



微生物果胶酶及其在食品方面的应用

崔福绵

(中国科学院微生物研究所)

微生物果胶酶在国外已有 50 多年的应用史,国内虽有研究,但应用甚少。本文介绍微生物果胶酶及其在食品方面应用概况。

一、果胶质

果胶质为杂多糖,分子量 3,000—300,000,完全水解后形成阿拉伯糖、木糖、半乳糖、鼠李糖、半乳糖醛酸和甲醇。果胶质存在于所有高等植物的组织中,主要集中在胞间层和初生细胞壁中。胞层间主要由果胶质和半纤维素组成。胞间层中的果胶质一经分解,细胞便分离,随之组织破坏。初生细胞壁主要由果胶质、纤维素和半纤维素组成。这种天然状态的果胶质不溶于水,称为原果胶。果胶质根据其分子中半乳糖醛酸的羧基酯化程度,可分为果胶酸和果胶。果胶酸分子中基本上所有半乳糖醛酸的羧基都是游离的。不同的果胶,分子中半乳糖醛酸的羧基酯化程度不同。含甲酯基很少的果胶被称为果胶酯酸。

二、果胶酶的分类^[1,2]

果胶酶是作用于果胶质的一类酶的总称。根据酶对底物的作用方式,果胶酶分类如下。

(一) 解酯酶(果胶酯酶)

果胶酯酶属于羧酸酯水解酶类,对果胶起解酯作用,产生果胶酸和甲醇。

(二) 拆链酶(解聚合酶)

通过解聚合酶水解(水解酶)或 β -消除(裂解酶)切割果胶质的糖苷键。

1. 水解酶

(1) 内切多聚半乳糖醛酸酶:最适作用底物为果胶酸。随机切割,产生寡聚半乳糖醛酸(半乳糖醛酸单体、二聚体、三聚体)。该酶对果胶也起作用,水解速度和程度随果胶酯化程度的增加而迅速下降。

(2) 外切多聚半乳糖醛酸酶:从末端开始切割果胶酸多聚物,产生半乳糖醛酸。

(3) 寡聚半乳糖醛酸水解酶:分为能水解饱和寡聚半乳糖醛酸的水解酶和能水解不饱和寡聚半乳糖醛酸的水解酶两种。它们分别从非还原末端开始切割饱和及不饱和寡聚半乳糖醛酸,产生半乳糖醛酸。

2. 裂解酶

(1) 内切果胶酸裂解酶:最适作用底物为果胶酸和低甲氧基果胶。随机切割底物,产生不饱和寡聚半乳糖醛酸(二聚体和三聚体)。

(2) 外切果胶酸裂解酶:对果胶酸的作用优于对果胶的作用,对多聚半乳糖醛酸和寡聚半乳糖醛酸的作用速度相同。从还原末端开始切割果胶酸,产生不饱和和二聚体。该酶对多聚甲半乳糖醛酸-甲基糖苷不起作用。

(3) 寡聚半乳糖醛酸裂解酶:从还原末端开始切割饱和及不饱和寡聚半乳糖醛酸。当以饱和寡聚半乳糖醛酸为底物时,产物为不饱和半乳糖醛酸单体;当以不饱和寡聚半乳糖醛酸为底物时,产物除了不饱和半乳糖醛酸单体外,还有一个 D-半乳糖醛酸单体。

(4) 内切果胶裂解酶:一种专一性的解聚合酶,仅随机切割高甲氧基果胶,产生低不饱和寡聚半乳糖醛酸甲酯。该酶对果胶酸无作用。

三、果胶酶的产生

(一) 产酶菌种的选择

许多微生物都具有产生果胶酶的能力。为安全起见,制取酶所用的菌种应当是非致病性的,甚至最好是与致病菌没有生理联系的,并且在产酶条件下不产生毒素和致病物质^[3]。研究和应用较多的是真菌果胶酶和细菌果胶酶。使用的产酶菌有酱油曲霉、日本曲霉、金黄曲霉^[4]、丰塞卡曲霉、黑曲霉^[5]、白腐盾壳霉^[6]、青霉和葡萄孢两个属的某些种^[7]以及枯草芽孢杆菌和某些欧文氏菌^[8]等。其中黑曲霉和枯草芽孢杆菌属于国际上一般认为安全的菌种,即 GRAS 微生物^[7]。由于黑曲霉所产生的果胶酶复合物不仅组分较全,而且所具有的性质使之适宜在食品方面应用,所以国内外多把它作为产酶源。

(二) 酶的产生条件

微生物果胶酶的工业化生产采用两种方法,即固体表面培养(盘曲、帘子曲、厚层通风曲、转鼓曲)和液体深层培养。

产酶的一个决定性因素是培养基的组成。在具有混合碳源的培养基中,产生的果胶酶量较多。例如在液体培养中,蔗糖和果胶、纤维素粉和果胶分别是黑曲霉^[9]和互隔交链孢霉^[9]产生果胶酶的最适碳源。一般采用半合成培养基,即以麦麸为主添加碳源和氮源。碳源以果胶(对于诱导产生果胶酶的菌来说,也是诱导物)为最佳。使用果胶不经济,可用甜菜渣、桔皮、水果渣滓、树叶代替果胶。氮源一般采用无机氮,例如硫酸铵、硝酸铵等。植物抽提物能显著地促进酶的产生。

例如,在含果胶的培养基中,花生粉抽提物^[1]、马铃薯组织抽提物(一种热不稳定因子)^[9]、胡萝卜抽提物(一种碱不稳定因子)^{[10][11]}分别能促进黑曲霉果胶酶复合物、胡萝卜软腐欧文氏菌果胶裂解酶、海芋欧文氏菌果胶裂解酶的形成。有些菌,例如液化气单胞菌在产胞外内切果胶裂解酶过程中,会受到异化抑制,因此其在限速生长(逐渐供给葡萄糖、甘油或果胶酸)条件下的产酶量比在非限速生长(底物过量)条件下的产酶量高许多倍^[11]。

除了培养基组成以外,培养基 pH、含水量、接种量、通气量以及培养温度对产酶均有影响。

(1) 黑曲霉固体曲: 在由 10kg 麦麸和 71.2% (NH₄)₂SO₄ 溶液组成的培养基上, 25—30℃ 培养 45—50 小时成曲。该果胶酶曲除果胶酶外, 还含有淀粉酶、纤维素酶、半纤维素酶、蛋白酶、花色素酶等。

(2) 黑曲霉液体曲: 在花生粉沸水抽提液加 0.05% Na₂SO₄、0.2% NH₄NO₃、2% 蔗糖和 2% 果胶的培养基中, 维持 pH 3—4, 30℃ 培养 5—6 天成曲^[8]。比较经济的培养基是 5% 麦麸混合物中加 0.5% (NH₄)₂SO₄ 和 1% 桔皮粉。

(3) 酱油曲霉固体曲^[13]: 20g 麦麸加 12ml 水为培养基, 30℃ 培养 3 天成曲。

(4) 日本曲霉固体曲^[14]: 20g 麦麸加 17ml 水为培养基, 25℃ 培养 65 小时成曲。

(5) 白腐盾壳霉固体曲^[15]: 菌在由 10kg 脱脂米糠和 6l 自来水组成的培养基上, 25—30℃ 培养 3 天成曲。菌在甜菜渣用水膨胀后去除多余水的培养基上, 26—28℃ 培养 3 天成曲。

(三) 酶的提取

固体曲加 5 倍量的自来水, 30—35℃ 抽提 1—2 小时或室温下抽提 2—3 小时后过滤。所得滤液和液体曲发酵液的滤液一样, 均为粗果胶酶液。粗果胶酶液可直接使用, 也可通过冷冻干燥或有机溶剂(丙酮或乙醇)沉淀制成酶粉后使用。

用真菌制备的果胶酶粗制剂中, 除了果胶酶以外, 还含有许多种其它酶, 例如, 淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、花色素酶等。与在食品方面使用的其它酶一样, 果胶酶也是粗制品。混合酶制剂的作用效果比单一纯酶好。例如, 当果胶酶用于果汁和果酒澄清时, 淀粉酶和蛋白酶有助于防止由淀粉和蛋白引起的混浊。又如, 当果胶酶用于水果、干果和蔬菜加工等时, 纤维素酶和半纤维素酶是有用的。但是, 当果胶酶用于山楂汁、红葡萄酒等有色果汁的澄清时, 花色素酶必须除去, 否则, 将使酒、汁失去天然红颜色^[13]。花色素酶可以用较方便的方法去除。

四、果胶酶在食品方面的应用

(一) 果汁提取

有些水果榨汁较费力。如果果肉经含纤维素酶的

粗果胶酶制剂处理, 则细胞壁大部分分解, 果胶部分破坏, 可以很容易地压出汁来, 并且还能提高榨汁率。水果中含有的多酚能抑制果胶酶的作用。对于苹果汁, 这一抑制可通过加不溶性聚乙烯吡咯烷酮予以解除^[11], 或通过通气使多酚凝聚成不溶性物质予以解除。

(二) 果汁果酒澄清和过滤。

新压出来的果汁不仅粘度大, 而且混浊不易消失。加果胶酶澄清处理后, 粘度迅速下降, 并且造成果汁混浊的粒子迅速凝聚, 使果汁易于过滤, 并且得以澄清。有些果汁含有淀粉, 为了防止果汁由于淀粉的存在出现混浊, 可用含有淀粉酶的粗果胶酶制剂进行澄清处理。粘度下降是由于果胶酯酶和内切多聚半乳糖醛酸酶共同作用于高酯化果胶的结果。果胶裂解酶对苹果汁有较好的澄清作用, 但对葡萄汁效果不明显。对于桔汁, 由于要求保持雾样混浊, 所以应当使用不含果胶酯酶的内切多聚半乳糖醛酸酶制剂进行澄清处理。

酶法澄清可在低温和高温两种温度条件下进行。在低温条件(15—20℃, 15 小时左右)下澄清, 有助于防止果汁在贮藏(尤其是冷藏)中出现后混浊现象, 在加明胶的情况效果更好。在高温条件(45—50℃, 0.5—2 小时)下澄清, 可以防止菌污染和发酵, 减少用酶量, 缩短澄清时间, 而且果胶能大量分解, 这对于制备浓缩果汁是必需的。但是高温能引起酶失活, 特别是在不利的条件下, 例如不适宜的 pH, 多酚、乙醇和二氧化硫等抑制剂^[15]的存在, 能加速失活。

果胶能引起果酒失光, 混浊和出现沉淀。果酒经果胶酶澄清处理能除去果胶从而保持稳定。由于发酵后用酶处理, 不仅用酶量大, 而且所需时间也长, 因此已广泛采用发酵前或发酵中加果胶酶处理的工艺。

果汁澄清的程度, 除了要用澄清度、相对粘度两个指标衡量外, 还要用果胶含量和淀粉含量这两个指标衡量。果胶和淀粉含量的定量测定比较费时。生产中, 用测定分解程度的方法确定酶法澄清的终点。果胶分解程度用乙醇试验法测定^[17]。如果果胶分解较少, 则当果汁与乙醇相混时, 将出现空气泡和稠密的胶样沉淀, 并且胶样沉淀上升到试管顶上来。如果果胶几乎完全分解, 则在果汁与乙醇相混后的 30 分钟内, 仅有一薄层沉淀和轻度的混浊。为了保证果酒的稳定性, 用于果酒生产的果汁经果胶酶澄清处理后, 乙醇试验的混合物必须在混合后保持透明。淀粉分解程度用碘试验法测定^[18]。

经酶法澄清的果汁的稳定性, 可通过稳定性试验测定^[19]: 澄清和过滤的果汁或浓缩果汁的稀释液于试管中煮沸, 并且立即冷却到近于结冰温度, 如果 12—24 小时没有出现雾样混浊, 则预示果汁在灭菌、浓缩、贮藏、重新稀释时是稳定的。

(三) 水果和蔬菜的浸解和液化

水果和蔬菜经富含内切多聚半乳糖醛酸酶而几乎

不含果胶酯酶和果胶裂解酶的果胶酶制剂浸解后,可形成结构松散的悬浮物。这种浸解处理方法可用于水果饮料(粉碎的水果果汁)、马铃薯泥和易于为儿童所食用的蔬菜(例如胡萝卜)的制备^[1]。当果胶酶与纤维素酶混合使用时,水果和蔬菜可完全液化。

(四) 果实脱皮

含有纤维素酶和半纤维素酶的粗果胶酶制剂能够作用于果实皮层,使之细胞分离,结构破坏而脱落。桔子囊衣、莲子内皮和大蒜膜层经粗果胶酶处理后,可以很快地脱落。此外,果胶酶,对杏仁也具有一定的脱皮作用。

(五) 物质提取

由于含有纤维素酶和半纤维素酶的粗果胶酶制剂对植物材料有很好的浸解作用,因此可以利用粗果胶酶从植物材料中提取有用物质。例如,从桔皮中提取香料油和类胡萝卜素,从果皮中和果渣中提取使饮料形成雾样混浊的物质^[1]。果胶酶还可以用于提高橄榄油的产量^[2]以及咖啡浓缩^[3]。

(六) 茶的处理

速溶茶在加工过程中使用果胶酶处理,可以去除使茶水产生泡沫的碳水化合物以及去除影响茶水澄清度和颜色的悬浮粒子。

果胶酶还可以用于医药制备和麻脱胶等。

果胶酶用量较大,据估计全世界食品酶产值约4,500万美元,其中涉及果胶酶的约占四分之一。我国随着人民生活水平的不断提高和扩大对外贸易,对果胶酶的需求量也必将不断增加。因此,今后除寻找新的果胶酶应用领域外,还须提高菌种产酶能力,以向市场提供充足而廉价的果胶酶。

参 考 文 献

[1] Rombouts, F. M. and W. Pilnik: *Economic Mic-*

robiology, volume 5, *Microbial Enzymes and Bioconversions* (ed. Hose, A. H.), p. 228—272, London New York Toronto Sydney San Francisco, 1980.

- [2] Kulp, K.: *Enzymes in Food Processing*, second edition (ed. Reed, G.) pllo, Academic press, New York San Francisco London, 1975.
- [3] Keay, L.: *Process Biochemistry*, 6(8): 17, 1971.
- [4] Meyrath, J. and G. Volavsek: *Enzymes in Food Processing* second edition (ed. Reed, G.), p. 294—297, Academic press New York San Francisco London, 1975.
- [5] Neubeck, C. E.: *ibid*, p. 397—438, 1975.
- [6] Gutcho, S. J.: *Microbial Enzyme Production*, *Chemical Technology* Heview No. 28, p. 188—189. Noyes data corporation Park Ridge London, 1974.
- [7] Taylor, M. J. and T. Richardson: *Advanc. Appl. Microbiol.* Vol. 25 (ed. D. Perlman), Academic press, New York London Toroto Sydney San Francisco, p. 7—35, 1979.
- [8] Tuttobello, R. and P. J. Mill: *The Biochemical journal*, 79(1): 51—57, 1961.
- [9] Kunte, S. and N. V. Shastri: *Indian Journal of Microbiology*, 20(3): 211—214, 1980.
- [10] Zucker, M., and L. Hankin: *Journal of Bacteriology*, 104(1): 13, 1970.
- [11] Tsuchida, T., et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 32(11): 1355, 1968.
- [12] Tomizawa, H., et al.: *ibid.*, 34(7): 1064, 1970.
- [13] Shigetaka, I. and T. Yokotsuka: *J. Agr. Food Chem.*, 19(5): 958—961, 1971.
- [14] Shigetaka, I. and T. Yokotsuka: *Agr. Biol. Chem.*, 36(11): 1885—1893, 1972.
- [15] Baumann, J. W.: *Enzymes and Food Processing* (ed. G. G. Birch et al.) p. 129—146, London, 1981.
- [16] Pintauro, N. D.: *Food Processing Enzymes Recent Developments* p. 292—321, Noyes data corporation Park Ridge, New Jersey, U. S. A., 1979.