

γ -射线辐照对 α -淀粉酶 和糖化酶的影响

钱瑞生

(食品科学与工程系)

摘要 本文研究了 α -淀粉酶和葡萄糖苷酶的 γ -辐照现象。剂量为 0.5kGy 时,活性分别提高 5% 和 10%, 用于山羊淀粉的酶促水解, 生成的还原糖增加, 剂量达 5kGy 和 50kGy 时, 酶活性分别开始下降。用差示扫描量热法(DSC)研究了辐照的热性质, 其 ΔH 随剂量升高而减小, 实验数据表明辐照技术可用于酒精发酵和酶制剂工业。

关键词 α -淀粉酶; 酶; 辐照; DSC

0 前 言

α -淀粉酶和葡萄糖苷酶(糖化酶)属于水解酶类, 具有高专一性和催化效率, 作用条件温和, 不会损害食品质量和营养价值, 广泛用于食品工业。在制造葡萄糖时, 糖化酶使淀粉水解成葡萄糖; 在生产淀粉糖时, α -淀粉酶能使淀粉液化; 用于烤制面包时则改善面团结构, 在酒精发酵工业中也被大量采用, 对酒精产量和质量的提高起了良好作用。然而酒精发酵工业仍存在能耗大的缺点, 虽然已提出多种工艺以解决这个难题, 但总有某些不足。辐照工艺本身是一种节能技术, 因此, 我们试图把它引入酒精发酵过程, 期望对降低能耗有所帮助。其中最关心的问题之一是酶辐照后活性的变化。本文介绍了这一研究结果, 并且用 DSC 法研究了辐照对酶结构的影响。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料和设备

- 1.1.1 糖化酶 无锡县酒厂提供。
- 1.1.2 α -淀粉酶 无锡市酶制剂厂提供。
- 1.1.3 山羊淀粉 无锡县酒厂提供。

收稿日期: 1991-11-12

1.1.4 辐照源 ^{60}Co ,其活度为 $8.9 \times 10^{13}\text{Bq}$,剂量率为 0.02kGy .

1.1.5 DSC-7 美国 Peking-Elmer 公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 酶的辐照 取一定量酶制剂(含水量为 6.9%),在室温下照射。

1.2.2 混合液辐照 向盛有山芋淀粉的试管中加入一定量的酶液和水,使淀粉:水为 1:3.5,酶浓度为 200u/ml ,然后照射不同剂量。

1.2.3 酶活性测定 辐照前、后的酶活按文献[1,2]方法进行,并以辐照组与对照组的相对酶活百分数表示(取 3~5 次实验平均值)。

1.2.4 还原糖的测定 按文献[3]方法测定。

1.2.5 DSC 测量 酶与水按 1:1 混匀,放置 4h,准确称取混合物于 DSC 皿中,密封后放入仪器中,并以空皿作参比,以 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率扫描。计算机处理后得热变性峰值温度(T_p)及热焓($\Delta H, \text{J/g}$)。

2 结果与讨论

2.1 辐照对糖化酶和 α -淀粉酶活性的影响

两种酶经 γ -射线照射后,与未照射酶的相对活性百分数如表 1 所列。

表 1 γ -照射对糖化酶和 α -淀粉酶活性的影响

糖化酶	剂量(kGy)	0.1	0.2	0.4	0.5	0.7	1	3	5	10	20	50	100
	活性(%)	97.5	98.1	105.3	110.4	101.1	99.6	100.8	102.1	101.1	99.6	83.1	59.4
α -淀粉酶	剂量(kGy)	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10	100				
	活性(%)	98.1	98.8	105.4	101.5	101.2	97.2	96.1	52.2				

由表 1 可知,糖化酶经 γ -照射,剂量小于 0.2kGy ,时酶活变化不大,剂量为 0.5kGy 时酶活提高 10%,随剂量继续增加直到 20kGy ,酶活亦变化不大,当剂量达 50kGy 时,活性降低 17%, 100kGy 时降低 40%。 γ -辐照对 α -淀粉酶活性的影响与糖化酶相似, 0.5kGy 时,酶活升高 5%,但耐辐照性较糖化酶低些。可见不同酶的耐辐照程度是有差别的。

低剂量照射生物体时呈现电离辐射刺激效应,并应用于农业等领域,使作物增产,很多学者^[4]研究了这一现象,作用机制比较复杂,但已注意到它与生物体中存在的酶活变化有关。谷崇光等人^[5]用 2kGy 照射草莓果胶酶时,发现果胶酶活力提高 5%。在较低剂量照射下酶活增加的现象,可能与下述因素有关;在酶制剂中存在的酶源,某些肽键因吸收了辐照能而被活化,这相当于增加了活性酶;同时酶的活性部位和酶分子表面的微环境特征,在电离辐射刺激下,一些肽键发生局部舒展,使酶与底物(如淀粉)的结合更容易,酶催化反应加速^[6],但吸收剂量超过 20kGy 时,酶活受抑制,此时维持酶特定空间结构的氢键或某些活性基团可能受到损伤或断裂。

此外数据证明,干酶制剂抗辐照能力很强,剂量达 20kGy ,仍不降低其活性。因此,辐照灭菌技术可用于食品工业中酶的灭菌,因为酶制剂生产过程中的后处理、包装等工序及保藏时易污染杂菌,而加热消毒又会使酶失活,所以辐照为酶制剂消毒另辟了一条途径。

2.2 放置时间与酶活的关系

为了观察受照射的酶活力随放置时间的变化,在不同的时间里测定了它们的活力,结果如表 2 所示。

表 2 照射酶活随时间的变化

酶	剂量(kGy)		酶的活性 ¹⁾ (%)		
糖化酶	0.5	109.7(4)	100.7(156)	99.9(252)	100.1(350)
	5	102.1(4)	103.3(156)	102.2(288)	
	100	59.4(4)	62.3(156)	63.1(252)	
α -淀粉酶	0.5	104.5(4)	103.0(28.8)	102.5(144)	100.3(540)
	2	102.0(1.5)	101.1(180)	101.0(312)	
	10	96.0(3)	99.3(252)	101.1(312)	
	100	55.2(2)	56.6(144)	59.3(336)	

¹⁾ 括号中数字表示酶存放时间(h)

表 2 数据表明,被辐照的酶,其活力随放置时间的变化大致可分 3 种情况,a. 照射后活力有所提高,但随时间增加,酶活性逐渐下降,恢复到原来水平;b. 酶活不受照射影响,放置一段时间后,其活性仍无变化;c. 照射后酶活下降,若其损伤程度较低,如 10kGy 时,在存放过程中,酶的空间结构能逐渐修复,活力趋于原来水平,但是,经辐照后酶活下降很多,放置一段时间后,活力仍不能恢复。说明个别高剂量照射酶时,它的氢键可能已脱落或处于活性部位的氨基酸残基已受到破坏,自身已不能修复,DSC 实验将证实这种现象。

2.3 照射酶的混合体系时酶活性的变化

中国山芋淀粉资源丰富,许多酒厂以山芋粉为原料发酵生产酒精,故选用山芋淀粉的水溶液为介质。糖化酶在山芋淀粉水溶液中照射,其活性变化列于表 3。

表 3 照射糖化酶-山芋淀粉-水体系酶的活性变化

剂量(kGy)	0.2	0.5	0.7	3	19	20.8	23.2
活性(%)	104.2	106.7	101.6	100.2	250.0	202.2	114.5

在水溶液中辐照酶, H_2O 分子在电离辐照作用下,能生成活性很强的 H^+ , OH^- 等自由基,它们作用于酶,易使酶失活。但表 3 数据表明,在剂量较低时,与干酶辐照时的活性变化相似。这时产生的自由基数量还较少,并且这些自由基除与酶作用外,还要与淀粉分子起反应,这相当于淀粉对酶活起了保护作用。当剂量达 19kGy 时,酶活提高很多,但是这并不是酶被激活,而是由于淀粉分子中,糖苷键在辐射能和自由基双重作用下变得很松弛或甚至部分键(包括氢键)已断裂,^[7]使酶切断糖苷键更易进行而表现出活性增加的缘故。剂量增加,失活的酶分子增多,相对活性又降低,但是淀粉的保护作用仍存在。

2.4 照射酶对山芋淀粉的水解能力

用 0.5kGy 辐照的 α -淀粉酶和糖化酶作用于经过 1kGy 照射的山芋淀粉及未照射的山芋淀粉,测定其酶解生成的还原糖,结果列于表 4。

表 4 照射山芋淀粉酶解产生的还原糖

酶制剂 ¹⁾	照射剂量(kGy)		还原糖(mg/g 原料)	
	山芋淀粉	低温蒸煮 ²⁾	未蒸煮 ³⁾	
0	0	13.70	3.68	
0	1.0	13.72	3.68	
0.5	1.0	14.21	4.01	

注: 1) α -淀粉酶和糖化酶加入量分别为 50u/g 原料, 100u/g 原料。

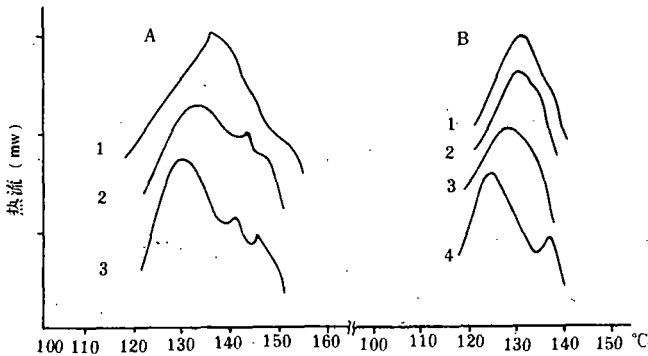
2) 原料: 水=1:3.5, 加热到 84℃, 保温 30min, 加入 α -淀粉酶, 然后冷却到 60℃, 加糖化酶, 反应 30min。

3) 加热到 60℃, 加入上述两种酶, 保温 30min。

表 4 数据表明经 0.5kGy 照射的酶作用于山芋淀粉时, 未蒸煮情况下, 生成的还原糖增加近 10%, 在蒸煮条件下, 提高 3.7%, 这就证明了酶促水解山芋淀粉时, 仍显示低剂量刺激效应, 这在辐照酒精发酵工艺中是极有价值的。

2.5 用 DSC 法观察酶的结构变化

酶的结构常用圆二色仪等方法验证, 也能用 DSC 方法来研究^[8,9]辐照后的变化, 若酶的结构发生变化, 则其热变性参数, 如吸热曲线上峰值温度(T_p)和热焓(ΔH)都会相应改变。因此, 我们用 DSC 法测定了辐照题示酶的 T_p 和 ΔH 值, 结果列于表 5, 吸热曲线如图 1 所示。

图 1 辐照 α -淀粉酶和糖化酶的 DSC 曲线

a. α -淀粉酶 剂量(kGy) (1) 0 (2) 10 (3) 100

b. 糖化酶 剂量(kGy) (1) 0 (2) 10 (3) 50 (4) 100

表 5 α -淀粉酶和糖化酶的 T_p 和 ΔH 值

剂量(kGy)		0	10	50	100
糖化酶	ΔH 值(J/g)	658.4	636.3	621.7	428.6
	T_p (°C)	130.0	128.8	125.4	123.1
α -淀粉酶	ΔH 值(J/g)	725.1	709.0	/	428.8
	T_p (°C)	135.8	133.5	/	126.3

由图 1 和表 5 知, 随剂量增大, 峰温向低温移动, ΔH 降低。由于酶分子中氢键或部分

分子断裂,则其热变性所需要的热焓降低。由此证实了酶被照射后结构受损伤,剂量越大,损伤越甚,酶活随之下降。

3 小 结

低剂量辐照 α -淀粉酶和糖化酶,酶活提高,用于山芋淀粉酶促水解,生成的还原糖增加,在较高剂量时酶活性变化也不大,因此,选用合适的工艺,即可应用于淀粉质原料的酒精发酵。在高剂量作用下,酶结构发生变化,活性降低。研究这种结构改变,DSC 方法是一种有潜能的手段。

参 考 文 献

- 1 Yoo Y T, et al. Biotech Bioeng, 1987; 30(1): 147
- 2 郭显章. 酶的工业生产技术. 吉林科学技术出版社, 1989
- 3 郑州粮食学院. 食品分析方法. 四川科学出版社, 1985
- 4 丘冠英. 核农学通报, 1990; 11(1): 82
- 5 谷崇光等. 原子能农业应用, 1985; 4: 59
- 6 颜思旭等. 酶催化动力学原理与方法. 厦门大学出版社, 1987
- 7 Han Y W. Patent U S. 1986; 4: 631, 258
- 8 Velicelebi G. Biochem, 1979; 18: 1180
- 9 Billaderis C G. Food Chem, 1983; 10: 239

致 谢

在实验过程曾得到陆炎培、吴文元、刘炳智、檀亦兵等同志的帮助,谨此谢意。

Effect of Gamma Radiation on α -amylase and Amyloglucosidase

Qian Ruisheng

(Dept. of Food Sci. and Eng.)

Abstract Investigated the effect of Gamma radiation on α -amylase and amyloglucosidase. At dose of 0.5kGy, activities increased 5% and 10% respectively. When enzymes reactive with sweet potato starch, reducing sugars increased, for dose of 5kGy, 50kGy, activities of α -amylase and amyloglucosidase respectively began to decreased. The effect of radiation on enthalpy (ΔH) of enzymes denaturation was studied by DSC. ΔH decreased with dose increased. Experiment shows that radiation has been applied in alcohol fermentation and enzymic industry.

Key-words α -amylase; Amyloglucosidase; Radiation; DSC