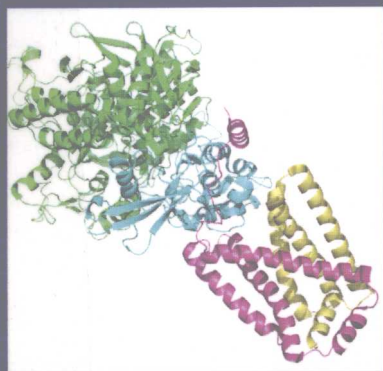


GUOJIAOMEI
JIQI YINGYONG

果胶酶及其应用

李鸿玉 李祖明◎编著

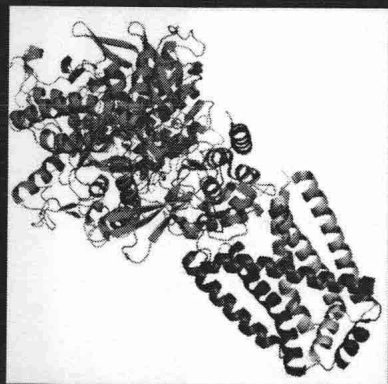


知识产权出版社

GUOJIAOMEI
JIQI YINGYONG

果胶酶及其应用

李鸿玉 李祖明◎编著



知识产权出版社

内容提要

本书分别对果胶酶的结构与催化功能、果胶酶的生产及分离纯化、果胶酶活力测定、果胶酶的固定化、果胶酶的应用等方面作了介绍,既包括相关基础理论,同时又收集了近年果胶酶相关理论和应用方面的研究现状和成果,可作为高等院校相关专业学生和科技人员以及果胶酶应用领域工作人员的参考书。

责任编辑:纪萍萍

图书在版编目(CIP)数据

果胶酶及其应用 / 李鸿玉, 李祖明编著. —北京:

知识产权出版社, 2010. 6

ISBN 978-7-5130-0081-9

I. ①果… II. ①李…②李… III. ①果胶酶 - 研究
IV. ①Q556

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 121521 号

果胶酶及其应用

李鸿玉 李祖明 编著

出版发行: 知识产权出版社

社 址: 北京市海淀区马甸南村 1 号

网 址: <http://www.ipph.cn>

发行电话: 010-82000860 转 8101/8102

责编电话: 010-82000860-8130

印 刷: 知识产权出版社电子制印中心

开 本: 880mm×1230mm 1/32

版 次: 2010 年 6 月第 1 版

字 数: 220 千字

邮 编: 100088

邮 箱: bjb@cnipr.com

传 真: 010-82000860-8240

责编邮箱: jipingping@cnipr.com

经 销: 新华书店及相关销售网点

印 张: 8.625

印 次: 2010 年 6 月第 1 次印刷

定 价: 30.00 元

ISBN 978-7-5130-0081-9/Q · 006 (10321)

版权所有 侵权必究

如有印装质量问题, 本社负责调换。

前 言

随着生物技术和人们对果胶类物质结构的认识,作为催化分解果胶质的生物催化剂果胶酶,越来越受到有关科学工作者的关注。国内外在果胶酶分子生物学研究上不断取得新的进展。果胶酶的应用也已从最初的饮料加工逐步扩展到了粮油加工、纺织、造纸、医药等领域,果胶酶固定化等研究也正在逐步深入。作者在多年教学和科研的基础上,结合关于果胶酶的一些研究工作,同时收集了近些年来国内外大量研究资料,编写了本书。书中对果胶酶的结构与催化功能、果胶酶的生产及分离纯化、果胶酶的活力测定、果胶酶的固定化和果胶酶的应用等方面分别作了较系统的介绍,既包括相关基础理论,同时收集了近年有关果胶酶的研究进展情况。本书可作为高等院校相关专业学生和从事此方面研究的科技人员以及果胶酶应用领域工作人员的参考书。

本书由北京联合大学师范学院李鸿玉和北京联合大学应用文理学院李祖明共同编写。全书分为7章,其中第三章、第四章主要由李祖明编写,其他章节主要由李鸿玉编写,部分章节存在某些交叉情况。北京联合大学师范学院厉重先参与了第七章的整理工作,在此表示感谢。由于编者水平所限加之时间仓促,书中难免会有错误和不足之处,恳请读者批评指正。

编 者

2010年5月

目 录

第一章 果胶.....	1
1.1 果胶在植物界的分布及其结构组成	1
1.1.1 果胶在植物界的分布	1
1.1.2 果胶的结构和化学组成	2
1.1.3 果胶物质的种类	4
1.2 果胶的性质	6
1.2.1 果胶物质的性质	6
1.2.2 果胶凝胶的形成	7
1.2.3 果胶的用途	8
参考文献	10
第二章 果胶酶的分类、结构与催化功能	11
2.1 果胶酶的分类和作用方式.....	11
2.1.1 果胶水解酶.....	12
2.1.2 果胶裂解酶.....	14
2.1.3 果胶酯酶.....	15
2.1.4 原果胶酶.....	15
2.2 酶的结构和活性中心.....	17
2.2.1 酶的化学结构.....	17
2.2.2 酶的空间结构.....	18
2.2.3 酶的活性中心.....	19
2.3 酶的催化特性.....	20
2.3.1 酶催化作用的特点.....	20

2.3.2 影响酶催化反应速率的因素	23
2.4 果胶酶的结构与分子生物学	30
参考文献	31
第三章 果胶酶的生产	34
3.1 果胶酶生产菌的筛选	35
3.1.1 果胶酶生产菌种	36
3.1.2 果胶酶生产菌的分离	37
3.2 果胶酶生产菌的鉴定	38
3.3 果胶酶生产菌的育种	39
3.3.1 诱变育种	40
3.3.2 杂交育种	42
3.3.3 原生质体融合育种	43
3.3.4 基因工程育种	44
3.3.5 产果胶酶菌株的育种	45
3.4 生产果胶酶的发酵方法	46
3.4.1 液态发酵法	47
3.4.2 固态发酵法	48
3.4.3 固定化细胞法	49
3.5 果胶酶发酵条件的优化	51
3.5.1 培养基	51
3.5.2 培养条件	55
3.5.3 果胶酶发酵条件的优化	57
3.6 果胶酶生产菌的分离筛选与鉴定举例	58
3.7 果胶酶发酵条件优化举例	74
3.8 果胶酶生产菌育种举例	90
参考文献	109

第四章 果胶酶的分离纯化与性质	114
4.1 果胶酶的提取	115
4.2 果胶酶的分离纯化与纯度检验	117
4.2.1 调节酶的溶解度的分离纯化方法	118
4.2.2 根据酶分子的大小、形状不同的分离 纯化方法	120
4.2.3 根据酶分子的电荷性质的分离纯化方法	122
4.2.4 根据酶分子的专一性结合的分离纯化方法	126
4.2.5 酶纯度的检验	126
4.3 果胶酶的性质	128
4.4 果胶酶的提取、分离纯化与性质举例	129
4.4.1 <i>B. gibsonii</i> 果胶酶的提取分离纯化与性质	129
4.4.2 <i>Penicillium oxalicum</i> 果胶酶的提取、分离纯化 与性质	154
参考文献	167
第五章 果胶酶活力的测定	171
5.1 酶活力	171
5.1.1 酶活力定义	171
5.1.2 酶活力单位及比活力	172
5.1.3 影响酶活力的因素	172
5.2 果胶酶活力测定的一般方法	175
5.2.1 比色法 (分光光度法)	175
5.2.2 滴定法	180
5.2.3 黏度降低法	182
5.2.4 还原法	184
5.3 各类果胶酶活力检测方法概述	185
5.3.1 聚半乳糖醛酸酶活力检测方法	185

5.3.2	果胶裂解酶活力检测方法	186
5.3.3	果胶酯酶活力测定方法	186
5.3.4	原果胶酶活力检测方法	187
5.4	其他方法简介	187
	参考文献	188
第六章	果胶酶的固定化	190
6.1	酶的固定化	191
6.1.1	酶固定化概念	191
6.1.2	固定化酶的优缺点	191
6.2	果胶酶固定化载体	192
6.2.1	固定化载体材料的性能要求	192
6.2.2	常用固定化酶载体材料	193
6.3	酶固定化方法及果胶酶固定化研究	200
6.3.1	吸附法	201
6.3.2	包埋法	204
6.3.3	共价结合法	207
6.3.4	交联法	210
6.4	果胶酶固定化研究实例	212
6.5	固定化果胶酶的酶学性质	221
6.5.1	固定化酶的活力	221
6.5.2	固定化酶的稳定性	221
6.5.3	固定化酶的最适 pH 变化	222
6.5.4	固定化酶的最适温度变化	223
6.5.5	米氏常数的变化	224
6.6	固定化果胶酶的酶学性质研究实例	224
6.7	固定化果胶酶的应用	228
	参考文献	229

第七章 果胶酶的应用	232
7.1 果胶酶在食品加工中的应用	232
7.1.1 饮料工业	232
7.1.2 食品发酵工业	239
7.1.3 油脂提取	240
7.1.4 绿色食品生产	242
7.1.5 生物活性成分提取	243
7.1.6 食品添加剂生产	245
7.2 果胶酶在医药工业中的应用	246
7.3 果胶酶在纺织工业中的应用	249
7.3.1 棉纤维的生物精炼	249
7.3.2 植物韧皮纤维的脱胶	252
7.4 果胶酶在造纸工业中的应用	254
7.5 果胶酶在环境领域中的应用	257
7.6 果胶酶在生物技术领域中的应用	258
7.7 果胶酶在饲料工业中的应用	259
7.8 果胶酶在其他领域中的应用	260
参考文献.....	262
展望	265

第一章 果 胶

1.1 果胶在植物界的分布及其结构组成

果胶（pectin）是果胶酶的作用底物。1825 年法国人 Bracennot^[1]首次从胡萝卜中提取出一种可形成凝胶的水溶性物质，将其命名为“pectin”，意思为容易成胶的物质。

1.1.1 果胶在植物界的分布

果胶广泛存在于高等植物的根、茎、叶和果实中。特别是水果和蔬菜中广泛存在果胶物质，是果胶的最丰富来源。例如苹果中果胶含量为 0.7%~1.5%（以湿品计），柑橘、柠檬、柚子等果皮中约含 30%果胶。商品果胶就是用酸从苹果渣与柑橘皮中提取制得的天然果胶。蔬菜中的果胶以南瓜含量最多，达 7%~17%。不同的蔬菜、水果口感有区别，主要是由它们的果胶含量以及果胶分子的差异决定的。表 1-1 是部分新鲜水果和蔬菜中果胶的含量^[2]。

表 1-1 新鲜水果和蔬菜中果胶的含量（平均值）

水果、蔬菜	果胶含量/%	水果、蔬菜	果胶含量/%
马铃薯	0.7	槲 樟	1.1
白球甘蓝	0.3	樱 桃	0.5
胡 萝卜	0.4	李 子	0.6
洋 葱	0.3	杏 子	0.7

续表

水果、蔬菜	果胶含量/%	水果、蔬菜	果胶含量/%
番茄	0.1	桃子	0.6
西瓜	0.7	草莓	1.6
甜瓜	0.6	橘子	0.7
葡萄	0.6	甜橙	0.9
苹果	1.1	柠檬	1.1
梨	0.8	柿子	0.9

果胶是一组多糖类物质，存在于植物的细胞初生壁和细胞间隙中，为内部细胞的支撑物质，胞间层基本由果胶组成。果胶在植物的细胞组织中起着软化和粘合作用。果胶在植物组织中与纤维素、半纤维素、木质素和蛋白质等相互交联，使细胞组织结构坚强，表现出固有的形态。植物细胞壁中果胶还可成为阻挡病原微生物入侵的天然屏障。

在不同植物及同种植物的不同生长期，植物组织中果胶的含量各异。在细胞壁中，果胶和纤维素及金属离子相结合，形成不溶于水的原果胶。在成熟的果实和蔬菜中，一部分果胶呈溶解状态而直接存在于细胞液中^[2]。

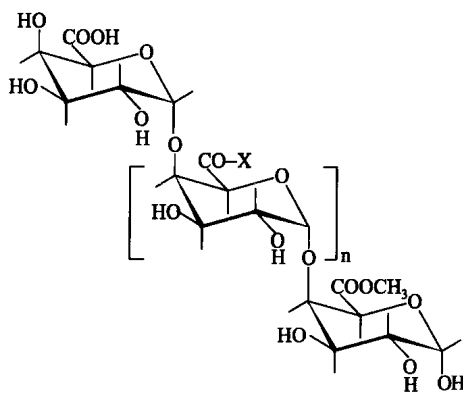
1.1.2 果胶的结构和化学组成

果胶属于多糖类物质，其化学结构比较复杂。果胶的主要结构是由 D-吡喃型半乳糖醛酸通过 α -1, 4-糖苷键连接形成的直链状聚合物。聚半乳糖醛酸中的羧基有不同程度的甲酯化，未甲酯化的羧基以游离酸的形式或以钾、钠、钙盐等形式存在。果胶质聚半乳糖醛酸主链上还常带有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、海藻糖、芹菜糖等侧链。果胶的相对分子质量从几万到几十万不等。在不同植物组织中果胶的化学结构和相对分子质量变化很大。

1944 年美国化学协会 (American Chemical Society) 给出如下定义：果胶质 (pectic substance) 是一种源于植物或从植物制

备的复合胶体碳水化合物，其基本单元是半乳糖醛酸，而其多聚物的羧基被甲醇部分酯化，或者部分或全部由一个或多个碱基所中和。

果胶分子的主要结构如图 1-1 所示。



X 为—OH 或—O—CH₃

图 1-1 果胶分子主要结构

果胶的结构组成因植物的种类、组织部位和生长条件等的不同而不同。对果胶结构化学的研究表明，果胶的化学结构比较复杂，除了基本骨架结构外，其他细微结构还不十分清楚。同其他植物多糖一样，果胶是多分子的、多分散的、多结构的、有高级空间构象的，并具有一定的相对分子质量分布^[3]。

一个世纪以来，众多科学家在果胶多糖领域进行深入研究，逐步建立了对果胶多糖结构、化学组成的认识。研究表明，天然果胶不是线型分子而是多分支分子，是由部分甲酯化的聚半乳糖醛酸为主链，由鼠李糖、D-半乳糖、L-阿拉伯糖及木糖等分别组成长短不同的侧链。果胶分子的总体结构可分为均匀区和毛发区。均匀区是由无分支的 α -D-半乳糖醛酸基同聚半乳糖醛酸（60%~90%）组成，毛发区是由高度支链 α -L-鼠李糖半乳糖醛酸聚糖（10%~40%）组成^[4,5]。结构简图如图 1-2 所示。

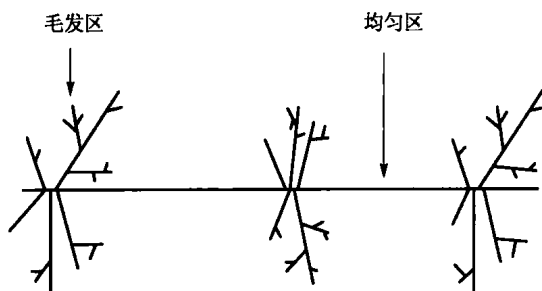


图 1-2 果胶分子结构示意图

果胶的多糖类结构，把植物纤维素基质内初生胞壁中的蛋白质、脂肪醇、脂肪酸及其酯类、胆甾醇和蜡质等，通过其主链与支链粘合，形成果胶质为骨架的庞大的疏水性网状层。其不溶性主要是由于钙等二价金属离子介入了聚半乳糖醛酸的结合，以及介入了阿拉伯聚糖、半乳聚糖等中性糖链的纤维素纤维的结合所引起的。由于动物体内缺乏降解果胶的酶类，因而果胶通常被认为是饲料中的抗营养因子。

果胶物质包括原果胶、果胶（果胶酯酸）和果胶酸。

1.1.3 果胶物质的种类

根据分子结构和性质的不同，果胶物质可分为原果胶、果胶酸和果胶酯酸。

1. 原果胶

原果胶存在于未成熟的果蔬的细胞壁中，是与纤维素、半纤维素结合的甲酯化聚半乳糖醛酸糖苷链。在未成熟果蔬组织中原果胶与纤维素和半纤维素粘结在一起形成较牢固的细胞壁，是未成熟果蔬比较坚硬的因素之一。原果胶无黏性。原果胶不溶于水。

原果胶不溶于水的原因较为复杂，一般为以下几种^[6]。

(1) 果胶分子与细胞壁的其他组分，如半纤维素或纤维素等连接在一起，果胶分子上的羧基可能与这些组分分子上的羟基形

成酯键；

(2) 果胶分子与多价金属离子，如 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 及 Mg^{2+} 等连接在一起；

(3) 果胶分子的羧基与蛋白质分子的碱基通过盐桥连接在一起；

(4) 果胶分子间及果胶与其他胞壁组分间以次价键形式相互缠绕在一起；

(5) 与一般的果胶分子相比，原果胶的相对分子质量较大。

原果胶用酸水解生成可溶性的果胶。对原果胶水解生成的可溶性的果胶再进行提取、脱色、沉淀、干燥，即为商品果胶。从柑橘皮中提取的果胶是高酯化度的果胶（酯化度在 70% 以上）。在食品工业中常利用果胶制作果酱、果冻和糖果，在汁液类食品中则用作增稠剂、乳化剂。

2. 果胶

果胶是羧基不同程度甲酯化和中和的聚半乳糖醛酸糖苷链，在成熟果蔬的细胞液内含量较多。果胶有黏性，可溶于水。

聚半乳糖醛酸羧基酯化的百分数称为酯化度（DE）。

果胶按其酯化度即羧基甲酯化的程度，又分为低酯果胶或低甲氧基果胶和高酯果胶或高甲氧基果胶两类。

(1) 高甲氧基果胶（HM）分子中超过一半的羧基是甲酯化（ $-\text{COOCH}_3$ ）的，称为高甲氧基果胶。余下的羧基是以游离酸（ $-\text{COOH}$ ）及盐（ $-\text{COONa}$ ）的形式存在；

(2) 低甲氧基果胶（LM）分子中低于一半的羧基是甲酯化的，称为低甲氧基果胶。

目前已从初生胞壁中分离得到三种果胶多糖出来，并分析了其结构特征。它们为均一的半乳糖醛酸聚糖、鼠李糖-半乳糖醛酸聚糖及取代半乳糖醛酸聚糖。

3. 果胶酸

果胶酸是完全未甲酯化的聚半乳糖醛酸苷链，是由 D-半乳糖醛酸脱水缩合，以 α -1, 4-糖苷键连接形成的直链状的聚合物，其中羧基与钙、镁、钾、钠等离子中和为果胶酸盐。果胶酸分子比果胶小，无黏性，微溶于水，呈酸性。在果胶酸酶的作用下可水解成 α -D-半乳糖醛酸。

随着果实的成熟，原果胶在聚半乳糖醛酸酶（PG）和果胶酯酶（PE）作用下，切断聚半乳糖醛酸而降低相对分子质量以及产生脱去甲酯的游离羧基，即逐渐水解成果胶和果胶酸，同时与纤维素、半纤维素分离，溶于水而进入细胞液使得果实软化，果实由硬转变为软硬适度的成熟果实。如果酶继续作用则造成果实过熟，也过软，所以在软腐状态的果蔬里果胶酸存在较多。

1.2 果胶的性质

1.2.1 果胶物质的性质

（1）性状及相对分子质量

果胶通常为白色至淡黄色粉末，稍带酸味。果胶的色泽随原料、生产工艺的不同而各不相同，颜色从乳白色到淡黄褐色。

果胶质具有一定的相对分子质量分布。果胶质的相对分子质量介于 10 000~400 000 之间^[7]，相对分子质量大小受来源和提取方法的影响。随着果实的成熟，原果胶逐渐水解为果胶和果胶酸，平均相对分子质量随之降低。

（2）旋光性

果胶溶液具有较高的旋光值。D-半乳糖醛酸的比旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 $+51.80^\circ$ ，而果胶多糖的平均比旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 为 $+235^\circ$ 。

（3）溶解性

果胶多糖在水、二甲基亚砷、甲醛和热甘油中是可溶的，而在大多数有机溶剂中是不溶的。果胶溶于 20 倍水中则呈黏稠状液体，果胶溶液属于胶体溶液。

果胶及果胶酸在水中的溶解度与分子的聚合度和酯化度有关。随聚合度的增大溶解度减小；在一定范围内随酯化程度的增大溶解度增大。果胶酸的衍生物（如果胶酸的甲醇酯或乙醇酯）的溶解度较大。

果胶溶于水形成的溶液黏度很大，其黏度与相对分子质量、酯化度、pH、电解质的存在有关。一般地，果胶相对分子质量越大、链越长，溶液黏度越大；而果胶酯化度越高，黏度越低。pH 越低黏度越低，pH 2.4 以下黏度没有什么变化，pH 6.0 左右黏度最高，pH 高于 6.0 时，果胶分子开始分解，黏度降低^[8]。

果胶溶于水形成的溶液，其黏度和溶解度还与悬浮介质中的电解质种类和浓度有关。例如，在甲酯含量低的果胶中，由于羧基具有较强的排斥力，而使其在中性环境中更易于溶解。

（4）水解

在酸、碱或果胶酶的催化作用下果胶物质可以发生酯水解或糖苷键断裂，生成半乳糖醛酸、醇等物质。在高温、强酸条件下，还可发生半乳糖醛酸的脱羧。

酸水解果胶中酯键或糖苷键受温度影响很大。在低温下趋向于水解酯键而糖苷键水解甚少，而在高温下则水解糖苷键较为迅速。果胶的甲酯基团可以通过稀碱在低温下稳定地皂化并且无解聚发生。

1.2.2 果胶凝胶的形成

果胶是亲水胶体，它的水溶液在适当条件下可以形成凝胶。果胶在食品工业中最重要的应用就是它的形成凝胶的能力。例如，果冻、果酱等胶冻类食品的生产就是利用了这一特性。

果胶溶液形成凝胶的条件主要是具有足够的糖、酸或 Ca^{2+} 。不同酯化度的果胶具有不同的凝胶机制。

果胶物质溶于水后形成亲水胶体，由于果胶周围水化膜的作用使果胶分子不能相互靠近，又由于大量的 $-\text{COO}^{-1}$ 相互间产生相斥，所以果胶不能形成凝胶。在果胶胶体中加入糖后，糖起了脱水剂的作用，由于糖与水的水化作用强于果胶与水的水化作用，所以糖破坏了果胶胶体的水化膜，起了中和 $-\text{COO}^{-1}$ 的作用。这样果胶胶体的稳定因素失去，胶粒与胶粒结合为链状胶束，最终形成果胶胶束结晶、沉淀和凝聚，有利于形成凝胶。

果胶的相对分子质量、酯化度及溶液的 pH 等对果胶凝胶的形成都有一定的影响。

果胶的相对分子质量越大，形成的果胶凝胶强度越大。因为在果胶溶胶转变为凝胶时，每 6~8 个半乳糖醛酸单位就形成一个结晶中心，所以随相对分子质量的增大，在标准条件下凝胶强度自然也就增强^[8]。

果胶分子的酯化度越高，形成的果胶凝胶强度越大。完全酯化的半乳糖醛酸只要有脱水剂存在即可形成凝胶。高酯果胶按“酸—糖成胶机制”胶凝，即在有足够的糖浓度和酸条件下能形成凝胶。高酯果胶的凝胶速率随着酯化度的提高而加速，分为速凝型果胶和慢凝型果胶。低酯果胶易于与 Ca^{2+} 等发生交联，通过金属离子桥与聚半乳糖醛酸中的游离羧基相结合，因此低酯果胶不需过多的糖和酸，只要有 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 等金属离子存在时就可形成胶凝。所以低酯果胶是制备低糖食品的重要原料。

1.2.3 果胶的用途

果胶是一种重要的工业产品。在工业生产中，果胶生产的主要原料一般是制备苹果、柑橘、柚果等果汁的副产物，即皮渣或废渣。此外，甜菜废渣、芒果渣、洋葱也可作为果胶的生产原料。近年又出现了以豆腐柴叶为原料生产高质量果胶的新工艺。