



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

## 《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 基于六神曲原料固态发酵制品的制备及其对小鼠食积和结肠炎的缓解作用  
作者： 张禾宁， 门志月， 包莉媛， 李军训， 罗学刚， 宋亚团  
DOI： 10.13364/j.issn.1672-6510.20250034  
收稿日期： 2025-03-01  
网络首发日期： 2025-07-29  
引用格式： 张禾宁， 门志月， 包莉媛， 李军训， 罗学刚， 宋亚团. 基于六神曲原料固态发酵制品的制备及其对小鼠食积和结肠炎的缓解作用[J/OL]. 天津科技大学学报. <https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250034>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



# 基于六神曲原料固态发酵制品的制备及其对小鼠食积和结肠炎的缓解作用

张禾宁<sup>1</sup>, 门志月<sup>1</sup>, 包莉媛<sup>1</sup>, 李军训<sup>2</sup>, 罗学刚<sup>1</sup>, 宋亚团<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 山东泰山生力源集团股份有限公司, 山东泰安 271000)

**摘要:** 为了开发一种基于六神曲原料的复合菌株固态发酵制品并对其肠胃调节功能进行研究。使用筛选的马克斯克鲁维酵母 JSA16、植物乳植杆菌 BY3 和枯草芽孢杆菌 BK3 组合, 对六神曲底物进行联合固态发酵, 对制品指标进行评价, 并通过动物实验研究该固态发酵制品对高蛋白饮食小鼠食积的缓解作用以及对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠肠道的保护作用。结果表明: 固态发酵制品的三联菌发酵后固态制品总酸含量、可溶性多肽含量、还原糖含量分别是发酵前的 7.9 倍、12.0 倍、4.2 倍。该制品能有效缓解高蛋白饮食小鼠的食积症状, 粪便含水量、小肠推进率和胃泌素分泌分别提高了 9.3%、30.6% 和 83.7%, 胃残留率降低了 45.2%。同时, 该制品显著增加结肠炎小鼠的结肠长度并缓解便血, 免疫指数降低了 18.5%, 炎症因子 (IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) 水平分别下降了 27.0%、17.9%、34.3%。结论: 该固态发酵制品具有缓解积食和抗结肠炎的作用, 在食品、饲料及医药领域具有应用潜力。

**关键词:** 六神曲; 固态发酵; 食积; 结肠炎

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

## Solid state fermentation products based on Massa Medicata Fermentata substrate and its alleviation of indigestion and colitis in mice

ZHANG Hening<sup>1</sup>, MEN Zhiyue<sup>1</sup>, BAO Liyuan<sup>1</sup>, LI Junxun<sup>2</sup>, LUO Xuegang<sup>1</sup>, SONG Yajian<sup>1\*</sup>

(1. College of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Shandong Taishan Shengliyuan Group Co., Ltd, Taian 271000, China)

**Abstract:** To develop and investigate a solid-state fermentation product based on Massa Medicata Fermentata for its gastrointestinal regulatory functions. A consortium of screened strains *Kluyveromyces marxianus* JSA16, *Lactiplantibacillus plantarum* BY3, and *Bacillus subtilis* BK3 was employed for cooperative solid-state fermentation of Massa Medicata Fermentata. The efficacy of the fermented product was assessed through physicochemical analyses and in vivo studies, evaluating its ability to alleviate food stagnation in high-protein diet-fed mice and its anti-inflammatory properties in dextran sulfate sodium-induced colitis mice. Results Fermentation significantly enhanced total acid, soluble peptide, and reducing sugar contents by reaching 7.9-, 12.0-, and 4.2-fold, respectively. In high-protein diet-fed mice, the fermented product alleviated food stagnation, increasing fecal water content by 9.3%, improving small intestinal propulsion by 30.6%, elevating gastrin secretion by 83.7%, and reducing gastric retention by 45.2%. In colitis mice, it extended colon length, alleviated hematochezia, reduced the immune index by 18.5%, and significantly lowered pro-inflammatory cytokine levels (IL-6 by 27.0%, IL-1 $\beta$  by 17.9%, and TNF- $\alpha$  by 34.3%). The solid-state fermented product possesses the potential to mitigate food accumulation and exert anti-colitis effects, highlighting its promising applications in the fields of food, feed, and medicine.

收稿日期: 2025-03-01; 修回日期: 2025-04-27

基金项目: 天津市科技成果转化项目 (24ZYCGSY00390)

作者简介: 张禾宁(1997—), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生; 通信作者: 宋亚团, 副教授, songyajian@tust.edu.cn

**Key words:** Massa Medicata Fermentata; solid state fermentation; indigestion; colitis

六神曲 (Massa Medicata Fermentata, MMF), 又名神曲、六曲, 在临床使用中被广泛认为具有健脾胃、消食、调中等功效<sup>[1]</sup>。传统六神曲以鲜青蒿、鲜苍耳、鲜辣蓼、赤小豆、杏仁, 麦麸、白面为底物, 经过自然发酵制成<sup>[2]</sup>。六神曲发酵过程实质为微生物生长、演替和代谢的过程, 发酵原料在微生物的作用下被降解转化为生物活性物质, 如消化酶、可溶性肽、还原糖、维生素、挥发油、苷类、黄酮类物质等, 从而发挥重要的生理调控作用<sup>[3]</sup>。

自然发酵的六神曲微生物种类、数量不易控制, 导致产品不同批次受发酵温度、时间、湿度、菌种等因素影响, 造成质量参差不齐, 甚至发生有害微生物污染, 产生有毒代谢产物<sup>[4]</sup>。目前, 六神曲的质量控制标准仍以外观性状为主, 以观察颜色、菌斑菌衣、折断面质地、纹孔和气味来辨别优劣, 缺乏量化评价指标, 无法对产品质量进行有效控制<sup>[5]</sup>。通过人工接种进行发酵可以快速提升目标菌种数量, 提高酶活力, 抑制其他杂菌生长, 有利于缩短发酵时间和控制六神曲品质<sup>[6]</sup>。酵母菌作为六神曲发酵过程中的优势菌种之一, 可以利用底物中的无机氮源和碳水化合物迅速生长, 有效降解抗营养因子, 合成微生物蛋白、维生素等生物活性物质<sup>[7-8]</sup>; 乳酸菌是固态发酵常用菌种, 可通过产生乳酸降低环境中的 pH, 抑制部分杂菌的生长, 同时乳酸菌还可以通过产生活性代谢产物改良发酵产物的风味, 产生益生效果<sup>[9]</sup>; 芽孢杆菌和霉菌具有丰富的纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶等酶系, 与霉菌相比, 芽孢杆菌的发酵周期更短, 繁殖速度更快<sup>[10-11]</sup>。因此, 酵母菌、芽孢杆菌和乳酸菌都可以作为六神曲发酵的理想候选菌株。

本研究将实验室分离筛选的优良酵母、乳酸菌及芽孢杆菌菌种联合用于固态发酵六神曲原料, 筛选获得最优组合马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) JSA16、植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) BY3 和枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BK3, 成功制备基于六神曲原料的固态发酵制品。并通过小鼠模型探讨了其对食积和结肠炎的干预作用和机制。该研究旨在建立基于六神曲底物的复合微生物固态发酵工艺, 开发具有肠道调节功能的新型功能制品。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

实验所有菌种均由实验室分离筛选, 其中马克斯克鲁维酵母 *K. marxianus* JSA16 (CGMCC 26422)、植物乳植杆菌 *L. plantarum* BY3 (CGMCC 26262) 和枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* BK3 (CGMCC 26260) 已保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。

#### 1.1.2 六神曲发酵原料

以传统发酵中药六神曲的发酵原料作为固态发酵制品的基质。根据卫生部药品标准 (中药成方制剂第 19 册), 六神曲的发酵原料为: 麦麸 5000 g, 面粉 2500 g, 辣蓼 500 g, 青蒿 500 g, 苍耳草 500 g, 赤小豆和苦杏仁各 100 g。

#### 1.1.3 试剂与仪器

葡聚糖硫酸钠 (DSS), 大连美仑生物技术有限公司; ELISA 试剂盒, 上海茁彩生物科技有限公司; 其他试剂, 北京索莱宝科技有限公司。

正置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; pH 计, 梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司; Multiskan SkyHigh 型全波长酶标仪、ST16R 型低温冷冻离心机, 美国 Thermo Forma 公司; R-3 型旋转蒸发仪, 瑞士步琪公司; 恒温培养摇床, 天津市欧诺仪器仪表有限公司; SPX-150 型生化培养箱, 北京市永光明医疗仪器厂; 鼓风干燥箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

### 1.2 实验动物及饲料

#### 1.2.1 高蛋白诱导的食积小鼠模型

24 只 (4 周龄) 健康雄性无特定病原体 (Specified pathogens free, SPF) 级 KM 小鼠来源于中国食品药品监督管理科学研究所 (批准号为 SWKL-20221203007)。高蛋白饲料由豆粕、鱼糜、面粉、奶粉按质量比 2 : 1 : 1 : 1 比例混合而成。

#### 1.2.2 DSS 诱导的结肠炎小鼠模型

24 只 (6 周龄) 健康雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠来源于中国食品药品监督管理科学研究所 (批准号 SWKL-20230106003); 常规饲料, 北京科奥协力饲料有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 发酵菌种组合的优化

酵母、乳酸菌、枯草芽孢杆菌按照 1 : 1 : 1 添加, 添加量均为  $10^7$  CFU/g, 30 °C 固态发酵 6 d,

通过相关发酵指标测定确定组合方案。

### 1.3.2 固态发酵方法

取麦麸 5000 g、面粉 2500 g、苦杏仁 100 g、红豆 100 g 混匀,经高温灭菌后置于 45 °C 烘箱干燥;辣蓼 500 g、青蒿 500 g、苍耳 500 g、加 10 倍质量纯净水煎煮浸提 1 h,4 层纱布过滤,浓缩至 1/5;混合制得固态发酵制品原料。

将 *K. marxianus* JSA16、*L. plantarum* BY3、*B. subtilis* BK3 以 1.3.1 中的比例混合接入制备好的固态发酵制品原料中,控制固态制品总含水量为 45%,在无菌环境下压制成型,30 °C 恒温培养箱(湿度 80%)发酵 4 d 至散发酸香味。将上述发酵后的固态发酵制品 75 °C 干燥 12 h 至表面微焦,取干燥后曲块加 10 倍质量的纯净水,煮开后过滤即得其煎煮液。

### 1.3.3 固态发酵制品基础指标测定

样品处理:样品经鼓风干燥箱 45 °C 干燥 4 h 至完全干燥,高速粉碎机粉碎后过筛,用于指标测定。

还原糖含量的测定:采用 3,5-二硝基水杨酸比色法(DNS 法)测定发酵后六神曲样品的还原糖含量。称取 1 g 样品,加入 50 mL 蒸馏水,充分搅拌,50 °C 水浴 60 min,离心取 1 mL 上清液,加入 1 mL 蒸馏水和 1.5 mL DNS 试剂,充分混匀,沸水浴加热 5 min。取出后迅速冷却,将反应体系定容至 25 mL。在 540 nm 波长下测定吸光度。配制不同质量浓度的葡萄糖溶液,绘制标准曲线,以此计算样品中还原糖的含量。

可溶性多肽含量的测定:采用福林酚法测定样品中可溶性多肽的含量。称取 0.3 g 样品,加入 6 mL 蒸馏水,充分搅拌,60 °C 水浴 30 min,离心保留上清液。将上清液按适当倍数稀释后,取 2 mL 稀释液,加入 2 mL 三氯乙酸,充分混匀,室温静置 20 min 沉淀大分子蛋白质。随后再次以 4 000 r/min 离心 15 min,在 680 nm 下测定上清液吸光度。配制不同质量浓度的牛血清白蛋白溶液,绘制标准曲线,用于计算样品中可溶性多肽的含量。

总酸含量测定:取 10 g 发酵饲料,加入 90 mL 蒸馏水,浸泡 1 h,每隔 20 min 充分搅拌 1 次,过滤,取 10 mL 滤液放入三角瓶中,再加入 30 mL 蒸馏水,摇匀后使用 pH 计指示。0.05 mol/L NaOH 溶液浓度使用邻苯二甲酸氢钾标定,滴定至 pH 8.2,记录初始和终末读数,以蒸馏水代替空白样进行滴定,测定发酵饲料的总酸含量。

### 1.3.4 食积小鼠的模型建立及指标检测方法

食积动物模型建立:将 24 只 KM 小鼠在 (24 ± 2) °C 动物实验室饲养,控制光照昼夜每 12 h 交替。小鼠自由饮水、自由进食,适应 7 d 后称体重,随机平均分成 3 组:正常饮食组(正常组)、食积模型组(模型组)、固态发酵制品煎煮液干预组(干预组)。正常组饲喂普通饲料,模型组和干预组饲喂高蛋白饲料,正常组及模型组饮用蒸馏水,干预组饮用固态发酵制品煎煮液(1 g/mL),实验期间每天记录小鼠体重与饲料消耗量。食积造模成功的指标可以分为外在指标和胃肠动力学指标两大类。外在指标可通过肉眼直接观测,造模成功的小鼠食欲下降,大便干结且便量减少;同时将胃肠运动功能进行量化后观测,判断成模的效果,胃残留率和小肠推进率降低也可以佐证小鼠造模成功<sup>[12-14]</sup>。

食积相关指标测定:取若干无菌鼠笼,将小鼠单独放入,待其自由排泄后,收集若干颗粪便,称湿质量;再将粪便在 80 °C 电热恒温鼓风干燥箱中烘干,称干质量,计算粪便含水量。小鼠禁食 18 h,在眼球采血 20 min 之前灌胃 0.4 mL 半固体营养糊,20 min 后将小鼠脱颈处死并解剖,将幽门和小肠末端扎紧后取出小肠,平放在实验台上,记录小肠的全长、幽门到营养糊推进长度(推进长度),并计算其推进率。将胃贲门和幽门扎紧后取出胃部,用生理盐水冲洗全胃,用滤纸吸去表面液体后称胃全重,全胃沿胃大弯解剖去除胃内容物后吸干水分称胃净重。胃全重与胃净重之差为胃内残留物的质量,胃残留物与所灌胃半固体糊的比值为胃残留率;按照 ELISA 试剂盒说明书对测定血清中胃泌素、生长抑素含量。使用正置荧光显微镜观察小肠切片(物镜 40×,目镜 10×)。

### 1.3.5 结肠炎小鼠的模型建立及指标检测方法

结肠炎动物的模型建立:将 24 只 C57BL/6 小鼠在 (24 ± 2) °C 动物实验室饲养,控制光照昼夜每 12 h 交替。小鼠自由饮水、自由进食,适应 7 d 后称量,随机平均分成 3 组:正常饮食组、结肠炎模型组、固态发酵制品煎煮液干预组。正常组及模型组每天灌胃 0.3 mL 生理盐水,干预组每天灌胃 0.3 mL 煎煮浓缩液(0.4 g/mL),饲料及饮用水条件相同,在实验第 3 周,将模型组和干预组小鼠饮用水更换为 2.5% 葡聚糖硫酸钠,继续饲喂 7 d。实验期间记录建模前后 7 d 小鼠体重以及饲料和饮用水消耗量。

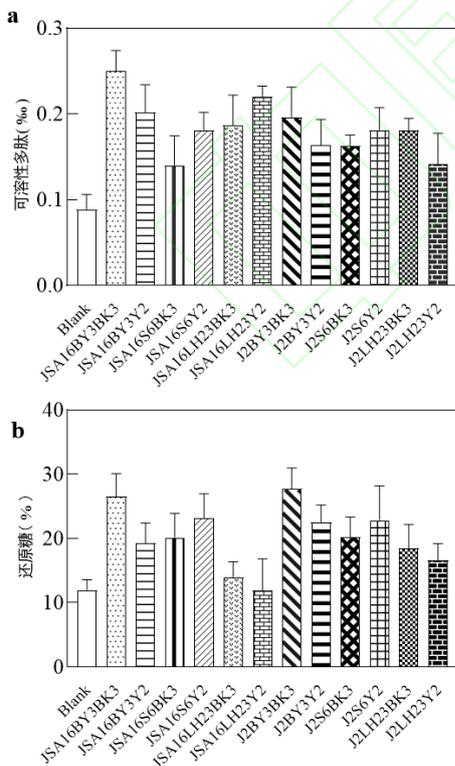
结肠炎相关指标测定:造模后每日记录小鼠排便情况。小鼠禁食不禁水 12 h 后,颈椎脱臼处死,

取脾脏, 吸干表面液体, 称量脾的湿重并记录, 脾重 (mg) /小鼠体重 (g) 比值即为小鼠的免疫指数。取小鼠的盲肠至肛门部分, 不附加外力下伸直, 测量盲肠下端至肛门上端长度计为结肠长度。按照 ELISA 试剂盒说明书进行炎症因子 IL-6、IL-10、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的测定。使用正置荧光显微镜 (物镜 40 $\times$ , 目镜 10 $\times$ ) 观察结肠切片。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵菌种组合的优化

选择具有较快生长速度的酵母菌 *K. marxianus* JSA16、*S. cerevisiae* J2; 较好蛋白酶和纤维素酶活性的枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* BK3、*B. pumilus* Y2, 以及优良抑菌活性的乳酸菌 *L. plantarum* BY3、*L. plantarum* S6、*L. casei* LH23 作为出发菌株。可溶性多肽和还原糖作为六神曲发酵检测的重要指标, 反映了微生物对底物的降解程度, 被普遍认为对动物和人的肠道健康具有积极作用。以麦麸为发酵底物, 混菌发酵接种比例为酵母、乳酸菌、芽孢杆菌的质量比为 3% : 3% : 3%, 30  $^{\circ}$ C 发酵 6 d, 测定可溶性多糖和多肽的含量。不同组合三联菌六神曲固态发酵制品可溶性多肽和还原糖含量如图 1 所示。



(a) 可溶性多肽 (b) 还原糖

图 1 不同组合三联菌六神曲固态发酵制品可溶性多肽和还

### 原糖含量

Fig. 1 Concentrations of soluble polypeptide and reducing sugar in solid-state fermentation preparations of MMF with different combinations of three strains

与未发酵饲料组相比, 组合 JSA16/BY3/BK3、JSA16/BY3/Y2 和 J2/BY3/BK3 的可溶性多肽含量提升, 其中组合 JSA16/BY3/BK3 发酵后的可溶性多肽含量最高, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。与未发酵饲料组相比, 组合 JSA16/BY3/BK3、J2/BY3/BK3 和 J2/BY3/Y2 的还原糖含量提升, 且差异极显著 ( $P < 0.05$ )。因此, 选择组合 *K. marxianus* JSA16、*L. plantarum* BY3 和 *B. subtilis* BK3 制备后续固态发酵制品。

### 2.2 基于六神曲原料的固态发酵制品的制备

以传统六神曲发酵原料为基质, 将 *K. marxianus* JSA16、*L. plantarum* BY3、*B. subtilis* BK3 组合应用于固态发酵制品的制备, 成品如图 2 所示。成品表面色泽金黄, 粗糙, 质地松软易碎, 有酒香气和乳酪的香味。



图 2 三联菌六神曲发酵成品

Fig. 2 The solid-state fermentation preparation of MMF with three strains

三联菌六神曲固态发酵制品指标见表 1。与空白对照组对比, 三联菌发酵后固态制品总酸含量、可溶性多肽含量、还原糖含量分别是发酵前的 7.9、12.0 倍、4.2 倍。

表 1 三联菌六神曲固态发酵制品指标

Tab. 1 Content of each index in the solid-state fermentation preparation of MMF

样品	总酸含量 (g/100 g)	可溶性多肽含量 (mg/g)	还原糖含量 /%
空白对照组	0.16 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.00	2.73 $\pm$ 0.45
三联菌发酵组	1.26 $\pm$ 0.05**	0.12 $\pm$ 0.02**	11.51 $\pm$ 0.99**

注: \*\*表示  $P < 0.01$ , \*表示  $P < 0.05$ 。

### 2.3 固态发酵制品对食积小鼠的生理调节作用

三联菌六神曲固态发酵制品对食积小鼠生理指标以及粪便和组织的影响如图 3 和图 4 所示。

使用固态发酵制品煎煮液干预食积模型小鼠, 从体重变化量、摄食量、饮水量观察小鼠的健康状况。由图 3 (a) —图 3 (c) 可知, 实验期间正常饮食小鼠、积食模型小鼠、干预组小鼠体重逐渐增加。正常组摄食量高于其他实验组, 而模型组与干预组总摄食量差异不大; 正常组的饮水量低于其他实验组, 干预组饮水量较大, 可能是由于发酵产品风味较好, 小鼠饮水次数增加。实验期间各组小鼠未出现消瘦、死亡的情况。

由图 4 (a) 可以看出, 正常组小鼠粪便湿润、颜色为浅色, 形态正常; 高蛋白饮食导致模型组小鼠粪便颜色呈黑褐色, 粪便干硬, 有个别粪便出现干结。干预组小鼠的粪便有所恢复。图 3 (d) 结果显示, 干预组小鼠粪便含水量显著提高 ( $P<0.05$ ), 较食积模型组小鼠提高 9.3%。应当注意的是, 三联菌发酵的固态制品煎煮液可以使小鼠饮水量增加, 粪便含水量的增加可能与饮水量增加有关。

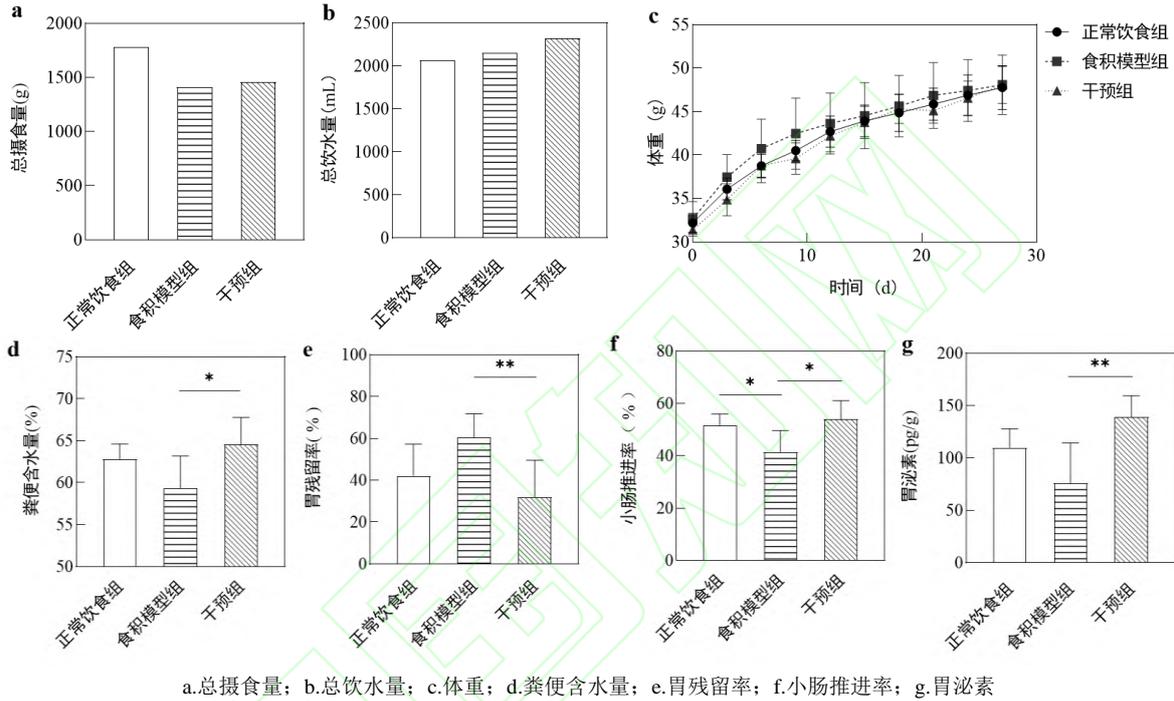


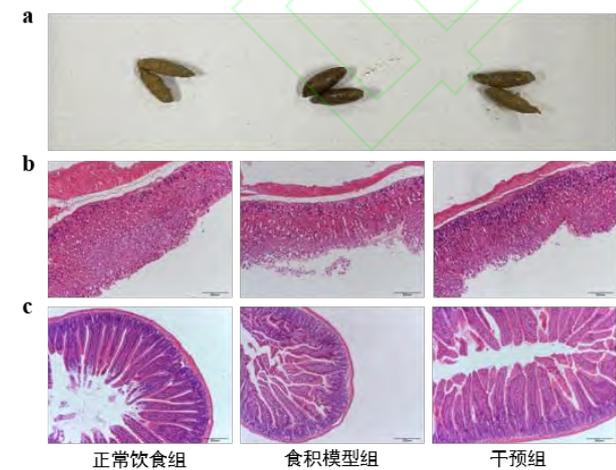
图 3 三联菌六神曲固态发酵制品对食积小鼠生理指标的影响

Fig. 3 Effect of solid state fermentation preparation of MMF with three strains on dyspepsia mice

MMF with three strains on dyspepsia mice

胃残留率是指在一定时间内, 食物在胃内残留量占全胃质量的比例, 反应了其消化能力。由图 3 (e) 可以看出, 与正常饮食组相比, 食积模型组小鼠的胃内残留率增高。干预组小鼠胃残留率显著下降 ( $P<0.01$ ), 较食积模型组小鼠降低 45.2%。胃排空延迟是功能性消化不良的主要症状, 本实验结果表明, 固态发酵制品煎煮液能产生促进胃排空的物质, 改善因高蛋白饮食引起的消化不良。

小肠推进率是指在一段时间内食物在小肠中的运输距离与小肠的总长度的百分比, 反映了小肠运转能力。结合图 3 (f) 可以看出, 食积模型组小鼠小肠推进率显著低于正常饮食组。而干预组小鼠小肠推进率显著高于食积模型组, 提高了 30.6%, 说明饮用固态发酵制品煎煮液显著改善了小鼠的小肠推进率。



a.粪便形态;b.胃切片组织;c.小肠切片组织 (图中标尺均为 200 μm)

图 4 三联菌六神曲固态发酵制品对食积小鼠粪便和组织的影响

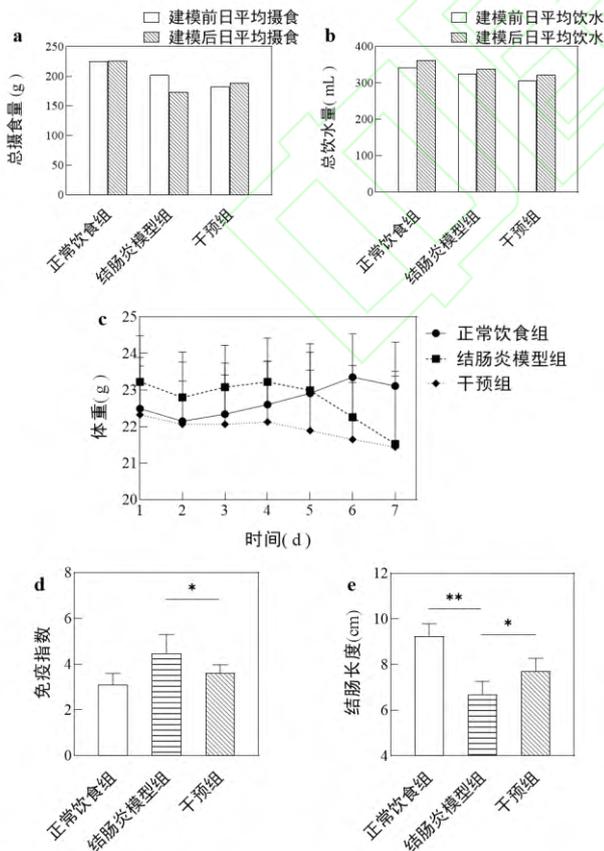
Fig. 4 Effect of solid state fermentation preparation of

胃酸分泌可以促进消化，其主要的调节剂是胃泌素和生长抑素<sup>[15]</sup>。从图 3 (g) 可以看出，与正常组相比，模型组小鼠胃泌素分泌水平有所降低，由于小鼠组间个体差异，无显著性差异。与模型组小鼠相比，干预组小鼠胃泌素分泌水平显著提高 ( $P<0.01$ )，较食积模型组小鼠提高了 83.7%。本实验结果说明，饮用固态发酵制品煎煮液，可以使高蛋白饮食食积小鼠胃泌素分泌增加，加速胃肠运动，促进胃排空。

将胃窦和小肠组织切片进行 H&E 染色后进行观察。如图 4 (b) 所示，正常组小鼠胃窦腺体排列整齐，细胞形态正常，未见腺体细胞脱落。模型组小鼠细胞略有脱落。干预组胃窦特征与正常组小鼠胃窦结构特征相似。如图 4 (c) 所示，正常组小鼠小肠粘膜上皮完好，细胞排列整齐，细胞间有大量的杯状细胞。模型组小鼠的小肠绒毛较少，间隙较大，粘膜结构完整性遭到破坏。干预组小鼠肠道粘膜形态特征均有一定程度的恢复。

**2.4 固态发酵制品对结肠炎小鼠的生理调节作用**

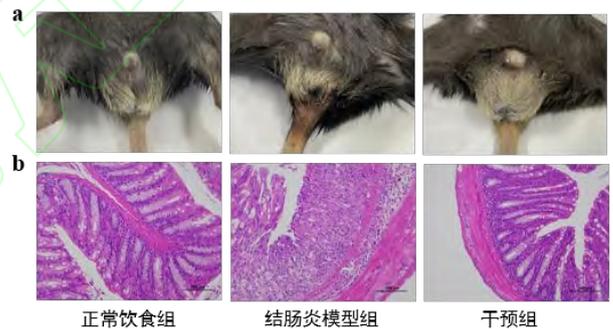
三联菌六神曲固态发酵制品对结肠炎小鼠指标以及便血情况和组织的影响如图 5 和图 6 所示，三联菌六神曲固态发酵制品煎煮液对结肠炎小鼠炎症因子的影响如图 7 所示。



a.总摄食量; b.总饮水量; c.体重; d.免疫指数; e.结肠长度  
图 5 三联菌六神曲固态发酵制品对结肠炎小鼠指标的影响

**Fig. 5 Effect of solid state fermentation preparation of MMF with three strains on colitis mice**

由图 5 可知，模型组建模后小鼠饮食量有所下降，干预组建模后小鼠的饮食量略有上升。脾脏作为重要的免疫器官，在炎症性疾病中常因免疫细胞（如淋巴细胞和单核巨噬细胞）的过度增殖和激活而肿大，导致脾脏免疫指数高于正常值<sup>[16-18]</sup>。模型组与正常饮食组相比，免疫指数显著上升 ( $P<0.01$ )，证明 DSS 诱导模型小鼠脾脏出现炎症。与模型组相比，干预组免疫指数降低 18.5%，反映了非特异性免疫活性的减弱，特别是炎症驱动的脾脏免疫细胞增殖的抑制，说明固态发酵制品缓解了 DSS 诱导的结肠炎炎症反应。结肠长度缩短是溃疡性结肠炎的显著病理特征<sup>[19]</sup>。模型组与正常饮食组相比，结肠长度显著缩短 ( $P<0.01$ )；与模型组相比，干预组的结肠长度显著增长 ( $P<0.05$ )。这说明固态发酵制品煎煮液具有结肠保护作用。



注: a.便血情况; b.结肠切片组织 (图中标尺均为 200 μm)

**图 6 三联菌六神曲固态发酵制品对结肠炎小鼠的影响**

**Fig. 6 Effect of solid state fermentation preparation of MMF with three strains on colitis mice**

由图 6 可知，在造模 5 d 后模型组小鼠出现肛门出血情况，且逐渐加重。干预组肛门观察与正常组相似，无明显出血。该结果也反映出固态发酵制品煎煮液对结肠的保护作用。结肠炎小鼠结肠常见隐窝结构消失，杯状细胞减少，以及炎性细胞弥漫浸润<sup>[20]</sup>。模型组小鼠的结肠杯状细胞有所缺失，且有较为明显的炎细胞浸润，隐窝消失，肠粘膜结构遭到破坏。干预组小鼠的结肠杯状细胞排列较为整齐，接近正常结肠形态。这说明固态发酵制品煎煮液能够对小鼠结肠结构形成保护作用。

细胞因子（如 IL-6, IL-1β, TNF-α 等）在免疫细胞、上皮细胞和间充质细胞间信号传递中发挥重

要作用, 是结肠炎发展的关键因素。由图 7 可以看出, 与正常组相比, 结肠炎模型组小鼠的 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平升高。与模型组相比, 干预组

IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  含量水平均出现显著下降, 分别下降了 27.0%、17.9%和 34.3%。

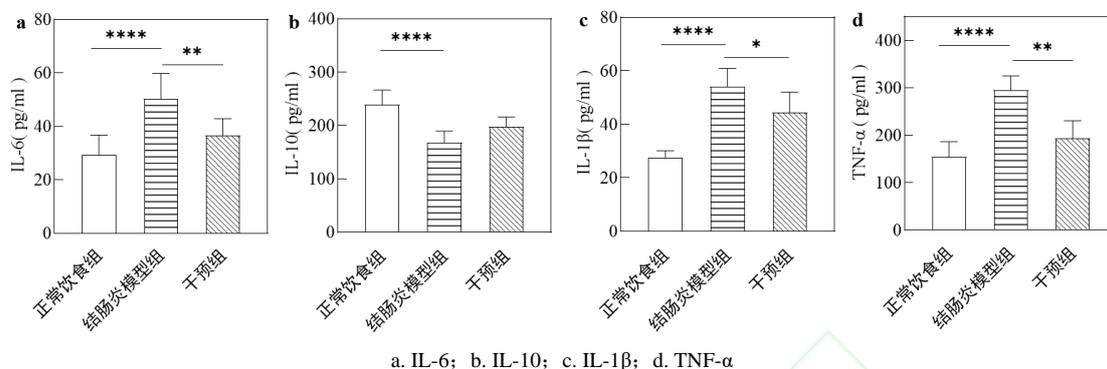


图 7 三联菌六神曲固态发酵制品煎煮液对结肠炎小鼠炎症因子的影响

Fig. 7 Effect of water extract of tribacteria *Massa Medicata Fermentata* solid state fermentation preparation on inflammatory factors in colitis mice

### 3 讨论

传统发酵六神曲中分离或测序发现的微生物门类众多, 例如霉菌类群中的曲霉、青霉、根霉、枝孢霉等, 酵母类群中的覆膜孢酵母、酿酒酵母、隐球酵母、毕赤酵母、威克汉姆酵母属等, 细菌类群中的肠杆菌、片球菌、芽孢杆菌、葡萄球菌、乳杆菌属、魏斯菌等<sup>[21-22]</sup>。在自然发酵过程中, 由于环境、温度、湿度等条件差异会造成参与发酵的微生物具有不确定性, 且存在有害菌污染的风险。同时, 复杂的菌种构成在对底物进行转化和生成活性物质的同时, 也使自然发酵六神曲质量控制极其困难, 不利于标准化生产。因此, 人工筛选发酵菌株及六神曲发酵工艺的研究具有重要的意义。

目前, 人工六神曲发酵有单一菌种发酵和混合菌种发酵两大类<sup>[21]</sup>。例如, 使用赛式曲霉进行单一菌种发酵<sup>[23]</sup>, 使用枯草芽孢杆菌和扣囊复膜酵母进行混合菌种发酵<sup>[24]</sup>, 使用米根霉和扣囊复膜酵母进行混合菌种发酵<sup>[25]</sup>。人工发酵六神曲的菌种选择应着重考虑发酵速度、底物转化能力、益生效应、杂菌控制和安全性几个方面。本研究尝试从实验室现有菌种中选择菌种进行六神曲发酵。最优组合中的枯草芽孢杆菌具有纤维素酶、蛋白酶和淀粉酶活性且好氧生长, 有利于发酵过程中对底物进行降解; 酵母菌具有生长迅速的特点, 在后续研究中被鉴定为马克思克鲁维酵母, 且细胞壁多糖具有良好的炎症干预作用; 植物乳植杆菌产酸能力和抑菌能力突出, 便于发酵过程的杂菌控制, 也是发酵制品酸香味的重要来源。马克思克鲁维酵母和植物乳植杆菌

为可食用微生物, 枯草芽孢杆菌广泛应用于医药和饲料行业, 具有较高的安全性。此外, 与曲霉相比, 上述菌株更易于进行种子制备和固态发酵操作。

六神曲的发酵产物中含有多种活性成分, 包括总酸、可溶性多肽和还原糖, 这些成分各具独特的生物活性, 共同发挥广泛的生理功能。总酸不仅能够抑制病原微生物生长, 发挥抗菌作用, 还能调节免疫反应并改善适口性, 促进动物摄食。可溶性多肽具有多种生物活性, 如调节肠道菌群结构、抗氧化、抗菌、免疫调节、抗炎等作用, 对维持机体健康具有重要作用。还原糖具有抗氧化等作用<sup>[26]</sup>。

虽然目前已有很多针对六神曲成分分析方面的研究, 但是其有效物质、作用靶点和机制仍不清晰, 各项指标与实际生理调控能力之间的关系并不明确。因此, 本研究在对发酵制品的总酸、还原糖、可溶性多肽等各项指标进行测定的同时, 重点考察了发酵制品对模型小鼠的干预作用, 同时使用高蛋白饮食食积模型和 DSS 诱导的结肠炎两种模型, 证实了发酵制品的肠胃调节功能。

综上所述, 本研究基于六神曲底物使用复合菌种发酵技术进行固态发酵, 发酵制品在食积和肠炎小鼠模型中观察到的显著效果, 对传统中药曲剂发酵技术和质量控制具有一定参考意义。在未来研究工作中, 应进一步明确六神曲的有效成分和生理调控机制, 建立更为科学的功能评价和质量控制体系。在此基础上才能进一步拓宽菌种筛选范围, 开发优良菌种并进行组合发酵工艺优化, 从而推进中药曲剂现代化发酵技术的发展。

## 参考文献:

- [1] HUSSAIN A, BOSE S, WANG J-H, et al. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines[J]. *Food research international*, 2016, 811-816.
- [2] XU M S, FU Q, BAXTER A. The components and amylase activity of *Massa Medicata Fermentata* during the process of fermentation[J]. *Trends in food science & technology*, 2019, 91: 653-661.
- [3] LIU S, DONG H, JI W, et al. Change in physicochemical properties, aroma components, and potentially beneficial compounds during the stir-frying of *Massa Medicata Fermentata*[J]. *Food chemistry advances*, 2023, 3: 100340.
- [4] 宋冬雪, 李璐, 卢文璐, 等. 中药六神曲发酵研究现状分析[J]. *工业微生物*, 2024, 54(1): 128-130.
- [5] 赵志君, 杨莹莹, 张璐, 等. 麸炒六神曲炮制工艺及质量标准研究[J]. *山西医科大学学报*, 2024, 55(1): 113-117.
- [6] ZHOU Y, ZHANG Y, PANG G, et al. Effect of inoculation of starter on physicochemical properties and texture characteristics of fermented beef jerky[J]. *Journal of food processing and preservation*, 2021, 45(9): e15744.
- [7] 高胜美, 张欢, 王跃飞, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap 技术的神曲发酵前后化学成分差异研究[J]. *中成药*, 2022, 44(12): 3890-3895.
- [8] DE OLIVEIRA A P A, SILVESTRE M A, ALVES-PRADO H F, et al. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts[J]. *African journal of biotechnology*, 2015, 14(14): 1215-1223.
- [9] LEROY F, DE VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry[J]. *Trends in food science & technology*, 2004, 15(2): 67-78.
- [10] LIU S, ZHAO L, LI M, et al. Probiotic *Bacillus* as fermentation agents: Status, potential insights, and future perspectives[J]. *Food chemistry: X*, 2024: 101465.
- [11] KAHIL T, HASSAN H M. Economic co-production of cellulase and  $\alpha$  amylase by fungi grown on agro-industrial wastes using solid-state fermentation conditions[J]. *Science*, 2015, 5(1): 184-195.
- [12] 刘昊, 李文静, 王馨媛, 等. 基于数据挖掘的功能性消化不良动物模型的评价[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(4): 478-491.
- [13] 何云山, 谭周进, 惠华英. 食滞胃肠泄泻动物模型制备思路与评价指标[J]. *湖北中医药大学学报*, 2020, 22(3): 121-125.
- [14] 彭昕欣, 易鑫, 刘婧, 等. 肠道内容物和黏膜菌群对枳实导滞汤剂治疗食积便秘的响应差异[J]. *中国微生物生态学杂志*, 2023, 35(11): 1241-1247+1256.
- [15] SHAMSI B H, CHATOO M, XU X K, et al. Versatile functions of somatostatin and somatostatin receptors in the gastrointestinal system[J]. *Frontiers in endocrinology*, 2021, 12: 652363.
- [16] LUO Y, FU S, LIU Y, et al. *Banxia Xiexin* decoction modulates gut microbiota and gut microbiota metabolism to alleviate DSS-induced ulcerative colitis[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2024, 326: 117990.
- [17] QIU Z C, LU X, HAN Y Y, et al. Structure-anti-inflammatory activity relationship of garlic fructans in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis: impact of chain length[J]. *Carbohydrate polymers*, 2024, 346: 122582.
- [18] WANG L T, WANG C M, WANG Z Z, et al. Transforming the spleen into a liver-like organ *in vivo*[J]. *Science advances*, 2020, 6: eaaz9974.
- [19] MA Y, LANG X, YANG Q, et al. Paeoniflorin promotes intestinal stem cell-mediated epithelial regeneration and repair via PI3K-AKT-mTOR signalling in ulcerative colitis[J]. *International immunopharmacology*, 2023, 119: 110247.
- [20] 于沛, 何贺, 钞艳惠, 等. 膳食纤维联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的疗效与机制[J]. *医药导报*, 2021, 40(11): 1487-1493.
- [21] 张会茹, 郭梦月, 吕建欣, 等. 发酵类中药的特点、微生物组成及真菌毒素污染概况[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(1): 48-57.
- [22] 陈彦林, 王云婷, 关凯乐, 等. 六神曲发酵过程中微生物群落结构研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(21): 5219-5225.
- [23] 程亦雄, 张婧, 戚岑聪, 等. 赛氏曲霉深层发酵神曲的工艺优选[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(19): 42-45.
- [24] 陈瑾, 吴春颖, 王舒玉, 等. 六神曲两菌协同发酵工

艺的优化[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(12): 7446-7449.

[25] 王舒玉, 阮明月, 栗园林, 等. Box-Behnken 响应面法优化六神曲两优势菌协同发酵工艺[J]. 中国现代中药,

2022, 24(8): 1543-1548.

[26] 张铭, 李伟, 吴松遥, 等. 固态发酵促生物活性物质释放与生物转化的研究进展[J]. 中国调味品, 2025, 50(1): 233-240.

