

丰水梨多酚氧化酶氧化茶多酚的研究

罗玲¹, 王洪新^{1,2*}, 胡倩倩¹, 姜在祥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, 江苏无锡 214122)

摘要 [目的] 提高茶黄素生产的经济效益, 降低生产成本。[方法] 采用单因素试验探索了茶多酚与丰水梨质量比从 1:1 ~ 1:50 的反应比例条件, 10 ~ 25 °C 的温度条件, 3.5 ~ 6.5 的 pH 条件, 以及 20 ~ 60 min 的反应时间对多酚氧化酶氧化茶多酚的影响。采用正交试验, 研究了酶与底物质量比、温度、时间、pH 4 个因素对丰水梨多酚氧化酶(PPO)氧化茶多酚形成茶黄素的影响。[结果] 单因素试验结果显示, 经组内比较, 反应比例 1:40、反应温度 20 °C、pH 5.5、反应时间 40 min 下所得产物, 用高精度测色仪检测, a 值最大, 红色最深。正交试验结果表明, 4 个因素对茶多酚的氧化均有显著影响。其中, 对茶多酚氧化的影响程度依次为质量比 > 时间 > pH > 温度, 最佳组合为茶多酚与酶源质量比 1:40, 温度 20 °C, pH 5.5, 氧化时间 40 min, 茶多酚的转化率为 45.70%。[结论] 该研究可为寻求低成本的茶黄素生成途径提供依据。

关键词 丰水梨; 多酚氧化酶; 茶多酚; 茶黄素

中图分类号 S661.2; Q946.81⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)11-03395-04

Study of the Oxidizing Effects of Fengshui Pear Polyphenol Oxidase on Tea Polyphenols

LUO Ling, WANG Hong-xin et al (School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122; State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract [Objective] To improve the economic benefit of theaflavins production and reduce production cost. [Method] By using single factor experiment, effects of tea polyphenols and HSBC pear ratio from 1:1 to 1:50, temperature from 10 to 25 °C, pH from 3.5 to 6.5, and the reaction time from 20 min to 60 min on oxidizing polyphenols with polyphenol oxidase were explored. [Result] The results of single factor experiment showed: in the within group comparisons, the products of the reaction ratio of 1:40, reaction temperature 20 °C, pH 5.5, reaction time 40 min has the largest a value and the deepest red wch was defined by the high accuracy of color measurement instrument. The design of multi-factor orthogonal experiment was applied to investigate the effects of temperature, pH value and time on the tea polyphenols being oxidized into Theaflavins by the PPO of HSBC pear. The 4 factors and 3 levels orthogonal test results showed that: 4 factors all have influence on oxidation of tea polyphenols. Among them, the order of influence degree of the oxidation of tea polyphenols are: quality ratio > time > pH > temperature. The optimal combination: tea polyphenols to enzyme source 1:40 in quality, temperature 20 °C, pH value 5.5, reaction time 40 min. The rate of conversion of tea polyphenols is 45.70%. [Conclusion] The study can provide reference for seek low cost production way of theaflavins.

Key words HSBC pear; Polyphenol oxidase; Polyphenols; Theaflavins

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)又称儿茶酚氧化酶^[1], 丰水梨含有较高活性的 PPO, 天然状态下与内囊体膜结合在一起无活性, 但将组织匀浆或损伤后酶活被活化, 从而表现出活性^[2]。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)、表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)^[3]。这 4 种儿茶素在多酚氧化酶(PPO)的作用下氧化缩合形成对应种类的茶黄素 TF、TF2a、TF2b、TF3, 颜色从淡黄色变成红色^[4]。

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^[5-8], 某些功能方面甚至优于儿茶素^[9], 所以其在食品、医药保健等领域的作用也越来越突出^[10]。目前对茶黄素的制备主要分为酶促氧化和化学氧化系统^[11-12]。笔者采用 L₉(4³) 正交试验研究酶源与底物比例、温度、pH、时间对茶多酚氧化程度的影响, 筛选出 4 个因素的最优组合, 从而提高

茶黄素生产的经济效益, 降低生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料 原料: 丰水梨, 山东烟台。主要试剂: 茶多酚, 四川富正源生物科技有限公司, 批号 TPH30523-C1; 乙酸乙酯、柠檬酸、柠檬酸钠等, 均为分析纯。主要设备仪器: UV-2100 型紫外可见分光光度计, 上海尤尼柯柯仪器有限公司; Data-color 400 高精度台式分光光度测色仪; 安捷伦 1260 高效液相色谱仪; RE52CS 旋转蒸发仪; 发酵罐; MJ-BL25C3 搅拌机, 广东美的精品电器制造有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 单因素试验 取 TPH30523-C1 批号的多酚 10.00 g 作为反应底物。分别取梨 10、50、100、150、200、250、300、350、400 g, 用搅拌机匀浆(1 min)。分别将底物与酶的混合物置于发酵罐中, 25 °C(实验室温度)、pH 4.8^[13](柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调制, 丰水梨浆液 pH)、通空气量 0.6 L/min、搅拌速度 300 r/min 的条件下反应 40 min^[11]。产物经 100 °C 沸水迅速灭酶(保证反应时间的一致性)。将混合液经 2 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 °C, 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。

选取以上试验获得的最佳反应比例分别在温度 10、15、20、25 °C; pH 3.5、4.5、5.5、6.5(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、

基金项目 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目; 江苏高校优势学科建设工程项目。

作者简介 罗玲(1988-), 女, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养功能因子。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事食品营养与功能因子研究。

收稿日期 2014-03-08

通空气量 0.6 L/min、搅拌速度 300 r/min 的条件下反应 20、30、40、50、60 min。反应后产物的处理与反应比例筛选试验保持一致。

1.2.2 正交试验。根据“1.2.1”单因素试验选取质量比、时间、温度、pH 进行 4 因素 3 水平试验,试验设计见表 1。

表 1 影响茶多酚氧化程度的 4 因素 3 水平正交试验设计

试验号	因素			
	质量比(TP/酶源)	时间//min	温度//℃	pH
1	1:35	30	15	4.5
2	1:35	40	20	5.5
3	1:35	50	25	6.5
4	1:40	30	25	5.5
5	1:40	40	15	6.5
6	1:40	50	20	4.5
7	1:45	30	20	6.5
8	1:45	40	25	4.5
9	1:45	50	15	5.5

按上述条件反应后,所得产物的处理与单因素试验操作保持一致。

1.3 测定内容及方法

1.3.1 单因素试验。单因素试验所得产物以反应前茶多酚作为对照,采用高精度测色仪测定产物的色度值,以 a (a 值表示红绿, + 表示偏红, - 表示偏绿, a 值越大,产物红色越深) 值作为判定依据;采用比色法测定产物的吸光值 (A), 从而得知总酚的含量。

1.3.2 正交试验。以反应前茶多酚作为对照,采用高精度测色仪测定产物的色度值,以 a 值作为判定依据;采用比色法测定产物的吸光值 (A);采用高效液相色谱法,测定 4 种儿茶素的浓度变化。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 产物色度值。由图 1 可见,茶多酚与酶源质量比为 1:40 时,所得产物 a 值最大;茶多酚与酶源质量比从 1:1 到 1:40 的反应比例条件下制备的产物 a 值呈现不同程度的递增趋势,而从 1:40 到 1:50 则呈现递减趋势。由图 2 可见, pH 为 5.5 时产物 a 值最大, pH 较低时对产物 a 值的影响小于 pH 较大时。由图 3 可见,反应时间为 40 min 时所得产物 a 值最大,且反应时间不足对 a 值影响大于反应时间过度对 a 值的影响。由图 4 可见,反应温度为 20 ℃ 时所得产物 a 值最大。

2.1.2 产物吸光值。根据 QB 2154-95 要求建立相对应的标准曲线,试验重复 3 次,其标准曲线见图 5。

比较图 6、7、8、9 发现,茶多酚与丰水梨质量比为 1:40、pH 5.5、反应时间为 40 min,反应温度为 20 ℃ 时,所得产物吸光值 (A) 最小,总酚含量最低。表明被转化的茶多酚的量最多,梨 PPO 发挥了最佳氧化效果。

2.2 正交试验

2.2.1 产物色度值。比较图 10 发现,茶多酚与酶源底物质量比为 1:40 的 3 组产物 a 值高于其余 2 种,所得产物 a 值最大,因此颜色最红;酶源过量对 a 值的影响小于酶源不足的 3

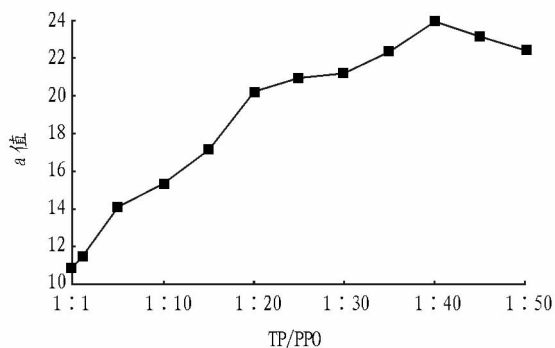


图 1 茶多酚与酶源质量比对产物 a 值的影响

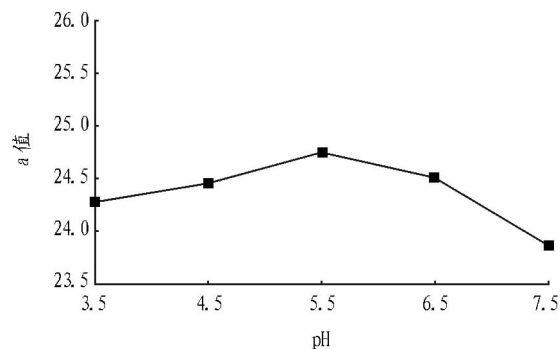


图 2 pH 对产物 a 值的影响

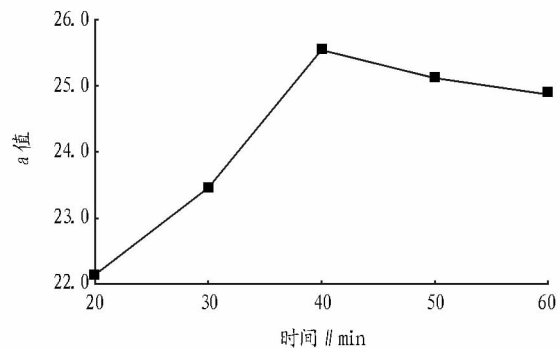


图 3 时间对产物 a 值的影响

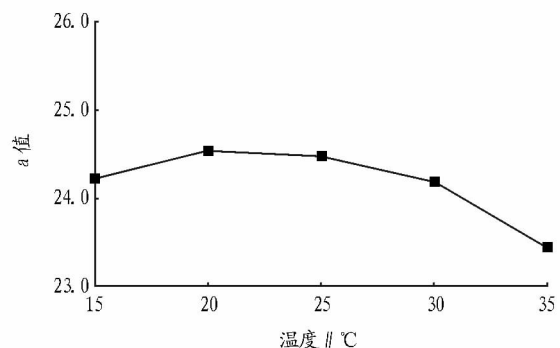


图 4 温度对产物 a 值的影响

组。相同反应时间条件下, pH 较小者对 a 值的影响小于 pH 较大者。

2.2.2 产物吸光值。比较表 2、图 11 发现,产物吸光度值均有不同程度的下降,其中 4、5、6 组吸光值 (A) 下降程度最大,茶多酚残余量最少,被转的茶多酚最多,丰水梨 PPO 的氧化效果最佳。

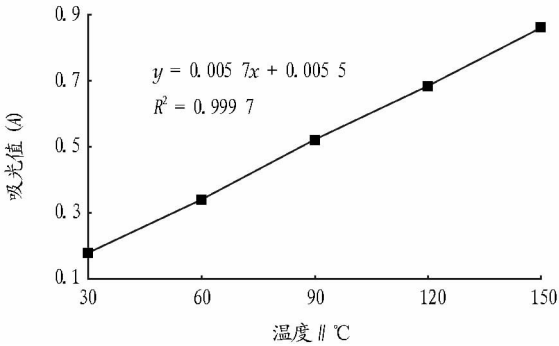


图5 没食子酸乙酯的标准曲线

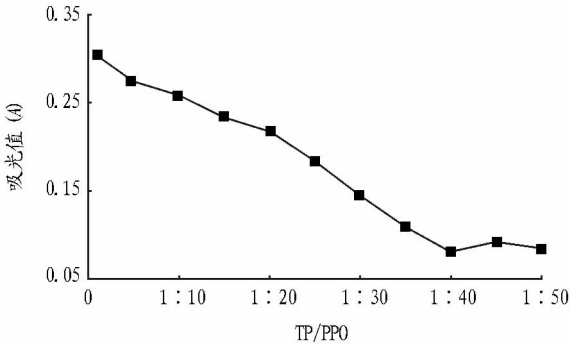


图6 茶多酚与酶源质量比对产物吸光值(A)的影响

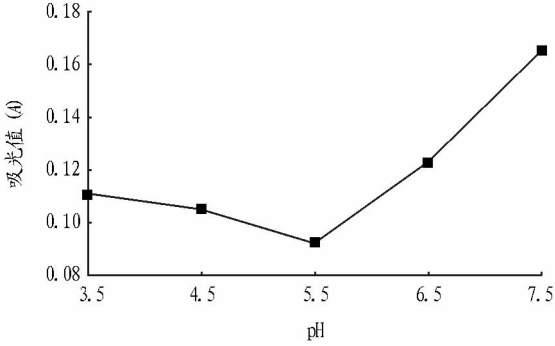


图7 pH对产物吸光值(A)的影响

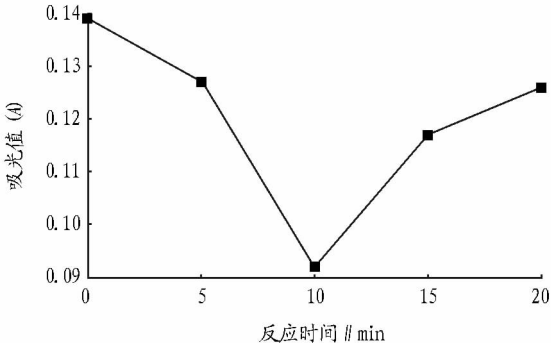


图8 时间对产物吸光值(A)的影响

2.2.2.3 产物中4种儿茶素含量。因为正交表中没有1:40、40 min、20℃、pH 5.5此组合,所以再做一组试验(X组)。对比表3中数据发现,1~3、4~6、7~9是按照比例不同的分组,4~6组所得产物中茶多酚含量最低,因此被氧化的茶多酚最多,丰水梨PPO作用效果更强。比较时间、温度、pH为分组标准的数据可知,这3个因素对丰水梨PPO氧化茶多酚

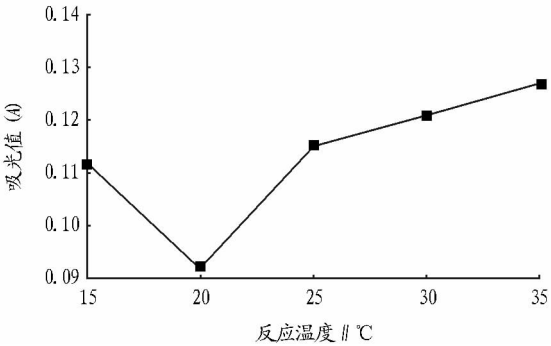


图9 反应温度对产物吸光值(A)的影响

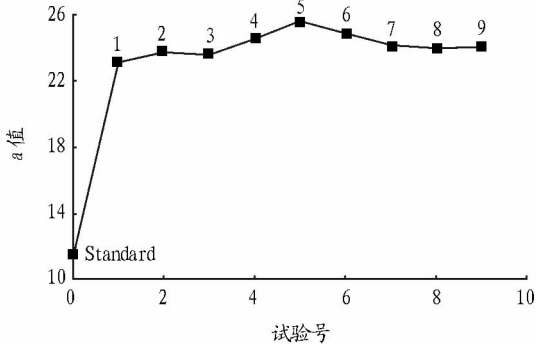


图10 色度值a值变化趋势

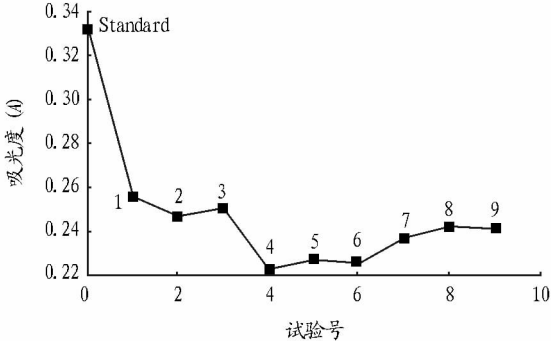


图11 吸光值(A)变化趋势

的影响均小于茶多酚与酶源质量比对其的影响。

表2 产物吸光值(A)及总酚含量变化

试验号	A 值	总酚含量/%	试验号	A 值	总酚含量/%
标准品	0.333	86.30	5	0.195	49.77
1	0.273	70.51	6	0.193	49.30
2	0.264	68.03	7	0.254	65.53
3	0.268	69.10	8	0.259	66.87
4	0.190	48.52	9	0.258	66.52

2.2.2.4 产物中4种儿茶素转化率。表4显示,茶多酚转化率最高的为X组达45.70%,与单因素试验结果吻合。SPSS差异显著性分析显示,P最大值为0.024(P<0.05),说明试验结果存在差异显著性,即时间、温度、pH、茶多酚与酶源质量比4个因素对PPO氧化茶多酚形成茶黄素均有显著性影响。

3 结论

通过单因素试验和正交试验筛选了丰水梨PPO氧化茶

多酚制备茶黄素的最优条件为茶多酚与酶源质量比 1:40,反应时间 40 min,温度 20 ℃,pH 5.5,在该条件下所得产物的茶多酚转化率为 45.70%;差显著性分析显示这 4 种因素对氧化结果均有显著性影响。

表 3 儿茶素含量的变化 mg/ml

试验号	EGC	EC	EGCG	ECG	总计
标准品	0.013 133 672	0.302 147 663	0.306 503 482	0.204 363 319	0.826 148 136
1	0.012 864 988	0.181 179 479	0.130 966 572	0.185 649 809	0.510 660 847
2	0.012 086 01 0	0.177 083 110	0.118 882 832	0.183 362 089	0.491 414 040
3	0.012 399 374	0.179 020 553	0.124 042 387	0.184 265 868	0.499 728 182
4	0.012 081 837	0.157 189 357	0.106 147 980	0.174 918 928	0.450 338 102
5	0.012 195 698	0.161 931 630	0.112 832 649	0.173 246 477	0.460 206 453
6	0.012 115 289	0.160 054 460	0.112 392 385	0.171 940 742	0.456 502 876
7	0.012 119 501	0.166 766 891	0.116 087 072	0.175 682 829	0.470 656 292
8	0.012 560 567	0.170 596 112	0.119 361 233	0.178 448 243	0.480 966 154
9	0.012 438 158	0.168 631 671	0.119 680 410	0.177 517 421	0.478 267 660
X	0.011 037 287	0.156 747 031	0.111 436 726	0.169 401 980	0.448 623 027

表 4 儿茶素含量转化率 %

试验号	EGC	EC	EGCG	ECG	总计
1	2.05	40.04	57.27	9.17	38.19
2	7.98	41.39	61.21	10.28	40.52
3	5.59	40.75	59.52	9.83	39.51
4	8.01	47.98	65.37	14.41	45.49
5	7.14	46.41	63.19	15.23	44.29
6	7.754	47.03	63.33	15.87	44.74
7	7.72	44.81	62.13	14.03	43.03
8	4.36	43.54	61.06	12.68	41.78
9	5.30	44.19	60.955	13.14	42.11
X	7.39	47.56	65.17	16.19	45.70

利用天然来源的 PPO 制备茶黄素既经济又高效,这对寻求低成本的茶黄素生产途径具有重要意义。

参考文献

[1] 邹显章. 酶的工业生产技术[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1988.
[2] TOLBERT N E. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts[J]. Plant Physiol,1973,51:575-580.

(上接第 3355 页)

态农业的发展,实现家居环境洁化、生活方式现代化、庭院经济高效化、农业生产无害化、蔬菜水果优质化的目标。

参考文献

[1] 杨海霞. 加大政策力度发展农村沼气——专访国家发展改革委农村经济司司长高俊才[J]. 中国投资,2010(12):72-75.
[2] 农业部科技教育司. 中国农村能源年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2010.
[3] HUANG L M. Financing Rural Renewable Energy: A Comparison between China and India[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2009

[3] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2003:9210,30231,225-227,250-251.
[4] 李大祥,宛晓春,杨昌军,等. 茶叶儿茶素氧化机理[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(1):171-181.
[5] 杜棋珍,江和源. 茶色素的药理及应用阴[J]. 中国茶叶,1997,19(5):36-37.
[6] STEELE V E, KELLOFF G J, BALETTINE D, et al. Comparativechemopreventivemechanism of green tea, black tea and selected polyphenol[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(1):63-67.
[7] 金恩慧,吴媛媛,屠幼英,等. 茶黄素抑菌作用的研究[J]. 中国食品学报,2011,11(6):108-117.
[8] 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(11):394-399.
[9] 谢笔均. 绿茶、乌龙茶、红茶中主要成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(4):20-23.
[10] 潼野贞则,今川. 茶叶儿茶酚氧化机制的研究[J]. 日本农艺学会志,1963(37):417
[11] 萧伟祥. 茶红色素形成机理和制取[J]. 茶叶科学,1997,17(1):1-8.
[12] 姚立虎, NURSTEN H E. 表儿茶素没食子酸及表没食子儿茶素没食子酸酯单体化学氧化研究[J]. 食品与发酵工业,1997,23(5):21-25.
[13] 谷记平,刘仲华,黄建安,等. 单双液相下不同多酚氧化酶对酶性合成茶黄素的影响[J]. 茶叶科学,2007(1):176-182.

(13):1096-1103.
[4] ZHANG X L, WANG R S, HUO M L, et al. A study of the Role Played by Renewable Energies in China's Sustainable Energy Supply[J]. Energy, 2010(35):4-6.
[5] 李萍. 农村户用沼气池建设的能源、经济、环境效益研究[D]. 南京:南京农业大学,2007.
[6] 温晓霞,李长江,眭彦伟,等. 退耕区户用沼气的生态环境效益评价[J]. 农业工程学报,2012,28(10):225-230.
[7] 刘萧凌,郑循刚,刘三成. 辉县市农村户用沼气综合利用效益分析[J]. 河南农业科学,2011,40(3):6-9.