

荔枝果皮花色苷的提取纯化及其酶促降解研究

吴金鋈¹, 刘通讯¹, 刘亮², 谢笔钧²

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640) (2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 本文从荔枝果皮中提取纯化得到了高活性多酚氧化酶和高纯度花色苷, 在此基础上, 研究了花色苷-PPO-表儿茶素之间的相互作用以及花色苷降解速率受各反应物浓度的影响。结果表明, PPO 先与表儿茶素发生氧化还原反应, 随着大量表儿茶素氧化产物生成, 其氧化产物再与花色苷作用, 使花色苷降解。花色苷降解速率受各反应物浓度的影响较大。

关键词: 花色苷; 多酚氧化酶; 表儿茶素; 纯化; 酶促降解

中图分类号: O629.13; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0683-04

Purification and Enzymatic Degradation of Anthocyanins from Litchi Pericarp

WU Jin-jun¹, LIU Tong-xun¹, LIU Liang², XIE Bi-jun²

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China) (2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Polyphenol oxidase and anthocyanins with high purity were obtained from Litchi pericarp by modern purification methods. The degradation mechanism of anthocyanins in the presence of (-)-epicatechin and litchi pericarp polyphenol oxidase (PPO) and the effects of the reactant concentration on the anthocyanins degradation rate were studied. The results showed that redox reaction between PPO and (-)-epicatechin occurred firstly and generated lots of (-)-epicatechin oxidation products, which reacted with anthocyanins and resulted in degradation of anthocyanins. Anthocyanins degradation rate was affected obviously by the substrate concentration.

Key words: anthocyanins; polyphenol oxidase; (-)-epicatechin; purification; enzymatic degradation

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是无患子科 (*Sapindaceae*) 荔枝属植物, 原产我国南方的亚热带名果。荔枝表皮的红色来源于花色苷, 但花色苷在荔枝采后及贮存中能迅速降解从而导致荔枝褐变^[1]。长期以来, 花色苷降解被认为是由多酚氧化酶 (PPO) 直接催化氧化花色苷引起的, 从而导致荔枝果皮褐变^[2-4]。但蒋跃明等^[5]发现荔枝花色苷虽然是多酚类物质, 却不能被荔枝果皮 PPO 直接催化氧化, 类似的报道还见于葡萄、草莓等水果^[6,7]。虽当 PPO 单独与花色素苷作用时没有活力, 而有某些酚类物质的存在会显著加快花色苷的氧化降解^[6-9]。到目前为止, 对于荔枝果皮中花色苷的降解机理, 研究者们仍然没有给出令人信服的解释, 对于花色苷-PPO-表儿茶素之间相互作用也鲜见报道。本实验在荔枝果皮中提取得到部分纯化后的 PPO 与花色苷的基础上, 着重研究花色苷-PPO-表儿茶素之间的相互作用, 为研究荔枝果皮中花色苷的降解机理和荔枝褐变机理提供更多的理论依据。

收稿日期: 2008-03-20

作者简介: 吴金鋈, 女, 在读硕士, 研究方向: 粮食油脂与植物蛋白工程

1 材料与方法

1.1 材料

荔枝: 产自广州市的桂味品种, 选择色泽鲜艳, 成熟度适中, 果形匀称, 未受机械损伤的新鲜荔枝。迅速去壳, 并将果皮装入保鲜袋中, 置于-18℃的冰柜中保存备用。

多酚氧化酶: 荔枝果皮中提取纯化 (纯化倍数为 2.65, 比活力 134916.67 U/mg)。

1.2 主要设备及试剂

表儿茶素 ((-)-Epicatechin) (SIGMA 公司); UV-1700 紫外可见分光光度计 (SHIMADZU); MODEL-330 高效液相色谱仪 (VARIAN)。

1.3 方法

1.3.1 荔枝果皮花色苷的提取纯化

1.3.1.1 花色苷的提取

从荔枝果皮中通过丙酮浸提法所得的滤液即花色苷粗提液, 将其通过大孔树脂 XAD-16 柱层析 (30 cm×2.5 cm, i.d.), 以 50% 的乙醇为洗脱液, 收集液

经旋转蒸发器于40℃减压浓缩,浓缩液经乙酸乙酯萃取,水相为花色苷溶液,然后经旋转蒸发浓缩,浓缩液于4℃保存备用。

1.3.1.2 可见光谱吸收扫描

经1.3.1.1分离后的花色苷pH值调至3.5,用UV-1700紫外可见分光光度计进行扫描,扫描范围为200~600 nm。

1.3.1.3 花色苷的纯化

经1.3.1.1分离后的花色苷用TSK凝胶色谱柱(Toyopearl HW-40S column [200 mm×16mm ID])层析法进行纯化,洗脱条件:洗脱液为甲醇-甲酸-H₂O溶液(50:2:48,体积比),流速为0.8 mL/min,以1.3.1.2扫描所得的最大吸收波长为检测波长,自动部分收集器分步收集,每4 mL收集一管。收集洗脱峰,经旋转蒸发浓缩去除有机溶剂后4℃保存备用。

1.3.1.4 RP-HPLC分析

分析条件为:DAD检测器,色谱柱(VP-ODS column 150 mm×4.6 mm, i.d., 5 μm, SHIMADZU),流动相为A:甲酸/水(2.5/97.5),B:甲酸/水/乙腈(2.5/40/57.5)。流速1 mL/min,洗脱梯度:0~40 min,5%~35% B;40~45 min,35%~50% B;45~50 min,50%~80% B;以1.3.1.2扫描所得的最大吸收波长为检测波长。

1.3.2 花色苷-PPO-表儿茶素之间的相互作用

1.3.2.1 花色苷-PPO反应

在比色皿中准确加入0.40 mL 0.45 mmol/L花色苷,2.55 mL pH 3.5的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和0.05 mL 36 μg/mL的PPO(3 mL反应体系,15℃),用UV-1700紫外可见分光光度计每隔5 min在600~300 nm对反应体系进行扫描,记录峰值变化,以测定花色苷降解速率的变化。

1.3.2.2 花色苷-表儿茶素反应

在比色皿中准确加入0.40 mL 0.45 mmol/L花色苷,2.10 mL pH 3.5的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和0.50 mL 3 mmol/L表儿茶素(3 mL反应体系,15℃),其它步骤同1.3.2.1。

1.3.2.3 花色苷-PPO-表儿茶素反应

在比色皿中准确加入0.40 mL 0.45 mmol/L花色苷,0.05 mL 36 μg/mL的PPO,2.10 mL pH 3.5的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和0.45 mL 6 mmol/L表儿茶素(3 mL反应体系,15℃),其它步骤同1.3.2.1。

在反应体系(3 mL)中通过改变表儿茶素、PPO、花色苷在体系中的浓度来研究各反应物浓度变化对花色苷降解速率的影响。其它步骤同1.3.2.1。

2 结果与分析

2.1 荔枝果皮中花色苷的提取纯化

经提取分离得到的花色苷粗品中常常含有其他多酚、多糖等杂质,这些杂质的存在会影响花色苷的稳定性以及花色苷与PPO之间关系的进一步研究,因此对粗品进行纯化是非常必要的。

2.1.1 花色苷可见光吸收光谱分析

如图1所示,在pH 3.5时,花色苷呈现其特征吸收峰,最大吸收波长为520 nm。

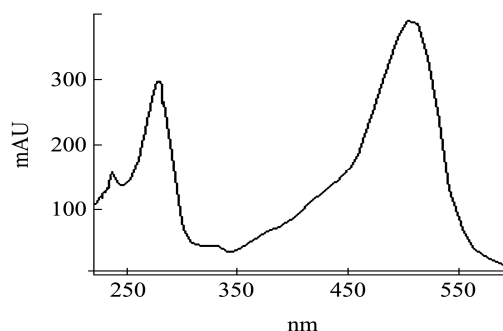


图1 花色苷在 pH3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中的可见光吸收光谱

Fig.1 Vis-absorption spectra of anthocyanins in citric acid-sodium citrate solution (pH 3.5)

2.1.2 TSK凝胶色谱柱层析纯化花色苷

采用TSK凝胶色谱柱层析法纯化荔枝花色苷的效果较好。如图2所示,经紫外分光光度计分析,在520 nm检测波长下,其洗脱曲线呈现一个单峰。

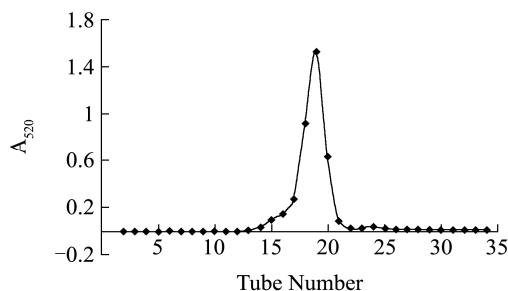


图2 花色苷洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of anthocyanins

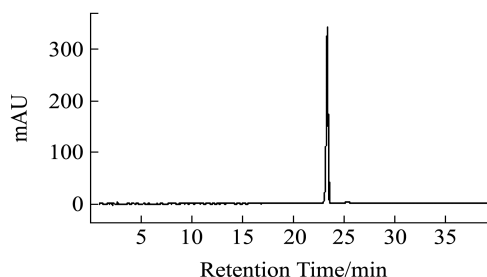


图3 纯化花色苷 HPLC 分析图

Fig.3 HPLC chromatogram of anthocyanins

所得样品进一步经 RP-HPLC 分析,表明其很可能为单一组分(图3),说明用 TSK 柱层析法使花色苷得到了较好的分离。

2.2 花色苷-PPO-表儿茶素之间的相互作用

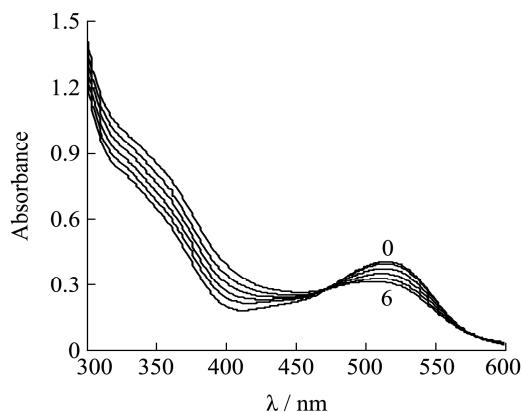


图4 花色苷在 pH 3.5 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中的降解趋势图(图中 UV-VIS 扫描线 0-6: 每隔 10 min 扫描一次)

Fig.4 Degradation of anthocyanins in citric acid-sodium citrate solution with pH value of 3.5 (scanning at specified time interval of 10 min)

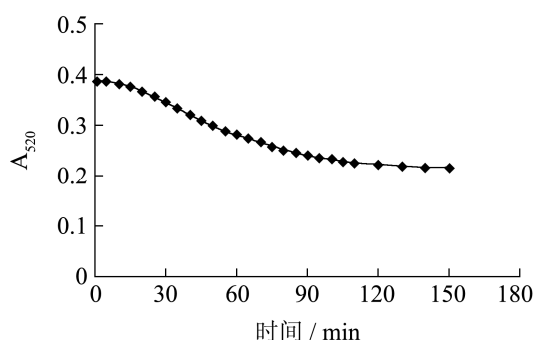


图5 花色苷的降解趋势图

Fig.5 Time course of the degradation of anthocyanins

对照实验中,花色苷单独与 PPO 反应或花色苷单独与表儿茶素反应时,花色苷在最大吸收波长 520 nm 处的吸收峰没有明显的减小,可知花色苷无降解。花色苷-PPO-表儿茶素之间的相互作用如图4和图5所示(表儿茶素浓度为 0.9 mmol/L)。花色苷在最大吸收波长 520 nm 处的吸收峰随着作用时间的延长逐渐变小,最后消失。表明花色苷在表儿茶素内源酚参与反应下被 PPO 催化降解;在加入 PPO 后的 10 min 内,花色苷降解曲线趋于平缓,说明反应进度缓慢,在 10~55 min 内花色苷降解曲线近似为一条直线($R^2=0.9964$),说明在此段时间内,花色苷迅速地降解,可以以该直线部分斜率的绝对值表示花色苷降解速率;其反应原理可能为: PPO 先与表儿茶素发生氧化还原反应,随着大量表儿茶素氧化产物生成,其氧化产物再与花色

苷作用,使花色苷降解。55~150 min 内,花色苷降解曲线又趋于平缓,是由于花色苷浓度减少,反应物分子间碰撞机率减少,降解速率逐渐减小。实验还得出在相同情况下,表儿茶素在花色苷的存在下,其酶促氧化速率明显降低,又如图4发生蓝移现象,可推断在反应中有新的物质生成影响反应速率,尚待进一步研究。

2.2.1 表儿茶素浓度对花色苷降解速率的影响

在反应体系(3 mL)中花色苷浓度和酶浓度分别为 0.06 mmol/L 和 0.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

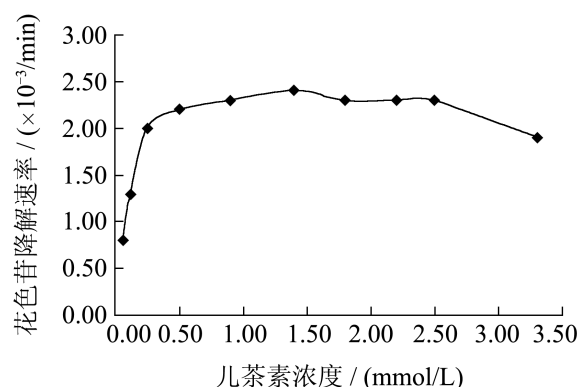


图6 表儿茶素浓度对花色苷降解速率的影响

Fig.6 Effect of (-)-epicatechin concentration on the degradation of anthocyanins

表儿茶素浓度对花色苷降解速率的影响见图6。以花色苷降解趋势曲线中直线部分斜率的绝对值来表示的花色苷降解速率。在表儿茶素浓度较低时,随表儿茶素浓度增加,花色苷降解速率显著增加;当表儿茶素浓度在 0.45~2.25 mmol/L 范围内,花色苷降解速率增加缓慢,表明在此浓度范围内,表儿茶素浓度对花色苷降解速率影响较小;但当表儿茶素浓度大于 2.25 mmol/L 时,随着表儿茶素浓度的增加,花色苷降解速率减小。由此推测,在加酶量一定的情况下,当表儿茶素增加到一定浓度后,酶被消耗较多,这时表儿茶素的氧化速度不再随其浓度的增加而增加。而花色苷的降解与表儿茶素氧化产物的生成速度有关,所以花色苷的降解也表现出与表儿茶素氧化类似的变化趋势。

2.2.2 PPO 浓度对花色苷降解速率的影响

在反应体系(3 mL)中花色苷浓度和表儿茶素浓度分别为 0.06 mmol/L 和 0.5 mmol/L。

如图7所示,随酶浓度增加,花色苷降解速率显著增加,花色苷降解速率与 PPO 浓度呈良好的线性关系, $R^2=0.9911$ 。由此推测,随着酶量的逐渐增加,生成的表儿茶素氧化产物浓度增加,越来越多的氧化产

物与花色苷作用, 加快花色苷降解速率。

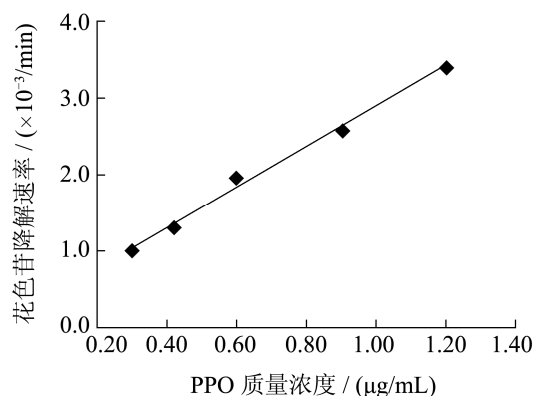


图7 PPO 浓度对花色苷降解速率的影响

Fig.7 Effect of PPO concentration on the degradation of anthocyanins

2.2.3 花色苷浓度对花色苷降解速率的影响

在反应体系 (3 mL) 中表儿茶素浓度和酶浓度分别为 0.5 mmol/L 和 0.6 μg/mL。

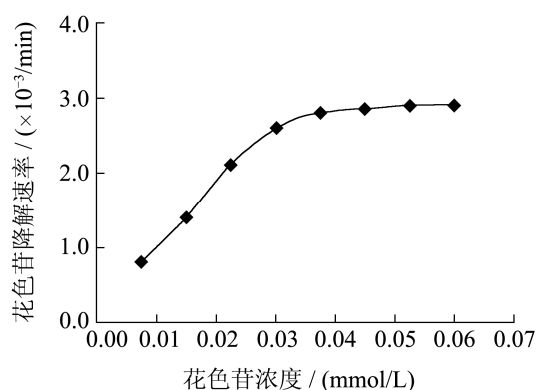


图8 花色苷浓度对花色苷降解速率的影响

Fig.8 Effect of anthocyanins concentration on its degradation

如图8所示, 在花色苷浓度较低时, 随花色苷浓度增加, 花色苷降解速率显著增加; 当花色苷浓度超过 0.035 mmol/L 以后, 继续增加花色苷浓度, 花色苷降解速率增加趋于平缓, 这可能是在花色苷浓度较低时, 表儿茶素氧化产物过量, 随着花色苷浓度的增加, 越来越多的氧化产物都与其结合, 直至达到最大饱和度。

3 结论

采用丙酮浸提法从新鲜荔枝果皮中提取花色苷, 粗提液经大孔树脂 XAD-16 柱层析、乙酸乙酯萃取、

TSK 柱层析、旋转蒸发浓缩后可得较高纯度的花色苷浓缩液。

在表儿茶素参与下, 花色苷的酶促降解机理为: PPO 先与表儿茶素发生氧化还原反应, 随着大量表儿茶素氧化产物生成, 其氧化产物再与花色苷作用, 使花色苷降解。花色苷降解速率受各反应物浓度的影响较大, 其中表儿茶素和花色苷在低浓度范围内与花色苷降解速率呈正相关关系, 在高浓度时则降解速率趋于平缓; 而 PPO 在整个观测浓度范围内与花色苷降解速率是呈正相线性关系。

参考文献

- [1] Zhang ZQ, Pang XQ, Ji ZL, et al. Role of Anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. Food Chemistry, 2001, 75: 217-221
- [2] Akamine, E. K. Preventing the darkening of fresh lychees prepared for transport. Hawaii, Agric. Exp. Stn., Tech. Prog. Rep. 1960, 127, 3-17
- [3] Huang, P. Y., Hart, H., Lee, H., Wicker, L. Enzymatic and color changes during postharvest storage of lychee fruit. J. Food Sci. 1990, 55, 1762-1763
- [4] Lee, H. S., Wicker, L. Anthocyanin pigments in the skin of lychee fruit. J. Food Sci. 1991, 56, 466-483
- [5] Jiang YM. Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. the Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 305-310
- [6] Wesche-Ebeling, P., Montgomery, M. W. Strawberry polyphenoloxidase: Its role in anthocyanin degradation. J. Food Sci. 1990, 55, 731-734
- [7] Sami, P., Fulcrand, H., Souillol, V., et al. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. J. Sci. Food Agric. 1995, 69, 385-391
- [8] Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., Metche, M. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Role of blueberry polyphenol oxidase, chlorogenic acid and anthocyanins. J. Sci. Food Agric. 1997, 74, 31-34
- [9] Kader, F., Irmouli, M., Nicolas, J. P., Metche, M. Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone. Food Chem. 2001, 75, 139-144