

超高压处理对鲜橙汁中果胶酶及过氧化物酶活性的影响

陈贺庆, 潘思轶, 王可兴*

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为推进国内非冷冻浓缩橙汁加工业的发展, 对新型超高压杀菌技术对橙汁中酶钝化的效果进行研究, 采用 200~600MPa 超高压处理鲜榨橙汁, 使用紫外分光光度法、滴定法分别测定鲜橙汁中过氧化物酶(POD)和果胶酶(PME)的活性, 进行两种酶在常温下超高压钝化酶一级动力学拟合研究。结果表明: 在常温条件下 200MPa 处理 10min 使两种酶轻微激活, 在 300~600MPa 条件下, 随压力和处理时间的增大, 两种酶钝化反应明显, 且符合一级动力学模型, 且果胶酶对压力钝化更加敏感。

关键词: 橙汁; 超高压; 过氧化物酶; 果胶酶; 酶活; 一级动力学

Effect of Ultra High Pressure Treatment on Pectin Methylesterase and Peroxidase in Orange Juice

CHEN He-qing, PAN Si-yi, WANG Ke-xing*

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to promote the industrialization of not from concentrated orange juice (NFCOJ), ultra-high pressure (UHP) sterilization was used for the inactivation of pectin methylesterase (PME) and peroxidase (POD) in orange juice. UHP treatment for fresh juice was performed at ambient temperature and pressures ranging from 200 to 600 MPa. The remaining activity of PME (pectin methylesterase) and POD (peroxide dismutase) in processed juice was measured by titration and UV-visible spectroscopy, respectively. The results showed both enzymes were slightly activated after 10-min treatment at 200 MPa. An obvious inactivation of PME and POD were observed when the pressure was higher than 300 MPa up to 600 MPa and the treatment time was prolonged, and the inactivation in the pressure range from 300 to 600 MPa was fitted well to the first-order kinetic model. Moreover, PME was more sensitive to pressure than POD.

Key words: orange juice; high pressure processing; peroxidase (POD); pectin methylesterase (PME); activation; first-order kinetic reaction

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0054-04

超高压处理(ultra high pressure, UHP)又称为高静压处理(high hydrostatic pressure, HHP), 是指以水或其他液体作为传压介质, 经 100MPa 以上压力处理, 在常温甚至更低的温度下达到杀菌、灭酶和改善食品功能特性等作用的新型技术^[1], 相比于传统热杀菌处理, 高静压只作用于非共价键^[2], 因此在达到杀菌、钝化酶效果的同时, 能更好的保持食品营养、风味等品质。

果胶酶(PME)广泛存在于柑橘类果实细胞壁中, 在榨汁过程中被释放, 将橙汁中的高甲氧基果胶水解, 产生的低甲氧基果胶与钙离子络合形成不容沉淀导致橙汁

失稳^[3]; 而过氧化物酶(POD)能催化果汁的褐变, 且反应产物对于果汁风味有不良影响, 因此在加工橙汁的过程中应尽量降低这两种酶的活性。

非浓缩还原橙汁(not from concentrated orange juice, NFCOJ)是指以新鲜橙子为原料, 采用物理方法将完好、成熟的橙果实加工制成的能发酵但未发酵, 保持原橙汁应有色泽、风味和可溶性固形物含量的制品^[4], 综上所述, 常温或仅联合中温的超高压处理在有着严格标准的非冷冻浓缩橙汁加工业有很好的应用前景。

本研究使用滴定法、分光光度法分别测定橙汁中果

收稿日期: 2011-04-05

作者简介: 陈贺庆(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: hehechen86@163.com

* 通信作者: 王可兴(1963—), 男, 工程师, 本科, 研究方向为食品工艺、饮料工艺学。

E-mail: wangkx@mail.hzau.edu.cn

胶酶(PME)和过氧化物酶(POD)的活性,着重对超高压钝化酶随压力(100~600MPa)及时间(0~50min)变化的动力学参数进行测定,通过拟合一级动力学方程,描述压力钝化酶反应的趋势。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜脐橙由湖北宜昌秭归县屈姑食品有限公司提供。

十二水合磷酸氢二钠(分析纯)、氯化钠(分析纯)、30%过氧化氢(分析纯)、2-甲氧基酚(化学纯) 国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钠(分析纯) 天津市北方天医化学试剂厂;高酯果胶(食用级) 湖北弘江香精香料有限公司;氢氧化钠(分析纯) 天津市天力化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

超高压处理设备(工作压力0~600MPa,温度10~50℃) 包头科发新型高技术食品机械有限公司;752型紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器 郑州长城科工贸有限公司;PB-10酸度计 德国Sartorius公司;Avanti J-E型高速冷冻离心机 美国Beckman公司;SHA-BA多功能水浴恒温振荡器 金坛市杰瑞尔电器有限公司;HR2084搅拌机 飞利浦(中国)投资有限公司。

1.3 方法

1.3.1 橙汁制备

新鲜脐橙清洗,剥皮,去籽,榨汁后双层纱布过滤,分装成20mL小袋试样,聚乙烯塑料袋真空密封,4℃冷藏备用,为保证实验中酶的含量和活性一致,每次实验所用橙汁均一次性制备,制备后12h内完成高压处理,24h内完成酶活性测定。

1.3.2 超高压处理

袋装试样置于超高压处理容器内,加水至淹没试样,于设定条件下进行超高压处理,经处理的试样立即置于4℃冷藏待测,每组处理至少取3个平行。

其中,压力对酶活影响研究设定条件:室温(15~20℃),在200、300、400、500、600MPa条件下处理10min;压力钝化PME动力学研究条件:室温(15℃),在300、400、500、600MPa条件下分别处理0、5、10、15、20、25、30min;压力钝化POD动力学研究设定条件:室温(15℃),在200、300、400、500MPa条件下分别处理0、10、20、30、40、50min。

1.3.3 酶活性的测定

1.3.3.1 PME的提取及测定

取10mL橙汁,加入1mol/L NaCl溶液20mL,冰浴180r/min振荡提取1h,10000r/min低温离心20min,收

集上清为待测粗酶液^[5]。

PME活性测定参考文献[6-7]滴定法,并稍作改动。取1g/mL果胶溶液30mL,用0.05mol/L及0.01mol/L NaOH调节pH值至7.5,并在恒温30℃磁力搅拌条件下平衡10min,加入10mL粗酶液,迅速调pH值至7.8,待pH值降到7.5时开始计时,同时使用0.01mol/L NaOH标准滴定液滴定,使溶液pH值始终保持在7.5,计时30min后结束测定,读取消耗NaOH滴定液体积。

1.3.3.2 POD的提取及测定

取5mL橙汁,加入0.2mol/L pH6.0磷酸缓冲液(含1mol/L NaCl)5mL,冰浴180r/min振荡提取1h,4000r/min离心20min,收集上清为待测粗酶液。

POD活性测定采用分光光度法^[8],并稍作改良,反应体系为0.2mol/L pH6.0磷酸缓冲液1.9mL,体积分数1% 2-甲氧基酚溶液0.42mL,质量分数0.3%过氧化氢溶液0.28mL,POD粗酶液0.5mL,在37℃恒温水浴反应1h后在470nm波长处测定溶液吸光度,以煮沸5min橙汁中提取的酶液为空白。

1.4 酶活性计算

1.4.1 PME活性计算

以单位体积酶液1min内消耗1mmolNaOH作为一个活性单位^[5,9]。

$$\text{PME酶活力}/(\text{U/mL}) = \frac{V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} \times 1000}{V_{\text{PME}} \times t_{\text{PME}}} \quad (1)$$

式中: V_{NaOH} 为消耗NaOH滴定液体积/mL; C_{NaOH} 为NaOH滴定液浓度/(mol/L); V_{PME} 为加入粗酶液体积/mL; t_{PME} 为酶促反应时间/min。

1.4.2 POD活性计算

以单位体积酶液1min内吸光度变化0.001作为一个活性单位^[7,10]。

$$\text{POD酶活力}/(\text{U/mL}) = \frac{A_{470\text{nm}} \times 1000}{V_{\text{POD}} \times t_{\text{POD}}} \quad (2)$$

式中: $A_{470\text{nm}}$ 为波长470nm处测得溶液吸光度; V_{POD} 为反应消耗粗酶液体积/mL; t_{POD} 为酶促反应时间/min。

1.4.3 酶钝化反应动力学参数的计算

对于PME和POD,都可以用残留酶活(RA)来直观表述其经高压处理后的钝化效果:

$$\text{RA}/\% = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

描述酶失活反应的一级动力学模型如下^[11]:

$$A = A_0 \times e^{-kt} \quad (4)$$

对于处理后未完全失活的酶而言,可用一级动力学

的特殊形式——微分转换方程拟合,失活速率(f)可用下式表示^[6,11]:

$$f = \frac{A_i - A_f}{A_0 - A_f} = e^{-kt} \quad (5)$$

式中: A_i 为经时长 t min 高压处理后的酶活/(U/mL); A_0 为保压时间为 0min 的酶活/(U/mL); A_f 为处理后的残存酶活/(U/mL); k 为钝化速率/(min⁻¹); f 为钝化率。

Eyring 理论表述了钝化速率对于处理压力的依赖性,活化体积 V_a 满足以下方程^[6,12]:

$$k = k_0 \cdot \exp\left(-\frac{V_a P}{RT}\right) \quad (6)$$

当上式两边同时取对数时,可推导出如下公式:

$$\ln k = -\frac{V_a P}{RT} + \ln k_0 \quad (7)$$

对于常温下的超高压处理,可用 $\ln k$ 对 P 作图计算 V_a 。

式中: k_0 为指前因子; P 为处理压力/(MPa); R 为气体常数(8.314 J/mol·K); V_a 为绝对温度为 T 时活化体积/(mL/mol); T 为钝化反应进行时绝对温度/K。

2 结果与分析

2.1 处理压力对酶活的影响

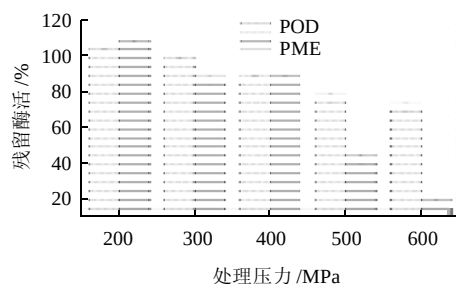


图1 处理压力对酶活的影响

Fig.1 Effect of pressure on the activity of POD and PME

鲜橙汁中提取的PME及POD酶比活力分别为 $(1.233 \pm 0.0037) \times 10^{-3}$ U/mL和 (17.37 ± 0.067) U/mL。POD是一种较耐热的酶,也是一种压力耐受性较强的酶^[13],从草莓中提取的POD在经400MPa处理10min后活性提高了1%^[14],而从苹果和胡萝卜中提出的POD,对于低于900MPa的压力下处理1min则表现出很强的耐受性,处理压力在300~500MPa范围内观察到了酶的激活现象^[15],由图1可知,经200MPa处理10min后观察到轻微的激活作用(残留酶活 $(101.53 \pm 0.32)\%$),压力 ≥ 300 MPa时,

随着处理压力升高,POD残存活性下降,但趋势较缓慢,压力达600MPa时残留酶活仍达 $(69 \pm 0.66)\%$ 。

PME是能水解果胶产生甲醇和H⁺的一类同工异构酶的总称,由于三维结构和基因序列的不同,导致了其耐热抗压性的不同^[6],国内已有文献称柠檬和柑橘皮中提取的PME粗酶液分别在30~60℃和25~50℃的中温范围内随温度升高活性增大,最适pH值分别在7.0和8.0左右,偏酸环境能很大的抑制其活性^[15-16],而国外学者则发现高温、高压联用对于钝化PME的效果出现了拮抗性,即一定高温(例如80℃)下,压力越大钝化酶速率反而越小,但在pH3.7的酸性环境下此现象不显著^[17]。200MPa室温处理后出现酶激活效应(残留酶活 $(107.43 \pm 1.12)\%$),随压力继续升高,PME残留活性显著下降,600MPa处理后残留酶活达 $(17.41 \pm 1.15)\%$,可能是由于橙汁自然酸度较低,PME表现出较差的耐压性。200~600MPa处理20min后橙汁的pH值仍稳定在 (3.45 ± 0.14) ,对于高压处理钝化酶活提供了较好的酸性环境。

关于本实验中出现的酶激活现象,目前国内外研究中报道的合理解释是较低压力或者温和的热处理能展开蛋白质链,改变酶的三维构造,暴露活性位点,但此变化一般是可逆的(常见于单体酶)^[13,18],而在较高压力或延长保压时间的处理后,酶的三维构象被不可逆压缩破坏或在瞬间释放高压时不可逆分解(多见于多聚酶)^[19-20]。

2.2 超高压钝化酶反应动力学

2.2.1 超高压钝化PME反应动力学

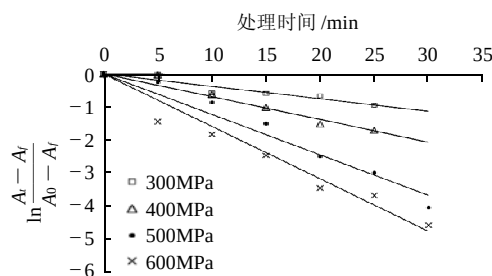


图2 橙汁中PME压力钝化动力学

Fig.2 Pressure-induced inactivation kinetics of PME in orange juice

表1 压力钝化橙汁中PME的一级动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of pressure-induced inactivation of PME in orange juice

压力/(MPa)	$k/(\text{min}^{-1})$	R^2	$\ln k$	$V_{a288K}/(\text{mL/mol})$	$k_0/(\text{min}^{-1})$
300	0.032	0.891	-3.44202	-11.97	0.0123
400	0.069	0.953	-2.67365		
500	0.123	0.961	-2.09557		
600	0.159	0.952	-1.83885		

如图2所示,常温下300~600MPa,0~30min的

处理条件范围内, 压力钝化 PME 反应能很好的拟合一级动力学模型($0.89 < R^2 < 0.97$), 表 1 给出了拟合一级动力学模型的各项参数。

2.2.2 超高压钝化 POD 反应动力学

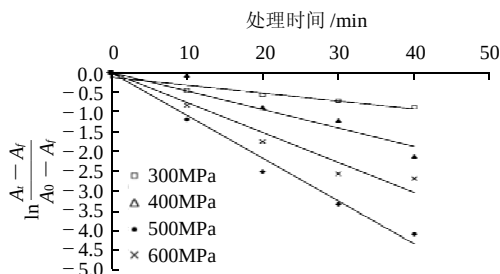


图3 橙汁中 POD 压力钝化动力学

Fig.3 Pressure-induced inactivation kinetics of POD in orange juice

如图 3 所示, 常温下 200~500MPa, 0~50min 的处理条件范围内, 压力钝化 POD 反应能很好的拟合一级动力学模型($0.91 < R^2 < 0.99$), 表 2 给出了拟合一级动力学模型的各项参数。

表 2 压力钝化橙汁中 POD 的一级动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of pressure-induced inactivation of POD in orange juice

P/(MPa)	k/(min ⁻¹)	R ²	lnk	V _{a288K} /(mL/mol)	k ₀ /(min ⁻¹)
200	0.020	0.914	-3.91202		
300	0.047	0.917	-3.05761	-11.97	0.00758
400	0.076	0.948	-2.57702		
500	0.108	0.981	-2.22562		

在压力钝化反应符合一级动力学模型的条件范围内, 两种酶钝化反应速率 k 都随处理压力的增大而增加, 室温下的活化体积 V_{a288K} 表示发生反应所需的最小体积变化量, 可在一定程度上表现出酶对于激活压力钝化反应的敏感度, 两种酶表现出一致性; 指前因子 k_0 是与反应条件无关, 仅与酶本身性质有关的参数, 压力钝化 PME 反应的 k_0 显著大于压力钝化 POD 反应, 表示在相同处理条件下, PME 的压力钝化反应速率要大于 POD, 即 POD 较 PME 更为耐压; PME 在 500MPa 处理 30min 后残留酶活降至(20.75 ± 0.89)%, POD 在 500MPa 处理 30min 反应后残留酶活为(68.14 ± 2.39)%, 处理 50min 反应后残留酶活仍为(67.33 ± 2.04)%, 也很好的支持了前面的推论。

3 结 论

综上所述, 超高压处理对于 PME 和 POD 均有显著影响, 影响趋势分为较低压力(≤ 200 MPa)下的激活和较

高压力(≥ 300 MPa)下的钝化。PME 和 POD 分别在 300~600MPa 和 200~500MPa 范围表现出符合一级动力学模型的压力钝化反应, 但 PME 较 POD 对压力更为敏感, POD 经 500MPa 处理 50min 后残留酶活仍有(67.33 ± 2.04)%, 应协同中温或其他处理方式取得更好的钝化效果。

参考文献:

- [1] 张文佳, 张燕, 廖小军, 等. 超高压对果蔬汁品质影响研究进展[J]. 食品发酵与工业, 2008, 34(9): 113-117.
- [2] BUTZ P, FERNANDEZ-GARCIA A, LINDAUER R, et al. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 56: 233-236.
- [3] BASAK S, RAMASWAMY H S. Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase[J]. Food Research International, 1996, 7(29): 601-607.
- [4] 张妍, 乔宇, 张韵, 等. 三种非浓缩还原橙汁香气成分分析[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 379-382.
- [5] 钟琳. 橙汁混浊稳定性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [6] POLYDERA A C, GALANOU E, STOFOROS N G. Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions[J]. Journal of Food Engineering, 2004, 62: 291-298.
- [7] LACROIX N, FLISS I, MAKHLOUF J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure[J]. Food Research International, 2005, 38: 569-576.
- [8] 夏远景, 李志义. 超高压处理对橙汁中过氧化物酶的影响[J]. 南京工业大学学报, 2009, 31(9): 58-62.
- [9] LARATTA B, MASI L, MINASI P. Pectin methylesterase in *Citrus bergamia* R.: purification, biochemical characterisation and sequence of the exon related to the enzyme active site[J]. Food Chemistry, 2008, 110: 829-837.
- [10] 曾庆梅, 潘见, 谢慧明, 等. 超高压处理对砀山梨汁中过氧化物酶活性的影响[J]. 农业工程学报, 2004, 20(7): 199-202.
- [11] TIWARI B K, MUTHUKUMARAPPAN K, O'DONNELL C P, et al. Inactivation kinetics of pectin methylesterase and cloud retention in sonicated orange juice[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10: 166-171.
- [12] HENDRICKX M, LUDIKHUYZE L, van den BROECK I, et al. Effects of high pressure on enzymes related to food quality[J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9: 197-203.
- [13] EISENMENGER M J, REYES-DE-CORCUERA J I. High pressure enhancement of enzymes: a review[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 45: 331-347.
- [14] GARCIA-PALAZON A, SUTHANTHANGJAI W, KAJDA P, et al. The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria × ananassa*) [J]. Food Chemistry, 2004, 88: 7-10.
- [15] 叶华, 马力, 王佩, 等. 柑橘皮中果胶酯酶的生物学特性研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(7): 159-160.
- [16] 张大凤, 蔡培原. 柑橘属柠檬类果实果胶酯酶的活性分析[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(6): 57-59.
- [17] ANESE M, NICOLI M C, DALLAGLIO G, et al. Effect of high-pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities[J]. Food Biochem, 1995, 18: 285-293.
- [18] HSU K C. Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing[J]. Food Sci Technol Leb, 2008, 41: 450-459.
- [19] 谢笔钧. 食品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 224-244.
- [20] PENNISTON J T. High hydrostatic pressure and enzymic activity: inhibition of multimeric enzymes by dissociation[J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 142: 322-332.