

愛玉瘦果中果膠脂酶抑制劑之分離、理化性質探討及其在果汁加工上之可能性應用
Isolation and Characteristic studies on pectinesterase inhibitor from Jelly fig (*Ficus
awkeotsang* Makino) achenes as well as its possible applications on juice processing

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-185

執行期限：民國 89 年 8 月 1 日起至民國 90 年 7 月 31 日止

主持人：張鴻民教授 臺灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

本研究目的在分離愛玉子 PEI，並進行成分鑑定以探討不同反應條件之下，PEI 抑制 PE 作用的情形，瞭解其特性，並根據酵素動力學的研究判斷其抑制型式；最後將愛玉子 PEI 作用於不同來源之 PE，以探討其廣效性，同時添加於新鮮的混濁果汁中，觀察愛玉子 PEI 於真實系統中抑制 PE 作用，以維持果汁混濁安定性之功效。結果顯示，經由 Sephadex G-50 分離而得的愛玉子 PEI，不具有醣蛋白的反應，而是一耐熱性的小分子蛋白質，分子量介於 3500~4500 Da 之間。胺基酸的組成以帶正電荷的胺基酸最多，Lys、Arg 及 His 共 3.52 nM，顯示其為一高 pI 的蛋白質；此外，極性或親水性的胺基酸如 Ser、Thr、Tyr 及 Gly 含量亦高，共 1.26 nM，故極具有親水性。理化性質方面，發現不同的反應溫度(4~90°C)均不會影響愛玉子 PEI 對於柑桔 PE 及愛玉子 PE 的抑制作用；不同的反應 pH(3~10)不會影響 PEI 對於愛玉子 PE 的抑制作用，但是對於柑桔 PE 的抑制作用則以中性 pH 範圍(pH 5~7)效果最強，在 pH 9~10 效果較差；至於不同的果膠基質 pH 值(pH 3~7)之影響，則是隨著基質 pH 提高，愛玉子 PEI 的抑制作用逐漸增強。單價鹽類如 NaCl、KCl 的存在均不會影響愛玉子 PEI 對於柑桔 PE 及愛玉子 PE 的抑制作用，但 CaCl₂ 及 MgCl₂ 兩種鹽類的添加(5~500 mM)則會增強 PEI 的抑制作用。glucose、galactose 兩種醣類也不會影響愛玉子 PEI 對於柑桔 PE 及愛玉子 PE 的抑制作用，而 fructose 及 sucrose 則隨

著添加濃度(10~30%)的提高使 PEI 對 PE 的抑制作用降低。根據酵素動力學的研究結果經由迴歸公式的計算，可得到柑桔 PE 之 $V_{max} = 0.92 \mu \text{ eq } -\text{COOH}/\text{min}$ ， $K_m = 2.22 \text{ mM } -\text{OCH}_3$ ；愛玉子 PE 之 $V_{max} = 1.09 \mu \text{ eq } -\text{COOH}/\text{min}$ ， $K_m = 0.78 \text{ mM } -\text{OCH}_3$ 。動力學的變化結果顯示，在基質濃度為 0.1~2.5 mM $-\text{OCH}_3$ 的測試範圍內，柑桔 PE 及愛玉子 PE 與不同濃度的愛玉子 PEI 作用時，PEI 濃度(0.5 mg/mL、1 mg/mL)的提高並不會改變 PE 的 V_{max} ，但會使 K_m 逐漸增加，再觀察 Lineweaver-Burk 圖形後得知，愛玉子 PEI 對於 PE 是屬於競爭型(competitive)的抑制作用。愛玉子 PEI 能夠抑制不同來源包括番茄、蘋果、木瓜、芭樂、柳橙、鳳梨、豌豆莢、龍鬚菜之 PE，但抑制作用則不盡相同，對於番茄、蘋果、龍鬚菜及芭樂 PE 的抑制效果較高，可達到 60~70% 的抑制效果，對於柳橙、木瓜、豌豆莢 PE 也有 30~50% 的抑制效果，但對於鳳梨 PE 的抑制作用較低，只有 7% 的抑制效果。愛玉子 PEI (0.29 U/mg) 添加於兩倍稀釋的果汁中(1:10, v/v)，在 4 °C、12 週的儲存期間，能夠長時間有效的降低番茄汁、蘋果汁、木瓜汁及芭樂汁的混濁度損失率(cloud loss %)，其中木瓜汁及芭樂汁能達到與加熱組相同的效果，顯示其在果汁加工上應用的潛力；而應用在柳橙汁及鳳梨汁的效果上則較差，但仍能長期的減少果汁的混濁度損失率，故愛玉子 PEI 添加於果汁中，確實能維持果汁的混濁安定性。

關鍵詞：愛玉子，果膠脂酶抑制劑，競爭性抑制，混濁度損失率

Abstract

Pectinesterase inhibitor (PEI) in jelly-fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes were isolated to understand its chemical composition, physical and chemical properties, and, most importantly, the inhibition mode on pectinesterase (PE). Practical application of PEI in the prevention of cloud loss of juices during storage was also conducted. PEI from jelly-fig achenes were applied on a Sephadex G-50 chromatography, and the collected bio-active fractions were approved to be proteins, determined by a native electrophoresis, with molecular weights ranging from 3500-4500 Da, determined by a Sephadex G-50 chromatography. High content (3.52 nM) of basic amino acids such as Lys, Arg and His provided PEI a high pI. In addition, PEI also contains 1.26 nM polar and hydrophilic amino acids such as Ser, Thr, Tyr and Gly. Partially purified PEI (0.61 U/mg) by Sephadex G-50 chromatography appeared to be highly heat resistant (4-90°C) when reacted with citrus PE and jelly-fig PE. Variation in pH value influenced insignificantly on the interactions between PEI and jelly-fig PE, while influenced remarkably on that between PEI and citrus PE, specially at pH 8-9. pH value (pH 3-7) in pectin medium apparently suppressed the PEI-PE reaction, which became more remarkable at the increasing pH (> 7) in pectin medium. Presence (50-500 mM) of

NaCl or KCl did not affect apparently the PEI-PE interaction. However, addition of CaCl₂ or MgCl₂ to the pectin solution enhanced the PEI-PE interaction markedly. Monosaccharide such as glucose and galactose at a concentration up to 30 % did not influence the inhibitory reaction of PEI on either citrus PE or jelly-fig PE. However, increase in fructose or sucrose level (10-30 %) apparently reduced the inhibition of PEI on PE. Studies of PEI on the PE kinetics revealed that V_{max} and K_m of citrus PE was 0.92 μ eq -COOH/min and 2.22 mM -OCH₃, respectively, while those of jelly-fig PE was 1.09 μ eq -COOH/min and 0.78 mM -OCH₃, respectively. Through the interaction between PE and PEI, it was found that V_{max} was a constant value and independent on the PEI level used. However, K_m increased in the increasing PEI level. Lineweaver-Burk plots of $1/[S]$ (mM -OCH₃)⁻¹ against $1/V$ (μ eq -COOH/min)⁻¹ suggested that PEI exhibited competitive inhibition on PE activity. PEI from jelly-fig achenes inhibited extensively on PE from tomato, apple, guava, asparagus (60-70 % inhibition), papaya, orange, pea pod (30-50 % inhibition) and pineapple (7 % inhibition). Besides, addition of PEI (0.29 U/mg) to two-fold diluted juices (1 : 10, v/v), using 0.1 % Na-benzoate as preservative, remarkably reduced the cloud loss (%) during the storage at 4°C for 12 weeks. Among the juice tested, cloud loss of papaya juice and guava juice added with PEI was closed to that of both juice with pasteurized treatment, revealing the potential utilization of PEI on juice processing.

Keywords: (*Ficus awkeotsang* Makino),

Pectinesterase, competitive inhibition, cloudy loss

二、緣由與目的

愛玉子之學名為 *Ficus awkeotsang* Makino, 簡稱 jelly-fig, 於 1904 年由日本人牧也富太郎(T. Makino)在嘉義下打貓地區採得標本。愛玉子植物型態及其隱花果生活史簡介愛玉子(jelly-fig) (*Ficus awkeotsang* Makino)屬於桑科(Moraceae), 是台灣特有的多年生常綠木質藤本植物, 據台灣通史農業誌之記載, 愛玉子產於嘉義後大埔(即今曾文水庫之大埔地區), 目前大多分佈於海拔 800~1800 公尺之間。

2. 愛玉子 PE 活性變化

愛玉子瘦果有 98 % 的 PE 活性存在於瘦果的外果皮(pericarp)中, 種子中僅有 2 % 之 PE 活性。位於外果皮之 PE, 要經後熟才會誘導其發生, 空氣和水是後熟誘發產生 PE 的重要條件(Lin et al., 1990)。

3. 愛玉子 PE 之理化性質

愛玉子 PE 分子量約為 38 kDa (Lin et al., 1989)或 42 kDa (Komae et al., 1990)由一條 peptide 鏈所構成的單體。目前所知無論是什麼來源 PE 均為單體。愛玉子 PE 之 pI 為 3.5 (Lin et al., 1989)或 4.5 (Komae et al., 1990)。目前所知高等植物來源之 pI, 大多為 pH 9~10, 只有愛玉子 PE 為低 pI 之酵素。

愛玉子 PE 大部分存在瘦果之果皮上, 以 4 % NaCl 經 24 小時的萃取有最佳的 PE 萃取效果(Lin et al., 1989)。愛玉子 PE 之最適作用 pH 為 6.5~7.5, 提高鹽濃度可提高愛玉子 PE 活性, 並使愛玉子 PE 對 pH 值的適應範圍擴大。愛玉子 PE 具有相當高之熱穩定

性, 於 60°C 下保溫 10 分鐘後活性幾乎不變。在安定性方面, 愛玉子 PE 萃取液在 4°C 下保存一年, 仍保有 100 % 之活性。另外, 半乳糖醛酸(galacturonic acid)對於許多來源之 PE 均有強烈的抑制作用, 但對於愛玉子 PE 之抑制, 則不若其他來源 PE 之強烈(Lin et al., 1989)。

四、愛玉凍凝膠原理與性質

愛玉凍是將愛玉乾瘦果刮取之後, 置於布袋中於約 60 倍水(如一般自來水等含有礦物質之水)的容器中, 以手搓洗約 10 分鐘, 使瘦果表面所含之果膠及 PE 溶出, 再靜置後所得之凝膠體。黃等(1980)首先提出愛玉凍凝膠的原理, 是將愛玉子溶出之高甲氧基果膠經其內部所含之 PE 作用成為低甲氧基果膠, 此一低甲氧基果膠分子上游離的羧基, 再進一步與水中之二價陽離子如鈣等形成交互聯結(cross linking), 逐漸形成網狀結構而產生凝膠。李(2000)對於愛玉凍凝膠性質進行了一系列的研究, 結果發現影響愛玉凍凝膠品質之因素有愛玉瘦果中 PE、PG、PAL 等酵素活性, 以及果膠含量、果膠分子量、果膠酯化度(DE 值)及 PEI 活性等, 並認為 PE 活性為最重要的影響因子。

五、愛玉子果膠酯酶抑制劑

愛玉子果膠酯酶抑制劑存在之探討

製作愛玉凍時經常失敗, 即使加水比例正確也常有不凝膠或凝膠過軟的情形, 其可能原因是搓洗時間過短致使果膠濃度太低, 或搓洗過度導致部分種子破裂, 使內部某種物質溶出所致。林(1991)在愛玉子專論一書中提到, 若將愛玉子磨碎後萃取其蛋白質, 則萃取液沒有 PE 活性, 因此推測種子內可能含有某種 PE 抑制物質。賴(1998)證實愛玉子中確實含有能抑制 PE 活性之物質, 將

愛玉子與 4 %食鹽水以 1 : 15 (w/v)的比率加以攪拌，在 0~10 小時之攪拌過程中，PE 活性逐漸增加，在 12~13 小時時活性達到最高 (11~12 U/mL)，此後酵素活性開始逐漸降低，至 90 小時則僅剩 0.2 U/mL。且從攪拌初期至結束，愛玉子 PE 活性均無顯著變化。據此，初步推測愛玉子 PEI 應存在於愛玉子之內部。

愛玉子果膠酯酶抑制劑基本性質

賴(1998)發現此抑制劑極為耐熱，在沸水中加熱 1 小時後仍有 95 %以上之 PE 抑制活性。另外，此抑制劑不僅對愛玉 PE (低 pl 之 PE)具有抑制活性，而且對於豌豆莢 PE (高 pl 之 PE)也具有幾乎相同之抑制效果，顯示愛玉子 PEI 在果汁加工業上之應用極具開發潛力。李(2000)進一步探討愛玉子 PEI 之基本性質，發現在抑制劑的萃取上，隨著萃取液中所添加的鹽濃度提高，會使抑制劑的萃取率降低，因而推測可能是因為抑制劑以某種疏水性引力，吸附於種子內部之物質所致。若將愛玉子 PEI (1.1 U/mL)與愛玉子 PE (1.2 U/mL)以 1 : 1 (v/v)比例混合，放置不同時間後測 PE 殘存活性，結果在 1 分鐘內，PE 相對活性只剩 16 %; 10 分鐘後，便已抑制 95 % 活性。因此可知抑制劑對 PE 的結合頗為快速(李，2000)。李(2000)將愛玉子 PEI 以 Sephadex G-25 配合 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)進行膠濾層析分離，初步推算其分子量約 2000~3000 Da，因其在 280 nm 下有吸光，故推測為一種含氮且含苯環(aromatic ring)的化合物，但其詳細的組成與特性均有待進一步的研究。

結果與討論

查、愛玉子 PEI 之分離純化

一、PEI 活性表示法

根據 Lee 和 MacMillan (1968)對於 PE 活性的表示方式，是以每分鐘釋放一個微毫當量羧基的酵素量，定為一個 PE 活性單位。因此我們訂定愛玉子 PEI 的活性表示方法為：每分鐘能降低 1 U PE 的 PEI 量，即為 1 U PEI。1 PEI unit = reduction 1 unit of PE in a min. 除上述表示方法之外，本實驗亦使用活性抑制率(Inhibitory percentage of PE, I %)來表示 PEI 的活性，即以所降低 PE 活性百分比來代表 PEI 抑制作用的大小。I %愈高，則表示 PEI 對於 PE 的抑制作用愈大。此方法較方便於比較。

二、PEI 分子量範圍之初步判定

愛玉子經過打碎、蒸餾水萃取、過濾、離心之後，得到的 PEI 粗萃液仍是一個複雜的系統，具 PE 抑制作用的活性成分首先利用膜區分來判斷分子量範圍，選用 MWCO 3000 及 10000 兩種區分膜，將愛玉子 PEI 粗萃液區分為 MW 3000 Da 以下、MW 3000~10000 Da 及 MW 10000 Da 以上三個部分。將此三區分凍乾後，分別配置成 1 mg/mL 溶液與柑桔 PE (1 U/mL)作用，以觀察膜各區分的抑制活性高低。結果顯示，是以 MW 3000~10000 Da 這個區分對於 PE 的活性抑制率最高(51 %)，由此可知愛玉子 PEI 活性成分主要是位於 MW 3000~10000 Da 之間。此結果亦提供了進一步純化 PEI 之參考依據。

三、PEI 之 Sephadex G-50 純化

根據膜區分的結果，進一步選擇了 Sephadex G-50 將 PEI 進行膠過濾的層析分離。層析結果於圖 1 中顯示，針對蛋白質及醣類的檢測均可得到 A、B、C 三個主要的波峰，且三個波峰中蛋白質和醣類均同時存在。

其中，醣類成分主要集中在波峰 A，而蛋白質成分則集中在波峰 C。將 Sephadex G-50 層析分離而得到的 A、B、C 三個主要的波峰分別收集、凍乾後取等量(1 mg/mL)與柑桔 PE (1 U/mL)作用，以觀察各波峰所含 PE 抑制活性成分的高低。圖 2 顯示，波峰 C 的 PE 抑制率最高，由此可知愛玉子 PEI 的活性成分集中在 C 波峰，收集此區分之流洗液，再經過適當濃縮、凍乾後即得較為純化的愛玉子 PEI。經由上述純化步驟，將各製備過程中愛玉子 PEI 的蛋白質、總醣含量及活性變化情形列於表 1。由表中看出，最後純化得到的 PEI 含 31 %蛋白質及 49 %醣類，與膜區分(MW 3000~10000 Da)之結果比較後發現，蛋白質所佔比例減少，醣類比例則稍微增加，但總固形物含量卻有降低的情形。此原因可能是因為最後經 Sephadex G-50 純化得到的 PEI，其凍乾後之粉末有容易吸濕的現象，因此而造成稱重上的誤差值。在活性變化方面，由表 1 中看出隨著純化的進行，PEI 活性逐漸提昇，最後經由 Sephadex G-50 純化而得的 PEI 能對 1 U/mL 的 citrus PE 有 0.61 U/mg 的抑制效果。經由此純化步驟，PEI 純度提高 2.1 倍。

四、愛玉子 PEI 活性成分鑑定

1. 親和性膠體檢定

賴(1998)提到愛玉子 PEI 液於沸水中加熱一小時後，仍保有 95 %之 PE 抑制活性，因此判斷其為耐熱性物質。而根據 Sephadex G-50 純化結果，愛玉子 PEI 區分中蛋白質和醣類同時存在，且利用陽離子(CM-Sepharose)或陰離子(DEAE-Sepharose)交換層析法均無法將兩者分開(結果未示)，故進行醣蛋白鑑定。Concanavalin A (Con A) Sepharose 親和性膠體，具有與醣蛋白結合的活性基，結合之後可再使用不同取代性的糖分子，將被吸附在膠體上的醣蛋白溶析下來，其取代程

度為 α -methyl mannoside > α -methyl glucoside > mannose > glucose。將經由 Sephadex G-50 純化的愛玉子 PEI 2 mL (5 mg/mL)注入管柱中，視其是否被吸附於 Con A Sepharose 上，若能被吸附則可再用含葡萄糖的流洗液將之溶析下來。結果顯示，愛玉子 PEI 在緩衝液 A 流洗的過程中就被流洗出來，顯示其無法吸附在 Con A 膠體上，因此 PEI 可能不含醣基，或所含醣基非 α -D-glucose 或 α -D-mannose (Amersham pharmacia biotech, 1999)。

2. 原態電泳檢定

使用 15 %之原態聚丙烯醯胺膠體，配合迷你電泳裝置，以 125 V 的電壓進行泳動，完成之後的膠片分別進行 CBR (Coomassie Brilliant Blue R-250)染色及 PAS (Periodic acid-Schiff)染色，其中 CBR 染色是針對蛋白質部分，PAS 染色則是針對醣蛋白，將兩者結果加以比對，若均呈色則表示樣品含醣蛋白。各 well 注入 5 μ L 樣品(濃度 5 mg/mL)，包括市售(Sigma)聚半乳糖醛酸(Lane 1、2)、自行萃取的愛玉子果膠(Lane 3、4)、膜區分 MW 3000~10000 Da 之愛玉子 PEI (Lane 5、6)以及 Sephadex G-50 純化所得之愛玉子 PEI (Lane 7、8)。結果於圖 3 顯示，在 CBR 染色(圖 3a)部分，聚半乳糖醛酸及愛玉子果膠不含蛋白質，因此並無呈色；不同純度的愛玉子 PEI (Lane 5~8)均有蛋白質呈色反應，且是以膜區分 MW 3000~10000 Da (Lane 5、6)所含蛋白質較高。PAS 染色部分則是在聚半乳糖醛酸(Lane 1、2)及愛玉子果膠部分(Lane 3、4)有明顯呈色反應，但由於其在 CBR 染色中無反應，因此並不含醣蛋白；膜區分 MW 3000~10000 Da 的 PEI (Lane 5、6)亦有 PAS 的呈色反應，且 CBR 也能呈現明顯色帶，所以此一區分推測有醣蛋白的存在，但由於此一樣品成分很雜，也可能會有其他不具 PEI 活性成分的物质如蛋白質或醣蛋白

的存在，因此，再觀察經由 Sephadex G-50 純化後的 PEI 電泳圖，則發現在 CBR 染色中有明顯呈色，但在 PAS 染色中並無呈色，故愛玉子 PEI 並無醣蛋白反應。

3. 蛋白酶檢定

根據 Con A 親和性層析及電泳染色法加以檢定後，已知愛玉子 PEI 並非醣蛋白，但由於兩成分實在難以分離，因此進一步利用蛋白酶加入膠過濾所得 PEI 之 C 區分中(圖 3-3)，觀察其中所含蛋白質被水解後對於 PEI 活性的影響，以判斷其活性成分是否屬於蛋白質或多醣體。將 PEI 區分 (1 mg/mL) 每 mL 另加入 0.1 mg 胰蛋白酶(1/10, w/w)，於室溫下反應 1 hr，充分將蛋白質水解後，再於沸水中加熱 10 min 使胰蛋白酶失活。控制組則包括未處理的 PEI (1 mg/mL) 及加入與胰蛋白酶等量之蒸餾水。結果顯示，控制組 A、B 兩者的 PE 活性抑制率可分別達到 43% 及 41%，表示加熱並不會影響 PEI 的抑制作用，故愛玉子 PEI 為耐熱性物質，此與賴(1998)之結果相同。但加入胰蛋白酶作用(1/10, w/w) 之後，PE 活性抑制率急劇降低至 1.5%，顯示 PEI 活性成分嚴重受到破壞，由於胰蛋白酶僅對蛋白質加以水解，此即可判斷，愛玉子 PEI 之活性成分屬於蛋白質，且此蛋白質極為耐熱。

五、分子量判定

愛玉子 PEI 活性成分為蛋白質，因此根據不同分子量的蛋白質標準品，以與愛玉子 PEI 相同的層析條件下來進行 Sephadex G-50 層析，計算 K_{av} 值 ($K_{av} = V_0 - V_i / V_i - V_0$)，製作蛋白質分子量之檢量線(圖 4)。結果得知愛玉子 PEI 之 $K_{av} = 0.819 \sim 0.847$ ，雖已超出檢量線的測定範圍，但由於市售產品無更小分子量之蛋白質標準品，故仍約略求出分子量範圍。帶入檢量線後計算結果顯示，愛玉

子 PEI 分子量介於 3500~4500 Da 之間，為一小分子蛋白質。

六、胺基酸分析

最後分析愛玉子 PEI 之胺基酸組成，以瞭解其極性程度及所帶電荷之種類。依照 Spackman 等(1958)所提的蛋白質酸水解法，將 0.1 mg 經 Sephadex G-50 純化的愛玉子 PEI，用 4 mL 6 N 的 HCl 於 110°C 水解 24 hr 後，利用胺基酸分析儀分析其胺基酸組成，結果列於表 2。

貳、愛玉子 PEI 之理化性質分析

一、不同處理方式對於 PEI 抑制活性之影響

根據李(2000)所提之愛玉子 PEI 萃取方法，萃取所得之愛玉子 PEI 粗萃液，首先必須在沸水中加熱 15 min 以使殘存的 PE 失活，並達到殺菌的目的。隨後密封並於 4°C 冷藏保存，但在此儲存條件下 2~3 個月之後，仍然會有腐敗及活性降低的情形產生。因此，為了要選擇一個最佳的 PEI 儲存方式，故將 PEI 粗萃液(0.29 U/mg)分別進行 4°C 冷藏、-20°C 冷凍及冷凍乾燥三種處理加以儲存，並於儲存一個月後測定各處理方式對於 PEI 活性之影響，其結果以相對抑制率表示，並以未經處理的 PEI 活性為 100%。結果(圖 4)顯示，各處理組之 PEI 對於 citrus PE (1 U/mL) 之活性抑制率均無顯著差異，顯示凍結及凍乾處理均不會影響 PEI 之活性。而其中以凍乾處理者具有體積小及可定量之優點，因此本實驗之愛玉子 PEI 均以凍乾處理保存。

二、PE 與 PEI 不同反應方式及時間對於 PEI 抑制 PE 作用之影響

此實驗目的在於決定愛玉子 PEI 對於 PE 之反應方式及反應時間，使用三種不同反應

方式進行測定，包括：(1)將市售柑桔 PE (1 U/mL)與經由 Sephadex G-50 純化之愛玉子 PEI (2 mg/mL)以 1:1 比例體積混合，於試管內反應不同時間(0~10 min)，再加入標準果膠溶液中測定 PE 活性；(2) PEI 先加入標準果膠溶液中反應，再於不同時間後加入 PE，測定 PE 活性；(3) PE 先加入標準果膠溶液中反應，再於不同時間後加入 PEI，測定 PE 活性。結果(圖 5)顯示，使用(2)和(3)兩種反應模式均不能有效的發揮 PEI 的抑制作用；只有在(1)這個模式之下，反應時間在一分鐘就能達到對 PE 將近 50 %的抑制率，且隨著時間延長，PE 活性表現逐漸降低，至 9~10 min 左右，活性不再明顯降低，表示抑制作用趨於完全。根據此實驗結果，訂定出 PE 與 PEI 於模式系統的反應方式為：先在試管中反應 10 min，再將反應液加入標準果膠溶液中測定 PE 活性，來觀察 PEI 對於 PE 的抑制作用。

三、PEI 之熱穩定性研究

將柑桔 PE 或愛玉子 PE (1 U/mL)與經由 Sephadex G-50 純化之愛玉子 PEI (2 mg/mL)之 1:1 體積比例混合液，在不同溫度之下(4~90°C)保溫 10 min，再迅速冷卻至室溫測定 PE 活性，以 PE 最高活性定為 100 %，再算出各組 PE 的相對活性，以相對活性之變化來觀察 PEI 的抑制作用。由結果(圖 6)中看出，不論是對柑桔 PE (圖 6a)或是愛玉子 PE (圖 6b)，由於熱使得酵素失活，因此反應溫度在 50°C 以上時，PE 活性就會急遽下降；而加入 PEI 的各組，在各個反應溫度之下均能有效的抑制 PE 活性。對柑桔 PE 的抑制作用隨溫度(4~50°C)不同，約能抑制 60~80%的相對活性，對愛玉子 PE 也隨溫度(4~70°C)不同，而能抑制約 40~50%的相對活性，由此可知，愛玉子 PEI 能在廣泛溫度範圍內有效抑制 PE 活性，顯示其在加工上應用的潛

力。文獻指出，奇異果 PEI (Balestrieri *et al.*, 1990)為醣蛋白，馬鈴薯 PEI (McMillan and Perombelon, 1995)為多醣體，兩種 PEI 對於 PE 的抑制作用亦同樣不會受到反應溫度的影響，故愛玉子 PEI 與之同為熱穩定性的物質。

四、PEI 之 pH 穩定性研究

將 PE 與 PEI 混合液於不同 pH (pH 3~10)之 universal 緩衝溶液中反應 10 min，再於 pH 6.0 的標準果膠溶液中測定 PE 活性。在柑桔 PE 方面，由圖 7a 中看出柑桔 PE 在 pH 7~8 左右活性最高，而愛玉子 PEI 對於柑桔 PE 之抑制作用則是在中性範圍較佳，可降低約 60 %的相對 PE 活性；在 pH 9~10 左右抑制作用較差，僅有 10~20 %的活性抑制率。至於愛玉子 PE，圖 7b 中顯示 PE 在 pH 9 左右活性最高，而與愛玉子 PEI 作用之後，其活性變化的趨勢與控制組(PE 單獨)類似，即 PEI 之抑制作用在各個 pH 之下均能達到幾乎相同的抑制效果，均能使 PE 活性降低約 30~40 %，此結果顯示 PEI 能夠在廣泛 pH 之下有效抑制 PE 活性。此種特殊作用可能與 PE-PEI 間之特殊親合力有關，即兩者之強烈作用不易受周圍環境之影響。至於奇異果 PEI (Balestrieri *et al.*, 1990)及馬鈴薯 PEI (McMillan and Perombelon, 1995)的對於 PE 的抑制作用亦同樣不會受到反應 pH 的影響。

五、鹽類對於 PEI 抑制作用之影響

Linewaver 和 Ballou (1945)指出，一價和二價離子具有活化 PE 的作用，但對於 PEI 之影響則仍未知。因此由各種不同鹽類的添加對於 PEI 抑制作用的影響，由表 3a 中可看出，對柑桔 PE 而言，隨著鹽類添加量的提高(0~500 mM)，PE 活性有逐漸增加的趨勢(1.00~1.30 U)；而 PEI 對於柑桔 PE 的抑制率(I %)不會受到 NaCl 及 KCl 兩種鹽類的影響，均維持在 70 %左右。但在 CaCl₂ 及

MgCl₂ 兩種鹽類的存在之下，各個濃度下均會使 PEI 之抑制率有增加的情形，其中 CaCl₂ 50 mM 的環境下能使抑制率從 70 % 提高到 88 %；MgCl₂ 則是在高濃度之下(50 mM、500 mM)能使抑制率提高至 92 %，提高抑制作用的效應最為顯著。

對於愛玉子 PE 而言，表 3b 中之結果，與柑桔 PE 的反應有類似的情形，不同濃度鹽類的添加對於 PE 活性並無顯著的影響；而 NaCl 及 KCl 兩種鹽類亦不會顯著影響 PEI 對於愛玉子 PE 的抑制率。但同樣的，在 CaCl₂ 及 MgCl₂ 兩種鹽類的存在之下，均會使得 PEI 對於愛玉子 PE 之抑制率提高。其中 CaCl₂ 在 5~500 mM 濃度範圍內均能使 PEI 之抑制率提高 10 % 左右；至於 MgCl₂ 則隨著添加濃度的提高使得抑制率亦逐漸提高(從 55 % 至 69 %)。此結果顯示，CaCl₂ 及 MgCl₂ 兩種鹽類會增強愛玉子 PEI 對於愛玉 PE 的抑制作用。此原因可能是適當濃度的 Ca²⁺、Mg²⁺ 等二價離子對於 PE-PEI 間之反應具有媒介作用所致，因而增強了 PEI 活性。

八、愛玉子 PEI 對於 PE 動力學之影響

以果膠質配置成不同濃度之果膠溶液(0.1~2.5 mM -OCH₃)作為酵素反應基質，再測定柑桔 PE 與愛玉子 PE 於各濃度受質之下所表現的反應初速度。因文獻(Chang *et al.*, 1993)上提及細胞壁的 pH 在 5.0~6.5 之間，但細胞壁的離子強度並無文獻記載，為使 PE 酵素與果膠分子間不會因正負電相吸太緊而不利於 PE 之作用，因此添加 0.2 M NaCl 於反應液中，並將反應液之 pH 定在 6.0。另外，因為果膠分子中實際接受 PE 作用之基質為甲酯鍵，而反應液中甲酯鍵濃度除了受果膠濃度影響外，亦受果膠酯化度之影響，因此實驗中基質濃度採用甲酯基(-OCH₃)之濃度代替果膠之濃度(江，1996)。

將市售(Sigma)柑桔果膠(甲氧基含量 9.5

%)，配置成含 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mM -OCH₃ 之柑桔果膠溶液，於 30°C、pH 6.0 的條件下，測定 PE 於各濃度基質之下的反應速率，即可求出 PE 動力學的反應；其次將經由 Sephadex G-50 純化而得的愛玉子 PEI 先與 PE 以 1:1 (v/v)混合作用(30°C) 10 min 後，再以同樣的方法測定 PE 動力學之反應。最後將各個動力學反應之迴歸線合併，繪製 Lineweaver-Burk 圖。

由圖 8a 對柑桔 PE 及圖 8b 對愛玉子 PE 之動力學反應結果可看出，在未與 PEI 作用之前，柑桔 PE 的動力學表現經由迴歸方程式計算，動力學常數 $V_{max} = 0.92 \mu \text{eq} \cdot \text{COOH}/\text{min}$ ， $K_m = 2.22 \text{ mM} \cdot \text{OCH}_3$ ；愛玉子 PE 方面， $V_{max} = 1.09 \mu \text{eq} \cdot \text{COOH}/\text{min}$ ， $K_m = 0.78 \text{ mM} \cdot \text{OCH}_3$ 。隨著 PEI 濃度的提高，圖中動力學迴歸線的斜率逐漸提高，且在縱軸相交於一點，顯示抑制劑對 PE 的 V_{max} 無影響，但 K_m 則隨著抑制劑濃度提高而逐漸增加。將此結果與各種抑制作用之 Lineweaver-Burk (1934)圖形對照後，顯示愛玉子 PEI 對於柑桔 PE 及愛玉子 PE 均顯示競爭型(competitive)抑制作用。文獻指出此種抑制劑的構造可能與基質相近，能與基質互相競爭酵素的活性部位，且此類抑制劑會因基質濃度的提高而降低其抑制作用(Richardson, 1976)。此一結果與奇異果 PEI 及馬鈴薯 PEI 之抑制類型有所不同，奇異果 PEI 對於奇異果 PE 是屬於競爭型(competitive)抑制(Balestrieri *et al.*, 1990)；至於馬鈴薯 PEI 對於馬鈴薯 PE 則是屬於不競爭型(uncompetitive)的抑制作用(McMillan and Perombelon, 1995)。

參、愛玉子 PEI 於果汁加工上之應用

一、愛玉子 PEI 對於蔬果 PE 之抑制作用

將八種蔬果之 0.5 M NaCl 萃取液經 100

%硫酸銨沉澱、透析之後(粗 PE 液)，將其 PE 活性調整為 1 U/mL，以 1:1 (v/v)之比例與經由 Sephadex G-50 純化之 PEI (0.13 mg/mL)混和作用 10 min，再測定各種蔬果 PE 之活性變化，以觀察愛玉子 PEI 對不同來源 PE 之抑制作用。結果於圖 9 中顯示，PEI 對於所選取的八種蔬果 PE 均有抑制作用。其中，對於番茄、蘋果、龍鬚菜及芭樂 PE 的抑制效果較高，可達到 60~73 %的抑制效果，對於柳橙、木瓜、豌豆莢 PE 也有 30~50 %的抑制效果，但對於鳳梨 PE 的抑制作用較低，只有 7 %的抑制百分比。此結果顯示愛玉子 PEI 能夠廣泛抑制不同來源之 PE。

二、愛玉子 PEI 對於果汁混濁安定性之影響

將六種水果以蒸餾水榨成果汁(1:1, v/v)後過濾、分成三組，包括未處理組(Untreatment)、加熱組(Pasteurization)及添加 PEI 組(PEI addition)，將各組儲存於 4°C 再於每週定期取出，測定各組果汁的混濁度損失率(cloud loss%)，以觀察愛玉子 PEI 對於果汁混濁安定性之影響。各個果汁之混濁度損失情形於圖 10a~f 表示。果汁混濁度損失率提高，表示果汁中因為 PE 作用而使得果汁的混濁安定性下降、黏稠度降低甚至變得澄清的現象產生。對混濁果汁(cloudy juice)而言，必須防止此現象以維持果汁的混濁度(cloudy index) (Castaldo *et al.*, 1991)。番茄汁(圖 10a)未處理組，在第一個星期就顯著的提高了 cloud loss %，之後趨於平緩，顯示隨著儲存時間延長，混濁度喪失得相當嚴重；加熱處理較能有效的減緩混濁度損失，能將 cloud loss %控制在 30 %以下；至於添加 PEI 組，在所測定的時間範圍內，與未處理組比較後，發現均能有效的減緩 cloud loss %達 40~50 %，雖未能達到與加熱組相同的效果，但也大幅的降低混濁度喪失的情形產生。由於 PEI 對於番茄 PE 之抑制作用強(圖 9)，故

再提昇愛玉子 PEI 濃度預期對番茄汁 cloud loss 會有更明顯之抑制作用。

蘋果汁(圖 10b)未處理組至第六個星期後，cloud loss %逐漸提昇，至第十二星期達到 90 %的損失率；而加熱組能有效維持混濁度而將 cloud loss %控制在 10 %以下；至於添加 PEI 組，則隨著時間延長 cloud loss %仍逐漸提高，但平均而言，能減緩 cloud %達 50~60 %之多，若再度提昇 PEI 濃度，將可明顯降低 cloud loss。

木瓜汁(圖 10c)未處理組在第一個星期，cloud loss %就高達將近 80 %，之後維持高損失率；若以加熱處理後則發現，可有效抑制 cloud loss %；添加 PEI 組也有同樣結果，可大幅降低 cloud loss %甚至達到與加熱組相同的結果。

芭樂汁(圖 10d)混濁度損失的情形並不顯著，表示果汁中 PE 作用的情形不嚴重，各組 cloud loss %均能維持在 20 %以下，但比較後仍可發現，添加 PEI 於芭樂汁中，可減緩果汁的 cloud loss %且達到與加熱組相同的效果。

柳橙汁(圖 10e)未處理組之 cloud loss %在第三星期就顯著提高到 80 %以上，延長除藏時間甚至達將近 100 %損失，顯示柳橙汁的混濁安定性極低；但加熱組完全抑制了 PE 活性，因此混濁度損失的情形獲得了有效的抑制；添加 PEI 後雖能減少損失率，但隨著時間延長，還是會使果汁 cloud loss %提高到將近 80 %。

鳳梨汁(圖 10f) cloud loss 的情形較為緩和，第三週以前各組無顯著差異，但由圖中可看出加熱組至儲存後期，cloud loss %仍會逐漸提高至 20 %；添加 PEI 對於 cloud loss %的抑制作用有限(約 10 %)，無法達到與其他果汁類似的結果。根據 PEI 對於蔬果 PE 抑

制作用的實驗結果(圖 3-14)中推測，此一結果可能是因為愛玉子 PEI 對於鳳梨 PE 的抑制作用能力較低(僅 7%)的原因所致。

根據圖 9，在模式系統中，相同的 PEI 量抑制相同活性的蔬果 PE，也會在不同蔬果之中顯示出不同的抑制效果。再加上真實系統的果汁中，除了 PE 殘存活性是主要的原因之外，仍有其他影響果汁混濁度安定性的因子，包括果汁黏度、果粒的質與量、濃度、儲存溫度等(Castaldo *et al.*, 1991)，亦可能包括果汁中的果膠含量、PG 活性以及鈣離子的含量等等，這些都會間接影響到果汁的混濁安定性，但 PE 活性仍是最主要須控制的因素，因為 PE 這個起始因子一旦作用後即啟發一連串的連鎖反應開始進行，包括果汁中的果膠被降解成低酯化度的果膠酸，接著 PG 才會開始切斷果膠分子造成黏度下降，而其中之果膠酸會進一步與二價的鈣離子形成果膠酸鈣而沉澱，最終導致果汁混濁度的喪失。

參考文獻

- 江啟銘 1996。I、不同生長及期及不同部位之豌豆植物中果膠酯酶同功酶之消長及其純化、生理意義及應用性之研究，II、果膠酯酶同功酶反應機制之研究。台大農化所博士論文。
- 李柏宏 2000。愛玉子凝膠性質及愛玉凍品質之研究。台大農化所博士論文。
- 林讚標 1991。愛玉子專論。林業叢刊第 36 號。台灣省林業試驗所編印。台北。
- 侯文琪 1995。I、豌豆植物中果膠鍵結模式之研究，II、豌豆植物中果膠酯酶及果膠酸甲基化酵素之分離及反應機制之研究。台大農化所博士論文。

張為憲 1993。有關植物體內果膠酯酶之研究。生命科學簡訊 7(2)：8-12。

劉哲政、林讚標、黃瑞祥、李茂松 1990。愛玉雌隱花果發育之生物學研究—隱花果、瘦果、果膠酯酶、果膠及甲氧基之變化。林業試驗所研究報告季刊 5(3)：209-216。

劉崇瑞 1962。台灣木本植物圖誌(II)。國立台灣大學。台北。

賴盈璋 1998。愛玉子果膠酯酶所催化轉酯基反應與愛玉子瘦果中所存在抑制劑之探討。台大農化所碩士論文。

Amersham pharmacia biotech AB. 1999. Affinity Chromatography Principles and Methods. 18-1022-29. Sweden.

Baker, R. A. and Bruemmer, J. H. 1969. Cloud stability in the absence of various orange juice soluble components. Proc. Fla. St. Hort. Soc. 82 : 215-221.

Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L., and Servillo, L. 1990. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). Eur. J. Biochem. 193(1) : 183-187.

BeMiller, J. N. 1986. An Introduction to pectins : structure and properties. In "Chemistry and Function of Pectins". (ed.). Fishman, M. L. and Jen, J. J. p.2-12. ACS Symposium Series 310. Washington, DC.

Black, S. A. and Smit, C. J. B. 1972. The

- grading of low-ester pectin for use in dessert gels. *J. Food Sci.* 37 : 726-729.
- Black, S. A. and Smit, C. J. B. 1972. The effect of demethylation procedures on the quality of low-ester pectins used in dessert gels. *J. Food Sci.* 37 : 730-732.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Brady, C. J. 1976. The pectinesterase of cation and solvent on the banana fruit. *Aust. J. Plant Physiol.* 3 : 163-172.
- Castaldo, D., Lovol, A., Quagliuolo, L., Servillo, L., Balestrieri, C., and Giovane, A. 1991. Orange juices and concentrates stabilization by a proteic inhibitor of pectin methylesterase. *J. Food Sci.* 56 : 1632-1634.
- Castaldo, D., Quagliuolo, L., Servillo, L., Balestrieri, C., and Giovane, A. 1989. Isolation and characterization of pectin methylesterase from apple fruit. *J. Food Sci.* 54 : 653-655.
- Glicksman, M. 1969. Pectins. In "Gun Technology in the Food Industry". (ed.). Glicksman, M. p.159-190. Academic Press, New York.
- Goldberg, R. 1984. Changes in the properties of cell wall pectin methylesterase along the *Vigna radiata* hypocotyl. *Physiol Plant.* 61 : 58-63.
- Komae, K. and Misaki, A. 1989. Isolation and characterization of gel forming polygalacturonide from seeds of *Ficus awkeotsang*. *Agric. Biol. Chem.* 53 : 1237-1245.
- Komae, K., Sone, Y., Kakuta, M., and Misaki, A. 1989. Isolation of pectinesterase from *Ficus awkeotsang* seeds and its implication in gel-formation of the awkeotsang polygalacturonide. *Agric. Biol. Chem.* 53 : 1247-1254.
- Komae, K., Sone, Y., Kakuta, M., and Misaki, A. 1990. Purification and characterization of pectinesterase from *Ficus awkeotsang*. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 1469-1476.
- Kulp, K. 1975. Carbohydrate. In "Enzymes in Food Processing" . (ed.). Reed, G. p.107-122. Academic Press, New York.
- Lea, A. G. H. 1991. Enzyme in the production of beverage and fruit juice. In "Enzymes in Food Processing", AVI. New York. p.208.
- Lee, M. and MacMillan, J. D. 1968. Mode of action of pectin enzymes. I. Purification and certain properties of tomato pectinesterase. *Biochem.* 7(11) : 4005-4010.
- Lee, M. and MacMillan, J. D. 1970. Mode of action of pectic enzyme. III. Site of initial

- action of tomato pectinesterase on highly esterified pectin. *Biochemistry*. 9(9) : 1930-1934.
- Lin, T. P., Liu, C. C., and Wang, W. Y. 1989. Purification and characterization of pectin methyltransferase from *Ficus awkeotsang* Makino achenes. *Plant. Physiol.* 91 : 1445-1453.
- Lin, T. P., Liu, C. C., Huang, R. S., Wang, W. Y., and Feng, T. Y. 1990. Induction of pectin methyltransferase in the pericarp of achenes of the jelly-fig *Ficus awkeotsang* Makino. *Plant Cell Physiol.* 31(4):533-537.
- Linewaver, H. and Ballou, G. A. 1945. The effect of cations on the activity of alfalfa pectinesterase (pectase). *Arch. Biochem.* 6 : 373-387.
- Linewaver, H. and Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. American Chem. Society.* 56 : 658-666.
- Linewaver, H. and Jansen, E. F. 1951. Pectic enzyme. *Adv. Enzymol.* 11 : 267-273.
- Taylor, A. J. 1982. Intramolecular distribution of carboxyl groups in low methoxyl pectins-a review. *Carbohydrate polymers.* 2 : 9-13.
- Van Buren, J. P. 1979. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Texture Studies* 10 : 1-8.
- Wood, P. J. and Siddiqui, I. R. 1971. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyltransferase activity. *Anal. Biochem.* 39(2) : 418-428.