

响应面法优选 N-14 菌株发酵黄芪总多糖的工艺条件

郭云霞, 吴国江*, 魏萌, 韩愈杰, 刘月琴, 郝庆红
(河北农业大学, 河北 保定 071001)

[摘要] 目的:优化益生菌 N-14 发酵黄芪总多糖的工艺条件。方法:采用 UV 测定总多糖含量,检测波长 620 nm。在单因素试验基础上,以总多糖得率为响应值,底物添加量、发酵时间和灭菌时间为自变量,通过响应面试验优选黄芪总多糖发酵工艺。结果:最佳发酵条件为底物添加量 4 g,发酵时间 24 h,灭菌时间 15 min,pH 7,接种量 1%。黄芪总多糖得率 6.56%,与预测值 6.69% 偏差较小,较水提醇沉工艺的 4.17% 提高了 57.31%。结论:响应面分析法可用于优选益生菌 N-14 发酵黄芪的工艺条件,优选的工艺条件稳定可行,为该药材资源的充分利用提供参考。

[关键词] 益生菌; 发酵工艺; 黄芪; 总多糖; 响应面法

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0038-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050038

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1452.007.html>

[网络出版时间] 2015-01-12 14:52

Optimization of Strain N-14 Fermentation Process of Total Polysaccharides from Astragali Radix by Response Surface Methodology GUO Yun-xia, WU Guo-jiang*, WEI Meng, HAN Yu-jie, LIU Yue-qin, HAO Qing-hong (Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize fermentation conditions of total polysaccharides from Astragali Radix by probiotic N-14. **Method:** UV was adopted to determine the content of total polysaccharides with detection wavelength at 620 nm. Based on single factor tests, response surface methodology (RSM) was employed to optimize fermentation process of total polysaccharides from Astragali Radix with yield of total polysaccharides as response value and sterilization time, fermentation time, the amount of substrate as independent variables. **Result:** Optimum fermentation conditions were as follows: the amount of substrate 4 g, fermentation time of 24 h, sterilization time of 15 min, pH of 7, inoculation of probiotic 1%. Yield of total polysaccharides was up to 6.56%, which was lower than the predictive value of 6.69%, but 57.31% higher than yield of total polysaccharides (4.17%) by water extraction and alcohol precipitation process. **Conclusion:** RSM is suited to optimize fermentation process of Astragali Radix with probiotic N-14, this optimized process is stable and feasible, it provides a reference for utilization of this herb.

[Key words] probiotics; fermentation; total polysaccharides; Astragali Radix; response surface methodology

现代医学研究表明黄芪具有调节血糖含量、扩张冠状动脉、改善心肌供血、延缓细胞衰老的功效^[1],其主要有效成分之一为多糖类化合物^[2]。目前常采用水煮醇提法提取黄芪总多糖,但该法提取率低,造成了药材的极大浪费^[3-4]。而微生物发酵技术可使药材中活性成分充分释放,起到减毒、增效的作用^[5-6]。前期研究已从健康牛肠道中筛选获得了一株发酵黄芪性能优良的芽孢菌株 N-14。影响中药微生物发酵过程的因素较多,采用常规的优化方法较难得到响应最佳值。本实验以总多糖得率为

[收稿日期] 20140512(014)
[基金项目] 河北省教育厅项目(Z2012196)
[第一作者] 郭云霞,在读博士,从事益生菌菌剂开发研究,Tel:13831260893,E-mail:gyx310@163.com
[通讯作者] * 吴国江,硕士生导师,副教授,从事微生物与中药资源开发与利用等研究,Tel:13931223126,E-mail:wu-guojiang@126.com

因变量,在单因素试验基础上,采用响应面分析法优选黄芪的发酵工艺条件^[7-9],为该药材的资源开发与利用提供参考。

1 材料

HP8453 型紫外-可见分光光度计(美国惠普公司),LDZX-30KBS 型立式压力蒸气灭菌锅(上海申安医疗器械厂),MP200B 型电子天平(上海精密仪器仪表有限公司),HZP250 型全自动恒温振荡摇床(上海精红实验仪器设备有限公司),DH500AB 型培养箱(天津市泰斯特仪器厂),GM-21 型高速冷冻离心机(苏州精密仪器仪表有限公司)。

黄芪购自河北省安国市场,经河北农业大学吴国江教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;甲基营养型芽孢杆菌 N-14(自制,保存于河北农业大学生命科学学院),葡萄糖(苏州振成化工有限公司),营养琼脂(nutrient agar,NA)培养基^[10]和发酵培养基(黄芪粉 2 g,NaCl 5 g,水 50 mL,pH 自然)均为自制,水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 菌种种子液的制备 取 N-14 菌株斜面,接种于 NA 培养基中,置于 37 ℃,180 r·min⁻¹ 的摇床上培养 24 h,即得。

2.2 黄芪发酵液的制备 将发酵黄芪种子液接种于发酵培养基中,37 ℃摇床培养,即得。

2.3 总多糖得率的测定

2.3.1 总多糖的提取 发酵结束后,取发酵液 5 000 r·min⁻¹离心 10 min,上清液中加入 10 倍量 95%乙醇,放置过夜,离心(2 000 r·min⁻¹,10 min,下同),收集沉淀加水溶解,离心后过滤,滤液中加入 95%乙醇使乙醇体积分数达 80%,低温静置过夜,沉淀经 95%乙醇洗涤后真空干燥,干燥后粉末加水溶解至适当质量浓度,即得。

2.3.2 总多糖的含量测定 精密称取干燥至恒重的葡萄糖 0.1 g,配制成 0.1 g·L⁻¹的贮藏液。精密量取该贮藏液 0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置于具塞洁净试管内,各加水至 1.0 mL,置冰水浴中 5 min,迅速加入新鲜配制的 0.2% 蒽酮试剂 4.0 mL,沸水浴加热 10 min,迅速置冰水浴冷却 5 min,室温静置平衡 5 min,以第 1 管为空白,于 620 nm处测定吸光度(A),以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 3.8965C + 0.0688$ ($R^2 = 0.9993$),线性范围 0.02 ~ 0.1 g·L⁻¹。按 $(CV/M) \times 100\%$ 计算总多糖得率,式中 C 为总多糖

质量浓度,V 为样品溶液体积,M 为黄芪药材称样量。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 底物添加量 称取黄芪粉(过 80 目筛)1,2,3,4,5 g,分别置于 250 mL 锥形瓶中,各加入水 50 mL,无机盐 5 g,按 2% 接种量接种 N-14 菌株发酵,于 37 ℃,180 r·min⁻¹摇床培养 24 h,计算黄芪多糖得率依次为 2.90%,4.48%,3.19%,5.51%,3.87%,故确定底物添加量 4 g。

2.4.2 接种量 确定底物添加量 4 g,接种量取 1%,2%,3%,4%,5%,其他条件同 2.4.1 项,计算总多糖得率分别为 5.76%,5.93%,5.50%,5.74%,5.76%,表明接种量对总多糖得率影响不大。

2.4.3 发酵时间 采用优选的黄芪量和菌株接种量,发酵时间分别为 0,6,12,18,24,30,36 h,其他条件同 2.4.1 项,计算总多糖得率分别为 5.14%,3.92%,4.21%,4.89%,6.32%,5.38%,3.87%,故确定发酵时间 24 h。

2.4.4 pH 利用优选的条件发酵,将 pH 调整为 5,6,7,8,9,其他条件同 2.4.1 项,计算总多糖得率分别为 6.78%,5.52%,5.78%,6.47%,6.86%,说明 pH 对黄芪总多糖得率的影响较小,故选择发酵 pH 7。

2.4.5 灭菌时间 利用优选的条件发酵,灭菌温度 121 ℃,灭菌时间调整为 10,15,20,25,30 min,其他条件同 2.4.1 项,计算总多糖得率分别为 4.37%,6.48%,5.17%,5.06%,4.41%,故选择灭菌时间 15 min。

2.5 响应面试验分析 在单因素试验基础上,选取底物添加量、发酵时间、灭菌时间为自变量,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,以黄芪总多糖得率为响应值,设计三因素三水平的响应面分析试验,试验安排及结果见表 1。采用 Design Expert 7.0 软件拟合得回归方程 $Y = 6.50 + 1.12X_1 + 0.054X_2 + 0.60X_3 - 0.30X_1X_2 - 0.50X_1X_3 + 0.69X_2X_3 - 2.30X_1^2 - 1.41X_2^2 - 1.18X_3^2$ ($R^2 = 0.9912$),说明有 99.56% 响应值变化来自于所选的变量,调整系数 0.9799,说明各自变量间相关性很好,且模型失拟项不显著,说明此模型的拟合度和可信度较高,试验误差较小,该模型的方差分析见表 2。结果显示模型的影响极显著;一次项 X_1, X_3 ,交互项 X_1X_3, X_2X_3 及二次项 X_1^2, X_2^2, X_3^2 对发酵工艺影响均极显著,说明自变量对响应值的影响并不只是简单的线性关系。

表 1 黄芪总多糖发酵工艺响应面试验分析

Table 1 Response surface analysis of fermentation process of total polysaccharides from Astragali Radix

No.	X_1 底物添加量 /g	X_2 发酵时间 /h	X_3 灭菌时间 /min	总多糖得率 /%
1	4	26	20	5.41
2	5	26	15	3.68
3	3	24	20	2.74
4	3	24	10	0.97
5	5	24	10	4.32
6	5	24	20	4.08
7	4	22	20	4.04
8	3	22	15	1.32
9	5	22	15	4.05
10	3	26	15	2.13
11	4	26	10	2.41
12	4	22	10	3.79
13	4	24	15	6.59
14	4	24	15	6.67
15	4	24	15	6.42
16	4	24	15	6.53
17	4	24	15	6.30

表 2 黄芪总多糖得率二次项模型方差分析

Table 2 Variance analysis for quadratic term model of yield of total polysaccharides from Astragali Radix

方差来源	SS	F	MS	F	P
模型	56.41	9	6.27	87.67	<0.000 1
X_1	10.06	1	10.06	140.69	<0.000 1
X_2	0.02	1	0.02	0.32	0.587 4
X_3	2.86	1	2.86	39.95	0.000 4
X_1X_2	0.35	1	0.35	4.87	0.063 1
X_1X_3	1.01	1	1.01	14.13	0.007 1
X_2X_3	1.89	1	1.89	26.45	0.001 3
X_1^2	22.20	1	22.20	310.50	<0.000 1
X_2^2	8.38	1	8.38	117.26	<0.000 1
X_3^2	5.85	1	5.85	81.80	<0.000 1
残差	0.50	7	0.07		
失拟项	0.42	3	0.14	6.58	0.050 1
误差项	0.08	4	0.02		
总合	56.91	16			

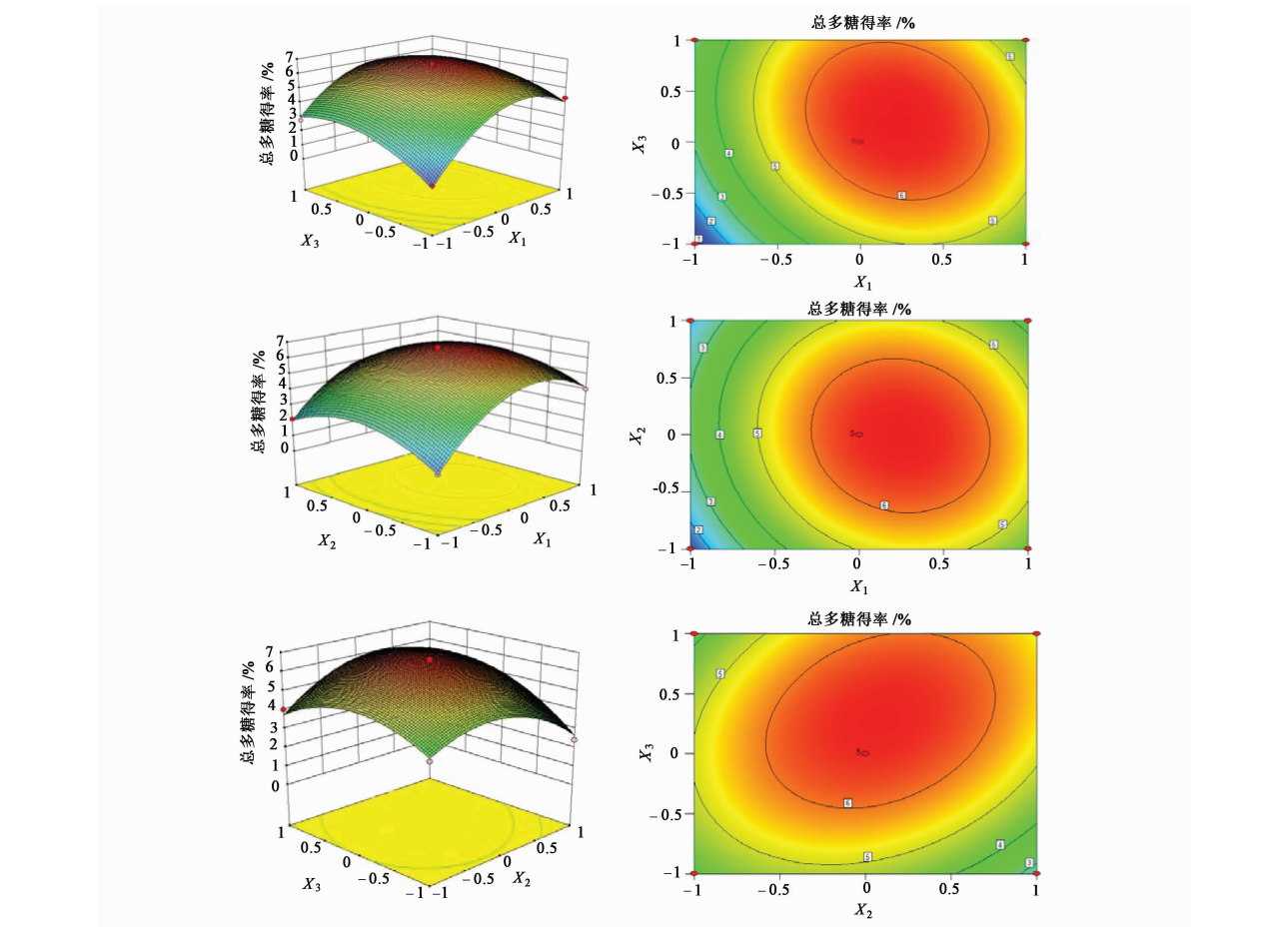


图 1 底物添加量、灭菌时间和发酵时间相互作用对黄芪总多糖得率影响的响应曲面和等高线
Fig.1 Contour line and response surface of interaction of different factors on yield of total polysaccharides from Astragali Radix

回归方程得到的响应曲面图及等高线见图 1。结果显示底物添加量约 4 g 和灭菌时间约 16 min 时,总多糖得率有极值;发酵时间约 24 h 和底物添加量约 4 g 时,总多糖得率有极值;灭菌时间约 16 min和发酵时间约 24 h 时,总多糖得率有极值。响应值最大为 6.69%,对二次回归拟合方程求一阶偏导数,得最优试验点为 $X_1 = 4.22$, $X_2 = 24.10$, $X_3 = 16.11$,考虑生产实际考虑,将最佳条件调整为底物添加量 4 g,发酵时间 24 h,灭菌时间 15 min。

2.6 验证试验 在其他条件不变的情况下,调整底物添加量、发酵时间、灭菌时间为优化条件,进行 3 组验证试验,结果黄芪总多糖得率平均值 6.56% (RSD 1.3%),比预测值低 0.13%,误差很小,说明此模型优选的发酵工艺稳定可行。

3 讨论

药材中多糖类、苷类、黄酮类等物质可为微生物的生长提供营养,同时微生物可促进中药有效成分的溶出,通过微生物转化可产生药理学作用的次级代谢产物,达到提高药效、降低毒副作用的目的。微生物在生长代谢过程中,可产生蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶等几十种胞外酶,具有降解细胞壁作用,可促进中药有效物质的溶出^[11-13]。目前报道的中药发酵菌种主要是从自然界中分离得到的真菌和细菌,对于数量庞大的微生物而言,这仅是其中的一小部分,因此开发利用新的菌种去发酵中药具有极大的研究空间。本文从牛肠道中筛选出 N-14 对黄芪进行发酵,能显著提高黄芪总多糖的得率,为菌株的工业化生产提供技术支持。采用响应面法^[14-17]优选益生菌 N-14 发酵黄芪的工艺条件,较常规提取的得率(4.17%)提高了 57.31%,优化效果显著。

[参考文献]

[1] Bedirl E, Pugh N, Calis L, et al. Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from astragalus species[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (7) : 834-837.

[2] 李世传. 黄芪多糖的研究进展及其在饲料中的应用[J]. 饲料广角, 2013 (21) : 37-38, 49.

[3] 王琳琳. 黄芪有效成分提取工艺研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009.

[4] 李万玉, 李安荣, 徐晓玉, 等. 黄芪多糖的提取方法[J]. 中国药业, 2009, 18 (11) : 87-88.

[5] 沈爱英, 谷文英. 复合酶法提取姬松茸子实体多糖的研究[J]. 食用菌, 2001 (3) : 7-9.

[6] 张普照, 杨丽娟, 侯志帆, 等. 雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (10) : 59-62.

[7] 陈敬, 温庆果, 刘韶, 等. 正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究[J]. 中草药, 2012, 43 (11) : 2183-2188.

[8] Trupkin S., Levin L, Forchiassin F, et al. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2003, 30 (12) : 682-690.

[9] 林建原, 季丽红. 响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J]. 中国食品学报, 2013, 13 (2) : 83-90.

[10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001 : 349-388.

[11] 杨吉霞, 蔡俊鹏, 祝玲. 纤维素酶在中草药成分提取中的应用[J]. 中药材, 2005, 28 (1) : 64-67.

[12] Hagiwara Y, Iwasaki T, Asanuma H, et al. Effects of intranasal administration of cholera toxin (or Escherichia coli heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain[J]. Vaccine, 2001, 19 (13/14) : 1652-1660.

[13] 王广, 杨景云, 李丽秋, 等. 用微生态的观点看中药有效成分在肠道的生物转化[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21 (7) : 659-661.

[14] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27 (1) : 38-41.

[15] Ferreira S L, Bezerra M A, Neto B X, et al. Application of doehlert designs for optimisation of an online preconcentration system for copper determination by flame atomic absorption spectrometry[J]. Talanta, 2003, 61 (3) : 295-303.

[16] Contesini F J, Barros F F, Maciel R F, et al. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from Aspergillus niger by solid-state fermentation[J]. J Microbiol, 2009, 47 (5) : 563-571.

[17] 田洪源, 李瑞芳. 响应面法在生物过程优化中的应用[J]. 食品工程, 2010 (2) : 8-11.

[责任编辑 刘德文]