微生物多级发酵对中药方剂功能活性及有效组分的影响

张红艳[1]，冉淦侨[1]，韩姗姗[2]，殷 红[2]，谭建新[3]，张 强[*1]
（1. 陕西省生物农业研究所，陕西 西安 710043；2. 陕西省酶工程技术研究中心，陕西 西安 710043；3. 陕西乐丽鑫生物科技有限公司，陕西 渭南 714005）

摘要：选用多菌株对一中药方剂（简称 JGZF）进行液体多级发酵，考察其在 3 种处理方式（直接熬制、自然发酵、人工发酵）下微量元素、体外抗氧化活性、抑菌活性以及其他有效组分等结果的变化。采用原子吸收光谱法检测微量元素；紫外-可见分光光度计检测体外抗氧化活性，包括过氧化物歧化酶 SOD 活性、DPPH 自由基的清除能力、羟基自由基的清除能力和总多酚含量；牛津杯抑菌圈法测定抑菌活性；UPLC-Q-TOF-MS/MS 非靶标代谢组学检测 JGZF 的药效成分。结果表明：跟直接熬制相比，中药方剂 JGZF 经自然发酵和人工发酵处理后，锌、铜、铁和钙的含量得到了显著提高；人工发酵能显著提高 JGZF 的体外抗氧化活性，其中 SOD 活性提高了 1.5 倍，DPPH 自由基的清除能力提高了 2.2 倍，羟基自由基的清除能力提高了 4.2 倍，总多酚含量提高了 2.2 倍；发酵后的 JGZF 对沙门氏菌和大肠杆菌的抑菌活性更强，但对志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性不变或略有降低；JGZF 经人工发酵后，药液组分含量有增有减，其中人体必需氨基酸 *L*-苯丙氨酸、抗炎物质黄芩素等含量显著增加；五味子苷 B、7-羟基香豆素、农药残留等含量有显著降低。

关键词：微生物；多级发酵；中药；有效组分；功能活性；中药炮制
中图分类号：R 943　**文章编号**：1673-1689(2021)11-0090-07　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.11.012

Effect of Microbial Multistage Fermentation on Functional Activity and Effective Components of Traditional Chinese Medicine Prescription

ZHANG Hongyan[1]，*RAN Ganqiao*[1]，*HAN Shanshan*[2]，*YIN Hong*[2]，*TAN Jianxin*[3]，*ZHANG Qiang*[*1]
(1. Bio-Agriculture Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, China; 2. Enzyme Engineering Research Center of Shaanxi Province, Xi'an 710043; 3. Shaanxi Lelixin Biotechnology Co., Ltd., Weinan 714005, China)

Abstract: The liquid multistage fermentation of a traditional Chinese medicine prescription (JGZF) was carried out with multiple strains. The changes of trace elements, antioxidant activity *in vitro*, antibacterial activity and other effective components of JGZF were investigated under three treatment methods (direct boiling, natural fermentation and artificial fermentation). The trace elements were detected by atomic absorption spectrometry, and the antioxidant activities *in vitro* were detected by

收稿日期：2020-03-30
基金项目：陕西省科学院重大科学研究专项项目（2018nk-05）。
作者简介：张红艳（1978—），女，助理研究员，主要从事生物农业研究。E-mail：1492491459@qq.com
* **通信作者**：张 强（1974—），男，硕士，副研究员，主要从事生物农业研究。E-mail：492748940@qq.com

ultraviolet visible spectrophotometer, including the superoxide dismutase (SOD) activity, DPPH radical scavenging capacity, hydroxyl radical scavenging capacity and the total polyphenol content. The antibacterial activity was determined by Oxford cup method and evaluated based on the diameter size of bacteriostatic ring. The pharmacodynamic components of JGZF were detected by UPLC-Q-TOF-MS/MS non-target metabonomics detection. The results showed that the contents of trace elements including Zn, Cu, Fe and Ca in JGZF after the natural fermentation and artificial fermentation were significantly increased compared with those of direct boiling. The antioxidant activity *in vitro* of JGZF was significantly improved by artificial fermentation, in which SOD activity was increased by 1.5 times, DPPH radical scavenging capacity was increased by 2.2 times, hydroxyl radical scavenging ability was increased by 4.2 times, and the content of total polyphenols increased by 2.2 times. The antibacterial activity of JGZF against *Salmonella* and *Escherichia coli* was stronger, however, the antibacterial activity against *Shigella* and *Staphylococcus aureus* unchanged or slightly decreased. After the artificial fermentation of JGZF, the content of liquid components increased or decreased, including the essential amino acid L-phenylalanine, anti-inflammatory substances such as baicalein increased by hundreds of millions of times, while the contents of huoxuetong schisandrin B, 7-hydroxycoumarin and pesticide residue were significantly decreased.

Keywords: microorganism, multistage fermentation , traditional Chinese medicine , effective components, functional activity, traditional Chinese medicine processing

发酵作为一种重要的中药炮制方法,其目的是改变原有药性,产生新的治疗作用。发酵后的中药制剂具有去毒存效、增强药效、提高中药提取率等作用[1]。中药的有效成分主要存在于植物细胞中,被细胞壁等组织包裹在细胞内部,而微生物发酵产生的酶系可以将植物细胞壁降解,促使有效成分更易释放,从而起到增加药效的作用。

传统发酵炮制通常是利用环境中的野生微生物对药渣或药液进行自然发酵,存在条件简陋、易染杂菌、发酵质量难以保证等缺点[2]。

现代中药发酵技术是利用益生菌和酶特有的生物转化能力,使中草药的有效成分被充分提取,不仅能减毒增效,还能产生新的易被人体吸收的活性物质[3]。

国内许多研究者[4-9]对中药发酵进行了研究,结果表明中药发酵后粗蛋白质、粗脂肪、多糖以及总黄酮、总皂苷等都有不同程度的增加。潘杨等[10]研究表明发酵炮制可使中药巴豆的毒性降低。苏建树等[11]研究发现川乌、附子经黑曲霉发酵后,乌头碱、次乌头碱等毒性物质显著减少。以上大多数研究都是采用单一菌株进行发酵或者是固体发酵,对多菌株多级液体发酵中药的研究较少。

中药方剂 JGZF 是由药食同源组分配比煎熬而成。JGZF 药液含有牛膝皂苷、蜕皮甾酮、齐墩果酸及其衍生物、地骨皮甲素、菟丝子糖苷酸、肉桂酸、柠檬酸、壬二酸、棕榈酸甲酯、杜仲木脂素、*L*-酪氨酸、精氨酸、金丝桃苷等天然活性成分,同时富含钙、铁、锌、镁等多种微量元素。作者采用 3 种方式(直接煎熬、自然发酵、人工发酵)对 JGZF 进行处理,对比不同处理方式下 JGZF 药液中微量元素、抗氧化活性、抑菌活性以及其他药效成分的变化,旨在考察不同的发酵炮制方法对 JGZF 方剂的功能活性及有效组分的影响,为今后发酵炮制技术在 JGZF 方剂中的工业化应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 中药方剂 JGZF 桂圆、杜仲、蒺藜、山药、菟丝子、枸杞、当归、怀牛膝、鱼鳔,按一定比例混合粉碎而成,由陕西乐丽鑫生物有限公司提供。

1.1.2 菌种 产朊假丝酵母(*Candida utilis* CICC31126)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen GIM2.137)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* CICC20265)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei* CGMCC1.574)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolensentis* CICC6176):由陕西省

生物农业研究所保藏提供;高活性干酵母:安琪酵母股份有限公司产品。

1.1.3 培养基 麦芽汁培养基(g/L):麦芽膏粉130,pH 6.4±0.1;强化羧菌培养基(g/L):蛋白质10.0牛肉粉10.0,酵母粉3.0,葡萄糖5.0,可溶性淀粉1.0,氯化钠5.0,醋酸钠3.0,*L*-半胱氨酸盐酸盐0.5,pH 6.8±0.1(25 ℃);MRS肉汁培养基(g/L):蛋白质10.0,牛肉粉8.0,酵母粉4.0,葡萄糖20.0,磷酸氢二钾2.0,柠檬酸氢二铵2.0,乙酸钠5.0,硫酸镁0.2,硫酸锰0.04,吐温80 1.0,pH 5.7±0.2(25 ℃)。

1.2 实验设备

RE-201D旋转蒸发仪:上海秋佐科学仪器有限公司产品;FL-30流水式中药粉碎机:瑞安市富力中药机械厂产品。

1.3 实验方法

发酵工艺路线如下:

中药→配方配合→粉碎→过筛→加水浸泡→复合酶解→煎熬→旋转蒸发浓缩→离心→灭菌→

↓

自然发酵

好氧发酵→厌氧发酵→离心→过滤→灭菌→中药发酵液→成分检测。

1.3.1 直接熬制 取1kg中药按配方比例混合粉碎后,按质量比1:2加入饮用水浸泡煎熬两次,滤网粗滤后用真空旋转蒸发仪(60 ℃)浓缩药液至1 L,离心(10 000 r/min,20 min)后灭菌(121 ℃,20 min),得到直接熬制的中药原液。

1.3.2 自然发酵 取1 kg中药按配方比例混合粉碎后,按质量比1:4加入饮用水浸泡1 h后用食醋调pH至4.8~5.0,加入复合酶粉(8 g/L),37 ℃酶解过夜,酶解后的中药按上述方法煎熬两次,滤网粗滤后用真空旋转蒸发仪(60 ℃)浓缩药液至1 L,离心(10 000 r/min,20 min)后灭菌(121 ℃,20 min),得到中药酶解原液。

将酶解后的药液倒入已灭菌的玻璃发酵罐中,室温下自然发酵5周。定期取样检测营养活性成分。

1.3.3 人工发酵 取1 kg中药按配方比例混合粉碎后,按1.3.2制备中药酶解原液,按比例将产朊假丝酵母、酿酒酵母、面包酵母(质量比为2:1:1)接入到上述的酶解中药原液中,30 ℃好氧发酵7 d(有浓郁的酒香味道)。好氧发酵结束后,对发酵液进行灭菌(121 ℃,灭菌20 min),再按比例接入植物乳杆菌、副干酪乳杆菌、青春双歧杆菌(质量比为1:1:1),37 ℃,厌氧(静置)发酵7 d。厌氧发酵结束后,将中药发酵液按之前方法煎熬两次,两次煎熬的药液混合在一起,离心(10 000 r/min,20 min)去除沉淀,上清经双层滤纸过滤后灭菌(121 ℃,20 min),得到人工发酵的中药原液。

1.4 指标检测

发酵样品外包检测全部冷链配送,微量元素检测由陕西省生物农业研究所渭南大荔基地完成,抗氧化活性检测由杭州晶百检测技术有限公司完成,基于代谢组的中药有效成分由上海阿趣生物科技有限公司完成。

1.4.1 微量元素检测 微量元素检测参照《食品中钙的测定 GB5009.92—2016》《食品中铁的测定 GB5009.90—2016》《食品中镁的测定 GB5009.241—2017》《食品中铜的测定 GB5009.13—2017》《食品中锌的测定 GB5009.14—2017》等标准。

1.4.2 抗氧化活性成分检测 超氧化物歧化酶(SOD)活性检测:参考《保健食品中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 GB/T5009.171—2003》;清除DPPH自由基能力的测定:参照文献[12]进行;羟基自由基清除作用的测定:参照文献[13]进行;总多酚的测定:参考文献[14]进行;抑菌活性的测定:牛津杯琼脂扩散法[15]。基于代谢组的中药有效成分分析:采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析方法。

2 结果与分析

2.1 不同处理方式对JGZF中微量元素质量浓度的影响

微量元素是中草药组分的重要组成部分,其不仅可以作为人体必需的营养物加以补充,还可能具有特殊的生物活性[16]。微量元素除了游离移动状态存在形式,还有一部分主要存在于植物的细胞壁中。

对直接熬制、自然发酵以及人工发酵3种方式得到的JGZF药液的5种常见微量元素质量浓度进行检测,结果如图1所示。JGZF人工发酵液中微量元素质量浓度顺序为:钙(10.23 mg/L)>铁(5.74 mg/L)>镁(2.73 mg/L)>锌(1.91 mg/L)>铜(0.24 mg/L)。跟直接熬制相比,JGZF经发酵(自然发酵和人工发酵)处理后,微量元素(钙、铁、锌、铜)的含量得到了

显著提高。由于两种发酵方式在熬制前均有浸泡和酶解的步骤,充分的浸泡以及复合酶对药材中的纤维素及半纤维素等物质的降解,再加上发酵过程中微生物的快速生长也会促使 JGZF 溶出更多的微量元素。结果显示,人工发酵与直接熬制相比,锌元素提高了 7.3 倍,铜元素提高了 6.8 倍,铁元素提高了 3.7 倍,钙元素提高了 2.2 倍。

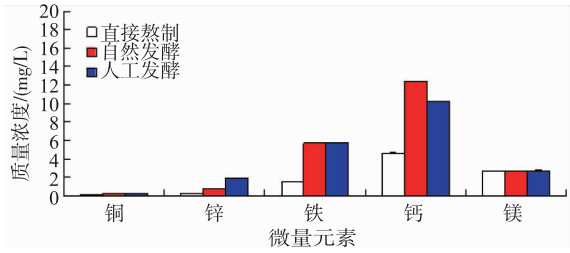


图 1　不同处理方式对 JGZF 中微量元素质量浓度的影响

Fig. 1　Effects of different treatments methods on the contents of trace elements in JGZF

2.2　不同处理方式对 JGZF 体外抗氧化活性的影响

中药的酚类、黄酮、生物碱、多糖、皂苷等有效成分均具有较好的抗氧化活性,可调节和增强机体特异性及非特异性免疫功能,抑制自由基的产生,或直接对抗自由基对细胞及组织的损伤作用[17]。实验采用紫外–可见分光光度计检测药液的过氧化物歧化酶 SOD 活性、DPPH 自由基的清除能力、羟基自由基的清除能力以及总多酚含量来评价不同处理方式对 JGZF 体外抗氧化活性的影响。

本实验条件下,自然发酵方式的 JGZF 药液中生长的微生物经镜检主要是酵母菌和少许杂菌,而人工发酵好氧阶段接入复合酵母菌,厌氧阶段接入复合乳酸菌。酵母菌本身就能代谢出具抗氧化功能的甘露聚糖等物质,而且微生物在发酵代谢过程中分泌的胞外酶可将药物成分分解转化,会产生种类丰富的初生或次生代谢产物,有些代谢产物本就是很好的活性物质[18]。此外,以 JGZF 中药液中的一些代谢产物为前体,再经过一系列酯化、氧化、葡萄糖基化等多种生物转化途径后,也会促使生成新的活性成分。由图 2 可见,跟直接熬制相比,JGZF 经自然发酵和人工发酵处理后,SOD 活性和羟基自由基的清除能力均有提高。此外人工发酵的另外两个抗氧化活性指标(DPPH 自由基的清除能力和总多酚含量)也有显著提高,分析原因如下:厌氧阶段接入的乳酸菌具有抵抗氧胁迫、调控信号通路途径、清除自由基系统、抑制脂质过氧化,具有一定的抗氧化能力[19]。人工发酵接入的菌种更有针对性,采用好氧与厌氧微生物的多级发酵方式更有利于抗氧化物质的产生和富集。

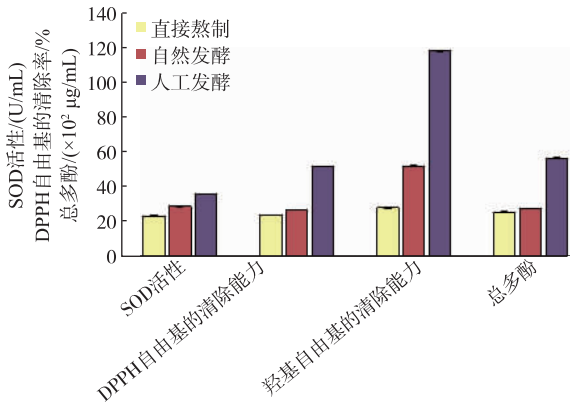


图 2　不同处理方式对 JGZF 中活性成分的影响

Fig. 2　Effects of different treatments methods on the active ingredients in JGZF

检测结果显示,JGZF 人工发酵液中的体外抗氧化活性结果为:SOD 活性 35.7 U/mL,DPPH 自由基的清除能力 51.4%,羟基自由基的清除能力 117.6%,总多酚质量浓度为 5.65×10^3 μg/mL。与直接熬制相比,SOD 活性提高了 1.5 倍,DPPH 自由基的清除能力提高了 2.2 倍,羟基自由基的清除能力提高了 4.2 倍,总多酚含量提高了 2.2 倍。

2.3　不同发酵方式对 JGZF 抑菌活性的影响

食源性疾病对人类健康造成严重的危害,有 60%以上的食源性疾病为细菌性致病菌污染食物所致[20]。采用牛津杯琼脂扩散法测算 JGZF 药液对 4 种标准菌株(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、志贺氏菌、沙门氏菌)的抑菌圈直径,考察 3 种不同处理方式(直接熬制、自然发酵、人工发酵)对 JGZF 中药液抑菌活性的影响。

结果如图 3 所示,跟直接熬制相比,自然发酵 JGZF 对沙门氏菌和大肠杆菌的抑制效果得到了显著提高。其中,对沙门氏菌的抑菌效果提高了 2.5 倍,对大肠杆菌的抑菌效果提高了 2.3 倍。而对志贺氏菌的抑菌效果几乎不变,对金黄色葡萄球菌的抑菌活性略有下降。人工发酵 JGZF 和直接熬制相比,沙门氏菌的抑菌效果提高了 2.2 倍,大肠杆菌的抑菌效果提高了 1.9 倍,而志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果却略有降低。

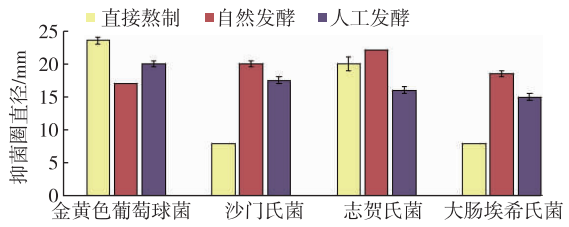


图 3 不同发酵方式对 JGZF 抑菌活性的影响

Fig. 3 Effects of different treatments methods on antibacterial activity of JGZF

对结果分析可知,酶降解纤维素、木质纤维素和益生菌发酵可促进药液释放更多的抑菌活性成分,而且益生菌自身代谢系统有可能产生了新的抗菌活性物质[21],例如厌氧发酵过程中产生的乳酸、丁酸等一些有机酸[22],也可能是能增强药液抑菌活性的原因之一。此外,发酵过后部分抑菌活性有所降低的原因推测可能与微生物将一些抑菌活性物质转化为无活性的物质有关。综上所述,中药组分和选用的菌种是直接影响中药发酵液具体抑菌功能的两大因素。

2.4 不同处理方式对 JGZF 主要有效组分的影响

中药发酵炮制过程也是中药化学成分变化及药效偏转的过程,单一化学成分研究很难反映炮制产品整体质量的变化。而对中药液进行高通量检测,运用植物代谢组学技术对海量数据进行模式识别,可以对炮制品化学物质基础进行全面研究[23]。作者采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对药液样品进行数据检测、提取、分类及识别,重在考察不同处理方式对 JGZF 主要有效组分的影响。

经检测, 人工发酵 JGZF 中最多的有效成分如图 4 所示,依次为:牛膝皂苷>柠檬酸>壬二酸>蜕皮激素>齐墩果酸>肉桂酸>金盏花苷 E>蒺藜皂苷 K>菟丝子糖苷酸 A3>地骨皮甲素>甜菜碱 (三甲基甘氨酸)>香豆素糖苷>竹节参皂苷 IVA>山奈酚 3-龙胆双糖苷> 硼替佐米 (二肽)>棕榈酸甲酯>川芎内酯>L-酪氨酸>肉桂丙烯醛>菟丝子糖苷酸 A2。将上述 20 种主要的有效成分进行归类,详见表 1。

由图 4 还可以看出,牛膝皂苷和柠檬酸是 JGZF

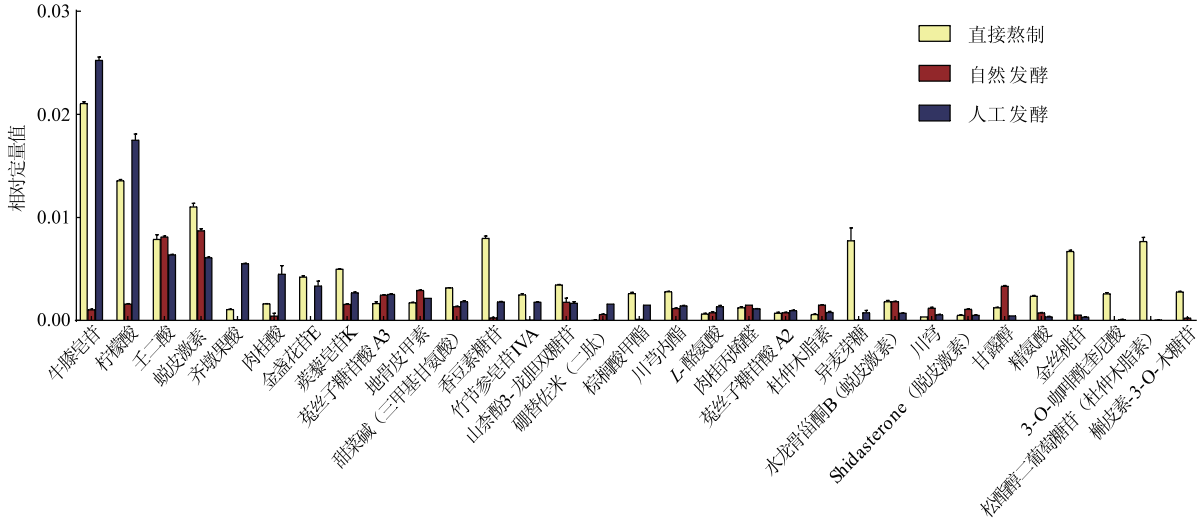


图 4 不同处理方式对 JGZF 主要有效组分的影响

Fig. 4 Effects of different treatments methods on the main medicinal ingredients of JGZF

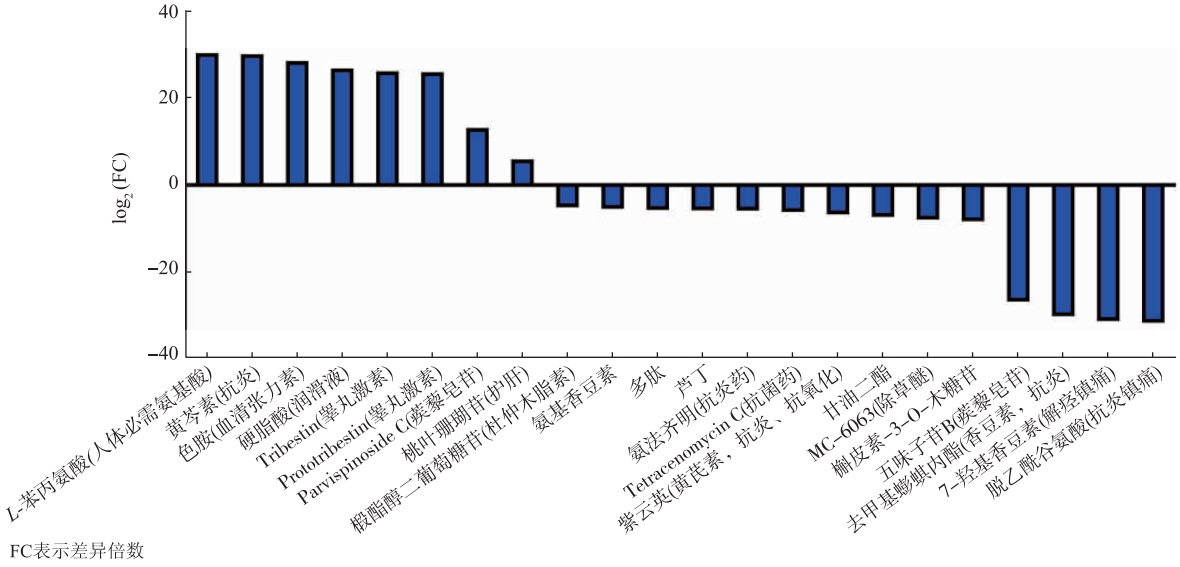
表 1 人工发酵 JGZF 中的主要药效成分

Table 1 Main medicinal ingredients in artificially fermented JGZF

种类	成分	用途
糖苷类	牛膝皂苷、齐墩果酸 28-OD-葡萄糖苷、金盏花苷 E、蒺藜皂苷 K、香豆素糖苷、竹节参皂苷 IVA、山奈酚 3-龙胆双糖苷	抗氧化、抗炎、抗癌、活血化瘀
有机酸	柠檬酸、壬二酸、肉桂酸	抑菌、美白
糖苷酸	菟丝子糖苷酸 A3/A2	补肾益精、养肝明目、固胎止泄
其他	蜕皮甾酮、地骨皮甲素、*L*-酪氨酸	提神、抗疲劳、增强体能、降血压

人工发酵液中含量最高的两种药效物质，含量对比:人工发酵>直接熬制>自然发酵,分析原因可能跟酶解过程增加牛膝皂苷的溶出以及人工发酵接入乳酸菌可促使葡萄糖转化成部分柠檬酸[24]有关。而自然发酵的微生物生长除了酵母菌还会有其他杂菌，这可能是导致牛膝皂苷前体被降解的原因。同时也能看出蜕皮激素、香豆素糖苷、异麦芽糖、金丝桃苷等在两种方式发酵后比直接熬制的含量降低,应该跟两种发酵中都存在酵母菌有关,具体机理和转化途径待进一步研究分析。

人工发酵前后 JGZF 药液中药效成分的变化结果如图 5 所示。*L*-苯丙氨酸(人体必需氨基酸)、黄芩素(抗炎)、色胺(血清张力素)、硬脂酸(润滑液)、Tribestin(睾丸激素)和 Prototribestin(睾丸激素)的含量增加了上亿倍;Parvispinoside C (蒺藜皂苷)的含量增加了上千倍;双氯非那胺(青光眼药)和桃叶珊瑚苷(护肝)的含量增加了数百倍。同时,人工发酵处理后某些物质的含量也被降低了。比如,五味子苷 B(蒺藜皂苷,活血化瘀、通经活络)、去甲基蟛蜞内酯(香豆素,抗炎)、7-羟基香豆素(解痉镇痛)和脱乙酰谷氨酸(抗炎镇痛)的含量降低了上亿倍;槲皮素-3-O-木糖苷(刺激神经中枢)、甘油二酯、紫云英(黄芪素,抗炎、抗氧化)、氯法齐明(抗炎药)、芦丁、多肽、氨基香豆素(抗菌药)和松酯醇二葡萄糖苷(杜仲木脂素,镇痛药)的含量降低了数百倍。



FC表示差异倍数

图 5　人工发酵前后 JGZF 中有效成分的变化

Fig. 5　Changes of medicinal ingredients in JGZF before and after artificial fermentation

3 结　语

1)跟直接熬制相比,中药方剂 JGZF 经自然发酵和人工发酵处理后,其微量元素锌、铜、铁和钙的含量得到了显著提高,这是由于自然发酵和人工发酵方式中浸泡、酶解步骤以及微生物的快速生长促进了药液中微量元素的溶出。

2)人工发酵能显著提高 JGZF 的体外抗氧化活性。与直接熬制相比，人工发酵 JGZF 药液中 SOD 活性提高了 1.5 倍,DPPH 自由基的清除能力提高了 2.2 倍,羟基自由基的清除能力提高了 4.2 倍,总多酚含量提高了 2.2 倍。微生物在发酵代谢过程中会产生种类丰富的初生或次生代谢活性产物,经过一系列酯化、氧化、葡萄糖基化等生物转化途径后,生成新的活性成分。而且有针对性性的人工接种多级发酵更有利于抗氧化活性物质的产生。

3)发酵后的 JGZF 中药液对沙门氏菌和大肠杆菌的抑菌活性更强,但对志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性不变或略有降低。生物酶降解纤维素等、益生菌发酵均可促使药液释放或者产生更多抑菌成分,同时微生物也可能将一些抑菌活性物质转化为无活性物质。

4) 基于代谢组学技术的分析，结果表明 JGZF 经人工发酵后,人体必需氨基酸 *L*-苯丙氨酸、抗炎

物质黄芩素等药效物质含量显著增加;五味子苷 B、7-羟基香豆素、农药残留等含量有显著降低。中药发酵过程会产生或者降解一些药效物质,从而导致药效含量有不同的变化。有效成分、非有效成分以及其他特殊物质与发酵微生物之间的相互作用机制、生物转化途径有待更深入的研究。

总体来说,微生物发酵炮制,尤其是人工定向发酵可以促进中药液微量元素的溶出、有利于抗氧化活性物质的产生、增强了药液对部分致病菌的抑菌活性、提高了部分药效成分含量并且降低了部分农药残留,对中药材的减毒增效具有积极意义。

参考文献:

[1] 陈富文,史高峰,王国英,等. 响应面法优化复方中药发酵工艺[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(4):73-77.
[2] 薛协超,史洪涛,乔宏兴,等. 发酵中药炮制研究进展[J]. 现代牧业,2017,1(2):26-29.
[3] 苏贵龙. 益生菌 FGM 发酵对黄芪根、茎、叶主要活性成分含量的影响研究[D]. 中国农业科学院,2017.
[4] 靳双星,张桂枝,雷兰霞. 混菌发酵对加减四君子汤营养成分变化及多糖提取的影响[J]. 中国兽医杂志,2015,22(7):89-93.
[5] 陈旸,王义,孙亮,等. 植物乳杆菌发酵转化人参皂苷的研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1435-1440.
[6] 张文意,张婧,高鹏飞,等. 槐耳 / 板蓝根双向发酵体系物质基础变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(16):66-70.
[7] 戴燊,程茂基,韩信,等. 中草药混菌发酵生产新型生物中药的研究[J]. 饲料工业,2013,34(11):20-24.
[8] 刘洋,金顺义,常娟,等. 复合益生菌发酵中草药前后活性成分变化[J]. 安徽农业科学,2017,45(34):123-125.
[9] 贾艳姝. 黄芪乳酸菌发酵工艺研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2012.
[10] 潘扬,吴晓峰,涂霞,等. 中药巴豆经炮制与发酵后毒性效应的比较[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(5):788-792.
[11] 苏建树,刘白宁,田平芳,等. 微生物发酵对川乌、附子中生物碱含量的影响[J]. 北京化工大学学报(自然科学版),2010,37(3):97-101.
[12] 李红,张元湖. 应用 DPPH·法测定苹果提取物的抗氧化能力[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2005,36(1):35-38.
[13] 杨洋,李晓儿,李煜彬. 对木瓜酵素中抗氧化物质活性的研究[J]. 食品安全导刊,2015(24):78-81.
[14] 李杰,赵声兰,陈朝银,等. Folin-Ciocalteu 比色法测定核桃青皮果蔬酵素总多酚含量[J]. 中国酿造,2015,34(9):130-134.
[15] WEN Y. Effects of fermentation treatment on antioxidant and antimicrobial activities of four common Chinese herbal medicinal residues by *Aspergillus oryzae*[J]. **Journal of Food and Drug Analysis**,2013,21:219-226.
[16] 车国冬,周昌范,王洪伦,等. 四种药用香薷植物中多种微量元素分析[J]. 广东微量元素科学,2009,16(8):40-44.
[17] 谈利红,杨宗发,张丹,等. 中药抗氧化活性成分及评价方法研究进展[J]. 亚太传统医药,2017,13(10):35-37.
[18] 唐思园. 胆南星发酵炮制工艺研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
[19] 赵彤,钟宜科,荀一萍,等. 乳酸菌抗氧化性及其作用机制研究进展[J]. 中国食品添加剂,2018(9):202-209.
[20] 历雪,夏青,李艳,等. 几种中药提取液对常见的致病菌体外抑菌及抗氧化活性的初步研究[J]. 长春理工大学学报(自然科学版),2019,42(1):139-142.
[21] 魏萌. 发酵黄芪菌株的筛选及对其功能的影响[D]. 保定:河北农业大学,2014.
[22] 冯慧杰. 乳酸菌高密度发酵及产 γ- 氨基丁酸的研究[D]. 无锡:江南大学,2014.
[23] 文旺,李莉,李德坤,等. 基于液质联用技术和植物代谢组学的甘草炮制品化学成分差异性分析[J/OL]. 中国实验方剂学杂志:1-9[2020-04-26].https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20201073.
[24] 熊骏. 云南传统发酵豆豉由来乳酸菌中主要有机酸的分析及其抑菌效果研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2011.