

酿酒酵母检验黑胡椒挥发油抗氧化活性研究

张玲玲¹, 张 鹏², 李士明³, 赵 辉^{1,*}

(1.天津商业大学 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134; 2.海南大学环境与植物保护学院, 海南 海口 570228;
3.黄冈师范学院 湖北省经济林种质资源改良与资源重点实验室, 湖北 黄冈 438000)

摘 要: 采用超临界CO₂流体萃取技术提取黑胡椒挥发油 (black pepper oil, BPO), 应用气相色谱-质谱联用技术对BPO进行分析, 采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基清除法和还原能力法对BPO进行了体外抗氧化活性检验, 并且采用酿酒酵母对BPO进行体内抗氧化活性检验。结果表明BPO主要成分为胡椒碱 (40.2%), BPO对DPPH自由基的清除能力和还原能力略低于二丁基羟基甲苯和抗坏血酸。而且BPO不同程度地提高了CCl₄、H₂O₂和CdSO₄氧化应激胁迫下酵母细胞的存活率; 较明显地降低了氧化应激胁迫下酵母细胞内氧化和膜脂质过氧化水平。实验结果还表明BPO抵抗脂质过氧化的机制很有可能与基因*ctt1*编码的过氧化氢酶有关。

关键词: 黑胡椒挥发油; 抗氧化; 酿酒酵母; 脂质过氧化; 细胞内氧化

Antioxidant Activity of Black Pepper Oleoresin Evaluated Using *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Lingling¹, ZHANG Peng², LI Shiming³, ZHAO Hui^{1,*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;
2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China;
3. Hubei Provincial Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, China)

Abstract: Black pepper oleoresin (BPO) was extracted using supercritical CO₂ fluid extraction, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant activity of BPO was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay and reducing capacity assay. In addition, *Saccharomyces cerevisiae* was used to determine its antioxidant activity *in vivo*. The results indicated that the main constituent of BPO was piperine (40.2%) and its DPPH radical scavenging capacity and reducing power were a bit lower than those of butylated hydroxytoluene (BHT) and VC. BPO increased the survival rates of *Saccharomyces cerevisiae* under the stress of CCl₄, H₂O₂ and CdSO₄ to different extents, and significantly decreased the levels of cellular oxidation and lipid peroxidation under oxidative stress. Additionally, our results showed the catalase encoded by the *ctt1* gene may be involved in the mechanism of action of BPO against lipid peroxidation.

Key words: black pepper oleoresin; antioxidant; *Saccharomyces cerevisiae*; lipid peroxidation; cellular oxidation

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201623009

中图分类号: F323.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 23-0051-06

引文格式:

张玲玲, 张鹏, 李士明, 等. 酿酒酵母检验黑胡椒挥发油抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 51-56. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201623009. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Lingling, ZHANG Peng, LI Shiming, et al. Antioxidant activity of black pepper oleoresin evaluated using *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Science, 2016, 37(23): 51-56. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201623009. <http://www.spkx.net.cn>

黑胡椒, 胡椒科植物胡椒 (*Piper nigrum* L., PN), 是一种开花藤本植物, 主要生长在高温和湿润的地区, 在我国主要种植在海南省。黑胡椒果实晒干之后通常作

为香料和调味料使用。黑胡椒经过超临界流体或者水蒸馏法提取可以得到黑胡椒挥发油 (black pepper oil, BPO)。BPO含有丰富的天然活性产物, 在食品和饮料

收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31571832; 81172837); 天津市农产品加工新工艺及相关机理研究创新团队项目 (TD12-5049)

作者简介: 张玲玲 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: Tjcu408@Gmail.com

*通信作者: 赵辉 (1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物制药。E-mail: zhaohui@tjcu.edu.cn

加工等方面被广泛使用^[1]。由于BPO富含胡椒碱和挥发油成分(水芹烯、柠檬烯、石竹烯和 β -蒎烯等)等风味物质,因而具有强烈芳香和刺激性辣味,BPO兼有除臭、杀菌作用,还可以促进胃肠蠕动,加速血液循环^[2]。最近几年关于BPO抗氧化的研究越来越多,研究方法主要基于BPO总抗氧化能力、清除超氧阴离子自由基能力、清除羟自由基能力、铁离子还原能力和抗亚油酸脂质过氧化能力等几种检测体系^[2],而这些体外检测体系只能初步的评价BPO的抗氧化能力,很难表征BPO在生物体内的抗氧化能力。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)广泛应用于酿酒、食品和饮料加工,同时也是一种被广泛应用的真核模式生物。人体中很多具有重要生物学意义的蛋白,如细胞周期蛋白、信号蛋白和蛋白形成酶等在酿酒酵母细胞内都存在。众多研究发现酵母基因与许多涉及人类遗传性疾病的基因有很高的同源性,因此通过研究这些基因及其编码蛋白的生理功能及它们与其他蛋白的相互作用能极大地帮助我们了解这些疾病,以便更有效地对相关疾病进行防治^[3-4]。酵母细胞和人体细胞的抗氧化机制相似,而且酵母生长代谢周期规律短暂,这些使得酵母成为抗氧化研究的新模式生物^[5]。

大量的研究发现,代谢紊乱产生的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)是引起心脑血管疾病、阿兹海默症、II-型糖尿病和肥胖等疾病的重要因素,而这些疾病已经严重影响了人类的身体健康。ROS和RNS在细胞内可以引起蛋白变性,膜脂质过氧化和DNA损伤,最终导致细胞死亡^[6-8]。为了保护人类健康,新型天然抗氧化剂的开发和利用越来越成为人们关注的热点。本研究采用真核模式生物*S. cerevisiae*野生型及其同源性基因缺陷型菌株sod1、ctt1、gsh1、gtt1和gtt2在H₂O₂、CCl₄和CdSO₄氧化应激胁迫下对BPO进行体内抗氧化活性检验,探索BPO在酵母体内的抗氧化活性,为后续的功能食品和保健品开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

琼脂粉 北京奥博星生物技术有限责任公司; LP0021酵母提取物 英国Oxoid公司; J636-1KG蛋白胨、D-葡萄糖 美国Amresco公司; 酸洗玻璃珠 北京索莱宝科技有限公司; 三氯乙酸(分析纯) 成都市科龙化工试剂厂; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 北京中生瑞泰科技有限公司; 抗坏血酸(VC)、2,6-二叔丁基对甲酚(butylated hydroxytoluene, BHT)、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、H₂O₂、CCl₄、CdSO₄等其他试剂均为国产分析纯。

野生型(wild type, WT) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741(MATa, his3, leu2, met15和ura3)及其同源性基因缺陷型菌株sod1、ctt1、gsh1、gtt1和gtt2由巴西南卡希亚斯大学教授Marcos D Pereira赠送。其中sod1编码细胞质超氧化物歧化酶; ctt1编码过氧化氢酶T; gsh1编码谷胱甘肽; gtt1和gtt2是编码谷胱甘肽硫转移酶的同工酶。

1.2 仪器与设备

P300超微量分光光度计 德国IMPLEN公司; Legend micro 17R离心机 美国Thermo公司; LH-12型固液两用超临界萃取制备系统 青岛利和萃取科技有限公司; 7890/5975C-GC/MSD气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)联机检测设备 安捷伦科技有限公司; SW-CJ-1F型单人双面净化工作台、BLB-1000洁净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; HK-180不锈钢万能粉碎机 广州旭朗机械设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 BPO的提取

取黑胡椒样品,干燥后粉碎,过20目筛。取400 g黑胡椒粉末与萃取釜中,以CO₂作为萃取介质,通过高压泵持续打压,使CO₂达到7.35 MPa、分离温度35~40℃,萃取2 h后从分离釜中收集萃取物,得黑褐色稠膏状物,称质量,计算回收率。

1.3.2 供试样品溶液制备

取1 g黑胡椒超临界萃取物,加10 mL无水乙醇溶解,摇匀得到100 mg/mL的母液。

1.3.3 GC-MS分析条件

色谱条件:色谱柱HP-5毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μ m);升温程序:初始温度为60℃,10℃/min升温至130℃,保持5 min,10℃/min升温至180℃,保持3 min,20℃/min升温至270℃,保持5 min结束;载气为高纯氮气,流速为1 mL/min,分流比20:1,溶剂延迟3 min。

质谱条件:电子电离(electronic ionization, EI)源,电离能70 eV,离子源温度230℃,界面温度250℃,质量扫描范围范围m/z 50~550 u。

1.3.4 清除DPPH自由基能力的测定

参考并优化了Joshi等^[9]的方法。用无水乙醇分别配制质量浓度为0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL的BPO溶液、2 mg/mL的BHT溶液和VC溶液作为样品溶液。然后将2 mL样品溶液和2 mL DPPH溶液(1.0×10⁻⁴ mg/mL)混合,混匀后暗处理0.5 h,以无水乙醇作参比,测定517 nm波长处的吸光度A,测定2 mL样品溶液和2 mL无水乙醇混合后溶液在517 nm波长处的吸光度A₀,同时测定2 mL DPPH溶液与2 mL无水乙醇混合液在517 nm波长处的吸光度A₁。根据下式计算DPPH自由基清除率:

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_1 + A_0 - A}{A_1} \times 100$$

1.3.5 还原能力测定

BPO还原能力测定参考并优化李慎新等^[10]的测定方法。取2.5 mL样品溶液, 2.5 mL磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 6.6)和2.5 mL铁氰化钾溶液(0.01 g/mL)混合, 摇匀之后放置于50 ℃水浴20 min, 迅速冷却。再加入2.5 mL三氯乙酸(0.1 g/mL), 3 000 r/min室温条件下离心10 min, 取上清液2.5 mL, 分别加入2.5 mL蒸馏水及0.5 mL三氯化铁溶液(0.1 g/mL), 混合均匀。静置10 min后, 于700 nm波长处测定其吸光度。平行测定3次, 吸光度越大表示待测样品的还原能力越强。

1.3.6 BPO对酵母细胞在氧化应激胁迫下存活率的影响

通过平板涂布法测定酵母的存活率来检测BPO的抗氧化活性^[11]。挑取单菌落接种于液体酵母膏腺葡萄糖琼脂(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基中, 28 ℃, 200 r/min摇床过夜培养。用无菌生理盐水稀释细胞悬浮液至OD_{600 nm}=1。取1 mL细胞悬液转移至9 mL含有不同质量浓度样品(25、50 μg/mL)的YPD培养基中, 涡旋振荡15 s后, 28 ℃, 200 r/min摇床培养2 h。然后, 在培养液中分别加入终浓度为2.0、10、2.5 mmol/L的H₂O₂、CCl₄和CdSO₄。涡旋振荡15 s后, 摇床培养1 h。取各处理的酵母细胞悬液, 分别稀释1 000倍, 取稀释后的细胞悬液100 μL均匀涂布在固体YPD培养基中。放置于生化培养箱中, 28 ℃, 倒置培养72 h。计数菌落个数, 每个处理方法做3个平行实验。以未应激对照组酵母细胞的存活率为100%, 计算各处理组的菌株存活率。

1.3.7 BPO对酵母细胞的脂质过氧化水平的影响

采用硫代巴比妥酸(thiobarbituri acid, TBA)法测定脂质过氧化水平^[11]。取OD_{600 nm}=1的酵母细胞悬浮液1 mL转移至9 mL含有不同质量浓度样品(25、50 μg/mL)的新鲜液体YPD培养基中, 培养2 h后, 分别加入终浓度为2.0、10、2.5 mmol/L的H₂O₂、CCl₄和CdSO₄。继续培养1 h后, 将酵母细胞培养液离心, 弃上清液, 取沉淀, 洗涤2次。取50 mg细胞沉淀重新悬浮在0.5 mL三氯乙酸(0.1 g/mL)中, 加入1.5 g酸洗玻璃微珠。使用涡旋振荡器振荡破碎细胞。然后离心, 取上清液, 加入0.1 mL EDTA(0.1 mol/L), 0.6 mL巴比妥酸(0.01 g/mL)。将上述混合物沸水浴15 min, 然后迅速冰浴, 待其冷却后, 532 nm波长处测定吸光度。每个处理做3个平行实验。酵母细胞脂质过氧化水平是以经氧化应激胁迫后BPO处理或者未处理的过氧化水平与对照组(未加BPO, 未氧化应激胁迫)过氧化水平的比值来表示。

1.3.8 BPO对酵母细胞胞内氧化水平的影响

通过2',7'-二氯二乙酸酯荧光探针法测定酵母细胞内过氧化水平, 参考并优化Dani等^[11]的方法。取OD_{600 nm}=1的酵母细胞悬浮液1 mL转移至9 mL含有不同质量浓度样品(25、50 μg/mL)的新鲜液体YPD培养基中, 培养2 h后, 分别加入终浓度为2.0、10、2.5 mmol/L的H₂O₂、CCl₄和CdSO₄。培养1 h后, 加入40 μL 2',7'-二氯二乙酸酯

探针溶液(5 mmol/L), 继续培养15 min后, 将酵母细胞培养液3 000 r/min室温条件下离心5 min, 弃上清液, 取沉淀, 洗涤2次, 加入50 mL去离子水和1.5 g酸洗玻璃微珠后涡旋破碎细胞。然后25 000 r/min离心5 min, 取上清液150 μL, 加入750 μL去离子水(稀释6倍), 混匀后, 取200 μL混合液加入96孔黑色微孔板, 置于酶标仪中, 在激发光504 nm和发射光524 nm条件下测定吸光度。每个处理3组平行。酵母细胞胞内氧化水平是以经氧化应激胁迫后BPO处理或者未处理的过氧化水平与对照组(未加BPO, 未氧化应激胁迫)过氧化水平的比值来表示。

1.4 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过Duncan's法分析显著性差异。

2 结果与分析

2.1 BPO的GC-MS分析结果

表1 黑胡椒CO₂超临界萃取物的化学成分
Table 1 Chemical components of BPO extracted by supercritical CO₂ extraction

序号	化合物名称	分类	匹配度/%	保留时间/min	相对含量/%
1	桉烯	烯类	90	5.25	1.1
2	α -水芹烯	萜类	94	5.84	3.0
3	α -蒎烯	萜类	91	5.94	2.1
4	4-萜烯	烯类	87	6.19	0.5
5	3-萜烯	烯类	92	6.34	3.4
6	D-柠檬烯	萜类	93	6.64	7.2
7	育亨宾	酯类	72	7.71	1.2
8	3-乙基环己烯	烯类	76	9.40	0.9
9	4-甲基环己烯	烯类	70	11.00	0.7
10	1,2,3,4,4a,7,8,8a-八氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)萘	萜类	89	11.19	0.2
11	萜烯油烯	烯类	93	11.64	2.2
12	石竹烯	萜类	82	12.27	8.7
13	α -石竹烯	萜类	57	12.75	0.4
14	雪松烯	烯类	76	13.25	0.7
15	甜没药烯	烯类	83	13.30	0.5
16	杜松萜烯	萜类	89	13.48	1.1
17	α -愈创木烯	杂环类	92	14.90	0.2
18	1,2,3,4,4a,7,8,8a-八氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-1-萘酚	萜类	84	15.11	0.9
19	十六烷酸	烷烃类	74	18.56	1.0
20	油酸乙酯	酯类	83	20.21	2.1
21	硬脂酸	脂肪酸类	59	20.43	0.8
22	亚油酸乙酯	酯类	69	21.03	0.5
23	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	含苯环类	77	22.47	0.6
24	间苯氧基苯甲醛	含苯环类	81	24.24	0.4
25	4-硝基苯基-3-茴香酸乙酯	酯类	92	24.54	1.4
26	9-十八烯酸-2-(十八烷氧基)乙酯	酯类	81	25.50	1.5
27	去甲吗啡	含苯环类	49	27.32	0.3
28	胡椒碱	嘧啶类	97	27.81	40.2
29	2,4,6,8-十四碳四烯酸-9-甲酰-10-氧乙酯	酯类	74	28.44	0.8
总计					84.6

从黑胡椒超临界CO₂萃取物中, 共分离得到29个组分, 其中以胡椒碱含量(40.2%)最高, 其次是石竹

烯(8.7%)、*D*-柠檬烯(7.2%)、3-萜烯(3.4%)和 α -水芹烯(3.0%) (表1)。胡椒中的主要活性物质是胡椒碱(piperine),它属于桂皮酰胺类生物碱,是胡椒中的特征性辣味成分,具有抗氧化、抗肿瘤、促进药物代谢等作用,此外还具有镇静催眠和抗抑郁等效果,对炎症和疼痛也有一定的缓解效果^[12-14]。王勇^[15]和陈建华^[16]等的研究表明超临界CO₂萃取得到的BPO能最大限度地保留胡椒中的有效成分,而且该法对胡椒碱的提取率可高达65.79%。最新的研究表明胡椒碱有可能通过影响树突细胞的迁移和功能来治疗树突细胞诱发的自身抗原和移植抗原病变^[17]。胡椒碱可以通过激活白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-8和MMP-13的表达来抑制发炎、牙周骨质丢失、骨微观结构和胶原纤维退化等^[18]。而且胡椒碱可以通过调节NF- κ B通路改善脂多糖诱导的急性肺损伤^[19]。可见胡椒碱的生物活性是很高的,其应用范围在不断的拓展,对胡椒碱不断地开发利用可能对人类健康带来极大的好处。

2.2 BPO清除DPPH自由基能力

DPPH自由基清除法是目前广泛被接受的一种测定生物样品体外抗氧化能力的方法。DPPH在有机溶剂中形成紫红色、稳定的自由基,与抗氧化剂反应生成无色产物,导致溶液的特征吸收峰下降,吸光度变小。

BPO、BHT和VC 3种抗氧化剂对DPPH自由基的清除能力如表2所示。由表2可知BPO的抗氧化活性随着质量浓度的增加而增加,BPO对DPPH自由基的清除能力略低于VC和BHT。当质量浓度都为1 mg/mL时,BPO对DPPH自由基的清除能力大约为VC的56%和BHT的66%。莫峥嵘等^[20]的研究表明,胡椒碱对DPPH自由基的清除能力大约相当于VC的60.5%。表1表明BPO中胡椒碱的含量为40.2%,以VC作为参比,推算胡椒碱在BPO清除DPPH自由基的反应中贡献大约43%的清除能力。此外,还有研究表明柠檬烯等挥发性物质也具有较强DPPH自由基清除能力^[21]。

表2 BPO对DPPH自由基的清除率
Table 2 DPPH radical scavenging capacity of BPO

样品	质量浓度/(mg/mL)	清除率/%
BPO	0.50	38.95 \pm 0.32
	0.75	48.31 \pm 0.55
	1.00	53.26 \pm 0.43
	1.25	65.02 \pm 0.27
	1.50	70.97 \pm 0.30
BHT	1.00	80.87 \pm 0.14
VC	1.00	94.01 \pm 0.23

2.3 BPO还原能力

还原能力是表示抗氧化剂提供电子能力的重要指标,它可以通过提供电子来中断自由基的连锁反应,使自由基变为稳定的物质。因此,还原能力与抗氧化能力存在着联系^[22]。

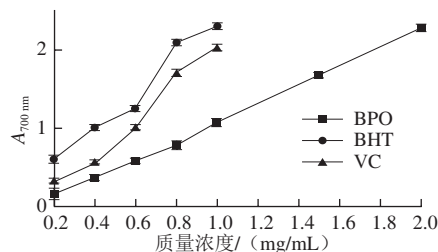
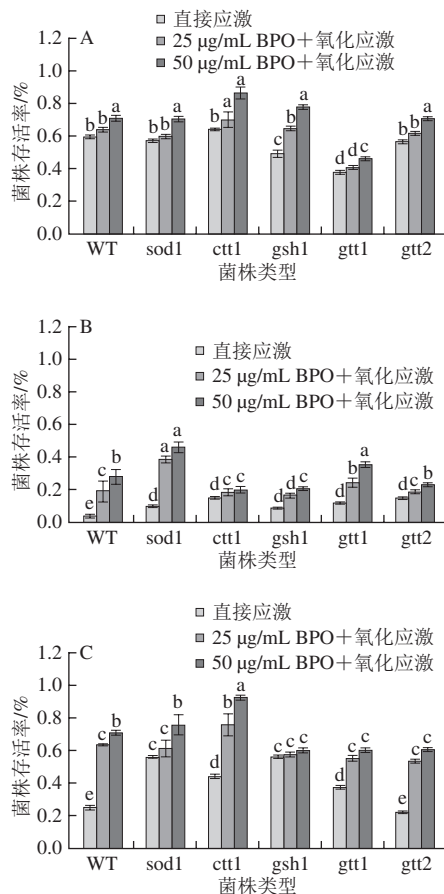


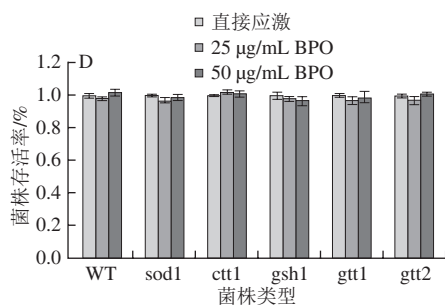
图1 BPO的还原能力

Fig. 1 Reducing capacity of BPO

BPO的还原能力测定结果如图1所示,VC和BHT在0.0~1.0 mg/mL质量浓度范围内与还原能力呈显著的量效关系;BPO在0.0~2.0 mg/mL质量浓度范围内也与还原能力表现出显著的量效关系。它们的还原能力为:BHT>VC>BPO。当BPO质量浓度达到2.0 mg/mL时的还原能力略高于质量浓度1.0 mg/mL VC的还原能力。

2.4 BPO对酵母细胞氧化应激胁迫下的保护作用





A~C. 分别为CdSO₄、H₂O₂、CCl₄氧化应激胁迫下各株酵母的存活率；

D. BPO作用下各株酵母的存活率。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图2 BPO对氧化应激胁迫下酵母细胞的耐受性保护作用

Fig. 2 BPO increased oxidative stress tolerance in *S. cerevisiae*

图2表明, H₂O₂对于所有酵母菌株毒性最强, 直接应激使各株酵母菌的存活率均低于20%, 其次是CCl₄和CdSO₄。由于H₂O₂在体内产生毒性最强和活性最高的反应性羟自由基, 而有机体对于过量的羟自由基几乎没有抵抗力, 因此酵母细胞对于H₂O₂的耐受性较低。大量的研究表明, 过氧化氢酶 (catalase from micrococcus lysodeikticus, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等自由基清除酶系是细胞抵抗氧化损伤的第一道屏障; 像GSH等细胞内非酶系清除物质构成第二道防护屏障^[23-25]。数据表明, BPO对于各株酵母细胞在3种氧化应激胁迫下均有不同程度的保护作用, 对CdSO₄作用下gsh1型菌株存活率提高最明显 (图2A), 表明BPO在抵抗CdSO₄对细胞氧化作用时, 与GSH的作用关系不是很显著。由于BPO是混合物, 在细胞内发挥抗氧化作用的机制是多样的, 因此对各株酵母均表现出保护作用。在H₂O₂作用下, 对sod1型菌株的保护作用最明显 (图2B), SOD在细胞内的主要作用是将超氧阴离子 (O₂⁻) 转化为H₂O₂, 因此在抵抗H₂O₂氧化损伤时与SOD的关系相对较小; 只有H₂O₂应激时, sod1型菌株的存活率明显高于WT型, 这有可能与其他抗氧化系统的代偿性过表达有关。一些研究表明当缺乏一种抗氧化体系时, 机体其他抗氧化体系的过表达反而提高了机体的抵抗效果^[26-27]。

2.5 BPO对酵母脂质过氧化水平和细胞内氧化水平的影响

表3 BPO对酵母脂质过氧化水平的影响
Table 3 Effect of BPO on lipid peroxidation

氧化剂	处理方式	菌株类型		
		WT	sod1	ctt1
CCl ₄	对照	1.7±0.1 ^a	1.9±0.2 ^a	1.7±0.1 ^a
	BPO处理	1.3±0.1 ^{bc}	1.1±0.1 ^c	1.4±0.1 ^b
H ₂ O ₂	对照	3.0±0.1 ^a	2.4±0.1 ^c	2.6±0.1 ^b
	BPO处理	2.1±0.1 ^d	1.6±0.2 ^f	2.3±0.1 ^c
CdSO ₄	对照	1.4±0.1 ^a	1.3±0.2 ^b	1.4±0.1 ^a
	BPO处理	1.1±0.1 ^c	1.1±0.1 ^c	1.0±0.1 ^c

注: 同行肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

表4 BPO对酵母细胞内氧化水平的影响
Table 4 Effect of BPO on cellular oxidation level

氧化剂	处理方式	菌株类型	
		WT	ctt1
CCl ₄	对照	2.5±0.1 ^b	2.0±0.1 ^c
	BPO处理	1.9±0.1 ^c	2.9±0.1 ^a
H ₂ O ₂	对照	7.0±0.3 ^a	6.5±0.2 ^a
	BPO处理	3.6±0.4 ^c	5.9±0.1 ^b
CdSO ₄	对照	1.2±0.1 ^a	1.3±0.1 ^a
	BPO处理	1.0±0.1 ^b	0.9±0.1 ^b

自由基在细胞内攻击的第一个目标是生物膜, 导致膜脂质过氧化, 进而引起细胞泄露甚至死亡。由表3可知, CCl₄、H₂O₂和CdSO₄这3种氧化应激均增加了WT、sod1和ctt1型酵母细胞的脂质过氧化水平, 而BPO展现出对生物膜氧化损伤不同程度的保护作用。由于BPO对其他几株基因缺陷型酵母细胞脂质过氧化和细胞内氧化的保护作用无明显特征性, 所以未列出讨论。结果表明, H₂O₂对各株酵母细胞造成的脂质过氧化损伤是最高的, 这与H₂O₂作用下酵母细胞存活率最低相一致。CCl₄作用下, BPO降低sod1型酵母细胞脂质过氧化的程度较明显, 这说明BPO在抵抗CCl₄损伤时可能与SOD的关系较小。

H₂O₂作用下, BPO对ctt1型酵母细胞脂质过氧化水平降低程度偏弱, 这说明缺乏过氧化氢酶对酵母细胞抵抗脂质过氧化影响较大, 也说明BPO对酵母的保护机制与过氧化氢酶的关系较大。

由于BPO具有一定的体外自由基清除活性, 实验中进一步通过荧光探针法测定酵母细胞内氧化水平, 这有助于说明BPO是否是通过降低细胞内活性氧自由基的浓度来提高酵母对氧化应激的耐受性。2',7'-二氯二乙酸酯荧光探针一旦进入细胞, 就会被ROS攻击, 产生荧光强度更大的化合物, 这种探针已经广泛应用于评估氧化应激后ROS的增强^[28]。

由表4可知WT和ctt1型酵母细胞直接暴露于H₂O₂和CCl₄中, 细胞内氧化水平会明显的增高, H₂O₂作用下细胞内氧化水平最高, 这与前面H₂O₂作用下各株酵母细胞存活率最低和膜脂质过氧化水平最高相对应。BPO能降低H₂O₂和CCl₄作用下的酵母细胞内ROS水平。CdSO₄对于酵母细胞内氧化水平影响很弱, 这说明CdSO₄可能不是通过提高细胞内ROS水平来发挥毒性作用的。

CCl₄、H₂O₂和CdSO₄作用对酵母细胞均能引起损伤。CCl₄和H₂O₂产生自由基, 并且能提高细胞内氧化水平; 而且这3种应激均能攻击生物膜, 导致膜脂质发生过氧化反应, 影响膜脂质的完整性和功能性^[26,29-30]。同时BPO有可能是通过降低酵母细胞膜脂质过氧化和细胞内ROS水平提高各株酵母对于氧化应激的耐受性, 进而提高应激状态下酵母存活率。

3 结论

本研究通过人为添加氧化剂 (H_2O_2 、 CCl_4 和 CdSO_4) 诱导酵母细胞产生一系列的氧化应激反应。酵母细胞对于不同氧化剂的应激机制是不同的, 相关的蛋白表达和抗氧化体系表达也有所差异。通过分析不同基因缺失型酵母在应激条件下表现出的存活率、脂质过氧化和细胞内氧化水平, 可以推断出酵母在不同应激情况下所依赖的抗氧化体系。而且使用BPO前处理酵母细胞后, 相同应激条件下, 不同基因缺失型酵母表现出抗氧化活性差异。进一步分析数据, 可以推断BPO在酵母细胞内发挥抗氧化作用所依赖的抗氧化体系。由于酵母细胞与人体细胞具有较高的同源性, 这对BPO进一步在人体内的作用机制研究提供较可信的参考。

研究采用超临界 CO_2 流体萃取得到的BPO, 提取率为7.3%。通过GC-MS联用技术分析结果可知, BPO的主要成分为胡椒碱 (40.2%)、石竹烯 (8.7%)、*D*-柠檬烯 (7.2%)、3-萜烯 (3.4%) 和 α -水芹烯 (3.0%), 占总BPO的62.5%。体外抗氧化活性检验表明, BPO对DPPH自由基的清除率略低于BHT和VC, 且BPO的还原能力也略低于BHT和VC, 但随着BPO质量浓度的升高, 其还原能力达到了VC的水平。采用模式生物酿酒酵母在 CCl_4 、 H_2O_2 和 CdSO_4 作用下检测BPO的抗氧化活性, 结果表明BPO不同程度的提高各株酵母在氧化应激胁迫下的存活率。结果还表明BPO抵抗脂质过氧化的机制很有可能与基因*ctt1*编码的过氧化氢酶有关。体外和体内的实验数据均表明黑胡椒超临界 CO_2 流体萃取物具有较强的抗氧化活性, 这为进一步拓展黑胡椒在食品、药品及人类健康方面的应用提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 回瑞华, 侯冬岩, 李铁纯, 等. 固相微萃取-气相色谱-质谱法分析黑胡椒挥发性成分[J]. 内蒙古民族大学学报, 2009, 15(4): 66-68. DOI:10.3969/j.issn.1008-5149.2009.04.031.
- [2] 王颖, 姜子涛, 李荣, 等. 黑胡椒和白胡椒精油抗氧化性能及清除自由基能力的比较[J]. 中国调味品, 2009, 34(5): 50-53. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2009.05.008.
- [3] WALKER L J, ALDHOUS M C, DRUMMOND H E, et al. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations[J]. Clinical and Experimental Immunology, 2004, 135(3): 490-496. DOI:10.1111/j.1365-2249.2003.02392.x.
- [4] MOYAD M A. Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: part II[J]. Urologic Nursing, 2008, 28(1): 73-75.
- [5] 王郅媛, 王友升, 李丽萍. 抗衰老研究新模型: 酵母细胞活性氧代谢研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 354-358.
- [6] FIOCCHETTI M, CAMILLI G, ACCONCIA F, et al. ER β -dependent neuroglobin up-regulation impairs 17 β -estradiol-induced apoptosis in DLD-1 colon cancer cells upon oxidative stress injury[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 149: 128-137. DOI:10.1016/j.jsbmb.2015.02.005.
- [7] BHARGAVA S, ALI A, KANKRA M, et al. Differential expression of lipid peroxidation and total antioxidant status in Indian patients with cardiovascular and cerebrovascular disease I[J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2014, 92(7): 592-597. DOI:10.1139/cjpp-2013-0481.
- [8] ZIMMERMAN M T, BAYSE C A, RAMOUTAR R R, et al. Sulfur and selenium antioxidants: challenging radical scavenging mechanisms and developing structure-activity relationships based on metal binding[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2015, 145: 30-40. DOI:10.1016/j.jinorgbio.2014.12.020.
- [9] JOSHI R, KAMAT J P, MUKHERJEE T. Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of embelin: biochemical and pulse radiolytic studies[J]. Chemico-Biological Interactions, 2007, 167(2): 125-134. DOI:10.1016/j.cbi.2007.02.004.
- [10] 李慎新, 曹新志, 钟俊波, 等. 几种中草药抗氧化性成分的还原能力及总酚含量比较研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29): 12755-12756. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2008.29.094.
- [11] DANI C, BONATTO D, SALVADOR M, et al. Antioxidant protection of resveratrol and catechin in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(11): 4268-4272. DOI:10.1021/jf800752s.
- [12] 廖红波, 刘屏, 胡园, 等. 胡椒碱的抗抑郁及神经保护作用研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1562-1565.
- [13] 刘红, 赵建平, 谭乐和. 胡椒碱的研究进展[J]. 中国调味品, 2008, 33(10): 33-36. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2008.10.003.
- [14] 刘屏, 索婧侠, 于腾飞. 胡椒碱药理作用的研究进展[J]. 中国药物应用与监测, 2007, 4(3): 7-9. DOI:10.3969/j.issn.1672-8157.2007.03.003.
- [15] 王勇, 魏娜, 李洪福, 等. 海南黑胡椒超临界萃取物中化学成分的GC-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 121-123.
- [16] 陈建华, 翁少伟, 李忠, 等. 超临界 CO_2 萃取黑胡椒中有效成分的研究[C]//第九届全国超临界流体技术及应用研讨会. 遵义: 中国化工协会, 2010: 991-995.
- [17] RODGERS G, DOUCETTE C D, SOUTAR D A, et al. Piperine impairs the migration and T cell-activating function of dendritic cells[J]. Toxicology Letters, 2016, 242: 23-33. DOI:10.1016/j.toxlet.2015.11.025.
- [18] DONG Y, HUIHUI Z, LI C. Piperine inhibit inflammation, alveolar bone loss and collagen fibers breakdown in a rat periodontitis model[J]. Journal of Periodontal Research, 2015, 50(6): 758-765. DOI:10.1111/jre.12262.
- [19] LU Y, LIU J, LI H, et al. Piperine ameliorates aipopolysaccharide-induced acute lung injury via modulating NF- κ B signaling pathways[J]. Inflammation, 2016, 39(1): 303-308. DOI:10.1007/s10753-015-0250-x.
- [20] 莫峥嵘, 张岐. 胡椒碱的抗氧化活性及稳定性研究[J]. 海南师范学院学报(自然科学版), 2006, 19(1): 52-54. DOI:10.3969/j.issn.1674-4942.2006.01.016.
- [21] 陈思佳, 刘雅丽, 张晨, 等. 柠檬精油抗氧化活性的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2015, 35(3): 343-346. DOI:10.3969/j.issn.1001-3733.2015.03.010.
- [22] 马玲, 彭登峰, 李慧, 等. 不同菌株组合 Mozzarella干酪成熟过程中提取液的抗氧化活性[J]. 中国农业科学, 2013, 46(12): 2615-2624. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2013.12.024.
- [23] HALLIWELL B. Biochemistry of oxidative stress[J]. Biochemical Society Transactions, 2007, 35(5): 1147-1150. DOI:10.1042/BST0351147.
- [24] JAMIESON D J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 1998, 14(16): 1511-1527. DOI:10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511.
- [25] PENNINEKX M J. An overview on glutathione in *Saccharomyces versus non-conventional yeasts*[J]. FEMS Yeast Research, 2002, 2(3): 295-305. DOI:10.1016/S1567-1356(02)00081-8.
- [26] FERNANDES P N, MANNARINO S C, SILVA C G, et al. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Redox Report, 2007, 12(5): 236-244. DOI:10.1179/135100007X200344.
- [27] FRANCA M B, PANEK A D, ELEUTHRIO E C A. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Cell Stress and Chaperones, 2005, 10(3): 167-170. DOI:10.1379/CSC-103R.1.
- [28] ROTA C, FANN Y C, MASON R P. Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2', 7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase possible consequences for oxidative stress measurements[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(40): 28161-28168. DOI:10.1074/jbc.274.40.28161.
- [29] BEWNNAN R J, SCHIESTL R H. Chloroform and carbon tetrachloride induce intrachromosomal recombination and oxidative free radicals in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1998, 397(2): 271-278. DOI:10.1016/S0027-5107(97)00225-X.
- [30] BRENNAN R J, SCHIESTL R H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast[J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1996, 356(2): 171-178. DOI:10.1016/0027-5107(96)00051-6.