

# 漆酶对苹果酚类物质的催化特性

郭盼<sup>a</sup>, 马惠玲<sup>b</sup>, 罗耀红<sup>b</sup>, 王江浪<sup>b</sup>

(西北农林科技大学 a 林学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】研究白腐菌漆酶对苹果多酚类物质的催化特征,为开发新型具有生物活性的色素物质提供理论依据。【方法】采用单因素和正交组合试验确定白腐菌漆酶对苹果多酚酶促氧化的最佳条件,并对氧化产物的稳定性进行分析;然后对酚类氧化产物进行 HPLC 分析,初步确定产物组分,最后分析了苹果多酚及其氧化产物对·OH和 DPPH·的清除作用。【结果】①漆酶对苹果多酚的最佳酶促氧化条件为:反应温度 55℃,pH 5.5,苹果多酚质量浓度 2.5 mg/mL,漆酶浓度 3.5 U/mL。②氧化产物在 363 nm 处有最大吸收峰,对温度和光照不敏感,随着 pH 增大颜色加深。③HPLC 分析表明,模式底物儿茶酚、表儿茶素、儿茶素分别能产生 2,2,4 种氧化产物。④抗氧化活性研究表明,质量浓度较高时,苹果多酚氧化产物对·OH和 DPPH·的清除作用强于苹果多酚,且在一定质量浓度范围内呈现量效关系。在氧化产物质量浓度为 500 μg/mL 时,对·OH的清除率最高,达 85.42%;在氧化产物 1 000 μg/mL、反应时间为 60 min 时,对 DPPH·的清除率最高,达 94.32%。【结论】优化了漆酶催化苹果多酚氧化的工艺条件,苹果酚类物质经漆酶催化氧化后形成了新的可溶性、光热稳定性的有色产物,高质量浓度下产物的抗氧化活性较原提取物增强。

**【关键词】** 漆酶;生物催化;苹果多酚;HPLC;抗氧化活性

**【中图分类号】** Q814

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2011)03-0103-10

## Characterization of laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds from apple

GUO Pan<sup>a</sup>, MA Hui-ling<sup>b</sup>, LUO Yao-hong<sup>b</sup>, WANG Jiang-lang<sup>b</sup>

(a College of Forestry, b College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 In order to develop novel and bio-active possessed pigment, the catalytic characteristics of apple phenolic compounds catalyzed by *Trametes versicolor* laccase were investigated. 【Method】 The process parameters of apple phenolic compounds catalyzed by *T. versicolor* laccase were optimized through both single-factor test and orthogonal experiment and the stability of oxidation products was analyzed; the composition of the end products was determined through HPLC and its properties were measured by scavenging free radical of·OH as well as DPPH·. 【Result】 ①The optimal parameters for the process of laccase-catalyzed oxidation were as follows: reaction temperature of 55℃, substrate concentration of 2.5 mg/mL, pH 5.5, enzyme dosage of 3.5 U/mL. ②The oxidative products presented maximum absorption peak at 363 nm, the color of which darkened with the increase of pH, and less sensitive to heating and light. ③HPLC analysis showed that substrates of catechol, epicatechin and catechin produced 2, 2 and 4 oxidized products, respectively. ④Each product revealed higher activity to scavenge free radical of·OH as well as DPPH· at their high mass concentration than the substrate, which showed dosage-effect effect

\* [收稿日期] 2010-08-26

[基金项目] 教育部留学回国人员科研启动项目(314020901);西北农林科技大学博士专项(08080101)

[作者简介] 郭盼(1985-),女,河北石家庄人,在读硕士,主要从事植物资源加工利用研究。E-mail:guopan0223@163.com

[通信作者] 马惠玲(1965-),女,新疆五家渠人,教授,博士,主要从事植物资源综合利用研究。

E-mail:ma\_huiling65@hotmail.com

within certain mass concentration scope, and a maximum scavenging activity to  $\cdot\text{OH}$  of 85.42% was reached at mass concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , while that to  $\text{DPPH}\cdot$  was 94.32% at 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 【Conclusion】 The conditions of apple phenolic compounds catalyzed by *T. versicolor* laccase were optimized, and new colorful and soluble product formed from apple polyphenol catalyzed by laccase. The product was stable to light and heating, and showed increased antioxidant activity than the original extract in high mass concentrations.

**Key words:** *Trametes versicolor* laccase; catalysis; apple phenolic compound; HPLC analysis; antioxidant activity

多酚类物质被称为“第七类营养素”,它具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等多种功效<sup>[1]</sup>。苹果多酚是苹果中具有苯环并结合有多个羟基的化学结构的总称<sup>[2]</sup>,它主要包括黄酮类、单宁类、酚酸类以及花色苷类等化合物<sup>[3]</sup>。近几年大量研究结果显示,苹果多酚具有重要的生物活性和多种药理功能,其许多生理功能活性比茶多酚高 100 倍以上,因此已广泛应用于食品、医药及化妆品行业<sup>[2,4-5]</sup>。随着现代科学技术的发展,苹果多酚的研究受到国内外有关学科专家及产业界的高度重视,对苹果多酚的提取、分离、纯化技术及其机制已有很深入的认识,苹果多酚的生产及应用技术也趋于成熟<sup>[2-9]</sup>,部分产品已实现产业化,获得了较好的经济和社会效益。但是有关利用酶生物技术对苹果多酚进行生物催化,并对其氧化产物活性的研究还鲜有报道。漆酶(EC1.10.3.2)是一种含铜氧化酶,能催化多种具有芳香环的化合物生物形成多聚酚类<sup>[10]</sup>,常用于食品加工中汁液类产品中酚类的去除,促进产品色泽与稳定性;另外,酚类聚合物往往比其单体具有更强和作用更持久的生物活性<sup>[11]</sup>,或者在某些功能方面优于其前导物<sup>[12]</sup>,有利于新型功能性物质的开发。因此,为了充分了解漆酶对苹果酚类物质的催化特征,使其在苹果加工中得到更加广泛的应用,本研究利用漆酶对苹果酚类物质进行生物转化,通过酶促氧化试验,确定其最佳氧化条件,研究氧化产物稳定性及抗氧化活性功能,以期得到具有利用价值的色素物质,为开发新型食品添加剂和加促酶技术在食品工业中的广泛应用提供理论和技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验材料与主要试剂 富士苹果:购于陕西杨凌市场;白腐菌(*Trametes versicolor*)漆酶(简称漆酶),活力 20 U/mg,购于美国 Sigma 公司;主要试剂:儿茶酚( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ , AR)、表儿茶素( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{H}_6$ , AR)和儿

茶素( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{H}_6$ , AR),均为 Sigma 公司产品。

1.1.2 主要仪器 精密电子天平,精度 1/100 000,德国 Sartorius research 公司生产;紫外分光光度计(UV-7000),日本 SHIMADZU 公司生产;精密酸度计(PHS-25C),上海理达仪器厂生产;高转速中草药粉碎机(FW177),天津市泰斯特仪器有限公司生产;无极调速搅拌器(D-971),郑州长城科工贸有限公司生产;旋转薄膜蒸发器(RE-52A),上海亚荣生化仪器厂;循环水式真空泵(SHZ-D III),巩义市英峪予华仪器厂生产;高速台式离心机(TGL-16G 0~16 000 r/min),上海安亭科学仪器厂生产;真空干燥箱(ZK),北京科伟永鑫实验仪器设备厂生产;液相色谱仪(water60 controller),美国 water 公司生产;真空冷冻干燥机(SIM),德国生产。

### 1.2 漆酶对苹果多酚的酶促氧化工艺

苹果多酚的提取:将新鲜苹果切片速冻后置于真空冷冻干燥机中干燥,分别记录冻干前后的质量,置于-80℃冰箱待用。将干燥样品粉碎后用体积分数 60%乙醇溶液浸提 12 h,料液体积比为 1:30,摇床震荡 30 min,抽滤分离,石油醚脱脂,浓缩,冷冻干燥,得苹果多酚制品。

1.2.1 单因素试验 (1) 苹果多酚质量浓度对氧化产物生成量的影响。参照茶多酚酶促氧化制取茶色素的方法<sup>[3]</sup>,并略有改进。用 pH 5.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠配制质量浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL 的苹果多酚溶液,加入 3.0 U/mL 漆酶,在 55℃水浴锅中保温反应 60 min,沸水浴 5 min 终止反应后置入冰盒,用等体积的乙酸乙酯萃取反应液,吸取 0.5 mL 的萃取液,稀释至 3 mL,于 363 nm 波长下比色,以反应前苹果多酚为空白,记录吸光值  $\text{OD}_{363}$ ,用以表示氧化产物的相对生成量。

(2) 漆酶浓度对氧化产物生成量的影响。按上述试验方法,采用最佳苹果多酚质量浓度 2.5 mg/mL,反应时间 60 min,依次改变漆酶浓度(1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 U/mL),测定氧化产物相对

生成量。

(3) 反应时间对氧化产物生成量的影响。按上述试验方法,采用最佳苹果多酚质量浓度 2.5 mg/mL,漆酶浓度 3.5 U/mL,依次改变反应时间(20,40,60,90,120 min),测定氧化产物相对生成

量。

1.2.2 正交试验 在单因素试验的基础上,以 pH、反应温度、苹果多酚质量浓度和漆酶浓度为因素,进行 4 因素 3 水平  $L_9(3^4)$  正交试验,选择漆酶催化氧化苹果多酚的最佳工艺(表 1)。

表 1 苹果多酚酶促氧化  $L_9(3^4)$  正交试验设计

Table 1 Orthogonal experiment design  $L_9(3^4)$  of apple polyphenol oxidation

水平 Level	因素 Factor			
	pH	反应温度/℃ Temperature	苹果多酚质量浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> ) Substrate mass concentration	漆酶浓度/ (U · mL <sup>-1</sup> ) Dosage of enzyme
1	5.2	52	2.2	3.2
2	5.5	55	2.5	3.5
3	5.8	58	2.8	3.8

### 1.3 苹果多酚氧化产物的稳定性试验

1.3.1 氧化产物的理化性质 室温条件下,紫外分光光度计测定苹果多酚氧化产物在 300~800 nm 波长下吸光值的变化。

将苹果多酚氧化产物溶液分别与水和甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等溶剂按体积比 1:1 混合,观察其溶解性。

#### 1.3.2 pH、温度、光照对氧化产物稳定性的影响

(1) pH 对氧化产物稳定性的影响。将不同质量浓度的苹果多酚氧化产物,用 pH 值分别为 3,4,5,6,7,8 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制成 2.5 mg/mL 的溶液,放置 2 h,以蒸馏水代替氧化产物作为空白,测定其在 363 nm 波长处的吸光值。

(2) 温度对氧化产物稳定性的影响。将不同 pH(3,4,5,6,7,8)的苹果多酚氧化产物溶液,分别置于 25,35,45,55,65,75,85,95 ℃ 的水浴锅内,30 min 后取出冷却,以蒸馏水代替氧化产物作为空白,测定其在 363 nm 波长处的吸光值。

(3) 光照对氧化产物稳定性的影响。将不同 pH(3,4,5,6,7,8)的苹果多酚氧化产物溶液在自然条件下,日光连续直射 7 d,每天 10~12 h,每隔 1 d 测定其在 363 nm 波长处的吸光值,并观察溶液的颜色变化,以蒸馏水代替氧化产物作为空白。

### 1.4 苹果多酚氧化产物的 HPLC 分析

1.4.1 标准品底物的配制及其氧化产物的制备 用 pH 5.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制 0.5 mol/mL 的儿茶酚标样、0.2 mol/mL 表儿茶素标样、0.3 mol/mL 儿茶素标样和 2.5 mg/mL 的苹果多酚溶液,分别在以上标样中加入 3.5 U/mL 的漆酶,于 55 ℃ 恒温反应 2 h,产物溶液经乙酸乙酯萃取 3 次,浓缩,冷冻干燥后于 4 000 r/min 冷冻离心 10 min,得各物质的氧化产物。

1.4.2 氧化产物的 HPLC 测定 在 300~800 nm 波长下对儿茶酚、表儿茶素、儿茶素标准液进行扫描,确定 3 种单酚物质均在 280 nm 波长处有较强吸收,且不受流动相中各溶剂的干扰,故以下试验均采用 280 nm 波长进行检测。

HPLC 分析条件:色谱柱 Symmetryshield RP18(4.6 mm×250 mm×5 μm),柱温 35 ℃,检测波长 280 nm,流动相为水-乙腈-乙酸混合液:A 为 V(水):V(乙腈):V(乙酸)=96.5:3:0.5,B 为 V(水):V(乙腈):V(乙酸)=69.5:30:0.5;线性梯度洗脱,0~55 min 为 0~100% B;55~60 min 为 100% A。

### 1.5 苹果多酚氧化产物的抗氧化活性测定

1.5.1 对 ·OH 的清除作用 采用铁-邻二氮菲法<sup>[13-15]</sup>测定苹果多酚及其氧化产物对 ·OH 的清除作用:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>通过 Fenton 反应产生 ·OH,邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>溶液被 ·OH 氧化成邻二氮菲-Fe<sup>3+</sup>,利用邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>(橙红色)的褪色程度来衡量苹果多酚对 ·OH 的清除量。取 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 0.2 mL,然后依次加入 7.5 mmol/L 邻二氮菲溶液 0.4 mL,7.5 mmol/L FeSO<sub>4</sub> 溶液 0.14 mL,50,100,200,500,600,800 μg/mL 的苹果多酚及其氧化产物溶液 2.0 mL,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液 0.12 mL,混匀后于 37 ℃ 保温 60 min,于 520 nm 下比色,记录吸光值。以重蒸水代替供试液组成的反应体系作为对照,0.2 mL 磷酸盐缓冲液和供试液、0.66 mL 重蒸水混合液作为空白。每个质量浓度组平行测定 3 次,取平均值,试验结果以清除率(scavenging activity,SA)表示。

$$SA = [1 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

式中:A<sub>i</sub> 为反应液的吸光值,A<sub>j</sub> 为对照的吸光值,A<sub>0</sub> 为空白的吸光值。

1.5.2 对 DPPH· 的清除作用 参照勾明玥等<sup>[16]</sup>和王海敏等<sup>[17]</sup>的方法,并略有改进。取 1 mL 质量浓度为 0.1, 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的苹果多酚及其氧化产物,与 60  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 DPPH· 溶液 1.0 mL 迅速混合,在 516 nm 下测定其吸光值( $A_t$ );以 1.0 mL DPPH· 溶液与 1.0 mL 无水乙醇反应测定其在 516 nm 处的吸光值为空白( $A_0$ );以 1.0 mL 样液和 1.0 mL 乙醇混合测定样品本身在 516 nm 处的吸光值为对照( $A_j$ )。测定在不同时间(5, 15, 30, 60, 90, 120 min)下苹果多酚及其氧化产物对 DPPH· 的清除能力,计算清除率。

## 1.6 酚类化合物含量的测定

1.6.1 总酚含量的测定 总酚含量的测定采用 Folin-Ciocalteu 法<sup>[18-19]</sup>。以标准品焦性没食子酸的质量浓度( $x$ )对吸光值( $y$ )做曲线  $y=0.0354x+0.0098$ ( $R^2=0.9992$ ),测定样品在 765 nm 处的吸光值,将吸光值代入标准曲线,得总酚质量浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),最后计算样品中的总酚含量。

总酚含量 = 总酚质量浓度/样品质量浓度  $\times 100\%$ 。

1.6.2 黄酮酚含量的测定 黄酮酚含量的测定采用亚硝酸钠-硝酸铝显色法<sup>[20]</sup>。以标准品芦丁的质量浓度( $x$ )对吸光值( $y$ )做标准曲线  $y=0.0107x-0.0025$ ( $R^2=0.9991$ ),测定样品在 510 nm 处的吸

光值,将吸光值代入标准曲线,得黄酮酚质量浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),最后计算样品中黄酮酚含量。

黄酮酚含量 = 黄酮酚质量浓度/样品质量浓度  $\times 100\%$ 。

1.6.3 单宁酚含量的测定 单宁酚含量的测定采用紫外分光光度法<sup>[21]</sup>。以标准品单宁酸的质量浓度( $x$ )对吸光值( $y$ )做标准曲线  $y=0.0913x-0.0056$ ( $R^2=0.9967$ ),测定样品在 680 nm 处的吸光值,将吸光值代入标准曲线,得单宁酚质量浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),最后计算样品中单宁酚含量。

单宁酚含量 = 单宁酚质量浓度/样品质量浓度  $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果多酚酶促氧化反应条件的优化

2.1.1 单因素试验 (1) 苹果多酚质量浓度。图 1 表明,苹果多酚质量浓度为 0.5~2.5 mg/mL 时,其氧化产物相对生成量随质量浓度的增大明显增加,当苹果多酚质量浓度为 2.5 mg/mL 时,氧化产物相对生成量达到最大值,之后随着苹果多酚质量浓度的增加,氧化产物相对生成量则开始降低,由此可知,在该反应体系下最适苹果多酚质量浓度以 2.5 mg/mL 为宜。

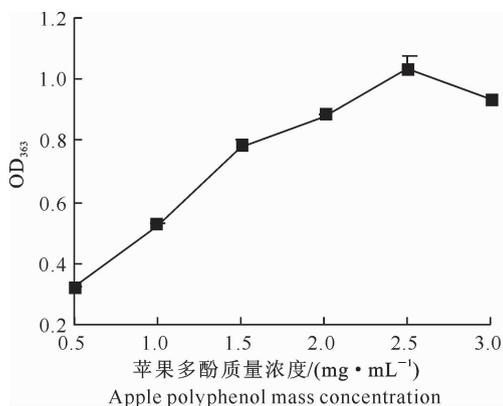


图 1 苹果多酚质量浓度对其氧化产物相对生成量的影响

Fig. 1 Effect of mass concentration of apple polyphenols on yield of oxidation products

(2) 漆酶浓度。图 2 显示,当漆酶浓度为 1.0~3.5 U/mL 时,苹果多酚氧化产物的相对生成量随漆酶浓度的增大而增加,当漆酶浓度为 3.5 U/mL 时,氧化产物相对生成量达到最大值,之后则趋于平缓,表明漆酶催化达饱和趋势。因此,该反应体系下漆酶浓度取 3.5 U/mL 为宜。

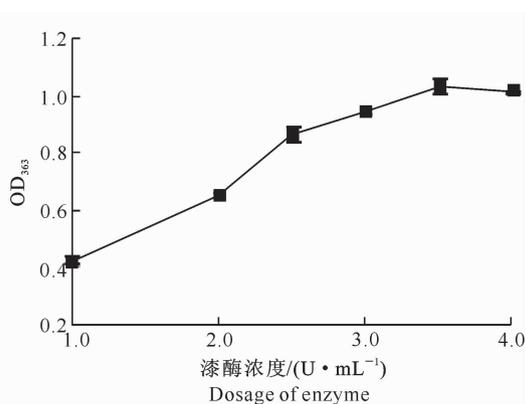


图 2 漆酶浓度对苹果多酚氧化产物相对生成量的影响

Fig. 2 Effect of concentration of laccase on yield of apple polyphenols oxidation products

(3) 反应时间。图 3 表明,反应时间在 0~60 min 时,随着反应时间的延长,反应液颜色逐渐加深,表明氧化产物逐渐增加,60 min 时氧化产物相对生成量达最大值,之后氧化产物相对生成量开始减小,这可能是由于部分氧化产物在反应过程中发生了聚合效应所致<sup>[22]</sup>,故本试验确定的最佳反应时

间为 60 min。

图 4 显示,苹果多酚经漆酶氧化后其酚类物质含量随着反应时间的延长逐渐下降,反应 120 min 时,

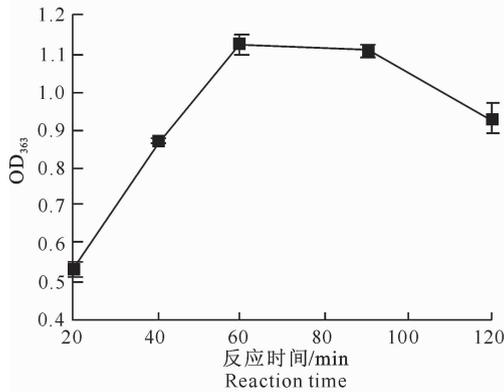


图 3 反应时间对苹果多酚氧化产物相对生成量的影响

Fig. 3 Effect of reaction time of apple polyphenols on yield of apple polyphenols oxidation products

综合分析图 3 和图 4 可知,在 20~60 min,总酚含量减少,而氧化产物相对生成量增加;60 min 后,虽然总酚含量仍在减少,但是氧化产物相对生成量却没有增加,反而在减少,试验中观察到反应体系混浊度增加,说明此时苹果多酚氧化后形成的可溶性产物可能进一步聚合形成了不溶性的多聚物。故本研究确定最佳酶促反应时间为 60 min。

表 2 苹果多酚酶促氧化 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experiment of the L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) apple polyphenols oxidation

处理编号 Transaction number	pH	反应温度/℃ Temperature	苹果多酚质量浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> ) Apple polyphenols mass concentration	漆酶浓度/ (U · mL <sup>-1</sup> ) Dosage of enzyme	OD <sub>363</sub>
1	1(5.2)	1(52)	1(2.2)	1(3.2)	0.483
2	1(5.2)	2(55)	2(2.5)	2(3.5)	1.278
3	1(5.2)	3(58)	3(2.8)	3(3.8)	0.928
4	2(5.5)	1(52)	2(2.5)	3(3.8)	0.889
5	2(5.5)	2(55)	3(2.8)	1(3.2)	1.520
6	2(5.5)	3(58)	1(2.2)	2(3.5)	0.912
7	3(5.8)	1(52)	3(2.8)	2(3.5)	0.807
8	3(5.8)	2(55)	1(2.2)	3(3.8)	0.996
9	3(5.8)	3(58)	2(2.5)	1(3.2)	0.756
K <sub>1</sub>	2.689	2.200	2.376	2.759	
K <sub>2</sub>	3.306	3.794	2.923	3.003	
K <sub>3</sub>	2.580	2.581	2.581	2.813	
R	0.242	0.531	0.300	0.081	

## 2.2 苹果多酚氧化产物的稳定性

2.2.1 氧化产物的理化性质 漆酶体外氧化产物低聚物部分易溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯等溶剂。用 UV-1700 分光光度计在 300~800 nm 波长扫描,结果(图 5)显示,该氧化产物在 363 nm 波长处有最大吸收峰,表明反应形成了新的色素物质。

总酚含量减少 56.92%,黄酮酚含量减少 50.88%,单宁酚含量减少 43.68%。总体而言,苹果多酚经酶促氧化后,游离酚类物质含量均下降较快。

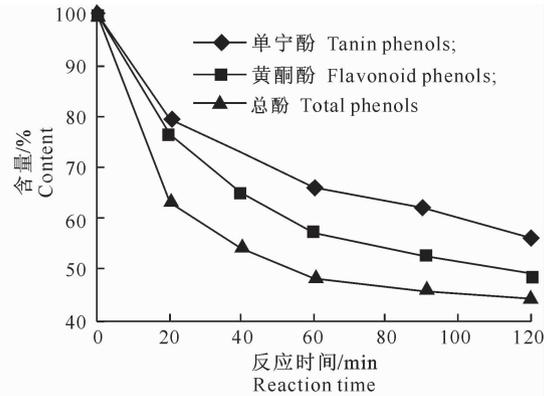


图 4 酶促反应后苹果酚类物质含量的变化  
Fig. 4 Variation of phenol content after enzymatic reaction

2.1.2 酶促氧化工艺参数的优化 由表 2 可知,苹果多酚酶促氧化最佳条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即在 pH 5.5,反应温度 55 ℃,苹果多酚质量浓度 2.5 mg/mL,漆酶浓度 3.5 U/mL 的条件下,氧化产物相对生成量最大。从 4 个因素的 R 值可知,反应温度对漆酶催化氧化苹果多酚的影响最大,其次为苹果多酚质量浓度、pH,影响最小的是漆酶浓度。

2.2.2 pH 对氧化产物稳定性的影响 表 3 显示,随着 pH 的增大,苹果多酚氧化产物颜色逐渐加深,其中 pH 在 3~5 时呈黄色至黄褐色;在 pH 为 6 时,呈棕红色;在 pH 大于 7 时呈褐色乃至棕褐色。这与付兆辉<sup>[23]</sup>在啤酒中的研究结果一致,即酚类氧化产物随着 pH 的增大,溶液色泽加深。

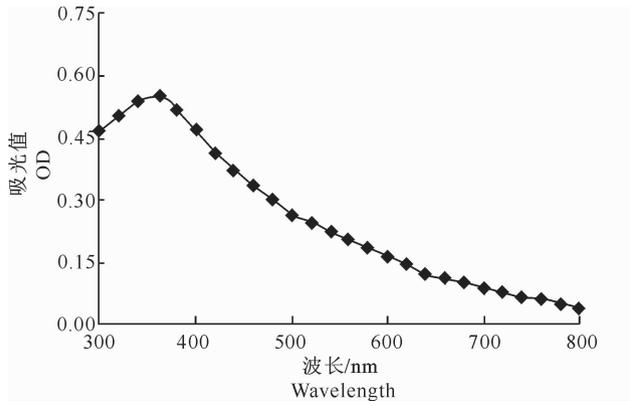


图 5 苹果多酚氧化产物的紫外可见吸收光谱

Fig. 5 UV/V spectrum of apple polyphenol oxidation product

表 3 不同 pH 下苹果多酚氧化产物溶液颜色的变化

Table 3 Color changes of the solution of oxidative products under different pHs

pH	3	4	5	6	7	8
颜色	黄色	橙黄	黄褐色	棕红色	褐色	棕褐色
Color	Yellow	Orange-yellow	Tan	Red-brown	Brown	Chocolate brown

表 4 不同温度下苹果多酚氧化产物吸光值的变化

Table 4 OD changes of apple polyphenol oxidative products under different temperatures

温度/℃ Temperature	pH					
	3	4	5	6	7	8
25	0.512	0.529	0.536	0.551	0.579	0.611
35	0.609	0.618	0.638	0.658	0.682	0.714
45	0.696	0.722	0.745	0.776	0.795	0.817
55	0.734	0.755	0.782	0.813	0.821	0.828
65	0.741	0.762	0.793	0.826	0.832	0.834
75	0.738	0.760	0.789	0.823	0.828	0.833
85	0.736	0.759	0.788	0.822	0.827	0.832
95	0.737	0.758	0.786	0.822	0.826	0.832

表 5 不同光照时间下苹果多酚氧化产物吸光值的变化

Table 5 OD changes of oxidative products under different days of sunshine

光照时间/d Time	pH					
	3	4	5	6	7	8
1	0.476	0.512	0.534	0.555	0.573	0.592
2	0.483	0.525	0.556	0.572	0.581	0.611
3	0.478	0.521	0.549	0.568	0.576	0.608
4	0.476	0.521	0.548	0.567	0.572	0.607
5	0.476	0.519	0.548	0.566	0.574	0.606
6	0.477	0.519	0.546	0.567	0.572	0.601
7	0.477	0.518	0.549	0.566	0.571	0.603

### 2.3 苹果多酚氧化产物的 HPLC 分析

分析苹果中具有代表性的酚类物质儿茶素、儿茶酚、表儿茶素及其氧化产物的 HPLC 图谱,结果见图 6~11。

经 HPLC 检测,儿茶酚、表儿茶素和儿茶素的漆酶氧化产物均为不同极性或不同分子量物质的混合物。对儿茶酚进行酶促氧化,主要得到 2 种产物,

且产物 1 的出峰时间早于产物 2,说明其极性相对较强,根据 Macheix 等<sup>[24]</sup>的研究,推测其可能是儿茶酚的二聚体;对表儿茶素进行酶促氧化,其氧化产物均为单一的 HPLC 峰,主要有 2 种氧化产物;对儿茶素进行酶促氧化,其主要氧化产物均为单一的 HPLC 峰,主要生成 4 种氧化产物(表 6)。

2.2.3 温度对氧化产物稳定性的影响 表 4 显示,在同一 pH 下,随着温度的升高,苹果多酚氧化产物的 OD<sub>363</sub> 明显增加,颜色变为橙黄色甚至橙红色,这可能与色素中某些还原性物质的热氧化有关。在温度为 65 ℃ 时,OD<sub>363</sub> 值均达到最大值;在 65~95 ℃ 时,随着温度的增加,OD<sub>363</sub> 几乎未发生明显变化,说明氧化产物有很强的耐热性,即热稳定性好。

2.2.4 光照对氧化产物稳定性的影响 表 5 显示,在同一 pH 下,自然光照对多酚氧化产物的影响很小,7 d 之内 OD<sub>363</sub> 几乎未发生变化,说明氧化产物对光照不敏感,这对开发新型天然色素十分有利。

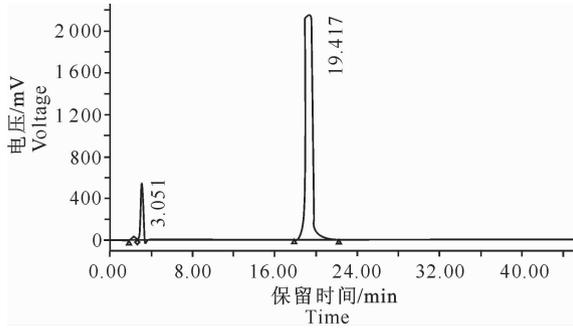


图 6 儿茶酚的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC chromatogram of catechol

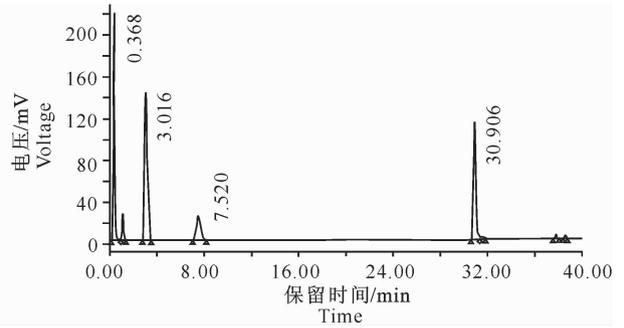


图 7 儿茶酚氧化产物的 HPLC 图谱

Fig. 7 HPLC chromatogram of oxidative products of catechol

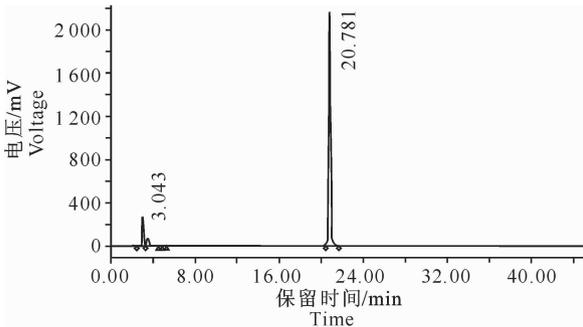


图 8 表儿茶素的 HPLC 图谱

Fig. 8 HPLC chromatogram of epicatechin

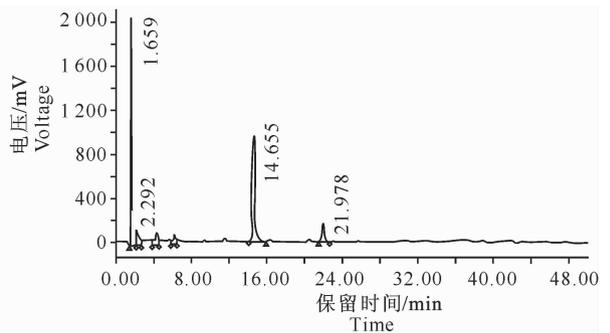


图 9 表儿茶素氧化产物的 HPLC 图谱

Fig. 9 HPLC chromatogram of the oxidative products of epicatechin

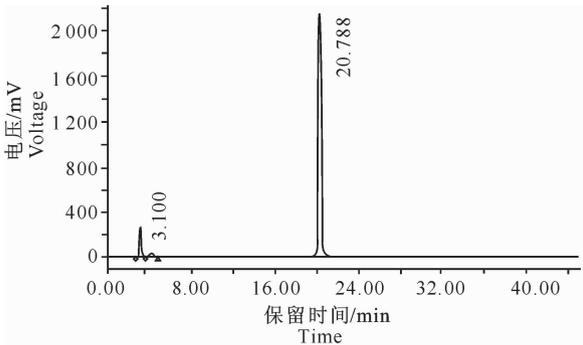


图 10 儿茶素的 HPLC 图谱

Fig. 10 HPLC chromatogram of catechin

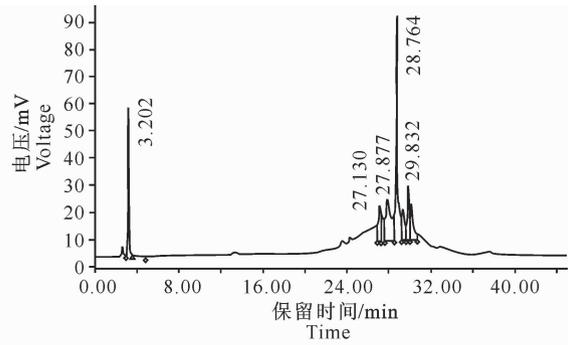


图 11 儿茶素氧化产物的 HPLC 图谱

Fig. 11 HPLC chromatogram of the oxidative products of catechin

表 6 3 种酚类物质氧化产物的 HPLC 分析结果

Table 6 Interpretation of HPLC analysis of oxidation products of three phenol substrates

苹果酚类物质 Apple polyphenol	氧化产物 Oxidative product	保留时间/min Retention time	峰面积 Peak area	可能的化合物 Possible compound
儿茶酚 Catechol	1	7.520	500 763	未知 Unknown
	2	30.906	1 570 669	未知 Unknown
表儿茶素 Epicatechin	1	14.655	1 661 138	未知 Unknown
	2	21.978	2 730 092	未知 Unknown
儿茶素 Catechin	1	27.130	222 758	茶黄素 Theaflavin
	2	27.877	539 291	茶黄素-3-没食子酸酯 Theaflavin-3-gallate
	3	28.764	1 118 940	茶黄素-3'-没食子酸酯 Theaflavin-3'-gallate
	4	29.832	210 283	未知 Unknown

苹果多酚提取物图谱复杂(没有列出),出现很多峰,氧化后酚类物质含量迅速减少,说明产物酚

羟基数目减少,底物发生了聚合;HPLC 图谱上底物峰大部分消失,又出现许多新的峰,说明出现了极性

和分子量大小不等的产物。由于苹果多酚的支链和断裂方式目前还不清楚,所以无法将氧化产物与之前的单体氧化结构进行一一对应,从而不能确定其为何种物质,所以还需要进一步深入研究。

## 2.4 苹果多酚及其氧化产物的抗氧化活性

2.4.1 对·OH的清除作用 从表7可以看出,在质量浓度为50~800 μg/mL时,苹果多酚及其氧化产物对·OH均有较强的清除作用。当质量浓度为50~500 μg/mL时,随着质量浓度的增加,苹果多酚及其氧化产物对·OH的清除率逐渐增加,在质量浓度为500 μg/mL时,苹果多酚及其氧化产物对·OH的清除率都达最大值,分别为83.77%和85.42%,之后随着质量浓度的增加,清除率呈逐渐降低趋势。究其原因,苹果多酚及其氧化产物均具

有酸性,虽然高质量浓度具有一定的活性诱发效应,但同时溶液的酸性增大,抑制效应也逐渐增强,当抑制效应强于活性效应时,对·OH的清除作用也随之降低<sup>[25]</sup>。

由表7还可以看出,当质量浓度为500~800 μg/mL时,苹果多酚氧化产物对·OH的清除率均较苹果多酚高,表明在质量浓度较高时,氧化产物具有更高的清除作用。其原因可能是氧化产物能形成更大的供氢体;此外,不同抗氧化性能的官能团共存于苹果多酚及其氧化产物体系中,抗氧化官能团之间可能互相还原产生协同作用,使氧化产物整体的抗氧化性更强<sup>[24]</sup>。由此可知,在一定质量浓度下苹果多酚氧化产物具有比苹果多酚更强的抗氧化活性。

表7 不同质量浓度苹果多酚及其氧化产物对·OH的清除率

Table 7 Scavenge rate of different-concentrated apple polyphenols and its oxidative products on hydroxyl radical %

样品 Sample	质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> ) Concentration					
	50	100	200	500	600	800
苹果多酚 Apple polyphenol	56.25±0.018 5	65.36±0.011 9	76.94±0.029 0	83.77±0.008 8	80.62±0.025 8	77.49±0.014 2
氧化产物 Oxidation products	52.36±0.014 6	62.65±0.057 0	75.98±0.024 0	85.42±0.009 7	83.66±0.043 4	79.32±0.023 6

2.4.2 对DPPH·的清除作用 不同时间、不同质量浓度下,苹果多酚及其氧化产物对DPPH·的清除率如表8所示。表8显示,在5~30 min,随着时间的延长,苹果多酚及其氧化产物对DPPH·的清除率逐渐增大,之后基本保持不变。高质量浓度苹果多酚及其氧化产物清除DPPH·的能力明显高于

低质量浓度,而且在质量浓度为0.1 μg/mL时,苹果多酚对DPPH·的清除能力略高于其氧化产物,高质量浓度(1 000 μg/mL)时,氧化产物对DPPH·的清除能力高于苹果多酚,与它们对·OH清除率的结果相一致,进一步说明氧化产物具有一定的质量浓度诱发效应。

表8 不同时间、不同质量浓度下苹果多酚及其氧化产物对DPPH·的清除率

Table 8 Scavenge rate of different mass concentration apple polyphenols and its oxidative products to DPPH· radical in different time %

样品 Sample	质量浓度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min
苹果多酚 Apple polyphenol	0.1	65.56±0.011 8	66.26±0.012 7	68.52±0.016 5	68.16±0.020 1	68.21±0.018 5	68.24±0.019 8
氧化产物 Oxidation products	0.1	60.67±0.011 1	61.22±0.020 1	61.92±0.022 1	62.02±0.020 7	61.92±0.014 2	61.89±0.001 2
苹果多酚 Apple polyphenol	1 000	87.03±0.104 0	88.62±0.014 9	89.53±0.022 3	89.58±0.021 6	89.35±0.019 7	89.28±0.013 7
氧化产物 Oxidation products	1 000	92.50±0.084 7	93.59±0.237 7	94.26±0.106 6	94.32±0.108 6	94.19±0.233 0	94.28±0.074 3

## 3 讨论

酶促反应受pH值和温度的影响很大,但它必须与酶的纯度、底物种类和质量浓度、缓冲剂的种类和浓度以及抑制剂等因素综合考虑才有意义<sup>[26-27]</sup>。底物质量浓度和酶浓度也是反应体系中影响氧化产物形成和积累的2个关键因素。在反应体系中,调整好以上两者的比例,利用较小的酶剂量和最大限度的底物质量浓度实现目的产物的最大积累,从而

可以最大限度地降低生产成本<sup>[28]</sup>。本试验发现,漆酶对苹果多酚的氧化环境偏酸性,温度为55℃,对苹果多酚氧化的最佳底物质量浓度为2.5 mg/mL,漆酶浓度为3.5 U/mL。因苹果多酚成分复杂,漆酶对其酶促反应是对苹果多酚中所有单体和聚合物共同作用的结果。

酚类化合物及其氧化产物具有多种生物活性,其中最主要的是抗氧化性,且活性与其酚类物质组成、分子结构、聚合度、是否有特定的基团(如六羟基

连苯二酰基,HHDP)有着密切联系<sup>[29]</sup>,抗氧化作用与自由基反应后形成的半醌自由基的稳定性有关,因此,苹果多酚及其氧化产物对不同自由基的清除能力不同。在不同条件下,酶促氧化产物可生成不同颜色的苹果多酚性色素<sup>[30]</sup>。同时苹果多酚氧化产物对光、温度、pH均有较好的稳定性,这为天然色素的制备提供了一条新思路和新途径。本试验结果表明,苹果多酚氧化产物仍具有较高的活性,其对·OH和DPPH·自由基的清除能力在一定质量浓度范围内高于多酚本身。因此认为,氧化可能会导致多酚类化合物的结构发生改变,适度的氧化聚合(聚合度<5)不仅不会影响其活性,还有可能有利于提高某些活性。

本试验中,利用漆酶氧化苹果多酚,经HPLC分析均灵敏地检测出了新的产物,此方法精确度高,分离效果好<sup>[9]</sup>。当漆酶作用于苹果多酚粗提物时,得到的氧化产物可能是几种色素的组合成分,如黄色素、褐色素等,因此在高压液相分析中因苹果多酚及氧化产物成分复杂,将这些物质逐一区分出来难度较大,以后尚需要进一步研究完善。

## 4 结 论

本研究得到的白腐菌(*T. versicolor*)漆酶对苹果多酚酶促氧化的最佳反应条件为:反应温度55℃,苹果多酚质量浓度2.5 mg/mL,pH 5.5,漆酶浓度3.5 U/mL,其作用强弱顺序为反应温度>苹果多酚质量浓度>pH>漆酶浓度,表明漆酶对温度敏感,控制反应温度尤为重要。

本试验通过紫外-可见光连续扫描可知,苹果多酚氧化产物在紫外区363 nm处有强的吸收峰,该产物在酸性(pH 3~5)条件下呈黄色素,pH 6条件下呈棕红色素,碱性(pH 7~8)条件下呈棕褐色素,有较强的耐热性,对光照不敏感,可在室温下放置7 d,溶液颜色基本保持不变;经HPLC检测,儿茶素、表儿茶素、儿茶酚和苹果多酚酶促氧化后,出现了极性或分子量大小不同的混合物,形成了新的产物。

苹果多酚及其氧化产物的抗氧化活性研究表明,对不同体系产生的自由基(·OH和DPPH·),苹果多酚及其氧化产物均表现出了明显的清除活性。在较高质量浓度时,氧化产物清除·OH和DPPH·的能力均优于苹果多酚,呈现出一定的质量浓度诱发效应。在质量浓度为500 μg/mL时,氧化产物对·OH的清除率最高,达85.42%,在质量浓度为1 000 μg/mL、反应时间为60 min时,其对

DPPH·的清除率最高,达94.32%。

## [参考文献]

- [1] 孙建霞,孙爱东. 苹果多酚的提取及其在食品中的应用现状分析[J]. 食品研究与开发,2004,25(5):50-53.  
Sun J X,Sun A D. The extraction of apple polyphenols and analysis on application status in foods [J]. Food Research and Development,2004,25(5):50-53. (in Chinese)
- [2] 赵京鑫. 苹果多酚的特性及其应用[J]. 中国食物与营养,2010(3):24-25.  
Zhao J C. Characteristics and application of apple polyphenol [J]. Food and Nutrition in China,2010(3):24-25. (in Chinese)
- [3] 徐竟一,王勇. 苹果多酚的提取工艺探讨[J]. 价值工程,2010,10(3):132-134.  
Xu J Y,Wang Y. Discussion on extraction of apple polyphenols [J]. Value Engineering,2010,10(3):132-134. (in Chinese)
- [4] 韩菊,高红潮,魏福祥,等. 苹果多酚的性能研究[J]. 食品科技,2008(10):139-141.  
Han J,Gao H C,Wei F X, et al. Study on characterization of apple polyphenols [J]. Food Science and Technology,2008(10):139-141. (in Chinese)
- [5] 钱志伟. 苹果多酚的提取分离以及在食品中的重组应用[J]. 农产品加工,2009,6(6):75-79.  
Qian Z W. Extraction and separation and recombining application in food of apple polyphenols [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing,2009,6(6):75-79. (in Chinese)
- [6] 晏日安,杨兴,黄雪松. 苹果多酚的分离提取与抗氧化性能的研究[J]. 食品科技,2008(3):154-156.  
Yan R A,Yang X,Huang X S. Study on the separation and anti-oxidative active of apple polyphenol [J]. Food Science and Technology,2008(3):154-156. (in Chinese)
- [7] 李莉,田士林. 苹果多酚抗氧化性的测定[J]. 安徽农业科学,2006,34(21):5716-5717.  
Li L,Tian S L. Research on the determination of the anti-oxidability of apple polyphenol [J]. Journal of Anhui Agri Sci,2006,34(21):5716-5717. (in Chinese)
- [8] 翁鸿珍,成宇峰. 高效液相色谱法测定苹果酒中的多酚物质[J]. 中国酿造,2009(5):159-161.  
Weng H Z,Cheng Y F. Determination of polyphenols in cider by HPLC [J]. China Brewing,2009(5):159-161. (in Chinese)
- [9] 陈磊,杨建荣,黄雪松. 高效液相色谱法快速测定红富士苹果渣中的6种多酚[J]. 食品与发酵工业,2008,34(8):158-161.  
Chen L,Yang J R,Huang X S, et al. Determination of 6 polyphenols in Fuji apple pomace by high performance liquid chromatography [J]. Food and Fermentation Industries,2008,34(8):158-161. (in Chinese)
- [10] 王石磊,张建波,张建英,等. 漆酶及其在纺织工业中的应用[J]. 印染,2010(12):52-55.  
Wang S L,Zhang J B,Zhang J Y, et al. Laccase and its applications in textile industry [J]. Printing and Dyeing,2010(12):52-55. (in Chinese)
- [11] 丁兆堂,王秀峰,于海宁,等. 茶多酚固定化酶体外氧化产物茶

- 黄素组成及其化学发光分析 [J]. 茶叶学, 2005, 25(1): 49-55.
- Ding Z T, Wang X F, Yu H N, et al. The composition and chemiluminescence analysis of theaflavins in enzymatic oxidation products of tea polyphenols [J]. Journal of Tea Science, 2005, 25(1): 49-55. (in Chinese)
- [12] 谷记平. 茶黄素生物合成的研究进展 [J]. 福建茶业, 2004 (2): 19-21.
- Gu J P. The research on biosynthesis of theaflavins [J]. Tea in Fujian, 2004(2): 19-21. (in Chinese)
- [13] 杜绍亮, 弓建红, 张寒娟, 等. 4 种植物多糖抗氧化活性的比较 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 129-133.
- Du S L, Gong J H, Zhang H J, et al. Comparison of the antioxidative activities of polysaccharides from four kinds of plants [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6): 129-133. (in Chinese)
- [14] 郭豫梅, 郭豫杰, 刘 贵, 等. 石参中黄酮类化合物含量的测定及抗氧化活性的研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(1): 168-169.
- Guo Y M, Guo Y J, Liu G, et al. Determination of total flavonoids in *Eremurus chinensis* and study on its antioxidant activity [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2010, 38(1): 168-169. (in Chinese)
- [15] 曾 军, 石国荣. 天然产物抗氧化活性的测定方法和原理 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(22): 35-36.
- Zeng J, Shi G R. The antioxidant activity and principles determination of natural products [J]. Anhui Agri Sci Bull, 2008, 14(22): 35-36. (in Chinese)
- [16] 勾明玥, 刘 梁, 张春枝. 采用 DPPH 法测定 26 种植物的抗氧化活性 [J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(3): 148-150.
- Gou M Y, Liu L, Zhang C Z. Determination of antioxidant activity in 26 plants by DPPH method [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(3): 148-150. (in Chinese)
- [17] 王海敏, 虞海霞, 董 蕊, 等. 苕子蜜总酚酸和总黄酮含量测定及抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(1): 54-57.
- Wang H M, Yu H X, Dong R, et al. Antioxidant activities and contents of total phenolic acid and total flavonoids in vicia villosa roth honey [J]. Food Science, 2010, 31(1): 54-57. (in Chinese)
- [18] Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. Methods in Enzymology, 1999(299): 152-178.
- [19] 韩 菊, 魏福祥. Folin-Ciocalteu 比色法测定苹果渣中的多酚 [J]. 食品科学, 2010, 31(4): 179-182.
- Han J, Wei F X. Determination of polyphenols in apple pomace by Folin-Ciocalteu colorimetry [J]. Food Science, 2010, 31(4): 179-182. (in Chinese)
- [20] 丛海迪, 郑毅男. 椴树蜜总酚酸和总黄酮含量测定及抗氧化活性研究 [J]. 现代农业科技, 2010(9): 31-34.
- Cong H D, Zheng Y N. Antioxidant activities and contents of total polyphenols and flavonoids in linden honey [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2010(9): 31-34. (in Chinese)
- [21] 吴冬梅, 陈筋鸿, 汪咏梅, 等. 高纯度塔拉单宁酸含量测定方法的研究 [J]. 现代化工, 2008, 28(2): 342-346.
- Wu D M, Chen J H, Wang Y M, et al. Study on quantitative determination of high purity tara tannic acid [J]. Modern Chemical Industry, 2008, 28(2): 342-346. (in Chinese)
- [22] 张影陆, 徐 岩. 果酒模拟体系中单酚酶促氧化聚合的研究 [J]. 酿酒科技, 2007(3): 45-50.
- Zhang Y L, Xu Y. Polymerization of enzymatic oxidation in model system of wine [J]. Liquor-making Science and Technology, 2007(3): 45-50. (in Chinese)
- [23] 付兆辉. 啤酒多酚的抗氧化研究 [J]. 酿酒, 2004, 31(4): 48-50.
- Fu Z H. The study of antioxidative activity of polyphenols in beer [J]. Liquor Making, 2004, 31(4): 48-50. (in Chinese)
- [24] Macheix J, Sapis J C, Fleuriet C. Phenolic compounds and polyphenol oxidases in relation to browning in grapes and wines [J]. Reviews in Food Science and Nutrition, 1991, 30: 441-486.
- [25] 李春美, 谢笔钧. 茶儿茶素氧化聚合物及其生物活性的研究 [J]. 精细化工, 2000, 17(4): 241-244.
- Li C M, Xie B J. Investigation with spectrophotometric method on the radical scavenging effect of tea polyphenol and its oxidant [J]. Fine Chemicals, 2000, 17(4): 241-244. (in Chinese)
- [26] 李 阳, 蒋国翔, 牛军峰, 等. 漆酶催化氧化水中有机污染物 [J]. 化学进展, 2009, 21(10): 2028-2035.
- Li Y, Jiang G X, Niu J F, et al. Laccase-catalyzed oxidation of organic pollutants in water [J]. Progress in Chemistry, 2009, 21(10): 2028-2035. (in Chinese)
- [27] 陈银霞. 影响酶促反应速度的外因研究 [J]. 现代农业科技, 2008(18): 238-239.
- Chen Y X. The study of external factors on the rate of enzymatic reaction [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008(18): 238-239. (in Chinese)
- [28] 洪 新, 唐 克, 牟小刚, 等. 耐酸性  $\alpha$ -淀粉酶酶促反应动力学研究 [J]. 辽宁工业大学学报: 自然科学版, 2010, 30(2): 115-118.
- Hong X, Tang K, Mou X G, et al. Kinetic study on enzymic reaction of antiacidic  $\alpha$ -amylase [J]. Journal of Liaoning University of Technology: Natural Science Edition, 2010, 30(2): 115-118. (in Chinese)
- [29] 李志洲. 提子皮中多酚类物质的微波提取及抗氧化性研究 [J]. 中成药, 2009, 31(12): 1939-1942.
- Li Z Z. The study of microwave extraction and antioxidative activity of polyphenols in grape skin [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2009, 31(12): 1939-1942. (in Chinese)
- [30] 许丽璇. 普洱茶中黄酮类化合物提取方法和抗氧化性初步研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(30): 14875-14878.
- Xu L X. Preliminary study on the flavonoids extraction methods and oxidation resistance in Pu'er Tea [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2009, 37(30): 14875-14878. (in Chinese)