

低 盐 酱 油 速 酿 法

当酱油醪发酵时,将酿造食盐水的浓度比常规法降低至10~15%的低盐浓度。盐水的用量拟为原料的120~140%,盐水温度由常规法30°C提高至40°C。在这种酿造盐水中加入酱油麴进行发酵,当第二天酱油醪温度降至35°C时,添加2%预先培养好的酱油酵母,每日搅拌2~4次,使温度保持35~38°C,大约10天即发酵成熟。然后按常规法进行榨汁、加温、过滤,便可制得低盐速酿酱油。

这种酱油的制造特点是周期短,成本低,质量有保证。适合于乡镇企业及个体户进行生产。产品因盐度低,有利于人体健康,并给高血压及成人病患者带来好处。

在传统酱油酿造中,酿造用盐的浓度大约在20~25%,这样的浓度,根据以往的经验,目的在于防止酱油的腐败。

这里介绍的低盐酱油的技术特点,在于利用特别培养的酱油酵母,当发酵温度在35~38°C时,以2%的量先添加于酱油醪中,使其急速发酵,借助产生酒精以达到抑制腐败细菌的目的,而不是依赖酱油麴。另外酵母菌的旺盛繁殖,使同时存在的腐败细菌几乎没有生长增殖的余地,而同时产生的二氧化碳气也具有杀菌能力。这样通过发酵成熟的酱油麴与特别

添加的酱油酵母一起完成速酿。

过去,在减盐处理方面,为了单纯地防止腐败细菌的产生,有人试图通过保持40~45°C的高温进行发酵,这样不仅会造成酱油香味的丧失,而且还会产生明显的大豆臭味,酱油醪一旦染上大豆臭味就很难除去。故超过40°C的高温是不足取的。

本法醪温保持在35~38°C之间进行发酵,可迅速进行醪的分解,每天进行适当地搅拌,用以补充氧气,使发酵旺盛地进行,产生多量的酒精和二氧化碳,足以抑制了腐败细菌的产生。由于这种相乘作用,在短期内即可完成了芳香,味美的速酿酱油。

举例说明如下:当酱油配醪发酵时,把食盐浓度调至13%,盐水温度调至40°C,在此酿造盐水中加入1450公斤酱油麴,盐水用量为所用酱油麴原料的130%,配醪后进行发酵,第二天将温度降低至35°C,加入预先培养好的酱油酵母100升,每天进行两次搅拌,保持醪温35°C,经发酵10天即成熟,按常规法进行压榨、加热过滤。所得成品的分析数据如下:波美度:17.7;盐度10.17;酒精含量3.2%;产品pH为5.3;含氮量:1.55%;色度:30。基本符合优级酱油的指标。 赵雪松编译

番 石 榴 的 多 酚 氧 化 酶

一、引言

水果和蔬菜在贮藏和加工期间因机械伤引起的褐变褪色主要是多酚氧化酶催化酚类物质的氧化而导致的结果。许多事例说明,酚的褐变是很麻烦的,所以生物学家们和食品工艺学家们对研究这种酶很感兴趣。已有人研究过苹果、[1-3]鳄梨、[4,5]香蕉、[6,7]茄子、[8]葡萄[9、

10]和桃子[11,12]的多酚氧化酶的分离,也描述了它的特性,关于植物多酚氧化酶的论文也刊载过,但对番石榴的多酚氧化酶的研究未见报道,尽管这种水果在东南亚地区逐渐受到欢迎。成熟的番石榴可以鲜吃,但一般用于制造蜜汁饮料、果汁饮料、果酱和果冻。

本研究对番石榴的多酚氧化酶进行提取、纯化并描述它的特性。

二、实验方法

1. 材料

番石榴果实来自于马来西亚雪兰莪的一个农场,新鲜采摘具有商品成熟度的果实,在提取多酚氧化酶前于4℃冷藏室放置1天;果实微绿,处未成熟阶段。总可溶性固形物和可滴定酸(柠檬酸)分别平均为6.5°Brix和0.24%。

2. 多酚氧化酶的提取和纯化

根据香蕉多酚氧化酶的提取方法^[6]提取番石榴多酚氧化酶。取300克纵切果实放进加有15毫克·克⁻¹聚乙烯吡咯烷酮和5微升·克⁻¹聚乙二醇辛基苯基醚的300毫升0.2M磷酸盐缓冲液(pH6.8),用Waring搅拌机搅拌均匀,然后把这些均质混合物用每分钟11000转的离心机(Du Pont设备, Sorvall RC—5B致冷超速离心机)在2℃下离心分离20分钟,再用棉花滤片过滤除去上清液中的漂浮物,弃除残渣。取一部分上清液(粗提液)于0.2M磷酸盐缓冲液(pH6.8)透析2天,并换两次缓冲液。

纯化的第一步是丙酮沉淀。在上清液中慢慢加进两体积的冷丙酮,于4℃下静置沉淀30分钟。加入丙酮后在略呈绿色的清静黄色溶液中形成类胶物质代替沉淀物,倾析出溶液,用300毫升0.2M磷酸盐缓冲液(pH6.8)从类胶物中重新提取多酚氧化酶,之后于每分钟15000转的离心机在2℃下离心分离20分钟去除丙酮提取液中的不溶解物质。

每80毫升丙酮提取液用一个装有YM—30膜的Amicon搅拌式浓缩设备超滤浓缩至30毫升,压缩氮的工作压力是50个大气压。

然后,Amicon浓缩液在相同的Amicon浓缩设备中超滤透析,使透析进行到酶提取液中低分子量的浓度达100倍为止。

酶的分离和纯化在温度4℃和4℃以下进行,所有酶提取液在纯化步骤之间和分析酶活性之前都要在4℃贮藏。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳现象

用非还原聚丙烯酰胺凝胶系统排除样品缓冲液中的2—巯基乙醇,根据Laemmli和

Favre^[16]采用的方法,用9%酰胺凝胶代替12%凝胶,用pH6.8的0.05M儿茶酚测定多酚氧化酶。

4. 蛋白质的测定

蛋白质含量用改良的Lowry方法测定,使用结晶的牛血清蛋白做为蛋白质标准。^[17,18]

5. 多酚氧化酶活性分析

使用Pye Unicam分光光度计测定样品吸收波长在410nm处的增加速率而得出酶活性。反应混合液包括1毫升0.05M儿茶酚、不同量的酶提取液和5毫升0.2M磷酸盐缓冲液(pH6.8),把儿茶酚溶液和酶提取液加进0.2M磷酸盐缓冲液中。测定温度为30℃,反应速率从活性曲线的直线斜率计算得出,酶单位(u)定义为在测定条件下每分钟吸收千分之一的变化。

1) pH值试验情况:在pH5.9~7.7范围内测定酶活性,用0.02M磷酸盐缓冲液来调节pH值。反应混合液包括1毫升儿茶酚加入0.02M、按要求配成pH值的磷酸盐缓冲液,0.5毫升酶和3.5毫升0.02M按要求配成pH值的磷酸盐缓冲液,测定温度为30℃。

2) 多酚氧化酶的热钝化:部分纯化酶(Amicon浓缩液和Amicon浓缩液的透析液)的热变性研究在温度45、55、65和75℃进行。做法是把装有5毫升酶的试管据所要求温度并按固定的加热时间进行加热保温,加热时间结束后,把试管浸在冰里冷却,然后测定酶活性,测定条件与上述相同。

3) 多酚氧化酶的抑制:反应检测包括1毫升0.05M儿茶酚、3毫升0.2M磷酸盐缓冲液(pH6.8)和1毫升不同浓度的抑制剂溶液,儿茶酚和抑制剂溶液加入0.2M磷酸盐缓冲液里(pH6.8)。本文研究的抑制剂有抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠和盐酸L—半胱氨酸,还包括氯化钠、乙二胺四乙酸(EDTA)对酶活性的影响。

一定浓度的抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠和盐酸L—半胱氨酸存在时出现一个停滞期(Lag phase),由于存在停滞期,酶活性是在停滞期过后由吸收光谱的改变速率计算得出。

三、结果与讨论

1. 多酚氧化酶的提取和纯化

从 300 克番石榴果实提取的多酚氧化酶的典型纯化结果见表 1, 有渗析粗提液纯化、丙酮沉淀获得 4.9 倍纯化和渗析 Amicon 浓缩液获得 17.2 倍纯化, 应该注意, 贮藏期间提取液的酶活性降低, 表一所给的数字是在每个纯化步骤之后立刻测定的结果。渗析粗提液的活性更确切说是粗提液活性作为计算纯化倍数时的参考。粗提液渗析之前的活性分析表明, 酶活性不随酶浓度的增加而直线上升, 而且, 当反应测定使用较高浓度(更多数量)的粗提液时会出现一个停滞期。可是, 粗提液在 0.2M 磷酸盐缓冲液里渗析之后, 酶活性随酶浓度的增加而直

线上升, 且停滞期消失。渗析去除存在于粗提液制备中可能是还原成分(如抗坏血酸)的干扰物质, 可能是这些还原成分与多酚氧化酶和儿茶酚反应形成的醌起反应, 就延迟了可测定的褐变速率。已经知道, 还原化合物被醌氧化产生的结果就是褪色。^[14]

注意到 Amicon 浓缩液的渗析液只有大约 17 倍纯化, 可见多酚氧化酶是一种相对难分离与纯化的酶,^[13,14] 经常遇到的一个问题是在分离期间出现导致性质的改变与表现复杂的变化酶的酚类氧化。和用来分离番石榴多酚氧化酶的聚乙烯吡咯烷酮一样, 抑制剂的使用能使酶活性受到抑制, 同时, 丙酮粉的制备和用澄清剂提取之后的增溶也能改变酶的结构与特性。^[13,14]

表 1 番石榴多酚氧化酶的纯化

提取液种类	提取液体积 (ml)	蛋白质浓度 (mg/ml)	酶活性 (u/ml)	特殊酶活性 (u/mg 蛋白质)	纯化倍数
渗析粗提液	655	4.38	200	45.7	1
丙酮沉淀液	281	0.99	220	222	4.9
渗析 Amicon 浓缩液	105	0.14	110	786	17.2

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳现象

聚丙烯酰胺凝胶电泳现象表明, 渗析 Amicon 浓缩液的多酚氧化酶分子量在 120000~140000 范围, 这是使用儿茶酚测定时在凝胶上出现单个显著带 (prominent band) 而得到证实。

根据酶的来源与提取方法不同, 多酚氧化酶有不同的分子结构, 有人推测酶单体的分子量大约是 30000,^[13,14] 在苹果、^[19] 马铃薯、^[20] 甘蔗、^[21] 蘑菇^[22] 的酶提取液中也发现了与番石榴多酚氧化酶相类似的有一分子质量的多酚氧化酶结构。

3. 番石榴多酚氧化酶的最适 pH 值

pH 值对番石榴多酚氧化酶的影响见图 1, 丙酮沉淀的酶的最适 pH 值是 7.2。已有陈述, 多酚氧化酶最适 pH 值随着酶的来源与底物不同在较大的 pH 值范围内起变化,^[23] 尽管有人报道, 在多数情况下酶的最适 pH 值在 4.0~7.0 之间, 但也应注意最适 pH 值会受缓冲液种类、

酶纯化的影响。

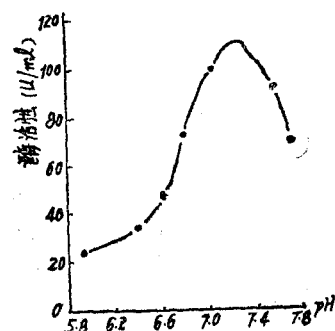


图 1 pH 对番石榴多酚氧化酶的影响

4. 多酚氧化酶的热钝化

部分纯化的酶 (Amicon 浓缩液) 的典型不耐热性的观测曲线见图 2, 渗析 Amicon 浓缩液的不耐热性表现了相同的特性, 在 45°C 加热 30 分钟不使酶活性明显受损失, 在 55、65、75°C 温度条件下, 使 50% 酶钝化所要求的时间分别是 10.1、3.5、1.1 分钟。

番石榴多酚氧化酶的热稳定性与其他来源的多酚氧化酶的比较表明, 番石榴多酚氧化酶

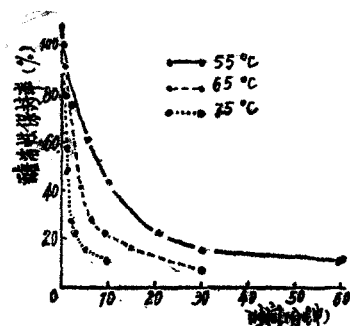


图2 番石榴多酚氧化酶在不同温度的热钝化

比葡萄、[10]粘核桃、[11]香蕉、[6]鳄梨、[24]Royal Ann 樱桃[25]梨[26]和芒果[27、28]的多酚氧化酶有较低的热稳定性。热钝化研究结果说明,这种多酚氧化酶不属于有极热稳定性的酶系列,正如从各种来源的多酚氧化酶的热变性研究结果表明的,短时间地暴露在温度70~90°C就足够使酶部分钝化或全部钝化。酶的热稳定性与果实的成熟度有关,在一些情况下也取决于pH值不同而异,此外,相同来源而不同分子结构的酶也有不同的热稳定性。[14]

5. 抑制剂的作用

抑制剂对褐变速率的影响见表2,偏亚硫酸氢钠,抗坏血酸和盐酸L-半胱氨酸有效地延迟褐变速率。这些抑制剂存在时,褐变常在停滞期过后开始发生,抑制率的大小和停滞期的持续时间取决于反应测定中的抑制剂种类和浓度。

抑制褐变的原因有:1)多酚氧化酶的钝化;2)反应底物(O_2 、多酚物质)其中之一消除;3)在二级反应中抑制剂对酶作用的反应产物起作用抑制有色物质的形成。特种抑制剂防止酶褐变的原因可能有抑制剂作用的单条途径的结果或两条及多条途径相互作用的结果。[14]偏亚硫酸氢钠和抗坏血酸被氧化时,就把多酚氧化酶作用形成的醌还原成多酚物质,因此它们只是

表2 抑制剂对褐变速率的影响*

抑 制 剂	浓 度 (mM)	停滞期 (分钟)	停滞期后的 抑制率(%)
偏亚硫酸氢钠	0.40	41	95
	0.20	14	94
	0.10	2.3	91
	0.04	0.6	92
抗坏血酸	0.40	>90	—
	0.08	3	85
	0.04	1.5	60
	0.02	0.25	51
盐酸L-半胱氨酸	0.10	9.2	96
	0.04	0.8	62
	0.02	—	14

* 本研究用 Amicon 浓缩液的渗析液,当用渗析之前的Amicon浓缩液时有相同趋势的抑制作用。

暂时防止褐变,且只表现在停滞期出现的时候,使用高浓度的抑制剂也能使酶钝化。盐酸半胱氨酸可表示为醌的连接物,它与醌一起形成稳定的无色化合物而防止醌氧化成有色物质,停滞期过后褐变发生的开始是在盐酸半胱氨酸在连接反应中全部被用完的时候。

0.1M的乙二胺四乙酸或氯化钠不能明显抑制褐变,据报道,乙二胺四乙酸对多酚氧化酶是效果很差的抑制剂,氯对多酚氧化酶的抑制决定于pH值。[12、13、23]

四、小结

应该注意本文对多酚氧化酶研究的极限性,所报道的特征数据是从有商品成熟度的番石榴提取的部分纯化的酶所得的结果,这些数据受到栽培条件、果实成熟度、操作温度、提取和纯化的影响。一般认为,多酚氧化酶容易变性,是一种分离和纯化都较难的酶。

江振盛译自《J Sci Food Agric》1985, 36, 1259—1265潘一山校