



中国食品学报

Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology

ISSN 1009-7848, CN 11-4528/TS

《中国食品学报》网络首发论文

题目： 马铃薯细胞壁中果胶酶的提取及特性研究
作者： 周盼，雷丹丹，李昊昕，秦礼康，董楠，刘嘉
网络首发日期： 2024-12-16
引用格式： 周盼，雷丹丹，李昊昕，秦礼康，董楠，刘嘉. 马铃薯细胞壁中果胶酶的提取及特性研究[J/OL]. 中国食品学报.
<https://link.cnki.net/urlid/11.4528.TS.20241216.1244.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

马铃薯细胞壁中果胶酶的提取及特性研究

周盼¹, 雷丹丹¹, 李昊昕², 秦礼康¹, 董楠⁴, 刘嘉^{1,2,3}✉

(1.贵州大学酿酒与食品工程学院 贵阳 550025; 2.贵州医科大学公共卫生学院 贵阳 550025; 3.贵州省农业科学院食品加工研究所 贵阳 550025; 4.贵州省农业科学院生物技术重点实验室 贵阳 550025)

*通信作者 刘嘉 E-mail: mcgrady456@163.com

摘要 通过硫酸铵梯度沉淀结合三相分离法来分离纯化马铃薯细胞壁果胶酶, 探究环境条件对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响及其酶学特性。结果表明, 当硫酸铵饱和度为 60%时, 果胶酶达到最大沉淀点。经两次三相分离纯化后果胶酶比活力达到 2 012.40 U/mg, 纯化倍数 5.72, 回收率 82%。其最适温度 20 °C, 最适 pH 4.8。Ca²⁺、Cu²⁺可显著促进果胶酶活力, 其中 Ca²⁺对果胶酶促进作用最明显(251%), 而 Zn²⁺、Na⁺对果胶酶活性没有影响, K⁺、Mg²⁺对果胶酶有显著抑制作用。在最适温度和最适 pH 值下反应 40 min 时酶活力最大(4 667.10 U/g), 果胶酶的动力学常数中 $K_m=0.13$ mg/mL, $V_{max}=277.80$ U/g。比较果胶酶对胶凝化的马铃薯果胶和原果胶的酶解效果, 结果胶凝化果胶对马铃薯细胞壁果胶酶有抗性。

关键词 马铃薯; 果胶酶; 三相分离法; 酶学性质; 马铃薯果胶

Extraction and Characterization of Pectinase from Potato Cell Wall

Zhou Pan¹, Lei Dandan¹, Li Haoxin², Qin Likang¹, Dong Nan⁴, Liu Jia^{1,2,3}✉

(1.School of Liquor & Food Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025; 2. School of College of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550025; 3. Institute of Food Processing Technology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025; 4. Guizhou Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550025)

Abstract The potato cell wall pectinase was isolated and purified by ammonium sulfate gradient precipitation with a combination of three phase partitioning method, and the effects of environmental conditions on the activity and enzymatic features of cell wall pectinase in potato were studied. The results showed that when the saturation of ammonium sulfate was 60%, pectinase reached the maximum precipitation point. Through a process of two three phase partitioning and purification, the specific activity of pectinase, the purification fold and the recovery rate reached 2 012.40 U/mg, 5.72 and 82%. The optimal temperature was 20 °C and the optimal pH was 4.8. Ca²⁺ and Cu²⁺ could significantly amp up pectinase activity, and Ca²⁺ possessed the strongest promoting effect on pectinase (251%), while Zn²⁺ and Na⁺ had no effect on pectinase activity, Whereas K⁺ and Mg²⁺ had a significant inhibiting effect on pectinase activity. The enzymatic activity reached to the climax (4667.10 U/g) when the reaction was conducted at the optimal temperature and pH for 40 min. The kinetic constants of pectinase were $K_m=0.13$ mg/mL and $V_{max}=277.80$ U/g. Simultaneousl enzymolysis effect the gelled potato pectin and the original pectin were compared. It turned out to be that gelled pectin was resistant to potato cell wall pectinase.

Key words potato; pectinase; three phase partitioning; enzymatic properties; potato pectin

由于丰富的营养属性, 马铃薯既可作为粮食为人们补充能量和蛋白质, 也可作为蔬菜补充维生素和膳食纤维^[1]。而马铃薯的加工方法因地域的饮食差异而不同。中华传统饮食中有一道经典菜肴“醋溜土豆丝”, 其中隐藏着通过醋酸预处理维持马铃薯热加工后脆度的秘密。前期有研究发现马铃薯在加热过程中, 细胞壁的果胶组分发生了降解, 形成大量的半乳糖醛酸, 而在酸处理组, 半乳糖醛酸的含量却显著低于对照组^[2]。由此, 推断马铃薯受热过程经历了果胶酶对果胶物质的降解作用。说明果胶酶在马铃薯受热软化过程中扮演着重要的角色。在自然界, 果胶酶存在于植物及微生物的细胞组织, 是一类可以水解果胶或果胶化合物的复合酶类^[3]。被报道其影响着果蔬的成熟度^[4]及贮藏稳定性^[5]。果胶酶可使果胶的结构多糖分解为 D-半乳糖醛酸、 α -1,4 糖苷键和果胶酸^[6]。果胶酶一般包含

基金项目: 贵州省基础研究计划(黔科合基础-ZK【2021】重点 039); 国家自然科学基金项目(32060545, 32260602)

第一作者: 周盼, 女, 硕士

网络首发时间: 2024-12-16 14:28:23 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.4528.TS.20241216.1244.004>

果胶酯酶 (Pectinmethyl esterase, PME)、多聚半乳糖醛酸酶 (Polygalacturonase, PG) 及果胶裂解酶 (Pectate lyase, PL) 等^[7]。目前, 关于果胶酶的研究多集中于提取方法及果汁澄清的应用中, 鲜有报道植物中果胶酶的特性。本研究以马铃薯为原料, 采用硫酸铵梯度沉淀结合三相分离法分离纯化马铃薯细胞壁果胶酶, 在此基础上分析环境条件对马铃薯细胞壁果胶酶酶活的影响。前期研究发现酸处理可导致马铃薯细胞壁中果胶发生胶凝化, 这是否会影响果胶酶对其的酶解作用不得而知。本试验中加入果胶酶酶解原果胶及胶凝化果胶, 研究果胶酶的酶学特性, 阐释酸处理维持马铃薯热加工脆度的科学依据。

1 材料与方方法

1.1 材料与试剂

新鲜马铃薯, 采自贵州省马铃薯研究所 (黔南州长顺县) 马铃薯种植基地 (品种: 黔芋 7 号, 采收时间: 2023 年 3 月), 于 4 °C 下贮藏。果胶、3,5-二硝基水杨酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 牛血清白蛋白 V、考马斯亮蓝 G-250, 北京索莱宝科技有限公司; 硫酸铵 (分析纯), 上海麦克林生化科技有限公司, 所用其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

BS-223S 型电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; H1650 高速离心机, 湘仪仪器有限公司; ILNESA-L5 紫外分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司制造; HWS-28 型电热恒温水浴锅, 上海-恒科学仪器有限公司; PB-10-pH 计, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; MS-H280 型磁力搅拌器, 大龙兴创实验仪器有限公司; SCINTZ-10YD/A 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 马铃薯细胞壁果胶酶的提取

参考黄浩等^[8]的方法, 取贮藏于 4 °C 的新鲜马铃薯, 用去离子水清洗, 切成碎块后放入预冷研钵中, 按照质量体积比 1:3 加入预冷醋酸钠缓冲液 (0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液), 研磨均匀之后, 转移到离心管中, 8 000 r/min, 离心 15 min, 收集上清液作为粗酶液。

1.3.2 马铃薯细胞壁果胶酶的粗分离

硫酸铵盐析: 取粗酶液, 在冰浴的条件下, 每管中加入不同饱和度梯度的固体硫酸铵 (20%~80%), 在 4 °C 下静置 8 h, 8 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清液, 保留沉淀物, 加入醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH=4.8, 0.2 mol/L) 以至沉淀溶解。溶解后的溶液放入透析袋 (MWCO:14 000) 透析 24 h, 每 8 h 换 1 次缓冲液, 随后测定透析后酶液中的果胶酶活性及蛋白质含量, 以此来确定硫酸铵分级沉淀的最大沉淀点。

1.3.3 马铃薯细胞壁果胶酶的三相分离纯化

参考刘洋等^[9]的方法, 通过 1.3.2 节得到的果胶酶粗酶液经硫酸铵梯度沉淀后, 选择适合的硫酸铵浓度, 并调节 pH 值到 6.5 (用 0.1 mol/L NaOH 和 HCl 进行调节), 按照 (1:1) 体积比加入叔丁醇, 磁力搅拌器低速混匀 2 min, 4 °C 静置冷藏 1 h, 逐渐形成三相体系, 将体系以 4 000 r/min 离心 10 min, 去除上层有机相和下层水相, 收集中间凝结成蛋白质的片状沉淀, 将沉淀用醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH=4.8 0.2 mol/L) 溶解, 并定容到 20 mL, 其为第 1 次纯化, 重复上述操作, 再次富集沉淀后定容至 20 mL 为第 2 次纯化, 每一次纯化都要测定其蛋白质含量和酶活 (U), 按照 (1) 计算每次纯化后的回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{纯化后总酶活}}{\text{粗酶液总酶活}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 马铃薯细胞壁果胶酶活性的测定

果胶酶活性测定采用 DNS 法, 参考于振林等^[10]的方法。在甲、乙两只具塞试管中分别加入 2 mL 蒸馏水和 0.5 mL 1% 的由 0.2 mol/L pH 4.8 的醋酸-醋酸钠缓冲液配制而成的果胶溶液, 甲管加入 0.5 mL 果胶酶液, 乙管加入去离子水, 20 °C 水浴 50 min 后加入 2.5 mL 的 DNS 终止反应, 沸水浴 5 min, 流水冷却后定容至 10 mL, 摇匀, 在 540 nm 处测定吸光值。按照 (2) 计算果胶酶活力 (U)。

$$X = \frac{1.08 \times 1000 \times m' \times v'}{m \times v \times t} \quad (2)$$

式中： X 为酶活力，U/g； m' 为从标准曲线中查得的葡萄糖质量，mg； v' 为样品提取液的总体积，mL； m 为样品质量，g； v 为测定时所取样品提取液体积，mL； t 为酶促反应时间，h；1.08 是葡萄糖换算成半乳糖醛酸的系数（194/180）。以每小时在 20 °C 下催化果胶产生 1 μ g 半乳糖醛酸所需的酶量定义为 1 个酶活力单位（U）。参考方法^[8]制备葡萄糖标准曲线，在波长 540 nm 处测定吸光度，得到的标准曲线为 $y=0.392x-0.064$ ， $R^2=0.9921$ ，测定样品吸光度，计算得到马铃薯细胞壁果胶酶液中的葡萄糖含量。

马铃薯细胞壁果胶酶的蛋白质含量参考^[11]方法测定，在波长 595 nm 下测定吸光值，绘制得到标准曲线为 $y=5.71x+0.0197$ ， $R^2=0.9939$ ，测定样品吸光度，计算得到马铃薯细胞壁果胶酶液中的蛋白质含量。

1.3.5 环境条件对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响

1) 温度对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响

以醋酸-醋酸钠缓冲液（pH=4.8，0.2 mol/L）配制 0.01 g/mL 的果胶作为底物，分别设定马铃薯果胶酶的水解温度在 20，30，40，50，60，70 °C，将不同温度下获得的最高酶活力（U）设定为 100% 相对酶活力（%），其余温度条件下为相对酶活力：（温度对应的酶活力/最高酶活力） \times 100%。

2) pH 值对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响

以 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH 值（2.8，3.8，4.8，5.8，6.8）分别配制 0.01 g/mL 果胶作为底物，在最适温度下依据 1.3.4 节测定果胶酶活，将不同 pH 值下获得的最高酶活力（U）设定为 100% 相对酶活力（%）。其余 pH 值条件下为相对酶活力：（pH 值对应的酶活力/最高酶活力） \times 100%。

(3) 金属离子对马铃薯细胞壁果胶酶活性影响

经分离纯化得到的酶液，分别加入氯化钠、氯化钾、醋酸锌、硫酸铜、无水氯化钙，使金属离子 Na^+ 、 K^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 的终浓度为 3×10^{-3} mol/L，室温下静置 20 min，在最适温度和最适 pH 值下依据 1.3.4 节测定果胶酶活。将没有加金属离子获得的酶活力（U）设定为 100% 相对酶活力（%），其余离子条件下为相对酶活力：（离子对应的酶活力/最高酶活力） \times 100%。

1.3.6 马铃薯细胞壁果胶酶的特性研究

1) 马铃薯细胞壁果胶酶的反应稳定性及动力学常数

在最适温度和最适 pH 值条件下，果胶酶酶解反应 20，40，50，60，80，100 min 后依据 1.3.4 节测定果胶酶活，将不同反应时间下获得的最高酶活力（U）设定为 100% 相对酶活力（%），其余反应时间条件下为相对酶活力：（反应时间对应的酶活力/最高酶活力） \times 100%。

以醋酸-醋酸钠缓冲液（pH=4.8，0.2 mol/L）配制果胶溶液（1，2，4，6，8，10 mg/mL），在上述测定的最适温度和最适 pH 值下依据 1.3.4 节测定果胶酶活力（U）。依据双倒数作图法，得到米氏常数 K_m 、 V_{max} 。

2) 马铃薯细胞壁果胶酶对原果胶及胶凝化果胶的酶解效果对比

参考 Dranca 等^[12]方法提取马铃薯果胶，将提取得到的果胶溶于水，果胶的浓度为 0.03 g/mL，60 °C 下水浴磁力搅拌溶解 40 min，冷却至室温，用冰乙酸调节 pH 值至 2.0，4 °C 下静置 2.5 h 后，冷冻干燥处理得到胶凝化马铃薯果胶，同样，将 0.03 g/mL 的果胶，在 60 °C 下水浴磁力搅拌溶解 40 min，冷却至室温后冷冻干燥处理得到原果胶。在最适温度和最适 pH 值条件下依据 1.3.4 节测定马铃薯原果胶、胶凝化果胶与果胶酶反应 0，5，10，15，20 min 后的半乳糖醛酸含量。

1.4 统计分析

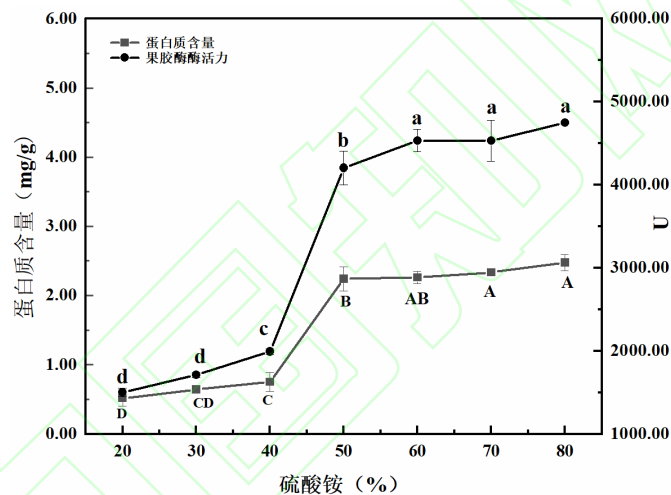
样品的所有指标测试都经过 3 次重复试验，结果以平均值 \pm 标准差表示，使用 SPSS 26 对数据进行 Turkey's 检验显著性分析（ $P < 0.05$ ）。使用 Origin 2018 进行数据绘图。

2 结果与分析

2.1 马铃薯细胞壁中果胶酶的分离及纯化

2.1.1 硫酸铵法分离马铃薯细胞壁果胶酶

通常利用溶剂法（丙酮和乙醇）和盐析法（硫酸铵）获得植物酶的粗提液。虽然，有机溶剂可以溶解酶，但他们往往会使蛋白质结构发生构象变化，所以纯化通常在-20℃的极低温度下进行，条件相对苛刻。而硫酸铵沉淀，是让蛋白质的溶解度随着溶液中硫酸铵饱和度的增大而降低，继而使其析出。硫酸铵因其溶解度大，温度系数少且与蛋白质大分子结合，具有保护蛋白质不容易使其变性的优势。如图1所示，随着硫酸铵浓度升高，马铃薯细胞壁果胶酶粗提物中酶活力和可溶性蛋白含量也逐渐升高。通过计算硫酸铵梯度下酶的比活力，选择60%的硫酸铵饱和度为最大沉淀点，得到马铃薯细胞壁果胶酶的比活力为665.42 U/mg，纯化倍数为1.89，回收率为96%。随着硫酸铵浓度升高，比活力的降低原因可能为有效蛋白含量的降低。植物酶提取的报道中，鲜有关关注果胶酶的提取，多为多酚氧化酶，过氧化物酶等的相关研究。Clnar等^[13]通过90%硫酸铵来纯化沉淀桃金娘浆果多酚氧化酶，得到纯化倍数为4.0，回收率为58.3%，Kumar等^[14]用80%的硫酸铵沉淀樱桃多酚氧化酶，得到纯化倍数为4.1，回收率为49.1%。



注：不同图中小写字母代表蛋白质含量间存在显著性差异 ($P < 0.05$)，不同大写字母代表果胶酶活力间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

图1 硫酸铵浓度(20%~80%)对马铃薯细胞壁果胶酶粗提物酶活力及蛋白含量的影响

Fig.1 Effects of ammonium sulfate concentration (20%~80%) on enzymatic activity and protein content of pectinase crude extract from potato cell wall

2.1.2 三相分离纯化马铃薯细胞壁果胶酶

表1 三相法分离纯化马铃薯细胞壁果胶酶

Table 1 Separation and purification of pectinase extracted from potato cell wall by using three phase partitioning method

步骤	总酶活/U	总蛋白质含量/mg	比活力/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	1 573.73 ± 88.03	4.47 ± 0.11	352.03	1.00	100.00
硫酸铵 (60%)	1 510.49 ± 36.71	2.27 ± 0.07	665.42	1.89	96.00
第1次纯化	1 353.31 ± 84.99	1.97 ± 0.05	686.96	1.95	86.00
第2次纯化	1 287.94 ± 32.73	0.64 ± 0.07	2012.40	5.72	82.00

表1记录了马铃薯细胞壁果胶酶三相分离纯化后的总酶活(U)，蛋白质含量(mg)，比活力(U/mg)，纯化倍速及回收率。第1次纯化后，果胶酶比活力上升到686.96 U/mg，纯化倍数为1.95，回收率为86%，重复三相法步骤，得到果胶酶第2次纯化的比活力为2012.40 U/mg，纯化倍数为5.72，回收率为82%。Chen等^[15]使用三相分离纯化黄瓜中过氧化物酶，酶回收率和纯化倍数达到84.53%和5.28倍。除了三相分离外，酶最常用的纯化手段有色谱和溶剂等，色谱技术有离子交换色

谱和凝胶过滤色谱。Salunke 等^[16]使用 DEAE Sephadex A 50 和凝胶过滤色谱 Sephadex G 100 纯化白假单胞菌 SUHU 25 纤溶酶, 得到其纯化倍数为 3.81, 而酶回收率仅为 7.82%。郭宇婷等^[17]纯化槟榔果仁多酚氧化酶, 使用 DEAE-Sepharose Fast Flow 和 Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 柱层析收集到的酶液其纯化倍数为 4.11 倍, 回收率仅为 7.8%。由表 1 可知, 马铃薯细胞壁粗酶液从硫酸铵粗分离到三相法进一步纯化, 随着每一步纯化步骤, 酶活、蛋白质含量和回收率都在下降, 而比活力和纯化倍数都在增加。与色谱技术分离相比, 三相分离表现出较好的纯化倍数和更高的回收率, 且操作更为简单的优势。

2.2 环境条件对马铃薯细胞壁细胞壁果胶酶的影响

2.2.1 温度对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响

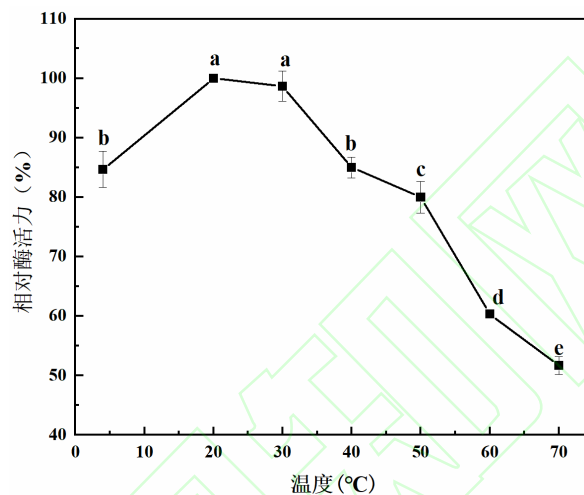


图 2 温度对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响
Fig.2 Effect of temperature on the enzymatic activity of pectinase extracted from potato cell wall

酶促反应, 本质上是酶与底物间分子的结构互补以及诱导契合, 容易受到环境变化的影响。如图 2 所示, 果胶酶相对酶活性在 4 °C 为 85%, 随着温度的上升, 其相对酶活性也得到显著升高。这是由于分子的热运动加快后, 导致酶与底物直接接触的机会增加所致。在 20~30 °C 之间, 马铃薯细胞壁果胶酶表现出了最大活性。30 °C 之后温度升高, 则果胶酶活性降低。这是由于酶的本身是蛋白质, 随着温度的上升, 蛋白质逐渐变性而失去活性。由此可知, 温度对果胶酶的活性影响很大, 且呈现先上升后下降的趋势。对微生物果胶酶的研究中发现, 新型板氏耶氏菌 XB3^[18]产胞外果胶酶的最适温度为 50 °C, 米根酶发酵产生的果胶酶最适温度为 35 °C^[19], 芽孢杆菌胞外果胶酶在 40 °C 下表现出最好的活性^[20]。因此, 相对来源于微生物的果胶酶, 马铃薯细胞壁的果胶酶 (来源于植物) 的最适温度较低。

2.2.2 pH 值对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响

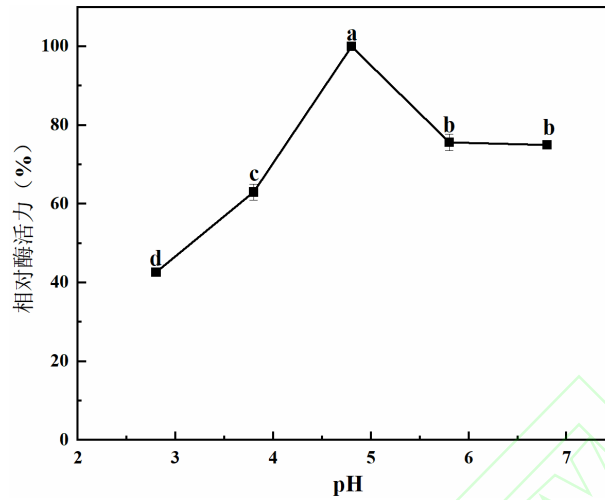


图 3 pH 值对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响
Fig.3 Effect of pH on the enzymatic activity of pectinase extracted from potato cell wall

如图 3 所示, pH 值对马铃薯细胞壁果胶酶活有极大的影响, 在 pH 2.8~4.8, 其相对酶活随 pH 值的降低而下降, 可能是由于 pH 值的降低让维持酶高级结构的盐键、范德华键断裂, 改变了酶蛋白的结构稳定性, 从而导致马铃薯细胞壁果胶酶对果胶的酶解能力降低。Gong 等^[21]研究结果表明 1% 的醋酸浓度 (pH 2.8) 会延缓贮藏后期马铃薯片硬度的下降, 从而在一定程度上会抑制果胶酶和纤维素酶的活性, 与本试验结果一致。在 pH 4.8 时果胶酶处于最有利与果胶结合并发生酶解的状态, 表现出最大酶活力, 随着 pH 值的上升, 酶的空间结构再次受到 pH 值的影响, 导致酶活降低。由此可知, pH 值对马铃薯细胞壁果胶酶活的影响呈现先上升后下降的趋势。在微生物果胶酶中芽孢杆菌 ZJ1407 最适 pH 值为 5.0^[22], 花生黑曲霉胞外果胶酶最适 pH 值为 4.0^[23]。因此, 马铃薯细胞壁果胶酶的最适 pH 值与微生物果胶酶的最适 pH 值相似。

2.2.3 金属离子对马铃薯细胞壁果胶酶活性影响

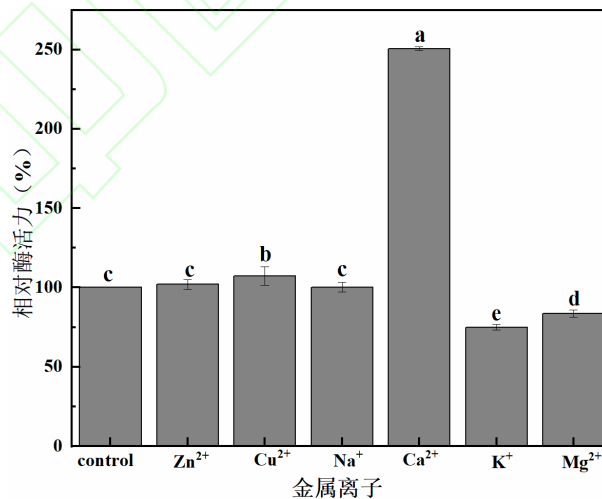


图 4 金属离子对马铃薯细胞壁果胶酶活性的影响
Fig.4 Effect of metal ions on the enzymatic activity of pectinase extracted from potato cell wall

金属离子能够与酶蛋白结合或与底物发生作用从而促进或抑制酶的活性^[24]。果胶酶是由 PME、PL、PG 等构成的一类复合酶, 其中 PME 和 PG 是酶解果胶主要的酶, PME 是 PG 酶解果胶的必要前提。Anand 等^[25]研究黄曲霉 MTCC 7589 外聚半乳糖醛酸酶的分离纯化时表明金属离子 Co²⁺、Cu²⁺均

能刺激 PG 活性, 也有研究^[26]表明 Ca^{2+} 能够促进 PME、PG 活性, 因此 Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 能够促进马铃薯细胞壁果胶酶活性, 且可能由于 Ca^{2+} 能同时促进 PME 和 PG 活性, 导致其对马铃薯细胞壁果胶酶活力的促进效果更显著。而 K^{+} 、 Mg^{2+} 能抑制马铃薯细胞壁果胶酶的活性, 这与微生物果胶酶^[22, 27-28] 研究结果一致。

2.3 马铃薯细胞壁果胶酶的特性

2.3.1 马铃薯细胞壁果胶酶的反应稳定性

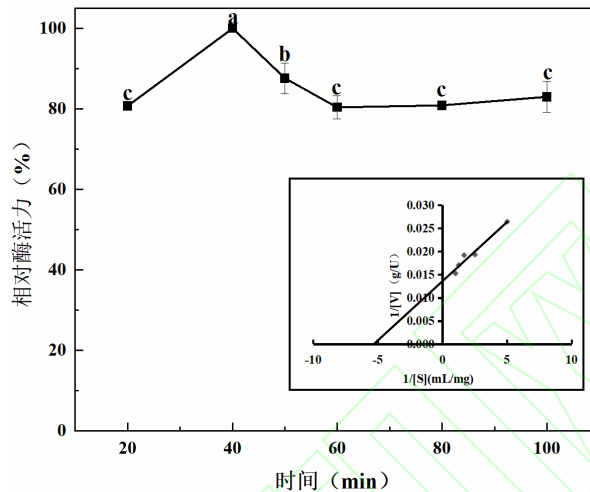


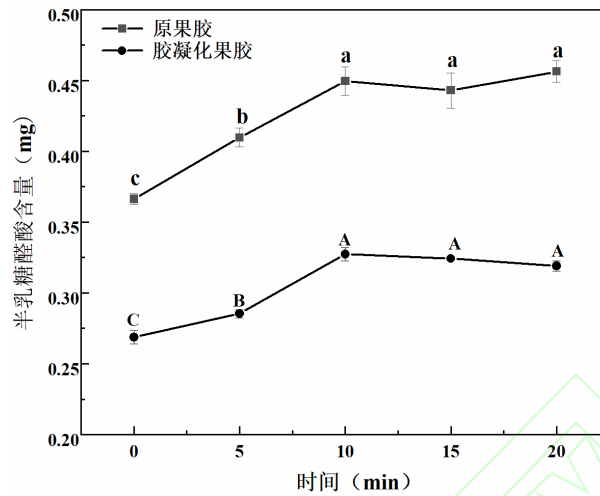
图5 马铃薯细胞壁果胶酶稳定性及反应常数

Fig.5 Stability and reaction constants of pectinase extracted from potato cell wall

如图 5 所示, 随着时间的延长, 果胶酶与底物 (果胶) 接触面积逐渐增大, 作用位点增多, 因此酶活显著上升, 在 40 min 时马铃薯细胞壁果胶酶活性达到最高。40 min 后暴露在 20 °C 下的马铃薯细胞壁果胶酶的活性逐渐降低, 导致果胶酶裂解果胶的能力下降。随着果胶酶与底物果胶反应完全, 60 min 后其相对酶活力趋于平稳。Oumer 等^[29] 在研究枯草芽孢杆菌 Btk 27 产果胶酶的纯化表征中, 得到的结果与本研究不一致, 其果胶酶反应到 60 min 时酶活稳定, 60 min 后酶活下降。因此, 来源于微生物的果胶酶显示出比马铃薯细胞壁果胶酶更加稳定的特性。

米氏常数是一种表示酶与底物亲和性的特征常数。以 $1/S$ 为横坐标, $1/V$ 为纵坐标, 绘制的米氏曲线如图 5 中插图所示。依据得到的米氏方程 $y=0.006x+0.0455$, $R^2=0.9876$, 计算果胶酶的米氏常数, 从而得到 $K_m=0.13 \text{ mg/mL}$, $V_{\max}=277.80 \text{ U/g}$ 。不同果胶酶的动力学常数不同, 枯草芽孢杆菌 15A-B92^[30] 分离纯化果胶酶时结果表明, 其 K_m 和 V_{\max} 分别为 1.72 mg/mL 和 $1\ 609 \text{ U/g}$, 对枯草芽孢杆菌 Btk 27^[29] 所产果胶酶的研究表明, 其果胶酶动力学常数 K_m 和 V_{\max} 分别为 1.89 mg/mL 和 $1\ 494 \text{ U/g}$ 。由于植物提取酶的浓度低, 因此微生物果胶酶的反应速率 (V_{\max}) 比马铃薯细胞壁果胶酶快。而 K_m 与酶的浓度没有关系, 只与温度、pH 值有关, K_m 越小, 结果表明马铃薯细胞壁果胶酶与果胶有较好的亲和力。

2.3.2 马铃薯细胞壁果胶酶对原果胶及胶凝化果胶的酶解效果对比



注：图中不同小写字母代表不同酶解时间原果胶半乳糖醛酸含量之间存在显著差异 ($P < 0.05$)，不同大写字母代表不同酶解时间胶凝化果胶半乳糖醛酸含量之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 6 马铃薯细胞壁果胶酶对原果胶及胶凝化果胶的酶解效果对比
Fig.6 Comparison of enzymatic hydrolysis effects of potato cell wall pectinase on protopectin and gelatinized pectin

由图 6 可见，随着酶解时间的延长，马铃薯原果胶和胶凝化果胶半乳糖醛酸含量都呈现出先上升后不变的趋势，而胶凝化果胶经果胶酶酶解后的半乳糖醛酸含量始终低于原果胶。前期研究结果^[31]表明，马铃薯中的原始果胶主要由球形和短的、单分枝的结构组成，而胶凝化果胶会出现多聚体和缠结的线状结构，推测马铃薯果胶发生胶凝化后阻碍了酶作用位点的形成，从而导致半乳糖醛酸含量的下降，这表明果胶胶凝化后对果胶酶表现出一定的抗性。

3 结论与讨论

本文以马铃薯细胞壁果胶酶作为研究对象，探究其酶学特性及其对胶凝化果胶的酶解效果，为预处理调节植物的热加工质构特性提供参考依据。研究发现，随着酶提取液中硫酸铵浓度的增大，所得沉淀中蛋白质及果胶酶活性逐渐增大，且在硫酸铵饱和度达到 60% 时，马铃薯细胞壁果胶酶的最高比活力为 665.42 U/mg，纯化倍数为 1.89，回收率为 96%。经三相纯化后，酶的比活力 665.42 U/mg 显著提升到 2 012.40 U/mg。所得果胶酶的酶活均受到环境（温度及 pH 值）的显著影响，升高温度 ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) 和降低 pH 值 (< 4) 会抑制其活性。 Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 能够促进马铃薯细胞壁果胶酶活性，而 K^{+} 和 Mg^{2+} 则相反。所得果胶酶的米氏常数 ($K_m = 0.13\text{ mg/mL}$, $V_{\max} = 277.80\text{ U/g}$)，低于常见的微生物果胶酶。有趣的是，酸诱导胶凝化的果胶对果胶酶的水解表现出了抗性。这证明原果胶在细胞壁中发生胶凝化，不仅是在物理层面（胶凝化后的黏接），且在生物层面（降低果胶酶作用）上，都有助于稳固马铃薯热加工后的细胞结构。

参考文献

- [1] 丁凯鑫, 王立春, 田国奎, 等. 马铃薯生长及生理特性对水分胁迫的响应研究[J]. 作物杂志, 2023 (4): 16-21.
DING K X, WANG L C, TIAN G K, et al. Response of potato growth and physiological characteristics to water stress[J]. Crop Magazine, 2023(4): 16-21.
- [2] LIU J, WEN C R, WANG M, et al. Enhancing the hardness of potato slices after boiling by combined treatment with lactic acid and calcium chloride: Mechanism and optimization[J]. Food Chemistry, 2020, 308(5): 124832.
- [3] 张小丹, 赵赛赛, 林一, 等. 果胶酶产生菌 *Bacillus subtilis* Z-5 的筛选及酶学性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49 (11): 34-40.
ZHANG X D, ZHAO S S, LIN Y, et al. Screening and enzymatic properties of pectinase-producing bacteria *Bacillus subtilis* Z-5[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(11): 34.
- [4] GE Y H, ZHANG J H, LI C Y, et al. Trisodium phosphate delays softening of jujube fruit by inhibiting cell wall-degrading enzyme activities during ambient storage[J]. Scientia Horticulturae, 2020, 262(4): 109059.
- [5] REN Y Y, SUN P P, WANG X X, et al. Degradation of cell wall polysaccharides and change of related enzyme activities with fruit softening in *Annona squamosa* during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 166(3): 111203.

- [6] 郭凯华, 高晓丽, 魏莎, 等. 果胶酶处理对沙棘汁生产中主要理化指标的影响[J]. 广东化工, 2022, 49(16): 58-60.
GUO K H, GAO X L, WEI S, et al. Effect of pectinase treatment on main physicochemical index in seabuckthorn juice production[J]. Guangdong Chemical Industry, 2022, 49(16): 58-60.
- [7] 刘静华, 欧阳钰, 钟舒雅, 等. 草菇自溶过程中果胶酶及纤维素酶的活力变化[J]. 中国食用菌, 2021, 40(5): 74-78.
LIU J H, OUYANG Y, ZHONG S Y, et al. Pectinase and cellulase activity change in the process of volvariella volvacea autolysis[J]. Edible Fungi of China, 2021, 40(5): 74-78.
- [8] 黄浩, 翁霞. 南果梨果胶酶活力的研究[J]. 鞍山师范学院学报, 2021, 23(2): 48-52.
HUANG H, WENG X, Study on enzyme activity of nanguo pear pectinase[J]. Journal of Anshan Normal University, 2021, 23(2): 48-52.
- [9] 刘洋, 陈勤操, 刘德春, 等. 茶叶多酚氧化酶三相分离纯化及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 119-124.
LIU Y, CHEN Q C, LIU D C, et al, Purification of polyphenol oxidase from tea leaf by three phase partitioning and enzymatic properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 119-124.
- [10] 于振林, 刘亚琼, 王颖, 等. 白地霉红枣果胶酶的分离纯化及酶学性质的研究[J]. 食品科技, 2017, 42(10): 253-261.
YU Z L, LIU Y Q, WANG J, et al, Purification and enzymatic properties of jujube pectinase from *Galactomyces candidum*[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(10): 253-261.
- [11] 林智. 食品中蛋白质含量的测定[J]. 当代化工, 2010, 39(2): 224-226.
LIN Z. The determination of the protein content in food[J]. Contemporary Chemical Industry, 2010, 39(2): 224-226.
- [12] DRANCA F, OROIAN M. Optimization of pectin enzymatic extraction from *malus domestica* 'fálticeni' apple pomace with celluclast 1.5 L[J]. Molecules, 2019, 24(11): 2158.
- [13] ÇINAR F, AKSAY S. Purification and characterization of polyphenol oxidase from myrtle berries (*Myrtus communis L.*)[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2022, 16(3): 2282-2291.
- [14] KUMAR V B A, MOHAN T C K, MURUGAN K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*)[J]. Food Chemistry, 2008, 110(2): 328-333.
- [15] CHEN X Y, HU Y X, TAN Z J. Innovative three-phase partitioning based on deep-eutectic solvents and sugars (sugaring-out effect) for cucumber peroxidase purification[J]. Microchemical Journal, 2023, 190(2): 108702.
- [16] SALUNKE A S, KHARAT A S. Data on isolation and purification of fibrinolytic enzyme from *Pseudomonas baetica* SUHU25[J]. Data in Brief, 2019, 26(1): 104369.
- [17] 郭宇婷, 潘永贵, 张正科, 等. 槟榔果仁多酚氧化酶分离纯化及其酶特性研究[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 235-239.
GUO Y T, PAN Y G, ZHANG Z K, et al. Isolation, purification and characterization of polyphenol oxidase from areca nut kernel[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 235-239.
- [18] EZEH N O, NWAGU T N T, AMADI O C, et al. Extracellular pectinase production from a novel *Yarrowia phangngaensis* XB3 grown on banana waste and its application in fruit juice clarification[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2023, 47(3): 102614.
- [19] CHOWDHURY T I, JUBAYER M F, UDDIN M B, et al. Production and characterization of pectinase enzyme from *rhizopus oryzae*[J]. Potravinarstvo, 2017, 11(1): 641-651.
- [20] MURUGAN T, DEEPIKA P, KOWSALYA A, et al. Production and characterization of extracellular pectinase from a newly isolated *Bacillus* species from fruit waste soil[J]. Materials Today: Proceedings, 2021, 45(2): 2087-2090.
- [21] GONG W H, SHI B Y, ZENG F K, et al. Evaluation of cooking, nutritional, and quality characteristics of fresh-cut potato slice pretreated with acetic acid[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(1): 427-437.
- [22] YU P, XU C C. Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus* sp. ZJ1407[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 972-980.
- [23] RASHMI R, SIDDALINGA M K R, SNEHA G, et al. Partial purification and biochemical characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* isolated from groundnut seeds[J]. Journal of Biosciences, 2008, 9(1): 378-384.
- [24] 邢颖, 徐怀德. 果蔬贮藏保鲜过程中果胶酶变化的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 401-407.
XING Y, XUN H D. Research progress of changes of pectase during the storage of fruits and vegetables[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 401-407.
- [25] ANAND G, YADAV S, YADAV D. Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017, 10: 264-269.
- [26] HAN Y Y, DU J H. Relationship of the methanol production, pectin and pectinase activity during apple wine fermentation and aging[J]. Food Research International, 2022, 159(8): 111645.
- [27] 罗雯, 徐珂盼, 王怡, 等. 果胶酶生产菌株的筛选、发酵优化及其酶学性质研究[J]. 食品科技, 2022, 47(4): 6-13.
LUO W, XUN K P, WANG Y, et al. Screening, fermentation optimization and enzymatic properties of pectinase-producing strains[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(4): 6-13.
- [28] 秦日甜, 谢占玲. 镰刀菌 Q7-31T 果胶酶 PGL1 的分离纯化、酶学性质鉴定及结构分析[J]. 生物技术通报, 2018, 34(4): 151-160.
QIN R T, XIE Z L. Isolation, purification, characterization and structural analysis of a pectinase PGL1 produced by *Fusarium* sp. Q7-31T[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(4): 151-160.
- [29] OUMER O J, ABATE D. Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans[J]. Enzyme Research, 2017, 2017(3): 7686904.
- [30] ALQAHTANI Y S, MORE S S, SHAIKH I A, et al. Production and purification of pectinase from *Bacillus subtilis* 15a-b92 and its biotechnological applications[J]. Molecules, 2022, 27(13): 4195.
- [31] HU Q, SHI B Y, DONG N, et al. Physicochemical and morphological characteristics of potato pectin with in-situ acid-induced gelation[J]. Journal of Food Science, 2022, 87(9): 3965-3977.