

微生物发酵前后铁皮石斛活性成分的变化

辛文燕, 何劲*, 汪艳群, 谭川川, 魏雨萌

(贵阳学院食品科学与工程学院, 贵州省果品加工工程技术研究中心, 贵州贵阳 550005)

摘要: 铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 是一种药食同源植物, 列“中华九大仙草”之首。为探究铁皮石斛在微生物转化过程中活性成分的变化。筛选出以铁皮石斛为发酵基质最适宜发酵的菌种, 在单因素试验基础上, 以多糖、黄酮和总酚物质含量的综合评分变化情况作为评价指标, 采用正交试验优化得到最佳发酵工艺, 并测定发酵前后铁皮石斛抗氧化能力。以铁皮石斛为发酵基质, 最适菌种为黑曲霉, 利用黑曲霉发酵得到最佳发酵工艺为料液比 1:3, 初始 pH 值 8, 接种量 10%, 发酵温度 34 °C, 发酵时间 9 d, 验证试验得多糖含量为 72.65 mg/g, 黄酮含量为 6.67 mg/g, 多酚含量为 11.32 mg/g, 综合评分 P_i 为 0.945 5。以 Vc 为对照, 发酵后的铁皮石斛 DPPH 自由基清除能力 IC_{50} 为 0.67 mg/mL, ABTS⁺ 自由基清除能力 IC_{50} 为 0.41 mg/mL, 还原能力 IC_{50} 为 16.50 mg/mL。筛选得到的菌株能够提高活性成分含量, 优化发酵工艺, 增加铁皮石斛抗氧化能力, 达到了经济、安全、高效的目的, 极大地提高了铁皮石斛的应用价值。

关键词: 铁皮石斛; 黑曲霉; 活性成分; 正交试验; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2025)04-185-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.0190

Changes in Active Ingredients of *Dendrobium officinale* before and after Microbial Fermentation

XIN Wenyan, HE Jin*, WANG Yanqun, TAN Chuanchuan, WEI Yumeng

(School of Food Science and Engineering, Guiyang University, Fruit Processing Engineering Technology Research Center, Guiyang 550005, China)

Abstract: *Dendrobium officinale* is a medicinal and food homologous plant, ranking first among the "Nine magic herbs of China". To investigate the changes in active ingredients of *Dendrobium officinale* during microbial transformation, the most suitable strain for fermentation using *Dendrobium officinale* as the fermentation substrate was screened out. Based on single factor experiments, the changes in comprehensive score of the polysaccharide, flavones and total phenolics were used as evaluation indicators, the optimal fermentation process was obtained by orthogonal experiments, and the antioxidant capacities of *Dendrobium officinale* before and after fermentation were measured. Using *Dendrobium officinale* as the fermentation substrate, the most suitable strain was *Aspergillus niger*. The optimal fermentation process was as follows: ratio of material to liquid, 1:3; initial pH, 8; inoculation amount, 10%; fermentation temperature, 34 °C; fermentation time, 9 days. The validation test results showed that the polysaccharide content was 72.65 mg/g, the flavonoid content was 6.67 mg/g,

引文格式:

辛文燕,何劲,汪艳群,等.微生物发酵前后铁皮石斛活性成分的变化[J].现代食品科技,2025,41(4):185-195.

XIN Wenyan, HE Jin, WANG Yanqun, et al. Changes in active ingredients of *Dendrobium officinale* before and after microbial fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 185-195.

收稿日期: 2024-02-16

基金项目: 贵州省研究生科研基金立项 (黔教合 YJSKYJJ[2021]195)

作者简介: 辛文燕 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程, E-mail: 1819197300@qq.com

通讯作者: 何劲 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物应用及食品加工, E-mail: jhe633@163.com

the polyphenol content was 11.32 mg/g, and the comprehensive score P_i was 0.945 5. Taking Vitamin C as the control, the IC_{50} of DPPH free radical scavenging ability of fermented *Dendrobium officinale* was 0.67 mg/g, IC_{50} of ABTS free radical scavenging ability was 0.41 mg/g, and IC_{50} of reducing ability was 16.50 mg/g. The screened strains could increase the content of active substances in *Dendrobium officinale*, optimize the fermentation process, increase the antioxidant capacity of *Dendrobium officinale*, which allowed achieving the goal of economy, safety, and efficiency, thereby improving greatly the application value of *Dendrobium officinale*.

Key words: *Dendrobium candidum*; *aspergillus niger*; active ingredient; orthogonal experiment; antioxidant

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 是我国名贵中药材, 为“中华九大仙草”之首, 并于 2020 年 1 月 2 日被国家卫健委、国家市场监督管理总局将列入药食同源目录^[1]。作为被《中国植物红皮书》记载为濒危植物的兰科石斛属铁皮石斛, 它不仅生长周期长, 而且难以自然繁殖, 通常生长于高海拔的山地岩石上, 适宜空气畅通、环境湿润凉爽的条件, 主要分布在中国贵州、广西、云南等地。铁皮石斛味道甘甜, 属性偏寒, 具有滋养阴津、抑制肿瘤、增强免疫、降血糖、抗疲劳、抗氧化等功效^[2-6], 主要表现在促进腺体分泌和脏器运动, 并且能够降低链脲霉素诱导引发的糖尿血糖值, 促进巨噬细胞的吞噬功能等。目前, 贵州大力推进石斛种植产业的发展^[7-9], 截止 2019 年, 贵州石斛种植面积 9 899.67 hm², 鲜条产量约 6 400 t, 产值 36 亿元。

铁皮石斛作为贵州重点发展的特色产业, 具有众多功效和广阔的发展市场, 除了使用各种物理机械方法提高铁皮石斛的储存期限, 并制作成一系列的石斛干条、枫斗及超微粉等, 还可以利用微生物发酵去提高石斛中各类营养成分含量, 解决石斛产品内容物的单一性, 同时提高产品的创新性和丰富度, 实现高质量高水平发展。目前, 微生物发酵铁皮石斛方面的研究仅限于铁皮石斛的多糖和石斛碱, 而对于其他活性成分如黄酮、多酚的研究尚浅, 有待于进一步研究。在微生物菌种的利用种类方面也有限, 主要是一些乳酸菌、酵母菌及芽孢菌。因此, 利用微生物对铁皮石斛进行发酵研究, 选取最适菌种, 优化发酵工艺, 并对发酵前后的抗氧化活性进行检测, 为开发铁皮石斛在抗氧化功效上的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

原料: 铁皮石斛, 原产地贵州赤水。

菌种: 米根霉 (*Rhizopus oryzae*, 3010), 中

国工业微生物菌种保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection, CICC); 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 中国工业微生物菌种保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection, CICC); 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 从纳豆发酵剂中分离筛选; 植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 从纳豆发酵剂中分离筛选。

试剂: PDA 培养基、MRS 培养基、LB 培养基, 杭州百思生物技术有限公司; 福林酚, 上海源叶生物科技有限公司; 无水碳酸钠, 天津致远化学试剂有限公司; 葡萄糖, 天津风船化学试剂科技有限公司; 没食子酸, 上海麦克林生物科技有限公司; 苯酚, 天津永大化学试剂有限公司; 硫酸、盐酸, 成都科隆化学品有限公司; 芦丁、硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钾、氢氧化钠等其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LDZM-60L 立式高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; CS-2000 高速多功能粉碎机, 永康天祺盛世工贸有限公司; DH5000B II 电热恒温培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; SHB- III 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; N-1300 旋转蒸发器, 上海爱朗仪器有限公司; 202-1AB 电热恒温干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; VM-5S 快速卤素水分测定仪, 江苏维科美拓仪器仪表有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 主要活性物质的测定

多糖的测定参考《GB/T 40632-2021 竹叶中多糖的测定》, 黄酮的测定参考《SN/T 4592-2016 进出口食品中总黄酮的测定》, 总酚的测定参考《T/NAIA 097-2021 枸杞中总酚的测定》。铁皮石斛多糖、黄酮、总酚采用水提醇沉法进行提取^[10-12]。

表 1 标准曲线绘制表

Table 1 Standard curve drawing table

标准品	质量浓度范围/(mg/mL)	吸光度/nm	标准曲线	R ²
葡萄糖	0~0.14	490	Y=5.922 2x+0.009 5	0.999 1
芦丁	0~0.20	500	Y=0.945 9x-0.003 5	0.998 2
没食子酸	0~0.20	760	Y=6.322 7x-0.002 2	0.999 2
DPPH 自由基	0~80	517	Y=0.014 9x-0.029 8	0.998 3
没食子酸	0~0.10	700	Y=6.478 5x+0.008 2	0.999 2

1.3.2 标准曲线的绘制

1.3.3 样品预处理

将新鲜的铁皮石斛茎条洗净后，切段烘干，破碎备用。

1.3.4 最适菌种的筛选

称取 10.0 g 铁皮石斛粉于 400 mL 发酵瓶中，按 1:4 的料液比添加蒸馏水，浸泡 2 h 后，121 °C 灭菌 10 min，接入米根霉、黑曲霉、枯草芽孢杆菌、植物乳杆菌各液体菌种 2 mL， 4.5×10^7 CFU/mL，28 °C 培养 3 d，121 °C 灭菌 10 min 结束发酵。测定多糖、黄酮和总酚含量，以三指标进行综合考察。

1.3.5 单因素试验

1.3.5.1 料液比

设定不同料液比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7，确定总量为每个发酵瓶 10 g 样品，搅拌均匀浸泡 2 h 后，加八层纱布封口，121 °C 灭菌 10 min，自然冷却，接种量 10%，发酵温度 28 °C，发酵时间 7 d，初始 pH 值 7。121 °C 灭菌 10 min 结束发酵，测定多糖黄酮总酚含量。

1.3.5.2 接种量

称取 10.0 g 铁皮石斛粉于发酵罐中，由 1.3.5.1 确定料液比为 1:3，加入蒸馏水，设定不同接种量分别为 3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%，其他操作方法同上。

1.3.5.3 初始 pH 值

称取 10.0 g 铁皮石斛粉于发酵罐中，设定不同初始 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9，用盐酸和氢氧化钠调节 pH 值至与试纸条同色，由 1.3.4.2 确定接种量为 10%，其他操作方法同上。

1.3.5.4 发酵温度

称取 10.0 g 铁皮石斛粉于发酵罐中，设定不同发酵温度为 22、25、28、31、34、37、40 °C，由 1.3.4.3 确定初始 pH 值为 6，其他操作方法同上。

1.3.5.5 发酵时间

称取 10.0 g 铁皮石斛粉于发酵罐中，设定不同

发酵时间为 1、2、3、5、7、9、12、15 d。由 1.3.4.4 确定发酵温度为 28 °C，其他操作方法同上。

1.3.6 正交试验

根据单因素优化试验结果，选取适当因素水平，进行 5 因素 4 水平 $L_{16}(4^5)$ 的正交试验，以发酵后提取液中的多糖、黄酮、总酚含量作为指标确定黑曲霉发酵铁皮石斛的最优条件。

1.3.6.1 正交试验

正交试验见表 2、3。

表 2 正交试验因素试验表

Table 2 Factors and levels of orthogonal test

因素	A 料液比 (g/mL)	B 初始 pH 值	C 接 种量/%	D 发酵 温度/°C	E 发酵 时间/d
1	1:3	5	7	25	3
2	1:4	6	8	28	5
3	1:5	7	9	31	7
4	1:6	8	10	34	9

表 3 正交试验设计表

Table 3 Table of orthogonal test design

试验 组	A 料液比 (g/mL)	B 初始 pH 值	C 接 种量/%	D 发酵 温度/°C	E 发酵 时间/d
T1	1:3	5	7	25	3
T2	1:3	6	8	28	5
T3	1:3	7	9	31	7
T4	1:3	8	10	34	9
T5	1:4	5	8	31	9
T6	1:4	6	7	34	7
T7	1:4	7	10	25	5
T8	1:4	8	9	28	3
T9	1:5	5	9	34	5
T10	1:5	6	10	31	3
T11	1:5	7	7	28	9
T12	1:5	8	8	25	7
T13	1:6	5	10	28	7
T14	1:6	6	9	25	9
T15	1:6	7	8	34	3
T16	1:6	8	7	31	5

1.3.6.2 多指标综合加权分析

多指标综合加权分析是利用一定的数理统计方法对任意一个内容复杂、指标多变、数据难以处理的试验进行简单快捷方便的分析处理,并通过这种方法找到最优的解决方案并评价出最优秀的等级的一种方法^[13]。首先是要识别出试验中的若干重要指标,接着对各个指标赋予权重,得到最终评分,然后根据得到的优劣等级及评分,确定最优秀的发酵试验组并进行下一步试验。

1.3.6.3 工艺验证

根据正交试验中得到的最优发酵条件进行验证,同时测定发酵后获得的铁皮石斛中的三项综合评价指标^[14],对发酵前后铁皮石斛中的多糖、黄酮、总酚含量进行测定分析。

1.3.7 抗氧化试验

参照张东峰等^[15]的方法制备样品。参照倪俊等^[16]的方法测定 DPPH 自由基清除能力。参考梁子昌等^[17]的方法测定 ABTS⁺ 自由基清除能力。参考袁博等^[18]的方法测定还原能力。

1.3.8 数据处理

在利用黑曲霉对铁皮石斛进行微生物发酵工艺中,其中的多指标成分含量采用综合加权分析法进行数据处理。利用正交试验助手 V3.1 对正交试验进行设计分析,并利用 ANOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。所有试验重复 3 次,应用 SPSS 25.0 进行统计学分析,应用 Origin 9.8 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 最适菌种的筛选

黑曲霉在泥土、粮食、植物性产品中分布广泛^[19],具有发酵条件简单、代谢旺盛、容易控制、生长周期短、不产毒素等优点,普遍应用于食品发酵、畜牧、医药等行业。黑曲霉能产生各种酶类,如纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶,由于酶的高效性、专一性,使得黑曲霉能够水解纤维素、破坏细胞壁、释放胞内营养元素,提高营养物质利用率;催化降解淀粉,提供能量来源,促进动物的消化与吸收;成为大量生产蛋白酶的发酵菌株,应用于食品饲料医药等行业;将脂肪水解为小分子物质,控制脂质代谢,利于动物消化吸收。

如图 1 所示,在植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌、米根霉、黑曲霉分别发酵铁皮石斛中,黑曲霉的发酵优势最为明显。在黑曲霉单菌发酵期间,其多糖

含量降低,但相较于其他菌种升高,可能是接种后黑曲霉大量利用植物细胞多糖进行繁殖,导致多糖含量减少,在微生物发酵过程中,酚类物质中的复杂大分子会被转换成小分子物质^[20]。与此同时,黑曲霉单菌发酵使铁皮石斛黄酮含量保持平稳,且菌种大量繁殖会增加样品中的酚类物质。王懿文等^[21]利用黑曲霉固体发酵金银花,发现发酵后的金银花纤维素酶含量增加,促使结合态多酚的释放,提高总多酚、总黄酮含量。

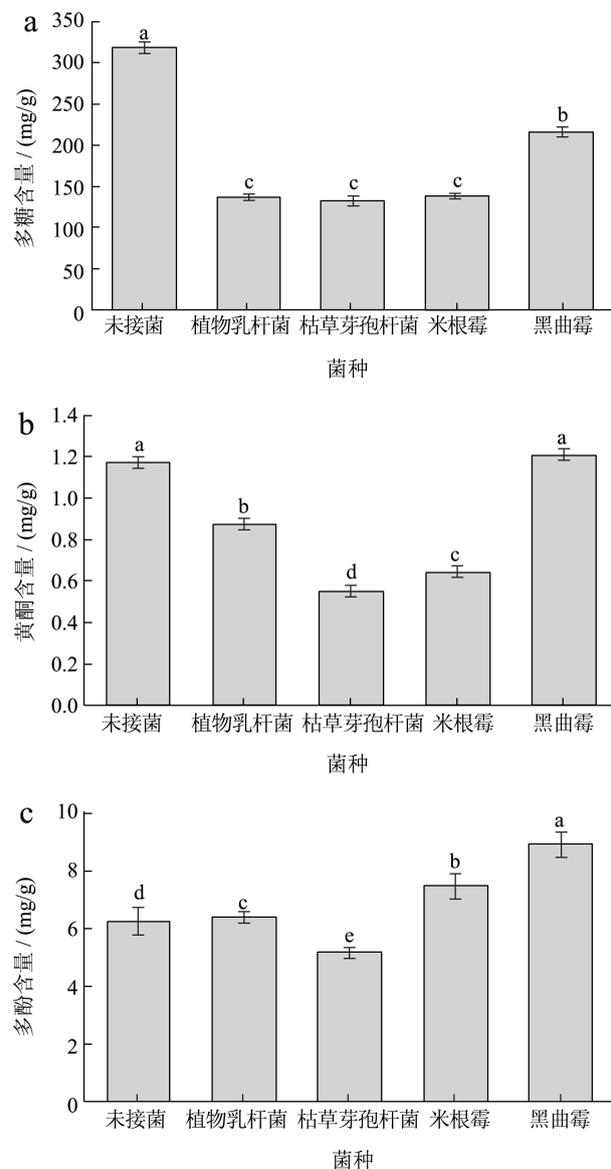


图 1 最佳菌种的筛选

Fig.1 Selection of the best strain

注:小写字母代表相同指标不同处理条件下具有显著性差异 ($P < 0.05$)。图 2~6 同。

综上所述,黑曲霉利用铁皮石斛中的少量多糖进行自身繁殖,同时产出更多的酚类物质,可作为适宜菌株进行铁皮石斛的微生物发酵。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

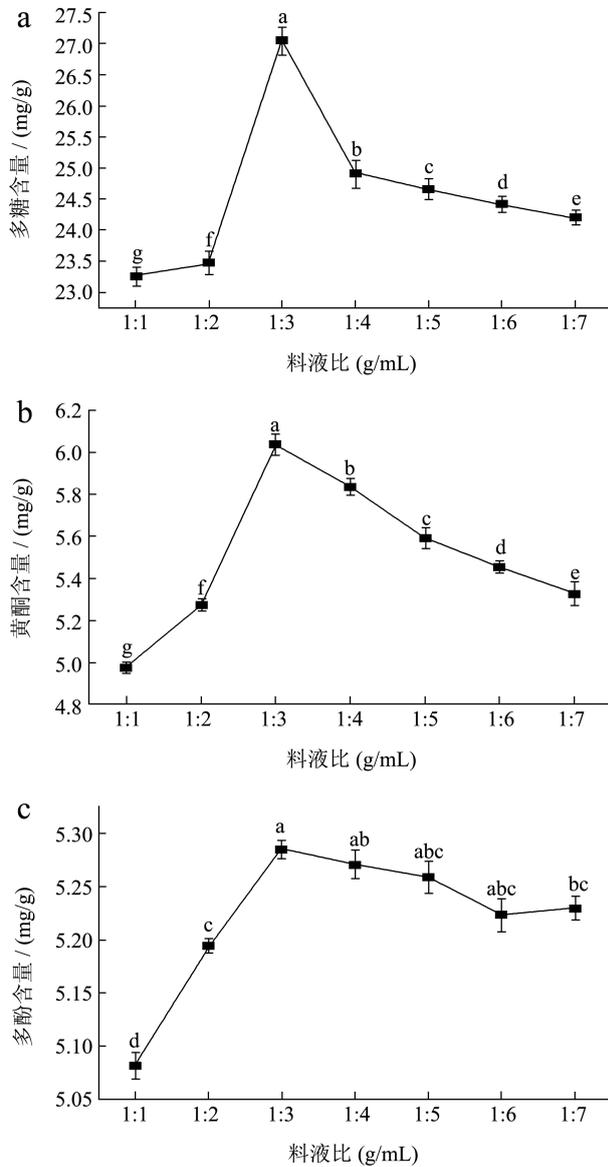


图2 料液比对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

Fig.2 Effect of Material liquid ratio on *Aspergillus niger* fermentation of *Dendrobium officinale*

料液比会极大的影响渗透压与多糖、黄酮含量。由图2可知，随着料液比的比例加大，多糖含量出现先上升后降低的趋势，以多糖含量为指标，最佳料液比为1:3；黄酮含量同样出现先上升后降低的趋势，在1:3处出现拐点，以黄酮含量为指标，最佳料液比为1:3；总酚含量随着料液比的增大而增大，且增长幅度趋于平稳，在1:3处出现最大值。说明黑曲霉在发酵过程中需要大量的水分，水含量过低不利于生长繁殖^[22]；而且，水分的持续增加会影响稀释发酵

时的底物浓度，不利于微生物吸收利用，减缓代谢物的积累^[23]。

综上所述，最适料液比为1:3。

2.2.2 接种量对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

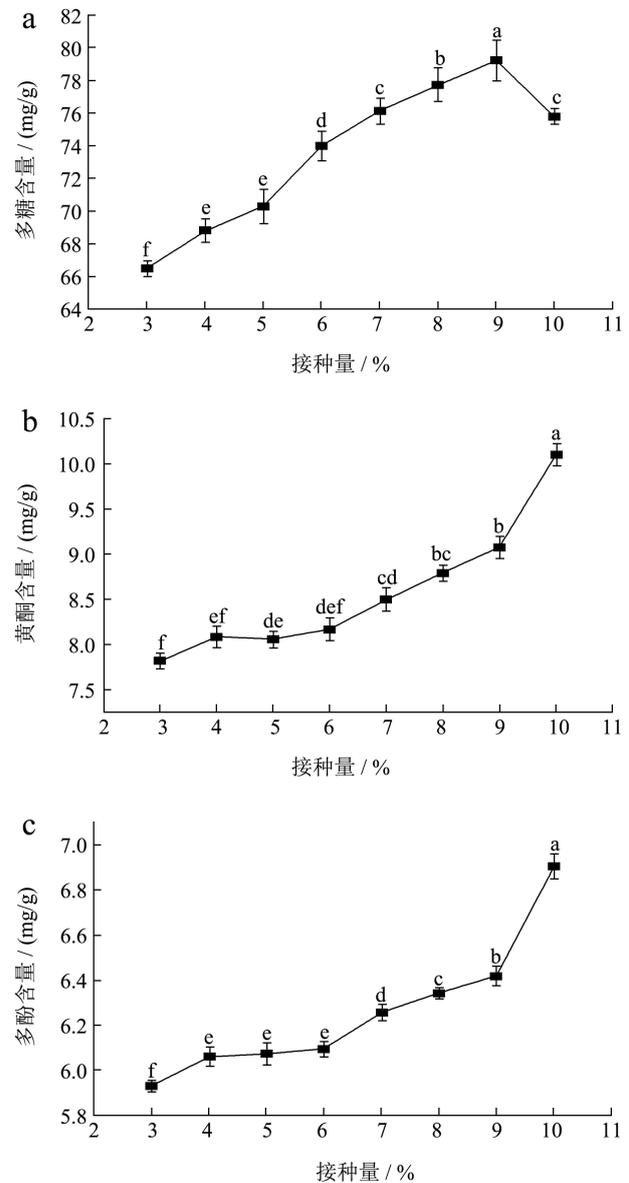


图3 接种量对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

Fig.3 Effect of inoculation amount on *Aspergillus niger* fermentation of *Dendrobium officinale*

由图3可知，随着接种量增加，多糖含量递增，在9%时出现最大值，为79.22 mg/g；黄酮含量逐步递增，在10%时出现最大值，为10.11 mg/g；总酚含量逐步递增，在10%时出现最大值，为6.90 mg/g。黑曲霉的质量浓度占比越大，其活性成分含量越高，多糖含量在9%发生转折，黄酮与总酚含量在10%达到最大。陈红慧等^[24]利用黑曲霉发酵三七叶茶，发现黑曲霉的生长于接种量有关，也与底物成分、

代谢物的调节反馈有关。在发酵过程中，黑曲霉能消耗铁皮石斛中的部分蛋白质及多糖，导致次生代谢产物损耗减小^[25]，使得发酵后的铁皮石斛中多酚、黄酮含量增加。

综上所述，最适接种量为 10%。

2.2.3 初始pH值对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

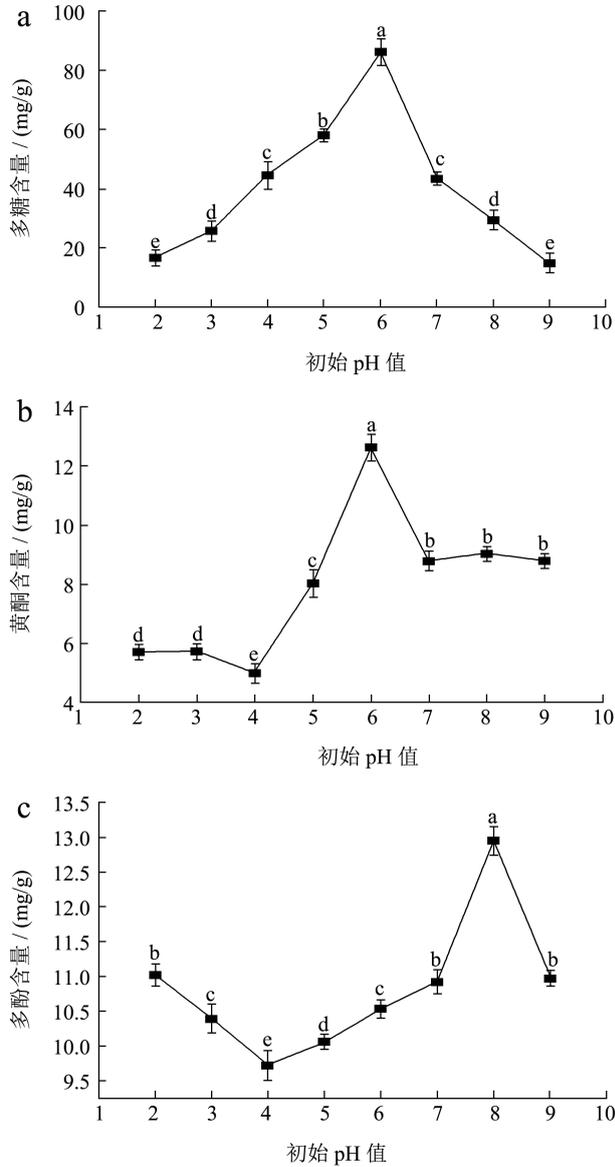


图 4 初始 pH 值对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响
Fig.4 Effect of initial pH on *Aspergillus niger* fermentation of *Dendrobium officinale*

在微生物发酵过程中，pH 值对黑曲霉的生长情况有一定的影响，或高或低都会降低其生长效率，不利于接种发酵，基质初始 pH 值对黑曲霉的接种发酵有直接关系。

由图 4 可知，随着初始 pH 值的增大，多糖、黄酮含量在 pH 值为 6 出现最大值，总酚含量在 pH

值 8 出现最大值；根据预实验结果，分别与未发酵 CK 比较，多糖含量降低，黄酮含量升高，总酚含量保持平稳，升高幅度不大，与 2.1 结果相似。铁皮石斛基质的 pH 值在 5.5~6.5 之间，黑曲霉的最适生长 pH 值在 5~8 之间，利用黑曲霉发酵铁皮石斛中的多糖可繁殖生成柠檬酸^[26]，产酸过度导致 pH 值降低至不适合黑曲霉生长，次生代谢产物含量减少。

综上所述，最适初始 pH 值为 6。

2.2.4 发酵温度对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

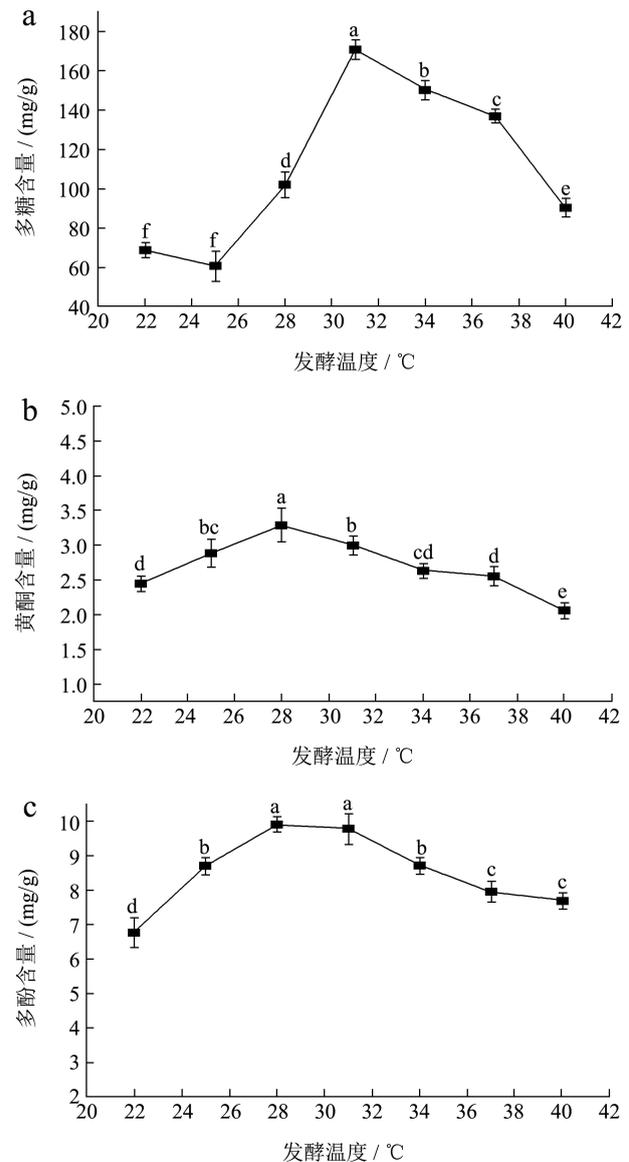


图 5 发酵温度对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响
Fig.5 Effect of fermentation temperature on *Aspergillus niger* fermentation of *Dendrobium officinale*

由图 5 可知，随着温度的升高，多糖、黄酮、总酚含量都出现先升高后降低的现象，分别在 31、28、28 °C 出现最大值，分别为 170.98、3.29、9.91 mg/g。

这是由于在适当升高的温度下,黑曲霉菌的生长代谢情况会加快,从而产生的蛋白酶不仅多而且强,发酵铁皮石斛产生的活性成分含量升高,但是温度过高不适宜菌丝生长,甚至不生长,从而使发酵活性成分含量下降^[27]。

综上所述,最适发酵温度为 28 ℃。

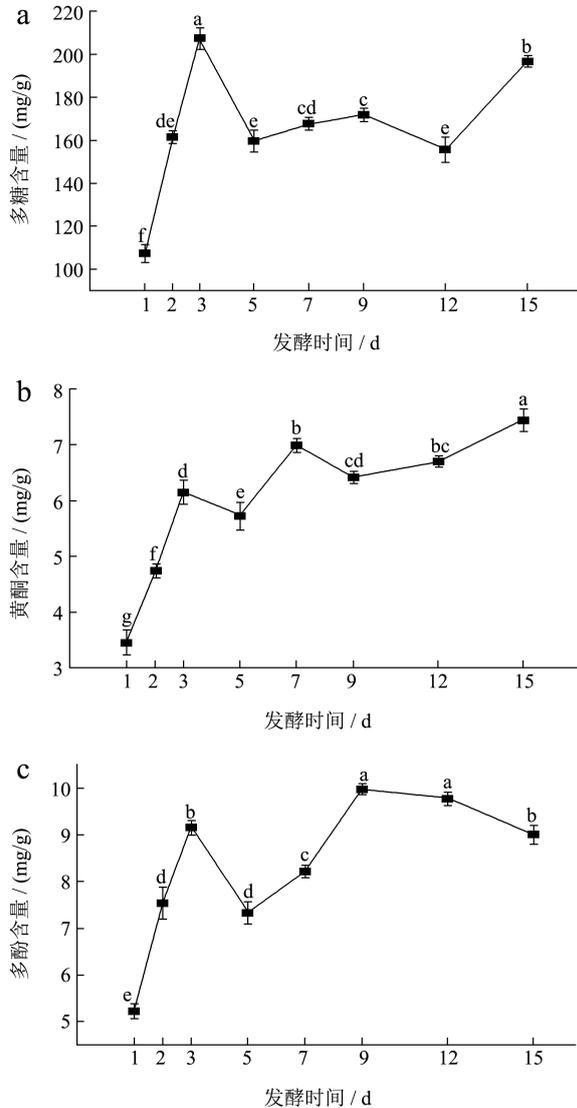


图 6 发酵时间对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

Fig.6 Effect of fermentation time on *Aspergillus niger* fermentation of *Dendrobium officinale*

2.2.5 发酵时间对黑曲霉发酵铁皮石斛的影响

由图 6 可知,多糖含量 1~3 d 急剧上升,5 d 下降,5~9 d 平缓上升,可能是由于本试验使用蒸馏水作为发酵培养基,未含多糖等营养成分,而在菌体发育生长繁殖的过程中,多糖作为重要的碳源需要为其提供能量,使得多糖含量急剧上

升后下降。黄酮含量于多酚含量都呈现先上升后下降再上升的趋势,原因可能是黑曲霉通过发酵产生各类次生代谢产物,其中酶类最盛^[28],从而水解多酚类化合物,使其从结合状态转变为游离状态,使得多酚含量升高;而随着发酵时间的延长,除了黄酮类以外的多酚物质,如花青素、原花青素、儿茶素、芪类化合物等活性物质含量还在增加^[29]。因此,多酚含量在第 9 天出现最大值,黄酮含量在第 7 天出现最大值。

根据上升趋势最好的情况来确定最佳发酵时间为 3 d。

不同微生物在不同基质中的发酵机理各不相同,其主要原因有:①微生物选择性代谢;②底物转化,释放能量;③代谢产物具备经济价值;④发酵条件对微生物生长代谢的重要影响;⑤发酵设备^[30-34]。多种微生物协同发展产生的效果大不相同。Li 等^[35]利用乳酸杆菌与乳酸球菌协同发酵,显著提高大部分怡人气味并抑制三甲胺和甲硫酸的产生,对改善罗非鱼鱼糜发酵的挥发性气味影响最大。黑曲霉在渥堆发酵制备普洱熟茶中被认为是优势菌株,主要是因为能促进特征成分的形成,如茶多酚、没食子酸、葛根素、 γ -氨基丁酸、槲皮素等^[36]。

利用微生物发酵影响铁皮石斛中活性成分含量,主要是利用微生物生长代谢产生的酶对底物结构进行修饰,从而更容易获得活性更好的成分。王丹等^[37]利用植物乳杆菌与保加利亚乳杆菌对铁皮石斛发酵,结果显示多糖含量明显下降,与本实验结果相似。黄振勇等^[38]利用乳酸菌发酵铁皮石斛制备风味饮料,发现发酵后多糖及石斛碱含量降低,总酚、总黄酮含量明显上升,抗氧化能力有所增强。可能是在生长代谢过程中,微生物消耗大量碳源氮源进行繁殖,产生纤维素酶,分解细胞壁结构,使得大分子物质转化为小分子物质,胞内物质溶出,提高活性成分含量,从而提升抗氧化能力。

2.3 正交试验

2.3.1 正交试验权重系数及综合评分的确定

选择 $L_{16}(4^5)$ 表,试验方案及结果见表 2、3。由于本次正交设计采用了多个指标成分进行分析,所以采用多指标试验公式法^[39]进行数据处理,数据处理结果见表 4~6。

表 4 正交试验各指标含量、权重系数的确定及综合评分结果

Table 4 Contents for indicators, weight coefficients and comprehensive score of orthogonal test

试验组	多糖含量/(mg/g)	黄酮含量/(mg/g)	多酚含量/(mg/g)	综合评分 P_i	评分排序
T1	53.87 ± 0.34 ^{Ac}	3.48 ± 0.24 ^{Bbc}	3.89 ± 0.59 ^{Bbcd}	0.671 6	4
T2	71.65 ± 0.57 ^{Ac}	2.51 ± 0.42 ^{Bdef}	3.00 ± 0.75 ^{Bdef}	0.635 7	5
T3	77.37 ± 0.99 ^{Ab}	3.21 ± 0.07 ^{Bbcd}	4.06 ± 0.32 ^{Bbc}	0.763 7	2
T4	77.62 ± 0.32 ^{Ab}	4.96 ± 0.60 ^{Ca}	6.10 ± 0.60 ^{Ba}	0.990 4	1
T5	49.77 ± 0.32 ^{Af}	3.09 ± 0.75 ^{Bbcde}	3.73 ± 0.68 ^{Bbcd}	0.619 2	8
T6	56.71 ± 0.61 ^{Ad}	3.74 ± 0.97 ^{Bb}	4.31 ± 0.45 ^{Bb}	0.723 9	3
T7	71.09 ± 0.84 ^{Ac}	2.48 ± 0.57 ^{Bdef}	2.94 ± 0.05 ^{Bdef}	0.627 7	6
T8	79.87 ± 0.90 ^{Aa}	2.08 ± 0.67 ^{Bef}	2.59 ± 0.23 ^{Befg}	0.620 1	7
T9	28.22 ± 0.01 ^{Aj}	2.29 ± 0.13 ^{Bdef}	2.50 ± 0.39 ^{Befg}	0.407 8	13
T10	39.70 ± 0.81 ^{Ag}	1.68 ± 0.16 ^{Bf}	2.29 ± 0.91 ^{Befg}	0.405 2	14
T11	54.44 ± 0.92 ^{Ac}	2.54 ± 0.27 ^{Bdef}	3.20 ± 0.09 ^{Bcde}	0.574 7	9
T12	49.28 ± 0.35 ^{Af}	1.98 ± 0.31 ^{Bf}	2.36 ± 0.70 ^{Befg}	0.470 0	11
T13	38.00 ± 0.11 ^{Ah}	1.88 ± 0.31 ^{Bf}	2.23 ± 0.73 ^{Befg}	0.408 0	12
T14	49.25 ± 0.69 ^{Af}	2.35 ± 0.64 ^{Bdef}	2.95 ± 0.19 ^{Bdef}	0.526 0	10
T15	31.22 ± 0.15 ^{Ai}	1.51 ± 0.98 ^{Bf}	1.87 ± 0.15 ^{Bg}	0.335 0	16
T16	28.11 ± 0.61 ^{Aj}	1.85 ± 0.20 ^{Bf}	2.03 ± 0.70 ^{Bfg}	0.352 7	15
Feight coefficient F_j	1.00	0.96	0.95		

注: 大写字母代表不同处理组相同指标的显著性差异, 小写字母代表相同处理组不同指标的显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 5 正交试验综合评分 P_i 均值回应表

Table 5 Mean response table for comprehensive score of orthogonal test

因素	A	B	C	D	E
1	0.765	0.527	0.581	0.574	0.508
2	0.648	0.573	0.515	0.560	0.506
3	0.464	0.575	0.579	0.535	0.591
4	0.405	0.608	0.608	0.614	0.678
极差	0.360	0.081	0.093	0.079	0.172
排秩	1	4	3	5	2

表 6 正交试验综合评分 P_i 方差分析表

Table 6 Analysis of variance for comprehensive score of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 值
A	0.330	3	3.618**
B	0.014	3	0.154*
C	0.019	3	0.208*
D	0.013	3	0.143*
E	0.080	3	0.877*
误差	0.460	15	

注: * 表示显著 ($P < 0.05$); ** 表示极显著 ($P < 0.01$)。

2.3.2 最佳发酵工艺条件的确立及验证

本试验选择 3 种检测指标作为黑曲霉发酵铁皮石斛综合品质的考察指标, 通过计算各指标的权重系数 (见表 4) 发现, 最高的权重系数是多糖, 最低的是总酚, 说明多糖对本试验影响较大, 因此分配权重较大, 相反, 总酚对本试验影响较小, 分配权重小。对综合评分进行排序 (见表 4) 发现, T4 组综合评分最高 (0.990 4), 直观排序为第一, 因此在本试验中 T4 组 ($A_1B_4C_4D_4E_4$) 在各试验组中发酵工艺最佳。而综合评分 P_i 的均值回应表 (表 5) 与方差分析结果 (表 6) 表明, 各因素对黑曲霉发酵铁皮石斛综合品质影响程度依次为 $A > E > C > B > D$, 即料液比 > 发酵时间 > 接种量 > 初始 pH 值 > 发酵温度, 其中, A 因素 (料液比) 的 P 值小于 0.01, 为极显著影响因素; B、C、D、E 因素的 P 值均小于 0.05, 为显著影响因素。

因此, 本试验最终发酵工艺为: 料液比 1:3, 初始 pH 值 8, 接种量 10%, 发酵温度 34 °C, 发酵时间 9d。在此条件下, 验证试验得多糖含量为 72.65 mg/g, 黄酮含量为 6.67 mg/g, 多酚含量为 11.32 mg/g, 综合评分 P_i 为 0.945 5。

本研究通过单因素及正交试验筛选出最佳发酵条件应用于铁皮石斛基质，不仅是利用黑曲霉无毒发酵、产酶丰富的特点，更是在未发酵铁皮石斛的基础上将其活性成分含量大力增强，功能活性增加，药用价值提升，有利于生产相关功能性产品，并应用于食品医药领域，开拓创新市场。

2.4 抗氧化能力

2.4.1 DPPH自由基清除能力

DPPH 自由基反应溶液在加入抗氧化剂时，在 517nm 波长下，反应溶液本身自带的深紫色，会转变为黄色或浅黄色，此外，溶液变色的情况反映了 DPPH 自由基的清楚能力，与抗氧化能力也呈正相关性^[40]。

结果如图 7 所示，发酵后的铁皮石斛样品提取液的 DPPH 自由基清除能力，在 0~5 mg/mL 质量浓度范围内，清除率逐渐从 45.27% 增至 77.26%，表明在规定范围内，铁皮石斛样品提取液对 DPPH 自由基有一定的清除作用；此外，拟合曲线方程 $R^2=0.9972$ ，经过拟合曲线模拟， IC_{50} 为 0.67 mg/mL，低于 Vc 对照组，高于空白对照组。

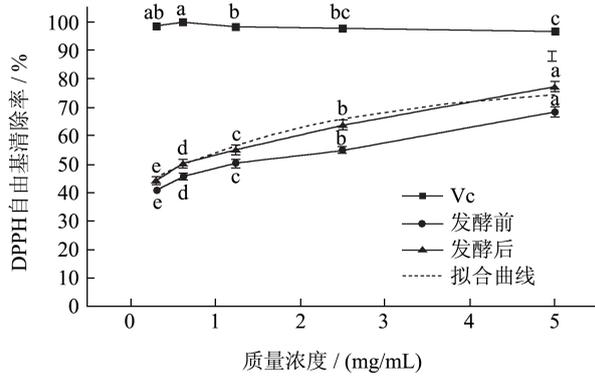


图 7 DPPH 自由基清除率测定结果

Fig.7 Determination results of DPPH free radical scavenging rate

注：图中不同小写字母代表同一指标不同处理条件下具有显著性差异 ($P < 0.05$)。下图同。

2.4.2 ABTS⁺自由基清除能力

ABTS⁺ 自由基是一种含氮的小分子，具有明显的紫色。将清除剂与 ABTS⁺ 自由基反应，ABTS⁺ 自由基会失去一个电子，转变成非常稳定的无色分子，从而清除自由基。

如图 8 所示，发酵后的铁皮石斛样品提取液的 ABTS⁺ 自由基清除能力，在 0~5 mg/mL 质量浓度范围内，清除率逐渐从 24.69% 增至 97.06%，表明在规定范围内，铁皮石斛样品提取液对 ABTS⁺ 自由

基有一定的清除作用；此外，拟合曲线方程 $R^2=0.9967$ ，经过拟合曲线模拟， IC_{50} 为 0.41 mg/mL，在相同质量浓度下，清除率低于 Vc 对照组，高于空白对照组，且存在显著差异。

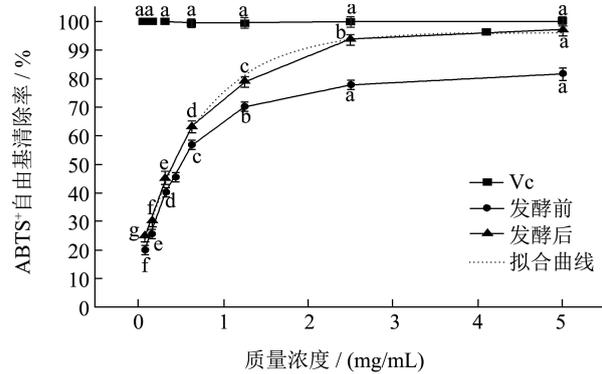


图 8 ABTS⁺ 自由基清除率测定结果

Fig.8 Determination results of ABTS⁺ free radical scavenging rate

2.4.3 还原能力

通常情况下，还原能力的测定可作为抗氧化活性的一个重要指标^[41]。结果如图 9 所示，随着发酵后的铁皮石斛样品提取液质量浓度升高，吸光度随着增大，说明样品质量浓度越高，存在更多的铁离子被还原成亚铁离子。样品提取液在 50 mg/mL 的质量浓度下还原能力为 0.074，拟合曲线方程 $R^2=0.9997$ ，经过拟合曲线模拟， IC_{50} 为 16.50 mg/mL，在相同质量浓度下，清除率低于 Vc 对照组，高于空白对照组，且存在显著差异。

本研究利用黑曲霉发酵铁皮石斛，观察其活性成分含量变化及抗氧化能力，发现多糖含量降低，黄酮、多酚含量升高，抗氧化能力增强。说明黑曲霉发酵能显著提升铁皮石斛的黄酮、多酚含量，经过最佳工艺提取后，黑曲霉能利用最少的多糖发酵产生更多的酚类物质。有研究^[42]表明，利用黑曲霉发酵能显著提升桑叶茶的总黄酮、总多糖、多酚类、游离氨基酸、芦丁、槲皮素含量，同时与未发酵桑叶绿茶比较发现其抗氧化活性提升 1~2 倍；同时，黑曲霉发酵南路边茶能改变茶叶代谢物的组成，影响茶叶品质含量，提高茶叶香气丰富度、滋味物质及甜度^[43]。黑曲霉发酵后的铁皮石斛抗氧化活性明显增强，分析其原因可能是：利用黑曲霉经过最佳工艺发酵后得到的铁皮石斛，其黄酮、多酚含量明显增加，而多酚物质具有一定的抗氧化能力，可向自由基提供电子，形成性质比较稳定的酚类游离基，不会引起新的链反应而被迅速氧化^[44]；抗氧化

能力的强弱取决于羟基的数量及位置,羟基化作用越强,抗氧化能力越强^[45];在发酵过程中,黄酮类物质为自由基提供氢原子,形成稳定的半醌基,从而提高抗氧化能力^[46];同时,多酚能调节 Nrf 2-ARE 途径中的抗氧化酶和肽的表达,激活机体抗氧化反应的元件^[47]。

综上,本次研究发现,在优化发酵条件后,黑曲霉发酵铁皮石斛能够显著提高抗氧化活性,增强抗氧化能力,为铁皮石斛抗氧化产品提供了新思路,微生物菌种的多样化利用提供了新依据。

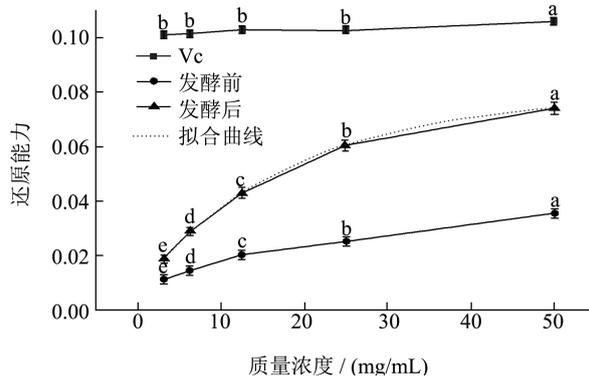


图9 还原能力测定结果

Fig.9 Determination results of reduction ability

3 结论

本试验筛选出了适用于铁皮石斛茎的发酵菌株黑曲霉,利用正交试验得出了最佳发酵工艺为料液比1:3,初始pH值8,接种量10%,发酵温度34℃,发酵时间9d,在此条件下发酵得到多糖含量为72.65 mg/g,黄酮含量为6.67 mg/g,多酚含量为11.32 mg/g,综合评分 P_i 为0.945 5。以维生素C为对照,得到发酵后的铁皮石斛DPPH自由基清除能力 IC_{50} 为0.67 mg/mL,ABTS⁺自由基清除能力 IC_{50} 为0.41 mg/mL,还原能力 IC_{50} 为16.50 mg/mL,均高于未发酵试验组。由上述试验结果可知,利用黑曲霉发酵铁皮石斛能够明显提高铁皮石斛中多酚含量,同时提高抗氧化活性,但发酵过程中的具体情况,如转化产物和原组分生物活性差异及生物利用度还有待进一步研究,以便更好地利用微生物的特性,经济、安全、高效地发酵铁皮石斛,提高铁皮石斛应用价值,为微生物资源合理利用、铁皮石斛制品的多样化及精深加工提供新思路。

参考文献

- [1] 国家两部门发文:对灵芝、天麻等9种物质试点既是食品又是中药材管理[J]. 食药菌,2020,28(1):16.
- [2] WANG Y, LI J L, LI N. Phytochemistry and pharmacological activity of plants of Genus *Curculigo*: an updated review since 2013 [J]. *Molecules*, 2021, 26(11): 3396-3396.
- [3] BANERJEE J, KARATI D. In-silico pharmacology against cancer of a novel phytosterol *Dendrosterone* isolated from plant *Dendrobium ochreatum* [J]. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 2022, 4: 100149.
- [4] 鹿伟,陈玉满,徐彩菊,等.铁皮石斛抗疲劳作用研究[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(10):2488-2490.
- [5] XIE H L, FANG J Y, FARAG M A, et al. *Dendrobium officinale* leaf polysaccharides regulation of immune response and gut microbiota composition in cyclophosphamide-treated mice [J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 13: 100235.
- [6] WANG Y H. Traditional uses and pharmacologically active constituents of *Dendrobium* plants for dermatological disorders: a review [J]. *Natural Products and Bioprospecting*, 2021, 11(5): 1-23.
- [7] SARSAIYA S, JAIN A, JIA Q, et al. First report of brown leaf rot disease on *Dendrobium nobile* caused by *Xylaria flabelliformis* in Guizhou Province, China [J]. *Plant Disease*, 2024, 108(6): 1894.
- [8] 罗在柒,龙启德,姜运力,等.全国石斛产业现状及贵州发展石斛产业的思考[J]. 贵州林业科技,2021,49(1):42-47.
- [9] SARSAIYA S, JIA Q, FAN X, et al. First report of leaf black circular spots on *Dendrobium nobile* caused by *Trichoderma longibrachiatum* in Guizhou Province, China [J]. *Plant Disease*, 2019, 103(12): 3275.
- [10] 陈远菲,严德林,莫雪婷,等.甘蔗叶多糖提取工艺优化及生物活性研究[J]. 食品研究与开发,2022,43(19):155-165.
- [11] 程丽娜,吴子威,吴榕珍,等.超声辅助提取藜麦黄酮工艺优化及抗氧化性[J]. 食品工业,2022,43(5):128-132.
- [12] 熊乐文,张龙霏,李佳,等.金银花酚酸类成分的提取优化及其成分分布[J]. 中药材,2022,45(8):1939-1945.
- [13] SMOLYAKOV Y N, KUZUIK B I. Integrative approach to assessing the complex of correlations between indicators of physiological functions [J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2020, 170(2): 275-278.
- [14] 胡瑞萍,丁贤,李俊伟,等.多指标综合加权分析法优化固态发酵豆粕工艺[J]. 农业工程学报,2019,35(12):304-312.
- [15] 张东峰,陈家豪,郭静,等.7种柑橘多酚、黄酮含量及其抗氧化活性比较研究[J]. 食品研究与开发,2019,40(6):69-74.
- [16] 倪俊,靖恒焯,高玉婷,等.滇西北地区鱼腥草抗氧化活性研究[J]. 化学与生物工程,2022,39(7):26-31.
- [17] 梁子昌,陈明,施雪敏,等.牛大力总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂,2023,36(10):101-106.
- [18] 袁博,曹健,秦朗,等.四种酚类化合物体外抗氧化活性的比较研究[J]. 食品工业,2018,39(9):200-204.
- [19] OLIACH D, CASTANO C, FISCHER C R, et al. Soil fungal community and mating type development of Tuber

- melanosporum in a 20-year chronosequence of black truffle plantations [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 165: 108510.
- [20] LI Y, LUO D, LI T, et al. Application of cellulase for contributing phenolic release and conversion in oats (*Avena sativa* L.) during microbial fermentation [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 195(7): 4277-4291.
- [21] 王懿文,谢纯良,朱作华,等.黑曲霉固态发酵对金银花多酚类物质释放及增效作用[J].*食品研究与开发*,2023, 44(22):23-29.
- [22] SUNDARAMOORTHY S, IVIN S J J. Induction of systemic resistance (ISR) in ground nut against collar rot (*Aspergillus niger*) by using Pyraclostrobin 20% water dispersible granules [J]. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 2023: 81-90.
- [23] 张帅,陈栩民,黄海潇.黑曲霉固态发酵餐厨垃圾生产酸性蛋白酶[J].*食品工程*,2023,2:44-47.
- [24] 陈红惠,向德健,高明菊,等.发酵条件对三七叶发酵茶活性物质的影响及抗氧化研究[J].*食品工业*,2022,43(4):174-179.
- [25] YANG C H, LUO L Z, CHEN P H, et al. Comprehensive study on the chemical profile and anti-tumor activity of secondary metabolites produced by *Aspergillus niger* [J]. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2022, 18(1): 141-160.
- [26] MELKUMYAN E I, MINASYAN E V, TOPLAGHALTSYAN A G. Characterization of citric acid biosynthesis by fungi *Aspergillus niger* for surface and submerged cultivation [J]. *Biology Bulletin*, 2024, 50(4): S589-S597.
- [27] MAKERI S M, BALA M, WANTE P S, et al. Activity of α -amylase produced by *Aspergillus niger* at different pH, temperature and incubation time using solid-state fermentation process of corn and wheat wastes [J]. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 2021: 1-11.
- [28] SINGH A, TATEWAR D, PANDHARIPANDE S, et al. Validity of artificial neural network for predicting effect of media components on enzyme production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation [J]. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science*, 2009, 11(4): 777-782.
- [29] LIU R T, TAO Y X, XU T T, et al. Antioxidant activity increased due to dynamic changes of flavonoids in orange peel during *Aspergillus niger* fermentation [J]. *International Journal of Food Science Technology*, 2023, 58(6): 3329-3336.
- [30] KARADUTA O, DVANAJSKAK Z, ZYBAILOV B. Metaproteomics-an advantageous option in studies of host-microbiota interaction [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 980.
- [31] CARLSON H K, VUONO D C, GLASS J B, et al. Editorial: selective controls on microbial energy metabolisms: from the Microscale to the Macroscale [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 728705.
- [32] RIMJHIM S, REGINA N, KUMAR A Y, et al. Systematizing microbial bioplastic production for developing sustainable bioeconomy: metabolic nexus modeling, economic and environmental technologies assessment [J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2023, 31(7): 21-20.
- [33] LEE Y D, PARK E S, KIM J E, et al. A comparative study of the physicochemical, microbial, and metabolic profiling of kimchi during long-term fermentation under varying salinity conditions [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2024, 196: 115838.
- [34] HADI M S R, FARHAD A, AHMAD V, et al. Technical note: design, development and validation of an automated gas monitoring equipment for measurement of the dynamics of microbial fermentation [J]. *MethodsX*, 2022, 9(prepublish): 101641.
- [35] LI C S, CHEN S J, HUANG H, et al. Improvement mechanism of volatile flavor in fermented tilapia surimi by cooperative fermentation of *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus sakei*: quantization of microbial contribution through influence of genus [J]. *Food Chemistry*, 2024, 449: 139239.
- [36] MA C Q, MA B S, ZHOU B X, et al. Pile-fermentation mechanism of ripened Pu-erh tea: omics approach, chemical variation and microbial effect [J]. *Trends in Food Science Technology*, 2024, 146: 104379.
- [37] 王丹,袁永俊,谭青云,等.不同菌种发酵对铁皮石斛多糖及其生物活性的影响[J].*中国调味品*,2019,44(9):39-43.
- [38] 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.
- [39] 赵泽颖,袁越锦,王栋,等.多指标试验公式法优化哈密瓜片真空热风干燥工艺[J].*食品与发酵工业*,2020,46(15): 140-146.
- [40] 罗海青.黄皮叶的质量评价及抗氧化活性研究[D].广州:广东药科大学,2019.
- [41] BOSKOV I A, SAVIC G I M, SAVIC I M, et al. Black locust flowers: antioxidant extraction kinetics, reducing capacity, mineral composition, and antioxidant activity [J]. *Chemical Engineering Communications*, 2022, 209(9): 1182-1190.
- [42] 蔡亚洁,乌日娜,李煜,等.发酵桑叶茶工艺条件优化及其抗氧化活性分析[J].*食品工业科技*2024, 45(15):187-194.
- [43] 田云.南路边茶发酵过程中黑曲霉对茶叶品质的影响[D].雅安:四川农业大学,2020.
- [44] 普天磊,韩学琴,邓红山,等.辣木抗氧化成分提取方法和抗氧化能力研究进展[J].*食品工业科技*,2019,40(19):310-315.
- [45] 袁圣亮,段智红,吕应年,等.海藻多酚类化合物及其抗氧化活性研究进展[J].*食品与发酵工业*,2019,45(5):274-281.
- [46] MOHAMMED J A, MADHAVA P N. Influence of 2iP and 2,4-D Concentrations on accumulation of biomass, phenolics, flavonoids and radical scavenging activity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cell suspension culture [J]. *Horticulturae*, 2022, 8(8): 683-683.
- [47] 云图娅,苏秀兰.抗氧化肽通过抗氧化作用抗肿瘤研究进展[J].*世界最新医学信息文摘*,2018,18(68):71-73.