

## 六神曲的发酵菌种分离及纯种发酵考察

邬吉野, 李莹, 王德馨, 史新元\*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** **目的:** 筛选优势菌种, 探索纯种发酵对六神曲发酵炮制品质量的影响。**方法:** 采用微生物菌种分离方法, 从实验室自制和同仁堂购买的六神曲中筛选菌种, 采用部分霉菌进行六神曲纯种发酵后淀粉酶及蛋白酶活力测定。淀粉酶活力测定依据碘-淀粉比色法, 蛋白酶活力测定采用 Folin 试剂法。**结果:** 筛选出 12 株霉菌, 黄曲霉能显著提高六神曲淀粉酶和蛋白酶的活力, 自制六神曲中分离的杂色曲霉产蛋白酶活力最高, 其次为同仁堂分离的肉色曲霉和伞枝犁头霉, 其余各组产蛋白酶活力明显低于传统自然发酵组。**结论:** 六神曲原材料中不含淀粉酶、蛋白酶, 纯种发酵能稳定提高六神曲发酵炮制品的质量。

**[关键词]** 六神曲; 纯种发酵; 酶活力

**[中图分类号]** R283.6, R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0012-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013160012

## Investigation Pure Fermentation and Strains Separation of Liushenqu

WU Ji-ye, LI Ying, WANG De-xin, SHI Xin-yuan\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To screen dominant bacteria and explore effects of pure fermentation on quality of processed products of Liushenqu. **Method:** Microbial strains separation method was adopted, bacteria in Liushenqu from Tongrentang and laboratory-made, amylase and protease activity was determined after Liushenqu pure fermented by some mildew, amylase activity was determined based on iodine-starch colorimetric method, protease activity was measured with Folin reagent. **Result:** Twelve mildews was screened, aflatoxin could improve vitality of amylase and protease in Liushenqu, protease activity was the highest which produced by aspergillus versicolor isolating from homemade Liushenqu, followed aspergillus carneus and absidia corymbifera isolating from Tongrentang, produced protease activity of the rest groups was significantly lower than traditional natural fermentation groups. **Conclusion:** There was no amylase and protease in raw materials of Liushenqu, pure fermentation could stabilize improve quality of processed products of Liushenqu.

**[Key words]** Liushenqu; pure fermentation; enzyme activity

发酵炮制是指经净制或处理后的药物在一定温度和湿度条件下, 由于霉菌和酶的催化分解作用, 使药物发泡、生衣的方法<sup>[1]</sup>。该方法比一般的物理或化学炮制手段更安全, 具有提高疗效<sup>[2-3]</sup>、降低毒副

作用<sup>[4-5]</sup>、扩大适应症<sup>[6]</sup>、提高提取效率<sup>[7]</sup>等特点。

六神曲处方来源于张仲景的《金匱要略》, 由苦杏仁、赤小豆、鲜青蒿、鲜苍耳草、鲜辣蓼、面粉(或麦麸)混合后发酵制成, 性甘、辛、温, 归脾、胃经, 具有消食化积、健脾和胃的功能, 主要用于饮食停滞、消化不良、脘腹胀满、食欲不振、呕吐泻痢等症。现代研究多以蛋白酶和淀粉酶的指标来衡量六神曲的内在质量<sup>[8]</sup>。六神曲的传统工艺采用自然发酵, 环境中微生物均参与发酵, 且发酵过程不进行严格的无菌控制, 造成不同产地或相同产地不同批次的产品差异较大<sup>[9]</sup>、质量稳定性较差等问题。本实验拟对六神曲传统固态发酵体系中微生物进行分离纯

**[收稿日期]** 20130326(008)

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

**[第一作者]** 邬吉野, 硕士, 从事发酵工程研究, Tel: 13810923225, E-mail: luoni1976@gmail.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

化,以淀粉酶及蛋白酶活力为评价指标,采用所分离的菌种对六神曲进行固态纯种发酵,为六神曲发酵炮制工艺的改进提供参考。

## 1 材料

LHS-80HC-II型恒温恒湿培养箱(上海一恒科技有限公司),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),Neofuge 23R型台式高速冷冻离心机(力康发展有限公司),UV-2100型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司)。

面粉(北京市古船食品有限公司),牛肉膏蛋白胨培养基、PDA培养基、查氏固体培养基、麦芽汁琼脂培养基(国药集团化学试剂有限公司),六神曲(自制或购自北京同仁堂)。赤小豆,苦杏仁,青蒿,苍耳草,辣蓼均购自河北省安国市,经北京中医药大学刘春生教授分别鉴定为豆科植物赤小豆 *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,菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的地上部分,蓼科植物 *Polygonum flaccidum* Meissn 的全草。

## 2 方法与结果

### 2.1 六神曲发酵

**2.1.1 传统自然发酵法** 称取面粉 40 g,麦麸(粉碎过 40 目筛)20 g,赤小豆、苦杏仁各 2.4 g,青蒿、辣蓼草、苍耳草(粉碎过 60 目筛)各 1.4 g,混匀,陆续加水 26 mL(加水量约 38%),揉搓成粗粒(以手握成团,掷之即散为准),压实成宽约 10 cm,厚 1.5 cm 的方形曲料,用湿纱布包裹,置恒温恒湿培养箱中,于 33 ℃ 培养 7 d(RH 80%)。

**2.1.2 纯种发酵曲料制备法** 原料同 2.1.1 项,混匀,陆续加水 26 mL,揉搓成粗粒,分装于 500 mL 锥形瓶中,加塞,用牛皮纸封口,置高压蒸汽灭菌锅中于 121 ℃ 灭菌 25 min,放冷后备用。

### 2.2 菌种分离培养基的配制

**2.2.1 马铃薯培养基 PDA(适合培养霉菌)** 称取马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g。将马铃薯去皮,切成块煮沸 0.5 h,用纱布过滤,加入葡萄糖及琼脂,加热溶化后补足水至 1 L,pH 自然。

**2.2.2 高氏 1 号培养基(适合培养放线菌)** 称取可溶性淀粉 20 g,  $\text{KNO}_3$  1 g,  $\text{NaCl}$  0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g,琼脂 20 g,水 1 L,加热溶解,调 pH 7.2~7.4。

**2.2.3 牛肉膏蛋白胨培养基(适合培养细菌)** 称取牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,  $\text{NaCl}$  5 g,琼脂 15~20 g,水 1 L,加热溶解,调 pH 7.0~7.2。

**2.2.4 麦芽汁琼脂培养基(适合酵母菌)** 称取麦芽汁琼脂粉 40 g,用水 1 L 加热溶解,pH 自然。

以上培养基均经 121 ℃ 灭菌 25 min,于无菌条件下将上述已灭菌的各培养基分别倒入已灭菌的培养皿中,每皿约 15~20 mL,冷凝后即制成平板。将制好的平板放入 37 ℃ 培养箱中培养 24 h,检查无菌落后使用。

### 2.3 微生物的分离纯化

**2.3.1 菌悬液的制备** 取停止发酵 24 h 内的新鲜神曲,粉碎,过 60 目筛,取粉末 1 g,于无菌环境中加至装有无菌水 99 mL,含玻璃小珠的 250 mL 锥形瓶中,振摇约 20 min,使菌分散。用 1 mL 无菌吸管从中吸取 1 mL 菌悬液,加至盛有无菌水 9 mL 的试管中,吹吸 3 次,使充分混匀。依此法制成  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  等稀释度的菌悬液。

**2.3.2 分离菌的培养** 用无菌吸管分别吸取  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  菌悬液 0.1 mL,滴入制好的平板中(每种培养基、每种稀释度重复 3 个平皿),用无菌金属涂布棒在培养基表面轻轻涂布均匀。将麦芽汁琼脂培养基、高氏 1 号培养基、PDA 平板倒置于 28 ℃ 恒温培养箱中,前者培养 3 d,后两者培养 5 d;牛肉膏蛋白胨培养基平板倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 3 d。

**2.3.3 菌落的选择** 分别挑取培养后长出的单个菌落,接种到各自适宜的培养基平板上,置 28 或 37 ℃ 培养箱中继续培养一代,待菌落长出后,用显微镜涂片染色法检查是否是单一微生物,若不纯,再依法反复稀释,直至获得纯培养物,纯培养物置 4 ℃ 冰箱冷藏备用。

### 2.4 纯种发酵

**2.4.1 孢子悬浮液的制备** 将待发酵的菌种分别接种于 PDA 斜面培养基,于 28 ℃ 培养 3~5 d 后,在无菌条件下用 10 mL 无菌水将斜面上孢子冲洗下来,并稀释至  $2 \times 10^5$  spores  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 备用。

**2.4.2 纯种发酵** 在无菌条件下,将上述孢子悬浮液以每瓶 6 mL 的接种量均匀地接种到已经灭菌的曲料中,作为试验组;将锥形瓶中曲料灭菌后加入无菌水 6 mL,作为空白组;将锥形瓶中曲料不经高压灭菌,于无菌条件下加入无菌水 6 mL,作为锥形瓶自然发酵组。加棉塞,置 30 ℃ 的恒温恒湿箱中发酵培养 3 d(RH 60%)。发酵结束后,将曲料取出并于

40 ℃ 低温烘干。

**2.5 酶活力测定** 将六神曲炮制品粉碎,过筛,称取 10 g,加水 100 mL 于 40 ℃ 恒温水浴锅中保温 1 h 并间断搅拌,取出,离心,取上清液,即得酶液。淀粉酶活力测定依据碘-淀粉比色法,蛋白酶活力测定采用 Folin 试剂法<sup>[10]</sup>。筛选出的菌种均由北京基诺莱普生物技术有限公司鉴定,结果从自制六神曲中分离出 8 种霉菌,已鉴定的有黄曲霉、杂色曲霉、伞枝犁头霉;细菌 6 种,包括蜡质芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌等;放线菌 1 种。同仁堂分离出 4 种霉菌,已鉴定的有伞枝犁头霉、杂色曲霉、肉色曲霉;细菌 4 种,包括芽孢杆菌、大肠杆菌等。表明自制六神曲与同仁堂购买的六神曲中所含菌种不尽相同,验证了传统固态发酵的随机性。采用分离得到的 12 株霉菌中 9 株,进行六神曲的纯种固态发酵,结果见表 1。

表 1 部分霉菌的六神曲纯种发酵产酶的酶活力测定( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

样品	酶活力/ $U \cdot g^{-1}$	
	淀粉酶	蛋白酶
空白	0	0
锥形瓶自然发酵	trace	31.35 ± 18.94
传统自然发酵	3.96 ± 0.07	229.11 ± 10.52
黄曲霉	11.92 ± 1.45 <sup>2)</sup>	504.74 ± 42.31 <sup>2)</sup>
伞枝犁头霉	1.40 ± 0.03 <sup>2)</sup>	235.30 ± 34.88 <sup>1)</sup>
杂色曲霉	trace	952.20 ± 6.53 <sup>2)</sup>
肉色曲霉	0	424.58 ± 72.62 <sup>2)</sup>
自制未知霉菌 1	0	39.38 ± 2.62 <sup>2)</sup>
自制未知霉菌 2	0	trace
自制未知霉菌 3	0	51.49 ± 31.24 <sup>2)</sup>
自制未知霉菌 4	0	91.89 ± 11.34 <sup>2)</sup>
TRT 未知霉菌	0	34.32 ± 6.57 <sup>2)</sup>

注:与传统自然发酵比较,采用 SPSS 16.0 统计方法,<sup>1)</sup>  $P > 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,TRT 为同仁堂简称。

由表 1 可知,空白组酶活力均为 0,说明六神曲原材料中不含淀粉酶、蛋白酶。锥形瓶自然发酵组产物中含有极微量淀粉酶、蛋白酶,酶活力较传统自然发酵组约小 7 倍,这可能是因为锥形瓶内通气量明显小于传统自然发酵,造成瓶内曲料中好氧微生物呼吸减弱,限制了微生物与曲料的物质交换,在一定程度上摇瓶内中药固态发酵制约了六神曲产酶能力。黄曲霉组六神曲纯种发酵的产淀粉酶活力极高,约为传统自然发酵组的 3 倍;其余各组产淀粉酶活力均明显低于对照组,甚至不产生淀粉酶。黄曲霉产蛋白酶活力是传统自然发酵组的 2 倍多,吴洁等<sup>[11]</sup>研究表明黄曲霉固态发酵麻疯树饼粕产蛋白

酶活力高。但自制六神曲中分离的杂色曲霉产蛋白酶活力最高,其次为同仁堂分离的肉色曲霉和伞枝犁头霉,其余各组产蛋白酶活力明显低于传统自然发酵组。

### 3 讨论

从自制和同仁堂购买的六神曲中筛选出 12 种菌种,通过考察不同菌种对淀粉酶及蛋白酶活力的影响发现,六神曲中分离的部分菌种对提高淀粉酶和蛋白酶活力具有显著影响,且纯种发酵能稳定提高六神曲发酵炮制品的质量。所分离的黄曲霉和杂色曲霉可能会产生黄曲霉素和杂色曲霉素,还有待于细化菌种分离工作,以寻找其他高产菌株,通过与其他菌种的协同发酵,可能会达到减毒作用。

### [参考文献]

[1] 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.

[2] 王身艳,陈建伟,张蔚学,等. 双向发酵对白芍 HPLC 指纹图谱及芍药苷含量的影响[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(2):6.

[3] 何晨,金钊,冯志华,等. 芽孢杆菌发酵炮制中药红花增强溶血栓药效研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5):340.

[4] 刘亮镜,曹亮,蒋亚平,等. 马钱子经朱红栓菌发酵前后毒性及镇痛、抗炎作用的实验研究[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(3):205.

[5] 戴万生,赵荣华. 发酵法对大黄蒽醌类成分含量的影响[J]. 云南中医药杂志, 2005, 26(1):38.

[6] 张普照,杨丽娟,侯志帆. 雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):59.

[7] 彭国平,张兰萍,王智,等. 应用微生物发酵与超声波联合处理高效提取钩藤碱[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(3):497.

[8] 张荣藻,芦艳卿,尹中兴,等. 含神曲中成药染菌限度的研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(8):474.

[9] 黄国能. 神曲等药曲中消化酶的检测与质量标准的探讨[J]. 中成药研究, 1981, 4(5):18.

[10] 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.

[11] 吴洁,吴远根,张远,等. 黄曲霉固态发酵麻疯树饼粕产蛋白酶及其酶学性质研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4):1681.

[责任编辑 仝燕]