

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.09.008

微生物发酵法制备牛樟叶粗多糖研究*

张蓓¹, 余潇零², 万永艳¹, 张洪平¹, 梁学政^{1△}

(1. 广西壮族自治区柳州市中医医院, 广西 柳州 545026; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310000)

摘要:目的 优化牛樟叶粗多糖的微生物发酵工艺。方法 以粗多糖得率为指标,以菌种、发酵时间、发酵温度、接种量为考察因素,在单因素试验基础上采用 Box-Behnken 中心组合试验设计优化牛樟叶粗多糖的发酵工艺条件。结果 发酵的最佳工艺条件为发酵时间 2.23 d,发酵温度 25℃,接种量 6%。结论 该优化工艺稳定可靠,试验值与建立的模型预测值基本一致。

关键词:微生物;发酵法;粗多糖;Box-Behnken 中心组合试验;单因素试验;工艺优化

中图分类号:R932;R943

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)09-0027-04

Extraction of Crude Polysaccharides from *Cinnamomum Kanehirae* Leaves by Microbial Fermentation

ZHANG Bei¹, YU Xiaoling², WAN Yongyan¹, ZHANG Hongping¹, LIANG Xuezheng¹

(1. Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545026; 2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Zhejiang, China 310000)

Abstract: **Objective** To optimize the microbial fermentation conditions of the extraction of crude polysaccharides from *Cinnamomum kanehirae* Leaves. **Methods** With taking the yield of crude polysaccharide as the index, the bacteria strain, fermentation time, fermentation temperature and the inoculation amount of bacteria as the investigation factors, the fermentation conditions of crude polysaccharides from *Cinnamomum kanehirae* Leaves were optimized by Box-Behnken central composite design based on the single factor test. **Results** The optimum fermentation conditions were as follows: the fermentation time was 2.23 d, the fermentation temperature was 25℃, and the inoculation amount was 6%. **Conclusion** The optimized process is stable and reliable, and the experimental value is consistent with the predicted value of the established model.

Key words: microbial; fermentation; crude polysaccharides; Box-Behnken central composite design; single factor test; process optimization

牛樟 *Cinnamomum kanehirae* Hayata 是樟科樟属植物,为我国台湾特有,牛樟芝寄生于其腐朽内壁。牛樟芝在台湾民间被称为“森林中的红宝石”,是珍贵药用真菌,具有极高的研究和商业价值,价格昂贵,但始终不能形成产业化发展^[1-2]。牛樟叶水提物的成分研究结果表明,多糖成分含量极高,药效学试验表明,其酒精性肝损伤保护作用及抗衰老作用明显;传统的提取多糖的方法包括水提取、碱提取、酸提取、苯酚提取、微波辅助提取、超声辅助提取、酶提取等,但多糖提取率低,纯度不高,原料浪费严重,且影响多糖的结构分析和功效鉴定^[3-6]。用微生物法提取多糖,是利用微生物在生长过程中会利用其他营养物质但不利用多糖进行生长的特点,提取时对植物多糖进行去杂纯化,反应条件温和,且能耗少,提取率高^[7-8]。本研究中以期通过研究成果,为牛樟产业化发展提供参考,同时为发酵法制备中药材有效成分的可行性作进一步论证。现报道如下。

1 仪器、试剂与菌种

1.1 仪器

AL204/01 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公

司,精度为 0.1 mg);XMTD-8222 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);L5 型紫外分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 240 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试剂

牛樟叶由广西柳州市天姿园艺有限公司提供,由柳州市中医医院吴冰副主任药师鉴定为正品,标本保存于柳州市中医医院药学部标本室;苯酚(成都市科龙化工试剂厂,批号为 2017091401);硫酸(批号为 2020030501),无水乙醇(批号为 2020011402),均为分析纯,购于成都市科隆化学品有限公司;无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110833-201707,规格为 100 mg,含量≥99%)。

1.3 菌种

酵母菌[LWCC2012(ATCC9763)],枯草芽孢杆菌[LWCC1005(CMCC(B) 63501)],黑曲霉[LWCC2002(CMCC(F)98003)],均购于上海鲁微科技有限公司;米曲霉(上海保藏生物技术中心,编号为 AS3.951);马铃

*基金项目:国家自然科学基金[81460549];新疆维吾尔自治区自然科学基金[2017D01C169];浙江省基础公益研究计划项目[LQ19H290002];柳州市柳北科学技术局科技攻关与新产品试制项目[LB201801];柳州市阳和工业新区应用技术研究开发与科技创新项目[2019007]。

第一作者:张蓓,女,硕士,副主任药师,研究方向为中药品质评价及活性成分,(电子信箱)zhangbei8402@126.com。

△通信作者:梁学政,男,硕士,主任药师,研究方向为医院药学及中药品质评价,(电子信箱)liangxuezheng@163.com。

薯葡萄糖琼脂培养基(编号为 1074511),马铃薯葡萄糖液体培养基(编号为 1084331),均购于广东环凯微生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品处理

种子液制备:取菌种复苏液划线进行斜面培养(PDA),酵母菌和枯草芽孢杆菌 35℃培养 3 d,黑曲霉和米曲霉 25℃培养 5 d。各取 1 环接种至 50 mL 进行液态培养(PDB),酵母菌和枯草芽孢杆菌 35℃培养 3 d,黑曲霉和米曲霉 25℃培养 5 d,得种子液。

样品发酵:牛樟叶打粉,过 60 目筛,取 1 g,加 10 mL 水(以刚好浸润药粉为度)润湿,灭菌,接菌量 6%,发酵 1~8 d。

样品提取:发酵后,加水 40 mL,90℃水浴浸渍 76 min,抽滤,取滤液 10 mL,加无水乙醇使含醇量达 90%,静置过夜,抽滤,得粗多糖,加水溶解定容至 250 mL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取无水葡萄糖对照品 0.024 8 g,精密称定,加水定容至 250 mL,即得。

供试品溶液:牛樟叶打粉,过 60 目筛,取 1 g,加 10 mL 水(以刚好浸润药粉为度)润湿,灭菌,接菌量 6%,发酵 3 d,发酵后,加水 40 mL,90℃水浴浸渍 76 min,抽滤,取滤液 10 mL,加无水乙醇使含醇量达 90%,静置过夜,抽滤得粗多糖,加水溶解,定容至 250 mL,即得。

2.3 牛樟叶多糖含量测定

取 1.0 mL 供试品溶液,置 10 mL 比色管中,加 5% 苯酚溶液 1.0 mL,混匀,加浓硫酸 3.0 mL,90℃水浴放置 15 min,迅速冷却至室温,以水作空白对照,于 490 nm 波长处测定吸光度。

2.4 方法学考察

标准曲线建立:精密量取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别置 10 mL 具塞比色管中,分别加水至 1.0 mL,加 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速精密加入硫酸 3 mL,摇匀,置 90℃水浴中保温 15 min,取出,

迅速冷却至室温。以水作空白对照,于 490 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(X)为纵坐标、质量浓度(Y)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 5.9627X + 0.337$, $R^2 = 0.9992$ ($n = 2$)。

精密密度试验:取 2.2 项下对照品溶液(质量浓度为 0.099 2 mg/mL),连续进样 6 次。结果的 RSD 为 1.28% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:精密吸取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 时进样,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.55% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:平行制备同一批(批号为 20200204)样品 6 份,依法制备供试品溶液,进样测定 6 次。结果的 RSD 为 0.87% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取重复性试验项下样品 0.5 g,精密称定,共 6 份,加入适量对照品,依法制备供试品溶液,进样测定吸光度,并计算回收率。结果回收率为 99.05%, RSD 为 1.65% ($n = 6$)。

2.5 发酵条件单因素考察

菌种和发酵时间:对酵母菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉、米曲霉 4 个菌种(分别编号为 I-IV)进行筛选,测定各菌种发酵的粗多糖含量。称取牛樟叶 1 g,共 32 份,分为 4 组,每组 8 份。按 2.1 项下方法处理,每组接种不同菌种,接菌量均为 6%,35℃培养,每天从 4 组里取 1 份;按 2.1 项下方法处理,测定粗多糖含量,确定发酵菌种。结果米曲霉在发酵第 3 天的粗多糖含量最高,故确定米曲霉为发酵菌种。详见表 1。

发酵温度:根据菌种和发酵时间项下试验结果,选取最佳发酵菌种、发酵时间进行发酵,接菌量均为 6%,分别考察 25, 30, 35℃培养箱温度下,对粗多糖含量的影响,结果 25℃发酵温度下粗多糖含量最高。详见表 2。

接菌量:选取最佳发酵菌种、发酵时间、发酵温度进行发酵,考察接菌量分别为 4%, 6%, 8%, 10%, 即 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 对粗多糖含量的影响,结果接菌量为 6% 时粗多糖含量最高。详见表 3。

表 1 发酵菌种对粗多糖含量的影响

Tab. 1 Effect of fermentation strains on the content of crude polysaccharide

编号	取样量(g)				时间(d)	温度(℃)	接菌量(%)	粗多糖含量(mg/g)			
	I	II	III	IV				I	II	III	IV
1	1.005 6	1.031 0	1.150 8	1.023 0	1	35	6	50.05	59.72	9.65	50.41
2	1.015 9	1.110 0	1.007 7	1.041 1	2	35	6	57.26	55.85	21.03	62.02
3	0.910 3	1.014 5	1.058 4	1.075 0	3	35	6	49.05	47.13	24.16	81.61
4	1.017 6	1.001 3	1.057 6	0.969 1	4	35	6	58.92	51.40	27.89	43.63
5	1.023 2	0.981 4	1.059 6	0.989 0	5	35	6	37.29	36.46	28.27	38.41
6	0.915 7	0.980 1	1.060 6	0.975 5	6	35	6	53.25	33.09	28.05	40.77
7	0.962 8	0.929 8	1.047 5	0.966 9	7	35	6	41.87	38.35	29.18	42.08
8	1.100 1	1.028 6	1.071 9	1.054 1	8	35	6	41.50	44.72	28.57	43.32

表2 不同发酵温度对粗多糖含量的影响

Tab. 2 Effect of different fermentation temperatures on the content of crude polysaccharide

序号	取样量(g)	时间(d)	温度(℃)	接菌量(%)	粗多糖含量(mg/g)
1	1.084 0	3	25	6	48.99
2	1.007 6	3	30	6	43.07
3	1.034 9	3	35	6	34.23

表3 不同接菌量对粗多糖含量的影响

Tab. 3 Effect of different inoculation amount on the content of crude polysaccharide

序号	取样量(g)	时间(d)	温度(℃)	接菌量(%)	粗多糖含量(mg/g)
1	1.012 3	3	25	4	64.11
2	0.994 9	3	25	6	69.65
3	1.053 1	3	25	8	59.60
4	1.006 8	3	25	10	50.34

2.6 BBD 响应面法优化提取工艺条件

发酵工艺条件:根据单因素试验与 Box - Behnken 试验设计原理,以发酵时间(因素 A)、发酵温度(因素 B)、接菌量(因素 C)为自变量,以粗多糖含量为响应值,进行 Box - Behnken 试验,每组平行做 3 次。因素与水平见表 4。

表4 试验设计因素水平表

Tab. 4 Factors and levels of the experimental design

水平	因素 A(d)	因素 B(℃)	因素 C(%)
-1	2	25	6
0	3	30	8
1	4	35	10

回归模型建立及方差分析:参照 Box - Behnken 试验设计原理,以发酵时间(因素 A)、发酵温度(因素 B)、接菌量(因素 C)为自变量,粗多糖含量为响应值,进行试验。试验设计与结果见表 5。

表5 Box - Behnken 试验设计与结果

Tab. 5 The design and results of Box - Behnken test

序号	因素 A(d)	因素 B(℃)	因素 C(%)	粗多糖含量(mg/g)
1	4	30	6	30.27
2	3	30	8	41.57
3	3	30	8	45.24
4	3	30	8	38.57
5	3	30	8	39.79
6	4	25	8	36.74
7	3	25	10	60.85
8	3	25	6	47.65
9	2	35	8	37.78

参考文献[9],利用 Design Expert 8.0.6 软件对上表试验数据进行多元回归拟合,得牛樟叶粗多糖的含量(Y)与自变量发酵时间(A)、发酵温度(B)、接菌量(C)之间的二元多项回归方程 $Y = 40.67 - 6.06A -$

$4.96B + 4.99C + 0.89AB - 4.66AC + 0.60BC - 7.57A^2 + 5.04B^2 + 2.75C^2$ 。回归模型及方差分析结果见表 6。可知,该模型的 $Pr > F$ 值 = 0.003 6,失拟误差不显著($Pr > F$ 值 = 0.206 5 > 0.05),表明该模型的显著性高,回归方程对试验数据的显著性高,无失拟因素存在,回归方程对试验数据的拟合度良好。对粗多糖含量的影响大小顺序为发酵时间 > 接菌量 > 发酵温度。

表6 回归方程及方差分析结果

Tab. 6 Regression equation and results of ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F 值
模型	1 142.093 282	9	126.899 253 5	9.527 100 752	0.003 6
A	293.546 45	1	293.546 45	22.038 321 95	0.002 2
B	197.011 25	1	197.011 25	14.790 835 85	0.006 3
C	199.200 8	1	199.200 8	14.955 218 72	0.006 2
AB	3.150 625	1	3.150 625	0.236 536 63	0.641 6
AC	86.769 225	1	86.769 225	6.514 294 811	0.038 0
BC	1.428 025	1	1.428 025	0.107 210 544	0.752 9
A ²	240.981 084 5	1	240.981 084 5	18.091 919 43	0.003 8
B ²	107.155 800 3	1	107.155 800 3	8.044 839 326	0.025 2
C ²	31.836 316 05	1	31.836 316 05	2.390 146 373	0.166 0
残差	93.238 73	7	13.319 818 57		
失拟误差	60.109 45	3	20.036 483 33	2.419 187 297	0.206 5
纯误差	33.129 28	4	8.282 32		
总和	1 235.332 012	16			

响应面分析:利用 Design Expert 8.0.6 软件分别绘制各因素交互作用的响应面图。结果见图 1。等高线越接近椭圆形或响应面线越陡峭说明这 2 种交互因素对响应值的影响越显著;反之,不显著^[10-11]。由图 1 可知,发酵时间和接菌量的交互作用对粗多糖含量的影响最显著,发酵时间和发酵温度及发酵温度和接菌量的交互作用对粗多糖含量的影响不显著。

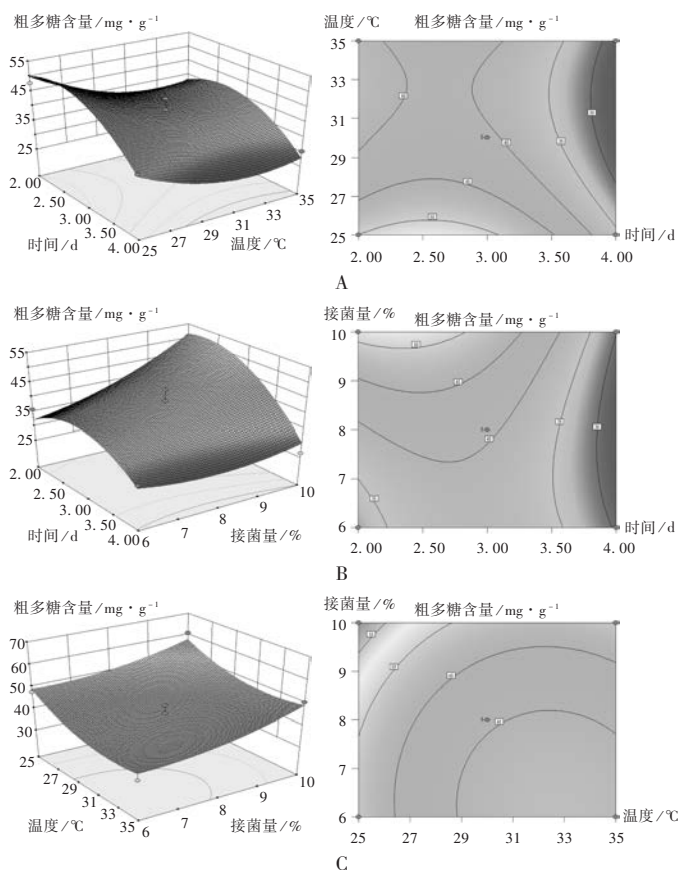
最优发酵工艺:通过 Design - Expert 8.0.6 软件优化得到的粗多糖最佳提取条件为发酵时间 2.23 d,发酵温度 25℃,接菌量 6%。

2.7 最佳提取工艺确定和验证试验

为验证响应面法所得结果的可靠性,对模型优化的工艺条件进行验证。考虑到试验的可行性与便捷性,选择工艺参数发酵时间为 2.5 d,发酵温度为 25℃,接菌量为 6%,试验 3 次,粗多糖平均含量为 64.354 7 mg/g。结果表明,回归方程与真实试验情况拟合度较好,优化的工艺可靠、可行。

3 讨论

植物、海洋生物及菌类等来源的多糖作为有生物活性的天然产物,有抗肿瘤、免疫、抗凝血、降血糖和抗病毒活性作用。植物多糖功能独特,毒性低,作为新药发展的方向具有广阔的应用前景^[12]。响应面法基于单因素



A. 发酵时间和发酵温度 B. 发酵时间和接种量
C. 发酵温度和接种量

图1 各影响因素间的交互作用对牛樟叶粗多糖含量影响的响应面图及等高线图

A. Fermentation time and temperature

B. Fermentation time and inoculation amount

C. Fermentation temperature and inoculation amount

Fig.1 Response surface diagram and contour map of the interaction of various factors on the extraction of crude polysaccharides from *Cinnamomum kanehirae* Leaves

试验基础上得到的点,并从这些点中获得完整、连续的面,再在面中获得最优值^[13]。因此,单因素的选择是该方法可行的关键因素。本试验中单因素的选取参考了大量的发酵工艺参数。

本研究中采用发酵法用于提取牛樟叶粗多糖,牛樟叶未经炮制,仅作灭菌处理后用生药试验。目前,多糖的提取方法主要有煎煮提取、超微粉碎提取^[14]、微波辅助提取^[15]等,且从物理变化上来改变提取率,很难提高提取率,始终不是最优的提取方法。发酵法提取是在原提取方法的基础上兼用化学方法作进一步改进,操作与原方法一样,有效地提高了提取率。

发酵法多用于食品工艺,较少运用在天然药物的提取,考虑到酵母菌能有效将植物淀粉转化为糖类成分,优先用单糖类成分作进一步发酵,只要有效控制发酵时

间,就能提高粗多糖的提取量。由于优先利用小分子糖类,有利于本课题下一步进行多糖类成分的富集及纯化研究。同时,经发酵法制备后的有效成分的药理学作用优于未经发酵的提取物^[16-18]。前期试验证明,发酵法制备牛樟叶粗多糖得率远高于未经发酵法提取的牛樟叶粗多糖得率,但药理活性需作进一步考证。

参考文献

- [1] 马晓蕾. 台湾红宝石-牛樟菇[J]. 中国商贸,2013(19):42-43.
- [2] 陈稳竹,钟建荣,杨善岩. 牛樟芝的研究现状·问题与展望[J]. 安徽农业科学,2018,46(27):25-28.
- [3] 张芳,郭盛,钱大玮,等. 枸杞多糖的提取纯化与分子结构研究进展及产业化开发现状与前景分析[J]. 中草药,2017,48(3):424-432.
- [4] 张艳荣,樊红秀,刘鸿铨,等. 人参多糖提取工艺优化及其组成分析[J]. 食品科学,2015,36(20):37-42.
- [5] 陈燕文,胡晶红,李佳,等. 金银花多糖提取、精制方法和药理活性综述[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(1):155-159.
- [6] 赵芷芊,王敏,张志清. 植物多糖的提取及抗氧化功效的研究进展[J]. 食品工业科技,2018,39(13):337-342.
- [7] 安全,许丹妮,李光敏,等. 微生物发酵法制备铁皮石斛多糖及抗氧化活性的研究[J]. 湖北农业科学,2017,56(10):1934-1937.
- [8] 刘平平,李萌,王昌涛,等. 仙人掌多糖发酵提取工艺优化及其抗炎功效研究[J]. 食品工业科技,2018,39(24):216-221.
- [9] JAKOBEK L, BOC M, BARRON AR. Optimization ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from apples[J]. Food Anal Methods,2015,8(10):2612-2625.
- [10] 李莉,张赛,何强,等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索,2015,34(8):41-45.
- [11] 户宪珍,杨长花,杨文娟,等. 响应面法优化超声辅助提取朱砂根中岩白菜素的提取工艺[J]. 西北药学杂志,2019,34(4):458-462.
- [12] 韦巍,李雪华. 多糖的研究进展[J]. 国外医学:药学分册,2005,32(3):179-184.
- [13] 金林,赵万顺,郭巧生,等. 响应面法优化白芍提取工艺的研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(15):2988-2993.
- [14] 张加梅,陈光芝,褚新红. 超微粉碎对提取葛根药材中总黄酮、多糖的影响[J]. 中国药业,2008,17(10):45-46.
- [15] 黄琨,黄少伟,池汝安. 微波辅助提取葛根多糖工艺研究[J]. 中国民族民间医药,2008,17(2):1-3.
- [16] 陈云,郁红礼,吴皓,等. 发酵对胆南星中胆汁酸类成分的影响及胆南星中3种游离胆汁酸含量测定研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(22):4457-4461.
- [17] 高晗,郭东会,张显忠,等. 黑曲霉发酵法辅助提取瞿麦黄酮及抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(32):142-143.
- [18] 陈妍言,李德贤,啟琪,等. 桑叶发酵前后提取液降血糖作用的研究[J]. 广东化工,2019,46(13):19-20.

(收稿日期:2020-05-28;修回日期:2020-09-11)