

# 包被工艺条件对植酸酶热稳定性的影响

苏东海,刘 萍,郑亚安,孙君社 \*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院生物工程系,北京 100083)

**摘要:**考察了不同种类的糖、盐及浓度在干热及湿热的环境下对残存酶活的影响,通过正交实验,确定包被工艺优化条件为:以多孔淀粉为载体,采用流化干燥法取得;包被中蔗糖的添加量为 40 mg/g 酶,氯化钠包覆用量为淀粉质量的 10%,明胶作外包被,用量为淀粉质量的 1.5%,得到包埋颗粒,其包埋率为 82.8%,包埋后,水分活度大于 0.35 时,包被酶在干热的情况下残存酶活比原酶有较大的提高,残存酶活提高 8.7%,湿热的情况下,残存酶活提高 58.3%,胃蛋白酶对其的损坏作用也明显减小。

**关键词:**颗粒化;植酸酶;稳定性

中图分类号:Q814

文献标识码:A

文章编号:1672-3678(2004)03-0040-06

## Increased thermostability of phytase by coated conditions

SU Dong-hai, LIU Ping, ZHENG Ya-an, SUN Jun-she

(Department of biology, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, 100083 China)

**Abstract:** The Effects of the various sugars, salts and their concentration on the relative retaining activities of phytase under the dry heat condition and the wet heat condition were investigated. Through results indicated that trehalose was more effective than sucrose, but for economy, sucrose was still selected. The optimeal composition of coat was obtained through orthogonal tests as follows: with porous starch as the carrier, the satisfactory adding amount was 40 mg/phytaseg, the content of NaCl was 10% w/w to starch, gelatin was 1.5% w/w to starch. The coated rate is 82.8%. after coating, when water activity is higher than 0.35. The relative retaining activities of coated phytase is much more than the original under the condition of thermostability. After the coating, the relative retaining activities of phytase under the dry heat condition in oven was more than that of free phytase in the same situation. Under the condition against steam treatment, the relative retaining activities of phytase was also much better than that of free phytase, and the degrade of coated phytase by pepsin was obviously lessened.

**Key words:** engranule; phytase; stabilization

随着环保意识的提高及养殖业的高速发展,植酸酶的应用越来越广泛<sup>[1]</sup>,但植酸酶在实际应用中遇到了一些障碍,植酸酶的活性在制粒的过程中损失较大<sup>[2]</sup>,通常酶在干燥的情况下,结构比较稳定,具有一定的耐热性,但在制粒过程中,在高温蒸汽的

作用下,酶就易变性失活,近年来颗粒饲料制造采取外喷的方法进行添加植酸酶,但外喷方法不容易添加均匀,并且在运输过程很容易将颗粒外表喷涂的植酸酶磨擦掉,失去添加意义<sup>[3]</sup>。内添加就不存在上述缺点。故提高植酸酶的耐热性,采取内添加还

\* 收稿日期:2004-04-12

作者简介:苏东海(1965-),男,博士生,副研究员,研究方向:食品生物技术。

联系人:孙君社,教授, E-mail: sunjsh61@263.net

是具有重要的应用价值。

在制粒的过程中,酶既要承受干热处理,又要承受湿热的处理,在干热的情况下,酶吸收热量,三维结构发生改变而导致其失活,在湿热的情况下,酶不仅吸收热量导致构像发生变化,同时水分子和酶分子内氢键相互作用的破坏,使得酶的构像更容易发生变化<sup>[4]</sup>。在植酸酶内添加多羟基化合物、盐等,提高其稳定性,同时人为的制造一个小环境,使酶受到湿热的可能性大大减少,这样,酶在受到湿热的情况下,残存酶活性得到较大提高<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和试剂

植酸酶(40 000 u/g)为中国农科院畜牧研究所提供,玉米淀粉为食用级,糖化酶,蔗糖、葡萄糖、明胶、海藻酸钠、氯化钠、硫酸铵、硫酸钠、钼酸铵、偏钒酸铵为分析纯,植酸钠(Sigma)、胃蛋白酶(Sigma)。

### 1.2 主要仪器设备

沸腾干燥装置,OS101-1AB型电热恒温鼓风干燥箱,电热手提式杀菌锅,722型分光光度计,电子恒温水浴锅,WH-2微型旋涡混合仪。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 微孔淀粉的制备

根据糖化酶的性质和制备微孔淀粉的有关文献确定条件<sup>[6]</sup>。

#### 1.3.2 植酸酶的流化床干燥法包被<sup>[7]</sup>

将微孔淀粉置于沸腾干燥装置的流化床上,在一定的温度下沸腾0.5 h,将一定浓度的酶液(含不同种类的糖)从沸腾装置的上方以高压气雾的方式喷到淀粉载体上,待其干燥后,将氯化钠盐溶液间歇式喷到载体上,待其干燥后,将明胶溶液喷到载体上,干燥到含水量5%左右即可。

#### 1.3.3 不同浓度的糖在干热及湿热的条件下对植酸酶活性的影响

将不同浓度的蔗糖、葡萄糖和海藻糖与酶液混合,以淀粉为载体,用上述方法干燥。干燥的酶做耐干热及湿热实验<sup>[8]</sup>

#### 1.3.4 不同种类的盐在干热及湿热的条件下对植酸酶活性的影响

以淀粉为载体,将植酸酶液喷到载体上,干燥后,分别将一定浓度的硫酸铵、氯化钠、硫酸钠和硫酸镁喷到酶颗粒的表面,控制喷液量,干燥后得到含

有不同盐质量分数的酶颗粒,干燥的酶做耐干热及湿热实验<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.5 包被植酸酶的干湿热处理方法

包被植酸酶的干热处理使用电热恒温鼓风干燥箱,80℃空气热处理0.5 h,取出后自然冷却,分别测定酶于热处理前后的酶活,以热处理前后其相对保留酶活反映其耐热性。包被植酸酶的湿热处理,采用手提式高压蒸汽消毒器,经100℃饱和水蒸汽处理4 min,然后自然冷却,分别测定酶于热处理前后的酶活,以热处理后其相对保留酶活反映其耐热性。

#### 1.3.6 包被植酸酶的包埋率<sup>[10]</sup>

准确称取1.000 g样品平铺于布氏漏斗(10 cm),在抽滤的同时用100 mL的水洗涤样品,收集洗涤滤液,测定洗涤滤液酶活,包埋率=[(样品酶活-滤液酶活)/样品酶活]×100%。

#### 1.3.7 不同的水分活度对包被的植酸酶的耐干热的影响

分别在干燥器中放入饱和的LiCl、MgCl<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、NaCl、KCl溶液,在30℃恒温培养箱中平衡,干燥器中的水分活度分别为0.11、0.33、0.427、0.528、0.752、0.842,将样品放入各种水分活度的干燥器中进行平衡直至恒重,样品的水分活度即达到环境之水分活度,分别将不同水分活度的样品密闭,于100℃烘箱热处理30 min,之后自然冷却。测定酶于热处理前后的酶活,以相对保留酶活反映其耐热性。

#### 1.3.8 胃蛋白酶对裸酶及包被植酸酶的影响

准确称取0.25 g裸植酸酶、包被植酸酶分别加入1 L水中,然后分别加入0.5 mL胃蛋白酶,作用60 min。植酸酶活性的测定参见文献[10~12]。

#### 1.3.9 植酸酶活性的定义

在37℃、pH 5.5的条件下,1 min从0.0051 mol/L的植酸钠溶液中释放出1 μmol无机磷所需的植酸酶的量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同浓度的糖在干热及湿热的条件下对植酸酶活性的影响

干燥的植酸酶中添加糖的比例对植酸酶在干热及湿热的情况下,剩余酶活有所不同,实验结果如图1、图2,从图1可知,在干热的情况下,当海藻糖添

加比例达 20 mg 以后,随着添加比例的增加,相对剩余酶活的提高趋势变缓;蔗糖的添加比例达 40 mg 时,相对剩余酶活的值达到最大,以后又呈下降趋势,葡萄糖对相对剩余酶活没有提高的作用,基本呈下降趋势。在湿热的情况下,当糖的添加比例达 10 mg 后,三种糖对保留剩余酶活的能力有一定的作用,但在添加达 60 mg 以后又呈下降趋势。

综合上述两种情况,海藻糖的效果虽然较好,但是它的价格较高,植酸酶包被以后,包被膜可以阻挡蒸汽的进入,所以面临的热主要为干热,故植酸酶包被时的酶液中应加 40 mg/g 酶的蔗糖。

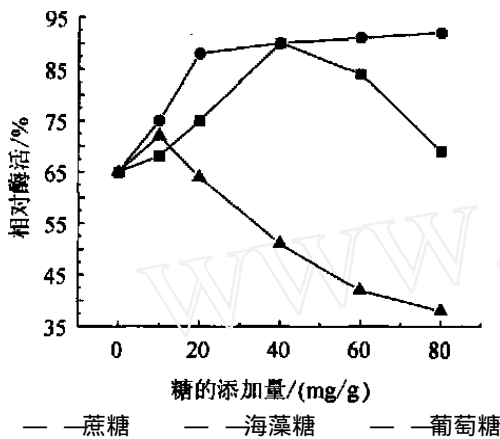


图 1 不同糖的浓度在干热情况下对植酸酶活性的影响

Fig. 1 Effect of sugar concentration on phytase stability against dry heat

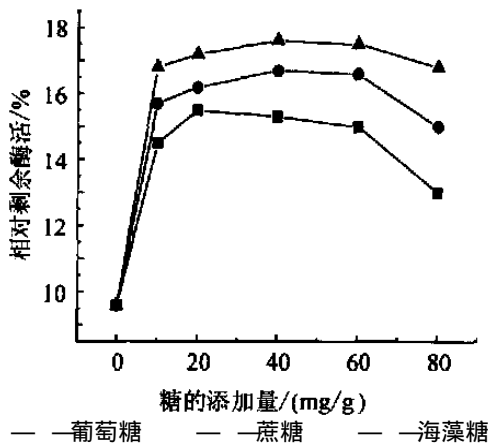


图 2 不同糖浓度在湿热情况下对植酸酶活性的影响

Fig. 2 Effect of sugar concentration on thermal stability against moist heat

### 2.2 不同种类的盐在干热及湿热的条件下对植酸酶活性的影响

以淀粉为载体,将酶液喷到载体上,在流化床上干燥后,再喷不同盐的溶液,同一种盐的包被浓度相

对淀粉的量分别为 1%、5%、10%、15%、20%,在流化床上充分干燥后,分别进行耐干热和耐湿热的实验,结果如图 3、图 4。

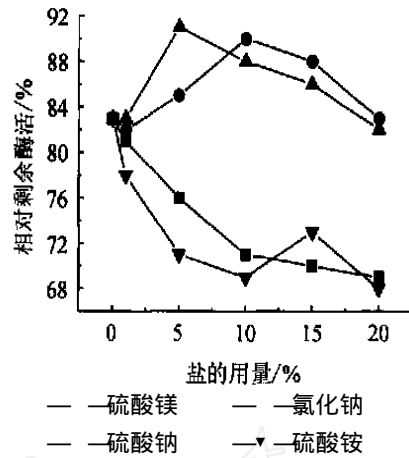


图 3 盐的种类和浓度在干热情况下对酶活的影响

Fig. 3 Effect of salt concentration on phytase thermal stability against dry heat

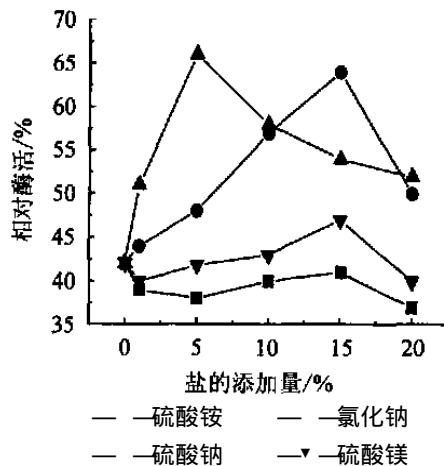


图 4 酶颗粒外表涂布不同的盐对植酸酶耐湿热的影响

Fig. 4 Effect of salt concentration on phytase thermal stability against moist heat

从图 3 中可以看出,不同的盐及浓度在干热的情况下对植酸酶的相对剩余酶活有着不同的影响,硫酸钠的用量达 5% 的情况下达到最大值,以后随着添加量的增大而趋于下降,氯化钠的用量达到 10% 的情况下达到最大值,以后随着添加量的增加而呈下降趋势,而硫酸铵和硫酸镁随着添加量的增加相对剩余酶活都呈下降的趋势。

从图 4 中可以看出,在酶颗粒表面涂布不同种类的盐浓度,在抗耐湿热方面显示出不同的能力,硫酸铵、硫酸镁的作用不是很明显,氯化钠和硫酸钠有较好的保护作用,在质量分数较低的情况下,保护作

用不明显,而在质量分数分别达到 15% 和 5% 时,保护作用达到最大值。随后呈下降趋势。在盐浓度较低的情况下,盐对酶未形成致密的保护层,耐湿热性未表现出来,随着盐质量分数的增加,酶颗粒的耐热性能有所下降,从理论上讲,盐不具备柔韧性,随着盐层厚度的增加,酶颗粒表面会产生一定的裂纹,这对酶颗粒的耐湿热将产生副面的影响。

### 2.3 包被胶的种类和质量分数对酶颗粒耐干热及湿热的影

以微孔淀粉为载体,喷液体植酸酶干燥后,分别以海藻酸钠和明胶为包被剂,然后测定不同种类的酶颗粒的耐湿热和耐干热的能力(见图 5、图 6)。

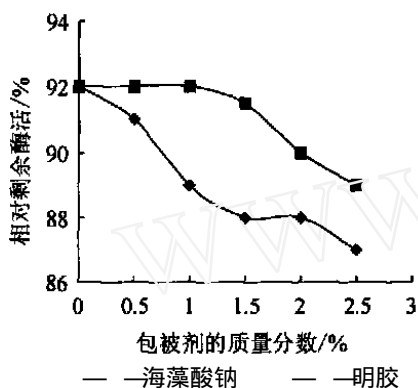


图 5 不同种类的包被剂及质量分数在干热情况下对剩余酶活的影响

Fig. 5 Effect of different encapsulating materials on phytase thermal stability against dry heat

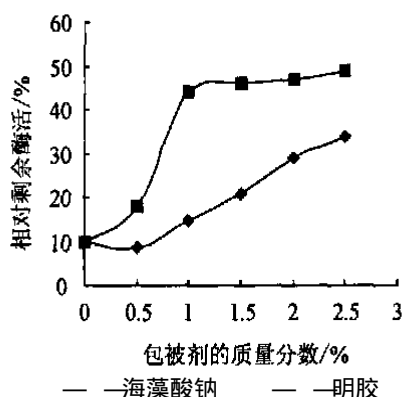


图 6 不同种类的包被剂及质量分数在湿热情况下对剩余酶活的影响

Fig. 6 Effect of different encapsulating materials on phytase thermal stability against moist heat

从图 5 可以看出,在耐干热的情况下,随着明胶添加量的提高,剩余酶活开始没变化,随后略有下降;而海藻酸钠随着添加量的提高,剩余酶活呈下降

趋势。从图 6 可以看出,随着胶的质量分数的提高,酶颗粒的耐湿热的能力都有提高的趋势,但明胶提高的幅度大于海藻酸钠的提高幅度,并且明胶的用量达 1% 以后提高的幅度变缓。

### 2.4 最佳包被条件的确定

植酸酶在制粒过程中,既要耐湿热又要耐干热,故植酸酶的包被条件既要符合耐干热的要求又要符合耐湿热的要求,采用正交实验的综合平衡法来找出最好的配方方案,选用正交表(表 1)  $L_9(3^4)$  来安排实验,通过上述研究可知,糖的浓度、盐的质量分数以及包被胶是影响包被酶耐热能力的重要因素,糖的三个水平为每 g 酶分别添加 20、40、60 mg 的蔗糖,盐的三个水平为添加淀粉量 5%、10%、15% 的盐,包被胶的三个水平为淀粉量的 0.5%、1% 和 1.5% 的明胶。

由颗粒稳定化植酸酶耐干热实验的正交表结果可知,  $K_2A > K_3A > K_1A$ ;  $K_3B > K_2B > K_1B$ ;  $K_2C > K_1C > K_3C$ , 所以最佳方案为 A2B3C2, 又因为  $C_2 > A_2 > B_3$ , 所以认为 B 因素对颗粒稳定化植酸酶耐干热影响最小。

由颗粒稳定化植酸酶耐湿热实验的正交表结果可知,  $K_2A > K_3A > K_1A$ ;  $K_2B > K_1B > K_3B$ ;  $K_3C > K_2C > K_1C$ , 所以最佳方案为 A2B2C3, 又因为  $A_2 > B_2 > C_3$ , 所以认为 C 因素对颗粒稳定化植酸酶耐湿热影响最小。

对耐干热的最佳方案是 A2B3C2, 对耐湿热的最佳方案是 A2B2C3, 这两个方案不完全一样, 为了得到较好的解决办法, 进行以下分析。

盐的添加对耐干热和耐湿热来说, 盐的极差都不是最大的, 也就是说不是最大的影响因素, 对干热来说盐的添加取 15% 最好, 但各水平间差别不大, 对湿热来说盐添加 10% 最好, 各水平间差别较大, 故盐的添加量取 10%。

从正交表看, 对耐湿热来说胶是最小的影响因素, 胶用量的极差最小; 对耐干热来说胶是最大的影响因素, 胶用量的极差最大, 应该取舍那一个呢? 植酸酶在制粒过程中, 稳定化颗粒植酸酶首先遇到的是湿热的影响, 它使酶失活的幅度最大, 在保证植酸酶能经受湿热的情况下, 再考虑随之而来得干热, 况且植酸酶的耐干热的能力较耐湿热的能力强, 所以胶的用量采用添加 1.5% 的明胶。

综合考虑影响耐干热和耐湿热的因素, 确定最后稳定化方案为: A2B2C3。即蔗糖的添加 40 mg/g

酶,盐的添加量为淀粉量的 10%,胶的添加量为淀粉量的 1.5%。

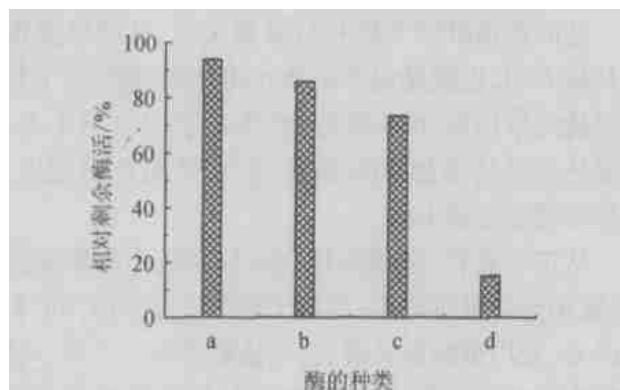
表 1 稳定化正交实验设计及结果

Table 1 Result of orthogonal design of stabilized condition

包埋植酸酶的耐干热的正交实验 $L_9(3^4)$					包埋植酸酶的耐湿热的正交实验 $L_9(3^4)$				
实验号	A(糖的质量分数)	B(盐的质量分数)	C(包被胶添加量)	耐干热剩余百分酶活(%)	实验号	A(糖的质量分数)	B(盐的质量分数)	C(包被胶添加量)	耐湿热剩余百分酶活(%)
1	1	1	1	57.2	1	1	1	1	44
2	1	2	2	75.4	2	1	2	2	58
3	1	3	3	53.3	3	1	3	3	41
4	2	1	2	83.2	4	2	1	2	64
5	2	2	3	66.3	5	2	2	3	72
6	2	3	1	79.3	6	2	3	1	61
7	3	1	3	63.7	7	3	1	3	59
8	3	2	1	71.5	8	3	2	1	55
9	3	3	2	78.0	9	3	3	2	49
K1	61.9	68.0	69.3		K1	143.0	167.0	165.0	
K2	76.3	70.2	78.9		K2	197.0	185.0	171.0	
K3	71.1	71.1	61.1		K3	163.0	151.0	172.0	
k1	20.6	22.7	23.1		k1	47.7	55.7	55.0	
k2	25.4	23.4	26.3		k2	65.7	61.7	57.0	
k3	23.7	23.7	20.4		k3	54.3	50.3	57.3	
R	4.8	1	5.9		R	18	11.4	2.3	
优方案	A2	B3	C2		优方案	A2	B2	C3	

2.5 湿热及干热对包被以后的植酸酶的影响

植酸酶用流化床干燥的方法包被以后,为了验证其耐热性,采用上述湿热及干热方法处理,然后与未包被的植酸酶进行对比,结果如图 7。



a 包被酶干热; b 未包被酶干热;  
c 包被酶湿热; d 未包被酶湿热;

图 7 植酸酶包埋前后的耐热性

Fig. 7 The thermal stability of original phytase and stabilized phytase

从图 7 可以看出,植酸酶经过包被以后,其耐湿热及干热的能力都得到了明显提高,在干热时,蔗糖

和盐都对植酸酶的稳定起到了作用,其中蔗糖填补了植酸酶空间结构的空隙,限制了酶由于加热而引起的空间结构的改变。在酶涂层的外表喷上一层盐,对裸露的酶进行了包覆,对酶的稳定也起到了重要的作用。在湿热时,由于明胶层的阻隔,蒸汽不能直接作用与植酸酶,内层的盐是热的不良导体且不易吸水,这对保证包被酶耐湿热起到了重要作用,只要包被层足够致密,蒸汽不能穿透保护膜,内部的植酸酶受到热还是干热,从前面的实验可知,植酸酶可耐一定程度的干热,在添加酶稳定剂的情况下,可进一步提高其耐热程度。

2.6 植酸酶的包埋率

经测定 1 g 样品中的酶活为 4 123 u,洗涤液中的总酶活为 733.8 u,故包埋率为 82.2%。

2.7 不同的水分活度对包被的植酸酶的耐干热的影响

将原酶粉和包被的酶在不同的水分活度下进行平衡后,密闭后在 85 的烘箱中加热 30 min,然后测定剩余酶活,结果如图 8。

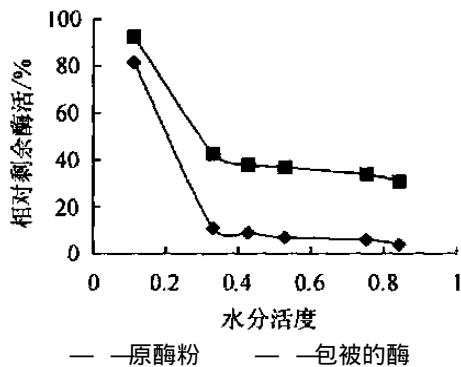


图8 水分活度对酶热处理后对剩余保留酶活的影响

Fig.8 Effect of water activity on relative retaining activity of phytase after heating

从图8中可以看出,在相同的水分活度下,包被植酸酶在干热的情况比未包被的耐干热的能力强。

### 2.8 胃蛋白酶对裸酶及包被植酸酶的影响

经胃蛋白酶的作用,包被酶和裸酶的残存酶活有一定的差别,包被酶未经胃蛋白酶作用时的酶活为925 u,经胃蛋白酶作用后,其残存酶活为782 u,包被植酸酶的存活率为84.5%,未包埋的酶未经胃蛋白酶的作用前,酶活为1004 u,经胃蛋白酶的作用后,其酶活为689 u。未包被植酸酶的存活率为68.6%。

## 3 结论

比较不同种类的糖及浓度在干热及湿热的情况下对残存酶活的影响,综合考虑确定其最佳添加量为每g植酸酶粉40mg蔗糖,颗粒包覆盐的量为淀粉质量的10%,外包胶经对比采用明胶较好,用量为淀粉量的1.5%,采用流化床干燥的方法,得到包

埋颗粒,其包埋率为82.8%,包埋后,水分活度大于0.35时,包被酶在干热的情况下残存酶活比原酶有较大的提高,比较包埋前后酶活损失情况,包埋后,干热的情况下,残存酶活提高8.7%,湿热的情况下,残存酶活提高58.3%;胃蛋白酶对其破坏作用也明显减小。

### 参考文献:

- [1] 马玺,单安山.植酸酶研究进展及其在饲料工业中的应用[J].粮食与饲料工业,2001,4:27-30.
- [2] Ir Mia Eeckhout. Phytase quality suffers from steam pelleting and storage temperature[J]. feed technology,1999,4(2):18-21.
- [3] 陆文清,王秀坤.饲料中补充植酸酶的新策略[J].国外畜牧科技,2000,27(6):22-26.
- [4] 姜锡瑞.酶制剂应用手册[M].北京:中国轻工出版社,1999,168-179.
- [5] 陆文清,李德法,武玉波.包被型耐高温颗粒饲用酶的生产方法[J].中国饲料,2001,22:20-21.
- [6] 林江海.微孔性变性淀粉制备的研究[A].郑州:郑州工程学院,1997.
- [7] 史锋,王璋,许时婴.用硫化床干燥法改善颗粒酶的热稳定性[J].食品与生物技术,2002,21(1):28-32.
- [8] Chang-Chih Chen,Ching-tsan Hunag,Kou-joan Cheng.Improvement of phytase thermostability by using sorghum liquor wastes supplemented with starch[J].Biotechnology Letters,2001,23:331-333.
- [9] Beck R,Nathaniel T,Christense N. Salt and Protein or Enzyme-containing Granules and method for Preparing them with Fluid-bed Coater [P]. PCT WO32612,1999.
- [10] 陆文清,刘伟,刘兴海.几种常见饲用酶制剂的酶活测定与分析[J].饲料工业,2000,21(2):17-20.
- [11] Wolfgang Haug, Hans-Joachim Lantzsch. Sensitive method for the rapid determination of phytase in cereals and cereal products[J].J. Sci Food Agric,1983,34:1423-1426.
- [12] 张若寒.植酸酶活性的检测方法[J].中国饲料,1997,5:30-32.