

专用小型粉碎机粉碎40秒钟,取出茶样粉末装盒供测。3)用色彩色差计测出三组 L^* 、 a^* 、 b^* 色度值。4)计算相应的色相角正切(b^*/a^*)、彩度(C^*_{ab})、色彩饱和度(S^*_{ab})值。5).利用相应的各套炒青绿茶测色品质数学模式,计算出各小样的品质得分,然后取其平均值,再根据等级得分标准,判断被检样的等级。

从上述的步骤来看,后期的数值计算因关联的公式、系数多,显得有些繁杂,为此可利用电脑代替人工自动处理测色信息,操作者只需从键盘输入3组测色原始数据(L^* 、 a^* 、 b^*),电子计算机自动计算处理后就打印出最后等级判定结果,这样就更加节省整个等级评定的时间,引进电脑后,一个茶样从取样开始大约15~20分钟就能得出结果。

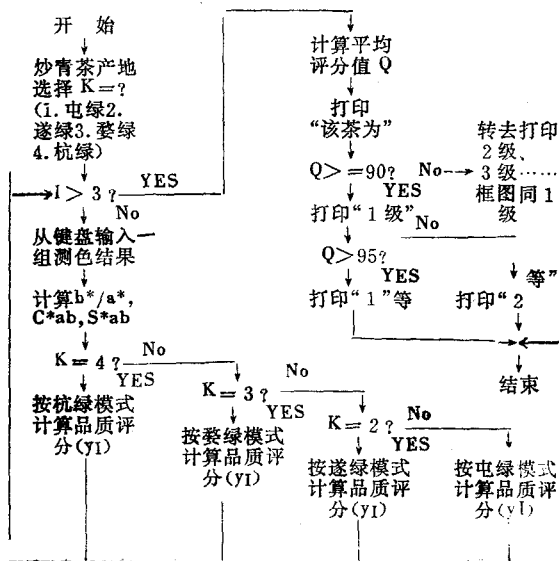


图2. 程序流程图

电脑自动处理系统使用 BASIC 算法语言,程序附后,其流程图如图2所示。

五、今后的课题

综上所述,在测色评定茶叶等级的研究中,已初步取得较好的结果,但在向实用性过渡中还有许多问题值得继续研究:

1. 进一步完善测色技术,尽可能减少测定误差,提高数据的重现性和稳定性,进一步提高模式的精度。
2. 结合感官审评数量化的研究,进一步提高品质回归方程的判别准确度。
3. 用生产样进行模式的验证
4. 结合外形因子的物理参数测试,建立测色与外形因子的加权数学模式,使炒青绿茶品质对条索的要求得到体现。

参考文献

- [1] 林刚,松久次雄(1985),日本绿茶的品质要素としての色の评价, [日]名城大学学报, 21: 27—32.
- [2] CIE(1976) Official recommendation on uniform color spaces color-difference equations and metric color terms
- [3] Robertson A R(1978) CIE guidelines for Co-ordinated research on color-difference evaluation color Research and Application, 3: 149—151.
- [4] Hunt, R.W.G.(1977) The specification of color appearance I & II color Research and Application, 2: 55—68, 2: 109—120.
- [5] Hunt R. W. G. (1978) Colour terminology color Research and Application, 3: 79—87
- [6] 纳谷嘉信(190)产业色彩学, 朝仓书店, 97—120.

淀粉和钙对微生物 α -淀粉酶热稳定性的影响

福州大学轻工系 林良贤 康健聪

摘 要

本文研究了底物浓度、变性剂、钙浓度及其存在状态,对BF7658枯草杆菌 α -淀粉酶活力和热稳定性

的影响,从而作出底物与钙和酶稳定性及其活力之定量关系。结果表明,底物浓度以1~40%范围内,酶的活力和热稳定性,同时随着底物浓度的增加而升高,酶催化反应所需的活化能均较低,其 E_a 值为

1358~4301 Cal/mol, 当底物浓度增加到50%时, 酶活力和热稳定性反而下降, 催化反应所需的活化能急剧上升, 其 E_a 值为7964 Cal/mol。

以EDTA螯合脱去 α -淀粉酶及其底物中的钙, 用原子吸收光谱法测定其脱钙前后的含钙量。比较实验得出, 反应体系中酶活力最高时所需的钙浓度为 $1.872 \times 10^{-3} M$ 。

目前我国生产的BF7658 α -淀粉酶, 含钙量较高一般为5.25mg/克酶, 底物浓度各取40%, 各以蕉芋、甘薯、木薯淀粉作底物, 反应液中钙浓度分别达: $2.385 \times 10^{-3} M$, $3.203 \times 10^{-3} M$, $1.453 \times 10^{-3} M$, 它们的数量级均达到酶活力最高时所需的钙浓度。因此, 酶法生产各类淀粉糖, 不必外加钙, 可降低 $CaCl_2$ 浓缩和精制除钙等方面的耗用。

一、引言

α -淀粉酶(EC. 3. 2. 1. 1)水解淀粉分子的 α -1,4-葡萄糖苷键, 其水解产物主要是不同聚合度的麦芽低聚糖。该酶已在食品, 酿造, 制药和纺织等工业广泛应用。

曾报道[2,8] Ca^{+2} 对常温菌 α -淀粉酶分子稳定性和酶活力是不可缺少的。在高温下底物可使某些微生物 α -淀粉酶保持稳定, 但不同微生物类型所产生的 α -淀粉酶的性质表现各异。

在高温下应用 α -淀粉酶, 工业价值较大。因此, 近年来, 探索提高酶的热稳定和动力学活性, 从嗜热菌中寻找和生产耐热性 α -淀粉酶的研究, 引人注目。

本文研究底物浓度、活化能、变性剂、钙浓度及其存在状态等因素, 对BF7658枯草杆菌 α -淀粉酶热稳定性及其活力的影响。

二、材料和方法

(一)、材料

1, 酶制剂: BF7658枯草杆菌 α -淀粉酶(α -1,4-glucan 4-glucanohydroase, EC. 3. 2. 1. 1), 无锡酶制剂厂生产, 经测定酶活性为1556单位/克酶。

2, 底物: 蕉芋(*Canna edulis*)淀粉, 产地: 闽清县; 可溶淀粉, CP级。

3, 试剂: 化学试剂均用分析纯。

4, 仪器: 501型超级恒温器 $\pm 0.5^\circ C$; TG328B电光分析天平, 进口透析膜, WTD—Y₂型原子吸收分光光度计, 25型酸度计。

(二)、方法

1, 底物处理

蕉芋淀粉 \rightarrow 研磨 \rightarrow 过筛(0.5mm孔径) \rightarrow 清水洗、过滤去杂 \rightarrow 静置沉淀, 去上清液 \rightarrow 沉淀加水搅匀 \rightarrow NaOH调pH \rightarrow 浸泡24小时 \rightarrow 倾去碱液, 清水至pH7.0 \rightarrow 蒸馏水洗涤 \rightarrow 晒后烘干备用。

2, 底物脱钙

取一定量经处理的蕉芋淀粉 \rightarrow 用0.2M EDTA溶液溶解 \rightarrow 在60rpm搅拌器中搅拌2小时 \rightarrow 静置, 沉淀, 倾去清液 \rightarrow 蒸馏水多次洗涤, 静置, 沉淀, 倾去清液 \rightarrow 再用0.2M EDTA溶液清洗, 60rpm搅拌2小时 \rightarrow 静置, 沉淀, 倾去清液 \rightarrow 连续用蒸馏水清洗15次, 静置, 沉淀, 倾去清液 \rightarrow 晒后, 烘干 \rightarrow 置干燥器中备用。

3, 酶脱钙

取一定量酶 \rightarrow pH6.0缓冲液溶解 \rightarrow 在3000rpm离心机中离心沉淀20分钟 \rightarrow 收集酶清液, 测活力 \rightarrow 取两份等量酶液, 一份加入EDTA溶液, 配成 $10^{-2} M$ 另加一份加等量毫升数的缓冲液 \rightarrow 各注40ml于透析袋中, 浸于盛有1000ml蒸馏水的烧杯中 \rightarrow 在4 $^\circ C$ 冰箱中, 每8小时更换一次膜外部蒸馏水, 进行透析脱钙7天, 从而获得脱钙酶和对照酶, 测酶力, 即行实验。

4, 钙元素测定

精确称取样品于坩锅中 \rightarrow 炭化(液体样品先蒸干再炭化) \rightarrow 灰化(500 $^\circ C$, 24小时) \rightarrow 冷却后加入15ml1:1盐酸溶液, 加热溶解 \rightarrow 冷却, 过滤 \rightarrow 加入0.3%氯化锶溶液(整个体系), 以消除干扰, 定容 \rightarrow 用WFD—Y₂型原子吸收分光光度计测定其吸光值[1] \rightarrow 另作标准工作曲线, 从曲线中求得试样中含钙量, 从而换算成原试样中钙元素的含量。此项工作在省中心检验所进行。

5, 酶活力测定

按轻工部部颁标准测定。

三、结果与分析

(一)、底物浓度对 α -淀粉酶热稳定性的影响

本实验以酶催化反应的最适温度来阐明酶的热稳定性。

配制 1%, 10%, 25%, 40%, 50% 不同浓度的可溶性淀粉溶液 (W/V), 于沸水浴中糊化, 调 pH6.0 (柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液), 按 8 单位/克淀粉加酶, 分别于不同温度水解, 达到碘色终点时, 求出酶的相对活力, 对反应温度作图, 结果见图 1。

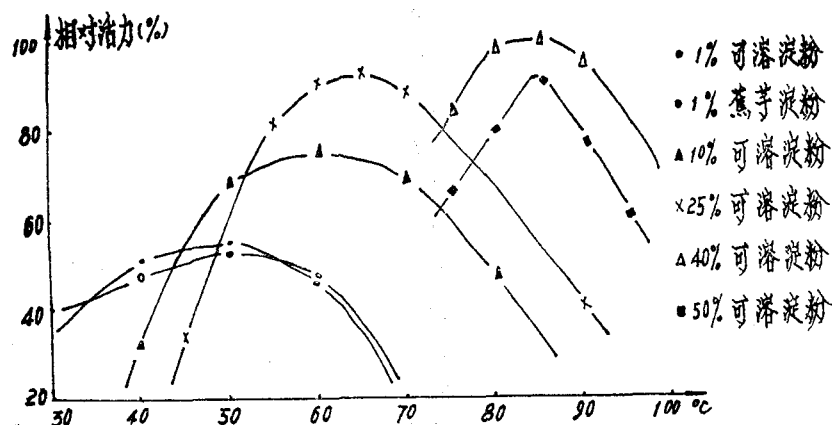


图 1 底物浓度对酶活力与反应温度关系

曲线表明, α -淀粉酶催化反应的最适温度范围, 随底物浓度和温度的提高而变窄; 底物浓度从 1~40% 范围内, 酶催化反应的最适温度, 随底物浓度的增加而升高; 酶的活力与底物浓度关系亦然。由此证明, 高浓度底物同时提高了酶的活力和酶的热稳定性。根据酶的催化机制分析, 提高底物浓度, 增加酶与反应物之间的定向碰撞机率, 促进酶催化反应效率; α -淀粉酶富含亲水性氨基酸—占氨基酸组份的 37% [2] 亲水性氨基酸侧链的 $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ 与淀粉分子的一 OH 形成氢键, 由于氢键对酶构象起稳定作用, 从而加强酶在高温条件下的热稳定性。

然而, 当底物浓度提高到 50% 时, 酶的热稳定性和活力反而下降。为此, 我们作如下分析:

根据阿累尼乌斯 (Arrhenius) 方程:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

经推导得如下公式: [3]

$$E_a = \frac{2.3RT_2T_1 \lg Q_{10}}{10}$$

式中: E_a : 为活化能

R : 为气体常数

T : 为绝对温度

Q : 为酶促反应的温度系数即温度升高 10°C 时, 酶反应速度增加的倍数。

在本实验的条件下, 取酶作用最适温度为 T_2 , Q_{10} 就等于酶在最适温度时的相对活力与低于最适温度 10°C 时 (T_1), 酶的相对活力的比值。

据此, 可以将实验所得数据由公式求出 Q_{10} 和活化能, 以活化能 E_a 值对底物浓度 [3] 值作图, 得图 2 曲线。

曲线说明, 底物浓度在 1~40% 范围内 α -淀粉酶催化反应所需活化能较低, 其 E_a 值为 $1358 \sim 4301 \text{ Cal/mol}$; 当底物浓度增加到 50% 时, 酶催化反应所需活化能急剧升高,

其 E_a 值为 7964 Cal/mol , 以致酶促反应在 85°C 的条件, 酶的相对活力下降。

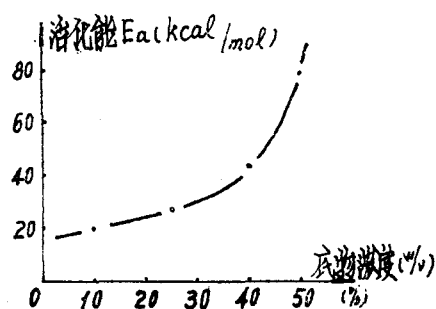


图 2 活化能与底物浓度关系曲线

(二) 底物浓度对酶变性剂的影响

曾有报道 [2,4] 尿素为 α -淀粉酶的变性剂, 它能使酶分子结构松弛而降低其热稳定性。

本实验从底物对抗变性剂的效果, 了解底物浓度对酶热稳定性的影响。分别配制两组

1%, 10%可溶性淀粉溶液, 其中一组反应液的尿素浓度为1 M, 其它条件同上述实验。测定酶的 T_m 值(即酶活性丧失50%时所对应的温度), 了解 T_m 值变化与底物浓度和变性剂相关性, 结果如下表。

底物浓度和尿素与 T_m 值关系

淀粉浓度 (%)	T_m	
	尿素 0M	尿素 1M
1	67°C	57°C
10	82°C	80°C

表中数值说明, 反应液存在尿素时 T_m 值均下降, 提高底物浓度, 无论尿素存在与否, T_m 值均显著上升, 尿素 1 M 时, 10% 底物浓度酶的 T_m 值比 1% 的 T_m 值高 23°C。从提高底物浓度对酶抗变性剂的效果, 充分说明对酶热稳定性作用。据认为尿素致酶变性的作用机制, 是导致酶分子中氢键断裂, 破坏疏水的非极性相互作用。由此推测, 底物对酶抗变性剂的效应, 是由于底物对酶的构象具有保护作用。

(三) 提高底物浓度和外加钙对酶的热稳定性的比较

配制 10%, 25% 淀粉溶液和含 $10^{-2}M CaCl_2$ 的 10% 淀粉液, 其他条件同上述实验, 测定酶活力与温度关系, 结果如图 3。

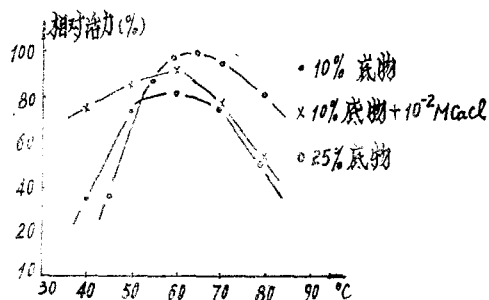


图3 底物浓度和外加钙对酶活力和温度关系曲线

曲线表示, 外加钙的作用, 只能提高酶原来作用温度点(即最适温度)下的活力, 而增加底物浓度, 既可提高酶的最适温度点(提高5°C), 又可提高酶的活力(提高18%)。

(四) 酶和底物中的 Ca^{2+} 对酶热稳定性的影响

α -淀粉酶是一种金属酶。据有关报道[2,5]

枯草杆菌(常温菌) α -淀粉酶和3个钙离子结合。 Ca^{2+} 保持酶分结构稳定性及其活性的出现是必须的。

实验采用经处理后的对照酶和脱钙酶, 两者各在不同温度下加热5分钟, 于pH6.0, 50°C, 分别水解同浓度的蕉芋淀粉和脱钙蕉芋淀粉(经测定蕉芋淀粉含钙量为0.213mg/克淀粉; 脱钙蕉芋淀粉含钙量为0.024mg/克淀粉), 测定酶的残余活力, 相对温度作图, 见图4。

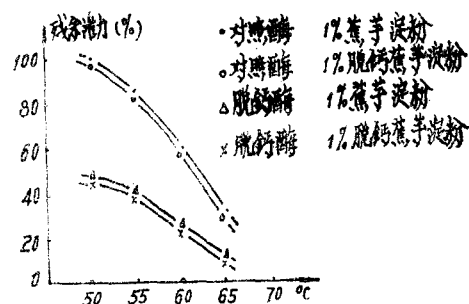


图4 酶和底物中的 Ca^{2+} 对酶活力~温度关系曲线

从曲线中可以看出, 脱钙酶的残余活性远低于对照酶的残余活性。两者在同样条件下, 分别水解蕉芋淀粉和脱钙蕉芋淀粉, 虽然前者含钙量比后者约高10倍, 但酶的残余活力仅高3%。这种现象表明, 钙对酶分子的稳定化及其活力的影响, 主要决定于酶制剂中含钙量, 而底物中的钙仅起补充作用。据 Sukan, Brich 报告[6], 淀粉分子对钙存在静电离子吸附和离子交换吸附, 后者是由钙离子与酯化磷酸盐基团结合, 而后再与淀粉分子结合。而且在酸性条件下淀粉分子的钙可被质子取代。在本实验条件下 pH6.0, 使钙的利用率降低。

(五) 酶催化反应所需钙浓度的探讨

采用 1% 浓度(W/V)的脱钙蕉芋淀粉为底物, 取上述实验的对照酶和脱钙酶, 在 pH6.1, 50°C下, 分别加入不同浓度的 $CaCl_2$ 溶液, 反应到终点, 测定酶的相对活性, 对 $CaCl_2$ 浓度作图, 结果示于图5曲线。

曲线表明: ①外加钙达 $1.86 \times 10^{-3}M$ 时, 对照酶活性提高10%, 脱钙酶仅5%。当外加钙浓度超过 $1.86 \times 10^{-1}M$ 时, 对照酶和脱钙酶均迅速失活。对照酶的结果与作者前文一致。②

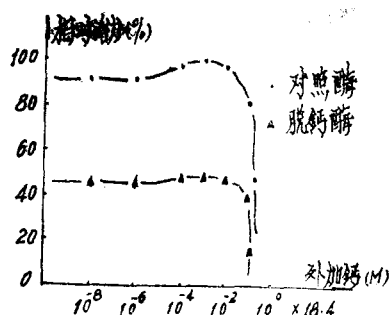


图5 酶活力与外加钙关系曲线

脱钙酶的最高活性仅为对照酶的49%。这说明外加钙不能完全恢复脱钙酶的活力。

有关文献^[7]报导,用超滤实验表明,Ca提高大分子 α -淀粉酶的稳定性,在除 Ca^{2+} 之后,则成为分子量较小的低活性的 α -淀粉酶。Roby和Ackerman的研究认为枯草杆菌 α -淀粉酶是寡聚体,也有单体形式,分子量较高的三聚体、四聚体的比活力高于分子量较小的二聚体和单体。

本实验用EDTA螯合脱去酶分子中的 Ca^{2+} 后,可能导致酶分子发生部分解聚而降低其活力。

基于以上实验,用原子吸收光谱法测定底物和酶的含钙量,加上外加钙量,换算成酶反应体系中酶活力最高时的钙浓度为 $1.872 \times 10^{-3} \text{M}$ (包括淀粉分子中的结合钙)。

据认为未提纯酶的钙,可使微生物 α 淀粉酶稳定化。经测定BF7658 α -淀粉酶工业制剂含 Ca^{2+} 量较高,每克酶含5.25mg Ca^{2+} 。当底物浓度各取40%,加酶8单位/克淀粉,计算反应体系中 Ca^{2+} 浓度分别为:蕉淀粉作底物的钙浓度为 $2.385 \times 10^{-3} \text{M}$,甘薯为 $3.203 \times 10^{-3} \text{M}$,木薯为 $1.453 \times 10^{-3} \text{M}$ 。三者的数量级均达到酶活力最高时所需要的钙浓度。因此,采用上述原料酶法生产各类淀粉糖,不必外加钙。这样,既可节省 CaCl_2 ,又可降低产物在浓缩时的能

量和减轻产物精制过程除 Ca^{2+} 耗用。

四、结语

(一)BF7658枯草杆菌 α -淀粉酶的热稳定性及其活力,随酶的底物浓度(1~40%)的增加而升高,而且酶催化反应所需活化能均较低。当底物浓度提高到50%时,酶催化反应所需活化能急剧上升,使酶的热稳定性和活力下降。

变性剂——尿素使 α -淀粉酶的热稳定性降低,增加底物浓度可加强酶抗变性剂的作用,10%底物浓度的 T_m 值比1%的 T_m 值高 23°C 。

(二)钙对 α -淀粉酶的热稳定性和酶活力的影响,主要取决于酶制剂中的钙含量,底物结合钙仅起补充作用。酶制剂中的钙用EDTA螯合脱去后,外加钙不能完全恢复酶活力。

(三)在本实验条件下, α -淀粉酶活力最高时所需的钙浓度为 $1.872 \times 10^{-3} \text{M}$ 。目前生产的BF7658 α -淀粉酶含钙量较高,每克酶制剂含钙量为5.25mg左右,采用该酶在高浓度底物(40%)和高温(85°C)下,可满足酶催化反应的需钙量,生产各类淀粉糖不必外加钙。

参考文献

- [1] (日)武内次,铃木正己著:原子吸收分光光度分析,王玉删等译 科学出版社1975
- [2] 应用微生物 1976.1 P18~23 谢其明译自《蛋白质、核酸、酵素》vol.20No1.199~204(1975)
- [3] 陶慰孙等 蛋白质分子基础,人民教育出版社1981
- [4] Kyok ogasahara etc The Journal of Biochemistry, vol. 67No 1 (1970)
- [5] A. Imanishi J. Biochem vol. 60, No4 381(1966)
- [6] G. Sukan etc Starch/starke vol. 31(1979)No 4. s 125-128
- [7] K. L. Kindle App. Biochem Biotechn. 1983. 8. 157~170