

糖化酶制剂辐照性能研究

陈如燕 蓝俊明 鄢尤奇 陶 璨

(湖南省原子能农业应用研究所, 长沙410125)

李世玠 宋良毕

(湖南省津市酶制剂厂, 湖南津市415400)

摘要 研究了工业糖化酶制剂经辐照处理后各项性能的变化。结果表明, 经2 kGy以下剂量的 γ 射线处理后, 可提高其贮存稳定性, 改善卫生品质, 不影响其正常使用。

关键词 糖化酶, γ 辐照, 糖化酶, 酶活性

糖化酶制剂是重要的工业酶制剂之一, 它大量用于制糖、酿造、食品加工及日化工业。我国目前的酶制剂产品, 存在活性保存率低和微生物含量偏高的问题, 阻碍了酶制剂产品质量的提高。为了解决上述两个问题, 我国酶制剂行业将酶液经盐析、烘干成粉状保存。这样处理, 虽然在贮存、包装及运输上带来一定的好处, 但盐析过程带入硫酸铵等无机盐杂质, 使产品纯度下降, 且微生物含量仍常常超标, 因此这种酶制剂属粗酶档次。本文将辐射技术引入酶制剂生产, 通过 γ 射线辐照酶制剂, 能改变酶分子构象, 稳定酶液pH值, 排除其它微生物的破坏干扰, 这样既能提高酶制剂贮存稳定性, 又改善其卫生品质。

实 验

1. 材料

液体和固体糖化酶制剂的活性分别为5万单位/ml和4万单位/g左右, 均由湖南省津市酶制剂厂提供。

2. 辐照

酶制剂在常温、常压下经 ^{60}Co γ 射线辐照, 吸收剂量率约16 Gy/min。

3. 贮存

液体糖化酶制剂由玻璃磨口瓶和小塑料桶贮存, 固体糖化酶制剂用薄膜塑料袋贮存, 定期观测其活性变化。

4. 微生物分析和酶活性测量

湖南农学院食品检测站和微生物教研室作微生物分析。根据我国标准局颁布的方法^[1], 湖南省原子能农业应用研究所和湖南津市酶制剂厂共同检测了酶活性。

结 果 和 讨 论

1. 辐照糖化酶制剂的贮存稳定性

表1、表2分别列出了辐照处理液体和固体糖化酶制剂, 经各段贮存期后测得的酶活性保存

Tab 1. Activity preservation period(%) of glucoamylase liquid preparations

Absorbed dose (kGy)	Preservation time (d), 1.2 Gy/min				Preservation time (d), 16 Gy/min			
	14	102	210	371	14	102	210	371
0	96.9	93.3	78.8	74.5	98.7	89.7	78.4	79.2
0.025	98.7	97.8	84.8		93.1	94.2	83.9	
0.05	98.7	100.00	84.8		98.7	98.7	80.2	77.3
0.10	98.7	99.6	78.4	81.0	96.9	86.1	81.3	
0.21	97.8	100.00	83.9		96.9	89.7	90.3	
0.40	96.9	98.7	91.3		98.7	86.1	93.1	81.9
0.80	94.1	92.4	89.4		94.1	87.9	91.3	
1.00	95.9	93.3	91.3	81.0	99.7	86.1	91.3	
1.25	92.7	95.1	92.2		98.7	86.1	91.3	
1.75	95.9	94.2	91.3		98.7	86.1	91.3	

率结果。活性保存率是指辐照样品和对照样品的酶活性与该酶制剂出厂时,测得的酶活性之比。

由表1可见,液体糖化酶制剂在贮存14 d和102 d后,辐照样品和对照样品的活性保存率无显著差异,均保持较高数值;但贮存210 d后,辐照样品比对照样品保存率高,最高超过14%。表明辐照处理可以提高液体糖化酶制剂的贮存稳定性。辐照具有灭菌效果,因而可以改善酶制剂的卫生品质,还可抑制微生物,特别是抑制产蛋白酶的细菌对酶分子的分解作用,所以有利于提高酶制剂的稳定性。从表中数据,看不出与吸收剂量率有显著的依赖性。在贮存371 d后,由于季节气温上升,贮存室温达34℃,致使酶活性保存率明显下降。

表2中固体糖化酶制剂贮存结果表明,辐照样品和对照样品均有较高的活性保存率。保存率与吸收剂量无明显的相关性。

Tab 2. Activity preservation period (%) of glucoamylase solid preparations

Absorbed dose (kGy)	preservation time (d)			
	32	67	150	206
0	97.8	94.7	96.9	90.1
2.0	95.3	93.7	94.2	93.3
4.0	96.0	90.5	92.0	91.2
6.5	91.7	96.4	91.7	92.5
8.0	93.1	92.9	92.6	91.6
10.0	89.8	91.5	90.7	88.6

2. 辐照糖化酶制剂的卫生品质

糖化酶制剂广泛应用于食品加工。根据卫生标准,酶制剂不应含致病菌,细菌总数含量不应高于 5×10^4 个/ml。由于酶活性对热很敏感,故不宜采用高温灭菌法。若采用添加防腐剂又可能存在防腐剂残留毒性。由于酶比微生物有较大的耐辐照性,因此选择适宜的辐照剂量,有可能杀灭其中的微生物,又不至使酶活性有严重的致钝作用。

通过对糖化酶制剂原有微生物分析得到,主要为细菌且以芽孢杆菌为主,几乎没有霉菌。以经过灭菌处理的液体和固体糖化酶制剂作载体,分别接入原样品中分离出的芽孢杆菌,进行不同剂量辐照后,测定细菌存活数,得到细菌存活数的对数与吸收剂量呈负线性相关。由线性回归分析

得到芽孢杆菌在液体和固体糖化酶制剂载体中相关系数分别为 -0.994 和 -0.991 , D_{10} 值分别为 1.31 kGy 和 2.04 kGy 。这表明, 芽孢杆菌在不同的载体中, 对辐射敏感性的差别较大, 固体糖化酶制剂灭菌较液体的困难。

3. 辐照对糖化酶制剂理化性能的影响

(1) 感官性能影响 正常液体糖化酶制剂呈浅黄色, 经辐照后颜色稍有加深, 呈褐色, 但这种变化不影响使用。

酶的香味在食品加工中很重要。实验证明, 辐照酶无异味, 甚至吸收剂量高达 100 kGy 以上也不产生任何异味。不辐照的糖化酶制剂, 如不及时添加防腐剂, 很快会变性腐败, 发出难闻的臭气。

(2) pH 值的影响 表 3 和表 4 所列结果表明, 糖化酶制剂经辐照后, pH 值下降。酶分子具有羧基和氨基, 辐照可能引起蛋白质脱氨基脱羧基等作用而引起 pH 值变化。贮存试验表明, 辐照样品的 pH 值基本保持不变, 对照样品的 pH 值明显上升, 可能是某些腐败菌作用的结果。辐照对酶制剂有灭菌效果, 这也可能是酶液 pH 值基本保持不变的原因之一。虽然酶液 pH 值变化机理尚待进一步研究, 但从 pH 值变化结果观察, 辐照有利于酶制剂的保藏。

Tab 3. The pH value change of irradiated glucoamylase preparations

Absorbed dose (kGy)	0	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0
pH-value	4.40	4.10	4.10	4.14	4.22	4.10	3.98	3.98	3.90	3.90

(3) 酶活性影响 辐照对酶产生致钝作用, 这种作用可能与射线对酶分子的直接作用和体系中水辐解产物对酶分子的间接作用有关。文献[2]中提出了酶的辐射钝化与吸收剂量的数学模式, 分别用(1)和(2)式表示直接作用和间接作用结果。

$$S_D = S_0 e^{-K_1 D} \quad (1)$$

$$S_D = S_0 - K_2 D \quad (2)$$

式中 S_0 和 S_D 分别表示被作用物酶在辐照前和接受吸收剂量为 D 后的活性, K_1 和 K_2 为常数。表 5 中列出了液体糖化酶制剂活性与吸收剂量的关系。

Tab 4. The pH value change of glucoamylase preparations during storage period

	No antiseptic Room temperature		Added antiseptic 4 °C in refrigerator
Storage time (d)	115	228	6
Irradiated sample	3.78	3.92	4.10
Control sample	4.82	6.74	4.34

由表看出, 吸收剂量低于 10 kGy 时, 辐照不引起酶活性明显变化。酶的残存活性与吸收剂量呈线性关系。相关系数为 -0.992 , 符合间接作用模式(2), 即为:

$$S_D/S_0 = 98.7 - 0.326 D \quad (3)$$

说明辐照酶制剂主要是通过时间间接作用而使酶活性钝化。

(4) 酶催化性能影响 工业酶制剂作为一种催化剂, 它具有普通无机催化剂一样的特性, 如有一定的反应速度、最合适的反应温度和 pH 值等。

Tab 5. Activity of glucoamylase liquid preparations irradiated

Absorbed dose (kGy)	Enzyme activity (u/ml)	Relative activity (%)	Absorbed dose (kGy)	Enzyme activity (u/ml)	Relative activity (%)
0	31025	100	60	23994	77.3
5	29790	96.0	80	21992	70.6
10	29503	95.1	100	19644	63.3
20	29068	93.7	120	18340	59.1
40	27183	87.6	140	17542	56.5

米氏常数(K_m)测定结果^[3]。米氏常数(K_m)是酶的一种特征常数,仅与酶的性质有关,与酶的浓度无关。用可溶性淀粉作反应底物,测得糖化酶辐照前后反应速度(单位时间内葡萄糖的生成量) V 与底物量 S 的变化结果列于表6中。

Tab 6. The relation between catalysis reaction velocity (V) and substrate content(S) of glucoamylase preparations

Substrate content S (mg) $1/S$		Irradiated sample (20 kGy) V (mg/min) $1/V$		Contrast sample V (mg/min) $1/V$	
1	1.0	0.0245	40.8	0.0240	41.7
2	0.50	0.0317	31.5	0.0310	32.3
4	0.25	0.0465	21.5	0.0461	21.7
6	0.17	0.0485	20.6	0.0507	19.7
8	0.13	0.0545	18.3	0.0546	18.4

用双倒数作图,得到 $1/V$ 与 $1/S$ 线性方程,根据米氏方程理论,分别计算出辐照样品和对照样品的米氏常数 K_m 为1.61和1.74,两者的差别在分析误差范围内。

最适反应温度和 pH 值。在其它反应条件相同下,仅改变温度,测得酶活性,用对照样品在40℃时的活性值归一化,其结果列于表7中。由表中结果看出,辐照样品和对照样品对反应温度的响应是一致的,最适反应温度均为60℃。

控制反应温度和反应时间,仅改变反应液的 pH 值,测得酶活性值用 $pH=4.6$ 时对照酶活性值归一化,其结果列于表8中。由测量结果可知,辐照样品和对照样品的最适反应 pH 值同为4.6,与正常酶反应条件相同。

Tab 7. The relation between glucoamylase preparations activity and reaction temperature

Reaction temperature (℃)	Relative enzyme activity (%)	
	Irradiated sample (20 kGy)	contrast sample
30	0.53	0.54
40	0.98	1.00
50	1.82	1.81
60	2.60	2.53
70	2.03	1.92

Tab 8. The relation between glucoamylase preparations activity and reaction pH value

pH value	Relative enzyme activity (%)	
	Irradiated sample (20 kGy)	Contrast sample
3.0	0.92	0.92
3.8	0.96	0.98
4.6	0.99	1.00
5.4	0.94	0.96
6.0	0.86	0.87

(5) 紫外吸收光谱的变化 采用岛津 UV-260 型紫外分光仪测得辐照样品和对照样品紫外吸收谱(图略)。通过对蛋白质分子的紫外吸收谱的认识得知, 在 280 nm 附近的强吸收峰是色氨酸和酪氨酸残基的贡献, 辐照作用显示出增色效应; 在 230 nm 附近的陡坡主要是肽键的贡献, 辐照样品的肽键贡献也明显加强, 并均随吸收剂量的增加而增大。上述影响可能是辐照引起了酶分子构象及其微环境的改变。

结 论

通过对糖化酶制剂进行辐照处理研究表明, 吸收剂量不超过 2 kGy 时, 辐照处理有下列优点: 能改善酶制剂的卫生品质, 辐照灭菌彻底, 而酶活性几乎不受影响, 对忌用防腐剂的用酶产品有特殊价值, 辐照不产生异味, 感官效果好。辐照能稳定酶液 pH 值, 能引起酶分子构象及其微环境变化, 综合效果能提高酶活性保存率。同时辐照对酶制剂的催化条件无影响, 不影响正常使用环境。

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国国家标准. GB 8276-87. 食品添加剂糖化酶制剂. 国家标准局发布. 1988
- 2 博维 F A 著, 钱保功等译. 电离辐射对天然及合成高聚物的效应. 科学出版社, 1962: 192—208
- 3 张树政, 孟广震, 何忠效主编. 酶学研究技术(上册). 科学出版社, 1987: 141—146

(稿件收到日期: 1991 年 9 月 17 日)

STUDY ON PROPERTY OF IRRADIATED GLUCOAMYLASE PREPARATIONS

Chen Ruyan Lan Junming Yan Youqi Tao Can

(Hunan Institute for Application of Atomic Energy in Agriculture, Changsha 410125)

Li Shijie Song Liangbi

(Hunan Jinshi Enzyme Preparations Factory, Jinshi in Hunan 410100)

ABSTRACT The properties of industrial glucoamylase preparations (IGP) irradiated by γ rays were studied. The experimental results showed that the preservation period became longer and the hygienic quality was improved when the IGP was irradiated by γ rays with dose under 2 kGy. The irradiation does not have obvious poor effects on properties of IGP. Therefore the irradiated IGP could be used normally.

KEYWORDS Glucoamylase, γ -irradiation, Glucoamylase, Enzyme activity