

## 2.2 胡萝卜粉的应用

### 2.2.1 胡萝卜粉在面条中的应用

由表5可以看出,两种粉应用在面条的感官评价是不同的,并不是粉的颗粒越小越好。实验中发现,50目粉由于颗粒大,遇水膨胀后在面条表面形成橙红色花纹,其色泽和香味随胡萝卜粉含量增加而更加明显,给人感官刺激增加,因而得分逐渐提高;300目粉颗粒由于小,能均匀地分布在面条中,当粉含量低时面条色泽不鲜艳,质地硬涩,胡萝卜香味淡,不受欢迎,得分较低,但含量达到8%时面条颜色鲜艳,胡萝卜香味浓厚,质地也很柔滑,最受欢迎,得分较高。因此,50目粉在面条中的使用效果比300目粉好。

### 2.2.2 胡萝卜粉在牛奶中的应用

表6 嗜好性感官评价

胡萝卜粉	含量	色泽	风味	口感	表现状态	总分
50目	1%	12.9	20.4	21.7	13.8	68.8
	2%	14.5	21.2	18.7	12.6	67.0
	3%	12.5	19.9	10.8	9.5	52.7
	4%	11.5	19.0	8.5	7.5	46.5
300目	1%	15.5	24.0	21.2	15.2	75.9
	2%	16.3	23.8	23.6	16.3	79.6
	3%	17.0	24.2	23.8	16.7	81.7
	4%	17.5	24.3	20.8	16.5	79.1

由表6可以看出,50目粉和300目粉在牛奶中的应用感官评价是不同的,添加300目胡萝卜粉的牛奶感官评价得分均比添加50目的得分高。300目胡萝卜粉的溶解性较好,口感细腻,胡萝卜粉香味浓郁,以添加3%的效果较好;而50目粉口感粗糙,难以被人接受,随

着添加量的增加,得分越来越低。因此,300目粉在牛奶中的使用效果比50目好。

## 3 结论

3.1 300目与50目的胡萝卜粉相比,比表面积增加了131%,而溶解性提高20%。

3.2 50目粉与300目粉存在色差,300目粉的L、a和b值都较大,但色调Hue没有改变。

3.3 50目粉的中位径为 $D_{50}=41.16\mu\text{m}$ ,50%的粒子直径分布在 $41.16\mu\text{m}$ 以下,300目粉的中位径 $D_{50}=20.0\mu\text{m}$ ,50%的粒子直径分布在 $20.0\mu\text{m}$ 以下。

3.4 50目粉和300目粉在面条和牛奶中的适用性不同。50目粉适合在面条中使用,而300目粉适合在奶粉中使用。

## 参考文献:

- [1] 顾尧臣,等.粮食深加工及综合利用[M].北京:科学出版社,1989.
- [2] 韩雅珊.食品化学实验指导[M].北京:中国农业大学出版社,1992.
- [3] 汪隆植,等.萝卜与胡萝卜[M].科学技术文献出版社重庆分社,1990.
- [4] 李春华,等.中药三七的超细粉碎工艺与产品物性研究[J].中国粉体技术,2001,7(6):21-23.
- [5] 钱海燕,等.扁平式气流磨制备超细粉料的研究[J].中国粉体技术,2001,7(3):23-25.
- [6] 王永刚.微细粉碎与分级技术在面粉中的应用[J].西部粮油科技,1997,22(4):3-5.
- [7] 中华人民共和国国家标准 GB 5161-85.
- [8] 中华人民共和国国家标准 GB 6524-86.
- [9] 中华人民共和国国家标准 GB/T 13390-9.

# 海藻酸钙明胶联合固定化 $\alpha$ -淀粉酶

祝美云<sup>1</sup>, 艾志录<sup>1,2\*</sup>, 赵秋艳<sup>1</sup>, 戴清源<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学生物技术与食品科学学院, 河南 郑州 450002;

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

**摘 要:**以海藻酸钙、明胶凝胶珠包埋、戊二醛交联制备固定化 $\alpha$ -淀粉酶,探讨了酶的固定化条件和固定化酶的部分性能。在戊二醛浓度0.3%、加酶量酶16.0g/L条件下可以获得最佳的固定化效果;与游离酶相比,制备的固定化酶最适反应pH由6.0降低到5.6,最适反应温度由65℃升高到70℃,其适宜作用温度范围、pH值范围均比自由酶范围宽;固定化酶的热稳定性优于游离酶,且连续7批次操作仍保持80%酶活力,显示出良好的稳定性。

收稿日期:2003-07-25

\* 通讯联系人

基金项目:天津市自然科学基金资助(003604211)

作者简介:祝美云(1955-),女,副教授,硕士生导师,主要从事食品工程技术与开发。

关键词: 海藻酸钠; 明胶; 固定化;  $\alpha$ -淀粉酶

## Immobilization of $\alpha$ -amylase in Calcium Alginate-Gelatin Hydrogels

ZHU Mei-yun<sup>1</sup>, AI Zhi-lu<sup>1,2\*</sup>, ZHAO Qiu-yan<sup>1</sup>, DAI Qing-yuan<sup>1</sup>

(1.College of Biotechnology and Food Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:**  $\alpha$ -amylase was immobilized by encapsulated in hydrogel beads prepared with calcium alginate-gelatin and crosslinked with glutaraldehyde. The immobilization conditions and partial properties of immobilized enzyme were investigated. The best efficiency of immobilization could be obtained under the condition that the concentration of glutaraldehyde was 0.3% and the adding amount  $\alpha$ -amylase was 16.0g/L. Compared with the free enzyme, the optimum pH value and temperature of immobilized  $\alpha$ -amylase were respectively shifted from 6.0 to 5.6 and from 65°C to 70°C. It showed a wider range of reaction pH value and temperature than the free enzyme. The thermostability of Immobilized  $\alpha$ -amylase was better than native enzymes. After seven times repeated batch operation, the relative activity of immobilized enzyme was about 79.8%, showed a high operational stability.

**Key words:** alginate; gelation; immobilization;  $\alpha$ -amylase

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2004)02-0064-05

与游离酶相比, 固定化酶在保持其高效、专一及温和的酶催化反应特性的同时, 还呈现稳定性高, 对抑制剂敏感性降低, 抗蛋白酶分解性能提高; 分离回收容易、可多次重复使用、可连续操作及自动化控制、工艺简便, 且产品中不会带进酶蛋白或细胞, 提高酶的利用效率, 降低生产成本等一系列优点。它在应用上和理论上的巨大潜力吸引了诸多领域的科研机构及企业科技部门研究人员的注意力, 成为现代酶工程领域的研究热点。 $\alpha$ -淀粉酶广泛应用于粮食加工、食品工业、发酵工业、纺织品工业和医药工业等行业, 有关 $\alpha$ -淀粉酶的固定化在国内外已有许多报道, 并在固定化载体、固定化方法、酶学特性及固定化酶反应器等方面取得了诸多进展<sup>[1~10]</sup>。

高分子复合物作为载体制备固定化酶是近年来引人瞩目的发展方向<sup>[2,3][11]</sup>, 如: 用聚甲基丙烯酸甲酯与聚丙烯酰胺的复合物固定化纤维素酶、聚乙烯醇与对甲苯基苯甲酸的复合物包埋葡萄糖氧化酶等等。海藻酸钠、明胶作为天然高分子材料因其安全、环保以及工艺方面的优良性能已应用于 $\alpha$ -淀粉酶的固定化<sup>[4,5][12]</sup>。而在迄今为止的研究中两种材料多单独使用, 尚未见有用海藻酸钠、明胶共混包埋、戊二醛交联制备固定化 $\alpha$ -淀粉酶的报道。本文采用这两种高分子复合物作为载体进行 $\alpha$ -淀粉酶的固定化, 并对其固定化条件及固定化酶性能进行了初步探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器设备

HJ-5 多功能搅拌机 常州国华电器有限公司; 电热恒温水浴锅 北京市长风仪器仪表公司; 722S 分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; FA2024A 电子天平 上海精天电子仪器厂; pH213 酸度计、锥型瓶、移液管等。

#### 1.2 试剂

海藻酸钠 广州西陇化工厂, 化学纯; 明胶 天津市天达净化材料精细化工, 生物试剂;  $\alpha$ -淀粉酶 北京市奥博星生物技术责任有限公司; 戊二醛: 天津市津宇精细化工(25%); 可溶性淀粉 四川泸州市军乐化工厂; 碘、碘化钾、氯化钠、磷酸氢二钠、柠檬酸等均均为分析纯。

#### 1.3 溶液配制

1.3.1 原碘液、稀碘液 见参考文献[13]。

1.3.2 缓冲液 见参考文献[14]。

1.3.3 可溶性淀粉(2%) 见参考文献[15], 临用时配制。

1.3.4  $\alpha$ -淀粉酶液 见参考文献[15], 存贮在 0~5°C 冰箱中备用。

1.3.5 海藻酸钠溶液(3%) 50~90°C 恒温水浴保温溶解。

1.3.6 明胶(3%) 50~70°C 水浴保温溶解。

#### 1.4 酶活测定方法<sup>[13][16,17]</sup>

以 20.0ml 的 2% 可溶性淀粉为底物, 加入 5.0ml 的缓冲液, 调节反应 pH 值。在 60°C 预热 5min 后加入适量固定化酶或稀释至适当浓度的酶液, 准确反应 5min 后立即取出 1.00ml 反应液置于 12.0ml 的 0.1mol/L HCl 中终止反应, 然后立即取出 1.00ml 溶液置于 5.00ml 碘液中摇匀显色。以加入同量失活酶代替原酶为空白, 在 660nm

波长下测定其吸光度值, 求出吸光度差值  $\Delta A$ 。

### 1.5 $\alpha$ -淀粉酶的固定化方法<sup>[14][20,21]</sup>

将酶液 7.5ml 与 3% 的海藻酸钠溶液 33ml 混合搅拌, 然后加入 3% 的明胶溶液 34ml 混合乳化 5~10min。控制此混合液 pH 值为 4.0, 通过七号注射器的针头将上述混合液以 5cm 高度注入 1% 的氯化钙液后立即形成光滑的微球体, 并将此固定化小球保持在 4℃ 的上述氯化钙液中硬化 30min, 然后在一定浓度戊二醛溶液中进一步硬化 10min, 用生理盐水洗涤后将固定化酶贮存在 0~5℃ 的冰箱中备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 戊二醛浓度的确定

#### 2.1.1 戊二醛浓度对固定化酶活性的影响

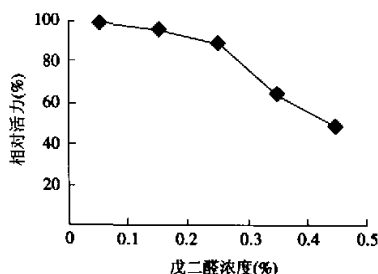


图1 戊二醛浓度对固定化酶活性的影响

固定其他条件分别在含 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的戊二醛溶液中交联制备固定化酶, 并测定其相对活力, 结果如图 1。从图 1 中可以看出随着戊二醛浓度的增加固定化酶相对活力逐渐下降, 当戊二醛浓度高于 0.3% 时, 酶的活力下降迅速。戊二醛既是交联剂, 又是蛋白质变性剂, 所以它的浓度大小直接影响固定化酶的活性与稳定性。戊二醛浓度过高会使固定化载体交联度过大, 形成的网络结构紧密, 底物和产物难以通过其网络空隙(即扩散限制), 使得酶活性降低; 同时过高浓度的戊二醛会与酶蛋白过度交联, 改变酶活性中心使酶变性, 也会导致酶活性降低。

#### 2.1.2 戊二醛浓度对固定化酶操作稳定性影响

用不同浓度戊二醛溶液制备的固定化酶分别在相同

表1 戊二醛浓度对固定化酶的稳定性的影响

戊二醛 浓度(%)	相对活力(%)				
	第一批	第二批	第三批	第四批	第五批
0.1	100	99.07	92.28	87.04	79.32
0.2	100	99.04	95.22	89.81	82.80
0.3	100	98.97	96.56	94.85	91.07
0.4	100	98.10	97.14	95.24	92.38
0.5	100	98.10	97.47	95.57	93.47

条件下连续进行五批次操作, 测定其酶活力并计算相对活力, 结果如表 1。

由表 1 可知低浓度戊二醛条件下, 随操作批次的增加酶的相对活力迅速降低, 而在戊二醛浓度 3% 以上时重复操作 5 个批次, 其相对活力仍保持 90% 以上。这说明戊二醛浓度对固定化酶的稳定性有明显影响, 随着戊二醛浓度的升高固定化酶的操作稳定性增强。结合图 1 和表 1 综合考虑戊二醛对固定化酶活性和稳定性的影响, 确定戊二醛的浓度为 0.3% 为宜。

### 2.2 酶浓度的确定

固定其他条件, 分别添加不同浓度(6.0~20.0g/L)的  $\alpha$ -淀粉酶液制备固定化酶, 并测定其活力, 结果如图 2 所示。图 2 表明当使用的酶浓度为 16.0g/L 时, 制备的固定化酶活力基本上达到最大值, 其后随着使用的酶浓度的升高固定化酶的活力升高变化缓慢, 也即是说一定量载体其结合容量是固定的, 随给酶量的增加其活性虽也不断增大, 但当达到饱和载量后, 过多结合的酶使空间位阻增加、扩散限制增大, 底物和酶、产物不能充分接触与转移, 从而影响酶活力, 同时过多的结合酶也易使酶活性中心改变影响酶活力。因此选用酶浓度为 16.0g/L 为宜。

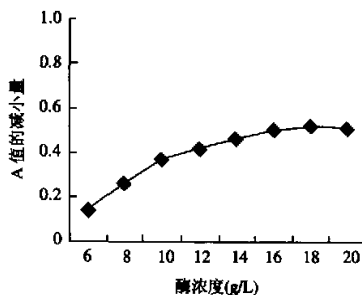


图2 酶浓度对固定化酶活性的影响

### 2.3 固定化酶的最适 pH 的确定

其它条件不变, 在 pH4.0~8.0 范围的 0.1mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中, 以 0.4 的间隔分别测定固定化酶和游离酶的活性, 以最大活性值为 100, 计算各自相对活力, 结果如图 3 所示。由图 3 中可以看出固定化酶最适 pH 为 5.6, 自由酶的最适 pH6.0, 固定化酶比游离酶较耐酸, 而且曲线较平缓, 显示出比游离酶更宽泛的 pH 适应性, 其原因可能是固定化载体维持了酶空间结构的稳定性。

### 2.4 固定化酶的最适温度的确定

其它条件不变分别在各自最适 pH 条件下, 在 40~90℃ 范围内每隔 5℃ 测定固定化酶和游离酶活性, 并计算相对活力, 结果如图 4 所示。由图可以看出游离酶被固定化后, 其最适温度也产生了变化, 固定化酶的最

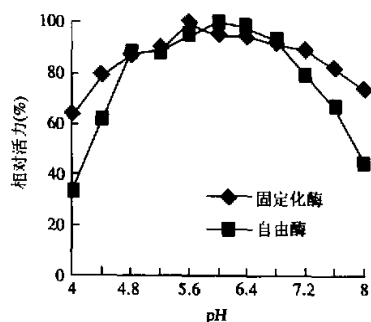


图3 pH对自由酶和固定化酶活性的影响

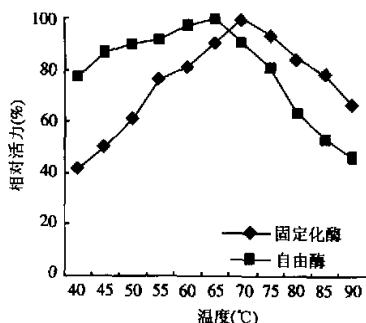


图4 温度对自由酶和固定化酶活性的影响

适温度提高,游离酶的最适温度为65℃,固定化酶为70℃。分析原因可能是固定化载体提高了酶的空间结构对热的稳定性。

## 2.5 固定化酶的热稳定性

将游离酶和固定化酶在50~80℃范围内每隔5℃分别保温15min后,立刻冰浴冷却测定酶活力,结果如图5所示。图5表明固定化酶的耐热性明显高于游离酶。

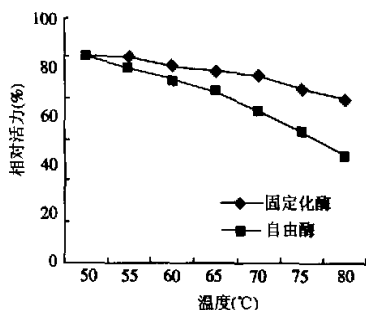


图5 自由酶和固定化酶的耐热性

## 2.6 固定化酶的操作稳定性

以2%淀粉溶液为底物分别在相同条件下连续进行七批次操作,测定其酶活力,以第一批酶活力作为100%计算相对活力,结果如图6所示。由图可知固定化酶具有极其良好的操作稳定性,在连续使用6个批次后其相对活力仍保持85.5%,第7批次后相对活力下降

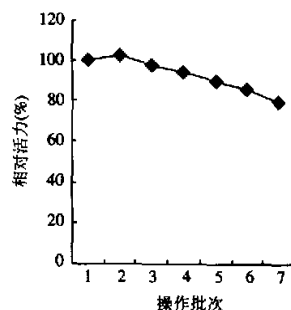


图6 重复使用次数对固定化酶活性的影响

较多,但仍然保持在79.8%。相对活力的下降可能是由于在不断搅拌下,固定化载体持水性发生变化,固定化酶凝胶结构的改变和酶的泄漏所造成的结果。

## 2.7 贮存稳定性

分别在0~4℃冰箱中和在25℃的室温下贮存10d,并测定其活性结果表明固定化酶的活力几乎都无损失。说明固定化酶具有较好的贮存稳定性。

## 3 小结

本试验就海藻酸钠、明胶复合材料包埋、戊二醛交联固定化 $\alpha$ -淀粉酶的固定化条件和部分酶学特性进行了探讨,得到如下结果:

戊二醛浓度为0.3%,酶浓度为16.0g/L可以获得较好的酶活力;固定化酶最适pH为5.6,最适温度为70℃,固定化酶的适宜作用温度范围、pH值范围均比自由酶宽;固定化酶的热稳定性高于游离酶,重复使用时批次操作也显示出较好的稳定性。

海藻酸钠、明胶复合包埋、戊二醛交联法固定化 $\alpha$ -淀粉酶具有良好的应用前景,但要运用于工业化生产中还需要作更进一步的研究。如:固定化酶的动力学特征、固定化酶反应的扩散效应、抗蛋白质变性剂的能力以及固定化酶反应器等方面进行研究。

## 参考文献:

- [1] Ivanova V, Dobrova E, Legoy M D. Characteristics of immobilized thermostable amylases from two *Bacillus licheniformis* strains[J]. *Acte Biotechnology*, 1998, 18 (4), 339-351.
- [2] Preparation and characterization of  $\alpha$ -amylase immobilized inorganic/organic hybrid membrane using chitosan as a dispersant in the sol-gel process[J]. *Chem. Lett*, 1997, (6): 577-578.
- [3] Aksoy S, Turturk H, Hasirci N. Stability of  $\alpha$ -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate acrylic acid) microspheres [J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 60 (1-2): 37-46.
- [4] Patel S, Bagai R, Madamwar D. Stabilization of a halophilic  $\alpha$ -amylase by calcium alginate immobilization[J].

- Biocatalysis Biotransform, 1996, 14 (2), 147-155.
- [5] Ray R R, Jana S C, Nanda G. Immobilization of  $\beta$ -amylase from *Bacillus megaterium* B6 into gelatin film by crosslinking [J]. *J Appl Bacteriol*, 1995, 79 (2), 157-162.
- [6] 谷军, 杨晨敏, 王闰芝. 固定化淀粉芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶的研究[J]. *生物技术*, 1995, 5(5): 30-32.
- [7] 李笃信, 贾德民, 周萍. 聚苯乙烯阴离子交换树脂吸附交联固定  $\alpha$ -淀粉酶[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 1998, 26(8): 63-67.
- [8] 朱祥瑞, 徐俊良. 家蚕丝固定化  $\alpha$ -淀粉酶的制备及其理化特性[J]. *浙江大学学报*, 2002, 28(1): 64-69.
- [9] 蒲一涛. 对几种相关酶联合固定化初探[J]. *深圳大学学报*, 1998, 15(1): 75-80.
- [10] 陈盛, 刘艳如, 余萍. 淀粉酶的固定化及其柱式反应器研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 1996, 12(4): 75-99.
- [11] 王洪祚, 刘世勇. 酶和细胞的固定化[J]. *化学通报*, 1997, (2): 22-27.
- [12] 李伟, 孙建中, 周其云. 适用于酶包埋的高分子载体材料研究进展[J]. *功能高分子学报*, 2001, 14(3): 365-369.
- [13] 河南农业大学选编. 酶制剂工艺学[M]. 1996, 179-202, 387-394.
- [14] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992. 182.
- [15] 彭志英. 食品酶学导论[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002. 182-200.
- [16] 高岐, 周玲妹. 分析化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 150-170.
- [17] [德]B. 斯特尔马赫, 著; 钱嘉渊, 译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社出版, 1992. 25-61.
- [18] 陆兆新. 现代食品生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 200-203, 281.
- [19] 陈明木, 王春英, 庞杰, 等. 海藻酸钙凝胶特性影响因素探讨[J]. *广州食品工业科技*, 2002, 18(3): 4-6, 11.
- [20] [日]相沢孝亮, 等, 著. 酶应用手册[M]. 黄文涛, 胡学智, 译. 上海科学技术出版社出版, 1989. 1-46, 456-459.
- [21] 陈雄. 固定化糖化酶的研究[J]. *中国酿造*, 2001, (2): 19-20.

## 酚类物质及其化学修饰物抗真菌的 构效关系研究

张桂芝<sup>1</sup>, 杨世忠<sup>2</sup>, 张唯一<sup>1</sup>

(1. 新疆农业大学食品科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 华东理工大学化学与制药学院, 上海 200237)

**摘 要:** 本文选用酚类物质及一系列酚类衍生物共 30 种为供试药剂, 对果蔬采后难控制的三种致病病原真菌进行药效实验。对药剂的化学结构与抗菌性能关系进行分析, 结果表明: (1) 邻位、对位多元酚对这三种病原真菌的抑制作用比一元酚作用强, 间位多元酚的作用最弱。二元酚作用比对应三元酚强。(2) 邻位、对位二元酚中的一个羟基被羧基取代后, 其抑菌性能大大减弱。(3) 对羟基苯甲酸羧基酯化后, 极大地提高了抑菌性能, 抑菌性能最强, 当酯化烷基的碳原子数超过 7 个时(碳链长度  $\geq 7$ ) 其抗菌性能迅速降低。(4) 酚乙酰化后, 抑菌性能发生变化, 间位多元酚乙酰化后, 抑菌性能增强, 其它酚乙酰化后, 抑菌性能均有所下降。

**关键词:** 酚类物质; 化学修饰物; 构效关系; 抗菌活性

### Study on Relationship Between Chemical Structure of Phenolic Compounds and Their Derivatives on Anti-fungal Activity

ZHANG Gui-zhi<sup>1</sup>, YANG Shi-zhong<sup>2</sup>, ZHANG Wei-yi<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;  
2. College of Chemistry and Pharmacy, East China Science and Engineering University, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** The tests on effects of phenols and their derivatives were conducted on fungal. The relationship between chemical

收稿日期: 2003-06-30

作者简介: 张桂芝(1973-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为食品化学。