

文章编号: 1000-5773(2004)02-0144-05

超高压处理对多酚氧化酶活性的影响^{*}

曾庆梅, 潘见, 谢慧明, 杨毅, 黄训端

(农产品生物化工教育部重点实验室(合肥工业大学), 安徽合肥 230069)

摘要:研究了超高压中温协同处理对砀山梨汁中多酚氧化酶活性的影响, 实验压力为 0.1~500 MPa, 温度为 20~60 °C。此外, 考察了不同 pH 值(3~7)和保压时间(2~34 min)超高压处理对酶活性的影响。实验结果分析表明: 在处理温度为 50 °C、保压时间为 10 min 和梨汁 pH 值为 5 的条件下, 200~300 MPa 处理梨汁时多酚氧化酶被激活, 活性表现最高; 500 MPa 时酶的活性下降到 75.3%。协同温度为 30 °C 处理梨汁时, 酶的活性反而增大; 30 °C 以后, 酶活性随温度升高而迅速降低; 有效协同高压处理的温度为 40 °C。随着保压时间的延长, 梨汁中过氧化物酶的活性减小; 18 min 以前下降速度较快些, 之后下降速度变缓。pH 在 5~6 之间, 酶的残留活性最大; pH 值为 6 时, 梨汁中多酚氧化酶最为耐压。

关键词: 梨汁; 超高压; 中温; 多酚氧化酶; 保压时间; pH 值

中图分类号: TS201.3; Q939.11

文献标识码: A

1 引言

多酚氧化酶(PPO; EC1.10.3.1)广泛地存在于各种植物中, 在大多数为人们所熟悉的水果和蔬菜中都能检出, 梨汁也不例外。在正常状态下, 细胞内的 PPO 与质体、线粒体和细胞内膜结合, 活性很低, 当细胞膜受到损伤后, 潜在的 PPO 可被激活。多酚氧化酶导致果汁的褐变, 影响产品的感官质量^[1]。传统的钝化酶活性的方法是高温热处理或添加抑制酶活性的化学添加剂。高温处理不仅影响产品的营养成分^[2,3]; 对于风味物质含量高的热敏性食品如梨汁等, 高温处理后其风味、色泽受到很大的影响。

超高压处理食品保鲜技术具有诸如保持食品原有的风味、色泽、营养成分、低能耗、对环境无污染以及少用或不用化学添加剂等很多优点^[4]。超高压处理不仅能杀灭食品中的微生物, 还可以抑制酶的活性^[5,6]。然而多酚氧化酶具有较高的耐压能力, 室温条件下需要很高的压力才能使其灭活^[7]。超高压装置的额定工作压力越大, 制造和运行成本就越高。中温(≤ 60 °C)不会对食品带来诸如上述高温产生的系列影响, 本实验采用中温协同高压进行多酚氧化酶的钝化处理, 从一方面讲有助于寻求降低处理压力的方法。

超高压处理钝化酶是通过改变酶蛋白的构象即变性来抑制酶的活性。酶的催化作用产生于其活性中心, 活性中心与三维构象有关。蛋白质构象的改变会导致蛋白质的变性, 同样会影响酶的功能。活性中心的微小变化可能使酶失去活性。高压对酶的影响分为两种情况: 压力较低时可能可以激活酶; 压力较高时使酶失去活性^[6], 加热可以协同高压抑制酶活性。

高压处理中, 酶的活性不仅取决于压力的大小, 同时与处理温度、保压时间、酸度值(pH 值)和处理对象的化学组成都有关系^[8]。由于不同的食品具有不同的 pH 值、化学成分等各自特点, 同种酶在不同食品中所表现的耐压特性有很大差异。本实验采用中温协同高压对梨汁中多酚氧化酶进行处理, 研究

* 收稿日期: 2003-09-09; 修回日期: 2003-11-17

基金项目: 国家发展计划委员会重大研究专项(0980108)

作者简介: 曾庆梅(1961—), 男, 博士研究生, 副教授, 主要研究方向为农产品生物化工。

E-mail: zengqingmei-1@163.com

了处理压力、温度、保压时间以及梨汁的 pH 值对其活性的影响。

2 材料和方法

2.1 试验材料

原料:市售安徽砀山酥梨。

2.2 试验设备

超高压处理装置^[9]:1L 自制可控温超高压试验装置(工作压力 0~600 MPa,工作温度 0~60 ℃)。

2.3 试验方法

2.3.1 试样的准备

试样制作工艺流程:选梨 → 清洗 → 捣碎(高速组织捣碎 5 min,2800 r/min) → 过滤去渣(两层粗纱布) → 梨汁(pH 值为 5) → 部分试样的 pH 值调整 → 聚乙烯塑料袋(长×宽×厚=50 mm×40 mm×7 mm)真空密封包装(不留顶隙,14 mL 梨汁/袋) → 冰浴保存(等待高压处理或作为对照样等待检测酶活性)。试样 pH 值的调整:精确称量一定量的柠檬酸和纯碱(碳酸钠),分别制成 1mol/L 的溶液,用于调整部分试样的 pH 值(pH 值分别调整为 3、4、5、6、7),并用精密酸度计测量记录试样的 pH 值。

为了保证实验数据不受实验材料取样的影响,全部梨汁均一次制作完成。用高温消毒的聚乙烯塑料袋(14 毫升/袋)分别真空包装后放置在 4 ℃ 的冰浴里,并在 12 h 内高压处理完毕。处理后试样保存在 4 ℃ 的冰箱里,在 48 h 内完成多酚氧化酶活性检测。所有数据均为 3 个试样测试后的平均值。

2.3.2 超高压处理

高压处理:为防止高压挤破单层包装袋,将已真空密封包装 14 mL 梨汁的聚乙烯塑料袋用聚乙烯塑料薄膜进行二次真空包装。二次包装后的袋装试样浸泡于高压容器的传压介质油中,按照实验设计,设定压力、温度和保压时间等参数,进行超高压处理。

试样加热:未加热前传压介质温度为 20 ℃(室温)。实验前,高压容器外夹套加热容器中传压介质至要求温度(30~60 ℃)。由于聚乙烯试样袋厚度(7 mm)小,试样袋内梨汁升温快。试样袋浸没于高压容器传压油中均热 30 s 后升压,试样加热即可达到实验要求温度。

2.3.3 酶活性的检测

酶液的制备:取 5 mL 样品(经高压处理的或未处理的对照样),加 0.2 mol/L pH 值为 6.8 的磷酸缓冲溶液 10 mL,8000 r/min 离心 15 min,取上清液作为酶液,冷藏待测多酚氧化酶(PPO)活性。

PPO 活性检测^[10]:反应体系为 5.4 mL 0.2 mol/L pH 值为 6.8 的磷酸缓冲溶液+0.4 mL 0.02 mol/L 邻苯二酚溶液+0.2 mL 酶液;在 30 ℃ 恒温水浴中进行酶促反应 15 min,冷却后于 721 分光光度计在 420 nm 波长测定吸光度值。

酶活性的定义:单位时间内,每毫升酶液,吸光度变化 0.001 定义为 1 个酶活性单位。相对酶活性的定义:相对残留活性=(处理样品活性/未处理对照样品活性)×100%。

3 结果与讨论

3.1 压力对多酚氧化酶活性的影响

多酚氧化酶也是最耐压的酶之一。为了考察梨汁中多酚氧化酶在高压下的变化特性,实验选用温度为 50 ℃、保压时间为 10 min、梨汁 pH 值为 5(梨汁自然酸度)的条件下,进行 5 种压力(100、200、300、400 和 500 MPa)的高压处理。压力对梨汁多酚氧化酶活性影响如图 1 所示。

由图可见,梨汁在 100 MPa 下处理,PPO 酶相对残留活性为 83.4%;在 200 MPa 和 300 MPa 处理时,相对活性分别为 115.3%和 111.4%,随着压力升高梨汁中多酚氧化酶的活性与未处理的对照样酶活性相比没有下降,反而升高;400 MPa 时酶活性为 79.2%,500 MPa 时为 75.3%。产生这种反常现象的主要原因可能是:在 50 ℃ 和 100 MPa 左右的较低压力下,温度和压力促进了梨汁中的游离酶产生变性;同时,由于酶液中还存在一定数量的梨细胞碎片,部分处于附着状态的多酚氧化酶(处于这种状态的

酶稳定性较高)还未解脱出来,故酶活性下降。当压力增加到 200 MPa 到 300 MPa 范围时,压力足以促使酶从梨汁细胞碎片附着而被束缚的状态中解离出来,其中先游离出来的部分酶也可能变性失活,还有一部分未能失活,综合效果是提高了酶的活性。

在本实验的条件下,当压力大于 300 MPa 时,游离的即没有与生物大分子(蛋白质、淀粉和多糖等)结合(或称为生物大分子保护)的多酚氧化酶,其构象和活性中心被破坏,随着压力加大,使部分酶逐渐丧失活性。压力越大,丧失活性的多酚氧化酶分子越多。但是,在压力为 500 MPa、50 °C、保压时间 10 min 和 pH 值为 5 的条件下,还不足以使梨汁中多酚氧化酶完全失活。

以上实验结果分析表明:在处理温度为 50 °C、保压时间为 10 min 和梨汁 pH 值为 5 的条件下,200~300 MPa 压力范围内处理梨汁时多酚氧化酶被激活,活性增加,并且在 200~300 MPa 之间时活性表现最高;超过 300 MPa 酶的活性开始下降,到 500 MPa 时酶的活性下降到对对照样酶活性的 75.3%。

3.2 温度对多酚氧化酶活性的影响

为了考察梨汁中多酚氧化酶在超高压处理时不同温度的协同酶活性的变化特性,实验选用在压力为 400 MPa、保压时间为 10 min、梨汁 pH 值为 5(梨汁自然酸度)的条件下,进行 6 种温度(20、25、30、40、50 和 60 °C)的中温协同高压处理。温度对梨汁多酚氧化酶活性的影响如图 2 所示。

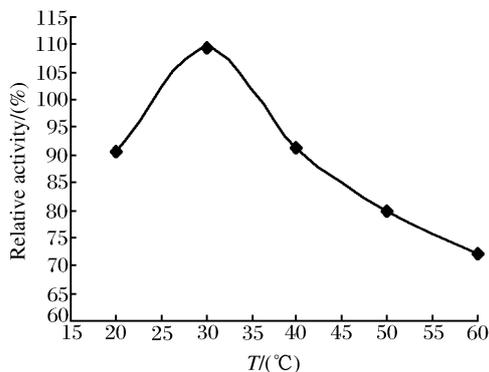


图 2 温度对 PPO 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on PPO activity

温升会弱化酶蛋白的一些氢键、疏水键、离子键和静电相互作用。高压增强这种弱化作用的效果,使酶的三维构象受到破坏,加速多酚氧化酶的失活。上面提到协同温度存在一个最小值,只有温度超过这个值后才能加速酶的活性的损失,引起酶变性。这个值大小与诸多因素相关如 pH 值、压力、介质的化学成分等。在本实验条件下,最小有效协同温度为 40 °C。

以上实验结果分析表明:在处理压力为 400 MPa、保压时间为 10 min 和梨汁 pH 值为 5 的条件下,在 30 °C 处理梨汁时,多酚氧化酶被激活,酶的活性反而增大;30 °C 以后,酶活性随温度升高而迅速降低;在本实验条件下,有效协同高压处理的温度为 40 °C。

3.3 保压时间对多酚氧化酶活性的影响

为了考察梨汁中多酚氧化酶的超高压处理保压时间对酶活性影响的变化特性,实验选用在压力为 400 MPa、温度为 50 °C、梨汁 pH 值为 5(梨汁自然酸度)的条件下,进行 6 种保压时间(2、10、18、26 和 34 min)高压处理。保压时间对梨汁多酚氧化酶活性的影响如图 3 所示。

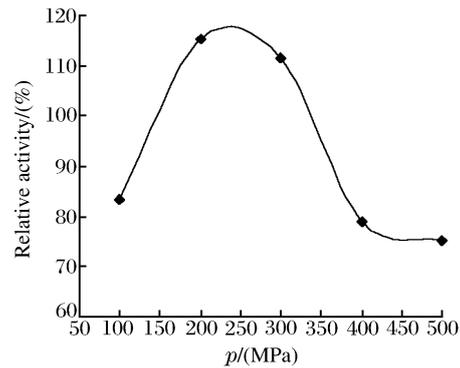


图 1 压力对 PPO 酶活性的影响

Fig. 1 Effect of pressure on PPO activity

由图可见,在 20 °C 进行高压处理时,PPO 酶的相对活性为 90.6%,略有下降;30 °C 温度协同超高压处理,多酚氧化酶活性没有下降,反而上升到了 109.4%;30 °C 以后,酶活性随温度升高而降低(40 °C 为 91.5%;50 °C 为 79.2%;60 °C 为 72.3%)。所以用温度与压力协同作用对梨汁多酚氧化酶灭活时,需要选取 40 °C 以上的温度,协同效果才显著。产生这种现象的主要原因可以解释为,正如每一种酶都有酶活性表现最大的合适温度范围,30 °C 是本实验条件下 PPO 酶蛋白构象最稳定、耐压能力最强的温度点;此外,在 30 °C 时梨汁中未破碎细胞的细胞膜更易被损坏或改变膜的通透性,使细胞内部的多酚氧化酶泄露出来,增加酶活性。

由图可见,在 18 min 以内随保压时间延长多酚氧化酶活性下降速率较大,从 2 min 保压时间的 89.6% 下降到 10 min 的 81.3% 和 18 min 的 75.8%;保压时间超过 18 min 后,酶活性随时间增加下降很慢,多酚氧化酶的活性趋于稳定,保压时间 26 min 时酶的相对活性为 72.5%,34 min 时仍为 70.7%。

以上实验结果分析表明:在 400 MPa、50 °C、pH 值为 5 的条件下,随着保压时间的延长,梨汁中 PPO 酶的活性减小;18 min 以前下降速度较快些;18 min 之后下降速度变缓慢。保压 34 min 梨汁中多酚氧化酶的残留活性达到最低水平,进一步延长保压时间对酶的活性影响甚微。也就是说,保压时间存在一个最小值,只要大于这个值,酶的高压处理残留活性就由其它条件(压力、温度、介质 pH 值和介质的化学组成等)决定。

3.4 pH 值对多酚氧化酶活性的影响

为了考察酸碱对超高压处理梨汁中多酚氧化酶活性影响的变化规律,实验选用压力为 400 MPa、温度为 50 °C、保压时间为 10 min 的条件下,进行 5 种 pH 值(3、4、5、6、7)梨汁的高压处理。由于砀山酥梨汁的天然 pH 值为 5 左右,本实验用柠檬酸和纯碱(碳酸钠)在 pH5 左右来调整梨汁的酸度。pH 值对梨汁中多酚氧化酶活性影响如图 4 所示。

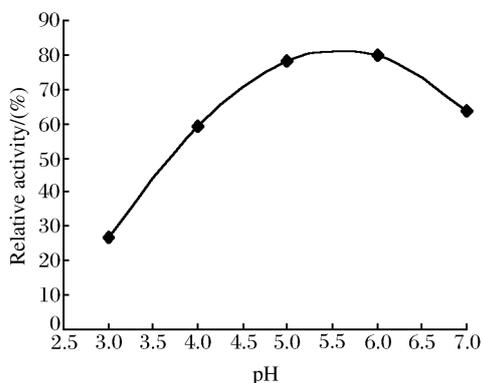


图 4 pH 值对 PPO 酶活性的影响
Fig. 4 Effect of pH on PPO activity

此外,PPO 是含铜蛋白质,在 pH 值低于 3 的酸性环境中,酶中的铜甚至能被解离出来;而在碱性条件下铜离子会与氢氧根离子结合解离生成氢氧化铜。故有调节 pH 值来防止褐变的做法。所以,pH 值对高压处理多酚氧化酶活性的影响是容易理解的。

以上实验结果分析表明:在 400 MPa、50 °C、保压时间为 10 min 的条件下,pH 值在 5~6 之间,酶的残留活性最大;pH 小于 5 或大于 6 时,酶的残留活性都呈下降状态。在 pH 值为 6 时,梨汁中多酚氧化酶最为耐压。

4 结 论

本实验采用中温协同高压对梨汁中多酚氧化酶进行处理,研究了处理压力、温度、保压时间以及梨汁的 pH 值对其活性的影响。经过实验研究和以上分析讨论得出如下结论:

(1) 在处理温度为 50 °C、保压时间为 10 min 和梨汁 pH 值为 5 的条件下,200~300 MPa 压力范围

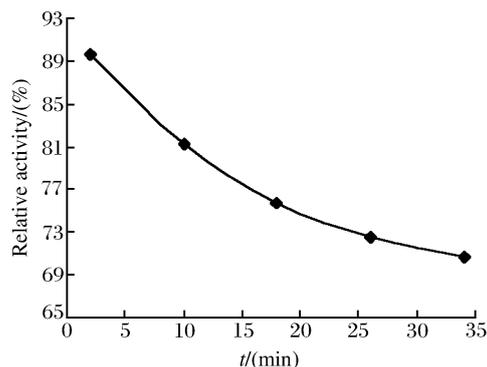


图 3 保压时间对 PPO 酶活性的影响
Fig. 3 Effect of dwell time on PPO activity

由图可见,pH 为 3 时,梨汁中多酚氧化酶的活性最小为 26.7%;随着 pH 值的升高,酶的残留活性不断地增加,在 pH 为 5 时酶的残留活性最大为 78.5%;pH 值为 6 时,酶的活性为 80.2%;当 pH 值超过 6 时,酶的残留活性随之下降,pH 值为 7 时,酶的残留活性回落到 63.9%。

酶的化学本质是蛋白质,故具有两性解离特性。pH 值影响酶活性催化基团的解离状态。pH 的改变(氢离子浓度发生了变化)会改变酶的活性中心有关基团的解离状态,从而影响酶的活性。由于多酚氧化酶的活性部位含有 His 残基,其催化基团的咪唑基的 $pK=6.00$,所以在中性偏酸(pH 值为 5~6)的条件下,表现较高的酶活力,也表现得更为耐压。

内处理梨汁时,多酚氧化酶被激活,活性表现最高;超过 300 MPa 酶的活性开始下降,在 500 MPa 时酶的活性下降到 75.3%。

(2) 协同温度为 30 °C 处理梨汁时,酶的活性反而增大;30 °C 以后,酶活性随温度升高而迅速降低;在本实验条件下,有效协同高压处理的温度为 40 °C。

(3) 随着保压时间的延长,梨汁中 PPO 酶的活性减小;18 min 以前下降速度较快;18 min 之后下降速度变缓慢。

(4) 在 400 MPa、50 °C、保压时间为 10 min 的条件下,pH 值在 5~6 之间,酶的残留活性最大;pH 值小于 5 或大于 6 酶的残留活性都呈下降状态。在 pH 值为 6 时,梨汁中多酚氧化酶最为耐压。

References:

- [1] Hernandez A, Cano M P. High Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Tomato Puree [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 226–270.
- [2] Pan J, Zhang W C, Chen C G, et al. Study on Ultra High Pressure Sterilization Practical Procedure and Equipment on Beverage [J]. *Transaction of the Chinese Society of Agriculture Engineering*, 2000, 16(1): 125–128. (in Chinese)
潘 见, 张文成, 陈从贵, 等. 饮料超高压杀菌实用性工艺及设备探讨 [J]. *农业工程学报*, 2000, 16(1): 125–128.
- [3] Weemaes C, Rubens P, de Cordt S, et al. Temperature Sensitivity and Pressure Resistance of Mushroom Polyphenoloxidase [J]. *J Food Science*, 1997, 62(2): 261–266.
- [4] Gomes M R A, Ledward D A. Effect of High-Pressure Treatment on the Activity of Some Polyphenoloxidases [J]. *Food Chemistry*, 1996, 56(1): 1–5.
- [5] Anese M, Nicoli M C, Dall'aglio G, et al. Effect of High Pressure Treatments on Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities [J]. *J Food Biochemistry*, 1995, 18: 285–293.
- [6] 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 and Technology*, 1998, 9: 197–203.
- [7] Lemos M A, Oliveria J C, Anne van Loey, et al. Influence of pH and High Pressure on the Thermal Inactivation Kinetics of Horseradish Peroxidase [J]. *Food Biotechnology*, 1999, 13(1): 13–32.
- [8] Rastogi N K, Eshtiaghi M N, Knorr D. Effects of Combined High Pressure and Heat Treatment on the Reduction of Peroxidase and Polyphenoloxidase Activity in Red Grapes [J]. *Food Biotechnology*, 1999, 13(2): 195–208.
- [9] Pan J, Zhang W C, Chen C G. Design of Ultra High Pressure Processing Procedure and Equipment on Foodstuff [J]. *Food and Machine*, 1999, 5: 32–33. (in Chinese)
潘 见, 张文成, 陈从贵. 超高压食品杀菌工艺及设备的设计 [J]. *食品与机械*, 1999, (5): 32–33.
- [10] Cheng J J. Study on Reactivity Dynamics and Progress of Apple-Pear Polyphenoloxidase [J]. *Food Science*, 2002, 23(8): 69–71. (in Chinese)
程建军. 苹果梨中多酚氧化酶反应动力学和反应进程的研究 [J]. *食品科学*, 2002, 23(8): 69–71.

Effect of High Pressure (HP) Treatments on Polyphenoloxidase (PPO) Activity in Pear Juices

ZENG Qing-Mei, PAN Jian, XIE Hui-Ming, YANG Yi, HUANG Xun-Duan

(Key Laboratory of Bio-Process (Hefei University of Technology),
Ministry of Education, Hefei 230069, China)

Abstract: The effect of high hydrostatic pressure treatment (0.1~500 MPa) combined with mild heat treatment (20~60 °C) under different pH values (3.0~7.0) on polyphenoloxidase (PPO) activity of Chinese Dangshan pear juice was investigated in this paper. Results showed that the polyphenoloxidase was activated when the high pressure treatment on the pear juice was carried out under the temperature 50 °C, the dwell time 10 min, the pH5 and the pressure between 200~300 MPa. The polyphenoloxidase activity reached the maximal level under temperature of 30 °C synergizing high pressure treatment, and decreased under the temperature of above 30 °C. The polyphenoloxidase residual activity was rapidly decreased with the increasing of dwell time. The polyphenoloxidase residual activity and the pressure-resistance reached their maximal level under pH6.

Key words: pear juice; ultra high pressure; mild heat; polyphenoloxidase; dwell time; pH