生物催化剂脱除食品中 SO_2 的初探

王向丽[1]，黄国平[2]，温其标[1]

（1. 华南理工大学轻工与食品学院，广州 510640；
2. 广东食品药品职业学院食品科学系，广州 510520）

摘要：主要研究从菠菜中提取叶绿体，并将其用于亚硫酸盐的脱除实验。实验中采用两步差速离心方法提取叶绿体，获得的叶绿体提取率、得率分别为 19.4%和 5.7%. 利用所提叶绿体催化氧化 $NaHSO_3$ 溶液，经单因素实验分析，叶绿体使用液用量为 0.1 g/L，pH8.0，反应 2 h，最终 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的清除率达到了 95.1%；光照和均匀振荡均能促进 $NaHSO_3$ 中 SO_3^{2-} 的氧化。

关键词：食品生物化学；生物催化剂；叶绿体；亚硫酸盐；脱除
中图分类号：TS619.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2009)08-1743-5

Primary study of sulfur dioxide residue elimination from food by a biocatalyst

WANG Xiangli[1], HUANG Guoping[2], WEN Qibiao[1]

(1. *College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou* 510640, *China*;
2. *Food Science Department, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou* 510520, *China*)

Abstract: Chloroplast separated from spinach in this study was applied to remove sulfite from sodium bisulfate. Two-step centrifugation method for extracting chloroplast from spinach was used. The extraction rate and yield reached 19.4% and 5.7% respectively. The extracted chloroplast was then applied in the oxidation of $NaHSO_3$ solution. A sufficiently high rate (95.1%) of sulfite elimination was observed with 0.1 g/L chloroplast, at pH8.0, within 2 hours. An oxidation prompting role of sun light irradiation and consistant agitation during the reaction was also observed.

Key words: food biochemistry; biocatalyst; chloroplast; sulfites; removal

0 引言

食品中 SO_2 残留指标是国家质检部门的严控指标之一，在食品加工过程中，人为或非人为的因素都会导致食品中 SO_2 的含量超出国家标准。如何控制 SO_2 残留指标是各食品厂家加工过程中的一大难题[1]。

拟采用生物技术方法进行脱除食品中 SO_2 残留的研究。主要方法：从特定品种的植物组织中提取并制备一种具有活性的细胞器——叶绿体，作为一种生物催化剂，利用叶绿体中的代谢途径将外源性亚硫酸盐进行氧化还原反应，将亚硫酸转化为硫酸盐[2~4]。通过研究这种生物催化剂的催化氧化亚硫酸盐的反应条件和应用效果，达到安全、经济、高效清除（降低）食品加工过程中残留亚硫酸盐的目的。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

新鲜菠菜，购于广州五山菜市场；NaCl、抗坏血酸、$NaHSO_3$、盐酸副玫瑰苯胺、铵基苯磺酸铵、

基金项目：高等学校博士学科点专项科研基金（新教师基金）(20070561076)
作者简介：王向丽（1984—），女，硕士研究生，主要研究方向：粮食油脂与蛋白质工程
通信联系人：黄国平，副教授，主要研究方向：食品营养与检测. E-mail: hgp888@sohu.com

甲醛、高氯汞钠（化学试剂均为分析纯）。

1.2 主要仪器与设备

ALPHA1-4 冷冻干燥机（德国 Martin Christ）；紫外可见光分光光度计（北京普析）；高速冷冻离心机（日本 Hitachi）；水浴恒温振荡器。

1.3 实验方法

1.3.1 叶绿体的提取

在各种植物中，蔬菜叶中的叶绿体含量较其他植物高，而在蔬菜中又以菠菜的叶绿体含量最高。因此，采用叶绿体含量高又廉价易得的新鲜菠菜作为研究对象。用温和的提取与制备手段[5~6]，以最大限度地保留菠菜叶绿体中亚硫酸盐氧化酶的活性，并对提取产物进行定性验证与定量分析。

从菠菜中提取叶绿体的提取工艺流程图如图 1 所示。

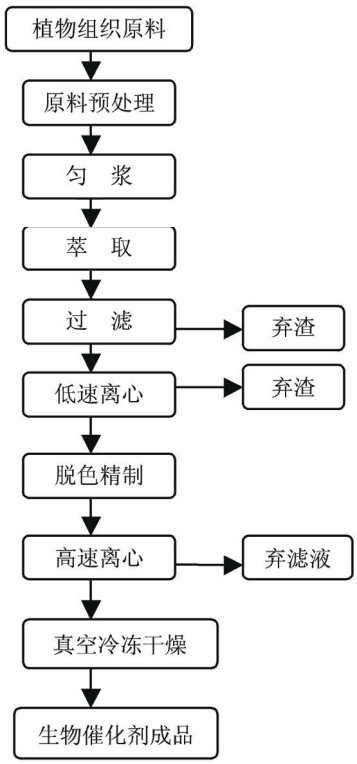


图 1 叶绿体的提取工艺流程图
Fig. 1 Extraction procedure of chloroplasts from spinach leaves

1.3.2 蛋白质含量的测定

采用凯氏定氮法对叶绿体蛋白质含量进行测定。

1.3.3 叶绿体的紫外光谱学性质

将制备好的叶绿体溶解于水，配制成 1 g/L 的溶液。用紫外可见光分光光度计在 190～400 nm 范围内进行扫描。

1.3.4 测定 SO_2 残留量测定

SO_2 含量按照文献[7]中的第一法——盐酸副玫瑰苯胺法测定。SO_2 清除率计算公式如式（1）所示：

$$SO_2\ 清除率(\%) = \frac{SO_2\ 初始量 - SO_2\ 剩余量}{SO_2\ 初始量} \times 100. \qquad (1)$$

1.3.5 pH 值对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 的影响

考察反应环境 pH 值分别为 4.0，5.0，6.0，7.0，8.0，9.0 时，对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响。将叶绿体粉末溶于 pH7.5 的磷酸盐缓冲液中，配成 1 g/L 的叶绿体使用液。其他条件为：叶绿体使用液 5 mL，浓度为 0.3 g/kg 的 SO_2 使用液50 mL，室温，在正常光照条件下，置于摇床中均匀缓慢振荡，反应 1 h.

1.3.6 反应时间对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 的影响

考察反应时间分别为 0.5，1，1.5，2，2.5，3 h 时，对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响。其他条件为：叶绿体使用液 5 mL，浓度为 0.3 g/kg 的 SO_2 使用液 50 mL，室温，pH8.0，在正常光照条件下，置于摇床中均匀缓慢振荡。

1.3.7 叶绿体使用液用量对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 的影响

考察叶绿体使用液用量分别为 1，3，5，8，10 mL 时，对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响。其他条件为：浓度为 0.3 g/kg 的 SO_2 使用液 50 mL，室温，pH8.0，在正常光照条件下，置于摇床中均匀缓慢振荡，反应 1 h.

1.3.8 其他条件的影响

考察光照与否、振荡与否和反应是否有氧气参与对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响。反应条件分别设为：叶绿体使用液 5 mL，浓度为 0.3 g/kg 的 SO_2 使用液 50 mL，pH8.0，在室温条件下，均匀振荡反应 1 h. 反应分别在光照、搅拌、密封以及对比条件下进行。

2 结果与讨论

2.1 叶绿体的提取与制备

叶绿体提取的工艺要点为：

1）原料清洗：新鲜菠菜叶片用自来水清洗 2 次，蒸馏水冲洗 1 次；

2）萃取液配方：0.9%NaCl 溶液，0.125 mol/L 抗坏血酸钠溶液；

3）第一次离心条件：2 500 r/min 3 min；

4）第二次离心条件：12 000 r/min 20 min.

实验中，采用 1 500 g 新鲜菠菜经分离提取后制得的最终粗制叶绿体 7.0 g. 由于菠菜中蛋白质含量约为 2.4%，水份含量约为 91.8%，得率为 5.7%.

2.2 叶绿体的蛋白质含量

由于叶绿体是植物光合作用的主要场所，构成叶绿体的主要成分有叶绿素、核酸、蛋白质等。提取的叶绿体按凯氏定氮法测得其蛋白质含量为 48.31%，含量偏高，说明该方法提取的叶绿体中含有其他杂质蛋白，在今后的工作中有待进一步加以纯化。

2.3 叶绿体的紫外扫描图谱

叶绿体溶液在 190～400 nm 范围内的紫外扫描光谱如图 2 所示，260 nm 处有最大吸收峰，在其他波长处无明显吸收峰，表明该溶液中无其他杂质干扰，主要成分为叶绿体。

2.4 亚硫酸盐含量标准曲线绘制

采用 $NaHSO_3$ 的标准溶液，按国标法进行测定操作，并在 550 nm 波长下绘制标准曲线（如图 3 所示），SO_2 含量（y）与吸光值（x）的关系可表示为：$y = 5.589\ 1x - 0.060\ 2$，相关系数 R^2 为 0.996 5，表明该曲线线性程度达到实验要求。

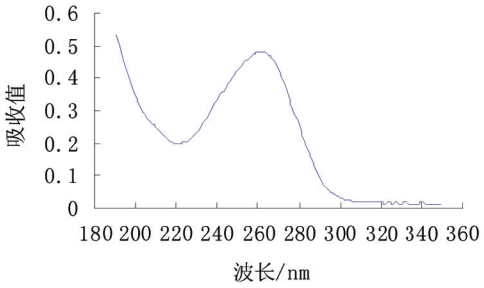


图 2 叶绿体提取液紫外可见光扫描图谱

Fig. 2 Visible light and UV wavelength scan of the extracted chloroplasts

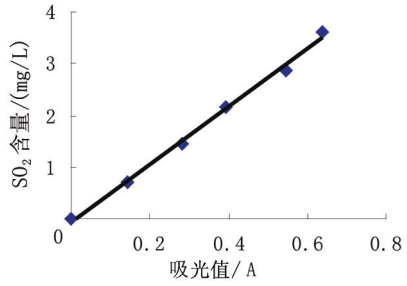


图 3 SO_2 含量标准曲线

Fig. 3 The standard curve of SO_2 content

2.5 pH 值对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 的影响

pH 值对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响结果如图 4 所示。可以看出：pH 变化范围在 4.0～6.0 时，SO_2 清除率逐渐减少至最低，这是因为在 pH6.0 时，正好处于叶绿体蛋白质的等电点附近，其溶解度最低，因此在该 pH 时脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的效率降低；pH 值变化范围在 6.0～8.0 时，SO_2 清除率逐渐增加至最高，在 pH8.0 时，叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的效率最高，反应 1 h 即可使 SO_2 残留下降 39.19%；pH 值变化范围在 8.0～9.0 时，SO_2 清除率有所减少，但影响不大。故 pH8.0 为较佳的反应 pH 值。

2.6 反应时间对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 的影响

反应时间对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响结果如图 5 所示。可以看出：叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 效率随反应时间变化而有所变化。反应 3 h 后，SO_2 残留下降了 94.40%. 延长反应时间无疑可

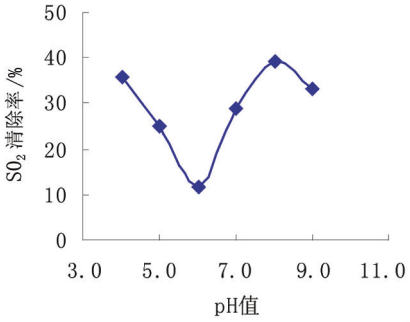


图 4　pH 值对 SO_2 清除率的影响

Fig. 4　Effect of pH value on removal rate of SO_2

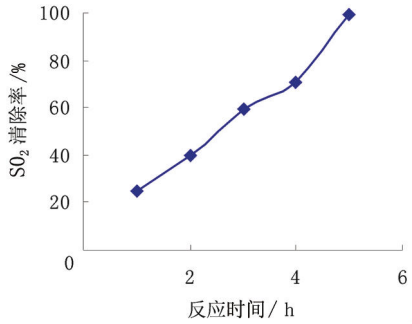


图 5　反应时间对脱除 $NaHSO_3$ 的影响

Fig. 5　Effect of reaction time on removal rate of SO_2

以降低 SO_2 残留，故适当延长反应时间有利于 SO_2 残留的降低，但综合考虑反应效率等因素，最佳反应时间为 2 h.

2.7　叶绿体使用液用量对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 的影响

叶绿体使用液用量对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响结果如图 6 所示。可以看出：叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 效率随叶绿体使用液用量变化而有所变化。叶绿体使用液用量愈大，SO_2 清除率愈大，故适当增大叶绿体使用液的用量有利于脱除 SO_2 残留，但考虑增大叶绿体使用液用量将增大经济成本，故叶绿体用量以 0.1 g/L 为佳.

2.8　其他条件对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 的影响

光照、振荡和氧气对叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的影响结果如图 7 所示。可以看出：在光照、振荡、敞开条件下，叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的效率均高于在黑暗、静止、密封条件下，说明叶绿体脱除 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的活性成分需要光照、氧气和振荡。

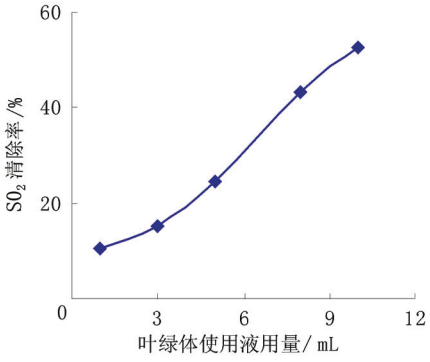


图 6　叶绿体使用液用量的影响

Fig. 6　Effect of chloroplast amount on removal rate of SO_2

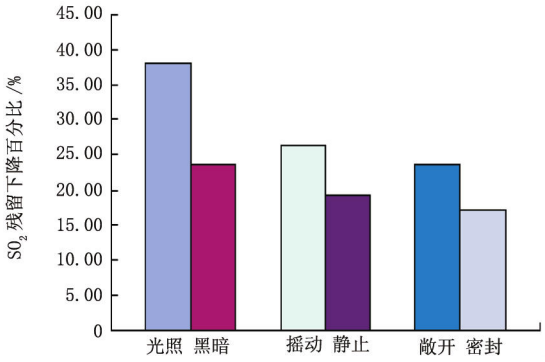


图 7　光照、振荡和氧气的影响

Fig. 7　Effect of lighting, shaking and oxygen on removal rate of SO_2

2.9　优化实验条件确定

通过单因素实验分析，得到的优化条件为：叶绿体用量为 0.1 g/L、反应 pH 值为 8.0，在光照、与空间接触、低速振荡的情况下反应 2 h，测得 SO_2 的清除率为 95.1%.

3　结论

从菠菜中提取叶绿体，对叶绿体清除亚硫酸盐的效果进行了初步研究。通过实验，取得了如下结论：

1）采用差速离心方法提取的叶绿体较纯净，最终获得叶绿体的提取率、得率分别为：19.4%，

5.7%，所得产品为暗绿色粉末。

2）将提取的叶绿体粉末配成叶绿体使用液，应用于 $NaHSO_3$ 中 SO_2 的清除，单因素实验得出 SO_2 的清除率与反应时间及叶绿体用量成正比，分析得出反应的较佳条件为：pH8.0，反应 2 h，叶绿体使用液用量为 5 mL；光照、与空气接触，均匀振荡条件下，SO_2 清除率为 95.1%.

[参考文献] (References)

[1] 黄国平. 食品中二氧化硫脱除方法研究进展[J]. 食品科技，2007 (12)：19～22.
HUANG G P. Advances in the study of removing sulfur dioxide from food[J]. Food Science and Technology，2007 (12)：19～22. (in Chinese)

[2] SCHRADER N，FISCHER K，THEIS K，et al. The crystal structure of plant sulfite oxidase provides insights into sulfite oxidation in plant and animals[J]. J. Structure，2003，11(10)：1251～1263.

[3] MASAKAZU H，MASATO N，TOSHIHARU H，et al. Oxidation-reduction properties of maize ferredoxin：sulfite oxidoreductase[J]. J. Biochimica et Biophysica Acta，2004，1608(2～3)：140～148.

[4] JOLIVET P，BERGERON E，MEUNIER J C. Metabolism of elemental sulfur and oxidation of sulfite by wheat and spinach chloroplasts[J]. J. Phytochem.，1995，38：9～14.

[5] 崔彬彬，李云，冯大领，等. 杨树叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法的研究[J]. 保定师范专科学校学报，2006 (2)：25～27.
CUI B B，LI Y，FENG D L，et al. A study for isolation of *Populus chloroplast* and cpDNA[J]. Journal of Baoding Teachers College，2006(2)：25～27. (in Chinese)

[6] 李爱芬，陈敏，周百成. 褐藻叶绿体的制备[J]. 生物化学与生物物理进展，2000，27 (5)：551～553.
LI A F，CHEN M，ZHOU B C. Preparation of chloroplasts from brown algae[J]. Prog. in Biochem. and Biophys，2000，27(5)：551～553. (in Chinese)

[7] GB/T5009.34—2003. 食品中亚硫酸盐测定国家标准法[S]. 北京：中国标准出版社，2003.
GB/T5009.34—2003. Determination of sulphite in foods[S]. Beijing：China Standard Press，2003. (in Chinese).