文章编号：1000-5773(2007)01-0089-06

超高压和酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中过氧化物酶和果胶甲基酯酶的影响*

黄 丽[1,2]，孙远明[1]，陈柏暖[3]，黄 苇[1]，谌国莲[1]

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

摘要：为了研究超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中过氧化物酶(POD)和果胶甲基酯酶(PME)的影响，将荔枝("淮枝"品种)果肉在两种酶抑制剂组合溶液(A：5 g/L 柠檬酸＋2.5 g/L L-抗坏血酸＋5 g/L 氯化钙；B：10 g/L 柠檬酸＋5 g/L L-抗坏血酸＋10 g/L 氯化钙)中分别浸泡 10 min，并在 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。结果表明：A、B 两种组合处理能够明显钝化 POD，但却显著激活了 PME；超高压与 A 组合联合处理不能使 POD、PME 活性下降；超高压与 B 组合联合处理对 POD、PME 的影响与压力值有关系，100～300 MPa 的超高压与 B 组合联合处理使 POD 活性下降，200～400 MPa 的超高压与 B 组合联合处理则使 PME 活性升高。因此，超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 POD 的钝化存在一定的协同效应，且浓度越高，协同抑制效应越明显；而超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 PME 的钝化却表现出一定的拮抗性。

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

1 引 言

荔枝(*Litchi chinensis*)属无患子科植物，世界上的生产地主要集中在中国、越南、泰国、印度、南非等地，其风味独特，深受广大消费者的喜爱，是国际上公认的精品水果[1]。目前荔枝原果汁及其加工产品如荔枝罐头等均采用热加工法。传统的热加工法具有很多缺点，例如，破坏了鲜果原有的品质，导致褐变以及营养素的损失，最终降低了其商品价值[2]。超高压加工法是新兴的一种冷加工技术，近些年来发展十分迅速[3-4]。超高压食品加工具有很多特点，如超高压引起微生物和酶失活，同时完整地保留了香味和多种维生素小分子物质[5-6]。在桃子[7]、草莓[8]、凤梨[9]、番石榴[10]、樱桃番茄[11]、香蕉[12]、胡萝卜汁[13]、橙汁[14]、西瓜[15]等一些水果的加工研究中，发现这些水果经过超高压处理后不仅保藏期可延长到半年以上，而且其天然的营养成分及风味等破坏程度很小，显示出超高压加工在水果加工中的潜在优势。有关荔枝的超高压冷加工法目前国内尚未见其他人在此方面的报道。我们曾经报道了在单纯的超高压条件下荔枝果肉中 POD 和 PME 的活性变化规律，发现单纯的超高压处理不能使它们的活性显著下降[16]。为了解决这个问题，本工作采用柠檬酸、L-抗坏血酸和氯化钙 3 种常用的酶抑制剂与超高压联合处理的方法，研究荔枝果肉中 POD 和 PME 活性的变化，为日后荔枝超高压加工技术的应用提供方法参考。

* **收稿日期**：2005-12-15；**修回日期**：2006-04-17
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)；
广东省科技计划重大专项(2004A20301002)
作者简介：黄 丽(1978—)，女，硕士，讲师，主要研究方向为食品科学. E-mail：huanglipk@sina.com.cn
通讯作者：孙远明，博士，教授，博士生导师，主要研究方向为食品化学、食品质量与安全. E-mail：ymsun@scau.edu.cn

2 材料与方法

2.1 材料与设备

实验原料采用新鲜的荔枝,“淮枝”品种(*Litchi chinensis* Sonn. cv. Huaizhi),产于广州从化市。分析测定所用的各种化学试剂均为分析纯。所用超高压加工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 样品准备及酶抑制剂处理

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,清水冲洗干净,晾干,备用。

配制A、B两种酶抑制剂组合溶液,其中,酶抑制剂A组合溶液为,柠檬酸浓度5 g/L,L-抗坏血酸浓度2.5 g/L,氯化钙浓度5 g/L;酶抑制剂B组合溶液为,柠檬酸浓度10 g/L,L-抗坏血酸浓度5 g/L,氯化钙浓度10 g/L。

将上面准备好的荔枝果肉分成两份,分别浸泡于A、B两种组合溶液中10 min,取出晾干,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介质,到达设定压力后进行保压,时间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)下经酶抑制剂单独处理的样品。经处理后的样品及空白对照于4 ℃下进行贮藏,尽快完成各项指标检测。

2.2.3 荔枝果肉中POD的提取与测定

POD酶样的提取与测定基本参照Prestamo等[17]的方法,稍作修改。以0.05 mol/L,pH8.0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,取上清液为粗酶液。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PME的提取与测定

PME酶样的提取及测定均参照Alonso等[18]的方法。以1 mol/L,pH7.5的NaCl溶液为提取液,冰浴研磨,12 000 r/min离心5 min,取上清液为粗酶液。以果胶(Sigma)为底物测定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。

3 结果与分析

3.1 酶抑制剂单独处理对荔枝果肉中POD和PME活性的影响

单纯的酶抑制剂处理对荔枝果肉中POD和PME活性的影响如图1、图2所示。从图1可见,经过柠檬酸、L-抗坏血酸和氯化钙等3种酶抑制剂组合溶液处理后,荔枝果肉中POD的活性显著下降,其中,经酶抑制剂A组合溶液处理后,荔枝果肉中POD相对活性为对照的23.7%;经酶抑制剂B组合溶液处理后,荔枝果肉中POD相对活性为对照的16.9%。从图2可以发现,经过酶抑制剂组合溶液处理后,荔枝果肉中PME的活性显著上升,其中,经酶抑制剂A组合溶液处理后,荔枝果肉PME相对活性为对照的275.1%;经酶抑制剂B组合溶液处理后,荔枝果肉PME相对活性为对照的169.6%。可见,柠檬酸、L-抗坏血酸和氯化钙等3种酶抑制剂组合处理可明显钝化荔枝果肉中POD的活性,但是却显著激活了PME的活性。

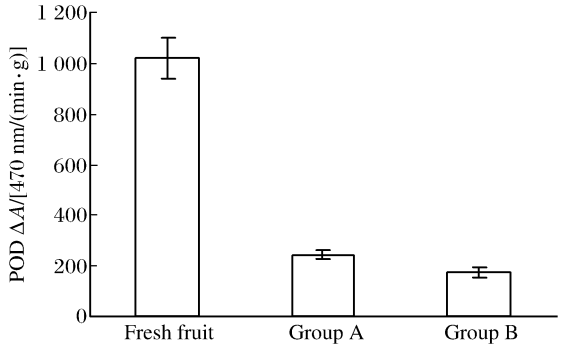


图 1　酶抑制剂单独处理对荔枝果肉中 POD 的影响

Fig. 1　Effect of enzyme inhibitors on POD in litchi pulp

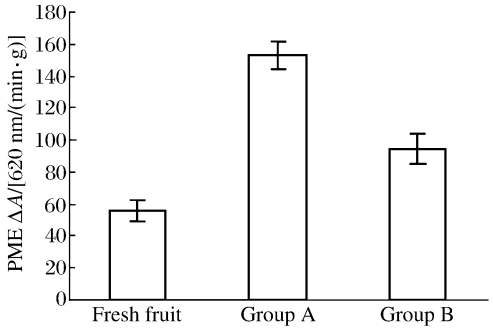


图 2　酶抑制剂单独处理对荔枝果肉中 PME 的影响

Fig. 2　Effect of enzyme inhibitors on PME in litchi pulp

3.2　超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 POD 活性的影响

超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 POD 活性的影响如图 3、图 4 所示。从图 3 可见,当采用酶抑制剂 A 组合溶液与超高压联合处理时,荔枝果肉中 POD 的活性除在 200 MPa 压力下与对照基本一致外,在其它压力下均比对照有所提高。从图 4 可见,当采用酶抑制剂 B 组合溶液与超高压联合处理时,在 100～300 MPa 下,POD 酶活有所下降,但在 400 MPa 压力下,酶活又显著上升。此结果表明,在浓度较低(A 组合)时,酶抑制剂与超高压联合处理会诱导 POD 酶活性的上升,但在较高浓度(B 组合)下可与一定压力值(100～300 MPa)的超高压处理发挥一定的协同抑制作用。

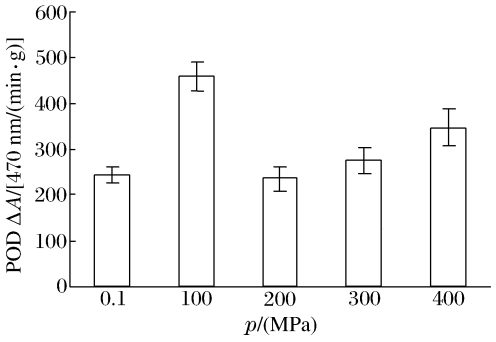


图 3　超高压与酶抑制剂 A 组合联合处理对荔枝果肉中 POD 的影响

Fig. 3　Effect of combined treatment of ultra high pressure and enzyme inhibitors(Group A) on POD in litchi pulp

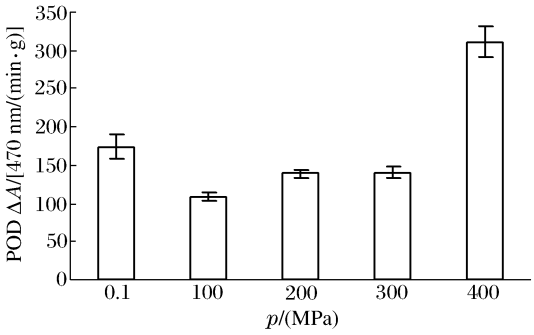


图 4　超高压与酶抑制 B 组合联合处理对荔枝果肉中 POD 的影响

Fig. 4　Effect of combined treatment of ultra high pressure and enzyme inhibitors(Group B) on POD in litchi pulp

3.3　超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 PME 活性的影响

从图 2 结果可知,酶抑制剂 A、B 两种组合溶液都激活了荔枝果肉中的 PME。超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 PME 活性的影响如图 5、图 6 所示。从图 5 可见,采用酶抑制剂 A 组合溶液与超高压联合处理,虽然在 100～400 MPa 压力下均使 PME 活性有所降低,但是,比新鲜荔枝果肉中的 PME 活性仍然要高(见图 2)。从图 6 可以发现,采用酶抑制剂 B 组合溶液与超高压联合处理,在 100～400 MPa 压力下都没有使 PME 活性降低,在 200～400 MPa 压力下还使 PME 的活性升高。因此,酶抑制剂 A、B 两种组合溶液与超高压联合处理对于荔枝果肉中 PME 的钝化不但都不存在协同抑制效应,反而在一些压力下还使酶活显著上升。此结果表明,对荔枝果肉中 PME 活性而言,超高压与酶抑制剂之间表现出了一定的拮抗性。

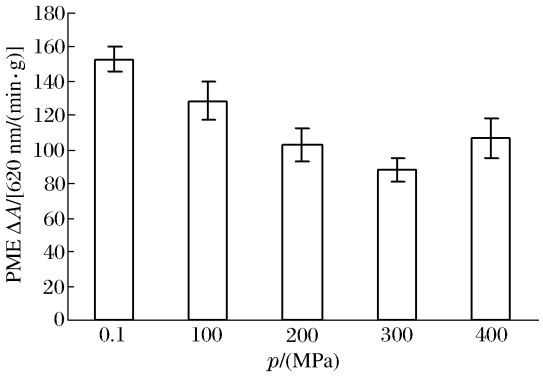


图 5 超高压与酶抑制剂 A 组合联合处理对荔枝果肉中 PME 的影响

Fig. 5 Effect of combined treatment of ultra high pressure and enzyme inhibitors (Group A) on PME in litchi pulp

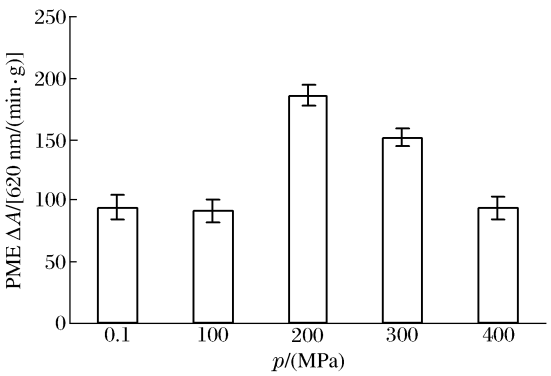


图 6 超高压与酶抑制剂 B 组合联合处理对荔枝果肉中 PME 的影响

Fig. 6 Effect of combined treatment of ultra high pressure and enzyme inhibitors (Group B) on PME in litchi pulp

4 讨 论

采用酶抑制剂进行处理是食品加工中常用的辅助手段之一,其中柠檬酸、抗坏血酸和氯化钙是几种最常用的酶抑制剂[19]。柠檬酸是金属离子螯合剂,可以螯合 Cu^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{2+} 等多价金属离子,这些金属离子通常为酶的作用辅基,缺乏它们会使酶的催化活性下降[20];抗坏血酸是一种抗氧化剂,可以清除氧自由基,因此对于 POD、PPO 以及 LOX 等此类氧化酶有较好的抑制作用[21],通常认为抗坏血酸与柠檬酸复合使用效果更佳;此外,由于柠檬酸和抗坏血酸也是一种酸味剂,可以使体系的 pH 值下降,使酶偏离它们的最适作用 pH 值,导致活性下降[20]。氯化钙是一种固化剂,研究表明,Ca^{2+} 有交联作用,可以使果蔬类食品中的细胞壁多糖成分——果胶类物质形成紧密交联网络结构,从而使果胶酶对它的降解作用大为减弱[22-23];另外,有文献报道,达到一定浓度的氯化钙对 POD 等氧化酶类也有一定的抑制作用[19]。抑制剂对酶的抑制作用不是绝对的,在其浓度较低时可能是酶的激活剂,因此在进行处理时,酶抑制剂的使用浓度必须控制得当。在本实验中,3 种酶抑制剂复合使用,发现对荔枝果肉中 POD 的活性有显著抑制作用,且浓度越高效果越明显。然而,其处理同时又激活了 PME 的活性,这可能是由于低浓度氯化钙起了相反作用的缘故。

采用酶抑制剂与超高压联合处理对食品中酶的影响已有许多报道。Weemaes 等[24]研究了不同 pH 值、各种试剂包括 EDTA、苯甲酸钠、氯化钠以及 4-己基间苯二酚分别与超高压联合处理对鳄梨和蘑菇中 PPO 的影响,发现有的试剂可以提高酶对高压的敏感性,使酶的高压失活阈值下降;而有的试剂会使酶的高压稳定性提高。Prestamo 等[25]研究了采用蔗糖和抗坏血酸组合溶液对苹果切片进行浸泡,再进行超高压处理,结果发现二者对于钝化 POD 没有协同作用,但是由于抗坏血酸的保护作用,可以防止由高压导致的酶促褐变,并且有很好的灭菌效果。Broeck 等[26-27]研究了蔗糖和 Ca^{2+} 分别与超高压联合处理对柑橘中 PME 的影响,结果发现随着 Ca^{2+} 浓度的上升,PME 在高压条件下的稳定性上升,表明 Ca^{2+} 与超高压处理对于 PME 活性的影响存在拮抗作用。从他们的研究结果中可以发现,酶抑制剂处理有改变酶高压敏感性的作用,然而一些金属离子型的酶抑制剂(如氯化钠、氯化钙等)虽然自身对酶活有影响,却能够提高酶的高压稳定性。酶抑制剂与超高压处理对酶活的影响,二者机理不同,因此它们之间并不一定存在协同效应。

即使达到灭菌效果的压力等级,也并不一定能够钝化食品中的酶。另外,由于超高压处理会破坏食品物料的组织结构,导致区域化结构去除,会促使酶和底物相接触,导致酶促变质。我们在过去的研究中发现,荔枝果肉中的 POD 和 PME 是两种耐压酶,单纯的超高压处理不能使它们的活性显著下降[16]。通过本工作的实验研究表明:超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 POD 的钝化存在一定的协同效应,且浓度越高,协同抑制效应越明显;而超高压与酶抑制剂联合处理对荔枝果肉中 PME 的钝化却表现出一定的拮抗性。

References:

[1] Phunchaisri C, Apicharsrangkoon A. Effects of Ultra-High Pressure on Biochemical and Physical Modification of Lychee(*Litchi chinensis* Sonn) [J]. J Food Chemistry, 2005, 93: 57-64.

[2] Krebbers B, Master A M, Koets M, et al. Quality and Storage-Stability of High-Pressure Preserved Green Beans [J]. J Food Eng, 2002, 54: 27-33.

[3] Smelt J P P M. Recent Advances in the Microbiology of High Pressure Processing [J]. J Food Sci Tech, 1998, 9: 152-158.

[4] Estrada-Giron Y, Swanson B G, Barbosa-Canovas G V. Advances in the Use of High Hydrostatic Pressure for Processing Cereal Grains and Legumes [J]. J Food Sci Tech, 2005, 16: 194-203.

[5] Sancho F, Lambert Y, Demazeau G, et al. Effect of Ultra-High Hydrostatic Pressure on Hydrosoluble Vitamins [J]. J Food Eng, 1999, 39: 247-253.

[6] 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 Microbiology, 2001, 9(1): 1-10.

[7] Sumitani H, Suekane S, Nakatani A, et al. Changes in Composition of Volatile Compounds in High Pressure Treated Peach [J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 785-790.

[8] Kimura K, Ida M, Yosida Y, et al. Comparison of Keeping Quality between Pressure-Processed Jam and Heat-Processed Jam: Changes in Flavor Components, Hue and Nutrients during Storage [J]. J Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(8): 1386-1391.

[9] Rastogl N K, Niranjan K. Enhanced Mass Transfer during Osmotic Dehydration of High Pressure Treated Pineapple [J]. J Food Sci, 1998, 63(3): 508-511.

[10] Yen G C, Lin H T. Changes in Volatile Flavor Components of Guava Juice with High-Pressure Treatment and Heat Processing and during Storage [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 2082-2087.

[11] Tangwongehai R, Ledward D A, Ames J M. Effect of High-Pressure Treatment on the Texture of Cherry Tomato [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 1434-1441.

[12] MacDonald L, Schaschke C J. Combined Effect of High Pressure, Temperature and Holding Time on Polyphenoloxidase and Peroxidase Activity in Banana(Musa acuminata) [J]. J Sci Food Agric, 2000, 80: 719-724.

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

[14] Polydera A C, Stoforos N G, Taoukis P S. Comparative Shelf Life Study and Vitamin C Loss Kinetics in Pasteurised and High Pressure Processed Reconstituted Orange Juice [J]. J Food Eng, 2003, 60: 21-29.

[15] Zeng Q M, Pan J, Xie H M, et al. Influence of Ultra-High-Pressure (UHP) on Micro-Organisms in Watermelon Juice [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18(1): 70-74. (in Chinese)
曾庆梅,潘　见,谢慧明,等. 西瓜汁的超高压杀菌效果研究 [J]. 高压物理学报, 2004, 18(1): 70-74.

[16] Huang L, Sun Y M, Pan K, et al. Influence of Ultra High Pressure on Peroxidase, Pectinmethylesterase and Soluble Protein in Litchi Fruit [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2005, 19(2): 179-183. (in Chinese)
黄　丽,孙远明,潘　科,等. 超高压处理对荔枝果肉中可溶性蛋白和两种酶的影响 [J]. 高压物理学报, 2005, 19(2): 179-183.

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

[18] 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.

[19] Pan K, Sun Y M, Huang L, et al. Effects of Some Factors on Peroxidase and Lipoxygenase Activity in Longan [J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(6): 13-17. (in Chinese)
潘 科,孙远明,黄　丽,等. 几种物质对龙眼果肉中过氧化物酶和脂肪氧合酶的影响 [J]. 食品与发酵业, 2002, 28(6): 13-17.

[20] Cheng J J, Ren Y H, Yang Y L. Recent Progress in Inhibition of Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2000, 31(4): 406-410. (in Chinese)
程建军,任运宏,扬咏丽,等. 果蔬酶褐变控制的研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(4): 406-410.

[21] Prestamo G, Manzano P. Peroxidases of Selected Fruits and Fegetables and the Possible Use of Ascorbic Acid as an Antioxidant [J]. HortScience, 1993, 28: 48-50.

[22] Alonso J, Rodriguez T, Canet W. Effect of Calcium Pretreatments on the Texture of Frozen Cherries. Role of Pectinesterase in the Changes in the Pectic Materials [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43: 1011-1016.

[23] Alonso J, Canet W, Rodriguez T. Thermal and Calcium Pretreatment Affects Texture, Pectinesterase and Pectic Substances of Frozen Sweet Cherries [J]. J Food Sci, 1997, 62: 511-515.

[24] Weemaes C A, Ludikhuyze L R, Broeck I E, et al. Influence of pH, Benzoic Acid, Glutathione, EDTA, 4-Hexylresorcinol and Sodium Chloride on the Pressure Inactivation Kinetics of Mushroom Polyphenol Oxidase [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 3526-3530.

[25] Prestamo G, Arroyo G. Protective Effect of Ascorbic Acid against the Browning Developed in Apple Fruit with High Hydrostatic Pressure [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 3541-3545.

[26] Broeck I E, Ludikhuyze L R, Ven Loey A M, et al. Thermal and Combined Pressure-Temperature Inactivation of Orange Pectinesterase: Influence of pH and Additives [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 2950-2958.

[27] Broeck I E, Ludikhuyze L R, Ven Loey A M, et al. Inactivation of Orange Pectinesterase by Combined Pressure-Temperature: A Kinetic Study [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 1960-1970.

Influence of Combined Treatment of Ultra High Pressure and Enzyme Inhibitors on Peroxidase and Pectin Methyl Esterase in Litchi Pulp

HUANG Li[1,2], SUN Yuan-Ming[1], CHEN Bai-Nuan[3], HUANG Wei[1], ZHAN Guo-Lian

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

Abstract: In order to investigate the effects of combined treatment of ultra high pressure (UHP) and enzyme inhibitors on the activities of peroxidase (POD) and pectin methyl esterase (PME) in litchi pulp, two kinds of enzyme inhibitor prescriptions were designed including group A (citric acid 5 g/L + L-ascorbic acid 2.5 g/L + calcium chloride 5 g/L) and group B (citric acid 10 g/L + L-ascorbic acid 5 g/L + calcium chloride 10 g/L). After being immersed in enzyme inhibitor solutions for 10 min, 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. Results showed that separate treatment of group A or group B could lead to obvious passivation of POD and prominent activation of PME. Combined treatment of UHP and group A could not make the activities of POD and PME decrease. The influence of combined treatment of UHP and group B on POD and PME had relevance to pressure value, the POD activity lowered when the combined treatment of 100～300 MPa and group B was applied, and the PME activity raised obviously when the combined treatment of 200～400 MPa and group B was applied. So, combined treatment of UHP and enzyme inhibitors had certain synergistic effect for POD inactivation, and the synergistic inhibition effect would be more obvious with higher concentration of enzyme inhibitors; but combined treatment of UHP and enzyme inhibitors showed certain rivalry for PME inactivation.

Key words: ultra high pressure (UHP); enzyme inhibitor; litchi pulp; peroxidase (POD); pectin methyl esterase (PME)