

## 赛氏曲霉深层发酵神曲的工艺优选

程亦雄, 张婧, 戚岑聪, 周黎, 史新元\*  
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的: 优选神曲的深层发酵工艺。方法: 以淀粉酶、蛋白酶活性为指标, 采用单因素试验考察面粉和麦麸比例、不同无机盐对发酵工艺的影响; 以蛋白酶活力为指标, 采用正交试验考察面粉-麦麸用量比、发酵温度、摇床转速、无机盐用量对神曲深层发酵工艺的影响。结果: 选定赛氏曲霉进行纯种发酵工艺,  $K_2HPO_4$  为神曲液态发酵所需的无机盐, 最佳发酵工艺为向 150 mL 水中加入面粉麦麸量 12 g 和  $K_2HPO_4$  0.15 g, 温度 28 °C, 摇床转速 180 r·min<sup>-1</sup>。结论: 优选的发酵工艺稳定可行, 为中药发酵炮制技术的开发提供参考。

**[关键词]** 神曲; 赛氏曲霉; 酶活力; 正交试验; 淀粉酶; 蛋白酶; 单因素试验

**[中图分类号]** R283.6; R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0042-04

**[doi]** 10.11653/syfj2013190042

## Optimization of Submerged Fermentation Technology for Massa Medicata Fermentata by Aspergillus Sydowii

CHENG Yi-xiong, ZHANG Jing, QI Cen-cong, ZHOU Li, SHI Xin-yuan\*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize submerged fermentation technology of Massa Medicata Fermentata. **Method:** With activity of amylase and protease as indexes, single factor test was adopted to investigate effects of flour-wheat bran ratio and different inorganic salts on fermentation technology; With activity of protease as the index, orthogonal test was used to optimize submerged fermentation technology of Massa Medicata Fermentata with

**[收稿日期]** 20130314(021)

**[基金项目]** 北京市科技新星计划交叉学科项目(xxhz201210)

**[第一作者]** 程亦雄, 在读硕士, 从事发酵工程研究, Tel:15101078376, E-mail:chengyixiong100@163.com

**[通讯作者]** \* 史新元, 副教授, 研究生导师, 从事中药生物技术研究, Tel:010-84738621, E-mail:xyshi@126.com

- [7] 曲中原. 刺五加总苷抗疲劳实验研究[J]. 中成药, 2009, 31(3): 474.
- [8] 许光辉, 吴艳萍, 罗友华, 等. 刺五加增强小鼠睡眠剥夺模型免疫功能和抗疲劳能力的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 153.
- [9] 袁昕蓉, 李康, 李强, 等. HPLC 法测定刺五加中游游离嗪皮啶和总异嗪皮啶的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(2): 118.
- [10] 周金黄, 王筠默主编. 中药药理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 238.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 192.
- [12] 陆兔林, 马新飞, 毛春芹. 刺五加药材提取工艺的研究[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(4): 59.
- [13] 王玉琴, 郑清. 刺五加中刺五加皂甙提取条件的优化[J]. 盐城工学院学报: 自然科学版, 2005, 18(1): 49.
- [14] 曲中原, 金哲雄, 高文昊. 刺五加总普提取工艺研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2005, 21(1): 14.
- [15] 陈明岩, 邹明强, 李爱军, 等. 紫丁香甙标准品的提纯与表征[J]. 食品科学, 2002, 23(7): 3.
- [16] 彭玉麟, 马桂荣, 藉宝霞, 等. 刺五加糖营 B、B-1 的分离提纯及刺五加不同部位中 B 和 B-1 含量的测定[J]. 河北省科学院学报, 1984(1): 91.
- [17] 邵佳锋, 刘树民, 牟洪, 等. 刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 的大孔树脂分离纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 10.

[责任编辑 仝燕]

fermentation temperature, shaking speed, ratio of flour-wheat bran and the amount of inorganic salts as factors.

**Result:** *Aspergillus sydowii* and  $K_2HPO_4$  were selected, optimum submerged fermentation technology was as following: added 12 g flour-wheat bran (1:6) and 0.15 g  $K_2HPO_4$  into 150 mL water, fermentation temperature at 28 °C, shaking speed 180 r·min<sup>-1</sup>. **Conclusion:** This optimized fermentation technology was stable and feasible, it could provide a reference for fermentation processing technology of Chinese materia medica.

[**Key words**] *Massa Medicata Fermentata*; *aspergillus sydowii*; activity of enzyme; orthogonal test; amylase; protease; single factor test

发酵炮制具有降低或消除中药材毒性和副作用、增强药效、产生新的药理作用、提高中药提取效率等作用<sup>[1]</sup>。利用自然环境中微生物进行混合发酵,由于环境中菌种不同,造成不同产地或相同产地不同批次的产品差异较大<sup>[2]</sup>。但某些真菌会产生有毒的代谢产物,即真菌毒素,目前已在中药发酵炮制品中检出对人类有强致癌作用的黄曲霉素<sup>[3]</sup>,使其应用受到影响。因此,改革传统中药发酵炮制工艺,确保产品的质量和安全,已成为当前发酵炮制生产中急需解决的问题。神曲系由面粉、赤小豆、苦杏仁、青蒿、苍耳草、辣蓼按一定比例混匀发酵制成的传统曲剂,具有健脾和胃、消食调中的功效,临床应用广泛。在前期研究基础上,本实验按传统工艺发酵制得神曲,筛选分离酶产量高的菌种,探讨神曲的深层发酵,并优选单一菌种发酵神曲的工艺条件,为中药发酵炮制新技术研究提供思路。

## 1 材料

HH-56 型数显恒温水浴锅(金坛市正基仪器有限公司),DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),D-37520 型台式高速冷冻离心机(力康发展有限公司),UV-2100 紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),HYG-B 型全温度摇瓶柜(太仓市实验设备厂)。

面粉(北京市古船食品有限公司),赤小豆、苦杏仁、青蒿、辣蓼、苍耳草(均购自河北省安国市,经本校刘春生教授鉴定,分别为豆科植物赤小豆 *Phaseolus calcaratus* Roxb. 的干燥成熟种子,蔷薇科植物东北杏 *Prunus mandshurica* (Maxim.) Koehne 的干燥成熟种子,菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的全草,蓼科植物垂蓼 *Polygonum flaccidum* Meissn. 的全草,菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的地上部分),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

活化培养基为 PDA 培养基。产淀粉酶筛选培养基为可溶性淀粉 0.4 g,牛肉膏 1 g,蛋白胨 2 g,氯

化钠 0.5 g,琼脂 4 g,水 200 mL,pH 自然。产蛋白酶筛选培养基为酪蛋白 10 g,牛肉膏 3 g,磷酸氢二钠 2 g,氯化钠 5 g,琼脂 15 g,水 1 L,0.4% 溴麝香草酚蓝溶液 12.5 mL,pH 7.4。药质培养基为 500 mL 锥形瓶中加入面粉 3 g,麦麸 9 g,苦杏仁、赤小豆各 0.48 g,青蒿、苍耳草、辣蓼各 0.28 g,药材均粉碎过 40 目筛,加 150 mL 水,pH 自然。

## 2 方法与结果

**2.1 淀粉酶活力测定** 淀粉酶活力是指 1 g 六神曲粉末在一定条件下(40 °C,pH 5.0)于 1 h 内催化可溶性淀粉水解生成葡萄糖的毫克数。按碘量法测定,取 2 个 250 mL 的碘瓶(标号 A,B),各加入 5% 淀粉溶液 25 mL,乙酸钠缓冲液 10 mL,水 10 mL,摇匀。淀粉酶反应试验为向 A 瓶中加入供试品溶液 5 mL,于 40 °C 反应 1 h,加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 1 mL 终止反应。空白试验为向 B 瓶中加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 3 mL,加供试品溶液(发酵后的药质培养基经 15 000 r·min<sup>-1</sup> 高速离心,取上清液即得)5 mL。2 个碘瓶分别加入 0.044 mol·L<sup>-1</sup> 碘液 10 mL,0.1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠 45 mL,暗处放置 20 min,加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸 2 mL,用 0.054 mol·L<sup>-1</sup> 硫代硫酸钠滴定至无色,记录消耗硫代硫酸钠的体积,计算淀粉酶活力。

$$\text{淀粉酶活力} = C \times (V_b - V_a) \cdot M \cdot N / 2 \times m \cdot t$$

式中  $C$  为硫代硫酸钠摩尔浓度, $M$  为葡萄糖的摩尔质量, $N$  为酶液稀释倍数, $V_a$  为样品滴定值, $V_b$  为空白滴定液, $m$  为六神曲的取样量, $t$  为反应时间。

**2.2 蛋白酶活力的测定** 按福林试剂比色法进行测定<sup>[4]</sup>。

**2.3 菌种分离**<sup>[5]</sup> 取停止发酵 24 h 内的新鲜神曲,粉碎,过 40 目筛,称取 1 g,在无菌条件下加入 99 mL 无菌水中,振摇,得 10<sup>-2</sup> 稀释度的菌悬液,吸取 1 mL 至 9 mL 无菌水中,混匀,依次制成 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> 稀释度的菌悬液。用无菌吸管分别吸取不同稀释度的菌液 1 滴,滴入普通培养基平板中(每个稀释度重复 3 次),涂布,培养。挑取单个菌落纯化培养,镜检。若不纯,再依法反复

稀释,直至获得纯培养<sup>[6]</sup>。结果得到 7 种纯菌落,经检查均为单一微生物,分别标为 1~7 号,依次初步鉴定为白地霉、青霉、白腐霉、烟曲霉、大毛霉、赛氏曲霉、黄曲霉。

**2.4 菌种筛选** 采用水解圈法筛选。将斜面保藏 1~7 号菌种活化,以三点法接种到初筛培养基上,产淀粉酶的初筛培养基置于 28 ℃ 培养 1~2 d 后,根据菌落周围水解圈大小筛选产淀粉酶能力强的菌株<sup>[7]</sup>,观察水解圈大小,用游标卡尺测量透明圈直径(*H*)分别为 1.93,1.70,3.53,0,3.70,2.37,3.50 cm,菌落直径(*C*)分别为 0.97,1.20,1.83,0.50,2.03,1.13,2.87 cm,计算两者比值(*HC*)分别为 2.06,1.43,1.93,0,1.83,2.10,1.22,表明 1 号菌白地霉和 6 号菌赛氏曲霉的透明圈较其他菌株大,*HC*均>2,说明产淀粉酶活力较高。选出 *HC* 较大的菌株在斜面上保藏,用于后续工艺研究中。将活化的菌种在产蛋白酶的初筛培养基上划线,置于 28 ℃ 培养 4~5 d 后,根据菌落周围水解圈大小及指示剂变色程度筛选产蛋白酶能力强的菌株,显示赛氏曲霉的蛋白酶培养基中指示剂变色明显,且变色范围较其他菌株有显著差别,说明赛氏曲霉分解酪蛋白的能力较其他菌种强,故选定赛氏曲霉进行纯种发酵工艺考察。

**2.5 种子液的制备** 将斜面菌种活化 2~3 次,分别接种于经 0.8 kg·cm<sup>-2</sup> 蒸汽灭菌 20 min 的液体 PDA 培养基 100 mL 中,于 28 ℃,160 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 3 d,即得。

**2.6 无机盐对酶活性的影响** 在药质培养基中分别加入 5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 接种 5% 菌液,于 30 ℃,160 r·min<sup>-1</sup> 条件下摇床培养 10 d,每个条件平行 3 份样品,测定空白样品及各样品的淀粉酶活力分别为 (21.29 ± 0.58), (33.90 ± 1.41), (25.43 ± 0.37), (22.97 ± 0.61), (21.47 ± 0.32), (24.51 ± 1.76), (19.15 ± 3.53), (23.5 ± 0.28) U·g<sup>-1</sup>,蛋白酶活力分别为 0, (29.41 ± 3.1), (12.71 ± 1.22), (3.99 ± 0.13), 0, (2.72 ± 0.28), 0, 0 U·g<sup>-1</sup>,表明加入 MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 NaCl 对淀粉酶活力均有提高,其中 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的影响最为显著,大幅提高了淀粉酶活力和蛋白酶活力,与神曲中钾离子含量高的报道相符<sup>[8]</sup>,故选定 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 为神曲液态发酵所需的无机盐。

**2.7 神曲原料中面粉和麦麸比例考察** 保持药质培养基中面粉和麦麸总量不变,分别选择全麦麸、面粉-

麦麸(1:6,1:3,1:1)进行发酵,接种量 5%,于 30 ℃,160 r·min<sup>-1</sup> 摇床上发酵 10 d,每个条件平行 3 份,结果淀粉酶活力分别为 (43.64 ± 1.07), (53.56 ± 2.11), (17.74 ± 1.23), (13.65 ± 0.76) U·g<sup>-1</sup>,蛋白酶活力分别为 (141.01 ± 2.77), (20.94 ± 0.91), (7.63 ± 0.36), 0 U·g<sup>-1</sup>。表明在全麦麸发酵中,蛋白酶活力较其他配比有显著差异,原因可能是麦麸自身作为氮源,对诱导赛氏曲霉产蛋白酶有促进作用;淀粉酶活性在配比为 1:6 时最大,说明面粉作为碳源有利于淀粉酶的生产,而随面粉量的增加、麦麸量的减少,淀粉酶、蛋白酶活性均呈现下降趋势;两者比例为 1:1 时蛋白酶活力为 0,原因可能是面粉黏稠性大,随面粉含量的增加,发酵液越来越黏稠,由于溶氧量不足,影响了菌体的正常代谢,此外,碳源充足促进菌体自身的生长和繁殖,而非酶的生产,故分别选取全麦麸和面粉-麦麸(1:6)进行下一步试验。

**2.8 神曲深层发酵的工艺考察** 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表<sup>[9]</sup>,由于淀粉酶活性差异不显著,故仅以蛋白酶活力为考察指标,对影响酶活性的面粉-麦麸总用量、温度、转速及无机盐用量进行考察,发酵 7 d,因素水平见表 1,由于 4 个因素都排满了,故采用重复 3 次试验的方法计算误差,试验安排及结果(平均值)见表 2,3,方差分析见表 4,5。

表 1 神曲深层发酵工艺正交试验因素水平

水平	A 面粉-麦麸 用量/g	B 温度 /℃	C 转速 /r·min <sup>-1</sup>	D 无机盐 用量/g
1	9	28	160	0.15
2	12	30	180	0.10
3	15	26	200	0.20

由直观分析可知,各因素对深层发酵工艺的影响顺序为 D>A>B>C。方差分析表明因素 A,B,C,D 均对发酵工艺具有显著性影响,对蛋白酶活力具有统计学意义,故确定最佳工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即向 150 mL 水中加入面粉麦麸量 12 g 和 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15 g,温度 28 ℃,摇床转速 180 r·min<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

六神曲多由自然发酵制得,由于各地环境、气候、发酵方法的差异,导致六神曲质量稳定性不足,进而直接影响临床用药的安全性和可靠性<sup>[10]</sup>。采用单一菌种进行纯种发酵,既有利于控制发酵产品的质量,又能避免产毒素的菌种掺入发酵体系所造成的污染。利用沙氏培养基分离培养出较纯净的酵母菌,但镜鉴未见到成功染色的毛状霉菌<sup>[11]</sup>。神曲

表2 神曲深层发酵工艺全麦麸正交试验安排

No.	A	B	C	D	淀粉酶活力 /U·g <sup>-1</sup>	蛋白酶活力 /U·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	21.817	143.981
2	1	2	2	2	14.621	81.443
3	1	3	3	3	8.174	231.262
4	2	1	2	3	8.146	395.594
5	2	2	3	1	13.258	134.172
6	2	3	1	2	25.064	40.441
7	3	1	3	2	5.224	32.863
8	3	2	1	3	4.521	69.933
9	3	3	2	1	6.028	43.032
K <sub>1</sub>	161.662	190.066	86.393	101.034		
K <sub>2</sub>	183.395	90.659	172.609	51.683		
K <sub>3</sub>	50.15	114.447	136.170	242.455		
R	133.245	99.407	86.216	190.772		

表3 神曲深层发酵工艺面粉-麦麸(1:6)正交试验安排

No.	A	B	C	D	淀粉酶活力 /U·g <sup>-1</sup>	蛋白酶活力 /U·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	25.428	127.68
2	1	2	2	2	15.893	43.46
3	1	3	3	3	10.900	332.58
4	2	1	2	3	8.146	436.12
5	2	2	3	1	12.373	148.40
6	2	3	1	2	20.678	25.23
7	3	1	3	2	6.028	41.68
8	3	2	1	3	6.922	32.12
9	3	3	2	1	4.822	69.29
K <sub>1</sub>	158.121	201.829	62.384	111.424		
K <sub>2</sub>	202.874	74.987	183.636	36.793		
K <sub>3</sub>	49.083	133.262	164.057	257.861		
R	153.791	126.842	121.252	221.068		

表4 全麦麸蛋白酶活力方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	92 035.420	2	158.375	<0.05
B	48 487.593	2	83.455	<0.05
C	33 715.827	2	58.018	<0.05
D	176 488.845	2	303.703	<0.05
误差	5 230.111	18		

注:  $F_{0.05}(2,18) = 3.55$  (表5同)。

表5 面粉-麦麸(1:6)蛋白酶活力方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	112 631.097	2	30.883	<0.05
B	72 559.090	2	19.895	<0.05
C	76 268.358	2	20.912	<0.05
D	226 025.365	2	61.975	<0.05
误差	32 823.420	18		

中含有大量酵母菌,有的含有少量乳酸菌<sup>[12]</sup>。本实验分离的赛氏曲霉菌落质地绿色绒毛状,表面有黄色渗出物,发酵过程伴有轻微酸性气味,产蛋白酶活性明显高于淀粉酶活性,可作为首选菌种进行后续试验。液态发酵可克服固态发酵生产效率低、过程可控性差的缺点,是现代发酵工业的主要发酵方式。

## [参考文献]

- [1] 杜晨晖,王兴宏. 发酵法炮制何首乌的初步研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(3):540.
- [2] 张荣藻,芦艳卿,尹中兴. 含神曲中成药染菌限度的研究[J]. 中国中药杂志,1998,23(8):474.
- [3] 黄国能. 神曲等药曲中消化酶的检测与质量标准的探讨[J]. 中成药,1981,3(5):18.
- [4] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:353.
- [5] 叶定江. 中药炮制学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:261.
- [6] 高慧,贾天柱. 单一菌种发酵神曲的质量比较研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(20):2323.
- [7] 刘鸿,方尚玲,陈茂彬,等. 大曲中放线菌和青霉产酶初探[J]. 酿酒,2010,37(2):38.
- [8] 周淑贤,张甲生. 神曲的营养成分[C]. 长春:吉林省第七届科学技术学术年会,2012.
- [9] 孔杰娜,谢茵,张凯,等. 正交试验优化六神曲中淀粉酶和蛋白酶的提取工艺[J]. 山西医科大学学报,2012,43(5):349.
- [10] 李羿,刘忠荣,吴洽庆,等. 发酵中药一拓展中药新药研究开发的新空间[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(2):179.
- [11] 蔡清宇,郑虎占,王敏. 4种发酵法炮制中药材的微生物初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):119.
- [12] 胡静,杨旭东,夏清平,等. 中药“神曲”中微生物的研究[J]. 牡丹江医学院学报,2004,25(2):19.

[责任编辑 仝燕]