

芽孢杆菌发酵法提取铁皮石斛多糖、 多肽及其抗氧化活性分析

王艳领, 余磊, 田春美*

(重庆工贸职业技术学院健康学院, 涪陵 408000)

摘要: **目的** 研究一种有效的铁皮石斛多糖、多肽提取方法, 并分析其基本性质及体外抗氧化活性。**方法** 以铁皮石斛为研究对象, 采用芽孢杆菌发酵法对铁皮石斛进行提取, 用蒽酮-硫酸法和双缩脲法分别测定铁皮石斛提取液的多糖和多肽含量, 以传统热水浸提法和超声波辅助提取法为对照, 通过提取液对自由基清除能力、螯合金属离子能力、抑制亚油酸自氧化能力指标, 评价芽孢杆菌发酵提取液的抗氧化活性。**结果** 芽孢杆菌发酵提取法工艺参数为: 投料比例 4% (g/mL)、发酵 pH 6、发酵温度 33.5°C、发酵时间 46 h, 此时多糖提取率为 37.21%, 多肽含量高达 4.43 mg/kg, 分子量主要分布在 2000 Da 以下, 占 84.95%。提取液对羟基自由基 (hydroxyl radical, ·OH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)自由基和 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-diazo-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)阳离子自由基有较强的清除能力, Fe²⁺螯合能力 67%、亚油酸自氧化抑制率 53%。**结论** 芽孢杆菌发酵法提取的铁皮石斛提取液, 多糖、多肽含量高, 具有较好的抗氧化性, 为铁皮石斛在食品领域的开发利用提供了一定的理论指导和实验数据参考。

关键词: 铁皮石斛; 芽孢杆菌发酵提取; 抗氧化性能

Extraction of polysaccharides and peptides from *Dendrobium officinale* by *Bacillus* fermentation method and analysis of their antioxidant activity

WANG Yan-Ling, YU Lei, TIAN Chun-Mei*

(College of Health, Chongqing Industry & Trade Polytechnic, Fuling 408000, China)

ABSTRACT: Objective To study an effective method for extracting polysaccharides and peptides from *Dendrobium officinale*, and analyze their basic properties and *in vitro* antioxidant activity. **Method** Taking *Dendrobium officinale* as the research object, the *Bacillus* fermentation method was used to extract *Dendrobium officinale*. The polysaccharide and peptide content of *Dendrobium officinale* extract were determined using anthrone sulfuric acid method and biuret method, respectively. The traditional hot water extraction method and ultrasonic assisted extraction method were used as controls, the antioxidant activity of *Bacillus* fermentation extract through indicators such as free radical scavenging ability, chelating metal ion ability, inhibition of linoleic acid autooxidation ability were evaluated. **Results** The process parameters of *Bacillus* fermentation extraction method were feed ratio 4% (g/mL), fermentation pH 6, fermentation

基金项目: 重庆市教委科学技术研究计划项目(KJQN202103605)

Fund: Supported by the Chongqing Education Commission Science and Technology Research Program Project (KJQN202103605)

*通信作者: 田春美, 硕士, 副教授, 主要研究方向为发酵食品加工理论研究与技术开发。E-mail: tianchunmei050@126.com

*Corresponding author: TIAN Chun-Mei, Master, Associate Professor, College of Health, Chongqing Industry & Trade Polytechnic, Fuling 408000, China. E-mail: tianchunmei050@126.com

temperature 33.5°C, fermentation time 46 h. At this time, the polysaccharide extraction rate was 37.21%, the peptide content was as high as 4.43 mg/kg, and the molecular weight was mainly distributed below 2000 Da, accounting for 84.95%. The extract had strong scavenging ability against hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, (DPPH) radicals, and 2,2'-diazo-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) cation radicals, with Fe^{2+} chelating ability of 67%, linoleic acid inhibition rate of 53%. **Conclusion** The extract of *Dendrobium officinale* extracted by *Bacillus* fermentation method has high content of polysaccharides and peptides, and good antioxidant properties, providing theoretical guidance and experimental data reference for the development and utilization of *Dendrobium officinale* in the fields of food.

KEY WORDS: *Dendrobium officinale*; *Bacillus* fermentation extraction; antioxidant properties

0 引 言

石斛是一种生长在热带和亚热带的兰科草本植物,在药学研究中应用广泛,其中,有突出药用价值的包括金钗石斛(*Dendrobium nobile*)、铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)以及霍山石斛(*Dendrobium huoshanense*) 3种^[1-3]。目前,已记载有超过 80 种石斛属植物^[4-5],它们含有多种天然生物活性成分,如氨基酸、植物多糖、生物碱、萜类、挥发性成分等^[6-8],具有抗氧化^[9-10]、清除自由基、降血糖、调节免疫力^[11-12]等多种功效。铁皮石斛在 2021 年被列入中国药食同源食品目录,作为一种具有丰富药理活性的中药资源,现已成为保健品和化妆品领域研究的热门话题,许多学者以铁皮石斛为原料,开发出了系列功能性产品,备受消费者青睐^[13-15]。

目前提取石斛多糖多肽的方法主要还是以罐式热水浸提法为主,虽然该方法简单易操作,但耗时长,影响因素较多且提取率相对低。为了提高铁皮石斛的利用率,联合复合酶提取法^[16]、超声波辅助提取法^[17]、发酵提取法^[18]等技术不断在相关文献中被报道。例如廖霞等^[19]研究了酶提取法联合微波辅助提取法提取铁皮石斛多糖,结果发现多糖提取率高于单独提取法;王林青等^[15]采用超声波-微波协同辅助提取铁皮石斛花多糖并评估其抗氧化功效;LIANG 等^[20]以深共晶溶剂作为提取剂、采用酶辅助提取铁皮石斛多糖,结果表明此法比水提法能获得更高产量的铁皮石斛多糖;李坚等^[21]采用乳酸菌发酵提取铁皮石斛多糖,结果表明这种方法不但可以提高多糖产率还可以增强其抗氧化活性。这些提取方法在多糖产率方面虽然比传统的热水浸提法高,但缺少联合多种提取方法对铁皮石斛多糖产率的影响因素和提取物对多种自由基清除能力等方面的深入研究。

本研究拟以多糖得率为基础评价指标,先通过正交实验优化热水浸提法提取铁皮石斛多糖工艺条件,然后在最优提取条件下用超声波辅助提取法和芽孢杆菌发酵提取法进行提取对比实验,比较 3 种提取方法对铁皮石斛多糖相对分子量及单糖组成的影响,同时以维生素 C (vitamin

C, VC)做阳性对照,考察不同提取方式所得提取液的抗氧化性能差异,分析其体外抗氧化活性,以期研究一种最优的铁皮石斛多糖、多肽的提取方法,为铁皮石斛这一药食同源资源的综合研究开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芽孢杆菌 DU-106(广州华南农业大学食品科学学院实验室); MRS 肉汤培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基、琼脂(广东环凯微生物科技有限公司); 铁皮石斛(含水量 $\leq 8\%$, 安徽一品堂生物科技有限公司); 福林酚、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)(分析纯,北京华迈科生物技术有限责任公司); 菲洛嗪(分析纯,美国 Sigma 公司); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、邻苯三酚、氢氧化钠、盐酸、甲醛、乙腈、三氟乙酸、亚油酸、双缩脲试剂、硫氰酸铵、氯化亚铁、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-diazo-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)(分析纯,上海阿拉丁有限责任公司); 三氯乙酸、乙醇(分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); PeLLicon-2 超滤装置(德国默克公司); TU-1810DAP 紫外分光光度计(北京通用仪器有限责任公司); KQ-400DB(10L)-400W 超声仪(巩义市予化有限责任公司); ASA-M100 皮肤角质层水分测试仪(日本 ASCH 公司); PHS-2F-pH 计(上海精密仪器有限公司); ME104 分析天平(120 g/0.1 mg, 广州靖扬仪器设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

取新鲜的铁皮石斛茎叶等部位清洗干净,然后置于 45°C 真空干燥箱中进行干燥,待茎叶水分蒸干后取出,粉碎,过 200 目筛,即为植物原粉。为探究不同工艺提取的活性物含量差别带来的功效差异,首先选用传统热水提取法筛选

最优提取条件,其次在最优提取条件下用超声波辅助提取法和芽孢杆菌发酵提取法进行实验,并检测活性物含量。

1.3.2 热水提取法

在热水提取工艺中,采用传统回流方法:取等量的植物粉末,加入到 300 mL 的单口圆底烧瓶中,接着向烧瓶中加入去离子水,在磁力搅拌下进行回流提取,然后将提取液进行过滤和离心(4000 r/min),上清液随后用 0.05 μm 滤膜过滤,得热水提取液。此提取实验中,单因素的控制条件包括料液比(1:20、1:15、1:10、1:5, g/mL)、回流温度(70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$),以及提取时间(6、12、18、24 h)。

1.3.3 超声波辅助提取法

在超声波辅助提取工艺中^[17],根据热水提取法获得的最佳料液比和回流提取时间进行操作。先在 300 mL 的单口圆底烧瓶中,按最佳料液比加入石斛粉末和去离子水,用 400 W 的超声仪分别处理 20、30、40 和 50 min。在超声的辅助下,磁力搅拌回流提取相同时间,提取液通过 0.05 μm 滤膜过滤,得超声波辅助提取液。

1.3.4 芽孢杆菌发酵提取法

在芽孢杆菌发酵提取工艺中^[18],准确称取等量植物粉末,先高压灭菌(115 $^{\circ}\text{C}$, 30 min),按照 4% (g/mL)投料比例接种芽孢杆菌 DU-106,初始 pH 为 6,在 33.5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 46 h,随后灭菌失活,冷却,过滤除渣,得粗多糖滤液,离心(4000 r/min),滤膜过滤,得芽孢杆菌发酵提取液。

1.3.5 提取液分析

(1)糖含量检测

提取液中多糖含量的测定,在波长 490 nm 下,用紫外分光光度计测定吸光度,并进行换算以获得多糖的含量^[22]。此外,根据文献^[23]的方法,对多糖进行水解,然后加入 PMP 进行衍生反应,最后用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)来测定石斛提取液降解产物的单糖组成和含量。

(2)多肽含量测定

提取液中多肽含量使用双缩脲法进行测定^[24-25]。首先用 4.00 mL 双缩脲试剂处理 20 mg/mL 的标准蛋白溶液,放置 30 min 后,在 540 nm 下测吸光度,根据浓度梯度结果绘制标准曲线。

用去离子水配制 10% 的三氯乙酸与等体积的提取液清液混合,放置反应 30 min,然后以 4000 r/min 转速离心 20 min,使析出的不溶性蛋白质固液分离,取上清液 1.00 mL,按相同方法处理并测定上清液的吸光度。通过对照标准曲线,计算出石斛提取液中多肽含量。

(3)水解度的测定

将石斛提取后的滤渣加入 100 mL 蒸馏水,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下,用 6 mol/L 的盐酸,放置反应 24 h,打断所有肽键,彻底水解,调节 pH 至中性,用甲醛滴定法,对比空白氢氧化钠的消耗量,换算得到水解后的总氨基氮含量。其中被水

解氨基氮数与原料总氮数的比值,即为发酵液的水解度(degree of hydrolysis, DH)。

(4)平均肽链长度的测定

评估蛋白质发酵产物中肽段质量可通过测定发酵液中平均肽链长度(average peptide chain length, APCL),它是评估肽段质量的重要指标,能够准确地表明提取液中肽段所包含氨基酸残基数的平均值。APCL 的计算方法按照文献^[26-27]要求进行。

(5)多肽相对分子质量的测定

采用 HPLC(含 M32 工作站)法。样品前处理:将发酵液加入适量蒸馏水,超声 10 min,使用 0.22 μm 滤膜过滤。

检测条件:色谱柱为凝胶柱,流动相为乙腈/水/三氟乙酸(40:50:0.1, V:V:V),进样量为 5 μL ,波长 220 nm,流速 0.5 mL/min,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.6 提取液性能检测

(1)抗氧化检测

提取液抗氧化性能测定方法,以 VC 为阳性对照,测定对超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除作用^[28-31]。

(2)超滤法分离纯化多肽

在室温下,用超滤装置对提取液进行连续三级超滤分离和纯化。在保持提取液质量浓度为 10 mg/mL 条件下,对所得滤液依次使用 10、5 和 3 kDa 截留分子量的超滤膜截留。随后,对各截留组分进行真空干燥,制备成 0.8 mg/mL 的溶液,以测定对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除作用。

(3)螯合金属离子能力的测定

通过评估提取液的螯合金属离子能力来间接评价其抗氧化性能。首先,将 3.00 mL 提取液与 100 μL 1 mmol/L FeCl_2 混合,加入 1.00 mL 1 mmol/L 的非洛嗪溶液,在常温下,缓慢搅拌反应 20 min,样品用紫外分光光度计测定其在 562 nm 处的吸光度。

(4)抑制亚油酸自氧化能力的测定

配制亚油酸储备液:首先在玻璃试管里,取 2.00 mL 2.5% 的亚油酸水溶液与 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(0.05 mol/L)涡旋混合 2 min,随后均质 10 min 得混合溶液。

取 2.00 mL 0.8 mg/mL 的提取液与等体积的亚油酸溶液充分混合均匀,将试管用锡箔纸包住避光,转移至 40 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中反应 1 周,空白对照组中提取液以蒸馏水作为替代。反应结束后,取 0.50 mL 反应液,依次加入乙醇(3.50 mL 75%)、硫氰酸铵(0.50 mL 30%)和 FeCl_2 溶液(0.5 mL 20 mmol/L),充分混匀,静置反应 3 min,用紫外分光光度计测定样品在波长 500 nm 处的吸光度。

1.4 数据处理

Excel 2019 对实验数据进行整理,GraphPad Prism 9.0、Origin 2023 软件进行数据统计分析及绘图,所有实验

均重复测定 3 次, 结果以平均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 铁皮石斛热水法提取最佳条件

在传统提取方法中, 料液比、温度、提取时间均是主要因素, 以三因素四水平的正交实验探究多糖提取率的最佳提取条件, 因素水平表见表 1, 实验结果见表 2。

表 1 铁皮石斛热水提取的正交因素水平表
Table 1 Level table of orthogonal factors in hot water extraction of *Dendrobium officinale*

水平	A(料液比)(g/mL)	B(温度)/°C	C(提取时间)/h
1	1:20	70	6
2	1:15	80	12
3	1:10	90	18
4	1:5	100	24

表 2 优化热水提取条件正交实验结果
Table 2 Orthogonal experiment results of optimizing hot water extraction conditions

编号	A (g/mL)	B/°C	C/h	多糖得率/%
1	1	1	1	22.34
2	1	2	2	25.78
3	1	3	3	27.28
4	1	4	4	26.62
5	2	1	2	30.12
6	2	2	1	25.66
7	2	3	4	25.18
8	2	4	3	23.74
9	3	1	3	34.56
10	3	2	4	31.18
11	3	3	1	30.44
12	3	4	2	27.08
13	4	1	4	21.19
14	4	2	3	21.72
15	4	3	2	22.08
16	4	4	1	19.95
K_1	102.02	108.21	98.39	
K_2	104.70	104.34	105.06	
K_3	123.26	104.98	107.30	
K_4	84.94	97.39	104.17	
k_1	34.01	36.07	32.80	$A>B>C$
k_2	34.90	34.78	35.02	$A_3B_1C_3$
k_3	41.09	34.99	35.77	
k_4	28.31	32.46	34.72	
R	38.32	6.95	5.78	

由表 2 可知, 3 种因素对铁皮石斛热水提取法的影响由大到小为: 料液比>温度>提取时间, 说明料液比的影响最大, 提取时间影响最小, 最优方案为 $A_3B_1C_3$, 即最佳提

取条件为料液比 1:10 (g/mL)、温度 70°C、提取时间 18 h, 按照最优条件进行再提取实验验证, 得铁皮石斛多糖提取率为 33.51%。

2.2 超声波辅助提取法结果分析

基于热水提取法的最优提取条件: 料液比 1:10 (g/mL)、温度 70°C、提取时间 18 h, 用 4000 W 超声波分别超声 20、30、40、50 min 后, 在超声辅助下进行回流提取, 多糖得率为 34.72%、38.31%、36.43%、34.81%。

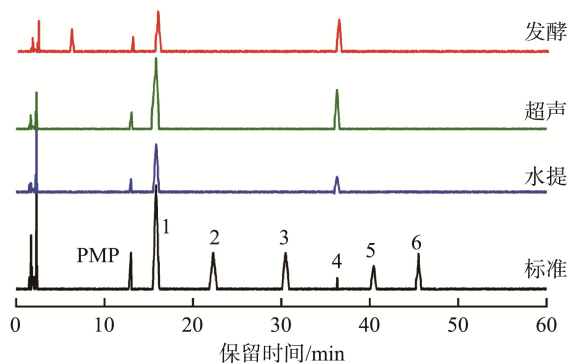
2.3 芽孢杆菌发酵提取法结果分析

根据热水提取法获得的最优提取料液比 1:10 (g/mL), 准确称量铁皮石斛粉末作为发酵底物, 按照 4% (g/mL) 投料比例接种芽孢杆菌 DU-106 发酵提取, 铁皮石斛的多糖提取率为 37.21%。

3 种实验方法的多糖含量对比发现, 发酵提取法的多糖含量比提取时间为 30 min 的超声波辅助提取法略低, 其有可能是发酵过程中, 芽孢杆菌生长对提取石斛多糖分解消耗^[32-34], 转化为乳酸、多肽等有机物, 进而在提取后获得的多糖会比超声波辅助法的稍低。

2.4 石斛提取液中单糖检测结果

由图 1 可知, 铁皮石斛多糖的主要成分是甘露糖和葡萄糖。经 HPLC 检测, 不同提取方法所得甘露糖与葡萄糖的比例不同, 其中水提取法所得甘露糖与葡萄糖的比例约为 3:1、超声提取法所得甘露糖与葡萄糖的比例约为 1.5:1、发酵提取法所得甘露糖与葡萄糖的比例约为 1:1。由于甘露糖与葡萄糖的比例是石斛多糖生理活性的重要影响因素^[35], 国家药典^[2]规定药用石斛多糖甘露糖含量不得少于 13%, 此时发酵提取法可能会影响石斛多糖的生理活性, 特别是其抗氧化能力。但在约 5 min 处, 发酵提取法中出现了一个非单糖吸收峰, 该峰是由芽孢杆菌 DU-106 在发酵过程中产生的乳酸形成的特征吸收峰。



注: 1-甘露糖; 2-鼠李糖; 3-半乳糖醛酸; 4-葡萄糖; 5-半乳糖; 6-阿拉伯糖。

图 1 提取液 HPLC 谱图

Fig.1 HPLC spectrum of the extract

2.5 多肽含量、DH 和 APCL 的测定结果

由表 3 可知,热水提取法和超声波辅助提取法对铁皮石斛多肽的提取效率相对较低。这可能是由于热水提取法的加热温度不够高,提取时间不够长,或者受其他因素的影响,导致铁皮石斛中的多肽没有被充分溶解出来;而超声波辅助提取法可能因为超声波的强度、频率等因素,没有足够的力量破碎铁皮石斛的细胞,从而使得多肽不能有效地释放和提取;发酵提取法的提取效率最高,高达 4.43 mg/kg,可能原因是在发酵过程中微生物能分泌多种酶,这些酶不但可以加速破坏铁皮石斛的细胞壁和释放胞内活性物质,还可通过生物转化降解潜在的有害物质,并生成有益的次生代谢产物,对增加铁皮石斛功效成分的提取率和活性很有利^[36]。此外,发酵过程也能够产生乳酸等有机酸,可进一步促进多肽的释放和提取。

表 3 不同提取方法的多肽含量、DH 和 APCL
Table 3 Peptide content, DH and APCL of different extraction methods

提取方法	多肽含量/(mg/kg)	DH/%	APCL
热水提取法	0.79±0.036	1.42±0.044	2.87±0.015
超声波辅助提取法	1.24±0.020	2.79±0.017	2.67±0.026
发酵提取法	4.43±0.035	16.37±0.040	6.08±0.021

热水提取法的 DH 较低,可能是由于提取条件中未考虑适宜的 pH,导致提取过程中多肽链没完全水解;超声波辅助提取法的 DH 较高,说明超声波作用能破碎铁皮石斛细胞,使包裹在细胞内的多肽更易被释放和提取;发酵提取法的 DH 最高,说明发酵过程中微生物作用明显,能加速多肽的降解。

热水提取法的 APCL 较高,说明该方法未能完全降解多肽链,或者是某些较长的多肽链在该条件下比较稳定,不易被降解;超声波辅助提取法的 APCL 较低,表明该方法能够降解一些较长的多肽链,使得 APCL 变短;发酵提取法的 APCL 最高,说明发酵过程能促进一些较短多肽链的合成,使得 APCL 变长,进一步表明了该发酵产物中肽段质量较高,有利于提高其抗氧化活性。

2.6 多肽分子量的测定结果

CHEN 等^[37]和 AUNG 等^[38]研究指出,长链多肽中可能会含有能与自由基反应的结构,通常长链的结构使其以非活性的形式存在。当生物多肽经过水解时,释放出大量的活性小分子肽,可充分与自由基反应,才表现出抗氧化活性。这里选用获取多肽含量最高的发酵提取法所得提取液进行多肽分子量的测定,以探讨其分布与抗氧化活性之间的关系。

由图 2 和表 4 可知,提取液中以小于 2000 Da 小分子

多肽为主,占其总量的 84.95%,可能是微生物产生的生物酶作用,可以促进石斛多肽的水解,产生了大量的小分子多肽,进而提高石斛发酵提取液的抗氧化活性和自由基清除活力,说明抗氧化活性的强弱与产物中多肽含量及分子量大小的分布情况有明显相关性。

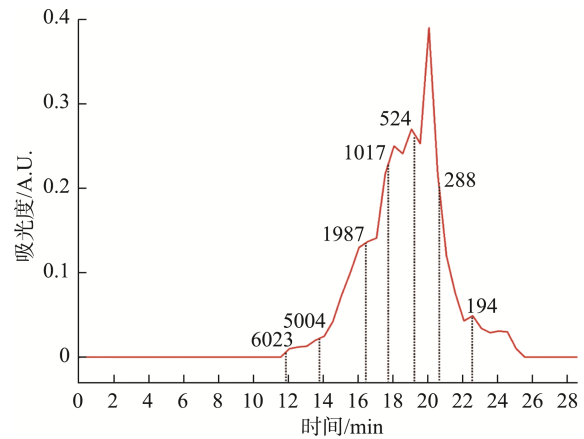


图 2 发酵提取法多肽分子量分布图

Fig.2 Molecular weight distribution of polypeptide by fermentation extraction methods

表 4 不同分子量的多肽含量

分子量/Da	多肽含量/%
>5000	2.77±0.020
5000~2000	12.28±0.030
2000~1000	17.32±0.020
1000~500	25.83±0.017
500~300	24.69±0.026
300~200	10.78±0.020
<200	6.33±0.010
总计(<2000)	84.95

2.7 抗氧化性能分析

2.7.1 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基清除能力

将 3 种提取方法获得的铁皮石斛提取液进行抗氧化性能的测定,以 VC 为阳性对照,测定对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除作用。测试 VC 样品分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 的水溶液,取热水法(方案 9)、超声法(提取时间为 30 min)、发酵法的铁皮石斛提取液,配制相同质量浓度的测试样品,测试其抗氧化性能。

由图 3 可知,经热水法提取后,铁皮石斛多糖对 4 种自由基的清除率约是相同 VC 浓度的 50%,说明石斛多糖具有一定的抗氧化性能,可调节人体自由基的平衡,是一种较好的天然抗氧化剂,可能的主要机制是通过皮肤吸收后,石斛多糖能够干预自由基反应链,增强机体的抗氧化

防御系统, 并降低炎症相关因子的表达, 从而实现抗氧化作用^[38]。

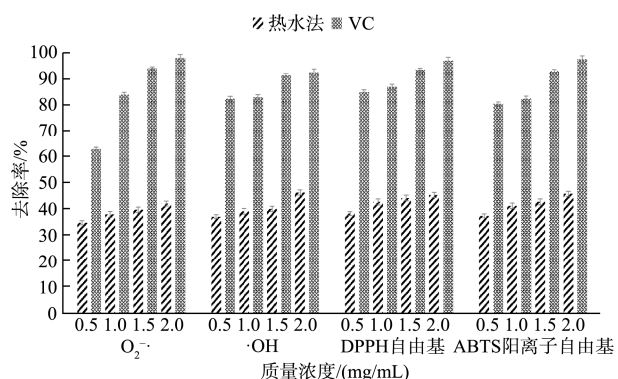


图 3 热水提取法与 VC 的抗氧化性能

Fig.3 Antioxidant properties of hot water extraction method and VC

由图 4 可知, 经超声波辅助提取后, 多糖的含量升高会增强抗氧化性能, 同时自由基清除能力也会随着多糖的剂量增加而增加, 其中, 在相同测试浓度下, 对 ABTS 阳离子自由基清除能力高于其他 3 种自由基清除能力。多糖清除 ABTS 阳离子自由基的机制与分子结构、组成、浓度、分子量等因素有关, 超声辅助能提高其清除能力的原因可能是石斛多糖中含有许多活性基团, 如羟基、磷酸基、羧基等, 它们能与 ABTS 阳离子自由基中的 $O_2^{\cdot-}$ 发生反应, 并将其捕获, 从而使 ABTS 阳离子自由基中的 $O_2^{\cdot-}$ 得到抑制, 进而使 ABTS 阳离子自由基被清除; 超声波辅助提取会在液体中产生多种声学效应, 导致出现剧烈的物理或化学反应, 形成更多的活性多糖或单糖, 从而提高清除 ABTS 阳离子自由基的能力。

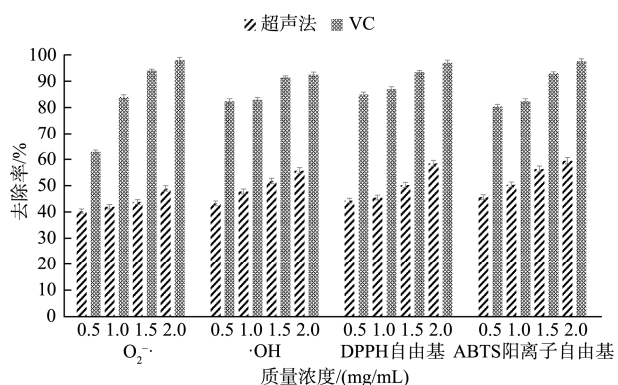


图 4 超声波辅助提取法与 VC 的抗氧化性能

Fig.4 Antioxidant properties of ultrasonic assisted extraction method and VC

由图 5 可知, 经芽孢杆菌发酵提取后, 2.0 mg/mL 的提取液对 $\cdot OH$ 、DPPH 自由基清除能力大幅度提高, 分别提高约为 32.90%、35.07%, 其原因可能是芽孢杆菌的代谢活动

导致发酵液中的多糖分子量降低, 赋予其更高的抗氧化能力。分子量是研究多糖结构与活性的重要参数之一^[39], 在生物体内, 多糖想要发挥活性功能需要穿过重重阻碍, 多糖的分子量越大意味着体积也越大, 在一定程度上会影响其跨越细胞膜发挥生物活性。另外研究表明^[38], 发酵法会提高提取液中多肽的种类与含量, 有助于提高抗氧化作用, 从而抵御皮肤受到的自由基损伤和外界环境对肌肤的伤害。

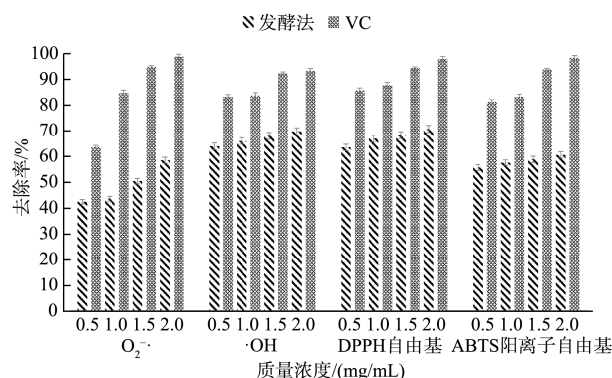


图 5 芽孢杆菌发酵提取法与 VC 的抗氧化性能

Fig.5 Antioxidant properties of *Bacillus* fermentation method *Bacillus* and VC

2.7.2 提取液纯化后的抗氧化性能分析

对发酵提取液进行连续的三级超滤分离和纯化, 依次使用不同截留分子量的超滤膜截留(如将 10 kDa 透过液用作 5 kDa 的起始液), 即可收集到不同分子量片段的截留液和透过液, 以此类推, 获得不同分子量的石斛多肽, 分别真空干燥, 测定不同分子量片段对 4 种自由基的清除能力。

由表 5 可知, 不同分子量片段对 $\cdot OH$ 和 DPPH 自由基的清除率相对较高, 表明这些多肽对它们的清除能力较强。不同抗氧化指标之间的清除率存在差异, 分子量为 3000~5000 Da 和 3000 Da 以下的多肽在各项抗氧化指标中均表现出较高的清除率, 具有较强的抗氧化活性, 这可能是因为这些多肽具有较好的结构稳定性和活性基团暴露, 有利于与自由基相互作用并清除它们; 而分子量为 5000 Da 以上的多肽抗氧化活性相对较弱, 这可能是因为这些肽的结构稳定性较差或活性基团暴露不足, 影响了它们与自由基之间的相互作用。

2.7.3 提取液螯合金属离子能力的测定

Fe^{2+} 被认为是一种对脂质氧化产生威胁的增强剂, 它能够在 Fenton 反应中产出更强的 $\cdot OH$, 这种化合物能够快速和环境中的生物大分子产生化学作用, 从而对细胞器造成巨大破坏。故可通过评价提取液对 Fe^{2+} 的螯合能力大小, 证明其抗氧化性的强弱。

表 5 不同分子量片段对 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除能力数据
Table 5 Scavenging ability data of different molecular weight fragments on $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, DPPH \cdot and ABTS $^{\cdot+}$

项目	10 kDa 以上	5000~10000 Da	3000~5000 Da	3000 Da 以下
$O_2^{\cdot-}$ 清除率/%	28.13±0.026	29.79±0.010	35.49±0.010	39.49±0.026
$\cdot OH$ 清除率/%	38.44±0.020	31.46±0.017	43.21±0.017	51.22±0.026
DPPH 自由基清除率/%	36.73±0.010	30.57±0.010	45.52±0.026	55.27±0.030
ABTS 阳离子自由基清除率/%	25.66±0.020	27.26±0.020	37.86±0.035	41.20±0.020

由图 6 可知, 发酵提取法的螯合能力最强, 达 67%, 这是由于发酵提取法中生成了大量的多肽, 而抗氧化作用是多肽通过其侧链上的羧基与 Fe^{2+} 发生螯合作用实现, 因为肽链分子中的羧基解离会影响提取液的螯合能力, 导致多肽的末端或侧链结构从电中性变成电负性, 使该部分更易与金属离子螯合。此外, 提取液中存在的小分子肽, 可能与乙二胺四乙酸有相似的空间结构, 通过“钳制”游离的金属离子, 增强提取液的螯合能力, 提高抗氧化活性。

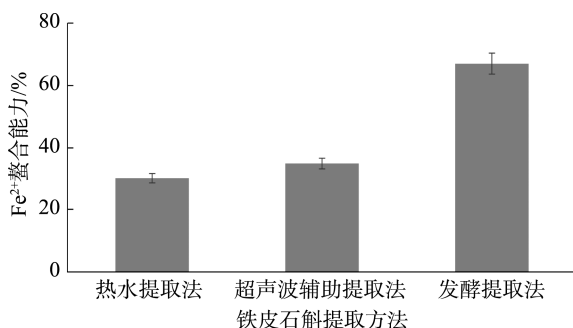


图 6 不同提取方式的提取液对 Fe^{2+} 的螯合力

Fig.6 Chelating ability of extracts from different extraction methods to Fe^{2+}

2.7.4 提取液抑制亚油酸自氧化能力的测定

由图 7 可知, 不同提取方式的提取液对亚油酸自氧化均有抑制作用, 作用 7 d 后, 发酵提取法的抑制率达 53%。这说明石斛多糖中含有一些不饱和双键, 它们与自由基反应, 稳定了自由基并抑制了亚油酸的氧化过程, 起到了抗

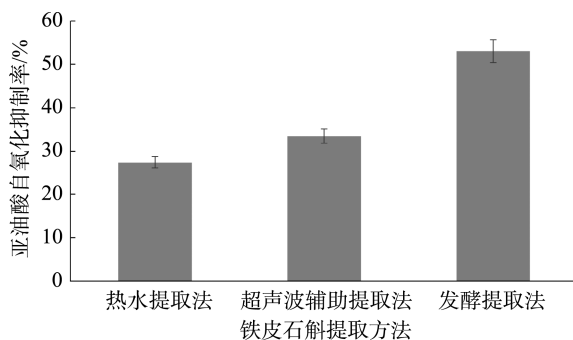


图 7 不同提取方式的提取液对亚油酸过氧化的抑制力

Fig.7 Inhibition effects of extracts from different extraction methods on linoleic acid peroxidation

氧化剂的作用。发酵提取液抗氧化能力最强, 可能是由于其富含多肽, 通过疏水性氨基酸残基与疏水性亚油酸分子产生不饱和烃的加成反应, 阻断了脂质过氧化过程中自由基引发的链式反应, 而表现出更强的抑制作用。此外, 发酵提取液中的小分子肽如果含有还原性的官能团, 也可以在解离时提供电子或质子与自由基或活性氧反应, 使其失去氧化活性, 减少脂质的过氧化反应。

3 结论

3 种提取方法获得铁皮石斛提取液, 在多糖含量上, 热水提取法为 33.51%, 超声波辅助提取法为 38.31%, 芽孢杆菌发酵提取法为 37.21%; 在多肽含量中, 发酵提取法获得多肽最高为 4.43 mg/kg, 多肽分子量主要分布在 2000 Da 以下, 占 84.95%, 为提取液提供了有效的抗氧化性能。同时, 不同分子量的多肽抗氧化性能测试结果表明了小分子的多肽对抗氧化性能提升具有重要意义。

抗氧化性能结果显示, 超声波辅助提取会在提取液中产生声学效应, 可产生剧烈的物理和化学反应, 从而使细胞壁更容易破裂获得更多的活性多糖或单糖, 提升其清除 ABTS 阳离子自由基的能力。发酵提取法则可获得更多的营养物质, 有利于提升对 $\cdot OH$ 、DPPH 自由基和 ABTS 阳离子自由基的清除能力。从 Fe^{2+} 螯合能力、亚油酸自氧化抑制率检测中可知: 提取液均表现出明显的抑制效果, 其中发酵提取法抑制效果最好, 分别为 67% 和 53%, 这说明发酵提取法提取植物活性成分, 可以增强提取液抗氧化性能。

该研究可为铁皮石斛的提取、抗氧化性能提供了一定的理论依据。但由于缺乏制备提纯设备, 未对提取液中营养物质、多肽结构进行表征, 导致缺乏对发酵方法提高抗氧化性能的主要影响因素分析。因此, 后续研究可以进一步探究发酵方法中营养物质、多肽结构对抗氧化性能的影响, 促进天然植物的提取在食品领域中的应用。

参考文献

- [1] XU J, HAN QB, LI SL, *et al.* Chemistry, bioactivity and quality control of *Dendrobium*, a commonly used tonic herb in traditional Chinese medicine [J]. *Phytochem Rev*, 2013, 12(2): 341–367.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [3] 赖策,魏小琴. 石斛属植物生态产地适宜性区划研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(6): 159-162, 206.
- LAI C, WEI XQ. Study on ecological habitat suitability re-gionalization of *Dendrobium* [J]. J Anhui Agric Sci, 2020, 48(6): 159-162, 206.
- [4] YU ZM, YANG ZY, TEIXEIRA DSJA, et al. Influence of low temperature on physiology and bioactivity of postharvest *Dendrobium officinale* stems [J]. Postharvest Biol Technol, 2019, 148: 97-106.
- [5] ZHENG S, HU Y, ZHAO R, et al. Genome-wide researchers and applications on *Dendrobium* [J]. Planta, 2018, 248(4): 769-784
- [6] 普冉,赫京生,吴雅文,等. 6种石斛的化学成分对比分析与质量评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(20): 71-77.
- PU R, HE JS, WU YW, et al. Comparative analysis and quality evaluation of chemical constituents of 6 kinds of *Dendrobium* species [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(20): 71-77.
- [7] 黄彪,刘文静,李巍,等. 不同人工栽培模式下铁皮石斛活性成分及抗氧化活性比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(8): 2665-2671.
- HUANG B, LIU WJ, LI W, et al. Comparative analysis of active constituents and antioxidant activities of *Dendrobium officinale* in different artificial cultivation models [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(8): 2665-2671.
- [8] 冯柳娟,刘凯月,全海倩. 铁皮石斛主要成分及其含量检测方法的研究[J]. 农产品加工, 2023, 3: 85-87.
- FENG LJ, LIU KY, QUAN HQ. Study on main composition and content determination of *Dendrobium candidum* [J]. Farm Prod Process, 2023, 3: 85-87.
- [9] XUE Y, GAN XS, HUANG KL, et al. Extraction process of polysaccharide by compound enzymatic method of *Dendrobium officinale* and its antioxidant activity [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(3): 215-219.
- [10] MIAO YX, LIAO MX, SUN AH, et al. Study on optimum extraction of polysaccharides from flowers of *Dendrobium officinale* and its antioxidant activity *in vitro* [J]. Food Res Dev, 2019, 40(2): 52-56.
- [11] HE L, YAN XT, LIANG J, et al. Comparison of different extraction methods for polysaccharides from *Dendrobium officinale* stem [J]. Carbohydr Polym, 2018, 198: 101-108.
- [12] 赵妹婷,王维浩,全志刚,等. 绿豆 RS4-Se(IV)制备、结构表征及对酶活抑制动力学[J]. 食品科学, 2022, 43(20): 53-62.
- ZHAO ST, WANG WH, QUAN ZG, et al. Preparation and structural characterization of mung bean RS4-Se (IV) and kinetics of enzymatic inhibition by it [J]. Food Sc, 2022, 43(20): 53-62.
- [13] 武鹏程. 花生芽中白藜芦醇的提取纯化、抗氧化及抑制酶活性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2021.
- WU PC. Research on extraction and purification, antioxidant and inhibitory enzyme activity of resveratrol from peanut sprout [D]. Alar: Tarim University, 2021.
- [14] HE Y, LI L, CHANG H, et al. Research progress on extraction, purification, structure and biological activity of *Dendrobium officinale* polysaccharides [J]. Front Nutr, 2022. DOI: 10.3389/fnut.2022.965073
- [15] 王林青,宁灿灿,李蕊,等. 铁皮石斛多糖超声-微波协同提取条件优化及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(11): 13-20.
- WANG LQ, NING CC, LI R, et al. Optimization of ultrasonic-microwave synergistic extraction conditions and antioxidant activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale* [J]. Food Res Dev, 2023, 44(11): 13-20.
- [16] TEIXEIRA D, NG TB. The medicinal and pharmaceutical importance of *Dendrobium* species [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2017, 101(6): 1-13.
- [17] ZHAO Y, LIU Y, LAN XM, et al. Effect of *Dendrobium officinale* extraction on gastric carcinogenesis in rats [J]. Evid Based Comp Alternat Med, 2016. DOI: 10.1155/2016/1213090
- [18] TANG HX, ZHAO TW, SHENG YJ, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization [J]. Evid Based Comp Alter Med, 2017. DOI: 10.1155/2017/7436259
- [19] 廖霞,王莹,黄大川,等. 微波辅助酶法提取铁皮石斛多糖的工艺[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 43-48.
- LIAO X, WANG Y, HUANG DC, et al. Microwave assisted enzymatic extraction of polysaccharide from *Dendrobium candidum* [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(1): 43-48.
- [20] LIANG J, ZENG YJ, WANG HF, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of novel polysaccharides from *Dendrobium officinale* by deep eutectic solvents [J]. Nat Prod Res, 2018. DOI: 10.1155/2017/7436259
- [21] 李坚,冉周. 石斛多糖的微生物发酵法提取及保湿功效研究[J]. 广东化工, 2020, 47(18): 79-81.
- LI J, RAN Z. Study on extraction and moisturizing effect of polysaccharides from *Dendrobium Officinale* under fermentation [J]. Guangdong Chem Ind, 2020, 47(18): 79-81.
- [22] 钟岩,潘浦群,王艳红,等. 苯酚-硫酸法测定鲜人参中多糖含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1957-1958.
- ZHONG Y, PAN PQ, WANG YH, et al. Determination of polysaccharide content in fresh ginseng by phenol sulfuric acid method [J]. Shizhen Chin Med J, 2008, 19(8): 1957-1958.
- [23] GUO X, HU XL, WANG YR, et al. System isolation and purification of *Isatis radix* polysaccharides and determination of their compositions [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(9): 1508-1514.
- [24] 王敏. 双缩脲法快速测定大豆分离蛋白粉中的粗蛋白[J]. 大豆通报, 2003, (3): 32.
- WANG M. Rapid determination of crude protein in soybean protein isolate powder using biuret method [J]. Soybean Bulle, 2003, (3): 32.
- [25] 张立娟,姜瞻梅,姚雪琳,等. 双缩脲法检测大豆分离蛋白中蛋白质的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 241-242.
- ZHANG LJ, JIANG ZM, YAO XL, et al. Study on the detection of protein in soybean protein isolates by biuret method [J]. Food Ind Sci Technol, 2008, 29(7): 241-242.
- [26] 李富伟. 肽的制备工艺及肽对肉鸡生长性能影响机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2003.

- LI FW. Study on the preparation process of peptides and the mechanism of their impact on the growth performance of broiler chickens [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2003.
- [27] 蔡兴, 王巧红, 陆媛玥, 等. 饲料中添加抗菌肽对肉鸡生长性能和抗氧化能力的影响[J]. 饲料博览, 2022, (5): 42–46.
- CAI X, WANG QH, LU YY, *et al.* The effect of adding antimicrobial peptides to feed on the growth performance and antioxidant capacity of broiler chickens [J]. *Feed Exp*, 2022, (5): 42–46.
- [28] 陈红惠, 牛念拉姆. 底圩茶多糖的超声波辅助提取及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(21): 179–184.
- CHEN HH, NIU NLM. Ultrasound assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from Diwei tea [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2020, 41(21): 179–184.
- [29] 周金平, 王自凡, 卢永仲, 等. 铁皮石斛多糖分级制备及理化活性研究[J]. 日用化学品科学, 2022, 8: 45.
- ZHOU JP, WANG ZF, LU YZ, *et al.* Classification preparation and physicochemical activity of polysaccharides from *Dendrobium officinale* [J]. *J Daily Chem Sci*, 2022, 8: 45.
- [30] AZARBANI F, SHIRAVAND S. Green synthesis of silver nanoparticles by *Ferulago macrocarpa* flowers extract and their antibacterial, antifungal and toxic effects [J]. *Green Chem Lett Rev*, 2020, 13(1): 41–49.
- [31] 陈默, 孙懿, 赵亚, 等. 铁皮石斛保湿性能研究[C]. 第十届中国化妆品学术研讨会论文集, 2014.
- CHEN M, SUN Y, ZHAO Y, *et al.* Study on the moisturizing performance of *Dendrobium officinale* [C]. Proceedings of the 10th China Cosmetics Academic Symposium, 2014.
- [32] 黄庆. 铁皮石斛乳酸菌发酵关键技术及其营养组分分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- HUANG Q. Key Technologies and nutrient component analysis of lactic acid bacteria fermentation in *Dendrobium officinale* [D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.
- [33] WANG Z, MA S, LI L, *et al.* Synergistic fermentation of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wheat bran dietary fiber-steamed bread [J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 16: 100528.
- [34] NGUYEN TQN, HANKOVA M, KRUZIK V, *et al.* Determination of volatile compound profiles and physico-chemical analysis of linden and acacia Czech honey [J]. *J Apic Res*, 2023, 62(2): 374–382.
- [35] 孟继坤, 张楠, 吴浩, 等. 超高压提取铁皮石斛多糖工艺优化及其抗氧化活性分析[J]. 食品与机械, 2023, 39(1): 157–163.
- MENG JK, ZHANG N, WU H, *et al.* Optimization of ultra-high pressure extraction technology of polysaccharide from *Dendrobium officinale* and its antioxidant activities [J]. *Food Mach*, 2023, 39(1): 157–163.
- [36] 陈漪汶, 文霞, 黄健聪, 等. 铁皮石斛的抗氧化、保湿功效研究和应用现状[J]. 广州化工, 2022, 50(13): 27–31.
- CHEN YW, WEN X, HUANG JC, *et al.* Research progress on antioxidant and moisturizing effect of *Dendrobium candidum* [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2022, 50(13): 27–31.
- [37] CHEN HM, KOJI M, FUMIO Y. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(3): 574–578.
- [38] AUNG T, PARK SS, KIM MJ. Influence of *Lactobacillus* (LAB) fermentation on the enhancement of branched chain amino acids and antioxidant properties in bran among wheat by-products [J]. *Fermentation*, 2022, 8(12): 732.
- [39] 王丹, 袁永俊, 谭青云, 等. 铁皮石斛发酵前后主要成分、活性和多糖分子量的变化[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(5): 22–26.
- WANG D, YUAN YJ, TAN QY, *et al.* Changes in main components, activity, and polysaccharide molecular weight of *Dendrobium officinale* before and after fermentation [J]. *Pack Food Mach*, 2019, 37(5): 22–26.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



王艳颖, 硕士, 讲师, 主要研究方向为发酵食品功能开发。
E-mail: 276514033@163.com



田春美, 硕士, 副教授, 主要研究方向为发酵食品加工理论研究与技术开发。
E-mail: tianchunmei050@126.com