

## 白芍发酵菌种及发酵工艺的优选

于定荣<sup>1</sup>, 麻印莲<sup>1</sup>, 顾雪竹<sup>1</sup>, 陈畅<sup>1</sup>, 程志铭<sup>1</sup>, 车勇<sup>2\*</sup>

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 山东医药技师学院 制药工程系, 山东 泰安 271000

**摘要:** 目的 优选白芍 *Paeoniae Radix Alba* 发酵菌种及发酵工艺条件。方法 以白芍与硫磺熏蒸白芍用乳酸菌和酵母菌进行发酵, 以活菌数为指标, 综合芍药苷定量测定结果, 优选白芍发酵菌种及发酵工艺条件。结果 白芍以酵母菌发酵效果为佳; 白芍和硫磺熏蒸白芍最佳发酵工艺均以酵母菌加培养基发酵 36 h 为佳。结论 白芍在发酵过程中, 酵母菌发酵效果优于乳酸菌发酵效果, 优选的发酵工艺可行。

**关键词:** 白芍; 芍药苷; 硫磺熏蒸; 发酵; 乳酸菌; 酵母菌

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2924-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.010

## Optimization of fermentation process and bacteria strain for *Paeoniae Radix Alba*

YU Ding-rong<sup>1</sup>, MA Yin-lian<sup>1</sup>, GU Xue-zhu<sup>1</sup>, CHEN Chang<sup>1</sup>, CHENG Zhi-ming<sup>1</sup>, CHE Yong<sup>2</sup>

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Department of Pharmaceutical Engineering, Shandong Medicine Technician College, Tai'an 271000, China

**Abstract: Objective** To optimize the fermentation process and bacteria strain for *Paeoniae Radix Alba* (PRA). **Methods** Both the crude drugs of PRA and PRA processed by sulfur fumigation were fermented with lactobacillus and microzyme. Using viable counts and paeoniflorin content as indexes, the fermentation process and bacteria strain for PRA were optimized. **Results** The microzyme had the best fermentation effect. The optimal fermentation process of PRA and sulfur fumigating PRA was for 36 h adding yeast and culture medium. **Conclusion** PRA can be fermented and the optimal fermentation process was for 36 h by adding microzyme and culture medium.

**Key words:** *Paeoniae Radix Alba*; paeoniflorin; sulfur fumigation; fermentation; lactobacillus; microzyme

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 味苦、甘、涩, 性微寒, 主要含有芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷和苯甲酰羟基芍药苷等单萜苷类和苯甲酸、没食子酸、儿茶素、鞣质等成分; 具有平肝止痛、养血调经、敛阴止汗等功效。其中芍药苷常作为芍药的指标成分, 《中国药典》2010 年版一部将其作为白芍药材质量主要控制指标之一<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 白芍具有镇静、镇痛、抗炎、保肝、免疫调节和抑制血小板凝集等作用<sup>[2-3]</sup>。

发酵是传统炮制方法之一, 应用历史悠久。发酵中药能达到减毒增效、增效、利于成分溶出及产生新的活性成分等新用途<sup>[4]</sup>, 但将白芍进行发酵, 在传统炮制方法中并未有资料记载。目前已经有人

利用双向发酵法, 观察白芍被 13 种药用真菌发酵后芍药苷及芍药内酯苷的量变化<sup>[5]</sup>, 双向发酵后“药性菌质”中芍药苷及芍药内酯苷的量都明显降低了, 但有未知的成分出现, 提示双向发酵在发酵中药白芍中具有一定的研究意义。

本实验以白芍药材提取液对乳酸菌及酵母菌进行抑菌性检测, 并优选其发酵工艺条件, 目前尚未见相关报道; 该实验能为白芍药材发酵提供实验依据。

### 1 材料与方法

岛津高效液相色谱仪, LC—20AT 泵, SPD—M20 检测器, 岛津公司; LDZX—75KB 立式高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; 高速万能粉碎机, 天津泰斯特 FW100, 南京以马内利仪器设备有限公司; BCD—215KALM 冰箱, 海尔集团; DHP—9082 电

收稿日期: 2014-05-12

作者简介: 于定荣(1975—), 男, 苗族, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药制剂与炮制研究。Tel: 13436821953 E-mail: yudingrong0826@sina.com

\*通信作者 车勇(1969—), 男, 博士, 副主任中医师, 研究方向为中药资源开发和质量控制。Tel: 13365388921 E-mail: yoche@aliyun.com

热恒温培养箱, 上海标仪仪器有限公司; THZ—C—1 台式冷冻恒温振荡器, 江苏太仓市实验设备厂。

乳酸菌为植物乳杆菌 LP (批号 BLCC2-0001)、地衣芽孢杆菌 dy7 (批号 BLCC1-0014)、产软假丝酵母 Cr (批号 BLCC4-0021), 均由山东宝来利来生物研究院菌种保藏中心提供。

白芍, 3 年生, 采自于安徽省亳州市谯城区谯东镇余集, 经中国中医科学院中药研究所炮制中心肖永庆研究员鉴定为毛茛科芍药属植物白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. 的根, 并按药农方法经产地加工所制得去皮白芍药材和去皮硫磺熏蒸白芍药材。

芍药苷对照品, 批号 110736-201136; 购于中国食品药品检定研究院, 质量分数为 96.0%; 水为重蒸馏水, 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 发酵菌种的优选

2.1.1 发酵液的制备 分别将硫磺熏蒸去皮白芍药

材和未用硫磺熏蒸去皮白芍药材粉末加到一定量的水中, 得到 8% 样品液, 再按表 1 配制后于 121 °C 灭菌 30 min, 并将此液体作为发酵待测液。

2.1.2 发酵液种子制备 取植物乳杆菌 LP、地衣芽孢杆菌 dy7 斜面培养物, 分别接种于各菌种的液体培养基中, 培养 18~24 h。

2.1.3 菌种发酵终点确定 测定各菌种发酵 8% 白芍添加各菌基础培养基的 24、36、48 h 活菌数, 以活菌数较高点为发酵终点。

2.1.4 各菌种发酵后活菌数及有效成分检测

(1) 乳酸菌发酵活菌数检测<sup>[6]</sup>: 以乳酸菌 2% 接种量添加到表 1 各发酵配方中, 参照“GB/T 13093-2006 饲料中细菌总数的测定”方法, 测定各乳酸菌发酵 24、36、48 h 的活菌数, 结果见表 2。

由表 2 结果可知, 各白芍样品经乳酸菌发酵 24 h 即达到较高活菌数。无硫白芍样品组和硫熏白芍样品 + 培养基组在 24~36 h 乳酸菌活菌数有明

表 1 白芍发酵配方表

Table 1 Prescription of PRA fermentation

发酵菌种	各菌种不同发酵配方				
	1	2	3	4	5
植物乳杆菌 LP	乳酸菌培养基 (MRS)	8% 白芍 (无硫)	8% 白芍 (硫熏)	8% 白芍 (无硫) + MRS	8% 白芍 (硫熏) + MRS
产软假丝酵母 Cr	酵母菌培养基 (YPD)	8% 白芍 (无硫)	8% 白芍 (硫熏)	8% 白芍 (无硫) + YPD	8% 白芍 (硫熏) + YPD

表 2 乳酸菌发酵 8% 白芍不同时间活菌数结果

Table 2 Viable bacteria counts of 8% PRA samples fermented by lactobacillus during different time

发酵配方	乳酸菌活菌数 / (CFU·mL <sup>-1</sup> )		
	24 h	36 h	48 h
1	1.5 × 10 <sup>9</sup>	1.2 × 10 <sup>9</sup>	2.5 × 10 <sup>8</sup>
2	4.0 × 10 <sup>8</sup>	6.7 × 10 <sup>8</sup>	3.7 × 10 <sup>8</sup>
3	3.8 × 10 <sup>8</sup>	4.5 × 10 <sup>8</sup>	3.6 × 10 <sup>8</sup>
4	2.2 × 10 <sup>9</sup>	1.8 × 10 <sup>9</sup>	4.1 × 10 <sup>8</sup>
5	2.0 × 10 <sup>9</sup>	1.6 × 10 <sup>9</sup>	3.8 × 10 <sup>8</sup>

显增加; 但在 48 h 反而有所下降; 且白芍 (无硫或硫熏) + 培养基组较白芍 (无硫或硫熏) 组活菌数高, 说明在 24~48 h 进行发酵, 加入培养基更有利于乳酸菌的生长, 发酵 48 h 后各组活菌数差异不显著。

(2) 酵母菌发酵白芍活菌数测定<sup>[6]</sup>: 按上述方法, 测定各酵母菌发酵 24、36、48 h 的活菌数, 结果见表 3。由表 3 可知, 发酵时间在 24~36 h, 与酵母菌基础培养基组活菌数相比, 各白芍组酵母菌

活菌数均高于酵母基础培养基组, 说明白芍对酵母菌的发酵有促进作用; 加入培养基各组活菌数均高于相应不加培养基活菌数; 且各组活菌数有随时间变化呈上升的趋势; 但发酵 48 h 后, 活菌数变化不明显, 反而呈下降趋势。

### 2.2 芍药苷的测定<sup>[7]</sup>

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量, 加甲醇制成含芍药苷 64.6 μg/mL 的溶液, 即得。

表 3 酵母菌发酵 8% 白芍不同时间活菌数结果

Table 3 Viable bacteria counts of 8% PRA samples fermented by microzyme during different time

发酵配方	酵母菌活菌数 / (CFU·mL <sup>-1</sup> )		
	24 h	36 h	48 h
1	6.0 × 10 <sup>7</sup>	6.1 × 10 <sup>7</sup>	5.7 × 10 <sup>7</sup>
2	1.9 × 10 <sup>8</sup>	7.7 × 10 <sup>8</sup>	1.8 × 10 <sup>8</sup>
3	1.3 × 10 <sup>8</sup>	7.0 × 10 <sup>8</sup>	1.2 × 10 <sup>8</sup>
4	2.2 × 10 <sup>8</sup>	8.0 × 10 <sup>8</sup>	2.0 × 10 <sup>8</sup>
5	1.6 × 10 <sup>8</sup>	7.3 × 10 <sup>8</sup>	1.5 × 10 <sup>8</sup>

**2.2.2 供试品溶液的制备** 按“2.1.1”项下方法，将乳酸菌、酵母菌的种子液分别按 2%接种量接种到表 1 各发酵配方中，发酵 24、36、48 h 后，分别放入真空冷冻干燥机中冻干 48 h，得到发酵供试品。

分别取上述发酵供试品粉末 0.1 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加入 30 mL 50%乙醇，超声 50 min（功率 240 W，频率 45 kHz），放冷，加 50%乙醇定容至刻度，用 0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

**2.2.3 水分测定** 按《中国药典》2010 年版附录 IX H 项下“烘干法”对“2.1.4”项下所制备的去皮白芍药材及去皮硫磺熏蒸白芍药材发酵供试品进行水分测定，结果见表 4 和 5。

**2.2.4 发酵供试品芍药苷定量测定<sup>[8]</sup>** 按《中国药典》2010 年版白芍中芍药苷定量测定项下方法测定。色谱条件：色谱柱为 Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液（14：86）；检测波长 230 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL；体积流量 1.0 mL/min。理论塔板数按芍药苷峰计算均不低于 2 000。

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，测定，即得。以干燥品计算芍药苷的量，测定结果见表 4、5。

**2.3 发酵工艺优选**

比较表 4、5 结果可知，以乳酸菌发酵无硫白芍药材最佳工艺为 2 号，即乳酸菌 8%白芍（无硫）36 h，其活菌数为 6.7×10<sup>8</sup> CFU/mL，芍药苷为 3.194 1%；以乳酸菌发酵硫熏白芍药材，最佳工艺为 14 号，即乳酸菌 8%白芍（硫熏）36 h，其芍药苷质量分数为

3.116 3%；其活菌数为 4.5×10<sup>8</sup> CFU/mL；以酵母菌发酵无硫白芍药材，最佳工艺为 11 号，即酵母菌 8%白芍（无硫）+培养基 36 h，其芍药苷质量分数为 3.755 8%，活菌数为 7.7×10<sup>8</sup> CFU/mL；以酵母菌发酵硫熏白芍药材，最佳工艺为 23 号，即酵母菌 8%白芍（硫熏）+培养基 36 h，其芍药苷质量分数为 3.574 1%；活菌数为 7.3×10<sup>8</sup> CFU/mL。

表 2、3 结果表明，在一定的时间内，发酵过程中加入培养基更有利于乳酸菌和酵母菌的生长，而且白芍药液对酵母菌的发酵有促进作用；但发酵供试品中硫熏白芍组中芍药苷质量分数与活菌数均低于相应无硫白芍组，表明白芍经硫磺熏蒸后，其成分有所改变，影响了酵母菌的繁殖。

上述结果表明，白芍以酵母菌发酵效果优于乳酸菌发酵效果，故发酵菌以酵母菌为佳；白芍和硫熏白芍其最佳发酵工艺是相同的。综合各发酵供试品中活菌数和芍药苷质量分数测定结果，以酵母菌进行发酵优于乳酸菌；白芍和硫熏白芍发酵最佳工艺为以酵母菌加入培养基发酵 36 h。

**2.4 工艺验证试验**

按“2.1.1”项下发酵液的制备方法，以酵母菌 8%白芍（无硫）加培养基发酵 36 h 工艺制备 3 批发酵供试品，测得其芍药苷平均质量分数为 3.752 4%；平均活菌数为 7.6×10<sup>8</sup> CFU/mL；以酵母菌 8%白芍（硫熏）加培养基发酵 36 h 工艺制备 3 批发酵供试品，测得其芍药苷平均质量分数为 3.573 9%；平均活菌数为 7.2×10<sup>8</sup> CFU/mL；分别优于表中其他发酵供试品；证明工艺可行，结果见表 6。

表 4 白芍药材发酵供试品水分、芍药苷定量测定结果 (n = 3)

Table 4 Contents of paeoniflorin and moisture in fermented PRA samples (n = 3)

编号	样品	水分		芍药苷	
		含水量 / %	RSD / %	质量分数 / %	RSD / %
1	乳酸菌 8%白芍（无硫）24 h	4.948 4	1.41	3.149 8	0.04
2	乳酸菌 8%白芍（无硫）36 h	4.341 3	1.51	3.194 1	0.03
3	乳酸菌 8%白芍（无硫）48 h	6.913 4	1.58	3.091 9	0.15
4	乳酸菌 8%白芍（无硫）+培养基 24 h	6.582 2	1.74	0.752 3	0.07
5	乳酸菌 8%白芍（无硫）+培养基 36 h	6.837 3	1.29	0.754 6	0.20
6	乳酸菌 8%白芍（无硫）+培养基 48 h	6.943 9	1.12	0.798 6	0.21
7	酵母菌 8%白芍（无硫）48 h	4.323 3	1.78	3.526 7	0.08
8	酵母菌 8%白芍（无硫）36 h	4.686 8	1.45	3.575 8	0.12
9	酵母菌 8%白芍（无硫）24 h	4.285 9	1.34	3.519 2	0.01
10	酵母菌 8%白芍（无硫）+培养基 24 h	3.855 9	1.85	3.691 1	0.06
11	酵母菌 8%白芍（无硫）+培养基 36 h	4.498 0	1.23	3.755 8	0.05
12	酵母菌 8%白芍（无硫）+培养基 48 h	4.228 8	1.31	3.634 0	0.10

表5 硫熏白芍药材发酵供试品水分和芍药苷定量测定结果 (n=3)

Table 5 Contents of paeoniflorin and moisture in fermented PRA samples processed by sulfur fumigation (n=3)

编号	样品	水分		芍药苷	
		含水量 / %	RSD / %	质量分数 / %	RSD / %
13	乳酸菌 8%白芍 (硫熏) 24 h	4.383 3	1.38	3.095 3	0.61
14	乳酸菌 8%白芍 (硫熏) 36 h	4.624 9	1.42	3.116 3	0.03
15	乳酸菌 8%白芍 (硫熏) 48 h	4.257 0	1.23	3.020 9	0.11
16	乳酸菌 8%白芍 (硫熏) +培养基 24 h	7.414 5	1.63	0.727 9	0.26
17	乳酸菌 8%白芍 (硫熏) +培养基 36 h	7.402 0	1.42	0.707 1	0.03
18	乳酸菌 8%白芍 (硫熏) +培养基 48 h	4.852 7	1.63	0.689 5	0.23
19	酵母菌 8%白芍 (硫熏) 24 h	4.041 7	1.38	2.698 8	0.11
20	酵母菌 8%白芍 (硫熏) 36 h	3.776 7	1.52	2.651 5	0.12
21	酵母菌 8%白芍 (硫熏) 48 h	4.520 2	1.63	2.696 1	0.01
22	酵母菌 8%白芍 (硫熏) +培养基 24 h	5.185 0	1.41	3.539 0	0.02
23	酵母菌 8%白芍 (硫熏) +培养基 36 h	4.320 4	1.89	3.574 1	0.02
24	酵母菌 8%白芍 (硫熏) +培养基 48 h	4.383 3	1.25	3.500 8	0.21

表6 工艺验证试验结果 (n=3)

Table 6 Results of technology verification (n=3)

样品	芍药苷		乳酸菌	
	质量分数 / %	RSD / %	活菌数 / (CFU·mL <sup>-1</sup> )	RSD / %
酵母菌 8%白芍 (无硫) +培养基 36 h	3.754 3	0.06	7.5×10 <sup>8</sup>	1.31
	3.749 8		7.7×10 <sup>8</sup>	
	3.753 1		7.6×10 <sup>8</sup>	
酵母菌 8%白芍 (硫熏) +培养基 36 h	3.574 8	0.10	7.2×10 <sup>8</sup>	0.80
	3.569 8		7.3×10 <sup>8</sup>	
	3.577 1		7.2×10 <sup>8</sup>	

### 3 结果与讨论

将白芍进行发酵, 在传统炮制方法中并未有相关资料记载, 且中药在发酵过程中, 菌种的选择非常重要。目前已经有研究利用药用真菌发酵白芍, 考察其双相发酵对白芍的影响; 但将细菌乳酸菌、真菌酵母菌用于白芍进行发酵, 并进行比较研究, 这是目前未见报道的。本实验将白芍药材及硫熏白芍药材以乳酸菌、酵母菌进行发酵, 通过比较不同发酵时间活菌数并综合发酵供试品中芍药苷定量测定结果, 优选出以酵母菌发酵效果为佳。

实验结果表明, 白芍药材及硫熏白芍药材最佳发酵工艺条件相同, 其发酵最佳工艺为以酵母菌加入培养基发酵 36 h。通过 3 批验证试验, 证明发酵工艺可行。本实验为白芍发酵工艺提供了试验依据, 具有一定的科研意义。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 刘鹰翔, 王玉卓. 白芍的化学成分与药理研究进展 [J]. 中草药, 1995, 26(8): 437-441.
- [3] 苏 玮, 郭 群. 白芍的现代药理研究概况 [J]. 中医药信息, 1996(4): 9.
- [4] 潘 扬, 张 弦, 刘亮镜, 等. 马钱子发酵品中生物碱化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 452-457.
- [5] 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(2): 6-9.
- [6] GB/T 13093-2006 饲料中细菌总数的测定 [S]. 2007.
- [7] 阎 妹, 石 森, 李优鑫, 等. 正交试验法优选芍药苷提取工艺研究 [J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(5): 311-312.
- [8] 傅 勇, 李 旭, 虞金宝. HPLC 同时测定红花逍遥片中芍药苷及甘草苷含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 152-154.