

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2021.4.06

解淀粉芽胞杆菌固态发酵当归培养基的研究

朱庆贺, 苗艳, 兰世捷, 陈亮, 尹琚伊, 黄宝银, 田秋丰, 张红, 史同瑞*

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江齐齐哈尔 161000)

[收稿日期] 2020-08-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 04-0044-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为筛选和优化解淀粉芽胞杆菌固态发酵当归培养基, 以当归多糖含量为指标, 采用单因素试验对当归固态发酵培养基成分筛选, 采用响应面分析试验对培养基组分进行优化。结果显示, 在所筛选成分中, 最适宜菌株发酵的固态培养基成分为当归、黄豆粉、碳酸钙和水。优化的固态发酵培养基各组分含量分别为: 当归 320.914 g/L、黄豆粉 109.918 g/L、碳酸钙 1.532 g/L、水 544.159 mL/L, 37 °C 发酵培养 72 h, 固态发酵物中的多糖质量分数达 24.91 mg/g。结果表明, 优化的当归固态发酵培养基适宜解淀粉芽胞杆菌生长, 易于多糖的释放, 所筛选的发酵培养基原材料符合固态发酵产业化生产条件要求。

[关键词] 当归; 解淀粉芽胞杆菌; 固态发酵当归培养基

Study on Angelica Medium for Solid Fermenting *Radix by Bacillus amyloliquefaciens*

ZHU Qing-he, MIAO Yan, LAN Shi-jie, CHEN Liang, YIN Jun-yi,
HUANG Bao-yin, TIAN Qiu-feng, ZHANG Hong, SHI Tong-ruì*

(Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China)

Corresponding author: SHI Tong-ruì, E-mail: systr@sina.com

Abstract: In order to screen and optimize medium for solid fermenting Angelica by *Bacillus amyloliquefaciens*, The components and compositions of angelica solid fermentation medium were screened and optimized by the single factor experiments, response surface methodology utilising the growth amount of bacteria and the polysaccharide as an indicators. In results, the optimum components of medium were angelica, soybean flour and calcium carbonate. The optimum medium was consisted of 320.914 g/L angelica, 109.918 g/L soybean flour, 1.532 g/L calcium carbonate and 544.159 mL/L water. The content of polysaccharide of *B. amyloliquefaciens* cultured in the optimised medium for 72 h at 37 °C was 24.91 mg/g. In conclusion, the optimized solid fermentation medium was suitable for the growth of *B. amyloliquefaciens*, polysaccharide release easily, materials conform to the requirements of industrial production conditions of solid fermentation.

作者简介: 朱庆贺, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为兽药及分子免疫。

通讯作者: 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

Key words: *Angelica*; *Bacillus amyloliquefaciens*; solid fermenting Radix

当归是一种具有补血活血、润肠通便、调经止痛等功效的常用中草药^[1]。其主要活性成分为藁本内酯、阿魏酸和当归多糖。在兽医临床中主要用于治疗猪、牛、羊的卵巢囊肿和子宫内膜炎,效果显著,也常作为中草药饲料添加剂用于改善动物生产繁殖性能^[2-4]。然而,当归中虽然含有众多的药物活性成分,但存在利用率较低的缺点,尤其在普通方法中药提取后所剩药渣中仍有较多活性成分残留。因此,有必要进一步改进当归相关活性成分的利用效率,提高活性物质的有效释放。

微生物发酵已被广泛报道可以有效提高中草药中主要活性成分的含量,甚至能够在发酵过程中产生新的活性物质^[5-6],这对于研究和开发新型绿色无公害饲料添加剂,新型中药的进一步开发甚至作为抗生素的替代品具有重要意义。解淀粉芽孢杆菌是一种好氧、易分离培养、抗逆性强的益生菌,可以提高饲料利用率,改善动物肠道微生物菌群结构。此外,解淀粉芽孢杆菌能够分泌多种酶类物质和抑菌活性物质,运用在中药发酵中能够帮助裂解细胞壁,从而有利于中药有效成分的释放^[7-8],研究利用已分离的一株解淀粉芽孢杆菌进行当归发酵,并以当归多糖含量为指标对固态发酵当归培养基的成分进行了筛选和优化,确定了固态发酵培养基的主要成分及添加比例。为后期兽用当归发酵产品的技术开发及工业生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 解淀粉芽孢杆菌 SSYB 株,由本单位微生物研究室分离并保存;当归粉(过 40 目筛),购自齐齐哈尔齐泰医药;蛋白胨,购自北京奥博星生物技术有限责任公司;葡萄糖、蔗糖、尿素等,购自齐齐哈尔恒辉化工。

1.2 试验仪器 UV-1900 PC/UV-1901 双束紫外可见分光光度计,上海佑科仪器仪表有限公司;TGL-16C 台式离心机,上海安亭科学仪器厂;MS104TS/02 电子天平,梅特勒-托利多(上海)有限公司。

1.3 种子液的制备 将贮存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的解淀粉芽孢杆菌(SSYB)解冻后划线于营养琼脂平板上,过夜培养后,从平板中挑取单菌落至 5 mL 营养肉汤培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,170 rpm 摇床活化 16~18 h 后,即制得种子液。

1.4 当归固态发酵培养基成分的筛选

1.4.1 碳源筛选 分别以 50 g/L 玉米粉、50 g/L 马铃薯淀粉、10 g/L 蔗糖、100 g/L 当归替代基础培养基(基础培养基:蛋白胨 20 g/L、葡萄糖 10 g/L、NaCl 5 g/L、当归粉 100 g/L)中的碳源葡萄糖,培养基中其他成分不变。取解淀粉芽孢杆菌种子液,以 2% 接种量分别接种替代培养基,同时以基础培养基作为对照。均置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静止培养 72 h,取样,按苯酚-硫酸显色法测定多糖质量分数,每个处理重复 3 次。

1.4.2 氮源筛选 分别以 10 g/L 尿素、50 g/L 黄豆粉、10 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 10 g/L NHCl 替代基础培养基中的氮源蛋白胨,培养基中其他成分不变。按照 1.4.1 中的方法培养、取样和测定多糖质量分数,每个处理重复 3 次。

1.4.3 无机盐筛选 分别以 2 g/L KH_2PO_4 、1.5 g/L 碳酸钙、2 g/L 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 和 0.2 g/L 硫酸锰替代基础培养基中的 NaCl,培养基中其他成分不变。按照 1.4.1 中的方法培养、取样和测定多糖质量分数,每个处理重复 3 次。

1.5 当归发酵培养基的优化

1.5.1 试验设计及结果分析 通过单因素试验筛选出当归粉、黄豆粉、碳酸钙和水为当归固态发酵培养基的组成成分,采用响应面中心组合的方法设计四因素三水平的响应面分析试验,优化当归固态发酵培养基中当归粉、黄豆粉、碳酸钙和水 4 个组分的配比量。各因素水平及编码见表 1,试验设计方案见表 2。用软件 Design Expert V 12 进行试验设计及数据分析,每个试验设置 3 组平行试验。

1.5.2 模型验证试验 将根据数据分析结果得到的最优化培养基和原始培养基,在相同的条件下进

行发酵培养,按 1.4.1 中的方法培养、取样和测定多糖质量分数,以验证预测结果的准确,每个试验设置 3 组平行试验。

表 1 Box - Behnken Design 试验因素和编码水平

Tab 1 Factors and levels for Box - Behnken Design

因素 (Factors)	编码水平		
	-1	0	1
当归粉质量浓度(A) Angelica concentration (g. L ⁻¹)	250	300	350
黄豆粉质量浓度(B) Soybean flour concentration (g. L ⁻¹)	80	100	120
碳酸钙质量浓度(C) Calcium carbonate concentration (g. L ⁻¹)	1	1.5	2
水体积分数(D) Water concentration (mL. L ⁻¹)	450	550	650

1.6 固体发酵当归中多糖含量的测定

1.6.1 标准曲线的绘制 选用苯酚 - 硫酸法进行测定。精密称取在 105 ℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 0.1 g 于 100 mL 的容量瓶中,加水定容至 100 mL 即得 1 mg/mL 葡萄糖对照品溶液,取 1 mg/mL 葡萄糖对照品分别制备为 5、10、20、40、60、80、100 μg/mL 葡萄糖对照品溶液。分别吸取 2 mL,加 5% 的苯酚 1 mL,混匀后迅速加 5 mL 浓硫酸,混匀后沸水中加热 15 min,放置室温后测量,以蒸馏水为空白,490 nm 测定吸光度值。

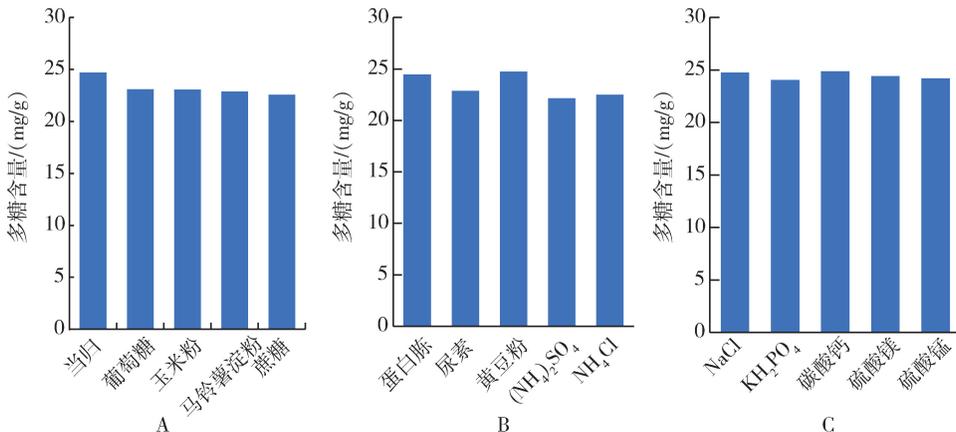


图 1 培养基成分筛选

Fig 1 Screening of medium components

1.6.2 样品溶液的测定 取 5 g 固态发酵培养物加 100 mL 水震荡浸泡 1 h,离心取上清后加无水乙醇至乙醇终浓度为 75%,室温静置 24 h 后离心收集沉淀加水定容至 500 mL,按照 1.6.1 中苯酚 - 硫酸法进行测定。

2 结果与分析

2.1 培养基成分的筛选

2.1.1 碳源筛选 试验结果如图 1 - A 所示,以当归为碳源的培养基中每克发酵物中多糖质量分数最高 (24.69 mg/g),然后依次是葡萄糖 (23.08 mg/g)、玉米粉 (23.05 mg/g)、马铃薯淀粉 (22.86 mg/g)、蔗糖 (22.56 mg/g)。因以当归粉为碳源进行发酵所得多糖含量最高,且本研究菌株旨在用于发酵中药,所以选用当归粉为碳源。

2.1.2 氮源筛选 试验结果如图 1 - B 所示,以黄豆粉为氮源的培养基中每克发酵物中多糖质量分数最高 (24.75 mg/g),然后依次是蛋白胨 (24.45 mg/g)、尿素 (22.87 mg/g)、NH₄Cl (22.50 mg/g)、(NH₄)₂SO₄ (22.15 mg/g),所以选用黄豆粉为氮源。

2.1.3 无机盐筛选 试验结果如图 1 - C 所示,以碳酸钙为无机盐的培养基中每克发酵物中多糖质量分数最高 (24.88 mg/g),然后依次是氯化钠 (24.76 mg/g)、硫酸镁 (24.43 mg/g)、硫酸锰 (24.21 mg/g)、KH₂PO₄ 最低 (24.04 mg/g),所以选用碳酸钙为无机盐。

2.2 当归发酵培养基的优化

2.2.1 试验设计及结果 在单因素的试验基础上,采用 Box - Behnken Design 方法设计四因素三水平的响应面分析试验,以多糖含量为响应值,以当归(A)、黄豆粉(B)、碳酸钙(C)和水(D)为四个考察因素进行响应面分析,试验设计及结果见表 2,共计 29 组试验,其中 Y 为每克固态发酵培养物中当归多糖的提取量(mg)。

表 2 Box - Behnken Design 试验设计及结果

Tab 2 Protocol and result of Box - Behnken Design

试验编号 Experimental NO.	因素 (Factors)				Y
	A	B	C	D	
1	-1	0	1	0	20.42
2	-1	0	0	-1	20.87
3	0	0	0	0	24.53
4	1	1	0	0	24.45
5	0	1	0	-1	23.66
6	-1	0	0	1	21.12
7	1	0	0	1	23.89
8	1	-1	0	0	22.02
9	-1	1	0	0	21.34
10	0	-1	0	1	21.87
11	-1	0	-1	0	21.42
12	0	-1	0	-1	22.73
13	0	0	1	-1	22.76
14	0	1	1	0	23.31
15	0	-1	-1	0	22.65
16	-1	-1	0	0	19.87
17	1	0	0	-1	23.94
18	0	0	0	0	24.44
19	0	0	-1	1	22.54
20	1	0	1	0	22.59
21	0	0	-1	-1	22.31
22	0	0	0	0	24.45
23	0	1	-1	0	23.28
24	0	0	0	0	24.47
25	0	0	0	0	24.60
26	0	0	1	1	22.23
27	0	1	0	1	23.35
28	0	-1	1	0	21.62
29	1	0	-1	0	22.27

2.2.2 数据处理 由表 3 可知,使用软件 Design Expert V 12 对上表中的试验结果进行分析,得回归方程: $Y = 24.5 + 1.18 * A + 0.7192 * B - 0.1283 * C - 0.1058 * D + 0.2400 * AB + 0.3300 * AC - 0.0750 * AD + 0.2650 * BC + 0.1375 * BD - 0.1900 * CD - 1.58 * A^2 - 0.8348 * B^2 - 1.18 * C^2 - 0.6948 * D^2$ 。其中, $R^2 = 0.9475$,说明该模型与实际拟合较好, A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对 Y 值影响均极显著($P < 0.001$),其余项影响均不显著。

2.2.3 响应面分析 由图 2、3 可知,通过 Design Expert V 12 软件作响应面图及等高线图,可直观地看出各因子对响应值的影响变化趋势。其中,图 1 中 A、B 两因素在所设中心点附近取值时 Y 值达到最大,图 2 中 C、D 两因素在所设中心点附近取值时 Y 值达到最大。在本研究水平范围内 Y 存在最大值,即等高线图标记的中心点。当 Y 值最大时,四个考察因素的浓度通过所得回归方程可求解,即:当归 320.914 g/L、黄豆粉 109.918 g/L、碳酸钙 1.532 g/L、水 544.159 mL/L。

2.2.4 模型验证试验 进行三次重复固态发酵后,固态发酵物中的当归多糖质量分数分别为 24.88、24.91 和 24.81 mg/g,平均值为 24.87 mg/g,与预测值相符。

2.3 固体发酵当归中多糖含量的测定

2.3.1 标准曲线的绘制 由图 4 可知,以 490 nm 为检测波长,测定各稀释度的葡萄糖对照品吸光度,以葡萄糖浓度($\mu\text{g/mL}$)为 x 轴,吸光值为 y 轴进行回归分析,得回归方程: $y = 0.0134x - 0.0417$, $R^2 = 0.9956$ 。结果表明,在 5 $\mu\text{g/mL}$ ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内,吸光度与浓度呈良好的线性关系。

2.3.2 样品溶液的测定 按照 1.6.1 中苯酚 - 硫酸法对样品进行吸光度测定,然后通过所绘制标准曲线的回归方程求得所测样品中葡萄糖浓度,结果见表 2,其中的 Y 值即为每克固态发酵培养物中当归多糖的提取量(mg)。

3 讨论与结论

解淀粉芽孢杆菌具有较强的产酶特性,可以合

表 3 二次回归模型方差分析结果

Tab 3 ANOVA results of factors for the quadratic regression model

来源(Source)	平方和(SUM of squares)	自由度(df)	均方(Mean square)	F 值(F-value)	P 值(P-value)	
Model	47.08	14	3.36	18.04	<0.0001	显著
A - A	16.16	1	16.61	89.13	<0.0001	
B - B	6.21	1	6.21	33.29	<0.0001	
C - C	0.1976	1	0.1976	1.06	0.3206	
D - D	0.1344	1	0.1344	0.7210	0.4101	
AB	0.2304	1	0.2304	1.24	0.2850	
AC	0.4356	1	0.4356	2.34	0.1486	
AD	0.0225	1	0.0225	0.1207	0.7334	
BC	0.2809	1	0.2809	1.51	0.2399	
BD	0.0756	1	0.0756	0.4057	0.5344	
CD	0.1444	1	0.1444	0.7746	0.3936	
A ²	16.16	1	16.16	86.71	<0.0001	
B ²	4.52	1	4.52	24.25	0.0002	
C ²	9.01	1	9.01	48.33	<0.0001	
D ²	3.13	1	3.13	16.80	0.0011	
残值(Residual)	2.61	14	0.1864			
失拟项(lack of fit)	2.59	10	0.2592	57.98	0.0007	显著
纯误差(pure Error)	0.0179	4	0.0045			
总离差(Cor Total)	49.69	28				

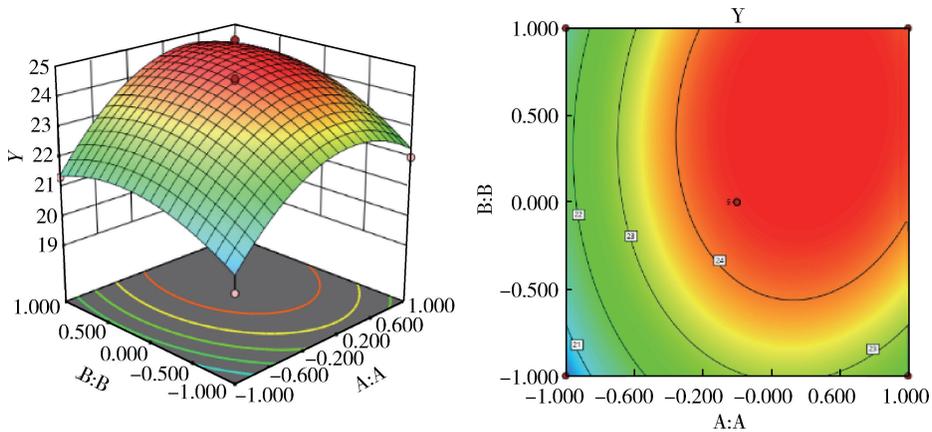


图 2 当归粉与黄豆粉交互响应面图及其等高线图

Fig 2 Response surface and contour plots for the effect between angelica and soybean flour

成多种纤维素酶,具有促进木质纤维素分解的能力^[10]。纤维素酶能够促进多种中药中有效成分释放,从而提高中药的提取率^[7]。侯美如等利用解淀粉芽胞杆菌对中药黄芪进行固态发酵,结果显示,

利用解淀粉芽胞杆菌固态发酵黄芪可显著提高黄芪各种有效成分的含量。从而提高了黄芪的利用率^[9]。研究应用本研究室所分离筛选到的一株产纤维素酶解淀粉芽胞杆菌(SSYB)发酵当归,旨在

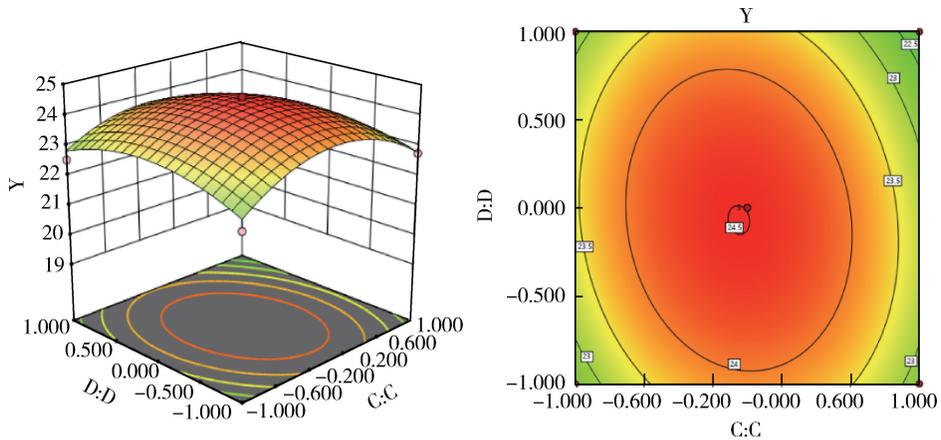


图 3 碳酸钙与水交互响应面图及其等高线图

Fig 3 Response surface and contour plots for the effect between calcium carbonate and water

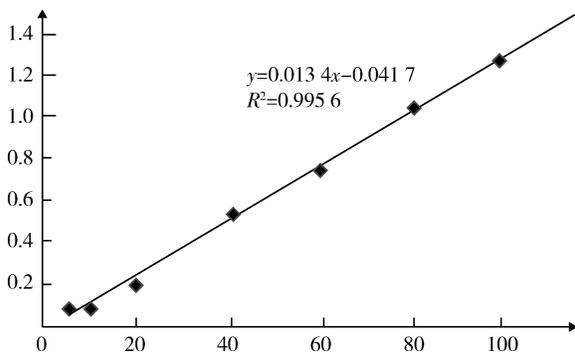


图 4 葡萄糖标准曲线

Fig 4 Glucose standard curve

为研发当归发酵中药奠定技术基础。

当归的主要活性成分为当归多糖,一般采用粗提、精提等多种分离技术,主要形式包括利用热水浸提法、微波萃取技术法、超声萃取法以及水煮醇沉法等进行提取^[1],本研究根据得量对比以及技术条件要求选择超声法进行了当归多糖的提取,结果表明,无论发酵前或是发酵后都能有效提取当归多糖,而且在经过筛选和优化后,发酵后的当归多糖得量质量分数达到 24.91 mg/g,即发酵后的当归多糖含量达到了发酵前当归多糖的 149.70%。发酵后当归多糖增加了接近 50%。证明解密芽孢杆菌发酵能够显著增当归中有效物质当归多糖的含量。

另外,目前用于发酵当归的菌种主要是灵芝菌,魏龙以当归为药性基质,灵芝为发酵菌种进行了双向发酵,确定灵芝-当归双向发酵菌质具有良

好的抗氧化活性,且较发酵前具有显著提高^[5],但该发酵方式时间较长,对 pH 和料层厚度都有一定要求,这就大大增加了时间成本、劳动成本和发酵难度。目前报道有将解淀粉芽孢杆菌用于中药黄芪发酵的报道,但尚未有用于当归发酵的报道。本研究选用在实际产业化生产中可实现的条件对当归进行发酵,所用培养基组分常见,所用发酵条件和方法简单易操作,更易于实现产业化,有广阔的应用前景。

研究根据解淀粉芽孢杆菌分离株的生物学特性以及研发目的,以当归粉、玉米粉、黄豆粉、尿素、碳酸钙、氯化钠等原材料为对象,采用单因素试验筛选拟用于当归产业化固态发酵的培养基组分,结果表明,当归粉、黄豆粉、碳酸钙和水是有利于当归发酵的高效成分。采用 Box - Behnken Design 试验优化的固态发酵培养基成分为当归 320.914 g/L、黄豆粉 109.918 g/L、碳酸钙 1.532 g/L、水 544.159 mL/L,表明在上述成分比例条件下,当归能够被最优发酵。

参考文献:

[1] 王英,张尚智,朱田田. 当归有效成分的提取与分析研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2016, 02(28): 75 - 78.
 [2] Wang Y, Zhang S Z, Zhu T T. Researches on the extraction and analysis of effective components of Angelica sinensis [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2016, 02(28): 75

-78.

- [3] 乔彦杰. 奶牛子宫炎早期预警及中药治疗对部分激素、子宫形态学的影响研究[D]. 石河子大学, 2019. 06.

Qiao Y J. Early warning of dairy cow uteritis and the study on the impact of traditional Chinese medicine on some hormone and uterine morphology in the treatment of Uteritis[D]. Shihezi University, 2019. 06.

- [3] 谢晓娟. 中草药添加剂对妊娠母羊生长性能、血液指标的影响[D]. 广西大学, 2014.

Xie X J. The effect of Chinese herb additive on the productivity and blood parameters of pregnant ewes [D]. Guangxi University, 2014.

- [4] 苗旭 史兆国 张玺, 等. 中草药饲料添加剂对畜禽繁殖性能影响的研究进展[J]. 中国草食动物科学 2020, 40(01): 42-48.

Miao X, Shi Z G, Zhang X, et al. Research progress on the effects of Chinese herbal Feed additives on the reproductive performance of livestock and poultry[J]. China Herbivore Science, 2020, 40(01): 42-48.

- [5] 魏龙. 灵芝-当归双向发酵条件优化及其抗氧化性研究[D]. 甘肃农业大学, 2014. 06.

Wei L. The Study on bi-directional fermentation condition optimization and antioxidant function of Gandoerma Lucidum - Angelicae Sinensis[D]. Gansu Agricultural University, 2014. 06.

- [6] 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.

Chen K Y, Gao Y, Hao B C, et al. Progress on probiotic fermentation traditional Chinese medicine [J]. Progress in Veterinary

Medicine, 2019, 40(12): 74-78.

- [7] 侯美如, 刘宇, 王岩, 等. 解淀粉芽孢杆菌固态发酵黄芪培养基的研究[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(10): 1328-1334.

Hou M R, Liu Y, Wang Y, et al. Study on medium for solid fermenting Radix Astragalus by Bacillus amyloliquefaciens[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 40(10): 1328-1334.

- [8] 夏超笃, 湛穗璋, 艾琴, 等. 一株解淀粉芽孢杆菌的益生特性及抑菌性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(2): 425-432.

Xia C D, Zhan H Z, Zhan H Z, et al. Study on the probiotic characteristics and antibacterial activity of a strain of Bacillus amyloliquefaciens [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(2): 425-432.

- [9] 侯美如, 刘宇, 王岩, 等. 解淀粉芽孢杆菌固态发酵黄芪中有效成分的变化[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(5): 64-68.

Hou M R, Liu Y, Wang Y, et al. Changes of effective components of Astragalus in the solid fermentation of Bacillus amyloliquefaciens [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(5): 64-68.

- [10] 戴圻霏, 张斯童, 孙旸. 解淀粉芽孢杆菌产纤维素酶及其酶解能力相关研究进展[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(10): 14-17.

Dai Q F, Zhang S T, Sun Y. Research progress on cellulase production by Bacillus amyloliquefaciens and its enzymatic efficacy [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(10): 14-17.

(编辑:陈希)