

温度对碱性脂肪酶型 TTI 可靠性的影响

乔磊¹, 卢立新^{1,2}

(1. 江南大学, 无锡 214122; 2. 中国包装总公司食品包装技术与安全重点实验室, 无锡 214122)

摘要: 酶型时间-温度指示器是一种新型的包装食品质量指示装置, 在生产后到使用前的贮藏过程中酶活的变化直接关系到在应用中的可靠性。研究了 25, 37, 50 °C 条件下, 基于扩散显色的酶型时间-温度指示器 (TTI) 中酶活的变化规律, 进行了动力学建模, 并通过其动力学方程对该 TTI 在 0 °C 和 3 °C 下的品质变化状况进行了预测和验证。结果表明, 该酶基体系在 0 °C 贮藏 180 d 仍可以保持 88.37% 的相对酶活, 与理论预测酶活的相对误差为 3.37%。根据 Orellana 的研究标准, 其相对酶活大于 85%, 可以有效保持其扩散显色特性。

关键词: TTI; 温度; 酶活

中图分类号: TB487; TS206 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2013)03-0032-04

Effect of Temperature on the Reliability of TTI Based on Alkaline Lipase

QIAO Lei¹, LU Li-xin^{1,2}

(1. Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Food Packaging Techniques and Safety of China National Packaging Corporation, Wuxi 214122, China)

Abstract: Enzyme time-temperature indicator (TTI) is a novel device to indicate the quality of packed food product. The change of its enzyme activity during storage before use directly links to its reliability. Enzyme activity changes of alkaline lipase based on diffusion and color change under 25 °C, 37 °C, 50 °C were investigated; chemical reaction kinetics equation was determined to judge the TTI quality. Furthermore, the change of enzyme activity for TTI under 0 °C and 3 °C was forecasted by the kinetics equation and verified by experiment. The results showed that the relative enzyme activity is 88.37% after being stored at 0 °C for 180 days with a relative error of 3.37% compared to the theoretical forecast. The diffusion and color development of the TTI was considered effective since its relative enzyme activity was bigger than 85% according to Orellana's research result.

Key words: TTI; temperature; enzyme activity

温度是食品在贮藏、运输以及销售过程中最为重要的因素, 同时也是最难以控制的因素, 直接关系到食品的货架寿命及食品安全, 因此对食品流通过程中的温度进行监控至关重要^[1]。由于食品流通过程中温度历史的不确定性以及监控的难度, 使得目前许多生产商和消费者所依赖的外包装标签上的货架期(即公开货架寿命)难以指示食品的真实品质。时间-温度指示器(TTI)可以通过不可逆的可视变化, 来指示食品从贮藏、运输直到消费者手中整个过程的温度变化, 来间接显示食品品质变化^[2], 是一种非常经济实用的方法。

作为一种实时指示产品质量的装置, TTI 已经在国外进行了大量的研究和应用^[3-5]。它可以用于监测食品的质量变化, 但在从生产后到使用前的贮藏过程中, 同样也存在着自身品质的变化, 这种变化直接关系到 TTI 在应用中的可靠性, 因此探讨 TTI 本身在贮藏过程中的品质变化非常重要, 目前国内外有关研究还鲜有报道。

笔者以本课题组研发的 TTI^[6]为对象, 以期通过研究该 TTI 的动力学特性, 得出其在低温条件下的品质变化状况, 进而研究其贮藏的温度条件, 增加其实际应用的可行性。该 TTI 通过酶固定化方法将酶液

收稿日期: 2012-11-08

基金项目: 江南大学创新团队项目(2009CXTD01)

作者简介: 乔磊(1988-), 男, 山西人, 江南大学硕士生, 主攻食品包装技术与安全。

通讯作者: 卢立新(1966-), 男, 江苏人, 博士, 江南大学教授、博士生导师, 主要从事食品包装技术与安全、运输包装等研究。

体系和底物体系分开贮藏,激活时将二者接触使酶向底物体系中扩散,并在 pH 指示剂的作用下发生显色,出现一条随着时间和温度不断向前扩散的颜色带,该颜色带的长度可以间接指示食品的品质状况,长度越长,说明食品品质越差。Orellana^[7]于 2004 年提出,固定化酶需要保证其具有 85% 以上的酶活才可以保持其良好的扩散性能,用于固定化酶的扩散显色。笔者以 TTI 中的酶活为判定其品质的关键因子进行不同温度下的恒温贮藏试验,并通过基于阿伦尼乌斯方程的动力学模型对 TTI 在低温条件下的品质变化进行预测,并进行试验验证。通过此种方法可以确定该 TTI 在激活前的贮藏温度条件,进一步增加其在实际生产应用中的可行性。

1 试验

1.1 材料和试剂

材料:课题组开发的 TTI 体系^[6]中的酶基体系。主要试剂:三乙酸甘油酯、溴百里酚蓝、乙醇(95%)、氢氧化钠,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

仪器与设备:AB204-N 电子天平;THZ-85B 台式恒温振荡器,常州诺基仪器有限公司;DW-25W198 海尔医用低温保存箱,青岛海尔特种电器有限公司;PQX 多段可编程人工气候箱,宁波东南仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 酶基体系的制作

在 250 mL 的烧杯中加入体积分数为 15% 的甘露醇溶液 1 mL,1 mol/L 的氯化钙溶液 2 mL,PEG400 (分析纯)2 mL,20 g/mL 的碱性脂肪酶溶液 5 mL 和 pH=10.6 的 Gly-NaOH 缓冲溶液 35 mL,最后用聚乙烯醇(PVA)溶液定容到 200 mL。然后在恒温振荡器上中速振荡 15 min。

取 54 个 25 mL 的具塞三角烧瓶,分别注入上述酶基体系 4 mL,盖塞密封并水平放置,于 -20 ℃ 下极速冷冻 16 h,然后取出在 25 ℃ 下解冻 6 h,得到待测的凝胶状酶基体系。

1.3.2 样品储藏与取样

将样品平均分为 3 组,分别于 25,37,50 ℃ 的温度下恒温贮藏,每隔 3 d 随机取 3 个放有凝胶状酶基体系的具塞三角烧瓶,并进行酶活的测定。

验证试验时再采用同样的方法将体系贮藏于 0 ℃ 和 3 ℃ 下进行恒温贮藏,间隔一定时间随机取 3 个放有凝胶状酶基体系的具塞三角烧瓶,进行酶活的测定。

1.3 检测方法^[8]

取 3 个 50 mL 的具塞三角烧瓶,分别向空白瓶 A 和样品瓶 B 和 C 中各加入三乙酸甘油酯 4 mL 和 Gly-NaOH 缓冲溶液 5 mL,再向 A 瓶中加入乙醇溶液(95%)15 mL,并放置于恒温振荡器中在 35 ℃ 下中速振荡 5 min。向 3 个瓶中各加入样品瓶中 4 mL 的待测酶基体系(由于空白瓶 A 中预先加入了乙醇,待测酶基体系加入后脂肪酶将立即失活),立即混匀计时,在预热温度 35 ℃ 的恒温振荡器中中速振荡 25 min,取出然后向样品瓶 B 和 C 中各加入 15 mL 95% 乙醇溶液终止反应。向 3 个锥形瓶中各滴 15 滴溴百里酚蓝指示剂溶液(0.1%),用 0.05 mol/L 的 NaOH 标准溶液滴定水解产生的游离脂肪酸,溶液呈现淡蓝色并保持 30 s 不褪色为滴定终点,记录消耗 NaOH 标准溶液的体积。等效酶活的计算^[8]:

$$X = (V_1 - V_2)tn \quad (1)$$

式中: X 为样品的等效酶活(U/mL); V_1 为滴定样品时消耗 NaOH 标准溶液的体积(mL); V_2 为滴定空白样品时消耗 NaOH 标准溶液的体积(mL); n 为酶液稀释倍数(50)。通过对 B 和 C 两个样品瓶求出来的等效酶活取平均数,得出该时刻的酶活值。

剩余相对酶活的计算:

$$X_R = \frac{X_1 - X}{X} \times 100\% \quad (2)$$

式中: X_R 为样品的剩余相对酶活; X_1 为样品在任意时刻的等效酶活(U/mL); X 为样品在初始时刻的等效酶活(U/mL)。

2 结果与分析

2.1 酶基体系酶活的变化

不同温度下凝胶状酶基体系的酶活变化趋势,以及通过一级动力学模型拟合其变化速率的结果见图 1,表明在同一温度下随着时间的增加,酶基体系的酶活呈下降趋势,但是酶活下降的速率比较慢,同时随着温度的升高,酶活下降的速率不断增加。通过一级动力学的模型对酶活下降速率进行拟合发现,其精度较高,与 Reyes-De-Corcuera^[9]对固定化酶的酶活下降

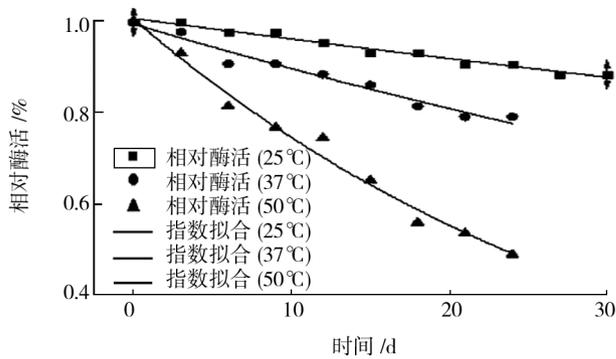


图1 不同温度下酶基体系酶活下降速率的拟合

Fig.1 Fitting curve of enzyme activity decreasing for enzyme-based system under different temperatures

符合一级动力学反应模型的研究结论相符,因此可以反映其真实下降速率(见表1)。此外酶稳定性的增加,可能是由于酶基体系中的碱性脂肪酶经过了PVA水凝胶的固定化处理。

表1 不同温度下酶基体系的酶活下降速率

Tab.1 Decreasing rate of enzyme activity for enzyme-based system under different temperatures

温度 / $^{\circ}\text{C}$	酶活下降动力学方程	速率常数 / d^{-1}	R^2
25	$R=1.0067\exp(-0.0046t)$	0.0046	0.9720
37	$R=0.9941\exp(-0.0103t)$	0.0103	0.9624
50	$R=1.0052\exp(-0.0299t)$	0.0299	0.9841

2.2 酶活变化的动力学模型及低温下酶活变化预测

阿仑尼乌斯方程是一种使用较为广泛的化学反应动力学模型。根据阿仑尼乌斯方程可知,酶活变化速率是温度的函数,即:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{Ea}{RT} \quad (3)$$

式中: k 为酶活下降速率(d^{-1}); k_0 为指前因子(d^{-1}); Ea 为活化能(kJ/mol); R 为通用气体常数($8.314 \text{ J/(K} \cdot \text{mol)}$); T 为热力学温度(K)。

根据上述方程建立以 $1/RT$ 为横坐标, $\ln k$ 为纵坐标的曲线并进行线性拟合,结果见图2。该曲线具有很好的相关性($R^2=0.9863$),直线方程为:

$$\ln k = 18.8537 - 6.0195 \times 10^4 \frac{1}{RT} \quad (4)$$

由式(4)可知,试验中酶基体系的活化能 $Ea=60.195 \text{ kJ/mol}$,指前因子 $k_0=1.542 \times 10^8 \text{ d}^{-1}$ 。

Orellana^[7]于2004年提出,固定化酶需要保证其具有85%以上的酶活才可以保持其良好的扩散性

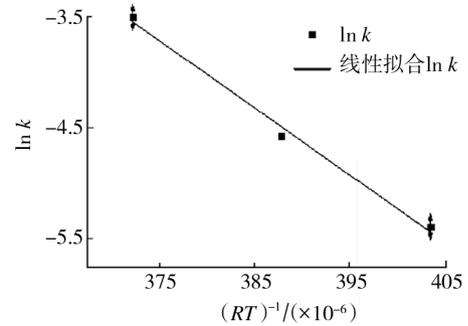


图2 酶基体系酶活下降速率的阿仑尼乌斯直线

Fig.2 Arrhenius straight line of enzyme activity decreasing rate for enzyme-based system

能,用于固定化酶的扩散显色。通过上述直线方程可以得到酶基体系贮藏于0,3,5 $^{\circ}\text{C}$ 下的反应速率及贮藏180 d以后的相对酶活,见表2。

表2 不同温度下酶基体系贮藏180 d后的相对酶活

Tab.2 Forecast of remaining relative enzyme activity for enzyme-based system after being stored for 180 d

温度 / $^{\circ}\text{C}$	理论酶活下降速率/ d^{-1}	贮藏180 d的相对酶活 /%
0	7.14×10^{-4}	91.45
3	9.06×10^{-4}	88.60
5	1.06×10^{-3}	86.23

2.3 低温条件下酶活变化的验证

根据表2中动力学模型的预测,采用与1.3章节同样的试验方法,将凝胶状酶基体系贮藏于0 $^{\circ}\text{C}$ 和3 $^{\circ}\text{C}$ 进行试验,并对其酶活进行测试。分析酶基体系在0 $^{\circ}\text{C}$ 和3 $^{\circ}\text{C}$ 下的相对酶活变化情况,表明该TTI在0 $^{\circ}\text{C}$ 下酶活保存较好,贮藏180 d后的相对酶活为88.37%,而在3 $^{\circ}\text{C}$ 下为83.24%(见表3)。

表3 0 $^{\circ}\text{C}$ 和3 $^{\circ}\text{C}$ 下酶基体系酶活变化情况Tab.3 Decrease of enzyme activity at 0 $^{\circ}\text{C}$ and 3 $^{\circ}\text{C}$ for enzyme-based system

时间/d	0	60	90	180	
相对酶活	0 $^{\circ}\text{C}$	100	93.02	90.7	88.37
/%	3 $^{\circ}\text{C}$	100	88.37	83.72	83.24

根据Orellana的理论,该体系可以在0 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏180 d并较好地保持其扩散特性。此外,实际相对酶活88.37%与理论相对酶活91.45%的相对误差为3.37%,说明该模型可以较好地反映TTI酶基体系酶活随温度的变化情况。

3 结论

基于阿仑尼乌斯方程动力学模型,评价了TTI酶

基体系在不同温度下的酶活变化情况,研究表明该体系在 0 ℃ 贮藏 180 d 仍可以较好地保持其扩散特性,即该 TTI 从生产以后到使用之前可以在 0 ℃ 贮藏 180 d 并保持良好的品质。通过此种方法,以酶活力变化为指标,评价了 TTI 本身在贮藏过程中的品质变化,进一步增加了其在现实应用中的可靠性。

参考文献:

- [1] TAOUKIS P S, KOUTSOUMANIS K, NYCHAS G J E, et al. Use of Time-temperature Integrators and Predictive Modeling for Shelf Life Control of Chilled Fish under Dynamic Storage Conditions[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 53(1): 21-31.
- [2] NUIN M, ALFARO B, CRUZ Z. Modelling Spoilage of Fresh Turbot and Evaluation of a Time-temperature Integrator (TTI) Label under Fluctuating Temperature[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 127: 193-199.
- [3] YAN S, HUAWEI C, LIMIN Z, et al. Development and Characterization of a New Amylase Type Time-temperature Indicator[J]. *Food Control*, 2008, 19(3): 315-319.
- [4] WON K, EUNA P, KWANG W H. Development of a Time-temperature Integrator System Using Burkholderia Cepacia Lipase[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(2): 497-502.
- [5] ELLOUZE M, AUGUSTIN J C. Applicability of Biological Time Temperature Integrators as Quality and Safety Indicators for Meat Products[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 138(1-2): 119-129.
- [6] 江南大学. 基于脂肪酶反应扩散的时间温度指示器的制备方法和应用[P]. ZL201110023063, 2012.
- [7] ORELLANA L E. Immobilized Enzymes: Time Temperature Indicators For Dielectric Pasteurization Processes [D]. Washington, MD: Washington State University, 2004.
- [8] 江慧芳, 王雅琴, 刘春国. 三种脂肪酶活力测定方法的比较及改进[J]. *化学与生物工程*, 2007, 24(8): 72-75. JIANG Hui-fang, WANG Ya-qin, LIU Chun-guo. Comparison and Improvement of Three Determination Methods for Lipase Activity[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2007, 24(8): 72-75.
- [9] REYES-DE-CORCUERA J I, CAVALIERI R P, POWERS J R, et al. Enzyme-electropolymer-based Amperometric Biosensors: an Innovative Platform for Time-Temperature Integrators[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(23): 8866-8873.
- [1] 京航空航天大学出版社, 2010.
- LI Rong-zheng, WANG Cheng-jie. PIC Microcontroller Principles and Applications [M]. Beijing: Beijing University Press, 2010.
- [4] 许茂林. 电液调节阀压力控制系统的研究[J]. *山东大学学报*, 2011(5): 127-131. XU Mao-lin. Research on a Pressure Control System in an Electro-hydraulic Control Valve[J]. *Journal of Shandong University (Engineering Science)*, 2011(5): 127-131.
- [5] 原佳宁, 孟焯. 棉麻改性中微波去除残余介质的模糊控制系统研究[J]. *制造业自动化*, 2012(10): 79-83. YUAN Jia-ning, MENG Chuo. Research on Fuzzy Control System for Removing Residual Medium by Microwave in Modified Cotton and Flax Yarn[J]. *Manufacturing Automation*, 2012(10): 79-83.
- [6] 李士勇. 模糊控制[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2011: 73-97. LI Shi-yong. Fuzzy Control[M]. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 2011: 73-97.
- [7] 吕剑虹, 陈来九. 模糊 PID 控制器及在汽温控制系统中的应用研究[J]. *中国电机工程学报*, 1999(1): 1-7. LYU Jian-hong, CHEN Lai-jiu. Fuzzy PID Controller and Its Application Study in Temperature Control System[J]. *Proceedings of the CSEE*, 1999(1): 1-7.
- [8] 张秀峰. MATLAB 机电控制系统技术与应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2011: 96-128. ZHANG Xiu-feng. MATLAB Mechanical and Electrical Control System Technology and Application[M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2011: 96-128.
- [9] QU Xiu-yun. Adaptive PID Temperature Controller Based on Fuzzy Logic[J]. *International Conference on Circuit and Signal Processing*, 2011, 57-55: 1455-1458.
- [10] LIN Chin-Teng, JUANG Chia-Feng, LI Chung-Ping. Temperature Control with a Neural Fuzzy Inference Network[J]. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics part C: Applications and Reviews*, 1999, 29(3): 440-451.
- [11] 张国良. 模糊控制及其 MATLAB 应用[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2002. ZHANG Guo-liang. Fuzzy Control and Application in MATLAB[M]. Xi'an: Xi'an Jiaotong University Press, 2002.

(上接第 20 页)