

茶花粉酶法破壁工艺提高提取物抗氧化活性及多酚含量

董亚婷¹, 杨远帆^{1,3*}, 倪辉^{1,3}, 彭文君²

(1. 集美大学生物工程学院, 厦门 361021; 2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093;
3. 厦门市食品生物工程研究中心, 厦门 361021)

摘要: 为了建立蜂花粉抗氧化活性物质的提取工艺并探索其抗氧化活性与多酚含量的关系, 该文研究了破壁用酶、提取溶剂、超声波处理对茶花粉提取液多酚含量及其抗氧化活性的影响。结果表明, 茶花粉经纤维素酶破壁后其上清液具有较高的还原力和 DPPH 自由基清除能力; 与温水和酸处理相比, 纤维素酶破壁沉淀物经乙醇提取后, 溶液多酚含量较高、抗氧化活性较强; 茶花粉不同提取方式多酚含量与 2 种抗氧化活性指标具有一定的相关性 ($r=0.8685$ 及 $r=0.7600$) ($p>0.05$); 与乙醇提取和水提取相比, 纤维素酶破壁处理结合乙醇提取将茶花粉的多酚含量、还原力及 DPPH 自由基清除能力分别提高 1.82 倍、2.17 倍、1.4 倍和 1.56 倍、1.38 倍、11 倍, 且二者对混合物还原力、DPPH 自由基清除能力及多酚含量的贡献比例分别为 1.6:1、3:1、1.08:1。该研究结果可为花粉资源的开发利用提供参考。

关键词: 提取, 纤维素酶, 乙醇, 茶花粉, 破壁, 多酚, 抗氧化

doi: 10.3969/j.issn.1002-6819.2013.21.036

中图分类号: S896.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2013)-21-0288-07

董亚婷, 杨远帆, 倪辉, 等. 茶花粉酶法破壁工艺提高提取物抗氧化活性及多酚含量[J]. 农业工程学报, 2013, 29(21): 288-294.

Dong Yating, Yang Yuanfan, Ni Hui, et al. Enzymatic cell wall disruption process improves antioxidant activity and polyphenol content of camellia pollen extracts[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(21): 288-294. (in Chinese with English abstract)

0 引言

蜂花粉含有丰富的蛋白质、不饱和脂肪酸、黄酮类化合物等物质, 对癌症、心脏病、高血压、高血脂、高血糖等多种疾病有很好的预防和改善作用, 并具有抗疲劳、抗氧化、增强体力、增强记忆力、改善脑功能、增强耐缺氧能力等作用^[1]。国内外研究表明, 花粉具有较强的抗氧化活性。孙丽萍等^[2]研究了油菜花粉 80%乙醇提取物的 DPPH 自由基清除能力及还原力; Morais 等^[3]发现 5 个不同地区的蜂花粉均具有较强的 DPPH 清除作用。有研究者指出多酚是分布最广、最具有生物多样性的天然物质^[4], 是一类保健和治疗作用较强的天然抗氧化物质^[5], 多酚对人类健康的独特功效已经得到科学界的普遍认可^[6-10]。蜂花

粉含有丰富的多酚类化合物, 研究报道蜂花粉对机体的治疗及保护作用与多酚含量有关^[11-13], 可作为潜在的抗氧化剂^[14]。

各种蜂花粉均具有坚硬的花粉壁, 导致其生物活性成分以及营养物质不易被人体有效吸收。因此, 对花粉进行破壁并提取其生物活性成分是其开发利用的重要研究领域。其中, 酶法破壁因其作用条件温和、对热敏性物质破坏小, 而被广泛应用。相关人员对多种蜂花粉酶解产物的抗氧化活性进行了研究, 朱晓丽^[15]等发现油菜花粉酶解提取物的抗氧化效果优于花粉水提取物; 胡筱波等^[16]优化了碱性蛋白酶水解油菜花粉谷蛋白的工艺, 指出油菜花粉谷蛋白酶解后可显著提高抗氧化活性; 董吉林等^[17]指出不同水解度的红茶花粉酶解产物对超氧阴离子自由基具有一定程度的清除作用。

虽然上述相关研究表明酶法破壁可提高花粉提取物的抗氧化活性, 但有关活性成分的基本构成和茶花粉的具体提取工艺的研究则相对较少。本研究的主要目的是建立酶法提取茶花粉抗氧化活性成分的工艺, 并研究其抗氧化作用和其中多酚类物质含量的关系, 以为茶花粉抗氧化活性成分的提取及开发利用提供参考。

收稿日期: 2013-05-20 修订日期: 2013-09-28

基金项目: 国家蜂产业技术体系科研基金项目 (30771636); 集美大学科研创新团队基金 (No. 2010A006)。

作者简介: 董亚婷 (1987-), 女, 吉林白山人, 主要研究方向为食品生物技术。厦门 集美大学生物工程学院, 361021。

Email: dyt0623xiang@126.com

*通信作者: 杨远帆 (1971-), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品化学。厦门 集美大学生物工程学院, 361021。

Email: yuanfan@jmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 原料与药品

茶花粉由北京市华林蜂业有限公司提供，经烘干、粉碎后备用。

三氯乙酸、铁氰化钾、三氯化铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇、没食子酸、无水碳酸钠、抗坏血酸等均为分析纯；纤维素酶（5 万 U/g）购于南宁庞博生物有限公司，碱性蛋白酶（26 万 U/g）购于诺维信（中国）生物技术有限公司，DPPH（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）购于 Sigma ALORICH 公司。

1.2 仪器与设备

FA1004N 型电子天平（上海精科天平仪器厂）；BS223S 电子天平（赛多利斯科学仪器（北京）有限公司）；DK-98-1 型恒温水浴锅（余姚市东方电工仪器厂）；TDL-40B 型台式离心机（飞鸽仪器厂）；Centrifue 5415D 型高速离心机（德国 eppendorf AG Co.）；KQ-250 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；WCJ-802 型磁力搅拌器（常州国华电器有限公司）；UV-2600A 型紫外可见分光光度计（尤尼柯（上海）仪器有限公司）；Unic7200 紫外分光光度计（尤尼柯（上海）仪器有限公司）；FE20/EL20 型 pH 计（梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司）。

1.3 酶法破壁处理

1.3.1 纤维素酶破壁处理

根据本实验室前期试验优化的工艺，称取适量茶花粉，以料液比 1:5 加入 pH 值 4.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液，混匀后按花粉质量加入 15% 的纤维素酶，55℃ 酶解 5 h 后，4 000 r/min 离心 10 min，分别测定上清液和沉淀中的多酚含量及其还原力和 DPPH 自由基清除能力，抗氧化能力用 mg/g（以 V_C 计）表示。

1.3.2 碱性蛋白酶破壁处理

根据预试验优化的工艺，称取适量茶花粉，以料液比 1:5 加入 pH 值 8.0 的磷酸盐缓冲液，混匀后按花粉总量加入 1% 的碱性蛋白酶，55℃ 酶解 3 h 后，4 000 r/min 离心 10 min，分别测定上清液和沉淀中的多酚含量及其还原力和 DPPH 自由基清除能力，抗氧化能力用 mg/g（以 V_C 计）表示。

1.3.3 花粉酶法破壁沉淀物有效成分的再提取

取适量酶法破壁沉淀物，分别以料液比 1:5 加入温水（50℃）、无水乙醇、0.05 mol/L pH 值 3.7 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液，提取 30 min，并于相同条件下进行超声波辅助提取。提取结束后，4 000 r/min 离心 10 min，分别测定上清液中的多酚含量及其还原力和 DPPH 自由基清除能力。

1.4 破壁茶花粉几种提取组分的制备

分别称取适量花粉，进行如下 3 种处理：纤维素酶破壁处理，收集上清液（处理 1）；用乙醇提取纤维素酶破壁沉淀物，收集提取液（处理 2）；合并处理 1 和处理 2 提取得到的上清液（处理 3）。分别测定各组的干物质含量、多酚含量及其还原力和 DPPH 自由基清除能力。其中处理 3 对 DPPH 自由基清除能力 IC_{50} 值（ IC_{50} 值为 DPPH 自由基清除率为 50% 时所对应提取物的质量浓度）的计算方法为：以不同质量浓度 c 的自然对数为横坐标，以质量浓度对应的清除率（%）为纵坐标，拟合方程，通过方程求得 IC_{50} 值。

1.5 分析测定方法

1.5.1 含水率的测定

方法参照 GB5009.3-2010^[18]。

1.5.2 多酚含量的测定

参照 GB/T8313-2008^[19]，采用福林酚法进行测定。上清液多酚含量用 mg/g（以 GAE 计）花粉表示；沉淀多酚含量用 mg/g（以 GAE 计）沉淀干物质表示。

1.5.3 DPPH 自由基清除能力的测定

参照文献[20]，在 4 mL DPPH 95%乙醇溶液（浓度为 0.2 mmol/L）中加入 1 mL 茶花粉提取液，振荡混匀后，室温避光放置 30 min 后，在 517 nm 处测定吸光度，按下式计算清除率。

$$E(\text{DPPH}\cdot)(\%)=[1-(A-A_1)/A_0]\times 100$$

式中， $E(\text{DPPH}\cdot)$ 为样品对 DPPH· 自由基的清除率，%； A_0 为 1 mL 蒸馏水+4 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液混匀测定的吸光值； A_1 为 1 mL 茶花粉提取液+4 mL 95%的乙醇溶液混匀测定的吸光值； A 为 1 mL 茶花粉提取液+4 mL 0.2 mmol/L DPPH 溶液混匀测定的吸光值。

1.5.4 还原力的测定

参照文献[21]。在 10 mL 离心管中依次加入 0.5 mL 茶花粉提取液，1.25 mL (0.05 mol/L pH 值 6.6) 磷酸盐缓冲液，1.25 mL 0.5% 铁氢化钾，混匀后 50℃ 水浴 20 min，再加入 1.25 mL 5% 三氯乙酸，混匀后 4 000 r/min 离心 10 min，取 1.25 mL 上清液，依次加入 1.25 mL 蒸馏水，0.25 mL 0.05% 氯化铁，室温反应 5 min 后于 700 nm 下测其吸光度，用蒸馏水调零。同时，用 0.5 mL 蒸馏水代替茶花粉提取液作为空白，测定体系的吸光度，按以下公式计算还原力

$$\text{还原力}=(A_{\text{样}}-A_{\text{空}})/A_{\text{空}}$$

式中， $A_{\text{样}}$ 为茶花粉提取液测定值； $A_{\text{空}}$ 为空白测定值。

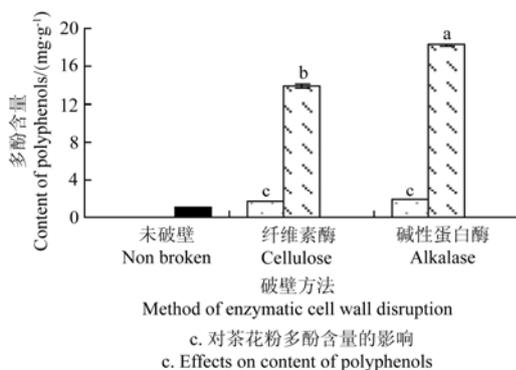
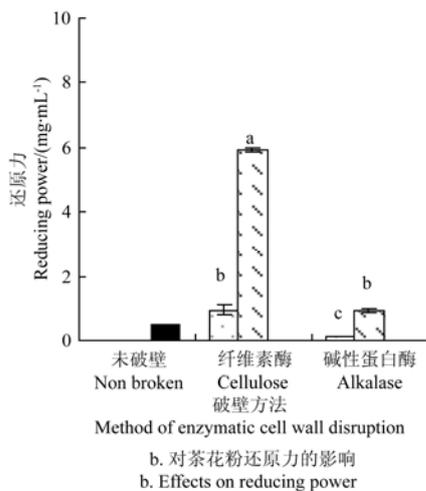
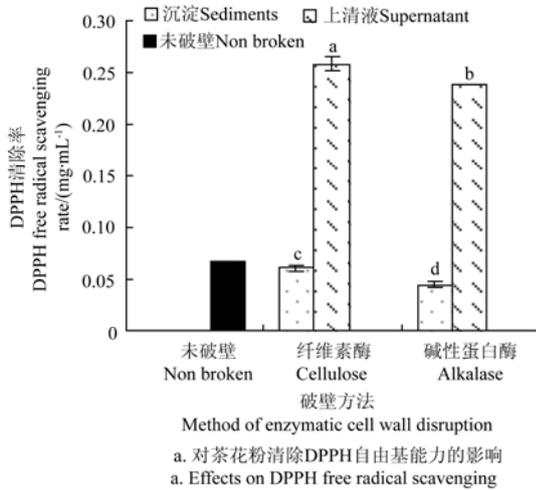
1.6 数据处理与统计

所有试验都进行 3 次平行，试验结果用平均值±标准偏差表示，采用 SPSS 17.0 软件进行 ANOVA 分析（显著性水平 $p=0.05$ ），采用 EXCEL 计算相关系数，对多酚含量及抗氧化指标进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 2种酶法破壁对茶花粉抗氧化活性及多酚含量的影响

用纤维素酶和碱性蛋白酶对茶花粉进行破壁处理,以未加酶的原花粉经水提取后所得的沉淀物作为对照,分别比较其上清液和沉淀中的多酚含量及还原力和 DPPH 自由基清除能力,结果如图 1 所示。



注: DPPH 自由基清除率以 V_C 计; 还原力以 V_C 计; 多酚含量以 GAE 计。
Note: DPPH scavenging ability was expressed as V_C ; Reducing power was expressed as V_C . The polyphenol content was expressed as Gallic Acid Equivalent.

图 1 酶法破壁对茶花粉抗氧化活性及多酚含量的影响

Fig.1 Effects of enzymatic cell wall disruption on antioxidant and content of polyphenols

由图 1a 和图 1b 可知,茶花粉用纤维素酶和碱性蛋白酶处理后,酶解上清液比未经过酶处理的花粉具有更强的 DPPH 自由基清除作用和还原力;而 2 种酶酶解沉淀的 DPPH 自由基清除作用、以及碱性蛋白酶酶解沉淀还原力都比对照低,但纤维素酶酶解沉淀还原力比对照高。说明酶法破壁处理有利于将抗氧化活性成分释放到提取液中。此外,纤维素酶水解上清液较碱性蛋白酶水解上清液具有更强的 DPPH 自由基清除效果及更高的还原力 ($p < 0.05$),表明纤维素酶处理花粉更有利于其抗氧化活性成分的释放。图 1c 表明,无论采用纤维素酶破壁还是碱性蛋白酶破壁,对花粉中多酚化合物的溶出均具有一定的促进作用。用碱性蛋白酶破壁花粉,破壁后上清液多酚含量大于用纤维素酶破壁所获得的上清液且具有显著性差异 ($p < 0.05$),沉淀中的多酚含量也表现出了相似的规律,但不具有显著性差异 ($p > 0.05$)。对比结果可以看出,碱性蛋白酶破壁较纤维素酶破壁更好的促进多酚的溶出,但纤维素酶破壁能更好的提高提取物的抗氧化活性。

2.2 茶花粉破壁沉淀物的二次提取方法对提取物抗氧化能力和多酚含量的影响

上述结果表明,酶法破壁后的花粉沉淀物中还含有部分多酚类物质,也表现出了一定的抗氧化能力,需要进一步提取。分别用温水 (50°C)、乙醇及 pH 值 3.7 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液作为提取溶剂,在常规搅拌和超声波辅助条件下对纤维素酶破壁后的花粉沉淀物进行二次提取,比较不同提取条件所得提取液中的多酚含量及其 DPPH 自由基清除能力和还原力,结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,乙醇作为提取溶剂,提取液对 DPPH 自由基的清除作用较好,还原力高,多酚含量多;这说明乙醇很适合从破壁花粉沉淀中提取抗氧化活性成分和多酚的溶剂。虽然超声波对乙醇提取物中多酚含量以及温水提取物清除 DPPH 自由基的能力具有显著影响,但其数值的差别并不大,且大多数情况下对各种溶剂提取花粉破壁沉淀中的抗氧化能力和多酚含量没有显著影响,因此总体上认为酶法破壁后,超声波对沉淀物辅助提取的促进作用可以忽略不计。

2.3 茶花粉几种提取组分抗氧化活性及多酚含量的比较

为确定较优的提取条件,结合上述酶法破壁和不同溶剂处理试验结果,按照 1.4 的步骤对茶花粉进行 3 种组合处理方式,并以乙醇提液和水提液作为对照,比较各溶液的 DPPH 自由基清除能力、还原力和多酚含量,结果如表 2 所示。

表 1 茶花粉破壁沉淀物二次提取方法对提取物抗氧化能力和多酚含量的影响

Table 1 Effects of different extract methods on antioxidant ability and polyphenols content of sediments

提取方法 Extracting methods	多酚含量 Content of polyphenols (mg·g ⁻¹)	DPPH 自由基清除能力 DPPH radical scavenging ability (mg·mL ⁻¹)	还原力 Reducing power (mg·mL ⁻¹)
温水结合超声波 Warm water combine ultrasonic extraction	0.28±0.00c	0.10±0.01bc	1.82±0.013b
温水提取 Warm water extraction	0.28±0.00c	0.09±0.00e	1.74±0.027bc
乙醇结合超声波 Ethanol combine ultrasonic extraction	0.66±0.01a	0.22±0.01a	3.45±0.058a
乙醇提取 Ethanol extraction	0.62±0.01b	0.22±0.00a	3.34±0.162a
酸结合超声波 Acid combine ultrasonic extraction	0.28±0.00c	0.10±0.00b	1.67±0.030c
酸提取 Acid extraction	0.26±0.00d	0.10±0.01bd	1.60±0.096c

注：“±”后数据为标准偏差 ($n=3$)；同列数据中不同小写字母肩标代表差异显著 ($p<0.05$)。多酚含量以 GAE 计，DPPH 自由基清除作用及还原力以 V_C 计。下同。

Note: The data after “±” means the standard deviation ($n=3$); The shoulder mark of Lowercase letters between the same column represented significant difference ($p<0.05$); The polyphenol content was expressed as Gallic Acid Equivalent, DPPH scavenging ability and reducing power were expressed as V_C . The same as blow.

表 2 不同提取组分多酚含量及其抗氧化能力的比较

Table 2 Content of polyphenols and radical scavenging ability of different extracting methods

提取组分 处理方式 Different extracts	DPPH 自由基清除能力 DPPH radical scavenging ability/(g·g ⁻¹)	还原力 Reducing power/(g·g ⁻¹)	多酚含量 Content of polyphenols (mg·g ⁻¹)
酶解上清液+沉淀乙醇提取液 Enzymatic supernatant and ethanol-extract of sediments	0.12±0.01a	0.19±0.00a	24.84±1.24a
酶解上清液 Enzymatic supernatant	0.08±0.01b	0.18±0.01b	12.89±0.55b
酶解沉淀乙醇提取液 Ethanol-extract of enzymatic sediments	0.05±0.00c	0.06±0.01d	11.95±0.43b
花粉乙醇提取液 Ethanol-extract of bee pollen	0.05±0.00c	0.06±0.00d	8.81±0.13d
花粉水提取液 Water-extract of bee pollen	0.01±0.00d	0.08±0.00d	9.70±0.09c

由表 2 可以看出，茶花粉经纤维素酶破壁处理后，其上清液的 DPPH 自由基清除能力、还原力及多酚含量较花粉醇提液和水提液均有显著提高 (p

<0.05)；破壁沉淀物经乙醇二次提取后，多酚含量为 24.8 mg/g (以 GAE 计)，明显高于花粉醇提液和水提液，DPPH 清除能力与醇提液相当，都高于水提液，而还原力则无明显差异。且酶解上清液与沉淀乙醇提取液对二者混合物的 DPPH 清除能力、还原力及多酚含量的贡献比例分别为 3:1、1.6:1、1.08:1。比较试验结果并经进一步计算可以发现，将酶解上清液和沉淀乙醇提取液混合后，其 DPPH 自由基清除能力、还原力及多酚含量均明显提高，与乙醇提取液相比，分别提高了 1.4 倍、2.17 倍、1.82 倍，与水提液相比，分别提高了 11 倍、1.38 倍、1.56 倍。因此，从花粉酶解沉淀物中二次提取多酚物质，结合溶剂提取，对于提高花粉提取物抗氧化活性及建立花粉加工循环经济有重要理论意义和应用价值。

2.4 提取液混合物的抗氧化活性验证试验

由表 2 可知，茶花粉纤维素酶酶解上清液和沉淀乙醇提取液混合物表现出了较好的抗氧化活性，且多酚含量最多。为验证其抗氧化活性并将该提取工艺的抗氧化能力与前人研究结果进行对比，将该混合物配成不同质量浓度，分别测定其 DPPH 自由基清除能力，结果如图 2 所示。

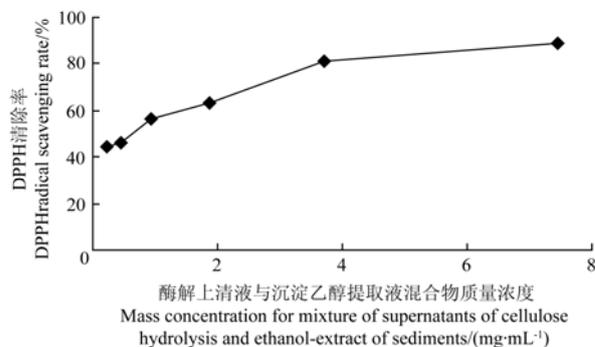


图 2 酶解上清液与沉淀乙醇提取液混合物对 DPPH 自由基的清除作用

Fig.2 DPPH free radical scavenging of mixture of supernatants of cellulose hydrolysis and ethanol-extract of sediments

由图 2 可以看出，纤维素酶破壁上清液和沉淀乙醇提取液混合物对 DPPH 自由基的清除作用与其质量浓度呈现一定的量效关系，经计算得知，其 IC_{50} 值为 0.58 mg/mL。

多年来，多种蜂花粉及其提取物的抗氧化活性在国内外学者的不断研究中日渐得到肯定。Nagai 等^[22]比较了西班牙岩蔷薇花粉热水提取物、温水提取物以及乙醇提取物对 DPPH 自由基的清除能力，指出乙醇提取物对自由基的清除能力有效且持久。Märghitas 等^[23]测定了罗马尼亚特兰西瓦尼亚地区

的花粉乙醇提取物、甲醇提取物、水提物的多酚含量, 并对其自由基清除能力进行了比较, 发现乙醇提取液的多酚含量最高, 清除 DPPH 自由基的能力最好, 且多酚含量与清除 DPPH 自由基能力成量效关系。Morais 等^[3]测定了 5 种不同来源的蜂花粉对 DPPH 自由基的清除作用, 计算得出其 IC₅₀ 值范围在 2.16~5.87 mg/mL 之间。孙丽萍等^[2]测定了几组油菜花粉 80%醇提取物的还原力, 数值介于 43.9~1 032.6 μg/mg (以 V_C 计) 之间。

本试验所获得纤维素酶破壁上清液与沉淀乙醇提取液混合物清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 值为 0.58 mg/mL, 抗氧化能力明显优于 Morais^[3]试验所得的提取物 (2.16~5.87 mg/mL); 还原力虽远低于孙丽萍等报道的槲皮素组 (1 032.64 μg/mg), 但介于黄酮醇苷组 (43.88 μg/mg) 和山奈酚组 (323.21 μg/mg) 之间, 比照对象是经过分离纯化后得到的纯度较高的蜂花粉组分, 而本研究的试验对象只是粗提取物。

2.5 茶花粉抗氧化活性与其多酚含量的相关性探讨

为进一步明确茶花粉抗氧化活性与其多酚含量之间的关系, 利用表 2 中的试验结果, 对各种提取组分的多酚含量与 2 种抗氧化指标进行相关性分析, 结果如表 3 所示。

表 3 茶花粉多酚含量与抗氧化活性的相关系数

Table 3 Correlation coefficient of total phenols and antioxidant activity

项目 Items	DPPH 自由基 清除能力 DPPH radical scavenging ability	还原力 Reducing power	多酚含量 Content of polyphenols
DPPH 自由基清除能力 DPPH radical scavenging ability	1		
还原力 Reducing power	0.8098	1	
多酚含量 Content of polyphenols	0.8685	0.7600	1

由表 3 可知, 5 种提取组分所得提取液多酚含量与 DPPH 自由基清除能力及还原力表现出一定的正相关 ($r=0.8685$ 及 $r=0.7600$), 但均不显著 ($p>0.05$)。越来越多的研究也表明, 蜂花粉的抗氧化功能不只取决于其中的某一类物质, 而可能是多种物质共同作用的结果。陈南迪^[24]等指出黄酮为蜂花粉清除 DPPH 自由基的主要成分之一; 另外, 孙丽萍^[25-26]及 Campos 等^[27]报道蜂花粉中黄酮类、多酚类、类胡萝卜素、V_C、V_E 等均具有一定的抗氧化作用。

本试验所得混合物的抗氧化活性是否为多酚与其他成分共同作用的结果还有待于进一步探究。

3 结 论

1) 茶花粉经酶破壁和未破壁相比, 其上清液具有较高的还原力和 DPPH 自由基清除能力; 由纤维素酶破壁比碱性蛋白酶破壁的工艺效果更好;

2) 与温水和酸处理相比, 纤维素酶破壁沉淀物经乙醇二次提取后, 溶液多酚含量较高、抗氧化活性较强;

3) 将茶花粉纤维素酶解上清液和沉淀乙醇提取液混合后, 其 DPPH 自由基清除能力、还原力及多酚含量均明显提高, 与传统的醇提液相比, 分别提高了 1.4 倍、2.17 倍、1.82 倍, 与水提液相比, 分别提高了 11 倍、1.38 倍、1.56 倍。该混合物的多酚含量为 24.8 mg/g (以 GAE 计), 清除 DPPH 自由基能力的 IC₅₀ 值为 (0.58±0.15) mg/mL;

4) 茶花粉提取液清除 DPPH 自由基能力和还原力均与其多酚含量具有一定的相关性, 但相关系数分别为 0.8685 和 0.7600, 均不显著 ($p>0.05$)。

[参 考 文 献]

- [1] 刘建涛, 赵利, 苏伟, 等. 蜂花粉生物活性物质的研究进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 909-912.
Liu Jiantao, Zhao Li, Su Wei, et al. Research advance of bioactive constituents in honey bee pollen[J]. Food Chemistry, 2006, 27(12): 909-912. (in Chinese with English abstract)
- [2] 孙丽萍, 徐响, 廖磊, 等. 油菜蜂花粉黄酮醇苷的体内抗氧化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 359-362.
Sun Liping, Xu Xiang, Liao Lei, et al. Anti-oxidant effect of flavonoid glycosides from rape bee pollen[J]. Food Chemistry, 2010, 31(19): 359-362. (in Chinese with English abstract)
- [3] Morais M, Moreira L, Feás X, et al. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(5): 1096-1101.
- [4] 魏颖, 籍保平, 周峰, 等. 苹果渣多酚提取工艺的优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(增刊 1): 345-350.
Wei Ying, Ji Baoping, Zhou Feng, et al. Technology optimization of polyphenols extraction from apple pomace[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2012, 28(Supp.1): 345-350. (in Chinese with English abstract)
- [5] 牛鹏飞, 仇农学, 杜寅. 苹果渣中不同极性多酚的分离及体外抗氧化活性研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 238-242.
Niu Pengfei, Qiu Nongxue, Du Yin. Separation of polyphenols from apple pomace based on different polarities and their antioxidative activities in vitro[J].

- Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2008, 24(3): 238—242. (in Chinese with English abstract)
- [6] Lu Y, Yeap Foo L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chemistry, 2000, 68(1): 81—85.
- [7] 薛自萍, 曹建康, 姜微波. 枣果皮中酚类物质提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 农业工程学报, 2009, 25(增刊 1): 153—158.
- Xue Ziping, Cao Jiankang, Jiang Weibo. Optimization of extraction and antioxidant properties of phenolic compounds in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill) peel[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2009, 25(Supp.1): 153—158. (in Chinese with English abstract)
- [8] Šarić A, Balog T, Sobočanec S, et al. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(3): 547—554.
- [9] Kroyer G, Hegedus N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2001, 2(3): 171—174.
- [10] Serra Bonvehí J, Soliva Torrentó M, Centelles Lorente E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(4): 1848—1853.
- [11] Rzepecka-Stojko A, Stec M, Kurzeja E, et al. The effect of storage of bee pollen extracts on polyphenol content[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2012, 21(4): 1007—1011.
- [12] Almeida-Muradian L B, Pamplona L C, Coimbra S, et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18(1): 105—111.
- [13] Almaraz-Abarca N, da Graca Campos M, Avila-Reyes J A, et al. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae)[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2007, 20(2): 119—124.
- [14] Kroyer G, Hegedus N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2001, 2(3): 171—174.
- [15] 朱晓丽, 孙丽萍, 董捷, 等. 油菜蜂花粉酶解物抗氧化性能的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 74—76.
- Zu Xiaoli, Sun Linping, Dong Jie, et al. Antioxidant activities of enzymatic hydrolysates of bee collected rape pollen[J]. Food Chemistry, 2007, 28(5): 74—76. (in Chinese with English abstract)
- [16] 胡筱波, 阮征, 薛朝晖, 等. 油菜花粉蛋白酶解物的制备[J]. 农业工程学报, 2008, 24(5): 240—244.
- Hu Xiaobo, Ruan Zheng, Xue Zhaohui, et al. Preparation of peptides hydrolyzed from rape pollen glutelin[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2008, 24(5): 240—244. (in Chinese with English abstract)
- [17] 董吉林, 杨公明. 碱性蛋白酶水解红茶花粉的工艺及抗氧化性研究[J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版, 2010, 25(1): 29—31.
- Dong Jilin, Yang Gongming. Study of enzymatic hydrolysis on black tea pollen by alcalase and its antioxidant activity[J]. Journal of Zhengzhou University of Light Industry Natural Science, 2010, 25(1): 29—31. (in Chinese with English abstract)
- [18] GB5009.3-2010, 食品中水分的测定[S].
- [19] GB/T8313-2008, 福林酚法测定花粉总酚含量[S].
- [20] Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, et al. Antioxidative properties of Xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(6): 945—948.
- [21] Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme[J]. Journal of Food Biochemistry, 2007, 31(2): 266—287.
- [22] Nagai T, Inoue R, Inoue H, et al. Scavenging capacities of pollen extracts from *cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals[J]. Nutrition Research, 2002, 22(4): 519—526.
- [23] Mărghitas L A, Stanciu O G, Dezmirean D S, et al. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania[J]. Food Chemistry, 2009, 115(3): 878—883.
- [24] 陈南迪, 方妙玉, 吴锡鸿, 等. 不同品种蜂花粉总黄酮含量与抗氧化活性相关性的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 70—73.
- Chen Nandi, Fang Miaoyu, Wu Xihong, et al. Study on the correlation between total flavonoids and anti-oxidation in bee pollens[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(1): 70—73. (in Chinese with English abstract)
- [25] 孙丽萍, 杨佳琳, 徐响, 等. 油菜蜂花粉酚类化合物的初步分离和抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 52—56.
- Sun Liping, Yang Jialin, Xu Xiang, et al. Purification and antioxidant activity of phenol compounds from rape pollen[J]. Food Chemistry, 2009, 30(23): 52—56. (in Chinese with English abstract)
- [26] 徐响, 何伟, 孙丽萍, 等. 蜂花粉油脂抗氧化活性与类胡萝卜素含量的相关性[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 155—158.
- Xu Xiang, He Wei, Sun Liping, et al. Correlation between antioxidant activity and carotenoid content in bee pollen oil[J]. Food Chemistry, 2010, 31(21): 155—158. (in Chinese with English abstract)

[27] Campos M G, Bogdanows, Almeida-Muradianl B, et al. Pollen composition and standardization of analytical

methods[J]. Journal of Apicultural Research and Bee World, 2008, 47(2): 156—163.

Enzymatic cell wall disruption process improves antioxidant activity and polyphenol content of camellia pollen extracts

Dong Yating¹, Yang Yuanfan^{1,3*}, Ni Hui^{1,3}, Peng Wenjun²

(1. School of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 3. Food Bio-engineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: Bee pollen is used as a dietary supplement which contains nearly all nutrients required by humans. It has been used as a folk medicine for centuries to alleviate or cure conditions such as colds, flu, ulcers, premature ageing etc. Related researches have indicated that pollen has stronger antioxidant activity home and abroad. It has been pointed out that polyphenols have unique effect on human health and are the most widespread biodiversity natural material, which is widely recognized in the scientific community. Bee pollen is rich in polyphenol compounds, which can be used as potential antioxidant. Because of the solid pollen wall, some biological active ingredients and nutrients are not effectively absorbed by human body, thus the cell wall disruption is essential. Although research has manifested that the enzymatic cell wall disruption can increase the extracts antioxidant, few studies have conducted on the basic active ingredients and the extraction progress. In order to establish the extraction progress of pollen antioxidants and explore the relative correlation between the polyphenol contents and its antioxidant activity, a series experiments were conducted on the influence of antioxidant ability and the polyphenol contents with different factors which were cell wall disruption enzyme, extraction solvent, and ultrasonication. The results showed that compared with the alkalase, the supernates from cellulase progress showed higher free-radical scavenging ability of DPPH and reducing power; compared with warm water and pH3.7 citric acid-phosphate buffer, ethanol extracts from the sediments of the cellulase showed higher polyphenol contents and free-radical scavenging ability. It showed some correlation coefficient between total phenols and two antioxidant indices in camellia pollen was 0.8685 and 0.7600 respectively ($p>0.05$). In terms of ethanol and water extract, cell wall disruption with cellulase and ethanol extract increased the polyphenol contents reducing power and the scavenging ability of DPPH by 1.82, 2.17, 1.4 times and 1.56, 1.38, 11 times respectively. The contribution to the reducing power, DPPH radical scavenging ability and the polyphenol content of the mixture were 1.6:1, 3:1, 1.08:1. The results provide some reference to the development and the utilization of the pollen resource.

Key words: extraction, cellulose, alcohols, camellia pollen, cell wall disruption, polyphenols, antioxidant

(责任编辑: 张俊芳)