

几种复合天然多酚氧化酶氧化茶多酚的比较研究

罗玲¹, 王洪新^{*1,2}, 胡倩倩¹, 娄在祥¹, 马朝阳¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以同一批次茶多酚为原材料, 以梨PPO作为对照, 比较研究梨与土豆、梨与山药、梨与红薯、梨与苹果4种复合天然PPO氧化茶多酚形成茶黄素的影响。实验结果表明, 在同等条件下, 5种天然PPO对茶多酚的氧化程度依次为梨与土豆PPO>梨PPO>梨与山药PPO>梨与苹果PPO>梨与红薯PPO。其中经梨与土豆PPO体外氧化制备的茶黄素, 质量分数为88.13%, 高于梨PPO单独作用时的76.95%, 所以梨与土豆组成的复合酶氧化茶多酚的效果最优。

关键词: 多酚氧化酶; 茶多酚; 茶黄素; 色度

中图分类号: Q 946.841 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)04—0385—05

A Comparative Study of Several Mixed Natural Polyphenol Oxidases on Oxidizing Tea Polyphenols

LUO Ling¹, WANG Hongxin^{*1,2}, HU Qianqian¹, LOU Zaixiang¹, MA Chaoyang¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi 214122, China)

Abstract: Effects of several mixed natural polyphenol oxidases (PPO) on the transform of tea polyphenols into theaflavins were compared in this paper. Results showed a ranking of pear and potato PPO>pear PPO>pear and yam PPO>pear and apple PPO>pear and sweet potato PPO for the oxidative activities of five enzyme systems. The pear and potato PPO mixture also led to a higher content of theaflavins (88.13%) than the pear PPO (76.95%). So the mixed pear and potato PPO system is optimal for the oxidation of tea polyphenols.

Key words: polyphenol oxidase, tea polyphenols, theaflavins, chromaticity

多酚氧化酶(polyphenol oxidase PPO)又称儿茶酚氧化酶^[1], 它广泛存在于植物(如土豆、荔枝、水蜜桃、苹果、蘑菇、马铃薯、豆类、甘薯、烟草等)组织中^[2-5], PPO天然状态下与内囊体膜结合在一起的, 无活性,

但将组织匀浆或损伤后酶活被活化, 从而表现出活性^[6]。茶多酚(tea polyphenols, TP)中的主要成分儿茶素类主要包括表没食子儿茶素(Epigallocatechin, EGC)、表儿茶素(Epicatechin, EC)、表没食子儿茶

收稿日期: 2014-03-21

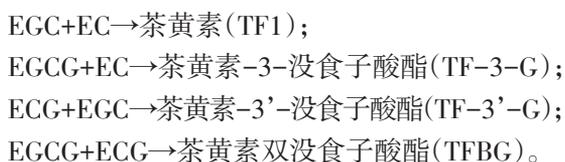
基金项目: 国家自然科学基金项目(31071601)。

*通信作者: 王洪新(1964—), 男, 江苏徐州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品营养与功能因子研究。

E-mail: cnwhx@163.com

素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)^[7]。

这4种儿茶素在PPO的作用下氧化缩合形成茶黄素TF1、TF2a、TF2b、TF3,颜色从淡黄色变为红色^[8-9]:



茶黄素(theaflavins, TFs)具有多种药理功能与保健功效,如降血脂、抗氧化、抗衰老、抗菌、抗突变、抗癌防癌等^[10-13],某些功能方面甚至优于儿茶素^[14],所以其在食品、医药保健等领域的作用也越来越突出^[15]。但是,茶黄素的提纯难度较大、性质欠稳定,并且直接从红茶中提制茶黄素所得产品纯度低、成本高、产能低。因此,为满足市场对茶黄素的需求,寻求生产成本更低、生产效率更高的茶黄素生产途径具有重要意义。作者研究了儿茶素多酚氧化酶通过体外氧化合成途径制备茶黄素混合物。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茶多酚:四川富正源生物科技有限公司产品;丰水梨:产自山东烟台;红富士:产自山东栖霞;土豆:产自山东潍坊;红薯:产自山东寿光;山药:产自福建龙岩;乙酸乙酯、柠檬酸、柠檬酸钠等,均为分析纯。

1.2 设备与仪器

UV-2100型紫外可见分光光度计:上海尤尼克柯仪器有限公司产品;安捷伦1260高效液相色谱仪:安捷伦公司产品;发酵罐:上海百伦生物科技有限公司产品。

1.3 试验方法

取TPH30523-C1批号的茶多酚10.00 g作为反应底物。根据最佳反应条件预试验结果,取梨400.00 g、梨与苹果(各200.00 g)、梨与土豆(各200.00 g)、梨与红薯(各200.00 g)、梨与山药(各200.00 g)5种天然酶,搅拌机匀浆(1 min)。将底物与酶的混合物置于发酵罐中,在25℃(室温)、pH 7.0(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、通气量0.6 L/min、搅拌速度300 r/min的条件下反应40 min。

反应产物经100℃沸水迅速灭酶(保证反应时间的一致性)。将混合液经两层纱布过滤,滤液经

等体积乙酸乙酯萃取3次,取上层红色液体,经低压旋转蒸发仪浓缩后转入真空干燥箱干燥(40℃,1 h)得到红色固体粉末。将红色固体粉碾压均匀得到均匀的固体粉末,以上试验均重复3次。

1.4 测定方法

色度值测定:采用分光光度测色仪测定;茶多酚总量的测定:酒石酸铁比色法(GB 8313-87);4种儿茶素和4种茶黄素质量分数的测定:样品经甲醇溶液溶解过0.45 μm有机膜,用高效液相色谱法检测。

2 结果与分析

2.1 产物色度值的测定结果分析

图1为5种PPO氧化茶多酚所得产物的色度值变化。图中a值表示红绿色值,a值越大,产物越红。梨与土豆复合PPO氧化制备的混合物色度值a稍大于梨PPO,高于其余3种PPO酶源制备的茶多酚混合物。此外,与反应前的样品相比,经5种PPO酶源氧化制备茶多酚混合物其a值都有所升高,证明所得产物红色均加深。5种酶源使氧化产物颜色变红程度依次是梨与土豆PPO>梨PPO>梨与山药PPO>梨与苹果PPO>梨与红薯PPO。

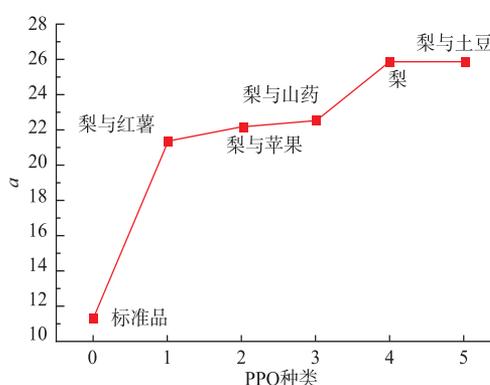


图1 产物的色度值

Fig. 1 Chroma value a of products

2.2 产物吸光值测定结果分析

根据QB 2154-95要求建立相对应的标准曲线,实验重复3次,其标准曲线见图2。

用酒石酸亚铁分光光度法,在 λ_{420} nm条件下测定反应前后样品中所含茶多酚总质量分数,其吸光值A及总酚质量分数见表1,A值变化趋势见图3。

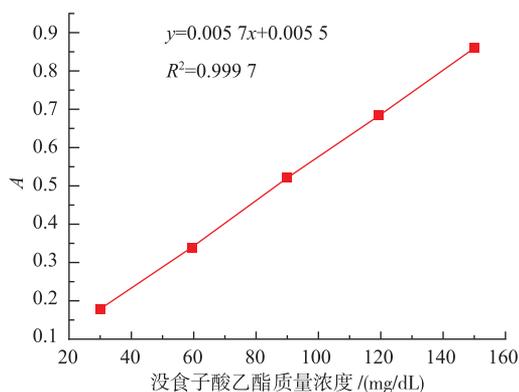


图2 没食子酸乙酯的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of ethyl gallate

表1 产物吸光度值A与总酚质量分数变化

Table 1 Absorbance value A and total phenolic content changes of products

PRO种类	A	质量分数/%
标准品	0.333	86.30
梨与土豆	0.153	38.92
梨	0.166	42.27
梨与山药	0.167	42.52
梨与苹果	0.193	49.38
梨与红薯	0.196	50.27

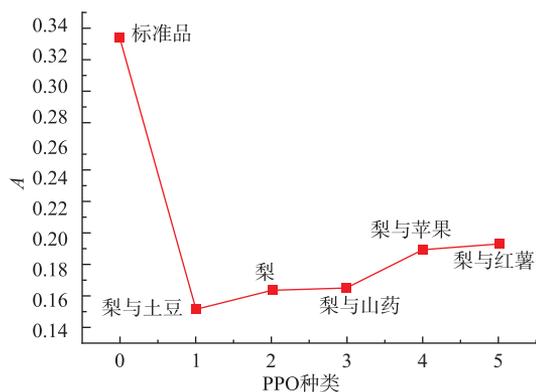


图3 5产物的的吸光值

Fig. 3 Absorbance value of products

比较结果(表1、图3)发现产物总酚质量分数均下降,其中梨与土豆PPO制备所得产物其总酚质量分数下降最多,梨与红薯源PPO的下降最少。梨与土豆PPO氧化制备的混合物A值最小,梨PPO和梨与山药PPO的吸光度值(A)相当。梨与苹果PPO和梨与红薯PPO的吸光值相当。此外,与反应前的样品相比,经5种PPO氧化制备的茶多酚混合物其吸光值都有所下降,证明所得产物中茶多酚总质量分数低于反应前的样品。5种酶源使氧化产物的吸光

值减小程度依次为梨与土豆PPO>梨PPO>梨与山药PPO>梨与苹果PPO>梨与红薯PPO。与高精度测色仪测定结果颜色加深程度呈相反趋势。

2.3 产物中4种儿茶素质量分数的测定结果

2.3.1 4种儿茶素质量分数的测定结果 根据测得样品的峰面积数据,采用外标法,按照 $c_x=c_r \cdot A_x/A_r$ 公式其中: c_x 为样品质量浓度; c_r 为对照质量浓度; A_x 为样品峰面积; A_r 为对照峰面积。

计算出5种酶制备所得产物中4种儿茶素的质量浓度值见表2。

表2 4种儿茶素的质量浓度

Table 2 Content of four kinds of catechin

(mg/mL)

儿茶素	标准品	梨与土豆	梨	梨与山药	梨与苹果	梨与红薯
EGC	0.013	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010
EC	0.302	0.194	0.157	0.161	0.165	0.161
EGCG	0.307	0.058	0.111	0.190	0.145	0.172
ECG	0.204	0.177	0.169	0.143	0.186	0.193
Total	0.826	0.441	0.449	0.505	0.507	0.535

按照公式 $r(\%)=(r$ 为转化率百分比, c_0 为反应前标准组分品浓度, c_x 为反应所得产物相应组分浓度)计算出4种儿茶素的转化率见表3。

表3 4种儿茶素的转化率

Table 3 Transformation of four kinds of catechin

(%)

儿茶素	梨与土豆	梨	梨与山药	梨与苹果	梨与红薯
EGC	13.077	7.981	13.750	13.244	22.584
EC	35.640	48.122	46.812	45.348	46.866
EGCG	80.966	63.643	37.881	52.679	43.996
ECG	13.340	17.107	30.089	9.063	5.698
Total	46.581	45.697	38.836	38.581	35.232

比较结果(表3)发现梨与土豆PPO氧化制备的混合物转化率最高达46.58%,且高于梨PPO单独作用时的45.70%;其中梨与土豆PPO对EGCG的转化程度明显高于梨源PPO,证明梨与土豆PPO之间可能存在某种协同作用使得其作用能力高于梨PPO单独的作用能力;梨、山药PPO对4种儿茶素的转化程度最为平均且对ECG的转化率明显高于其余4组;梨与苹果PPO及梨与红薯PPO对ECG的转化率都很低,但是梨与红薯PPO对EGC的转化效率高于

其余4组,说明红薯PPO对EGC的转化能力高于其余酶源的PPO。5种酶制得产物的转化率从高到低依次是梨与土豆PPO>梨PPO>梨与山药PPO>梨与苹果PPO>梨与红薯PPO。利用SPSS对各组儿茶素转化率进行差异显著性分析,结果显示 P 最大值为0.041($P<0.05$),存在差异显著性。

2.3.2 4种茶黄素质量分数的测定结果 同样根据峰面积,按照外标法计算公式,计算出茶黄素相应组分的质量浓度见表4。

表4 产物中4种茶黄素的质量浓度

Table 4 Content of four kinds of theaflavins in products ($\mu\text{g/mL}$)

儿茶素	梨与土豆	梨	梨与山药	梨与苹果	梨与红薯
TF1	69.803	64.099	34.789	26.195	27.887
TF2a	151.354	142.268	62.384	52.662	44.075
TF2b	38.082	34.630	19.174	16.655	14.842
TF3	83.751	79.650	36.132	34.270	27.629
Total	342.990	325.262	152.479	129.782	114.433

比较表4数据发现,梨与土豆PPO和梨PPO氧化制备所得产物中,梨与土豆PPO制备所得茶黄素质量浓度最高为343.00 $\mu\text{g/mL}$,梨PPO制得产物中茶黄素质量浓度为325.26 $\mu\text{g/mL}$ 。这两组产物中茶黄素的质量浓度相当且是其他组的至少2倍。4种复合酶氧化茶多酚生成的茶黄素中TF2a、TF3明显高于TF1和TF3,对照茶黄素生成途径以及茶多酚转化率(表3)可知,确实是EGCG和EC是主要的被氧化的成分。5组产物中5种茶黄素的质量浓度多少均呈TF2a>TF3>TF2b>TF1,即4种复合酶组与梨PPO单独作用时4种茶黄素的质量分数多少的顺序保持一致,说明梨PPO及4种组合酶中,转化茶多酚形成茶黄素起主导作用的是梨PPO,土豆的PPO与梨的PPO之间存在较好的协同作用,并且根据数据可计算出,土豆PPO对梨PPO转化茶多酚的协同作用大小依次是TF2b>TF1>TF2a>TF3。综上几种复

合酶对茶多酚的氧化效果梨与土豆组合是最优选,且两者协同作用时TF2b的转化率明显升高。

2.3.3 产物中茶黄素占总酚质量分数的计算结果 经梨与土豆天然PPO体外氧化途径制备的茶黄素,其占总酚质量分数最高达88.13%,高于梨PPO单独作用时制备所得产物的76.95%。梨与山药、苹果、红薯组成的复合酶体外氧化制备茶黄素的能力较低,有鉴于此,在以后的生产中选择梨与土作为PPO酶源,体外氧化茶多酚制备茶黄素可得到茶黄素质量分数较高的产品。

3 结语

综上所述,以上5种天然多酚氧化酶在一定条件下可氧化茶多酚制得含一定质量分数茶黄素的混合物,颜色变红;5种酶源使氧化产物颜色变红程度依次是梨与土豆PPO>梨PPO>梨与山药PPO>梨与苹果PPO>梨与红薯PPO。随着氧化消耗茶多酚,茶多酚总酚质量分数呈现不同程度的降低,梨与土豆PPO试验组总酚质量分数减少程度最大。高效液相色谱法检测儿茶素质量分数变化显示,梨与土豆PPO氧化制备的混合物转化率最高达46.58%,且高于梨PPO单独作用时的45.70%;猜测因梨与土豆PPO对氧化儿茶素各组间存在某种协同作用,所以在同等实验条件下,梨与土豆PPO氧化制得产物中茶黄素质量分数最高达88.13.95%,且高于梨PPO单独作用时的76.85%。5种酶源制得的产物中茶黄素质量分数从高到低依次是梨与土豆PPO>梨PPO>梨与山药PPO>梨与苹果PPO>梨与红薯PPO。梨与土豆组合是最优选,且两者协同作用时TF2b的转化率明显升高。

此外,土豆市售价格是梨的一半,该复合酶的使用可大大降低茶黄素生产成本,因此在今后的茶黄素生产中可将梨与土豆PPO组合酶作为优选酶,对于寻求价格低廉的天然酶源,降低茶黄素生产成本具有一定意义。

参考文献:

- [1] 郭显章. 酶的工业生产技术[M]. 吉林:吉林科学技术出版社,1988.
 - [2] 刘春丽,杨跃寰,陈欲云. 荔枝果肉多酚氧化酶酶学性质研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(2): 646-648.
- LIU Chunli, YANG Yuehuan, CHEN Yuyun. Study on enzymatic characteristics of polyphenol oxidase (PPO) in litchi pulp [J]. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 2011,39(2): 646-648.(in Chineses)

- [3] 刘亮,曹少谦,陈伟等. 脉冲强光及紫外线对水蜜桃多酚氧化酶活性的影响[J]. 农学报,2014,28(1): 85-90.
LIU Liang, CAO Shao-qian, CHEN Wei, et al. Effects of pulsed light and ultraviolet-C irradiation on the activity of polyphenol oxidase from honey peach [J]. **Journal of Nuclear Agricultural Sciences**, 2014, 28(1): 85-90. (in Chinese)
- [4] 刘树兴,王乐. 苹果多酚氧化酶特性及无硫护色脱水研究[J]. 食品工业科技,2011,32(3): 334-336.
LIU Shuxing, WANG Le. Characteristics of polyphenol oxidase in apple and non-sulfur prevention of discoloration in dried apple slice processing [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2011,32(3): 334-336. (in Chinese)
- [5] 周春梅,王欣,王俊城等. 白玉菇多酚氧化酶的酶学特性[J]. 食品与发酵工业,2010,36 (5): 5-9.
ZHOU Chunmei, WANG Xin, Wang Juncheng et al. Study on the characteristics of polyphenol oxidase (PPO) in white hypsizygus marmoreus[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010,36 (5): 5-9. (in Chinese)
- [6] Tolbert N E. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts [J]. **Plant physiology**,1973, 51(2): 234-244.
- [7] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京:中国农业出版社,2008.
- [8] 金恩惠,吴媛媛,屠幼英. 茶黄素抑菌作用的研究[J]. 中国食品学报,2011,11(6):108-112.
Kim Eun Hye, Wu Yuanyuan, Tu Youying. Study on antibacterial effect of theaflavins[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2011, 1 (6):108-112. (in Chinese)
- [9] 刘伟,周洁,龚正礼. 茶黄素的功能活性研究进展[J]. 食品科学,2013, 34(11): 386-391.
LIU Wei, ZHOU Jie, GONG Zheng-li. Research progress in functional activity of theaflavins[J]. **Food Science**, 2013, 34(11): 386-391. (in Chinese)
- [10] 李大祥,宛晓春,杨昌军等. 茶儿茶素氧化机理[J]. 天然产物研究与开,2006 , 18 :171-181.
LI Daxiang, WAN Xiaochun, YANG Changjun et al. Oxidation mechanism of tea catechins[J]. **Nat Prod Res Dev**,2006, 18 :171-181. (in Chinese)
- [11] 杜棋珍,江和源. 茶色素的药理及其应用[J]. 中国茶叶,1997,05:36-37.
DU Qizhen, JIANG Heyuan. The pharmacology and application of tea pigments[J]. **China tea**,1997,05:36-37. (in Chinese)
- [12] Steele VE, Kelloff GJ, Balentine D et al. Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays[J]. **Carcinogenesis**, 2000,21(1):63-67. (in Chinese)
- [13] 谢笔钧,石焯,胡慰望等. 绿茶、乌龙茶、红茶中的主要组分和酚类化合物抑制脂肪氧合酶活性和抗油脂自动氧化特性的研究[J]. 天然产物研究与开发,1994,6(4):19-26.
XIE Bijun , HU Weiwang, SHI Huang et al. Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas[J]. **Nat Prod Res Dev**, 994,6(4):19-26. (in Chinese)
- [14] 潼野庆则,今川. 茶叶儿茶酚氧化机制的研究[J]. 日本农艺化学会志, 1963, 37 :417 .
Tong Ye Qing Ze , JIN Chuan .Study on the oxidation mechanism of tea catechins[J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, 1963, 37:417.(in Japanese)
- [15] 魏青,张凌云,张灵枝. 酶工程在茶黄素制备上的研究进展[J]. 福建茶叶,2013,04(4):02-04.
WEI Qing, ZHANG Lingyun, ZHANG Lingzhi. The advanced progress of enzyme engineering in the preparation of theaflavins[J]. **Fujian tea**, 2013,04(4):02-04.