

酶解结合高剪切破壁技术对蜂花粉酚类物质及抗氧化活性的影响

王悦¹, 徐元元², 杨二林², 程妮^{2,3*}

(1. 西北大学化工学院, 西安 710069; 2. 西北大学食品科学与工程学院, 西安 710069; 3. 陕西省蜂产品工程技术研究中心, 西安 710065)

摘要: 为了提高蜂花粉体外抗氧化活性及其对质粒 DNA 氧化损伤的保护作用, 该研究以荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰、五味子 6 种蜂花粉为对象, 研究纤维素酶酶解结合高剪切破壁技术对蜂花粉酚类物质溶出的影响。破壁试验结果表明, 采用质量分数 1%~4% 纤维素酶 (荷花 1%; 枣花 4%; 茶花 2%; 油菜 1%; 玫瑰 4%; 五味子 3%) 结合 30 s 10 000~15 000 r/min 高剪切, 6 种蜂花粉均可达到 90% 以上破壁率。高效液相色谱-二极管阵列检测法 (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection, HPLC-DAD) 分析结果表明 6 种蜂花粉破壁后酚类物质的溶出量和种类均有不同程度增加, 荷花蜂花粉没食子酸含量较破壁前增加 6 倍, 枣花蜂花粉经破壁后山奈酚溶出, 且含量较高, 为 10.31 mg/g, 破壁后油菜蜂花粉没食子酸含量为 11.59 mg/g, 较破壁前提高 59%。油菜蜂花粉总黄酮含量为 29.6 mg/g (以芦丁当量计), 相较破壁前提高 6.4 倍, 总酚含量为 21.60 mg/g (以没食子酸当量计), 相较未破壁提高 1.5 倍; 体外抗氧化试验表明, 破壁能够将枣花蜂花粉 Fe^{2+} 络合力提高 2.2 倍, 油菜蜂花粉 Fe^{3+} 还原力提高 8 倍。破壁后荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰、五味子 6 种蜂花粉对 pBR322 质粒 DNA 氧化损伤的保护作用分别提高了 60.5%、12.4%、287.7%、442.1%、82.5%、4.8%。结果表明, 纤维素酶酶解结合高剪切破壁方法, 能够促进蜂花粉酚类物质的溶出, 增强体外抗氧化活性, 有效预防 DNA 氧化损伤。研究结果为蜂花粉资源的开发与利用提供理论依据。

关键词: 提取; 纤维素酶; 蜂花粉; 破壁; 酚类物质; 抗氧化活性; DNA 氧化损伤

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.2.036

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2021)-2-0313-08

王悦, 徐元元, 杨二林, 等. 酶解结合高剪切破壁技术对蜂花粉酚类物质及抗氧化活性的影响[J]. 农业工程学报, 2021, 37(2): 313-320. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.2.036 <http://www.tcsae.org>

Wang Yue, Xu Yuanyuan, Yang Erlin, et al. Effects of enzymatic hydrolysis combined with high-shear wall breaking technology on phenolic compounds and antioxidant activity of bee pollen[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(2): 313-320. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.2.036 <http://www.tcsae.org>

0 引言

蜂花粉是由蜜蜂采集被子植物雄蕊花药或裸子植物小孢子囊内的花粉细胞, 并混入花蜜及自身分泌物而形成团粒状物^[1]。蜂花粉作为一种保健食品, 具有治疗特性, 蜂花粉中约 70% 的物质具有生物活性, 具有抗氧化、保护肝脏、抗炎、抗菌和抗癌作用^[2-4]。其中多酚类物质表现出强抗氧化活性^[5], 可以有效清除自由基, 保护机体免受活性氧的损伤, 同时增强血管活性, 从而改善血液循环和心脏功能。酚类物质可促进改变膜的通透性, 破坏细菌的遗传物质达到抑菌效果, 特别是对病原菌化脓性链球菌有显著的抗菌效果^[6], 酚类物质是蜂花粉主要的抑菌剂, 总酚含量同革兰氏细菌生长数量呈负相关^[7]。酚类物质还有抑制肿瘤细胞的作用, 阻断肿瘤细胞特定基因的表达, 同时增强免疫系统^[8]。但蜂花粉外壁主要由纤维素和孢粉素构成, 具有抗酸、耐碱、抗微生物分解的

特性, 不经破壁, 酚类物质很难溶出, 只能从萌发孔中缓慢释放, 体外抗氧化活性很低, 不利于开发用于外用的护肤品及药品。此外坚硬的花粉壁使得蜂花粉在生物体内消化率不高, 吴伟^[9]通过小鼠体内消化试验表明破壁蜂花粉在小鼠胃部更容易排空, 荧光显微镜观察消化 2 h 和 12 h 后的蜂花粉形态, 发现破壁蜂花粉碎片并无变化, 未破壁蜂花粉粉粒依旧完整, 表明蜂花粉外壳并不受消化酶影响, 意味着大部分营养物质不能够被胃肠消化。未破壁蜂花粉在生物体内消化率只有 52%~59%, 导致营养成分浪费, 因此蜂花粉破壁有助于对提高蜂花粉活性物质溶出, 提高体内外利用度^[10-12]。

花粉破壁是指在外力作用下破坏花粉壁结构, 破壁后内容物溶出, 有助于提高生物活性。吴伟^[9]研究表明, 破壁后蜂花粉总黄酮、总酚溶出率显著增加 ($P<0.001$)。赵萌萌等^[13]对青稞麸皮超微破壁后, 抗氧化活性均有显著提高 ($P<0.05$)。目前主要采用机械破壁、温差破壁、酶解以及微生物发酵等破壁方法。机械破壁法时间作用长可能导致原料温度过高, 破坏营养成分; 温差破壁法成本过高, 时间过长; 酶解破壁与微生物发酵法等生物破壁法, 成本较高、时间过长, 大量使用使样品污染的可能性增大^[14]。由于蜂花粉外壁主要由纤维素和孢粉素

收稿日期: 2020-09-21 修订日期: 2020-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(31602013); 陕西省农业科技项目(2019NY-163)

作者简介: 王悦, 研究方向为功能性食品。Email: 541184109@qq.com

*通信作者: 程妮, 博士, 副教授, 研究方向为功能食品研究与开发。

Email: chengni@nwnu.edu.cn

构成,且为了克服单一破壁方法的弊端,故本研究采用纤维素酶酶解结合高剪切方法进行复合法破壁,提高生物利用度,降低成本的同时不破坏营养成分。且目前对于蜂花粉破壁研究多集中于破壁后形态表征以及对总酚、总黄酮含量影响,而破壁对蜂花粉酚类物质的溶出情况、抗氧化活性及对·OH介导的质粒DNA氧化损伤的保护作用的影响研究甚少。

本文以荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰和五味子6种蜂花粉等为研究对象,采用酶解联合高剪切破壁技术,研究破壁对蜂花粉酚类物质和抗氧化活性的影响。同时探讨破壁前后蜂花粉对·OH介导的质粒DNA链氧化损伤的保护作用,以期为蜂花粉资源的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰、五味子6种蜂花粉均直接从蜂农处采购,且植物源经过孢粉学鉴定^[15],确认每种蜂花粉的种类。

菲洛嗪(Ferrozine)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、水溶性维生素E(Trolox)、2,4,6-三(2-吡啶基)三嗪(tripyrildiazine, TPTZ)和酚类标准品(没食子酸、对羟基苯甲酸、2,4-二羟基苯甲酸、咖啡酸、丁香酸、p-香豆酸、阿魏酸、芦丁、鞣花酸、肉桂酸、槲皮素、柚皮素、山奈酚、异甘草素)购自美国Sigma公司;色谱级甲醇购自上海安谱实验科技股份有限公司;过氧化氢(H₂O₂)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自科昊生物工程有限公司;纤维素酶(酶活力为400 U/mg)购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2 蜂花粉破壁工艺

1.2.1 纤维素酶酶解破壁

参考并优化孟良玉等^[16]的方法,分别称取0.5 g蜂花粉,置于15 mL离心管中,添加质量分数为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%纤维素酶,料液比为1:10 g/mL,50℃恒温水浴摇床酶解5 h。酶解结束后,80℃水浴灭酶10 min。吸取破壁蜂花粉悬浊液1 mL,蒸馏水定容到10 mL,取1~2滴稀释液于载玻片上,置于20×20目(放大倍数:400×)荧光显微镜下观察,取九宫格视野,计算破壁率。

$$\text{破壁率} = \frac{\text{视野中已破壁蜂花粉个数}}{\text{同视野中蜂花粉总数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 纤维素酶酶解-高剪切联用破壁

参考王凯^[17]的方法,采用D-500均质机(德国Wiggins公司)将酶解过的蜂花粉悬浊液高剪切30 s,转速10 000~15 000 r/min,根据1.2.1节方法计算破壁率。

1.3 蜂花粉酚类物质富集

为了保证试验统一性,6种花粉均称取20 g,用体积分数为75%的乙醇、料液比1:20 g/mL(破壁蜂花粉酚类物质富集:称取20 g蜂花粉,按照料液比1:10 g/mL酶解后,将酶解液低温旋转蒸发至一定量,加入无水乙

醇配制成本体积分数为75%的乙醇溶液,按照1:20 g/mL料液比添加到破壁蜂花粉渣中)热回流2 h,三次回流,浓缩,采用体积分数为75%的乙醇定容至15 mL,备用。

1.4 HPLC分析6种蜂花粉破壁前后乙醇提取物酚类化合物

采用高效液相色谱-二极管阵列检测(High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection, HPLC-DAD)法测定蜂花粉酚类化合物含量^[18]。HPLC-DAD(U3000 HPLC, G1315A DAD, 美国Thermo公司),色谱柱Zorbax SB-C18(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:甲醇(A)、体积分数为0.1%的甲酸(B);梯度洗脱程序为:0~5 min, 15%A+85%B;5~10 min, 17%A+83%B;10~25 min, 30%A+70%B;25~35 min, 40%A+60%B;35~40 min, 50%A+50%B;40~55 min, 55%A+45%B;55~65 min, 60%A+40%B;65~70 min, 65%A+35%B;70~75 min, 70%A+30%B。流速为1.0 mL/min,进样量是10 μL蜂花粉乙醇提取物,二极管阵列检测器(DAD)检测波长:254、280、290、324 nm;柱温是30℃。

1.5 总酚含量测定

参照Sfifzadeh等^[19]方法,采用Folin-Ciocalteu法测定6种蜂花粉破壁前后的总酚含量,以表示酚类物质的溶出量。吸取0.3 mL方法1.3节中蜂花粉乙醇提取液定容到200 mL。准确吸取1 mL蜂花粉乙醇提取液,加入1 mL福林酚试剂、5 mL 1 mol/L Na₂CO₃溶液,用蒸馏水定容到10 mL,振荡混匀后,避光反应1 h。760 nm处,以蒸馏水为参比,测吸光度值,总酚含量以没食子酸当量(Gallic Acid Equivalents, GAE) mg/g表示。

1.6 总黄酮含量测定

参照张翠香等^[20]方法,采用Al(NO₃)₃比色法测定6种蜂花粉破壁前后的总黄酮含量,以表示黄酮类物质的溶出量。吸取0.3 mL蜂花粉乙醇提取液定容到10 mL。吸取1 mL蜂花粉乙醇提取液,加0.4 mL 5 g/mL的NaNO₂,反应6 min后,加入0.4 mL 10%的Al(NO₃)₃,反应6 min后,加入4 mL 4%的NaOH溶液,用80%的甲醇溶液定容到10 mL,静置15 min。于510 nm处测定其吸光度值,总黄酮含量以芦丁当量(Rutin Equivalents, RE) mg/g表示。

1.7 DPPH自由基清除能力测定

参照Hara等^[21]的研究方法,并进行调整后测定6种蜂花粉破壁前后对DPPH的清除能力,分别吸取0.6 mL不同浓度破壁前后的蜂花粉乙醇提取液,加入0.04 mg/mL的DPPH甲醇溶液5 mL,混匀后在暗处静置1 h,于517 nm处测其吸光度。结果以IC₅₀值(抑制50% DPPH自由基时所需蜂花粉的浓度)表示, DPPH自由基清除率计算公式如下:

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中A₀为参比溶液的吸光值;A₁为样品溶液吸光值。

1.8 Fe²⁺络合力测定

参照何亮亮等^[22]方法,吸取200 μL蜂花粉乙醇提取

液, 加入 100 μL 浓度为 1 mmol/L 的 FeSO_4 溶液, 300 μL 1 mmol/L 的 Ferrozine 溶液, 用甲醇定容至 3 mL, 混匀, 10 min 后于 562 nm 处测定吸光度。蜂花粉 Fe^{2+} 络合力测定以 mg/g 表示 (以 Na_2EDTA 计)。

1.9 Fe^{3+} 还原力测定

参照 Rao 等^[23]方法, 取 0.4 mL 蜂花粉乙醇提取液, 加入 3.6 mL 的 TPTZ (10 mmol/L TPTZ 溶液、20 mmol/L FeCl_3 溶液、300 mmol/L pH 值为 3.6 醋酸缓冲液, 1:1:10 体积比配制) 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 于 593 nm 处测定吸光度。蜂花粉铁还原抗氧化力以 mg/g 表示 (以 Trolox 计)。

1.10 对 $\cdot\text{OH}$ 诱导的 pBR322 质粒 DNA 氧化损伤保护作用的测定

使用琼脂糖凝胶电泳法分别测定蜂花粉破壁前后对 $\cdot\text{OH}$ 诱导的 pBR322 质粒 DNA 氧化损伤保护作用。参照陈思南等^[24]方法进行测定。未破壁组: 试验组加入 1 μL DNA、1 μL 1.0 mmol/L FeSO_4 、1 μL H_2O_2 和 3 μL 0.3 mL/mL 蜂花粉提取物, 用 50 mmol/L PBS 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.0) 定容到 15 μL , 模型组用 50 mmol/L PBS 磷酸盐缓冲液代替样品, 正常组添加 1 μL DNA 和 14 μL 磷酸盐缓冲液; 破壁组: 试验组加入 1 μL DNA、1 μL 1.0 mmol/L FeSO_4 、1 μL H_2O_2 和 3 μL 0.3 mL/mL 破壁蜂花粉提取物, 用 50 mmol/L PBS 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.0) 定容到 15 μL , 模型组用 50 mmol/L PBS 磷酸盐缓冲液代替样品, 正常组添加 1 μL DNA 和 14 μL 磷酸盐缓冲液。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光水浴 30 min 后, 加入 1 μL 上样缓冲液混合均匀, 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳 50 min (电压为 50 V)。使用凝胶成像仪 (德国耶拿分析仪器股份公司) 对电泳条带进行拍照, 使用 Quantity One 软件进行数据分析, 破壁前后的蜂花粉保护率用以下公式计算进行对比

$$\text{保护率} = \frac{\text{蜂花粉组双螺旋占比} - \text{模型组双螺旋占比}}{\text{对照组双螺旋占比}} \times 100\% \quad (3)$$

1.11 数据处理

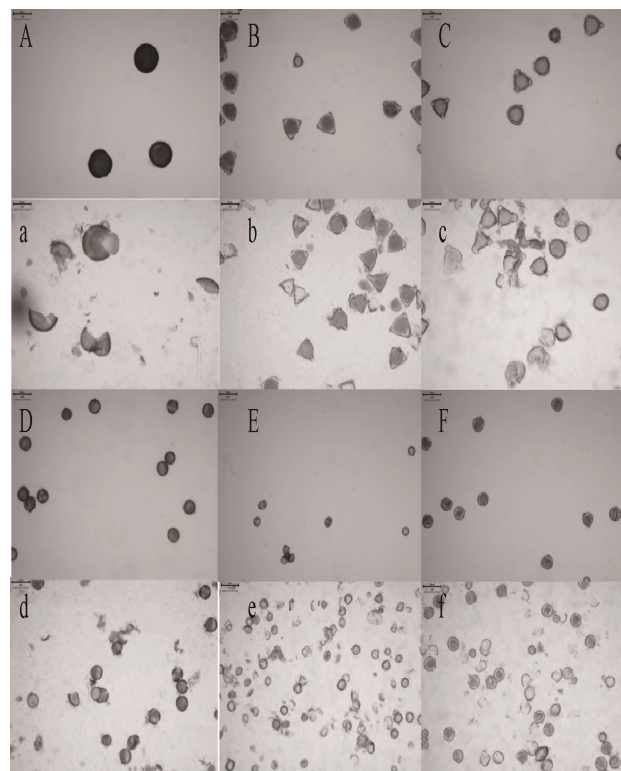
所有试验均测定 3 次, 结果以平均值 \pm 标准偏差表示, 使用 SPSS 19.0 软件进行方差分析和显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, 采用 Origin 9.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶-高剪切联用对蜂花粉破壁率的影响

由于蜂花粉复杂的细胞壁, 具有生物活性的化合物难以被充分释放, 导致蜂花粉营养成分利用率低^[25], 破壁可以使蜂花粉细胞壁破碎, 内容物充分溶出, 营养物质释放, 提高蜂花粉营养物质利用率。本文首先研究了纤维素酶酶解对不同品种蜂花粉破壁率的影响, 结果见图 1 和图 2。不同种类的蜂花粉经破壁后, 花粉孢子均呈现出不同程度的破裂现象, 且随纤维素酶浓度的增加, 蜂花粉的破壁率均增加。不同蜂花粉的细胞壁结构不同, 因此对纤维素酶的耐受能力不同, 本研究中玫瑰蜂花粉耐受力最强, 纤维素酶添加量增加到 8% 时破壁率只有

74%, 荷花蜂花粉最弱, 1% 的纤维素酶就可使其破壁率达到 87%。



注: A-F 为荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰、五味子 6 种蜂花粉破壁前的形态表征, a-f 为荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰、五味子 6 种蜂花粉破壁后形态表征 (纤维素酶添加量: 荷花 1%; 枣花 4%; 茶花 2%; 油菜 1%; 玫瑰 4%; 五味子 3%, 结合高剪切 30 s, 破壁率 $\geq 90\%$)。放大倍数: 400 \times 。
Note: A-F are morphological characterization of lotus, jujube, camellia, rape, rose, schisandra bee pollen before cell wall disruption, a-f are morphological characterization of lotus, jujube, camellia, rape, rose, schisandra bee pollen after cell wall disruption, respectively. (Cellulase addition amount: lotus 1%; jujube 4%; camellia 2%; rape 1%; rose 4%; schisandra 3%, combined with high shear for 30 s, cell wall disruption rate $\geq 90\%$) Magnification: 400 \times .

图 1 蜂花粉破壁前后形态表征

Fig.1 Morphological characterization of bee pollen before and after the cell wall disruption

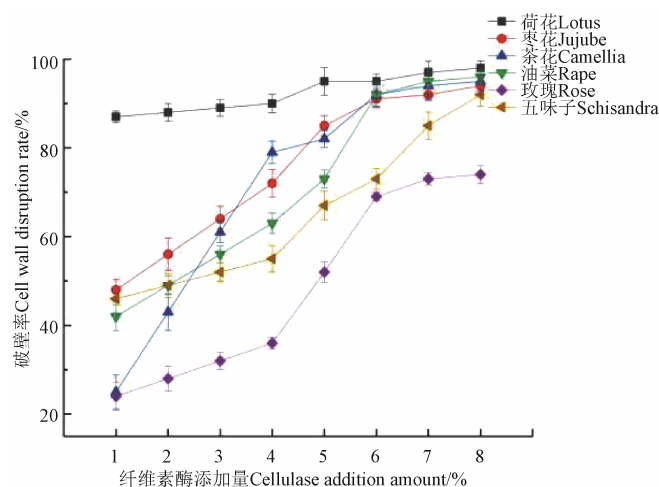


图 2 纤维素酶添加量对蜂花粉破壁率的影响

Fig.2 Effects of cellulase addition amount on cell wall disruption rate of bee pollen

在纤维素酶酶解基础上, 采用了高剪切破壁技术, 结果见图 3。6 种蜂花粉酶解后经过 30 s, 10 000~15 000 r/min

的高剪切, 破壁率均有显著提高 ($P<0.05$), 两种方法联用能以 1%~4% 较少的纤维素酶用量达到 90% 及以上的破壁率。油菜蜂花粉 1% 的纤维素酶即可达到 93%, 较仅采用酶解方法提高了 1.2 倍; 茶花、玫瑰蜂花粉只需 2%、4% 的纤维素酶即可达到 96%、90% 的破壁率, 较单采用酶解方法提高了 1.2 倍和 1.5 倍。马福敏等^[26]研究了超声、温差、酵母发酵 3 种破壁技术两两复合及三者复合联用对茶花粉进行破壁, 结果表明三者联用破壁效果最好, 破壁率为 85%, 本研究所用方法与之相比, 仅需 2% 的纤维素酶, 结合高剪切后, 破壁率达到 96%, 且操作简单。

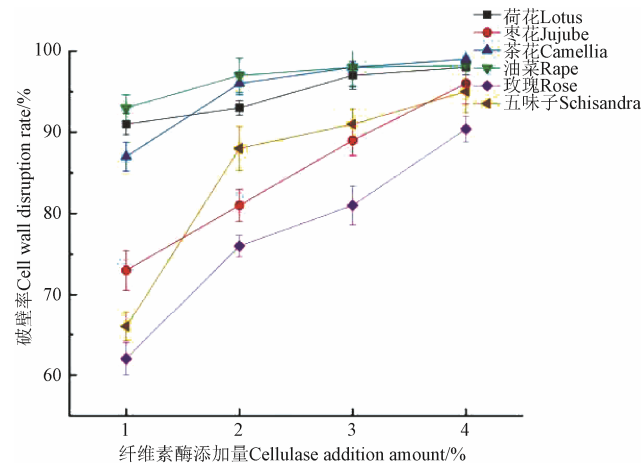


图3 纤维素酶-高剪切联用对蜂花粉破壁率的影响
Fig.3 Effects of cellulase enzymatic-high shear combination on cell wall disruption rate of bee pollen

基于以上研究结果, 下述研究的破壁蜂花粉均采用破壁率达到 90% 以上的蜂花粉, 具体破壁采用不同浓度的纤维素酶酶解与高剪切联用的方法 (纤维素酶添加量: 荷花 1%; 枣花 4%; 茶花 2%; 油菜 1%; 玫瑰 4%; 五味子 3%), 在此基础上探究破壁对蜂花粉酚类物质及抗氧化活性的影响。

2.2 纤维素酶-高剪切联用破壁对蜂花粉酚类化合物的影响

酚类化合物对癌症、动脉粥样硬化, 免疫系统衰弱以及帕金森等疾病均有预防和治疗作用^[27], 可用于防止氧化损伤, 清除自由基, 螯合金属离子的活性物质^[28]。近年来, 蜂花粉酚类化合物因其保健作用备受关注^[29]。本文测定了 6 种蜂花粉破壁前后总黄酮、总酚含量见表 1, 6 种蜂花粉破壁后总黄酮、总酚含量均有不同程度的增加。破壁后, 油菜蜂花粉酚类物质的释放作用最为显著 ($P<0.05$), 总酚含量由 8.6 mg/g 提高至 21.6 mg/g, 提高 1.5 倍, 总黄酮含量提高 6.4 倍, 阮征等^[30]用纤维素酶-果胶酶-蛋白酶复合酶液酶解油菜蜂花粉, 总黄酮含量由 2.2447 mg/g 提高到 2.4312 mg/g, 提高 8.3%, 相比而言本研究方法能够释放更多活性物质; 经破壁后茶花蜂花粉总酚含量为 15.7 mg/g, 提高 11.3%。油菜蜂花粉总黄酮含量最高, 五味子蜂花粉破壁后总酚含量最高, 荷花蜂花粉总黄酮、总酚含量较低。本文采用 HPLC-DAD 对 6 种蜂花粉中的酚类物质进行分析, 结果见表 2。茶花蜂花

粉破壁后共检测出 10 种物质, 较未破壁多检测出 2 种物质; 肉桂酸和山奈酚在破壁后被释放, 含量分别为 0.72 mg/g 和 4.38 mg/g, 没食子酸含量由 0.39 mg/g 增加到 2.53 mg/g, 柚皮素含量为 6.50 mg/g, 是破壁前 4 倍, 且高于其他蜂花粉。油菜蜂花粉经破壁后, 山奈酚和异甘草素溶出, 异甘草素含量达到 0.97 mg/g, 系 6 种蜂花粉中含量最高, 山奈酚含量达到 2.32 mg/g, 较 Lv 等^[31]微波破壁检测得到的山奈酚含量少 (23.44 mg/g), 可能由于油菜蜂花粉破壁方式、产地影响, 以及酚类富集方式不同, 导致差异; 油菜蜂花粉破壁后没食子酸含量为 11.59 mg/g, 较未破壁前提高 59%, 为所检测到的酚类物质中含量最高。枣花蜂花粉经破壁后检测出山奈酚, 含量为 10.31 mg/g, 高于其他蜂花粉。破壁使玫瑰蜂花粉多检测出两种酚类物质, 五味子蜂花粉多检测出三种酚类物质, 荷花蜂花粉虽没有其他酚类物质溶出, 但没食子酸含量有大幅度增加, 由 0.72 mg/g 增加到 4.43 mg/g, 较破壁前提高 5 倍。破壁后, 茶花蜂花粉检测出的酚类物质种类最多、含量最高, 荷花蜂花粉酚类物质种类及含量均为最少。

表1 破壁前后蜂花粉的总黄酮、总酚含量
Table1 The content of total flavonoids and phenols in bee pollen before and after cell wall disruption

蜂花粉类别 Bee pollen types	总黄酮含量 Total flavonoid content/(mg·g ⁻¹)		总酚含量 Total phenols content/(mg·g ⁻¹)	
	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption
	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption
荷花 Lotus	3.60±0.02 ^b	6.70±0.03 ^a	13.10±0.07 ^b	14.70±0.03 ^a
枣花 Jujube	9.60±0.13 ^b	22.50±0.20 ^a	8.70±0.04 ^b	20.60±0.27 ^a
茶花 Camellia	11.00±0.16 ^b	12.50±0.12 ^a	14.10±0.10 ^b	15.70±0.19 ^a
油菜 Rape	4.00±0.06 ^b	29.60±0.18 ^a	8.60±0.02 ^b	21.60±0.16 ^a
玫瑰 Rose	8.80±0.07 ^b	10.20±0.09 ^a	20.10±0.05 ^b	21.10±0.09 ^a
五味子 Schisandra	7.40±0.04 ^b	15.70±0.04 ^a	18.20±0.12 ^b	23.90±0.12 ^a

注: 同一类别蜂花粉同一指标数据中不同小写字母肩标代表差异显著 ($P<0.05$), 下同。
Note: The shoulder marks of different lowercase letters in the same index data of bee pollen of the same category represent significant differences ($P<0.05$), the same below.

2.3 纤维素酶-高剪切联用破壁对蜂花粉体外抗氧化活性的影响

由表 3 可知, 6 种蜂花粉破壁后体外抗氧化能力均增强。DPPH 自由基 (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 中氮原子的奇数电子通过从抗氧化剂接受一个氢原子到相应的肼而被还原^[32]。酚类物质这类抗氧化剂可以有效减少 DPPH 自由基, 对氧化应激损伤有保护作用^[33]。测定 IC₅₀ 值越小, 则自由基清除能力越强。经破壁后, 同等质量下枣花蜂花粉清除 50% DPPH 自由基所需浓度降低约 95%, 油菜蜂花粉降低约 92%, 延莎等^[34]采用气流超微粉碎破壁处理油菜蜂花粉后清除 50% DPPH 自由基所需蜂花粉浓度由 0.338 mg/mL 降低到 0.315 mg/mL, 仅降低 6.8%, 且破壁后检测到总黄酮含量由 25.462 mg/g 减少到 23.611 mg/g, 可见气流超微粉碎破壁方法效率不高且对蜂花粉营养物质有所损伤, 相

比而言酶解与高剪切联用的破壁方法使 DPPH 自由基清除能力更大,且溶出的总黄酮含量增加 6.4 倍,在不破坏其营养成分的同时释放更多的抗氧化物质。破壁对玫瑰蜂花粉和五味子蜂花粉 DPPH 自由基清除能力也有明显的增强趋势 ($P<0.05$)。 Fe^{2+} 等过渡态离子能够催化 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$ ^[35],加速氧化反应,酚类化合物与 Fe^{2+} 络合,中断氧化反应。破壁后 6 种蜂花粉 Fe^{2+} 络合能力均有提高作用 ($P<0.05$),枣花蜂花粉 Fe^{2+} 络合能力由 0.36 mg/g 提高至 1.16 mg/g,提高约 2.2 倍;

茶花、玫瑰蜂花粉提高约 1 倍,荷花、油菜、五味子蜂花粉较其他 3 种蜂花粉提升幅度较小。 Fe^{3+} 还原力是指样品提供电子,将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,生成有色物质引起吸光度值增加^[36]。破壁后 6 种蜂花粉的 Fe^{3+} 还原力均提高 ($P<0.05$),其中对油菜蜂花粉影响作用最大,从 6.20 mg/g 提高至 55.80 mg/g,提高 8 倍;其次为枣花蜂花粉,提高 1.5 倍;茶花蜂花粉破壁后 Fe^{3+} 还原力由 15.30 mg/g 提高至 24.20 mg/g。破壁对荷花蜂花粉和玫瑰蜂花粉 Fe^{3+} 还原力影响较弱,但也有提高。

表 2 破壁前后蜂花粉的酚类化合物含量
Table 2 The content of phenolic compounds in bee pollen before and after cell wall disruption (mg·g⁻¹)

编号 Number	化合物 Compound	保留时间 Retention time/min	荷花 Lotus		枣花 Jujube		茶花 Camellia		油菜 Rape		玫瑰 Rose		五味子 Schisandra	
			破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption
1	没食子酸 Gallic acid	4.21	0.72±0.01	4.43±0.04	4.49±0.04	4.77±0.12	0.39±0.01	2.53±0.02	7.29±0.04	11.59±0.05	6.93±0.01	8.87±0.21	1.10±0.01	4.32±0.04
2	对羟基苯甲酸 p-hydroxybenzoic acid	12.75	tr	0.28±0.01	0.06±0.00	0.12±0.00	0.02±0.00	0.05±0.01	nd	0.45±0.02	0.21±0.01	0.59±0.03	0.11±0.00	0.79±0.04
3	2,4 二羟基苯甲酸 2,4 Dihydroxybenzoic acid	14.62	tr	tr	tr	0.62±0.01	nd	nd	tr	tr	tr	tr	tr	tr
4	丁香酸 Syringic acid	15.74	tr	0.11±0.00	nd	0.07±0.00	1.58±0.00	2.91±0.03	0.01±0.00	0.46±0.01	0.03±0.00	0.04±0.00	nd	tr
5	p-香豆酸 p-coumaric acid	19.64	nd	nd	0.87±0.01	1.40±0.01	tr	1.61±0.00	nd	nd	tr	tr	nd	nd
6	阿魏酸 Ferulic acid	21.39	nd	nd	1.02±0.01	7.91±0.32	0.14±0.00	0.46±0.00	nd	nd	nd	nd	0.03±0.00	0.09±0.01
7	芦丁 Rutin	27.51	0.03±0.00	0.27±0.03	nd	nd	3.85±0.02	7.74±0.23	nd	nd	tr	0.30±0.00	nd	3.45±0.01
8	鞣花酸 Ellagic acid	29.20	nd	nd	nd	nd	0.20±0.00	1.13±0.04	0.17±0.00	0.60±0.00	nd	0.09±0.00	nd	0.25±0.01
9	肉桂酸 Cinnamic acid	35.36	nd	nd	nd	nd	nd	0.72±0.01	tr	0.06±0.00	tr	tr	nd	nd
10	槲皮素 Quercetin	36.98	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	柚皮素 Naringenin	36.71	nd	nd	nd	nd	1.56±0.01	6.50±0.04	nd	nd	nd	1.64±0.01	nd	nd
12	山奈酚 Kaempferol	40.81	nd	nd	nd	10.31±0.30	nd	4.38±0.05	nd	2.32±0.05	nd	nd	nd	nd
13	异甘草素 Isoliquiritigenin	42.17	0.05±0.00	0.11±0.00	nd	nd	nd	nd	nd	0.97±0.00	nd	nd	nd	nd
总量 Total content			0.80	5.20	6.44	25.20	7.74	28.03	7.47	16.45	7.17	11.53	1.24	8.90

注：“tr”表示痕量,“nd”表示未检出。
Note: “tr” means trace amount, and “nd” means not detected.

表 3 破壁前后蜂花粉的抗氧化活性
Table 3 Antioxidant activity of bee pollen before and after cell wall disruption

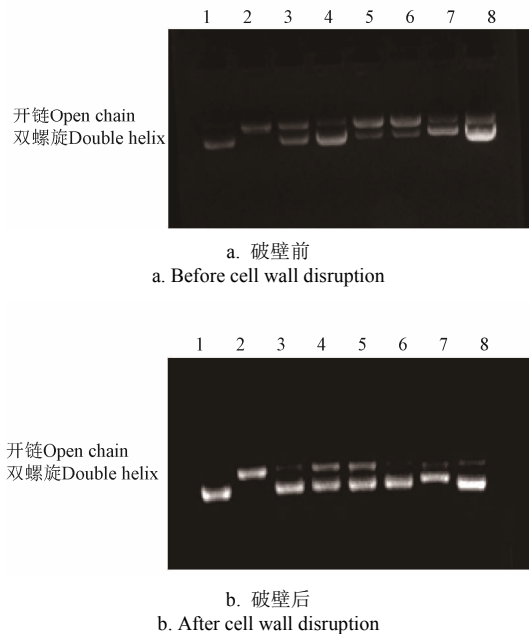
蜂花粉类别 Bee pollen types	DPPH 自由基清除能力 DPPH free radical scavenging capacity/(mg·mL ⁻¹)		Fe^{2+} 络合力 Fe^{2+} complex force/(mg·g ⁻¹)		Fe^{3+} 还原力 Fe^{3+} reduction capacity/(mg·g ⁻¹)	
	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption	破壁前 Before cell wall disruption	破壁后 After cell wall disruption
荷花 Lotus	157.20±0.42 ^b	81.90±0.16 ^a	1.17±0.01 ^b	1.53±0.01 ^a	2.20±0.00 ^b	3.10±0.03 ^a
枣花 Jujube	7.60±0.03 ^b	0.36±0.00 ^a	0.36±0.00 ^b	1.16±0.01 ^a	15.40±0.05 ^b	38.20±0.33 ^a
茶花 Camellia	12.30±0.08 ^b	4.90±0.02 ^a	0.77±0.00 ^b	1.55±0.00 ^a	15.30±0.06 ^b	24.20±0.24 ^a
油菜 Rape	34.90±0.20 ^b	2.70±0.01 ^a	0.35±0.00 ^b	0.58±0.00 ^a	6.20±0.01 ^b	55.80±0.21 ^a
玫瑰 Rose	52.85±0.33 ^b	45.10±2.30 ^a	0.55±0.00 ^b	1.01±0.00 ^a	6.90±0.02 ^b	9.00±0.12 ^a
五味子 Schisandra	2.90±0.02 ^b	2.10±0.01 ^a	1.11±0.00 ^b	1.35±0.00 ^a	49.00±1.03 ^b	58.70±0.42 ^a

注：同一类别蜂花粉同一指标数据中不同小写字母肩标代表差异显著 ($P<0.05$)。
Note: The shoulder marks of different lowercase letters in the same index data of bee pollen of the same category represent significant differences ($P<0.05$).

基于以上数据,证实破壁能够增强蜂花粉体外抗氧化活性。破壁后,枣花蜂花粉 DPPH 自由基清除能力最强,主要基于其高含量的酚类化合物,五味子、油菜蜂花粉较其稍弱;茶花蜂花粉 Fe^{2+} 络合力强于其余 5 种蜂花粉,可能源于茶花蜂花粉破壁后检测出的酚类物质种类和含量最多;五味子、油菜蜂花粉均有强 Fe^{3+} 还原力,高含量的黄酮、酚酸能够将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 。枣花、茶花、五味子、油菜蜂花粉含有丰富的酚类物质,表现出强抗氧化活性,可为蜂花粉抗氧化食品的开发利用提供理论依据。

2.4 纤维素酶-高剪切联用破壁蜂花粉对·OH 诱导的 pBR322 质粒 DNA 氧化损伤保护作用的影响

H_2O_2 是机体氧化代谢的副产物,是一种非自由基物质,很容易扩散到活细胞当中,过渡态金属离子条件下,Fenton 反应中 H_2O_2 生成·OH,从而破坏 DNA 双螺旋结构。酚类化合物通过络合过渡态金属离子或者清除 H_2O_2 使得反应中断,从而保护 DNA 双螺旋结构^[37],通过计算 DNA 双螺旋结构占比来测定蜂花粉对·OH 诱导的 pBR322 质粒 DNA 氧化损伤的保护作用。凝胶电泳成相后得到图 4,6 种蜂花粉破壁后,DNA 双螺旋条带均更明亮清晰。由表 4 可知,破壁后,油菜蜂花粉对 DNA 氧化损伤的保护能力提高 442.7%,茶花蜂花粉提高 287.7%,荷花、枣花、玫瑰、五味子这 4 种蜂花粉分别提高了 60.5%、12.4%、82.5%和 4.8%,表明破壁使得蜂花粉中酚类物质得到充分的释放,可以有效提高对·OH 诱导的 pBR322 质粒 DNA 氧化损伤的保护能力。



注: 1 号泳道: 对照组; 2 号泳道: 模型组; 3-8 号泳道: 分别为荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰、五味子蜂花粉组。
Note: Lane 1:control group; Lane 2:model group; Lane 3-8:lotus, jujube, camellia, rape, rose, schisandra bee pollen group,respectively.
图 4 6 种蜂花粉破壁前后对羟基自由基介导 pBR322DNA 断裂的保护作用

Fig.4 The protective effects of 6 kinds of bee pollen on pBR322 DNA fragmentation mediated by hydroxyl radicals before and after cell wall disruption

表 4 破壁前后蜂花粉对 DNA 氧化损伤的保护率						
Table 4 Protection rate of bee pollen against DNA oxidative damage before and after cell wall disruption						
花粉状态 Bee pollen state	荷花 Lotus	枣花 Jujube	茶花 Camellia	油菜 Rape	玫瑰 Rose	五味子 Schisandra
破壁前 Before cell wall disruption	54.8±0.03 ^b	71.5±0.07 ^b	20.0±0.03 ^b	17.3±0.01 ^b	52.1±0.02 ^b	92.1±0.06 ^b
破壁后 After cell wall disruption	88.0±0.02 ^a	80.3±0.01 ^a	77.6±0.04 ^a	93.9±0.05 ^a	95.0±0.04 ^a	96.5±0.03 ^a

3 结 论

- 1) 少量纤维素酶(荷花 1%; 枣花 4%; 茶花 2%; 油菜 1%; 玫瑰 4%; 五味子 3%) 结合高剪切技术使得 6 种蜂花粉达到 90%以上破壁率。
- 2) 6 种蜂花粉经破壁作用后酚类物质种类及含量均增加,总黄酮、总酚含量显著增加($P<0.05$)。荷花蜂花粉没食子酸含量较破壁前提高 5 倍,油菜蜂花粉总黄酮含量提高 6.4 倍,总酚含量由 8.6 mg/g 提高至 21.6 mg/g,茶花蜂花粉共检测到 10 种酚类物质,较未破壁前多 2 种。
- 3) 体外抗氧化试验表明,破壁能够将枣花、油菜蜂花粉清除 50%DPPH 自由基所需浓度降低 95%和 92%,枣花蜂花粉 Fe^{2+} 络合力提高 2.2 倍,油菜蜂花粉 Fe^{3+} 还原力提高 8 倍。破壁后荷花、枣花、茶花、油菜、玫瑰、五味子 6 种蜂花粉对 pBR322 质粒 DNA 氧化损伤的保护作用分别提高了 60.5%、12.4%、287.7%、442.7%、82.5%、4.8%。

[参 考 文 献]

[1] Kieliszek M, Piwowarek K, Kot A M, et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products[J]. Trends in Food Science and Technology, 2018, 71: 170-180.

[2] Li Q, Sun M, Wan Z, et al. Bee pollen extracts modulate serum metabolism in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice with anti-inflammatory effects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(28): 7855-7868

[3] Tuoheti T, Rasheed H A, Meng L, et al. High hydrostatic pressure enhances the anti-prostate cancer activity of lotus bee pollen via increased metabolites[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 261: 113057.

[4] Joanna K, Ma Gorzata K, Dorota L K, et al. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018(2): 1-29.

[5] Anna R S, Jerzy S, Kurek-Górecka A, et al. Polyphenols from bee pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity[J]. Molecules, 2015, 20(12): 21-32.

[6] Bridi R, Atala E, Pizarro, et al. Honeybee pollen load: Phenolic composition and antimicrobial activity and antioxidant capacity[J]. Journal of Natural Products, 2019, 82(3): 559-565.

[7] Sittiwet C. Antimicrobial activity of essential oil from Nelumbo nucifera Gaertn. pollen[J]. IJP-International Journal

- of Pharmacology, 2009, 5(1): 98-100.
- [8] Melo A A M. Chemical and Microbiological Profile, Color, Palynological Analysis and Biological Properties of Dehydrated Bee Pollen[D]. Ottawa: University of Sao Paulo, 2015.
- [9] 吴伟. 破壁对五种蜂花粉的营养素释放和消化的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
Wu Wei. Effects of Wall-disruption on Nutrients Releases and Digestion of Bee Pollen[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019. (in Chinese with English abstract)
- [10] Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: A review[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 96(13): 4303-4309.
- [11] Wu W, Wang K, Qiao J, et al. Improving nutrient release of wall-disruption bee pollen with a combination of ultrasonication and high shear technique[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2018, 99: 564-575.
- [12] Bell R R, Thornber E J, Seet J L L, et al. Composition and protein quality of honeybee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*[J]. Journal of Nutrition, 1983, 113(12): 2479.
- [13] 赵萌萌, 张文刚, 党斌, 等. 超微粉碎对青稞麸皮粉多酚组成及抗氧化活性的影响[J]. 农业工程学报, 2020, 36(15): 291-298.
Zhao Mengmeng, Zhang Wengang, Dang Bin, et al. Effects of ultra-micro-crushing on composition of polyphenols and antioxidant activity of barley bran powder[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(15): 291-298. (in Chinese with English abstract)
- [14] 刘功良, 唐汉良, 谢锐均, 等. 蜂花粉破壁技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 25(12): 102-104.
Liu Gongliang, Tang Hanliang, Xie Ruijun, et al. Advance on cell wall disruption method of bee pollen[J]. Food Research and Development, 2014, 25(12): 102-104. (in Chinese with English abstract)
- [15] 徐万林. 中国蜜源植物[M]. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 1992.
- [16] 孟良玉, 蔡文倩, 兰桃芳, 等. 纤维素酶对油菜蜂花粉的破壁作用[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 72-75.
Meng Liangyu, Cai Wenqian, Lan Taofang, et al. Cell wall disruption of rape bee pollen by cellulase[J]. Food Science, 2012, 33(22): 72-75. (in Chinese with English abstract)
- [17] 王凯. 五种蜂花粉超声—高剪切联用破壁效果及营养成分变化研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2016.
Wang Kai. Wall-disruption Effects and Nutritional Levels of Five Species of Monofloral Bee Pollen Treated with Combination of Ultrasonication and High Shear[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [18] Li F, Guo S, Zhang S, et al. Bioactive constituents of *F. esculentum* bee pollen and quantitative analysis of samples collected from seven areas by HPLC[J]. Molecules, 2019, 24(15):1-15.
- [19] Seifzadeh N, Sahari M A, Barzegar M, et al. Evaluation of polyphenolic compounds in membrane concentrated pistachio hull extract[J]. Food Chemistry, 2019, 277(30): 398-406.
- [20] 张翠香, 罗永会, 徐春萍, 等. 蜂花粉多糖和黄酮的联合提取及含量测定[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(10): 59-62.
Zhang Cuixiang, Luo Yonghui, Xu Chunping, et al. Extraction and content determination of bee pollen polysaccharide and flavonoids[J]. Food Research and Development, 2017, 38(10): 59-62. (in Chinese with English abstract)
- [21] Hara K, Someya T, Sano K, et al. Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay[J]. Data in Brief, 2018, 17(1): 870-875.
- [22] 何亮亮, 赵浩安, 刘新艳, 等. 枸杞蜜的抗氧化活性及其对 DNA 氧化损伤的保护作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 105-111.
He Liangliang, Zhao Haoan, Liu Xinyan, et al. Antioxidant activity and protective effect on DNA oxidative damage of medlar honey[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(12): 105-111. (in Chinese with English abstract)
- [23] Rao S, Callcott E T, Santhakumar A B, et al. Profiling polyphenol composition and antioxidant activity in Australian-grown rice using UHPLC/online-ABTS system[J]. Journal of Cereal Science, 2018, 80: 147-177.
- [24] 陈思南, 王心怡, 李梦婷, 等. 五味子蜂花粉不同萃取物对小鼠肝脏脂质过氧化及 DNA 氧化损伤的作用[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 146-151.
Chen Sinan, Wang Xinyi, Li Mengting, et al. Effects of different solvent extracts from schisandra chinensis bee pollen on hepatic lipid peroxidation and DNA oxidative damage[J]. Food Science, 2019, 40(11): 146-151(in Chinese with English abstract)
- [25] 王林. 不同品种蜂花粉破壁效果及体内外抗氧化活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
Wang Lin. Study on Cell Disruption and Anti-oxidant of Bee Pollen *in Vitro* and *in Vivo*[D]. Wuhan: Huangzhong Agricultural University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [26] 马福敏, 刘玉玲. 复合破壁方法对蜂花粉破壁率及其主要功能性成分的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(5): 184-186.
Ma Fumin, Liu Yuling. Influence of combined wall-breaking method on wall-breaking rate and functional components of bee pollen[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(5): 184-186. (in Chinese with English abstract)
- [27] Mrgoan R, Stran M, Varadi A, et al. Bee collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits[J]. Antioxidants, 2019, 8(12), 568-608.
- [28] Kanar Y, Bekir Gökçen Mazı. Effect of different drying methods on antioxidant characteristics of bee-pollen[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019, 13(4): 3376 - 3386.
- [29] Saliha Esin Çelik, Ayşe Nur Tufan, Burcu Bekdeşer, et al. Identification and determination of phenolics in lamiaceae species by UPLC-DAD-ESI-MS/MS[J]. Journal of Chromatographic Science, 2017, 55(3): 291-300.

- [30] 阮征, 邓泽元, 吴龙耀, 等. HPLC 法测定油菜蜂花粉中黄酮含量及六种破壁方法对黄酮提取的影响[J]. 食品科学, 2008,29(10): 455-458.
- Ruan Zheng, Deng Zeyuan, Wu Longyao, et al. Determination of flavonoids content in rape bee pollen by HPLC and effects of six cell wall-breaking techniques on flavonoids release from rape bee pollen cell[J]. Food Science, 2008,29(10): 455-458. (in Chinese with English abstract)
- [31] Lv H, Wang X, He Y, et al. Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from Qinghai-Tibetan Plateau by HPLC-DAD-APCI/MS[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2015, 38: 49-54.
- [32] Kedare S B, Singh R P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay[J]. Journal of Food Science and Technology-mysore, 2011, 48(4): 412-422.
- [33] Zhang H, Liu R, Lu Q. Separation and characterization of phenolamines and flavonoids from rape bee pollen, and comparison of their antioxidant activities and protective effects against oxidative stress[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1264-1281.
- [34] 延莎, 贺晋云, 杨蕙茹, 等. 气流超微粉碎破壁法对蜂花粉营养及抗氧化特性的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(2): 94-98.
- Yan Sha, He Jinyun, Yang Huiru, et al. Effects of airflow ultrafine pulverization and wall breaking method on nutrition and antioxidant properties of bee pollen[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(2): 94-98. (in Chinese with English abstract)
- [35] Halliwell B. Antioxidants: The basics--what they are and how to evaluate them.[J]. Advances in Pharmacology, 1997, 38(8):3-20.
- [36] Gulcin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview[J]. Archives of Toxicology, 2012, 86(3): 345-391.
- [37] Zhou J, Li P, Cheng N, et al. Protective effects of buckwheat honey on DNA damage induced by hydroxyl radicals[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(8): 2766-2773.

Effects of enzymatic hydrolysis combined with high-shear wall breaking technology on phenolic compounds and antioxidant activity of bee pollen

Wang Yue¹, Xu Yuanyuan², Yang Erlin², Cheng Ni^{2,3*}

(1. College of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. College of Food Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3. Bee Product Research Center of Shaanxi Province, Xi'an 710065, China)

Abstract: Bee pollen is collected by honeybees from the pollen of flowers, with the addition of the nectar and their own secretions to form grains. Approximately 70% of the substances in bee pollen have biological activities, such as antioxidant, liver protection, anti-inflammatory, antibacterial and anti-cancer. However, the outer wall of pollen spores has the characteristics of acid resistance, alkali resistance, and anti-microbial decomposition. Without breaking the wall of spores, phenolic compounds can only be released from the germination pores, and thus the digestibility of bee pollen is only 52%-59% *in vivo*, meaning that most of them cannot be digested by human. Therefore, the wall breaking of spores has become necessary to improve the bioavailability of bee pollen. In this study, taking six kinds of bee pollen as research objects, including lotus, jujube, camellia, rape, rose, and schisandra, a wall-breaking method of enzymatic hydrolysis combined with high-shear technology was used to reveal the effect of wall breaking on the phenolic compounds and antioxidant activities of bee pollen. An attempt was made to explore the protective effect of bee pollen, with or without wall breaking, on the OH-mediated oxidative damage of plasmid DNA for bee-pollen functional foods. An investigation was also made to find the effects of cellulase enzymatic hydrolysis on the wall-breaking rates of different kinds of bee pollen. Different kinds of bee pollen exhibited different degrees of tolerance to the cellulase. The wall-breaking rate of bee pollen increased with the increase of cellulase concentration. After six kinds of bee pollen enzymatically hydrolyzed, the wall-breaking rate was significantly improved with high shear at 10 000-15 000 r/min for 30 s. More than 90% of the wall-breaking rate was achieved with less cellulase in the combined methods. The release of phenolic compounds from rape bee pollen was the most significant after the wall was broken ($P<0.05$). The total flavonoid content increased by 6.4 times, and the total phenol content increased from 8.6 mg/g to 21.6 mg/g, as well as the total phenol content of camellia bee pollen was 15.7 mg/g, an increase of 11.3% after the wall was broken. The phenolic compounds in six kinds of bee pollen were analyzed using a high-performance liquid chromatography method with diode array detection (HPLC-DAD). The results showed that the types and content of phenolic compounds in bee pollen increased after the wall was broken. The concentration of jujube bee pollen to scavenge 50% DPPH free radicals is reduced by about 95%, and rape bee pollen is reduced by about 92%, the Fe^{2+} complex ability of jujube bee pollen increased from 0.36 mg/g to 1.16 mg/g, increased by about 2.2 times. The Fe^{3+} reducing power in the six types of bee pollen increased after the walls were broken. The Fe^{3+} reducing power of rape bee pollen increased from 6.2 mg/g to 55.8 mg/g, increased 8 times. After walls breaking, the protective abilities against DNA oxidative damage increased by 60.5%, 12.4%, 287.7%, 82.5%, 442.7% and 4.8% in the six kinds of bee pollen (lotus, jujube, camellia, rape, rose and schisandra), respectively, indicating that the wall breaking made phenolic compounds of bee pollen fully be released, which can effectively improve the protective ability of OH-induced pBR322 plasmid DNA oxidative damage. These findings can provide a theoretical basis and strategy for the development of bee-pollen functional foods.

Keywords: extraction; cellulase; bee pollen; cell wall disruption; phenolic compounds; antioxidant activity; DNA damage