

• 药剂与工艺 •

基于“微生物-理化参数”动态互作解析马蓝叶的浸泡发酵机制

黄 麒¹, 苏 娟¹, 杨 鑫¹, 贺亚男¹, 杨红亚¹, 阳向波², 杨 明³, 张定堃^{1,4*}, 韩 丽^{1*}

1. 成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 雅安迅康药业有限公司, 四川 雅安 625000

3. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

4. 成都中医药大学天府中医药创新港 四川省经典名方二次创新开发工程研究中心, 四川 成都 611930

摘要: 目的 青黛 *Indigo Naturalis* 浸泡发酵环节存在工艺稳定性差、有效成分波动大的问题, 为提高青黛的品质, 系统解析马蓝叶的浸泡发酵机制是关键。方法 采用溶氧仪等连续监测 6、12、24、36、48、60、72 h 发酵液中的 pH 值、氧化还原电位 (oxidation-reduction potential, ORP)、溶氧量等物理指标。利用 HPLC 法测定不同发酵时间下样品中靛蓝、靛玉红、色胺酮、靛红等关键化学成分含量变化, 同时采用高通量测序对样品中微生物组成进行鉴定和考察。对微生物和理化参数进行相关性分析, 微生物群落动态演替与理化参数的关联变化。**结果** 随着发酵时间的不断增加, pH 值、ORP、溶氧量等物理指标均呈现先下降后相对平稳的趋势, 靛蓝、靛玉红等靛类成分均呈现先上升后缓慢下降的趋势。发酵 6 h 样本细菌和真菌的多样性最丰富, 且群落结构与后期发酵样品的差异显著。主要的优势菌群包括细菌中的梭状芽孢杆菌属 *Clostridium_sensu_stricto_1*、乳酸球菌属 *Lactococcus*、肠杆菌属 *Enterobacter*、肠球菌属 *Enterococcus*, 以及真菌中的丝孢酵母属 *Trichosporon*、unclassified_f_Didymellaceae、季也蒙迈耶氏酵母属 *Meyerozyma*、帚枝霉属 *Sarocladium*、*Cutaneotrichosporon*。相关性分析揭示, 门水平上, 细菌中的厚壁菌门 (Firmicutes) 与 pH 值和 ORP 呈显著负相关 ($P < 0.01$), 而变形菌门 (Proteobacteria) 则相反; 真菌中的担子菌门 (Basidiomycota) 与之呈显著负相关 ($P < 0.01$), 而子囊菌门 (Ascomycota) 则相反; 属水平上, 梭状芽孢杆菌属、乳酸球菌属等细菌属与关键成分的含量呈显著正相关 ($P < 0.01$), 与丝孢酵母属、皮肤孢菌属 *Cutaneotrichosporon* 等真菌属呈显著性正相关 ($P < 0.01$)。**结论** 初步阐明了在青黛浸泡发酵过程中, 微生物群落动态演替与理化参数的显著互作, 构建了二者的关联网, 为进一步通过理化参数对发酵过程靛类成分含量与发酵程度进行快速预测, 从而实现青黛工业生产的可观、可控及可调提供理论支撑。

关键词: 青黛; 浸泡发酵; 微生物群落; 靛蓝; 靛玉红; 相关性分析; 理化参数; 色胺酮; 靛红; 高通量测序

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)21-7700-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.005

Based on dynamic interaction of “microorganism-physical and chemical parameters” to analyze soaking and fermentation mechanism of *Baphicacanthus cusia* leaves

HUANG Qi¹, SU Juan¹, YANG Xin¹, HE Yanan¹, YANG Hongya¹, YANG Xiangbo², YANG Ming³, ZHANG Dingkun^{1,4}, HAN Li¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Sichuan Yaan Xunkang Pharmaceutical Co., Ltd., Yaan 625000, China

3. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

收稿日期: 2025-06-16

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1707205); 国家自然科学基金面上项目 (82173976)

作者简介: 黄 麒, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制与制剂。E-mail: huangqi1005@163.com

*通信作者: 韩 丽, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂工艺原理与品质优化。E-mail: hanliyx@163.com

张定堃, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂新技术与质量评价研究。E-mail: zhangdingkun@cdutcm.edu.cn

4. Sichuan Provincial Engineering Research Center of Innovative Re-development of Famous Classical Formulas, Tianfu TCM Innovation Harbour, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611930, China

Abstract: Objective Qingdai (*Indigo Naturalis*, IN) soaking and fermentation faces challenges such as poor process stability and significant fluctuations in active ingredients. To improve its quality, systematically elucidating the soaking and fermentation mechanism of *Baphicacanthus cusia* leaves is crucial. **Methods** In this study, dissolved oxygen meters and other devices were used to continuously monitor physical parameters such as pH value, oxidation-reduction potential (ORP) and dissolved oxygen content in the fermentation broth for 6, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h. The content changes of key chemical components such as indigo, indirubin, tryptanthrin and isatin in the samples under different fermentation times were determined by HPLC. Meanwhile, high-throughput sequencing was used to identify and investigate the microbial composition in the samples. Correlation analysis was conducted on microorganisms and physicochemical parameters, as well as the correlation changes between the dynamic succession of microbial communities and physicochemical parameters. **Results** With the continuous increase of fermentation time, physical indicators such as pH value, ORP and dissolved oxygen content all showed a trend of first decreasing and then relatively stable, while indigoid compounds such as indigo and indirubin all showed a trend of first increasing and then slowly decreasing. The microbial diversity of bacterial and fungal was highest in the 6 h fermentation samples, and their community structures were significantly different from those in later fermentation stages. The dominant microbial taxa identified were the bacteria *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Lactococcus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, and the fungal *Trichosporon*, unclassified_f_Didymellaceae, *Meyerozyma*, *Sarocladium*, *Cutaneotrichosporon*. Notably, correlation analysis showed at the phylum level, the bacterial phylum Firmicutes were significantly negatively correlated with pH value and ORP ($P < 0.01$), whereas Proteobacteria exhibited the opposite trend. The fungal phyla Basidiomycota was significantly negatively correlated with pH and ORP ($P < 0.01$), whereas Ascomycota exhibited the opposite trend. At the genus level, the bacterial genera *Clostridium_sensu_stricto_1* and *Lactococcus* were significantly positively correlated with the content of key components ($P < 0.01$), as were the fungal genera *Trichosporon* and *Cutaneotrichosporon* ($P < 0.01$). **Conclusion** This study preliminarily elucidated the significant interactions between microbial community succession and physicochemical parameters during the soaking and fermentation of IN and constructed an association network between them. These findings provide a theoretical basis for the rapid prediction of indigo-related compound contents and degree of fermentation based on physicochemical parameters, thereby enabling observable, controllable, and tunable industrial production of IN.

Key words: *Indigo Naturalis*; soaking and fermentation; microbial community; indigo; indirubin; correlation analysis; physical and chemical parameters; tryptanthrin; isatin; high throughput sequencing

青黛为典型的中药发酵饮片，是由爵床科板蓝属植物马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek.、蓼科蓼属植物蓼蓝 *Polygonum tinctorium* Ait.以及十字花科菥蓂属植物菥蓂 *Isatis indigotica* Fort.的叶或茎叶经浸泡发酵、石灰打靛及水飞精制等工序加工而成的干燥粉末、团块或颗粒。其具有清热解毒、凉血消斑之功效，广泛应用于银屑病、慢性粒细胞白血病及溃疡性结肠炎等疾病的临床治疗^[1]。研究表明，靛蓝、靛玉红、色胺酮及靛红等靛类成分是青黛发挥药效的重要物质基础^[2-3]。《中国药典》2020年版将靛蓝与靛玉红含量作为青黛质量控制的关键指标，要求靛蓝含量不低于 2.0%、靛玉红含量不低于 0.13%。随着中药卓越监管体系的持续推进，《中国药典》2025 年版将靛蓝含量提高至不低于 3.0%，靛玉红含量提高至不低于 0.20%，这为青黛饮片企业的生产控制带来了巨大的挑战。

青黛炮制工艺中的浸泡发酵环节是靛类成分发

生转化的关键，直接影响青黛的质量与临床疗效^[4]。目前，对于青黛浸泡发酵原理解释主要借鉴于染料靛的合成原理，即马蓝中的吲哚苷等前体物质在碱性条件或内源性酶作用下水解生成吲哚酚，随后经氧化缩合形成靛蓝；部分吲哚酚自由基可进一步转化为靛玉红^[5-6]。该研究认为内源性酶在靛类成分的转化过程中具有重要作用。同时，本课题组前期研究发现，浸泡发酵环节中变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门是主要的优势菌群，可能与靛类成分的转化存在关联^[7]。但是，早期研究表明，真菌和细菌能够分泌 β -糖苷酶，促进吲哚苷的水解^[8]，且在以靛蓝产率为指标时，靛蓝产率最高的组合依次为真菌和细菌混合发酵、真菌发酵、细菌发酵和无菌发酵^[9-10]。近年来，真菌在天然产物发酵中的关键作用日益凸显，研究表明其作为 β -糖苷酶的重要来源具有显著功能价值^[11-14]。此外，在青黛浸泡发酵的过程中靛类成分的动态变化规律，是否与发酵过程中

微生物的种类和代谢活动存在关联尚不清楚。基于此,本研究以微生物群落与理化参数的动态关联变化为切入点,通过解析马蓝叶发酵过程中菌群结构与物理指标、靛类成分的之间的潜在规律,揭示靛类成分生物转化的关键调控节点,以期为青黛生产工艺的优化提升提供理论支撑。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪,美国 ABI 公司; QuantiFluor™-ST 型荧光计,美国 Promega 公司; DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂; Illumina Miseq 型测序仪,美国 Illumina 公司; PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司; LH-D702 型便携式溶解氧检测仪,浙江陆恒环境科技有限公司; EPSON Perfection V370 Photo 型全彩平板扫描仪,爱普生(中国)有限公司; BAS224S 型万分之一电子分析天平、BT125D 型十万分之一天平,德国 Sartorius 公司; KQ-500DE 型数控超声仪,昆山市超声仪器有限公司; SCIENTZ-10N/C 型真空冷冻干燥机,宁波新芝冻干设备股份有限公司; U3000 型高效液相色谱仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; U3000 型双光束紫外-可见分光光度计,翱艺仪器(上海)有限公司。

1.2 试剂及试剂

新鲜马蓝叶,采摘地为四川雅安(YA),雅安迅康药业有限公司提供,采摘季节为夏季,经成都中医药大学药学院张定堃教授鉴定,为爵床科板蓝属植物马蓝 *B. cusia* (Nees) Bremek.; 对照品靛红(批号 DSTDD01820)、吲哚苷(批号 DST220317-664)、色胺酮(批号 DST200611-256)、靛玉红(批号 DSTDD012201)、靛蓝(批号 DSTDD008801),质量分数均>95.0%,均购于成都德思特生物技术有限公司; 甲醇为色谱级,美国 Fisher 公司; *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),成都市科隆化学品有限公司; E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA 抽提试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司; Biowest Agarose 琼脂糖,西班牙 Biowest 公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒,美国 Axygen 公司; NEXTFLEX 建库试剂盒,美国 Bioo Scientific 公司; MiSeq Reagent Kit 测序试剂盒,美国 Illumina 公司。

2 方法与结果

2.1 马蓝叶发酵过程

本研究所用马蓝叶发酵液样本的发酵条件为

料液比 1:12,即 1 kg 马蓝叶加入 12 L 水。28 °C 恒温浸泡发酵。分别于发酵 6、12、24、36、48、60、72 h 取同一批次发酵缸的上、中、下层发酵液混合均匀,每个时间点取样 3 组平行,取样 3 份,每份样品 500 mL。将发酵样品分别记作 YA6h~YA72h。将取回的样本分成 2 份储藏于-80 °C,1 份用于测定样本中靛类成分的含量,1 份用于检测微生物的多样性。另 1 份用于现场测定物理指标。

2.2 马蓝叶发酵过程中理化参数的测定与分析

2.2.1 物理指标的测定 采用便携式 pH 计、溶氧仪现场测定发酵过程中马蓝叶发酵液的 pH 值和氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)、溶氧量数值,分别于第 6、12、24、36、48、60、72 小时取样测定,每组样品平行测定 3 次。

2.2.2 靛类成分的含量测定

(1) 对照品溶液的制备:精密称取靛蓝、靛玉红、色胺酮、靛红对照品适量置于 10 mL 量瓶中,加入 DMF 适量,超声溶解后定容,配制成质量浓度分别为靛蓝 108.0 μg/mL、靛玉红 132.0 μg/mL、色胺酮 121.0 μg/mL、靛红 68.8 μg/mL 的混合对照品溶液。

(2) 供试品溶液的制备:分别取 6、12、24、36、48、60、72 h 的马蓝叶发酵液 10 mL,置于真空冷冻干燥机中,冷冻干燥成粉末,加入适量的 DMF 溶剂至 10 mL 量瓶中,超声(150 W、40 kHz)提取 30 min,静置,补量定容至 10 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液^[4]。

(3) 色谱条件^[15]:采用 Welchrom-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以纯水-甲醇为流动相,梯度洗脱程序:0~8 min, 20%~40%甲醇; 8~12 min, 40%~44%甲醇; 12~17 min, 44%~70%甲醇; 17~37 min, 70%~85%甲醇; 37~42 min, 85%甲醇; 42~47 min, 85%~20%甲醇; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL; 检测波长为 289 nm。

2.2.3 吲哚苷含量的测定

(1) 对照品溶液的制备:精密称取吲哚苷对照品适量置于 10 mL 量瓶中,加蒸馏水后超声溶解(150 W、40 kHz),定容,制得含吲哚苷 64.6 μg/mL 的对照品母液。

(2) 供试品溶液的制备:取 5 mL 马蓝叶发酵液过 0.22 μm 微孔滤膜后,稀释一定倍数,置于紫外-可见分光光度计中,于 290 nm 波长处进行测

定,使吸光度(A)范围在0.2~0.8^[16]。

(3) 线性关系考察:分别精密量取1.0、1.5、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 吡啶母液于10 mL 量瓶中,加蒸馏水定容,其中吡啶的质量浓度分别为6.46、9.69、16.15、19.38、22.61、25.84 μg/mL,置于紫外可见光分光光度计中,于290 nm 波长处进行测定,以对照品质量浓度为横坐标(X),A 值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程:吡啶 $Y=0.0298X+0.0032$, $R^2=0.9997$,线性范围6.46~25.84 μg/mL。

2.2.4 马蓝叶发酵过程中的理化参数变化分析 马蓝叶发酵过程中,理化参数的变化主要分为2个阶段,即快速变化阶段和相对稳定阶段。pH 值变化趋

势如表1所示,发酵前期(6~24 h),pH 值急剧下降,从7.8 降至6.1。发酵中期(24~48 h),pH 值略微上升,从5.8 升至6.0,发酵末期(48~72 h),pH 值变化趋于平缓,维持在6.1 左右。发酵液中ORP 的变化则表现出与pH 值相近的变化趋势。在发酵前期,ORP 从80 mV 骤降至-480 mV,中期略微下降后又上升至-520 mV,末期维持在-500 mV 左右。发酵液中的溶氧量变化趋势与ORP 相似,前期溶氧量从5.4 mg/L 下降到0.2 mg/L,中期缓慢上升至0.4 mg/L,末期维持在0.15 mg/L 左右。

靛类成分的HPLC 图见图1,含量变化如表1所示,在发酵前期(6~24 h),吡啶、靛蓝、靛玉

表 1 马蓝叶发酵过程中理化参数的演变 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Evolution of physicochemical parameters of *B. cusia* leaves during fermentation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	pH值	ORP/mV	溶解氧/ (mg·L ⁻¹)	吡啶/ (μg·mL ⁻¹)	靛蓝/ (μg·mL ⁻¹)	靛玉红/ (μg·mL ⁻¹)	靛红/ (μg·mL ⁻¹)	色胺酮/ (μg·mL ⁻¹)
YA6h	7.79±0.00	79.00±4.00	5.42±0.02	3.99±0.00	0.01±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00
YA12h	6.67±0.01	39.67±2.08	0.29±0.01	14.14±0.19	27.34±0.51	0.12±0.02	1.38±0.27	0.12±0.00
YA24h	6.11±0.01	-479.00±1.00	0.21±0.02	138.19±0.34	108.36±0.37	3.29±0.05	12.93±0.13	1.60±0.03
YA36h	5.83±0.01	-526.00±1.00	0.37±0.02	322.23±0.77	134.75±11.19	4.44±0.65	11.72±1.45	1.67±0.09
YA48h	6.02±0.01	-518.33±1.15	0.15±0.02	278.61±0.77	149.01±1.83	4.55±0.18	6.49±0.22	1.26±0.08
YA60h	6.34±0.01	-493.00±6.08	0.16±0.01	252.46±1.94	90.11±8.39	3.57±0.09	5.87±1.41	0.59±0.09
YA72h	6.39±0.01	-456.67±2.52	0.09±0.00	233.44±1.93	94.37±13.82	1.06±0.01	7.32±0.60	0.96±0.10

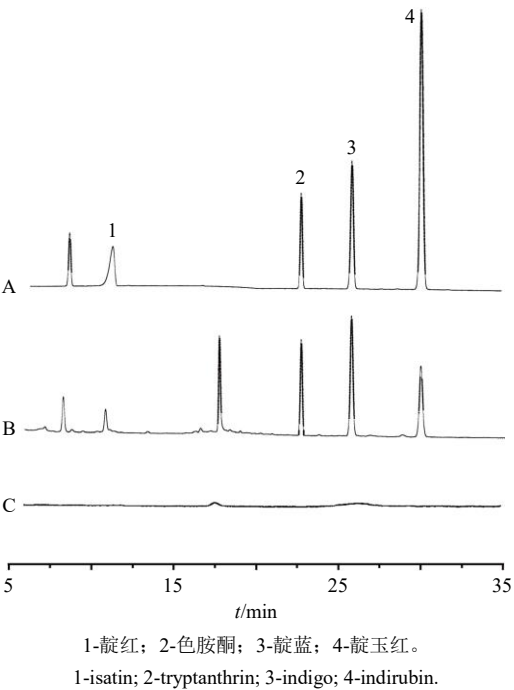


图 1 混合对照品 (A)、供试样品 (B) 和空白 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), test sample (B), and negative control (C)

红、靛红以及色胺酮等靛类成分的含量呈上升的趋势;发酵中期(24~48 h),靛蓝和靛玉红的含量缓慢上升并达到峰值,而靛红和色胺酮的含量在达到峰值后开始下降;发酵后期(48~72 h),靛蓝和靛玉红的含量开始下降,靛红和色胺酮的含量变化平缓。吡啶是生成靛蓝靛玉红等的重要前体物质,其与靛蓝、靛玉红之间的转化率分别为60%~80%和2%~5%。吡啶的含量变化在整个发酵过程与靛蓝、靛玉红等保持相近的变化趋势。

2.3 马蓝叶发酵过程中微生物群落结构分析

2.3.1 样品前处理及高通量测序与分析 在无菌操作间中,将“2.1”项下采集的发酵液样本用无菌纱布初滤,除去漂浮物,再用0.22 μm 微孔滤膜真空抽滤,富集发酵液中的微生物。取富集有微生物的滤膜至无菌离心管中,加入适量无菌水后,混悬均匀,去除滤膜,保留微生物沉淀,12 000 r/min 离心10 min 得到菌沉淀,按照E.Z.N.A.® Soil DNA Kit DNA 抽提试剂盒步骤提取基因组DNA,利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA 提取质量。

以提取的DNA 为模板,使用引物799F(5'-AA-

CMGGATTAGATACCKG-3')和 1193R(5'-ACGT-CATCCCCACCTTCC-3')对细菌的 V5~V7 区进行扩增,使用引物 ITS1F(5'-CTTGGTCATTAGAG-GAAGTAA-3')和 ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCAT-CGATGC-3')对真菌的 ITS1 区进行扩增。PCR 产物经检测定量后进行文库构建并测序,对测序片段进行分类学操作单元(operational taxonomic units, OTU)聚类,OTU 代表序列与 Silva 数据库进行比对分析,获取 OTU 对应的分类单元(包括门纲目科属种)及其相应的丰度信息。

采用 QIIME 和 R 语言绘制多样性指数分析、OTU 水平上的韦恩图和物种组成柱形图,对物种数据进行降维后,基于 Bray-Curtis 距离绘制主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)二维排序

图,以此进行 β 多样性分析,根据 β 多样性距离矩阵进行层次聚类。

2.3.2 稀释曲线和 OTU 分布 Venn 图的绘制与分析 各组稀释曲线图(图 2-a)表明,随着测序深度的增加,稀释曲线达到平缓,即增大样本容量,曲线变化也非常微小,说明测序数据量合理且足够大,能够满足后续分析要求^[14]。按照 97% 的相似水平下的进行 OTU 生物信息统计分析, Venn 图结果(图 2-b)显示,在 7 个时间段内,细菌共有 84 个 OTUs,真菌共有 63 个 OTUs。通过 OTUs 数目可知,发酵 6 h 的马蓝叶发酵液中细菌和真菌物种与其余 6 个时间段的物种具有明显差异。

2.3.3 马蓝叶发酵过程中微生物的 α 多样性分析 为考察马蓝叶浸泡发酵样品中微生物群落的丰富度

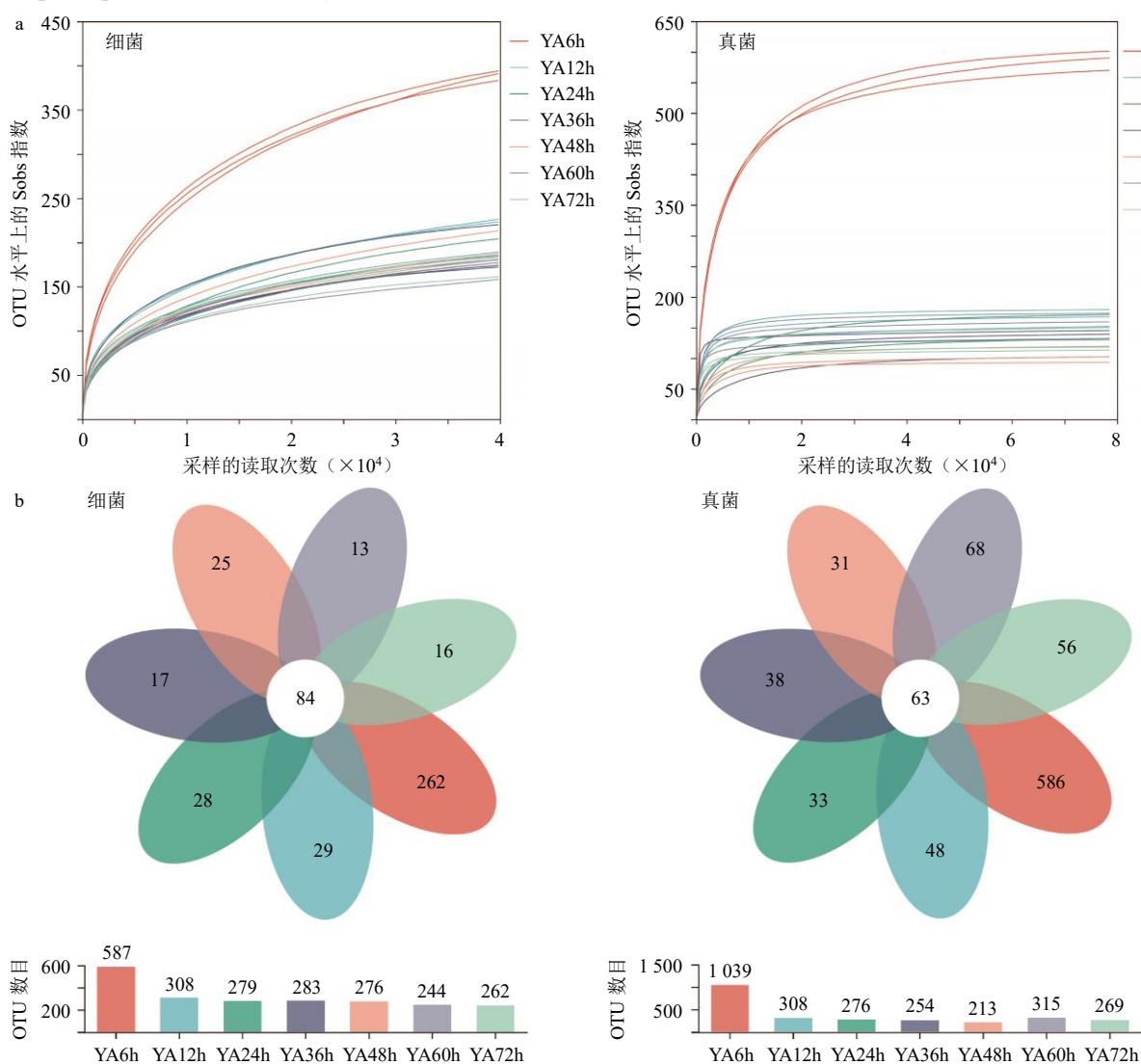


图 2 发酵液样本中微生物(细菌和真菌)测序数据的稀释曲线(a)和 OTU 分布 Venn 图(b)

Fig. 2 Dilution curves (a) and Venn diagrams of OTU distribution (b) of microorganisms (bacteria and fungi) sequencing data in fermentation broth samples

和多样性,对微生物数据进行 α 多样性分析。评价参数有 Coverage 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数^[17],结果见表 2。其中, Coverage 指数反映群落覆盖度,Chao1 指数反映群落丰富度, Shannon 指数值与群落多样性呈正相关,而 Simpson 指数值与群落多样性呈负相关^[13]。

研究结果表明,细菌和真菌的群落覆盖度

(Coverage 指数)均大于 99.99%,说明测序结果越能代表样本中微生物组成的情况。随着马蓝叶发酵时间的增加,6 h 的样品中菌群丰度最高,从发酵的第 12 小时起呈现出菌群丰度急剧下降后逐渐平缓的趋势(Chao1 指数)。发酵液样品中的真菌和细菌的均匀度均呈现先减少后增加的趋势(Shannon 指数和 Simpson 指数)。

表 2 马蓝叶发酵过程中微生物的 α 多样性指数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Alpha diversity index of microorganisms during fermentation process of *B. cusia* leaves ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	细菌				真菌			
	Coverage 指数/%	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Coverage 指数/%	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
YA6h	99.80	434.37 $\pm$ 27.57	3.35 $\pm$ 0.09	0.08 $\pm$ 0.01	99.96	600.88 $\pm$ 13.36	3.16 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.01
YA12h	99.87	265.00 $\pm$ 25.71**	2.66 $\pm$ 0.11*	0.14 $\pm$ 0.02	99.99	169.03 $\pm$ 12.98**	2.15 $\pm$ 0.15*	0.40 $\pm$ 0.05
YA24h	99.88	224.53 $\pm$ 24.32**	2.56 $\pm$ 0.12*	0.13 $\pm$ 0.02	99.99	150.30 $\pm$ 25.32**	1.28 $\pm$ 0.30	0.54 $\pm$ 0.09*
YA36h	99.90	210.33 $\pm$ 27.84**	2.66 $\pm$ 0.25	0.13 $\pm$ 0.03	99.99	132.77 $\pm$ 24.59**	2.36 $\pm$ 1.37	0.27 $\pm$ 0.23
YA48h	99.88	233.99 $\pm$ 16.94**	2.75 $\pm$ 0.09*	0.11 $\pm$ 0.01	99.99	107.81 $\pm$ 13.26**	1.28 $\pm$ 0.15*	0.50 $\pm$ 0.10*
YA60h	99.90	209.75 $\pm$ 8.38**	2.67 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	99.99	160.15 $\pm$ 13.68**	2.18 $\pm$ 0.30	0.36 $\pm$ 0.10
YA72h	99.90	210.77 $\pm$ 30.48**	2.72 $\pm$ 0.04*	0.00 $\pm$ 0.00	99.99	134.03 $\pm$ 27.65**	2.05 $\pm$ 0.29	0.39 $\pm$ 0.10

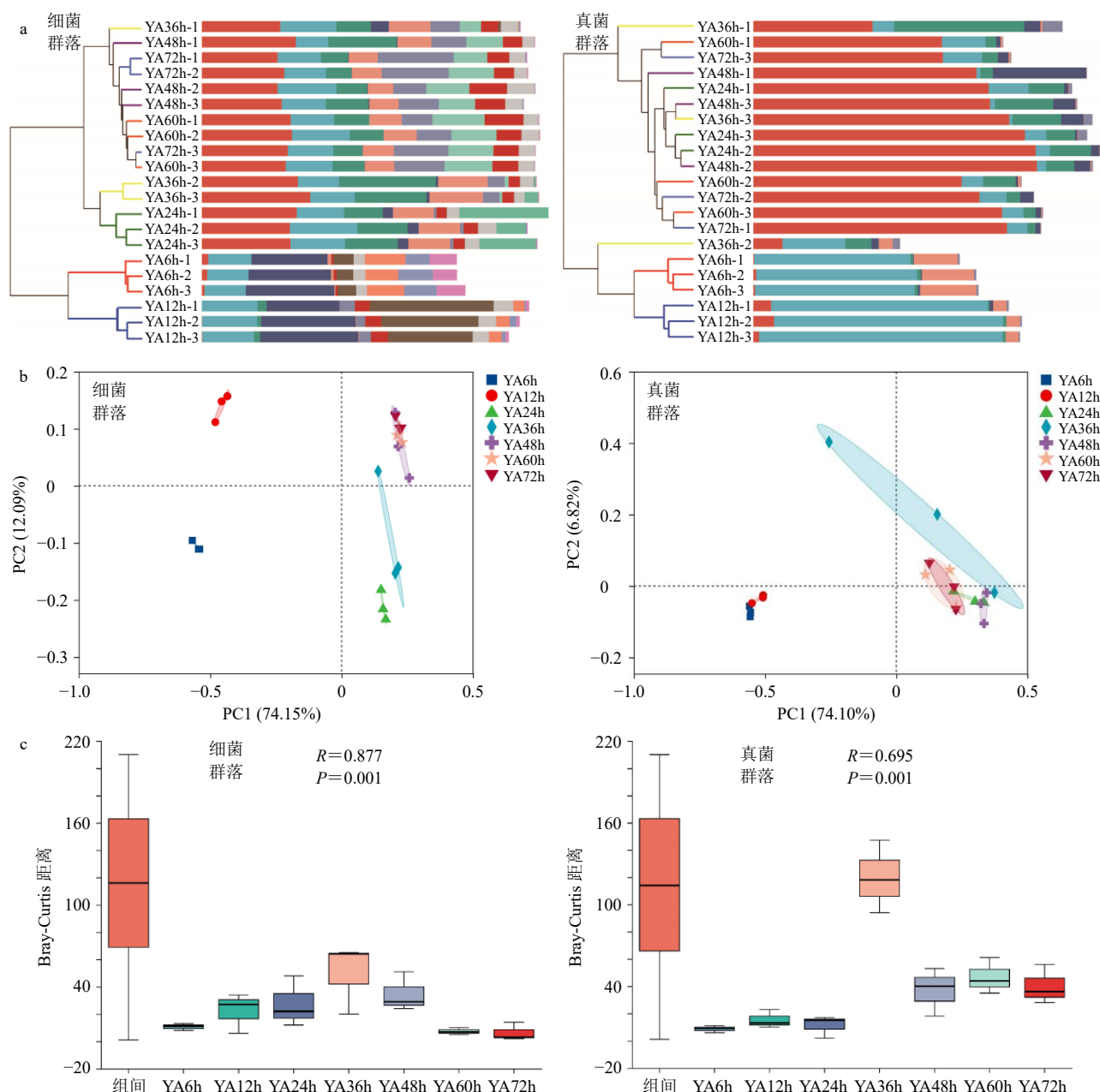
与 YA6h 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs YA6h.

2.3.4 马蓝叶发酵过程中微生物的 β 多样性分析
 基于 Bray-Curtis 距离的细菌和真菌群落层次的聚类分析结果如图 3-a 所示。发酵 6、12 h 的马蓝叶发酵过程样品中的细菌群落结构相似度较高,发酵 24、36、48、60、72 h 的马蓝叶发酵过程样品中的细菌群落结构相似,真菌的群落结构也呈现出相似的结果。这表明在发酵的 12 h 以后,发酵样品中的群落结构发生较大的变化,可能是因为随着发酵时间的进行,氧气消耗,好氧微生物减少,而厌氧微生物和兼性厌氧微生物增加。PCoA 结果表明(图 3-b), PC1 和 PC2 的累积方差贡献度为 86.24%,发酵 6、12、24、36 h 的马蓝叶发酵过程样品中的细菌群落组成存在差异,而发酵 48、60、72 h 的马蓝叶发酵过程样品中的细菌群落存在重叠现象,相似度较高。发酵 36 h 的样品中真菌的群落组成存在显著差异,发酵 6 h 与发酵 12 h,发酵 60 h 与发酵 72 h 样品中真菌群落的相似度较高, PC1 和 PC2 分别解释了群落结构方差的 74.1%和 6.8%。这表明在发酵后期,体系的菌落结构变化减小并趋于稳定。通过组间 Bray-Curtis 距离发现(图 3-c),随着发酵进行,发酵体系中细菌前 36 h 差异较大,从发酵 48 h 开始各组之间距离越来越远,表明细菌群落组成差异逐渐减小,相似度逐渐变高,这与 PCoA 结果一

致。而发酵体系中真菌的组间距离结果表现出与细菌相反的变化趋势。

2.3.5 马蓝叶发酵过程中细菌菌群结构分析
 发酵样品中,细菌在门水平上的菌落结构分布如图 4-a 所示,主要有厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)和放线菌门(Actinobacteriota),这与先前的研究结果一致^[7]。发酵第 12 小时后厚壁菌门开始增加,发酵至第 24 小时成为绝对优势菌门(66.21%),持续至 72 h 丰度基本不变(60.82%)。发酵至第 72 小时随着营养物质和氧气不断被消耗,细菌代谢不断产生有机酸,厌氧型的厚壁菌门能够存在于缺氧和高酸的生长环境,相对丰度增加^[7];拟杆菌门(Bacteroidota)细菌与厚壁菌门细菌发生竞争发育,适应生长后丰度维持稳定^[18]。细菌在属水平上,如图 4-c 所示,发酵过程中的优势菌属为梭状芽孢杆菌属 *Clostridium_sensu_stricto_1*、金黄色杆菌属 *Chryseobacterium*、肠杆菌属 *Enterobacter*、乳酸球菌属 *Lactococcus* 和肠球菌属 *Enterococcus*。随着马蓝叶发酵时间的延长,梭状芽孢杆菌属丰度先增加后减小,在第 48~72 小时变化平稳;金黄色杆菌属丰度逐渐减少;肠杆菌属的丰度变化平稳。乳酸球菌属随发酵时间的延长在 6~36 h 增加,在第 48 小



a-细菌、真菌的分层聚类; b-细菌、真菌的 PCoA 分析; c-细菌、真菌的 ANOSIM 分析。
a-Hierarchical clustering of bacteria and fungi; b-PCoA analysis of bacteria and fungi; c-ANOSIM analysis of bacteria and fungi.

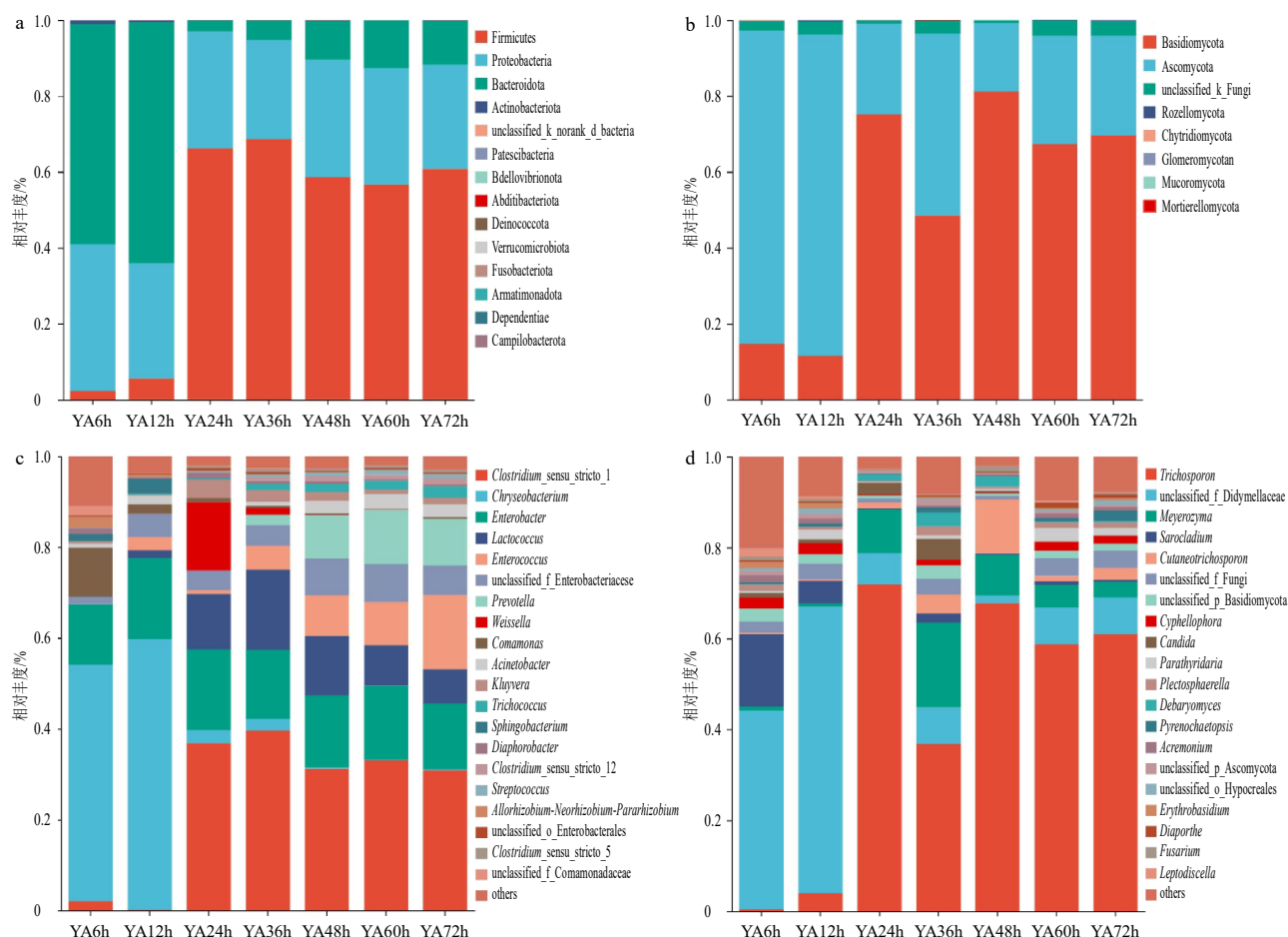
图 3 发酵液样品中微生物的 β 多样性分析

Fig. 3 Analysis of microbial β diversity in fermentation solution samples

时减少后并维持平稳。肠球菌属的丰度随发酵时间缓慢增加,在第 72 小时达到最大。

2.3.6 马蓝叶发酵过程中真菌菌群结构分析 发酵样品中,真菌在门水平上的主要菌落结构分布如图 4-b 所示,主要有担子菌门 (Basidiomycota)、子囊菌门 (Ascomycota) 和 unclassified_k_Fungi。担子菌门和子囊菌门在真菌中的总物种数中占比 80% 左右^[19]。研究结果表明,担子菌门丰度随发酵时间呈现“M”型变化趋势,子囊菌门丰度则呈“W”

型变化趋势, unclassified_k_Fungi 整体保持相对稳定。真菌在属水平上,如图 4-d 所示,随着发酵时间的延长,丝孢酵母属 *Trichosporon* 丰度先增加后减少,在 48 h 增加后并维持平稳; unclassified_f_Didymellaceae 属和帚枝霉属 *Sarocladium* 的丰度逐渐降低。季也蒙迈耶氏酵母属 *Meyerozyma* 的丰度随发酵时间增加,在 36 h 达到最大,在 48 h 减少后并维持平稳。皮肤孢菌属 *Cutaneotrichosporon* 的丰度在 6~48 h 增加,随后逐渐减小。 unclassified_f_



a, b-细菌、真菌在门水平上的相对丰度；c, d-细菌、真菌在属水平上的相对丰度。

a, b-relative abundance of bacteria and fungi at phylum level; c, d-relative abundance of bacteria and fungi at genus level.

图 4 发酵液样品中微生物的组成

Fig. 4 Composition of microorganisms in fermentation solution samples

Didymellaceae 属和帚枝霉属是好氧型真菌，氧气随着发酵时间不断被消耗，相对丰度降低。

2.4 微生物群落与理化参数之间的相关性分析

微生物群落与理化参数之间的相关性分析利用 SPSS 26.0 软件进行，运用 Origin 2021、Graphpad Prism 10.1 软件进行作图汇总。

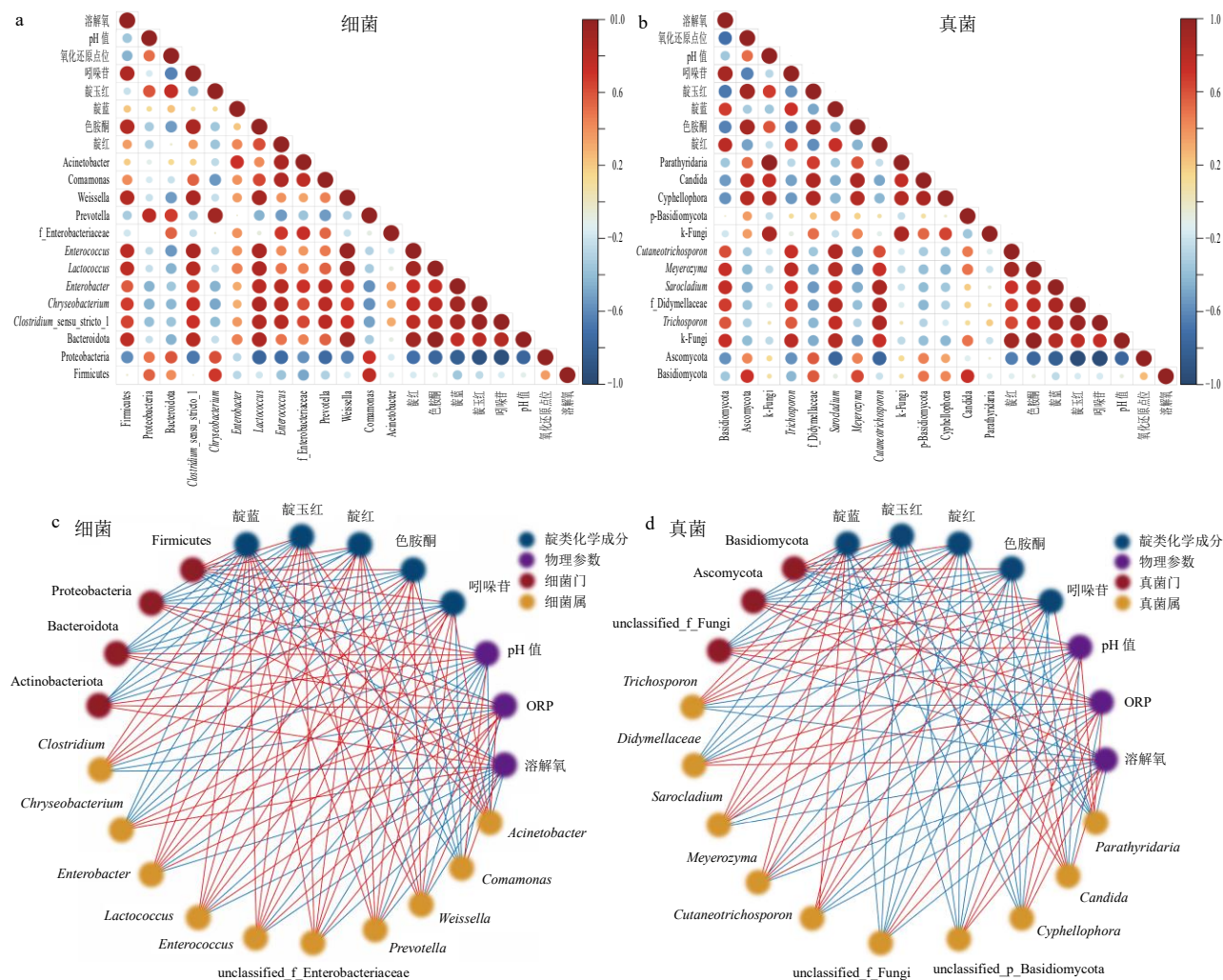
2.4.1 微生物群落与理化参数之间的相关性分析 对马蓝叶浸泡发酵过程中的理化参数和微生物群落进行 Spearman 相关性分析，结果见图 5。红线代表正相关，蓝线代表负相关。细菌与理化参数、靛类成分的相关性如图 5-a、c 所示，厚壁菌门与 pH 值、溶氧量、ORP 呈负相关，而变形菌门、拟杆菌门和放线菌门与之呈正相关，表明酸性环境和微氧状态可抑制部分细菌生长。

靛类成分与细菌的相关性分析结果表明，在门水平上：靛蓝、靛玉红、靛红、色胺酮、吲哚昔和厚壁菌门呈显著性正相关 ($P < 0.05$ 、 0.01)；在属水

平上：靛蓝、靛玉红、靛红以及色胺酮等与梭状芽孢杆菌属、乳酸球菌属、魏斯氏菌属呈显著性正相关 ($P < 0.01$)。此外，靛蓝、靛玉红还与肠球菌属、unclassified_f_Enterobacteriaceae 属和普雷沃氏菌属呈显著性正相关 ($P < 0.05$)，与金黄色杆菌属、丛毛单胞菌属呈显著性负相关 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

真菌与理化参数、靛类成分的相关性如图 5-b、d，担子菌门 pH 值、溶氧量、ORP 呈负相关，而子囊菌门与之呈正相关。靛类成分与细菌的相关性分析结果表明，在门水平上：靛蓝、靛玉红、靛红、色胺酮、吲哚昔和担子菌门呈显著性正相关 ($P < 0.01$)；在属水平上：靛蓝、靛玉红、靛红以及色胺酮等与丝孢酵母属、帚枝霉、皮肤孢菌属呈显著性正相关 ($P < 0.01$)。

2.4.2 细菌与真菌属之间的相关性分析 对马蓝叶发酵过程中相对丰度前 20 的细菌属和真菌属进行相关性分析，以相关性热图直观地展示菌群之间的



a, b-细菌、真菌与理化指标的相关性热图; c, d-细菌、真菌与理化指标的相关性网络图。

a, b-heat map of correlation between bacteria, fungi and physicochemical parameters; c, d-correlation network diagram between bacteria, fungi and physicochemical parameters.

图 5 发酵液样品中微生物与理化参数的相关性

Fig. 5 Correlation between microorganisms and physicochemical parameters in fermentation solution samples

生长相关性。由图 6 可知,梭状芽孢杆菌属与季也蒙迈耶氏酵母属、丝孢酵母属、皮肤孢菌属等呈较强正相关性,而与帚枝霉属、*unclassified_f_Didymellaceae* 等呈强负相关;金黄色杆菌属与丝孢酵母属、皮肤孢菌属等呈强负相关,与帚枝霉属、*unclassified_f_Didymellaceae* 等呈较强正相关;肠杆菌属与所有真菌没有显著相关性;乳酸球菌属与季也蒙迈耶氏酵母属、皮肤孢菌属、丝孢酵母属等呈强正相关性,与其他真菌呈负相关性。

结合前述马蓝叶发酵过程中微生物群落结构的动态变化规律,推测在发酵起点有较高密度的金黄色杆菌属抑制了包括丝孢酵母属、皮肤孢菌属等真菌的增殖,促进了 *unclassified_f_Didymellaceae* 等真菌的增殖生长。

2.4.3 物理指标与靛类成分的相关性分析 对马蓝叶发酵过程中的物理指标和关键靛类成分进行相关性分析。由表 3 可知,吲哚苷、靛红、色胺酮、靛蓝、靛玉红与 pH 值、ORP 以及溶解氧量均呈负相关。其中,吲哚苷、靛红、色胺酮、靛蓝、靛玉红与 pH 值、ORP 均呈显著性负相关 ($P < 0.01$)。这表明靛类成分的合成与积累高度依赖于发酵体系的酸碱平衡与氧化还原状态调控。

3 讨论

马蓝叶发酵过程中理化参数的变化遵循 2 阶段模式,物理指标呈快速变化后相对平稳,靛类成分呈快速增加后下降。pH 值和 ORP 均呈现显著降低后平缓的变化趋势,这与 Aino 等^[20]的研究结果一致。发酵前期, pH 值快速下降,这可能是由于马蓝

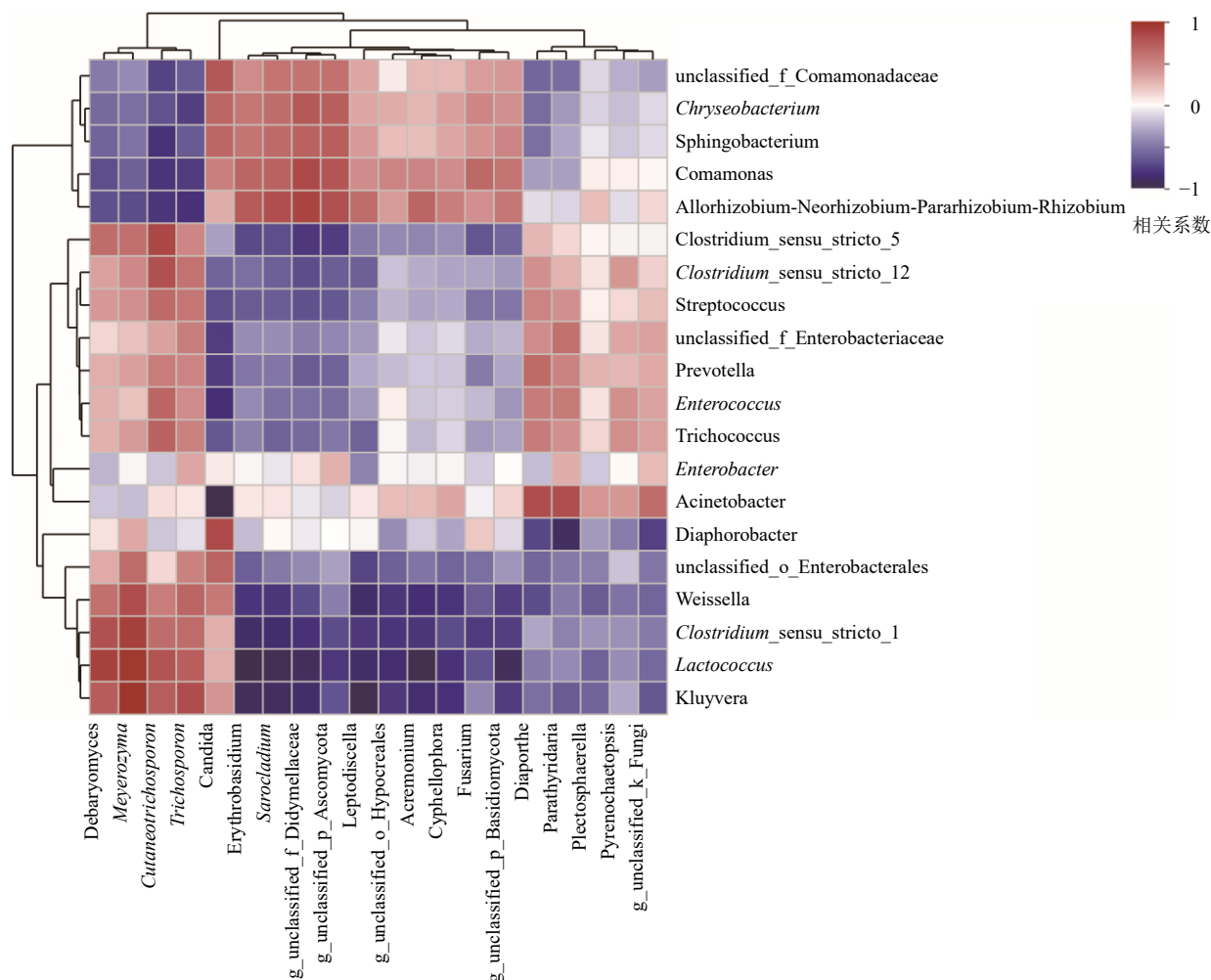


图 6 马蓝叶发酵过程优势细菌和真菌的相关性热图

Fig. 6 Correlation heat map of dominant bacteria and fungal in fermentation process of *B. cusia* leaves

表 3 发酵液样品中物理指标与靛类成分的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of physical indicators and indigoid compounds in fermentation broth samples

成分	pH值		ORP		溶解氧	
	斯皮尔曼相关性	显著性水平（双尾）	斯皮尔曼相关性	显著性水平（双尾）	斯皮尔曼相关性	显著性水平（双尾）
吲哚昔	-0.878**	0.000	-0.954**	0.000	-0.346	0.124
靛红	-0.740**	0.000	-0.624**	0.002	-0.292	0.199
色胺酮	-0.892**	0.000	-0.764**	0.000	-0.221	0.336
靛蓝	-0.891**	0.000	-0.846**	0.000	-0.390	0.080
靛玉红	-0.945**	0.000	-0.972**	0.000	-0.290	0.203

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 相关性显著。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, correlation is significant.

叶中吲哚昔和色氨酸等物质的溶出，同时，微生物代谢主导的酸化过程，产生有机酸等物质^[21]。发酵前期，发酵液样品的 ORP 急剧下降，从正电位变为负电位；可能原因是吲哚酚转化为靛蓝的过程比氧溶解过程快得多，使得发酵液中电子供体（吲哚酚）的可用性远远高于电子受体（氧）的可用性，导致 ORP 为负^[22]。发酵中期，发酵液样品的氧化电位呈

现弯曲的“U”型，可能与电子受体（氧）对电子供体（吲哚酚）的补偿有关^[22]。发酵后期，ORP 保持平缓，由溶氧量结果可知，后期处于微氧状态，电子供体（受体）枯竭，反应链终止，ORP 不再变化。靛蓝和靛玉红的含量变化均呈现先上升后下降的变化趋势，这与先前的研究结果一致^[7]。综上，理化参数的快速变化阶段表明发酵体系中微生物群

马蓝叶浸泡发酵过程中“微生物-理化参数”间存在潜在关系。发酵过程中的理化参数和细菌、真

综上,在发酵过程中微生物群落、物理指标和靛类成分的动态变化可能是驱动青黛有效成分转化的机制之一(图7)。发酵初期,马蓝叶以及水中自带的微生物分布于整个发酵体系。随着发酵时间的延长,发酵体系中的真菌、细菌等微生物将马蓝

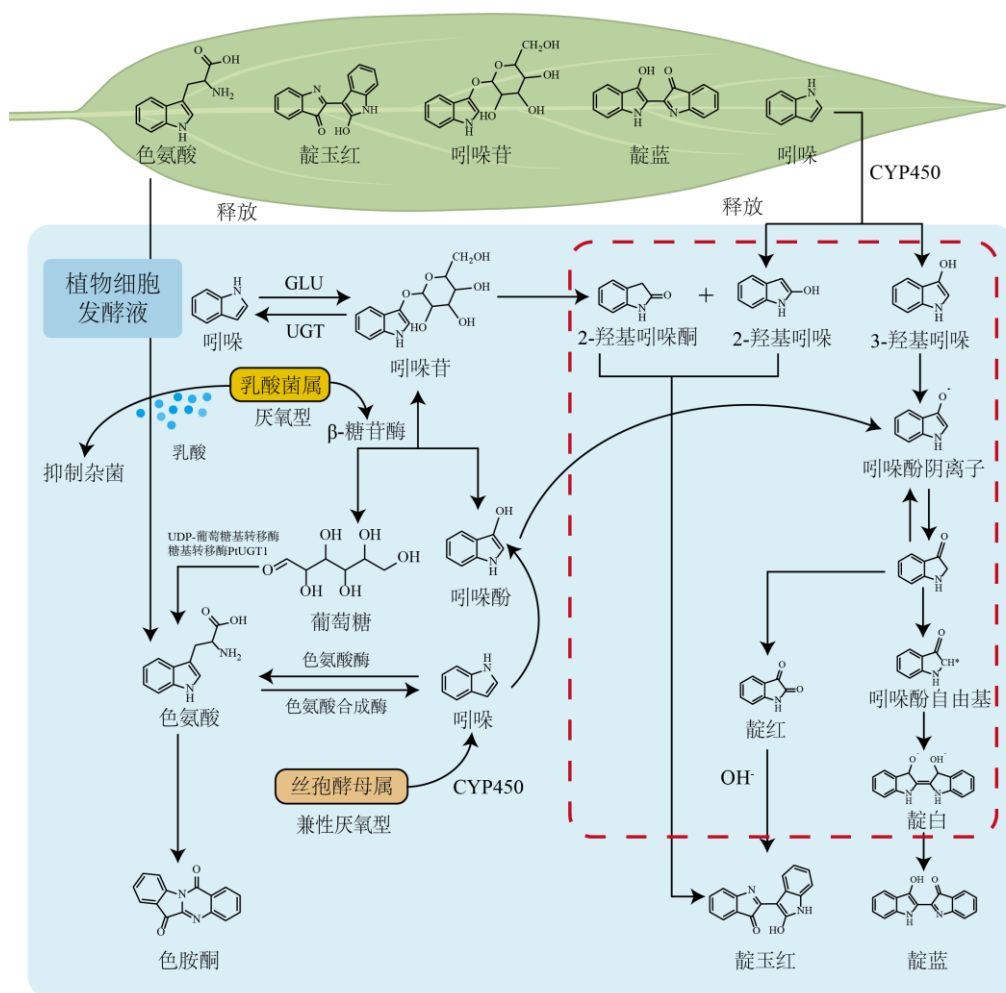


Fig. 7 Mechanism of soaking and fermentation process of *B. cusia* leaves

叶分解以获取其生存所需的碳源、氮源, 释放出马蓝叶中所含有的靛类成分和前体物质等。

靛蓝、靛玉红、色胺酮、吲哚等成分对部分微生物具有抑制或杀灭作用, 导致微生物群落为适应环境做出改变, 从而塑造发酵微生物群落结构的初态。发酵中期, 随着发酵的营养物质和氧气被微生物大量消耗, 乳酸菌属等为争夺生存空间会释放有机酸, 使环境 pH 值下降, 造成一些不能耐缺氧、耐酸的微生物受到抑制或消失。同时, 发酵体系中某些微生物为了改善其生存状态, 如丝孢酵母属、乳酸球菌属等会分泌一些降解或合成靛类成分的酶, 促进体系物质的转化。发酵体系中的前体物质如吲哚昔、吲哚等, 在微生物分泌的特异性酶作用下, 分解成吲哚酚; 吲哚酚在氧气作用下形成吲哚酚阴离子并进一步形成吲哚酚自由基或吲哚满二酮, 最终形成靛红、靛蓝、靛玉红等靛类成分。同时, 吲哚酚又能在微生物的帮助下可逆地性转化为吲哚昔, 且微生物还可利用植物中的还原糖合成色氨酸, 并将色氨酸进一步转化为吲哚, 或通过代谢色氨酸合成色胺酮^[6]。

发酵末期, 随着发酵进行, 微生物将氧气和营养物质消耗殆尽, 发酵速率下降, 靛蓝、靛玉红等靛类成分的产率降低, 发酵进程步入终点。在后续的实验, 有必要进一步研究关键菌属对靛类成分转化的分子机制, 从而验证微生物-理化参数的协同调控网络。

本研究首次以马蓝叶浸泡发酵过程中微生物-理化参数为切入点, 发现在发酵过程中的优势菌群中, 有 9 种细菌和 5 种真菌与靛类成分呈正相关。阐明了微生物群落结构与理化参数的动态耦合关系及阶段性互作规律, 同时明确微生物是靛类成分生物转化的核心驱动力, 并推测其通过代谢网络(如 β -糖苷酶降解及氧化还原调控)驱动吲哚昔水解与靛蓝合成的级联反应。但在浸泡发酵过程中, 关键菌株对理化参数的具体调控尚不明确, 因此, 需要进一步定向富集功能菌群, 验证微生物与成分之间的交互作用关系网络, 为青黛浸泡发酵的精准调控提供理论框架, 并为青黛传统炮制工艺的改良优化与工业化生产提供科学支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Yang Q Y, Zhang T, He Y N, *et al.* From natural dye to herbal medicine: A systematic review of chemical

constituents, pharmacological effects and clinical applications of *Indigo Naturalis* [J]. *Chin Med*, 2020, 15(1): 127.

- [2] Xie J, Huang Q, Xie H J, *et al.* Hyaluronic acid/inulin-based nanocrystals with an optimized ratio of indigo and indirubin for combined ulcerative colitis therapy via immune and intestinal flora regulation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 252: 126502.
- [3] 梁艳妮, 唐志书, 李璐含, 等. 基于高通量测序技术研究色胺酮对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(4): 380-387.
- [4] 马乐乐, 许润春, 张定堃, 等. 古今青黛饮片形式的变化: 靛花与粗靛质量的系统对比研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(13): 3188-3197.
- [5] 杨明, 刘泽玉, 苏柘瑾, 等. “蓝”类植物中的前体物质转化为“靛”的机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 928-931.
- [6] 杨明, 张定堃, 贺亚男, 等. 青黛产业高质量发展的挑战与策略 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(13): 3171-3179.
- [7] 贺亚男, 马乐乐, 吴意, 等. 青黛炮制浸泡发酵环节微生物群落结构与吲哚类成分转化研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(13): 3180-3187.
- [8] Srivastava N, Rathour R, Jha S, *et al.* Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversation for biofuels application [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(6): 220.
- [9] 阳泰, 王永宏, 徐非一, 等. 青黛微生物发酵工艺初步研究 [J]. 中成药, 2005, 27(8): 914-915.
- [10] 魏琪. 青黛炮制工艺改进及微生物在炮制过程中的作用研究 [D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [11] Lai Y P, Wang J, Xie N, *et al.* Dual role of MthAC-1 in regulating cellulase and xylanase production in *Myceliophthora thermophila* [J]. *Microb Biotechnol*, 2025, 18(8): e70203.
- [12] Sorour A A, Olama Z A, El-Naggar M Y, *et al.* Bioprocess development for extraction and purification of cellulases from *Aspergillus niger* 3ASZ using statistical experimental design techniques [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 242(Pt 1): 124759.
- [13] 赖晓微, 邓可众, 罗梦甜, 等. 真菌发酵对中药化学成分的转化及应用研究进展 [J]. 中国酿造, 2024, 43(6): 21-26.
- [14] 孙德娇, 范玉梅, 余金燕, 等. β -葡萄糖苷酶高产真菌的筛选、鉴定及其液体发酵条件优化 [J]. 中国饲料, 2025(13): 36-42.
- [15] 苏娟, 贺亚男, 杨鑫, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 和 HPLC-DAD 法研究不同干燥方式对马蓝叶化学成分的影响 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7374-7386.

- [16] 曾茜. 马蓝制靛工艺的优化及马蓝黑色素的制备 [D]. 南京: 南京师范大学, 2022.
- [17] Maughan H, Wang P W, Diaz Caballero J, *et al.* Analysis of the cystic fibrosis lung microbiota via serial Illumina sequencing of bacterial 16S rRNA hypervariable regions [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45791.
- [18] 胡炜东, 曹晓娟, 武俊英, 等. 发酵时间对燕麦青贮发酵品质和微生物群落的影响 [J]. 饲料研究, 2022, 45(17): 106-110.
- [19] He M Q, Cao B, Liu F, *et al.* Phylogenomics, divergence times and notes of orders in *Basidiomycota* [J]. *Fungal Divers*, 2024, 126(1): 127-406.
- [20] Aino K, Hirota K, Okamoto T, *et al.* Microbial communities associated with indigo fermentation that thrive in anaerobic alkaline environments [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2196.
- [21] Rao Y, Tao Y F, Li Y L, *et al.* Characterization of a probiotic starter culture with anti-*Candida* activity for Chinese pickle fermentation [J]. *Food Funct*, 2019, 10(10): 6936-6944.
- [22] Pattanaik L, Naik S N, Hariprasad P, *et al.* Influence of various oxidation parameter(s) for natural indigo dye formation from *Indigofera tinctoria* L. biomass [J]. *Environ Chall*, 2021, 4: 100157.
- [23] Light S H, Méheust R, Ferrell J L, *et al.* Extracellular electron transfer powers flavinylated extracellular reductases in Gram-positive bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(52): 26892-26899.
- [24] Light S H, Su L, Rivera-Lugo R, *et al.* A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria [J]. *Nature*, 2018, 562(7725): 140-144.
- [25] Tu Z H, Lopes H F S, Narihiro T, *et al.* The mechanism underlying of long-term stable indigo reduction state in indigo fermentation using *Sukumo* (composted *Polygonum tinctorium* leaves) [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 698674.
- [26] Elcheninov A G, Zayulina K S, Klyukina A A, *et al.* Metagenomic insights into the taxonomic and functional features of traditional fermented milk products from Russia [J]. *Microorganisms*, 2023, 12(1): 16.
- [27] Li L, Shin S Y, Lee S J, *et al.* Production of ginsenoside F₂ by using *Lactococcus lactis* with enhanced expression of β -glucosidase gene from *Paenibacillus mucilaginosus* [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(12): 2506-2512.
- [28] Zhang J Q, Wang Q F, Yu H M, *et al.* Metagenomic insights into protein degradation mechanisms in natural fermentation of cassava leaves [J]. *Bioresour Technol*, 2024, 396: 130433.
- [29] Wang Y Q, Wu J T, Lv M X, *et al.* Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 612285.
- [30] Singh J K, Devi P B, Reddy G B, *et al.* Biosynthesis, classification, properties, and applications of *Weissella* bacteriocins [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1406904.
- [31] Akapo O O, Padayachee T, Chen W P, *et al.* Distribution and diversity of cytochrome P450 monooxygenases in the fungal class *Tremellomycetes* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 2889.
- [32] Stündl U M, Schmidt I, Scheller U, *et al.* Purification and characterization of cytosolic cytochrome P450 forms from yeasts belonging to the genus *Trichosporon* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 357(1): 131-136.

[责任编辑 郑礼胜]