

酶法催化柚皮苷制备根皮素及其抗氧化活性分析

李慧灵¹, 周金林¹, 卢宇靖², 陈宏基¹, 叶德晓¹, 林育成¹

(1. 梅州金柚康健康科技有限公司, 广东梅州 514000) (2. 广东工业大学生物医药学院, 广东广州 510006)

摘要: 本文阐述一种高效、环保制备高价值天然抗氧化剂根皮素的方法。以天然的柑橘提取物柚皮苷为原料, 经一锅法加氢反应制得柚苷二氢查尔酮, 再以 α -鼠李糖苷酶 (α -rhamnosidase) 和纤维素酶 (cellulase) 高效催化水解而制得根皮素。采用单因素和正交实验对 α -鼠李糖苷酶和纤维素酶酶解反应的 pH、温度、酶与底物比进行优化, 同时对根皮素、三叶苷、柚苷二氢查尔酮、柚苷的抗氧化性进行了研究, 结果表明: α -鼠李糖苷酶 (α -rhamnosidase) 酶解最佳工艺为温度 60 °C、pH 4、酶与底物比为 0.6:1; 纤维素酶 (cellulase) 最佳工艺为温度 45 °C、pH 5.5、酶与底物比为 0.3:1。在此工艺下根皮素的转化率为 96.10%, 比原工艺提高了 10.53%。抗氧化性研究结果为: 清除 DPPH 自由基能力根皮素 (0.18 ± 1.45) > 三叶苷 (0.3 ± 1.63) > 柚苷二氢查尔酮 (0.95 ± 1.24) > 柚苷 (8 ± 1.97), 还原铁离子能力为根皮素 (7.1 ± 0.68) > 三叶苷 (2.51 ± 0.75) > 柚苷二氢查尔酮 (2.05 ± 0.58) > 柚苷 (0.11 ± 0.92)。本方法条件温和, 周期短且转化率高, 易于放大生产。抗氧化性结果表明根皮素具有较高的抗氧化性。这对根皮素的放大生产及应用具有重大意义。

关键词: 柚皮苷; 酶法; 根皮素; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2020)12-69-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0609

Enzymatic Preparation of Phloretin from Naringin and Their Antioxidant Activity Analysis

LI Hui-ling¹, ZHOU Jin-lin¹, LU Yu-jing², CHEN Hong-ji¹, YE De-xiao¹, LIN Yu-cheng¹

(1. Meizhou Golden Pomelo Technology Co. Ltd., Meizhou 514000, China)

(2. School of Biomedical and Pharmaceutical Science Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A highly efficient and environmentally friendly method for the preparation of high-value natural antioxidant phloretin was described in this work. Naringin dihydrochalcone was prepared from naringin which is a kind of natural citrus extract by one pot hydrogenation, and then was hydrolyzed by α -rhamnosidase and cellulase to product phloretin. The process conditions including pH, temperature and substrate to enzyme ratio of α -rhamnosidase and cellulase were optimized by single factor and orthogonal experiments. The antioxidant activity of phloretin, trilobin, naringin dihydrochalcone and naringin were also studied. The results showed that the optimum conditions of α -rhamnosidase were as follow: temperature of 60 °C, pH of 4.0, and the substrate to enzyme ratio of 0.6:1. The optimum conditions of cellulase were as follow: temperature of 45 °C, pH of 5.5, and the substrate to enzyme ratio of 0.3:1. Under these optimum conditions, the conversion of phloretin was 96.1%, which increased by 10.53% compared to the original method. The orders of antioxidant activity were as follows: the DPPH free radical scavenging capacity of phloretin (0.18 ± 1.45) > trilobin (0.3 ± 1.63) > naringin dihydrochalcone (0.95 ± 1.24) > naringin (8 ± 1.97), the reduced iron ion capacity of phloretin (7.1 ± 0.68) > trilobin (2.51 ± 0.75) > naringin dihydrochalcone (2.05 ± 0.58) > naringin (0.11 ± 0.92). The new preparation method of phloretin was mild, short-cycle, high-conversion and was easy to scale up. Phloretin produced by this method had a good antioxidant activity. This work will be helpful to the enlarge production and application of phloretin.

Key words: naringin; enzymatic; phloretin; antioxidant activity

引文格式:

李慧灵, 周金林, 卢宇靖, 等. 酶法催化柚皮苷制备根皮素及其抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 69-76

LI Hui-ling, ZHOU Jin-lin, LU Yu-jing, et al. Enzymatic preparation of phloretin from naringin and their antioxidant activity analysis [J].

Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 69-76

收稿日期: 2020-07-01

基金项目: 广东省“扬帆计划”引进创新创业团队专项资助项目 (2015YT02S006)

作者简介: 李慧灵 (1989-), 女, 硕士, 研究方向: 生物酶的发酵及应用

通讯作者: 周金林 (1977-), 男, 博士, 研究方向: 生物医药、中草药和农产品精深加工、生物合成与酶催化

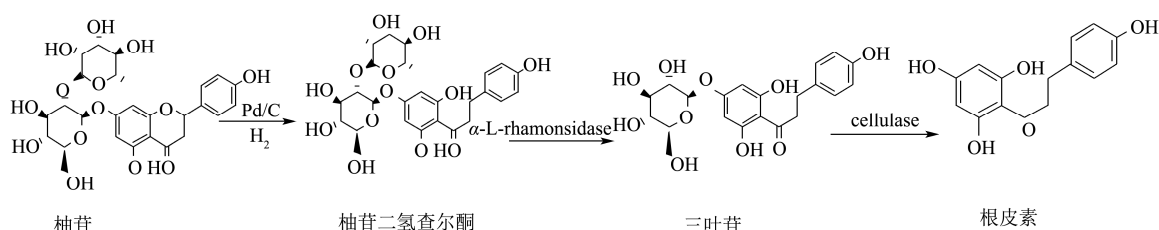


图1 两步酶法催化柚苷制备根皮素过程

Fig.1 The preparation of phloretin from naringin through two steps enzymatic catalysis synthesis process

根皮素是一种天然的二氢查尔酮类化合物, 主要存在于蔬菜、苹果、梨等水果中, 具有抗氧化^[1]、抑菌^[2-3]、抑制肿瘤细胞增殖^[4-6]、抗炎^[7]、抑制酪氨酸酶活性^[8]等作用, 因此在食品、药品、化妆品等领域具有较大的应用前景^[9-11]。目前根皮素的来源主要有(1)天然提取, 主要从苹果皮或梨中提取, 但由于这些水果中含量少, 提取难, 价格贵, 限制了根皮素的生产与应用;(2)通过天然原料根皮苷经酶法或者酸法去除根皮苷上的葡萄糖制得, 但根皮苷原料同样受到提取及原料的限制, 不能使根皮素广泛生产;(3)来源于柚皮苷, 柚皮苷来源丰富, 广泛存在于芸香科植物葡萄柚、橘、橙的果皮与果肉中^[12-14], 其含量也相对较高, 且市场价格远远低于根皮苷。以它为原料制备根皮素, 成本较低, 发展潜力巨大。目前利用柚皮苷制备根皮素的研究较少, 李秉擎^[15]等人利用柚皮苷制备根皮素, 其研究方法是将柚皮苷进行氢化得柚皮苷二氢查尔酮, 经 8% 的盐酸在 85~95 °C 下酸解制得根皮素, 此法利用酸法制备根皮素, 其工艺并未完全实现工业化, 并且酸法反应剧烈, 会造成很大的环境问题。利用酶法从柚皮苷制备根皮素尚未见到报道。研究证明, 类黄酮化合物具有消除自由基和抗氧化的作用, 类黄酮化合物在植物中的存在形式一般为苷元或者糖苷的形式, 根皮素为二氢查尔酮类, 是类黄酮的一种^[16,17], 从结构上看根皮素与天然甜味剂三叶苷相差一个葡萄糖苷, 三叶苷与柚苷二氢查尔酮相差一个鼠李糖苷, 利用柚苷二氢查尔酮作为原料, 水解掉鼠李糖和葡萄糖就可以得到根皮素, 本文用的鼠李糖苷酶属于糖苷水解酶类, 能够专一、高效水解许多天然糖苷化合物如橙皮苷、芦丁、柚皮苷和槲皮苷等末端的 α -L-鼠李糖基。所用的纤维素酶是一类能够将纤维素降解成葡萄糖的多组分酶系的总称, 可以把纤维素分解成寡糖和纤维二糖, 最后水解成葡萄糖, 本研究利用其水解葡萄糖的性质来水解三叶苷分子结构上的葡萄糖苷来制备根皮素, 其制备过程如图 1 所示。众所周知, 根皮素作为抗氧化剂广泛应用于食品及化妆品中, 其抗氧化性的研究受到很多学者的青睐, 但其上游产品三叶苷及原料二氢查尔酮和柚苷与根皮素抗氧化性的

综合研究尚未报道。本文利用两步酶法制得根皮素, 该方法反应温和, 低温条件下就可以反应, 操作简单, 高效环保, 为柚皮苷制备根皮素的工业化生产奠定基础。同时对其原料及中间产物与根皮素做抗氧化性对比研究, 比较几种类黄酮化合物的抗氧化性的大小, 为其应用和研究做参考。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种, 含有重组质粒 *pPIC9K-rha* 的毕赤酵母 JJK-01, 本公司实验室保存。柚苷 (98%, HPLC), 柚苷二氢查耳酮 (99%, HPLC), 根皮素 (99%, HPLC) 均由本公司提供, P-硝基苯基 α -L-鼠李糖苷 (98%, HPLC), 对硝基苯酚 (97%, HPLC) 购自 sigma 公司。纤维素酶 (酶活 8500 U/mL), 购自山东蔚蓝生物技术有限公司, 分析纯柠檬酸 (AR), 分析纯十二水合磷酸氢二钠 (AR), 均购自西陇科学。

YPD 培养基配方: 1%酵母膏、2%蛋白胨、2%葡萄糖。

发酵培养基配方: CaSO_4 0.93 g/L、 K_2SO_4 18.2 g/L、 KOH 4.13 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.9 g/L、甘油 40 g/L、酵母膏 5 g/L、蛋白胨 5 g/L、微量元素 PTM 14.4 ml/L。

1.2 设备

50 升发酵设备, 上海保兴生物设备工程有限公司; 安捷伦 1100 高效液相色谱仪, 安捷伦科技(中国)有限公司; UV-1100 分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; SpectraMax Paradigm 酶标仪, Molecular Device 公司; SHZ-B 水浴恒温振荡器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; FE 20 pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; FA 1004 电子分析天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 α -鼠李糖苷酶的制备

将保存的 JJK-01 菌种在 YPD 液体培养基中进行活化;活化后的菌液按 5% 的接种量再转接至 YPD 液体培养基中继续培养,当 $OD_{600} \geq 3.0$ 时,按照 5% 的接种量接种至 50 L 的发酵罐中,在 pH 5, 温度 30 °C、400 r/min, 通气量 3.5 mL/min 条件下进行 α -L-鼠李糖苷酶的发酵生产;发酵液每隔 12 h 取样 1 次, pNP-Rha 比色测定法进行酶活检测^[18]。当酶活不再增长时下罐离心得酶液,所得 α -鼠李糖苷酶的酶活为 5000 U/mL。

1.3.2 柚苷的氢化反应

柚苷溶于氢氧化钠溶液中,使用催化剂 Pd/C 处理,在 0.1 MPa 的压力下与 H_2 氢化 15 h,过滤后用盐酸调 pH 至 6。冷却至室温以后,干燥得柚苷二氢查耳酮^[19]。

1.3.3 α -鼠李糖苷酶和纤维素酶催化单因素实验

称取一定量的柚苷二氢查耳酮于三角瓶中,按底物浓度加入适量由柠檬酸和十二水合磷酸氢二钠配制的缓冲液,调节至适合 pH 值, α -鼠李糖苷酶在酶底比 0.2:1~1:1, pH 3.5~6, 温度 45~70 °C 条件下酶解 5 h; 纤维素酶在酶底物比 0.1:1~0.5:1, pH 3.5~6.0, 温度 40~60 °C 条件下酶解 3 h, 分别研究 pH 值、酶底比和反应温度的影响;酶解步骤为在一定条件下向含有柚苷二氢查耳酮底物的缓冲液中加入 α -鼠李糖苷酶进行酶解后,沸水浴灭除酶活,调节温度、pH 值后,再加入纤维素酶继续酶解,测定根皮素的转化率。同时以原始工艺(鼠李糖苷酶:温度为 50 °C, pH 4, 酶与底物比为 0.4:1; 纤维素酶:温度 40 °C, pH 5, 酶与底物比为 0.3:1)做空白对照。

1.3.4 α -鼠李糖苷酶和纤维素酶催化正交实验

表 1 鼠李糖苷酶因素水平表

Table 1 The table of α -L rhamnosidase of factors and levels

水平	因素		
	温度/°C	pH	m(底物):m(酶)
1	55	3.5	0.4:1
2	60	4	0.6:1
3	65	4.5	0.8:1

表 2 纤维素酶因素水平表

Table 2 The table of cellulase of factors and levels

水平	因素		
	温度/°C	pH	m(底物):m(酶)
1	45	4.5	0.25:1
2	50	5	0.3:1
3	55	5.5	0.4:1

在单因素试验结果的基础上,以两种酶对各自底物的转化率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计 3 因素 3

水平的正交实验。每个实验做 3 个平行,因素水平表见表 1 和表 2。

1.3.5 在最佳工艺下中试规模验证试验

在 100 L 规模下进行 3 批酶转化实验,以验证最佳工艺。

1.3.6 检测方法

样品处理:取一定体积的酶反应液,利用 DMSO 溶解至一定体积,0.45 μ m 的微孔滤膜过滤。采用 HPLC 色谱图面积归一法跟踪根皮素的转化率。

液相条件:色谱柱:XBridge C18 液相色谱柱(10 μ m $\times$ 250 mm $\times$ 4.6 mm);流动相:乙腈:0.5%乙酸(34:66, V/V) 流速:1 mL/min;波长 282 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μ L。

1.3.7 柚苷、柚苷二氢查耳酮、根皮素抗氧化性研究

采用常规的抗氧化活性的评价方法清除自由基的 DPPH 法,还原铁离子抗氧化能力的 FRAP 法。

1.3.7.1 清除自由基的 DPPH 法^[20]

将柚苷二氢查耳酮、三叶苷、柚苷、根皮素用乙醇分别配制成 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1 mmol/L 浓度的系列溶液,对照物采用乙醇为溶剂。用乙醇配制 0.1 mmol/L DPPH 作储备液,置于 4 °C 冰箱保存。将 0.1 mmol/L 的 DPPH 溶液用乙醇稀释至 60 μ mol/L 作为工作溶液。分别取以上系列溶液或乙醇 50 μ L,与 650 μ L DPPH 混合均匀,分别得到系列待测液和空白溶液,以乙醇溶剂作参比。将混合液在波长 515 nm 下测其吸光度,作为初始吸光度值 A_0 。将系列待测液在室温下置于暗处放置 12 h,分别测定吸光度值为 A_1 。平行测定三次。按照公式 1 计算^[21]。

$$\text{DPPH清除率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.7.2 FRAP 法测定还原铁离子能力

将柚苷二氢查耳酮、三叶苷、柚苷、根皮素用乙醇分别配制成 0.025、0.050、0.075、0.100、0.125、0.150、0.175、0.200 mmol/L 浓度的系列溶液,对照物采用乙醇为溶剂。

FRAP 试剂配制:以 pH 3.6 醋酸-醋酸钠缓冲液(1.6 g 醋酸钠和 16 mL 冰醋酸稀释至 1 L),10 mmol/L TPT(三吡啶三嗪)的 40 mmol/L 的 HCl 溶液和 20 mmol/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 按照体积比 10:1:1 混合。分别取以上系列溶液或乙醇 50 μ L,与 650 μ L FRAP 试剂混合均匀,反应一段时间后在 593 nm 下测吸光度(以 650 μ L FRAP 试剂与 50 μ L 乙醇作为参比)。将 0.2 mL 0.05~2 mmol/L $FeSO_4$ 的水溶液测标准曲线。样品的抗氧化活性(FRAP 值)用达到同样吸光度值所需的

FeSO_4 的量 (mmol/L) 表示。整个反应于 pH=3.6, 37 °C 条件下进行。

1.3.8 数据处理

使用 Origin 8.1 和 Spss 16.0 进行数据处理。

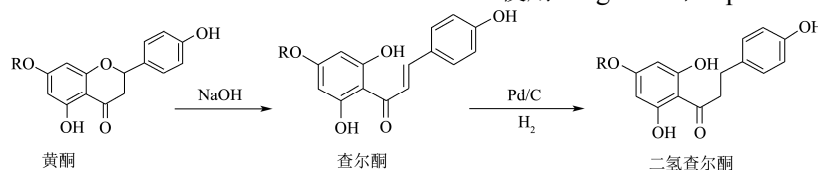


图2 黄酮—锅合成双反应转化为二氢查尔酮

Fig.2 The preparation of dihydrochalcone by converting flavanone through two reactions in one-pot synthesis

2 结果与讨论

2.1 柚苷的氢化作用

采用一锅法从柚苷制备柚苷二氢查耳酮的过程如图2所示。在常压氢气(H_2)和4% (m/m) Pd/c 催化剂的催化15 h, 柚皮苷二氢查尔酮的收率为99%。

2.2 pH 对鼠李糖苷酶和纤维素酶催化反应的影响

影响

考察反应介质 pH 3.5~6.0 范围内 pH 对鼠李糖苷酶和纤维素酶催化效果的影响, 结果见图3。

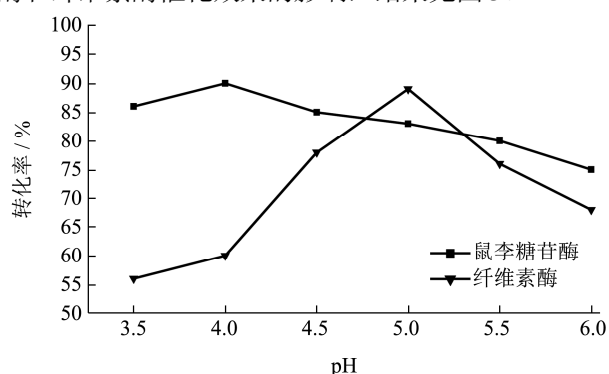


图3 pH 对 α -L 鼠李糖苷酶和纤维素酶催化反应的影响

Fig.3 Effect of pH on the catalytic reaction of α -L rhamnosidase and cellulase

从图3可以看出在 pH 3.5~6 范围内, 鼠李糖苷酶催化反应产率都在75%以上, 说明鼠李糖苷酶在弱酸到中性范围内具有良好的催化活性。在 pH 4.0 时达到最佳催化效果, 从 pH 4.0 开始催化效果随 pH 的升高而降低。纤维素酶的转化反应率在 pH 3.5~6 范围内变化较大, 在 pH 5 时达到最大值90%左右。在 pH 5 之前, 转化率随 pH 的升高而升高。在 pH 5 之后, 转化率随 pH 的升高而降低。缓冲液的 pH 会影响到酶的活性, 过酸或过碱的缓冲液都会使酶的活性下降, 因此选择最适的 pH 值对酶催化反应尤其重要, 在最优 pH 条件下, 不仅可以节省酶的添加量, 还可以达到较高的转化率。综上所述鼠李糖苷酶我们选择 pH 3.5、pH

4、pH 4.5, 纤维素酶选择 pH 4.5、pH 5、pH 5.5 来做正交实验

2.3 温度对鼠李糖苷酶和纤维素酶催化反应的影响

以鼠李糖苷酶和纤维素酶催化水解柚苷二氢查耳酮制备根皮素为反应模型, 考察了 40~70 °C 范围的反应温度对鼠李糖苷酶和纤维素酶的催化反应的影响, 结果如图4。

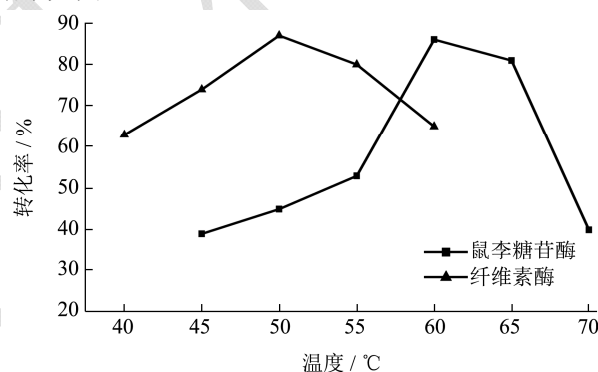


图4 温度对 α -L 鼠李糖苷酶和纤维素酶催化反应的影响

Fig.4 Effect of temperature on the catalytic reaction of α -L rhamnosidase and cellulase

从图4中可以看出, 从 45 °C 升高至 60 °C, 鼠李糖苷酶的催化效果提高了2倍, 并在 60 °C 达到最佳催化效果。反应温度从 65 °C 升高至 70 °C, 酶的催化效果迅速下降到40%以下。从 40 °C 到 50 °C, 纤维素酶随温度的升高, 转化率逐渐升高, 在 50 °C 时达到最高, 50 °C 以后随温度的升高, 转化率逐渐降低。这是因为, 在一定温度范围内, 酶催化反应的速率随温度的升高而升高, 超过一定范围, 过高的温度容易使酶的反应基团和疏水区域暴露, 促使蛋白质聚合导致酶失活。因此最适温度的条件对酶催化效果的影响非常重要。选择合适的温度有助于提高底物的转化率。根据上述结果针对酶解温度鼠李糖苷酶选择 55 °C、60 °C、65 °C, 纤维素酶选择 45 °C、50 °C、55 °C 做正交实验。

2.4 酶底比对鼠李糖苷酶和纤维素酶催化反

的影响

由于本实验的底物柚苷二氢查尔酮的水溶性不高,故采用反应温度下的饱和浓度的底物进行。将底物固定为饱和浓度,增大酶的用量,以底物与酶的质量比作为变量因素,考察鼠李糖苷酶和纤维素酶的用量对催化反应的影响,结果见图5。

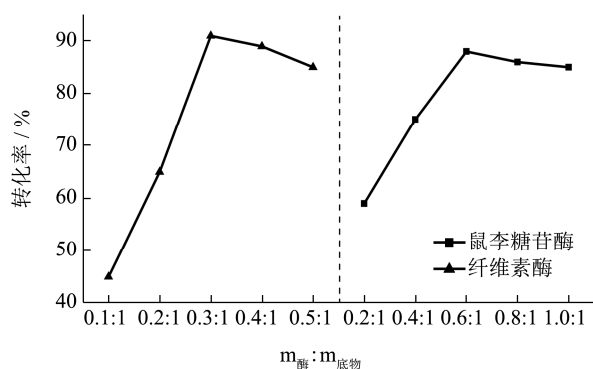


图5 酶与底物比对α酶与鼠李糖苷酶和纤维素酶催化反应的影响

Fig.5 Effect of the substrate and enzyme ratio on the catalytic reaction of α -L rhamnosidase and cellulase

从图5可以看出,在酶反应体系中,固定底物为饱和浓度,鼠李糖苷酶与底物的质量比在0.2:1~0.6:1时,纤维素酶与底物的质量比在0.1:1~0.3:1底物转化率与酶的浓度成正比。当酶超过0.6:1和0.3:1时,底物浓度已不足使酶达到饱和,再继续增加酶的浓度反应速度不再成正比的增加。因此两种酶与底物最适的酶底比分别为0.6:1和0.3:1,采用最适的酶底比,既能有效的达到较高的转化率,又能节省酶的资源。

2.5 正交实验结果

2.5.1 鼠李糖苷酶催化正交试验结果

在鼠李糖苷酶单因素试验结果的基础上,按照L₉(3⁴)正交表设计正交实验,鼠李糖苷酶催化反应实验极差分析和方差分析结果如表3和表4所示。

从表3可以看出不同的因素对鼠李糖苷酶催化反应的影响不同,各因素对鼠李糖苷酶水解影响大小从大到小排列顺序为A(温度)>B(pH)>C(酶与底物比),鼠李糖苷酶催化最佳的酶解工艺条件为A₂B₂C₂,即温度60℃、pH4、酶与底物比为0.6:1。从表4可以看出温度的P值<0.05, pH和酶与底物比这两个因素的p值>0.05,说明温度对鼠李糖苷酶水解具有显著性的影响, pH和酶与底物比这两个因素对鼠李糖苷酶水解无显著性影响。

表3 正交实验条件下各转化率及极差分析

Table 3 Conversion rates under orthogonal experimental conditions and the range analysis

实验号	A	B	C	转化率/%
	温度/℃	pH	酶与底物比	
1	1(55)	1(3.5)	1(0.4:1)	82.62
2	1	2(4)	2(0.6:1)	85.71
3	1	3(4.5)	3(0.8:1)	86.33
4	2(60)	1	3	88.53
5	2	2	1	95.40
6	2	3	2	91.28
7	3(65)	1	2	83.52
8	3	2	3	80.15
9	3	3	1	79.80
K ₁	84.81	84.82	85.92	A>B>C
K ₂	91.72	86.84	86.84	
K ₃	81.11	85.70	84.93	
R	10.61	2.02	1.91	
最优水平	A ₂ B ₂ C ₂			

表4 鼠李糖苷酶正交实验方差分析

Table 4 The variance analysis of orthogonal experiment on rhamnosidase

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
温度	527.590	2	263.795	59.055	0.000**
pH	18.682	2	9.341	2.091	0.150
酶与底物比	8.759	2	4.380	0.980	0.392
误差	89.339	20	4.467		
总和	639.465	26			

2.5.2 纤维素酶正交试验结果

在纤维素酶催化反应单因素试验结果的基础上,按照L₉(3⁴)正交表设计正交实验,纤维素酶催化反应实验的极差分析和方差分析结果如表5和表6所示。

从表5可以看出不同因素对纤维素酶催化反应的影响不同,各因素对纤维素酶水解影响大小从大到小排列顺序为D(温度)>F(酶与底物比)>E(pH),纤维素酶催化最佳的酶解工艺条件为D1E3F2,即温度45℃、pH5.5、酶与底物比为0.3:1。从表6可以看出三个因素的P值<0.05说明温度、pH和酶与底物对鼠李糖苷酶水解均具有显著性的影响。

综合以上结果可知,两步酶法催化柚皮苷二氢查尔酮最佳的工艺条件是鼠李糖苷酶的条件为温度为60℃、pH4、酶与底物比为0.6:1;纤维素酶的条件为温度45℃、pH5.5、酶与底物比为0.3:1。

表 5 正交实验条件下各转化率及极差分析

Table 5 Conversion rates under orthogonal experimental conditions and the range analysis.

实验号	D	E	F	转化率/%
	温度/℃	pH	酶与底物比	
1	1(45)	1(4)	1(0.25:1)	88.41
2	1	2(4.5)	2(0.3:1)	94.52
3	1	3(5.5)	3(0.4:1)	93.30
4	2(50)	1	3	90.53
5	2	2	1	83.42
6	2	3	2	92.36
7	3(55)	1	2	85.58
8	3	2	3	81.19
9	3	3	1	83.44
K ₁	92.11	88.13	85.17	D>F>E
K ₂	88.73	86.30	90.82	
K ₃	83.30	89.61	88.37	
R	8.81	3.31	5.65	
最优水平			D ₁ E ₃ F ₂	

表 6 纤维素酶正交实验方差分析

Table 6 The variance analysis of orthogonal experiment on cellulase

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
温度	359.218	2	179.609	101.040	0.000**
pH	56.072	2	28.036	15.772	0.000**
酶与底物比	140.539	2	70.270	39.530	0.000**
误差	35.552	20	1.778		
总和	591.381	26			

2.5.3 最佳工艺验证

根据正交实验优化后的工艺条件进行三次平行实验,实验结果如表 7 所示。工艺优化后的转化率可达 96.11%,与优化前根皮素转化率 85.58%相比,提高了 10.53%左右。

表 7 最佳工艺表

Table 7 The best process table

工艺条件	实验序号	转化率/%
A ₂ B ₂ C ₂ D ₁ E ₃ F ₂	1	95.91
	2	96.30
	3	96.11
	平均值	96.11
	空白对照	85.58

2.6 柚苷、柚苷二氢查耳酮与根皮素抗氧化性

研究

2.6.1 清除 DPPH 自由基的能力

不同浓度的柚苷、柚苷二氢查耳酮、三叶苷、根皮素清除 DPPH·的能力结果如图 6, IC₅₀ 的值如表 6 所示。

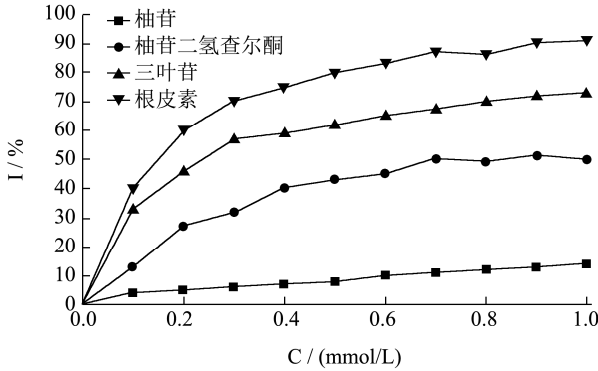


图 6 不同浓度的柚苷、柚苷二氢查耳酮、三叶苷、根皮素清除 DPPH· 的能力

Fig.6 Capability determination for clear DPPH· from different concentrations of naringin, naringin dihydrochalcone, trilobatin and phloretin

从图 6 可以看出随着四种物质浓度的增加,其清除 DPPH 的能力逐渐增强,根皮素清除 DPPH 的能力明显高于三叶苷、柚苷二氢查耳酮和柚苷,结合表 4 中 IC₅₀ 的值, IC₅₀ 是指被对 DPPH 自由基清除率达到 50%时所需抗氧剂的浓度,该数值越低,抗氧化活性越高。从表 8 可以看出,根皮素清除 DPPH 能力是柚苷的 44 倍,是柚苷二氢查耳酮的 5.2 倍,是三叶苷的 1.6 倍。

表 8 四种类黄酮清除自由基 DPPH 的 IC₅₀ 值

Table 8 Clear DPPH IC₅₀ value of four flavonoids

样品	IC ₅₀ /(mmol/L)
柚苷	>8.00±1.97
柚苷二氢查耳酮	0.95±1.24
三叶苷	0.3±1.63
根皮素	0.18±1.45

2.6.2 还原铁离子能力(FRAP)

在还原铁离子的能力测定柚苷、柚苷二氢查耳酮、三叶苷、根皮素抗氧化能力的结果如图 7 和表 9 所示。

表 9 四种类黄酮的 FRAP 值

Table 9 Reduction iron capacity FRAP value of four flavonoids

样品	FRAP 值
根皮素	7.10±0.68
三叶苷	2.51±0.75
柚苷二氢查耳酮	2.05±0.58
柚苷	0.11±0.92

图 7 表明根皮素的还原铁离子的能力高于三叶苷、柚苷二氢查耳酮和柚苷。结合表 9 中的结果,FRAP

值越大,表明由抗氧化物质还原得到的 Fe^{2+} 越多,抗氧化活性越高。还原铁离子的能力根皮素>三叶苷>柚苷二氢查尔酮>柚苷,此结果和清除 DPPH 的方法中的结果一致。由图 6 和图 7 说明根皮素的抗氧化活性在四种类黄酮中是最高的。

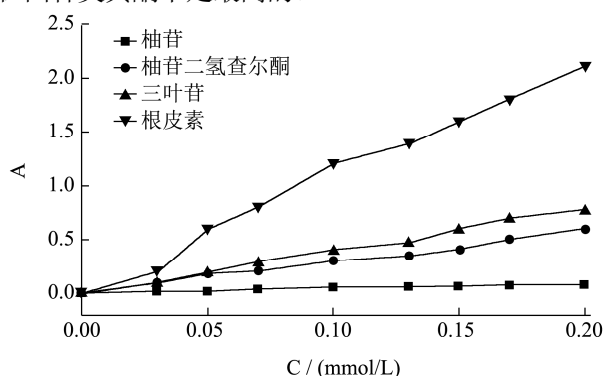


图 7 不同浓度的柚苷、柚苷二氢查尔酮、三叶苷、根皮素还原铁离子的能力

Fig.7 Ferric reducing antioxidant power from different concentrations of naringin, naringin dihydrochalcone, trilobatin and phloretin

3 结论

3.1 本实验利用两步酶法催化柚皮苷生产根皮素,经过单因素实验和正交实验得出最佳的酶解工艺,第一步酶解最佳工艺为温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4, 酶与底物比为 0.6:1, 第二步酶解最佳工艺为温度 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5.5, 酶与底物比为 0.3:1。在最佳工艺下根皮素的转化率达 96.11%, 与工艺优化前相比转化率提高了 10.53%。李秉擎^[15]等人利用柚皮苷酸法制备根皮素, 8%盐酸 $85\sim 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 3 h 得根皮素, 收率为 86%, 此方法, 反应剧烈, 用到大量的酸, 对环境造成污染, 不是理想的制备方法。与梅建凤等^[22]人用根皮苷作原料酶法生产根皮素的转化率 90.3%, 提高了 6%。汪瑾雨等^[23]以根皮苷为原料, 以酿酒酵母培养液催化根皮苷制备根皮素, 此方法条件温和, 但转化率为 70.12%, 反应时间较为久为 18 h。本研究同时对根皮素、中间产物三叶苷, 柚苷二氢查尔酮以及原料柚皮苷的抗氧化活性进行研究, 结果为四种物质清除 DPPH 自由基的能力根皮素>三叶苷>柚苷二氢查尔酮>柚苷, 还原铁离子能力为根皮素>三叶苷>柚苷二氢查尔酮>柚苷。综合以上结果在四种类黄酮中根皮素的抗氧化能力最强。Liu A 等^[24]人对类黄酮化合物苷元和糖苷抗氧化性研究, 研究表明水解掉末端的鼠李糖, 有利于抗氧化性的提高, 苷元的抗氧化性要比糖苷的抗氧化性强, 本文结果与之研究结论相符。

3.2 本研究阐述了一种以柑橘黄烷酮柚皮苷为原料, 通

过加氢反应后, 通过两步酶法来制备抗氧化活性较好的天然抗氧化剂根皮素的一种方法。本研究为根皮素的制备开辟了一种新的途径, 克服现有技术的缺点, 可为企业大幅度降低原料成本, 为工业化生产提供了可靠的依据。不足之处在于没有试验两种酶同时加入会对水解反应产生哪些影响, 两种酶是否有相互促进作用或者抑制作用需要深入研究。同时也可以筛选能够同时水解两种糖苷键的酶, 对工艺做进一步的优化。

参考文献

- [1] Limasset Benjamin, Le Doucen Christian, Dore, et al. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils: Multivariate analysis of structure-activity relationships (SAR) [J]. Elsevier, 1993, 46(7): 1557-1571
- [2] 张英. 根皮素抑菌活性及抑菌机理的研究[D]. 陕西师范大学, 2016
- [3] ZHANG Ying. Study on antibacterial activity and mechanism of phloretin [D]. Shanxi Normal University, 2016
- [4] Liu A, Huang B, Lei L, et al. Production of high antioxidant activity flavonoid monoglucosides from citrus flavanone with immobilised α -L-rhamnosidase in one step [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(10): 2854-2862
- [5] Hayday A C. $\gamma\delta$ Cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection [J]. Pubmed, 2000, 18: 975-1026
- [6] Chung Chun-Shiang, Watkins Lara, Funches Antonio, et al. Deficiency of $\gamma\delta$ T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis [J]. Pubmed, 2006, 291(5): 1338-1343
- [7] Andrew Elizabeth M, Newton Darren J, Dalton Jane E, et al. Delineation of the function of a major gamma delta T cell subset during infection [J]. Pubmed, 2005, 175(3): 1741-1750
- [8] Hisashi Matsuda, Toshio Morikawa, Shin Ando, et al. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action [J]. Elsevier Ltd, 2003, 11(9): 1995-2000
- [9] 王建新, 周忠, 王建国. 根皮素抑制酪氨酸酶活性研究[J]. 香料香精化妆品, 2002, 2: 4-5
- [10] WANG Jian-xin, ZHOU Zhong, WANG Jian-guo. Study on inhibitory activity of phlorizin against tyrosinase [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2002, 2: 4-5
- [11] 崔树梅, 曹孟岑, 杨雪晨, 等. 根皮素在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 2018, 48(2): 113-118

- CUI Shu-mei, CAO Meng-cen, YANG Xue-chen, et al. Applications of phloretin in cosmetics [J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2018, 48(2):113-118
- [10] Mariadoss, Vinyagam R, Rajamanickam V, et al. Pharmacological aspects and potential use of phloretin: a systemic review [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2019, 19: 1-8
- [11] 刘彩云,王卓娅,罗欣茹,等.根皮素抗氧化剂自微乳及微乳凝胶剂的研究[J].香料香精化妆品,2017,3: 49-53
LIU Cai-yun, WANG Zhuo-ya, LUO Xin-ru, et al. Study on self-microemulsion and microemulsion gel of antioxidant of phloretin [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2017, 3: 49-53
- [12] 贾冬英,姚开,谭敏,等.柚果皮中生理活性成分研究进展[J].食品与发酵工业,2001,27(11):74-78
JIA Dong-ying, YAO Kai, TAN Min, et al. Advance in research of physiologically-active compounds in pummelo peel [J]. Food and Fermentation Industries, 2001, 27(11): 74-78
- [13] 龚盛昭,陈秋基,曾海宇.柚皮中有效成分综合利用的途径[J].广州食品工业科技,2003,19(3): 81-82,96
GONG Sheng-zhao, CHEN Qiu-ji, ZENG Hai-yu. Comprehensive utilization of effective component in citrus grandis peel [J]. Guangzhou Food Science and Technology, 2003, 19(3): 81-82, 96
- [14] 刘英,但俊峰,吴丹,等.柚皮中柚皮苷的超声波辅助提取条件研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(4): 218-222
LIU Ying, DAN Jun-feng, WU Dan, et al. Study on the ultrasonic wave extracting conditions of naringin from pummelo peel [J]. Journal of Northwest A & F University (Nat. Sci. Ed.), 2008, 36(4): 218-222
- [15] 李秉攀.具有生物活性的天然产物根皮素的合成与纯化的相关研究[D].杭州:浙江大学,2012
LI Bing-bo. Studies on the synthesis and purification of one natural product: phloretin [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012
- [16] Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants [J]. Phytochemistry, 2010, 71(8-9):838-843
- [17] Michael Eichenberger Beata Joanna Lehka, Christophe Folly, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for de novo production of dihydrochalcones with known antioxidant, antidiabetic, and sweet tasting properties [J]. Metabolic Engineering, 2016, 39(2017): 80-89
- [18] 张振华,蔡同一,倪元颖,等. α -鼠李糖苷酶最佳测定条件的建立及酶学性质研究[J].食品工业科技,2002,23(2):15-17
ZHANG Zhen-hua, CAI Tong-yi, NI Yuan-ying, et al. Study on the optimum determination conditions and enzymatic properties of α -rhamnosidase [J]. Science and Technology of Food industry, 2002, 23(2):15-17
- [19] Lei J, Zhou L, Luo Y, et al. Effect of Pd/C on neohesperidin dihydrochalcones synthesis [J]. China Brewing, 2014, 33(8): 60 - 62
- [20] SHU Wen-xiu, WU Zu-fang, WENG Pei-fang, et al. Comparison of quality characteristics and antioxidant activity of the fruit juice of *Citrus paradisi* cv. Changshan huyou fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* [J]. Food Science, 2019, 40(2): 152-158
- [21] Krzystek J, Sienkiewicz A, Pardi L, et al. DPPH as a standard for high-field EPR [J]. Journal of Magnetic Resonance, 1997, 125(1): 207-211
- [22] 梅建凤,李靓,易喻,等.紫变青霉生物转化根皮苷制备根皮素的研究[J].浙江工业大学学报,2016,44(6):660-664
MENG Jian-feng, LI Liang, YI Yu, et al. Bioconversion of phlorizin to phloretin by a selected *Penicillium purpurescens* strain [J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2016, 44(6):660-664
- [23] 汪瑾雨,余海立,刘兰庆,等.根皮苷生物转化制备根皮素工艺优化研究[J].中国酿造,2018,37(2):148-152
WANG Jin-xu, YU Li-hai, LIU Lan-qing, Optimization of preparation process of phloretin by the biotransformation of phlorizin [J]. China Brewing, 2018, 37(2): 148-152
- [24] Liu A, Huang B, Lei L, et al. Production of high antioxidant activity flavonoid monoglucosides from citrus flavanone with immobilised α -L-rhamnosidase in one step [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019