

試驗報告第428號  
BULLETIN No. 428

# 愛玉瘦果中果膠酯酶之抽取條件及 活性測定方法之釐定

黃永傳 劉哲政

Method of extraction and assay for pectinesterase in  
achenes of jelly fig (*Ficus awkeotsang* MAKINO)

by

Yung-Chuan Huang Chih-Cheng Liu

臺灣省林業試驗所

臺灣 臺北

中華民國七十三年八月

TAIWAN FORESTRY RESEARCH INSTITUTE

Taipei, Taiwan, Republic of China

Aug. 1984



# 愛玉瘦果中果膠酯酶之抽取條件及 活性測定方法之釐定

黃永傳<sup>1)</sup> 劉哲政<sup>2)</sup>

## 摘 要

為挽救臺灣固有植物「愛玉」及由其瘦果製成之特殊食品「愛玉凍」消滅之厄運，實有對野生愛玉進行選育並加強栽培之必要。當吾人進行選種、栽培及各種有關研究之前，筆者首先釐定出愛玉瘦果中果膠酯酶活性測定之標準方法如後。

(1)粗酵素液之抽取：試料愛玉瘦果與20倍量之5%氯化鈉溶液混合，於30°C置24小時使果膠酯酶洗出，過濾所得之粗酵素液置入5°C貯存。宜於1天至4天之內供測其活性。

(2)活性之測定：取粗酵素液之一定量及基質果膠液之充分量，均加BTB為指示劑預先以0.1N氫氧化鈉溶液中和。置基質液在保熱電磁攪拌器上保溫於30°C，並適加氯化鈉以保持作用液中之氯化鈉含量於0.5%。加入酵素液令其作用，並隨時不斷的滴入0.01N NaOH標準液以維持作用液之pH於6.8~7.0之BTB呈色。由一級反應每分鐘所消耗之氫氧化鈉之量，計算果膠酯酶之活性。

1meq/min = 1 PEu (pectinesterase unit) = 1000 milli PEu

## 一、前 言

在臺灣有一種特殊而經濟可口，且頗具鄉土風味的半飲料食品——愛玉冰，它是一種淡黃色之軟凝膠體狀之「愛玉凍」切片，放在不太甜的冰水中供吃者。愛玉凍<sup>(1, 2)</sup> (fig jelly; Awkeo-jelly) 係以臺灣特殊植物——愛玉<sup>(3)</sup> (學名：Ficus awkeotsang MAKINO, 英名：Awkeotsang; jelly fig, 日名：あいぎよくしいたび) 之陽乾瘦果 (sun-dried achene)，俗稱愛玉子，放入布袋在60~100倍水中揉搓10分鐘左右，所得之粘性液靜置後自行凝膠者。惟愛玉本係野生，且其本性要攀緣其他大樹上才見開花結果，隨森林之常年

砍伐，野生愛玉愈來愈少，愈要入深山才可找到，尤其爬上懸崖高樹上採果，稍有不慎即有危害生命之虞。產果母株日漸減少的今日，若非人工栽培則難望成為經濟植物，且本省之此種特殊食品愛玉凍亦將在吾人之社會中消失，故亟需選種、育種、栽培及推廣<sup>(1, 3)</sup>。選種、育種之目標應為：(一)高產量，即單位面積之愛玉子收穫率高。(二)同一重量之愛玉子可揉出更多之愛玉凍，即製凍率高，亦即果膠酯酶之活性高。(三)最好育出不爬樹之新品種，如無花果之直立性者，即可除去攀緣其他樹木或支架之煩而在栽培管理及果實採收上方便甚多。

有鑑於此，筆者等自民國72年起分別從選種、採收成熟度、瘦果之乾燥及貯藏等進行一連串之試

1) 國立臺灣大學園藝學系教授 Professor, Dept. of Horticulture, National Taiwan University

2) 臺灣省林業試驗所育林系助理 Assistant, Division of silviculture, Taiwan Forestry Research Institute

驗。然此等試驗，每每要牽涉到果膠酯酶活性之測定，而此酵素活性之測定時，自酵素之抽取一直到其與基質之作用，幾個步驟中所採用之各種條件，稍有偏差，則對活性之測定值往往會造成很大之差異。當我們將要經常進行測定而用以比較之前，評估方法之釐定成爲第一步必做之工作。本研究對愛玉果膠酯酶之抽取及作用之各種條件，包括酵素抽取時之溫度、時間、抽取混合物中氯化鈉之濃度；作用液中氯化鈉之含量、保持之溫度及 pH 值等等，重新作進一步之探討估計，找出最方便並可得最可靠且穩定的測定值之方法。

本研究承育林系胡大維主任助言甚多，活性測定由王翠霞、侯純蓉兩位小姐協助，於此致謝。

## 二、愛玉果膠酯酶有關的前人報告概略

### (1) 愛玉凍凝膠之原理

黃氏等人<sup>(2)</sup>以多年果膠方面之研究基礎，已調查出其凝膠機構之概略，其要點爲：愛玉子在水中搓揉時，由其溶出之高甲氧性果膠(high methoxyl

pectin 簡稱 HMP)受愛玉子所含之一種特殊的果膠酯酶(pectinesterase 簡稱 PE)作用，行脫甲基變成低甲氧性果膠(low methoxyl pectin 簡稱 LMP)，再與水中之雙價陽離子，如  $Ca^{2+}$  交聯(cross linking)成爲更巨大分子之低甲氧性果膠之鈣鹽，於是不需加糖或酸即可凝膠。愛玉凍之 pH 值在 4.0 左右，果膠含量僅爲 0.1%。

### (2) 愛玉果膠酯酶作用之 pH 範圍

酵素之反應<sup>(4)</sup>受 pH 值之影響至巨，而由不同材料所抽出之果膠酯酶，都具有適合其作用之 pH 範圍。一般而言，由高等植物抽出之果膠酯酶其最適反應 pH 值爲 7.0~7.5，而由微生物抽出者其最適反應 pH 範圍爲 4.5~5.0。高等植物中，如番茄、柑桔等均富含果膠及果膠酯酶，但何以不能如愛玉子般地有凝膠現象產生呢？黃氏等人<sup>(2)</sup>曾以愛玉子及番茄果肉分別準備果膠酯酶之粗酵素液，在各種不同 pH 下測其活性，經重複多次實驗結果示如圖 1：

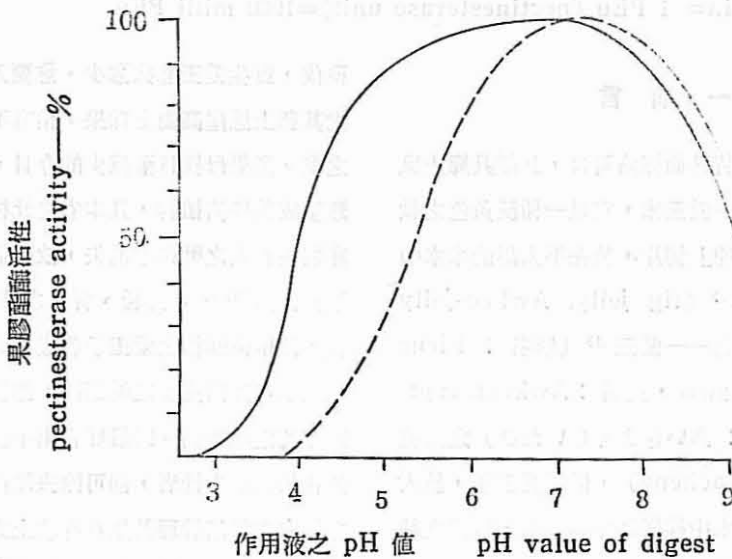


圖 1 愛玉子與番茄果肉兩者果膠酯酶活性隨 pH 之變化

(最適 pH 之活性爲 100%，——愛玉子；---，番茄)

Fig 1. Effect of pH on the activity of pectinesterase from achenes of jelly fig and tomato pulp

(Activity at optimum pH as 100%, ——jelly fig; ---tomato)

由圖 1 知，愛玉果膠酯酶作用之 pH 範圍在 3 以上，最適 pH 在 7 附近。若以此最適 pH 時之活性為 100%，則 pH 4.5 時已有 75%，pH 5 時則有 90% 之高；反觀番茄果膠酯酶之最適 pH 在 7.5，與一般高等植物之情形相同，而在 pH 大於 4 時始具有活性，pH 5 時的活性為最適 pH 時之 30%，pH 6 時也不過是最高值之 75% 而已。此由可知，愛玉果膠酯酶，於較低 pH 時仍能有較多之作用，而由於果膠酯酶之作用，漸次將基質液變為更酸性，即 pH 更降低時仍能繼續反應；番茄果膠酯酶則不然，會因 pH 之下降而很快地失去作用。

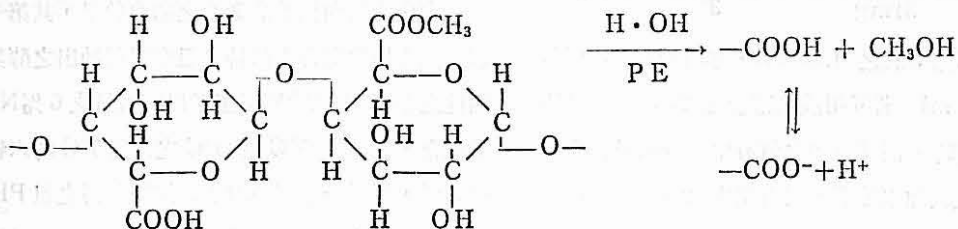
愛玉子預先殺青，入布袋內而與 60 倍自來水一起揉搓時，所得粘液之 pH 約為 5.3，但普通未經殺青的愛玉子所採出之粘液經果膠酯酶作用，pH 漸次降低，至開始凝膠時之 pH 約在 4.5，最後安定之 pH 約為 4.0，由圖 1 知此時尚有 50% 以上之活性。一方面番茄果肉漿本來之 pH 約為 4.0~4.2，由圖 1 可知，在此種 pH 之下，番茄之果膠酯酶幾近無法發揮活性之作用，且因作用而 pH 再降低，即達

無作用能力之範圍。

由兩者的此等差異可看出愛玉果膠酯酶最特殊之處，也是愛玉凍無需加糖、酸即可自行凝凍，而番茄果肉漿不能自行成凍之重要原因之一。

### (3) 果膠酯酶活性測定之原理<sup>(5,6)</sup>

愛玉瘦果中之果膠酯酶以氯化鈉溶液洗出 (elute out)，過濾得 PE 之粗酵素液。酵素液與基質果膠液均預先以氫氧化鈉溶液中和，而將一定量之酵素液加入充分量之基質液中，使基質果膠中之部份甲酯基 (-COOCH<sub>3</sub> carbomethoxyl group) 受 PE 之促進作用被加水分解成爲羧基 (-COOH) 及甲醇 (CH<sub>3</sub>OH)，此羧基在溶液中解離產生氫離子 (H<sup>+</sup>) 之結果，隨 PE 之作用，作用液會往酸性方向偏移。此時吾人可隨時滴下稀氫氧化鈉溶液去中和所產生之 H<sup>+</sup>，並保持作用液之 pH 於一定之範圍。由每分鐘中和所需氫氧化鈉之量可算出每分鐘由 PE 作用所產生之 H<sup>+</sup> 量，亦則是每分鐘 PE 可促進多少 COOCH<sub>3</sub> 水解也。



### (4) 果膠酯酶活性測定之方法

黃氏等<sup>(2)</sup>研究愛玉凍凝膠機構時，曾詳查前人<sup>(6-12)</sup>對果膠酯酶活性測定之方法，並探討其作用條件，採用如下列之方法，如今看來雖不太理想但仍不失爲此次試驗研究之基礎。茲將其<sup>(2)</sup>方法記載如下：

1. 酵素液：愛玉子以 20 倍量之 6% 氯化鈉溶液攪拌混合，於 5°C 靜置一天，使果膠酯酶儘量洗出，然後過濾得果膠酯酶之粗酵素液，存於 5°C 備用。

2. 基質果膠液：以 Sigma 牌果膠粉之 0.1% 溶液貯存於 5°C 備用。

3. 活性之測定：基質果膠液 200ml 及酵素液均先以溴麝香草酚藍 (bromothymol blue, 簡稱 BTB) 爲指示劑，用 0.1N 氫氧化鈉溶液預先中和，對基質加入適量氯化鈉，調整氯化鈉量達 0.3%，加熱至 30°C，置於附有保熱板之電磁攪拌器 (hot plate magnetic stirrer) 上，倒入預備好之酵素液，即開始計時，不斷滴下 0.05N 氫氧化鈉溶液使作用液之 pH 值維持在 7.2~7.3，並保持 30°C。每 30 秒鐘讀出所消耗之 0.05N 氫氧化鈉溶液之 ml 數，由一級反應 (first order reaction) 每分鐘之氫氧化鈉溶液之消耗量計算果膠酯

酶活性如下式：

$$1 \text{ meq/min} = 1\text{PEu}(\text{pectinesterase unit}) \\ = 1000 \text{ milli PEu}$$

### 三、材料及方法

#### (1) 愛玉子

本試驗所用之瘦果係民國71—72年在奮起湖等地區所採，持回之聚合果 (Sycone) 對半剖開，挖下瘦果陰乾 10 天，用塑膠袋密封貯置於冷藏庫 5°C 溫度下，於每批試驗時，再分別取樣放入乾燥器中仍存於 5°C 備用。

#### (2) 基質用果膠粉之性質

以美國 Sigma 牌 (No. P-9135, grade 1) 柑桔果膠粉，經筆者等人分析結果該果膠粉含果膠 (Ca-PGA) <sup>(5, 13)</sup> 80.0%，而果膠中甲氧基含量 (OCH<sub>3</sub>/Ca-PGA) <sup>(5, 14)</sup> 為 11.9%，則該果膠粉之 0.1% 溶液 100ml 中甲氧基 (-OCH<sub>3</sub>) 有 0.307 meq

$$\frac{100\text{mg} \times 0.8 \times 0.119}{31\text{mg}} = \frac{9.52}{31} = 0.307 \text{ meq}$$

相當於 1N 標準液之 0.307ml，亦即相當於 0.01N 液之 30.7 ml。若採用該果膠粉之 0.2% 溶液 150 ml 為基質時，設基質中之所有甲氧基由果膠酶作用而完全被加水分解，因而產生之酸性若要滴定中和之，則需 0.01N NaOH 92 ml。而酵素活性之測定 <sup>(3, 4, 7)</sup>，普通只取其一級反應之範圍，用以比較。即採用全作用量之前  $\frac{1}{4}$  (如 92 ml  $\times \frac{1}{4}$  = 23 ml) 以內之直線作用部分來計算活性，超過之漸次轉弱部分不應採用。

#### (3) pH 值之測定

以 pH 測定儀 (Corning model 12 research pH meter) 測之。

#### (4) 實驗進行之步驟

本研究先對酵素液抽取時之各種條件，如抽取時的抽取液之溫度、抽取時間以及抽取液中氯化鈉

之濃度等條件下手，調查此等條件對所抽得粗酵素液之活性有如何的影響。然後調查作用時之各種條件，如作用液中氯化鈉之含量、作用液保持之溫度及 pH 值等條件對活性測定值之影響。最後再調查經抽出之粗酵素液於 5°C 隨保存時間的長短，對活性之影響情形。

#### (5) 實驗結果的表示及比較之方法

各項試驗除用於比較的條件之外，其他一切條件均力求一致。同樣性質之試驗均重複舉行二次以上以求其信賴性。由一定量之酵素液，對充分量之基質果膠液，取其一級反應之期間內中和其每分鐘產生之酸性所需之 0.01N NaOH 溶液之 ml 數，可直接用以比較之外，也可用以計算 PE 活性來比較。或者由每次試驗之結果繪出曲線，便可一目了然，或由曲線之最高點為指標 (index)，為 100%，用以計算各不同處理之效果比率以資討論。

### 四、結果及討論

#### (1) 抽取溫度

本研究特別注重酵素液之抽取效果，其第一項即為探求抽取混合物保持之溫度對所抽出之酵素液活性之影響。本試驗將愛玉子以 20 倍量之 6% NaCl 液混合，並分為 5°C 至 30°C 之每隔 5°C 的六種溫度處理，靜置一整天即 24 小時過濾所得之粗 PE 液，再置入 5°C 待 1 至 2 天，用以比較活性。活性測定時，取酵素液 4.0ml，基質果膠液 0.1% 150ml，均採用 BTB 為指示劑預先以 0.1N NaOH 溶液中中和。基質液置於加熱電磁攪拌器上保持 30°C，將酵素液倒入基質液中，令其作用並不斷滴入 0.01N NaOH 溶液保持 pH 7.2—7.3 之 BTB 青綠色。此時作用液之全量為 170~190 ml 之間，而作用液中之 NaCl 調為 0.3%。每一分鐘讀出 0.01N NaOH 溶液所消耗之 ml 數，計算每 g 瘦果所抽出之酵素液 (20 ml) 所表現之活性列入表 1：

表 1 抽取溫度與果膠酯酶活性之關係

Table 1: Relation between pectinesterase activity and extracting temperature

抽取溫度 extracting temperature, °C	5	10	15	20	25	30
活性 activity, milli PEu/g achene.	11.1	18.3	25.2	31.8	38.4	45.6
活性之比率 rate of activity, %	24	40	55	70	84	100

由表 1 知，抽取溫度與活性幾成直線之正比。於 5°C 抽取者之活性，只有 30°C 抽取者之 24% 而已，抽取溫度每改變 5°C，活性將有 15% 之差異出現，則每相差 1°C 即有 3% 之活性變動，實在馬虎不得。本試驗為力求劃一穩定之結果，以便各不同材料互相要隔時比較時之操作方便起見，筆者建議仍採用 30°C 為保持抽取混合物之溫度。

(2) 抽取時間

抽取條件之第二項是抽取的時間之長短。為調查變換抽取之時間對所抽出的酵素液之活性有何影響，本試驗照(1)之方法，惟抽取混合物於 30°C 恆溫槽內所保持之時間改變為由 2 小時至 48 小時不等

之七種處理。所得各種酵素液之活性及酸含量之比率示如圖 2：

由圖 2 之酵素液中之酸含量比率曲線知，瘦果被浸於氯化鈉溶液時，以酸為代表之可溶性固形物，隨浸漬時間之經過，2 小時已溶出應溶出量之半數，16 小時已有 93% 溶出，24 小時已達 98% 之譜，而 36 小時以後則完全溶出。反觀活性比率曲線，果膠酯酶被洗出之速度較可溶性固形物被溶出之速度慢了許多，至 16 小時祇不過洗出全量之 72% 而已，以後洗出之速度更慢，經 24 小時才達 89%，至 36 小時達 97%，48 小時才算完全洗出。此則表示在劃一條件下抽取酵素液時，混合物在 30°C 之溫度保持

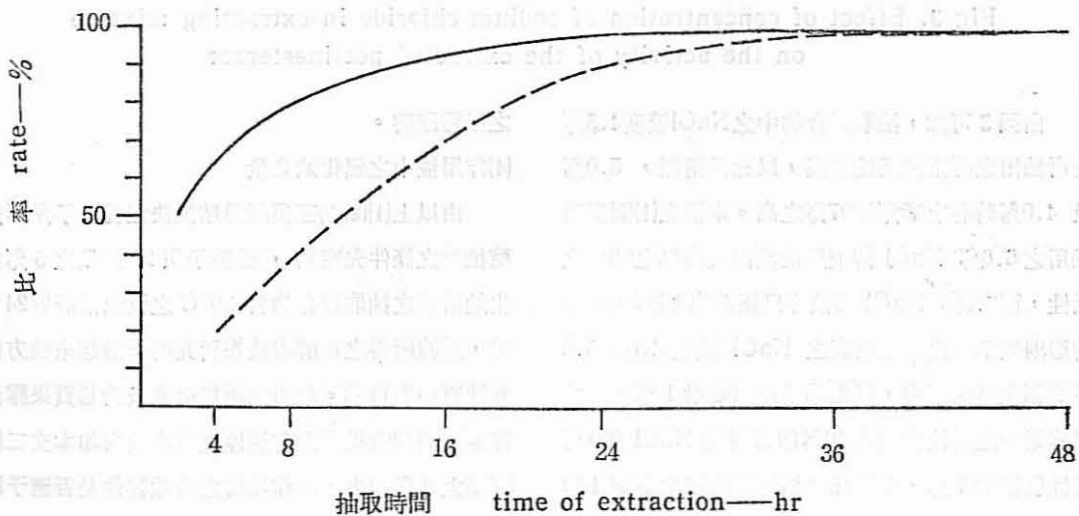


圖 2. 酵素液之酸含量及果膠酯酶活性依抽取時間之變化

Fig 2. Variation of acid content in enzyme solution and activity of pectinesterase by extracting time

(—) 酸含量之比率 rate of acid content  
 (---) 活性之比率 rate of activity



之抽取時間，對於酵素液之活性有相當大的差異出現，應加注意。

在 30°C 溫度條件下，愛玉子之果膠酯酶在氯化鈉溶液中雖要浸 48 小時才能完全被洗出，而浸 24 小時者才被洗出其 89%，但由實驗操作之方便和預防變質起見，筆者建議抽取時間一律定為 24 小時較為妥當。即實地操作要嚴守 24 小時，到達預定時間

才可過濾，也一定要及時過濾。

### (3) 抽取混合物中之氯化鈉之濃度

植物細胞內之果膠酯酶可以氯化鈉溶液洗出<sup>(4)</sup>。茲將愛玉子果以 20 倍量之不同濃度氯化鈉溶液於 30°C 浸 24 小時，過濾所得之粗酵素液之活性，示如圖 3：

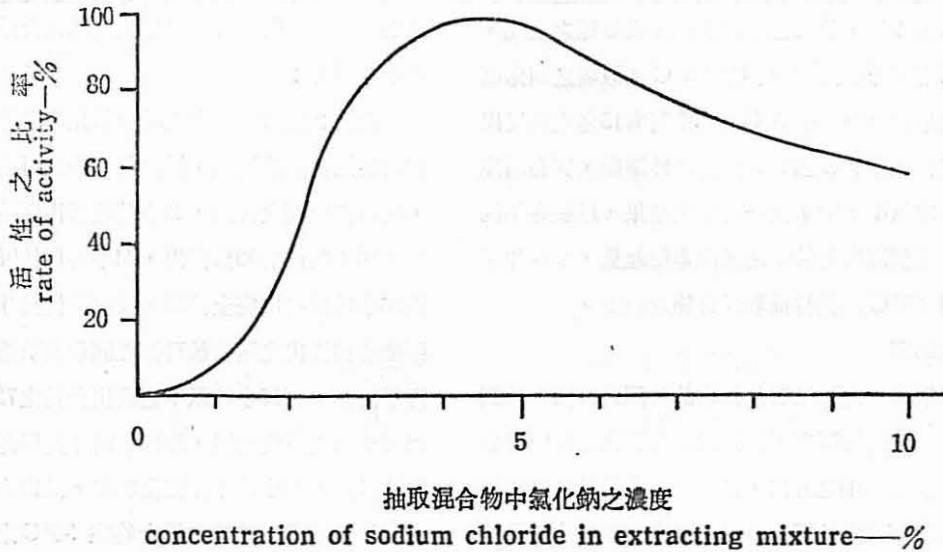


圖 3. 抽取混合物中氯化鈉之濃度對所抽果膠酯酶活性之影響

Fig 3. Effect of concentration of sodium chloride in extracting mixture on the activity of the extracted pectinesterase

由圖 3 可知，抽取混合物中之 NaCl 濃度 4.5% 時所抽出之酵素液活性最高，以此為指標，5.0% 及 4.0% 時各有 98% 及 97% 之高。本節之(1)(2)項所採用之 6.0% NaCl 溶液只能洗出最高點之 88% 之活性，而 3.0% NaCl 溶液亦只能洗出 85%。此等情形則表示洗出效果最高之 NaCl 濃度 4.0 至 5.0 % 範圍之外面兩邊，氯化鈉濃度每變動 1%，所抽出酵素液之活性會相差 10% 即每變動 NaCl 0.1% 活性就相差 1%，至於比 3% 更低濃度之 NaCl 溶液洗出之效果會直瀉下降，需特別注意。

由實驗結果表示 4.5% NaCl 溶液雖有最高之洗出效果，但由操作及計算之方便起見，筆者推薦採用有 98% 效果之 5% NaCl 溶液用以抽取愛玉子

之果膠酯酶。

### (4) 作用液中之氯化鈉含量

由以上(1)(2)(3)三項所得結論決定愛玉子果膠酯酶抽取之條件先定為，愛玉子與 20 倍量之 5% 氯化鈉溶液之抽取混合物於 30°C 之恆溫槽靜置 24 小時，過濾所得之粗酵素液在研究時準備起來較方便且性質穩定可靠。利用此種粗酵素液對基質果膠作用，而測定果膠酯酶活性之方法前有如本文二節(4)項之 3 所記者，但作用時之各種條件是否應予調整？本試驗首先將作用液中之氯化鈉改變為 0.1~1.5% 之 10 種不同含量，以調查其對活性測定值之影響，其結果整理如表 2。惟作用液中之氯化鈉含量係作用液總量內之氯化鈉所佔有之重量百分比，

表 2 作用液中氯化鈉含量對果膠酯酶活性測定值之影響  
Table 2. Effect of sodium chloride content in the digest to the measured activity of pectinesterase

作用液中氯化鈉之含量 content of sodium chloride in the digest, %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.2	1.5
活性之比率 rate of activity, %	59	76	88	95	99	100	99	98	94	79

而作用液總量為酵素液、基質液、氯化鈉及所有滴下氫氧化鈉溶液之總合。

由表 2 可知，作用液中之氯化鈉含量調為 0.5~1.0% 時果膠酯酶作用之效果最高而穩定。0.4% 以下或 1.2% 以上的含量對酵素作用之效果有漸次降低之影響，則 0.3% 者活性已降為最高者之 88%，0.1% 者更降低到只有 59%，一方面氯化鈉含量增高至 1.5% 者亦降為 79%。再以氯化鈉含量 0.5% 者為例，含量若往下降 0.1% 活性比率就會降下 4%。然由 0.3% 之含量降為 0.2% 時情形更厲害，此時降低含量 0.1% 會影響活性測值達 12% 之多。所以作用液中 NaCl 之含量咸需調節保持於一定，且不許隨便變更。

由本試驗之結果筆者推薦作用液中之氯化鈉含量採用 0.5% 為原則，而若因試料愛玉子之果膠酯

酶活性太低致使酵素液用量非增加不可之情況下，NaCl 含量寧可酌量增加至 1.0%，反之，活性太強時也不要隨便減少酵素液用量，使作用液中之氯化鈉含量低於 0.45%。

(5) 作用液之溫度

酵素之作用乃為基質之某種化學變化之觸媒，而酵素自己類似蛋白質，遇不適當之高溫會引起不可逆行之變化，因而活性會減少或消失。黃氏等人<sup>(9)</sup>，曾以番茄果膠酯酶對果膠之作用液在不同溫度下作用之結果已知，超過 60°C 者在數十分鐘後會不活性化，超過 75°C 者則瞬間發生不活性化，作用液保持 40°C 以下才可長時間保全 PE 之活性不變。本試驗將作用液保持於 15~35°C 之五種不同溫度，作用之結果列表 3：

表 3 果膠酯酶活性依作用溫度之變化  
Table 3. Variation of pectinesterase activity with digesting temperature

作用溫度 digesting temperature, °C	15	20	25	30	35
活性比率 rate of activity, %	50	65	81	100	122

由表 3 知活性測定值隨作用溫度之提高而升高，每提高 5°C 活性會有約 15~20% 之上升。作用溫度由 30°C 上升或下降 1°C 時，活性測值有 4% 之遞升或漸降，所以在做實驗時，作用液之溫度須力求保持一定不變，千萬馬虎不得。

在 30°C 之作用溫度，測定值已相當高，而此

種溫度較易保持，因其與室溫相差不多。經驗告訴我們，室溫低於 20°C 而作用溫度高於 35°C 時偶而會由作用液發生水蒸氣凝於滴定管表面或測定人員之眼鏡，實有干擾實驗操作之不便，因此筆者推薦作用液保持於 30°C。

(6) 作用液之 pH 值



愛玉凍凝膠之原理，其要點為：愛玉瘦果果膠酯酶之作用 pH 範圍特殊，比一般高等植物者偏酸性之故。本文之圖 1 表示愛玉 PE 之最適 pH 在 7 附近，pH 低於 3 之強酸性下無法作用，pH 5 時已有最高活性之 90% 之作用效果。而在鹼性方面活性逐見被限制，在 pH 8 時已降為 90%，pH 9 時僅剩最高點之 55% 而已。

以前黃氏等採用 BTB 為 PE 活性測定時之指示劑，理由為 B.T.B 在 pH 7.0 時呈綠色，由鹼性方面 pH 6.0 之黃色至鹼性方面之 pH 8.0 之

深藍色，變色顯著清楚可靠之故。尤以 pH 7.2~7.3 略相當於一般高等植物 PE 之最適 pH，同時其呈色為青綠色，看起來很舒服，每每長時間實驗都有稱心愉快之感覺。

測定 PE 活性的作用液之 pH 值已會影響其測值，究要維持於多少？實有重新探討之必要。本試驗配用 pH meter 將作用液之 pH 值較準確的保持於 6.0—8.0 之 5 種處理，各令愛玉 PE 液對基質果膠液之充分量作用，並將其結果整理繪成圖 4：

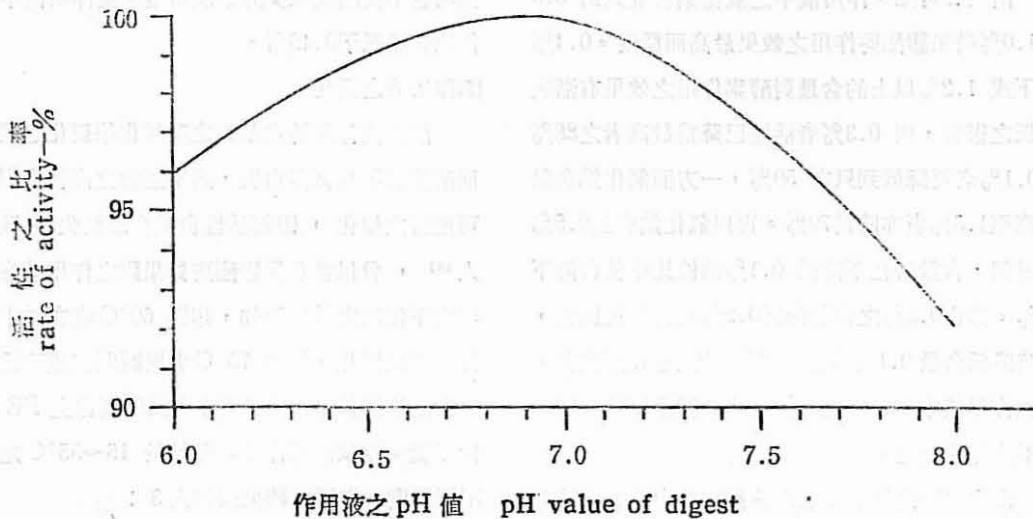


圖 4. 愛玉瘦果果膠酯酶活性依作用液 pH 值之變化

Fig 4. Effect of pH value of digest on the pectinesterase activity of jelly fig

由圖 4 可知，愛玉果膠酯酶作用之最適 pH 在 6.8~7.0 之間。以此之最高作用量為指標，在 pH 6.5 及 7.2 時均為 99%，而在 pH 6.0 及 7.6 時均為 96%。筆者認為作用液應保持於 pH 6.8~7.0 較為適當。實地操作時保持於 pH 7.0 之 BTB 綠色，而有 NaOH 過多之 pH 7.2 之青綠色出現時應該停止滴下 NaOH 溶液，待作用液漸漸恢復酸性至草黃色則 pH 6.5~6.6 附近，再行滴下 0.01N NaOH 溶液去中和就可。

(7) 粗酵素液之保存期限

以前研究番茄<sup>(6)</sup>、柑桔<sup>(7)</sup>時抽取所得之粗酵

素液入 5°C 保存 1—2 星期均未發現任何變敗，而愛玉之粗酵素液本身因酸性不強，雖置入 5°C 保存時間一久仍有變敗之虞。茲按照 (1)~(6) 所釐定出之方法，將 30°C 靜置 24 小時過濾所得之粗酵素液再置入 5°C 由數小時至 14 天之期間試測其活性變化情形，結果列如圖 5：

由圖 5 知，存於 5°C 之粗酵素液半天後活性不知何故會上昇，而一天以後至 2 天之間活性最強。4 天以內尚可保持最高值之 99%，再延後者隨貯存日數之增加，活性之轉弱愈來愈快。7 天者降為 96%，10 天為 91%，14 天後已降為 80%。因此筆者建

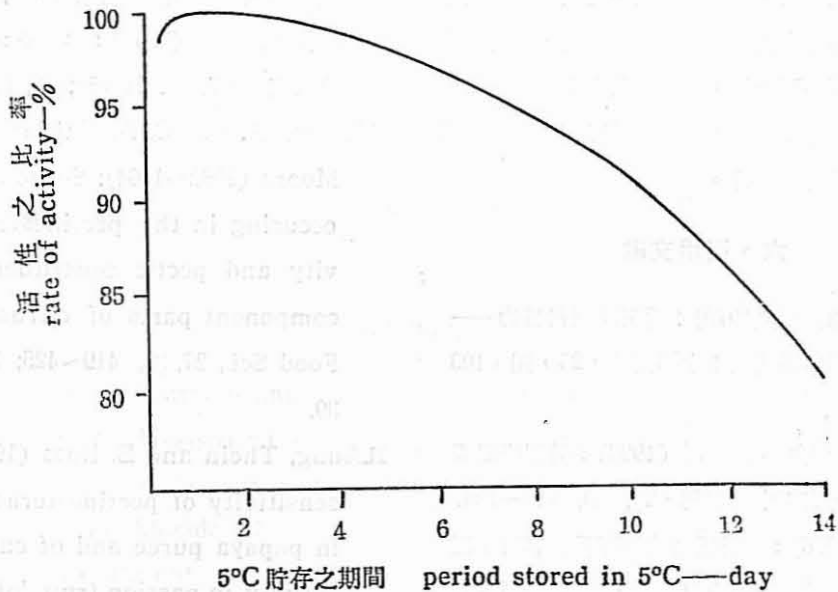


圖 5. 愛玉粗酵素液隨貯存期間活性變化之情形

Fig 5. Variation of pectinesterase activity of jelly fig with stored period of crude enzyme solution

識所準備之酵素液，應於 1 天至 4 天內測其活性。超過 4 天以後才使用之酵素液，可參照圖 5 來計算活性。粗酵素液雖入 5°C 貯存但諸如前述愛玉不加柑桔、番茄之有明顯之酸性，若想保存 10 天以上，可加一點檸檬酸以增加酵素液之酸性。

### 五、結 論

酵素之活性依其來源植物之種類、部位、成熟度，當然有所不同外，酵素抽取之條件、方法對所得酵素之活性具有很大之影響。然酵素活性測定時所採用之各種條件，對測出之活性亦有莫大之影響。

在臺灣野生植物愛玉之選種、育種之始，吾人要大規模的對不同母株、不同採收期、不同乾燥法所得之愛玉瘦果將評估其取捨價值之際，瘦果中果膠酯酶活性之測定勢將或為必行之工作。因此筆者為此目的特將愛玉子（瘦果）之果膠酯酶活性評估之各種條件：包括抽取時之各種條件以及活性測定時之各種條件，經一年來之調查探討結果，鑑定出一種最簡便而測值相當高且穩定之落實方法，如下

記(1)(2)。

(1)粗酵素液之抽取：試料愛玉子（瘦果）放入 20 倍量之 5% 氯化鈉溶液，構成之抽取混合物於 30°C 之恆溫水槽經置 24 小時整即行過濾，所得之粗酵素液存入 5°C 電冰箱內保存。該粗酵素液 20ml 相當於瘦果 1g，宜於 1 天至 4 天之內測其活性。

(2)活性之測定：取粗酵素液之一定量及基質果膠液之充分量，均採用 BTB 為指示劑，以 0.1N NaOH 溶液預先中和。將基質果膠液置於保熱電磁攪拌器上保溫於 30°C，並適加氯化鈉以保持作用液中之氯化鈉含量於 0.5%。對如此準備好之基質液加入酵素液令其作用，並隨時不斷的由上面滴下 0.01N NaOH 溶液以維持作用液之 pH 值於 6.8~7.0 之 BTB 呈色。每分鐘讀 0.01N NaOH 溶液之累積消耗數一次，取其一級反應每分鐘所消耗之 NaOH 之量來計算果膠酯酶之活性。

由於實地之設備或條件之不能完全控制如上述

條件時，所測之值可參照本報告之各種圖表所示之情況行適當之修正，以求適宜劃一之標準值以便比較。但不可心存有任何因為有辦法修正，而使測試活性之各種條件不一致，對測值將產生極大影響，則非本試驗所能予修正，因此須嚴守本結論之(1)(2)所記載之條件方法執行。

## 六、引用文獻

1. 黃永傳、陳文彬 (1979)：愛玉凍原料植物——愛玉之回顧與前瞻；中國園藝，25，(4)，103~111.
2. 黃永傳、陳文彬、邵雲屏 (1980)：愛玉凍凝膠機構之研究；中國園藝，26，(4)，117~126.
3. 胡大維 (1976)：森林副產物的開發和利用；經濟部林業發展聯繫小組叢書，第二號，4~6.
4. Sumner, J. B. and O. F. Somers (1953): Chemistry and Method of Enzymes; 3rd. ed.
5. 黃永傳 (1968)：果膠之性質及其定量法；中國農業化學會誌，6，(3)、(4)，A15~A17.
6. Kertesz, Z. I. (1951): The Pectic Substances.
7. 陳碧雲 (1969)：桶柑果實各部位中總果膠含量及果膠酯酶活性隨成熟季節之變化；國立台灣大學農學院園藝研究所碩士論文，民國58年6月。
8. 黃永傳、杜榮茂 (1967)：pH、溫度或加食鹽對於番茄 pectinesterase 活性之影響；國立台灣大學農學院研究報告，9，(1)，86~95.
9. 三浦洋、久保進 (1960)：ペクチンについて；食品工業，3，(6)，51~57；(7)，52~59.
10. Roose, A. H., C. D. Atkins and E. L. Moore (1962~1964): Seasonal changes occurring in the pectinesterase activity and pectic constituents of the component parts of citrus fruits; J. Food Sci., 27, (5), 419~425; 29, (1), 34~39.
11. Aung, Thein and E. Ross (1965): Heat sensitivity of pectinesterase activity in papaya puree and of catalase-like activity in passion fruit juice; J. Food Sci, 30, (1), 144~147.
12. Lee, Y.S. and R.C. Wiley (1970): Measurement and partial characterization of pectinesterase in apple fruits; J. Amer. Soc. Hort. Sci., 95, (4), 465~468.
13. 黃永傳 (1965)：配位滴定法在果膠酸鈣定量上之應用；化學，民國54年，第一、二期，6~11.
14. 黃永傳、陳成基、黃美忠 (1965)：番茄果膠甲氧基含量之研究；台大農學院研究報告，八卷，二期，208~215.



# Method of extraction and assay for pectinesterase in achenes of jelly fig (*Ficus awkeotsang* MAKINO)

Yung-Chuan Huang    Chih-Cheng Liu

## summary

A method of extraction and assay for pectinesterase in achenes of jelly fig (*Ficus Awkeotsang* MAKINO) were investigated, and proposed as follows:

- (1) Preparation of crude enzyme solution; Put sample achenes into twenty times of 5% sodium chloride solution. Keep this extracting mixture at 30°C for just 24 hours to elute out pectinesterase and is then filtered. Store the obtained crude enzyme solution in 5°C, and use it for assay within the period from one to four days.
- (2) Assay; Employ bromothymol blue as indicator, and each of enzyme solution and substrate solution are periously neutralized with 0.1N NaOH solution. Put the substrate solution on hot plate magnetic stirrer to keep at 30°C, and add adequate NaCl to adjust the digest contains 0.5% of NaCl. Then, add the enzyme solution to begin digestion, and contineously titrated with 0.01N NaOH solution to maintain the colour of the digest on pH 6.8~7.0. From consumed amount of alkali while the first order reaction, the activity of pectinesterase may be calculated as follow:

$$1\text{meq}/\text{min}=1 \text{PEu (pectinesterase unit)}=1000\text{milli PEu}$$