

國立台灣大學生物資源暨農學院農業化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Agricultural Chemistry

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

愛玉子瘦果渣水萃物中果膠酯酶抑制物之研究

Studies on the Characteristics of Pectinesterase Inhibitor

from Aqueous Extract of Jelly Fig (*Ficus awkeotsang*

Makino) Achenes Residue

馮幼佳

Feng You-Jiang

指導教授：蘇南維 博士

Advisor: Nan-Wei Su, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

愛玉子瘦果渣水萃物中果膠酯酶抑制物之研究  
Studies on the Characteristics of  
Pectinesterase Inhibitor from Aqueous Extract of  
Jelly Fig(Ficus awkeotsang Makino) Residue

本論文係馮幼佳君 (R96623009) 在國立臺灣大學農化學系 (所) 完成之碩士學位論文，於民國九十八年六月二十九日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：薛南維 (簽名)

(指導教授)  
李敏雄

陳錦樹

古明隆

賴盈璋

李達源

系主任、所長

(簽名)

## 誌謝

如果要為這篇碩士論文起個小名，我想要取名為「never ending story」。多虧先前實驗的經驗與失敗，才有目前的一些小成果，在此十分感謝蘇南維副教授給了學生不少機會接觸不同的實驗，以及潛移默化地啟發了學生許多邏輯性的思考方式；而李敏雄教授對將科技融入生活的堅持一直令學生敬佩不已，最喜歡就是在走廊上攔住李老師，聽李老師提點實驗的疑惑該如何解決；在此也要非常謝謝口試委員陳錦樹教授、古國隆副教授及賴盈璋助理教授口試中論文的指導與指正，使本論文得以更臻完備，此外特別感謝古老師提供儀器並不厭其煩和學生討論並給予不少建議，使學生受益良多。

讓我最最驕傲的忘年之交，莫過於劉大俠劉媽了，儘管忙碌還是每天活力充沛，上山下海都一樣沒問題，每次看到劉媽，心裡總有個聲音告訴自己：「以後我也要成為跟劉媽一樣帥氣的奶奶！」

騰旭學長大概是本實驗室裡最最辛苦的一位研究生了，若說劉媽是大總管，那學長就是超級奶爸了，專業的實驗指導或是生活上的偷吃步，學長都有獨家的秘方，真慶幸這實驗室能有學長在。在這實驗室裡從馬小圭到現在變成人兒口中的馬大姐，常常想起從前琮元學長總在我沮喪的時候說笑話逗我開心，偷畫小烏龜在我的筆記上；蔚任學長的一身好手藝讓我身上的肉增加了不少；還有致剛學長會在我實驗太晚回不了家的時候送我一程；而在我每一個重要的人生階段，都一定少不了彥志的加油打氣；可愛的培益學長雖然常常對我施予暴力，但卻是最常讓我要到肚子痛的開心果；最重要的當然還有瑛哥，有他在的時候總是有如親人在身邊格外安心的感覺，好像天塌下來都有瑛哥頂著什麼都不用怕。

如果說實驗室是個大家庭，那我的兄弟姐妹就屬方董、祐生、小葡萄跟張阿家了吧，模範生方董雖然現在是英勇的國軍，但他總不忘關心我的實驗進度還有實驗室的最新消息，好像他從未離開一樣；帶了本英文字典就到金門做兵的祐生，不知道那裡的高粱符不符合他的口味；小葡萄宜璇跟我的關係最複雜了，既是同學也是學姊，很高興在大四那年有妳的陪伴，還常提醒我不要忘記自己是個女孩兒；和張阿家在最後的那段日子裡幾乎是相依為命，我想我會永遠記得我們的急智歌曲和快速競走；後來加入的阿勇，也要謝謝你常跟我一個鼻孔出氣；對了，小蔡的故事，這應該是值得一輩子津津樂道的。

畢業的當季，腦袋不時浮現過去跟大家一起玩耍嬉鬧的畫面，感謝這最後半年裡我的最佳玩伴—小Q和小蘭。謝謝你們陪我度過了最棒的25歲生日，25歲的這一年裡因為有大家的祝福和驚喜讓我的心裡總是滿滿的；小Q的那份禮物真的十分令人感動，對於我的任性大概是配合度最高的一位；小蘭對我來說真是個好玩咖，刀山跟油鍋都一樣海浪滔滔我不怕。323裡有太多太多的回憶，沒想到在我這一屆就這樣畫下了句點，希望在未來的329也能繼承這裡的歡笑與快樂。

煜鈞學長、嘉珣學姐、怡燕學姊、彥良學長、安井學長、阿山哥還有眾多學長姐們，謝謝你們這一路上的照顧與提攜，教會我很多很多的事，讓我開了很多很多的眼界，是你們在我的身上裝上了翅膀，教我學會飛翔，香辰學長和靜玲學姐給了我很多很多的勇氣，讓我能有更堅定的決心往更遠的地方飛去而不感到害怕。謝謝我的好麻吉，我的夏天吳小群，最有默契的趴妮林早和，清交殺手陳小牛，妳們總是分享了我的種種心情，心有靈犀地在每個最適當的時機出現在我的身邊，陪著我大笑也陪著我難過。原諒我無法一一列出所有的朋友，總之謝謝你們成就了馬小圭許許多多的夢想，也成就了現在的馬阿瓜。

我最愛的家人，你們一直是我往前的動力，謝謝你們給了我很大的空間完成不同的嘗試與體驗，很高興有這樣的哥哥和妹妹，大家分工合作地完成了很多事，共同度過了這些歲月。最要感謝老天一直與我同在，派了這麼多的天使來到我的身邊陪伴我成長，陪我寫著自己的故事。而這個故事，似乎沒有完結的一天……

## 中文摘要

本研究從愛玉子瘦果渣分離其中之果膠酯酶抑制物，並探討其理化性質，同時建立一快速檢測抑制果膠酯酶活性之測定方法，用以輔助追蹤愛玉子中果膠酯酶抑制物之化學組成。

以甲基紅及亞甲基藍混合作為指示劑，利用其於鹼性下呈現綠色，酸性則為紫紅色之特性，發現此指示劑於果膠溶液中之 OD<sub>527 nm</sub> 變化量與反應液中 pH 之變化量呈現良好之線性關係，故可做為檢測果膠酯酶活性抑制程度之指示劑。

將愛玉子瘦果渣以水均質萃取，加入等體積 3% 之 NaCl 後，破壞乳化相去除部分雜質，再經由 90% 丙酮沉澱去除不可溶之蛋白質，將丙酮上清液減壓濃縮去除丙酮後，通過 HP-20 管柱進行疏水性層析區分，結果顯示甲醇流洗出的區分具有最顯著的抑制活性，可有效分離愛玉子中果膠酯酶抑制物。

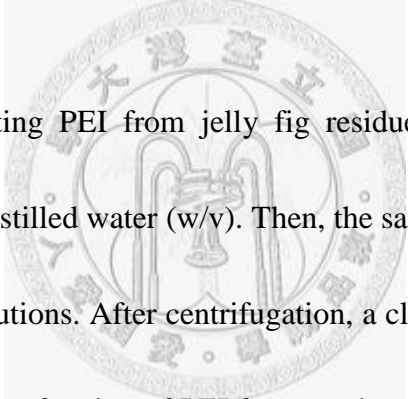
愛玉子中果膠酯酶抑制物即使經過 90% 丙酮處理後，仍在上清液顯示具有抑制活性，且具有高耐熱性，推測此抑制物之成份並非多肽；此外，此抑制物可被 PVPP 所吸附，並經酸水解後會失去抑制活性且酸水解後之游離胺基酸之含量並無增加，推測此抑制物可能為酚類化合物；依其與蛋白質水溶液混合後會產生沉澱之特性，與 HPLC 圖譜 hump-like 之現象，推論其可能為單寧類化合物。以 HPLC 分析此抑制物之酸水解產物，發現水解物中出現有鞣花酸 (ellagic acid) 單元，推測此果膠酯酶抑制物可能屬於一種可水解之鞣花酸單寧。

此外，90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 (PEI-AS) 經 HP-20 管柱流洗所得之甲醇區分物可抑制枯草桿菌微生物之  $\alpha$ -amylase 及牛胰蛋白酶 (trypsin) 之活性，但是對豬脂解酶 (lipase) 活性則有促進之效果。

關鍵字：愛玉子；果膠酯酶抑制劑；單寧

## Abstract

In this study, we isolated pectinesterase inhibitors (PEI) from aqueous extract of jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) residue, which is the by-product of jelly curd making and studied on the physico-chemical characteristics of the pectinesterase inhibitors. In addition, we developed a simple and effective procedure to monitor the change of pH value in the reaction solutions by means of using a devised indicator of methylene blue and methyl red for tracing the fractions of PEI during the isolation processes.



The process for isolating PEI from jelly fig residue was firstly conducted by extraction with 12 fold of distilled water (w/v). Then, the same volume of 3% NaCl was added into the extracted solutions. After centrifugation, a clear crude extract solution of PEI was obtained. The further fraction of PEI from crude extract solution was preceded by adding volumes of acetone into the extract for removing the protein of materials. Following removing acetone under vacuum, the 90 % acetone-soluble aqueous solution was subjected into a Diaion HP-20 column. The most level of PEI fraction was obtained from methanol elution of the hydrophobic chromatography.

According to the physico-chemical characteristics of PEI tested in this study, the PEI of jelly fig achenes was supposed as belonging to a polyphenolic component. Furthermore, the results from HPLC pattern profile, protein-binding capability and

analysis of hydrolysate were revealed that the PEI of jelly fig achenes was considered as being a novel tannin.

Besides, we found out the PEI also inhibited the activities of  $\alpha$ -amylase (*Bacillus* spp.) and trypsin (bovine pancreas), but had an enhanced effect toward lipase (porcine pancreas).

Keywords: jelly fig achenes, pectinesterase inhibitor, tannin



# 目錄

口試委員會審定書 .....	i
誌謝 .....	i
中文摘要 .....	iii
Abstract.....	iv
第一章、研究動機 .....	1
第二章、文獻回顧 .....	2
第一節、果膠酯酶抑制劑 (Pectinesterase inhibitor, PEI) .....	2
壹、果膠 (Pectin) .....	2
1. 果膠之化學組成 .....	2
2. 果膠之酯化度 .....	2
3. 果膠在食品上之應用 .....	6
貳、果膠酯酶 (Pectinesterase, PE) .....	6
1. 果膠酯酶之分布 .....	6
2. PE 作用機制 .....	6
3. 果膠酯酶之理化性質 .....	8
4. 果膠酯酶活性測定 .....	8
5. 果膠酯酶活性影響因素 .....	9
參、果膠酯酶抑制劑 .....	11
1. 果膠酯酶抑制劑之研究與發現 .....	11
2. 植物中內源性之果膠酯酶抑制劑 .....	11
3. 果膠酯酶抑制劑存在於植物體內的生理意義 .....	12
4. 果膠酯酶抑制劑在食品上的應用 .....	13
第二節、愛玉子 .....	14
壹、愛玉子 .....	14
1. 愛玉子名稱之由來 .....	14
2. 愛玉子之稱呼 .....	14
3. 愛玉子之植物型態 .....	15
貳、愛玉凍 .....	17
1. 愛玉凍凝膠原理 .....	17

2. 影響凝膠之因素 .....	17
參、愛玉子中果膠酯酶活性 .....	18
肆、愛玉子中存在之果膠酯酶抑制劑 .....	18
1. 愛玉子 PEI 之發現 .....	18
2. 愛玉子 PEI 之化合物鑑定 .....	19
3. 愛玉子 PEI 應用性之探討 .....	19
第三節、單寧 (Tannin) .....	21
壹、單寧之定義與分類 .....	21
貳、單寧的分類與特性 .....	23
1. 可水解單寧 (Hydrolysable tannins) .....	23
2. 縮合單寧 (condensed tannins) .....	25
第三章、材料與方法 .....	26
第一節、實驗架構 .....	26
第二節、實驗材料 .....	27
壹、生物性材料 .....	27
一、愛玉子 ( <i>Ficus awkeotsang</i> M.) .....	27
二、果膠酯酶 (Pectinesterase, 以下簡稱 PE) .....	27
貳、試藥 .....	27
第三節、儀器設備 .....	28
第四節、實驗方法 .....	29
壹、樣品前處理 .....	29
1. 愛玉子 PEI 之製備 .....	29
2. 豌豆莢 PE 之萃取 .....	29
貳、建立快速檢測 PE 活性之方法 .....	31
1. PE 酵素活性指示劑之製備 .....	31
2. PE 酵素活性指示劑之波長選擇 .....	31
3. 吸光值 OD <sub>527 nm</sub> 與[H <sup>+</sup> ]改變量之相關性 .....	31
4. 抑制 PE 酵素能力試驗之操作流程 .....	31
參、PEI 之追蹤與鑑定 .....	32
1. 丙酮沉澱試驗 .....	32



2. PEI 分子量之初步區分 .....	32
3. PVPP (Polyvinylpyrrolidone) 吸附試驗 .....	32
4. 與不同蛋白質之交互作用 .....	32
5. 酸水解 .....	32
肆、管柱層析法之分離純化與化合物分析 .....	34
1. Diaion HP-20 管柱分離 .....	34
2. 甲醇流洗液之酵素水解 .....	34
3. PEI 與 Tannase 之交互作用 .....	34
4. 甲醇流洗液之酸水解 .....	34
5. Ninhydrin test .....	35
伍、愛玉子瘦果渣水萃物之性質探討 .....	37
1. PEI 對 Lipase 活性之影響 .....	37
2. PEI 對 $\alpha$ -amylase 活性之影響 .....	37
3. PEI 對 Trypsin 活性之影響 .....	37
陸、數據之統計分析 .....	38
第四章、結果與討論 .....	39
第一節、樣品前處理與 PEI 活性追蹤方法之建立 .....	39
壹、PEI 活性追蹤方法之建立與量化 .....	39
1. PE 酵素活性指示劑及 PEI 活性追蹤 .....	39
2. PE 酵素活性指示劑之波長選擇 .....	40
3. OD <sub>527 nm</sub> 與反應液中 H <sup>+</sup> 釋放量之相關性 .....	40
貳、愛玉子 PEI 之萃取與純化 .....	44
第二節、PEI 之追蹤與鑑定 .....	46
1. 丙酮沉澱試驗 .....	46
2. 分子量之初步區分 .....	46
3. PVPP 吸附試驗 .....	47
4. 與蛋白質之交互作用 .....	48
5. 酸水解 .....	48
第三節、愛玉子 PEI 之純化與組成分析 .....	53
壹、Diaion HP-20 管柱分離純化 .....	53
貳、愛玉子 PEI 之組成分析 .....	56
1. Tannase 酵素水解 .....	56

2. PEI 與 Tannase 之交互作用 .....	56
3. MeOH <i>frc.</i> 酸水解 .....	57
4. Ninhydrin test .....	57
第四節、生物活性試驗 .....	62
1. 抑制 Lipase 活性測試 .....	62
2. 抑制 $\alpha$ -amylase 活性測試 .....	62
3. 抑制 Trypsin 活性測試 .....	63
第五章、結論 .....	67
第六章、參考文獻 .....	68
附錄一、PE 酵素活性指示劑 .....	74
附錄二、以 3%NaCl 去除愛玉子水萃液之乳化相 .....	75
附錄三、酸水解對 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 (PEI-AS) 之影響 .....	76



## 圖目錄

圖 2.1 Pectin 之組成單元與化學結構示意圖 .....	3
圖 2.2 果膠之連續分子片段與其官能基 .....	4
圖 2.3 鼠李糖 (Rhamnose) 穿插於 D-半乳糖醛酸 (GalA) 中所造成之轉折 .....	5
圖 2.4 果膠之鈣離子鍵凝膠 .....	7
圖 2.5 愛玉雌隱花果剖面圖 .....	16
圖 2.6 單寧之化學結構分類 .....	22
圖 2.7 沒食子酸單寧示意圖 .....	23
圖 2.8 鞣花酸 .....	24
圖 2.9 SanguinH-6 化學結構式(草莓中主要的鞣花單寧) .....	24
圖 2.10 縮合單寧之單元與結構示意 .....	25
圖 3.1 愛玉子 PEI 粗萃液萃取純化流程圖 .....	30
圖 3.2 愛玉子 PEI 之 Diaion HP-20 管柱純化流程圖 .....	36
圖 4.1 PE 催化活性指示劑於果膠溶液中經 PE 酵素催化後扣除空白對照組之 UV-VIS 光譜 .....	42
圖 4.2 PE 催化活性指示劑於果膠溶液中 OD527nm 與 Log[amount of H <sup>+</sup> release] 之關係圖 .....	43
圖 4.3 愛玉子 PEI 粗萃液與其分子量區分之 PEI 抑制活性測定 .....	45
圖 4.4 玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液與其分子量區分片段及酸水解區分片段 .....	50
圖 4.5 愛玉子 PEI 粗萃液與 PVPP 和蛋白質間之交互作用 .....	51
圖 4.6 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液酸水解 HPLC 分析圖譜 .....	52
圖 4.7 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液之 HP-20 管柱流洗 .....	54
圖 4.8 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 HPLC 分析圖譜 .....	55
圖 4.9 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 MeOH fraction 相關 HPLC 分析圖譜 .....	59
圖 4.10 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液之 HP-20 MeOH fraction 經 tannase 水解 .....	

之 PEI 抑制活性測定 .....	60
圖 4.11 Tannase 與愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 HP-20 MeOH fraction 作用後 對 Tannic acid 水解能力測試之 HPLC 分析圖譜 .....	61
圖 A.1 果膠溶液與 PE 作用後 PE 酵素活性指示劑顏色變化 .....	74
圖 A.2 愛玉子水萃液加入等體積之 3%NaCl 對乳化狀態之影響: .....	75
圖 A.3 PEI-AS 酸水解前後之外觀變化 .....	76



## 表目錄

表 4. 1 Ninhydrin test 中 Gelatin 與 MeOH frac. 酸水解前後之 OD <sub>570 nm</sub> .....	58
表 4. 2 愛玉子水萃物對 Lipase 活性之影響 .....	64
表 4. 3 愛玉子水萃物對 $\alpha$ -amylase 活性之影響 .....	65
表 4. 4 愛玉子水萃物對 Trypsin 活性之影響 .....	66



## 第一章、研究動機

在現今水果酒製酒工業中，以草莓酒為例，由於草莓本身之果膠成分較多，在釀造過程中若以全果進行釀造容易因果膠酯酶之釋出，使果膠水解產生甲醇，因而造成甲醇含量過高之問題，其解決方法有二，一為先進行榨汁後，將果肉分離，而後再以草莓汁釀酒，二為加入果膠酯酶之抑制劑。

除了外源性之果膠酯酶抑制劑，近年來亦有學者陸續發現植物中存在天然之果膠酯酶抑制劑奇異果(Balestrieri, et al. 1990)、馬鈴薯塊莖(Mcmillan and Perombelon 1995)、愛玉子(Jiang, et al. 2002)及硬心香蕉(Wu, Tseng et al. 2002)中皆有發現抑制 PE 活性之物質存在，且目前已廣泛應用於製酒工業中，抑制果膠酯酶之活性。

本研究原以回收利用愛玉子果凍之副產物—愛玉子瘦果渣為目的，分離純化其中之果膠酯酶抑制物，將其應用於草莓酒之造酒工業上，防止過量之甲醇於草莓酒釀造過程中生成。但在研究如何有效萃取分離果膠酯酶抑制物過程中，觀察果膠酯酶抑制物的理化特性，發現與 Jiang 等人（2002b）所發表之論文中指出愛玉子中果膠酯酶抑制物應分子量介於 3.5~4.5kDa 之 polypeptides 的理論有所出入，遂將實驗方向轉為愛玉子果膠酯酶抑制物之成份分析。

本研究主要針對 Jiang 等（2002b）之推論進行進一步的研究探討，以經漂洗過之愛玉子瘦果副產物為原料，希望藉由採用其他相關實驗方法研究愛玉子中果膠酯酶抑制物之理化性質，並建立快速檢測果膠酯酶抑制物抑制活性之方法輔助追蹤；此外，針對愛玉子瘦果渣之水草物進行生物活性測試。一方面確立果膠酯酶抑制物之性質，另一方面達到廢棄物再利用之目的，提高副產物之附加價值。

## 第二章、文獻回顧

### 第一節、果膠酯酶抑制劑 (Pectinesterase inhibitor, PEI)

#### 壹、果膠 (Pectin)

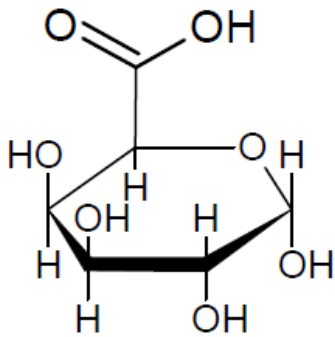
##### 1. 果膠之化學組成

植物中細胞壁與中膠層為果膠質所組成(Northcote 1958)，果膠質廣存於高等植物中，其單體為 D-半乳糖醛酸 (D-galacturonic acid) (圖 2.1)，其 C<sub>6</sub> 上之官能基可能為游離羧基、酯基或醯胺基 (amide) (Axelos 1991) (圖 2.2) 果膠質很少只有 D-半乳糖醛酸的存在，中間會有一些中性糖如葡萄糖、半乳糖，木糖 (xylose)、阿拉伯糖 (arabinose) 和鼠李糖 (rhamnose) 穿插其中 (圖 2.3) (Northcote 1958; Kiegestra 1973; Van Buren 1979)。鼠李糖通常會出現在以 D-半乳糖醛酸為主之主鏈上，形成主鏈的轉折，其餘之中性糖則是扮演果膠分子支鍊的角色，接在主鏈上，含量的多寡與種類，依果膠的來源、萃取條件和置備方法而異(Christensen 1986)。

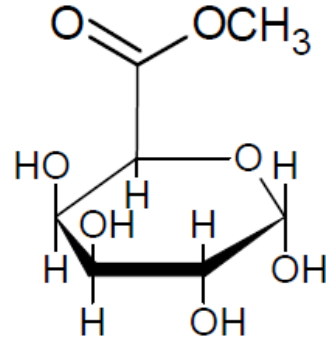
果膠是以 D-半乳糖醛酸由  $\alpha$ -1, 4-糖苷鍵結合成聚合物，甲醇會與接近一半以上的半乳糖醛酸酯化形成甲基酯鍵(Christensen 1986)，酯化的程度因植物種類、組織部位與成熟度之不同而有所差異，一般酯化度大約介於 60 至 90% 之間(Van Buren 1979)。

##### 2. 果膠之酯化度

分子中酯化的半乳糖醛酸於全部半乳糖酸所佔之百分比定義為果膠酯化度 (degree of esterification, DE) 或甲氧基化度 (degree of methoxylation, DM)。當 DE 大於 50% 稱為高甲氧果膠 (high-methyl pectin, 簡稱 HM pectin 或 HMP); DE 小於 50% 以下者，則為低甲氧果膠 (low-methyl pectin, 簡稱 LM pectin 或 LMP)。此外，酯化度亦可以重量百分率來表示，當所有的聚半乳糖醛酸中的羧基皆被甲基化酯化後，其甲氧基之重量百分率為 16.32%，大於 7% 者稱為高甲氧果膠，小於 7% 者稱為低甲氧果膠。但由於天然果膠中並不會皆為半乳糖醛酸單體所構成，會



D-Galacturonic acid



D-Galacturonic acid methyl ester

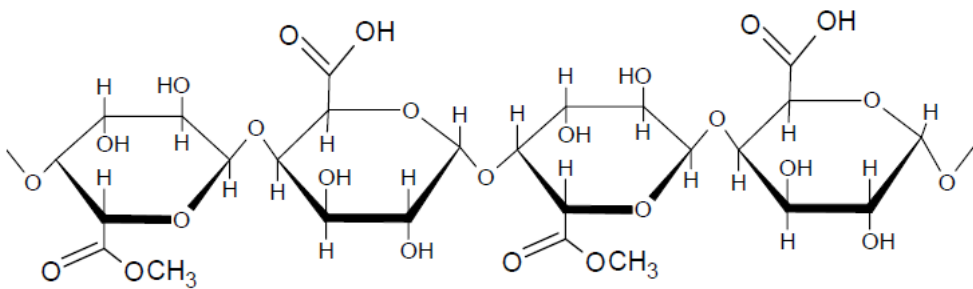


圖 2.1 Pectin 之組成單元與化學結構示意圖

Fig2.1 The constituent units and chemical structure of pectin.



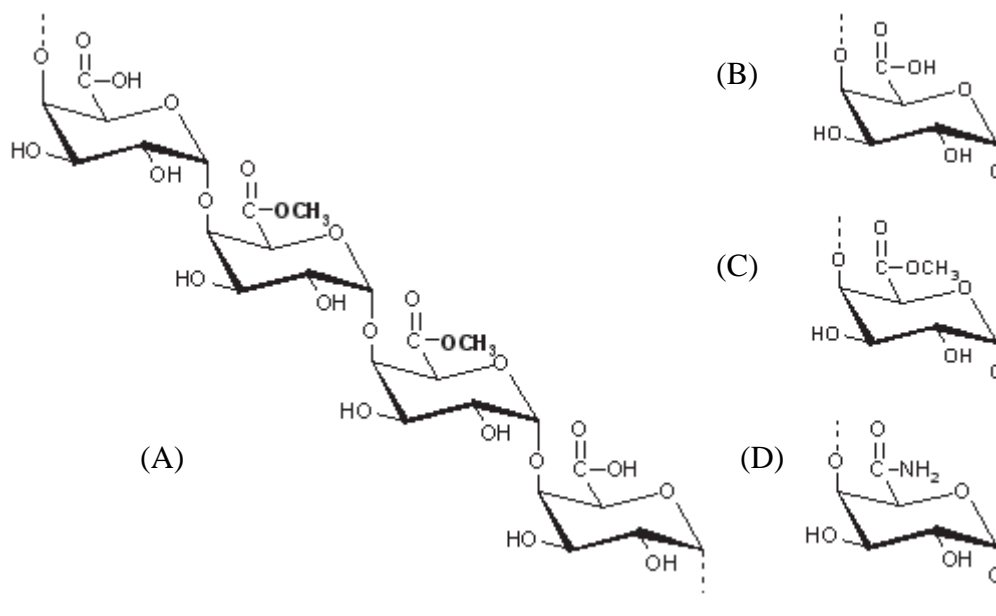


圖 2.2 果膠之 (A) 連續分子片段與其具 (B) 羧基、(C) 酯基及 (D) 醯胺基之官能基

Fig 2.2 (A) A repeating segment of pectin molecule and functional groups: (B) carboxyl; (C) ester; (D) amide in pectin chain. (Sriamornsak, 2003)

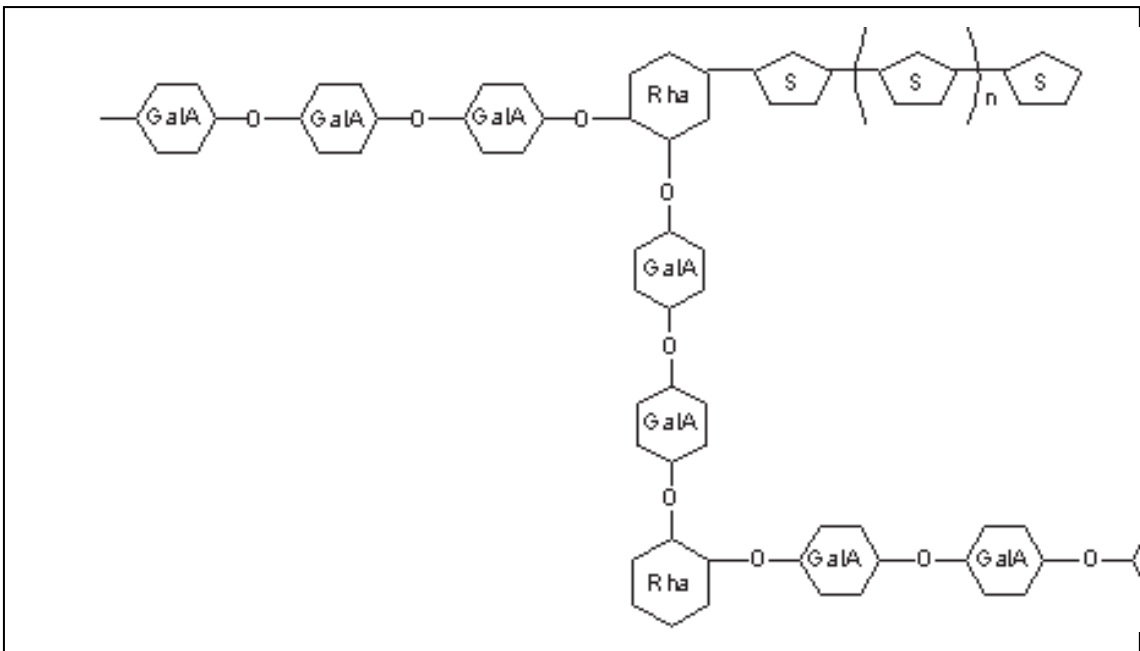


圖 2.3 鼠李糖 (Rhamnose) 穿插於 D-半乳糖醛酸 (GalA) 中所造成之轉折 (S 為中性糖) (Sriamornsak, 2002).

Fig. 2.3 Rhamnose (Rha) insertions cause kinking of galacturonic acid (GalA) chain; S = neutral sugars.

穿插其他之中性分子，故甲氧基含量不會達 16.32%，因此，以重量百分率表示果膠酯化度目前較少採用，一般仍多以 DE 值表示(林正彥 1976)。

### 3. 果膠在食品上之應用

果膠在食品工業上，多利用其可凝膠之特性，用於製作果醬或果膠凍 (Pectin Jellies)；高甲氧果膠依酯化度之不同，因應製造過程操作之需求，又可分為快速凝膠 (DE > 70%)、中速凝膠 (DE 65~69%) 及慢速凝膠 (DE 50~65%) 等(Kulp 1975)。此外，高甲氧果膠亦可作為食品之安定劑、增稠劑及黏度控制劑等用途。

低甲氧果膠適用於非水果口味之果膠軟糖、果凍 (cup jelly) 及巧克力內餡等產品之製造，當產品所含固形物較低時，高甲氧果膠可能會有凝膠的困難，常會選擇低甲氧果膠作為凝膠的來源(Glicksman 1969; 吳祝和 1994)。

## 貳、果膠酯酶 (Pectinesterase, PE)

### 1. 果膠酯酶之分布

果膠酯酶 (pectinesterase) 【pectin pectyl- hydrolase, EC3.1. 1. 11】，以下簡稱 PE，，屬於果膠酵素的一群，廣存於高等植物之根、莖、葉和果實等組織中 (Lineweaver et al. 1951; Deuel et al. 1958)，與細胞壁具有緊密的結合(Pressey 1984)；Jansen 等 (1960) 認為此酵素是以離子鍵的方式結合。

### 2. PE 作用機制

PE 為一水解酶(hydrolase)，將果膠質單元分子的半乳糖醛酸 C<sub>6</sub> 羧基上的甲基酯鍵水解，產生游離羧基和甲醇，使果膠質的酯化度降低，若溶液中含有二價金屬離子如 Ca<sup>2+</sup>，可使其在羧基間形成離子架橋而凝膠 (圖 2.4) 等植物如番茄及苜蓿之 PE 的作用方式屬於區段性去酯化 (blockwise de-esterification) (Kohn et al. 1968)，而微生物 PE 之作用方式則屬於隨意型之去酯化作用 (random de-esterification)(Kohn et al. 1983)。

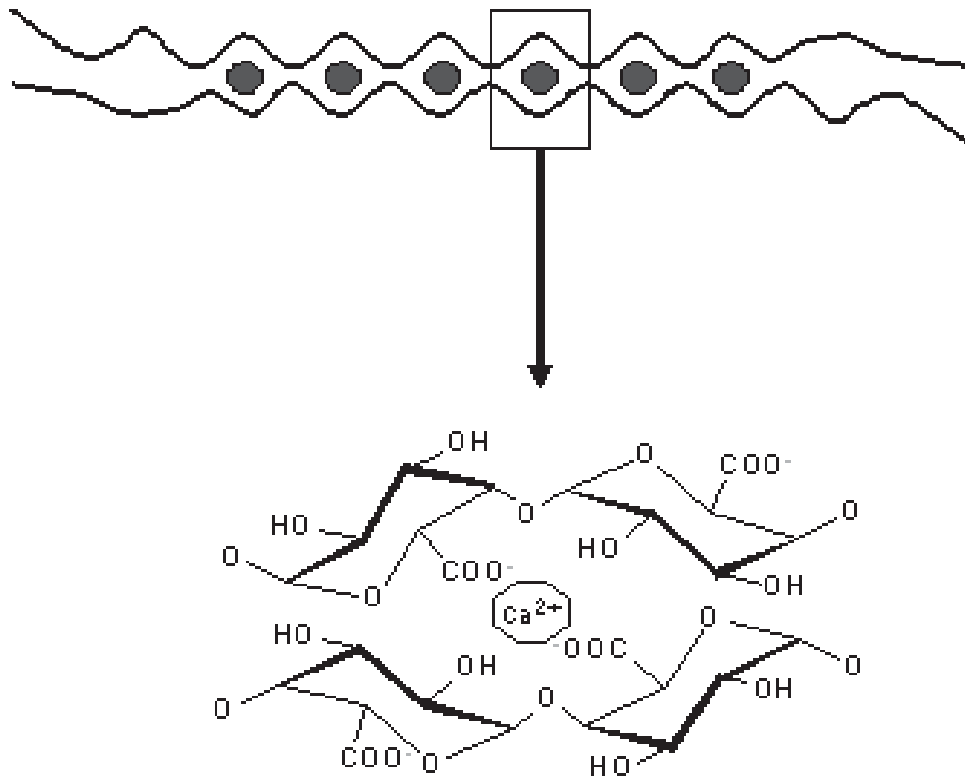


圖 2.4 果膠之鈣離子鍵凝膠 (Axelos and Thibault, 1991)

Fig 2.4 Gelation of calcium binding to pectin.

### 3. 果膠酯酶之理化性質

PE分子量通常在30~40 kDa間，但亦有高分子量(大於50 kDa)者，然均為單體(monomer)，分子次單元體(subunit)則迄今未被發現。高等植物PE之等電點(isoelectric point; pI)大部分屬於高pI者，而微生物來源之PE則屬於低pI者。

### 4. 果膠酯酶活性測定

PE活性的測定方式有下列幾種：

#### (1) 鹼滴定法

由於果膠被去酯化過程中會產生羧基，利用pH-stat，以鹼液連續滴定PE水解果膠所產生的羧基 (Lee and MacMillan, 1968 ; Goldberg, 1984 ; Goldberg et al., 1992 ; MacDonald et al., 1993)，而以單位時間內所產生的羧基量表示PE活性。此法因配合自動滴定儀使用，故優點為準確性高、再現性好，缺點則是測定耗時，不適合大量樣品處理，且設備昂貴。

#### (2) 比色法

利用酸鹼指示劑如bromothymol blue (Hagerman and Austin, 1986 ; Cameron et al., 1992 ; Rillo et al., 1992 ; Giovane et al., 1990)、bromocresol green和Congo red (Vilarino et al., 1993)、methyl red (Bordenave and Goldberg, 1993)等加入果膠基質溶液中，當PE水解果膠所產生的游離羧基解離而降低pH時，則可改變反應液顏色，故可依顏色變化程度測定PE活性。或以p-nitrophenylacetate為基質(Moustacas et al., 1986 ; Goldberger et al., 1992)，經PE水解後釋出p-nitrophenol，可用400 nm波長吸光度之變化來測定PE活性。酸鹼指示劑法之優點是快速、操作簡單，但缺點是易受所測酵素緩衝液而影響其呈色，而p-nitrophenol比色法則無此缺點。

#### (3) 呈色法

利用過錳酸鉀(Wood and Siddiqui, 1971) 或 alcohol oxidase (Castaldo et al., 1989) , 將PE作用所釋出的甲醇氧化成甲醛, 再與 2,4-pentadione反應呈色, 以偵測PE水解果膠所產生的甲醇量, 而以單位時間內所釋出的甲醇量表示PE活性。此法因釋出之甲醇容易在操作過程中揮發, 再現性較差;另外, 酵素成本昂貴也是其缺點。

#### (4) 氣相層析法

利用氣相層析儀偵測PE在反應期間所產生的甲醇量 (King et al., 1986 ; Lee et al., 1979 ; McFeeters and Armstrong, 1984) , 而以單位時間內所釋出的甲醇量表示PE活性。氣相層析儀設備昂貴、操作複雜, 亦不適合大量樣品之同時檢測, 此為氣相層析法之缺點。

### 5. 果膠酯酶活性影響因素

#### (1) pH

一般而言, 高等植物PE之反應最適pH值, 約在6~9之間, 屬於中~鹼性範圍, 而由微生物產生之PE的反應最適pH值分佈較為廣泛, 在pH 4~9之間, 但大部分微生物PE的最適pH是在微酸性範圍(Kulp, 1975 ; Rexova-Benkova 和 Markovic, 1976)。就安定性而言, PE在pH3以下或pH8以上較不安定(Kertesz, 1955)。Manabe (1973) 以柑橘為材料, 發現PE在pH 5~8間較安定, 而在pH低於3或高於10時, 則在10分鐘內就完全失去酵素活性。另外, 剛果膠pH在7以上時, 除了酵素去酯化外, 亦會有鹼水解去酯化反應發生。

#### (2) 溫度

PE與其他酵素一樣, 其活性隨著溫度上升而增加, 但當溫度超過某一極限時, 則會因為單白質變性而使活性急速下降。一般而言, PE之最高活性溫度約在60°C左右, 屬於中溫或較耐高溫的酵素。

### (3) 金屬離子之種類與濃度

Lineweaver 和 Ballou (1945) 首先提出，少量金屬離子的存在可活化苜蓿PE，而二價金屬離子之活化效果則大於一價金屬離子。兩位學者認為，金屬離子存在的意義是與果膠之羧基產生電性中和，以避免果膠分子之帶負電荷羧基與帶正電荷之PE分子形成太強的結合而妨礙PE催化水解反應。楊(1991)與賴(1991)則認為金屬離子存在的目的，在於提供適當的離子強度，而與金屬種類無關。若二價金屬離子濃度提高時，例如鈣離子，在果膠分子上的游離羧基形成架橋，導致反應液黏度上升，甚至凝膠，影響PE活性測定。

### (4) 產物抑制作用

PE水解果膠質的最終產物—聚半乳糖醛酸(polygalacturonic acid; PGA)對PE的去酯化活性有競爭性抑制作用。Lee 和 MacMillan (1986)以蕃茄PE做研究，求得PGA之抑制常數 $K_i$ 值為7mM 半乳糖醛酸。

### (5) 糖類

Chang等(1965)發現，蔗糖、葡萄糖和麥芽糖等醣類會抑制木瓜PE之活性，其抑制方式為非競爭抑制作用(noncompetitive inhibition)；Brady(1976)也指出，甘油、半乳糖和麥芽糖等均會抑制香蕉PE活性。張(1990)指出葡萄糖會抑制蘿蔔PE；賴(1991)亦發現不同醣類會抑制豌豆莢PE之活性。

### (6) 其他抑制劑

Markovic 和 Patocka (1977)研究蕃茄PE之活性部位(active site)時發現，蕃茄的PE活性部位，可能含有 tyrosine 和 histidine 殘基。大豆芽PE(楊，1991)及豌豆莢PE(賴，1991)亦受碘液的抑制，故推測屬於 tyrosine type 的水解酶。SDS亦會抑制PE活性(Zimmerman, 1978)，而Balestrieri等(1990)從奇異果中純化出專一性抑制PE的糖蛋白。

## 參、果膠酯酶抑制劑

### 1. 果膠酯酶抑制劑之研究與發現

PE 之抑制物質就目前已知的發現，多為外源性或非專一性之抑制成份，植物中內源性之果膠酯酶抑制劑直到近年來陸續有學者發現在奇異果(Balestrieri et al. 1990)、馬鈴薯塊莖(Mcmillan et al. 1995)、愛玉子(Jiang et al. 2002)及硬心香蕉(Wu et al. 2002)中含有抑制 PE 活性之物質存在。

### 2. 植物中內源性之果膠酯酶抑制劑

#### (1) 奇異果 (*Actinidia chinensis*)

Balestrieri 等 (1990) 自奇異果 (kiwi fruit) 中純化出 PEI，並鑑定出其為一種以酸性胺基酸為主體的醣蛋白，側鏈會接上半乳糖 (galactose)、阿拉伯糖 (arabinose) 及鼠李糖 (rhamnose)。奇異果中之 PEI 分子量約 28 kDa，等電點小於 3.5，屬於 competitive inhibition，最適抑制作用的 pH 為 3.5-7.5 之間，針對不同來源之 PE (如番茄、柳橙、蘋果、香蕉、馬鈴薯) 皆有很好的抑制效果。Ly-Nguyen 等 (2004) 指出奇異果 PEI 對香蕉及草莓中之 PE 屬於 noncompetitive inhibition，而對於 carrot PE 屬於 competitive 抑制。

Giovane 等 (1995) 以 affinity chromatography 純化奇異果中之 PEI，經由 SDS-PAGE 得知其分子量為 18 kDa，而由膠體過濾層析得原態分子量 25 kDa，由另一方面證明奇異果之 PE 非為一蛋白酶而是一種醣蛋白。

#### (2) 馬鈴薯塊莖 (potato tuber) 中之 PEI

McMillan 和 Perombelon (1995) 從 *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* cv. Katahdin 的馬鈴薯塊莖品種中，以 Q- 和 SP-Sepharose column chromatography 純化出 PEI，此 PEI 為分子量約 200 kDa 的多醣體，其主鏈及支鏈分別由 uronic acid 和中性糖所構成，其抑制 PE 之活性不受溫度及 pH 之影響，屬於



uncompetitive inhibition，可抑制不同來源之PE，但微生物來源之PE除外。此外，此PEI具有促進polygalacturonase和pectin lyase活性的能力。

#### (3) 硬心香蕉（Rubbery banana）的PEI

Wu等（2002）自萃取硬心香蕉果肉中的PE同時發現有PEI，將含有PEI之粗萃液煮沸180分鐘仍具有明顯的抑制活性，對於豌豆的PE亦具有抑制的作用。

#### (4) 愛玉子（Jelly fig achenes）的PEI

Jiang等（2002a）將破碎愛玉子瘦果之粗萃液於100°C下煮沸60分鐘，測試其對豌豆莢中之PE的抑制活性，結果發現即使粗萃液經過加熱仍不影響對PE之抑制活性，因此推論愛玉子瘦果中含有耐熱之PEI物質。

Jiang等（2002b）以超過濾濃縮膜區分自愛玉子瘦果中含PEI的粗萃液後，再配合Sephrose G-50膠體過濾分離PEI，發現其為分子量介於3.5-4.5kDa之間的polypeptides，此外，對於柑橘與愛玉子中之PE皆屬於競爭型的抑制作用。

### 3. 果膠酯酶抑制劑存在於植物體內的生理意義

為何植物體內自然產生PE抑制物質之原因與機制目前尚未明瞭，因為已知某些植物體內含有某物質，能抑制植物病原菌所產生的多醣分解酵素，故有學者推測可能是一種防禦的機制，使植物可以抵抗一些病原菌。McMillan等（1993）則指出，PEI之存在可以影響果膠質的甲基酯化程度，因而提高植物的抵抗力，研究中指出，馬鈴薯塊莖中存在之PEI可維持細胞壁上果膠的高酯化程度，以抵抗*Erwina* spp.之侵襲。

PEI的產生對於植物之生理機制而言，就生長與成熟來說，可能具有一種調控的機制，例如Balestrieri（1990）之研究結果發現，在未成熟之奇異果中並無法測

得 PEI 的存在；且隨著果實成熟度的增加，PEI 之含量亦會隨之增加，分子量亦有增大的情形。

#### 4. 果膠酯酶抑制劑在食品上的應用

PE活性的殘存常會嚴重影響產品之品質與安定性，因此控制產品中PE的活性十分重要，例如果汁與果泥相關產品中，為避免PE活性影響其混濁安定性，會將產品貯存於低溫之下或使用巴斯德滅菌處理使PE失活。Castaldo等（1991）將奇異果中純化而得知PEI，添加於「cut-back」果汁中，發現PEI可經由抑制果汁中PE之活性降低果汁的混濁損失率（cloud loss，%），同時也可與巴斯德殺菌達到相同的效果。



## 第二節、愛玉子

### 壹、愛玉子

#### 1. 愛玉子名稱之由來

愛玉子之學名為 *Ficus awkeotsang* Makino，於 1904 年由日本人牧野富太郎 (T. Makino) 在當時嘉義廳的下打貓地區所採集得到之愛玉子標本，經與榕屬型態極為類似之 *Ficus hanceana* Maxim 比較發現兩者之葉部特徵有明顯不同，再與 *Ficus pumila* Linn (薜荔) 比對發現兩者之葉及瘦果亦有差異，因此認為是一新種，而訂其學名如上 (林，1991)。

而我國有關愛玉子名稱之最早文獻，是連雅堂於 1921 年所著之臺灣通史之農業志中所記載的一段小故事，其概略內容如下：在清朝道光年間，有一個專門採辦土產的同安人經過嘉義大埔時，因為天氣很熱，就到溪邊去喝水，看到水面結了一層凍，用手挖了一塊來吃，吃後感覺非常清涼。不過此時正逢盛夏，哪裡會有冰呢？他看到水面上飄著一些樹子，這些樹子用手搓揉後有漿液流出來，他想：「水裡的凍應該就是從這些樹子來的吧！」遂將這些樹子帶回家用水洗，流出的汁馬上結成凍，加上糖風味更佳。他有一個可愛的女兒叫愛玉，平常在家也沒事，就把這種凍拿出去賣，吃過的人都稱讚，所以就把這種凍叫做「愛玉凍」了。

但連雅堂在該段文章後面加了一句話：「愛玉子，即薜荔，性清涼，可解暑。」這部分應該是當時錯將愛玉子與薜荔混淆。植物學上薜荔跟愛玉子雖然是同種植物，卻屬於不同變種，分布地也不太一樣，愛玉子大多生長在中海拔地區，薜荔則常見於平地低海拔。

#### 2. 愛玉子之稱呼

我們在一般日常生活中常會將愛玉、愛玉子、愛玉凍等名詞混用，但實際上

「愛玉」指的應該是整株愛玉植物，而市售之「愛玉子」則為愛玉之乾燥後的雌隱花果，包含了瘦果與花托之統稱，是將採下之新鮮隱花果經削果、翻轉、乾燥後而得。要製備愛玉凍時再刮下其著生於花托上之瘦果(含果柄)。「愛玉凍」則是將愛玉瘦果置於布袋中，以水搓洗所得之澄黃透明的凝膠狀物。

### 3. 愛玉子之植物型態

愛玉子屬於桑科 (Moraceae)、無花果屬 (Ficus) 常綠蔓性植物，氣根多，易纏繞於岩石或樹幹上。葉互生，長橢圓狀披針形，全緣，革質，表面濃綠色無毛，葉背灰綠色，密生淡茶褐色柔毛，果實長倒卵形，表面綠色，成熟時黃綠色或紫色，具白色斑點。



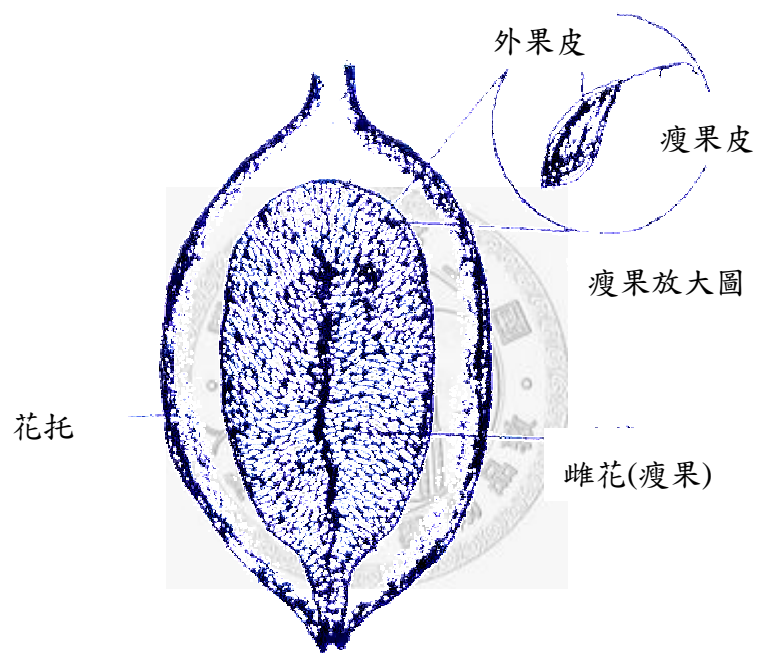


圖 2.5 愛玉雌隱花果剖面圖

Fig 2.5 The syconium of *Ficus awkeotsang*.

## 貳、愛玉凍

### 1、愛玉凍凝膠原理

愛玉凍是將愛玉子瘦果置於布袋中，然後置於約60倍水之容器中，以手搓洗約10分鐘，使其果膠及果膠酯酶溶出，再經靜置後所得之凝膠體。製作愛玉凍時應避免使用蒸餾水與一般所謂的「軟水」，而應選用含有鈣、鎂離子的硬水，且搓洗時間不能太長。

黃（1980）首先提出愛玉凍是由愛玉子溶出之高甲氧基果膠經其內含之果膠酯酶作用成低甲氧基果膠，再與水中之雙價陽離子如鈣等作交互聯結，逐漸形成網狀結構而產生凝膠。



### 2. 影響凝膠之因素

#### (1) 果膠濃度

理想之愛玉凍中果膠含量應介於 0.05~0.1 % 之間，而一般市售以 60~100倍水搓揉約10分鐘所製得之愛玉凍，其果膠濃度多介於0.06~0.09 % 之間，對愛玉子果膠之抽取率也僅有76~84 %。但若用150倍以上的水抽取時，雖有90 %之果膠抽取率，但所得到之愛玉凍凝膠太軟，無商品價值（黃等，1980）。

#### (2) 水中二價陽離子濃度

有經驗的愛玉凍業者都知道使用軟水所製得之愛玉凍其凝膠偏軟或甚至不凝膠，一般認為水中的二價陽離子種類及濃度對於愛玉凍凝膠都扮演著重要角色。

黃等（1980）研究鈣離子與凝膠之關係指出，愛玉凍中的鈣離子來源主

要有以下三種：

- (1) 愛玉子本身內含（以60倍蒸餾水搓揉10分鐘，所得愛玉凍中鈣離子含量約為1.6 ppm）
- (2) 水中原本含有
- (3) 外部添加者

同時並指出，水中鈣離子濃度應介於50~100 ppm 之間可得到品質較佳之凝膠，然而當水中鈣離子濃度超過100 ppm 以上則凝膠品質又變差，可見鈣離子添加過量對凝膠並無幫助。

### 參、愛玉子中果膠酯酶活性

愛玉子種子愈新鮮其果膠酯酶活性愈強，且凝膠性能亦愈強。保存約10年之瘦果顏色變黑，總果膠含量降至3 % 左右，同時果膠酯酶活性亦幾乎喪失，其凝膠能力亦消失（黃等，1980）。

愛玉子果膠酯酶之最適作用 pH 值雖在7.0 附近，但真實系統下，隨著果膠溶出及去酯化反應之進行，凝膠時之 pH 值約為4.5；但在此 pH 下，愛玉子果膠酯酶仍保有約75% 活性，對於凝膠仍有相當大的作用。

### 肆、愛玉子中存在之果膠酯酶抑制劑

#### 1. 愛玉子 PEI 之發現

製作愛玉凍時即使加水的比例正確也常會發生不凝膠或凝膠過軟的情況，可能原因為搓洗愛玉子的時間太短，所溶出的果膠濃度過低，或是搓洗太久導致愛玉子瘦果破裂，使內部的某種成分溶出所造成。

林(1991)曾在愛玉子專論一書中提到，若將愛玉子磨碎萃取其蛋白質，則萃取

液並無法測得果膠酯酶活性，因此推測種子內可能含某果膠酯酶抑制物質。

賴(1998)對於抑制劑之存在曾作初步的証實，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，果膠酯酶活性逐漸增加，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小時時則僅剩下0.2 U/mL。

另外，以事先打碎之種子重覆上述實驗，在0~8小時之間酵素活性卻始終只有0.2~0.4 U/mL，且從攪拌初期至結束，愛玉子果膠酯酶活性均無顯著變化。據此，初步推測愛玉子果膠酯酶抑制劑應存在於瘦果種子內部。另發現此抑制劑極為耐熱，在沸水中加熱1小時後仍具95%以上之果膠酯酶抑制活性(賴，1998)。

## 2. 愛玉子 PEI 之化合物鑑定

李(2001)以 Sephadex G-50 分離而得愛玉子 PEI 進行研究，結果指出，愛玉子中之 PEI 並非醣蛋白，應為一耐熱性之小分子蛋白質，胺基酸的組成以帶正電的胺基酸最多(57%)，Lys、Arg 及 His 共 3.52 nM，屬於親水性及高 pI 之蛋白質。

## 3. 愛玉子 PEI 應用性之探討

李(2001)將自愛玉子萃出之PEI對多種蔬果來源之PE，如番茄、蘋果、木瓜、芭樂、柳橙、鳳梨、豌豆莢、龍鬚菜有所抑制，結果指出愛玉子PEI對各種來源的PE都有抑制的作用，但抑制的作用卻有所差異。此外，將愛玉子PEI添加於稀釋的果汁中(番茄汁、蘋果汁、木瓜汁、芭樂汁、柳橙汁及鳳梨汁等)，於4°C下貯存12週，發現愛玉子PEI對果汁能長時間有效降低混濁度損失率，其中木瓜汁與芭樂汁甚至可達到與殺菌組相同之效果。

在製酒工業上，目前民國91年1月1日施行「菸酒管理法」後，開放民間釀酒，過去由於公賣的壟斷，民間普遍沒有專業的知識和技術，因此釀造出的水果酒品



質往往難以掌控。水果中富含果膠與PE，因此在製作水果酒的同時，由於PE之催化作用，使果膠產生大量的甲醇，使其甲醇含量往往超過政府之規定，因此，目前已有業者將愛玉子之PEI應用於水果酒之製作過程，抑制其PE之作用，防止果膠水解產生大量的甲醇。



### 第三節、單寧 (Tannin)

#### 壹、單寧之定義與分類

植物中含有各式各樣的次級代謝物，其中包含生物鹼 (alkaloid)、萜烯類 (terpenes) 及多酚類 (phenolics)，這些化合物並不如一級代謝物具有生物性合成、生物性分解或中間代謝之能量轉換，其具有各種生物活性，例如草食性動物之掠食及對抗病蟲害等功能(Hagerman, 1998)。

單寧為植物中廣泛存在之次級代謝物，常見於樹皮、木材、果實、果莢、葉、根及蟲癭中，一般單寧的主要特性可分為：(Mane et al., 2007)

- (1) 具有特定的分子量範圍 (一般為 500~20,000 kDa)
- (2) 結構中之次單元皆由酚類化合物所組成
- (3) 具有和蛋白質結合的特性

由於單寧具有各種結構之特異性，為了研究之方便，依其結構之特徵和化學特性區分為可水解單寧 (hydrolysis tannins)、縮合單寧 (condensed tannins) 及兼具前兩者結構特徵之複合單寧 complex tannins，若單純以結構特性可區分為以下四種單寧類 (如圖 2.2)：(Khanbabae, 2001)

- (1) 沒食子酸單寧 (gallotannins)：主要單元為 galloyl units 或其間位 (meta) 與 polyol、catechin、triterpenoid 等單元縮合之衍生物。
- (2) 鞣花酸單寧 (ellagitannins)：至少由兩個 galloyl units 以 C-C 鍵結而成，不會與 catechin unit 以糖苷鍵結之形式相連。
- (3) 複合單寧 (complex tannins)：catechin unit 以糖苷鍵結之形式與沒食子酸單寧或鞣花酸單寧 (ellagitannins) 串連。
- (4) 縮合單寧 (condensed tannins)：由花青素以聚合的方式，以 catechin 上之 C-4 連接至下依各單元上的 C-8 或 C6。

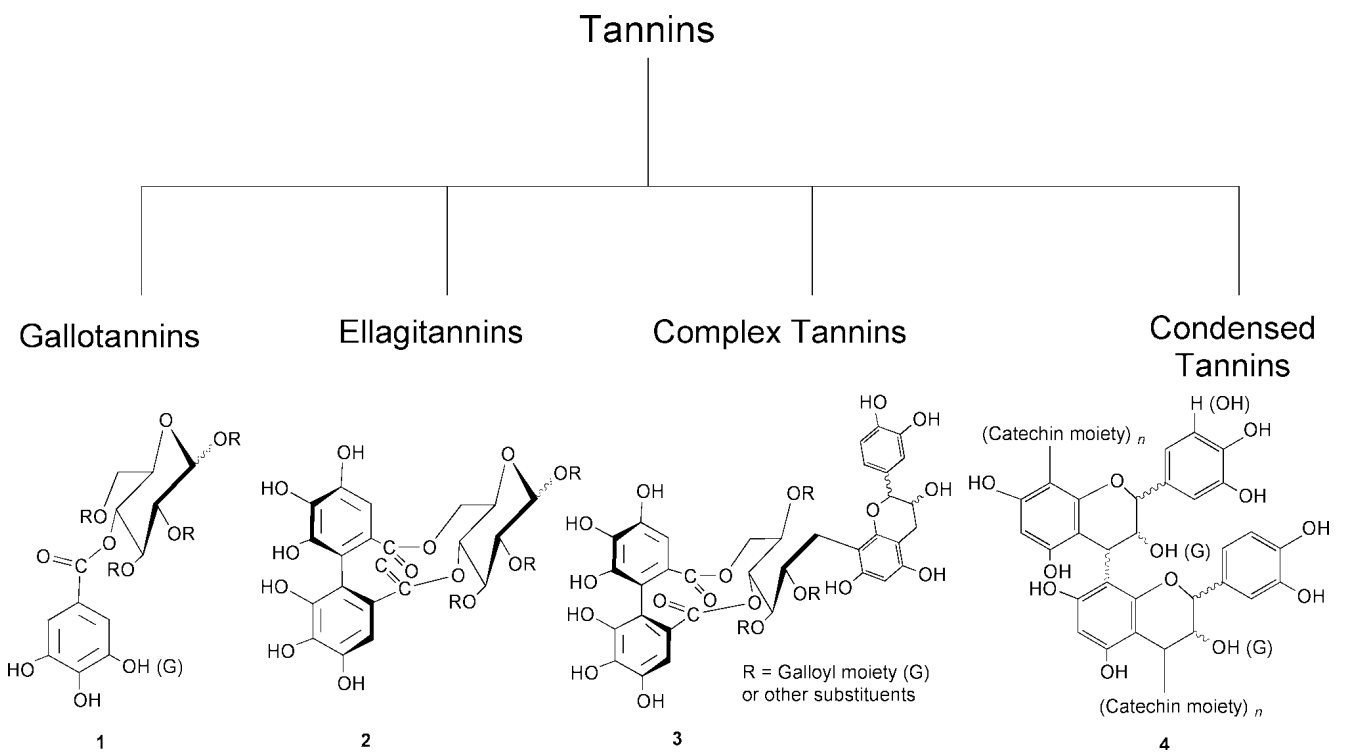


圖 2.6 單寧之化學結構分類 (Khanbabae K 2001)

Fig 2.6 Classification of the tannins.

## 貳、單寧的分類與特性

### 1. 可水解單寧 (Hydrolysable tannins)

可水解單寧為 gallic acid (3, 4, 5-trihydroxyl benzoic acid) 的衍生物，經由酯化以酯鍵或氧化作用產生 crosslinkage 相互連接形成複雜之可水解單寧 (Khanbabaee K 2001)。其鍵結可經由水解試劑，熱水，酸或鹼破壞形成單元，大致可分為由沒食子酸 (gallic acid) 組成之沒食子酸單寧 (gallotannins) 及鞣花酸 (ellagic acid) 形成之鞣花酸單寧 (ellagitannins)。

#### (1) 沒食子酸單寧 (gallotannins)

為最簡單之可水解單寧，由沒食子酸 (gallic acid)，每單元分子間以 *meta*-depside bonds 連接，其鍵結較脂肪之酯鍵不穩定，可在弱酸之甲醇中進行甲基化，而脂肪的甲基化須在強酸及熱的環境下才能進行甲基化。沒食子酸單寧最常連接之 core polyol 多為 D-glucose (圖 2.3)，其他可能也會包含 catechin 及 triterpenoid。

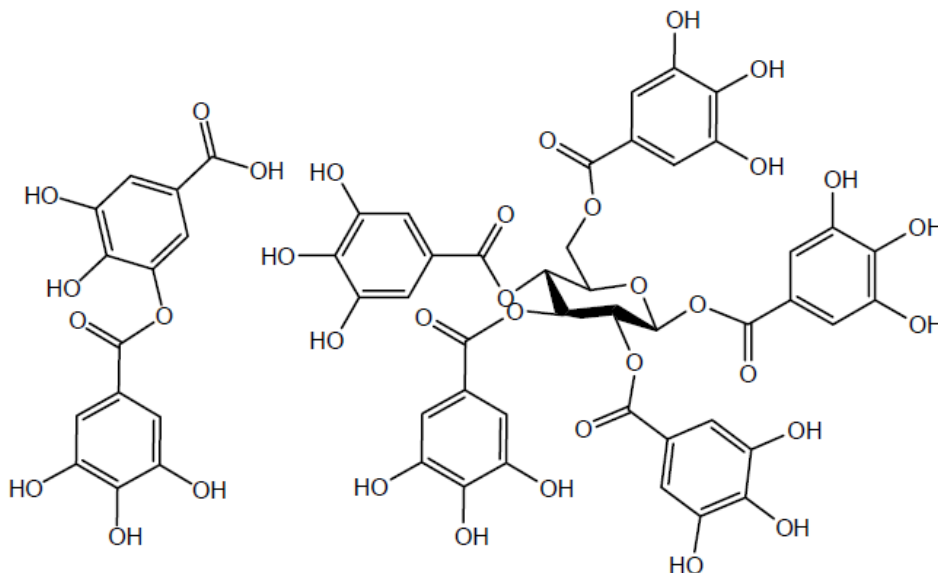


圖 2.7 沒食子酸單寧示意圖

Fig 2.7 Simple structure of the gallotannins

(2) 鞣花酸單寧 (ellagitannins)

鞣花酸單寧為 pentagalloylglucose 之衍生物，但不同於沒食子酸單寧，鞣花酸單寧包含 galloyl moieties 間經氧化作用形成之 C-C 鍵結，最後形成 hexahydroxydiphenoyl (HHDP) unit，鞣花酸 (ellagic acid) (圖 2.8) 係經由 hexahydroxydiphenic acid 於水溶液中自發性所形成。

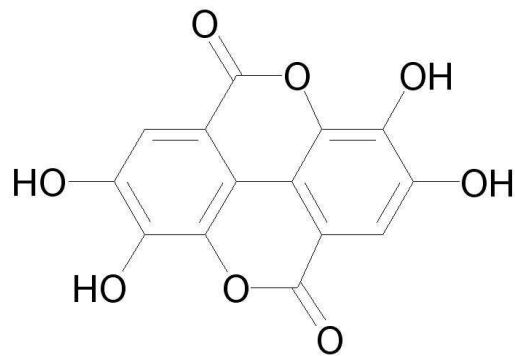


圖 2.8 鞣花酸 (ellagic acid)

Fig 2.8 Chemical structure of ellagic acid

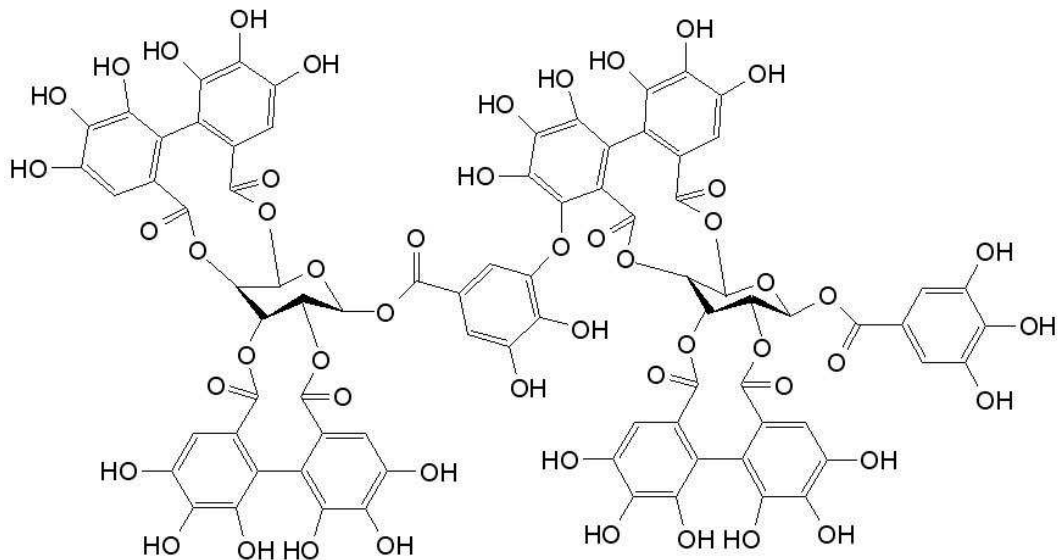


圖 2.9 SanguinH-6 化學結構式(草莓中主要的鞣花單寧)

Fig 2.9 Chemical structure of sanguinH-6 (the major form of ellagitannin in strawberry)

## 2. 縮合單寧 (condensed tannins)

又稱為原花青素 (proanthocyanidins)，以 catechin 為單元聚合而成，C-C 鍵相互結合，由 C-4 連接至另一 catechin 之 C-8 或 C-6 上，其聚合之程度影響其沉澱蛋白質的能力，於製酒工業中，高聚合度的縮合單寧會造成乾澀的口感。

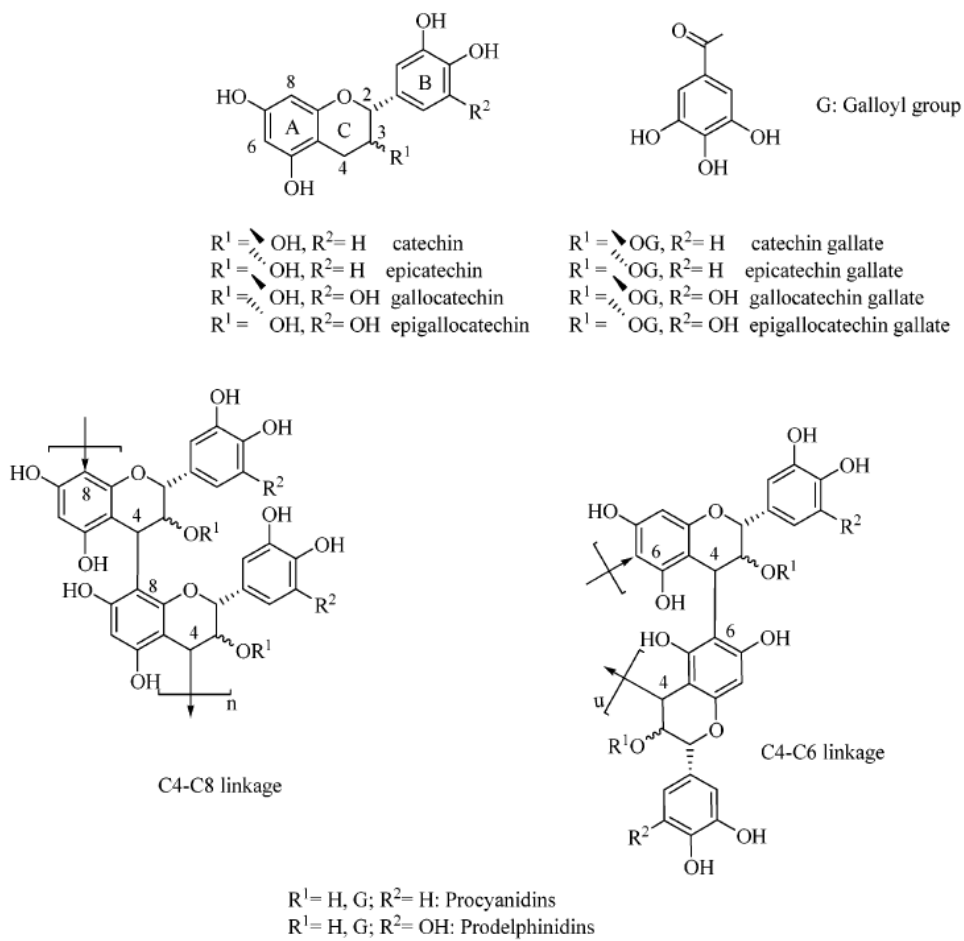


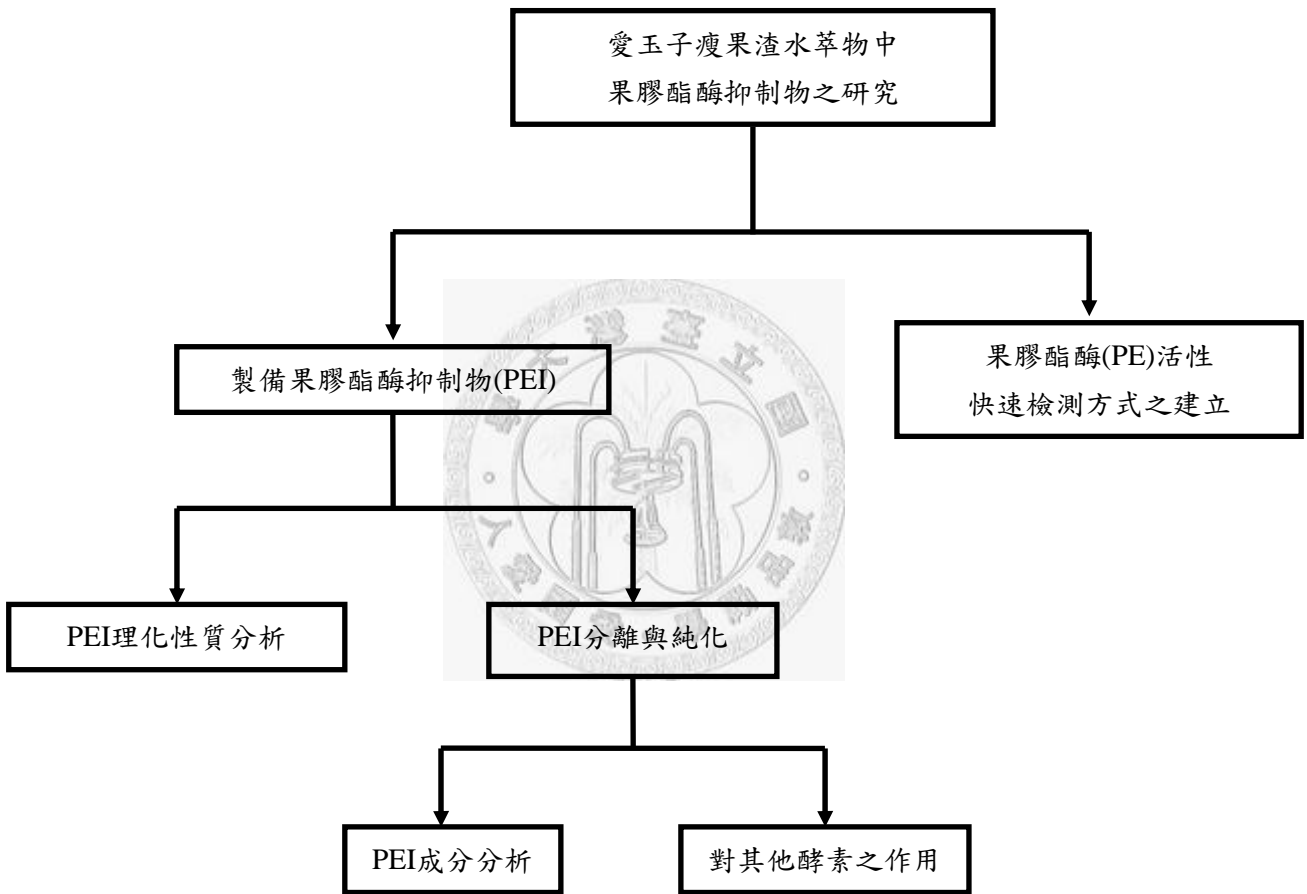
圖 2.10 縮合單寧之單元與結構示意(Es-Safi et al. 2006)

Fig 2.10 Chemical units and structures of the condensed tannin

### 第三章、材料與方法

#### 第一節、實驗架構

本研究「愛玉子瘦果渣水萃物中果膠酯酶抑制物之研究」實驗流程大綱如下：



## 第二節、實驗材料

### 壹、生物性材料

#### 一、愛玉子 (*Ficus awkeotsang* M.)

購自台北市迪化街銀峰國際貿易有限公司所販售之阿里山愛玉子，刮取愛玉子瘦果（種子與冠毛部分），置於室溫下保存，作為萃取果膠酯酶抑制劑（Pectinesterase inhibitor，以下簡稱 PEI）之來源。

#### 二、果膠酯酶（Pectinesterase，以下簡稱 PE）

來源購自台北市公館水源市場之豌豆 (*Pisum sativum* L.)，剝除豆莢頭尾並去除豌豆仁後，秤重，利用自來水清洗過後以衛生紙吸乾，作為萃取果膠酯酶之材料。



### 貳、試藥

- (1) Pectin、Lipase、Tannase：購自美國 Sigma 公司。
- (2) Methylene blue：購自德國 Riedel-de Haën 公司。
- (3) Methyl red：購自德國 Ferak 公司。
- (4) NaCl：購自德國 Riedel-de Haën 公司。
- (5) Acetone、Methanol、HCl、Casein：購自德國 Merck 公司。
- (6) Polyvinylpyrrolidone (PVPP)：汎球國際貿易有限公司。
- (7) Bovine serum albumin：購自美國 Sigma 公司。
- (8) Soyprotein：購自台灣振芳有限公司。
- (9) DIAION<sup>®</sup> HP-20：購自日本三菱株式會社。
- (10) Amylase、Lipase 檢驗試劑：購自英國 Randox 有限公司。
- (11)  $\alpha$ -amylase：購自英國 Megazyme 公司有限公司。
- (12) Trypsin 檢測試劑：購自美國 Thermo 有限公司。



### 第三節、儀器設備

- (1) 酸鹼度計：Suntex SP-701。
- (2) 高壓滅菌釜：Huxley HL-340(Vertical type)、Tomy ES-315。
- (3) 高速離心機：Beckman AVANTI J-20
  - 轉子：JLA-81000、JA-14。
- (4) 分光光度計：
  - Hitachi U-1100 spectrophotometer。
  - Hitachi U-1900 spectrophotometer。
- (5) 恆溫水浴槽：Kansin WB211-B1。
- (6) 電磁攪拌器：Corningm。
- (7) 減壓濃縮裝置：
  - 旋轉蒸發器：Büchi Rotavapor R-114。
  - 真空值控制器：Büchi Vacumm Controller B-721。
  - 水浴鍋：Büchi Waterbath B-480。
  - 水幫浦：Tokyo Rikakikai A-3S。
  - 冷卻裝置：Eyela Cool Ace CA-1111。
- (8) 高效能液相層析儀：
  - 幫浦：Spectra System P1000。
  - 檢測器：Spectra System UV6000LP。
  - 積分軟體：ChromQuest 4.X。
- (9) 均質機

## 第四節、實驗方法

### 壹、樣品前處理

#### 1. 愛玉子 PEI 之製備

將愛玉子種子置於棉布袋中，以自來水搓洗至滑膩感消失，於 50°C 下烘乾，取乾燥之愛玉子瘦果渣 50 g，加入 10 倍量 (v/w) 之 500 mL 蒸餾水於室溫下攪拌隔夜，均質破碎，離心 (3,000 rpm, 10 分鐘)，將離心出之水不溶物再加入 2 倍體積 (v/w) 之 100 mL 蒸餾水攪拌 2 小時，離心 (3,000 rpm, 20 分鐘) 取上清液，合併上清液後以 95°C 水浴 15 分鐘使 PE 酵素失活，以蒸餾水定量至 500 mL，加入等體積 3% NaCl，混合靜置，離心 (6500 rpm, 20 分鐘) 過濾，並定容至 1 L，即得 PEI 粗萃液 (取 200 mL 經減壓濃縮抽乾後計算單位產率)，將 PEI 粗萃液進行 PEI 抑制活性測試 (流程示意圖如圖 3.1)。

#### 2. 製備豌豆莢 PE 酵素

將去除豌豆仁及豆莢頭尾之豌豆莢加 4 倍量 (v/w) 之去離子水均質破碎，以抽氣過濾去除濾液後取得濾渣，再以 2 倍體積之 0.3 M NaCl 於 4°C 下攪拌 2 小時後抽氣過濾，所得之濾液為 PE 酵素液，分裝後於 -20°C 下貯藏備用，使用前於 30°C 水浴回溫，經適當稀釋後使用。

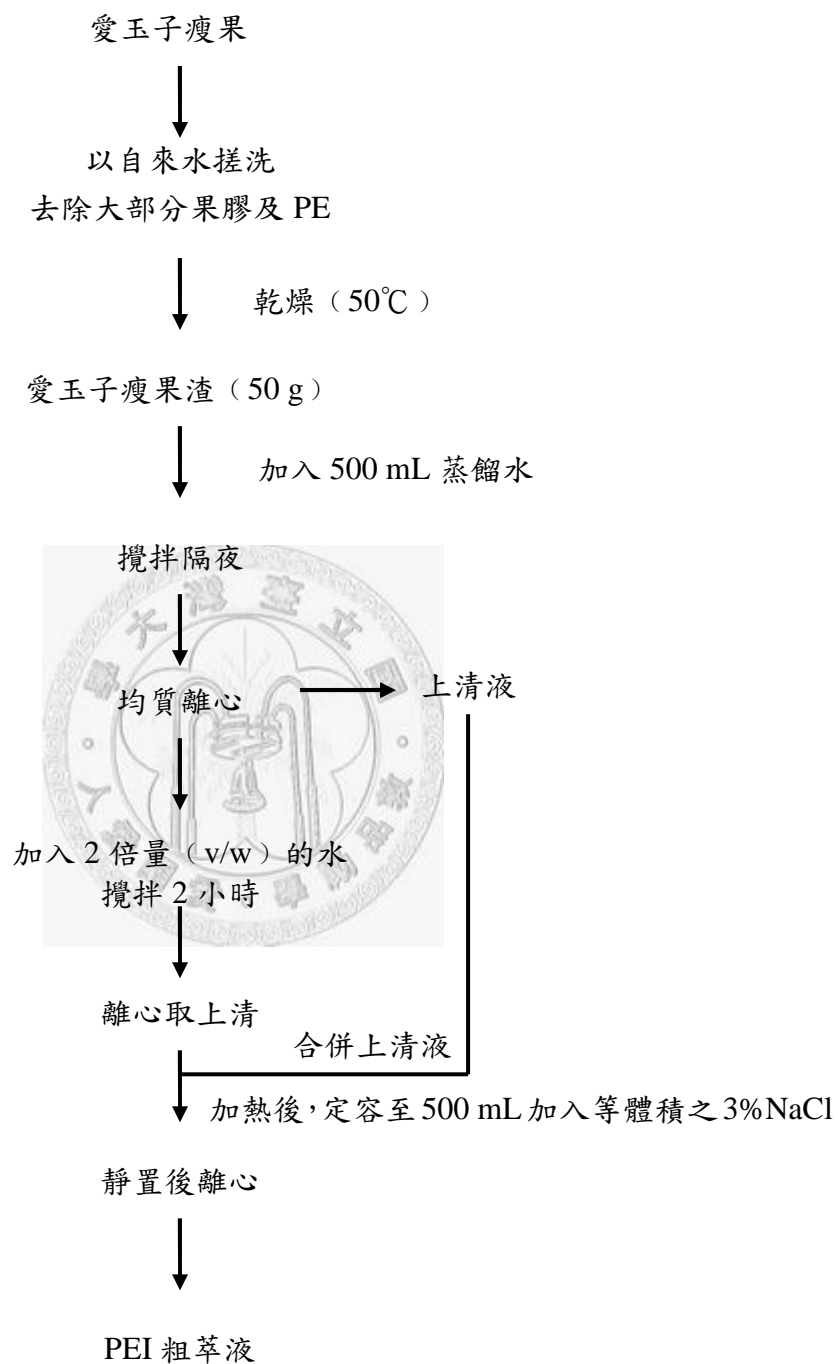


圖 3.1 愛玉子 PEI 粗萃液萃取分離流程圖

Fig 3.1 Flow chart of crude PEI extraction from jelly fig seeds.

## 貳、建立快速檢測 PE 活性之方法

### 1. PE 酵素活性指示劑之製備

取甲基紅粉末 0.02 g 以 60 mL 乙醇溶解後以蒸餾水定容至 100 mL，得甲基紅溶液（pH 6.2 時呈現黃或橘色；pH 4 時為紅色）；另配製 20 ppm 亞甲基藍水溶液（藍色），將此兩溶液以等體積混合，得 PE 活性指示劑，儲存於 4°C 冰箱。

### 2. PE 酵素活性指示劑之波長選擇

PE 酵素液（一組預先置於 95°C 水浴中 15 分鐘使酵素失活）與 1.5% NaCl 以 1:4 (v/v) 混合，於 30°C 水浴 10 分鐘，各取 1 mL 加入 4 mL 含 0.1 M NaCl 之 0.5% 柑橘果膠溶液，於 40°C 水浴下作用 1 小時後以 95°C 水浴 15 分鐘使酵素失活，而後加入 100  $\mu$ L 酸鹼指示劑，分別進行全波長掃描（220~700 nm）。

### 3. 吸光值 OD<sub>527 nm</sub> 與 [H<sup>+</sup>] 改變量之相關性

以 0.3 M NaCl 系列稀釋 PE 粗萃液 1、10、20、50、100 倍以及已煮沸失活之 PE 粗萃液，各取 200  $\mu$ L（空白對照組以 0.3 M 之 NaCl 代替）與 800  $\mu$ L 之 1.5% NaCl 混合置於 30°C 水浴下 10 分鐘，加入 4 mL 含 0.1 M NaCl 之 0.5% 柑橘果膠溶液，於 40°C 水浴下作用 30 分鐘後以 95°C 水浴 15 分鐘使酵素失活，加入 100  $\mu$ L 指示劑測量 527 nm 吸光值並測其 pH，將測得之數據結果以 OD<sub>527 nm</sub> 對 pH 作圖。

### 4. 抑制 PE 酵素能力試驗之操作流程

200  $\mu$ L PE 粗萃液與 800  $\mu$ L 含 PEI 之水溶液混合，30°C 水浴 10 分鐘，加入 5 mL 含 0.1 M NaCl 之 0.5% 柑橘果膠溶液，於 40°C 水浴下作用 1 小時後再置於 95°C 水浴 15 分鐘使酵素失活，冷卻至室溫，加入 100  $\mu$ L 酸鹼指示劑，紀錄呈色，並測其 OD<sub>527 nm</sub>，統計分析是否和對照組有顯著差異以判斷是否具有抑制活性。

## 參、PEI 之追蹤與鑑定

### 1. 丙酮沉澱試驗

以攪拌子攪拌愛玉子 PEI 粗萃液並緩慢加入丙酮，使其溶液最後含 90% 丙酮，於 -20°C 放置隔夜，以濾紙過濾得濾液，再以減壓濃縮去除丙酮，加入蒸餾水定容至原體積，得 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液，取部份進行 PEI 抑制活性測定，其餘保存於 4°C 備用。

### 2. PEI 分子量之初步區分

分別取 5 mL 愛玉子 PEI 粗萃液及愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液置於 Minipore 之超過濾濃縮膜 (MWCO 10 kDa) 進行離心 (3,000 rpm, 30 分鐘)，離心後將其區分為大於 10 kDa (以 5 mL 之 1.5% NaCl 回溶) 及小於 10 kDa 兩個區分，進行 PEI 抑制活性測定。

### 3. PVPP (Polyvinylpyrrolidone) 吸附試驗

取 10 mL 愛玉子 PEI 粗萃液加入 0.2 g (2%) 之 PVPP，室溫下以攪拌子攪拌 1 小時後離心取上清液，以蒸餾水定容至 10 mL，進行 PEI 抑制活性測定。

### 4. 與不同蛋白質之交互作用

分別配製 1% 之酪蛋白、大豆蛋白及牛血清蛋白水溶液，與愛玉子 PEI 粗萃液等體積混合後於 4°C 下震盪隔夜，離心 (3,000 rpm, 30 分鐘) 取上清，以對半稀釋的愛玉子 PEI 萃出液作為空白對照組進行 PEI 抑制活性測定。

### 5. 酸水解

以 12 N HCl 將愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液調酸至溶液含 1 N HCl，置於高壓滅菌釜，溫度 121°C，壓力 1 kg/cm<sup>2</sup> 下進行酸水解反應 30 分鐘，冷卻後以 50% NaOH 調整至 pH 6，取 5 mL 置於 Minipore 之超過濾濃縮膜 (MWCO 10 kDa) 進行離心 (3,000 rpm, 30 分鐘)，離心後區分為大於 10 kDa (以 5 mL 之 1.5% NaCl

回溶) 及小於 10 kDa 兩部分，進行 PEI 抑制活性測定與 HPLC 分析。

#### HPLC 分析條件

Column : Water Polarity™dC<sub>18</sub> (5 μm, 250 × 4.6 mm)

Mobile phase : solvent (A) water with 0.1% acetic acid ;

solvent (B) methanol with 0.1% acetic acid

Elution conditions : 0-60 min (1%B to 50%B)

Flow rate : 0.65 mL/min

Sample loop : 20 μL

Detector : 267 nm



## 肆、管柱層析法之分離純化與化合物分析

### 1. Diaion HP-20 管柱分離

稱取 20 g Diaion HP-20 疏水性樹脂，以 MeOH 裝填於長度 33 公分，直徑 3.8 公分之玻璃管柱，裝填後 bed volume 約  $590 \text{ cm}^3$  ( $45.4 \text{ cm}^2 \times 13 \text{ cm}$ )。以水溶液平衡之後，通入愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 60 mL。依序以 60 mL 水溶液、30% MeOH 及 MeOH 流洗。洗出液分別以減壓濃縮抽乾，以蒸餾水以原體積回溶，進行 PEI 抑制活性測定（流程示意圖如圖 3.2）。

### 2. 甲醇流洗液之酵素水解

分別配製 0.1% 之 tannase、0.1% 經 15 分鐘煮沸之 tannase 及 0.1% BSA，與已經減壓濃縮並以原體積半倍量蒸餾水回溶之甲醇流洗物等體積混合，另取 0.1% 之 tannase 與 400 ppm tannic acid 做相同之處理作為對照，反應於 30°C 水浴震盪進行 12 小時，離心（3000 rpm，10 分鐘），進行 HPLC 分析，及 PEI 活性測試。

### 3. PEI 與 Tannase 之交互作用

配製 0.1% 之 tannase 與已經減壓濃縮並以原體積半倍量蒸餾水回溶之甲醇流洗物等體積混合，反應於 30°C 水浴震盪 12 小時後，將 400 ppm 之 tannic acid 與此反應液 1:1 混合，於 30°C 水浴震盪 3 小時後，以 HPLC 分析是否有 gallic acid 之生成。

### 4. 甲醇流洗液之酸水解

將甲醇流洗液以 MeOH 定容至 60 mL 後取 50 mL，經減壓濃縮後抽乾，加入 50 mL 之 1 N HCl，置於高壓滅菌釜，121°C 下進行酸水解反應 1 小時，冷卻後離心（8000 rpm，20 分鐘），以蒸餾水定容至 50 mL 後進行 HPLC 分析。

#### HPLC 分析條件

Column: Water Polarity™ dC<sub>18</sub> (5 μm, 250 × 4.6 mm)

Mobile phase: solvent (A) water with 2% acetic acid;

solvent (B) methanol with 2% acetic acid

Elution conditions : 0~5 min (1%B)

5~30 min (1%B~60%B)

30~40 min (60%B~80%B)

40~50 min (80%B~90%B)

Flow rate : 0.75 mL/min

Sample loop : 20  $\mu$ L

Detector : 255 nm

#### 5. Ninhydrin test

收集甲醇流洗液 300 mL 以減壓濃縮抽乾，約可得 0.1 g 之乾物，另秤取 0.1 g 之 gelatin，分別加入 10 mL 之 1 N HCl，於 121°C 反應 60 分鐘，冷卻後調整 pH 約至 5，減壓濃縮去除部份之溶液，加入 5 mL 酒精，最後以蒸餾水定容至 10 mL。另外在對照組方面，將甲醇流洗物（約 0.1 g）與 0.1 g 之 gelatin 溶於 10 mL 50% 酒精中（必要時加熱溶解），將以上四組樣品各取 2 mL，加入 0.2% 之 ninhydrin 酒精溶液，於沸水浴中反應 4 分鐘，冷卻後測量 570 nm 之吸光。



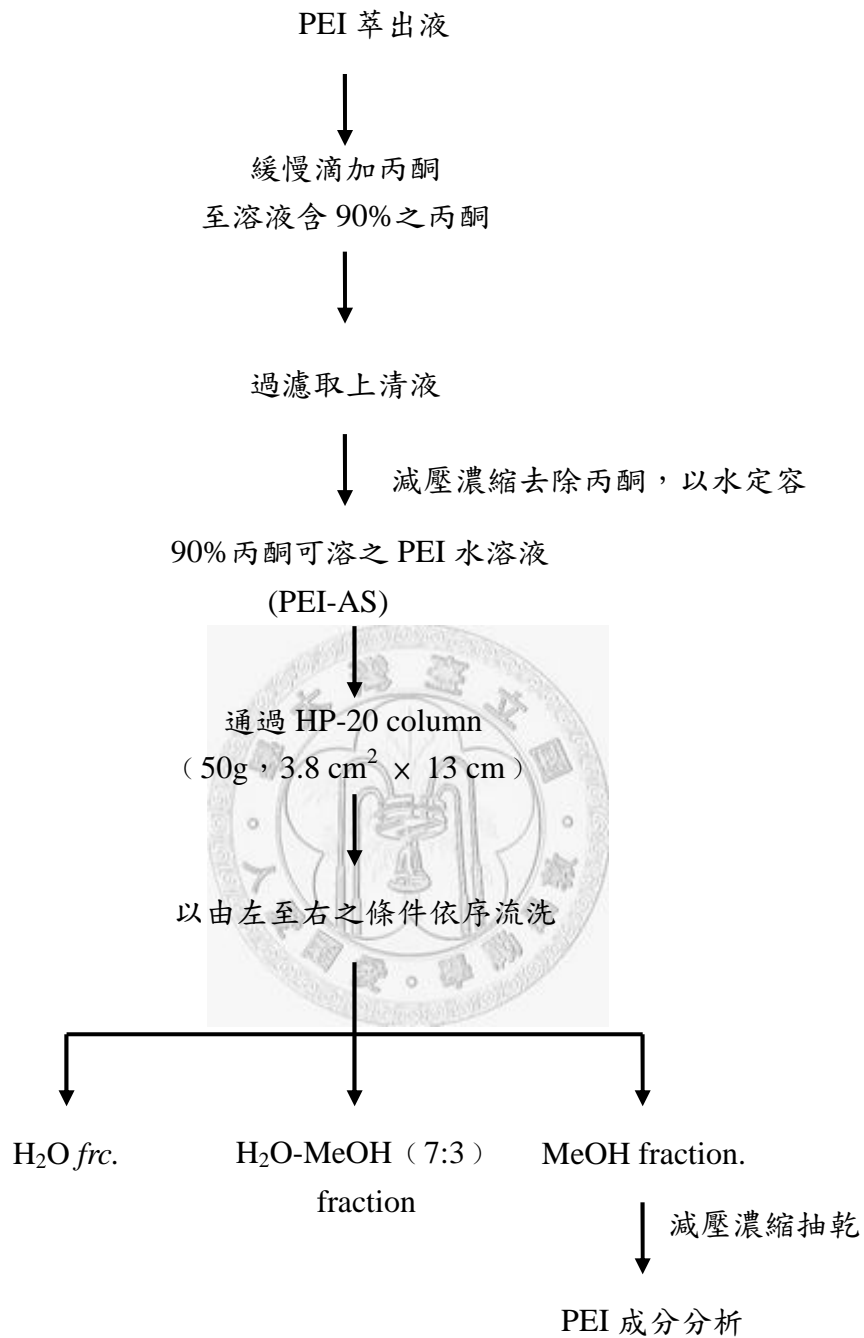


圖 3.2 愛玉子 PEI 之 Diaion HP-20 管柱純化流程圖

Fig 3.2 Scheme for purification of PEI in jelly fig by Diaion HP-20 column.

## 伍、愛玉子瘦果渣水草物之性質探討

### 1. 抑制 Lipase 活性測試

以 0.9% NaCl 水溶液配製 lipase (porcine pancrease) 酵素液 500 ppm，取 20  $\mu$ L，分別和 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液與其 MeOH fraction 80  $\mu$ L 混合（空白對照組以 1.5% NaCl 水溶液代替），於 37°C 水浴中反應下 10 分鐘後取 40  $\mu$ L，加入 Lipase 檢驗試劑 1 mL（檢驗方式依照檢驗試劑之建議方法），平衡 1 分鐘後，紀錄 4 及 9 分鐘之吸光值（340 nm），將兩值相減後得  $\Delta A_{\text{sample}}$ 。依下列計算公式得 Lipase 酵素活性後，分別將實驗組和空白對照組比較相對活性。

$$\text{Sample activity} = \text{Factor} \times \Delta A_{\text{sample}}$$

$$\text{Factor} = \frac{\text{Activity}}{\Delta A_{\text{standard}}} \quad (\text{Lipase activity : } 380 \text{ U/l at } 37^\circ\text{C})$$

### 2. 抑制 $\alpha$ -amylase 活性測試

取  $\alpha$ -amylase 酵素液，以 0.9% NaCl 稀釋 400 倍後各取 20  $\mu$ L，分別和 PEI 90% 丙酮可溶水溶液與其 MeOH fraction 80  $\mu$ L 混合（空白對照組以 1.5% NaCl 水溶液代替），於 37°C 水浴中反應 10 分鐘後取 20  $\mu$ L，加入 Amylase 檢驗試劑 1 mL（檢驗方式依照檢驗試劑之建議方法），平衡 1 分鐘後，紀錄 1、2 及 3 分鐘之吸光值（405 nm）後。依下列計算公式得  $\alpha$ -amylase 酵素活性後，分別將實驗組和空白對照組比較相對活性。

$$\text{Activity (U/l)} = 4712 \times \Delta A_{405 \text{ nm/min}}$$

### 3. 抑制 Trypsin 活性測試

分別將 PEI 90% 丙酮可溶水溶液與 MeOH fraction 以超純水稀釋 100 倍，分別將稀釋液與 0.5  $\mu$ g/mL 之 trypsin (bovine pancreas) 以 1:19 (v/v) 混合，於 28°C 下 10 分鐘後取 100  $\mu$ L，加入 100  $\mu$ L，0.5  $\mu$ g/mL 螢光標定之 FTC-Casein，於 28°C 下

反應 20 分鐘，以激發波長 485 nm 測其放射波長 538 nm 之吸光值；此外並製作 0.5  $\mu\text{g/mL}$  之 trypsin 經系列稀釋後取 100  $\mu\text{L}$  與 FTC-Casein 100  $\mu\text{L}$  於相同條件下反應，將所得吸光值對 trypsin 濃度製作標準曲線，將實驗之吸光值代入標準曲線中，得 Activity in the present of PEI。

#### 陸、數據之統計分析

使用 Statistical Analysis System 軟體進行數據統計分析，以 ANOVA 程序作變異分析，並且以 Duncan's Multiple Range Test 顯著性差異比較，若  $p < 0.05$  表示有顯著差異。



## 第四章、結果與討論

本研究目的為鑑定愛玉子瘦果渣所萃取出之 PEI 可能化合物種類，經過初步純化後，針對此 PEI 進行不同理化性質之測試，並建立快速檢測 PEI 抑制活性測試之方法，輔助追蹤 PEI，有助於在分離與純化中迅速判斷其位置以及殘餘活性之檢測，綜合各理化特性推測 PEI 之化合物類別；為進一步確認此推斷，經管柱進一步純化分離後，藉由酵素之專一性及酸水解，分析鑑定釋出之小分子片段，以推測此 PEI 可能之化學構造。此外，探討愛玉子瘦果渣水萃物是否具有其他功能性的生物活性，提高其利用之價值。

### 第一節、樣品前處理與 PEI 活性追蹤方法之建立

#### 壹、PEI 活性追蹤方法之建立與量化

##### 1. PE 酵素活性指示劑及 PEI 活性追蹤

由於在 PE 水解果膠過程中會產生游離之羧基使 pH 值下降，運用此原理可利用酸鹼指示劑，在 pH 值下降時產生顏色的變化，用以快速判斷 PE 催化活性，本實驗選用 Methyl Red (Bordenave, et al., 1993) 作為酸鹼變化之指示劑，Methyl Red 於 pH 6.2 時呈現黃或橘色；pH 4 時轉為紅色，為使顏色變化更明顯，加入染色常用之 Methylene Blue (藍色)，將含此兩化合物之水溶液混合，於中性時之顏色可呈現為綠色，酸性時轉為紫紅色，利用此混合試劑可以肉眼直接判斷 PE 酵素催化作用之活性，若 PE 活性未被抑制，催化水解果膠 (原 pH 值為 6) 釋出游離之羧基後，溶液顏色會因 pH 值下降明顯由綠色轉為紫紅色，若是 PE 酵素失活或是有被抑制之情形，顏色會和 Negative control 顏色 (含 PEI 不含酵素) 相同呈現顏色或因水解速度減慢而使顏色變化不明顯，依此可快速推斷 PEI 抑制作用的情形。此外，為避免緩衝溶液造成 pH 變化不明顯，故選擇直接使用 0.3 M NaCl 萃取豌豆莢 PE 酵素。

## 2. PE 酵素活性指示劑之波長選擇

指示劑雖然可直接以肉眼判斷 PE 活性之抑制情形，但無法正確量化，因此需藉由儀器，將顏色變化數值化，故在本實驗中，分別將具有活性及失活之 PE 酵素與果膠反應 30 分鐘後，滴加指示劑，混合均勻分別進行全波長掃描，將兩全波長掃描之數值相減後，以波長 527 nm 之差值最大（圖 4.1），故後續實驗取 O.D<sub>527 nm</sub> 作為統計分析之數值。

## 3. OD<sub>527 nm</sub> 與反應液中 H<sup>+</sup> 釋出量之相關性

為探討 OD<sub>527 nm</sub> 之數值是否和反應液中[H<sup>+</sup>]之變化量有所相關或具有其代表性，本實驗於果膠溶液中加入不同稀釋倍率之 PE 酵素液（1、10、20、50、100 倍以及已煮沸失活之 PE 粗萃液），作用 30 分鐘後，分別測量其 pH 值與 OD<sub>527 nm</sub>，將所得之數值以 OD<sub>527 nm</sub> 對 pH 值作圖，可得一線性公式為  $y=0.135x + 0.0487$  且  $R^2=0.9621$  之趨勢線（圖 4.2），由此可知，OD<sub>527nm</sub> 與反應液中氫離子釋出量之對數值具有良好之線性關係與相關性，因此，從 OD<sub>527nm</sub> 之變化量可快速推估[H<sup>+</sup>]變化之情形。

經由 OD<sub>527nm</sub> 估算[H<sup>+</sup>]變化可知 pH 於反應液中下降之情形以判斷 PE 之活性變化（OD<sub>527nm</sub> 改變量越大，表示 PE 催化的活性越強；PEI 抑制活性則越弱）；在針對 PEI 進行追蹤與純化時，可立即從觀察顏色變化判斷 PEI 抑制 PE 之情形。為使 OD<sub>527nm</sub> 之改變量直接反應出 PEI 抑制 PE 酵素能力變化之情形（PE Inhibition），本實驗就 OD<sub>527nm</sub> 之相對讀值，訂定出一簡易之計算公式，以 PE 活性抑制百分比（PE Inhibition（%））表示 PEI 抑制 PE 酵素之能力，以方便比較各種處理對 PEI 抑制 PE 能力之影響。

其公式（PE Inhibition（%））如下頁所示：

$$\text{PE Inhibition (\%)} = \left( 1 - \frac{\Delta\text{OD}_{\text{sample}}}{\Delta\text{OD}_{\text{control}}} \right) \times 100\%$$

	PE	PEI
<b>Positive Control</b>	+	-
<b>Blank</b>	-	-
<b>Sample</b>	+	+
<b>Negative Control</b>	-	+

Wavelength : 527 nm

$$\Delta\text{OD}_{\text{control}} = \text{OD}_{\text{positive control}} - \text{OD}_{\text{blank}}$$

$$\Delta\text{OD}_{\text{sample}} = \text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{negative control}}$$

將加入 PEI 和未以 PEI 處理之反應液中 OD<sub>527nm</sub> 變化量相比較，可知 pH 下降多寡之差異同時判斷 PEI 對 PE 酵素之抑制活性。此外，針對 PEI 理化性質之探討，亦可比較經不同處理過後之 PEI 相對抑制能力之消長情形。此公式提供一較直接之比較方式，方便快速判讀 PEI 抑制 PE 活性之能力及比較各分離步驟對抑制能力之影響。

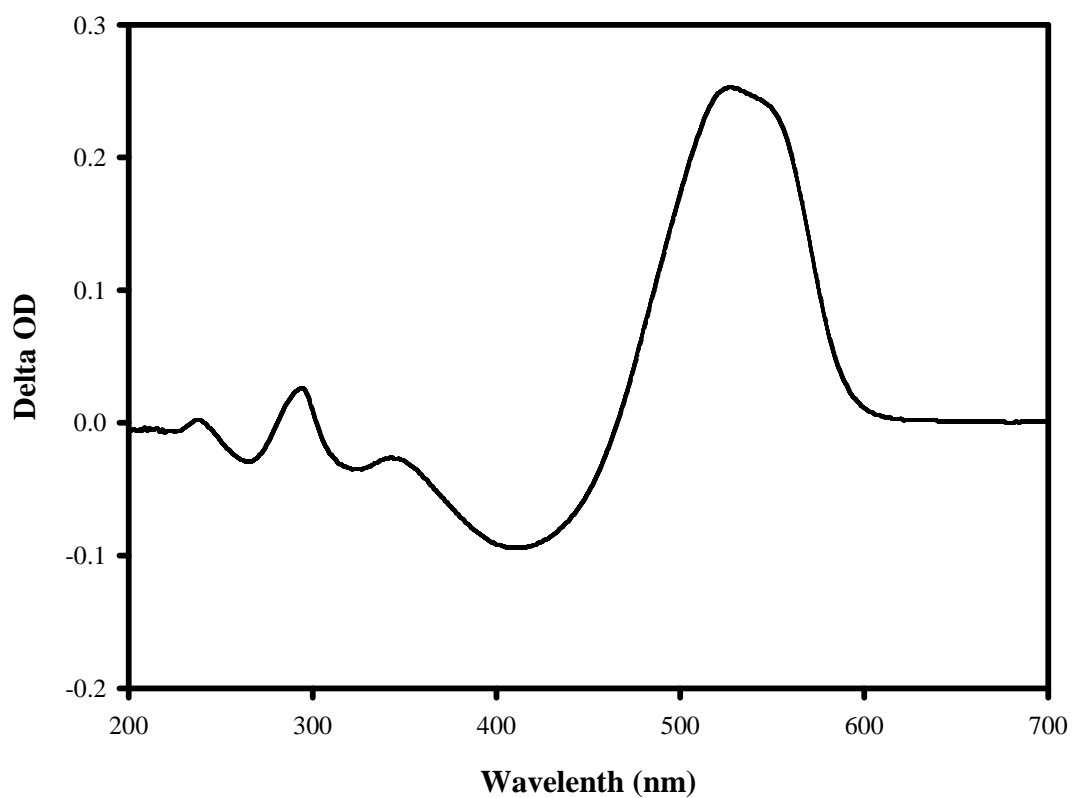


圖 4.1 PE 酵素活性指示劑於果膠溶液中經 PE 酵素催化後之 UV-VIS 光譜變化

Fig 4.1 The overlay of UV-VIS spectra change of the pectin solution with indicator of PE inhibition after treatment with PE.

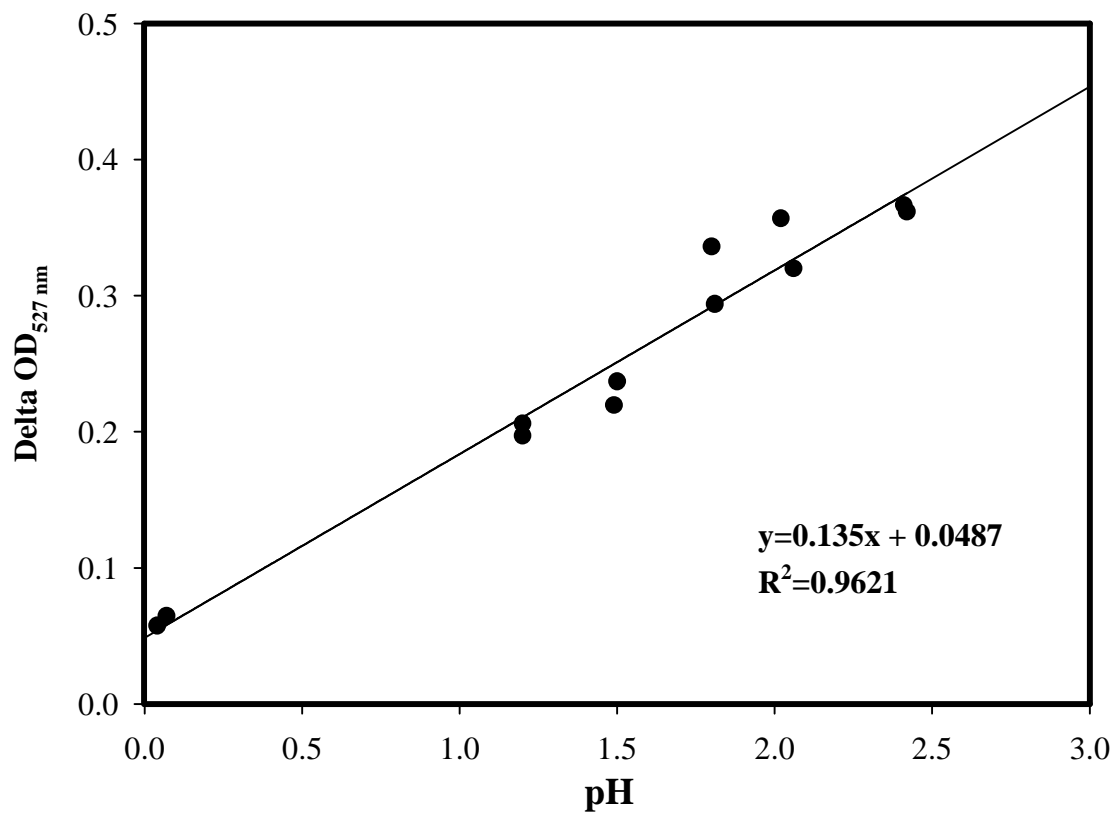


圖 4. 2 PE 酵素活性指示劑於果膠溶液中 OD<sub>527nm</sub> 與 pH 之關係圖

Fig4.2 The correlation between OD<sub>527nm</sub> and pH.



## 貳、愛玉子 PEI 之萃取與純化

本實驗以利用愛玉子殘渣為目的，故參考賴（2008）之萃取方法並加以調整，採用自來水搓洗過之愛玉子乾燥後以水直接萃取，但本實驗未在一開始即將其破碎均質，原因是愛玉子之乾燥瘦果渣較水要輕，會漂浮在水面上，造成破碎不易，此外，由賴（2008）之結果可知，不論是完整或者是破碎之瘦果渣，以水經過隔夜萃取之效果相同，故本實驗以 500 mL 蒸餾水加入完整之烘乾瘦果渣中，攪拌隔夜，使瘦果渣膨潤沉降至液底，有利於均質時愛玉子殘渣之破碎，均質後離心，保留上清液，以 200 mL 蒸餾水對破碎之愛玉子殘渣進行 2 小時之再萃取後離心將上清液合併，兩上清液合併後約可得 500 mL 之 PEI 粗萃液。

上述之上清液即使經過過濾仍呈現一混濁之膠體溶液，不利於後續實驗 PEI 抑制活性之觀察與追蹤，故在將上清液煮沸使 PE 失活後，加入等體積（500 mL）之 3%NaCl，靜置，可有效使混濁之膠體沉降成為澄清之 PEI 水萃液，分離上清液，將其減壓濃縮抽乾後秤重，約每公克愛玉子 PEI 粗萃液可收集到  $28.6 \pm 5.1$  毫克之愛玉子水萃物。

將粗萃液（Crude extract）進行 PEI 活性測試，如圖 4.3 所示，在加入 PEI 之水萃液與 PE 酵素液混合 10 分鐘後，於果膠溶液中反應，與對照組相比較，其抑制 PE 能力（PE Inhibition）可達 99%，表示 PE 酵素被抑制而無法水解果膠產生游離之羧基使 pH 值下降，顯示愛玉子粗萃液中含有可抑制豌豆 PE 酵素活性之 PEI 存在。

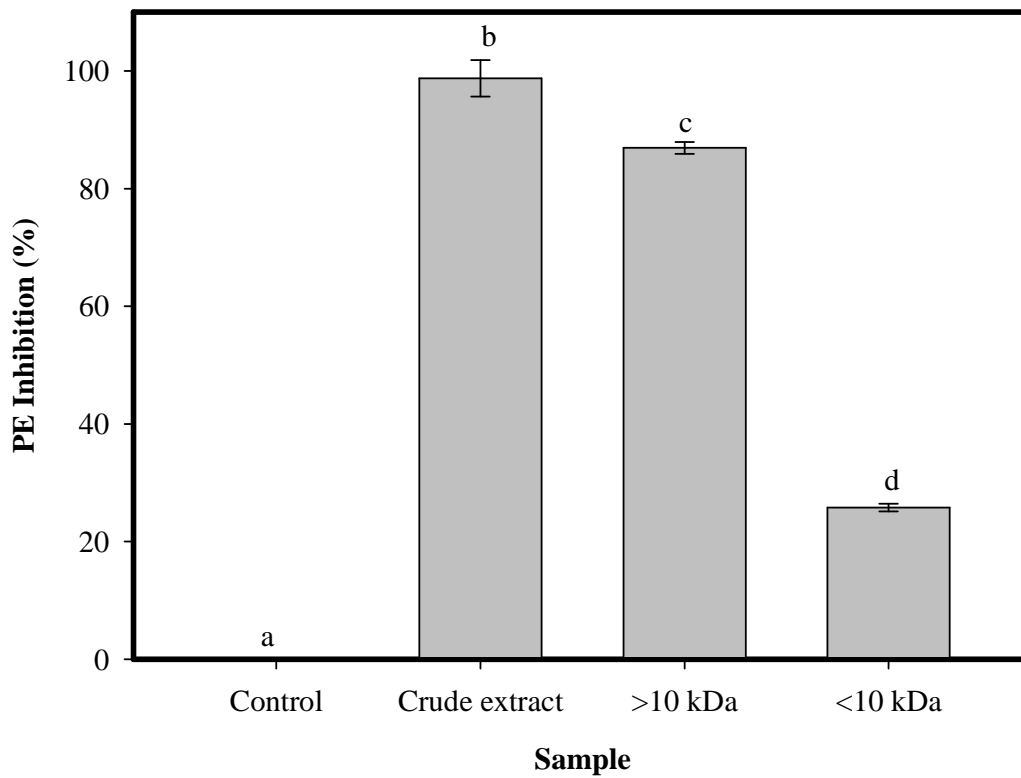


圖 4.3 愛玉子 PEI 粗萃液與其分子量區分之 PE 抑制活性

Fig 4.3 Relative PE inhibition test of PEI crude extract and its molecular fractions.

Bars with different letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.

## 第二節、PEI 之追蹤與鑑定

### 1. 丙酮沉澱試驗

Jiang 等 (2002) 提出愛玉子中之 PEI 應為一耐熱之 polypeptides，故本實驗參考莊 (2005) 藉由有機溶劑沉澱法，稀釋水濃度降低水活性，使蛋白質水合度降低，產生沉澱，藉以回收 PEI。經過 90% 丙酮沉澱後，可發現有大量之蛋白質沉澱，為確定 PEI 是否可經由有機溶液沉澱法沉澱，過濾後將 90% 丙酮上清液的部分以減壓濃縮去除丙酮後以蒸餾水定容至未加丙酮前之原始體積，進行 PEI 抑制能力測定。結果如圖 4.4 所示，若含有 PEI 90% 丙酮可溶部份之水溶液 (圖示中之 PEI-AS)，其抑制 PE 能力 (PE Inhibition) 可達 93%，顯示 PEI 之活性仍保留在 90% 丙酮上清液中；此外，若將 90% 丙酮不溶物以氮氣吹乾以 1.5% NaCl 回溶後進行抑制 PE 活性能力測試，並沒有顯著之抑制效果。根據莊 (2005) 之解釋，有機溶劑沉澱中，脂溶性蛋白質的溶解度反而會增加，但和此 PEI 存在於水溶液之情況不符，因此可能是此 PEI 之水溶性極高，即使溶液中含 90% 丙酮，仍可存在於上清液中。

### 2. 分子量之初步區分

本實驗將 PEI 粗萃液 (crude extract) 及 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 (PEI-AS) 分別區分為兩區段 (大於 10 kDa 及小於 10 kDa 兩區分)，將此兩部份進行 PEI 抑制活性測定，結果發現，如圖 4.4 所示，在 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液的兩個區段中，皆可發現 PEI 之存在，其中又以大於 10 kDa 的部份抑制情形較好 (大於和小於 10 kDa 之 PE Inhibition 分別約為 90.5% 及 80%)，顯示 PEI 之分子量應落於 10,000 Da 左右，又以大於 10 kDa 的部份抑制活性較強。此結果和 Jiang 等 (2002) 之結果 (分子量介於 3,500~4,500 Da 之間) 並不相同。

此外，雖然 PEI 90% 丙酮可溶水溶液在小於 10 kDa 之區段中，可發現 PEI 之存在 (PE Inhibition 為 79.84%)，但在愛玉子 PEI 粗萃液小於 10 kDa 的部分卻很

少（圖 4.3），其 PE Inhibition 只有約 25.6%，可能是愛玉子 PEI 粗萃液中仍含有大分子的蛋白質，將膜表面的孔隙阻塞，使其他分子無法通過，亦有可能是粗萃液之蛋白質會和 PEI 因某種交互作用而以非共價之方式結合，使得其在做分子量區分時，隨大分子之蛋白質分子留在大 10 kDa 之區段，而在進行丙酮沉澱時，蛋白質沉降的同時破壞了部分 PEI 與蛋白質間之鍵結，使 PEI 回復成游離的狀態，而使分子量較小之 PEI 可通過 10 kDa 之濃縮膜。由此推論，以丙酮沉澱不僅可去除大量之蛋白質與其他雜質，還可去除蛋白質與 PEI 結合之干擾，可視為一純化之步驟。

若此 PEI 活性多存在於分子量大於 10 kDa 的部份，此 PEI 有可能不是 polypeptides，大於 10 kDa 的分子量應分類為蛋白質，再者，愛玉子中之 PEI 兼具高耐熱性以及 90% 丙酮無法沉澱之高水溶性的兩大特性，不易因熱而造成構形改變而失去抑制能力，也不受有機溶劑可能會造成變性的影響，依以上結果初步推測此 PEI 可能不屬於 polypeptides，亦非蛋白質，而可能是屬於一高分子量的聚合物，必須更一步之實驗證實。

### 3. PVPP 吸附試驗

PVPP 為一官能基由 pyrrolidone 環組成之飽和碳鏈，其官能基恰巧暴露於顆粒的表面，環上含有氮原子及其相鄰之羧基，具有極強的負電性，可與多酚類或蛋白質之 CO-N 鍵結和 phenol groups 以氫鍵產生鍵結（Benedicte and others, 2006），因此，本實驗為釐清愛玉子中之 PEI 是否可能為酚類化合物，於愛玉子 PEI 之萃出液中添加 2% 之 PVPP 反應 1 小時後，離心取上清液以蒸餾水定容後，測試 PEI 之抑制活性，PE Inhibition 只剩下 15.8%（如圖 4.5），發現其抑制活性有顯著性地降低（未處理前 PE Inhibition 可達 99%），顯示愛玉子中之 PEI 可被吸附在 PVPP 之固體表面上，經離心過後之上清液轉為較澄清透明的顏色，且 PEI 大大減少抑制 PE 之能力，由此推測愛玉子中之 PEI 除了可能是蛋白質外，亦有可能為高分子

量之多酚類化合物。

#### 4. 與蛋白質之交互作用

多酚類化合物具有和蛋白質結合之特性，可能經由氧化形成共價鍵結之醌類化合物或是形成非共價鍵結之型態而產生沉澱。在 PVPP 試驗後推測愛玉子中之 PEI 很可能為一多酚類化合物，為進一步證明此推測，利用多酚類可和蛋白質結合之原理，將不同蛋白質溶液（soyprotein、lysozyme 和 BSA）與愛玉子之 PEI 粗萃液等體積混合至隔夜，可發現溶液轉為混濁，離心後可發現明顯的白色不溶物沉澱，取上清液測試其 PEI 之抑制活性，可以發現 PE Inhibition 皆降至 20~30%（如圖 4.5），和水等體積混合之空白對照組 PE Inhibition 可達 98% 相對比，其抑制 PE 的能力大大地減少。

文獻中(Siebert et al. 1996)指出，蛋白質可和多酚類化合物形成可溶性之錯合物，而後形成膠體顆粒，最後產生沉澱。此現象和本實驗所觀察到之結果相吻合，且在和蛋白質形成錯合物後抑制 PE 的能力明顯減弱之情形來看，愛玉中之 PEI 可能為一多酚類化合物。

#### 5. 酸水解

將 PEI 90% 丙酮可溶水溶液調酸 37% HCl 至含 1 N 之 HCl，於 121 °C 高壓滅菌釜中反應 30 分鐘，冷卻後將溶液以 NaOH 調至 pH 6，再依 Minipore 之超過濾濃縮膜（MWCO 10 kDa）作區分，分別對大於 10 kDa 及小於 10 kDa 兩部份作 PEI 抑制活性測試，發現相較於未酸水解前，酸水解液之抑制活性有顯著性的減少，大於 10 kDa 之 PE Inhibition 由 90.5% 降至 37.5%；小於 10 kDa 則由 79.8 降至 16.5%（如圖 4.4），表示加熱過程中，在酸性環境下可使愛玉子之 PEI 部份水解，使其失去抑制 PE 之活性，表示 PEI 可為酸水解，因此，除了蛋白質之外，可能是大分子多酚化合物或是碳水化合物；又因其酸水解後，溶液會自茶色轉變為晶紅色，將 pH 值調至 6 後，顏色又會轉回紅棕色，顯示其水解後的小分子片段可能是顏色

易會受 pH 值影響之多酚類化合物。

PEI 90% 丙酮可溶水溶液，經 HPLC 分析後，如圖 4.6 (A)，可以從圖譜中觀察到，在 30 至 60 分鐘之間，基線有一駝峰狀之隆起，此為單寧類於 RP-HPLC 在梯度流洗過程中之特徵。在植物萃取物中，常常無法以梯度流洗之方式分離單寧之 peak，各種類似型態的代謝物在相近之時間流洗出來而呈現一 broad timespan 之現象，在圖譜上呈現 hump-like 之效應 (Stead 1998)，但經過酸水解處理後，此 hump-like 的形狀會從圖形上消失 (圖 4.6 (B)) 產生其他的 peak，而抑制 PE 的活性也隨之消失，顯示此區段的化合物可能已在高熱的環境下為酸所水解。

由種種證據顯示，愛玉子殘渣水萃物中所存在之 PEI 可能並非如 Jiang 等 (2002b) 所推測為一 polypeptides，而是一種分子量約在 10 kDa 左右可水解之單寧類化合物。



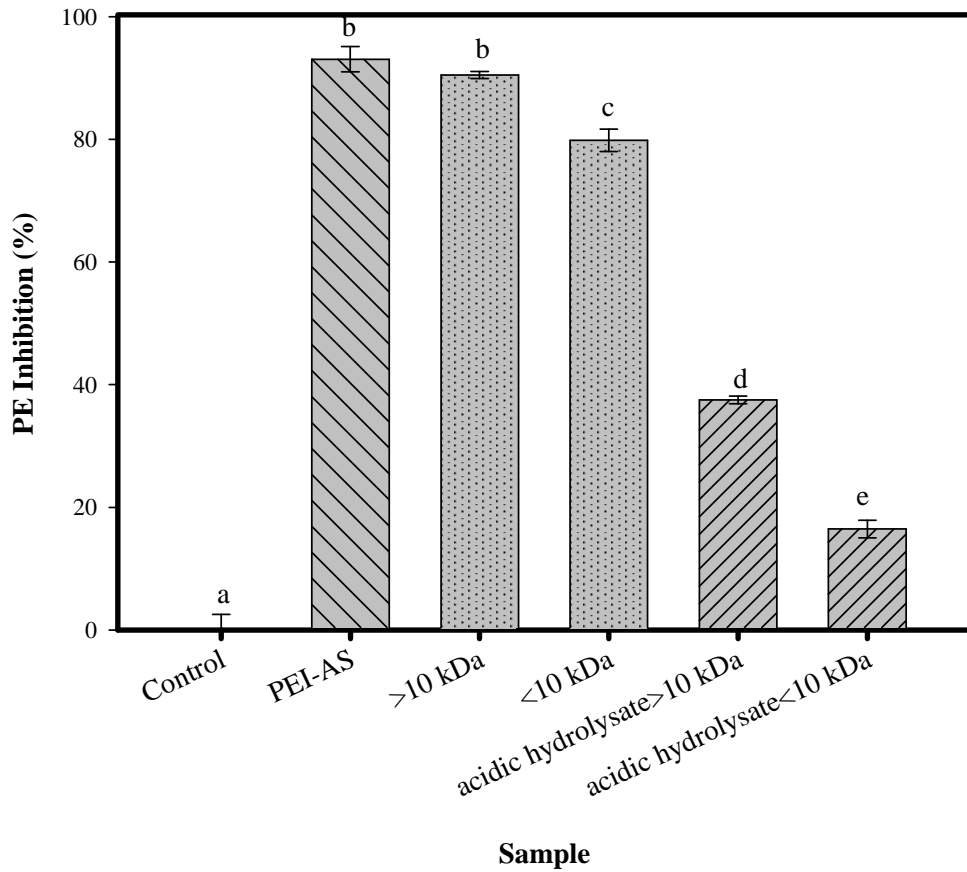


圖 4.4 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液與其分子量區分及酸水解區分之抑制 PE 活性能力

Fig 4.4 Relative PE inhibition of PEI-AS and its molecular fractions before and after acidic hydrolysis.

Bars with different letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.

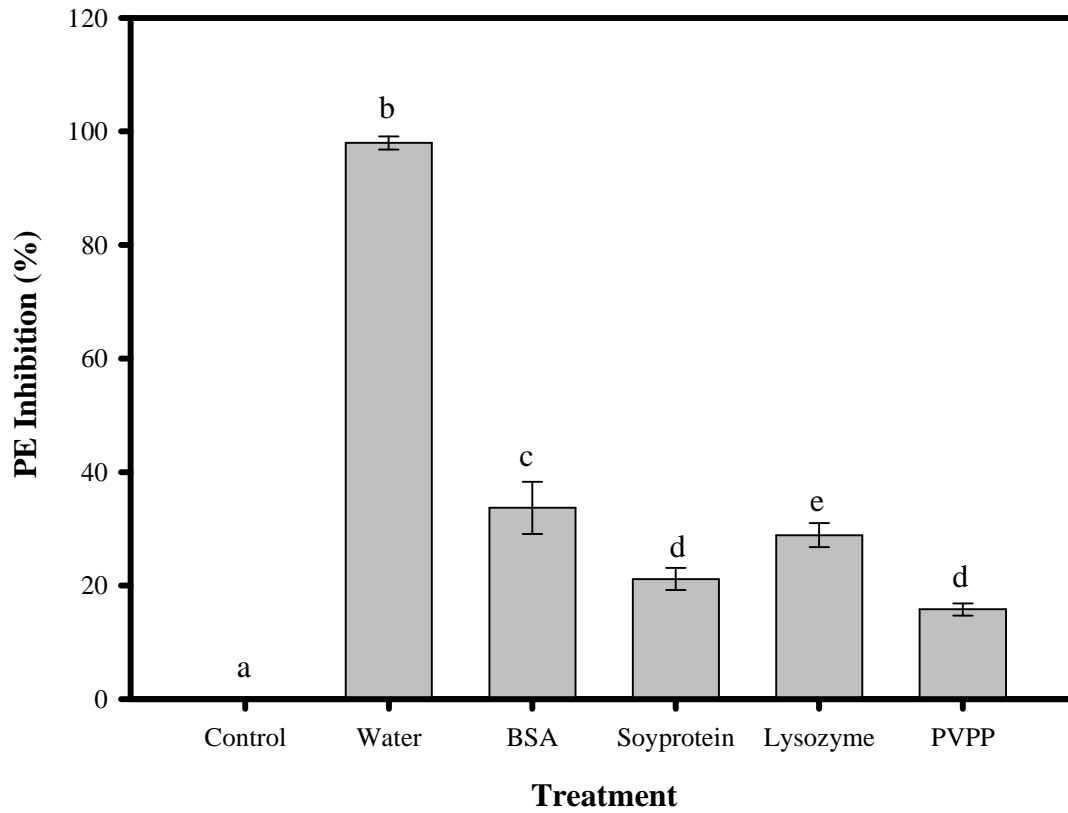


圖 4.5 愛玉子 PEI 粗萃液與 PVPP 和蛋白質間之交互作用

Fig 4.5 Relative PE inhibition of the interaction between PEI and PVPP / proteins.

Bars with different letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.



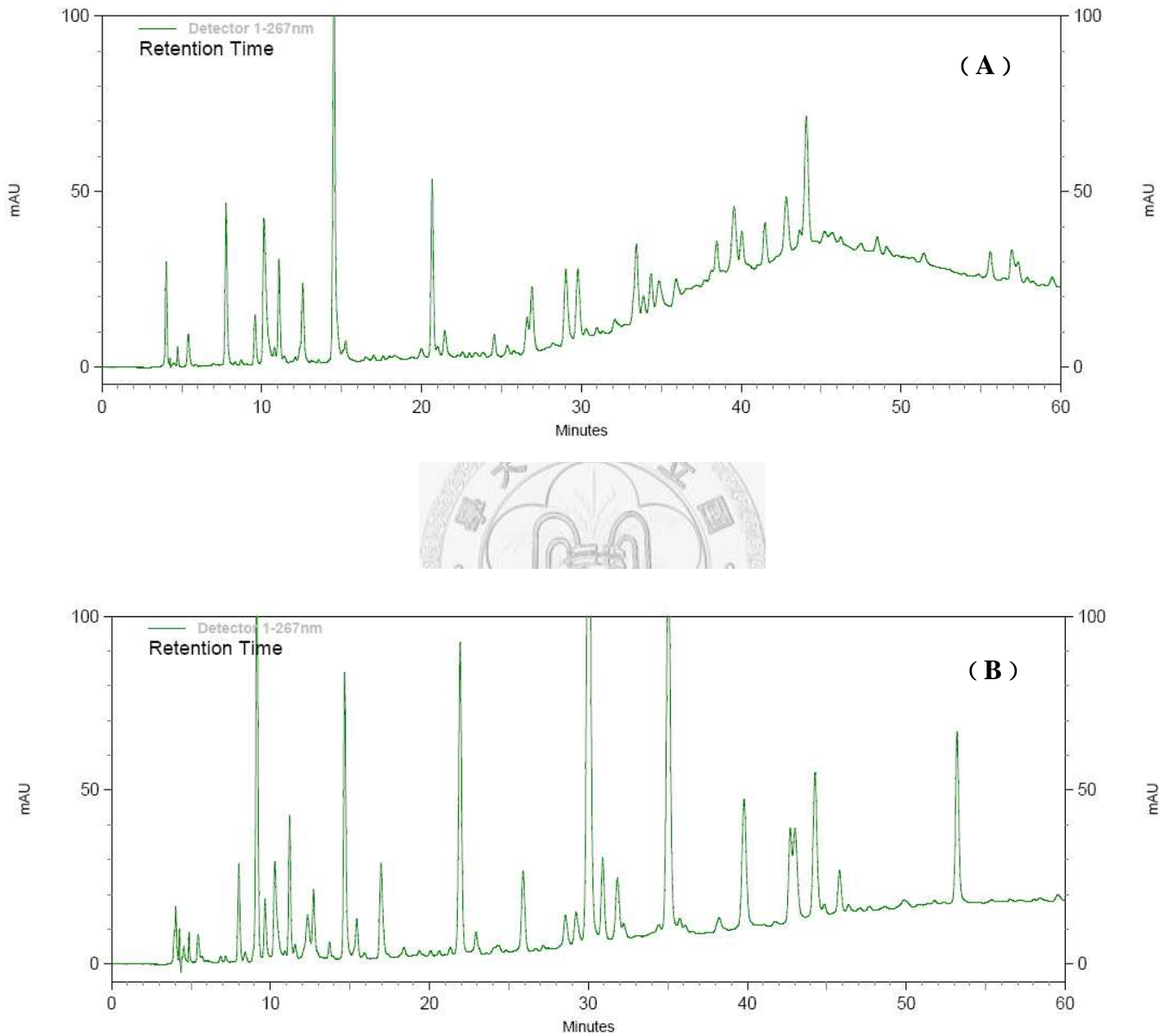


圖 4.6 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液酸水解之 HPLC 分析圖譜

(A) 酸水解前

(B) 酸水解後

Fig4.6 HPLC chromagram of PEI-AS acidic hydrolysis:

(A) Before acidic hydrolysis and (B) After acidic hydrolysis.

### 第三節、愛玉子 PEI 之純化與組成分析

#### 壹、Diaion HP-20 管柱分離純化

Diaion HP-20 常用於天然物之分離與純化，適合吸附中性水溶性之化合物，並可同時脫鹽，故本實驗採用 Diaion HP-20 分離管柱進行分離，將 PEI 90% 丙酮可溶水溶液通過 Diaion HP-20，再依序以等體積之 H<sub>2</sub>O、30% MeOH、MeOH 流洗，各別收集流洗液後，以減壓濃縮抽乾，可發現 H<sub>2</sub>O 流洗液在減壓濃縮後有透明結晶析出，顯示鹽類可被 H<sub>2</sub>O 自 Diaion HP-20 洗出而達到脫鹽之效果；以蒸餾水以等體積回溶後，進行 PEI 抑制活性測試，結果如圖 4.7 所示，其流洗液之 PE Inhibition 只殘留 15.1%，顯示大部分具有活性之 PEI 可被 Diaion HP-20 所吸附，最後由 MeOH 洗出，相較於 H<sub>2</sub>O、30% MeOH 之 PE Inhibition（分別為 13.8 及 8.27%），MeOH 之 PE Inhibition 可達 82.2%，表示具有活性的部份多集中於 MeOH 之部分；此外，比照 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液（圖 4.8（A））及 MeOH fraction. 之 HPLC 分析圖譜（圖 4.8（B）），前段偏極性之部分可經由 Diaion HP-20 管柱分離去除，進一步分離純化愛玉子中之 PEI。

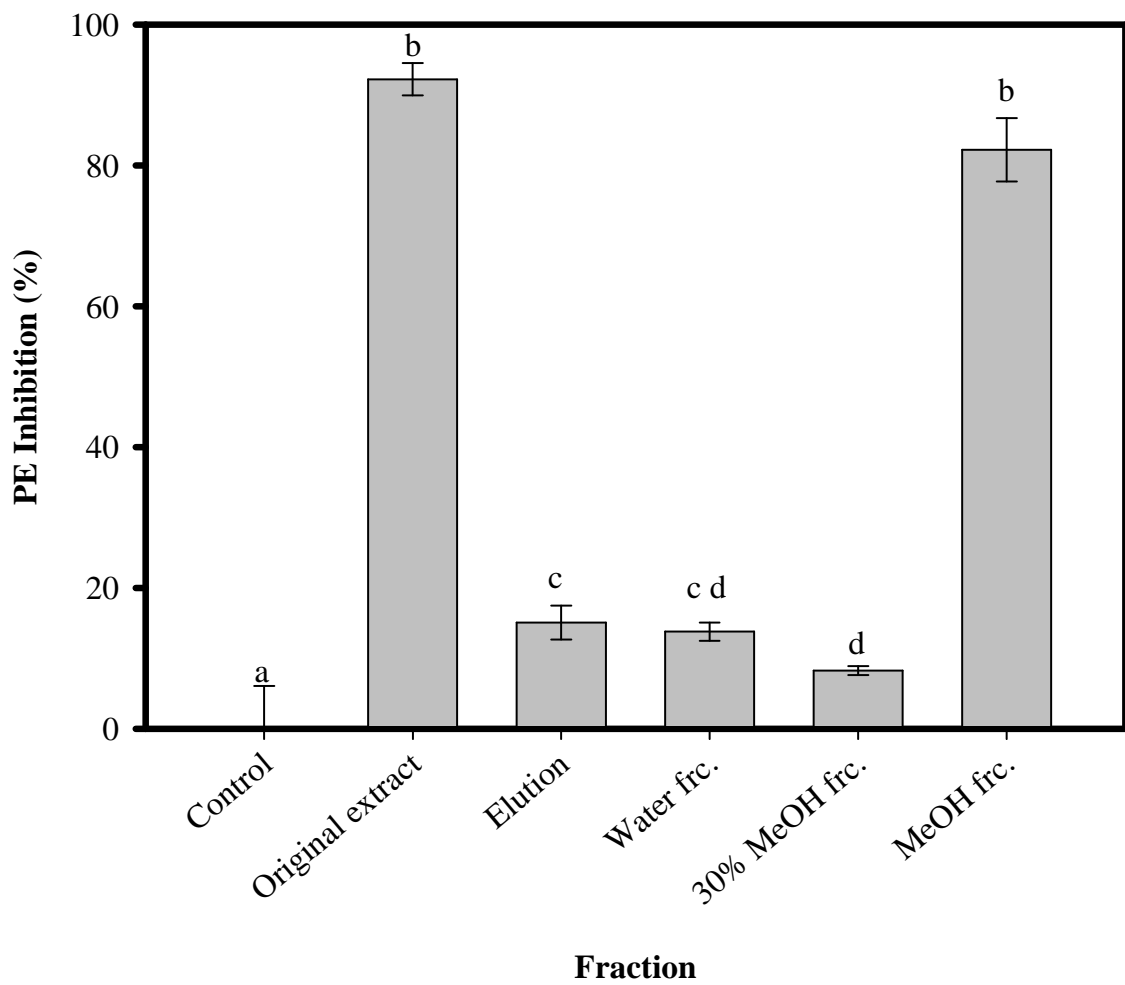


圖 4.7 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液之 Diaion HP-20 管柱流洗

Fig 4.7 PE inhibition of elutions of PEI-AS by Diaion HP-20 column.

Bars with different letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.

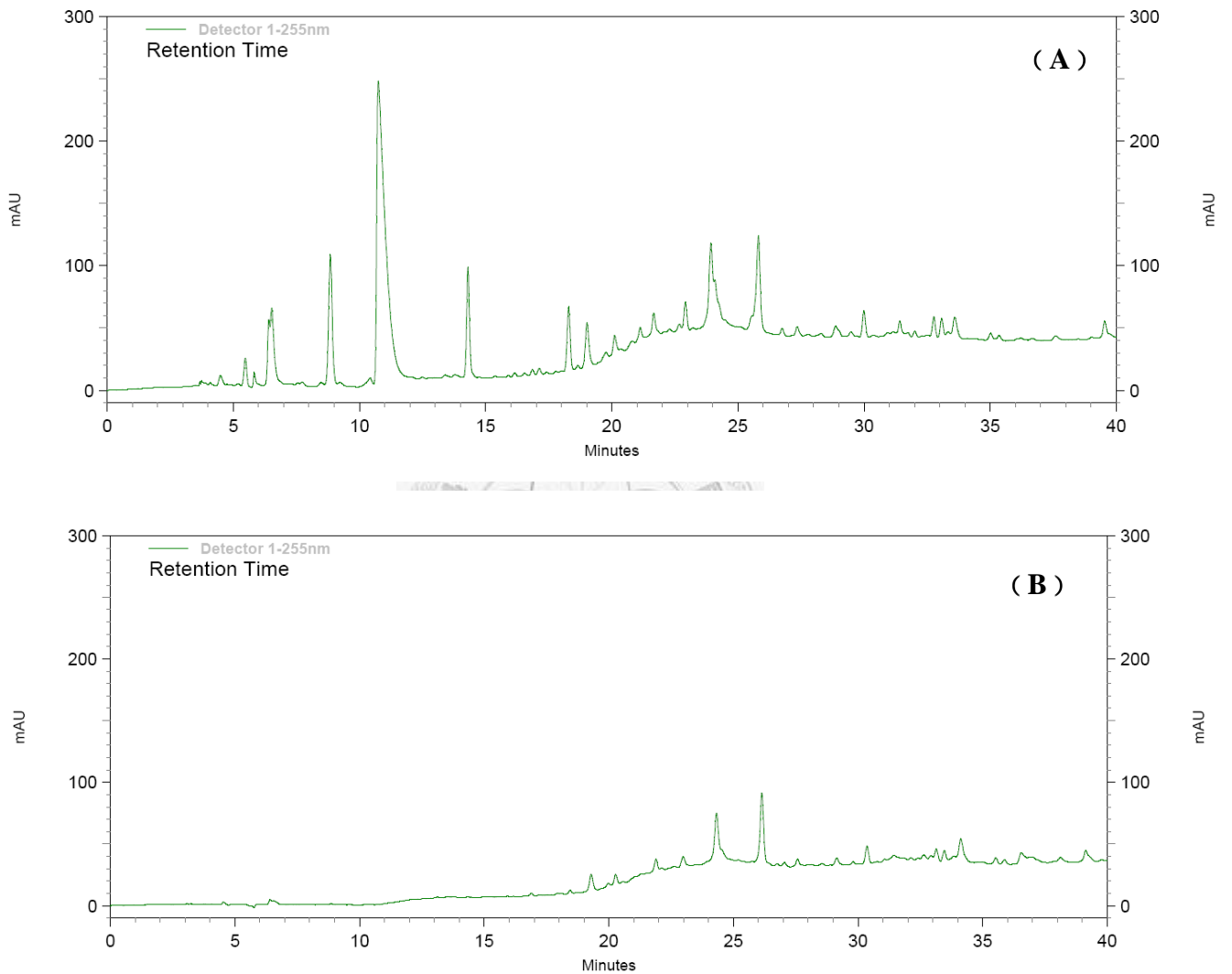


圖 4.8 愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 HPLC 分析圖譜

(A) 原液

(B) 經 Diaion HP-20 層析之甲醇區分物

Fig 4.8 HPLC chromatogram of PEI-AS:

(A) original solution and (B) MeOH fraction.

## 貳、愛玉子 PEI 之組成分析

由前述實驗推斷愛玉子中之 PEI 可能為可水解單寧，可水解之單寧大致可分為由沒食子酸(gallic acid)組成之沒食子酸單寧(gallotannin)及鞣花酸(ellagic acid)組成之鞣花酸單寧(ellagic acid)。因此，必須藉由管柱進一步純化後，針對可水解單寧之特性進行探討。

### 1. Tannase 酵素水解

利用 tannase 可催化水解 hydrolysable tannins 產生 gallic acid 的原理，分析愛玉子 PEI 是否含有 gallic acid 的片段，以判定是否為 gallotannins。

將愛玉子 PEI 以 tannase 處理與經 tannase 催化的 tannic acid 的 HPLC 分析圖譜比較(如圖 4.9)，發現，tannic acid 經 tannase 水解後可在圖譜中看到明顯的 gallic acid 波峰，顯示酵素具有活性，但在 tannase 與愛玉子 PEI 混合液中並沒有發現 gallic acid 之 peak(如圖 4.9B)，其原因可能有二，一為可能此單寧結構並非由 gallic acid 所組成；二為 tannase 可能被 PEI 所抑制因此無法進行催化反應，為證實後者的可能性，針對對照組與實驗組進行 PEI 抑制活性測試。

由 PEI 抑制活性測試可知(如圖 4.10)，同濃度下之 BSA 可與部分之 PEI 形成錯合物，使 PEI 抑制 PE 之活性降低，但同濃度經煮沸失活之 tannase 並沒有與 PEI 結合而使其失去抑制 PE 活性之能力，故可排除 PEI 抑制 tannase 催化活性的疑慮，由此，可判定愛玉子 PEI 應非 gallic acid 所組成之 gallotannins。

### 2. PEI 與 Tannase 之交互作用

為進一步求證 tannase 是否亦是亦會被愛玉子之 PEI 所抑制而無法具有催化活性水解產生 gallic acid，故本研究進行一延伸實驗，便是將與 PEI 作用過後之 tannase 再與 tannic acid 作用，檢測是否仍可使 tannic acid 水解產生 gallic acid。由 HPLC 分析結果顯示(如圖 4.11)反應液中有 gallic acid 之生成，即使 tannase 與愛玉子

PEI 作用之後，仍然具有催化活性，水解 tannic acid，亦可證明愛玉子 PEI 對 tannase 並無明顯之抑制效果。

### 3. MeOH fraction. 酸水解

根據其可被酸水解的特性，本實驗收集 MeOH fraction 後以減壓濃縮後抽乾，以 1 N HCl 回溶後加熱進行酸水解，冷卻後定容，分別比較酸水解前後之 MeOH *frac.* 之 HPLC 圖譜，如圖 4.9 所示，可觀察到在酸水解後，較酸水解前多出數個 peak，其中可明顯看到鞣花酸(34 分鐘)之 peak，但並無明顯沒食子酸之 peak(13 分鐘)，因此，本結果顯示，此 PEI 應為以鞣花酸(ellagic acid)為單位所構成之單寧類化合物。

### 4. Ninhydrin test

為證實本研究自愛玉子中所分離出之 PEI 是否為 Polypeptides，利用 Free amino group 於加熱過程中可將 ninhydrin 還原形成 hydrindatin，hydrindatin 再與 ninhydrin 及 NH<sub>3</sub> 形成紅紫色複合物之原理，測試 PEI 是否具有 Amino group；另一方面，由於前述實驗中，愛玉子 PEI 於酸性環境下加熱後，抑制 PE 活性之能力會有顯著性地降低，顯示其可能被酸水解成較小之分子片段，故本研究亦針對此部份進行 ninhydrin test，比較酸水解前後，free amino group 之含量是否有因酸水解處理而有所增加。

結果如表 4.1 所示，gelatin 經酸水解處理後進行 ninhydrin test，於 570 nm 之吸光值有顯著性地增加，表示於酸性環性下加熱分解蛋白質可使 free amino group 之含量增加，但在 MeOH *frac.* 經酸水解處理後，吸光值之變化無顯著性差異，表示 free amino group 之含量並沒有增加，且不論酸水解前後，其吸光值皆偏低，顯示 free amino group 含量極少，故可推判其並非蛋白質類之化合物。

表 4. 1 Ninhydrin test 中 Gelatin 與 MeOH *frac.* 酸水解前後之 OD<sub>570 nm</sub>

Table 4.1 OD<sub>570 nm</sub> of Gelatin and MeOH *frac.* before and after acidic hydrolysis in  
Ninhydrin test

	Hydrolysis (OD <sub>570 nm</sub> )	
	Before	After
Gelatin	0.36±0.03 <sup>a</sup>	9.10±0.45 <sup>b</sup>
MeOH <i>frac.</i>	0.03±0.01 <sup>c</sup>	0.03±0.02 <sup>c</sup>

Data were expressed as mean ± SD under three independent experiments. Different prefix letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.

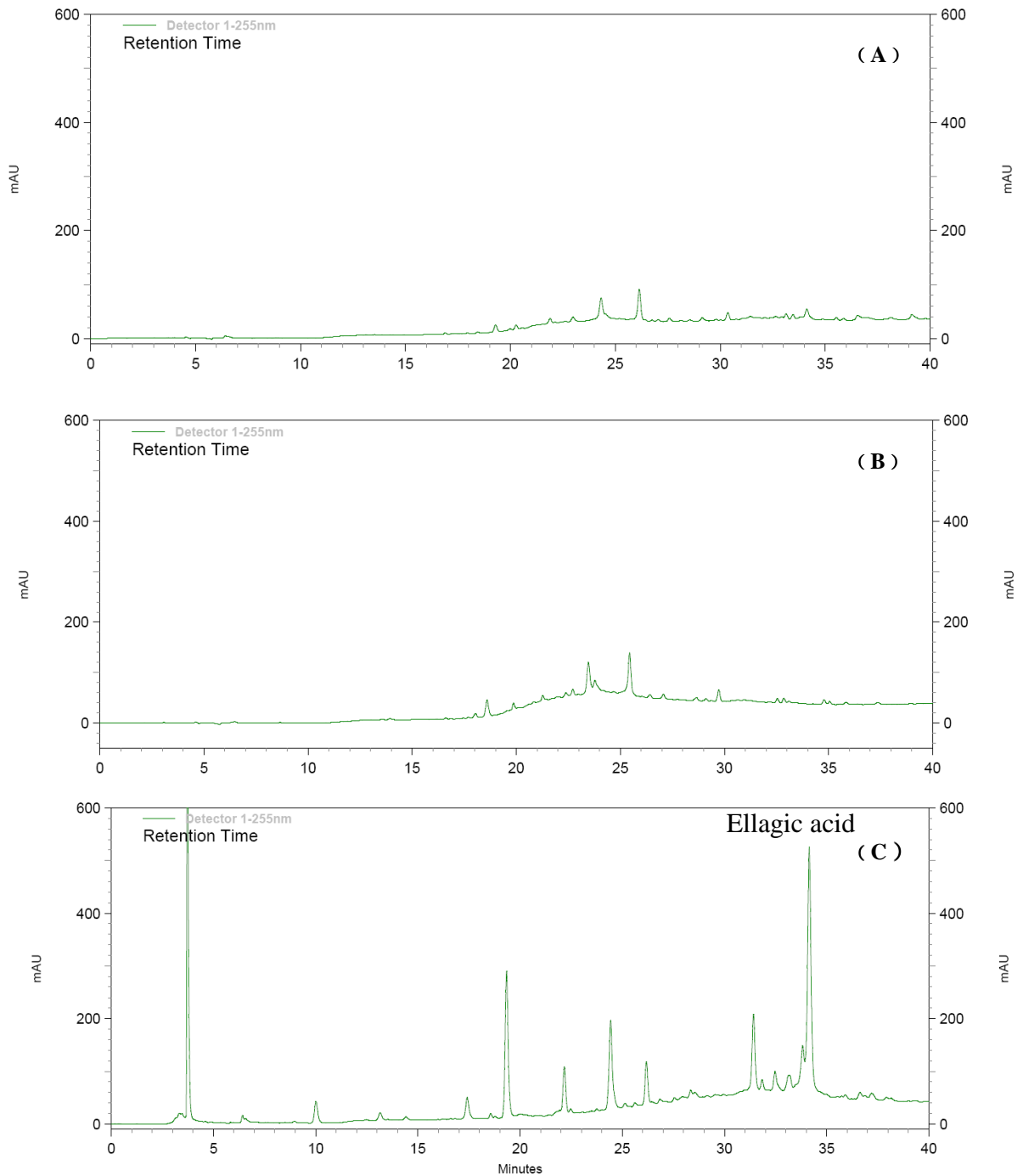


圖 4.9 愛玉子 PEI 90% 丙酮可溶水溶液之 MeOH fraction 相關 HPLC 分析圖譜

(A) 原液、(B) 0.1% Tannase 作用 12 小時和 (C) 減壓濃縮後以等體積 1N HCl 加熱酸水解

Fig 4.9 HPLC chromatogram of PEI-AS:

Original solution(A) , treated with 0.1% Tannase (B) and after acidic hydrolysis(C).



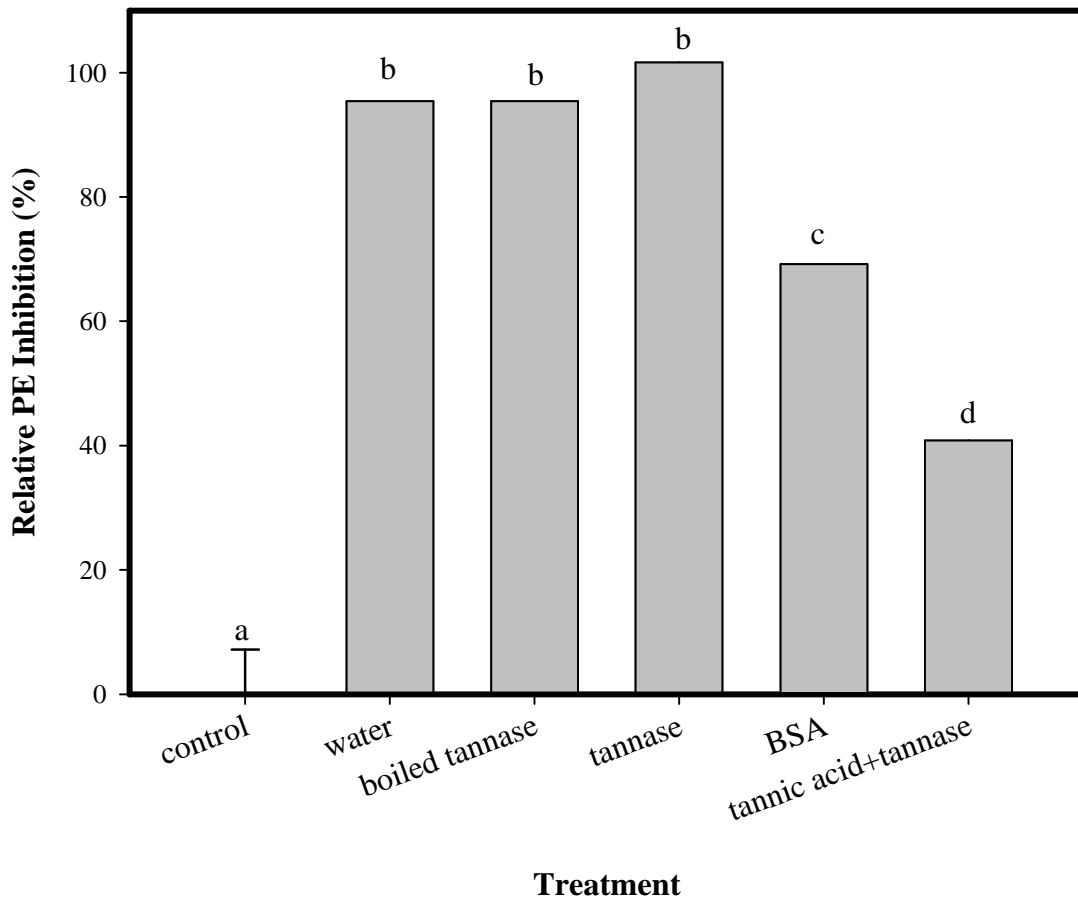


圖 4.10 愛玉子 PEI 90% 丙酮可溶水溶液之 HP-20 MeOH *frac.* 經 tannase 水解之 PE 抑制活性測定

Fig 4.10 PE inhibition of HP-20 MeOH *frac.* from PEI-AS after hydrolysis by tannase.

Bars with different letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.

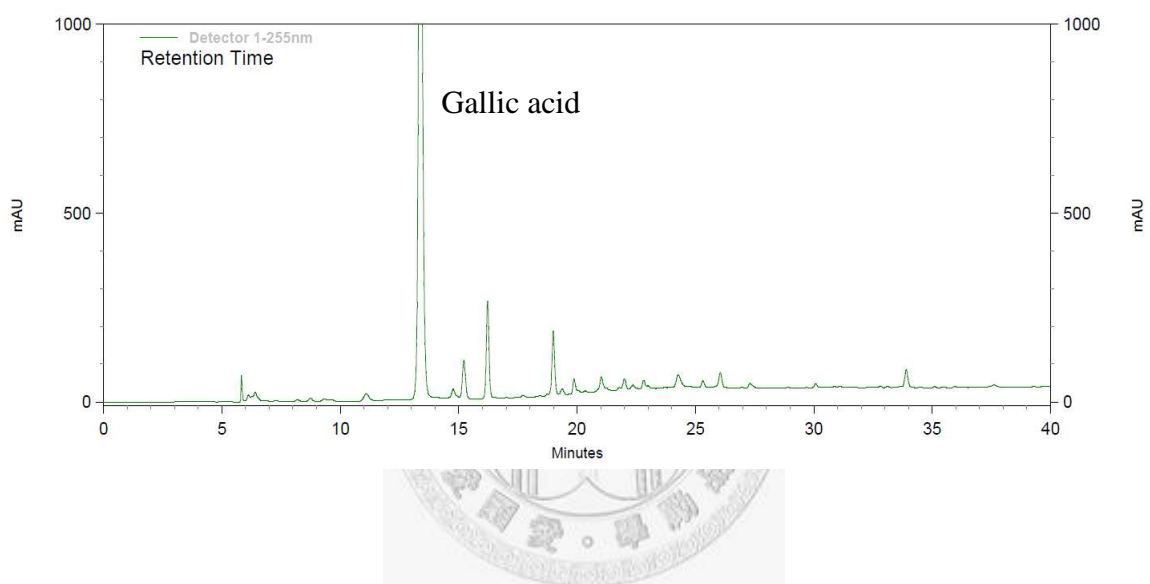


圖 4.11 Tannase 與愛玉子 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液之 HP-20 MeOH fraction 作用後對 Tannic acid 水解能力測試之 HPLC 分析圖譜

Fig 4.11 HPLC chromatogram of tannase hydrolysis toward tannic acid after treated with HP-20 MeOH fraction. of PEI-AS.

## 第四節、生物活性試驗

在與蛋白質交互作用之試驗可知，PEI 可與蛋白質形成錯合物，使蛋白質與其結合後產生沉澱，因此，在愛玉中之 PEI 對於 PE 之抑制作用非專一性之抑制，而是因為多酚類化合物與酵素蛋白質間因交互作用結合而使 PE 失活。因此，本部分之實驗針對動物體消化系統中主要之消化相關酵素，以 PEI 進行抑制試驗，了解 PEI 是否亦可對 Lipase 及  $\alpha$ -amylase 具有抑制的效果。

### 1. PEI 對 Lipase 活性之影響

檢驗試劑係利用 triolein 經 lipase 催化後產生 monoglyceride 及 oleic acid，偵測 340 nm 之吸光，與標準品比較計算樣品中 lipase 的活性。

由結果表 4.2 可知，不管是 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液或是其 MeOH fraction，皆對 lipase (porcine pancreas) 不具抑制的效果，甚至可增加 lipase 之相對活性。單寧雖然可與蛋白質結合形成錯合物，但對於不同的蛋白質結合之情形不同，推測可能 lipase 之蛋白質構形較不易與 PEI 形成錯合物，而使 PEI 對 lipase 有抑制的作用；此外，可能是在反應液中仍存在有其他化合物，可增加 lipase 之活性，使 lipase 之活性不減反增。此外，lipase 的來源為豬的胰臟，因此其中可能亦含有 protease，此 protease 可能原先可水解 lipase，但在與 PEI 結合後失活而失去水解 lipase 的能力，而使 lipase 之活性增強，此部分需針對 lipase 酵素進行 protease 活性測試才能進一步驗證。

### 2. PEI 對 $\alpha$ -amylase 活性之影響

此檢驗試劑之原理係利用  $\alpha$ -amylase 水解 ethylidene-G<sub>7</sub>pNP (G = glucose, pNP = paranitrophenol) 產生 ethylidene-G<sub>x</sub> 與 G<sub>x</sub>-pNP (x= 2 to 5)，再利用  $\alpha$ -glucosidase 將 G<sub>x</sub>-pNP 水解成 glucose 及 pNP，paranitrophenol 之生成量可藉由 405 nm 之吸光之增加測得，藉此測得  $\alpha$ -amylase 之活性。

由表 4.3 可知，無論是 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液或是 MeOH fraction，皆對於  $\alpha$ -amylase 具有抑制的效果，顯示  $\alpha$ -amylase 可能亦可與愛玉子中之 PEI 以蛋白質之形式結合。

### 3. PEI 對 Trypsin 活性之影響

Jiang 等人 (2002b) 所發表之論文中，表示愛玉子中的 PEI 經過 trypsin 水解後其抑制 PE 活性之能力會有顯著性地降低，但根據本實驗結果 PEI 會與蛋白質結合之特性，懷疑可能是 trypsin 以蛋白質之角色與部份之 PEI 結合後，使其抑制 PE 活性之能力減弱，並非 trypsin 水解 PEI 所造成之結果。

故本研究針對此疑慮，設計並探討 trypsin 與愛玉子 PEI 交互作用後，是否會造成 trypsin 水解 casein 之活性減弱，結果顯示 (表 4.4)，trypsin 與 PEI 作用之後，水解 casein 之效率有顯著性地降低，由此可推論愛玉子中之 PEI 可能因具有 tannins 之特性而可與 trypsin 以蛋白質之形式交互作用，使 trypsin 部份失活，愛玉子中之 PEI 因部分與 trypsin 結合之故，而對 PE 活性之抑制能力降低所致，應非愛玉子之 PEI 為 polypeptides 被 trypsin 水解之結果。

表 4.2 愛玉子甲醇流洗物對 lipase 活性之影響

Table 4.2 Effect of MeOH fraction on lipase from jelly fig achenes.

	<b>Relative activity (%)</b>
<b>Control w/o PEI</b>	100±17.2 <sup>a</sup>
<b>PEI-AS</b>	228±16.9 <sup>b</sup>
<b>MeOH fraction</b>	284±23.8 <sup>c</sup>

Data were expressed as mean ± SD under three independent experiments. Different prefix letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.

$$\text{Relative activity (\%)} = \left( \frac{\text{Activity in the presence of PEI}}{\text{Original activity}} \right) \times 100\%$$

表 4.3 愛玉子甲醇流洗物水萃物對 $\alpha$ -amylase 活性之影響

Table 4.3 Effect of MeOH fraction on  $\alpha$ -amylase from jelly fig achenes.

	Relative activity (%)
<b>Control w/o PEI</b>	100 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>
<b>PEI-AS</b>	76.8 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>
<b>MeOH fraction</b>	78.4 $\pm$ 11.5 <sup>b</sup>

Data were expressed as mean  $\pm$  SD under three independent experiments. Different prefix letters are significantly ( $p < 0.05$ ) different base on Duncan's multiple comparisons.

$$\text{Relative activity (\%)} = \left( \frac{\text{Activity in the presence of PEI}}{\text{Original activity}} \right) \times 100\%$$

表 4.4 愛玉子甲醇流洗物對 Trypsin 活性之影響

Table 4.2 Effect of MeOH fraction on trypsin from jelly fig achenes.

	<b>Relative activity (%)</b>
<b>Control w/o PEI</b>	100±3.11 <sup>a</sup>
<b>PEI-AS (100×)</b>	88.6±0.29 <sup>b</sup>
<b>MeOH fraction (100×)</b>	70.2±4.16 <sup>c</sup>

Data were expressed as mean ± SD under three independent experiments. Different prefix letters are significantly (p<0.05) different base on Duncan's multiple comparisons.

$$\text{Relative Hydrolysis (\%)} = \left( \frac{\text{Activity in the presence of PEI}}{\text{Original activity}} \right) \times 100\%$$

## 第五章、結論

- 一、 利用 methyl red 和 methylene blue 混合指示劑可以肉眼直接判斷 PE 之酵素活性，輔助追蹤各純化步驟中 PEI 之存在，且 OD<sub>527 nm</sub> 變化量與反應液中氫離子釋出量之對數值具有良好之線性關係。
- 二、 愛玉子瘦果渣可以水均質萃取出果膠酯酶抑制劑(PEI)，以等體積 3%NaCl 破壞水萃出液之乳化狀態去除部分雜質、90%丙酮沉澱去除大量蛋白質及 Diaion HP-20 管柱進行疏水性層析區分等方法分離愛玉子中之 PEI。
- 三、 根據愛玉子 PEI 以下特性：
  - (1) 可與蛋白質形成錯合物產生沉澱
  - (2) HPLC 圖譜中 hump-like 之現象
  - (3) 酸水解後失去抑制 PE 活性之能力
  - (4) 酸水解產物中含有鞣花酸 (ellagic acid) 單元
  - (5) 酸水解後 free amino acid 之含量並無增加可初步判定愛玉子 PEI 可能屬於一種可水解之單寧
- 四、 愛玉子 90%丙酮可溶水溶液 (PEI-AS) 經 Diaion HP-20 管柱進行疏水性層析之甲醇區分物具有以下特性：
  - (1) 對於 lipase (porcine pancreas) 並無抑制效果
  - (2) 可抑制 $\alpha$ -amylase (microorganism) 及 trypsin (bovine pancreas) 之酵素活性



## 第六章、參考文獻

- Axelos, M. A. V. a. T., J.F. (1991). The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. The chemistry and technology of pectins. R. H. Walter. San Diego, Academic Press, Inc.: 109.
- Balestrieri, C., D. Castaldo, A. Giovane, L. Quagliuolo and L. Servillo (1990). A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia-Chinensis*). *European Journal of Biochemistry* **193**(1): 183-187.
- Bordenave, M. and R. Goldberg (1993). Purification and characterization of pectin methylesterases from mung bean hypocotyl cell-walls. *Phytochemistry* **33**(5): 999-1003.
- Cameron, R. G., B. S. Buslig and P. E. Shaw (1992). Adaptation of a spectrophotometric assay for pectinmethylesterase to a kinetic microplate reader. *Journal of Food Science* **57**(4): 1006-1008.
- Cardone, E. and R. Mazzarella (1938). The adsorption of phenol by protein in preparation of certain biologic products. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **24**: 137-141.
- Castaldo, D., Laratta, B., Loiudice, R., Giovane, A. and L. Quagliuolo, and Servillo, L. 1997 (1976). The pectinesterase of cation and solvent on. the banana fruit. *Aust. J. Plant Physiol* **3**: 163-172.
- Castaldo, D., A. Lovoi, L. Quagliuolo, L. Servillo, C. Balestrieri and A. Giovane (1991). Orange juices and concentrates stabilization by a proteic inhibitor of pectin methylesterase. *Journal of Food Science* **56**(6): 1632-1634.
- Castaldo, D., L. Quagliuolo, L. Servillo, C. Balestrieri and A. Giovane (1989). Isolation and characterization of pectin methylesterase from apple fruit. *Journal of Food Science* **54**(3): 653-&.
- Chang, L. W. S., Morita, L. L. and Yamamoto, H. Y (1965). Papaya pectinesterase inhibition by sucrose. *J. Food Sci* **30**: 218-222.
- Christensen, S. H. (1986). Pectins. *Food Hydrocolloids*. M. Glicksman. Florida. **3**: 205.

- Deuel, H. and E. Stutz (1958). Pectic substances and pectic enzymes. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* **20**: 341-382.
- Ding, J. L. C., J. S. F. Hsu, M. M. C. Wang and J. T. C. Tzen (2002). Purification and glycosylation analysis of an acidic pectin methylesterase in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(10): 2920-2925.
- Doner, L. W., G. Becard and P. L. Irwin (1993). Binding of flavonoids by polyvinylpolypyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**(5): 753-757.
- Es-Safi, N. E., S. Guyot and P. H. Ducrot (2006). NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(19): 6969-6977.
- Giovane, A., C. Balestrieri, L. Quagliuolo, D. Castaldo and L. Servillo (1995). A Glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit - purification by affinity-chromatography and evidence of a ripening-related precursor. *European Journal of Biochemistry* **233**(3): 926-929.
- Giovane, A., L. Quagliuolo, D. Castaldo, L. Servillo and C. Balestrieri (1990). Pectin methyl esterase from *actinidia-chinensis* fruits. *Phytochemistry* **29**(9): 2821-2823.
- Glicksman, M. (1969). *Pectins. Gun technology in the Food Industry*. M. Glicksman. New York, Academic Press.
- Goldberg, R. (1984). Changes in the properties of ceil waii pectin methylesterase along the *Vigna radiata* hypocoty. *physiol plant.* **61**: 58-63.
- Goldberg R, P. M., Durand L, Mutaftshiev S (1992). In vitro and in situ properties of cell pectinmethylesterases from mung bean hypocotyls. *J Exp Bot* **43**: 41-46.
- Hagerman, A. E. tannin chemistry. from <http://www.users.muohio.edu/hagermae/>.
- Hagerman, A. E. and P. J. Austin (1986). Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34**(3): 440-444.

- Jiang<sup>a</sup>, C. M., C. P. Li and H. M. Chang (2002). Influence of pectinesterase inhibitor from jelly fig (*Ficus awkeotsang Makino*) achenes on pectinesterases and cloud loss of fruit juices. *Journal of Food Science* **67**(8): 3063-3068.
- Jiang<sup>b</sup>, C. M., C. P. Li, J. C. Chang and H. M. Chang (2002). Characterization of pectinesterase inhibitor in jelly fig (*Ficus awkeotsang Makino*) achenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(17): 4890-4894.
- Kertesz, Z. I. (1955). Pectic Enzymes. *Methods in Enzymology* **1**: 158-166.
- Khanbabaee K, v. R. T. (2001). Tannins: Classification and definition *Natural Product Reports* **18**(6): 641-649.
- Kiegestra, K., Talmadge, KW, Bauer, WD, and Albersheim (1973). The structure of plant cell walls. *Plant Physiology* **51**: 188-197.
- King, K., J. R. Mitchell, G. Norton and J. Caygill (1986). Insitu de-esterification of lime pectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **37**(4): 391-398.
- Kohn, R., I. Furda and Z. Kopec (1968). Distribution of free carboxyl groups in pectin molecule after treatment with pectin esterase. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **33**(1): 264-&.
- Kohn, R., K. Heinrichova and A. Malovikova (1983). Binding of cadmium and copper(Ii) ions to oligogalacturonic acids. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **48**(7): 1922-1935.
- Kulp, k. (1975). *Carbonhydrate. Enzyme in food processing*. G. Reed. New York, Academic Press: 107-122.
- Laborde, B., V. Moine-Ledoux, T. Richard, C. Saucier, D. Dubourdiou and J. P. Monti (2006). PVPP-polyphenol complexes: A molecular approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(12): 4383-4389.
- Lee, C. Y., N. L. Smith and R. R. Nelson (1979). Relationship between pectin methylesterase activity and the formation of methanol in concord grape juice and wine. *Food Chemistry* **4**(2): 143-148.
- Lee, M. a. M., J. D. (1968). Mode of action of pectic enzymes. I. Purification and properties of tomato pectinesterase. *Biochemistry*. **7**(11): 4025-4030.

- Lineweaver, H. and E. F. Jansen (1951). Pectic enzymes. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* **11**: 267-295.
- Ly-Nguyen, B., A. M. Van Loey, C. Smout, I. Verlent, T. Duvetter and M. E. Hendrickx (2003). Effect of mild-heat and high-pressure processing on banana pectin methylesterase: A kinetic study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(27): 7974-7979.
- Macdonald, H. M., R. Evans, Wendy J Spencer. (1993). Purification and properties of the major pectinesterases in lemon fruits (*Citrus-Limon*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **62**(2): 163-168.
- Manabe, M. (1973). Studies on derivatives of pectic substances .4. Purification and properties of gitrus-natsudaikai pectinesterase. *Agricultural and Biological Chemistry* **37**(6): 1487-1491.
- Mane, C., N. Sommerer, Yalcin T, Cheynier V, Cole RB, Fulcrand H. (2007). Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes. *Analytical Chemistry* **79**(6): 2239-2248.
- Markovic, O. and J. Patocka (1977). Action of iodine on tomato pectinesterase. *Experientia* **33**(6): 711-713.
- Mcfeters, R. F. and S. A. Armstrong (1984). Measurement of pectin methylation in plant-cell walls. *Analytical Biochemistry* **139**(1): 212-217.
- Mcmillan, G. P. and M. C. M. Perombelon (1995). Purification and characterization of a high pI pectin methyl esterase isoenzyme and its inhibitor from tubers of solanum-tuberosum subsp tuberosum Cv katahdin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46**(5): 413-427.
- Moustacas, A. M., J. Nari, G. Diamantidis, G. Noat, M. Crasnier, M. Borel, J. Ricard. (1986). Electrostatic effects and the dynamics of enzyme-reactions at the surface of plant-cells .2. The role of pectin methyl esterase in the modulation of electrostatic effects in soybean cell-walls. *European Journal of Biochemistry* **155**(1): 191-197.
- Northcote, D. H. (1958). The cell wall of higher plants: Their composition, structure and growth. *biological reviews* **33**: 53-102.

- Pasch, H., A. Pizzi, K. Rode. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. *Polymer* **42**(18): 7531-7539.
- Pressey, R. (1984). Role of pectinesterase in pH-dependent interactions between pea cell-wall polymers. *Plant Physiology* **76**(2): 547-549.
- Rexova-Benkova, L. a. M., O (1976). Pectic enzymes. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. R. S. Tipson, and Horton, D. New York, Academic Press. . **33**: 323-385.
- Rillo, L., D. Castaldo, A. Giovane, L. Servillo, C. Balestrieri, L. Quagliuolo. (1992). Purification and properties of pectin methylesterase from mandarine orange fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**(4): 591-593.
- Siebert, K. J., N. V. Troukhanova, P. Y. Lynn. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**(1): 80-85.
- Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses : A review. *Silpakorn Univ Int J.* **3**: 206-228
- Stead, P. (1998). *Methods in biotechnology. Natural Products Isolation*. S. Glaxo Wellcome Research & Development, Herts, UK, Humana Press. **4**: 165-208
- Thibault, M. A. V. A. a. J. F. (1991). The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. *The chemistry and technology of pectins*. R. H. Walter. San Diego, Academic Press Inc.: 109-118.
- Van Buren, J. P. (1979). The chemistry of texture in fruits and vegetable. *Texture Studies* **10**: 1-8.
- Vilarino, C., J. F. Delgiorgio, R. A. Hours , O. Cascone. (1993). Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. *Food Science and Technology- Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **26**(2): 107-110.
- Wilfred Vermerris, R. N. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer Netherlands.
- Wood, P. J. and I. R. Siddiqui (1971). Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry* **39**(2): 418-&.

Wu, M. C., K. C. Tseng, et al. (2002). Pectinesterase inhibitor in rubbery banana (*Musa sapientum* L.). *Journal of Food Science* **67**(4): 1337-1340.

Zimmerman, R. E. (1978). Rapid assay for pectinesterase activity which can be used as a prescreen for pectinesterase inhibitors. *Analytical Biochemistry* **85**(1): 219-223.

吳祝和 (1994)，果膠質及其在食品的應用，*食品資訊*，**97**: 32-35。

李佳佩 (2001)，愛玉子果膠酯酶性質及愛玉凍品質之研究，國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

林正彥 (1976)，果膠，*食品工業*，**8**(4): 18~22。

林讚標 (1991)，愛玉子專論，*林業叢刊*第 36 號，台北，台灣省林業試驗所編印。

張士耀 (1990)，不同生長期蘿蔔植物果膠酯之純化與理化性質研究，國立台灣大學農業化學所碩士論文。

莊榮輝 (2005)，*酵素化學實驗*，國立台灣大學。

黃永傳, 陳文彬 (1980)，愛玉凍凝膠機制之研究，國立台灣大學農業化學所碩士論文。

楊秀美 (1991)，大豆芽果膠酯酶之性質研究，國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

賴盈璋 (1998)，愛玉子果膠酯酶所催化轉醯基反應與愛玉子瘦果中所存在抑制劑之探討，國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。

賴盈璋 (2008)，愛玉子瘦果殘渣水萃物功能性質之研究，國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

賴麗絨 (1991)，豌豆莢之烹煮特性及其中溫預煮硬化效應有關因素-果膠質與果膠酯酶之研究，國立台灣大學農業化學所碩士論文。

## 附錄一、PE 酵素活性指示劑

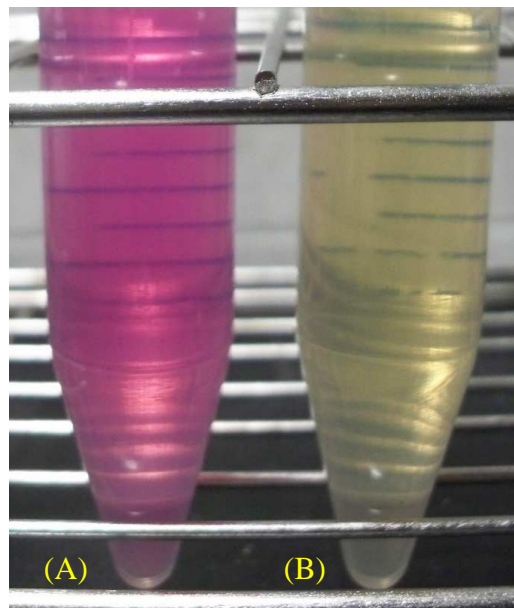


圖 A.1 果膠溶液與(A)具活性與(B)失活之 PE 作用後 PE 酵素活性指示劑顏色變化

Fig A.1 Color changes in pectin solution after treated with active (A) and denatured (B) pectinesterase

附錄二、以 3%NaCl 去除愛玉子水萃液之乳化相

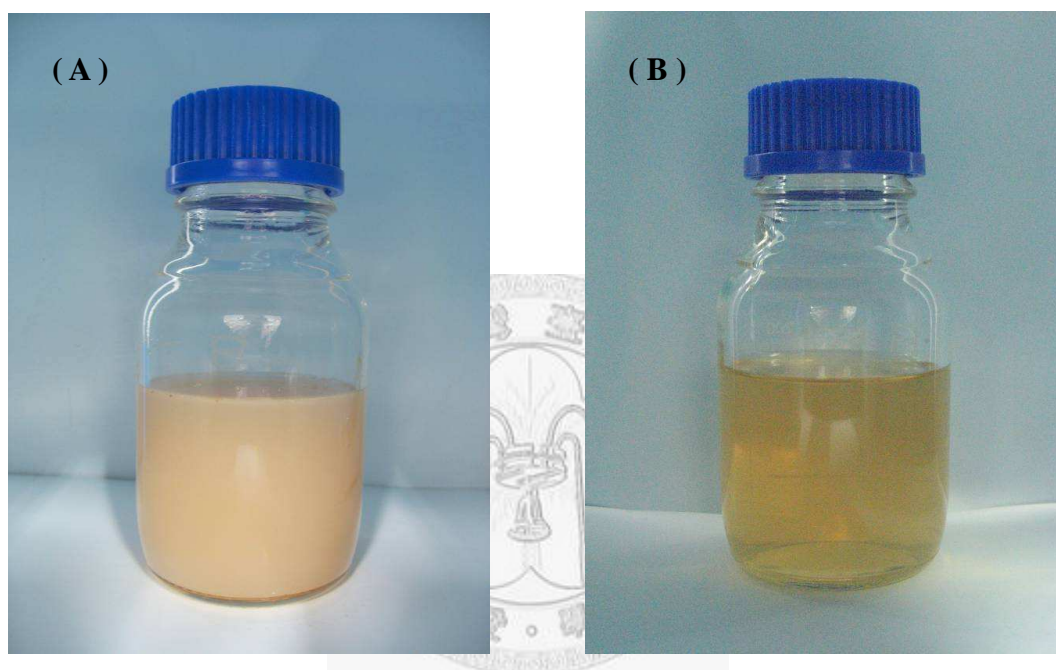


圖 A.2 愛玉子粗萃液加入等體積之 3%NaCl 對乳化狀態之影響:

(A) 靜置前與(B)靜置後

Fig. A.2 Effect on aqueous solution extracted from jelly fig achenes with treatment with equal volume of 3%NaCl. Before (A) and after (B) stillness.



附錄三、酸水解對 90% 丙酮可溶之 PEI 水溶液 (PEI-AS) 之影響

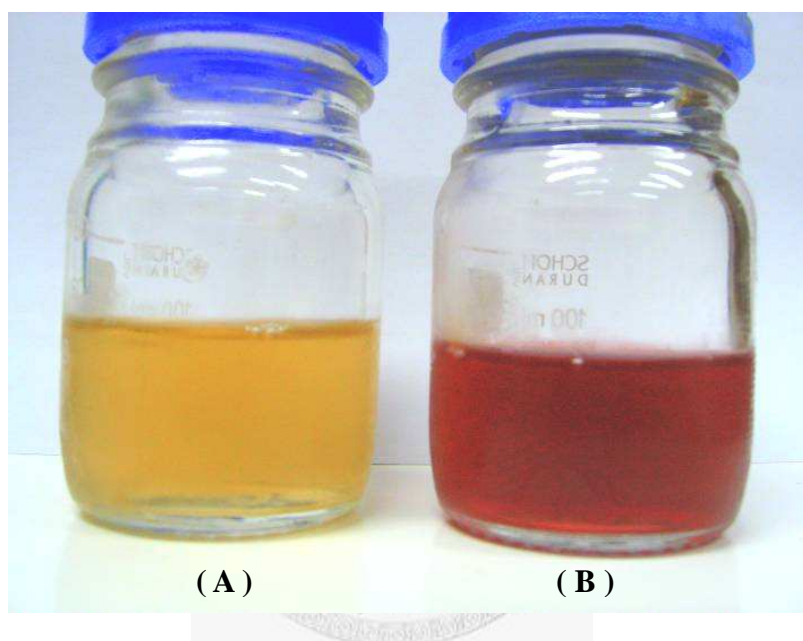


圖 A.3 PEI-AS (A) 與其酸水解後 (B) 之外觀變化

Fig A.3 Appearance changes of PEI-AS before (A) and after (B) acidic hydrolysis.