

油菜蜂花粉酶解物抗氧化性能的研究

朱晓丽, 孙丽萍*, 董捷, 张智武, 张红城

(中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要: 对油菜蜂花粉酶解物和水提物进行了体外抗氧化实验。结果表明, 花粉酶解物具有良好的抗氧化功能, 在 50mg/ml 浓度下对超氧阴离子自由基、羟自由基和脂质过氧化的抑制率分别达到 87.4%、61.2% 和 95.9%。比较酶解物和水提物抗氧化性能可知, 酶解物清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力明显高于水提物, 在 50mg/ml 时, 对羟自由基的抑制率比水提物高约 30%, 清除超氧阴离子自由基的能力高约 20%, 而抑制脂质过氧化的能力与水提物之间无明显差异。

关键词: 油菜蜂花粉酶解物; 水提物; 羟自由基; 超氧阴离子自由基; 脂质过氧化

Antioxidant Activities of Enzymatic Hydrolysates of Bee Collected Rape Pollen

ZHU Xiao-li, SUN Li-ping*, DONG Jie, ZHANG Zhi-wu, ZHANG Hong-cheng

(Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates of bee collected rape pollen (BCRP) was studied *in vitro*. Superoxide anion radical, hydroxyl radical and lipid peroxidation are found to be inhibited by 87.4%, 61.2% and 95.9% respectively with the concentration of enzymatic hydrolysates of BCRP at 50 mg/ml. Compared with the water extract of BCRP, the enzymatic hydrolysates of BCRP demonstrate higher capabilities in scavenging superoxide anion radicals and hydroxyl radicals and similar effects in the inhibition of lipid peroxidation.

Key words bee collected rape pollen (BCRP); water extract of bee collected rape pollen; hydroxyl radical; superoxide anion radical; lipid peroxidation

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0074-03

机体氧化反应中产生的有害化合物, 具有强氧化性, 可损害机体的组织和细胞, 进而引起慢性疾病及衰老效应。人体在正常及病理过程中均有自由基参与反应, 自由基参与各种发病机理, 如人体的衰老、癌症及各种心血管疾病等^[1]。蜂花粉是蜜蜂采集植物雄蕊花药的团状物质, 具有植物发育所需要的全部营养物质, 被称为“最全面的营养库”。蜂花粉含有丰富的蛋白质、氨基酸、多糖、维生素及黄酮类化合物等生理功能物质, 具有预防衰老、养颜美容、增强免疫功能、抗缺氧等功能, 同时对心脑血管病、前列腺疾病、肝病、习惯性便秘、贫血、糖尿病等有一定治疗和辅助治疗功能^[2]。蜂花粉的生理功能与其中所含的抗氧化物质密切相关, 因此, 研究蜂花粉中抗氧化活性物质具有非常重要的意义。

在前期实验中我们采用不同类型的蛋白酶对油菜蜂花粉进行酶解, 以水解度为指标得出碱性蛋白酶对油菜蜂花粉的酶解效果较好。因此, 本实验采用碱性蛋白酶

对蜂花粉进行酶解, 对酶解物的抗氧化性能进行了体外实验, 并将其抗氧化能力与蜂花粉水提物的抗氧化能力进行了比较, 以考察酶解对蜂花粉抗氧化性能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和设备

1.1.1 材料

破壁油菜蜂花粉; 大豆卵磷脂; 抗超氧阴离子自由基测试盒; 脂质体分散体系; 三氯醋酸-硫代巴比妥酸-盐酸混合液(TCA-TBA-HCl 混合液), 其它试剂均为分析纯。

1.1.2 设备

凯氏定氮法消化装置; 半微量法蒸馏装置; 恒温水浴锅; 低速大容量离心机; 精密电子天平 AL204; pH 计。

1.2 方法

收稿日期: 2007-03-29

*通讯作者

基金项目: 中国农业科学院科技基金项目

作者简介: 朱晓丽(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生化。

1.2.1 样品的制备

1.2.1.1 酶解物的制备

称取一定量的破壁花粉,以料水比1:10(即蛋白含量为3%)加入所需pH值的缓冲体系中,混匀,调节温度50℃,加入一定量的碱性蛋白酶进行水解。反应3h后,90℃灭酶10min,在4000r/min下离心15min,上清液冷冻干燥,备用。

1.2.1.2 水提物的制备

称取一定量的破壁花粉,以料水比1:10,混匀,调节温度50℃,反应3h后,在4000r/min下离心15min,上清液冷冻干燥,备用。

1.2.2 抗氧化实验方法

称取一定量的干燥样品,按照实验要求配成一定浓度的液体,进行抗氧化实验。

1.2.2.1 清除超氧阴离子自由基实验

采用抗超氧阴离子自由基测试盒,模拟人体中黄嘌呤氧化酶反应体系产生超氧阴离子自由基。当被测样品中含有 O_2^- 清除剂时,反应体系中 O_2^- 的量随之减少,颜色发生变化。按照表1进行加样,充分混匀,置于37℃恒温水浴40min,分别加入2.0ml显色剂,混匀后静置10min,以蒸馏水作空白,测定 OD_{532} 。

表1 超氧阴离子自由基体系活性测定加样量
Table 1 Loading of superoxide anion radical system

处理	试剂一	样品	试剂二	试剂三	试剂四
对照管(ml)	1.0	0.05(后加)	0.1	0.1	0.1
测定管(ml)	1.0	0.05	0.1	0.1	0.1

$$\text{抑制率}(\%) = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) \times 100 / A_{\text{对照}}$$

式中, $A_{\text{对照}}$ 为试管中样品待加入显色剂后添加的吸光度; $A_{\text{测定}}$ 为加入样品的吸光度。

1.2.2.2 清除羟自由基实验^[3]

试管中依次加入50mmol/L pH7.4的PBS 0.4ml,0.1ml一定浓度的样品A,1.04mmol/L EDTA 0.1ml,1mmol/L $FeSO_4$ 0.1ml,1mmol/L VC 0.1ml,10mmol/L H_2O_2 0.1ml,60mmol/L 脱氧核糖(DR)0.1ml,定容到1.0ml,37℃水浴加热60min,然后加入2.0ml的TCA-TBA-HCl混合液,100℃沸水加热15min,5000r/min离心10min,以蒸馏水作空白,测定 OD_{532} 。

$$\text{抑制率}(\%) = [A_{\text{对照}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{样品}})] \times 100 / A_{\text{对照}}$$

式中, $A_{\text{对照}}$ 为以溶剂代替样品的吸光度; $A_{\text{测定}}$ 为加入DR和样品的吸光度; $A_{\text{样品}}$ 为以蒸馏水代替DR,加入样品的吸光度。

1.2.2.3 抑制脂质过氧化实验^[4]

样品管中依次加入0.2ml卵磷脂、样品1.0ml、50 μ l $FeSO_4$ (347.5mg硫酸亚铁,35mg抗坏血酸,定容

到25ml)加PBS缓冲液定容到3ml,37℃水浴加热40min,每5min摇匀一次,然后加入2.0ml的TCA-TBA-HCl混合液。100℃沸水加热15min,5000r/min离心10min,以蒸馏水作空白,测定 OD_{532} 。

$$\text{抑制率}(\%) = [A_{\text{对照}} - (A_{\text{测定}} - A_{\text{样品}})] \times 100 / A_{\text{对照}}$$

式中, $A_{\text{对照}}$ 为以溶剂代替样品的吸光度; $A_{\text{测定}}$ 为加入卵磷脂和样品的吸光度; $A_{\text{样品}}$ 为以PBS代替卵磷脂,加入样品的吸光度。

2 结果与分析

2.1 清除羟自由基能力

油菜蜂花粉酶解物和水提物清除羟自由基实验结果如图1所示。两者清除羟自由基能力的趋势基本相同,在低浓度时,清除羟自由基的能力随液体量的变化较大,而在高浓度时变化则不是很明显。在50mg/ml浓度时,酶解物对羟自由基的抑制率达到87.4%,而水提物对羟自由基的抑制率仅为68.4%。通过酶解,花粉提取物清除羟自由基的能力增加了近20%,这说明,酶解油菜蜂花粉能够显著提高其清除羟自由基的能力。

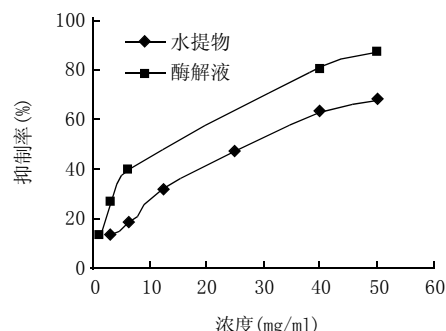


图1 油菜蜂花粉酶解物和水提物清除羟自由基效果
Fig.1 Effects of scavenging hydroxyl radical

2.2 抗超氧阴离子自由基实验

油菜蜂花粉酶解物和水提物抗超氧阴离子自由基实验结果如图2所示,两者均有抗超氧阴离子自由基的能力。低浓度时,酶解物的抗超氧阴离子自由基能力随浓度的增加迅速增强,达到25mg/ml后抗超氧能力增加

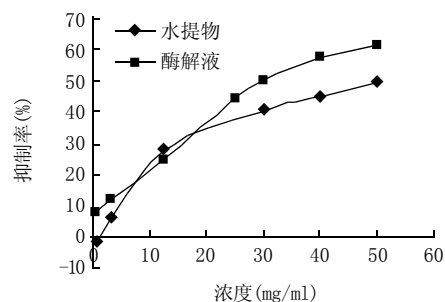


图2 油菜蜂花粉酶解物和水提物抗超氧阴离子自由基效果
Fig.2 Effects of scavenging superoxide anion radical

趋于缓慢。水提物在浓度小于 12.5mg/ml 时抗氧化能力随浓度的增加而快速增加, 达到 12.5mg/ml 后增加缓慢。在 50mg/ml 浓度时酶解物对超氧阴离子自由基的抑制率达到 61.2%, 而水提物对羟自由基的抑制率仅为 49.8%, 酶解物抗超氧阴离子自由基的能力增加了近 10% 以上。由此可见, 蜂花粉酶解后能够显著提高其抗超氧阴离子自由基的能力。

2.3 抑制脂质过氧化实验

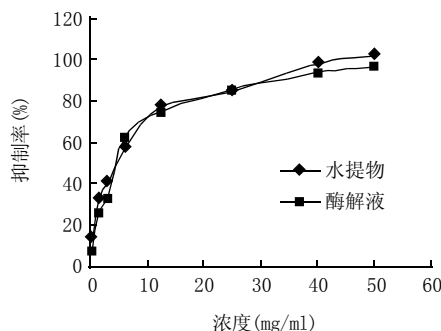


图3 油菜蜂花粉酶解物和水提物抑制脂质过氧化效果
Fig.3 Effects of scavenging lipid peroxidation

油菜蜂花粉酶解物和水提物抑制脂质过氧化实验结果如图3所示, 两者均有抑制脂质过氧化的能力, 且趋势基本相同。浓度为 12.5mg/ml 时, 蜂花粉酶解物和水提物对脂质过氧化的抑制已接近 80%。当浓度超过该浓度后, 两者随浓度的增大对脂质过氧化的抑制能力增加趋势变化也不是很大。在 50mg/ml 浓度时, 酶解物和水提物对脂质过氧化的抑制率都在 95% 以上。两者抑制脂质过氧化能力差异不显著, 这说明花粉酶解后并没有减弱其抑制脂质过氧化的能力。

2.4 酶解物和水提物的抗氧化能力分析

EC_{50} 即半数有效浓度, 是指引起 50% 试验动物产生某一特定反应, 或是某反应指标被抑制一半时的浓度, 浓度越低, 说明其抑制能力越强。通过比较酶解物和水提物对不同抗氧化模型作用的 EC_{50} 值可以比较两者的抗氧化能力。酶解物和水提物对清除自由基的 EC_{50} 如表 2 所示。

表2 酶解物和水提物对清除自由基的 EC_{50}

Table 2 Scores of EC_{50} of enzymatic products and water extracts

EC_{50} (mg/ml)	清除超氧阴离子自由基	清除羟自由基	抑制脂质过氧化
酶解物	30.88	9.28	4.06
水提物	53.27	24.23	3.31

由表 2 可以看出, 酶解物和水提物对这三种抗氧化模型的作用中, 抑制脂质过氧化的 EC_{50} 值最低, 即抑制脂质过氧化的能力最强, 并且两者抑制脂质过氧化的能力没有明显的差异, 但是两者清除超氧阴离子自由基和羟自由基的能力相对弱些。在这三种抗氧化模型中, 水提物的 EC_{50} 值较高, 尤其是清除超氧阴离子自由基和

羟自由基的 EC_{50} 值, 而酶解物的 EC_{50} 值较低, 两者相比较, 水提物的 EC_{50} 值接近酶解物的 3 倍, 清除超氧阴离子自由基的 EC_{50} 值也接近 2 倍。根据以上数据得出: 油菜蜂花粉酶解后清除超氧阴离子自由基和羟自由基的能力明显地增加, 并且没有减弱其抑制脂质过氧化的能力。

3 讨论

生物体内的许多具有抗氧化活性的物质属于蛋白质类。由于蛋白质具有优良的乳化特性, 能在油水界面起介导作用, 因此其在清除生物体内过量自由基, 抑制膜脂质过氧化方面具有重要意义。随着营养学和生物技术的发展, 人们发现, 介于蛋白质和氨基酸间的肽类由于结构特点, 与其他生物分子如氨基酸、大分子蛋白质等相比较, 食用安全性更高, 且具有极强的活性和多样性, 其抗氧化性相比于蛋白质和氨基酸往往更为显著^[5]。

生物科学的发展表明采用各种酶或微生物水解动植物原料蛋白的水解产物中存在多种抗氧化肽, 它们的抗氧化活性与原料蛋白相比更强。目前, 人类充分利用各种生化手段对优质蛋白如大豆蛋白、乳酪蛋白和肉类蛋白等, 海洋资源蛋白以及废弃蛋白资源进行水解得到了抗氧化能力较强的多肽。

油菜蜂花粉是一种营养充分, 搭配合理的保健食品, 我国油菜花粉资源丰富, 产量大, 并且油菜蜂花粉的蛋白含量非常丰富。我们前期的实验表明蜂花粉蛋白的抗氧化性较弱, 为了充分利用蜂花粉蛋白, 本实验利用蛋白酶水解油菜破壁花粉, 将花粉中大分子的蛋白降解, 酶解后的花粉提取物的抗氧化效果好于未酶解的花粉提取物, 尤其是清除超氧阴离子和羟自由基的能力得到显著的提高, 其抑制能力分别提高 20% 和 30% 左右。其抗氧化效果好的原因可能是由于酶解后花粉中一些大分子的难溶性或水不溶性蛋白降解为小分子的多肽, 多肽的溶解性大于大分子的蛋白, 使水溶液中可溶性氮的比率由未水解前的 3% 增加到 50% 以上, 活性多肽使得酶解物的抗氧化能力增强。基于以上因素, 我们将进一步研究酶解物中的物质组成变化, 并对其各种生理功能进行全面的评价。

参考文献:

- [1] KNIGHT J A. Diseases related to oxygen-derived free radicals[J]. Ann Clin Lab Sci, 1995, 25(2): 111-121.
- [2] 杨晓萍, 罗祖友, 吴谋成. 油菜花粉多糖提取工艺条件研究[J]. 食品科学, 2004, 25(9): 128-131.
- [3] 厉闻, 曹炜, 宋纪蓉. 蜂花粉提取物抗氧化作用的研究[J]. 西北大学学报: 自然科学网络版, 2004(2): 1-6.
- [4] 吕晓玲, 朱惠丽, 姜平平, 等. 紫苏提取物抗氧化活性体外实验研究[J]. 中国食品添加剂, 2003(5): 22-25.
- [5] 周雪松. 水解蛋白来源的抗氧化肽研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005(6): 84-87.