

#### 参考文献

- 〔1〕 渡边笃二等：新蛋白食品知识，1987。
- 〔2〕 清水良等：京大食研报，23，1—8，1960。
- 〔3〕 横山理雄：各种淀粉对肉粘着力的影响，日水志，

41，1197—1201，1975。

- 〔4〕 D.M.W. Anderson, C.T. Greenwood, and E.L. Hirst, J. Chem. Soc., 225, 1965。
- 〔5〕 清水潮等：软罐头食品生产的理论与实际，1986。
- 〔6〕 张弘等：食品科学，4，35—37，1987。

## 抗坏血酸衍生物抑制蘑菇的多酚氧化酶

### 引言

生果蔬的酶褐变主要由天然的酚化合物转换成醌，醌再聚合成褐、红或黑的色素所致。通常参与这一系列反应的是多酚氧化酶(PPO)，但也有认为是酪氨酸酶，儿茶酚酶，甲酚酶和酚酶。在合适的pH、温度和水活性条件下，酚的基质、PPO和氧气聚合一起时则发生褐变。许多果蔬由于切割、去皮或碰、压等方式使细胞受到损伤时都会促使酶褐变。果蔬的老化或病变也会引起酶褐变。对于新鲜的或加工的果蔬，酶褐变都会带来不利的颜色和风味。除了外观质量受到影响，它还使诸如抗坏血酸之类的果蔬营养遭到破坏。

由于酶褐变给果蔬造成有害影响，因此在寻找消除或者至少推迟酶褐变的途径方面做过许多研究。在理论上存在着多种手段解决问题，但是对果蔬工业最有实用价值的是减少PPO使酚氧化形成的醌得到还原，也就是抑制PPO，使PPO失活。还原剂(如抗坏血酸、巯基丙氨酸和二氧化硫)使O—醌还原成其前身O—酚。但是这类还原剂的作用是暂时的，因为它们本身在O—醌还原过程中被氧化，而且氧化过程不可逆。使用还原剂还会产生影响果蔬风味的氧化物。过去常用的还原剂亚硫酸盐对人体健康不利，需要重新审定。食品中天然存在的硫氢基化合物(如巯基丙氨酸)含量较高时，会与O—醌反应形成无色硫醚。但在食品中这类化合物真起作用的情况只是少数。

因为抗坏血酸(AA)在其用量范围内是无毒化合物，所以广泛用于抑止果蔬的酶褐变。AA抑制PPO的过程复杂。Golan-Goldhirsh等

(1984)已证实蘑菇的PPO与O—二羟基苯酚反应抑止了褐色形成。通常认为AA抑制机理是O—醌还原为酚的基质。Varoquaux等(1979)提出AA既不能抑制酶也不能激活酶。与此相反，其它报告(Baruah等，1953; Ponting, 1954)认为AA直接与PPO发生相互作用。这些结果未说清楚酶失活的机理。Golah-Goldhirsh等(1985)认为AA与PPO发生K—型相互作用。由于这种类型的抑止作用，反应产物与酶反应形成共价的酶衍生物，这种酶衍生物是没有活性的。

尽管在选用抑止新鲜果蔬褐变的物质时，首先是AA，它的缺点是不稳定。因此需要进一步寻找其它AA衍生物，要求防褐变效果好而且稳定。人们对两种AA衍生物最感兴趣，即抗坏血酸2—磷酸盐(AA-2-PO<sub>4</sub>)和抗坏血酸-2—硫酸盐(AA-2-SO<sub>4</sub>)。因为这两种AA衍生物经过酶作用转换成AA的时间极短，可看成是AA的瞬间释放源。

为了证实AA使PPO失活的机理是Cu<sup>2+</sup>还原为Cu<sup>+</sup>，研究中用了电子顺磁共振谱(EPR)。此外还测了脱氢抗坏血酸(dehydro AA)、异抗坏血酸(iso AA)，AA-2-PO<sub>4</sub>和AA-2-SO<sub>4</sub>对PPO活性的影响，确定了它们抑止PPO的效果。研究了由AA-2-PO<sub>4</sub>和AA-2-SO<sub>4</sub>转换成AA来控制PPO活性的可能性。通过以上研究为采用AA衍生物控制新鲜果蔬的酶褐变创造了条件。

### 材料和方法

一、材料 蘑菇的PPO，酸性磷酸酶和硫酸酯酶，L-DOPA(二羟苯丙氨酸；多巴)，脱

氢抗坏血酸, 异抗坏血酸和抗坏血酸-2-硫酸盐由Sigma化学公司供应。L-抗坏血酸由Aldrich化学公司供应。抗坏血酸-2-硫酸盐由堪萨斯州立大学Paul A. Seib博士赠送。

二、PPO测定 通常用分光光度法测PPO活性(Hsu等, 1984)。取反应介质的2ml等分试样(充满氧气)进行标准测定。这反应介质是在50mM磷酸钠(pH6.8)中包含0.25mM DOPA和20 $\mu$ g蘑菇PPO。反应在加入基质后开始。利用Beckmann26型分光光度计自动记录在419nm的吸收随时间变化关系。所有数据至少由三次实验平均得到。

三、酶-抑制剂孕育 如果抑制剂(AA, dehydro AA iso AA, AA-2-PO<sub>4</sub>和AA-2-SO<sub>4</sub>)没有与PPO预孕育过, 则在PPO中加基质前先将抑制剂加进去, 反应如上述方式进行。每种抑制剂的浓度在图表中给出。为研究抑制剂预孕育对PPO活性的影响借助定速摇床使抑制剂在无基质情况下与酶孕育。经一定的时间间隔取出等分试样, 如上所述, 加入基质后反应即开始。根据加入基质10分钟后的试样在419nm的吸收变化确定PPO活性。

四、用酸性磷酸酶或硫酸酯酶消化AA-2-PO<sub>4</sub>或AA-2-SO<sub>4</sub>: 将50微克分子AA-2-PO<sub>4</sub>加到含0.6~1个单位的酸性磷酸酶的乙酸纳(0.15M, pH5.0)或磷酸纳(0.05M, pH6.8)缓冲液中。混和物在25°C或37°C下孕育一定时间(以0至3小时)。用Howritz(1965)方法测定生成的抗坏血酸量。用硫酸酯酶消化AA-2-SO<sub>4</sub>时, 孕育条件与前面相同, 只是硫酸酯酶用量为15个单位。

五、电子顺磁共振谱测定 利用带有频率计数器和测量系统的电子顺磁共振谱仪(E109 B型), 于冰点以下测溶液试样的铜离子(Cu<sup>2+</sup>)浓度(Himmelright等, 1980)。谱仪的共振器配备自动调温系统, 可控制样品温度在77K到室温或者更高的范围。

### 结果和讨论

AA对于含DOPA和蘑菇PPO的水溶液变

褐的影响与AA浓度有关。取各组分混合在一起的时刻为时间零点, 则形成颜色前的滞后时间随着AA浓度增加而变长。溶液在15分钟后的褐变程度随AA增加而减弱。Golan-Goldhirsh等(1984)同样报导过褐变滞后时间随AA浓度增加而延长。当AA浓度为0.5mM时, 它完全抑制褐色素形成可长达几个小时。对于AA和AA的四种衍生物, 各取其0.25mM溶液与DOPA和蘑菇PPO一起孕育, 分别测出它们抑止PPO的效果, 在图1进行了比较。AA推迟褐色素形成的效果与iso AA相当, Dehydro AA的效果比AA差。AA-2-SO<sub>4</sub>和AA-2-PO<sub>4</sub>未曾见效, 即使将浓度提高到5mM也不管用。这种结果并不意外, 因为体系中不存在将AA衍生物水解成AA的磷酸酶或硫酸酯酶。AA, iso AA和dehydro AA推迟褐变效果比较恒定, 滞后时间至少为8至10小时。AA-2-SO<sub>4</sub>和AA-2-PO<sub>4</sub>与对照相比都不能推迟褐色形成。开始时, AA和iso AA抑止褐变比dehydro AA有效, 但在1小时以后, dehydro AA的效果变得稍佳, 而且在整个孕育期间更显稳定。

AA, isoAA和dehydro AA对蘑菇PPO的影响完全不可逆。如果PPO与这些抑止剂的孕育时间不到1小时。那么其活性可保留到90%。但若孕育时间是8至10小时, 则PPO要失活一半或更多。Ponting(1954)的结果与我们相反, 他认为从苹果或蘑菇中分离出来的PPO受AA作用的失活过程可逆。

表1给出用AA, dehydro AA和iso AA分别与PPO作过预孕育处理对抑止效果的影响, 并与未预孕育体系进行了比较。在未预孕育情况下, AA使PPO失活效果最佳(I<sub>1/2</sub>, 0.04mM)而iso AA和dehydro AA的效果差些(I<sub>1/2</sub>分别为0.25mM和7.5mM), 如果先有预孕育处理, AA-2-SO<sub>4</sub>和AA-2-PO<sub>4</sub>对PPO活性仍不起作用, 其它抑止剂在预孕育2或3小时后使PPO失活50%左右。dehydro AA的效果显得更好些。在类似的实验条件下, Golan-Goldhirsh等(1984)的结果是5mM AA在130分钟后减少PPO活性50%。

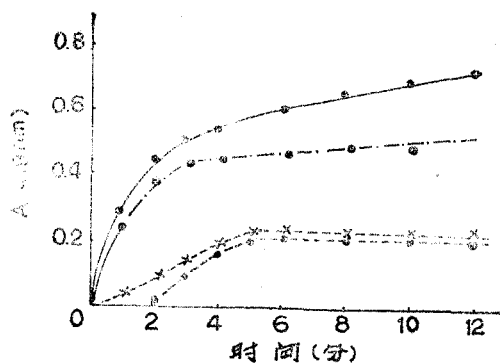


图1 抗坏血酸衍生物抑制蘑菇PPO效果比较 AA (●.....), iso AA (●---●), dehydro AA (●---●), AA-2-PO<sub>4</sub> (●---●), AA-2-SO<sub>4</sub> (●---●) 在 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH6.8) 中含 20μg 蘑菇PPO 和 0.25mM DOPA, 再分别加入各种抑制剂 (浓度 0.25mM) 于 25°C 孕育。在相同条件下但不加抑制剂作为对照 (●---●), PPO 活性用分光光度法 (419nm) 测定。

#### 在含DOPA和蘑菇PPO体系中各种酶褐变

表1 抑制剂的比较

变量 <sup>b</sup>	AA	isoAA	dehydroAA	AA-2-PO <sub>4</sub>	AA-2-SO <sub>4</sub>
t <sub>1/2</sub> (小时)	2.50±0.10 <sup>c</sup>	3.10±0.11	1.90±0.10	Nd	N
I <sub>1/2</sub> (mM)	0.040±0.002	0.250±0.001	7.500±0.370	N	N

a AA=抗坏血酸, isoAA=异抗坏血酸, dehydroAA=脱氢抗坏血酸, AA-2-PO<sub>4</sub>=抗坏血酸-2-磷酸盐, AA-2-SO<sub>4</sub>=抗坏血酸-2-硫酸盐

b t<sub>1/2</sub>=用 0.25mM 抑制剂使蘑菇PPO失活50%需要孕育的时间 (DOPA基质加入到体系前的时间)

I<sub>1/2</sub>=将对照样品产生的褐变量减少一半需用的抑制剂浓度 (在加基质前抑制剂未与蘑菇PPO预孕育)

c 标准偏差

d 没有测到

Golan-Goldhirsh等(1984)曾测过AA对蘑菇PPO活性的影响,他们认为AA对PPO有独特效果,并指出AA在孕育初期显得更具反应性。本研究根据PPO的Cu<sup>2+</sup>还原成Cu<sup>+</sup>说明AA对PPO有直接作用(图2)。图2a所示的PPO电子顺磁共振谱(EPR)具有180高斯左右的超精细结构。在g=2.00区域存在两个组分,这与Bouchilloux等(1963)的报导类似。在他们的研究中由EPR测到PPO的正铜和亚铜形式,但是由EPR并不能说明Cu<sup>2+</sup>还原为Cu<sup>+</sup>是抗坏血酸起的作用。不过根据2',2'-二喹啉吸收发生变化的初步实验表明抗坏血酸有可能使PPO的

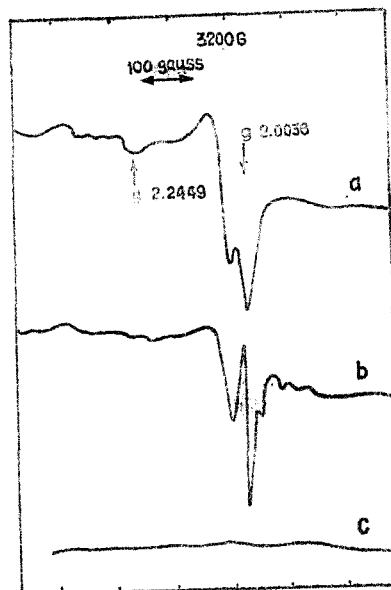


图2 在有或无抗坏血酸情况下多酚氧化酶的电子顺磁共振谱

(a) 磷酸钠缓冲液 (50mM, pH6.8) 中含 PPO (10mg/ml)

(b) 与谱(a)条件相同,但添加10mM抗坏血酸钠

(c) 仅有磷酸钠缓冲液 (50mM, pH6.8)

铜还原。这些资料表明不是存在着一种以上的Cu<sup>2+</sup>接合点就是存在着自由基。当PPO溶液中含抗坏血酸钠时,EPR谱也出现正铜信号,但是自旋密度减少,如图2(b)所示。在g=2.00区域的共振峰强度增大表明可能形成自由电子一类的自由基,g值是2.0023。我们的数据说明与PPO有关的正铜由于添加AA发生还原作用。

如前面图1所示,在只含DOPA和蘑菇PPO的体系中,AA-2-PO<sub>4</sub>和AA-2-SO<sub>4</sub>不能推迟褐变。这些AA衍生物本身没有活性,但它们可以作为AA的源库渐渐释放出AA,这是因为在生果蔬中含有断开磷酸盐或硫酸盐的基因必需的磷酸酶或硫酸酯酶。通过各种pH值和温度的条件试验,得到AA-2-PO<sub>4</sub>转化成AA的最佳条件是pH6.8和25°C。经过2小时孕育约有2% AA-2-PO<sub>4</sub>转化为AA。但是在类似条件下,硫酸酯酶不能将AA-2-SO<sub>4</sub>转化为AA。即使取硫酸酯酶的浓度比磷酸酶的高,在最佳条件 (pH 5.0, 25°C) 下也只有极少量AA-2-SO<sub>4</sub>转化为AA。这表明AA-2-SO<sub>4</sub>作为硫酸酯酶的基质是

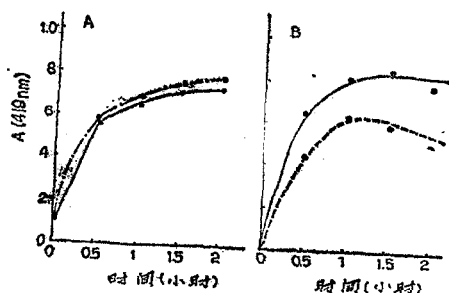


图 3(A)硫酸酯酶(B)磷酸酯酶对AA-2-SO<sub>4</sub>和AA-2-PO<sub>4</sub>抑制蘑菇PPO活性的影响。  
对照实验(●—●)包含20μg蘑菇PPO, 0.5mM AA-2-SO<sub>4</sub>或AA-2-PO<sub>4</sub>与0.5mMDOPA。  
在孕育零时刻对照样品中添加3个单位的硫酸酯酶(●...●)或磷酸酯酶(○...○)以测定它们对蘑菇的影响。

比较差的。在含 DOPA, PPO和AA-2-PO<sub>4</sub>或AA-2-SO<sub>4</sub>的体系中加入磷酸酯酶或硫酸酯酶的影响由图 3 给出。体系中存在磷酸酯酶时, AA-2-PO<sub>4</sub>能减少褐色素, 这大概是AA-2-PO<sub>4</sub>水解产生AA的缘故。在含硫酸酯酶和AA-2-SO<sub>4</sub>体系中没有观察到褐色素减少, 这与上述关于AA-2-SO<sub>4</sub>是硫酸酯酶弱基质的结论吻合。

本文的结果表明AA抑止蘑菇PPO的机理与过去的认识不同。此外, 我们还提出有可能用AA-2-PO<sub>4</sub>代替AA作为食品褐变的抑止剂。

丁连忠译自J. of Food Science, Vol.53 No. 3, 1988 P765—767

## 提取果胶新工艺——盐析法

陈 策 岐

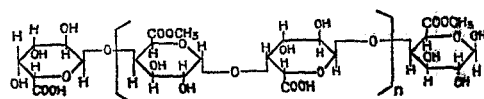
**提要:** 目前国内果胶生产由于多种原因停止于中试水平, 未能工业化, 主要原因产品成本高, 原材料燃料消耗量太高所致。本文试图从果胶生产的新工艺——盐析法试验中探索出生产效率高, 原辅材料消耗较低, 节约能源, 成本较低的有效方法, 使果胶生产效益较高, 能获得进一步发展。

### 一、概述:

果胶是一种胶体物质, 它以原果胶形式存在于植物细胞壁中, 使细胞粘结在一起, 由水溶性果胶和纤维素结合而成不溶于水的成分, 未成熟水果所以组织坚实, 就是因果实细胞壁中有原果胶存在之故, 随着果实不断生长成熟原果胶在酶作用下逐渐分解为(水溶性)果胶酸和纤维素。而果胶酸再在酶作用下继续分解为低分子半乳糖醛酸和α—半乳糖醛酸, 因而果皮不断变软变薄, 原果胶含量日益减少, 原果胶在水和酸中加热, 可分解为水溶性果胶酸。

果胶分子结构尚未完全清楚, 通常认为果胶酸是由很多α—半乳糖醛酸的1位C和4位C经氧桥连接而成链状化合物, 其部份羧基的甲酸所酯化, 所以水溶性果胶酸含有甲氧基

(或称甲基化)的α1, 4多半乳糖醛酸也称多半乳糖醛酸甲酸, 结构式如下:



果胶分子为链状结构, 分子量为5~20万属于直链多糖其部份羧基与甲基酯化[—COOH→COOCH<sub>3</sub>]游离基很容易被钠、钾或铵离子中和。

酯化的半乳糖醛酸对总的半乳糖醛酸的比值称为酯化度, 简称DE, DE值对果胶性能极为重要, 一般从天然原料提取出来果胶DE值为50~75%。各种类型果胶DE值控制在20~70%, 商品果胶以DE值50%区分为高甲氧基和低甲氧基果胶界线。完全甲基化的果胶, 甲氧基含量高达16.3%, 甲氧基含量在7%以上称高甲氧基果胶, 甲氧基含量在7%以下为低甲氧基果胶。

果胶为白色无定形物质, 能溶解于水成为乳浊状胶体溶液, 不溶于乙醇, 在果胶液中加入适量乙醇, 果胶即沉淀析出, 目前一般生产