

不同菌种发酵前后三七药渣中多糖的含量变化

黄纯莹^{1,2}, 侯小涛^{1,2,3*}, 杜正彩^{1,2,3}, 李永华^{1,4}, 邓家刚^{1,2,3}, 李星赞¹

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200; 3. 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心, 南宁 530200; 4. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

摘 要: 目的 比较三七药渣经过不同菌种固态发酵前后多糖的含量变化, 为三七药渣综合开发利用提供研究基础。**方法** 培养不同菌种, 制备相应的孢子或菌体悬液。固态发酵三七渣后低温干燥; 通过水提醇沉法提取发酵前后三七药渣中多糖, 并采用 Sevag 法除蛋白, 用苯酚-硫酸法测定三七药渣发酵前后多糖的含量。

结果 固态发酵三七渣后, 单一菌种发酵三七渣后多糖含量最高为巨大芽孢杆菌, 黑曲霉 3 次之, 多糖含量分别为 12.36% 和 11.65%, 发酵后三七药渣中多糖的含量比发酵前分别提高了 5.74% 和 5.03%; 混合菌种发酵三七渣后多糖含量最高为黑曲霉 1 和酿酒酵母共同发酵, 多糖含量为 14.09%, 发酵后三七药渣中多糖的含量比发酵前提高 7.47%。**结论** 采用菌种固态发酵技术发酵三七药渣能提高三七药渣中多糖的含量。

关键词: 三七药渣; 多糖; 固态发酵

Changes of polysaccharide content in *Panax notoginseng* residue before and after fermentation with different strains

HUANG Chun-Ying^{1,2}, HOU Xiao-Tao^{1,2,3*}, DU Zheng-Cai^{1,2,3}, LI Yong-Hua^{1,4},
DENG Jia-Gang^{1,2,3}, LI Xing-Zan¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medical, Nanning 530200, China; 3. Guangxi Collaborative Innovation Center of Study on Functional Ingredients of Agricultural Residues, Nanning 530200, China; 4. College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT: Objective To provide research basis for the comprehensive development and utilization of the residue of *Panax notoginseng* by comparing the content of polysaccharide in the residue of *Panax notoginseng* before and after solid fermentation with different strains. **Methods** Different kinds of bacteria, were cultured and the corresponding spores or suspension of bacteria were prepared. After solid fermentation, the residue of *Panax notoginseng* was dried at low temperature. Polysaccharides from the residue of *Panaxnotoginseng* were extracted by water extraction and alcohol precipitation method, and protein was removed by Sevag method. The content of polysaccharides was determined by phenol-sulfuric acid method. **Results** The highest content of polysaccharide in the residue of *Panax notoginseng* after solid fermentation with the single strain was fermented by *Bacillus megaterium*, followed by *Aspergillus niger* 3, with the content of polysaccharide 12.36% and 11.65% respectively and the the content of polysaccharide in the residue of *Panax notoginseng* after fermentation was 5.74% and 5.03%

基金项目: 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心项目(CICAR 2017-Z2)、广西中药药效研究重点实验室项目(17-259-20)

Fund: Supported by Collaborative Innovation Center of Research on Functional Ingredients from Agricultural Residues (CICAR 2017-Z2) and Guangxi Key Laboratory Project of TCM Pharmacodynamics Research (17-259-20)

*通讯作者: 侯小涛, 教授, 主要研究方向为中药活性成分及质量控制研究。E-mail: xthou@126.com

*Corresponding author: HOU Xiao-Tao, Professor, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, 13 Wuhe Avenue, Qingxiu district, Nanning 530021, China. E-mail: xthou@126.com

respectively higher than that before fermentation. The highest polysaccharide content after co-fermentation was 14.09%, which was fermented by *Aspergillus niger* 1 and *Saccharomyces cerebraiae*, which was 7.47% higher than that before fermentation. **Conclusion** The content of polysaccharide in the residue of *Panaxnotoginseng* can be increased by solid fermentation.

KEY WORDS: *Panax notoginseng* residue; polysaccharides; solid fermentation

1 引言

三七是五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) f. H. Chen 的干燥根及根茎。又名田七、田三七、滇三七、参三七、血参等, 主要产地是云南、广西和四川等地。三七味甘、微苦, 性温, 主归肝、胃、大肠经, 主要传统功效为散瘀止血、消肿定痛和补虚等功效, 主治咯血、吐血、补血、衄血、便血、崩漏、外伤出血和跌打肿痛等^[1]。现代药理研究发现三七在血液系统、免疫系统、神经系统和心脑血管系统等方面都具有显著的药理活性, 广泛用于治疗血栓、冠心病、心绞痛和糖尿病等病^[2]。三七是云南白药、复方三七口服液、片仔癀、血栓通、复方丹参滴丸和三七血伤宁胶囊等常见中药制剂的主要配方成分之一, 其主要有效成分为皂苷类化合物和三七素。三七一般药厂只提取三七总皂苷, 剩下的药渣被作为废弃物丢弃, 但这些三七药渣中还残留有多糖、黄酮、淀粉、粗蛋白、氨基酸及挥发油等活性成分^[3,4]。三七多糖是由阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖等 3 种单糖组成的大分子物质^[5]。研究表明, 三七多糖具有抗肿瘤、降低血糖、免疫调节、抗衰老、抗氧化、保护生殖系统及保肝能力等多种药理活性^[6]。三七多糖不仅是开发新药的重要药物中间体, 功能性保健食品的天然原料, 而且还可作为化妆品的活性原料^[7], 具有极大的开发潜力。

中药药渣中因含有微生物生长繁殖所需的碳源、氮源、生长因子、无机盐等营养物质, 常作为发酵基质用于固体发酵或液体发酵中^[8]。三七渣中除了含有多种生物活性小分子外, 还含有大量的三七多糖、皂苷等生物活性成分, 还有淀粉、粗蛋白、氨基酸、脂肪酸、维生素及微量元素等多种营养组分, 可以作为固态发酵培养基进一步开发利用^[9,10]。真菌固态发酵技术是利用微生物及其产生的酶类用于中药材成分进行生物转化, 具有促进有效成分析出、增加疗效减少毒性以及产生新的活性成分等优点^[11]。本研究将真菌固态发酵技术用于三七药渣, 用苯酚-硫酸法测定三七药渣发酵前后多糖的含量并比较不同菌种发酵前后三七多糖的含量变化, 为三七药渣的综合利用以及相关保健食品的研发提供研究基础。

2 材料与方法

2.1 药品与试剂

三七药渣(梧州中恒集团制药厂血栓通三七渣, 药渣

对应药材批号为 A019C1402040, A019C1505150, A019C1401020, 药渣经 65 °C 干燥至恒重); 黑曲霉 1、酿酒酵母、紫色红曲霉、金地灵芝(成都信息工程学院资源环境学院); 黑曲霉 2、黑曲霉 3、棘孢木霉、巨大芽孢杆菌(中国农业微生物菌种保藏管理中心)。

氯仿、无水乙醇(分析纯, 天津富宇化学试剂公司); 异戊醇、苯酚、氯化钠(分析纯, 成都金山化学试剂有限公司); 无水葡萄糖(分析纯, 天津科密欧化学试剂厂); 浓硫酸(分析纯, 廉江市爱廉化试剂有限公司); 硝酸钠(分析纯, 天津大茂化学试剂厂); 七水硫酸镁、无水硫酸镁、磷酸二氢钾(分析纯, 天津博迪化工股份有限公司); 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、牛肉浸膏(广东环凯微生物科技有限公司)。

2.2 仪器与设备

HR40-II A2 生物安全柜(青岛海尔特种电器有限公司); MJ-250-II 霉菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); SQP 十万分之一电子天平(美国赛多利斯科学仪器有限公司); DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱(上海右一仪器有限公司); UPK-II10T 优普系列超纯水仪(上海四科仪器设备有限公司); 岛津 UV-2700 紫外-可见分光光度计(上海莱睿科学仪器有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 溶液的制备

(1) 药渣粗多糖的提取及其溶液的制备

分别称取 3 个批次三七药渣各 3 份, 每份 100.00 g, 粉碎过 24 目筛, 加水 2000 mL, 煮沸 2 h, 过滤, 收集滤液, 重复 4 遍, 合并 4 次滤液, 约 6000 mL, 60 °C 浓缩至约 3000 mL, 加 3 倍体积无水乙醇, 混匀, 置于 4 °C 冰箱中静置过夜, 除去上清液, 所得沉淀用 80% 乙醇洗涤, 乙醇挥发彻底后, 用 Sevag 法除蛋白: 在样品液中加入等体积的 Sevag 液(氯仿:异戊醇=4:1 混合液, V/V), 混匀后静止, 弃下层有机相, 重复 5 次, 最上清液层干燥后得三七粗多糖, 水浴不超过 60 °C 干燥, 最后放烘箱干燥至恒重, 粗多糖为黄棕色略透明固体。取 10 mg 上述所提取的三七多糖, 溶解, 定容于 100 mL 容量瓶中, 摇匀。此液即为 0.01 mg/mL 供试品溶液^[12-15]。

(2) 标准溶液的配制

配制葡萄糖溶液: 精密称定标准无水葡萄糖 10.0 mg, 置于 100 mL 烧杯中, 加适量水溶解后转移至容量瓶中定

容摇匀, 即得 0.1 mg/mL 葡萄糖标准溶液, 4℃冰箱保存、备用^[12-15]。

(3)6%苯酚溶液的配制

精密称取苯酚 6 g, 加水稀释至 100 mL, 置于棕色瓶内, 于 4℃冰箱保存、备用^[12-16]。

2.3.2 发酵菌种的培养

黑曲霉 1、黑曲霉 2、黑曲霉 3、棘孢木霉、紫色红曲霉、酿酒酵母、巨大芽孢杆菌和金地灵芝在斜面培养基上, 30℃下恒温培养至状态良好后刮下制成浓度为 2×10^7 个/mL 的孢子悬液, 放入恒温摇床 150 r/min, 30℃培养 24 h。

2.3.3 菌种发酵液的制备

(1)酿酒酵母的种子液培养基

黄豆芽 100 g, 洗净后加入 1 L 水加热煮沸 30 min, 冷却后, 损失的水要补足, 加入 50.0 g 葡萄糖, pH 保持自然, 于 121℃灭菌 30 min。

(2)紫色红曲霉种子液培养基

纯水 100 mL, 葡萄糖 6g、蛋白胨 2 g、硝酸钠 1 g、磷酸二氢钾 1 g、七水硫酸镁 0.5 g, pH 自然, 121℃灭菌 30 min。

(3)灵芝种子液培养基

纯水 100 mL, 土豆 20 g, 葡萄糖 2.0 g, 蛋白胨 0.2 g, 酵母粉 0.3 g, 磷酸二氢钾 0.1 g, 硫酸镁 0.06 g, pH 自然, 121℃灭菌 30 min。

(4)巨大芽孢杆菌种子培养基

纯水 100 mL, 牛肉浸膏 1.0 g, 蛋白胨 1.0 g, 葡萄糖 2.0 g, pH 自然, 121℃灭菌 30 min。

(5)黑曲霉 1、黑曲霉 2、黑曲霉 3、棘孢木霉种子液培养基

麦麸 30 g 加入 1000 mL 水加热煮沸 30 min, 过滤冷却后, 损失的水要补足, 取 100 mL 加入硫酸铵 0.2 g、磷酸二氢钾 0.2 g、七水硫酸镁 0.1 g, pH 自然, 121℃灭菌 30 min。

2.3.4 三七药渣的固态发酵

将 10.0 g 过 24 目筛的三七渣置于 250 mL 的锥形瓶中, 加入硫酸铵 0.8 g、 KH_2PO_4 0.08 g、硫酸镁 0.01 g、氯化钠 0.01 g, 培养基含水量 60%(m/m), 塞上橡胶塞并覆盖捆扎牛皮纸, 置于高温高压灭菌锅中, 121℃灭菌 30 min, 取出置于超净工作台上, 待灭菌后的三七渣恢复室温后, 加入的种子液浓度 2×10^7 个/mL, 总接种量为 20%(2 mL), 混合菌每种菌各 10%(1 mL), 然后置恒温恒湿培养箱中, 培养温度为 30℃, 培养时间 6 d 后取出, 121℃灭菌 30 min, 65℃干燥至恒重。即得固态发酵三七渣。

2.3.5 标准曲线的绘制

分别精密吸取葡萄糖标准溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 20 mL 具塞试管中, 各以蒸馏水补至 2.0 mL, 然后加入 6%苯酚 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL, 振荡后于沸水浴中加热 10 min, 冷水冷却至室温, 在 490 nm 波长测定标准溶液吸光度, 吸光度(A)为纵坐标, 葡萄糖含量(C)为横

坐标, 制作标准曲线。

2.3.6 三七药渣样品中多糖含量的测定

取固态发酵前不同批次的 3 批三七药渣样品各 3 份, 再取同一批次三七渣不同菌种固态发酵后的三七渣样品各 3 份, 分别按制备供试液方法, 在 2.3.5 相同条件下测定其吸光度值, 同时以纯化水做空白, 根据标准曲线计算多糖含量。

3 结果与分析

3.1 方法学验证

3.1.1 线性关系

方法的回归方程为 $Y=59.25X-0.0056$, 相关系数 $r^2=0.9998$, 结果表明, 方法在 0.0020~0.0150 mg/mL 线性范围内线性关系良好。

3.1.2 精密度

适量取葡萄糖对照品和样液, 在 2.3.5 项相同条件下测定吸光度, 连续测定 6 次。结果显示, 对照品和样品精密度实验的相对标准偏差均小于 3%, 表明方法精密度良好。

3.2 样品中粗多糖含量测定

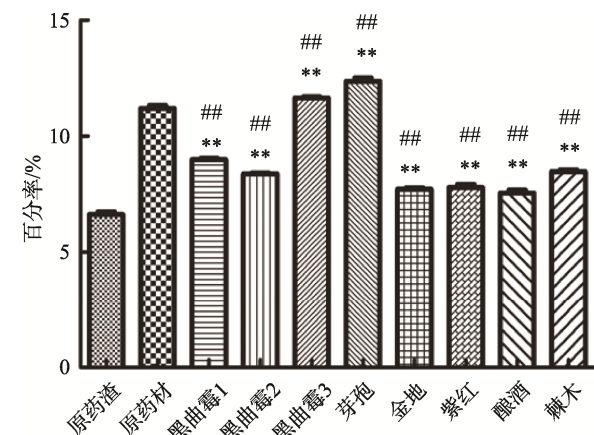
三七药渣中多糖含量结果如表 1 所示, 单一菌种固态发酵后的三七药渣中多糖含量结果如图 1 所示, 混合菌种固态发酵后的三七药渣中多糖含量结果如图 2 所示。

表 1 三七药渣中多糖含量($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 The content of polysaccharides in *Panaxnotoginseng* residue($\bar{x}\pm s, n=3$)

名称	多糖含量/%	平均含量/%
第一批样品 1	6.77	6.70±2.54
第一批样品 2	6.51	
第一批样品 3	6.83	
第二批样品 1	6.29	6.28±2.55
第二批样品 2	6.44	
第二批样品 3	6.12	
第三批样品 1	6.46	6.63±2.22
第三批样品 2	6.68	
第三批样品 3	6.74	

如表 1 和图 1~2 所示, 三七药渣中多糖含量(以葡萄糖计)在 6.28%~6.70%之间。单一菌种发酵所得三七药渣中多糖平均含量在 7.55%~12.36%之间, 其中采用巨大芽孢杆菌发酵的三七药渣中多糖含量最高, 为 12.36%, 相比发酵之前提高了 5.74%。其次为黑曲霉 3, 发酵后多糖含量为 11.65%, 比发酵前增加了 5.03%。混合菌种发酵所得三七

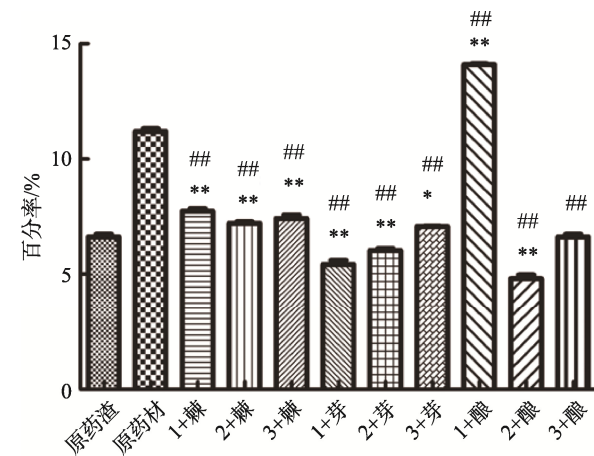
药渣中多糖含量在 5.43%~14.09%之间, 其中采用黑曲霉 1 和酿酒酵母共同发酵的药渣中多糖含量最高, 为 14.09%, 相比发酵之前提高了 7.47%。经过固态发酵, 药渣中多糖含量有所提高, 使用复配菌种多糖含量增加更明显。真菌固态发酵技术是利用微生物及其产生的酶类用于中药材成分进行生物转化, 可以促进有效成分析出, 单一菌种巨大芽孢杆菌发酵最有利于促进三七药渣中多糖成分的析出; 而混合菌种采用黑曲霉 1 和酿酒酵母共同发酵最有利于促进三七药渣中多糖的析出, 出现这样不同的结果, 需要进一步的研究不同菌种发酵对促进其多糖析出的原理。



注: **表示与原药渣有极显著差异($P < 0.01$), ##表示与原药材有极显著差异($P < 0.01$)。

图 1 单一菌种发酵结果($n=3$)

Fig.1 Result of single strain fermentation($n=3$)



注: *表示与原药渣有显著差异($P < 0.01$), **表示与原药渣有极显著差异($P < 0.01$), ##表示与原药材有极显著差异($P < 0.01$)。

图 2 混合菌种发酵结果($n=3$)

Fig.2 Result of mixed strain fermentation($n=3$)

4 结论与讨论

本研究采用水提醇沉法提取三七药渣中的三七多糖,

用苯酚-硫酸法测定三七药渣中多糖含量。结果表明, 苯酚-硫酸法线性关系和精密度较好。本研究固态发酵菌种选用了黑曲霉 1、黑曲霉 2、黑曲霉 3、棘孢木霉、紫色红曲霉、酿酒酵母、巨大芽孢杆菌和金地灵芝。采用单一菌种和复合菌种发酵, 对比了固态发酵前后三七药渣中多糖的含量变化。实验结果表明, 采用固态发酵的方法对三七药渣进行处理后, 药渣中多糖的含量都有不同程度的增加。其中, 巨大芽孢杆菌、黑曲霉 3 和黑曲霉 1+酿酒酵母固态发酵均显著提高了三七药渣中的多糖含量。单一菌种发酵时, 巨大芽孢杆菌的效果最好, 黑曲霉 3 次之混合菌种发酵则以黑曲霉 1 与酿酒酵母共同发酵效果最为明显。本研究从 8 株单菌中筛选出巨大芽孢杆菌和黑曲霉 3 两株优良菌种, 从 9 种复合菌中筛选出黑曲霉 1 与酿酒酵母这一优良混合菌种。证实了采用菌种固态发酵技术发酵三七药渣, 能提高三七渣中多糖的含量, 可变废为宝, 对于进一步开展三七药渣的应用和相关保健食品开发的工作研究具有实际意义。

参考文献

- [1] 国晶晶, 李来来, 朱会超, 等. 三七主要成分及其免疫调节作用的研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(2): 119-124.
Guo JJ, Li LL, Zhu HC, et al. Research progress of *Panax notoginseng* main components and their immunomodulatory effects [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2014, 33(2): 119-124.
- [2] 夏鹏, 张顺仓, 梁宗锁, 等. 三七化学成分的研究历程和概况[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2564-2570.
Xia PQ, Zhang SC, Liang ZS, et al. Research history and overview of chemical constituents of *Panax notoginseng* [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2014, 45(17): 2564-2570.
- [3] 杨娟, 袁一征, 尉广飞, 等. 三七植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(10): 1641-1647.
Yang J, Yuan YZ, Wei GF, et al. Research progress of chemical composition and pharmacological actions of *Panax notoginseng* [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2017, 19(10): 1641-1647.
- [4] 韦维, 黄永秋, 梁柳丹, 等. 三七有效成分对免疫性肝损伤的保护作用[J]. 天津医药, 2014, 42(9): 893-895, 961.
Wei W, Huang YZ, Liang LD, et al. Protective effects of active ingredients of *Notoginseng* on immunological liver injury [J]. Tianjin Med J, 2014, 42(9): 893-895, 961.
- [5] 盛卸晃, 王健, 郭建军, 等. 三七多糖的分离纯化及理化性质研究[J]. 中草药, 2007, 38(7): 987-989.
Sheng XH, Wang J, Guo JJ, et al. Study on isolation, purification and physicochemical properties of *Panax notoginseng* polysaccharide [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2007, 38(7): 987-989.
- [6] 沈志伟, 龚云麒, 李莹. 三七多糖的新研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(58): 194-196.
Shen ZW, Gong YQ, Li Y. New study progress of *Notoginseng* polysaccharide [J]. J Clin Med, 2018, 5(58): 194-196.
- [7] 李江霞, 丁艳芬, 陈金东, 等. 三七渣中多糖超声提取工艺研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(2): 131-134.
Li JX, Ding YF, Chen JD, et al. The research of ultrasonic extraction process of polysaccharides in *Notoginseng radix et Rhizoma* after extracts

- PNS [J]. Mod Chin Med, 2013, 15(2): 131–134.
- [8] 刘焕焕, 郭枫, 许文迪, 等. 基于生物发酵技术的中药药渣开发应用研究进展[J]. 中国酿造, 2017, 36(4): 6–9.
- Liu HH, Guo F, Xu WD, *et al.* Research progress on development and application of traditional Chinese medicine residues based on bio-fermentation technology [J]. China Brew, 2017, 36(4): 6–9.
- [9] 谭显东, 段娅宁, 王君君, 等. 三七渣混菌发酵生产蛋白饲料的初步研究[J]. 饲料研究, 2014, (7): 30–33, 52.
- Tan XD, Duan YN, Wang JJ, *et al.* Preliminary study on the production of protein feed by mixed fermentation of *Panax notoginseng* residue [J]. Feed Res, 2014, (7): 30–33, 52.
- [10] 胡伟, 谭显东, 黄凡, 等. 三七渣固态发酵所产淀粉酶的酶学特性研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(5): 110–114.
- Hu W, Tan XD, Huang F, *et al.* Enzymatic characteristics of amylase from *Notoginseng* Residues by solid state fermentation [J]. J Chin Cere Oils Assoc, 2014, 29(5): 110–114.
- [11] 秦晓瑜, 李冠华. 固态发酵炮制中药材研究进展[J]. 中药材, 2016, 39(3): 691–695.
- Qin XY, Li GH. Research progress in processing Chinese medicinal materials by solid state fermentation [J]. J Chin Med Mater, 2016, 39(3): 691–695.
- [12] 罗海燕, 冯棋琴, 马小花, 等. 苯酚-硫酸法测定保健酒药渣中总多糖的含量[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(2): 97–100.
- Luo HY, Feng QQ, Ma XH, *et al.* The determination of total polysaccharides from the herb residue of health wine with phenol-sulfuric acid method [J]. Food Ferment Technol, 2012, 48(2): 97–100.
- [13] 刘岩, 范开, 李龙军, 等. 三七多糖的含量测定方法及不同部位多糖的含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 118–120.
- Liu Y, Fan K, Li LJ, *et al.* Studies on content determination of the polysaccharides in *Panax notoginseng* and change of polysaccharides in *Panax notoginseng* collected at different parts [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2012, 18(19): 118–120.
- [14] 郭剑, 冯海. 麦冬药渣中麦冬多糖的提取工艺研究[J]. 广东化工, 2014, 41(11): 27–28, 19.
- Guo J, Feng H. Extraction of polysaccharide from *Radix dregis* [J]. Guangdong Chem Ind, 2014, 41(11): 27–28, 19.
- [15] 孔庆龙, 余汪平, 郭冬梅, 等. 苯酚-硫酸法测定三七枸杞酒中多糖含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2267–2271.
- Kong QL, Yu WP, Guo DM, *et al.* Determination of polysaccharide in the alcoholic drink of SanqiGouqi by phenol-sulfuric acid colorimetry method [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(6): 2267–2271

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



黄纯莹, 硕士研究生, 主要研究方向为中药质量控制与中药资源开发。
E-mail: 985940921@qq.com



侯小涛, 博士, 教授, 主要研究方向为中药活性成分及质量控制研究。
E-mail: xthou@126.com