



## 黄芪渣虫草发酵粉的抑菌活性及安全性评价

朱振元, 肖超岭, 孙会轻, 代丽翠, 高 辉

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 为了评价黄芪渣虫草发酵粉的抑菌活性和安全性, 以及为其综合开发提供科学依据, 对黄芪渣虫草发酵粉粗提物的抑菌活性进行了研究, 并对其发酵粉中重金属及其污染微生物进行了测定. 抑菌实验结果表明, 黄芪渣虫草发酵粉对常见的 4 种细菌的抑制作用大小依次为沙门氏菌( $G^-$ ) > 金黄色葡萄球菌( $G^+$ ) > 枯草芽孢杆菌( $G^+$ ) > 大肠杆菌( $G^-$ ), 而对真菌抑菌效果最好的是曲霉和青霉, 对根霉和毛霉无明显抑制作用. 重金属定量检测, 铅的含量为 0.795 4 mg/kg, 汞的含量为 0.019 0 mg/kg, 砷的含量为 0.636 4 mg/kg. 在微生物分析中, 根据国家标准规定的方法, 培养测得菌落总数为  $140 g^{-1}$ , 大肠菌群数少于 30 个/100 g, 霉菌数为  $0 g^{-1}$ , 沙门氏菌未检出.

**关键词:** 黄芪渣; 冬虫夏草; 发酵; 重金属; 微生物; 安全性

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2013)04-0001-04

## Antibacterial Activity and Safety Assessment of the Powder of Astragalus Residues Fermented by *Cordyceps Sinensis*

ZHU Zhenyuan, XIAO Chaoling, SUN Huiqing, DAI Licui, GAO Hui

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** To evaluate the safety and provide basis for comprehensive development and utilization of the powder of astragalus residues fermented by *Cordyceps*, the antimicrobial effects of extracts and the contents of heavy metals and microbe in this powder were measured. The antimicrobial ability of the extract is: *Salmonella spp* ( $G^-$ ) > *Staphylococcus aureus* ( $G^+$ ) > *Bacillus subtilis* ( $G^+$ ) > *Escherichia coli* ( $G^-$ ). As to the fungi, the best effect of antimicrobial is on *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.*, while its effect on *Rhizopus spp.* and *Mucor spp.* is not obvious. The testing results of heavy metals and microbe show that the lead content is 0.795 4 mg/kg, mercury 0.019 0 mg/kg, and arsenic 0.636 4 mg/kg. In the microbiological analysis, the total counts of mesophilic aerobic bacteria (TMAB) is  $140 g^{-1}$ , the counts of *Coliform* group is fewer than 30 a/100 g, the counts of *fungus* is  $0 g^{-1}$ , and *salmonella* are not found.

**Key words:** astragalus residues; *Cordyceps sinensis*; fermentation; heavy metals; microbe; safety

我国是中药的生产及消费大国, 随着市场对中药材需求量的增加以及对中药资源开发力度的增大, 每年药渣的产量也越来越高, 而大多数都被中药制药厂当作废料垃圾掩埋或者焚烧. 药渣中残余许多有效成分, 除含有大量的纤维素、木质素外, 通常还有糖类、蛋白质、氨基酸、油脂、有机酸、苷类、生物碱、黄酮类、无机盐、维生素等<sup>[1]</sup>, 如: 黄芪药渣中还残留有多糖、皂苷类、黄酮类和氨基酸类等化合物<sup>[2-3]</sup>, 所以

亟需综合利用中药药渣的新技术.

黄芪渣虫草发酵粉即以此为前提研究发明的, 以黄芪药渣为基质接种冬虫夏草菌——中国拟青霉, 进行固体发酵培养, 发酵结束可获得富含虫草多糖、虫草酸、蛋白质等活性成分的黄芪虫草固体培养物, 烘干粉碎后即黄芪渣虫草发酵粉<sup>[4]</sup>. 本文对黄芪渣虫草发酵粉粗提物进行抑菌实验, 并对其重金属及污染微生物进行检测, 为黄芪渣虫草发酵粉的综合开发利

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-04-22

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2A100009)

作者简介: 朱振元(1969—), 男, 湖南武冈人, 教授, zhyuanzhu@tust.edu.cn.

用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黄芪渣虫草发酵粉,天津科技大学生物资源与功能食品研究室提供。大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella* spp.)、毛霉(*Mucoraceae* spp.)、根霉(*Rhizopus* spp.)、青霉(*Penicillium* spp.)、曲霉(*Aspergillus* spp.)由天津科技大学菌种保藏室提供。

AA-6800 型原子吸收分光光度计,日本岛津公司; AFS-830 型双道原子荧光光度计,北京吉天有限公司;超净工作台,苏净集团安泰公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海华线医用核子仪器有限公司;电热恒温培养箱,上海福马实验设备有限公司。

### 1.2 提取物制备

称取黄芪渣虫草发酵粉 20 g 于 250 mL 圆底烧瓶中,以料液比(g:mL)1:10 的比例加入 70%乙醇溶液。50 °C 回流浸提 2 h,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,重复上述步骤 3 次。将 3 次的上清液合并并进行抽滤,保证上清液的澄清。将上清液进行旋转蒸发,得到浓缩液。将浓缩液在-50 °C 冷冻干燥,最终得到粗提取物冻干粉。

### 1.3 培养基制备

牛肉膏蛋白胨培养基与 PDA 培养基参考文献[5]方法进行配制。

### 1.4 菌悬液制备

细菌菌悬液的制备:将各供试菌接种于适宜的培养基上,进行斜面活化,37 °C 培养 18~24 h,挑取单个菌落分别接种于新鲜肉汤培养基中,37 °C 培养 18~24 h 后,用灭菌生理盐水稀释至  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  备用。

真菌悬浮液的制备<sup>[6]</sup>:取 25 °C 下培养 10 d 的带菌 PDA 平皿,加入含 0.05%吐温 20 的无菌水 10 mL,用玻璃棒刮下平板上的霉菌孢子,然后转入 50 mL 三角瓶中,在微型旋涡混合器上振荡 15 s,再经双层纱布过滤,血球计数板计数,稀释至  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  备用。

### 1.5 琼脂孔扩散法抑菌活性测定<sup>[7-8]</sup>

粗提物溶液配制:用两倍稀释法将提取物冻干粉制成质量浓度为 30、60、120 mg/mL 的溶液。

将高压灭菌的琼脂培养基(细菌用牛肉膏蛋白胨培养基,霉菌用 PDA 培养基)倒入干燥灭菌的培养皿内,厚度约为 2 mm,待培养基冷凝后,加入 0.2 mL 菌悬液于培养基上,均匀涂布,用无菌金属打孔器( $d=6 \text{ mm}$ )打成深 2 mm 的小孔 4 个,去除孔内琼脂并适当封闭孔底。分别吸取 40  $\mu\text{L}$  不同浓度提取物加入孔内,并用各自的溶剂作空白对照。细菌于 37 °C 培养 24~48 h,霉菌 28 °C 培养 48~96 h,设 3 个平行组,用十字交叉法测量抑菌圈直径。实验重复 3 次,取其平均值  $\pm$  标准差作为测定结果。

### 1.6 重金属含量的测定

选取铅、汞、砷这 3 种重金属进行测定,用 AA-6800 原子吸收分光光度计和 AFS-830 双道原子荧光光度计测定相应标液及样品中重金属铅、汞、砷的含量,绘制标准曲线,计算其重金属含量。

### 1.7 微生物学检验

称取 25 g 黄芪渣虫草发酵粉置于 225 mL 灭菌蒸馏水的锥形瓶,充分混匀,即为 1:10 稀释液。取 1:10 稀释液 1 mL 注入含有 9 mL 无菌水的试管中,另换一支 1 mL 无菌吸管反复吹吸,此液为 1:100 稀释液。按上述顺序,如此递增稀释。根据国家食品安全标准要求或对标本污染情况的估计,选择 2~3 个适宜稀释度进行检验。

按照国家食品安全标准<sup>[9-12]</sup>规定,对黄芪渣虫草发酵粉的菌落总数、大肠菌群、沙门氏菌、霉菌进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度提取液的抑菌效果

通过琼脂孔扩散法测定了不同浓度提取液对常见污染菌的抑菌活性,其结果见表 1。由表 1 可知,不同浓度提取物对细菌均有明显抑菌效果,且呈剂量关系,其抑菌效果由大到小依次为沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌。而提取物对曲霉和青霉有明显的抑制作用,且呈剂量关系,对曲霉抑菌效果优于青霉,对毛霉和根霉几乎没有抑制作用。

发酵粉中含有丰富的虫草菌丝体,菌丝体中有些成分有显著抗生素作用,如虫草素<sup>[13]</sup>、虫草多糖、多肽<sup>[14]</sup>、酶类<sup>[15]</sup>、环孢菌素、蛇形虫草素及腺苷类抗生素等成分,都具有一定的抑菌作用,而且黄芪残渣中还残留黄芪甲苷<sup>[16]</sup>、黄芪多糖<sup>[17]</sup>等抑菌物质。所以该

发酵粉具有一定抑菌活性。

表 1 提取物的抑菌作用

Tab. 1 Antimicrobial effects of extracts from the powder

提取液质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	抑菌圈直径/mm							
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	沙门氏菌	枯草芽孢杆菌	青霉	曲霉	毛霉	根霉
30	12.30 ± 0.32	13.00 ± 0.37	14.20 ± 0.33	12.20 ± 0.18	10.80 ± 0.62	12.50 ± 0.42	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00
60	15.20 ± 0.22	16.10 ± 0.78	17.30 ± 0.56	14.40 ± 0.42	12.20 ± 0.30	13.90 ± 0.34	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00
120	17.80 ± 0.45	18.60 ± 0.65	20.00 ± 0.32	17.00 ± 0.46	14.00 ± 0.23	16.80 ± 0.66	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00
空白对照	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00

注:直径为 6.00 mm 表示未观察到明显抑菌圈。

## 2.2 重金属含量

### 2.2.1 铅含量

铅标准曲线回归方程为  $y = 0.006x + 0.0086$ , 其中相关系数  $R^2 = 0.9982$ 。

测定结果表明,黄芪渣虫草发酵粉中铅的含量为 0.7954 mg/kg, 国家对不同食品中铅限量指标为 0.02 ~ 5 mg/kg<sup>[18]</sup>, 对不同饲料和饲料添加剂中铅限量指标为 5 ~ 40 mg/kg<sup>[19]</sup>。

### 2.2.2 汞含量

汞标准曲线回归方程为  $y = 1413.7x - 40.072$ , 其中相关系数  $R^2 = 0.9996$ 。

测定结果表明,黄芪渣虫草发酵粉中汞的含量为 0.0190 mg/kg, 国家对不同食品中汞限量指标为 0.01 ~ 0.05 mg/kg<sup>[18]</sup>, 对不同饲料和饲料添加剂中汞限量指标为 0.1 ~ 0.5 mg/kg<sup>[19]</sup>。

### 2.2.3 砷含量

砷标准曲线回归方程为  $y = 246.62x - 9.8010$ , 其中相关系数  $R^2 = 0.9989$ 。

测定结果表明,黄芪渣虫草发酵粉中砷的含量为 0.6364 mg/kg, 国家对不同食品中砷限量指标为 0.05 ~ 1 mg/kg<sup>[18]</sup>, 国家对不同饲料和饲料添加剂中砷限量指标为 2 ~ 20 mg/kg<sup>[19]</sup>。

通过重金属检测可知,黄芪渣虫草发酵粉完全符合国家对饲料及饲料添加剂中铅、汞、砷的限量标准,可完全应用于饲料及饲料添加剂方面,而在食品方面则需要视具体情况而定。

分析原因可能为,黄芪渣原料本身重金属超标,且超微粉碎过程中与金属粉碎机剧烈接触,可能有少量金属掺入发酵粉中。

## 2.3 微生物含量

微生物检测的数据见表 2。测定其中的菌落总数为 140 g<sup>-1</sup>, 数量极少。在测定大肠菌群数时, 均无阳性反应, 经计算得小于 30 个/100 g。沙门氏菌是危险性较大的致病菌, 所以, 也检测了其含量。结果表明

黄芪渣虫草发酵粉中不含有致病性沙门氏菌。最后, 检测了霉菌的含量, 培养的平皿均无菌落生长, 含量为 0 g<sup>-1</sup>。

分析原因: 黄芪渣虫草发酵粉生产过程中先经过高温灭菌, 再接种发酵, 经高温干燥后超微粉碎而得, 其发酵前经过高温灭菌, 且发酵菌种单一, 未杂菌污染, 中国拟青霉为低温菌种, 发酵后高温干燥, 菌种失活。

表 2 微生物检测的结果

Tab. 2 Results of microbiological determination

样品	菌落 总数/g <sup>-1</sup>	大肠菌群 (个/100 g)	沙门氏菌	霉菌/g <sup>-1</sup>
发酵粉	140	<30	未检出	0

## 3 结 论

通过对黄芪渣虫草发酵粉提取物抑菌活性的测定, 并对发酵粉中重金属及污染微生物的检测表明: 黄芪渣虫草发酵粉有一定抑菌活性, 其中重金属和微生物含量符合国家关于饲料及饲料添加剂的卫生标准; 而且黄芪渣虫草发酵粉含有丰富的虫草多糖、虫草酸、蛋白质等活性物质<sup>[4]</sup>, 可完全应用于饲料及饲料添加剂领域, 从而提高动物生产性能及免疫力, 达到资源的最优利用, 而且可以降低生产成本, 提高经济效益, 减少抗生素的应用, 为其综合利用提供了广阔的前景。

## 参考文献:

- [1] 马逊风, 马宏军, 唐占辉, 等. 中药渣剩余成分分析及利用途径研究[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2004, 36(2): 108-111.
- [2] 黄亚非, 刘杰, 黄际薇, 等. HPLC 测定黄芪药渣中黄芪甲苷含量[J]. 中山大学学报: 自然科学, 2009, 48(2): 146-148.

- [ 3 ] 周萍,王成军,邓励. 黄芪药渣中黄芪甲苷含量的测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(13):7773-7774.
- [ 4 ] 朱振元,丁丽娜,姚强,等. 黄芪渣中国拟青霉固体培养及发酵产物分析[J]. 食品研究与开发,2012,33(2):171-173.
- [ 5 ] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000:349-354.
- [ 6 ] Bi Y, Tian S P, Guo Y R, et al. Sodium silicate reduces postharvest decay on Hami melons: Induced resistance and fungistatic effects[J]. Plant Disease, 2006, 90(3): 279-283.
- [ 7 ] 万京华,章晓联,辛善禄. 鸭跖草的抑菌作用研究[J]. 公共卫生与预防医学,2005,16(1):25-27.
- [ 8 ] Mathabe M C, Nikolova R V, Lall N, et al. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 105(1/2):286-293.
- [ 9 ] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.2—2010 食品安全国家标准·食品微生物学检验·菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [ 10 ] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.3—2010 食品安全国家标准·食品微生物学检验·大肠菌群计数[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [ 11 ] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.4—2010 食品安全国家标准·食品微生物学检验·沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [ 12 ] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789.15—2010 食品安全国家标准·食品微生物学检验·霉菌和酵母计数[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [ 13 ] 彭国平,李红阳,袁永泰. 冬虫夏草与人工蛹虫草的成分比较[J]. 南京中医药大学学报,1996,12(5):26-27.
- [ 14 ] Wong J H, Ng T B, Wang H, et al. Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*[J]. Phytomedicine, 2011, 18(5):387-392.
- [ 15 ] Park B T, Na K H, Jung E C, et al. Antifungal and anti-cancer activities of a protein from the Mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Korean Journal of Physiology Pharmacology, 2009, 13(1):49-54.
- [ 16 ] 张金婷,邓旋,车团结,等. 黄芪浸出液对致龋菌的体外抑菌实验[J]. 实用口腔医学杂志,2009,25(4):588-590.
- [ 17 ] 李树鹏,郝艳霜,陈福星,等. 黄芪多糖和 2 株益生菌体外抑菌作用研究[J]. 河南农业科学,2007(4):86-88.
- [ 18 ] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 2762—2005 食品中污染物限量[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [ 19 ] 中华人民共和国卫生部. GB 13078—2001 饲料卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社,2001.

责任编辑:郎婧