文章编号：1000-5773(2005)02-0179-05

超高压处理对荔枝果肉中两种酶和可溶性蛋白的影响*

黄 丽[1,3]，孙远明[1]，潘 科[1]，陈柏暖[2]，梁棣文[2]，谌国莲[1]，余红英[1]

(1.华南农业大学食品学院，广东广州 510642；
2.华南理工大学工业装备与控制工程学院，广东广州 510641；
3.广东农工商职业技术学院，广东广州 510507)

摘要：为了研究超高压处理对荔枝果肉中过氧化物酶(POD)、果胶甲基酯酶(PME)及可溶性蛋白含量的影响，将荔枝("淮枝"品种)果肉在100～400 MPa压力、10 ℃温度条件下处理30 min，采用分光光度法测定果肉中POD、PME的活性，用天然凝胶电泳法以及活性染色法测定POD、PME同工酶的变化，用SDS凝胶电泳法测定果肉中可溶性蛋白含量。结果表明：100～200 MPa超高压处理使荔枝果肉中POD活性上升且出现新的同工酶，300～400 MPa超高压处理则使其活性降低且新出现的同工酶消失；100 MPa压力处理使荔枝果肉中PME活性上升且出现新的同工酶，200～400 MPa超高压处理则使其活性降低且新出现的同工酶消失；100 MPa超高压处理使荔枝果肉中可溶性蛋白含量有所增加，而在200～400 MPa压力处理下其含量持续下降。

关键词：超高压；荔枝果肉；过氧化物酶；果胶甲基酯酶；可溶性蛋白
中图分类号：O521.9；TS209.5 **文献标识码**：A

1 引 言

荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)属无患子科植物，是我国南方的特色水果之一，其果肉香甜可口，营养丰富，深受广大消费者的喜爱。由于荔枝特殊的生理特性，采收期又集中在炎热的夏季，其鲜果的保藏期很短。为缓解鲜果销售上的压力，将荔枝加工成罐头等产品可大大延长其保藏期。但由于目前采用热加工法，加工后容易出现后熟味，而且维生素C含量也大为下降。食品超高压加工技术是新兴的一种冷加工技术，它不仅可以有效地杀灭食品物料中的微生物，延长食品保藏期，同时还能较好地保持食品中天然的营养成分及风味，因此超高压杀菌法在许多食品加工上得到了应用[1]。过氧化物酶(POD)及果胶甲基酯酶(PME)是引起食品变质的重要食品品质酶，近年来超高压加工对其影响也引起了许多研究者的重视。由于所选材料的不同，超高压处理的影响通常会表现出较大的差异[2]。目前国内外尚未见有荔枝超高压加工方面的报道。本实验主要研究超高压加工对荔枝果肉中POD、PME和可溶性蛋白的影响，为以后荔枝超高压加工技术的应用提供理论依据和实践基础。

2 材料与方法

2.1 材料与设备

本实验原料采用新鲜的荔枝，"淮枝"品种(*Litchi chinensis* Sonn. cv. Huaizhi)，产于广东从化。分

* **收稿日期**：2004-02-02；**修回日期**：2004-06-08
基金项目：广东省自然科学基金项目(010342)；广东省科技攻关项目(B202)
作者简介：黄 丽(1978—)，女，硕士，助教，主要研究方向为食品化学.
通讯作者：孙远明，主要研究方向为食品化学、食品质量与安全. E-mail：sunyuanming@263.net

析测定所用的各种化学试剂均为分析纯。所用超高压设备为上海大隆机器厂生产,由华南理工大学自动工程控制学院高压容器研究所提供,其传压介质为煤油与改性汽油,其比例为1∶1。

2.2 方法

2.2.1 样品准备

选取成熟度适中,形态良好,无病虫害的果实,去皮、核,切成小块,于聚乙烯塑料薄膜内进行真空包装,冰水中贮藏,次日清晨进行超高压处理。

2.2.2 超高压处理实验

将包装好的样品置于高压容器内,密闭,采用高压泵由底部输送传压介质,到达设定压力后,保压30 min,温度控制在10 ℃。本实验采用100、200、300、400 MPa等4个压力等级进行超高压处理,空白对照为常压(0.1 MPa)下未经处理的样品。经处理后的样品及空白对照均于4 ℃下进行贮藏,尽快完成各项指标检测。

2.2.3 荔枝果肉POD的提取与测定

酶样的提取与测定基本参照Prestamo等[4]的方法,稍作修改。称取约10 g重的果肉,加入5 mL浓度为0.05 mol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液(内含1% 聚乙烯聚吡咯烷酮)为提取液,冰浴研磨,12 000 r/min离心5 min,上清液为粗酶液。取100 μL粗酶液,以愈创木酚和过氧化氢为底物测定POD活性,于470 nm下记录光密度变化值,以每分钟变化0.001个光密度为一个酶活单位,重复3次。

2.2.4 荔枝果肉中POD同工酶电泳分析

参照文献[3]的方法进行。采用不连续电泳法,以8%凝胶为分离胶,以4%凝胶为浓缩胶;电泳完毕后,采用联苯胺染色液进行活性染色,固定后进行扫描,记录酶谱。

2.2.5 荔枝果肉PME的提取与测定

酶样的提取及测定均参照Alonso等的方法[5]。称取约10 g果肉,加入5 mL浓度为1 mol/L、pH 7.5的NaCl溶液,冰浴研磨,12 000 r/min离心5 min,上清液为粗酶液。取200 μL粗酶液,以果胶为底物,溴百里香酚蓝为指示剂测定PME活性,于620 nm下记录光密度变化值,以每分钟变化0.001个光密度为一个酶活单位,重复3次。

2.2.6 荔枝果肉中PME同工酶电泳分析

参照Helen等[6]的方法,稍加修改,采用7.5%的分离胶(内含0.1%的果胶),3%的浓缩胶。先将上面提取的PME粗酶液用浓度为0.02 mol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液透析12 h以上进行脱盐,然后用聚乙二醇6000适当浓缩,再进行点样。电泳完毕后将凝胶置于0.02 mol/L、pH 8.0的Tris-HCl缓冲液中37 ℃下保温30 min,蒸馏水冲洗,用0.5 g/L的次甲基蓝染色液进行活性染色10 min,蒸馏水脱色,完毕后进行扫描,记录酶谱。

2.2.7 荔枝果肉中可溶性蛋白SDS-PAGE电泳分析

参照文献[3]的方法进行。采用不连续电泳法,以10%凝胶为分离胶,以5%凝胶为浓缩胶,恒压电泳,完毕后采用考马斯亮蓝G-250染色,醋酸-甲醇溶液脱色固定后进行扫描。

3 结果与分析

3.1 超高压处理对荔枝果肉中POD活性和同工酶的影响

如图1所示,在100～200 MPa压力下,荔枝果肉中POD活性上升,在300、400 MPa压力下,POD活性有所抑制,在400 MPa压力下POD活性降低12.3%。从图2中可知,在100、200 MPa压力下,荔枝果肉中POD同工酶出现新酶带,在300、400 MPa压力下,新酶带消失。

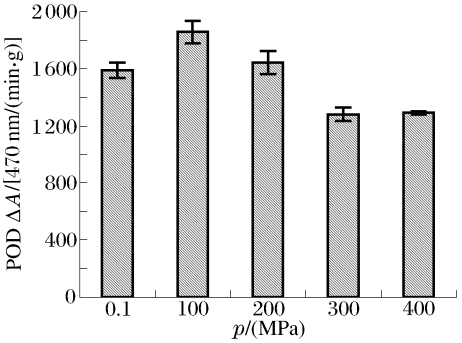
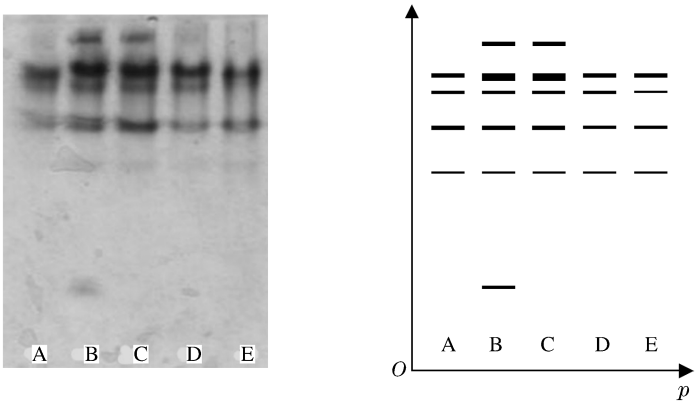


图1 超高压处理对荔枝果肉中POD的影响

Fig. 1 Effect of ultra high pressure on POD in litchi fruit



A. 0.1 MPa;B. 100 MPa;C. 200 MPa;D. 300 MPa;E. 400 MPa

图 2　超高压处理对荔枝果肉中 POD 同工酶的影响

Fig. 2　Effect of ultra high pressure on isoenzymes of POD in litchi fruit

3.2　超高压处理对荔枝果肉中 PME 活性和同工酶的影响

如图 3 所示,在 100 MPa 压力下,荔枝果肉中 PME 活性上升;在 200～400 MPa 压力下,PME 活性均有所下降。从图 4 可知,在 100 MPa 压力下,荔枝果肉中 PME 同工酶新增了一条酶带;在 200～400 MPa压力下,PME 同工酶组成与对照一致。可见,在超高压条件下 PME 的变化规律与 POD 相似:在较低压力下活性上升,并且出现新的同工酶;在较高压力下时,新酶带消失,活性有所抑制。

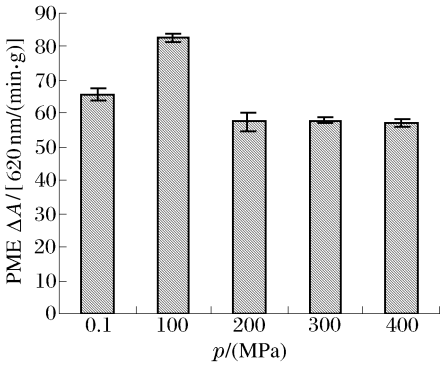
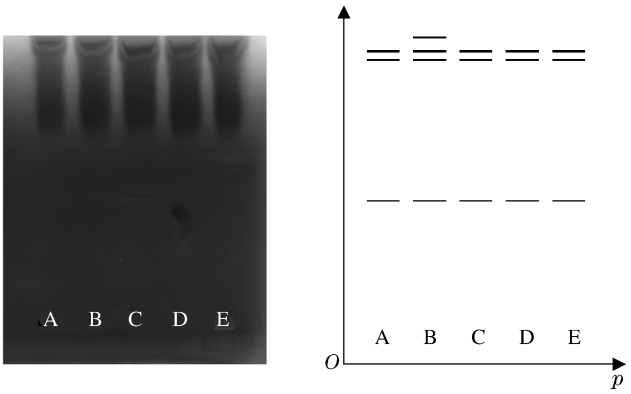


图 3　超高压处理对荔枝果肉中 PME 的影响

Fig. 3　Effect of ultra high pressure on PME in litchi fruit



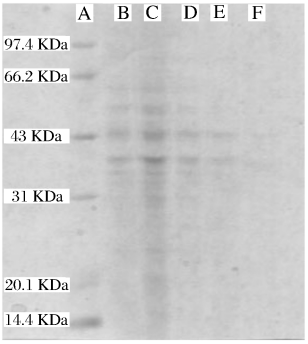
A. 0.1 MPa;B. 100 MPa;C. 200 MPa;D. 300 MPa;E. 400 MPa

图 4　超高压处理对荔枝果肉中 PME 同工酶的影响

Fig. 4　Effect of ultra high pressure on isoenzymes of PME in litchi fruit

3.3　超高压处理后对荔枝果肉中蛋白质的影响

由图 5 可见,超高压处理对荔枝果肉中的蛋白质组成产生较大的影响。在 100 MPa 压力下,蛋白质带比对照(0.1 MPa)有所增多,而在 200～400 MPa 的压力下,随着压力的上升,蛋白带逐渐减少。



A. Marker;B. 0.1 MPa;C. 100 MPa;D. 200 MPa;E. 300 MPa;F. 400 MPa

图 5　超高压处理对荔枝果肉中蛋白质的影响

Fig. 5　Effect of ultra high pressure on protein in litchi fruit

4　讨　论

前人许多研究均发现,POD 是一种非常耐受超高压处理的食品品质酶,但材料来源不同,其结果会表现出一定的差异。Arroyo 等人研究了超高压处

理对洋葱中POD的影响，发现在300～350 MPa压力下处理30 min会使其活性上升，在400 MPa压力下活性下降不显著[8]。Prestamo等人对苹果切片的研究则发现，在600～800 MPa压力下处理15 min均使POD的活性上升，在1 000 MPa压力下活性下降40%左右[4]。Krebbers等人对绿豆的研究发现，在500 MPa压力下处理1 min，POD活性下降25%[9]。我们研究则发现，荔枝果肉中的POD在100～200 MPa压力处理时其活性上升，在400 MPa压力处理下其活性仅下降12%左右。Quaglia认为，POD存在多种形式的同工酶可能是其耐受超高压处理的原因[10]，我们的研究结果支持这一观点，荔枝果肉中的POD含有多种同工酶，并在较低压力处理时出现新的同工酶，因而POD活性有所上升。超高压处理对PME的影响随着材料来源的不同则表现出较大的差异，大概有三种情况。第一种是PME随压力上升活性下降，如Polydera等人对希腊脐橙果汁的研究发现，在500 MPa压力下处理15 min，PME活性基本被钝化[11]；Nienaber等人对柑橘汁的研究发现，在600 MPa压力下处理3 min，PME的活性下降90%左右[12]。第二种是PME随压力上升其活性基本不变，如Ratchada等人对番茄整果进行了超高压处理，发现在200～600 MPa压力下处理20 min，PME活性基本没有什么变化[13]。第三种是PME在较低压力时活性上升，只有当压力上升到一定程度时，活性才开始下降，如Shook等人对番茄切片进行超高压处理，发现在400～600 MPa压力处理5 min后，PME活性上升，800 MPa压力下活性仅下降30%左右[14]；Kim等人对胡萝卜汁的研究发现，在100～600 MPa的压力范围内处理10 min，PME活性随着压力的上升而上升；在500～600 MPa压力下其活性比对照还高[15]。我们的研究结果属于第三种情况，并且PME同工酶的变化规律与POD相似。本研究结果表明：荔枝果肉中的POD和PME是两种耐压酶。目前正在探讨更高压力处理、中温协同处理、抑制剂预处理以及高温瞬时冲击预处理等各种方式对其影响，结果将另文发表。

References:

[1] Yuste J, Capellas M, Pla R, et al. High Pressure Processing for Food Safety and Preservation: A Review [J]. J Rapid Methods and Automation in Microbioligy, 2001, 9(1): 1－10.

[2] Pan K, Sun Y M, Huang L. The Effect of Ultra High Pressure Processing on Enzymes Related to Food Quality [J]. Food Sci, 2003, 24(3): 142－146. (in Chinese)
潘 科，孙远明，黄 丽. 超高压加工对食品品质酶的影响 [J]. 食品科学，2003，24(3)：142－146.

[3] Zhao Y H, Gao X Y. Lectures of Experimental Technology of Biochemistry [M]. Guangzhou: South of China University of Technology Press, 2000, 45－50: 170－176. (in Chinese)
赵亚华，高向阳. 生物化学实验技术教程 [M]. 广州：华南理工大学出版社，2000，45－50：170－176.

[4] Prestamo G, Arabas J, Broczek M F, et al. Reaction of B. *cereus* Bacteria and Peroxidase Enzymes under Pressure > 400 MPa [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49: 2830－2834.

[5] Alonso J, Rodriguez T, Canet W. Purification and Characterization of Two Pectinmethylesterase from Persimmon (*Diospyros kaki*) [J]. J Sci Food Agric, 1997, 75: 352－358.

[6] Helen M M, Roger E, Wendy J P. Purification and Properties of the Major Pectinesterases in Lemon Fruits(*Citrus limon*) [J]. J Sci Food Agric, 1993, 62: 163－168.

[7] Hendrickx M, Ludikhuyze L, Broeck I V D, et al. Effect of High Pressure on Enzymes Related to Food Quality [J]. Trends in Food Sci Tech, 1998, 9: 197－203.

[8] Arroyo G, Sanz P D, Prestamo G. Response to High-Pressure, Low-Temperature Treatment in Vegetables: Determination of Survival Rates of Microbial Populations Using Flow Cytometry and Detection of Peroxidase Activity Using Confocal Microscopy [J]. Applied Microbiology, 1999, 86: 544－556.

[9] Krebbers B, Matser A M, Koes M, et al. Quality and Storage-Stability of High-Pressure Preserved Green Beans [J]. J Food Engineering, 2002, 54: 27－33.

[10] Quaglia G B, Gravina R, Paperi R, et al. Effect of High Pressure Treatments on Peroxidase Activity, Ascorbic Acid Contend and Texture in Green Peas [J]. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 1996, 29: 552－555.

[11] Polydera A C, Galanou E, Stoforos N G, et al. Inactivation Kinetics of Pectin Methylesterase of Greek Navel Orange

Juice as a Function of High Hydrostatic Pressure and Temperature Process Conditions [J]. J Food Engineering, 2004,62:291－298.

[12] Nienaber U, Shellhammer T H. High-Prssure Processing of Orange Juice: Kinetics of Pectinmethylesterase Inactivation [J]. J Food Sci, 2001,66(2):328－331.

[13] Ratchda T, Dave A L, Jennifer M A. Effect of High-Pressure Treatment on the Texture of Cherry Tomato [J]. J Agri Food Chem, 2000,48:1434－1441.

[14] Shook C M, Shellhammer T H, Schwartz S J. Polygalacturonase, Pectinesterase, and Lipoxygenase Activities in High-Pressure-Processed Diced Tomatoes [J]. J Agri Food Chem, 2001,49:664－668.

[15] Kim Y S, Park S J, Cho Y H, et al. Effect of Combined Treatment of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat on the Quality of Carrot Juice [J]. J Food Sci, 2001,66(9):1355－1360.

Influence of Ultra High Pressure on Peroxidase Pectin Methyl Esterase and Soluble Protein in Litchi Fruit

HUANG Li[1,3], SUN Yuan-Ming[1], PAN Ke[1], CHEN Bai-Nuan[2], LIANG Di-Wen[2], CHEN Guo-Lian[1], YU Hong-Ying[1]

(1. *College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou* 510642, *China*;
2. *College of Industrial Equipment and Control Engineering, South China University of Technology, Guangzhou* 510641, *China*;
3. *Guangdong Agriculture, Industry and Business Polytechnique College, Guangzhou* 510507, *China*)

Abstract: In order to investigate the effects of ultra high pressure(UHP) on the content of soluble protein, peroxidase(POD) and pectinmethylesterase(PME) in litchi fruit, the pulp of litchi(*Litchi chinensis* Sonn cv. Huaizhi) was subjected to UHP treatment(100～400 MPa for 30 min at 10 ℃). The activities of POD and PME were detected by spectrophotometry, the isoenzymes of POD and PME were detected by native-PAGE and active staining. The content of soluble protein was detected by SDS-PAGE. Results showed that the POD activity raised and the new isoenzyme appeared when a treatment of 100～200 MPa was applied, the treatment of pressure 300～400 MPa made the POD activity decrease and the new isoenzyme disappear. The PME activity ascended and the new isoenzyme of PME appeared at 100 MPa; when the treatment of 200～400 MPa was applied the PME activity lowered and the new isoenzyme disappeared. The content of soluble protein had a little increase at 100 MPa, but continue to declined at 200～400 MPa.

Key words: ultra high pressure; litchi fruit; peroxidase(POD); pectin methyl esterase(PME); soluble proteins