

橄榄酒清除活性氧及抗氧化作用研究

李 羚¹ 高云涛²

(1.保山师范学院,云南 保山 678000;2.云南民族大学化学与生物技术学院,云南 昆明 650031)

摘要: 利用 Fenton 反应、光照核黄素产生活性氧自由基·OH、O₂⁻分光光度法研究橄榄酒清除活性氧作用,通过硫代巴比妥分光光度法研究橄榄酒抗·OH 引起的 DNA 氧化损伤的保护作用。结果表明,橄榄酒能清除·OH、O₂⁻自由基,对 DNA 的·OH 氧化损伤有显著的抑制作用。

关键词: 橄榄酒; 活性自由基; 抗氧化

中图分类号: TS262.7;TS261.7;TS971 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2007)09-0043-02

Investigation on the Elimination of Active Oxygen by Canarium Album Wine & Its Antioxidation in vitro

LILing¹ and GAO Yun-tao²

(1. Baoshan Normal College, Baoshan, Yunnan 678000; 2. School of Chemistry and Bio-Science, Yunnan Nationality University, Kunming, Yunnan 650031, China)

Abstract: Active oxygen free radical including ·OH and O₂⁻ in vitro were produced by Fenton reaction and riboflavine photosensitization. Then the elimination of active oxygen by canarium album wine was investigated by spectrophotometry and the protection on the damage of DNA chain induced by hydroxyl radical was studied by thiobarbituric acid spectrophotometry. The results showed that canarium album wine could eliminate free radical including ·OH and O₂⁻ efficiently and it could also significantly inhibit anti-lipid peroxidation and the damage of DNA induced by free radical.

Key words: canarium album wine; active free radical; antioxidation

滇橄榄又称余甘子^[1],其味较酸,而余味甘甜爽口。据《滇南本草》记载,余甘子酸甘苦凉,润肺化痰,生津止渴,可用于治疗感冒发热、咳嗽、咽喉肿痛,对腹泻肠炎、高血压症也有疗效。西南各民族早有利用野生滇橄榄果制橄榄酒的习俗,笔者研究了利用滇橄榄酿制的橄榄酒对 Fenton 反应发生的羟基自由基及光照核黄素体系发生的超氧自由基的清除作用、抗脂质氧化作用,发现橄榄酒具有一定清除活性氧自由基及抗氧化的能力。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

橄榄酒:昆明情果红酒业有限公司生产,茶多酚、四川筠莲茶多酚厂生产。

7200 型可见分光光度计:上海尤尼柯仪器有限公司;光照箱:自制,灯功率 18 W。

所用试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 橄榄酒活性制备

收稿日期:2007-07-02

作者简介:李羚(1963-)女,云南会泽人,副教授,主要从事物理化学的教学和研究。

取橄榄酒 500 mL,减压蒸馏至干,得到固体物质 11.1 g。准确称取上述提取物 500.0 mg,用 90% vol 乙醇溶解后,用水定容至 100.0 mL,制得 5.0 mg/mL 橄榄酒活性物溶液。

1.2.2 ·OH 产生及清除活性测定

采用 Fenton 反应产生·OH,MB 捕获显色法^[2]。取 2 mL NaHCO₃ 缓冲溶液,加入不同体积的橄榄酒活性物溶液,2 mL 200.0 μmol/L Fe²⁺ 溶液,2 mL 20.0 μmol/L MB 溶液,然后加入 2 mL 20 mmol/L H₂O₂ 溶液,定容至 10 mL,混匀,于常温下反应 5 min,以缓冲溶液为参比,测定 660nm 的吸光度 A,以 5 mL 水代替橄榄酒活性物溶液,同样条件下测定吸光度 A_R,同时测定未加 Fe²⁺、H₂O₂ 及橄榄酒活性物溶液空白溶液的吸光度为 A₀。

$$\text{清除率} = \frac{A - A_0}{A_R - A_0} \times 100\%$$

1.2.3 光照核黄素体系产生 O₂⁻ 及清除

参照文献^[3]的方法,用 pH 值为 7.8 的 0.05 mol/L 混合磷酸盐缓冲液为溶剂,配制含 3.3 × 10⁻⁶ mol/L 核黄

素、0.01 mol/L 蛋氨酸、 4.6×10^{-5} mol/L 氯化硝基四氮唑兰(NBT)及各种浓度的橄榄酒活性物溶液,在25℃下,置于光照箱光照30 min,取出后以蒸馏水作为参比液,测定 560nm 处吸光度A,同时以水代替橄榄酒溶液测定空白吸光度 A_{00} 。

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

2 结果与分析

2.1 对 Fenton 反应产生·OH 的清除作用

橄榄酒活性物溶液与茶多酚进行对照研究,对 Fenton 反应产生·OH 的清除作用见图 1。

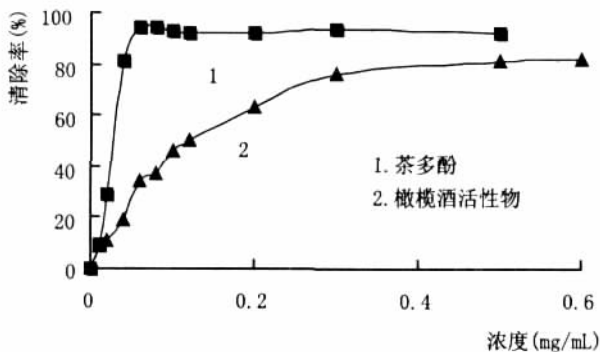


图 1 对 Fenton 反应产生·OH 的清除作用

从图 1 可知,橄榄酒活性物溶液 $IC_{50}=0.12 \text{ mg/mL}$,质量浓度 0.6 mg/mL ,清除率达最大,最大清除率为 88.2%。茶多酚 $IC_{50}=0.038 \text{ mg/mL}$,最大清除率达到 94.2%。结果还表明,橄榄酒活性物溶液对·OH 的清除效果明显, IC_{50} 高于茶多酚,最大清除率略低于茶多酚,原因在于橄榄酒活性物溶液非纯物,而茶多酚是纯品。

2.2 对光照核黄素产生 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

橄榄酒活性物溶液及茶多酚对光照核黄素产生 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用见图 2。

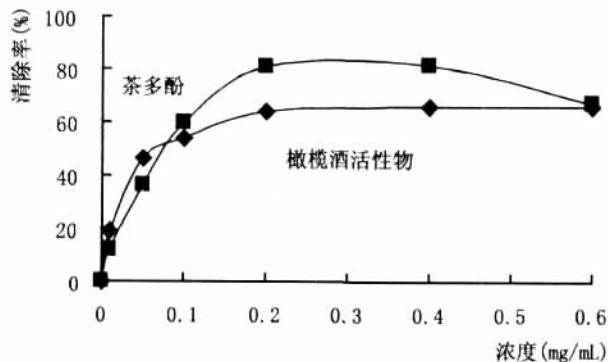


图 2 光照核黄素 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用

图 2 表明,橄榄酒活性物溶液及茶多酚对光照核黄素产生 $O_2^{\cdot-}$ 均有较强的清除作用,橄榄酒活性物溶液 $IC_{50}=0.096 \text{ mg/mL}$ 。橄榄酒活性物溶液 0.6 mg/mL 对

$O_2^{\cdot-}$ 的清除率达最大,最大清除率为 67.2%。茶多酚 $IC_{50}=0.082 \text{ mg/mL}$,浓度达 0.20 mg/mL 时对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率达最大,最大清除率为 81.7%。结果表明,橄榄酒活性物溶液对 $O_2^{\cdot-}$ 清除率略低于茶多酚, IC_{50} 较茶多酚高的原因同样可能与所用橄榄酒活性物溶液纯度不高有关。

2.3 对·OH 引发 DNA 氧化损伤的抑制作用

硫代巴比妥酸(TBA)可与丙二醛(MDA)类似物反应生成粉红色物质,该物质在 532 nm 处有最大光吸收,采用 TBA 反应可定量检测脱氧核糖或 DNA 上脱氧核糖环受·OH 攻击氧化断裂产生的丙二醛类似物^[4]。本文选择 DNA 为·OH 靶底物,结果见表 1。

表 1 橄榄酒活性物溶液对·OH 引发 DNA 产生 MDA 的抑制作用

浓度 (mg/mL)	$A_{532\text{nm}}$	抑制率 (%)
0	0.192	0.00
0.1	0.152	20.83
0.2	0.137	28.65
0.4	0.079	58.85
0.6	0.059	69.27

表 1 表明,未加橄榄酒活性物溶液时,体系有较大的 $A_{532\text{nm}}$,说明·OH 能对 DNA 的脱氧核糖进行攻击,使糖环断裂,产生丙二醛类似物,加入橄榄酒后, $A_{532\text{nm}}$ 值明显减小,表明丙二醛类似物产生减小, DNA 氧化损伤被抑制,抑制率随橄榄酒活性物溶液浓度的增加而增加,说明橄榄酒能有效抑制 MDA 生成,对 DNA 上脱氧核糖的氧化损伤抑制作用较好。

3 讨论

橄榄含有丰富的类 SOD 活性物质和其他多种具有生物活性的物质^[5],如黄酮等,尤其维生素 C 含量特高,鲜果可达 $400 \sim 500 \text{ mg/100 g}$,维生素 C 是目前橄榄的主要有效成分,实验表明,维生素 C、黄酮类物质多数具有独特的药理活性^[6],与茶多酚中的儿茶素类似具有酚羟基的结构^[7],酚羟基与自由基反应可形成稳定的半醌式自由基结构,从而终止自由基链式反应,这是酚羟基化合物清除自由基的最主要机制^[8]。可以认为酚羟基是多酚类物质抗氧化作用的主要活性基团;多酚类物质也是种供氢体,可以通过形成氢键达到稳定并降低自由基活性的目的,酚羟基结构同时还能通过螯合体系中的 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 等微量元素,阻止·OH 的产生,其中的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴雪辉,谢治芳,黄永芳. 余甘子的化学成分和保健功能作用 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(6): 69-71.

(下转第 52 页)

据贵阳地区原料价格作基础计,其他地区可根据实际情况,可因时、因地选择合理的原料配方。

3.2 筛选出来的替代原料曲与对照曲的出酒率及质量指标

试验结果可知,试验酒曲在酒度设定为45% vol时,比吴家酒曲出酒率高出5%,筛选出的配比原料与麸皮原料相比所生产的Q303纯种根霉菌在质量上并无差异,而仅仅是二者的价格上的差异。从试验酒样的理化卫生指标可以看出,酵母配比为10%的 J_2 试验酒及市售曲的试验酒虽然我们在蒸馏工序中进行了掐头去尾的操作处理,但是杂醇油含量仍然超标。而酵母配

比量为6%的 J_1 试验酒的杂醇油含量却在标准范围内。当然,小曲酒杂醇油的降低除了与酒曲相配的酵母有关外,另一方面,蒸馏工序中严格执行掐头去尾的操作,也有利于酒体杂醇油含量的控制。因此,在酒曲配制过程中,添加适量的酵母配制对杂醇油的降低是十分有效的。 J_1 的实验分析结果表明,添加酵母的配比量以6%为宜。

参考文献:

- [1] 陈士瑜.食用菌生产[M].北京:农业出版社,1987.
- [2] 天津轻工业学院,等.工业发酵分析[M].北京:轻工业出版社,1991.

(上接第44页)

- [2] 廖力夫,何玉媛,袁亚莉,等.可见分光光度法检测 Fenton 反应中的羟自由基[J].衡阳医学院学报,1996,24(2):130-134.
- [3] Beauchamp C, Fridovich I. *In* Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1971, 44: 276-287.
- [4] 王爱国,罗广华.羟自由基启动下的脱氧核糖降解及其产物的TBA反应[J].生物化学与生物物理进展,1993,20(2):150-152.
- [5] 程伟贤,陈鸿雁,张义平,等.余甘子功能食品的开发及其类

- SOD活力测定[J].食品与生物技术学报,2006,25(4):113-115.
- [6] Cutteridge M C. Thiobarbituric acid reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates [J]. FEBS Letters, 1961, 128: 343-348.
- [7] 魏朝良,于德红,安利佳.黄酮类化合物及清除自由基机制的探讨[J].中成药,2005,27(2):239-241.
- [8] 贾之慎,杨贤强.茶多酚清除活性氧自由基的分光光度法研究[J].茶叶,1993,19(1):25-27.

(上接第47页)

表5 无机氮源对休哈塔假丝酵母木糖发酵的影响

项目	无机氮源				
	尿素	硫酸铵	硝酸铵	磷酸氢二铵	柠檬酸三铵
乙醇最大浓度(g/L)	20.52 ^a	17.76 ^a	19.26 ^a	16.18 ^a	14.84 ^a
得率(g/g)	0.34	0.30	0.32	0.28	0.26
乙醇得率与理论值之比(%)	74.5	64.4	70.0	60.1	56.7
残余木糖浓度(g/L)	0.15 ^a	0.00 ^a	0.15 ^a	1.47 ^a	3.10 ^a
木糖利用率(%)	99.8	100	99.8	97.6	94.8
生物量(g/L)	4.32	4.50	4.82	3.44	5.16

能力达到3% vol,在28℃,初始pH值5.0,160 r/min,250 mL三角瓶装液量150 mL,木糖浓度60 g/L,玉米浆0.5% (v/v),尿素0.024%的条件下,休哈塔假丝酵母发酵木糖能产乙醇20.52 g/L,得率达到理论值的74.5%,且发酵时间由原来的120 h缩短到72 h。由于休哈塔假丝酵母发酵木糖产乙醇周期还较长,而且酒精耐受性不高,因此有待对菌株选育和发酵条件等方面进行研究。

参考文献:

- [1] 刘巍峰,张晓梅,陈冠军,等.糖发酵酒精代谢工程的研究进展[J].过程工程学报,2006,6(1):138-143.
- [2] Jeewon Lee. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol [J]. J. Biotechnol, 1997, (56): 1-24.
- [3] T W Jeffries, Y.-S. Jin. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, (63): 495-509.
- [4] Dien B S, Cotta M A, Jeffries T W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current Status [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, (63): 258-266.
- [5] 杜连祥,等.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.
- [6] 蔡武诚,袁厚积.生物物质常用化学分析方法(第一版)[M].北京:科学出版社,1982.
- [7] 王亚楠,肖春光.快速测定啤酒酒精度和真正发酵度的方法[J].酿酒,2002,29(6):84-86.
- [8] Nolteau V, Prezibst Belby L, Kgenes J P et al. Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance [J]. Current Microbiol, 1993, (27): 191-197.