

李琦玲,李 豫,王志伟,等. 响应面法优化桂北金槐槐米固态发酵工艺条件[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):230-235.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.044

响应面法优化桂北金槐槐米固态发酵工艺条件

李琦玲,李 豫,王志伟,顾生玖,朱开梅

(桂林医学院,广西桂林 541004)

摘要:以桂北金槐(*Sophora japonica* cv. *jinhuai*)为原材料进行青霉菌(*Penicillium*)固态发酵,优选出桂北金槐槐米固态发酵的最佳工艺。以槲皮素含量为因变量,采用单因素试验和响应面法优化试验优化发酵条件。结果表明,根据所建模型得到发酵金槐槐米的最佳工艺为温度 29.97 ℃、时间 6.88 d、转速 180.86 r/min,接种量 3.93 mL,槲皮素预计含量为 34.81 mg/g,在此基础上调整发酵参数,实际含量为 33.67 mg/g,与预测值相近。证明响应面法优化槐米发酵工艺合理,为该药材的开发和利用提供参考。

关键词:金槐;槐米;槲皮素;青霉菌;发酵工艺;响应面法

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0230-06

豆科植物槐(*Sophora japonica* L.)的干燥花蕾习称槐米(*flos sophorae immaturus*),其形状如米粒,主要含有芸香苷和槲皮素等 10 余种黄酮类化合物^[1],2015 版《中国药典》收录的槐的药用价值有凉血止血、清肝泻火^[2]。槐树的栽培品种主要有白槐、黄槐和金槐。其中,金槐是优良的槐树栽培品种,金槐米中芸香苷含量高,是其他品种的 1~2 倍,广西全州县金槐米的芸香苷含量一般为 25%~28%,最高可达到 40%^[3-4],而槲皮素可由芸香苷水解而成。槲皮素是近年来的研究热点,具有抗氧化、抗变形链球菌生物膜活性、抗过敏、抗病毒和抗肿瘤等功效^[5-7],它在医疗和制药行业有巨大的发展空间和应用前景,因此优化金槐米制备槲皮素的工艺方法对临床应用及制药是很有必要的。

目前,获得槲皮素的方法主要有溶剂提取法^[8]、超声辅助提取法^[9]、微波辅助提取法^[10]和微生物发酵法^[11-12]。微生物发酵是指在发酵过程中,利用微生物在生长代谢过程中所产的酶转化中药

材中的有效成分^[13]。有研究表明,槐米有效成分芸香苷进入肠道后,通过微生物水解成槲皮素而发挥药效^[14]。该试验以桂北金槐米为基质,利用青霉菌进行固态发酵,将金槐米中芸香苷转化成槲皮素,通过响应面法^[15]优化金槐米的发酵工艺,为金槐米中芸香苷的有效利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

金槐取自广西壮族自治区全州县,经广西植物所蒋云生研究员鉴定为槐米;青霉菌由桂林医学院基础院病原微生物实验室分离筛选;槲皮素对照品购自中国食品药品检定研究院,批号 100081,含量 99.1%;甲醇为色谱纯,水为超纯水;蔡氏培养基购自上海博微生物科技有限公司;分析天平购自上海精天电子仪器厂;高速多功能粉碎机购自永康市铂欧五金制品有限公司;高效液相色谱仪(岛津 LC-20A)购自岛津企业管理有限公司;恒温振荡器购自韶关市泰宏医疗器械有限公司。

1.2 种子液的制备

将菌种接种到斜面蔡氏培养基上,30 ℃恒温条件下培养 4~6 d,加入无菌水充分刮下孢子,制备孢子悬浮液,装入含有 100 mL 种子液培养基的锥形瓶中,在 30 ℃、160 r/min 恒温振荡培养箱中培养 72 h,得到种子液。

1.3 固态发酵培养

将槐米干燥粉碎(过 100 目筛),称取 5 g 槐米粉末,放入 250 mL 锥形瓶中,加入一定量的无机盐

收稿日期:2019-06-18

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科能 1598025-46);桂林市科学研究与技术开发计划(编号:20150102-6、20150102-7、20150102-8);桂工信科技(编号:[2017]119 号);广西壮族自治区大学生创新创业训练计划(编号:201710601054、201710601055)

作者简介:李琦玲(1993—),女,江西萍乡人,硕士研究生,主要从事药物研发生产与质量控制研究。E-mail:2573755939@qq.com。

通信作者:朱开梅,硕士,教授,主要从事药物研发生产与质量控制研究。E-mail:370489448@qq.com。

蔡氏培养基,混合均匀,121 ℃ 高压灭菌 30 min。在无菌条件下,接入一定量的种子液后放于恒温振荡培养箱培养一定时间。

1.4 发酵工艺单因素试验

发酵温度对槲皮素含量的影响:发酵温度 24、26、28、30、32 ℃,接种量 4 mL,摇床转速 160 r/min,时间 5 d;发酵时间对槲皮素的影响:发酵时间 3、5、7、9 d,接种量 4 mL,摇床转速 160 r/min,发酵温度 30 ℃;摇床转速对槲皮素的影响:转速 120、160、180、200、240 r/min,接种量 4 mL,发酵温度 30 ℃,发酵时间 5 d;接种量对槲皮素的影响:接种量 1、4、7、10、13 mL,发酵温度 30 ℃,发酵时间 5 d,摇床转速 160 r/min。

1.5 槲皮素含量的测定

1.5.1 色谱条件 色谱柱: InertSustain C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 流速 1 mL/min, 检测波长 365 nm, 进样量 20 μL, 流动相: 甲醇-水 (60:40)。

1.5.2 槲皮素含量标准曲线的绘制 精准称取槲皮素对照品 5 mg 于 50 mL 容量瓶中,加色谱甲醇溶解,定容至刻度线,充分摇匀后置于 4 ℃ 冰箱备用。精确称量 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 上述对照品溶液分别置于 5 mL 容量瓶中,用色谱甲醇定容。按上述色谱条件进样并测定峰面积。试验结果表明,槲皮素在 2~12 μg/mL 范围内呈良好的线性关系,回归方程: $y = 173.74x - 106.53$, $r^2 = 0.9997$ 。

1.6 响应面法优化试验

根据单因素试验结果,选择发酵温度、发酵时间、摇床转速、接种量 4 个因素为自变量,槲皮素含量为响应值。根据 Box-Behnken 设计原理,进行 4 因素 3 水平的响应面法分析试验,因素水平设计详见表 1。采用 Design Expert 8.0 软件对数据进行分析,得出最佳发酵工艺,试验重复 3 次。

表 1 响应面因素水平

水平	A:接种量 (mL)	B:温度 (℃)	C:时间 (d)	D:转速 (r/min)
-1	1	28	5	160
0	4	30	7	180
1	7	32	9	200

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 发酵温度对槲皮素含量的影响 由图 1 可

知,槲皮素含量受发酵温度的影响,发酵温度为 30 ℃ 时槲皮素含量最高,再继续升高温度,槲皮素含量下降。温度过低时会减缓青霉菌的生长代谢,导致槲皮素含量较低;温度升高时也会抑制菌体的生长或灭活。因此选择 30 ℃ 为最佳发酵温度。

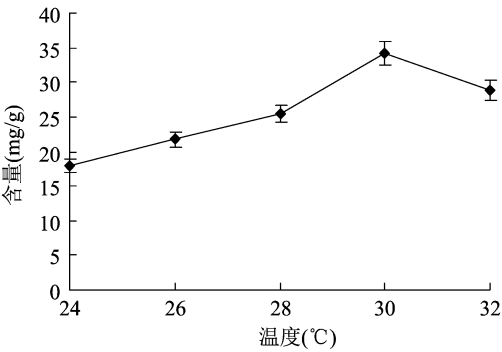


图1 发酵温度对槲皮素含量的影响

2.1.2 发酵时间对槲皮素含量的影响 由图 2 可知,发酵时间为 3~7 d 时,槲皮素含量随着发酵时间的延长而增加,发酵温度在 7 d 时,槲皮素含量达到最大;随着发酵时间再度增加,槲皮素含量略微下降。在发酵过程中,发酵时间过长,菌利用产物进行生长繁殖,导致槲皮素含量的减少。因此选择 7 d 为最佳发酵时间。

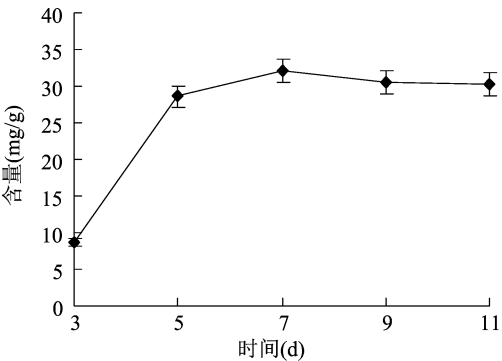


图2 发酵时间对槲皮素含量的影响

2.1.3 摇床转速对槲皮素含量的影响 由图 3 可知,槲皮素含量随转速升高而逐渐增加,当转速达到 180 r/min 时,槲皮素含量最高;当转速再升高时,槲皮素含量下降并趋于平缓。转速增加时溶氧量也相应增加,当转速达到最佳值时,溶氧量也达到上限,转速再继续增加不会增加溶氧量^[16],因此选择最佳摇床转速为 180 r/min。

2.1.4 接种量对槲皮素含量的影响 由图 4 可知,接种量为 1~4 mL 时,槲皮素含量随着接种量的增加而逐渐增加,接种量为 4 mL 时,槲皮素含量达到

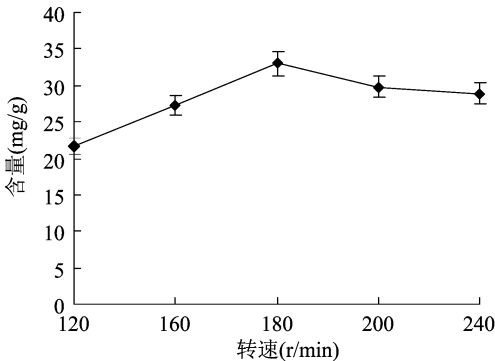


图3 摇床转速对槲皮素含量的影响

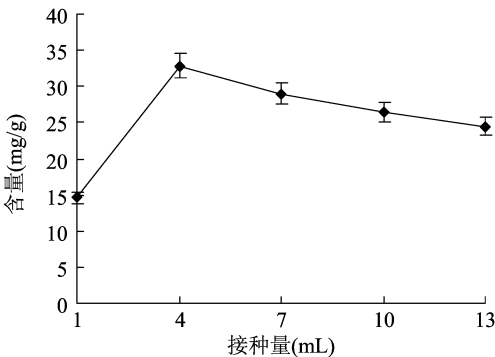


图4 接种量对槲皮素含量的影响

最大;接种量继续增加时,槲皮素含量下降。接种量的多少可以影响菌的生长繁殖速度,接种量过多时,菌体繁殖过快,导致菌体生长所需的营养物质不够而利用槲皮素作为其营养物质的来源,降低了槲皮素含量^[17]。因此选择 4 mL 为最佳接种量。

2.2 响应面结果与分析

2.2.1 回归方程的建立与分析 根据单因素试验结果,以发酵温度、时间、转速、接种量作为主要因素,根据 BOX - Behnken Design 设计原理,试验设计和试验结果详见表 2。

利用 Design - Expert 8.0 软件对表 2 数据进行二次元回归分析,可得出影响因素的关联方程,多元回归拟合分析得到模型的拟合方程为 $Y = 34.75 - 0.48A - 0.12B - 1.05C + 0.63D - 0.74AB - 0.21AC + 1.78AD - 0.17BC - 2.68BD - 0.78CD - 8.12A^2 - 7.43B^2 - 8.98C^2 - 7.80D^2$ 。

由表 3 可知,回归方程显著 (P 模型 < 0.0001),失拟项不显著 ($P > 0.05$),表明试验模型中的二项式方程较符合实际发酵情况,较好地反映了发酵温度、时间、转速、接种量对槲皮素含量的交互作用具有高度显著影响。

2.2.2 响应面交互作用分析 由图 5 可知,固定发酵时间 5 d,转速 160 r/min,当发酵温度不变时,槲

表 2 Box - Behnken 试验设计和结果

试验号	A:接种量	B:温度	C:时间	D:转速	含量 (mg/g)
1	-1	0	0	1	18.27
2	-1	-1	0	0	17.06
3	0	0	1	1	16.53
4	1	0	1	0	16.81
5	0	0	0	0	37.26
6	0	0	0	0	32.36
7	0	0	0	0	34.58
8	0	0	0	0	35.79
9	0	0	-1	1	18.60
10	0	-1	-1	0	19.24
11	0	1	0	1	18.54
12	0	1	1	0	16.23
13	-1	0	0	-1	22.16
14	0	0	0	0	33.78
15	1	0	0	1	18.20
16	-1	0	1	0	17.16
17	0	-1	0	1	26.28
18	1	0	-1	0	19.96
19	0	1	-1	0	19.61
20	1	0	0	-1	14.96
21	-1	1	0	0	20.17
22	-1	0	-1	0	19.48
23	0	1	0	-1	19.50
24	0	-1	0	-1	16.53
25	0	0	-1	-1	17.35
26	1	1	0	0	19.36
27	0	-1	1	0	16.55
28	0	0	1	-1	18.39
29	1	-1	0	0	19.21

皮素含量随着接种量的增加先增加后减少;当接种量不变时,槲皮素的含量随着发酵温度的升高先增加后减少;在发酵温度和接种量处于中间水平时槲皮素含量达到最大值。

由图 6 可知,固定发酵温度 30 ℃,转速 160 r/min,当发酵时间不变时,槲皮素含量随着接种量的增加先增加后减少;当接种量不变时,槲皮素含量随着发酵时间的延长先增加后减少;在发酵时间和接种量处于中间水平时槲皮素含量达到最大值。

由图 7 可知,固定发酵温度 30 ℃,发酵时间 5 d,当转速不变时,槲皮素含量随着接种量的增加先增加后减少;当接种量不变时,槲皮素含量随着转速的增大先增加后减少;在接种量和转速处于中

表 3 响应面法方差二次模型方差分析

项目	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
模型	1 158.79	14	82.77	20.13	<0.000 1 **
A	2.80	1	2.80	0.68	0.422 8
B	0.18	1	0.18	0.04	0.838 3
C	13.17	1	13.17	3.20	0.952 0
D	4.73	1	4.73	1.15	0.301 9
AB	2.19	1	2.19	0.53	0.477 5
AC	0.17	1	0.17	0.04	0.840 8
AD	12.71	1	12.71	3.09	0.100 6
BC	0.12	1	0.12	0.03	0.867 3
BD	28.68	1	28.68	6.97	0.019 4 *
CD	2.42	1	2.42	0.59	0.455 9
A ²	427.32	1	427.32	103.92	<0.000 1 **
B ²	358.24	1	358.24	87.12	<0.000 1 **
C ²	522.82	1	522.82	127.15	<0.000 1 **
D ²	394.92	1	394.92	96.04	<0.000 1 **
残差	57.57	14	4.11		
失拟差	43.50	10	4.35	1.24	0.452 5
纯误差	14.06	4	3.52		
总差	1 216.36	28			

注：* 表示差异显著 ($P < 0.05$)，** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

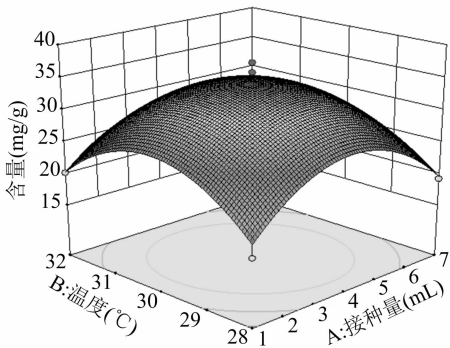


图5 温度和接种量对槲皮素含量交互影响的三维曲面图和等高线

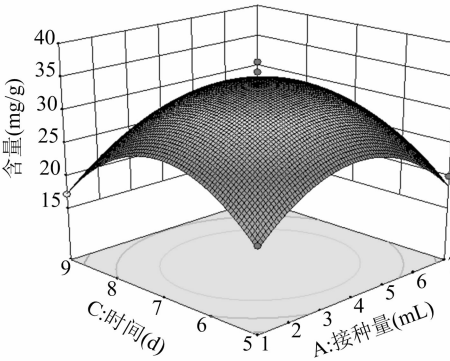
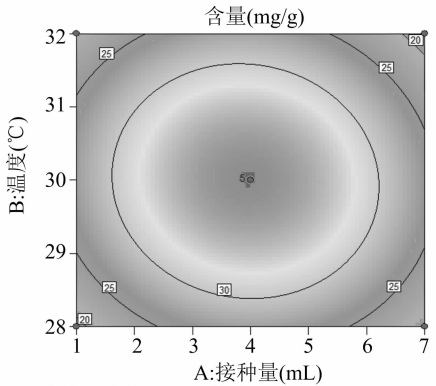


图6 时间和接种量对槲皮素含量交互影响的三维曲面图和等高线

间水平时槲皮素含量达到最大值。

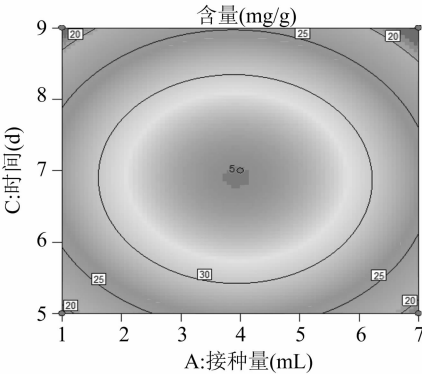
由图 8 可知,固定接种量 4 mL,转速 160 r/min 当发酵温度不变时,槲皮素含量随着发酵温度的升高先增加后减少;当发酵温度不变时,槲皮素含量随着发酵时间的延长先增加后减少;在发酵时间和温度处于中间水平时槲皮素含量达到最大值。

由图 9 可知,固定发酵时间 5 d,接种量 4 mL 当发酵温度不变时,槲皮素含量随着转速的增大先增加后减少;当转速不变时,槲皮素含量随着发酵温度的升高先增加后减少;在转速和发酵温度处于中间水平时槲皮素含量达到最大值。

由图 10 可知,固定发酵温度 30 ℃,接种量 4 mL 当发酵时间不变时,槲皮素含量随着转速的增大先增加后减少;当转速不变时,槲皮素含量随着发酵时间的延长先增加后减少;在转速和发酵时间处于中间水平时槲皮素含量达到最大值。

2.3 验证试验

根据 Box – Behnken 优化试验和回归模型分析,得出金槐米最佳发酵条件为接种量 3.93 mL、发酵温度 29.97 ℃、发酵时间 6.88 d、转速 180.85 r/min,在此优化条件下槲皮素含量预计为



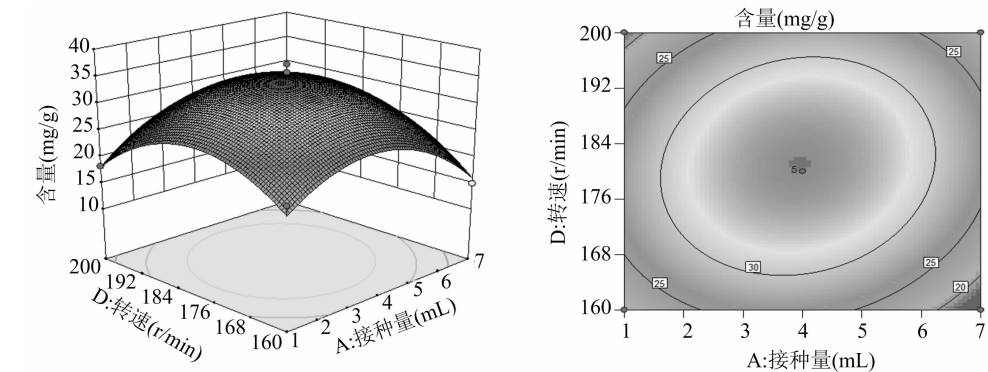


图7 转速和接种量对槲皮素含量交互影响的三维曲面图和等高线

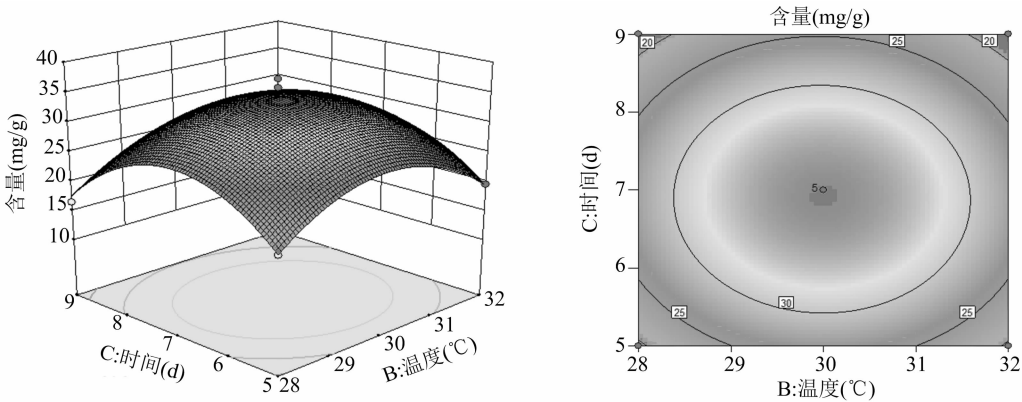


图8 时间和温度对槲皮素含量交互影响的三维曲面图和等高线

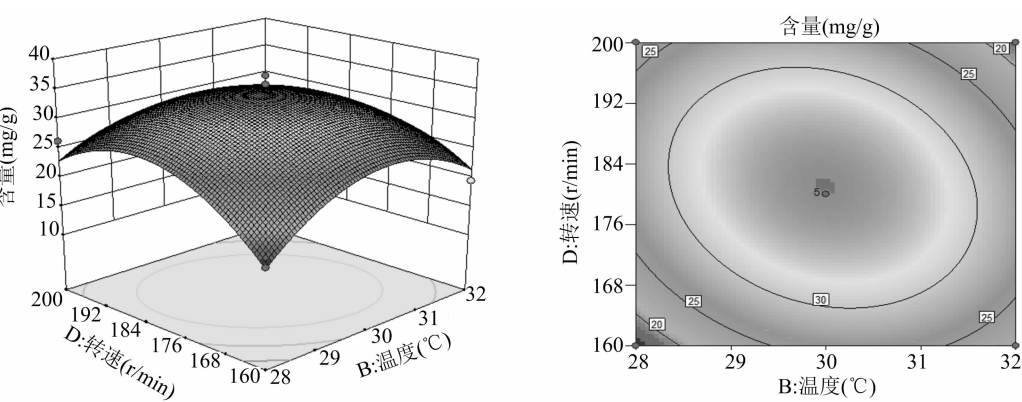


图9 转速和温度对槲皮素含量交互影响的三维曲面图和等高线

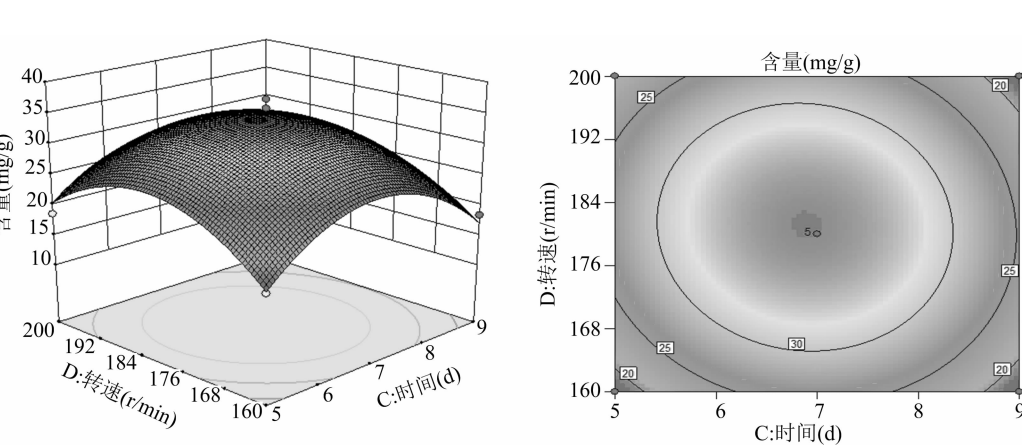


图10 转速和时间对槲皮素交互影响的三维曲面图和等高线

34.81 mg/g。考虑到实际操作,为了便于试验,在此基础上调整发酵参数,确定最佳发酵工艺条件为接种量 4 mL、发酵温度 30 ℃、发酵时间 7 d、转速 180 r/min,重复 3 组平行试验,得到槲皮素含量为 33.67 mg/g,与预测值接近,证明了优化的固态发酵桂北金槐槐米工艺条件的准确性和可靠性。

3 讨论

现行的槲皮素生产一般采用的是化学二步法工艺,而微生物发酵能将金槐米中的芸香苷直接转成槲皮素,且固态发酵对设备要求低、耗能低、污染小;发酵产物无需复杂的提取分离过程,这对进一步降低生产成本和环境污染具有实际的利用价值。微生物发酵是一个极其复杂的生化反应过程,在发酵工业中,其生产水平不仅取决于生产菌种的自身性能,还和发酵条件等外界环境有关,因此发酵培养基的优化对发酵水平的提高起着举足轻重的作用^[18-19]。为了获得最佳发酵工艺,本试验采用响应面法,与传统优化方法相比,响应面法能通过直观、精准度较高的数学模型对最佳工艺进行优化,将因素和结果的关系进行多项式拟合,优化出最佳青霉菌固态发酵金槐米转化槲皮素的发酵工艺,最佳发酵工艺为接种量 4 mL、发酵温度 30 ℃、发酵时间 7 d、转速 180 r/min,此条件下槲皮素含量为 33.67 mg/g。该试验建立的数学模型可靠、合理,提高了工作效率,而且为进一步开发金槐中的芸香苷转化槲皮素提供了参考。

参考文献:

- [1] Kite G C, Veitch N C, Boalch M E, et al. Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of Fructus Sophorae and Flos Sophorae [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(6): 785-794.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [3] 陈积凤, 蒋荣能. 桂北金槐种植技术总结[J]. 南方园艺, 2013, 24(3): 48-49.
- [4] 蒋运生. 金槐规范化种植技术(一)[J]. 广西林业, 2013(5): 48-49.
- [5] Li X, Liu Y, Yu Y, et al. Nanoformulations of quercetin and cellulose nanofibers as healthcare supplements with sustained antioxidant activity[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 207: 160-168.
- [6] Zeng Y, Nikitkova A, Abdelsalam H, et al. Activity of quercetin and kaemferol against *Streptococcus mutans* biofilm[J]. *Archives of Oral Biology*, 2019, 98: 9-16.
- [7] 杨娜, 朱开梅, 顾生玖. 从槐米中提取槲皮素方法的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3340-3341.
- [8] 苏思恩, 阮焕群. 金缕梅中槲皮素的提取工艺优化[J]. 广东化工, 2017, 44(8): 84-85, 107.
- [9] 姚听利. 采用响应面法对超声波辅助提取桂北金槐中芦丁与槲皮素的工艺优化[D]. 桂林: 桂林医学院, 2018.
- [10] 孙雪, 徐艳阳, 刘扬, 等. 响应面法优化微波辅助提取香菇柄槲皮素的工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2098-2104.
- [11] 孙红, 王昌禄, 李贞景, 等. 黑曲霉 M8 固态发酵槐米对高尿酸血症小鼠的影响[J]. 食品科学技术学报, 2013, 31(6): 15-20.
- [12] 熊宇. 微生物酶法从苦荞中制备槲皮素的工艺方法的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- [13] 陆承云, 张传博. 一株曲霉属真菌(*Aspergillus* sp.) 固体发酵对金银花及叶的活性成分影响[J]. 微生物学杂志, 2017, 38(4): 1-9.
- [14] Andlauer W, Stumpf C, Fürst P. Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 62(3): 369-374.
- [15] 杨耀维, 薛一哲, 张恒, 等. 响应面法优化连翘内生真菌 J8 抗氧化活性物质的发酵提取工艺[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2018, 46(2): 88-94.
- [16] 王文秀, 于佳, 李钊, 等. 不同条件对纳豆菌发酵蛤蚧产物中游离氨基酸态氮含量及纳豆激酶活性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 113-116.
- [17] 周小红, 李学英, 杨宪时, 等. 接种量对单增李斯特菌生长期及生长界面的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 180-184.
- [18] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 894-903.
- [19] 张楠, 夏尚远, 刘训理. 统计优化技术在微生物发酵中的应用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2009, 40(3): 465-468.