

个数值表明导出的方程式(7)和(8)是相当精确的。

(四)几个动力学问题的讨论

弗札—哈里斯 (Feather-Harris)、斯捷图里及其同行 (Szejtli et al) 曾先后研究过棉子糖酸性水解, 他们认为: Ga 取代基导致了 G-F 键水解能力下降。然而, 他们的结论仅仅基于盐酸介质中进行的水解

为弄清 Ga 取代基对 G-F 水解的影响, 现将作者对高粱糖蜜 (Sorghummolasses) 应用盐酸和草酸的水解结果 [9, 10], 一并标绘于图2至图5中。对比表明: 棉子糖中 G-F 键和高粱糖蜜中的水解速度不同。当它们同在盐酸介质中水解, 棉子糖中 G-F 键的水解速度约 25% 低于高粱糖蜜; 而在草酸介质中水解, 前者的水解速度约 39% 快于后者。由此, 本研究的结论是: 在盐酸介质中, Ga 取代基降低了 G-F 键的水解能力, 但在草酸介质中, Ga 取代基促进了 G-F 键的水解, 这种现象很可能是草酸和棉子糖之间的分子缔合作用, 形成了一种更易水解的棉子糖草酸脂而造成的, 当然, 作者的这一推测尚待进一步证实。

斯捷图里曾报导, 棉子糖的 Ga-G 键和在蜜二糖分子中的 Ga-G 键的水解速度相同 [8]。因此, 棉子糖分子中的两种键的水解能力可以进行比较。根据本研究测定, 蜜二糖 Ga-G 键在 0.8% (w/v) 草酸和 80°C 时, k 值为 0.000098 分⁻¹ [10], 而棉子糖在相同条件下为 0.102072 分⁻¹, 这就是说, 棉子糖 G-F 键的水解速度比 Ga-G 键大 1041 倍。

四、研究结论

本研究得出如下结论:

1. 确立了棉子糖在盐酸和草酸介质中的水解动力学模型。

2. 在盐酸介质中, 棉子糖 G-F 键的水解速度约 25% 低于高粱糖蜜中蔗糖分子的 G-F 键。这种情况可归因于 Ga 取代基导致构形变化更加困难。

3. 在草酸介质中, 棉子糖 G-F 键的水解速度约 39% 快于高粱糖蜜中蔗糖分子的 G-F 键, 这种情况很可能是分子缔合作用生成了更易水解的络合物。

4. 当水解进行在草酸介质中, 棉子糖分子中 G-F 键的水解速度大约 3 个数量级快于 Ga-G 键的水解速度。

参考文献

- (1) М. З. Хелемский, Е. А. Воробьева, М. Л. Пельц, Трубы ТСИНС, 11, 18 (1963)
- (2) М. З. Хелемский, Технологические Качества Сахарной Свеклы, VI, Москва (1967)
- (3) A. L. Lehninger, Biochemistry, Worth Publishers, Inc. (1975)
- (4) W. N. Howarth, E. L. Hirst, D. A. Rucii, Trans. Chem. Soc. (London) 123, 3125 (1923)
- (5) Andress de Grandchamp-Chaudun, Compt. rend, 236, 244 (1953). (C. A. 46: 2891 f)
- (6) E. A. Moelwyn-Hughes, Trans. Faraday Soc., 25, 503 (1929)
- (7) J. Szejtli, R. D. Henriques, M. Castineira, Acta Chim Acad Sci., Hung., 66, 213 (1970)
- (8) M. S. Feather, J. F. Harris, J. Organic Chem., 30, 153 (1965)
- (9) 钟穗生, L. T. Fan, J. Food Sci., 49 (6) 1428 (1984)
- (10) 钟穗生, L. T. Fan, 太原工业大学学报, 1, 85 (1985)

柞蚕 β 葡萄糖苷酶和多酚氧化酶的初探

上海科技大学生物工程系 周祖荫

动植物中含有丰富的醌类物质。这些物质

在食品加工过程中, 在食品中存在的多酚氧化

酶等的催化下迅速氧化聚合, 最终生成黑素(melanin), 严重影响食品的质量。

柞蚕是我国广泛养殖的蚕类, 体内含有丰富的蛋白质等营养物质, 产丝后仍可食用。近年来, 随着柞蚕综合利用的开展, 从蚕体或废丝中提取蛋白质, 水解成肽和氨基酸, 最后制成相应的营养添加剂并用于食品和化妆品已受到关注。但制备过程中褐变反应产生的深色严重影响产品的质量。

Brunet^[1]认为柞蚕体内或绢丝腺中含有丰富的龙胆酸葡萄糖苷, 经 β -葡萄糖糖苷酶作用生成龙胆酸葡萄糖。龙胆酸再经多酚氧化酶催化, 氧化聚合生成有色的多醌类物质。

本文在Brunet研究的基础上, 以我国辽宁丹东地区产丝前柞蚕的绢丝腺为原料, 对上述二酶的性质作初步探讨, 以为柞蚕和蚕丝的加工利用研究提供一些参考资料。

一、酶活力测定方法:

1. β -葡萄糖糖苷酶:

将NAG(对硝基苯酚-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖糖苷)配于0.05M, pH6的柠檬酸缓冲液中, 浓度为 5×10^{-3} M。取0.2ml上述底物溶液, 加入适当稀释的酶液, 使最终反应体积为1ml。 30°C 保温3分钟, 加入1ml 0.2M碳酸钠溶液终止反应。生成的黄色溶液在分光光度计400nm波长处测定光吸收值。

2. 多酚氧化酶

在室温 $16 \sim 18^{\circ}\text{C}$, 取酶液0.5ml, 加0.1M, pH6.4磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液5ml, 再迅速加入0.5M邻苯二酚0.5ml, 速摇匀后, 在400nm处测定不同的光密度增值。对照分别为只含酶液和只含底物的缓冲液。

二、实验结果:

1. β -葡萄糖糖苷酶:

(1) 酶的提取: 取保存于 -10°C 的柞蚕, 解冻后剖腹, 去除体液, 用蒸馏水漂洗体腔二次。取绢丝腺, 剪碎。用适量0.2M, pH6柠檬酸缓冲液抽提, 抽提液离心, 残渣再加少许缓

冲液抽提一次。合并抽提液, 对20倍体积0.05M, pH6柠檬酸缓冲液 4°C 透析, 以去除提取液中的小分子物质。外透液经紫外光谱测定, 得图1的紫外吸收曲线, 显示在325nm处有一明显的吸收峰。

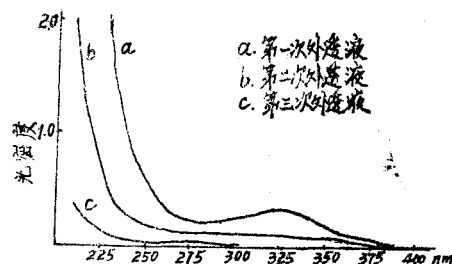


图1 柞蚕绢丝腺提取液外透液的紫外吸收光谱

透析液测定 β -葡萄糖糖苷酶活力。以NAG为酶作用底物, 结果见图2。实验表明酶液对NAG的水解与时间呈很好的线性关系。

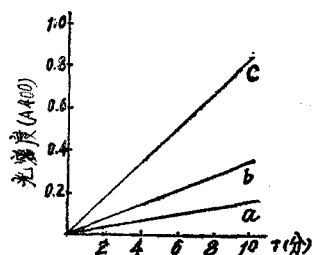


图2 柞蚕绢丝腺提取液 β -葡萄糖糖苷酶活力曲线
a. 酶液0.1ml, b. 0.1ml, c. 0.4ml。底物NAG

(2) 酶对底物的专一性:

柞蚕的 β -葡萄糖糖苷酶能分别作用于NAG和p-NPG(对硝基苯胺)的糖苷键, 反应均呈很好的线性关系。然而对NPG的水解活性是对p-NPG的4倍(图3)。

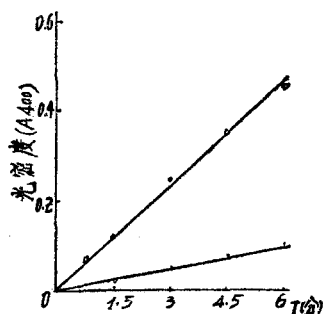


图3 柞蚕绢丝腺 β -葡萄糖糖苷酶的底物专一性
● 底物为5mM p-NPG 0.2ml ○ 底物为5mM NAG 0.2ml

(3) pH 对酶活力的影响:

在不同的 pH 下, 测定柞蚕 β -葡萄糖糖苷酶对 NAG 的水解活性, 结果见图 4。该酶在 pH5.5~6.5 对 NAG 具有最强的活力, 这与许多文献报道的 β -葡萄糖糖苷酶最适 pH4.4~5.0 有些差异。^[2,3,4]

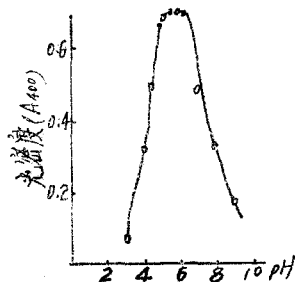


图 4 pH 柞蚕绢丝腺 β -葡萄糖糖苷酶活力的影响, 各 pH 酶液 0.3ml, 5mM NAG 0.2ml, 30°C 反应 8 分钟。

(4) 酶对绢丝腺中生色物质的水解作用:

(a) 按 Brunet 法, 用甲醇提取保存于一10°C 的绢丝腺, 提取液离心后, 溶液在干燥器内浓缩。浓缩液在 15×15cm 新华 III 号滤纸的左下角 2×4cm 处点样, 吹干, 于室温下在正丁醇-醋酸-水 (4:1:1) 系统中层析。吹干, 荧光灯 360nm 波长下检测, 得到 A 和 B 二个荧光点 (图 5)。A 光泽深蓝, 亮度较大, 且点的直径也大。B 光泽蓝, 亮度较弱, 点子小。剪取只含 A 的部份。

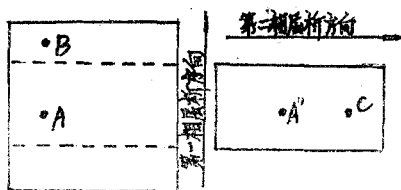


图 5 柞蚕绢丝 β -腺葡萄糖糖苷酶对绢丝腺生色物质的水解作用, · 点样处, 剪开处。

含有 β -葡萄糖糖苷酶的柞蚕绢丝腺提取液, 经 Sephadex-G-25 浓缩后, 喷于含 A 的上述滤纸上, 装于潮湿的塑料袋内, 30°C 保温 4 小时, 吹干, 在上述同一溶剂系统中进行第二向层析, 吹干后在荧光灯 36nm 波长下检测。发现 A 点消失, 在滤纸的前沿得到蓝色荧光点 C, 在滤纸中央得到深蓝色荧光点 A' (图 5)。

我们用对 NAG 具有很强水解活力的从公牛副睾提取的 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖糖苷酶 (本系李惠福提供) 进行上述实验, 第二向层析后, 只在滤纸的中央有荧光点 A'', A'' 的荧光颜色, 位置均与 A' 相同, 而不产生 C。

我们又以蒸馏水代替酶液进行上述试验。第二向层析后, A 点消失, 在滤纸的中央产生 A'', A'' 的位置, 荧光颜色均与 A', A'' 一致。由于 A'' 是未经酶解的 A, 因此 A' 可能就是 A 中未被酶解的部分, C 是 A 中被酶解的, 经第二向层析后分离出来的新的物质。

(b) 取保存于一10°C 的柞蚕于一0~4°C 放置数天, 用甲醇抽提其绢丝腺, 抽提液按 (a) 中条件层析, 结果见图 6。与 (a) 的抽提液相比较, A 点荧光物质显著减少, B 点荧光物质显著增多。说明 β -葡萄糖糖苷酶在深冻过的蚕体在 0~4°C 存放期间也能在蚕体内催化水解作用。

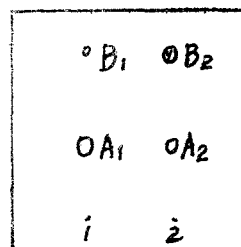


图 6 -10°C 和 4°C 保存的柞蚕绢丝腺甲醇抽提液层析图谱比较

1. -10°C 保存, 2. 0°C 保存

(c) 收集荧光点 A, 用甲醇溶解, 过滤。滤液在干燥器中浓缩至干, 再用蒸馏水溶解, 测定其紫外吸收光谱, 并与合成龙胆酸 (市售商品的紫外吸收光谱相比较, 发现紫外吸收曲线基本一致 (图 7)。

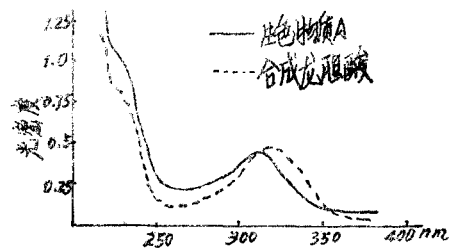


图 7 柞蚕绢丝腺生色物质 A 与合成龙胆酸水溶液紫外吸收光谱

点(d)荧光点A和B(或C)均能与三氯化铁—铁氰化钾试剂和硝酸银试剂起显色反应。并分别测定了A和B的R_f值。结果均与 Brunet 报道的基本相符(表1)^[1]。

表1 柞蚕绢丝腺生色物质A(A', A'')和C的一些理化性质

性 质	生色物质	A(A', A'')	B(或C)	合成龙胆酸
R _f 值(正丁醇:醋酸:水) (4:1:1)		0.46	0.87	0.89
硝酸银试剂		无色	棕色	棕色
三氯化铁—铁氰化钾试剂		蓝色	蓝色	蓝色
360nm 荧光检测		深蓝	蓝色	亮蓝色

上述结果证实柞蚕β-葡萄糖糖苷酶有别于公牛副睾N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖糖苷酶^[5]，而相似于Brunet^[1]报道的苦杏仁酶(emulsin)——一种复杂的α、β-糖苷酶体系，均能作用绢丝腺中的生色物质A，产生C。但不同的是苦杏仁酶能全部水解A，产生C。而柞蚕β-葡萄糖糖苷酶只能水解A中的部份物质，产生C。

(5)酶的K_m值: 图8是以NAG为酶作用底物测得柞蚕β-葡萄糖糖苷酶的K_m值为 8×10^{-5} M。此值表明NAG是该酶的理想底物。

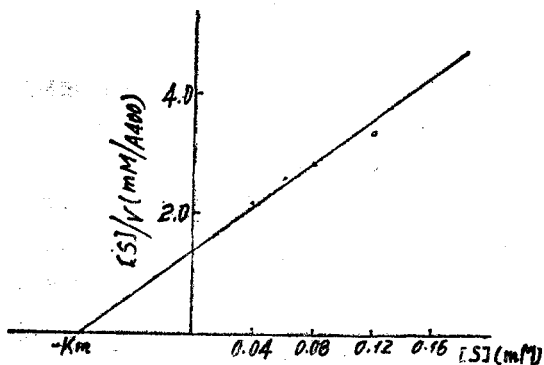


图8 以NAG为底物的 $(S) - [S]_0/V$ 作图

2. 多酚氧化酶

(1) 酶的提取

取保存于 -10°C 的柞蚕，按上法取出绢丝腺，剪碎，加冷蒸馏水适量，冰浴内抽提30分钟，离心，离心液过滤，滤液冰浴中保存。提取液的多酚氧化酶对邻苯二酚的水解活性见图9。在5分钟内，酶活力与时间呈线性关系。

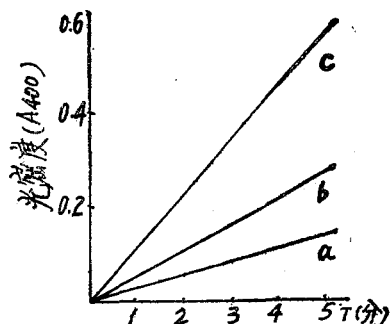


图9 柞蚕绢丝腺多酚氧化酶活力曲线底物为邻苯二酚
a. 酶液0.1ml, b. 0.2ml, c. 0.4ml

(2) 酶的底物专一性:

对不同底物进行多酚氧化酶的活力测定，结果见图10。酶对邻苯二酚(0.5 M)活力最强，其次是对甲酚(0.5 M)，而对对苯二酚(0.5 M)和酪氨酸(饱和)则稍有活力，对间苯二酚(0.5 M)和龙胆酸(0.2 M)均无作用。邻苯二酚和对甲酚经酶催化后均生成黄色的溶液，并逐渐转

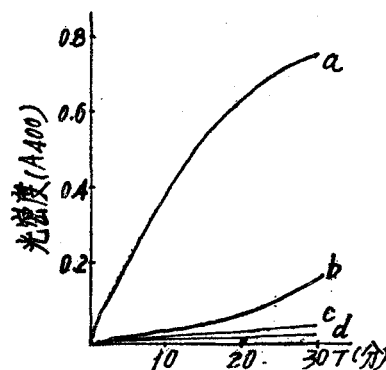


图10 柞蚕绢丝腺多酚氧化酶的专一性
a. 底物邻苯二酚, 酶液0.2ml; b. 底物对甲酚, 酶液1ml;
c. 底物对苯二酚, 酶液1ml; d. 底物饱和酪氨酸, 酶液1ml;

变成棕黄色，时间长后，邻苯二酚—酶反应液颜色逐渐转黑，聚合成黑素。酶对对甲酚作用时，反应初期有一明显的诱导期，这与文献报道的一致^[6,7]。对苯二酚—酶反应液呈微红棕色。

(3) pH对酶活力影响: 酶液分别在pH3~8的环境中与邻苯二酚作用，结果见图11。酶在pH 6.5附近对底物显示最大的催化活性。而在pH4以下，pH 8以上，活性显著下降，pH₅时，酶几乎完全丧失活性。

(4) 酶的K_m值,

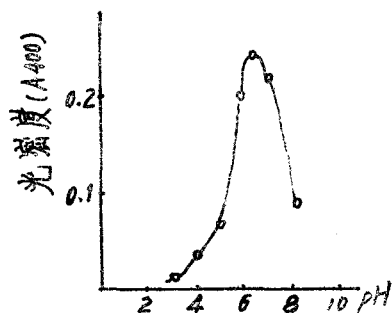


图 11 pH对柞蚕丝腺多酚氧化酶活力的影响。各pH缓冲液5ml, 酶液0.2ml邻苯二酚0.5ml, 17°C, 5分钟。

图 12 表示以邻苯二酚为底物时, 测得的柞蚕多酚氧化酶的 k_m 值为 $6.4 \times 10^{-3}M$ 。显示邻苯二酚是酶的良好作用底物。

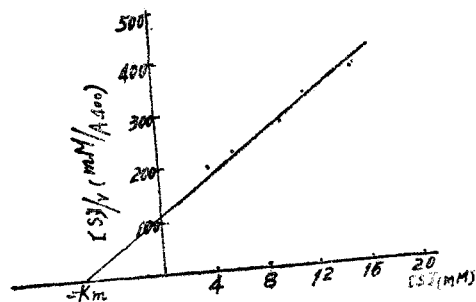


图 12 以邻苯二酚为底物的 $[S] - [S]/V$ 作用

三、讨论

食品贮存和加工中常伴随着褐变的过程。酶促褐变的主要原因是食品中存在着醌类物质, 在水和氧的存在下, 食品内的多酚氧化酶的催化下, 它们迅速被氧化聚合, 并发生褐变。动植物内存在的多酚氧化酶有漆酶^[7]、酪氨酸酶(儿茶酚氧化酶)^[8]、香蕉果皮多酚氧化酶^[9]等等, 它们都能催化食品的褐变反应。然各种多酚氧化酶的底物专一性却有不同。表 2 中的柞蚕多酚氧化酶与其它来源的多酚氧化酶比较, 具有更广泛的底物作用能力。该酶很可能是酪氨酸酶和漆酶的复合酶系, 这种酶系在某些植物中是存在的^[7]。

Brunet 认为柞蚕体内的生色物质是龙胆酸葡萄糖苷, 经 β -葡萄糖糖苷酶水解产生龙胆酸, 再氧化聚合成生色物质。本研究对柞蚕生色物质的水解, 荧光特性、紫外吸收光谱和一些化学显色反应的研究得到与 Brunet 的实

表 2 柞蚕丝腺多酚氧化酶和一些已知的多酚氧化酶底物专一性比较

底物	邻苯二酚	间苯二酚	对苯二酚	对甲酚	酪氨酸
酶					
酪氨酸酶	+	-	-	+	+
荔枝果皮多酚氧化酶 ^[10]	+	-	+	-	-
漆酶	+	-	+	-	-
香蕉果皮组织多酚氧化酶	+	-	-	-	-
柞蚕丝腺多酚氧化酶	+	-	+	+	+

注: +代表有反应, -代表无反应

验相似的结果。而合成龙胆酸并不能被柞蚕多酚氧化酶氧化, 这似乎表明龙胆酸并不是柞蚕体内的色变物质。而邻苯二酚、对苯二酚、对甲酚等能有效地被该酶催化变色, 因此参与柞蚕色变过程很可能是这些化合物或它们的衍生物。这些物质在柞树叶中是普遍存在的。

通常认为, 植物果实如马铃薯^[11]、香蕉、荔枝、鸭梨^[12]均能直接发生酶促褐变反应。而在柞蚕体内, 醌类物质因具有较高的毒性, 通常是以相应的无毒的糖苷存在。在多酚氧化酶作用之前, 糖苷必需先在 β -葡萄糖糖苷酶催化下水解成糖和醌, 而后再在多酚氧化酶作用下氧化聚合, 发生色变。这与植物的色变单纯由多酚氧化酶催化有所不同。

柞蚕体内的 β -葡萄糖糖苷酶不能像苦杏仁酶那样完全水解柞蚕体内的各种生色物质的糖苷。若杏仁是包括 α 、 β 葡萄糖糖苷酶、 α 、 β 半乳糖糖苷酶等的复合酶。这似乎表明柞蚕内除含有 β -葡萄糖糖苷外, 还可能含有其它糖苷。

柞蚕体内的生色物质通过上述二酶的连续催化才能产生生色反应, 因此在对生色反应的控制研究中, 可从抑制上述二酶活性上综合加以考虑。

自然界中的色变作用除酶促褐变外, 还存在非酶褐变^[13]。如酶一炭反应、抗坏血酸褐变等。本研究发现, 邻苯二酚、对苯二酚在近中性溶液中, 在氧的存在和室温条件下也能缓慢地发生非酶褐变。所以考虑动植物组织的褐变作用时, 除酶促褐变外, 还需重视其它非酶褐变存在可能性的研究。

参考文献

- [1] Brunet, P. G. J and Barbara, C. Coles, 1974: *Proc R. Soc. Lond. B*, 187, 133—170.
- [2] Agrawal, K. M. L. and Bahl, O. P., 1968: *J. Biol. Chem.*, 243, 103~111.
- [3] Gatt, S. and Rapport, M. M., 1966: *Biochem Biophys Acta.*, 113, 567~576.
- [4] Guilbauf, G. G., 1976: *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis*, pp. 113.
- [5] 上海科技大学生物工程研究室“NAG技术鉴定会”资料(1983)
- [6] Nelson, J. M. and Dawson, C. R., 1944: *Adv Enzymol.*, 4, 99~152.

- [7] Dawson, C. R. and Tarpley, W. B., 1951: In *The Enzymes*, edited by J. B. Sumner and K. Myrback 1st. Ed., Vol: II, pt. 1 pp. 454~498
- [8] Smith, J. L. and Krueger, R. C., 1962: *J Biol Chem.*, 237, 1121~1128.
- [9] 林哲甫, 张维钦, 1965: *植物生理学报*, 2, 94~103.
- [10] 李明启, 严君灵, 1963: *植物学报*, 11, 329~336.
- [11] 袁振远, 杨李益, 1985: *食品科学*, No1, 4~9.
- [12] 中国科学院北京植物研究所鸭梨黑心病研究小组, 1974: *植物学报*, 16, 236~241.
- [13] 天津轻工业学院, 无锡轻工业学院, 1981: *食品生物化学*, pp368~383.

蜂蜜酿酒机理探讨

安徽省分析测试中心 夏邦旗

蜂蜜酒的生产, 方兴未艾。目前我国许多地方陆续兴建了蜜蜂酿酒厂, 但由于技术落后, 又缺乏完备的检测手段, 从而产品质量相形见绌; 而且科研又落后于生产。科研工作仅从实践、经验出发对生产工艺、产品结构进行改进性研究; 而从理论角度对蜂蜜酒在酿造过程中主要成份(糖份、蛋白质和氨基酸)的变化进行分析。笔者通过对三种成份的变化研究, 为提高产品质量和制定蜂蜜酒质量标准, 做一点有益的工作, 不妥之处, 恳切希望同行们予以指正。

酿造中糖份、蛋白质和氨基酸的变化:

蜂蜜内含有许多营养成份, 其中主要是糖份、蛋白质和氨基酸。蜂蜜的质量好坏, 直接影响着酒的风味和质量。蜂蜜内主要成份含量是: 碳水化合物 79.59%, 含氮物 0.26%^[1], 氨基酸含量少^[2]。蜂蜜酒内的蛋白质、糖份和氨基酸含量(以北京西山酒厂的蜂蜜酒为例)分别为 0, 9.19 克/100 毫升和 1.56 克/升^[3]。蜂蜜在酿酒过程中蛋白质、糖份和氨基酸的变化如下:

糖份的变化: 蜂蜜中碳水化合物包括果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖及其他还原性双糖

和多糖^[4]。发酵中参加反应的是单糖, 多糖经过酵母胞外酶——果胶酶的酵解作用生成单糖后, 才能被微生物吸收利用。糖份变化分三个阶段进行:

(1) 前发酵阶段: 该过程糖份主要是提供酵母大量繁殖时需要的能量。

(2) 主发酵阶段: 糖份在酵母作用下, 生成酒精。它是蜂蜜酿酒的主要反应阶段, 同时也为酵母繁殖提供少量能量。

(3) 后发酵阶段: 酵母死亡, 剩下的少量糖份, 反应停止。残余的糖份一般控制在 1% 以下为最好。

2. 蛋白质的变化。蜂蜜内含蛋白质很少, 不利于酵母繁殖, 繁殖力不强, 需适当补充氮源。含蛋白质多也不利, 常常会导致蜂蜜酒发生沉淀, 故蜂蜜酒内不含蛋白质。具体变化可以归纳三个方面:

<1> 提供酵母繁殖时需要的氮源。(酵母是异养型微生物, 它不能直接利用蛋白质, 必须把蛋白质分解成蛋白胨、蛋白膘, 多肽和氨基酸等, 才能利用)。

<2> 在酵母酶促。作用下分解成肽和氨基酸。