

铁皮石斛酵素功能性研究

岩孔卜 梦 婷 崔文锐 云南农业大学热带作物学院 云南普洱 665000

摘要: 研究以普洱铁皮石斛酵素为原料,运用全自动氨基酸仪等仪器设备,采用 FRAP 法等方法测定其氨基酸成分,分析其抗氧化能力、自由基清除能力、SOD 活力、脂肪酶活力和淀粉酶活力。试验表明:铁皮石斛酵素内含有较高的胱氨酸、磷酸丝氨酸、酪氨酸与肌肽,其中肌肽含量非常丰富;每毫升的浓度为 10% 的铁皮石斛酵素的清除 DPPH 自由基能力等价于每毫升浓度为 0.0135 mmol/L 的 Vc, 石斛酵素的总抗氧化能力等价于浓度为 1.9310 mmol/L 的 Vc; 随着酵素体积的不断增大, SOD 抑制率也逐渐增大,但是两者并没有呈现线性关系,当酵素体积达到 0.2ml 时, SOD 抑制率的增加逐渐平缓,当酵素体积达到 0.4ml 时, SOD 抑制率达到了 82.68%。因此,铁皮石斛酵素具有较高的总抗氧化性、DPPH 和 ABTS 自由基去除能力。酶活性方面,普洱铁皮石斛酵素不能有效分解淀粉、消化脂肪,脂肪酶活力不强。

关键词: 铁皮石斛酵素; 氨基酸; 抗氧化性; 自由基清除能力; SOD 的抑制能力; 内酶活力

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 属于兰科草本植物,它的干燥茎^[1]2010 年在《中华人民共和国药典》内单独列出于石斛中。《道藏》就把其列为“中华九大仙草”的第一名,《本草纲目》记录铁皮石斛具有“强阴益精,厚肠胃,补内绝不足,平胃气,长肌肉,益智除惊,轻身延年”等功效,被益为“救命仙草”。《食品安全法》与《新资源食品管理办法》(2012 版)均将其原球茎列为新资源食品^[2]。

本试验借助 ABTS[2, 2- 联氮 - 二 (3- 乙基 - 苯并噻唑 -6- 磺酸) 二铵盐]2 种自由基体系及总抗氧化能力 DPPH(二苯代苦味酰肼自由基)体系,研究测定了普洱铁皮石斛酵素的有关抗氧化能力、体外清除自由基能力以及脂肪酶、淀粉酶、SOD 的活力^[3],旨在提供铁皮石斛的功能性成分及功效方面的客观数据,为进一步利用和研究铁皮石斛及其酵素提供一些参考。

1 材料与仪器设备

1.1 材料与试剂

本试验所用材料: 宁洱县宗理石斛经营部销售的铁皮石斛鲜品、上水井红糖重庆九区食品厂销售的红糖和北京艾森绿宝油脂有限公司销售的玉米油^[4]。

本试验所用试剂: Sigma 公司销售的分析纯级别的无

水乙醇、过硫酸钾、三氯化铁、磷酸氢二钠、甲醇、磷酸二氢钾、可溶性淀粉、硫酸亚铁、酚酞、2, 4, 6- 三吡啶基三嗪 (TPTZ)、2,2- 联氮 - 二 (3- 乙基 - 苯并噻唑 -6- 磺酸) 二铵 (ABTS)、维生素 C(L- 抗坏血酸) 和 1,1- 二苯基苦基苯肼 (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)。

1.2 仪器与设备

本试验所用的仪器与设备主要有: 上海元析仪器有限公司生产的 UV-2300 紫外可见分光光度计、同泰联科技有限公司生产的 TTL-DCH 氮吹仪和赛卡姆 (北京) 科学仪器有限公司生产的 S433D 全自动氨基酸分析仪。

2 试验方法与测定

2.1 铁皮石斛酵素的制备

铁皮石斛 (干燥茎) → 清洗 → 刀切成段 → 称 30g 置于玻璃瓶内 → 再加 10g 红糖和 100ml 水 → 密封后置于 20℃ 恒温下 → 放一次气 /10d → 两个月后取出进行过滤 → 置于阳光下照射 2h 后停止发酵^[5-6]。

2.2 分析铁皮石斛酵素所含氨基酸成分

2.2.1 预处理铁皮石斛酵素

首先用吸管吸取酒样 200ul 置于 10ml 的玻璃管内,然后利用氮吹仪将其吹干,最后用 2ml 样品稀释液将其再次呈溶液状态,置于分析仪上准备检测^[7]。



2.2.2 分析色谱的条件

分析色谱的条件见表 1 所列。

表 1 色谱分析条件表

条件	参数指标
进样量	50 μ L
冲泡状态	易溶解
检测波长	570、440 nm
流动相流速	0.45 mL/min
茚三酮流速	0.25 mL/min
色谱柱	LCA K07/Li
反应器温度	130 $^{\circ}$ C

2.3 铁皮石斛酵素抗氧化测定

2.3.1 总抗氧化能力测定

2.3.1.1 配制 TPTZ 工作液

TPTZ 工作液是将以下三种溶液按照 1: 1: 10 的体积比例混合后所得: 将浓度为 0.02mol/L 的 $FeCl_3$ 溶液溶解在浓度为 0.04 mol/LHCl 中, 再加入浓度为 0.01 mol/L 的 2,4,6- 三吡啶基三嗪 (TPTZ) 溶液。

2.3.1.2 测定总抗氧化能力 (FRAP 法)

分别将体积均为 2ml 的 TPTZ 工作液与样品溶液精确移进试管内, 均匀混合后, 置于 25 $^{\circ}$ C 恒温及无光的环境下, 让混合液自行反应 10min, 然后在检测波长 593nm 下来测定吸光度^[8-9], 并用 V_c 作为阳性对比。标准物质选硫酸铁来标定, 标准曲线如图所示 1。

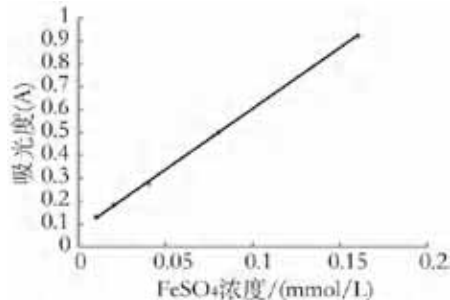


图 1 硫酸铁标准物质绘制标准曲线图

根据上图, 可以得到 $Y=5.298X+0.0075$ 这样的线性回归方程, 其相关系数 $R^2=0.999$, 用 FRAP 值表示的待测样品的总抗氧化能力: 1FRAP 单位 = 1 mmol/L 硫酸铁, 即待测定的样品普洱铁皮石斛酵素的总抗氧化能力与浓度为 1mmol/L 硫酸铁是一样的。

2.3.2 DPPH 自由基清除能力测定

2.3.2.1 DPPH 工作液配置

DPPH 工作液的配置方法分两步: 第一步制得 DPPH

储备液: 先精准称量 19.7mg 的 DPPH, 再溶解于甲醇, 最后形成 50ml 的溶液, 并保存在恒温 4 $^{\circ}$ C 条件下; 第二步制得 DPPH 工作液: 从 50mlDPPH 储备液中移取 15ml, 再添加甲醇, 是总体积达到 100ml, 即最终得到 0.15mmol/L 的 DPPH 工作液。

2.3.2.2 DPPH 自由基清除测定

先后将体积均为 3.2ml 的 DPPH 溶液 (0.15 mmol/L) 与 0.8ml 的样品溶液精确移进试管内, 均匀混合后, 置于 25 $^{\circ}$ C 恒温及无光的环境下, 让混合液自行反应 30min, 然后在检测波长 517nm 下来测定吸光度, 并用 V_c 作为阳性对比^[10]。DPPH 自由基的清除率 (%) 应该依照公式 (a) 来计算。

$$\text{清除率} (\%) = ((A_0 - A_j) / A_0) \times 100 \quad (a)$$

上式 (a) 内: A_0 、 A_j 分别表示双蒸水、样品与 DPPH 混合溶液的吸光度。

2.3.3 ABTS 自由基清除能力测定

2.3.3.1 工作液配制

首先分别准确称量 0.0662g 的过二硫酸钾与 0.3841g 的 ABTS 置于烧杯内, 然后加蒸馏水定容到 100ml, 这样配置成浓度为 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液和浓度为 7mmol/L 的 ABTS 溶液; 接着把该混合液置于常温且无光的环境下, 自行反应 12-16h, 反应完成后添加甲醇进行稀释, 然后在检测波长为 734nm 下吸光度达到 0.8 左右, 最终完成 ABTS+ 自由基工作液的配制。

2.3.3.2 ABTS 自由基清除测定

用 V_c 作为阳性对比, 先后将体积为 3 毫升的 ABTS+ 自由基工作液以及 0.3 毫升的不同浓度样品溶液精确移进试管内, 均匀混合后, 置于 25 $^{\circ}$ C 恒温及无光的环境下, 让混合液自行反应 10 分钟, 然后在检测波长 732 纳米下来测定样品的吸光度, ABTS 自由基的清除率 (%) 应该依照公式 (b) 来计算。

$$\text{清除率} (\%) = ((A_{01} - A_{j1}) / A_{01}) \times 100 \quad (b)$$

上式 (b) 内: A_{01} 、 A_{j1} 分别表示双蒸水、样品与 ABTS 溶液的吸光度。

3 结果与分析

3.1 氨基酸成分测定结果与分析

3.1.1 氨基酸成分

测定铁皮石斛酵素中的氨基酸成分, 结果见所列表 2:



表 2 氨基酸种类分析结果表

序号	名称	含量/(mg/mL)	保留时间(分钟)
1	尿素	0.060	7.864
2	胱氨酸	0.024	62.104
3	肌肽	0.023	92.771
4	磷酸丝氨酸	0.019	3.693
5	酪氨酸	0.018	72.389
6	瓜氨酸	0.018	53.173
7	苯丙氨酸	0.017	76.203
8	3-甲基组氨酸	0.017	88.973
9	1-甲基组氨酸	0.017	90.392
10	α -氨基己二酸	0.016	43.931
11	组氨酸	0.016	87.832
12	谷氨酸	0.015	34.661
13	蛋氨酸	0.015	64.445
14	磷乙醇胺	0.014	6.36
15	牛磺酸	0.013	5.283
16	天冬氨酸	0.013	19.952
17	异亮氨酸	0.013	67.699
18	亮氨酸	0.013	69.160
19	苏氨酸	0.012	27.019
20	缬氨酸	0.012	58.235
21	丝氨酸	0.011	29.232
22	天冬酰胺	0.01	32.541
23	α -氨基丁酸	0.01	54.976
24	β -氨基异丁酸	0.01	80.243
25	γ -氨基丁酸	0.01	82.411
26	丙氨酸	0.009	50.896
27	β -丙氨酸	0.009	79.501
28	甘氨酸	0.008	48.725

如上表检测所示：铁皮石斛酵素液内含有除色氨酸和赖氨酸外的人体六大必需氨基酸，即：苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸；除含有 6 种人体必需氨基酸外，其中还有胱氨酸、磷酸丝氨酸、酪氨酸、瓜氨酸、3-甲基组氨酸、1-甲基组氨酸、 α -氨基己二酸、组氨酸，谷氨酸、牛磺酸、天冬氨酸、 α -氨基丁酸、 β -氨基异丁酸、 γ -氨基丁酸、甘氨酸、丝氨酸、 β -丙氨酸和丙氨酸等 20 种氨基酸；并且富含胱氨酸、磷酸丝氨酸、酪氨酸、肌肽和尿素。

3.1.2 铁皮石斛酵素氨基酸成分分析

有关文献报道肌肽在牛肉中的含量大约为 0.0135mg/g，本试验中普洱铁皮石斛酵素内肌肽的含量达到了

0.023mg/g，这大大超过牛肉的含量，对抗衰老肌肽能起到非常大的作用，而且属于一种具有美白功能的被人们普遍选择的添加物。

3.2 铁皮石斛酵素抗氧化试验结果

3.2.1 总抗氧化能力测定结果

分别将铁皮石斛酵素浓度值与 Vc 浓度值作为横坐标，将 FRAP 值作为纵坐标作点画图，如图 2 与图 3 所示，我们可以发现 FRAP 值分别与普洱铁皮石斛酵素浓度值、Vc 浓度值很好地反映了线性关系。由此，我们分别得出普洱铁皮石斛酵素总抗氧化能力的公式为： $Y=0.0692X-0.0065$ ，其中 $R=0.9993$ ；Vc 总抗氧化能力的公式为： $Y=5.7205X-0.0146$ ，其中 $R=0.9989$ 。根据上述两个公式，我们可以得出这样的结论：每毫升的浓度为 1% 的普洱铁皮石斛酵素的总抗氧化能力等价于每毫升的浓度为 0.0135 mmol/L 的 Vc 的总抗氧化能力。

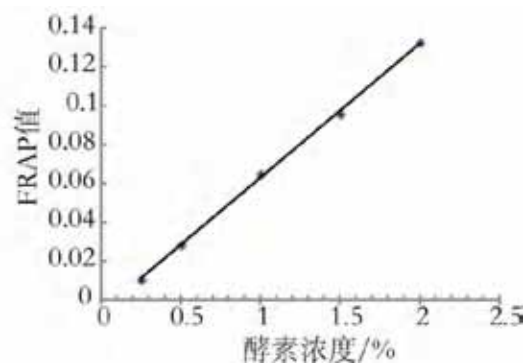


图 2 铁皮石斛酵素总抗氧化能力

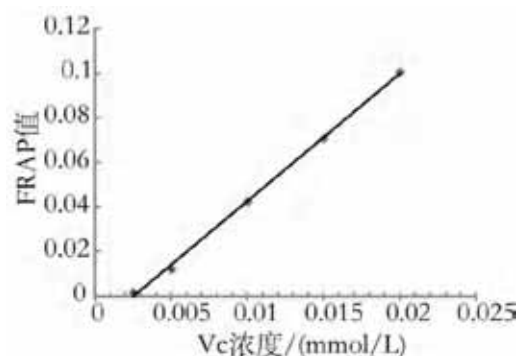


图 3 Vc 总抗氧化能力

3.2.2 清除 DPPH 自由基试验结果

分别将普洱铁皮石斛酵素浓度值与 Vc 浓度值作为横坐标，将 DPPH 自由基清除率作为纵坐标作点画图，如图 4 与图 5 所示，我们可以发现其与铁皮石斛



酵素浓度值、Vc 浓度值都很好地反映了线性关系，由此，我们分别得出铁皮石斛酵素清除 DPPH 自由基的公式为： $Y=2.8288X-7.5891$ ，其中 $R=0.991$ ；Vc 清除 DPPH 自由基的公式为： $Y=332.94X+10.222$ ，其中 $R=0.9714$ 。根据上述两个公式，我们可以得出这样的结语：每毫升的浓度为 10% 的铁皮石斛酵素的清除 DPPH 自由基能力等价于每毫升的浓度为 0.0135mmol/L 的 Vc 的清除 DPPH 自由基能力。

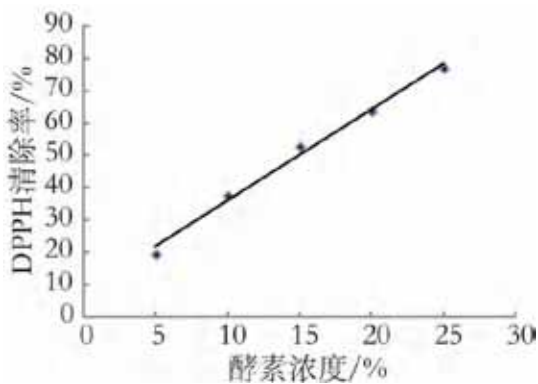


图4 铁皮石斛酵素清除 DPPH 自由基结果

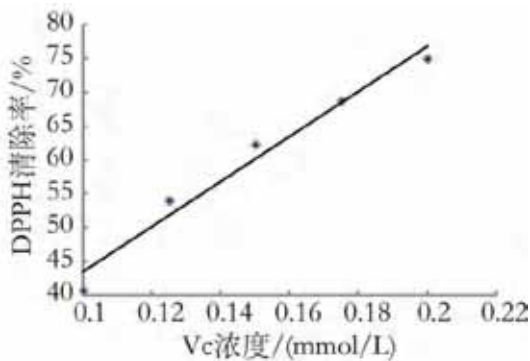


图5 Vc 清除 DPPH 自由基结果

3.2.3 清除 ABTS 自由基试验结果

分别将普洱铁皮石斛酵素浓度值与 Vc 浓度值作为横坐标，将 ABTS 自由基清除率作为纵坐标，并且根据这个作点画图，如图 6 与图 7 所示，可以分析出来，发现 ABTS 自由基清除率分别与普洱铁皮石斛酵素浓度值、Vc 浓度值很好地反映了线性关系。由此，我们分别得出普洱铁皮石斛酵素清除 ABTS 自由基的公式为： $Y=5.064X+12.23$ ，其中 $R=0.991$ ；Vc 清除 ABTS 自由基的公式为： $Y=3.7701X-8.6657$ ，其中 $R=0.9946$ 。根据上述两个公式，我们可以得出这样的结语：铁皮石斛酵素的总抗氧化能力等价于浓度为

1.9310mmol/L 的 Vc 的总抗氧化能力。

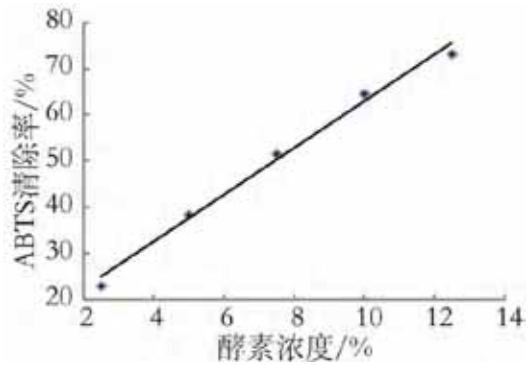


图6 铁皮石斛酵素清除 ABTS 自由基结果

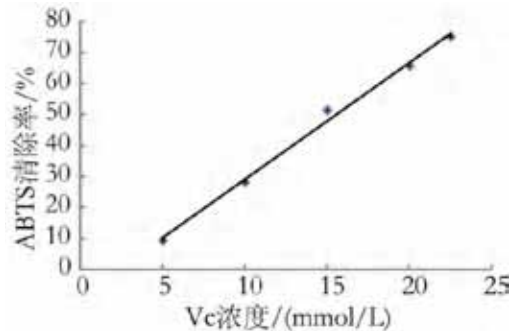


图7 Vc 清除 ABTS 自由基结果

3.3 铁皮石斛酵素内酶活力试验结果

3.3.1 SOD 测定结果

由图 8，我们可以看出：虽然随着酵素体积的不断增大 SOD 抑制率也逐渐增大，但是两者并没有呈现线性关系，另外当酵素体积达到 0.2ml 时，SOD 抑制率的增加逐渐平缓，当酵素体积达到 0.4ml 时，SOD 抑制率达到了 82.68%。从以上分析中我们可以得到这样的结语：普洱铁皮石斛酵素对人体有着非常强大的抑制 SOD 能力。

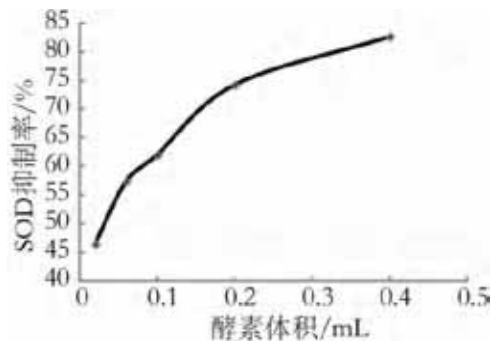


图8 铁皮石斛酵素 SOD 抑制率结果

3.3.2 淀粉酶测定结果

在本试验中，淀粉酶活力测量值为 $(7.5 \pm 0.4)U/$



mL。这一结果表明：普洱铁皮石斛酵素不能有效地分解淀粉。

3.2.3 脂肪酶测定结果

在本试验中，脂肪酶活力测量值为 $(1.6 \pm 0.28)U/mL$ 。这一结果表明：普洱铁皮石斛酵素不能有效地消化脂肪。

4 结语

本试验运用全自动氨基酸分析仪测定类普洱铁皮石斛酵素的成分，结果表明：普洱铁皮石斛酵素几乎含有所有人体必需的氨基酸，肌肽的含量特别高，超过其在牛肉内的含量，说明普洱铁皮石斛酵素对补给人体氨基酸、美白与抗衰老等方面都可以有深入的探究和应用。试验还利用 DPPH 与 ABTS 两种不同自由基体系及三种酵素内酶活力试验，深入分析了该酵素清除自由基的能力与内酶活力的强弱。研究显示，每毫升浓度为 10% 的铁皮石斛酵素的清除 DPPH 自由基能力等价于每毫升的浓度为 0.0135mmol/L 的 Vc，石斛酵素的总抗氧化能力等价于浓度为 1.9310mmol/L 的 Vc。虽然在酵素体积不断增大时，SOD 抑制率也逐渐增大，但是两者并没有呈现线性关系。当酵素体积达到 0.2ml 时，SOD 抑制率的增加逐渐平缓，当酵素体积达到 0.4ml 时，SOD 抑制率达到了 82.68%，证明普洱铁皮石斛酵素有很高的总抗氧化能力、DPPH 自由基去除能力、ABTS 自由基去除能力和 SOD 抑制能力。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:282-283.

[2] 吕圭源, 颜美秋, 陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013,38(04):489-493.

[3] 陈丽君, 陈朝银, 赵声兰. 传统药用酵素 [J]. 药物生物技术, 2016,23(02):183-188.

[4] 陈丹. 浅论食用酵素 [J]. 食品研究与开发, 2016,37(12):210-214.

[5] 刘加友. 富含 γ -氨基丁酸葛根酵素发酵及其解酒功效的研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016:21-25.

[6] 艾学东, 胡丽娜. 水果植物复合酵素饮料的研制 [J]. 食品与发酵科技, 2015,51(02):105-108.

[7] 苗雨田, 杨悠悠, 王浩, 刘佟, 杨永坛. 全自动氨基酸分析仪测定不同年份黄酒中游离氨基酸的含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015,6(04):1154-1161.

[8] 张村雪, 朱渭兵, 李志西, 等. 紫甘薯醋及其不同发酵阶段产物的抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2013,34(11):88-93

[9] 李洋, 马文平, 倪志婧. 宁夏枸杞体外抗氧化机制研究 [J]. 食品科学, 2014,35(1):79-84

[10] 上海市医学化验所. 临床生化检验(上册)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979:366-368

[11] 张威, 蔡建美, 康志敏, 孙学军. 氢分子医学研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2009,30(10):1203-1205.

[12] 米增法, 高优, 杨新蕾, 孟红阳, 郭志谦, 雷磊, 江碧川, 张新合. 氢分子医学的研究进展 [J]. 医学综述, 2013,19(19):3481-3484.

(上接第113页)品,质量、保质期、营养和功能、安全,受到生产工艺、设备的限制和国家各级职能部门的管理与监督。作为乳制品企业,不应依靠高价引进国外技术与设备,生产一些无营养的乳饮品和需要引进菌种的难以保存的乳酸菌饮料,应在引进的工艺和设备上再加改良、创新。我们对引进的国外工艺与设备,在学习的基础上作了改良与创新,研制出能隔离《氧气》空气的无菌罐。在灌装设备进一步改造中,《灌装设备增加包装排气功能》即可生产出不含空气的乳饮品,提高了乳饮品的品味,延长了质保期。与新兴学科氢分子医学联姻,以对气体具

有超强亲和力的乳品为氢气的载体,生产出含氢量高的乳饮品及衍生产品,使饮用者获得营养的同时,达到氢分子医学效应,减轻了医疗机构的压力,使广大饮用者少生病,增强免疫力。

参考文献

[1] 张威, 蔡建美, 康志敏, 孙学军. 氢分子医学研究进展 [J]. 第二军医大学学报, 2009,30(10):1203-1205.

[2] 米增法, 高优, 杨新蕾, 孟红阳, 郭志谦, 雷磊, 江碧川, 张新合. 氢分子医学的研究进展 [J]. 医学综述, 2013,19(19):3481-3484.

