

# 糖化酶型时间-温度指示器反应体系的制备

郑光临, 钱 静\*, 冯 钦  
(江南大学机械工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 利用糖化酶与淀粉的水解反应, 以碘液为指示剂, 通过颜色变化可以显示时间和温度的累积效应。确定糖化酶型时间-温度指示器反应体系的参数为: 以10mL质量浓度40g/L的麦芽糊精为反应底物, 3mL质量浓度为1g/L的碘液, 糖化酶的加入量是可变的。该时间-温度指示器可应用于冷链运输时间不同的产品。加酶量为50 $\mu$ L的反应体系适用于3~4d的4℃左右的低温温控包装中, 通过测定其在不同温度条件下的反应速率, 确定该反应体系的活化能为75.94kJ/mol。该体系可以应用于因脂肪氧化而造成质量损失的冷鲜肉等产品。

**关键词:** 时间-温度指示器; 糖化酶; 冷链运输; 活化能; 脂肪氧化

## Preparation of Time-Temperature Indicator Reaction System Based on Glucoamylase

ZHENG Guang-lin, QIAN Jing\*, FENG Qin  
(School of Mechanical Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Color changes occurring during the course of reaction between glucoamylase and starch in the presence of iodine solution as an indicator display the cumulative effects of time and temperature. A time-temperature indicator reaction system was developed with 10 mL of 40 g/L maltodextrin as reaction substrate, 3 mL of 1 g/L iodine solution and variable amounts of glucoamylase. The time-temperature indicator was widely applicable for products at different times of cold chain transportation. The reaction system with 50  $\mu$ L of glucoamylase was suitable for low temperature controlled packaging for 3 to 4 d at about 4  $^{\circ}$ C, and the activation energy was found to be 75.94 kJ/mol. This system had potential application for chilled fresh meat, which is vulnerable to quality deterioration caused by lipid peroxidation.

**Key words:** time-temperature indicator; glucoamylase; cold chain transportation; activation energy; lipid oxidation

中图分类号: TS205

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)12-0082-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201312017

随着科学技术的进步、制冷技术的发展, 冷链物流得到了快速的发展。对于冷链运输的产品来说, 其质量除受其自身组成等内部因素影响外, 还受温度、光照、压力等外部环境条件的影响, 其中冷链温度的影响往往是最主要的。若存放温度高于要求温度, 往往会导致食品虽然还处于保质期内, 但是食品品质已经发生劣变; 反之, 若存放温度低于要求温度, 在到达保质期时, 优质的食品便会被认为已变质而遭丢弃, 从而导致浪费。因此, 需要采取一种有效的手段来监控产品在流通过程中的时间和温度的累积, 同时指示产品的质量信息, 提供产品的剩余货架期的信息。在这种情况下, 时间-温度指示剂/器(time temperature indicator/integrator, TTI)便应运而生。TTI作为包装的一部分, 可呈现出易于识别且与时间及温度相关的不可逆变化, 这种变化通常表现为机械变形或者是颜色的变化, 从而反映出被监测产品的温度累积, 达到监测食品质量的目的<sup>[1-3]</sup>。

在国外, TTI已经广泛应用的到冷链运输的产品中, 如冷冻鱼<sup>[4-5]</sup>、冷藏水果<sup>[6]</sup>、冷藏蔬菜<sup>[7]</sup>、冷冻肉<sup>[8-10]</sup>等。而国内对TTI的研究还处于起步阶段, 成果较少。2009年, 徐幸莲等<sup>[11]</sup>开发了专利CN101349599A, 利用的是碱性脂肪酶与底物三乙酸甘油酯的水解反应。蔡华伟<sup>[12]</sup>发布的专利CN101055255A, 利用的是淀粉酶与淀粉水解反应, 以碘为指示剂, 通过颜色变化显示时间、温度的累积<sup>[12-16]</sup>。

在4℃条件下, 蔡华伟<sup>[12]</sup>研究的淀粉酶型TTI可指示的食品货架期在2~10个月范围内, 属于长期监测; 而徐幸莲等<sup>[11]</sup>研究的碱性脂肪酶型TTI的监测时间则只有2d左右。本研究研制的时间-温度指示器则是针对4℃条件下贮藏时间在4d左右的产品。基本原理是利用糖化酶在液体体系中水解麦芽糊精, 以碘为指示剂, 利用颜色由深紫到无色的变化指示产品的新鲜程度。

收稿日期: 2012-03-12

作者简介: 郑光临(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为运输包装。E-mail: zheng\_guanglin@126.com

\*通信作者: 钱静(1968—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为运输包装。E-mail: qj639@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1号糖化酶(100000U/mL) 无锡杰成科技有限公司; 2号糖化酶(100000U/mL) 无锡杰能科生物工程有限公司; 3号糖化酶(149000U/mL) 无锡赛德生物工程有限公司; 麦芽糊精 罗盖特(中国)精细化工有限公司; 碘、碘化钾、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠 国药集团化学试剂有限公司。

缓冲液的配制: 取2.2g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 6.84g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 加水配制成1L的pH6.0的缓冲液。

碘液的配制: 取0.5g碘、1g碘化钾, 再加入100mL蒸馏水, 搅拌至碘颗粒完全溶解, 即得到5g/L的碘溶液。待使用时, 稀释处理即可得到1g/L的碘液。

### 1.2 仪器与设备

UV-2802型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; SPX-150B-Z型生物培养箱 上海博迅实业有限公司; 电脑恒温层析柜 上海沪西分析仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 糖化酶的选择

虽然都是糖化酶, 但由于来源不同、酶活不同、作用机理不同等原因, 使其在与麦芽糊精反应的过程中, 呈现出不一样的变化, 如变色时间不同, 颜色变化过程中不同阶段颜色的差别明显程度不同。实验中准备了产自不同公司的3种糖化酶, 向装有10mL 10g/L麦芽糊精, 3mL 1g/L碘液的试管中分别加入1、2、3号酶各50 $\mu\text{L}$ , 每组设3个平行, 混匀测体系的初始吸光度, 然后4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 每24h测一次反应体系的吸光度。

#### 1.3.2 底物质量浓度的确定

在碘的质量浓度为1g/L、用量为3mL, 麦芽糊精用量为10mL的条件下, 通过吸光度的测量及实验过程中对颜色的观察, 得到底物质量浓度的大致范围为10~50g/L之间。

配制10、20、30、40、50g/L 5个质量浓度的麦芽糊精溶液, 各取10mL加入到试管中, 然后各加入3mL 1g/L碘液, 以及50 $\mu\text{L}$ 的1号酶, 后续操作同1.3.1节。

#### 1.3.3 酶用量的确定

分别向装有10mL 40g/L麦芽糊精, 3mL 1g/L碘液的试管中加10、30、50、75 $\mu\text{L}$ 的1号糖化酶, 后续操作同1.3.1节。

#### 1.3.4 温度与反应体系变色时间的关系及动力学参数的确定

取9支试管, 各加入10mL 40g/L的麦芽糊精, 3mL 1g/L的碘液, 及50 $\mu\text{L}$ 的1号糖化酶, 每3支作为一组, 分别放置于4、20、37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中反应, 每隔一段时间测一次吸光度, 绘制吸光度随时间变化的曲线。

根据Taoukis等<sup>[17]</sup>对TTI的动力学描述, TTI体系的吸

光度 $x$ 可以用如下方程表示:

$$F(x)=kt$$

式中:  $F(x)$ 为TTI的响应方程;  $t$ 为时间/h;  $k$ 为表观反应速率常数/h $^{-1}$ 。

方程可由实验测得的 $x$ 值与时间 $t$ 进行拟合得到, 通过拟合方程可以得到表观反应速率常数 $k$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 糖化酶的选择

在不同糖化酶的作用下, 各TTI反应体系的反应速率是不同的, 变色过程也会有所不同。由于TTI是用来指示食品新鲜程度的, 所以在这里选取反应速率适中且变色阶段性明显的糖化酶作为TTI体系的反应物。

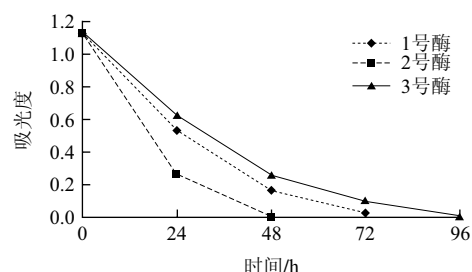


图1 不同糖化酶作用下反应体系的吸光度与反应时间的关系图

Fig.1 Temporal evolution of the absorbance of reaction systems with different types of glucoamylase

从图1可以看出, 2号酶的反应速率要远快于1号和3号酶, 吸光度在48h时已趋于零。反应速率太快, 会导致颜色的渐变过程不容易被观察到, 因此, 排除2号酶。对于1号酶和3号酶, 虽然反应速率比较接近, 但是在反应过程中颜色的变化方面, 1号酶更符合的要求。1号酶的变色历程为: 深蓝、深紫、亮紫、浅紫、粉色、无色; 而3号酶在整个反应过程中颜色一直比较灰暗, 大致经历了深蓝、灰紫、暗粉、无色这样一个过程, 这些颜色对识别食品的新鲜程度不够明显。因此, 选择1号酶作为反应物。

### 2.2 底物质量浓度的确定

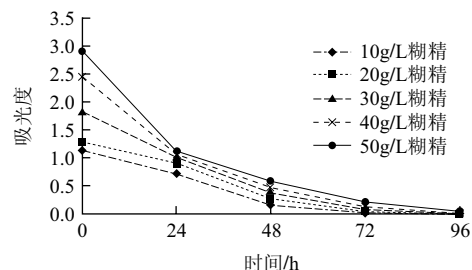


图2 不同糊精质量浓度下反应体系吸光度与时间的关系图

Fig.2 Temporal evolution of the absorbance of reaction systems with different concentrations of maltodextrin

由图2可知,各质量浓度下TTI反应体系的反应速率的趋势是基本一致的,反应刚开始的时候速率较快,之后会慢慢趋于平稳。这是由于酶反应的速率与底物质量浓度有关,底物质量浓度越大,反应速率就越快。

随着糖化酶与糊精水解反应的进行,最终溶液会趋向于无色透明,即吸光度趋近于0。欲使反应过程中呈现出明显的色彩变化,需将初始颜色加深,即初始吸光度较大。在图2中,糊精质量浓度为40g/L的初始吸光度约为2.5,50g/L的初始吸光度约为2.9,较其他质量浓度的初始吸光度要大很多,这就为后续的吸光度降低提供了空间,即整个过程中吸光度的变化幅度会比较大。从图2还可以看出,反应进行到24h后,这两个质量浓度的吸光度就开始比较接近了,而初始颜色的微小差别肉眼是识别不出的,本着节约成本的角度综合考虑,将该糖化酶型时间-温度指示器的底物质量浓度定为40g/L。

### 2.3 酶用量的确定

加酶量不同,体系反应的时间会有所不同,即指示时间不同,这样就可以应用于冷链运输时间不同的产品。根据所测吸光度,绘制不同加酶量下吸光度随时间变化的曲线,如图3所示。

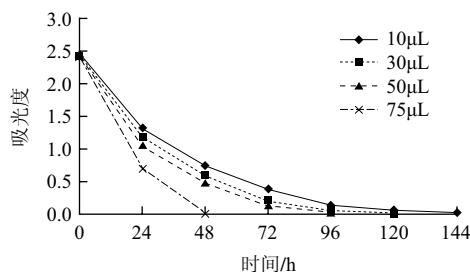


图3 不同酶用量下反应体系吸光度与时间的关系图

Fig.3 Temporal evolution of the absorbance of reaction systems with different doses of glucoamylase

随着酶用量的增加,反应速率逐渐加快,达到反应终点的时间逐渐变短。加酶量与指示时间的对应关系如表1所示。在酶用量为75μL时,指示时间仅为48h;而酶用量为50μL时,指示时间则为96h,是75μL时指示时间的两倍,可见加酶量的多少对指示时间的长短影响显著。

表1 加酶量与指示时间的对应关系

Table 1 Relationship of enzyme dose with indication time

加酶量/μL	10	30	50	75
指示时间/h	144	120	96	48

由表1可知,对于4℃条件下4d左右的低温温控包装来说,可以选用加酶量为50μL的反应体系。根据该时间-温度指示器颜色的变化,可以方便地监测食品在流通过程中的质量状况。例如,若TTI的颜色显示为深紫色,

则说明食品一直处于低温的环境下,新鲜度依然很好;而如果TTI的颜色呈现为浅粉色,那就表明食品已经处于变质的边缘,营养流失较严重。

### 2.4 温度与反应体系变色时间的关系及动力学参数的确定

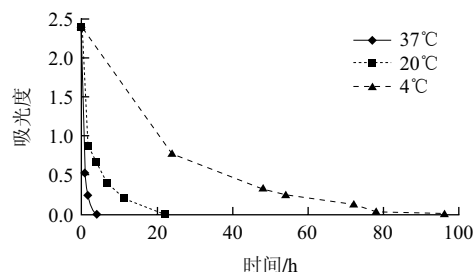


图4 不同温度条件下TTI的吸光度与时间的关系图

Fig.4 Temporal evolution of the absorbance of reaction systems at different temperatures

由图4可知,随温度的升高反应速度加快,且反应的变化趋势呈指数形式。对图4的曲线进行指数函数的拟合,得到反应速率和对应的相关系数如表2所示。

表2 不同温度下体系的反应速率*k*和拟合曲线的相关系数

Table 2 Reaction rate constants (*k*) and correlation coefficients (*r*) of fitted curves for reaction systems at different temperatures

<i>T</i> /K	<i>k</i> /h <sup>-1</sup>	<i>r</i>
277(4℃)	0.05	0.965
293(20℃)	0.19	0.982
310(37℃)	1.25	0.981

从表2可以看出,*r*都大于0.96,这表明TTI模型模拟函数与TTI响应值有很好的相关性。

酶催化反应中温度对反应速率的影响遵循Arrhenius公式<sup>[18]</sup>:

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT$$

式中:*k*为反应的速率常数/h<sup>-1</sup>; *k*<sub>0</sub>为指前因子(对于指定反应是一个常数)/h<sup>-1</sup>; *R*为摩尔气体常数(J/(K·mol)); *T*为热力学温度/K; *E*<sub>a</sub>为活化能/(kJ/mol)。

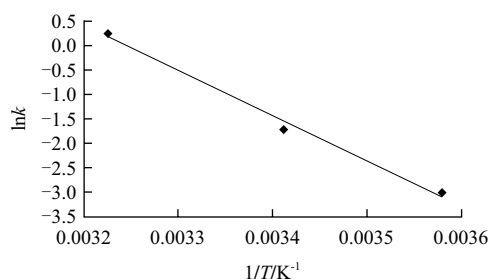


图5 TTI的反应速率与温度关系图

Fig.5 Reaction rate vs. temperature plot

以ln*k*对1/*T*作图得到一条直线,如图5所示。由直线的斜率可求得活化能*E*<sub>a</sub>=75.94kJ/mol。根据引起食品质量下降的主要反应的活化能(表3),可以判断出该时间-温度指示器可以应用于因脂肪氧化而造成的食品质量损失。

表3 食品质量损失的典型活化能值

Table 3 Typical activation energy values for food quality deterioration

食品质量损失	典型活化能值
扩散控制	0~15kcal/mol(0~62.76kJ/mol)
酶反应	10~15kcal/mol(41.84~62.76kJ/mol)
脂肪氧化	10~25kcal/mol(41.84~104.6kJ/mol)
营养损失	20~30kcal/mol(83.68~125.52kJ/mol)
非酶褐变	25~50kcal/mol(104.6~209.2kJ/mol)
微生物增长	20~60kcal/mol(83.68~251.04kJ/mol)
芽孢致死	60~80kcal/mol(251.04~334.72kJ/mol)
植物细胞破坏	50~150kcal/mol(209.2~627.6kJ/mol)

冷鲜肉是低温流通中主要因脂肪氧化而发生腐败的典型<sup>[19-21]</sup>。通过测其不同温度下脂肪氧化的速率,根据Arrhenius公式可以推得冷鲜肉因脂肪氧化而腐败的活化能为65.72kJ/mol。根据TTI预测食品货架寿命的匹配原则,只要食品与TTI的活化能差值小于25kJ/mol,就可以将TTI应用到该产品上。因此,从理论角度看,该糖化酶型TTI可以用来指示冷鲜肉的新鲜程度。

### 3 结论与讨论

本实验确定了该糖化酶型时间-温度指示器反应体系的组成:质量浓度为40g/L的麦芽糊精10mL,质量浓度为1g/L的碘液3mL,糖化酶的加入量是可变的,因此可以将该时间-温度指示器应用于冷链运输时间不同的产品。结果表明,加酶量为50μL的反应体系适用于3~4d的4℃左右的低温温控包装中,随温度和时间变化,体系的颜色呈现出良好的规律性变化,能反映出时间-温度的累积。通过测定该反应体系在不同温度条件下的反应速率,确定其活化能为75.94kJ/mol,而对于该时间-温度指示器是否能够很好地指示因脂肪氧化而导致食品变质的产品,TTI的指示时间与冷鲜肉的变质过程是否相一致,还有待做进一步的验证。

由于固态的时间-温度指示器要比液态的更实用稳定一些,所以今后还需做进一步的研究来考虑将反应体系固定化。此外,酶的活性问题对于时间-温度指示器的精确性也至关重要,因此,有必要将如何保持酶活性的问题纳入今后的研究内容。

### 参考文献:

- [1] WANIHSUKSOMBAT C, HONGTRAKUL V, SUPPAKUL P. Development and characterization of a prototype of a lactic-acid-based time-temperature indicator for monitoring food product quality[D]. Thailand: Kasetsart University, 2010.
- [2] SHIMONI E, ANDERSON E M, LABUZA T P. Reliability of time temperature indicators under temperature abuse[J]. Food Engineering and Physical Properties, 2001, 66(9): 1337-1340.
- [3] 田秋实, 谢晶. 时间温度指示剂的发展现状[J]. 渔业现代化, 2009, 36(6): 50-52.
- [4] TINKER J H, SLAVIN J W, LEARSON R J, et al. Evaluation of automated time-temperature monitoring system in measuring the freshness of chilled fish[J]. IIF-IIR Commissions C2, D3 4, 1985, 2(34): 286-290.
- [5] MENDOZA T F, WEIT B A, OTWEI S, et al. Kinetic parameter estimation of time-temperature integrators intended for use with packaged fresh seafood[J]. J Food Sci, 2004, 69(3): 90-96.
- [6] SINGH R P, WELLS J H. Monitoring quality changes in stored frozen strawberries with time-temperature indicators[J]. Refrig, 1987, 10(5): 296-300.
- [7] GIANNAKOUREOU M C, TAOUKIS P S. Systematic application of time temperature integrators as tools for control of frozen vegetable quality[J]. J Food Sci, 2002, 67(6): 2221-2228.
- [8] RODRIGUEZ N, ZARITZKI N E. Development of time temperature integrator indicator for frozen beef[J]. J Food Sci, 1983, 48(5): 1526-1531.
- [9] SINGH R P, WELLS J H. Use of time-temperature indicators to monitor quality of frozen hamburger[J]. Food Technology, 1985, 39(12): 42-50.
- [10] YOON S H, LEE C H, KIM D Y, et al. Time-temperature indicator using phospholipid-phospholipase system and application to storage of frozen pork[J]. J Food Sci, 1994, 59(3): 490-493.
- [11] 江南大学. 基于脂肪酶反应扩散的时间温度指示器的制备方法和应用: 中国, CN201110023063.5[P]. 2011-09-07.
- [12] 蔡华伟. 淀粉酶时间温度指示卡的研制与开发[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [13] 任发政, 蔡华伟, 张恒涛, 等. 一种酶学时间温度指示卡的制作方法: 中国, 101055255[P]. 2007-10-17.
- [14] SUN Yan, CAI Huawei, ZHENG Limin, et al. Development and characterization of a new amylase type time-temperature indicator[J]. Food Control, 2008, 19(3): 315-319.
- [15] 任发政, 蔡华伟. 时间-温度指示卡的研究与应用[J]. 肉类研究, 2006, 20(2): 49-52.
- [16] 蔡华伟, 任发政, 张恒涛, 等. 淀粉酶型时间-温度指示卡的研制[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 60-63.
- [17] TAOUKIS P S, LABUZA T P. Applicability of time temperature indicators as shelf-life monitors of food products[J]. J Food Sci, 1989, 54(4): 783-788.
- [18] 佟懿, 谢晶. 时间-温度指示器响应动力学模型的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(22): 9341-9343; 9348.
- [19] 霍晓娜, 李兴民, 谢辉, 等. 天然抗氧化剂对控制猪肉脂肪氧化及保鲜效果研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 145-148.
- [20] 霍晓娜, 李兴民, 南庆贤, 等. 不同包装形式和复合天然抗氧化剂对猪肉脂肪氧化的影响[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 240-244.
- [21] 李新, 林若泰, 熊光权, 等. 冷鲜肉辐照异味和脂肪氧化控制技术的研究[J]. 核农学报, 2010, 24(5): 1001-1005.