

耐高温 α -淀粉酶的酶学性质研究

毕金峰¹, 董福奎²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所 农业部农业核技术与农产品加工重点实验室, 北京 100094;

2. 内蒙古呼和浩特市赛罕区蔬菜技术推广站, 内蒙古 呼和浩特 010020)

摘要: 耐高温 α -淀粉酶是淀粉生产麦芽糖的关键酶。本文对两种耐高温 α -淀粉酶的酶学性质进行了对比研究。结果表明: 两种酶的耐高温能力差别较大, 酶活差别明显; 最适 pH 值均为 7.0, 耐酸性较差; 当 Ca^{2+} 浓度在 7~9 mmol/L 时, 酶活提高明显。

关键词: 耐高温 α -淀粉酶; 性质

Studies on Enzyme Properties of Heat-resisting α -amylase

BI Jin-feng¹, DONG Fu-kui²

(1. Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agricultural Nuclear Technology and Agro-Food Processing, MOA, Beijing 100094, China;

2. Vegetable Technology Popularize Station of Saihan District in Huhehaote City, Huhehaote 010020, China)

Abstract: Heat-resisting α -amylase is a critical enzyme for producing maltose. Enzyme properties of two species of heat-resisting α -amylases were studied. The results were as follows: the heat-resisting ability for two species of enzymes was different, and there was an evident difference in enzyme activity. The optimum pH was 7.0, and the acid-resisting ability was poor. The

收稿日期: 2005-01-21

作者简介: 毕金峰(1970-), 男, 副教授, 博士后, 主要从事食品化学与生物技术研究。

3 结 论

植物乳杆菌素 L-1 经硫酸铵沉淀, 透析除盐后效价达 1280 AU/ml, 作用方式为杀菌。在 7、15、30、37℃ 下, 添加植物乳杆菌素 L-1 对单增李斯特菌都有一定的抑制作用。7℃ 下该细菌素在 144h 内控制住初始菌数, 温度较高的情况下则可以在短时间内迅速降低活菌数。在选用的六种 pH 下, pH7.0 时植物乳杆菌素 L-1 的抑菌效果最好。不论在培养基中还是 pH7.0, 5 mmol/L 的磷酸缓冲液中, 盐对该细菌素具有一定的拮抗作用, 各盐分之间和同种盐不同浓度之间差异不显著。有关吸附作用的研究发现: 低 pH(5.0~5.5) 下, 植物乳杆菌素 L-1 不能吸附在单核细胞增生李斯特氏菌上, 而 pH6.0~7.5 下有 50% 吸附在指示菌上。盐对该细菌素吸附单核细胞增生李斯特氏菌没有显著影响。

参考文献:

- [1] 吕燕妮, 李平兰, 江志杰. 乳酸菌 31-1 菌株产细菌素的初步研究[J]. 中国食品学报, 2003, 增刊: 130-133.
- [2] 郁庆福, 蔡宏道, 何晓青, 等. 现代卫生微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 116-117.
- [3] Sophie M P, Emilia F, Richard J. Purification, Partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolation from a cheese[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 30: 255-270.
- [4] Atrih A, Rekhif N, Moir A J G, et al. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39: 1173-1179.
- [5] Atrih A, Rekhif N, Moir A J G, et al. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 68: 93-104.
- [6] Rongguang Y, Monty C J, Bibek R. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria[J]. Applied and Environment Microbiology, 1992, 58: 3355-3359.
- [7] 还连栋, 贾士芳, 庄增辉, 等. 乳链菌肽(NISIN)的杀菌作用机制[J]. 中国食品添加剂, 1997, (4): 20-23.
- [8] S Todorov, B Onno, O Sorokine, et al. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough[J]. Int J Food Microbiol, 1999, 48: 167-177.

activity of two kinds of enzymes could be enhanced when the concentration of Ca^{2+} was 7~9mmol/L in the enzyme solution.

Key words: heat-resisting α -amylase; property

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0125-04

高麦芽糖浆是一种麦芽糖含量较高($\geq 50\%$)而葡萄糖含量较低($\leq 10\%$)的淀粉糖浆。因其具有无色透明、甜度低、熬糖温度高、吸湿性低、抗结晶性好等特点而成为糖果工业更新换代的产品,被广泛应用于糖果、蜜饯、果蔬汁饮料中^[1~4]。低聚异麦芽糖是近些年国内外市场上发展较快的一种功能性低聚糖。作为生产低聚异麦芽糖过程中 α -转移葡萄糖苷酶的作用底物,也要求这种淀粉水解产物中含有较高的麦芽糖、较低的葡萄糖和糊精。目前,国内外生产低聚异麦芽糖产品主要是以玉米淀粉为原料,国内也有用木薯淀粉及玉米直接法生产低聚异麦芽糖的报道^[5~7]。国内外在低聚异麦芽糖生产工艺中采用耐高温 α -淀粉酶和真菌 α -淀粉酶生产高麦芽糖浆的较多。耐高温 α -淀粉酶是淀粉生产高麦芽糖浆的关键酶。耐高温 α -淀粉酶的选择对提高麦芽糖产品质量和降低生产成本至关重要。选用的耐高温 α -淀粉酶一般要求具有作用温度高,作用力强等特点,能耐 110°C 左右的高温,符合生产工艺操作条件。目前,国内外生产的耐高温 α -淀粉酶种类较多,酶活及酶学性质差别较大。研究耐高温 α -淀粉酶的酶学性质及性价比,可为生产麦芽糖的企业提供理论指导,本文在此方面做了些探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶制剂 国产耐高温 α -淀粉酶(以下简称“G酶”);进口耐高温 α -淀粉酶(以下简称“N酶”)。

1.1.2 玉米淀粉(洁鹅牌) 中国人民解放军辽宁省军区宁官农场淀粉厂。

1.1.3 可溶性淀粉 沈阳化学试剂厂。

1.2 试验方法

酶活测定方法—吸光光度法。

吸取2%的可溶性淀粉20ml于试管中,加入缓冲液5ml摇匀,耐高温 α -淀粉酶在最适温度下,pH值6.5条件下反应5min,再加入稀释好的酶液1ml,立即计时,准确反应5min。立即吸取反应液1.0ml加入到5ml稀碘液中,摇匀,并以稀碘液作空白,在660nm波长下比色,迅速测定吸光度值,根据吸光度值查表,求得测试酶液的浓度(C),通过公式计算出样品的酶活力。

$X=cn$ X—样品的酶活力(U/ml);

c—测试酶液的浓度(U/ml);

n—样品稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 稀释倍数对G酶、N酶酶活的影响

将G酶和N酶从冰箱中取出适量,用蒸馏水(pH值6.0)分别稀释不同倍数,测定不同稀释倍数下的酶活,结果如表1。

表1 稀释倍数对酶活的影响
Table 1 Effect of dilution multiple on enzyme activity

稀释倍数	G酶酶活(U/ml)	N酶酶活(U/ml)
100	—	—
200	616.8	—
300	—	1304.1
400	—	—

注:“—”表示超出测定酶活力范围,无法计算酶活力。

从表中看出,不同稀释倍数对酶活有一定影响,稀释倍数增加,酶活迅速降低,当达到稀释400倍时,两种酶均不易测出酶活。N酶稀释300倍时酶活还高于G酶稀释200倍的酶活,可见N酶的酶活高于G酶。为研究方便,选用N酶稀释300倍(以下简称N-300)、G酶稀释200倍(以下简称G-200)作为反应酶液,进行其它酶学性质研究。

2.2 N-300、G-200酶的最适温度

最适温度不是酶的特征性物理常数。酶作用时间长短影响最适温度值。酶在短时间内能耐受较高温度;当反应时间延长时,最适温度向低温方向移动。因此,严格讲只有在反应时间一定时,才有最适温度。

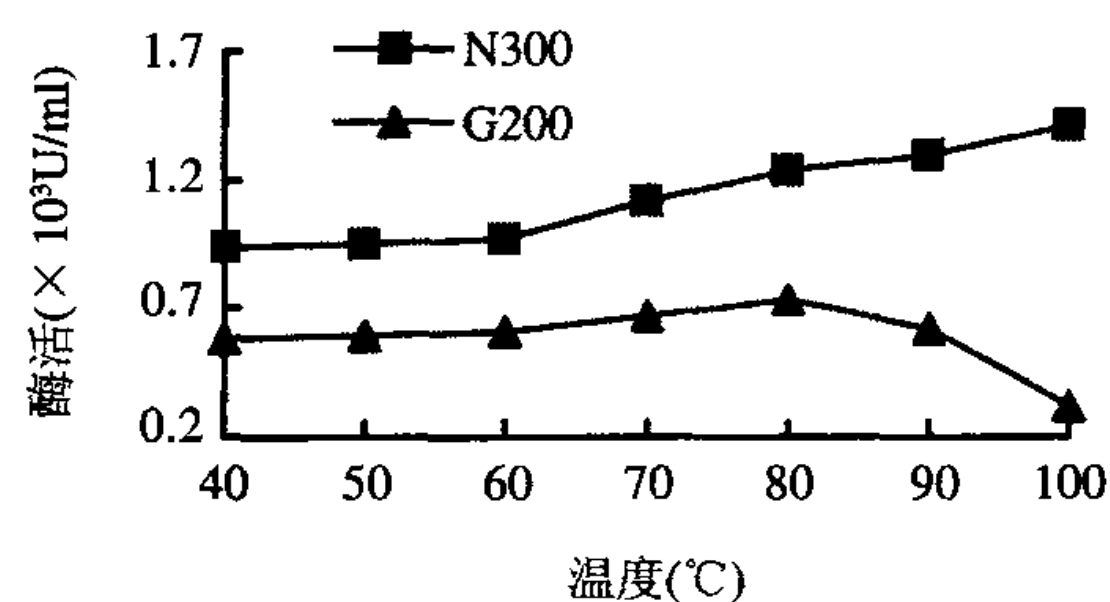


图1 两酶的最适温度

Fig.1 Optimum temperature for two kinds of enzymes

分别吸取2%的可溶性淀粉20ml于若干试管中,各加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液5ml摇匀,在不同温度的恒温水浴锅中预热5min,再加入稀释好的酶液各1ml,测试酶液的酶活,结果见图1。可知N-300酶在40~100°C范围内,随温度升高,酶活增加;而G-200在80°C时酶活最高,到100°C时酶活明显降低。可确定在试验研究范围内,N-300、G-200的最适温度分别为100、80°C。

2.3 N-300、G-200酶的热稳定性

不同酶的耐高温能力不同,将酶于不同温度下处理

一定时间(通常为 1h), 迅速冷却至室温, 用标准方法测定酶的残余活力, 可了解酶的热稳定性。

取适量 N-300、G-200 酶液, 分别在不同温度下保温 1h, 然后冷却至室温, 按常规方法测定酶活(N-300 酶为 100℃、G-200 酶为 80℃), 结果见表 2。说明 N-300 酶的热稳定性比较好, 在不同温度下保温 1h, 残余酶活力较高。G-200 酶热稳定性较差, 95、100℃保温 1h 后, 丧失酶活。

表 2 两酶的热稳定性

Table 2 Heat-resistance of two kinds of enzymes

温度(℃)	N-300 酶活($\times 10^3$ U/ml)	G-200 酶活($\times 10^3$ U/ml)
75	1.21	0.68
80	1.22	0.72
85	1.12	0.61
90	1.21	0.41
95	1.39	—
100	1.38	—

注: “—”表示酶活较低, 超出测定范围。

2.4 N-300、G-200 酶的最适 pH 值

pH 值是影响酶活的主要因素。它影响酶分子构象的稳定性, 影响酶分子极性基团的解离状态, 也影响底物的解离。pH 值不是酶的特定常数, 它可随底物的浓度和种类、酶的纯度、缓冲液的种类和浓度、温度、反应时间长短以及抑制物的作用等而改变。

配制不同 pH 值的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液, 用不同 pH 值缓冲液配制 2% 的可溶性淀粉。分别吸取不同 pH 值的 2% 可溶性淀粉 20ml 于若干试管中, 各加入相应 pH 值的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液 5ml, 摇匀, 在最适温度(N-300 酶为 100℃、G-200 酶为 80℃)的恒温水浴锅中预热 5min, 再加入稀释好的酶液 1ml, 测定酶液的酶活, 结果见图 2。可知 N-300 和 G-200 酶的最适 pH 值均为 7.0, 在 pH 值 6.0~7.6 范围内较稳定, 当 pH 值低于 5.2 时, 酶活降低。说明耐高温 α -淀粉酶对酸敏感, 可用加酸的方法来灭酶。

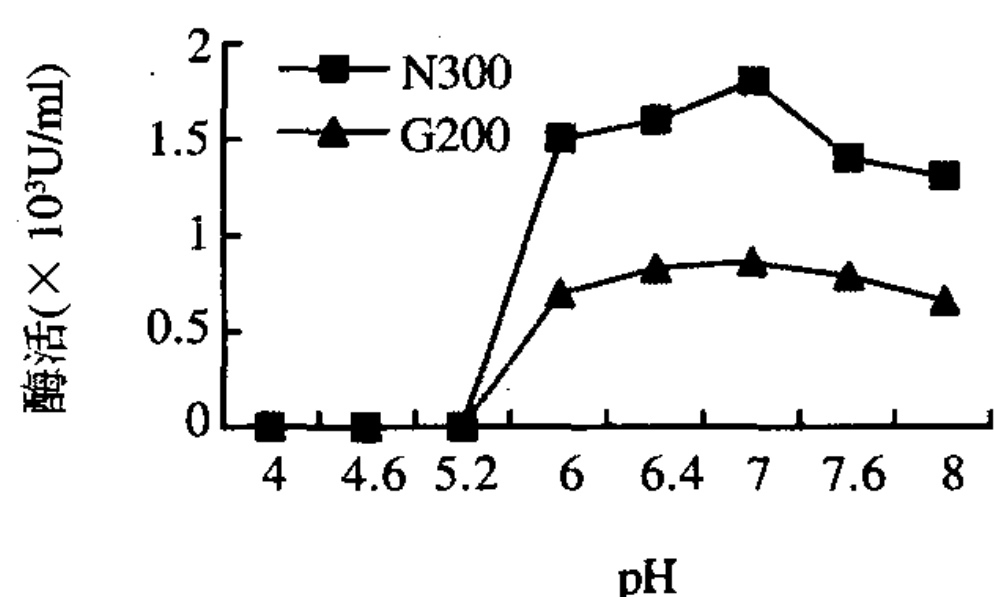


图 2 两酶的最适 pH 值

Fig.2 Optimum pH value for two kinds of enzyme

2.5 N-300、G-200 酶 pH 值稳定性

配制不同 pH 值的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液, 用不同 pH 值的缓冲液将 N 酶和 G 酶分别稀释 300 倍和 200 倍。在常温下保温 1h 后, 调 pH 值为 7.0, 在最适 pH

值条件下测定酶活。结果见图 3。可知两种酶在 pH 值 4.0~7.0 的范围内较稳定, 当 pH 值达到 8.0 时, 残余酶活明显降低。当 pH 值 ≤ 3.0 时, 酶变性失活。同时, 也进一步证明了在相同条件下, N-300 的酶活要高于 G-200。

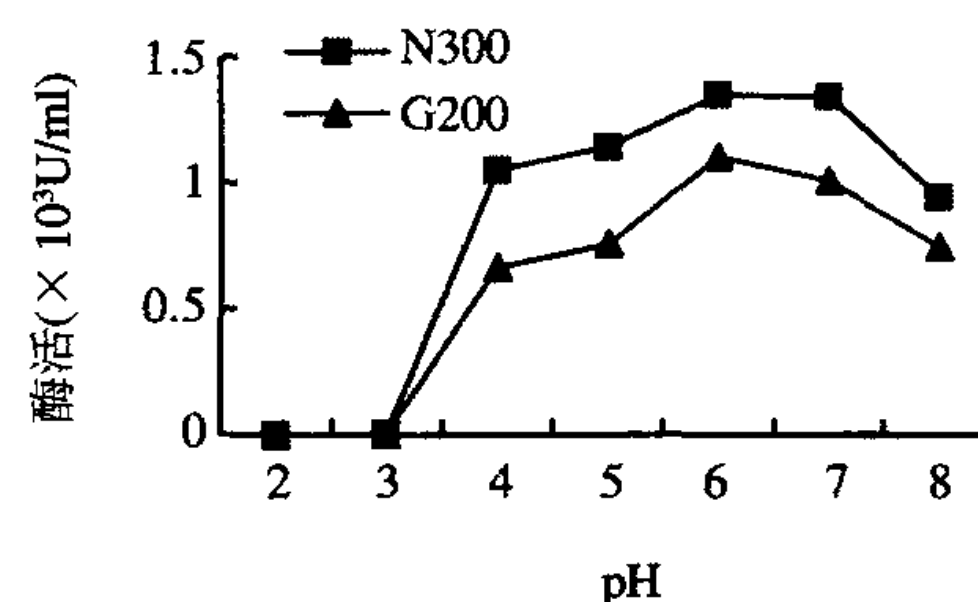
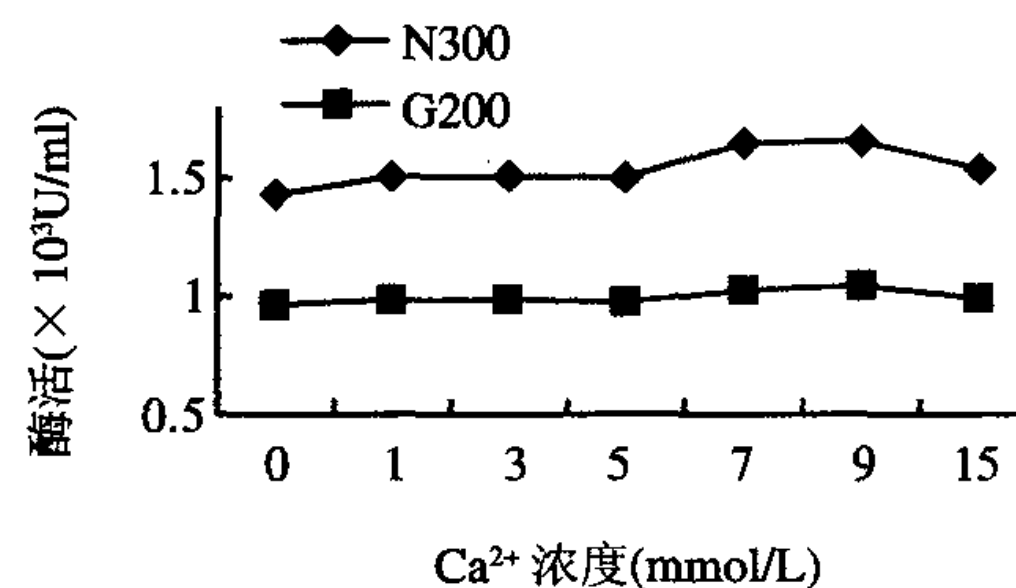


图 3 两酶的 pH 值稳定性

Fig.3 The stability of two kinds of enzymes in different pH value solution

2.6 Ca^{2+} 对耐高温 α -淀粉酶活力的影响

有些学者认为, 耐高温 α -淀粉酶作用时要求 Ca^{2+} 浓度越低, 酶稳定性越好, Ca^{2+} 浓度对酶活影响不大, 本文对此做了研究。精确称取不同量的 CaCl_2 (精确到 0.0001g) 放于小试管中, 加入定量的 N-300、G-200 酶液, 配制不同 Ca^{2+} 浓度的酶液, 充分混匀后, 室温静置 30min, 取 1ml 酶液, 按标准方法测定酶活, 结果见图 4。可见 Ca^{2+} 对耐高温 α -淀粉酶有一定影响, 加入 Ca^{2+} 的处理好于对照, 尤其当 Ca^{2+} 浓度在 7~9mmol/L 时, 酶活增加明显。

图 4 Ca^{2+} 对两酶酶活的影响Fig.4 Effect of Ca^{2+} on the activity of two kinds of enzymes

2.7 两酶的价格比分析

G 酶和 N 酶的市场售价分别为 30 元/kg 和 47 元/kg。从酶学性质分析, N 酶的酶活高于 G 酶, N 酶耐高温能力强, 能满足以蒸汽喷射液化工艺糊化、液化淀粉要求, 酶反应条件温和, 适合工业化生产; G 酶尽管价格较低, 但各方面性质不如 N 酶, 建议生产上使用 N 酶。市场上还有几家公司生产耐高温 α -淀粉酶, 其酶学性质和催化特性有待于进一步研究。

3 结 论

耐高温 α -淀粉酶 N 酶、G 酶的最佳试验稀释倍数分别为 300、200。N-300 酶的最适温度为 100℃, 在 100℃

绿原酸清除活性氧和抗脂质过氧化物的研究

胡宗福, 于文利, 赵亚平*

(上海交通大学化学与化工学院, 上海 200240)

摘要: 采用化学发光法, 研究了不同浓度的绿原酸溶液对 3 种活性氧(Reactive Oxygen Species) $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 和 H_2O_2 的清除和抗脂质过氧化能力。研究表明, 绿原酸对三种活性氧均有清除作用, 其清除能力与浓度呈剂量关系, 还与所清除的自由基种类有关系。绿原酸溶液浓度较大时, 对三种活性氧的清除效果均明显而且稳定, 而浓度较低时, 对 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 清除效果则不理想, 甚至产生一定的促氧化作用。同样, 绿原酸对脂质过氧化也有明显的抑制作用, 抑制效果也与浓度呈剂量关系。

关键词: 绿原酸; 自由基; 脂质过氧化; 化学发光法

Study on the Scavenging of ROS and Anti-lipid Peroxidation by Chlorogenic Acid

HU Zong-fu, YU Wen-li, ZHAO Ya-ping*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: The scavenging ability on ROS(Reactive Oxygen Species)— $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ and H_2O_2 and anti-lipid peroxidation of chlorogenic acid was evaluated by means of chemiluminescence system. The results show that the scavenging ability varies with the concentration of chlorogenic acid and the type of reactive oxygen species. High concentration of chlorogenic acid has significant scavenging effects, while very low concentration has less effect, even has prooxidative actions towards $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$. The anti-lipid peroxidation of chlorogenic acid is also obvious and is related with the concentration of chlorogenic acid.

Key words: chlorogenic acid; ROS; lipid peroxide; chemiluminescence

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)02-0128-03

生物体系中包含大量的脂质过氧化和自由基反应。正常情况下, 生物体内自由基的产生和清除呈平衡状态, 失去平衡时, 在机体内可造成多种功能障碍与疾病的发生。脂质过氧化严重破坏细胞膜的脂质结构中的脂肪酸, 使膜酶损伤导致细胞功能障碍。研究发现, 肿瘤、化学中毒、感染、炎症反应、自身免

疫病、辐射损伤、血管疾病、癌症、衰老、DNA 损伤等生理过程与二者有密切联系^[1,2]。

绿原酸(Chlorogenic acid)是我国传统中药金银花、杜仲叶的主要有效成分, 也存在于葵花籽、水果、蔬菜、大豆、小麦、咖啡豆中。研究表明, 绿原酸具有清热解毒、消炎利胆、抗菌、降血脂等生理功能^[3],

收稿日期: 2005-01-24

* 通讯作者

作者简介: 胡宗福(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然抗氧化剂的提取。

下保存 1h 酶活仍较高; 最适 pH 值为 7.0, 在 pH 值 4.0~7.0 的范围内较稳定; Ca^{2+} 浓度在 7~9mmol/L 时对该酶有激活作用。G-200 酶的最适温度为 80℃, 在 95℃ 下保存 1h 几乎失去酶活; 最适 pH 值为 7.0, 在 pH 值 4.0~7.0 的范围内也较稳定; Ca^{2+} 浓度在 7~9mmol/L 时对该酶也有激活作用。从性价比分析, 建议生产上选用 N 酶。

参考文献:

[1] 鲍元兴, 等. 低聚异麦芽糖的质量与工艺设备[J]. 食品工业, 1999,

(3): 8-9.

[2] 刘汉文, 等. 几种 α -淀粉酶生产麦芽低聚糖工艺研究[J]. 食品科技, 1999, (6): 31-32.

[3] 高雯, 等. 食品酶学原理与分析方法(第一版)[M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1991. 237-273.

[4] 罗九甫. 酶和酶工程(第一版)[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 1996. 176-202.

[5] 彭志英. 食品酶学导论(第一版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 122-165.

[6] 吴东儒. 糖类的生物化学(第一版)[M]. 上海: 高等农业教育出版社, 1987. 222-255.

[7] 周晓云. 酶技术(第一版)[M]. 北京: 石油工业出版社, 1995. 180-297.