

# 野菊蜜中生物酶的耐热性能研究\*

曾哲灵 胡虹 熊涛 高荫榆

(南昌大学食品科学教育部重点实验室, 南昌, 330047)

**摘 要** 测定了在不同加热温度下加热处理野菊蜜时, 野菊蜜中淀粉酶、蔗糖转化酶及葡萄糖氧化酶的活性或酶值随时间的变化情况, 分析了野菊蜜中生物酶的耐热性能, 找到了确定野菊蜜加工工艺及条件的理论依据。

**关键词** 野菊蜜, 生物酶, 淀粉酶, 蔗糖转化酶, 葡萄糖氧化酶, 酶活性, 酶值, 耐热性能

蜂蜜中生物酶含量较丰富, 有蔗糖转化酶、淀粉酶、葡萄糖氧化酶及少量的过氧化氢酶和磷酸酯酶。生物酶是蜂蜜中重要的活性物质, 蜂蜜中生物酶活性或酶值的高低反应了蜂蜜的新鲜程度、成熟度及其品质优劣<sup>[1]</sup>。蜂蜜中生物酶活性或酶值的保持是蜂蜜加工和贮藏过程的关键控制因素之一。

到目前为止, 各国仍然以蜂蜜淀粉酶酶值的高低来评价蜂蜜的新鲜程度、成熟度及其品质优劣, 造成了过于注重蜂蜜中的淀粉酶, 而忽视了蜂蜜中的其他生物酶的现象。本文通过测定不同加热温度下处理野菊蜜时, 野菊蜜中淀粉酶、蔗糖转化酶和葡萄糖氧化酶的活性或酶值随时间的变化, 分析野菊蜜中生物酶的耐热性能, 找出确定野菊蜜加工工艺及条件的理论依据。

## 1 原料和方法

### 1.1 原料和试剂

新鲜野菊蜜(避光低温保存); 碘, 碘化钾, 乙酸钠, 冰醋酸, NaCl, 可溶性淀粉,  $H_2O_2$ , NaOH, 丙三醇(均为分析纯); 3,5-二硝基水杨酸(化学纯), 靛蓝胭脂红, 蒸馏水, 二次蒸馏水。

### 1.2 仪器设备

超级恒温箱, 恒温水浴锅, 紫外可见分光光度计(上海光谱 756PC)。

### 1.3 实验方法

根据野菊蜜中各种生物酶的活性或酶值随加热温度和时间变化的快慢, 在 45~85℃ 范围内按 5℃ 或 10℃ 的梯度逐渐改变加热处理温度, 采用每间隔 1 h 或 2 h 测定 1 次的方式测定某一恒定温度下新鲜野菊蜜热处理过程中各种生物酶的活性或酶值随时间的变化。

### 1.4 蜂蜜的生物酶酶值定义

蜂蜜的淀粉酶酶值: 指 1 g 蜂蜜所含淀粉酶在一定条件下可转化 2% 淀粉溶液的体积(mL)。

蜂蜜的蔗糖转化酶酶值(mg/g): 指 1 g 蜂蜜中所含蔗糖转化酶在 45℃ 条件下、1 h 内能使多少毫升的蔗糖转化为单糖<sup>[2]</sup>。

蜂蜜的葡萄糖氧化酶酶值( $\mu\text{g/g}$ ): 指 1 g 蜂蜜中所含葡萄糖氧化酶在 37℃ 条件下、0.5 h 内氧化葡萄糖产生  $H_2O_2$  的质量( $\mu\text{g}$ )。

### 1.5 野菊蜜的生物酶酶值测定方法

#### 1.5.1 野菊蜜的淀粉酶酶值测定方法

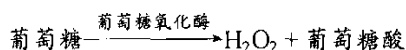
根据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T0852-2000, 采用分光光度法测定加有一定量碘和淀粉的蜂蜜溶液蓝色减退的速度<sup>[3]</sup>。

#### 1.5.2 野菊蜜的蔗糖转化酶酶值测定方法

蔗糖转化酶可以将蔗糖转化为葡萄糖和果糖。野菊蜜中所含糖类物质主要是葡萄糖、果糖及少量的麦芽糖、寡聚糖, 而蔗糖的含量很少。可以用葡萄糖溶液作为标准液, 测定经蔗糖转化酶作用前、后的野菊蜜和蔗糖的混合液中还原糖的量来测定蔗糖转化酶的活性或酶值<sup>[2]</sup>。本实验根据在 NaOH 和丙三醇存在下, 还原糖能将 3,5-二硝基水杨酸中的硝基还原为氨基而生成氨基化合物, 此氨基化合物在过量的 NaOH 碱性溶液中呈桔红色, 在 540 nm 处有最大吸收, 其吸光度与还原糖含量有线性关系。

#### 1.5.3 野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值测定方法

葡萄糖氧化酶酶值的测定依据:



$H_2O_2$  在过氧化物酶的作用下使一些物质生成显色物质, 通过分光光度计测定产生的  $H_2O_2$  的含量。辣根过氧化物酶测定  $H_2O_2$  法, 是利用葡萄糖氧化酶-辣根过氧化物酶-苯胺衍生物或染料隐性体偶联反应体系测定葡萄糖氧化酶的活性或酶值<sup>[4]</sup>, 存在显色

\* 第一作者: 博士研究生, 教授(高荫榆教授为通讯作者)。

\* 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目

收稿日期: 2005-02-03, 改回日期: 2005-05-13

物质不稳定、在 1 min 内有明显褪色、数据的重复性不好等不足。本实验采用褪色光度法测定痕量  $H_2O_2$ , 进而测出葡萄糖氧化酶酶值, 即在 100℃ 加热的条件下, 使  $H_2O_2$  直接与靛蓝胭脂红在 pH 3.5 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液中发生褪色反应, 由于其反应速度在一定范围内和  $H_2O_2$  的浓度成正比, 通过测定褪色反应速度即可测定  $H_2O_2$  的浓度, 进而测定葡萄糖氧化酶酶值<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 野菊蜜的淀粉酶酶值

在不同加热温度下加热处理野菊蜜, 其淀粉酶酶值随加热时间的变化见图 1。

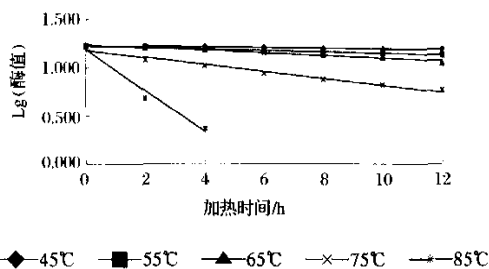


图 1 野菊蜜的淀粉酶酶值随加热时间和温度的变化

由图 1 可以看出, 当加热温度  $\leq 45^\circ\text{C}$  时, 野菊蜜的淀粉酶酶值在恒温加热处理过程中变化很小, 加热时间的影响很小。当加热温度  $\leq 65^\circ\text{C}$  时, 野菊蜜的淀粉酶酶值在恒温加热过程变化较小, 加热时间的影响不明显。加热温度  $\geq 75^\circ\text{C}$ , 野菊蜜的淀粉酶值在恒温加热过程中变化较大, 加热时间的影响明显。

在恒温加热处理过程中, 野菊蜜的淀粉酶酶值的对数值(lg)与加热时间呈线性关系, 符合一级反应动力学方程。依据我国蜂蜜产品国家标准(蜂蜜的淀粉酶酶值  $\geq 8 \text{ mL/g}$ ), 可确定各加热温度下的加热时间限度。当加热温度为  $65^\circ\text{C}$  时, 最长加热时间 24.80h; 当加热温度为  $75^\circ\text{C}$  时, 最长加热时间为 7.72h; 当加热温度为  $85^\circ\text{C}$  时, 最长加热时间为 1.33 h。

### 2.2 野菊蜜的蔗糖转化酶酶值

在不同加热温度下加热处理野菊蜜, 其蔗糖转化酶酶值随加热时间的变化见图 2。

由图 2 可以看出, 在  $45 \sim 55^\circ\text{C}$ , 恒温加热处理野菊蜜, 随加热时间的延长, 野菊蜜的蔗糖转化酶酶值逐渐下降; 随加热温度的升高, 蔗糖转化酶酶值的下降速率逐渐加快。在  $60 \sim 70^\circ\text{C}$  恒温加热处理野菊蜜, 随加热时间的延长, 蔗糖转化酶酶值先逐渐下降, 2 h 后逐渐升高; 随加热温度的升高, 蔗糖转化酶酶

值的下降速率和升高速率皆逐渐加快。说明野菊蜜中的蔗糖转化酶有 2 个酶活最适温度, 含多种同工酶。

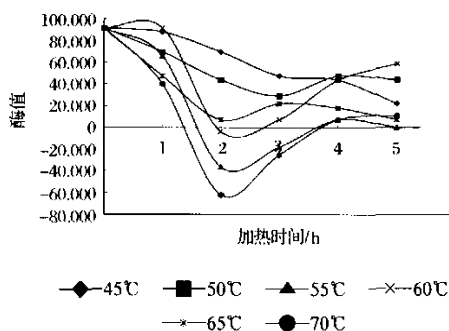


图 2 野菊蜜的蔗糖转化酶值随加热时间和温度的变化曲线

蔗糖转化酶含多种同工酶, 分别处于植物不同的亚细胞位置, 生化特性不尽相同, 最适催化反应温度和 pH 值也有所不同<sup>[6,7]</sup>。野菊蜜中的蔗糖转化酶来源于蜜蜂从植物花朵中采集的花粉中, 含有多种同工酶, 具有 2 个酶活最适温度,  $60^\circ\text{C}$  时野菊蜜的蔗糖转化酶酶值有一个突然提高的现象就是很好的证明。在恒温加热处理过程, 野菊蜜的蔗糖转化酶酶值随加热温度和加热时间的变化不尽相同, 说明野菊蜜的蔗糖转化酶中所含的多种同工酶的酶活受温度影响很大。但加热处理 2 h 后野菊蜜的蔗糖转化酶酶值又逐渐上升的原因不明, 有待今后进一步分析, 或者是根据经蔗糖转化酶作用前、后的野菊蜜和蔗糖的混合液中还原糖的量来测定蔗糖转化酶的酶活性有未考虑周全之处。

### 2.3 野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值

在不同加热温度下加热处理野菊蜜时, 野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值随加热时间的变化见图 3。

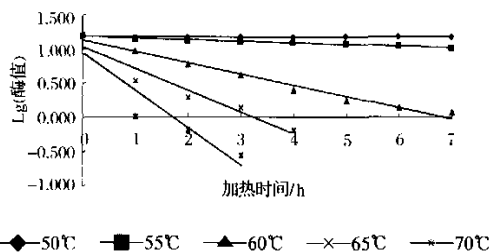


图 3 野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值随加热时间和温度的变化

由图 3 可以看出, 加热温度  $\leq 55^\circ\text{C}$  时, 野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值在恒温加热处理过程中变化不大, 加热时间的影响不明显。而当温度  $\geq 60^\circ\text{C}$  时, 野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值在恒温加热处理过程中变化较大, 加热时间的影响明显。

在恒温加热处理过程中, 野菊蜜的葡萄糖氧化酶

酶值的对数值(lg)与加热时间呈线性关系,符合一级反应动力学方程。依据 White 的蜂蜜抑菌效能实验,当每克蜂蜜在每小时内产生的  $H_2O_2$  少于  $3.4 \mu g$  时,这种蜂蜜没有抗菌作用和医疗效果。<sup>[8]</sup>以野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值  $>1.7$  为基准,确定当加热温度分别为  $60^\circ C$ 、 $65^\circ C$ 、 $70^\circ C$  时,最长加热时间分别为 5.47、2.52、1.29 h。

### 3 结 论

(1) 在  $45 \sim 85^\circ C$  范围内恒温加热处理野菊蜜时,随加热时间的延长,野菊蜜的淀粉酶酶值逐渐下降,其对数值与加热时间呈线性关系,符合一级反应动力学方程;随加热温度的升高,野菊蜜的淀粉酶酶值的下降速率加快。

(2) 在  $45 \sim 55^\circ C$  范围内恒温加热处理野菊蜜时即当加热温度  $\leq 55^\circ C$  时,随加热时间的延长,野菊蜜的蔗糖转化酶酶值逐渐下降;随加热温度的升高,野菊蜜的蔗糖转化酶酶值的下降速率逐渐加快。在  $60 \sim 70^\circ C$  范围内恒温加热处理野菊蜜时即当加热温度  $\geq 60^\circ C$  时,随加热时间的延长,野菊蜜的蔗糖转化酶酶值先逐渐下降、加热处理 2 h 后又逐渐升高;随加热温度的升高,野菊蜜的蔗糖转化酶酶值的下降速率和升高速率皆逐渐加快。说明蔗糖转化酶存在 2 个酶活最适温度,与蔗糖转化酶具有多种同工酶有关。

(3) 在  $50 \sim 70^\circ C$  范围内恒温加热处理野菊蜜时,随加热时间的延长,野菊蜜的葡萄糖氧化酶酶值逐渐下降,其对数值与加热时间呈线性关系,符合一级反应动力学方;随加热温度的升高,野菊蜜的葡萄糖氧

化酶酶值的下降速率加快。

(4) 综合野菊蜜的淀粉酶和葡萄糖氧化酶(蔗糖转化酶的变化规律难以描述,意义不大)在不同的加热条件下的酶活变化,在保证野菊蜜生物酶的酶活有效性的前提下,确定野菊蜜的加热处理温度为  $60^\circ C$ ,加热处理时间为 5.5 h。

(5) 各种蜂蜜中所含生物酶种类不尽相同,有的甚至相差很大,本实验得出的结论只能成为确定其他种类蜂蜜加工工艺和条件的参考。

### 参 考 文 献

- 1 Barhate R S, Subramanian R, Nandini K E, et al. Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 60: 49 ~ 54
- 2 陶 琼. 蜂蜜中蔗糖转化酶和淀粉酶活性的热稳定性比较[J]. 蜜蜂杂志, 2002(4): 5 ~ 6
- 3 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T0825 ~ 2000
- 4 朱 敏, 黄雪梅, 沈含熙. 辣根过氧化物酶在分析化学中的应用[J]. 分析科学学报, 1999, 15(5): 418 ~ 424
- 5 庄会荣, 胡顺香, 陈鸿琪. 靛红褪色光度法测定过氧化氢[J]. 理化检验-化学分册, 2000, 36(1): 37 ~ 41
- 6 Sturm A. Molecular characterization and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot[J]. Journal of Experimental Botany, 1996, 47: 1 187 ~ 1 192
- 7 Tymowska-Lalanne Z, Kreis M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology[J]. Adv Bot Res, 1998, 28: 71 ~ 117
- 8 吕效吾编译. 蜂菌杀菌作用的机理[J]. 蜜蜂杂志, 1990 (1): 10 ~ 11

### 信 息 窗

#### 为企业提供进口生化试剂

目前我国食品和发酵领域的工业企业已经进入大型化、标准化和国际化发展阶段,企业自身的研发规模和水平都有显著提高,对于进口生化试剂的数量和质量的需求急剧增加。但是由于国内进口生化试剂针对企业的市场服务机制尚不完善,经常出现订货出现误差、供货延期甚至不能有效交货等现象,严重影响了企业生产和科研工作的正常进行。

中国食品发酵工业研究院为了更好地服务于行业,满足企业对进口试剂及时便捷地需求,确保科研和生产的顺利进行,现与国际著名的生化试剂公司合作,建立了国际生化试剂的快捷进口供货通道,并由具有化学、生物学和分子生物学背景的技术人员专职负责,充分满足企业及时、快速、安全购买进口生化试剂的需求。

美国 Sigma、德国 Fluka、Merck、比利时 Acros、日本东京化成以及世界其他著名试剂公司的产品,询价当天答复,供货周期仅为 2~4 周,最快到货时间只需 7 天。

联系人: 杨梅

电话: 010-64666552; 传真: 010-64616613

电子邮件: yangmei@china-cicc.org, 网址: www.china-cicc.org

地址: 中国食品发酵工业研究院, 北京市朝阳区霞云路 32 号, 100027