

爱玉子瘦果果胶酯酶的抽提条件及活性测定研究

吴文珊^{1,2}, 谢清清³, 郑翠芳², 朱晓东², 林 玮², 黄美丽²

(1 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002; 2 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007; 3 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究了爱玉子果胶酯酶的优化提取方法, 并测定了不同条件下爱玉子果胶酯酶的活性及热稳定性。结果表明: 爱玉子果胶酯酶抽提液中 NaCl 的最佳浓度是 5%, 最佳抽提温度是 30℃, 最佳抽提时间是 24 h, 最佳保存时间 24 h; 酶活测定时作用液中 NaCl 最适浓度范围为 0.6%~1.0%, 作用液的最适 pH 为 7.0, 温度 30~50℃, 爱玉子果胶酯酶的热稳定性良好。

关键词: 爱玉子瘦果; 果胶酯酶活性; 抽提条件

中图分类号: TS 201.25

文献标识码: A

Extracting condition and the activity admeasurement for pectinesterase in achenes of *Ficus awkeotsang* Makino

WU Wen-shan^{1,2}, XIE Qing-qing³, ZHENG Cui-fang², ZHU Xiao-dong², LIN Wei², HUANG Mei-li²

(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China;

3. College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

Abstract: A method of extraction and assay for the pectinesterase were investigated and proposed as follows: the best concentration of NaCl in extracting mixture is 5%, the best extracting temperature is 30℃, the best extracting time is 24 hours, the best conservating time is 24 hours, the best concentration of NaCl in mixture is 0.6% to 1.0%, and maintain the pH on 7.0 Between 30–50℃, the pectinesterase in achenes of *Ficus awkeotsang* has a good thermal stability.

Key words: *Ficus awkeotsang* Makino achenes; pectinesterase activity; extracting condition

爱玉子 (*Ficus awkeotsang* Makino) 是桑科榕属的常绿大藤本植物, 在台湾、福建及浙江南部均有零星分布, 主要散生于天然林或人工林中以及林区附近的房前屋后等^[1]。民间自古就有采摘野生爱玉果实制作爱玉冻食用的习俗。爱玉冻是颇受人们喜爱的一种消暑解渴的半固体饮料, 而在爱玉冻凝胶过程中无须任何添加剂, 其中爱玉果胶酯酶起决定性作用, 在同等的果胶含量下, 果胶酯酶的活性越高, 爱玉子瘦果的制冻率就越高^[2], 因此人工栽培选种时果胶酯酶活性将作为品种筛选的重要指标。本研究探讨了爱玉果胶酯酶的抽提条件及其活性测定条件, 为深入探讨爱玉果胶酯酶理化特征以及爱玉果胶酯酶在发育过程中活性变化打下基础, 为爱玉子采前品质育种、采后果品的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试材料为 2005 年 9 月采自福建省福州市闽侯县边尾村人工栽培的爱玉子瘦果 5 kg, 40℃烘至恒重, 装入广口瓶存于 4℃冰箱。使用试剂: 溴百里香酚蓝 (BTB 指示剂)、3, 5-二硝基水杨酸 (DNS 试剂)、氢氧化钠、氯化钠、盐酸、柠檬酸、磷酸氢二钠 (以上所用试剂均购自北京化学试剂公司, AR)、果胶 (Sigma 公司产品, AR)、果胶解聚酶 (上海试剂二厂, AR)。

1.2 果胶酯酶 (PE) 活性测定原理与方法

爱玉子瘦果中的果胶酯酶用 NaCl 溶液抽提, 过滤得到 PE 的粗酶液, 酶液与基质果胶液均预先用 NaOH 溶液中和, 而将一定量的酶液加入充分

收稿日期: 2007-01-16 初稿; 2007-09-18 修改稿

作者简介: 吴文珊 (1966-), 女, 副教授, 从事生化与分子生物学研究 (E-mail: wuwenshan@126.com)。

基金项目: 福建省教育厅基金资助项目 (K04029), 福建省科技厅重点资助项目 (2007S0015)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

过量的基质液中, 使基质果胶中的部分甲酯基 (-COOCH₃) 受 PE 的催化作用被分解成羧基 (-COOH) 和甲醇 (CH₃OH), 这些羧基在溶液中解离产生氢离子 (H⁺), 随着 PE 的作用, 作用液会往酸性方向偏移。这时, 可随时滴加稀 NaOH 中和所产生的 H⁺, 并保持作用液的 pH 于一定的范围。由每分钟中和所需 NaOH 的量, 可计算出在一级反应的时间范围内, 每分钟由 PE 作用所产生的 H⁺ 量, 也就是每分钟 PE 可促进多少甲酯基水解^[3]。果胶酯酶活性 ($U \cdot mL^{-1} \cdot min^{-1}$) = $X \times N / (T \times V)$, 其中: X—0.01 mol · L⁻¹ NaOH 消耗量 (mL), T—作用时间 (min), V—所取酶液量 (mL), N—酶液稀释倍数。

酶活性的一级反应时间范围确定: 分别量取果胶酶液 5 mL、0.1% 果胶溶液 20 mL, 酶液和果胶液都必须滴加适量的 BTB 指示剂, 并用 0.01 mol · L⁻¹ NaOH 溶液调节 pH 至中性 (呈青绿色)。基质果胶液放置于水浴锅中保持在 30 °C, 倒入酶液, 令其作用并不断滴加 0.01 mol · L⁻¹ NaOH, 保持 pH 7.0~7.5 (用 pH 酸度计监控)。滴定 30 min, 每 2 min 读数 1 次, 记录 NaOH 溶液消耗量 (V)。试验重复 3 次, 取平均值, 做出 30 min 内 NaOH 溶液消耗量和时间的关系曲线图 (图 1)。结果表明: 0~10 min NaOH 溶液消耗的体积与时间成线性关系 ($r = 0.9929$), 因此确定其为爱玉子果胶酯酶活性测定的一级反应时间范围。测定酶活性时取 10 min 为反应时间, 读取

NaOH 溶液消耗量。

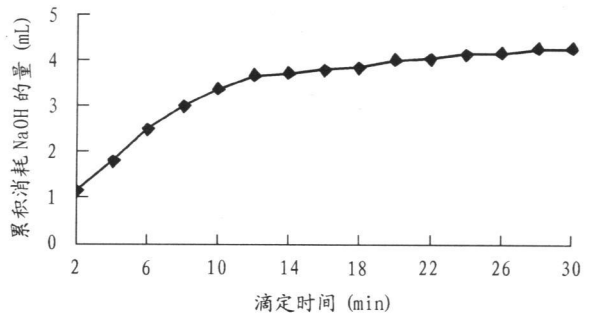


图 1 NaOH 消耗量与滴定时间的关系

Fig 1 Correlation between consumption of NaOH and titration time

1.3 爱玉子果胶酯酶优化提取条件测定

1.3.1 爱玉子果胶酯酶酶液抽提条件对其活性测定的影响 通过预试验确立果胶酯酶酶液的制备流程, 即称取爱玉子样品, 按 1:20 比例加入一定浓度的 NaCl 溶液, 在一定温度水浴锅内搅拌 15 min, 浸渍抽提一定时间, 抽滤后装入具塞试管中, 于 5 °C 冰箱内保存。取上述酶液 5 mL, 按 1.2 方法进行滴定, 并计算各温度下所抽提酶液的酶活, 以酶活最高者为 100%, 其他条件下所得酶活以此为标准计算出酶活比率。为了研究酶液的制备过程中抽提温度、抽提时间、抽提液中 NaCl 浓度以及低温保存对其活性测定的影响, 按表 1 方案设计试验。

表 1 爱玉子果胶酯酶酶液抽提条件对其活性测定的影响

Table 1 Effect extracting condition for pectinesterase on activity admeasurement

试验内容	NaCl (%)	抽提温度 (°C)	抽提时间 (h)	5 °C 保存时间 (h)
1. 抽提温度与酶活性的关系	5	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40	24	24
2. 抽提时间与酶活性的关系	5	30	4, 8, 16, 24, 36, 48	24
3. 抽提液 NaCl 浓度与酶活性关系	3, 4, 5, 6, 7	30	24	24
4. 酶液保存时间与酶活性关系	5	30	24	6, 12, 24, 36, 48, 72, 96

1.3.2 作用液中 NaCl 的浓度与爱玉子果胶酯酶活性的关系 按 1.3.1 筛选的爱玉子果胶酯酶制备优化方法制备酶液, 将不同体积的酶液与 0.1% 果胶液混合, 使作用液中 NaCl 浓度分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.5%, 然后进行滴定。酶活的计算与绘图同 1.3.1。

1.3.3 爱玉子果胶酯酶作用最适合 pH 的研究

同上法制备爱玉子果胶酯酶酶液, 量取果胶酶液 5 mL 和果胶液 20 mL (以 25 mL 果胶液为对照组), 用 NaOH、HCl 调节作用液 (对照组) 的 pH 值, 使 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 然后进行滴定。酶活的计算与绘图同 1.3.1。

1.3.4 爱玉子果胶酯酶热稳定性研究 同上法制备方法获得爱玉子果胶酯酶酶液, 分别于 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 水浴锅内保存, 隔 30

min、40 min、70 min、80 min 后, 取酶液 5 mL 冰浴 5 min 后进行滴定。酶活的计算与绘图同 1.3.1。

2 结果与分析

2.1 抽提温度与爱玉子果胶酯酶活性的关系

试验结果表明(图 2), 低于 30℃, 随着抽提温度的升高, 果胶酯酶的活性逐渐增强。在 30℃ 条件下抽提的果胶酯酶的活性最高, 高于 30℃, 随着温度逐渐升高, 活性成直线关系下降。温度每改变 5℃, 果胶酯酶活性变动约 10%。由试验的结果可知, 抽提温度对果胶酯酶的活性影响很大, 爱玉子果胶酯酶的最佳抽提温度为 30℃。

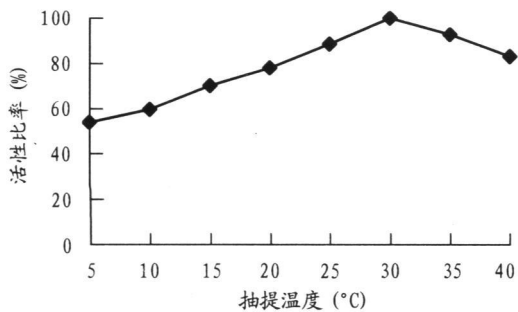


图 2 抽提温度与爱玉子果胶酯酶活性的关系

Fig 2 The correlation between PE activity and extractive temperature

2.2 抽提时间与爱玉子果胶酯酶活性的关系

试验结果如图 3 所示, 在抽提时间为 4~36 h 条件下, 随着时间的增加, 爱玉子果胶酯酶活性增加, 这是由于酶液浸出量随时间增加而增加。在 24 h 时已抽提 94.4%, 36 h 已完全浸出, 而 48 h 后, 酶活性降低为 90.9%。考虑到浸提 24 h 酶液浸出量较高, 又可避免浸提时间过长所造成的试验操作冗长和酶液变质, 因此将抽提时间定为 24 h。

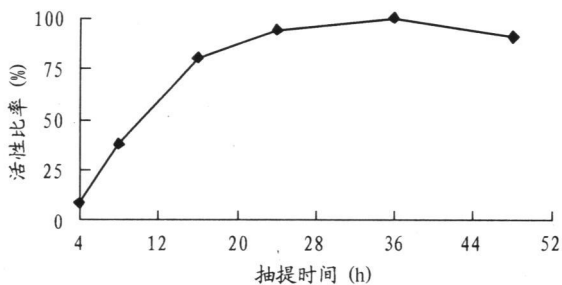


图 3 抽提时间与爱玉子果胶酯酶活性的关系

Fig 3 The correlation between PE activity and extractive time

2.3 抽提液中 NaCl 的浓度与爱玉子果胶酯酶活性关系

试验结果如图 4 所示, 抽提混合物中 NaCl 浓度为 5% 时, 抽提的果胶酯酶活性最高, 抽提混合物中 NaCl 浓度每变动 1%, 果胶酯酶活性变动约 6%。所以, 抽提混合物中 NaCl 浓度对果胶酯酶的活性影响很大, 这在生产与试验中都应予以考虑。

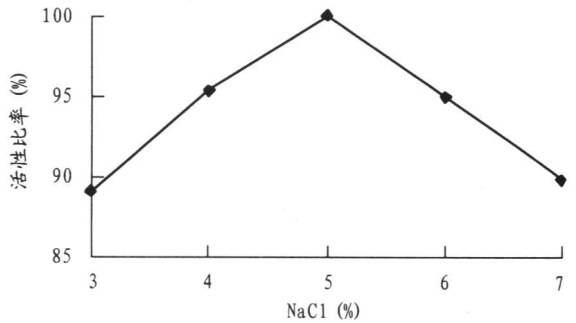


图 4 抽提液中 NaCl 与果胶酯酶活性关系

Fig 4 The correlation between PE activity and extractive time

2.4 果胶酯酶活性与酶液保存时间相关性的研究

试验结果如图 5 所示, 酶液保存 24 h 内活性略微上升, 保存 24 h 的酶液活性最高; 超过 24 h 后, 随着保存时间的延长活性逐渐降低。

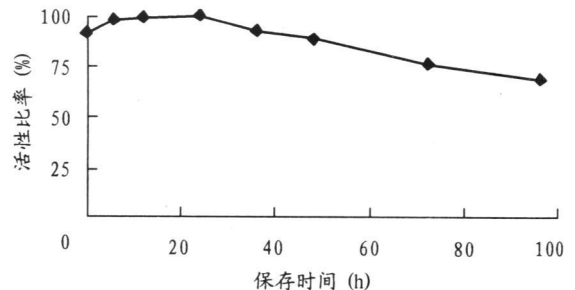


图 5 酶液保存时间与果胶酯酶活性关系

Fig 5 The correlation between PE activity and extractive time

2.5 作用液中 NaCl 的浓度与爱玉子果胶酯酶活性的关系

试验结果如图 6 所示, 作用液中 NaCl 浓度显著影响爱玉子果胶酯酶活性表达。作用液中 NaCl 的浓度为 0.8% 时, 果胶酯酶活性最高。作用液中 NaCl 的适宜浓度范围为 0.6%~0.9%。

2.6 爱玉子果胶酯酶作用的最适 pH

试验结果如图 7 所示, 爱玉子果胶酯酶的最适反应 pH 为 7.0, 小于 7.0 时, 活性随着 pH 的降

低而降低; pH 大于 7.0 后, 随着 pH 增高, 活性又逐渐降低。爱玉子果胶酯酶的活性表达受 pH 值的影响, 反应适宜 pH 为 6.5~7.5。

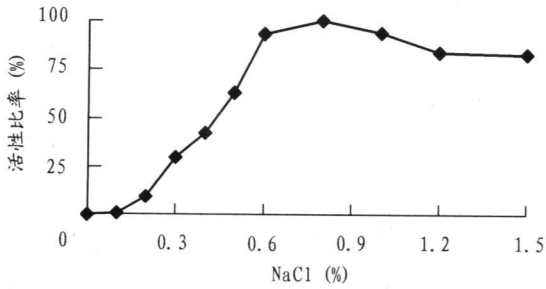


图6 作用液中 NaCl 与果胶酯酶活性关系

Fig 6 The correlation between PE activity and extractive time

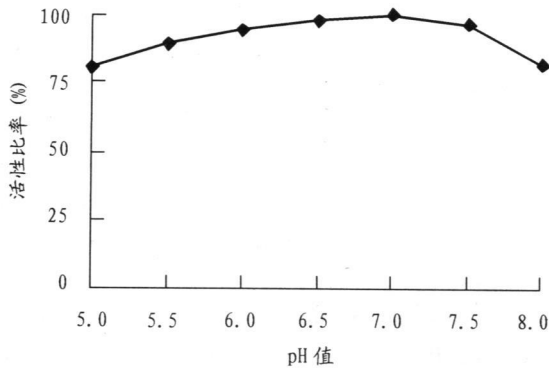


图7 作用液中 pH 与爱玉子果胶酯酶活性关系

Fig 7 The correlation between PE activity and extractive time

2.7 爱玉子果胶酯酶热稳定性

由图 8 可知, 爱玉子果胶酯酶在 30℃ 时活性最高, 而且最稳定; 随着温度升高, 酶活性逐渐降低, 且稳定性降低; 在 60℃ 环境中, 酶活性降幅加大; 在 70℃ 时爱玉子果胶酯酶已无活性。

3 结论

爱玉子果胶酯酶的抽提条件、作用液中 NaCl 的浓度与 pH、酶液保存时间、酶热稳定性对果胶酯酶活性具有很大的影响。爱玉子果胶酯酶抽提与活性测定的最佳方案为:

(1) 爱玉子果胶酯酶液的抽提: 将爱玉瘦果与 5% 的 NaCl 溶液按 1:20 混合, 搅拌均匀, 于

30℃ 的恒温水浴锅中放置 24 h, 后用抽滤漏斗抽滤, 所得的果胶酯酶液存放到 5℃ 冰箱内保存 24 h, 在 24~48 h 内测其活性。

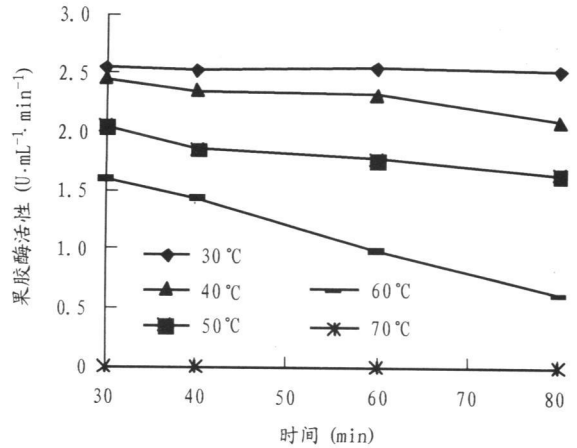


图8 不同温度下果胶酯酶的活性变化及热稳定性

Fig 8 The variation of PE activity and thermal stability under different temperature

(2) 爱玉子果胶酯酶活性的测定: 取一定量粗酶液和 0.1% 果胶基质液足量 (作用液中 NaCl 的浓度以 0.6%~1.0% 为宜) 混合, 以 BTB 为指示剂, 用 NaOH 预先中和至中性 (青绿色)。在 30℃ 条件下, 往 0.1% 果胶基质液中加入果胶酯酶液, 并不断加入 0.01 mol·L⁻¹ NaOH 溶液以维持作用液的 pH 为 7.0~7.5, 10 min 后读取 0.01 mol·L⁻¹ NaOH 溶液的消耗量, 计算出一级反应中果胶酶的活性。

试验结果表明, 在 30~50℃ 爱玉子果胶酯酶的热稳定性较好, 果胶酯酶在 30℃ 时活性最高, 而且最稳定。因此在爱玉冻制作过程中水温应控制为 30~50℃, 使爱玉子果胶酯酶的活性维持在较高水平以提高爱玉冻的凝胶效率。

参考文献:

- [1] 黄永传, 陈文彬. 爱玉冻原料植物爱玉的回顾和前瞻 [J]. 中国园艺, 1979, 25 (4): 103-110.
- [2] 林炜, 宁正祥. 爱玉多糖的制备、凝胶性能及反应 [J]. 四川食品工业科技, 1997 (1): 23-26.
- [3] 陈碧云. 桶柑果实各部位中总果胶含量及果胶酯酶活性随成熟季节的变化 [D]. 台湾: 台湾大学农学院园艺研究所, 1969.

(责任编辑: 刘新永)