DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.03.002

参苓白术散改良方发酵工艺及对GES-1细胞酒精性损伤的干预作用研究

刘红宁,郑凯麒,陈丽华,姜佳恩,周权
(江西中医药大学,江西 南昌 330004)

摘要:目的 研究阿氏肠杆菌和蛹虫草真菌发酵参苓白术散改良方最佳发酵条件,并在细胞层面评价发酵液的安全性和对酒精性胃损伤治疗的有效性。方法 实验检测经不同条件发酵后的参苓白术散改良方发酵液中功能成分的含量,并进行综合评价,在此基础上利用单因素实验对发酵条件进行优化;以酒精作用24 h建立GES-1细胞酒精性损伤模型,考察参苓白术散改良方水提液(0.938 mg/g)和发酵液在低、中、高剂量(0.469、0.938、1.876 mg/g)对人胃黏膜上皮细胞株GES-1细胞酒精性损伤基础凋亡的干预作用。结果 阿氏肠杆菌发酵参苓白术散改良方的最佳发酵工艺为pH值5,接种量1%,发酵时间1 d。蛹虫草真菌发酵参苓白术散改良方的最佳发酵工艺为pH值6,接种量3%,发酵时间3 d。多菌种发酵最佳接种顺序为先接种阿氏肠杆菌。最佳发酵工艺下人参皂苷Re、橙皮苷、总黄酮和总多糖含量均得到显著性提高;参苓白术散改良方发酵液作用于GES-1细胞48 h时使细胞增殖活力提高,且中、高剂量组发酵液能降低GES-1细胞酒精性损伤的总凋亡率。结论 参苓白术散改良方发酵后其成分影响较大,含量有明显变化,发酵工艺可行,且对GES-1细胞有增殖作用,同时能降低GES-1细胞酒精性损伤的总凋亡率。

关键词:微生物;发酵;GES-1细胞;酒精性胃损伤
中图分类号:R284.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)03-0006-08

Study on Fermentation Technology of Shenling Baizhu Powder(参苓白术散) and Its Intervention Effect on Alcohol Injury of GES-1 Cells

LIU Hongning, ZHENG Kaiqi, CHEN Lihua, JIANG Jiaen, ZHOU Quan
(Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi, China)

Abstract: *Objective* To study the optimal fermentation conditions of Enterobacter albieri and Cordyceps pupae for Shenling Baizhu Powder(参苓白术散), and evaluate the safety and efficacy of the fermentation solution on alcoholic gastric injury at cell level. *Methods* In this experiment, the contents of functional components in fermentation broth of the modified formula of Shenling Baizhu Powder after fermentation under different conditions were measured and comprehensively evaluated. The alcoholic gastric injury model of GES-1 cells was established after 24 h of alcohol intervention. The intervention effects of water extract(0.938 mg/g) and fermentation broth of the modified formula of Shenling Baizhu Powder at low, medium and high doses(0.469 mg/g, 0.938 mg/g, 1.876 mg/g) on basic apoptosis of GES-1 cells were investigated. *Results* The optimal fermentation process of Enterobacter asburiae for Shenling Baizhu Powder was pH value 5, inoculation amount 1% and fermentation time 1 day. The optimal fermentation process of Shenling Baizhu Powder was pH 6, inoculation amount 3% and fermentation time 3 days. The best inoculation sequence for multistrain fermentation was to vaccinate Enterobacter asburiae first. The contents of ginsenoside Re, hesperidin, total flavonoids and total polysaccharides were significantly increased under the optimal fermentation process. The fermentation solution of Shenling Baizhu Powder improved GES-1 cells at 48 h, and the fermentation solution of medium and high dose groups could reduce the total apoptosis rate of GES-1 cells. *Conclusion* After fermentation, the composition of the modified formula of Shenling Baizhu Powder had a great influence, the content changed obviously and the fermentation process was feasible. It had a proliferation effect on GES-1 cells, and at the same time it could reduce the overall apoptosis rate of GES-1 cells.

Keywords: microorganism; fermentation; GES-1 cells; alcoholic stomach injury

目前临床上用于治疗胃黏膜损伤的药物主要有铝制剂以及铋剂等,但存在着不良反应大、易复发和需长期使用等缺点[1]。随着健康中国2030启动,研究开发具备养胃、护胃功效的药食同源产品,对于降低饮酒导致的胃部相关疾病的发病率具有重要意义。活性氧是引起胃黏膜酒精性损伤的重要因素之一[2-4]。中药复方通过抗氧化应激、控制炎症因子等多重作用协同发挥药效,体现了中草药治疗疾病多靶点、整体调节的

基金项目:江西省科技计划"揭榜挂帅"关键技术类项目(20212AAF01005);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划项目(CXTD-22004)
作者简介:刘红宁(1957-),男,江西赣县人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药药性与配伍机制。
通讯作者:陈丽华(1972-),女,江西崇仁人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:高品质中药产品开发与评价。E-mail:chlly@163.com。

优势[5]。参苓白术散改良方是由人参、茯苓、陈皮、白扁豆、山药、甘草、莲子、砂仁、薏苡仁和桔梗十味药食同源中药组成,含有黄酮、多糖和皂苷类成分,有研究发现[6-7]橙皮苷不仅能直接地抑制氧化酶活性,还可以通过减少中性粒细胞的迁移,增强胃黏膜旁黏液的保护屏障;人参皂苷 Re 对钙离子稳态、线粒体氧化应激等具有保护作用[8],同时还有一定的抗胃癌作用[9];多糖类、黄酮类、萜类和生物碱类等物质是具有抗酒精性胃损伤功能中草药的活性成分[10]。黄酮类物质可通过影响胃组织中生物酶的表达,抑制炎症反应,同时减轻乙醇和脂质过氧化引起的自由基损伤,共同起到保护胃黏膜的作用,且对酒精性胃损伤的预防具有积极作用[11]。同时多糖类成分能多方位地调节抗氧化剂和炎症因子的水平、促进相关防御因子的释放和降低血清中组胺水平等方式有效地保护酒精性胃损伤[12]。中药材经微生物发酵后能提高多糖类、黄酮类、皂苷类等有效成分含量并改善肠道四大屏障,调节菌群及代谢,维持肠道稳态[13-14],且发酵后中药的抗氧化、抗炎、抑菌、降血脂等作用显著增强[15],同时补益类中药经微生物发酵后,更容易被人体吸收,营养价值和药效更高[16]。有研究表明中药复方同样也可以利用微生物进行发酵,且发酵后的中药复方疗效显著性提高[17-18]。

基于此,采用液态发酵参苓白术散改良方,以人参皂苷 Re、橙皮苷、总黄酮和总多糖含量为指标成分,比较发酵前后参苓白术散改良方中指标成分的变化,并在细胞层面评价发酵液的安全性和有效性。

1 材料与仪器

1.1 主要材料与试剂

人参、砂仁、薏苡仁、桔梗、白扁豆、茯苓、山药、陈皮、甘草、莲子(购自江中饮片厂);阿氏肠杆菌(分离自江西中医药大学);蛹虫草真菌(购自北纳创联生物技术研究院);橙皮苷对照品(购自成都普菲德生物技术有限公司);人参皂苷 Re 对照品(购自维克奇生物科技有限公司);乙腈、甲醇(购自美国 sigma 公司);人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 细胞(购自中国上海细胞库);Cell Counting Kit-8、Annexin V-AbFluorTM488/PI(购自亚科因生物技术有限公司);DMEO 高糖培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、PBS 缓冲液、胰蛋白酶-消化液(无 EDTA)、芦丁对照品、D(+)-无水葡萄糖对照品(购自北京索莱宝科技有限公司);胎牛血清(购自上海逍鹏生物科技有限公司);细胞冻存液(购自苏州海星生物科技有限公司);氢氧化钠;亚硝酸钠;三氯化铝;无水乙醇;浓硫酸;苯酚;马铃薯葡萄糖肉汤;马铃薯葡萄糖琼脂;MRS 肉汤;MRS 琼脂;营养琼脂;营养肉汤;沙氏葡萄糖液体培养基;沙氏葡萄糖琼脂。

1.2 主要仪器

CJ-SL20I 超纯水仪(四川纯洁科技有限公司);DZTW 电热套(永光明医疗仪器有限公司);KQ-500VDE 双频数控超声清洗器(昆山超声仪器有限公司);OSB-2200 油浴锅(上海爱朗仪器有限公司);CCP5-Mini 低温冷却循环机(大龙兴创实验仪器公司);NVP-1000 隔膜真空泵(上海爱朗仪器有限公司);C-15R 冷冻高速离心机(杰懋万得福生物科技有限公司);DZKW-S-8 水浴锅(永光明医疗仪器有限公司);T6 新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);SCI-VS 可调式混匀仪(美国 scilogex 公司);THZ-300C 恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司);SW-CJ-2F 双人超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);GI54DS 高压蒸汽灭菌器(致徽厦门仪器有限公司);BT25S 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);ICES/NMB-001 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);TSZ4-WS 低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Forma Series Ⅱ CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);SPARK 10M 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);CKX41 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);DHG-9246A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备公司);Attune NxT 流式细胞仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 实验方法

2.1 参苓白术散改良方的发酵工艺

工艺流程:中药饮片→纯水提取→灭菌→接菌→发酵→灭菌→检测。

2.1.1 发酵步骤 分别称取人参(人工种植 3 年)、茯苓、白扁豆、橘皮、山药、甘草、莲子、砂仁、薏苡仁、桔梗(比例关系:5∶20∶5∶10∶20∶10∶20∶1∶5∶5),加入 10 倍体积水中,煎煮 2 h 冷却后经纱布过滤上清液,将残渣加入 8 倍体积水中,继续煎煮 1.5 h 冷却后经纱布过滤上清液,合并两次上清液,浓缩至 0.5 g/mL,制成参苓白术散改良方提取液。取 20 mL 提取液于 50 mL 锥形瓶中,调节 pH,121 ℃高压蒸汽灭菌 30 min,冷却至室温后,按一定接种量接入单一菌种菌悬液,将锥形瓶置于恒温培养箱或恒温摇床中进行发酵。

2.1.2 菌种发酵条件 (1)阿氏肠杆菌发酵条件:固定发酵温度为 37 ℃。

(2)蛹虫草真菌发酵条件:固定发酵温度为 28 ℃,转速 125 r/min。

2.2 发酵条件单因素优化实验

考察发酵时长、接种量和 pH 值对阿氏肠杆菌发酵参苓白术散改良方的影响。考察发酵时长、接种量和 pH 值对蛹虫草真菌发酵参苓白术散改良方的影响。考察接种顺序对多菌种发酵参苓白术散改良方的影响。先后接入单一菌种(阿氏肠杆菌或蛹虫草真菌)菌悬液,按其最佳发酵条件进行发酵,待发酵完成后,再接种另一种菌种按其最佳发酵条件进行发酵。实验设计见表 1。

2.3 含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 待发酵完成后,121 ℃高压蒸汽灭菌 30 min,待锥形瓶冷却至室温后,以 5000 r/min,4 ℃,离心 10 min,吸取上层清液,再以相同条件离心 10 min,两次离心后合并上清液,于 4 ℃储存备用。

2.3.2 发酵前后人参皂苷 Re 和橙皮苷的含量测定 (1)液相条件:色谱柱:菲罗门 Titank C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:乙腈(A)-水(B),洗脱梯度(0~12 min,19% A;12~25 min,19%~23% A;25~26 min,23%~29% A;26~55 min,29%~32% A),流速:1 mL/min,柱温:35 ℃,检测波长:203 nm,进样量 10 μL。

(2)人参皂苷 Re 标准曲线的制定:取浓度为 2.012、1.006、0.503、0.252、0.126 mg·mL^{-1}的人参皂苷 Re 对照品溶液,根据“2.3.2”项的液相条件进样,计算峰面积,以峰面积为

表 1 发酵条件单因素优化实验设计

样品编号	发酵菌种	接种量/(%)	接种 pH 值	发酵时间/(d)	样品编号	发酵菌种	接种量/(%)	接种 pH 值	发酵时间/(d)
1	阿氏肠杆菌	3	6	1	15	蛹虫草真菌	3	6	3
2	阿氏肠杆菌	3	6	2	16	蛹虫草真菌	3	6	4
3	阿氏肠杆菌	3	6	3	17	蛹虫草真菌	3	6	5
4	阿氏肠杆菌	3	6	4	18	蛹虫草真菌	3	6	6
5	阿氏肠杆菌	3	6	5	19	蛹虫草真菌	1	6	3
6	阿氏肠杆菌	1	6	1	20	蛹虫草真菌	5	6	3
7	阿氏肠杆菌	5	6	1	21	蛹虫草真菌	7	6	3
8	阿氏肠杆菌	7	6	1	22	蛹虫草真菌	3	5	3
9	阿氏肠杆菌	1	5	1	23	蛹虫草真菌	3	7	3
10	阿氏肠杆菌	1	7	1	24	蛹虫草真菌	3	8	3
11	阿氏肠杆菌	1	8	1	25	蛹虫草真菌	3	9	3
12	阿氏肠杆菌	1	9	1	26	接种阿氏肠杆菌,24 h 后接种蛹虫草真菌			
13	蛹虫草真菌	3	6	1	27	接种蛹虫草真菌,72 h 后接种阿氏肠杆菌			
14	蛹虫草真菌	3	6	2					

纵坐标,人参皂苷 Re 浓度为横坐标,建立标准曲线,回归方程:$y = 2\,515.6x + 44.35$,$r = 0.999\,4$。

(3)橙皮苷标准曲线的制定:取浓度为 0.506、0.253、0.127、0.064、0.032 mg·mL^{-1}的橙皮苷对照品溶液,根"2.3.2"项的液相条件进样,计算峰面积,以峰面积为纵坐标,橙皮苷浓度为横坐标,建立标准曲线,回归方程:$y = 41\,494x - 114.52$,$r = 0.999\,6$。

(4)含量测定:将供试品用超纯水稀释 5 倍,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后按"2.3.2"项下液相条件进样,测定其峰面积,根据回归方程计算样品中人参皂苷 Re、橙皮苷的含量,乘以稀释倍数,结果表示为 mg·g 原药材$^{-1}$。人参皂苷 Re 和橙皮苷含量按公式计算:

$X_1 = C_1 \times n_1 / A$

X_1:发酵液中人参皂苷 Re 或橙皮苷含量(mg·g 原药材$^{-1}$);n_1:试样溶液的稀释倍数;C_1:由标准曲线计算得出的待测样品溶液的样品浓度(mg/mL);A:提取液浓度(0.5 g/mL)。

2.3.3 发酵前后总多糖的含量测定 (1)标准曲线的制定:精密称定无水葡萄糖对照品 2.5 mg,加水于 5 mL 容量瓶定容于刻度线,配制成 0.5 mg·mL^{-1}的葡萄糖标准溶液。精密量取对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL,加水补充体积至 1 mL,精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL(临用配制),摇匀,再精密加入浓硫酸 5 mL,摇匀,置沸水浴中加热 20 min,取出后置冰浴中冷却 5 min,置于紫外-可见分光光度计中,在 488 nm 的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,建立标准曲线,回归方程:$y = 57.714x + 0.046\,6$,$r = 0.999\,1$。

(2)含量测定:将供试液稀释 400 倍,取稀释后的样品 1 mL,置于 10 mL 具塞试管中,同"2.3.3"项下方法,自"精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL"起,依法测定吸光度,带入标准曲线得待测样品溶液的多糖浓度。

总多糖含量按公式计算:

$X_2 = C_2 \times n_2 \times 400 / A$

X_2:发酵液中总多糖含量(mg·g 原药材$^{-1}$);n_2:试样溶液的稀释倍数;A:提取液浓度(0.5g/mL);C_2:由标准曲线计算得出的待测样品溶液的多糖浓度(mg/mL);400:待测液稀释倍数。

2.3.4 发酵前后总黄酮的含量测定 (1)标准曲线的制定:吸取浓度为 1 mg·mL^{-1}芦丁标准溶液 0、0.4、1、0.8、1.6、2.0 mL 分别置于 10 mL 的棕色容量瓶中,加 60% 乙醇溶液至 5.0 mL,加 0.3 mL 5% 亚硝酸钠溶液,混匀后静置 6 min;再加入 0.3 mL 10% 的三氯化铝溶液,摇匀后静置 8 min;加 4 mL 4% 的氢氧化钠溶液,用 60% 乙醇溶液定容至刻度,摇匀后静置 8 min。在 510 nm 波长处测定吸光度值,以未加芦丁标准液的溶液为空白,横坐标为芦丁标准液浓度,纵坐标为吸光度值,绘制标准曲线。回归方程:$y = 9.780\,5x - 0.027\,9$,$r = 0.999\,1$。

(2)含量测定:将供试液稀释 5 倍,取稀释后的样品 1 mL,置于 10 mL 具塞试管中,同"2.3.4"项下方法,加入试剂同上。以未加氢氧化钠试剂的溶液为空白,在 510 nm 波长处测定吸光度值,带入标准曲线得待测样品溶液的黄酮浓度。

总黄酮含量按公式计算:

$X_3 = C_3 \times n_3 \times 5 / A$

X_3:发酵液中总黄酮含量(mg·g 原药材$^{-1}$);n_3:试样溶液的稀释倍数;A:提取液浓度(0.5 g/mL);C_3:由标准曲线计算得出的待测样品溶液的黄酮浓度(mg/mL);5:待测液稀释倍数。

2.4 发酵液评分标准建立

本实验分别对参苓白术散改良方发酵液的人参皂苷 Re、橙皮苷、总黄酮和总多糖含量 4 个指标进行测定。按照综合评分的方法确定参苓白术散改良方适宜发酵菌种以及发酵条件优化,评分方案如下。

人参皂苷 Re 得分 = 人参皂苷 Re 含量/表中人参皂苷 Re 最高量 × 0.25 × 100

橙皮苷得分 = 橙皮苷含量/表中橙皮苷含量最高量 × 0.25 × 100

总黄酮得分 = 总黄酮含量/表中总黄酮含量最高量 × 0.25 × 100

总多糖得分 = 总多糖含量/表中总多糖含量最高量 × 0.25 × 100

综合评分 = 人参皂苷 Re 得分 + 橙皮苷得分 + 总黄酮得分 + 总多糖得分

2.5 细胞实验

2.5.1 CCK-8 法检测不同浓度参苓白术散改良方发酵液对 GES-1 细胞增殖情况的影响 取生长良好的 GES-1，PBS 清洗 2 次，消化计数，按每孔 8×10^3 接种至 96 孔板，分组设为空白组、对照组、水提组、低剂量组、中剂量组和高剂量组，每组设 6 个复孔，每孔液体体积为 100 μL；将接种好的 96 孔板分别培养 24、48、72、96 h，按照 CCK-8 检测试剂盒说明书提示操作，检测波长设为 450 nm，用多功能酶标仪检测空白孔、对照孔和实验孔吸光度，重复 3 次。

2.5.2 流式细胞术检测不同浓度参苓白术散改良方发酵液对酒精干预后 GES-1 细胞基础凋亡状况的影响 取生长良好的 GES-1 细胞，PBS 清洗 2 次，消化计数，按每孔 2×10^5 接种至 6 孔板中，先用含 3% 酒精的完全培养基处理 24 h，加药干预，设置正常对照组、模型组、水提组、低剂量组、中剂量组和高剂量组，每组设 3 个复孔，每孔液体体积为 2 mL，将 6 孔板培养 48 h，按双染凋亡检测试剂盒操作，流式细胞仪检测，FlowJo_V10 软件分析，重复 3 次

3 实验结果

3.1 菌种发酵条件单因素优化实验结果

各指标含量测定结果以及评价得分见表 2。

3.1.1 阿氏肠杆菌发酵时长优化结果分析 如表 2 和图 1 所示，与水提组相比，经阿氏肠杆菌发酵 1～4 d 时人参皂苷 Re 含量增多，在发酵 2 d 时增幅最大；橙皮苷含量在发酵 1 d 后增加，发酵 2～5 d 后随发酵时间增长不断减少；总黄酮含量经发酵后减少；总多糖含量随发酵时长增加而减少。根据评分标准得出阿氏肠杆菌发酵组中第 1 组得分最高，所以认定发酵 1 d 为阿氏肠杆菌最佳发酵时间。

3.1.2 阿氏肠杆菌发酵接种量优化结果分析 如表 2 和图 2 所示，在接种量优化实验中，与水提组相比，在 1% 接种量时人参皂苷含量、总黄酮含量增多；总多糖含量较水提液均减少；接种量仅在 1% 时橙皮苷含量减少。根据阿氏肠杆菌接种量优化组中总评分可看出第 6 组得分最高，故阿氏肠杆菌接种量为 1% 时为其最适接种量。

3.1.3 阿氏肠杆菌发酵 pH 值优化结果分析 如表 2 和图 3 所示，在 pH 值优化实验中，pH 值在 5～7 时人参皂苷 Re 含量增多，且 pH 值在 6 时增加最多；pH 值在 5 时橙皮苷含量不变，pH 值在 6～9 时减少；pH 值在 5～7 时，总黄酮含量降低；pH 值在 5 时总多糖含量增多。根据阿氏肠杆菌 pH 值优化组中总评分可看出第 9 组得分最高，阿氏肠杆菌的最适发酵条件为 pH 值为 5 的酸性环境。

因此，阿氏肠杆菌的发酵参苓白术散改良方最适条件为在 pH 为 5 的条件下，以 1% 接种量接种后发酵 1 d。

3.1.4 蛹虫草真菌发酵时长优化结果分析 如表 2 和图 4 所示，与水提组相比，经蛹虫草真菌发酵 1～6 d 后使人参皂苷 Re 含量增多；橙皮苷含量在发酵2～6d时增多，且随发酵时长增

表 2 菌种发酵条件单因素优化实验活性成分含量测定结果

样品编号	人参皂苷 Re 含量($\bar{x}\pm s$)/(mg·g 原药材$^{-1}$)	橙皮苷含量($\bar{x}\pm s$)/(mg·g 原药材$^{-1}$)	总黄酮含量($\bar{x}\pm s$)/(mg·g 原药材$^{-1}$)	总多糖含量/(mg·g 原药材$^{-1}$)	综合评分/(分)
1	5.261±0.124	1.592±0.004	2.399±0.086	81.543±1.081	94.09
2	6.410±0.627	1.454±0.024	2.346±0.005	51.053±2.089	86.34
3	4.569±0.564	1.307±0.206	2.351±0.011	42.434±1.118	74.14
4	3.874±0.203	1.299±0.027	2.545±0.035	38.295±1.461	71.84
5	2.201±0.138	1.207±0.029	2.351±0.035	37.058±0.818	61.46
6	10.152±0.232	0.658±0.011	2.823±0.135	90.737±2.598	84.94
7	4.879±0.231	1.599±0.023	2.394±0.065	87.961±0.609	82.12
8	5.531±0.133	1.580±0.018	2.326±0.040	92.001±2.000	83.92
9	6.184±0.084	1.640±0.037	2.465±0.031	131.180±0.160	87.06
10	4.257±0.101	1.438±0.106	1.851±0.018	76.379±1.133	63.34
11	–	–	1.939±0.018	70.585±0.218	30.62
12	–	–	2.379±0.017	73.138±0.272	35.01
13	6.206±0.016	1.663±0.011	3.798±0.042	126.243±1.073	90.37
14	6.494±0.315	1.706±0.036	3.653±0.056	137.466±4.041	93.06
15	6.536±0.216	1.697±0.021	3.823±0.067	146.813±1.047	95.73
16	5.864±0.044	1.737±0.030	3.812±0.039	123.138±1.790	89.58
17	6.534±0.320	1.816±0.009	4.068±0.091	126.584±0.398	95.60
18	5.787±0.030	1.908±0.093	4.045±0.056	125.078±0.534	93.29
19	6.034±0.165	1.716±0.017	3.414±0.039	145.046±1.325	93.40
20	5.614±0.107	1.608±0.023	3.669±0.113	141.826±0.434	91.21
21	4.582±0.126	1.600±0.024	4.139±0.218	135.860±3.196	88.97
22	5.443±0.005	1.848±0.044	3.423±0.069	116.806±1.233	86.81
23	5.804±0.083	1.613±0.026	3.128±0.024	125.168±0.408	84.42
24	6.345±0.024	1.414±0.009	3.178±0.035	112.911±2.749	81.92
25	6.966±0.206	0.632±0.027	3.377±0.072	113.101±1.578	74.89
26	6.632±0.065	1.816±0.053	4.276±0.068	146.910±1.645	96.98
27	7.512±0.286	1.824±0.008	3.952±0.128	143.809±3.300	97.60
水提组	2.590±0.024	1.520±0.008	2.801±0.010	122.782±1.239	–

大而增多;总黄酮含量在经发酵后增多,随发酵时长增大而增多;发酵 2 ~ 3 d 时总多糖含量提升,在发酵 3 d 时增幅最大。根据评分标准得出蛹虫草真菌发酵组中第 15 组得分最高,因此认定发酵 3 d 为蛹虫草真菌最佳发酵时间。

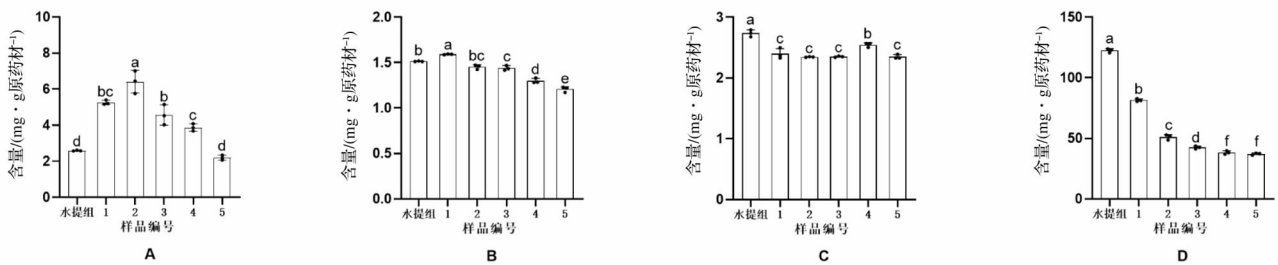
3.1.5 蛹虫草真菌发酵接种量优化结果分析 如表 2 和图 5 所示,在接种量优化实验中,与水提组相比,人参皂苷 Re 含量均增加;在 3% 接种蛹虫草真菌时人参皂苷 Re 含量上升最多;橙皮苷含量 1% 和 3% 接种量有显著性提高;总黄酮含量均增加,且随接种量加大而增多;总多糖含量亦增多,接种量在 1% 和 3% 时组间显著性增多。根据蛹虫草真菌接种量优化组中总评分可看出第 15 组得分最高,蛹虫草真菌接种量为 3% 时为其最适接种量。

3.1.6 蛹虫草真菌发酵 pH 值优化结果分析 如表 2 和图 6 所示,在 pH 优化实验中,与水提组相比,人参皂苷 Re 含量增多,且随 pH 值增大而不断增加;橙皮苷含量在 pH 值为 5 ~ 7 时增多,随 pH 值增大而减少;总黄酮含量增多,pH 值在 6 时增幅最大;总多糖含量仅在 pH 值为 6 时增多。根据蛹虫草真菌 pH 值优化组中总评分可看出仍是第 15 组得分最高,故蛹虫草真菌的最适发酵条件为 pH 值为 6 的弱酸性环境。因此,蛹虫草真菌的发酵参苓白术散改良方最适条件为在 pH 为 6 的条件下,以 3% 接种量接种后发酵 3 d。

3.1.7 多菌种发酵菌种接种顺序结果分析 如表 2 和图 7 所示,在多菌种发酵实验中,与水提组相比,多菌种发酵各项指标显著提升。先接种蛹虫草真菌的多菌种发酵组较其他组人参皂苷 Re 含量有显著性提升;橙皮苷含量较阿氏肠杆菌发酵组均有显著性提升,较蛹虫草发酵组无显著性提升;先接种阿氏肠杆菌的多菌种发酵组总黄酮含量增幅最大;多菌种发酵组和蛹虫草发酵组总多糖含量均高于阿氏肠杆菌发酵组,且多菌种发酵组的主要活性成分含量增强率优于单菌种发酵组。根据评分标准得出第 26 组得分最高,先接种阿氏肠杆菌为多菌种发酵的接种顺序。

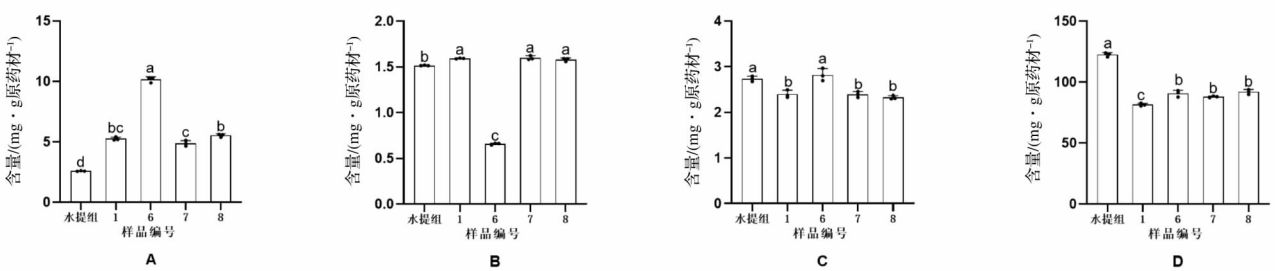
3.2 细胞实验结果

3.2.1 不同浓度参苓白术散改良方发酵液对 GES - 1 细胞增殖情况的影响 与对照组相比较,水提组和低、中、高剂量组参



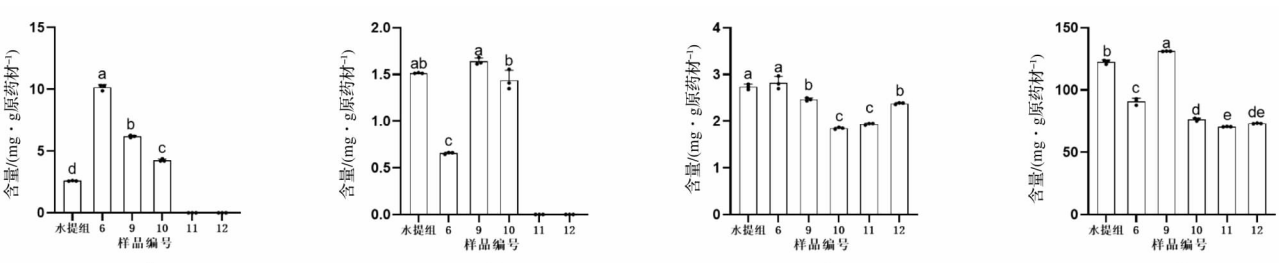
注:A. 人参皂苷 Re 含量;B. 橙皮苷含量;C. 总黄酮含量;D. 总多糖含量;不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),相同字母为差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 1 阿氏肠杆菌发酵时长优化活性成分含量测定结果



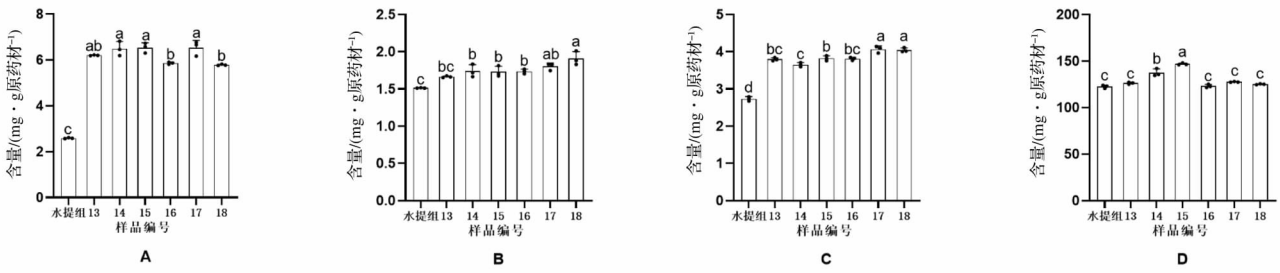
注:A. 人参皂苷 Re 含量;B. 橙皮苷含量;C. 总黄酮含量;D. 总多糖含量;不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),相同字母为差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 2 阿氏肠杆菌发酵接种量优化活性成分含量测定结果



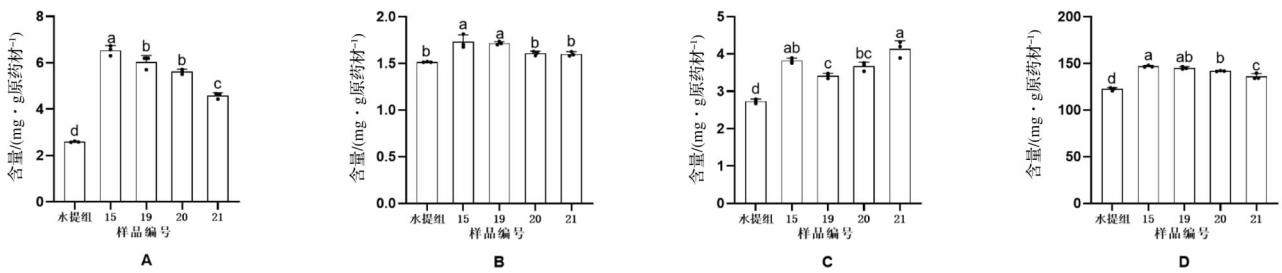
注:A. 人参皂苷 Re 含量;B. 橙皮苷含量;C. 总黄酮含量;D. 总多糖含量;不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),相同字母为差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 3 阿氏肠杆菌发酵 pH 值优化活性成分含量测定结果



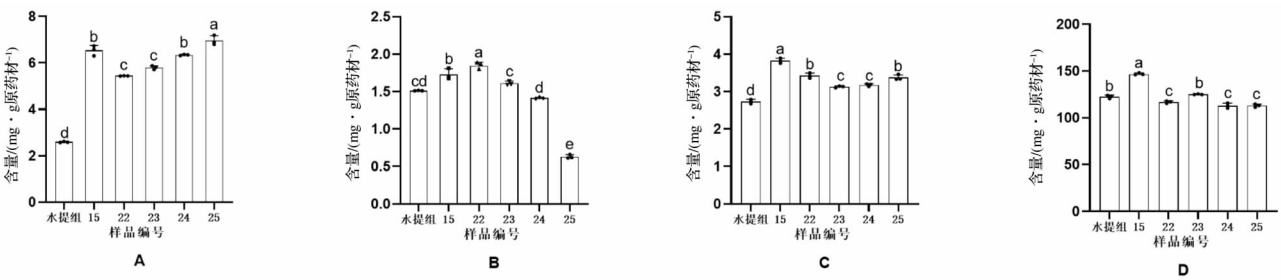
注:A. 人参皂苷 Re 含量;B. 橙皮苷含量;C. 总黄酮含量;D. 总多糖含量;不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),相同字母为差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 4 蛹虫草真菌发酵时长优化活性成分含量测定结果



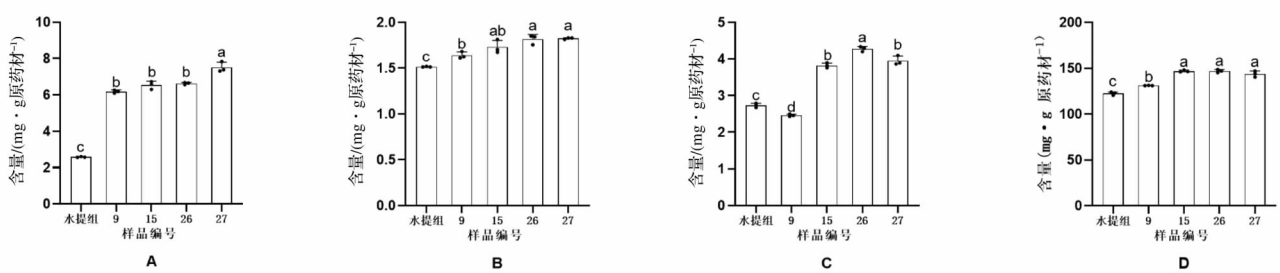
注:A. 人参皂苷 Re 含量;B. 橙皮苷含量;C. 总黄酮含量;D. 总多糖含量;不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),相同字母为差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 5 蛹虫草真菌发酵接种量优化活性成分含量测定结果



注:A. 人参皂苷 Re 含量;B. 橙皮苷含量;C. 总黄酮含量;D. 总多糖含量;不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),相同字母为差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 6 蛹虫草真菌发酵 pH 值优化活性成分含量测定结果



注:A. 人参皂苷 Re 含量;B. 橙皮苷含量;C. 总黄酮含量;D. 总多糖含量;不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),相同字母为差异无统计学意义($P>0.05$)。

图 7 多菌种发酵活性成分含量测定结果

苓白术散改良方发酵液含药血清在孵育 48 h 均能促进 GES-1 细胞的增殖活力,但在低、高剂量组效果显著,其中低剂量组发酵液在孵育 48 h 时对细胞增殖活力具有明显的促进作用,且对细胞增殖活力效果最好。水提组和低、高剂量组发酵液在孵育 72 h 能促进 GES-1 细胞的增殖活力,但是相比于 48 h 促进细胞增殖效果随作用时间增长而衰退,其结果说明参苓白术散改良方及其发酵液的安全性和有效性,但值得注意的是中剂量在作用 72 h 后细胞增殖活力相比于对照组低,如插页Ⅰ图 8 所示。

3.2.2 不同浓度参苓白术散改良方发酵液对酒精干预后 GES-1 细胞基础凋亡状况的影响 经 FlowJo-V10 分析得到

的流式细胞术检测 GES－1 细胞基础凋亡状况的结果表明，模型组凋亡率比正常组增加（$P<0.05$）；与模型组相比参苓白术散改良方水提组早期凋亡率有降低（$P<0.05$），但晚期凋亡率增加（$P<0.05$）；中、高剂量组参苓白术散改良方发酵液早期凋亡率显著性降低（$P<0.05$），高剂量组晚期凋亡率几乎不变，其余组晚期凋亡率有显著性增加，中、高剂量总凋亡率在 13.63%～17.43%，差异有统计学意义（$P<0.05$），表明中、高剂量的参苓白术散改良方发酵液能够有效降低 GES－1 细胞酒精性损伤的总凋亡率，如插页Ⅰ图 9 所示。

4 结论与讨论

经蛹虫草真菌发酵后黄酮含量增加，其原因可能是蛹虫草这类真菌自身含有一定量的黄酮类物质，在发酵的过程中不断积累，高压灭菌处理后使子实体内黄酮类物质溢出，从而提高了总黄酮含量。阿氏肠杆菌使总多糖含量减少，多糖被消耗可能是因为随着发酵的进行，微生物不断生长利用并分解糖类物质[19]。蛹虫草中菌丝体中较其他部位多糖含量最大[20]，而在液体发酵中蛹虫草真菌产生大量菌丝体，从而仅蛹虫草真菌使总多糖含量增多，同时发酵过程中还可能产生具有还原力且能显著提升自由基清除能力的氨基酸和抗氧化维生素等物质[21]。

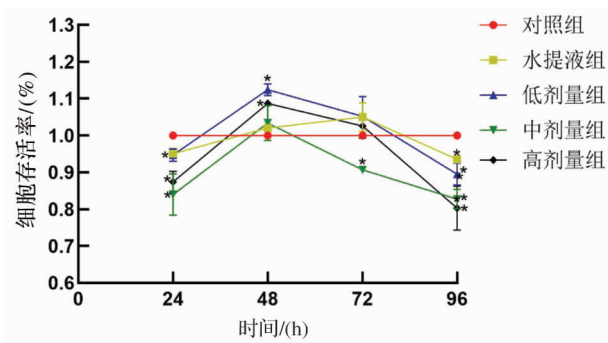
参苓白术散改良方发酵液对酒精干预后 GES－1 细胞基础凋亡状况影响结果显示，参苓白术散改良方发酵液的中、高剂量组对 GES－1 细胞酒精性损伤的凋亡率有显著提高，且高剂量组对凋亡率改善最大。这可能是由于参苓白术散改良方发酵后主要活性物质提升带来的影响，且中、高剂量组降低 GES－1 细胞酒精性损失主要是降低其早期凋亡率，有研究表明黄酮类可减少早期细胞凋亡，减少细胞内活性氧、丙二醛含量，且能够降低 GES－1 细胞的氧化应激[22]，且大量的实验研究证明多糖有助于增强细胞膜的紧密性，抑制氧化应激，修复细胞损伤[23－25]。通过微生物转化制备了一种活性指标含量更高且抗酒精性胃损伤功能更有效的发酵液，并从细胞层面验证了其安全性和有效性，给这类健康产品研发带来新思路。

参考文献

[1] 刘睿，珠娜，郝云涛，等. 核桃低聚肽对大鼠胃黏膜损伤的保护作用[J]. 食品科学，2021，42(7)：191－197.
[2] MA K，BALOCH Z，HE T T，et al. Alcohol consumption and gastric cancer risk：a meta－analysis[J]. Med Sci Monit，2017，23：238－246.
[3] SUZUKI Y，ISHIHARA M，SEGAMI T，et al. Anti－ulcer effects of antioxidants，quercetin，alpha－tocopherol，nifedipine and tetracycline in rats[J]. Jpn J Pharmaco，1998，78(4)：435－441.
[4] BRZOZOWSKI T，KONTUREK P C，KONTUREK S J，et al. The role of melatonin and L－tryptophan in prevention of acute gastric lesions induced by stress，ethanol，ischemia，and aspirin[J]. J Pineal Res，1997，23(2)：79－89.
[5] 王雪雪，尹爱武，陶柱萍，等. 中草药抗酒精性胃损伤活性成分及其作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志，2020，45(20)：4836－4845.
[6] DA SILVA L M，PEZZINI B C，SOMENSI L B，et al. Hesperidin，a citrus flavanone glycoside，accelerates the gastric healing process of acetic acid－induced ulcer in rats[J]. Chem Biol Interact，2019(1)：308：45－50.
[7] SELMI S，RTIBI K，GRAMI D，et al. Protective effects of orange (Citrus sinensis L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat[J]. Lipids Health Dis，2017，16(1)：152.
[8] 孔宏亮，赵雨婷，蒋玉昆，等. 人参皂苷 Rb1 对心力衰竭大鼠线粒体膜电位的影响[J]. 中国医药，2020，15(9)：1351－1354.
[9] JANG H J，HAN I H，KIM Y J，et al. Anticarcinogenic effects of products of heat－processed ginsenoside Re，a major constituent of ginseng berry，on human gastric cancer cells[J]. J Agric Food Chem，2014，62(13)：2830－2836.
[10] 陆海霞，徐莹，潘美辰，等. 谷氨酰胺、姜黄素组方对酒精性胃粘膜损伤的保护作用[J]. 食品工业科技，2024，45(4)：299－304.
[11] LIU B，FENG X，ZHANG J，et al. Preventive effect of anji white tea flavonoids on alcohol－induced gastric injury through their antioxidant effects in kunming mice[J]. Biomolecules，2019，9(4)：137.
[12] CHENG D，KONG H. The effect of Lycium barbarum polysaccharide on alcohol－induced oxidative stress in rats[J]. Molecules，2011，16(3)：2542－2550.
[13] 谢耀慧，李成义，冯慧敏，等. 中药活性成分微生物发酵研究进展[J/OL]. 中成药：1－7[2024－06－07].
[14] 彭杨月，常满，牛盼迪，等. 发酵中药改善肠道屏障和肠道菌群的研究进展[J]. 中国现代应用药学，2023，40(11)：1563－1570.
[15] 刘秀玉，罗凌龙，马莹，等. 植物天然产物途径创建[J]. 药学学报，2021，56(12)：3285－3299.
[16] 马定财，王毛毛，王哲，等. 补益类中药发酵方面研究进展[J]. 中成药，2024，46(11)：3735－3740.
[17] LV W，MA Y，ZHANG Y，et al. Effects of Lactobacillus plantarum fermented Shenling Baizhu San on gut microbiota，antioxidant capacity，and intestinal barrier function of yellow－plumed broilers[J]. Front Vet Sci，2023，10：1103023.
[18] GUO X，YAN Z，WANG J，et al. Effect of traditional chinese medicine (TCM) and its fermentation using Lactobacillus plantarum on ceftriaxone sodium－induced dysbacteriotic diarrhea in mice[J]. Chin Med，2022，17(1)：20.
[19] 周映君，谢纯良，陈柏忠，等. 不同酵母菌与植物乳杆菌复合发酵对新会柑酵素品质的影响[J]. 食品工业科技，2022，43(6)：118－125.
[20] 陈丽冰. 北虫草固体培养残基中多糖和虫草素高效提取与纯化研究[D]. 荆州：长江大学，2015.
[21] HU Y，WANG Y，LI A，et al. Effects of fermented rapeseed meal on antioxidant functions，serum biochemical parameters and intestinal morphology in broilers[J]. Food and Agricultural Immunology，2016，27(2)：182－193.
[22] TY，LIANG J，AI JY，CUI JL，et al. Mulberry ethanol extract and rutin protect alcohol－damaged GES－1 cells by inhibiting the MAPK pathway[J]. Molecules，2022，27(13)：4266.
[23] LIU H，ZHUANG S，LIANG C，et al. Effects of a polysaccharide extract from Amomum villosum Lour. on gastric mucosal injury and its potential underlying mechanism[J]. Carbohydr Polym，2022，294：119822.
[24] HUI H，LI X，JIN H，et al. Structural characterization，antioxidant and antibacterial activities of two heteropolysaccharides purified from the bulbs of Lilium davidii var unicolor Cotton[J]. Int J Biol Macromol，2019，133：306－315.
[25] ZHANG Y，ZHOU T，WANG H，et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of an acidic polysaccharide from Angelica sinensis (Oliv.) Diels[J]. Carbohydr Polym，2016，147：401－408.

参苓白术散改良方发酵工艺及对 GES－1 细胞酒精性损伤的干预作用研究

（正文见 6－12 页）



注：* 与对照组相比，$P<0.05$。

图 8　参苓白术散改良方水提液及发酵液含药血清对 GES－1 细胞增殖活力的影响

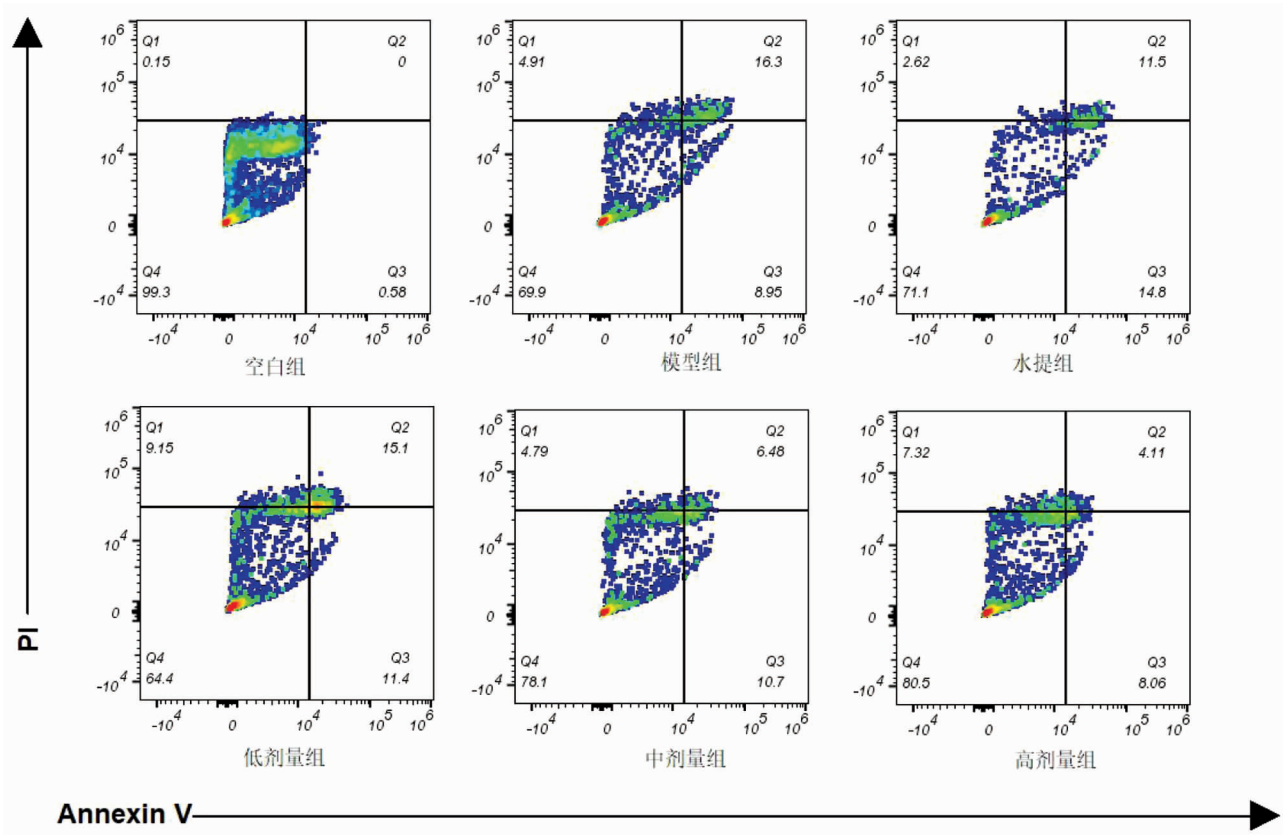


图 9　发酵液含药血清对 GES－1 细胞酒精性损失基础凋亡状况的影响