

图4 VC、VE与OPC的协同抗氧化效应

对OPC的抗氧化作用均有协同增效作用, 增效作用的强弱顺序为VC>VE。当同时添加OPC、VC、VE时, 表现了更强的抗氧化性, 说明三者具有较强的协同抗氧化作用。

3 结论

本研究表明, 低聚原花色素水溶性好, 具有一定的

耐光性、耐热性和较强的抗氧化性。其抗氧化能力优于VC、VE; 与VC、VE混合使用时, 表现出很强的协同抗氧化性。因此, OPC有望成为一种新的安全高效、性能优良天然抗氧化剂。

参考文献:

- [1] Escribano-Bailon T, Gutierrez-Fernandez Y, Julian C et al. characterization of procyanidins of vitis vinifera variety tinta del pais grape seed. *Agric Food Chem*, 1992, 40(10): 1794 - 1799.
- [2] Salah N, Miller NJ, Paganga G et al. Rice - Evans [J] *Arch Biochem Biophys*, 1995, 322: 339 - 346.
- [3] Jorge M, Ricardo D, Jacques R et al. Procyanidins dimers and trimers from grape seeds [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(4): 1259 - 1264.
- [4] 魏福祥, 韩菊, 张兰等. 葡萄籽中提取低聚原花色素的技术研究 [J] *现代化工*, 2001, 21(4): 27 - 29.

果胶酶水解产物的制备及抑菌活性的研究

马庆一, 李学红, 张占营

(郑州轻工业学院食品与生物工程系, 郑州 450002)

摘要: 本工作采用市售果胶酶成功地制备了果胶酶水解物。在设计其反应条件的同时, 还探讨了反应过程跟踪检测的方法; 测定了酶水解产物的抑菌活性, 并与相应酶水解产物做了对比。结果表明, 在反应过程中, 水解液粘度与半乳糖醛酸含量呈反相关关系, 二者均可用来跟踪酶水解过程和判断反应终点。果胶酶水解物对大肠杆菌, 枯草杆菌和金黄色葡萄球菌有明显的抑制活性, 其最低抑菌浓度(MIC)为0.62%, 而果胶及其酸解产物均无相应的活性。

关键词: 果胶; 果胶酶; 水解物; 抑菌活性

Abstract: In this work pectin hydrolysate was successfully prepared by using raw pectinase. The reaction conditions were designed and the methods for monitoring assay in the reaction process were discussed. The antibacterial activity of the enzymatic hydrolysate was investigated and a comparison with its acidic counterpart was made. The results showed that the viscosity and galacturonic acid contents of the reaction mixture could be correlated each other and both of these parameters could be applied for monitoring the process of pectin hydrolysis and the end of the reaction determination. The pectin hydrolysate, obtained by pectinase had inhibitory activity on *Escherichia coli*, *Bacillus Sullilis*, and *Staphylococcus aureus*. Its MIC was 0.62%, however, pectin polymer and hydrolysate, obtained with acid, had no any similar activity at all.

Key words: pectin; pectinase; hydrolysate; antibacterial activity

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)02-0038-05

收稿日期: 2002-07-15

作者简介: 马庆一(1944-), 教授, 博士后, 硕导, 研究方向: 天然抑菌剂, 天然抗氧化剂和可食性涂膜保鲜, 食品功能基料及保健食品等。

果胶是部分羧基被甲基化了半乳糖醛酸单元以 $\alpha-1,4$ 糖苷键连接的植物多糖,作为细胞壁的重要组成部分而广泛分布于植物界。提取苹果渣、桔皮等废料的果胶^[11],主要用作食品加工中的增稠剂和稳定剂^[12]。

果胶与琼脂、海藻酸等许多植物多糖类似,其自身并无抑菌活性,当用酶将其降解为一定分子量范围的低聚物时,则具有明显的抑菌效果^[13]。日前虽有关于果胶酶水解物可用做防腐剂的文献综述提及,但尚未见任何制备方法和抑菌活性的细节。本文用廉价的市售果胶酶成功地制得了果胶酶水解物,并在确立其反应条件的同时,还探讨了反应过程跟踪检测的方法,以便为其工业化提供一定的实验基础。所得产物的抑制细菌的种类和强度也随后做了测定。实验结果证明了果胶酶水解物是一种良好的新型天然抑菌剂。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂:果胶、半乳糖醛酸(Sigma公司),果胶酶(无锡酶制剂厂)。

仪器与设备:PYX-DHS型隔水式电热恒温培养箱;YXQ-SG41-280型高压蒸汽灭菌锅;HH-S11-2型电热恒温水浴锅;800型离心机;RE52CS型旋转蒸发器;透析袋;乌氏粘度计(0.6mm)。

供试菌种:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(由本系微生物实验室提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 果胶酯化度的测定^[14]

用中和滴定法分别测定皂化值和酸值,再计算酯值。由酯值和皂化值可算出酯化度。

1.2.2 半乳糖醛酸标准曲线的制作

配制系列半乳糖醛酸标准溶液,用次亚碘酸钠法^[15]绘制以硫代硫酸钠量为横坐标、半乳糖醛酸为纵坐标的标准曲线。

1.2.3 果胶酶解曲线的制作

取果胶不同水解时间的水解产物,测定其浓度(以半乳糖醛酸计, g/L),根据产物浓度与时间的关系即可做出果胶酶解曲线图。半乳糖醛酸浓度计算公式如下:

$$\text{半乳糖醛酸浓度(g/L)} = (B - A) \times M \times 0.5 \times 194 / 2$$

式中: B、A——分别代表空白及样品滴定所耗标准 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液体积 ml;

M——标准 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液浓度;

0.5——换算系数;

194——半乳糖醛酸分子量;

2——取样体积(ml)。

1.2.4 酶解液粘度曲线的制作

果胶水解过程中定时取样,用乌氏粘度计^[16]测其粘度,绘制时间-粘度的关系曲线。

1.2.5 果胶酶的纯化^[6,7](硫酸铵盐析法)

分别配制 20% 和 95% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液。先将粗酶液盐溶、过滤去渣,再进行盐析,离心所得沉淀最后进行透析、浓缩。按照 1.2.3 法测定酶活力。对酶活性的表示,自行定义为:在 pH3.5 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液中, 50℃ 下每 h 催化果胶水解生成 1ml 半乳糖醛酸的酶量为 1 个活性(U)单位。计算公式如下:

$$U = (B - A) \times M \times 0.5 \times 200 \times 194 / (0.5 \times 2 \times 0.015)$$

式中, 200——反应液体积(ml);

0.5——反应时间(h);

0.015——反应液含酶量(g);

其它字母与数字的意义与 1.2.3 同。

1.2.6 果胶酶水解物的制备

将 3g 果胶溶于 300ml 1:1 HCl 水溶液中,配成 1% 的果胶溶液,在 50℃ 的恒温水浴中反应。分别在 40、60、80、100min 时取样 50ml,用稀 NaOH 溶液调节 pH 值至 3.5,浓缩样液至产物浓度为 1.25%,编号,待测。

1.2.7 果胶酶水解物的制备^[6]

称取 1.5g 果胶溶于 150ml 0.1mol/L 磷酸氢二钠-柠檬缓冲液(pH3.5)中,稍加热,使果胶充分溶解,配制成 1% 的果胶溶液,移入塑料反应器中。精确称取 0.15g 果胶酶,溶于 150ml pH3.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中,过滤除去不溶物,配制成 0.1% 的果胶酶溶液,然后将这一溶液迅速加入反应器中,强烈振荡、混匀,在 50℃ 的恒温水浴中反应。分别在 40、60、80、100min 时取样 50ml,加热使酶失活,浓缩样液,调整产物浓度为 1.25%。

1.2.8 抑菌实验(滤纸片法)^[18]

用无菌镊子夹取数片经干热灭菌后的滤纸圆片,分别置于不同的待测果胶酶水解样品中,浸泡 20min,按无菌操作的方式往无菌培养皿中倒入适量培养基,每皿约 15ml,即培养基的厚度约为 1.5mm,待培养基凝固后,用无菌移液管吸取 0.1~0.2ml 菌悬液于培养基表面,用无菌涂布棒涂布均匀,然后用无菌镊子以无菌操作取出各溶液浸泡后的滤纸片,按皿底的标号,对号入座,将滤纸片放入培养基表面相应位置。在 37℃ 温度下培养 24h,观察结果。

1.2.9 抑菌强度实验^[9]

本实验是在参考文献所介绍方法的基础上略加修改而进行的。取无菌试管 5 支,分别往每支试管中加入 1ml 的无菌生理盐水,在试管 1# 中加入 1ml 1.25% 果胶酶水解液,混匀,再从中取出 1ml 加入试管 2#,依次类推。将原液制备成系列浓度稀释液后,再往每支试管中吸入 9ml 培养基,充分混匀,趁热倒入无菌培养皿中,待培养基凝固后,用移液管吸取少量菌悬液,接种在培养基上相应的位置,置于 37℃ 温度下培养 24h 后,观察细菌生长情况,以完全无菌生长的最低浓度为混合液的最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果与讨论

2.1 果胶酶的纯化

表 1 果胶酶纯化前后的酶活力

	耗量(ml)	反应时间(min)	酶活力
酶纯化前	14.28	30	1.7×10^4
酶纯化后	14.30	15	3.5×10^4

注:耗量为滴定用去 0.025mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液体积。

表 1 的数据表明:硫酸铵盐析法虽使酶活力略有提高(酶活力约提高了一倍,但远未达到预期的纯化目的。这可能是源自有两种酶(PG, PE)参加的反应体系的复杂性。任何提纯方法,只有使二者活性同时都得到提高时,才会有显著的效果。

2.2 半乳糖醛酸标准曲线

不同浓度的半乳糖醛酸与其所耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 量如表 2 所示。

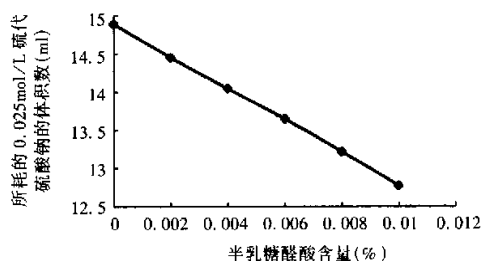
表 2 不同浓度的半乳糖醛酸与其所耗的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 量

样品	空白	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1.0%
耗量(ml)	14.89	14.45	14.04	13.64	13.21	12.77

注:耗量为滴定用去 0.025mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的体积

根据表 2 的数据,可做出半乳糖醛酸含量的标准

曲线见图 1:

图 1 半乳糖醛酸 - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 标准曲线

由图 1 可以看出,半乳糖醛酸的含量与所耗 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 体积呈线性关系,根据这一关系,通过 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的耗量可推算出反应中任何时刻酶解液中半乳糖醛酸的含量。果胶本身就带有一定数量的醛基,它所相当的半乳糖醛酸含量由图 2 可得,约为 0.045%;待反应 150min 后,反应已处于平衡状态,此时酶解液中半乳糖醛酸的含量约为 0.525%。

2.3 果胶水解过程中产物浓度、粘度与时间的关系

果胶酶水解过程中不同时间的产物浓度及粘度测定结果见表 3。

根据表 3 数据,可绘出相应的酶解曲线的粘度曲线见图 2、图 3。

果胶酶是一种复合酶,随来源不同,各成分的含量也不一样。用紫外分光光度计法,在 235nm 波长下对果胶酶水解物进行检测,未发现带有不饱和双键的消去反应产物,说明果胶混合酶中无裂解酶(聚半乳糖醛酸裂解酶和聚甲基半乳糖醛酸裂解酶)的存在。

原料果胶酯化度约为 75%,果胶酯酶的参与可不断地提供去甲酯的聚半乳糖醛酸,以维持反应的持续进行,因为甲酯不是水解酶的底物。

表 3 果胶酶解液在不同时间的产物浓度及粘度

反应时间 (min)	耗量(ml)		产物浓度(g/L)		酶水解液流经 毛细管时间(s)	粘度 (Pa·s)
	酶纯化前	酶纯化后	酶纯化前	酶纯化后		
空白液	14.81	14.84	0	0	86.2	1.513
15		14.30	0.32	0.65	36.1	0.634
30	14.28	13.95	0.64	1.08	34.9	0.612
45		13.85	0.90	0.20	34.3	0.602
60	13.82	13.87	1.06	0.17	34.0	0.596
90	13.85	13.83	1.16	0.22	33.8	0.593
120	13.78	13.89	1.25	1.15	33.8	0.593
15	13.79		1.23	1.19	33.8	0.593

注:耗量为滴定用去 0.025mol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液体积;产物浓度:以半乳糖醛酸计,未计入原果胶溶液中游离醛基量。

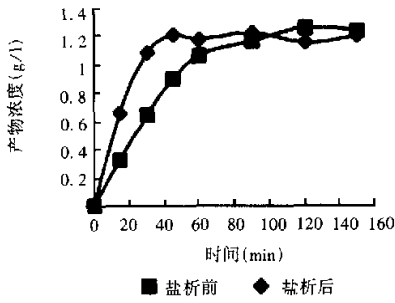


图2 果胶酶解曲线

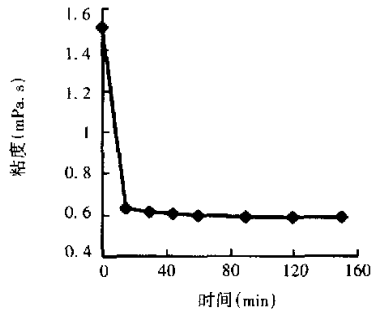


图3 果胶水解过程中粘度的变化

在测果胶酶解曲线时,在果胶底物浓度为1%的情况下,曾用过1.0%、0.1%的果胶酶溶液,结果表明(未列出):1.0%和0.1%的酶浓度过高、反应过快,无法准确测出果胶酶解曲线的初始部分,而仅在果胶酶溶液稀释到0.03%浓度时,曲线的测出才成为可能。事实上,在测定果胶酶活力时,除酶的大致活力范围外,温度、pH值和离子强度等均对测定时间影响很大。控制酶反应时间在反应初始点附近的线性部分是至关重要的。这是因为在此区域内酶的活性所受的干扰最小、分析方法也最灵敏。

由图3可以看出,在果胶酶解过程中,一开始粘度的变化很大。这是因为酶解反应刚开始时,反应速率很快,果胶高分子中大量 $\alpha-1,4$ 糖苷键短时间内被切断,在大量醛基裸露、所相当的单体半乳糖醛酸的量急剧增加的同时,一系列低聚半乳糖醛酸生成,聚合度的降低会导致粘度的减小。因此分子量或粘度测定法与半乳糖醛酸分析法一样,都可确定酶解反应进行的程度。分子量、粘度和半乳糖醛酸的含量本质上是相关的和可以互相替代的。抑菌活性应与水解物分子量的大小有关。在本研究中,我们用粘度测定取代步骤烦琐的分子量确认,以监测反应进行的程度。由图2与图3可以看出,在经历最初的快速降低之后,随着反应速度变慢,粘度的下降亦趋缓。粘度曲线与半乳糖醛酸含量曲

线的变化呈规范的反相关关系,证明二者均可用来跟踪酶水解过程和判断反应终点。

2.4 抑菌实验

对果胶各水解产物进行抑菌性能实验,所得结果见表4。

表4 抑菌实验结果

供试菌种	酶解时间(min)				酸解时间(min)				果胶溶液 (1.25%)
	40	60	80	100	40	60	80	100	
大肠杆菌	+	+	+	+	-	-	-	-	-
枯草杆菌	+	+	+	+	-	-	-	-	-
金黄葡萄球菌	+	+	+	+	-	-	-	-	-

注: + 有明显抑菌效果; - 无抑菌效果; 以果胶溶液为空白对照

2.5 抑菌强度实验

对果胶各水解产物进行抑菌强度实验,所得结果见表5。

表5 果胶水解物的抑菌强度

供试菌种	果胶酶解物浓度(%)						果胶溶液 (1.25%)
	1.25	0.62	0.31	0.16	0.07		
大肠杆菌	+	+	-	-	-	-	-
枯草杆菌	+	+	-	-	-	-	-
金黄葡萄球菌	+	+	-	-	-	-	-

注: "+"表示无菌生长; "-"表示有菌生长

实验表明,尽管果胶、半乳糖醛酸(未列出)和果胶酸解产物均无抑菌活性,但果胶酶水解物在pH为3.5时,对大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用。其最低抑菌浓度(MIC)为0.62%。

3 小结

3.1 粘度与半乳糖醛酸的含量曲线的变化呈反相关关系。粘度测定和半乳糖醛酸分析均可用来进行酶水解过程的跟踪和反应终点的判断。

3.2 硫酸铵盐析法可使果胶酶活略有提高(酶活力从 1.7×10^4 单位到 3.5×10^4 单位,大约增加了一倍),但远未达到所预期的效果。这主要是双酶相继作用反应体系的复杂性所致。

3.3 果胶和果胶酸解产物均无抑菌活性,但果胶酶水解物在pH为3.5时,对大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌有明显的抑制作用。其MIC为0.62%。

参考文献:

[1] 关西梅等.天然防腐剂的研究进展及应用前景[J].广州食品工业科技,2000,16(4):19-22.

- [2] 凌关庭等. 食品添加剂手册(下册)[M]. 化学工业出版社
- [3] 唐传核. 天然抗菌防腐剂[J]. 四川食品与发酵, 1999, (4): 26-28.
- [4] 周家华等. 食品添加剂[M]. 化学工业出版社, 2001.
- [5] 刘志皋、高彦祥等. 食品添加剂基础[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [6] 郭勇等. 酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社.
- [7] 沈同, 王镜岩. 生物化学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社.
- [8] 60种食药两用中药抗菌防腐作用研究[J], 天然产物研究与开发, 1997(12): 62-67.
- [9] 全国中等卫生学校试用教材编写组. 微生物学及检测技术[M]. 广东人民出版社, 1984. 84.

超滤浓缩微生物胞外多糖 PS-9415 发酵液的研究

宋 刚¹, 张 宁², 彭志英¹

(1. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640)

(2. 暨南大学食品科学与工程系, 广州 510632)

摘 要: 本文采用了截留分子量为 70, 000 的平板超滤膜对微生物胞外多糖 PS-9415 的发酵液进行了超滤浓缩的研究。膜的透过通量受料液浓度、搅拌速度、操作压力等因素的影响。其中, 降低料液浓度, 增加搅拌、提高压差可以增加膜的透过通量。0.5% 的多糖在室温、0.15MPa 下超滤 108min 可浓缩 2 倍。

关键词: 平板膜超滤; 微生物胞外多糖 PS-9415

Abstract: Flat sheet membrane ultrafiltration cup with membrane molecular weight of 70, 000 was used to concentrate PS-9415 fermentation broth. Increasing the operation pressure could improve the permeation flux. So did better agitation and lower initial concentration. The concentration of exopolysaccharides broth (0.5%) could be increased 2 fold under the condition of 0.15MPa and room temperature.

Key words: flat sheet membrane ultrafiltration; exopolysaccharides PS-9415

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)02-0042-03

随着膜分离技术的不断发展, 超过滤技术在许多工业领域中得到了广泛作用, 如工业废水深度处理; 化学、食品与医药工业中高分子溶液的浓缩、纯化和分离, 生物制品溶液和饮料的除菌、澄清和纯化, 淀粉酶、糖化酶、碱性蛋白酶和脲酶等的纯化、分离和浓缩, 多糖的提纯和浓缩等等。采用膜分离技术对多糖的发酵液进行预处理, 不仅可以浓缩澄清的多糖, 还可分离发酵液中残余的培养基组分, 包括: 糖, 含氮物质, 无相盐等等。^[1~3] 本文对采用平板膜超滤器对放射形土壤杆菌 Q9415 发酵生产的微生物胞外多糖 PS-9415 进行了超滤浓缩的研究。

1 材料与方法

1.1 菌种 放射形土壤杆菌 Q9415 为华南理工大学生物科学与工程中心从自然界筛选得到^[4,5]。

1.2 仪器设备 搅拌式超滤杯: 450ml, 北京中科膜

技术开发中心; 聚偏氟乙烯 PVDF 超滤膜: 截留分子量 70000, 上海原子核物理研究所; 紫外可见分光光度计; UV754, 上海分析仪器设备总厂

1.3 膜通量(J)的测定

一定操作压力下, 水或溶液通过超滤膜的透过液为一定体积(V)时所需要的时间(t), 用单位时间内通过单位面积(S)的透过量表示:

$$J = V / (S \times t)$$

式中: J——[L/(m²·h)]或[ml/cm²·h];

V——透过液体积, L 或 ml;

S——膜的有效面积, m² 或 cm²;

t——超滤时间, h 或 min。

1.4 物料扩散公式

根据浓差极化模型^{[3][6,7]}, 边界层中的物料的扩散方程如下:

$$J_v \cdot C = J_v \cdot C_p - D(dC/dx)$$

收稿日期: 2002-07-14

基金项目: 广东省自然科学基金(No. 960257); 广东省科技攻关资助项目(粤财工[98]278号)

作者简介: 宋刚(1978-), 男, 2001级博士, 主要从事食品生物技术与天然生物活性物质的研究。