袋,存放于冰箱中,冷藏保鲜,3 d 后取出,切块,低温干燥。

2.2 消化酶活力测定

2.2.1 酶液的制备^[9] 称取粉碎过 20 目筛神曲粉末 1.0 g 置于锥形瓶中,加入水 20 mL,在 40 ℃ 条件下用摇床(110 r·min⁻¹)振摇提取 0.5 h,离心 5 min(8 000 r·min⁻¹,下同),取上清液,加水稀释 4 倍,充分混匀,4 ℃ 保存,备用。

2.2.2 蛋白酶活力的测定^[10] 采用福林酚比色法。精确称取干酪素 0.7 g,用少量 0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液浸泡,4 ℃ 冰箱放置过夜,次日置于水浴锅中加热使之完全溶解,转移至 100 mL 量瓶中,加水定容。酶液及酪蛋白溶液于 40 ℃ 分别预热 5 min,各吸取 1 mL 至干燥洁净的试管中,40 ℃ 精确保温 10 min,立即加入三氯乙酸 2.5 mL,40 ℃ 保温 30 min 以终止反应,使残余蛋白质沉淀后离心 10 min,各取上清 1 mL,依次加入 0.4 mol·L⁻¹碳酸钠溶液 5 mL 和福林酚工作液 1 mL,摇匀,40 ℃ 保温发色 20 min,于 680 nm 处测定吸光度 A。其中空白管加入 1 mL 水以代替消化酶液。蛋白酶活力单位定义为在上述反应条件下,每克神曲样品在 40 ℃ 时每分钟水解酪蛋白释放酪氨酸的含量。

2.2.3 淀粉酶活力测定^[3] 采用二硝基水杨酸比色法。吸取 1% 可溶性淀粉溶液 1 mL 置于试管中,

加入 1% 氯化钠溶液 400 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min, 加入相应酶液 200 μL , 准确计时反应 5 min, 取出, 立即加入 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 200 μL 终止反应, 加入二硝基水杨酸溶液 200 μL , 煮沸 5 min, 显色。待冷却至室温后, 各吸取 200 μL 反应液于 96 孔酶标板中, 重复加 3 个孔, 于 540 nm 处测定 A。每组均设定空白管, 空白管先加入酶液, 再加入 NaOH 溶液, 其余步骤与样品管的方法相同。淀粉酶活力单位定义为单位质量的神曲粉末, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 1 min 内水解可溶性淀粉生成麦芽糖的含量。

2.3 HPLC 特征图谱

2.3.1 供试品溶液的制备^[7] 将不同发酵方式制备的神曲及市售神曲生品粉碎, 过二号筛, 各称取 7.50 g 至锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称重, 30 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 0.5 h, 称重后用甲醇补足损失的质量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 20 mL, 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中挥干溶剂, 加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 冷藏, 备用。

2.3.2 色谱条件 Waters Symmetry-C₈ 色谱柱 (3.9 mm \times 150 mm, 5 μm), 检测波长 280 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL , 流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5% A; 10 ~ 15 min, 5% ~ 10% A; 15 ~ 30 min, 10% ~ 20% A; 30 ~ 45 min, 20% ~ 50% A; 45 ~ 75 min, 50% ~ 75% A; 75 ~ 80 min, 75% ~ 85% A; 80 ~ 90 min, 85% ~ 90% A; 90 ~ 95 min, 90% ~ 92% A; 95 ~ 105 min, 92% ~ 96% A; 105 ~ 115 min, 96% ~ 20% A; 115 ~ 120 min, 20% ~ 5% A; 120 ~ 125 min, 5% A), 流速 0 ~ 10 min, 0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 10 ~ 15 min, 0.6 ~ 0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 15 ~ 125 min, 0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3.3 方法学考察 取恒温恒湿发酵神曲供试品溶液, 连续进样 6 次, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 0.6%, 相对峰面积的 RSD 2.3%, 表明仪器精密密度良好。取同批恒温恒湿发酵神曲, 按 2.3.1 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样并记录特征图谱, 结果各共有峰相对保留时间 RSD 0.4%, 相对峰面积 RSD 4.5%, 表明该方法重复性良好。取同一供试品溶液分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样分析, 结果各共有峰相对保留时间 RSD 0.8%, 相对峰面积 RSD 3.7%, 表明供试品溶液于 24 h 内测定稳定性良好。

2.4 神曲发酵条件单因素试验考察 以淀粉酶、蛋白酶活力为评价指标, 考察药汁加入量和发酵湿度。

在制备神曲过程中所加入药剂量以每 100 g 麸面中分别含药汁 90, 85, 75, 65, 55 mL 进行考察, 结果淀粉酶活力分别为 27.784, 8.032, 24.077, 37.636, 29.998 $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, 蛋白酶活力分别为 228.56, 210.62, 244.07, 253.53, 178.86 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 。相对湿度分别选择 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 进行考察, 结果淀粉酶活力分别为 17.270, 20.220, 21.236, 27.120, 25.705 $\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, 蛋白酶活力分别为 109.77, 118.01, 129.40, 143.46, 125.04 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ 。说明淀粉酶和蛋白酶活力随发酵湿度及药汁加入量增加, 基本呈现先增加后降低的趋势, 其中以相对湿度 80% 和药汁加入量 0.65 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 条件下发酵神曲, 2 种酶活力最高。

2.5 不同发酵方式神曲对消化酶活力的影响 福林酚比色法和二硝基水杨酸比色法检测结果见表 1。说明恒温恒湿发酵及自然发酵神曲的蛋白酶活力与未发酵软材相比, 差异具有统计学意义; 3 组之间的淀粉酶活力虽无统计学差异, 但发酵组与未发酵组相比仍有提高淀粉酶活力的趋势。提示神曲经过发酵后酶活力会显著升高, 且恒温恒湿发酵优于自然发酵, 自然发酵神曲还容易受季节条件变化的影响而使神曲质量不稳定。

表 1 不同发酵方式神曲对蛋白酶和淀粉酶活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effect of different fermentation way of Massa Medicata Fermentata on enzyme activity of amylase and protease ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	蛋白酶活力 $/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	淀粉酶活力 $/\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$
未发酵软材	46.982 \pm 1.260 ²⁾	12.834 \pm 2.674
恒温恒湿发酵	79.467 \pm 3.661 ¹⁾	14.768 \pm 3.041
自然发酵	64.679 \pm 1.111 ^{1,2)}	14.929 \pm 2.834
Z 生品	68.073 \pm 2.622 ^{1,2)}	13.213 \pm 1.116

注: 与未发酵软材组相比¹⁾ $P < 0.05$, 与恒温恒湿发酵组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

2.6 HPLC 特征图谱色谱峰的指认 将各供试品溶液按 2.3.2 项下色谱条件测定, 记录特征图谱, S1 ~ S4 分别为未发酵软材、恒温恒湿发酵神曲、自然室温发酵神曲及 Z 生品。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A) 软件处理数据, 以 S1 为参照图谱, 见表 2。从匹配的色谱峰中共确定了 25 个共有峰, 共有峰的相对保留时间依次为 16.726, 38.331, 42.469, 45.999, 56.432, 57.041, 57.496, 69.334, 70.042, 82.703, 83.525, 84.361, 85.198, 86.544, 87.095, 87.866, 88.752, 90.820, 91.893, 92.994, 96.005, 97.013, 102.336, 104.805, 107.366 min, 见图 1。结果说明未发酵神曲与发酵

神曲相比,在化学成分上存在差异,而不同发酵方式制备的神曲及市售神曲在化学成分上的差异不大。

表 2 不同神曲样品的相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of *Massa Medicata Fermentata* samples

样品	S1	S2	S3	S4	对照特征图谱
S1	1.000	0.665	0.571	0.762	0.828
S2	0.665	1.000	0.886	0.859	0.947
S3	0.571	0.886	1.000	0.689	0.902
S4	0.762	0.859	0.689	1.000	0.934
对照特征图谱	0.828	0.947	0.902	0.934	1.000

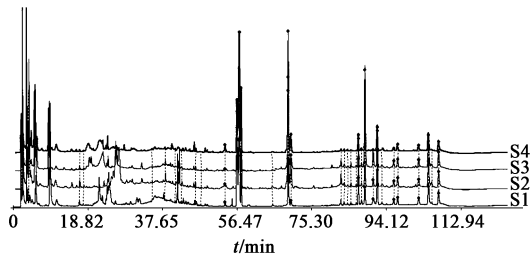


图 1 不同发酵方式及市售神曲生品的 HPLC 特征谱

Fig. 1 HPLC specific chromatograms of *Massa Medicata Fermentata* with different fermentation ways and its commercially available raw product

3 讨论

神曲是发酵法炮制中药的代表,发酵温度、湿度及时间等因素均会影响其表面微生物生长和代谢活动,若温度、湿度等因素不稳定,则难以保证微生物生长状态及代谢活动,进而影响产品质量^[11-12]。目前尚无特定评价神曲质量的指标,多数文献通过消化酶活力来评价神曲质量,应用恒温恒湿箱发酵可较好地控制发酵温度及湿度,能为微生物生长代谢提供稳定的外部环境,更利于微生物分泌产生淀粉酶、蛋白酶等消化酶,并且在实验过程中也观察到,经恒温恒湿箱发酵的神曲表面菌丝生长较自然室温发酵神曲快速且旺盛,虽然二者消化酶活力差异不显著,但前者酶活力要略高于后者,同时,自然室温发酵神曲的条件不稳定。但 HPLC 特征图谱分析结果表明二者相似度均 > 0.9,因此推测湿度、温度等因素仅对微生物分泌产生消化酶活力有影响,而由于各样品组成原料配比相同,2 种发酵方式并未对其化学成分造成差异。

比较未发酵软材与 3 种发酵神曲的化学成分及消化酶活力,存在一定差异,神曲经发酵后消化酶活力升高,原料中原有化学成分减少且有新成分生成,说明在发酵过程中既发生了量变也发生了质变,综合分析,发酵神曲要优于未发酵软材,在发酵过程中微生物分泌产生消化酶并对原料中原有化学成分

进行了转化,因此有必要对成分转化机制进行研究,为揭示神曲发酵机制奠定基础。由于神曲在恒温恒湿箱发酵效果较优,因此对其湿度等因素进行考察十分有意义。神曲只有在适宜的湿度及药汁加入量条件下,酶活力才能达到最高,所得产品质量才最优,若湿度或药汁加入量过大则容易霉烂,影响最终产品质量,反之,会使微生物生长不完全,阻碍表面微生物产生次级代谢产物的活动。

在实验过程中还观察到自然室温发酵 7 ~ 8 d 时,神曲产生的消化酶活力水平与恒温恒湿箱发酵 3 d 左右产生的消化酶活力水平较接近,说明恒温恒湿发酵神曲可节省时间、提高生产效率。本研究仅从消化酶活力及整体化学成分变化角度考察了不同发酵方式及发酵条件的差别,对于不同发酵方式神曲的临床疗效差异并未进行考察。

[参考文献]

- [1] 甄权. 药性论 [M]. 芜湖: 皖南医学院科研科, 1983:42.
- [2] 贾天柱. 中药炮制学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008:291.
- [3] 王海洋, 高文远, 张丽霞. 六神曲不同的制备工艺对其淀粉酶活力的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (14):2084-2087.
- [4] 刘腾飞, 高慧, 刘晓瑜, 等. 响应面法优化六神曲发酵工艺 [J]. 中药材, 2014, 37(10):1757-1761.
- [5] 汪昂. 本草备要 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997:59.
- [6] 刘腾飞, 贾天柱. 神曲制备过程中配料比考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15):40-43.
- [7] 练晶军. 六神曲质量特征及发酵变化研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [8] 国家药政管理局. 全国中药饮片炮制规范 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988:407-408.
- [9] 孔杰娜, 谢茵, 张凯, 等. 正交实验优化六神曲中淀粉酶和蛋白酶的提取工艺 [J]. 山西医科大学报, 2012, 43(5):349-352.
- [10] YUN X, YAN B X, XIN R Z, et al. Monitoring of the bacterial and fungal biodiversity and dynamics during *Massa Medicata Fermentata* fermentation [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(22):9647-9655.
- [11] 邬吉野, 李莹, 王德馨, 等. 六神曲的发酵菌种分离及纯种发酵考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (16):12-14.
- [12] 曹国琼, 张永萍, 徐剑, 等. 神曲与酶对化风丹药母发酵过程中毒性成分的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4):1-4.

[责任编辑 刘德文]