

半夏曲炮制中 4 种优势微生物的生理生化特性及黄色素含量测定

龙 凯, 郭佳佳[#], 苏明声, 谢卫华, 王立元, 谢小琴, 杨 明*, 谢小梅*

江西中医药大学, 江西 南昌 330004

摘 要: **目的** 研究半夏曲中 4 种优势微生物的生理生化特性, 测定炮制过程中不同时间点各样本的黄色素含量, 为揭示半夏曲炮制机制奠定基础。**方法** 以半夏曲中筛选出的 4 株优势菌枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii*、丝衣霉菌 *Byssoschlamys spectabilis*、黑曲霉 *Aspergillus niger* 为研究对象, 分别测定它们的最适宜生长温度、pH 值, 利用糖类的产酸能力以及产淀粉酶、蛋白酶、黄色素的能力, 同时测定半夏曲炮制过程中 5 个不同时间点样本的黄色素含量。**结果** 枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉生长的最适温度分别为 35 °C、29 °C、29~31 °C、39 °C, 最适 pH 值分别为 7.0、7.0、7.5、7.0。4 种菌均具有产淀粉酶和蛋白酶的能力, 宛氏拟青霉、丝衣霉菌具有产黄色素能力。5 个不同时间点样品的黄色素质量分数分别为 69.875、69.875、71.750、119.500、137.875 μg/g。**结论** 4 种优势微生物在半夏曲炮制中可能起重要作用。

关键词: 半夏曲; 发酵炮制; 优势菌; 生理生化特性; 黄色素; 枯草芽孢杆菌; 宛氏拟青霉; 丝衣霉菌; 黑曲霉

中图分类号: R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2019)15 - 3637 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.018

Physiological and biochemical characteristics of four dominant microbes and content of yellow pigment in fermentation process of *Pinelliae Rhizoma Fermentata*

LONG Kai, GUO Jia-jia, SU Ming-sheng, XIE Wei-hua, WANG Li-yuan, XIE Xiao-qin, YANG Ming, XIE Xiao-mei

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To study the physiological and biochemical characteristics of four dominant microorganisms and the yellow pigment content of *Pinelliae Rhizoma Fermentata* (PRF), and provide basis for exploring the mechanism of PRF processing. **Methods** The optimum growth temperature and pH value of the four dominant microorganisms *Bacillus subtilis*, *Paecilomyces variotii*, *Byssoschlamys spectabilis*, and *Aspergillus niger* were studied. The ability of producing acidase, amylase, protease, and yellow pigment were determined. The yellow pigment content of each sample at different fermentation time points in process of PRF was determined. **Results** The most suitable growth temperatures for *B. subtilis*, *P. variotii*, *B. spectabilis*, and *A. niger* were 35 °C, 29 °C, 29—31 °C, and 39 °C; And the optimum pH were 7.0, 7.0, 7.5, and 7.0, respectively. Four kinds of microorganisms had the ability to produce amylase and protease. *P. variotii* and *B. spectabilis* had the ability to produce yellow pigment. The content of yellow pigment were 69.875, 69.875, 71.750, 119.500, and 137.875 μg/g in the samples at different time points. **Conclusion** Four kinds of dominant microorganisms may play an important role in fermentation process of PRF.

Key words: *Pinelliae Rhizoma Fermentata* (PRF); fermentation processing; dominant microorganisms; physiological and biochemical characteristics; yellow pigment; *Bacillus subtilis*; *Paecilomyces variotii*; *Byssoschlamys spectabilis*; *Aspergillus niger*

中药发酵炮制大致分为 2 类: 一种是将中药直接进行发酵, 如淡豆豉、片仔癀、百药煎等^[1-2]; 一种是将药物与其他辅料混合后发酵, 如半夏曲、连翘胆矾溶液等^[3]。经发酵炮制的中药与其他方法炮制

收稿日期: 2019-04-20

基金项目: 国家中医药管理局 2015 年中医药行业科研专项 (201507004-03)

作者简介: 龙 凯, 男, 高级实验师, 从事中药学研究。E-mail: longkai2006@163.com

*通信作者 谢小梅, 女, 教授, 硕士生导师, 从事微生物学研究。Tel: (0791)87118707 E-mail: jxxm1964@sina.com

杨 明, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制和中药制剂研究。Tel: (0791)87119118 E-mail: yangming16@126.com

[#]并列第一作者 郭佳佳, 女, 硕士研究生, 从事中药学研究。E-mail: 779018788@qq.com

的中药相比,显著不同的是微生物对整个炮制过程起着至关重要的影响^[4-5]。本实验室前期已从半夏曲炮制过程的不同时间点样品中分离出 30 余株优势微生物,在半夏曲炮制后期宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii*、丝衣霉菌 *Byssoschlamys spectabilis* 的数量突然增多(结果未发表)。查阅文献可知,枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 是发酵豆豉中常见的优势细菌,世界公认其安全性^[6]。黑曲霉 *Aspergillus niger* 发酵周期短、用于生产淀粉酶、蛋白酶等多种酶,不产生毒素^[7]。枯草芽孢杆菌、黑曲霉、宛氏拟青霉已应用到纳豆、酱油、酒类的发酵中,除本实验室^[8-9]外,迄今未见研究者关注半夏曲炮制中的微生物学研究。基于此,本研究通过测定半夏曲中分离的枯草芽孢杆菌、宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉这 4 种优势微生物的生理生化特性和产黄色素能力,并测定半夏曲炮制过程中 5 个不同时间点样本的黄色素含量,初步探讨它们在半夏曲炮制中的作用,为揭示半夏曲的炮制机制、纯种发酵等奠定基础。

1 材料与仪器

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* Ax1、宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* BJ2、丝衣霉菌 *Byssoschlamys spectabilis* BJ3、黑曲霉 *Aspergillus niger* FX3 为本实验室从半夏曲炮制过程中不同时间点的样品中分离保存,鉴定人为江西中医药大学谢小梅教授和王立元副教授。

半夏曲炮制过程中 5 个不同时间点的样本来自成都中医药大学,经江西中医药大学杨明教授鉴定。

脑心浸液肉汤、马铃薯葡萄糖琼脂,青岛海博生物有限公司,批号分别为 HB8297-1、HB0233;β-胡萝卜素对照品,批号 SLBG6787V,质量分数 95%,美国 Sigma 公司。

UV-2102C 紫外可见分光光度计,上海优尼柯仪器有限公司;MJ-150I 霉菌培养箱、DHP-9082 电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司;PHS-25 型数显 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司。

2 方法

2.1 半夏曲的制备与取样^[10]

由成都中医药大学制备。参照 1995 年出版的《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》(第十册),结合调研相关生产厂家、咨询四川辅正药业股份有限公司和四川新荷花中药饮片股份有限公司等相关中药发酵炮制方面的老药工及成都中医药大学炮制专家,确定了半夏曲的发酵炮制工艺

为清半夏 160 g、白矾 10 g、六神曲 5 g、生姜汁 20 g、面粉 32 g,除生姜汁、面粉外,其余 3 味粉成细粉;生姜汁加水适量,与面粉及上述细粉搅匀,制成粗粒软硬适宜的小块或颗粒,在一定条件下发酵,每隔一定时间取样 1 次,并记录其性状,发酵至产生“黄衣”时即为炮制终点(5 d,记为 100%),取出。分别取发酵 0、30、60、90、120 h 的样品于无菌的密封袋中 4 ℃ 保存,尽快进行后续实验。

2.2 生理生化特性试验

2.2.1 不同温度对优势菌株生长的影响^[11] 将枯草芽孢杆菌接种(接种量 5%)于 pH 值 7.0 的液体培养基中,分别置于不同温度下培养 48 h,测其吸光度(*A*)值;用直径 6 mm 的打孔器分别将宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉打出 6 mm 菌饼(菌饼形成的介质是马铃薯葡萄糖琼脂),接种于 pH 值 7.0 的固体培养基中央,分别置于不同温度下培养 96 h,用十字交叉法测菌落直径。

2.2.2 不同 pH 值对优势菌株生长的影响^[12] 将枯草芽孢杆菌分别接种于不同 pH 值的液体培养基中,置最适温度下培养 48 h,测其 *A* 值;用打孔器分别将宛氏拟青霉、丝衣霉菌、黑曲霉打出 6 mm 的菌饼分别接种于不同 pH 值的固体培养基中,最适温度下培养 96 h,用十字交叉法测菌落直径。

2.2.3 糖类利用产酸实验^[13] 称取蛋白胨 2 g、磷酸氢二钾 0.2 g、氯化钠 5 g,加入不同的糖(葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖)10 g,加 1 000 mL 双蒸水,高压灭菌后待培养基温度降至 50~60 ℃ 时加入 1% 溴百里酚蓝水溶液 3 mL,混匀倒平板备用。用接种针将菌种接种于培养基上。培养基颜色由绿变黄为阳性(+),不变色为阴性(-)。

2.2.4 优势菌株产淀粉酶能力试验^[13] 称取蛋白胨 10 g、可溶性淀粉 2 g、磷酸氢二钾 3 g、酵母膏 2 g、硫酸镁 0.1 g、琼脂粉 20 g,加 1 000 mL 双蒸水,调 pH 7.0,高压灭菌,倒平皿备用。用无菌牙签蘸取少许菌落插入培养基中,碘液染色,出现透明圈者为阳性(+),无透明圈者为阴性(-)。

2.2.5 优势菌株产蛋白酶能力试验^[13] 称取葡萄糖 10 g、奶粉 10 g、琼脂 20 g,加 1 000 mL 双蒸水,调 pH 7.0,高压灭菌,倒平皿备用,用无菌牙签沾取少量菌于培养基中,细菌置 37 ℃、真菌置 28 ℃ 培养箱中培养 2 d,出现透明圈者为阳性(+),无透明圈者为阴性(-)。

2.2.6 产黄色素菌株的筛选及色价的测定^[14] 将

菌株接种于相应培养基上, 观察菌落颜色, 初筛产黄色的菌株。将初筛的产黄色素菌株进行液体培养, 取培养液 1 mL 加 9 mL 70%乙醇, 于 30 ℃摇床中萃取 30 min。取萃取液 1 mL 加 9 mL 70%乙醇, 单层滤纸滤过, 在紫外分光光度计 445.5 nm 波长下测 A 值, A 值乘以稀释倍数即为黄色素色价。

2.3 半夏曲炮制中各样品的黄色素含量测定^[15]

2.3.1 绘制标准曲线 以 β -胡萝卜素为对照品, 溶于 70%乙醇中, 分别配制质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 在 445.5 nm 下测 A 值, 以 β -胡萝卜素质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标制作标准曲线。

2.3.2 样品中黄色素的提取和检测 取 0.2 g 半夏曲样品加入 20 mL 70%乙醇, 75 ℃水浴 40 min 后, 离心, 滤过并定容至 25 mL, 在 445.5 nm 处测 A 值。重复性实验: 每个样品设 3 个重复, 计算 RSD。稳定性实验: 每个样品每隔 20 min 测其 A 值, 计算

RSD 值。

3 结果

3.1 半夏曲炮制过程中不同时间点样品的性状

根据“2.1”项下方法进行炮制, 通过观察半夏曲炮制过程中各样品的性状变化, 确定了取样的时间节点, 结果见表 1 和图 1。半夏曲发酵初时, 颜色为淡白色, 呈颗粒状。发酵 30 h, 有淡淡的特异香气, 外观无明显变化。发酵 60 h, 有酒香气, 可少见颗粒聚集成块状。发酵 90 h, 块状聚集较多且出现黄色菌丝, 有特异香气。发酵终点 120 h, 可见块状多且黄衣明显, 特异香味浓郁。

3.2 不同温度对各优势菌株生长的影响

由表 2 可知, 当 pH 值为 7 时, 枯草芽孢杆菌、黑曲霉、宛氏拟青霉和丝衣霉菌培养的最适温度分别为 35 ℃、39 ℃、29 ℃和 29~31 ℃。

3.3 不同 pH 值对各优势菌株生长的影响

由表 3 可知, 在最适宜温度下, 枯草芽孢杆菌、

表 1 半夏曲发酵过程中不同时间点样品性状

Table 1 Samples traits of PRF at different time points during processing

发酵时间/h	时间节点	形色气味
0	0%	淡黄白色颗粒状, 气微
30	25%	淡黄白色颗粒状, 微有特异香气
60	50%	淡黄白色, 偶见有部分颗粒聚集成球状, 有肉眼可见的“白毛”, 有酒香气
90	75%	淡黄白色, 颗粒聚集成块, 质疏松, “白毛”上遍, 偶见黄色菌丝, 有特异香气
120	100%	黄白色, 颗粒聚集成块状, 质疏松, 表面遍生“黄衣”, 内外均可见黄色的菌斑, 特异香气较浓郁



图 1 半夏曲发酵过程中不同时间点样品的外观性状

Fig. 1 Appearance traits of PRF samples at different time points during processing

表 2 不同温度下 4 种优势菌的生长情况

Table 2 Growth of four dominant strains at different temperatures

温度/℃	枯草芽孢杆菌 (A 值)	宛氏拟青霉 (直径/mm)	丝衣霉菌 (直径/mm)	黑曲霉 (直径/mm)
25	1.72	2.94	3.97	1.34
27	1.86	3.75	4.25	2.05
29	2.11	5.36	6.33	2.77
31	2.25	5.13	6.32	3.52
33	2.44	4.87	4.51	3.64
35	3.27	3.96	3.82	4.03
37	3.12	2.07	3.04	4.35
39	3.05	1.89	2.84	5.55

表 3 不同 pH 值下 4 种优势菌的生长情况

Table 3 Growth of four dominant strains at different pH

pH 值	枯草芽孢杆菌(A 值)	宛氏拟青霉 (直径/mm)	丝衣霉菌 (直径/mm)	黑曲霉 (直径/mm)
6.0	2.03	3.70	3.24	4.33
6.5	2.12	4.94	3.84	4.80
7.0	2.53	5.75	5.02	5.67
7.5	2.36	5.51	5.16	5.45
8.0	2.11	4.15	4.63	5.21

黑曲霉、宛氏拟青霉生长的最适 pH 值均为 7; 丝衣霉菌的最适生长的 pH 值为 7.5。

3.4 各优势菌株对糖类利用的产酸情况

由表 4 可知, 宛氏拟青霉、丝衣霉菌均能利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖。而枯草芽孢杆菌和黑曲霉不能利用乳糖。

3.5 各优势菌株的产淀粉酶和蛋白酶能力

由表 5 可知, 4 种菌均有产淀粉酶和蛋白酶的能力。

3.6 产黄色素菌株的初筛及色价的测定

通过观察各优势菌株在培养基上的菌落颜色可知(图略), 黑曲霉菌落颜色为中间呈黑色颗粒状, 边缘为白色绒毛状。枯草芽孢杆菌菌落为大颗粒、晶莹饱满白色菌落。根据菌落颜色推测它们不具备产黄色素能力。宛氏拟青霉、丝衣霉在培养前 3 d 菌落颜色为白色, 在第 4~5 天时, 菌落颜色逐渐变为淡黄色, 根据颜色推测其具有产黄色素的能力。

表 4 4 种菌利用糖类的产酸能力

Table 4 Acid production of carbohydrates of four dominant strains

菌种	葡萄糖利用	蔗糖利用	麦芽糖利用	乳糖利用
枯草芽孢杆菌	+	+	+	-
宛氏拟青霉	+	+	+	+
丝衣霉菌	+	+	+	+
黑曲霉	+	+	+	-

+表示阳性; -表示阴性, 下表同

+ indicates positive; - indicates negative, same as below

表 5 4 种菌产淀粉酶、蛋白酶能力

Table 5 Enzyme production of four dominant strains

菌种	产淀粉酶活力	产蛋白酶活力
枯草芽孢杆菌	+	+
宛氏拟青霉	+	+
丝衣霉菌	+	+
黑曲霉	+	+

测定其色价分别为 4.3、3.6 U/mL。

3.7 半夏曲炮制过程不同时间点样本的黄色素定量测定

由表 6 结果可知, 黄色素的标准曲线线性回归方程为 $Y=0.136X+0.006$, $r^2=0.997$, 表明线性关系良好。重复性和稳定性实验中 RSD 结果均小于 3%, 表明此实验的重复性和稳定性均良好, 用此法测得半夏曲炮制至 0、30、60、90、120 h 的黄色素的质量分数分别为 69.875、69.875、71.750、119.500、137.875 $\mu\text{g/g}$ 。

表 6 半夏曲炮制过程中不同时间点样本的黄色素含量测定
Table 6 Content of yellow pigment in PRF at different time points during processing

发酵时间/h	RSD/%		质量分数/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
	重复性	稳定性	
0	1.46	2.26	69.875
30	1.21	1.69	69.875
60	0.72	0.72	71.750
90	0.88	0.81	119.500
120	0.77	0.78	137.875

4 讨论

中药经发酵炮制后, 品质的高低不仅与发酵的菌种有关, 发酵条件如温度、湿度、pH 值等都对其有重要影响。半夏曲的炮制实质是微生物的发酵, 微生物的发酵依赖其中优势菌株的性能。优势菌株的生长受发酵环境与工艺的影响。温度是调控微生物生长繁殖最重要的因素之一, 所有酶促反应都与温度有关, 温度升高, 细胞繁殖加快, 同时酶失活的速度也加快, 发酵周期缩短, 这可能是为何在不同季节发酵炮制的药材其成分和功效相差巨大的原因。通过本实验明确了这 4 种菌的最适宜生长温度、pH 值以及产酶能力, 为后续纯种发酵奠定了基础。

糖类利用产酸实验中, 4 种优势菌均能利用葡萄糖、蔗糖和麦芽糖, 但枯草芽孢杆菌和黑曲霉不

能利用乳糖; 4种优势菌株都可以产生淀粉酶、蛋白酶。结合张超^[10]对半夏曲炮制过程中总糖、淀粉酶、蛋白酶的含量变化研究结果, 笔者推测, 发酵炮制初期微生物较少, 随着炮制时间的延长, 4株优势菌的数量增多(另文发表), 消耗的总糖量增加, 使半夏曲中淀粉酶和蛋白酶的含量逐渐增加。

真菌色素主要是一些酮类、醌类、酸类以及含氮化合物。目前, 研究较深入的是红曲中的黄色素, 《本草纲目》记载, 红曲消食活血、健脾燥胃、治赤白痢。这与半夏曲的功效相似。黄色素具有安全性高、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用, 未来应用前景广阔。通过肉眼观察在半夏曲炮制后期, 样品表面逐渐变黄, 张超^[10]已通过色彩色差计、机器视觉等技术对半夏曲颜色进行客观量化, 表明半夏曲炮制至90、120 h时样品的颜色明显发生变化, “黄衣”是判断半夏曲炮制进程和成功与否的一个重要指标, 可能是微生物代谢产生的黄色素。本研究发现, 随着炮制时间的延长, 半夏曲炮制中黄色素含量逐渐增多, 产黄色素菌种为宛氏拟青霉、丝衣霉菌, 结合优势微生物定量动态变化的研究结果(另文发表), 推测宛氏拟青霉、丝衣霉菌在半夏曲黄色素形成中可能起重要作用, 但半夏曲的黄色素具体为哪种以及是否还存在其他产黄色素的菌种等将进一步研究。本研究将为进一步揭示半夏曲炮制机制、规范炮制工艺、纯种发酵等奠定基础。

参考文献

- [1] 丛悦怡, 孙佳, 于恩, 等. 红曲霉发酵转化人参皂苷 Rg₃ 的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1298-1303.
- [2] 都晓伟, 牟晋超, 孟凡佳, 等. 内生真菌固体发酵提高穿山龙中薯蓣皂苷元的研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 179-181.
- [3] 袁学刚, 叶羊, 赵甲元, 等. 基于高通量测序分析连翘酚溶液发酵炮制过程中真菌菌群多样性变化 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4259-4268.
- [4] 胥敏, 吴纯洁, 严丹, 等. 中药发酵技术传承与创新的探索 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 230-234.
- [5] 孙凯峰, 包怡红. 微生物发酵对黑木耳总糖含量和体外调脂活性的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3781-3787.
- [6] 袁小平, 王静, 姚惠源. 枯草芽孢杆菌内切木聚糖酶的纯化与性质研究 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(8): 55-59.
- [7] 张熙, 韩双艳. 黑曲霉发酵产酶研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2016, 3(1): 13-16.
- [8] 郭佳佳, 王立元, 翁美芝, 等. 半夏曲中4种优势微生物的荧光定量PCR方法的建立 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5130-5135.
- [9] 郭佳佳, 苏明声, 王立元, 等. 半夏曲炮制过程中优势微生物的鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(16): 3027-3031.
- [10] 张超. 半夏曲质量标准提升及发酵过程研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [11] 吴青录, 秦秀丽. 枯草芽孢杆菌液体培养条件的研究 [J]. 吉林农业, 2012(04): 65+64.
- [12] 罗光明, 董艳凯, 朱玉野, 等. 栀子褐斑病原菌生物学特性研究 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1312-1316.
- [13] 贾丹丹. 六神曲和百药煎炮制过程中微生物分离、鉴定与特性分析 [D]. 上海: 中国医药工业研究总院, 2016.
- [14] 张成程. 多孔菌科一株产黄色素真菌的鉴定及其色素分析 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2016.
- [15] 翁志平, 郭丽冰, 杨霞, 等. 六味地黄汤经光合细菌代谢后β-胡萝卜素含量的变化 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2145-2146.