

## 霍山石斛酵素发酵过程中抗氧化性能的变化

李江<sup>1</sup>, 顾逸菲<sup>1</sup>, 王珍珍<sup>1</sup>, 蒋增良<sup>2</sup>, 沙如意<sup>1\*</sup>, 毛建卫<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心

浙江科技学院生物与化学工程学院 杭州 310023

<sup>2</sup>西湖大学生命科学学院 杭州 310024

<sup>3</sup>浙江工业职业技术学院 浙江绍兴 312000)

**摘要** 以霍山石斛为原料,研究发酵过程中活性成分(总酚、总黄酮、总酸)及体外抗氧化性能(ABTS 自由基清除能力和羟基自由基清除能力)的变化规律。通过 Spearman 分析确定发酵过程中活性成分变化与体外抗氧化性能的相关性。以 WRL-68 人正常肝细胞构建氧化应激模型,探究发酵前、后样品处理细胞相关抗氧化酶活力的变化。结果表明:发酵前、后霍山石斛酵素总酚和总黄酮含量分别增加 35.5%( $P<0.05$ ) 和 49.1%( $P<0.05$ ),ABTS·和·OH 清除能力分别提高了 31.1%( $P<0.05$ ) 和 26.3%( $P<0.05$ )。前者与总酚( $P<0.05$ )、总酸( $P<0.05$ )含量呈正相关,后者与总酸( $P<0.05$ )、总黄酮( $P<0.05$ )含量呈正相关。使用双氧水构建 WRL-68 人正常肝细胞氧化应激模型,酵素组干预后胞内活性氧自由基(ROS)水平显著降低,且相关抗氧化酶系过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和超氧化物歧化酶(SOD)活力上升。结论:霍山石斛酵素发酵前、后活性成分和抗氧化能力显著提升,抗氧化能力的提升与发酵过程中酚酸类和黄酮类物质的增加呈显著正相关,发酵后比发酵前具有更强的 WRL-68 细胞氧化应激防护能力。

**关键词** 霍山石斛; 酵素; 抗氧化活性; 细胞模型

**文章编号** 1009-7848(2023)03-0080-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.009

霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)是一种草本植物,分类学上归于兰科石斛属,民间称“米斛”,主要产于安徽霍山地区<sup>[1]</sup>。研究表明,石斛属植物中主要成分为多糖,兼含有萜酮、联苳类、生物碱、倍半萜、香豆素等小分子有效成分<sup>[2-3]</sup>,具有改善肠胃、抗肿瘤、抗癌、抗氧化、降糖降脂、保肝等功效<sup>[4]</sup>。现阶段,霍山石斛的加工主要以打粉、制成枫斗等粗加工方式为主<sup>[5]</sup>,加工方式较为传统,科技含量低,造成霍山石斛的活性成分利用率较低,经济效益不高。急需开发新型的深加工产品,以丰富霍山石斛市场产品种类,提升附加值。

植物酵素是以一种或几种植物如谷类、豆类、新鲜水果和蔬菜以及可食用的传统药用植物为原料,经 1 种或多种有益菌,如酵母菌、乳酸菌发酵而成的带有某些功能的产品<sup>[6-7]</sup>。大量研究表明,不

同来源的原料经发酵后其活性成分及抗氧化性能都得到不同程度地提升<sup>[8-14]</sup>,其原因是发酵过程伴随着微生物的生长繁殖,在各种酶系的作用下使体系内产生丰富的次生代谢产物。根据酵素发酵方式可以分为人工接菌发酵和自然发酵,人工接菌发酵是人为添加纯种菌控制发酵过程,优势在于可以缩短发酵周期,抑制有害物生成<sup>[15]</sup>。自然发酵的菌种往往是各原料自身携带而来,主要来源于植物自身特有或其生存环境中,优点是可能产生特殊香味或有效成分,缺点是发酵周期长,发酵过程不易控制。植物生长过程中本体与其内生微生物存在共生互利的关系,有些甚至能产生与宿主相同或相似的化学成分。Chen 等<sup>[16]</sup>对不同生长年份霍山石斛茎和根的 16S rRNA 基因和内部转录间隔区的 nrDNA 片段进行高通量测序,结果显示:在根中检测到的原核和真菌生物比在茎中检测到的更丰富,且不同年份的生根中内生微生物的多样性存在显著性差异,表明霍山石斛具有丰富的内生微生物组。基于霍山石斛丰富的活性成分及良好的功效作用,探究其自身微生物作用下的自然发酵过程,具有重要研究意义。

目前尚未有关霍山石斛酵素产品的报道。本

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2017C02009)

第一作者: 李江,男,硕士生

通信作者: 沙如意 E-mail: kevinsha\_0204@163.com

毛建卫 E-mail: zjhzjmjw@163.com

研究以霍山石斛为原料,制备霍山石斛酵素,探究其自然发酵过程中活性成分(总酚、总黄酮、总酸)及抗氧化性能( $\cdot\text{OH}$ 清除能力、ABTS $\cdot$ 清除能力)的变化规律。以 WRL-68 人正常肝细胞构建氧化应激模型,以相关抗氧化酶活为指标,探究发酵前、后霍山石斛样品对胞内氧化应激防护的影响,以期为霍山石斛的综合开发利用提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂

五年生霍山石斛,安徽省霍山县石斛种植基地;WRL-68 人正常肝细胞,获赠于浙江大学医学院;0.25%EDTA、青霉素-链霉素、PBS、DMEM 高糖培养基、FBS,武汉普诺赛生命科技有限公司;其它化学试剂均为分析纯,国药化学试剂(上海)有限公司;总 SOD 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;MTT 及其它试剂盒,碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

电子天平 PTX-FA210,福州华志科学仪器有限公司 pH 计 PB-10,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;10L 发酵罐,浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室提供;T25 培养瓶,美国康宁公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 霍山石斛酵素的制备 使用无菌水冲洗石斛表面,风干后打浆,先用 1%的纤维素酶、果胶酶柠檬酸缓冲液(pH=6)将打浆后的石斛在 45℃酶解 5 h。按石斛:白砂糖:水质量比 1:1:6 加入灭菌冷却后的发酵罐中,密闭,室温发酵,发酵时间为 90 d。定期取样(0,3,6,9,12,15,22,29,36,43,50,90 d)。取样后在 10 000 r/min 条件下离心 20 min,保留上层清液,即不同发酵时间的霍山石斛样品,在-20℃条件下保存,备用。

1.3.2 霍山石斛酵素理化指标及活性成分测定 总酚含量测定参考范昊安等<sup>[17]</sup>方法,以没食子酸为标品,线形回归方程为  $y=0.0057x+0.0167$  ( $R^2=0.9994$ );总黄酮含量测定参考丁玉峰等<sup>[18]</sup>方法,以芦丁为标品,线形回归方程为  $y=0.0048x+0.0077$  ( $R^2=0.9997$ );总酸含量测定使用电位滴定仪,结

果以乳酸计;pH 值使用精密 pH 计测定。

1.3.3 霍山石斛酵素抗氧化能力测定  $\cdot\text{OH}$ 清除能力测定参照 Shi 等<sup>[19]</sup>的方法并略作修改。取不同发酵时间的酵素样品各 100  $\mu\text{L}$ ,加水稀释至 1 mL,加入 0.7 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液(6 mmol/L),再加入 0.3 mL 水杨酸钠(20 mmol/L)和 1 mL  $\text{FeSO}_4$ (1.5 mmol/L),涡旋混匀后 37℃反应 1 h。以去离子水为参比溶液,测定波长 510 nm 处的吸光度。

ABTS $\cdot$ 清除能力测定参照 Arnao 等<sup>[20]</sup>的方法并略作修改。在 ABTS 溶液(7 mmol/L)中加入过硫酸钾溶液,得到终浓度为 2.45 mmol/L ABTS 溶液,室温避光放置 12~16 h。使用前,用 PBS 缓冲液(5 mmol/L,pH=7.4)将 ABTS 溶液稀释,使其吸光度为  $0.70\pm 0.02$  (734 nm 处)。取 15  $\mu\text{L}$  酵素样品,用上述 PBS 溶液稀释至 300  $\mu\text{L}$ ,加入 5 mL 上述 ABTS 稀释液,30℃下反应 1 h,测定波长 734 nm 处的吸光度。

上述两种自由基清除率计算公式一致,即:

$$\text{自由基清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_0$ ——空白对照管的吸光度; $A_1$ ——样品测定管的吸光度; $A_2$ ——样品本底管的吸光度。

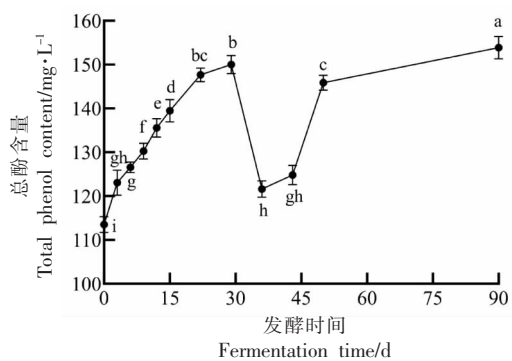
1.3.4 WRL-68 氧化应激模型 细胞培养、毒性检测及双氧水建模参考郑文豪等<sup>[21]</sup>方法。使用 ROS 检测试剂盒测定胞内活性氧水平,使用 BCA 检测试剂盒测定胞内蛋白质含量,使用 SOD、CAT、GSH 检测试剂盒测定相应酶活,各酶活基于单位蛋白质含量(mg pro)计算。

1.3.5 数据处理和分析 采用 Prism 9 软件绘制图表,SPSS 26.0 处理数据,杜肯检验多组间显著性分析。每组试验均重复 3 次,结果形式为平均值 $\pm$ 标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵过程中总酚含量的变化

多酚类物质能够降低正常细胞内氧化剂浓度,在对抗或减缓慢性和退行性疾病,如癌症、心血管和神经退行性疾病方面有积极作用,并具有阻止或逆转氧化应激相关疾病的潜在能力<sup>[22]</sup>。霍山石斛酵素发酵过程中总酚含量变化见图 1。总酚含量随发酵时间的延长总体呈上升态势。从发



注:图中标注不同字母表示杜肯检验下的显著性差异( $P<0.05$ )。

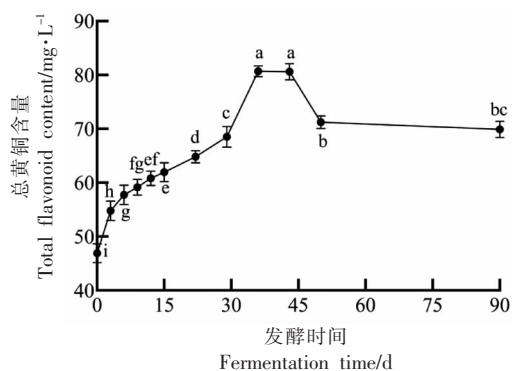
图1 发酵过程中总酚含量的变化

Fig.1 The changes of total phenolic content during fermentation

醇初 ( $113.53\pm 1.79$ ) mg/L 上升到发酵终点的 ( $153.85\pm 2.58$ ) mg/L,增加了 35.5% ( $P<0.05$ )。发酵前 30 d, 体系中碳源充足, 有助于微生物生长繁殖, 在复杂酶系作用下原料中的酚类物质持续溶出, 酚类物质含量呈稳定增长趋势; 发酵 30~36 d, 总酚含量下降, 一方面是由于多酚类物质有抑菌作用, 抑制微生物的生长<sup>[23]</sup>; 另一方面, 酚类物质与多糖、蛋白质等大分子物质通过疏水键和多元氢键结合, 使其含量降低<sup>[24]</sup>。此现象文献中时有报道。发酵 36 d 后, 总酚含量持续回升, 并在 90 d 时达到最大值 ( $153.85\pm 2.58$ ) mg/L, 可能是在微生物作用下与酚酸类物质代谢途径有关。

## 2.2 发酵过程中总黄酮含量的变化

黄酮类化合物于自然界的植物中广泛存在, 具有抗炎、抗菌、抗癌、抗氧化、保肝和降糖降脂等



注:图中标注不同字母表示杜肯检验下的显著性差异( $P<0.05$ )。

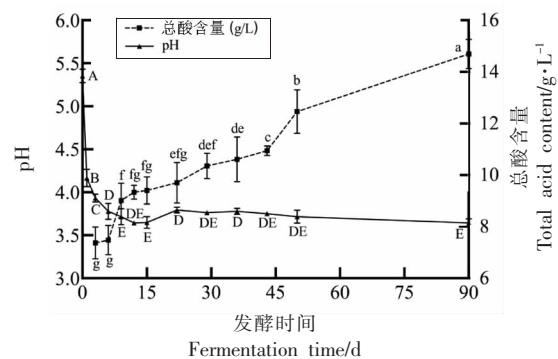
图2 发酵过程中总黄酮含量的变化

Fig.2 The changes of total flavonoid content during fermentation

活性<sup>[25]</sup>。Wu 等<sup>[26]</sup>和 Liang 等<sup>[27]</sup>分别从霍山石斛中分离得到 6 个和 22 个黄酮类成分, 说明霍山石斛具有丰富的黄酮类物质。霍山石斛发酵过程中总黄酮含量变化见图 2。总黄酮含量随发酵时间的延长总体呈上升趋势。发酵前、后含量从 ( $46.88\pm 1.77$ ) mg/L 升到 ( $69.90\pm 1.50$ ) mg/L, 增加 49.1% ( $P<0.05$ )。发酵前 30 d, 体系中总黄酮含量缓慢上升, 与此阶段微生物代谢所致黄酮类物质逐渐溶出有关。发酵 30~36 d, 总黄酮含量在短时间内有较大提高, 在发酵 36 d 达到最大值 ( $80.67\pm 1.0$ ) mg/L, 比发酵前增加 61.7% ( $P<0.05$ )。发酵第 43~50 天, 黄酮类物质在特定酶作用下被氧化分解, 导致总黄酮含量有所下降<sup>[17]</sup>。发酵 50~90 d 总黄酮类物质含量趋于稳定。

## 2.3 发酵过程中总酸含量与 pH 值的变化

pH 值和总酸是反映酵素整体发酵状况的理化指标<sup>[28]</sup>, 在某些原料中甚至作为发酵终点的判定依据, 从侧面反映微生物的代谢情况。发酵过程中霍山石斛酵素的总酸和 pH 值变化见图 3。霍山石斛酵素全发酵过程中总酸含量稳增加, pH 值在发酵前 3 d 快速下降, 此过程伴随着原料中有机酸的溶出和微生物代谢产酸。3 d 后 pH 值缓慢下降并逐渐稳定。经 90 d 的发酵, 发酵液中总酸含量从 ( $7.37\pm 0.61$ ) g/L 增至 ( $14.69\pm 0.57$ ) g/L, 增加 99.32% ( $P<0.05$ ); pH 值从发酵初期的  $5.35\pm 0.08$  降至  $3.64\pm 0.05$ 。发酵过程中总酸含量明显增加, 可能是在微生物的作用下生成某些不易转化的酸类物质累加的结果, 说明体系中产酸能力较强的



注:图中标注不同字母表示杜肯检验下的显著性差异 ( $P<0.05$ ), 不同组分用大小写区分。

图3 霍山石斛酵素发酵过程中总酸、pH 值的变化

Fig.3 The changes of total acid, pH value in the fermentation of *Dendrobium huoshanense*

微生物,如:乳酸菌、醋酸菌随着发酵的进行逐渐占据主导地位。

#### 2.4 发酵过程中·OH 清除能力的变化

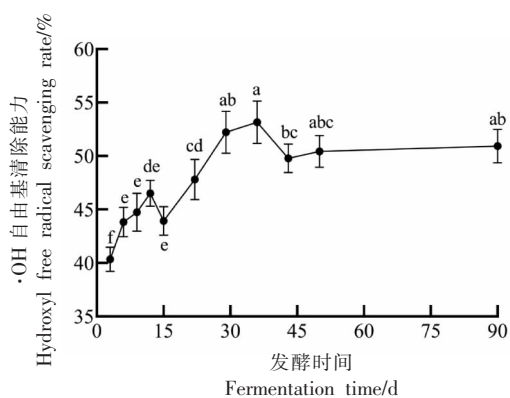
·OH 是活性氧自由基的一种,具有强氧化性,同时在活性氧自由基中毒性最强,能与细胞中多数物质发生反应,导致细胞损伤甚至死亡<sup>[29]</sup>,其清除率是体现酵素抗氧化能力的重要指标。由图 4 可知,霍山石斛酵素对·OH 的清除率随着发酵的进行逐渐升高,发酵第 36 天达到最大值为(53.16±1.97)%,之后变化趋于稳定。发酵第 90 天羟基清除能力为(50.92±1.58)%,相较发酵第 3 天清除率总体增长 26.3%( $P<0.05$ ),说明通过生物发酵可以显著提升霍山石斛·OH 清除能力。此结果在同类研究中常见报道,如舒旭晨等<sup>[30]</sup>以铁皮石斛为原料,以酵母菌和乳酸菌为混菌发酵剂,发酵 8 d 制备铁皮石斛酵素,·OH 清除率从 9.87% 提高至 34.79%。黄振勇等<sup>[31]</sup>在铁皮石斛汁中接种乳酸菌发酵 6 h,制备石斛饮品,其·OH 清除能力从 15% 提升至 35%。不同研究的差异可能与原料来源和各自发酵工艺有关。

#### 2.5 发酵过程中 ABTS·清除能力的变化

不同发酵时间的霍山石斛样品对 ABTS·清除能力的变化情况见图 5。ABTS·清除能力随着发酵时间的延长而上升,发酵第 90 天清除率达到最大值(62.63±0.90)%,与发酵第 3 天相比提升 31.08%( $P<0.05$ )。邹璐等<sup>[32]</sup>和宫晓玥<sup>[33]</sup>以铁皮石斛为原料制备酵素,同等浓度下其 ABTS·清除率分别为 40% 和 60%,与本文结果类似。蒋增良等<sup>[12]</sup>对葡萄酵素的研究发现,ABTS·清除能力与总酚含量具有显著的相关性。Yang 等<sup>[34]</sup>研究发现黑鲨鱼皮蛋白水解物抗氧化肽中存在的酚基与 ABTS·中的 N 键结合形成衍生物,随后降解为紫色化合物,说明多酚类物质对 ABTS·清除能力有贡献。对比本文图 1 和图 5 可以发现总酚含量和 ABTS·清除率变化趋势相近,其相关性下文分析。

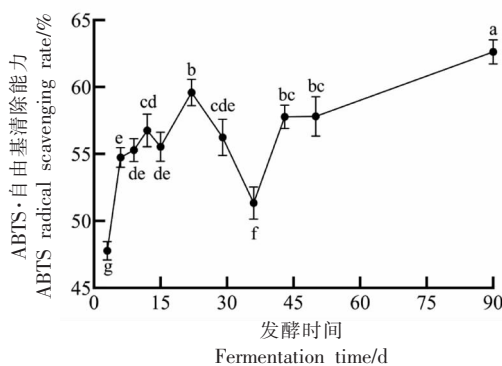
#### 2.6 相关性分析

2.4 节和 2.5 节表明霍山石斛酵素具有较强的抗氧化活性。使用 spearman 相关系数分析霍山石斛酵素发酵过程中总酚、总酸、总黄酮含量和 pH 值的变化与抗氧化性能(ABTS·清除能力和·OH 清除能力)变化之间的相关性,找出对抗



注:图中标注不同字母表示杜肯检验下的显著性差异( $P<0.05$ )。

图 4 霍山石斛酵素发酵过程中·OH 清除能力的变化  
Fig.4 The changes of hydroxyl free radical scavenging ability during the *Dendrobium huoshanense* fermentation



注:图中标注不同字母表示杜肯检验下的显著性差异( $P<0.05$ )。

图 5 霍山石斛发酵过程中 ABTS·清除能力的变化  
Fig.5 Changes of ABTS free radical scavenging ability during the *Dendrobium huoshanense* fermentation

氧化活性影响较大的组分。如图 6 所示,霍山石斛在发酵过程中,ABTS·清除能力与总酚( $P<0.05$ )和总酸( $P<0.05$ )含量呈显著正相关;·OH 清除能力与总黄酮( $P<0.05$ )和总酸( $P<0.05$ )含量呈显著正相关,这与黄琴等<sup>[35]</sup>对铁皮石斛的研究结果一致,表明霍山石斛酵素抗氧化活性的提升与酚酸类和黄酮类物质含量增加有关,其内在机制有待研究。

#### 2.7 氧化应激模型的建立及其保护作用

上述研究表明,霍山石斛发酵前、后体外抗氧化活性显著提升,不足之处是:使用化学法测得的抗氧化数据存在局限性。本文以 DHJ (*Dendrobium huoshanense* Jiaosu)代表霍山石斛酵素,选取发酵前、后两组样品,分别以 DHJ0 和 DHJ90 表示

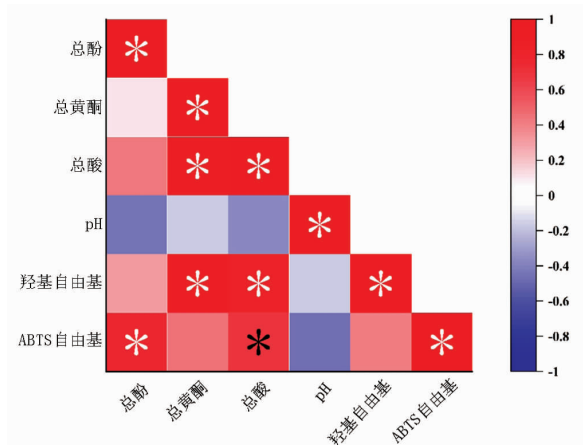


图6 发酵过程中各理化指标与抗氧化活性的相关性分析热图

Fig.6 Heatmap from correlation analysis between physicochemical parameters and antioxidant activity during fermentation

发酵 0 d 和 90 d 的样品, 通过 WRL-68 人正常肝细胞建立氧化应激模型, 探究酵素样品对细胞氧化应激的防护作用。

2.7.1 氧化应激模型的建立和细胞毒性试验 使用 0.6~1.3 mmol/L 双氧水处理 WRL-68 细胞 8 h, 建立氧化应激模型, 结果如图 7 所示。随着双氧水浓度的增加, WRL-68 细胞存活率逐渐下降, 二者呈良好的浓度依赖性。当双氧水浓度为 1.1 mmol/L 时, WRL-68 细胞存活率为  $(49.74 \pm 1.95)\%$ , 接近半数抑制浓度, 选择此浓度作为建立氧化应激模

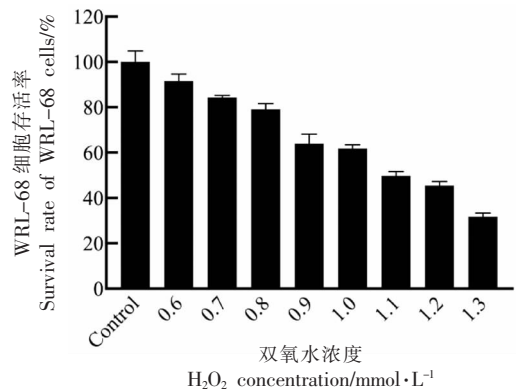


图7 不同 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度对 WRL-68 细胞存活率的影响

Fig.7 Effects of different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations on the survival rate of WRL-68 cells

型的造模浓度。

为排除样品浓度过高对 WRL-68 细胞存活率造成影响, 先进行毒性试验确定最佳干预浓度。VC 是一种强大的抗氧化剂, 以其为阳性对照。不同浓度发酵前、后霍山石斛酵素样品和 VC 对细胞存活率的影响见表 1。与空白对照组 (control) 相比, 两组样品均在稀释 160 倍后对 WRL-68 细胞无显著影响 ( $P < 0.05$ ), VC 质量浓度为 0.1 mg/L 和 0.2 mg/L 时对 WRL-68 细胞无显著影响 ( $P < 0.05$ ), 说明 3 种物质在上述浓度下不会引起 WRL-68 细胞损伤。综合考虑, 选择 0.1 mg/L VC 和稀释 160 倍的 DHJ0 和 DHJ90 干预 WRL-68 细胞, 测定氧化应激相关酶系的保护作用。

表 1 不同浓度样品和 VC 对 WRL-68 细胞存活率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of samples and VC on the survival rate of WRL-68 cells

| DHJ <sub>0</sub> 组 | 存活率/%                      | DHJ <sub>90</sub> 组 | 存活率/%                      | VC 组/mg·L <sup>-1</sup> | 存活率/%                       |
|--------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 对照                 | 100 ± 1.82 <sup>a</sup>    | 对照                  | 100.18 ± 1.82 <sup>a</sup> | 对照                      | 100.18 ± 4.38 <sup>a</sup>  |
| 20                 | 88.43 ± 2.13 <sup>c</sup>  | 20                  | 90.36 ± 0.89 <sup>d</sup>  | 0.1                     | 98.62 ± 2.69 <sup>ab</sup>  |
| 40                 | 88.66 ± 1.88 <sup>c</sup>  | 40                  | 95.07 ± 0.93 <sup>c</sup>  | 0.2                     | 96.93 ± 2.99 <sup>abc</sup> |
| 80                 | 91.79 ± 1.82 <sup>bc</sup> | 80                  | 96.81 ± 0.54 <sup>bc</sup> | 0.3                     | 94.34 ± 3.42 <sup>bc</sup>  |
| 160                | 95.7 ± 1.91 <sup>ab</sup>  | 160                 | 98.91 ± 2.18 <sup>ab</sup> | 0.4                     | 93.63 ± 3.07 <sup>c</sup>   |

注: 表中肩标不同字母表示差异显著性 ( $P < 0.05$ ), 20, 40, 80, 160 表示稀释倍数。

2.7.2 DHJ 对 WRL-68 细胞氧化应激后胞内 ROS 水平和相关抗氧化酶系的影响 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种强氧化剂, 常用于构建细胞氧化应激模型, 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后使线粒体内的 ROS 含量上升, ROS 是一组不稳定分子, 包括过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟自由

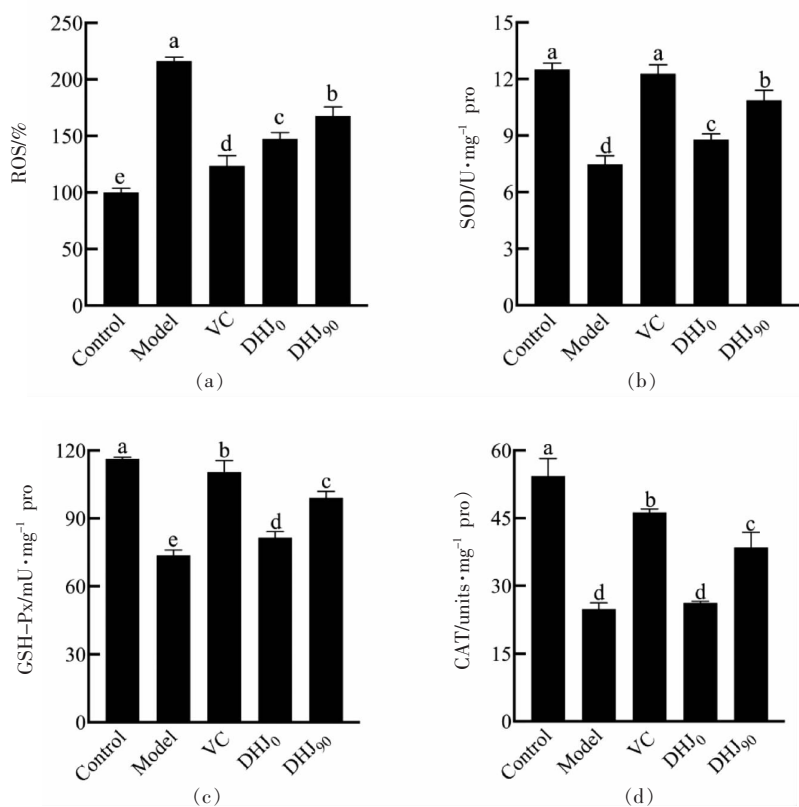
基 ( $\cdot\text{OH}$ )、单线态氧 ( $^1\text{O}_2$ ) 和超氧化物如超氧阴离子 ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), 如果不能有效清除, 会对细胞造成损伤甚至诱发凋亡<sup>[36]</sup>。而 SOD、GSH-Px、CAT 是生物体自带的抗氧化剂, SOD 可以催化超氧阴离子自由基生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub>, CAT 可将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为 O<sub>2</sub> 和

H<sub>2</sub>O, GSH 可将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解为 H<sub>2</sub>O 或将 ROOH 还原成 ROH 后变为氧化性谷胱甘肽 GSSH, 其又在 GSH-Px 的作用下还原成 GSH, 继续参与清除自由基<sup>[37]</sup>。3 种抗氧化酶在互相协同、代偿、保护作用下共同抑制 ROS 的生成<sup>[38]</sup>。

图 8a 显示不同处理组对细胞内 ROS 水平的影响。经 1.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的模型组 (Model) 细胞内 ROS 水平显著上升, 比空白对照组 (Control) 胞内 ROS 水平提高了 116.27%, 说明细胞氧化应激效果显著, 模型构建优良。VC 组胞内 ROS 水平显著下降, 结合图 8b~8d, 说明 VC 通过保护 3 种胞内抗氧化酶有效抑制 ROS 的生成。DHJ0 和 DHJ90 处理组胞内 ROS 水平处于模型组和 VC 组间, 说明二者均具有一定的细胞抗氧化能力, 而弱于 0.1 mg/L VC, 且 DHJ0 效果略优于 DHJ90。基于前文研究结果, 推测可能是 DHJ90 中累积的酸类物质在保护细胞的同时, 也会对细胞

产生一定的刺激。

图 8b~8d 显示不同处理组对细胞内 SOD、GSH-Px、CAT 酶活力的影响。模型组 3 种抗氧化酶的酶活均显著下降, 相比空白对照组分别下降 40.41%, 36.58%, 54.21% (SOD、GSH-Px、CAT, 下同), 进一步验证了模型的有效性。VC 处理组胞内 3 种抗氧化酶酶活相比模型组分别提高了 64.17% ( $P < 0.05$ ), 49.89% ( $P < 0.05$ ), 86.05% ( $P < 0.05$ ), 说明 VC 对 3 种抗氧化酶均有较强的保护作用, 其中 VC 组的 SOD 酶活力与空白对照组无显著差异, 说明 VC 对 SOD 酶保护效果最好。DHJ0 和 DHJ90 组的 3 种抗氧化酶活均介于 Model 组和 VC 组之间, 其中 DHJ0 比模型组分别提高了 17.67% ( $P < 0.05$ ), 10.46% ( $P < 0.05$ ), 5.47% ( $P > 0.05$ ), 说明 DHJ0 对 SOD 和 GSH-Px 酶具有一定的保护作用, 而对 CAT 酶保护作用不显著。DHJ90 比模型组分别提高了 45.45% ( $P < 0.05$ ),



注: Control、Model、VC、DHJ<sub>0</sub>、DHJ<sub>90</sub> 分别表示空白对照组、模型对照组、VC 阳性对照组、霍山石斛发酵第 0 天样品组、霍山石斛发酵第 90 天样品组。

图 8 霍山石斛发酵前、后对 WRL-68 细胞氧化应激后胞内 ROS 水平及相关抗氧化酶系的影响

Fig.8 Effects of DHJ before and after fermentation on intracellular ROS level and related antioxidant enzymes in WRL-68 cells after oxidative stress

34.38% ( $P < 0.05$ ), 54.90% ( $P < 0.05$ ), 说明霍山石斛经 90 d 发酵后具有更强的细胞抗氧化能力, 验证了上述体外抗氧化结果。研究表明, 多酚类物质可以通过调节细胞外激酶途径上调抗氧化酶活性, 从而防止氧化应激引起的细胞损伤<sup>[39]</sup>。DHJ90 比 DHJ0 抗氧化酶系活力强, 可能与霍山石斛发酵过程中溶出或转化的某些功能性小分子物质, 特别是黄酮类和多酚类物质有关。

### 3 结论

通过测定总酚、总黄酮、总酸、pH 等理化特性, 探究霍山石斛酵素发酵过程中活性成分的变化规律, 同时测定·OH 清除率、ABTS·清除率, 评价霍山石斛酵素的抗氧化能力。使用 Spearman 分析发酵过程中活性成分变化与抗氧化性能的相关性, 通过 WRL-68 氧化应激模型探究霍山石斛酵素发酵前、后样品对相关抗氧化酶系的影响。结果表明, 以霍山石斛为原料自然发酵 90 d 的酵素产品具有良好的抗氧化性能。发酵过程中总酚、总黄酮、总酸、·OH 清除能力、ABTS·清除能力总体呈增加趋势, pH 值先下降后趋于稳定。相关性分析表明霍山石斛酵素的抗氧化性能 (·OH 清除能力和 ABTS·清除能力) 与总酸、总酚和总黄酮含量呈显著正相关。在 WRL-68 细胞氧化应激模型中, 经酵素干预后的细胞再用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 8 h, 胞内 ROS 水平显著下降, 相关抗氧化酶系 SOD、GSH-Px、CAT 酶活显著提高, 且发酵后显著优于发酵前, 说明通过生物发酵制备酵素提高了抗氧化能力, 是实现霍山石斛高值化利用的一种有效加工方式。本研究为霍山石斛的功能化开发利用提供了新思路。

### 参 考 文 献

- [1] 包雪声. 中国药用石斛图志[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005: 1-10.  
BAO X C. Medicinal dendrobium in China [M]. Shanghai: Fudan University Press, Shanghai Medical University Press, 2001: 1-10.
- [2] WANG Y H. Traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities, and toxicological effects of *Dendrobium* leaves: A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 270: 113851.
- [3] 张光浓, 毕志明, 王峥涛, 等. 石斛属植物化学成分研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(6): 102-105.  
ZHANG G N, BI Z J, WANG Z T, et al. Advances in studies on chemical constituents from plants of *Dendrobium* Sw.[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34(6): 102-105.
- [4] 宋广青, 刘新民, 王琼, 等. 石斛药理作用研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2576-2581.  
SONG G Q, LIU X M, WANG Q, et al. Research progress on pharmacological activities of medical plants from *Daendrobium* Sw.[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(17): 2576-2581.
- [5] 程良燕. 霍山石斛产业化发展现状与对策[J]. 农民致富之友, 2018, (22): 12.  
CHENG L Y. Development status and countermeasures of *Dendrobium huoshanense* industrialization[J]. Nong Min Zhi Fu Zhi You, 2018, (22): 12.
- [6] DAI J, SHA R, WANG Z, et al. Edible plant Jiaosu: manufacturing, bioactive compounds, potential health benefits, and safety aspects[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(15): 5313-5323.
- [7] 毛建卫, 吴元锋, 方晟. 微生物酵素研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2010, 39(3): 42-44.  
MAO J W, WU Y F, FANG S. Research progress of microbial enzymes [J]. Bulletin of Fermentation science and technology, 2010, 39 (3): 42-44.
- [8] JIANG K, ZHAO Y, LIANG C, et al. Composition and antioxidant analysis of jiaosu made from three common fruits: watermelon, cantaloupe and orange [J]. CyTA - Journal of Food, 2021, 19(1): 146-151.
- [9] HU N, LEI M, ZHAO X, et al. Analysis of the microbial diversity and characteristics of fermented blueberry beverages from different regions[J]. Foods, 2020, 9(11): 1656.
- [10] ZHU Y, JIANG J, YUE Y, et al. Influence of mixed probiotics on the the bioactive composition, antioxidant activity and appearance of fermented red bayberry pomace[J]. Lwt-Food Science and Technology, Amsterdam: Elsevier, 2020, 133(12): 110076.
- [11] PARK S Y, JANG H L, LEE J H, et al. Changes in the phenolic compounds and antioxidant activities of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts during different fermentation periods[J]. Food Science

- and Biotechnology, Seoul: Korean Society Food Science & Technology-Kosfost, 2017, 26(1): 105-112.
- [12] 蒋增良, 毛建卫, 黄俊, 等. 葡萄酵素在天然发酵过程中体外抗氧化性能的变化[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10): 29-34.
- JIANG Z J, MAO J W, HUANG J, et al. Changes of antioxidant properties of grape enzymes *in vitro* during natural fermentation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(10): 29-34.]
- [13] 蒋增良, 毛建卫, 黄俊, 等. 蓝莓酵素在天然发酵过程中抗氧化性能的变化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 194-197, 201.
- JIANG Z L, MA J W, HUANG J, et al. Changes in antioxidant activity of blueberry-ferment during natural fermentation process[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(2): 194-197, 201.
- [14] 程勇杰, 陈小伟, 张沙沙, 等. 柘树植物酵素中氨基酸分析及抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 1-7, 12.
- CHENG Y J, CHEN X W, ZHANG S S, et al. Analysis of amino acids and *in vitro* antioxidant activity of *Cudrania tricuspidata* Jiaosu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(6): 1-7, 12.
- [15] 张卿, 程文健, 陈丽娇. 自然发酵与人工接种发酵比较研究及展望[J]. 科技创新与应用, 2020, (5): 46-47.
- ZHANG Q, CHENG W J, CHEN L J. Comparative study and prospect of natural fermentation and artificial inoculation fermentation[J]. Technology Innovation and Application, 2020, (5): 46-47.
- [16] CHEN S, DAI J, SONG X, et al. Endophytic microbiota comparison of *Dendrobium huoshanense* root and stem in different growth years[J]. *Planta Medica*, 2020, 86(13/14): 967-975.
- [17] 范昊安, 沙如意, 方晟, 等. 苹果梨酵素发酵过程中的褐变与抗氧化活性[J]. 食品科学, 2020, 41(14): 116-123.
- FAN H A, SHA R Y, FANG S, et al. Browning and antioxidant activity of apple-pear Jiaosu during fermentation[J]. Food Science, 2020, 41(14): 116-123.
- [18] 丁玉峰, 马艳莉, 李素萍, 等. 体外模拟消化对葡萄酵素多酚生物利用度及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2021, 43(2): 1-14.
- DING Y F, MA Y L, LI S P, et al. Effect of *in vitro* simulated digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity of grape Jiaosu[J]. Food Science, 2021, 43(2): 1-14.
- [19] SHI M J, WEI X, XU J, et al. Carboxymethylated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*: Preparation and *in vitro* antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2017, 215: 76-83.
- [20] ARNAO M B, CANO A, ACOSTA M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2001, 73(2): 239-244.
- [21] 郑文豪, 王珍珍, 李江, 等. 扁桃斑鸠菊叶酵素发酵过程中理化性质分析、抗氧化能力评价及对氧化应激细胞防护作用研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 1-13.
- ZHENG W H, WANG Z Z, LI J, et al. Physico-chemical Indexes, antioxidant activity and inhibitory effect on intracellular oxidative damage of *Vernonia amygdalina* Delile leaf Jiaosu during fermentation[J]. Science and Technology of food Industry, 2021, 42(18), 1-13.
- [22] PICCOLELLA S, CRESCENTE G, CANDELA L, et al. Nutraceutical polyphenols: New analytical challenges and opportunities[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 175: 112774.
- [23] 陈小伟, 范昊安, 张婷, 等. 咖啡果皮酵素发酵过程中代谢产物与抗氧化功能评价[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(9): 18-25, 50.
- CHEN X W, FAN H A, ZHANG T, et al. Study on the evaluations of metabolites and antioxidant activity during the fermentation process of coffee peel Jiaosu[J]. Food Research and Development, 2019, 40(9): 18-25, 50.
- [24] 周偏, 蔡坤, 梁丛颖, 等. 诺丽酵素在自然发酵过程中体外抗氧化活性变化及品质研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(1): 92-96.
- ZHOU P, CAI K, LIANG C Y, et al. Changes of *in vitro* antioxidant activity of *Morinda citrifolia* ferment during natural fermentation process and quality analysis[J]. China Brewing, 2018, 37(1): 92-96.
- [25] XIAO J B, CAPANOGLU E, JASSBI A R, et al. Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2015, S29. DOI:10.1080/10408398.2015.1067595.



- [26] WU C, GUI S, HUANG Y, et al. Characteristic fingerprint analysis of *Dendrobium huoshanense* by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Analytical Methods, 2016, 8(18): 3802-3808.
- [27] LIANG Z Y, ZHANG J Y, HUANG Y C, et al. Identification of flavonoids in *Dendrobium huoshanense* and comparison with those in allied species of *Dendrobium* by TLC, HPLC and HPLC coupled with electrospray ionization multi-stage tandem MS analyses[J]. Journal of Separation Science, 2019, 42(51): 1088-1104.
- [28] 张浩然, 范昊安, 顾逸菲, 等. 沙棘酵素发酵过程中代谢产物及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(11): 125-133.
- ZANG H R, FAN H A, GU Y F, et al. Study on metabolites and antioxidant activity of seabuckthorn Jiaosu during fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(11): 125-133.
- [29] KOMAKI Y, SIMPSON A M A, CHOE J K, et al. Serum electrolytes can promote hydroxyl radical-initiated biomolecular damage from inflammation [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 141: 475-482.
- [30] 舒旭晨, 杜万根, 姜东, 等. 混菌发酵石斛酵素及其抗氧化活性研究[J]. 徐州工程学院学报(自然科学版), 2019, 34(2): 63-70.
- SHU X C, DU W G, JIANG D, et al. Study on mixed fermentation of *Dendrobium* enzyme and its antioxidant activity[J]. Journal of Xuzhou Institute of Engineering (Natural Science Edition), 2019, 34(2): 63-70.
- [31] 黄振勇, 张娥珍, 淡明, 等. 乳酸菌发酵对铁皮石斛活性物质含量及其抗氧化能力的影响[J]. 热带作物学报, 2020, 41(3): 572-578.
- HUANG Z Y, ZHANG E Z, DAN M, et al. Effects of *Lactobacillus* fermentation on active substance and anti-oxidant activity of *Dendrobium candidum* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(3): 572-578.
- [32] 邹璐, 孙悦, 林冰, 等. 铁皮石斛酵素的制备及活性测定[J]. 食品科技, 2018, 43(10): 129-134.
- ZOU L, SUN Y, LIN B, et al. Preparation and preliminary bioactivity determination of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo enzyme[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(10): 129-134.
- [33] 宫晓玥. 铁皮石斛植物乳杆菌发酵及其发酵物活性研究[D]. 海口: 海南大学, 2020.
- GONG X Y. Study on fermentation of *Dendrobium candidum* by *Lactobacillus plantarum* and its fermentation activity [D]. Haikou: Hainan University, 2020.
- [34] YANG Q, CAI X, YAN A, et al. A specific antioxidant peptide: Its properties in controlling oxidation and possible action mechanism[J]. Food Chemistry, 2020, 327: 126984.
- [35] 黄琴, 沈杨霞, 张成静, 等. 铁皮石斛多酚和黄酮含量及与抗氧化活性的相关性[J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(3): 438-442.
- HUANG Q, SHEN Y X, ZHANG C J, et al. Correlation of the antioxidant property with the total phenolic content and total flavonoids of different *Dendrobium officinale* extracts[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2014, 20(3): 438-442.
- [36] YANG S, LIAN G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2020, 467(1/2): 1-12.
- [37] KHAMMANIT R, LOMARAT P, ANANTACHOEN, et al. Inhibition of oxidative stress through the induction of antioxidant enzymes of pigmented rice bran in HEK-293 cells[J]. Natural Product Communications, 2017, 12(7): 1107-1110.
- [38] 唐功. 活性氧·抗氧化酶及抗氧化剂之间关系的探讨[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33): 18619-18621.
- TANG G. The discuss on the relationship among reactive oxygen species, antioxidant enzymes and antioxidants[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2010, 38(33): 18619-18621.
- [39] RODRÍGUEZ-RAMIRO I, MARTÍN M Á, RAMOS S, et al. Comparative effects of dietary flavanols on antioxidant defences and their response to oxidant-induced stress on Caco2 cells[J]. European Journal of Nutrition, 2011, 50(5): 313-322.

## The Changes of Antioxidant Activity of *Dendrobium huoshanense* Jiaosu

Li Jiang<sup>1</sup>, Gu Yifei<sup>1</sup>, Wang Zhenzhen<sup>1</sup>, Jiang Zengliang<sup>2</sup>, Sha Ruyi<sup>\*</sup>, Mao Jianwei<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Zhejiang Provincial Key Lab for Chem & Bio Processing Technology of Farm Product, Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023

<sup>2</sup>School of Life Science, Westlake University, Hangzhou 310024

<sup>3</sup>Zhejiang Industry Polytechnic College, Shaoxing 312000, Zhejiang)

**Abstract** In this paper, *Dendrobium huoshanense* was used as raw material to study the changes of active components (total phenols, total flavonoids, and total acids) and *in vitro* antioxidant properties (ABTS radical scavenging capacity and hydroxyl radical scavenging capacity) during fermentation. The correlation between the changes of active components and *in vitro* antioxidant properties was determined by Spearman analysis. The oxidative stress model was constructed with WRL-68 human normal hepatocytes to explore the changes of cell-related antioxidant enzyme activities before and after fermentation. The results showed that the contents of total phenols and flavonoids of *Dendrobium huoshanense* enzyme increased by 35.5% ( $P < 0.05$ ) and 49.1% ( $P < 0.05$ ), and the scavenging capacity of ABTS· and ·OH increased by 31.1% and 26.3%, respectively. The former was positively correlated with the contents of total phenols ( $P < 0.01$ ) and total acids ( $P < 0.05$ ), while the latter was positively correlated with the contents of total acids ( $P < 0.01$ ) and total flavonoids ( $P < 0.01$ ). The oxidative stress model of WRL-68 cells was constructed with hydrogen peroxide. In the enzyme group, the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) decreased significantly, and the activities of related antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), and superoxide dismutase (SOD) increased. Conclusion: the active components and antioxidant capacity of *Dendrobium huoshanense* before and after fermentation were significantly improved, and the improvement of antioxidant capacity was significantly positively correlated with the increase of phenolic acids and flavonoids during fermentation. After fermentation, WRL-68 cells had a stronger protective ability against oxidative stress than before fermentation.

**Keywords** *Dendrobium huoshanense*; Jiaosu; antioxidant activity; cell model