

酚。其适宜的处理条件是：交联度 0.5%，处理温度 30℃，处理时间 30min，交联 PVP 用量为 7g/L，茶多酚的吸附率为 66.83%。

3.2 茶多酚通过竞争吸附，顶替交联 PVP 水凝胶吸附活性点上的结合水，形成氢键吸附。

#### 参考文献

- 1 杨昌照. 我国茶饮料的现状与发展趋势. 饮料工业, 1999, 2: 1~3.
- 2 杨海昭. 乌龙茶饮料沉淀原因及解决方法初探. 食品工业科技, 2000(21): 23~24.
- 3 王水兴, 于敏等. 绿茶饮料的澄清技术. 食品科学, 1996(17): 36~40.
- 4 崔英德, 易国斌, 廖列文. 聚乙烯吡咯烷酮的合成和应用. 科学出版社, 北京, 2001: 2.
- 5 黎新明, 崔英德. PVP 的交联聚合研究. 化工科技, 2001, 5: 1~3.
- 6 GB8313-87.

## 茶多酚对米曲霉 $\alpha$ -淀粉酶的回收及其特性的影响

黄惠华 黄少斌 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641  
梁汉华 香港理工大学应用生物与化学技术系 香港

**摘要** 研究绿茶中多酚类对米曲霉来源的  $\alpha$ -淀粉酶特性的影响。从绿茶中提取茶多酚(TP),对米曲霉  $\alpha$ -淀粉酶进行络合、沉淀及回收;以 Bernfeild 法测定  $\alpha$ -淀粉酶与 TP 络合后,在不同温度、不同 pH 值、不同底物浓度的活性变化。结果表明:茶多酚对米曲霉  $\alpha$ -淀粉酶无活性抑制作用,两者之间具有起混作用;0.3%的茶多酚浓度,获得最大  $\alpha$ -淀粉酶活性回收率(约 71%)。  $\alpha$ -淀粉酶与 TP 络合后,最适反应温度由 30~50℃ 范围变为 60~70℃,最适 pH 值由 3.0~8.0 变为 5.0~6.0;在 80℃ 下,活性变化总趋向与游离的  $\alpha$ -淀粉酶相似,180min 后能够保存 85% 的酶活力,但是在前 40min 酶活力下降较快, Lineweaver-Burk 图表明,络合后的  $\alpha$ -淀粉酶  $K_m$  由 0.18% 变为 1.03% (可溶性淀粉底物浓度)。结论:米曲霉  $\alpha$ -淀粉酶与 TP 络合后活性不受抑制并可通过这种络合回收,络合后的  $\alpha$ -淀粉酶,最适反应温度及最适 pH 值变大、变窄,对底物的亲和力下降。

**关键词** 茶多酚 米曲霉  $\alpha$ -淀粉酶 络合

**Abstract** To assess the effects of tea polyphenols (TP) on the properties of  $\alpha$ -amylase extracted from *Aspergillus Oryzae*.  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus Oryzae* was complexed with TP extracted from green tea. Bernfeild method was adopted to analyze the activities of free  $\alpha$ -amylase and TP complexed  $\alpha$ -amylase under various temperatures, pH values and substrate concentrations. It was found that TP were haze-active and showed no inhibitory effect on the  $\alpha$ -amylase. By complex and sedimentation, the maximum recovery of the  $\alpha$ -amylase activity reached about 71% at 0.3% TP concentrations. The optimum temperatures for the  $\alpha$ -amylase were changed from 30~50℃ to 60~70℃, pH value from 3.0~8.0 to 5.0~6.0 and the  $K_m$  value of the  $\alpha$ -amylase complexed with TP from 0.18% to 1.03% the substrate concentration of soluble starch. It is concluded that TP recovered the activity of the  $\alpha$ -amylase and showed no inhibitory effect by complexation. After complexed with TP, the optimum temperature and pH value for the  $\alpha$ -amylase were increased and narrowed. The  $K_m$  value was changed higher for soluble starch substrate, indicating the decreased affinity of the  $\alpha$ -amylase with the substrate.

**Key words** Tea polyphenols  $\alpha$ -amylase Complex

淀粉是人类膳食中碳水化合物的主要来源。通过水解,淀粉还可以转化成糖浆或含有葡萄糖、麦芽糖和其他寡糖的固形物。这些淀粉转化产品,在食品及医药上都具有重要的应用价值。淀粉在人体内的转化

是食物消化的重要部分,尤其是以谷物为主食的地区。 $\alpha$ -淀粉酶以随机的方式作用于淀粉,水解淀粉中的  $\alpha$ -1,4 糖苷键而产生糊精和还原糖,为淀粉的进一步转化提供前体。工业生产规模上的淀粉转化,以

$\alpha$ -淀粉酶为主的酶法水解正在逐渐取代传统的酸水解法。 $\alpha$ -淀粉酶存在于植物、哺乳动物组织和微生物中,目前商业用的 $\alpha$ -淀粉酶源主要是米曲霉和黑曲霉的发酵产品。 $\alpha$ -淀粉酶产品除了用于淀粉的转化外,在医药上还可以作消化药的成分,同时在糖化食品如面食、啤酒的加工方面,有广泛的应用价值。这些应用都需要对 $\alpha$ -淀粉酶进行相应的改性。本文以茶叶中的天然产物茶多酚对 $\alpha$ -淀粉酶的进行络合及沉淀回收。主要目的是研究利用茶多酚作为一种络合剂,对 $\alpha$ -淀粉酶进行回收和改性。为 $\alpha$ -淀粉酶的进一步应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 茶多酚的提取及分析

茶多酚的提取及 HPLC 分析参见文献[1]。茶叶为绿茶。HPLC 为 490-750 型 waters 高效液相色谱仪。柱温为 30℃。样品配制成 0.05% 进样体积为 25 $\mu$ l。流动相(有机相):N,N'-二甲基酰甲胺:甲醇:乙酸(20:1:0.5)为 A 泵溶剂,水为 B 泵溶剂,梯度洗脱,在前 15min,流速为 1.0ml/min,洗脱液有机相含量为 21%;16min 后流速改为 1.5ml/min,有机相含量为 30%;28min 后,流速恢复至 1.0ml/min,洗脱液中含 21% 的有机相。总洗脱时间为 30min。然后在 280nm 处用 490 型紫外光检测仪分析测定,提取物中的茶多酚含量 > 90%。

### 1.2 $\alpha$ -淀粉酶和茶多酚的络合沉淀及回收

$\alpha$ -淀粉酶(EC3.2.1.1,从米曲霉中提取, Sigma 公司产品),用 pH7.0, 0.1mol/L 的磷酸缓冲液配成 0.2% 溶液。将 20% 的茶多酚按不同用量(50~550 $\mu$ l)添加到 9ml  $\alpha$ -淀粉酶溶液中,定容至 10ml,混合溶液中茶多酚的浓度从 0.1% 到 1.1% 变化。混合液在 35℃ 中水浴 30min,冷却后置于冰箱中 4℃ 存放 2h 至过夜,使之形成茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶络合物。观察过程中的起混现象,沉淀用离心分离并定容至 10ml,测定其中的蛋白质含量或酶活性。

### 1.3 蛋白质含量的测定

用 Bradford 法测定溶液中的蛋白质浓度<sup>[2]</sup>,以 $\alpha$ -淀粉酶本身作标准蛋白,与 Bradford 试剂作用,用 Hitachi U-2000UV/V 分光光度计测定 595nm 波长处的吸光度变化,以蛋白质的浓度对吸光度作图,得到相应的标准曲线( $y = 0.0012x + 0.5009, R^2 = 0.98$ )样品的蛋白质含量以此计算。

### 1.4 $\alpha$ -淀粉酶活性的测定

用 Bernfeild 法测定<sup>[3]</sup>。利用酶水解淀粉时释放出还原官能团,与二硝基水杨酸作用后形成在 540nm 波长处有吸收峰的络合物,用分光光度法比色测定。一个 $\alpha$ -淀粉酶活性的单位定义为:在规定的反应条件下,样品水解可溶性淀粉底物时每分钟释放出 1 $\mu$ mol 还原物质(以麦芽糖为标准物计算)所需要的酶量。反应条件为 25℃, pH6.9。

### 1.5 $\alpha$ -淀粉酶的温度-活性曲线及 pH-活性曲线的比较

在 10℃~75℃ 的温度范围下,以每 5℃ 为一间隔取样测定游离 $\alpha$ -淀粉酶及 TP- $\alpha$ -淀粉酶的活性变化。在 pH2.0~11.0 下,以每一个 pH 值为间隔,调整底物溶液的 pH 值,分别测定游离 $\alpha$ -淀粉酶及与茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶的活性变化。

### 1.6 两种 $\alpha$ -淀粉酶热稳定性的比较

将游离的 $\alpha$ -淀粉酶及与茶多酚结合后的 $\alpha$ -淀粉酶溶液进行 80℃ 的温浴处理 180min,过程中每隔 20min 取样一次,测定酶活性。

### 1.7 游离 $\alpha$ -淀粉酶及 TP- $\alpha$ -淀粉酶的 $K_m$ 值比较

在底物浓度 0.05%~0.5% 的范围内,选择多种底物浓度测定 $\alpha$ -淀粉酶及茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶的活性,以酶活性的倒数对底物浓度的倒数作图,得 Lineweaver-Burk 图。从图中获取游离 $\alpha$ -淀粉酶及茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶的  $K_m$  值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 茶多酚对 $\alpha$ -淀粉酶的络合与沉淀回收

在 0.1%~1.1% 的茶多酚浓度范围内与 $\alpha$ -淀粉酶络合,35℃ 温浴后常温存放,观察不到起混现象(haze),但是在冰箱中 4℃ 存放过夜后,从茶多酚浓度 0.1% 起,即呈浑浊乳液状并有沉淀产生,说明茶多酚与 $\alpha$ -淀粉酶发生了络合。起混现象是茶多酚与 $\alpha$ -淀粉酶形成分子量较大的络合物的结果。络合的机理是茶多酚与 $\alpha$ -淀粉酶之间的非共价结合。茶叶中的多酚属于黄烷醇类化合物,分子结构中含有能与蛋白质形成氢键结合的两种活性基团:羟苯基和酯酰基。由于这两种基团构型上的差异以及羟基的变化而形成多种结构相似的单体组分,即儿茶素单体。HPLC 分析证明为 5 种儿茶素单体:表儿茶素没食子酸酯(L-ECG)、儿茶素(DL-C)、表儿茶素(L-EC)、表没食子儿茶素(L-EGC)和表没食子酸酯儿茶素没食子酸酯(L-EGCG)。具体的研究结果我们已有另文报导<sup>[1]</sup>。

在这五种儿茶素单体中,最具有与蛋白质结合活性的主要是两种酯型儿茶素即 L-ECG 和 L-EGCG 两种单体,因为 L-ECG 和 L-EGCG 分子中分别有二个能与酶蛋白络合作用的活性基团:一个酯酰基,一个是羟苯基。其他三种单体, L-ECG、D-LC、L-EC 则只有羟苯基一个活性基团,由于这些活性基团,使儿茶素能以氢键的形式与酶蛋白络合,从而形成浑浊和沉淀,即所谓的起混活性(haze-active)。与植物中大多数多酚类物质如丹宁酸等性质相似,在啤酒、茶饮料及一些果蔬汁饮料中,起混是一种常见的现象。蛋白质的起混活性主要在于其分子组成中的脯氨酸残基。Asano 等指出<sup>[4]</sup>,含有脯氨酸残基的蛋白质在与多酚类化合物络合时容易产生浑浊。包括  $\alpha$ -淀粉酶在内的许多蛋白质都具有这种起混活性。多酚类物质起链桥的作用,使蛋白质相互链接,而蛋白质中的脯氨酸作为链接部位起关键性作用(即活性中心)。通过这种络合,使分子变大,最终产生沉淀<sup>[5,6,7]</sup>。当然,影响多酚类与蛋白质的这种络合、起混及沉淀还有温度、pH 值、浓度以及某些金属离子等等,这些都有待进一步的研究。

另一方面,淀粉酶是具有相应酶活性的蛋白质。有研究表明,多种酶在与茶多酚络合后,酶活性都有改变的现象。如大豆脂肪酶、人体唾液中的  $\alpha$ -淀粉酶、酪氨酸酶、黄嘌呤蛋白酶等<sup>[8-11]</sup>。对于  $\alpha$ -淀粉酶,在多种食物原料尤其是抗昆虫类的作物中,都发现有抑制剂的存在,这些抑制剂主要是单宁、多酚类和蛋白质或多肽<sup>[12-14]</sup>。然而在本实验中,在 0~1.1% 的茶多酚浓度范围内,发现  $\alpha$ -淀粉酶的活性变动很微,在 9.77~10.45U/mg 之间(图 1)。说明茶多酚对来自米曲霉的  $\alpha$ -淀粉酶无抑制作用。这一点与 Hara 和 Honda 的研究结果<sup>[9]</sup>明显不同。Hara 和 Honda 用来自人体唾液的  $\alpha$ -淀粉酶所作的实验结果表明,茶多酚对这种淀粉酶具有较强的抑制作用,酶活性的抑制率达到 50% 时各种茶多酚单体浓度, L-EC、L-C 和 L-EGC 在 1000 $\mu$ mol/L 以上, L-EGCG 为 260 $\mu$ mol/L 而 L-ECG 为 130 $\mu$ mol/L。Hara 和 Honda 的研究结果,对于以茶或茶多酚为基料设计减肥保健食品有启发性。同时也说明,即使是具有同一种生物活性的酶类,由于来源的差异,茶多酚的影响效果也存在着较大的差别。图 2 为不同茶多酚浓度对米曲霉  $\alpha$ -淀粉酶的沉淀回收效果。通过 0.3% 左右的茶多酚浓度,可以获得最高的  $\alpha$ -淀粉酶活性回收率(约 71% 左右),而此时  $\alpha$ -淀粉酶蛋白的回收率很小。因此用 0.3%

的茶多酚浓度回收  $\alpha$ -淀粉酶活性,既有利于获得较大的回收率,又利于提高其酶比活,去除杂蛋白。茶多酚是茶叶中天然的品质成分,对米曲霉  $\alpha$ -淀粉酶无失活性的影响,同时又具有较高的回收率。这对于利用茶多酚来分离和改性米曲霉  $\alpha$ -淀粉酶具有较大意义。

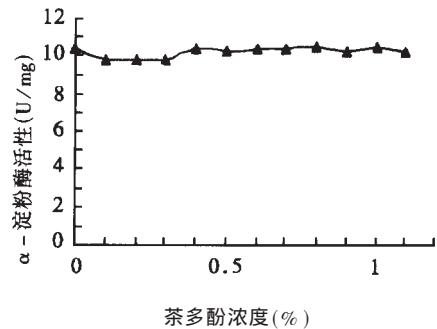


图 1 茶多酚对  $\alpha$ -淀粉酶的影响

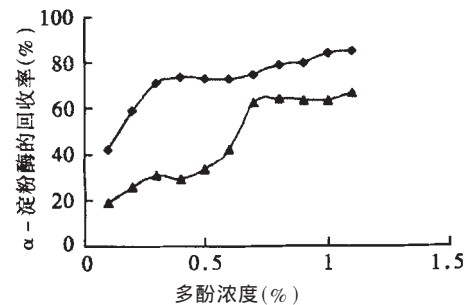


图 2 茶多酚对  $\alpha$ -淀粉酶活性(◆)及  $\alpha$ -淀粉酶蛋白(▲)回收率的影响

## 2.2 $\alpha$ -淀粉酶络合茶多酚后的最适反应温度及 pH 值的变化

将游离的  $\alpha$ -淀粉酶及收集到的茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶在 10~75 $^{\circ}$ C 的温度范围和 pH2.0~11.0 范围内分别测定其活性变化,结果见图 3 A。从图 3 A 中可以看出,  $\alpha$ -淀粉酶在与茶多酚络合后的最适反应温度都有所改变。游离  $\alpha$ -淀粉酶的最适反应温度在 30~

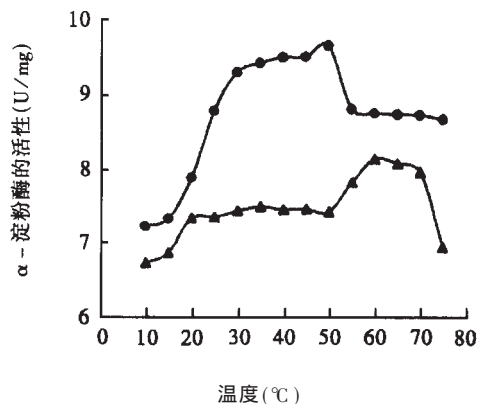


图 3 温度对游离  $\alpha$ -淀粉酶活性(◆)和茶多酚络合  $\alpha$ -淀粉酶(▲)的影响

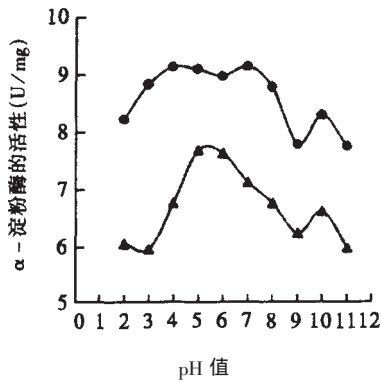


图4 pH值对游离 $\alpha$ -淀粉酶活性(◆)和茶多酚结合 $\alpha$ -淀粉酶(▲)影响

50℃较宽范围内,与茶多酚络合后,最适反应温度变为60~70℃,变高,变窄;最适pH值也发生了较为明显的变化,游离的 $\alpha$ -淀粉酶有较宽的最适pH反应范围,为3.0~8.0,而络合后的 $\alpha$ -淀粉酶最适反应的pH值范围变窄,为pH5.0~6.0。

### 2.3 $\alpha$ -淀粉酶与茶多酚络合后的热稳定性及米数常数( $K_m$ 值)的变化

图5为以80℃温浴下,茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶及游离 $\alpha$ -淀粉酶活性的变化曲线。从图5中可以看到,两种 $\alpha$ -淀粉酶在80℃下的活性变化趋向相似,在80℃下180min后能够保存85%的酶活力,曲线基本上可

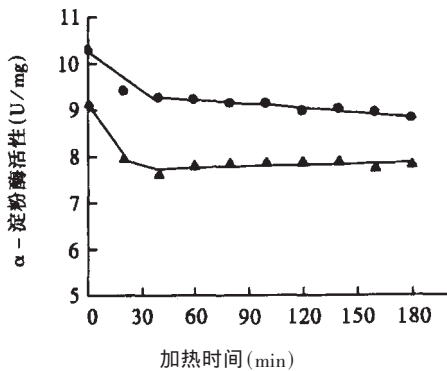


图5 在80℃游离 $\alpha$ -淀粉酶(●)和茶多酚结合 $\alpha$ -淀粉酶(▲)热稳定性的比较

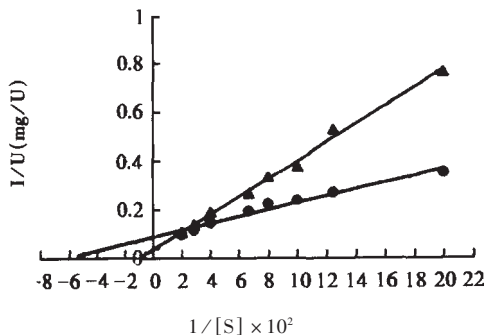


图6 游离 $\alpha$ -淀粉酶(●)和茶多酚结合 $\alpha$ -淀粉酶(▲)的

以分为两段:第一段为0~40min,酶活力变化呈线性下降趋向,第二段为40~180min,酶活力变化缓慢阶段。两种酶的耐热性差别主要表现在第一段曲线的斜率大小。直线的斜率反映了酶的失活速率,在此阶段内,茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶失活曲线的斜率比游离 $\alpha$ -淀粉酶大。因此在受热的40min内,茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶失活速度较游离 $\alpha$ -淀粉酶大。

在0.05%~0.5%的底物浓度范围内选择多种底物浓度测定两种 $\alpha$ -淀粉酶的反应速度,以双倒数作图法得到的Lineweaver-Burk图,见图6。从图中得到游离酶以可溶性淀粉为底物时的 $K_m$ 值为0.18%,而茶多酚- $\alpha$ -淀粉酶的 $K_m$ 值为1.03%。 $K_m$ 值的明显增大,表明 $\alpha$ -淀粉酶与茶多酚结合后对底物的亲和力有所下降。

### 参考文献

- Liang HH, Huang, HH, Kwok KC. Properties of tea-polyphenol-complexed bromelain. *Food Res. Int.* 1999, 32, 545~551.
- Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.*, 1981, 116, 53~56.
- Stellmach B. 著,钱嘉渊译. 酶的测定方法[M],北京,轻工业出版社,1992,36~40.
- Asano K, Shinagawa K, Hashimoto N. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1982, 40: 147~154.
- Siebert KJ, Carrasco A, Lynn PY. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.* 1996a, 44(8): 1997~2005.
- Siebert KJ, Troukhanova NV, Lynn PY. Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.* 1996b, 44(1): 80~85.
- Van Buren JP, Robinson WB. Formation of complexes between protein and tannic acid. *J. Agric. Food Chem.* 1969, 17(4): 772~777.
- Sekiya J, Kajiwara T, Monma T, Hatanaka A. Inter-reaction of tea catechin with protein: formation of protein precipitate. *J. Agric. Biol. Chem.* 1984, 48(8): 1963~1967.
- Hara Y, Honda M. The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenols. *J. Agric. Biol. Chem.* 1990, 54(8), 1939~1944.
- Kim JK, Cha WS, Park JH, et al. Inhibition effect against tyrosinase of condensed tannin from Korean green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 1997, 29(1): 173~177.
- Yeo SG, Park YB, Kim IS, et al. Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea. *J. Korean Soc. Food and Nutr.* 1995, 24(1): 154~159.

- 12 Quesada C, Bartolome B, Nieto O. et al. Phenolic inhibitors of alpha - amylase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils, and cocoa. *Journal of Food Protection*, 1996, 59 (2) : 185 ~ 192.
- 13 Gibbs BF, Alli I, Characterization of a purified alpha - amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Res. Int*, 1998, 31 (3) 217 ~ 225.
- 14 Nguz K, Gaver DV, Huyghebaert A. In vitro inhibition of digestive enzymes by sorghum condensed tannins *Sorghum bicolor* L. (Moench). *Sciences - des - Aliments*, 1998, 18(5) 507 ~ 514.

# NaCl 和糖对葛根淀粉糊化特性的影响

杜先锋 安徽农业大学食品工程系 合肥 230036

许时婴 王璋 无锡轻工大学食品学院 无锡 214036

**摘要** 通过差示扫描量热法 (DSC) 研究糖和盐对葛根淀粉糊化特性的影响, 结果表明葡萄糖、果糖和蔗糖均可使葛根淀粉的糊化温度(包括  $T_0$ 、 $T_p$  和  $T_c$ )和糊化焓  $\Delta H$  升高, 不同的糖对提高葛根淀粉糊化温度的顺序依次为蔗糖 > 葡萄糖 > 果糖。NaCl 的添加也可导致葛根淀粉糊化温度(包括  $T_0$ 、 $T_p$  和  $T_c$ )和糊化焓  $\Delta H$  升高, 其上升的幅度与 NaCl 的添加量呈正相关性。

**关键词** 葛根淀粉 糊化 NaCl 糖

**Abstract** The gelatinization behavior of kuzu starch was investigated by differential scanning calorimetry (DSC). The results showed that both the gelatinization temperature (including the onset temperature  $T_0$ , the peak temperature  $T_p$  and the conclusion temperature  $T_c$ ) and the gelatinization enthalpy of kuzu starch were increased by the addition of sugars and NaCl. The increasing effect of different sugars on gelatinization temperature were in the order of sucrose > glucose > fructose. The addition of NaCl had the effect as sugars, and the scale of the increasing was in the positive correlation with the adding amount of NaCl.

**Key words** Kuzu starch Gelatinization NaCl Sugar

葛根是豆科植物野葛 *Kuzu* (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) 的块根, 因富含淀粉, 其可食用性在我国及日本、韩国等周边国家均具有悠久的历史<sup>[1,2]</sup>。用葛根淀粉制作的食品, 不易老化, 而且具有葛根特有的清香味。此外, 葛根淀粉糊的透明度高, 在被用作食品添加剂或填充料时能赋予产品良好的外观<sup>[3]</sup>。虽然人类自古就有食用葛根淀粉的习俗, 但对葛根淀粉系统的理论研究和深层次的应用研究相当缺乏。糖和无机盐等因能改善产品的风味而广泛应用于食品工业, 但糖和无机盐等会通过淀粉亲水胶体相互作用, 从而影响淀粉的糊化作用、老化作用以及淀粉类食品的质构等。本文研究在葛根淀粉中分别添加不同浓度的 NaCl、蔗糖、葡萄糖和果糖, 探讨其对葛根淀粉糊化特性的影响, 以指导实际应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

葛根淀粉的制备按文献[4]的方法进行。

### 1.2 主要仪器

差示扫描量热仪: 美国 Perkin - Elmer 公司, DSC - 7 型

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 DSC 研究葛根淀粉的糊化

仪器先采用金属铟进行校正 (铟的熔融焓  $\Delta H$  为 28.45J/g, 熔点 156.4℃)。准确称取一定量的淀粉样品 (按干基计) 于 DSC 铝坩埚中, 以微量进样器加入水 (水: 淀粉 = 2:1, w/w)<sup>[5,6]</sup>, 坩埚中样品的总重量小于 10mg。坩埚加盖密封后, 于室温平衡 24h。以空坩埚作为参比, 从 30℃ 加热至 110℃, 升温速率 5℃/min, 样品室的氮气流量 30ml/min, 测定糊化时的起始温度  $T_0$ 、峰温  $T_p$ 、终止温度  $T_c$  以及糊化的热焓值  $\Delta H$ 。

#### 1.3.2 糖对淀粉糊化的影响

将三种不同的糖 (蔗糖、葡萄糖和果糖) 分别配成 20% 的浓度, 以微量进样器加糖液于淀粉 (糖液: 淀粉 = 2:1)。测定条件同 1.3.1。

#### 1.3.3 NaCl 对淀粉糊化的影响