

· 中药研究 ·

固载乳酸菌发酵中药槐角研究

金爽, 白雪, 许雯惠, 陈威沛, 吕晨, 程玉鹏, 崔喆, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究省部共建重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:目的:采用响应面法优化固载乳酸菌发酵中药槐角发酵体系的最佳条件,为槐角药用资源的进一步开发利用提供参考。方法:以发酵体系中染料木素含量为指标,通过中心组合试验原理设计单因素实验,并结合响应面法考察乳酸菌发酵后 pH 值、温度和液料比对发酵体系中总黄酮和染料木素含量的影响。结果:最佳发酵条件为 pH 5.0, 时间 36 h, 液料比 25:1 (mL/g), 优化后槐角发酵体系中总黄酮的含量达到 (122.00 ± 0.56) mg/g, 染料木素含量 (18.93 ± 0.47) mg/g, 为原药材的 2.90 倍。结论:采用单因素优化结合响应面分析对固载乳酸菌发酵中药槐角体系条件进行优化,发酵后染料木素和总黄酮的含量极大提高,优化后的新工艺可在实际应用中推广,为中药槐角的开发利用奠定了基础,提供了新途径。

关键词:固载;乳酸菌;槐角;总黄酮

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2392(2022)01-0047-05

DOI:10.19664/j.cnki.1002-2392.220011

槐角(Fructus Sophorae)为豆科植物槐的果实,作为一味常用的中药,可止血凉血、清热泻火,性苦、寒,归肝、大肠经。槐角中富含黄酮类和异黄酮类化合物,如染料木素、染料木苷、槐角苷、槐角双苷等^[1-3]。其中,染料木素等异黄酮类化合物是槐角中最主要的成分和标志性活性物质^[4-6]。众所周知,染料木素具有雌性激素及抗雌性激素性质,可以抑制拓扑异构酶 II 的活性和酪氨酸蛋白激酶 PTK 的活性,因其抑菌、降血脂、抗氧化等作用已成为国际上的研究和开发热点。微生物转化具有较高的立体选择性、基团选择性和区域选择性。与化学反应相比,具有反应条件温和、后处理简单、污染小、成本低等优点。近年来,随着生物技术的飞速发展,微生物转化发酵炮制的基础研究和应用研究得以大力发展,但传统的微生物转化炮制主要以真菌为主,其效果虽好,安全性有待考量。益生菌作

为研究热点一直备受关注,应用益生菌对中药材进行发酵炮制也逐步成为研究的热点^[7-9]。乳酸菌作为代表性的益生菌以其无毒并具有独特的生理功效受到了国内外研究人员的广泛关注,通过乳酸菌发酵中药拥有广阔的发展前景^[10]。

本文对槐角提取物中染料木素的含量进行了测定,以乳酸菌发酵炮制槐角后染料木素的含量为衡量指标,通过对 pH、温度和料液比等影响因素进行了单因素考察试验,并结合中心组合设计试验和固载微生物技术,采用固载乳酸菌发酵处理中药槐角,对槐角的最佳发酵条件进行初步研究,优化出最佳的发酵条件,并对槐角乳酸菌转化发酵生产染料木素过程进行研究,同时考察发酵过程中总黄酮的含量变化,为乳酸菌发酵炮制中草药领域的进一步深入研究探索及相关开发提供了理论依据。

1 材料

槐角购自黑龙江省哈尔滨市药材市场,经黑龙江中医药大学药学院苏连杰教授鉴定为药典收载品种;乳酸乳球菌购自黑龙江省微生物研究所;HZQ-C 空气浴振荡器,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;BPH-9162 精密恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;其他试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 固载乳酸乳球菌菌液的制备

向培养好的乳酸乳球菌培养皿中加入 20 mL 灭菌后的蒸馏水,将菌种用接种环轻轻刮下,混合均匀备用。

收稿日期:2021-04-21 修回日期:2021-06-06

基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(H2018053);中国博士后基金特别资助项目(2018T110321);中国博士后基金面上资助项目(2016M591567);黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-Z15206);黑龙江中医药大学优秀青年教师支持计划项目(2018RCQ10);黑龙江中医药大学大学生科技创新项目(2021-2);黑龙江中医药大学大学生创新创业训练计划项目(X202110228002)

作者简介:金爽(1984-),女,博士,副教授,研究方向:中药生物技术制药。

*** 通讯作者:**匡海学(1955-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药性味理论及中药药效物质基础研究。

2.2 固载乳酸乳球菌菌球制备

室温下,取 3 mL 均匀乳酸乳球菌菌液加入到 6 mL 浓度为 5% 的海藻酸钠溶液中,用注射器量取混合液滴入到 3% 氯化钙溶液中,迅速搅拌,制成直径约为 5 mm 的菌球,形成形状完好的菌球后静置 2 h,用无菌水冲洗 3 次得到固载菌球。

2.3 发酵基质的制备

将槐角研粉碎后过 80 目筛,称取 1 g 槐角粉末投到含有 50 mL 无糖马铃薯液体培养基中,121 °C 条件下高压灭菌 30 min,制备得到发酵基质,备用。

2.4 固载乳酸菌发酵过程

将制备得到的固载乳酸乳球菌球投入到发酵基质后,在 37 °C 恒温条件下进行摇床培养。

2.5 发酵中药槐角后染料木素的提取

将培养后的槐角和固载乳酸乳球菌用滤纸过滤,使发酵液与槐角和固载乳酸乳球菌分离。将发酵液旋转蒸干,加入适量 80% 乙醇,超声后得到溶解液。然后,再向过滤分离得到的槐角和固载球菌中加入适量 80% 乙醇溶液,超声提取 30 min,滤纸过滤,重复提取 2 次,合并提取液,且将上述溶解液和提取液合并,旋转蒸干,加入 80% 乙醇定容至 50 mL,于 12 000 r/min 离心以备用。

2.5.1 标准曲线的制备

精密称取芦丁对照品,加入乙醇,置于水浴溶解,加蒸馏水稀释至刻度,摇匀,即得芦丁标准品溶液(芦丁含量为 0.2 mg/mL)。吸取 0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 芦丁标准溶液,分别置于 10 mL 容量瓶内,加入

30% 乙醇至 2 mL,再加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.5 mL 放置 8 min,加入 10 % 硝酸铝溶液 0.5 mL 放置 8 min,分别加入 4 % 氢氧化钠溶液 4.0 mL,定容后摇匀,放置 15 min。以 0 mL 的容量瓶内试剂为空白,在 510 nm 波长处测定吸光度。以芦丁浓度作为横坐标,吸光度为纵坐标制作标准曲线,求得回归方程。

2.5.2 样品溶液的制备

取实验样品,挥干溶剂,量取 3 mL 无水乙醇于 10 mL 容量瓶,加蒸馏水定容后,用等体积石油醚依次萃取,脱脂、脱色素,取水层用于总黄酮的含量测定。

2.6 发酵中药槐角后染料木素的检测

测定在不同 pH 值(4.0、5.0、5.5、6.0、7.0)、不同时间(12、24、36、48、60 h)、以及不同液料比(15:1、20:1、25:1、30:1、35:1 mL/g)下中药槐角炮制后发酵体系中染料木素的含量,确定槐角的最佳发酵条件。

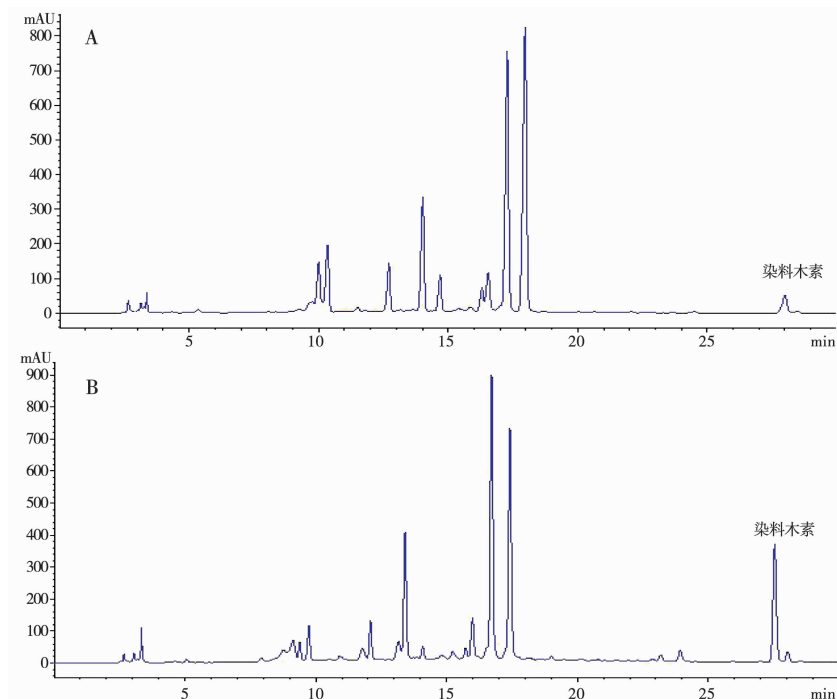
2.7 中心组合设计法优化发酵体系条件

根据 2.6 发酵中药槐角后染料木素的检测中单因素优化的试验结果,选择对该体系中有显著作用的 3 个因素,采用中心组合法进行 3 因素 3 水平试验,并结合响应面法对试验进行进一步优化,研究这 3 个因素不同水平下的组合对炮制槐角发酵体系中染料木素含量的影响。

3 结果

3.1 固载乳酸菌发酵炮制槐角色谱相图

槐角原药材中染料木素含量为 (6.53 ± 0.06) mg/g,经过发酵优化为 (18.93 ± 0.47) mg/g,可达原药材的 2.90 倍,见图 1。



注:A. 中药槐角原药材;B. 中药槐角经固载乳酸菌炮制后

图1 中药槐角原药材及经固载乳酸菌炮制后的高效液相色谱图

3.2 固载乳酸菌发酵总黄酮的变化分析

据分析,得到标准曲线为 $y = 1.221\ 4x - 0.019\ 2$ ($R = 0.998$),总黄酮含量原药材为 (74.00 ± 0.42) mg/g,

表 1 乳酸菌发酵槐角前后总黄酮含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

发酵时间 (h)	12	24	36	48	60	72
发酵后含量 (mg/g)	94.00 $\pm$ 0.13	105.00 $\pm$ 0.32	122.00 $\pm$ 0.56	102.00 $\pm$ 0.71	84.00 $\pm$ 0.52	77.00 $\pm$ 0.62

3.3 固载乳酸菌发酵体系单因素优化

本实验对固载乳酸菌槐角发酵体系的条件进行了单因素优化,考察了 pH 值、时间、液料比 3 个因素,实验结果见表 2~4。

表 2 不同 pH 发酵槐角前后染料木素含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

pH	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0
发酵后含量 (mg/g)	4.73 $\pm$ 0.23	6.24 $\pm$ 0.48	5.94 $\pm$ 0.25	5.74 $\pm$ 0.16	5.52 $\pm$ 0.26

由表 2 可得,pH 值对发酵过程有较大的影响,当

表 3 不同发酵时间发酵槐角前后染料木素含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

发酵时间 (h)	12	24	36	48	60	72
发酵后含量 (mg/g)	6.45 $\pm$ 0.56	8.84 $\pm$ 0.22	11.73 $\pm$ 0.47	10.32 $\pm$ 0.35	7.28 $\pm$ 0.24	6.83 $\pm$ 0.12

将该体系放置在 pH 值为 5.0 的培养基中培养,测定不同的发酵时间染料木素的含量。由表 3 可知,当发酵基质的发酵时间为 36 h 时,槐角体系中的染料木素含量达到最大值 11.73 mg/g。时间在 12.0 ~ 36.0 h 范围内,槐角体系中染料木素的含量逐渐增加,而在 48 ~ 72 h 时,染料木素的含量逐渐降低。这是因为在发酵过程中存在最适发酵时间,发酵时间过短发酵不完全,过长则损失更多的营养,导致降剩下的量显著降低,从而影响染料木素的含量。

表 4 不同液料比发酵槐角前后染料木素含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

液料比 (mL/g)	15	20	25	30	35
发酵后含量 (mg/g)	11.82 $\pm$ 0.28	15.36 $\pm$ 0.16	18.93 $\pm$ 0.44	16.12 $\pm$ 0.29	13.22 $\pm$ 0.17

将纳豆菌发酵槐角体系放到按照不同的液料比配制好的培养基中进行培养,由表 4 可知,液料比对发酵过程影响颇大,当发酵基质的液料比为 25 mL/g 时,槐角体系中的染料木素含量达到最大值为 18.93 mg/g。液料比在 15.0:1 ~ 5.0:1 mL/g 范围内,染料木素的含量逐渐增加,而在 25:1 ~ 35:1 mL/g 时,染料木素的含量逐步下降。分析出现上述的原因是合适的培养基给细胞提供了充足的氧气,而培养基的配比过量会影响酶的活性,使其活性降低。

3.4 中心组合设计法优化固载乳酸菌发酵槐角条件

按照单因素试验结果,选择 pH (A)、液料比 (B)

发酵 36 h 时总黄酮含量可达 (122.00 ± 0.56) mg/g,见表 1。

发酵基质的 pH 值为 5.0 时,槐角体系中的染料木素含量达到最大值 6.24 mg/g。pH 在 4.0 ~ 5.0 时,槐角体系中染料木素的含量逐渐增加,而 pH 在 5.5 ~ 7.0 时,染料木素的含量开始下降。pH 作为微生物在一定环境条件下代谢活动的综合指标,对菌体的生长和产品的积累有很大的影响,上述发生的变化取决于菌种的特性和产物的化学性质,而 pH 值的变化会影响酶活力的改变,以致影响产物的合成,但 pH 值过高会使酶失活而无法发挥其活性,从而导致生成产物的含量降低。

和发酵时间 (C) 作为中心组合设计的三个优化因素,具体见表 5、表 6 和表 7。

表 5 中心组合试验因素与水平表

因素		水平		
		-1	0	1
pH	A	4	5	6
液料比 (mL/g)	B	20	25	30
时间 (h)	C	24	36	48

表 6 中心组合试验设计方案与结果

标准序号	A	B	C	实际值 (mg/g)	预测值 (mg/g)
	pH	液料比 (mL: g)	时间 (h)		
1	4.00	20	24	14.18	14.40
2	6.00	20	24	14.39	14.44
3	4.00	30	24	15.68	15.35
4	6.00	30	24	15.16	15.27
5	4.00	20	48	16.01	15.98
6	6.00	20	48	15.56	15.97
7	4.00	30	48	17.86	17.89
8	6.00	30	48	17.90	17.76
9	3.32	25	36	16.63	16.73
10	6.68	25	36	16.88	16.66
11	5.00	16	36	14.05	13.70
12	5.00	33	36	15.77	16.00
13	5.00	25	18	14.88	14.89
14	5.00	25	50	18.45	18.32
15	5.00	25	36	18.93	18.82

表 7 二次中心组合设计方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	59.88	9	6.65	89.74	<0.000 1	显著
A	6.57E-003	1	6.570E-003	0.089	0.772 0	
B	6.41	1	6.41	86.39	<0.000 1	
C	14.20	1	14.20	191.49	<0.000 1	
AB	7.200E-003	1	7.200E-003	0.097	0.761 7	
AC	1.250E-003	1	1.250E-003	0.017	0.899 3	
BC	0.46	1	0.46	6.33	0.031 8	
A ²	8.10	1	8.10	109.22	<0.000 1	
B ²	28.32	1	28.32	382.02	<0.000 1	
C ²	8.80	1	8.80	118.69	<0.000 1	
残差	0.74	10	0.074			
失拟项	0.62	5	0.12	4.97	0.051 5	不显著
纯误差	0.12	5	0.025			
总和	60.62	19				

注: $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

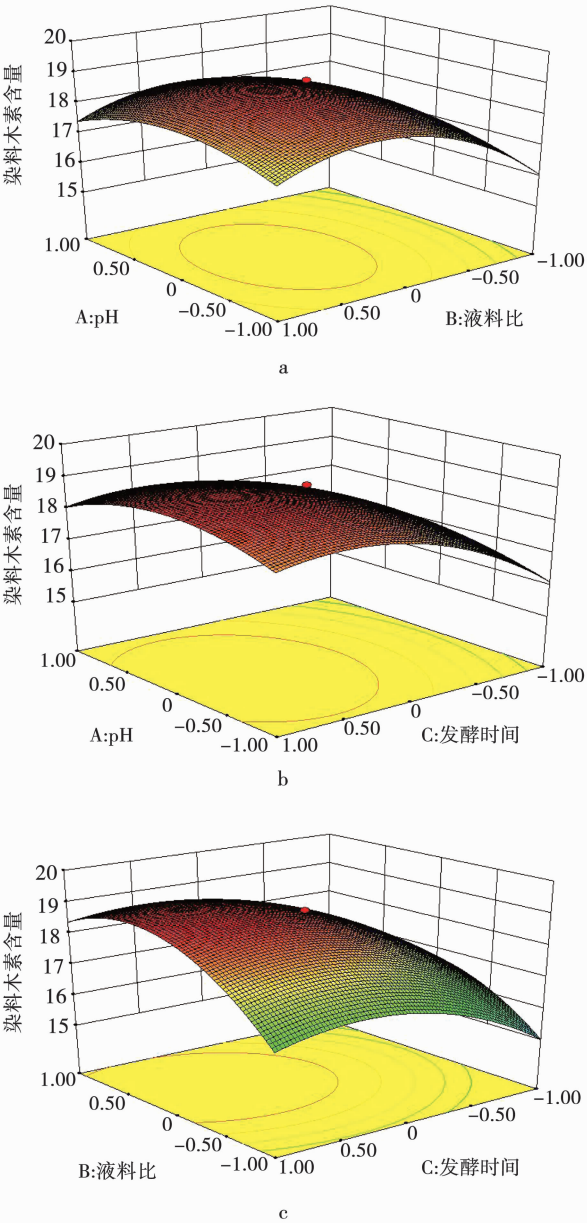
选择中心组合法对固载乳酸菌发酵槐角的条件进行响应面试验,继而应用相关的软件对结果进行回归分析和方差分析(表 5、6),用槐角体系中染料木素的含量作响应值(Y),自变量为 pH 值、发酵时间、液料比的二次多元回归方程: $Y = 18.82 - 0.022A + 0.68B + 1.02C - 0.030A \times B - 0.012A \times C + 0.24B \times C - 0.75A^2 - 1.40B^2 - 0.78C^2$

据表 7 可得, $P < 0.000 1$, 说明差异极显著;而模型失拟项是表示模型中的理论值与实际值不相拟合的概率,本部分中的失拟 $P = 0.0515 > 0.05$, 说明模型的失拟度不显著。

如图 2(a~c), 随意两个交互因素的响应面都有最高值。据分析, 发酵时间和料液比对发酵槐角的影响较大, 而 pH 值的影响相对较小。通过软件分析, 最佳发酵工艺为: 发酵时间为 36 h、pH 5.0、料液比为 25:1 (mL/g), 在此条件下发酵槐角得到的染料木素含量为 (18.93 ± 0.47) mg/g, 是原药材的 2.90 倍, 而最优条件下的总黄酮含量为 (122.00 ± 0.56) mg/g。

4 讨论

本实验以槐角中总黄酮含量和染料木素含量为指标, 对固载乳酸菌炮制槐角发酵体系进行了研究, 在单因素实验的基础上结合响应面法, 对固载乳酸菌发酵槐角的条件进一步优化, 得到槐角最佳的发酵条件为 pH 5.0, 液料比 25:1 (mL/g), 发酵时间 36 h, 发酵后得到最优染料木素含量为 (18.93 ± 0.47) mg/g, 是原药材的 2.90 倍, 而最优条件下总黄酮为 (122.00 ± 0.56) mg/g, 远高于未处理时槐角原药材的含量。



注: a. pH 和液料比响应面图; b. pH 和发酵时间响应面图; c. 液料比和发酵时间响应面图

图 2 固定化乳酸菌发酵槐角的响应面图

该实验将益生菌微生物转化与固载技术结合发酵炮制中药槐角, 消除了传统炮制方法的弊端, 研究结果为槐角的进一步的开发利用提供了理论基础, 为创新技术的发展提供了依据。

参考文献:

[1] QI Y Y, SUN A L, LIU R M, et al. Isolation and purification of flavonoid and isoflavonoid compounds from the pericarp of Sophora japonica L by adsorption chromatography on 12% cross-linked agarose gel media [J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1140 (1/2): 219-224.

[2] CHANG L, REN Y P, CAO L, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of six flavonoids from Fructus Sophorae extract

- in rat plasma by LC – MS/MS [J]. Journal of Chromatography B, 2012, 904: 59 – 64.
- [3] HAN H M, HONG S H, PARK H S, et al. Protective effects of *Fructus sophorae* extract on collagen – induced arthritis in BALB/c mice [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 13 (1): 146 – 154.
- [4] 房敏峰, 曲欢欢, 文颂华, 等. 槐角不同炮制品中槐角苷的含量测定 [J]. 中药材, 2007, 30 (1): 24 – 25.
- [5] 郭建国, 余伟, 葛娟, 等. 酶法转化槐角异黄酮的工艺及转化途径推论 [J]. 华中科技大学学报 (自然科学版), 2010, 38 (8): 125 – 128.
- [6] FENG C, JIN S, XIA X X, et al. Effective bioconversion of sophoricoside to genistein from *Fructus sophorae* using immobilized *Aspergillus niger* and Yeast [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31 (1): 187 – 197.
- [7] 刘波, 张鹏翼, 孟祥璟, 等. 益生菌发酵中药方法概述及其应用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22 (10): 1741 – 1750.
- [8] 陈柯源, 高艳, 郝宝成, 等. 益生菌发酵中药研究进展 [J]. 动物医学进展, 2019, 40 (12): 74 – 78.
- [9] 王静涵, 张斯童, 滕利荣, 等. 益生菌发酵中药的研究现状及产品开发 [J]. 食品工业科技, 2020, 41 (14): 337 – 343, 348.
- [10] 武万强, 孔庆敏, 田培郡, 等. 肠道菌群是调节神经系统功能紊乱的潜在靶点 [J]. 工程, 2020, 6 (4): 415 – 434.

Fermentation of *Fructus Sophorae* by Immobilized Lactic Acid Bacteria

JIN Shuang, BAI Xue, XU Wenhui, CHEN Weipei, LYU Chen, CHENG Yupeng, CUI Zhe, KUANG Haixue
(Provincial Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective: To optimize the fermentation conditions of *Fructus Sophorae* by immobilized lactic acid bacteria (LAB) by using response surface methodology (RSM), thus to provide reference for the further development of medicinal resource of *Fructus Sophorae*. Methods: The content of genistein in the fermentation system was taken as an index, and a single factor experiment was conducted by central composite design, the effects of pH value, time and liquid – solid ratio on the contents of total flavonoids and genistein in the fermentation system were investigated by response surface methodology. Results: The optimum processing conditions were as follows, pH was 5.0, temperature was 36 h, liquid – solid ratio was 25:1 (mL/g), the content of total flavonoids was (122.00 ± 0.56) mg/g, and the optimum content of genistein was (18.93 ± 0.47) mg/g, which was 2.90 times to the untreated sample. Conclusion: The single factor and response surface method were used to optimize the fermentation conditions of *Fructus Sophorae* with immobilized LAB. The contents of genistein and total flavonoids were greatly increased in the optimal fermentation condition. The optimized process can be applied in practice, which lays a foundation and provides a new way for the development and utilization of *Fructus Sophorae*.

Key words: Immobilization; Lactic acid bacteria; *Fructus Sophorae*; Total flavonoids