文章编号：1000-5773(2011)01-0089-08

高压与加热协同处理对牛肌肉中蛋白酶活性的影响*

马汉军[1]，周光宏[2]，余小领[1]，高海燕[1]，潘润淑[1]，D. A. Ledward[3]

(1. 河南科技学院食品学院，河南新乡 453003；
2. 南京农业大学教育部肉品加工与质量控制重点实验室，江苏南京 210095；
3. Department of Food Biosciences, University of Reading, P. O. Box 226, Whiteknights, Reading RG6 6AP, UK)

摘要：在不同温度(20～60 ℃)和压力(0.1～600 MPa)下处理 20 min，对牛肌肉中蛋白酶活性的影响进行了研究。结果显示：室温下，随着处理压力的增加，酶的活力显著下降，而压力达 400 MPa 及以上时，酶的活力则没有明显变化，同时在 pH 值为 3 和 7.5 时酶的活性几乎完全丧失。200 MPa 以下的压力处理使肌肉中游离氨基酸总量显著上升，压力继续升高，游离氨基酸含量增加的幅度随之降低。400 MPa 及以上压力处理使胰蛋白酶对蛋白质的消化性增强。在 40 ℃温度、200 MPa 压力下的处理，酶的活性没有明显下降，氨基酸总量也未发生明显变化。随着压力的升高酶的活性逐渐丧失，600 MPa 时，酶在 pH 值为 7.5 时几乎完全失活，氨基酸总量急剧下降。60 ℃温度下，部分酶仍具有一定活力，200 MPa 没有造成酶活力的明显变化，然而游离氨基酸的含量则显著增加。600 MPa 压力下几乎使所有酶丧失活力，游离氨基酸的含量也明显降低。40～60 ℃温度下的压力处理，胰蛋白酶对蛋白质的降解作用表现出相同的规律，200 MPa 时与对应的处理温度相比没有明显变化，600 MPa 时显著提高。实验结果显示，高压和温度结合处理能调节蛋白酶的活性，提高肉类品质。

关键词：高压；热处理；牛肌肉；蛋白酶活性
中图分类号：O521.9；TS251.1 **文献标识码**：A

1 引 言

高压处理是近 20 年来兴起的一种新技术，其特点是在能保持肉类及其制品营养和风味的前提下，延长制品的贮藏期、提高安全性、改善组织结构、调节酶活力等，是目前肉品科学领域研究的一个热点[1-7]。提高肉类嫩度和杀菌防腐是高压技术在肉类工业中应用的两个重要方面，对于高压处理提高肉类嫩度方面，众多学者已经进行了深入的探讨。结果显示，压力处理对僵直前的肌肉具有显著的嫩化效果，但对僵直后的肌肉低温下处理则无明显的嫩化作用，部分研究甚至发现，压力能导致肌肉变硬[3,8-9]。将高压和热处理结合起来，其嫩化效果能得到较大的改善[10]。研究也表明，高压处理对食品中的腐败菌和病原菌具有良好的钝化作用，可显著延长制品的贮藏期。然而，芽胞菌对高压的耐受力较强，在常温下能抵抗 1 000 MPa 的压力，如果将高压(250 MPa)与加热(40 ℃)结合起来，则可以大大增强对芽孢菌的钝化效果[6]。因此，与加热协同处理是高压技术在肉类工业中应用的一个方向。

* **收稿日期**：2009-08-20；**修回日期**：2009-10-14
基金项目："十一五"国家科技支撑计划项目(2006BAD05A03)；教育部留学回国人员科研启动基金
作者简介：马汉军(1965—)，男，博士，教授，主要从事高压技术在肉类加工中的应用研究. E-mail：hjma@hist.edu.cn

Beilken 等研究表明,30 ℃以上的温度与高压结合处理对僵直后的牛肉具有明显的嫩化效果[8]。Zamri 等研究发现,60 ℃或 70 ℃的温度与温和的压力(200 MPa)结合处理对鸡肉组织具有显著的嫩化效果[11]。Ma 和 Ledward 的研究也表明,60 ℃或 70 ℃下 200 MPa 的压力处理对僵直后的牛肉具有显著的嫩化效果,其嫩化机理可能与高压下缓慢升高的温度促使酶活性的变化有关[12]。

宰后肌肉中蛋白酶的作用对肉的质量有至关重要的影响,而高压处理在肉类中的作用也可以通过对蛋白酶的调节来实现[13]。Ohmori、Homma 和 Jung 等已经对压力对肌肉中酶的影响进行了研究[14-18],结果发现压力处理能促进溶酶体酶的释放,提高组织蛋白酶的活力[16];较低压力(200 MPa 以下)能提高钙激活中性蛋白酶的活力[17]。

肌肉中酶的种类繁多,而对宰后肌肉质量有重要影响的主要有组织蛋白酶和钙激活中性蛋白酶。目前鉴定出的组织蛋白酶有 20 多种,但被认为在蛋白质降解中起重要作用的主要有组织蛋白酶 B、L、D 和 H[19]。组织蛋白酶 B、L 和 D 的最适 pH 值在 3.0～4.5 之间,而组织蛋白酶 H 的最适 pH 值为 5.0～7.0。组织蛋白酶 D 在以肌肉蛋白为底物时表现出较大的 pH 活性范围(pH 值为 3.0～6.0)[20]。温度对组织蛋白酶 D 的活力影响很大,以肌肉蛋白或血红蛋白为底物时其最佳活力温度为 45 ℃,在较低温度(15 ℃)条件下几乎完全丧失活力[21]。钙激活中性酶是一组半胱氨酸内肽酶,能够水解肌肉结构中的许多骨架蛋白[22-23]。钙激活中性酶对温度和 pH 值很敏感,他们在 25 ℃和 pH 值为 7.5 的条件下活力最强,而在 pH 值为 6.0～6.2 时则活力很低。

常温下高压处理对肌肉中蛋白酶活性的影响前人已经进行了研究[14-18],而高压与加热结合处理后蛋白酶活性的变化尚未见报道。因此,本研究的目的就是探讨高压和加热协同处理对肌肉中蛋白酶活性的影响,为高压在肉类工业中的应用提供进一步的理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

牛背最长肌,源于江苏澳士达牧业有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

24 月龄的本地黄牛与夏洛来的改良牛,按常规方法屠宰后,30 min 内取下背最长肌,包装后在 0～4 ℃下运回,然后修整除去可见的脂肪,切成重约 50 g 的块状,于－18 ℃贮存,备用。整个过程大约需要 10 h。

使用前随机取出肉样,在 4 ℃下放置解冻。平行于肌纤维方向切成 2.5 cm×2.5 cm×6 cm 的块状,密封于聚乙烯袋中。

2.2.2 压力处理

将包装的肉样置于高压处理设备(包头科发高压科技有限责任公司生产)中,分别于室温(20 ℃)下,100、200、400、600 MPa 压力以及 40、60 和 70 ℃下 200 和 600 MPa 的压力处理 20 min,同时,分别在 40、60 和 70 ℃水浴中处理 30 min 作为对照。

2.2.3 肌肉抽提液的制备

将处理后的肉样绞碎,加入 3 倍体积的冷却蒸馏水,用匀浆机(XHF-1 型,上海金达生化仪器厂生产)匀浆(10 000 r/min)30 s 后,在碎冰中冷却 30 s,共进行 3 次。然后,在碎冰中冰浴 1 h,离心(12 000g)20 min,过滤,取上清。

2.2.4 抽提液蛋白质浓度测定

蛋白质浓度用 BCA 试剂盒(Pierce Biotechnology 公司生产)测定。

2.2.5 蛋白酶活性测定

参考 Ohmori 等的方法,并作适当修改[14]。血红蛋白(上海利珠东风生物技术有限公司)作底物。将肉样抽提液按 2 mg/mL 的浓度,添加于 50 mM 的不同反应混合液(醋酸-盐酸缓冲液,pH 值为 3.0;

柠檬酸钠缓冲液,pH 值为 5.0;Tris-盐酸缓冲液,pH 值为 7.5;分别含 5 mg/mL 肌红蛋白,1 mM NaN_3)中,反应体系的总体积为 3 mL。37 ℃下保持 4 h 后,添加同体积 10%的三氯乙酸终止反应。用离心机(Beckman Allegra 64R, 美国)离心(5 000g,15 min),取上清,在 280 nm 处测定其吸光度值。同时,按同等条件另取混合液,加入抽提液后,立即添加 10%的三氯乙酸终止反应作为对照。以能使 OD 值增加 1 的蛋白酶量为一个酶活性单位。

2.2.6 *游离氨基酸分析*

将样品绞碎,按 1∶50 的比例加入 5%的磺基水杨酸溶液,4 ℃、6 000 r/min 匀浆 5 min,然后 4 ℃、15 000g 离心 15 min。采用氨基酸自动分析仪(HITACHI835-50,日本)进行分析,每个样品的进样量为 0.05 mL,标样为 18 种氨基酸,洗脱液为柠檬酸缓冲液(pH 值为 3.3～3.9),显色液为茚三酮、乙二醇甲醚、乙酸钠按 2∶75∶25 比例配置的缓冲液。检测波长为 570 nm。

2.2.7 *蛋白可消化性测定*

将 0.5 mL 肌肉抽提液,加入到 3 mL、50 mM 的 Tris-盐酸缓冲液(其中含 0.05 mg/mL 的胰蛋白酶)中,在 37 ℃下反应 3 h,添加同体积 10%的三氯乙酸终止反应。离心(5 000g,15 min),取上清,在 280 nm 处测定其吸光度值(A280)。

2.3　统计分析

数据采用 SPSS 12.0 for windows 进行处理,多重比较用 Fisher's LSD 和 S-N-K 法。

3　结果与讨论

3.1　压力和热处理对牛肉抽提液蛋白酶活力的影响

从图 1(a)可以看到,压力处理前 pH 值为 5 时酶的活力相对较高,pH 值为 3 时次之,而 pH 值为 7.5 时酶的活力较低。最适 pH 值为 3～5 的蛋白酶类主要为组织蛋白酶和二肽酶Ⅰ、Ⅱ,它们都属于溶酶体酶。最适 pH 值在 7.5 左右的酶类主要为二肽酶Ⅲ、Ⅳ,氨肽酶,羧肽酶和钙激活中性蛋白酶。室温下,随着处理压力的增加,酶的活力显著下降,而压力达 400 MPa 及以上时,酶的活力则没有明显变化。这个结果与 Ohmori 等的实验结果相似,他们发现 103.1～506.6 MPa 的压力处理后,牛肉抽提液中中性和碱性酶蛋白酶的活力持续下降,506.6 MPa 压力时仍存在活力。氨肽酶和羧肽酶分别在 500 和 400 MPa 时就完全失活,而酸性蛋白酶的活性在 303.9 MPa 以下时还有上升的趋势,随压力继续上升而下降[14-15]。从图 1(a)可见,压力在 400 MPa 以上时,虽然还可检测到酶的活力,但 pH 值为 3 和 7.5 时酶的活力都很低。Homma 等人的研究证实,钙激活中性蛋白酶在 200 MPa 压力处理时,其活力显著下降;300 MPa 时几乎完全钝化。组织蛋白酶 H 和氨肽酶 B 的活力随压力的上升而降低。而组织蛋白酶 B、D、L 在 400 MPa 以下压力时随压力的增加而活力上升,500 MPa 时则下降[16-17]。众多研究表

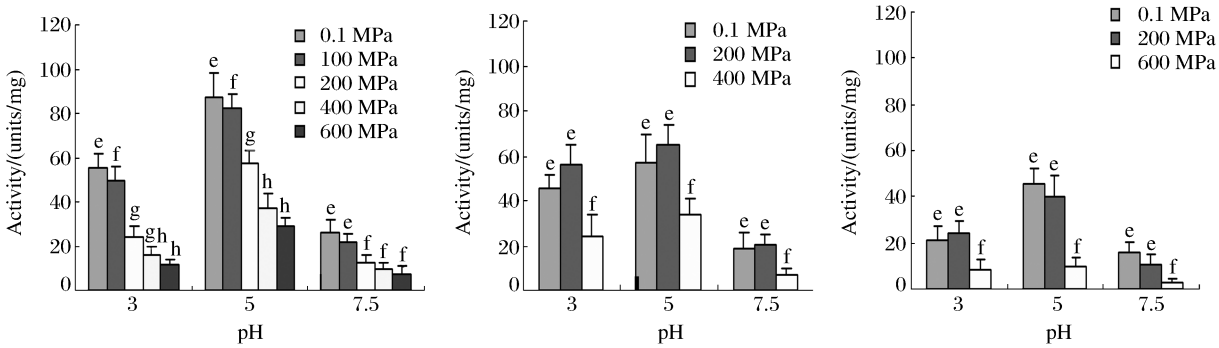


图 1　高压处理对牛肉抽提液蛋白酶活力的影响(相同 pH 值下的处理字母不同者为差异显著($P<0.05$))

Fig. 1　Effect of high pressure treatment on the protease activity of the beef extracts

明，在较低压力(200 MPa 左右)时压力处理导致肌浆蛋白变性，从而使部分蛋白酶丧失活力，与此同时，由于压力对溶酶体膜的破坏，能使溶酶体中释放出更多的酶[24-26]，综合结果就是使得酶的相对活力有所上升[14-16]或维持稳定[27]。而随着压力的升高，越来越多的酶失去活性，酶的综合活力就持续下降，直至完全钝化。

由于大部分蛋白酶的最适温度都在 40 ℃左右[21]，因此，常压下 40 ℃的热处理并没有导致酶活力的显著变化(图 1(b))。虽然 40 ℃的热处理会导致少部分蛋白质变性，但溶酶体释放的酶量也随着温度的升高而增加[28]。200 MPa 压力处理后，与单纯 40 ℃热处理相比都没有明显的变化，而压力上升到 600 MPa，导致酶的活力显著下降，pH 值为 7.5 的酶活力几乎完全丧失，主要原因可能还是压力导致的蛋白变性[16]。60 ℃热处理造成很大部分蛋白变性，只有部分蛋白酶，如二肽酶Ⅰ、Ⅱ能在较高温度下具有最高的活力[29]，因此酶的活力与 40 ℃相比大幅度下降(图 3(c))。当同时进行压力处理时，200 MPa 处理时酶的活力没有发生显著变化，而 600 MPa 则导致几乎所有的酶丧失活力。这与我们先前的研究结果相一致，较高的温度(60 ℃及以上)下，压力对蛋白变性有一定的抑制作用，从而使部分酶得到保护，呈现一定的活力[29]。Balny、Masson 和 Fernandez-Martin 等人也曾报道，温度较高时，压力和温度对于分子变化的影响是相互抑制的，压力能部分抵消由热引起的蛋白变性[30-31]。

3.2 压力和热处理对牛肉抽提液蛋白质可消化性的影响

单纯热处理时，随着加热温度从 40 ℃上升到 60 ℃，胰蛋白酶对牛肉抽提液蛋白的消化性缓慢而显著升高(图 2)。室温下压力处理时，200 MPa 以下压力处理对蛋白的消化性没有产生明显的影响(图 2(a))，而 400 MPa 及以上压力时，则显示出显著增加的趋势($P<0.05$)，此结果与 Ohmori 等人的报道相一致[14]。当与不同的温度(40～60 ℃)结合处理时(图 2(b)和图 2(c))，其变化的规律则十分相似，200 MPa的压力不会产生明显影响，而 600 MPa 则使可消化性显著增加。压力和热处理都会造成蛋白质立体结构的破坏，肽链伸展，肽链上酶切位点更多外露，从而使胰蛋白酶对蛋白质的消化能力提高。

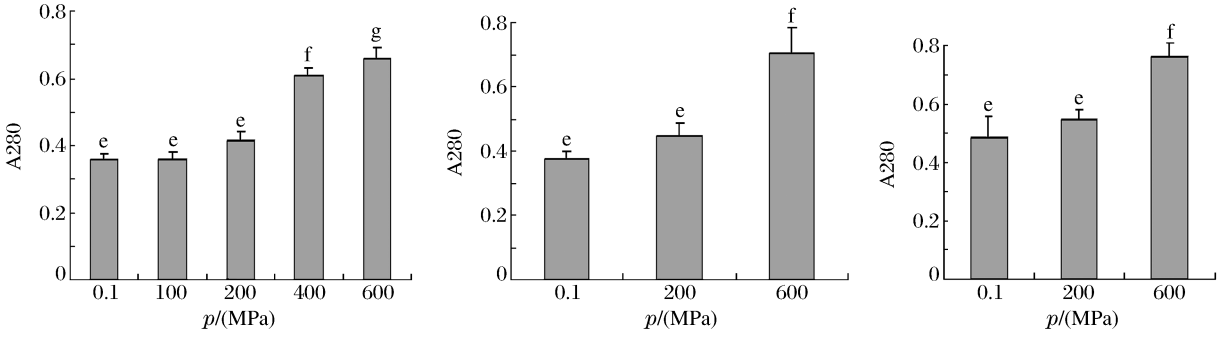


图 2 高压处理对牛肉抽提液蛋白质可消化性的影响(标注字母不同者为差异显著($P<0.05$))

Fig. 2 Effect of high pressure treatment on the tryptic digestibility of protein in beef extracts

3.3 压力和热处理对牛肌肉中游离氨基酸含量的影响

酶活性的变化与肌肉蛋白质的水解程度、游离氨基酸的含量具有密切的关系，尤其是肌肉中内肽酶和外肽酶。从表 1 可以看到，热和压力处理使肌肉中游离氨基酸的含量发生了不同的变化。常压下的热处理对肌肉中游离氨基酸的含量有一定的影响。40 ℃的热处理使肌肉中氨基酸总量由原来的 1.38 mg/g上升到 2.25 mg/g，而当温度继续上升到 60 ℃时，游离氨基酸的总量又恢复到与对照组肌肉相当的水平(分别为 1.44 mg/g)。这种结果与前面对于酶活力研究的结论是一致的，40 ℃时只有少部分酶蛋白发生变性，且大部分酶的最适温度在 40 ℃左右[29]，同时由于温度的升高还能使溶酶体中的酶释放量增加[28]，从而使蛋白质的水解速度加快，游离氨基酸的含量上升。

常温下进行压力处理时，100 和 200 MPa 的压力处理使游离氨基酸的总量迅速增加(分别为 2.75

和2.60 mg/g),增加的氨基酸主要有丝氨酸、谷氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸等 8 种。当压力继续升高到 400 和 600 MPa 时,氨基酸总量又以较大幅度下降。其结果与 Ohmori 等人的报道相一致,他们发现牛腿部肉经 100～300 MPa 压力处理并在 4 ℃下贮藏一周后,氨基酸总量显著增加,并且增加的氨基酸主要是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸。而当压力继续增加至500 MPa时,与对照组相比则没有明显的变化[14]。

40 ℃、200 MPa 的压力处理与常压 40 ℃热处理相似,没有使氨基酸总量产生明显变化。当压力达 600 MPa 时,氨基酸总量降低到 1.80 mg/g。60 ℃下的压力处理,氨基酸总量的变化趋势基本相同,200 MPa时氨基酸总量明显高于常压同温度热处理和 600 MPa 压力处理。

表 1　不同温度和压力处理并贮藏一周后牛肌肉中游离氨基酸含量的变化

Table 1　Change in the free amino acid content of pressurized beef for 20 min **at different temperature and storage for 1 week at** 4 ℃　　**(Unit:**mg/100 g**)**

Amino acid	p/(MPa) (T=20 ℃)					p/(MPa) (T=40 ℃)			p/(MPa) (T=60 ℃)		
	0.1	100	200	400	600	0.1	200	600	0.1	200	600
Asp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thr	40	41	48	44	48	49	51	44	36	57	49
Ser	3	9	7	4	3	9	6	4	3	6	4
Glu	1	6	6		2	11	3	1	1	5	2
Gly	11	13	11	12	11	13	12	10	9	13	11
Ala	25	42	37	30	27	40	35	31	25	34	26
Cys	4	12	11	2	12	5	4	10	7	12	9
Val	7	22	17	10	11	16	14	11	9	16	9
Met	6	25	20	8	18	14	16	16	12	17	10
Ile	8	18	14	7	9	9	12	9	8	12	7
Leu	4	25	21	8	5	12	17	8	3	19	10
Tyr	8	9	18	10	9	7	15	8	8	14	8
Phe	7	26	24	11	10	16	25	10	8	23	12
Lys	4	12	9	5	4	10	8	5	4	7	5
His	2	5	4	2	2	5	3	3	2	3	2
Arg	5	5	9	6	5	4	8	6	5	7	6
Pro	3	5	4	5	3	5	4	4	4	4	4
Try	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total	138	275	260	164	179	225	233	180	144	249	174

压力和温度处理对肌肉中酶的影响较为复杂,一方面,由于压力和热的作用导致肌质网、线粒体以及溶酶体的结构被破坏,使其中的钙离子和溶酶体酶释放、钙激活酶抑制蛋白变性以及蛋白质底物被修饰,更容易受酶的进攻而发生水解,从而使钙激活酶及溶酶体酶的活性提高。另一方面,压力和温度又可导致酶自身变性,会降低酶的活性。因此,压力和热处理过程中酶活力的降低并不一定意味着其分解蛋白质能力的下降。Macfarlane、Morton 和 Suzuki 等人的研究都曾发现,压力能导致肌节结构的破坏,尤其是 Z-线,M-带和 I-带,其破坏程度与添加钙激活酶的肌原纤维发生的变化极为相似[32-33],因此,他们认为压力处理可能使钙激活酶的综合活力提高。我们的实验也证明,即使在高温(60 ℃)下200 MPa 压力处理,酶的活力比鲜肌肉的低得多,但其游离氨基酸的含量有一定的增加。

4 结 论

肌肉中酶的活力在 pH 值为 5 时比 pH 值为 3 和 7.5 时高。室温下,随着处理压力的增加,酶的活力显著下降,压力达 400 MPa 及以上时,酶的活力没有明显变化,且在 pH 值为 3 和 7.5 时,酶的活性几乎完全丧失。200 MPa 以下的压力处理使肌肉中游离氨基酸的总量显著上升,压力继续升高,游离氨基酸含量增加的幅度随之降低。400 MPa 及以上压力处理使胰蛋白酶对蛋白质的消化性增强。

40 ℃、200 MPa 的压力处理,酶的活性与 40 ℃热处理相比没有明显变化,氨基酸总量也未发生明显下降。600 MPa 时,酶在 pH 值为 7.5 时完全失活,氨基酸总量急剧下降。60 ℃、200 MPa 没有造成酶活力的明显变化,然而游离氨基酸的含量则显著增加。600 MPa 几乎使所有酶丧失活力,游离氨基酸的含量也明显降低。40～60 ℃温度下的压力处理,胰蛋白酶对蛋白质的降解作用表现出相同的规律,200 MPa时与对应的处理温度相比没有明显变化,600 MPa 时显著提高。研究结果表明,高压与热协同处理能调节蛋白酶的活性,改善肉类品质。

References:

[1] Garriga M, Grèbol N, Aymerich M T, et al. Microbial Inactivation after High-Pressure Processing at 600 MPa in Commercial Meat Products over Its Shelf Life [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2004, 5(4): 451-457.

[2] Rubio B, Martínez B, García-Cachán M D. Effect of High Pressure Preservation on the Quality of Dry Cured Beef "Cecina de Leon" [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2007, (8): 102-110.

[3] Cheftel J C, Culioli J. Effects of High Pressure on Meat: A Review [J]. Meat Sci, 1997, 46(3): 211-236.

[4] Sikes A L, Tobin A B, Tume R K. Use of High Pressure to Reduce Cook Loss and Improve Texture of Low-Salt Beef Sausage Batters [J]. Innov Food Sci Emerg Technol, 2009, 10(4): 405-412.

[5] Pedro H A L, Alfaia A J, Marques J, et al. Design of an Immobilized Enzyme System for Naringin Hydrolysis at High-Pressure [J]. Enzyme Microb Tech, 2007, 40(3): 442-446.

[6] Cheftel J C. Review: High-Pressure, Microbial Inactivation and Food Preservation [J]. Food Sci Technol Intern, 1995, 1(2-3): 75-90.

[7] Michael J, Eisenmengera, Reyes-De-Corcuera J I. High Hydrostatic Pressure Increased Stability and Activity of Immobilized Lipase in Hexane [J]. Enzyme Microb Tech, 2009, 45(2): 118-125.

[8] Beilken S L, Macfarlane J J, Jones P N. Effect of High Pressure During Heat Treatment on the Warner-Bratzler Shear Force Values of Selected Beef Muscles [J]. J Food Sci, 1990, 55(1): 15-18.

[9] Jung S, Ghoul M, de Lamballerie-Anton M. Changes in Lysosomal Enzyme Activities and Shear Values of High Pressure Treated Meat During Ageing [J]. Meat Sci, 2000, 56(3): 239-246.

[10] Lamballerie-Anton M D, Enitiaa Taylor R G, Culioli J. High Pressure Processing of Meat [A]//Kerry J, Ledward D. Meat Processing: Improving Quality [C]. Woodhead: CRC Press Cambridge, 2002: 314-331.

[11] Zamri A I, Ledward D A, Frazier R A. Effect of Combined Heat and High-Pressure Treatments on the Texture of Chicken Breast Muscle (Pectoralis Fundus) [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(8): 2992-2996.

[12] Ma H J, Ledward D A. High Pressure/Thermal Treatment Effects on the Texture of Beef Muscle [J]. Meat Sci, 2004, 68(3): 347-355.

[13] Johnston D E. High Pressure—A New Dimension to Food Processing [J]. Chem Indus, 1994, (13): 499-501.

[14] Ohmori T, Shigehisa T, Taji S, et al. Effect of High Pressure on the Protease Activities in Meat [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(2): 357-361.

[15] Ohmori T, Shigehisa T, Taji S, et al. Biochemical Effects of High Hydrostatic Pressure on the Lysosome and Proteases Involved in It [J]. Biosci, Biotech, Biochem, 1992, 56(8): 1285-1288.

[16] Homma N, Ikeuchi Y, Suzuki A. Effects of High Pressure Treatment on the Proteolytic Enzymes in Meat [J]. Meat Sci, 1994, 38(2): 219-228.

[17] Homma N, Ikeuchi Y, Suzuki A. Levels of Calpain and Calpastatin in Meat Subjected to High Pressure [J]. Meat Sci, 1995, 41(3): 251-260.

[18] Jung S, Ghoul M, de Lamballerie-Anton M. Changes in Lysosomal Enzyme Activities and Shear Values of High

Pressure Treated Meat During Ageing [J]. Meat Sci,2000,56(3):239-246.
[19] Zeece M G,Woods T L,Keen M A. Role of Proteinase and Inhibitors in Post-Mortem Muscle Protein Degradation [J]. Reciprocal Meat Conference Proceedings,1992,45:51-61.
[20] Hughes M C,Healy Á,McSweeney P L H. Proteolytic Specificity of Cathepsin D on Bovine F-Actin [J]. Meat Sci,2000,56(2):165-172.
[21] Zeece M G,Katoh K. Cathepsin D and Its Effects on Myofibrillar Proteins:A Review [J]. J Food Biochem,1989,13(3):157-178.
[22] Goll D E,Otsuka Y,Nagainis P A. Role of Muscle Proteins in Maintenance of Muscle Integrity and Mass [J]. J Food Biochem,1983,7(3):137-177.
[23] Koohmaraie M. Muscle Proteinases and Meat Aging [J]. Meat Sci,1994,36(1-2):93-104.
[24] Elgasim E A,Kennick W H. Effect of High Hydrostatic Pressure on Meat Microstructure [J]. Food Microstructure,1982,1:75-82.
[25] Elgasim E A,Kennick W H,Anglemier A F,et al. Effect of Prerigor Pressurization on Bovine Lysosomal Enzyme Activity [J]. Food Microstruct,1983,2:91-97.
[26] Kubo T,Gerelt B,Han G D,et al. Changes in Immunoelectron Microscopic Localization of Cathepsin D in Muscle Induced by Conditioning or High-Pressure Treatment [J]. Meat Sci,2002,61(4):415-418.
[27] Angsupanich K,Ledward D A. High Pressure Treatment Effects on Cod (*Gadus morhua*) Muscle [J]. Food Chem,1998,63(1):39-50.
[28] Shiono T,Hayasaka S,Mizuno K. Effect of Temperature and pH on Release of Enzymes from Lysosomes of the Bovine Retinal Pigment Epithelium in Vitro [J]. Exp Eye Res,1983,36(6):871-876.
[29] Sentandreu M A,Coulis G,Ouali A. Role of Muscle Endopeptidases and Their Inhibitors in Meat Tenderness [J]. Trends Food Sci Tech,2002,13(12):400-421.
[30] Balny C,Masson P. Effects of High Pressure on Proteins [J]. Food Rev Int,1993,9(4):611-628.
[31] Fernández-Martín F,Fernández P,Carballo J,et al. Pressure/Heat Combinations on Pork Meat Batters:Protein Thermal Behavior and Product Rheological Properties [J]. J Agric Food Chem,1997,45(11):4440-4445.
[32] Macfarlane J J,Morton D J. Effects of Pressure Treatment on the Ultrastructure of Striated Muscle [J]. Meat Sci,1978,2(4):281-288.
[33] Suzuki A,Watanabe M,Iwamura K,et al. Effect of High Pressure Treatment on the Ultrastructure and Myofibrillar Protein of Beef Skeletal Muscle [J]. Agric Biolog Chem,1990,54(12)::3085-3091.

Effects of Combined High Pressure and Thermal Treatment on Protease Activities in Beef Muscle

MA Han-Jun[1],ZHOU Guang-Hong[2],YU Xiao-Ling[1],GAO Hai-Yan[1],
PAN Run-Shu[1],D. A. Ledward[3]

(1. *School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang* 453003, *China*;
2. *Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*;
3. *Department of Food Biosciences, University of Reading, P. O. Box* 226, *Whiteknights, Reading RG6 6AP, UK*)

Abstract: The effects of combined high pressure (0.1～600 MPa) and temperature (20～60 ℃) treatment for 20 min on beef protease activities were studied. The results showed that the protease activities decreased with increasing pressure up to 400 MPa at room temperature, after which there was no significant change of them. The content of free amino acid increased significantly at 200 MPa and then the

increased speed decreased with the pressure increasing. 400 MPa or higher pressure treatment at room temperature resulted in the increase of tryptic digestibility of protein in beef extract. There was no significant effect on protease activities and free amino acid content in beef after pressurized at 200 MPa, 40 ℃, but the protease was almost completely inactivated at pH 7.5 and free amino acid content reduced rapidly after treated at 600 MPa, 40 ℃. Part of protease activities survived in beef muscle when heated at 60 ℃. They did not change significantly when treated at 200 MPa, 60 ℃, but the free amino acid content increased obviously. Treatment of 600 MPa at 60 ℃ resulted in the inactivation of almost all the proteases and the free amino acid content also decreased markedly. The similar changes of tryptic digestibility of protein in beef extract were found when pressure applied at 40～60 ℃. 200 MPa treatment did not cause significant changes and 600 MPa treatment induced the tryptic digestibility of protein marked increase. These results suggested that high pressure treatment combined with heating could regulate proteases activities of beef and improve its quality.

Key words: high pressure; thermal treatment; beef muscle; protease activities

《高压物理学报》征稿简则

《高压物理学报》是我国高压物理领域唯一的专业性学术刊物，在国内外公开发行。力求及时报道高压物理学科基础理论和应用研究方面具有创新性、高水平、有重要意义的研究成果，读者对象为国内外科技工作者。征稿内容为动态及静态高压技术，人工合成新材料，高温高压下材料的力学、光、电、磁等特性以及物质微观结构的研究，动态及静态高压研究中的测试技术，高温高压下的相变，高温高压物态方程等。接受中、英文稿件。

1. 来稿应具有科学性、先进性和实用性，论点明确、论据可靠、数据准确、逻辑严谨、文字简练、图表清晰。每篇论文的篇幅应在6 000～8 000字以内，请使用中华人民共和国法定计量单位。论文格式请参考近期出版的《高压物理学报》。请使用网站(www.gywlxb.cn)的作者投稿系统进行投稿。

2. 所投稿件不得涉及国家及本单位机密，投稿时请附本单位保密审查意见，由审查者签名并加盖公章。

3. 文章标题字数应在20字以内。文中图、表应有自明性，所有图题、图注、表题、表注均为中、英文对照，图、表中的文字一律用英文。

4. 第一作者应确保全体作者同意文章署名，请提供第一作者、通讯作者简介(姓名、出生年、性别、职称、学位、研究方向等)，以及所有联系方式(通信地址、邮政编码、电话号码、传真、电子邮箱等)，以备联系。请注明论文(工作)的资助项目(资助项目名称和批准号)，简要介绍工作背景和论文意义。

5. 来稿应保证文章版权的独立性，严禁抄袭，文责自负，请勿一稿多投。

重点注意事项

▲ 中英文摘要 摘要用第三人称书写，语言要简练，应有具体内容。要求：(1) 拥有与论文同等量的主要信息，重点包括4个要素：即研究目的、方法、结果和结论。(2) 以提供论文梗概为目的，不得评论、解释论文内容。中文摘要应在200～400个字之间，英文摘要不少于120个实词。为便于Ei Compendex以及国外其它数据库收录，英文摘要中尽量避免特殊字符(各种数学符号、上下脚标及希腊字母)及由特殊字符组成的数学表达式；第一句不要与英文题名重复；尽量用短句子并避免句形单调；用过去时态叙述主要工作，用现在时态叙述结论，尽量用主动语态代替被动语态。

▲ 参考文献 参考文献应是公开出版物。请充分著录参考文献，引用条数不宜太少，并尽量引用近期国内外文献，采用“顺序编码制”著录。中文参考文献必须附英译文，著录项目应齐全。

▲ 版权与稿酬 《高压物理学报》已加入《中国学术期刊(光盘版)》、万方数据——数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中文科技期刊数据库、中国期刊网、台湾中文电子期刊服务——思博网(CEPS)等，并被Ei Compendex光盘收录。凡经本刊录用的稿件，其著作权(包括光盘版和网络版出版权)便自动转让给《高压物理学报》编辑部，编辑部不再另行通知。来稿一经发表，即付稿酬(包括光盘版和网络版稿酬)。

《高压物理学报》一贯秉承服务科学、服务读者、服务作者的办刊理念，慎重对待每一篇来稿，尊重作者劳动。优秀稿件享有快速发表通道，重大创新性成果可在3个月内刊出。

通信地址：四川绵阳919信箱110分箱《高压物理学报》编辑部，邮政编码：621900

网　　站：www.gywlxb.cn；　电子邮件：gaoya@caep.ac.cn (征订、咨询)

电　　话：(0816)2490042；　传　　真：(0816)2485139

《高压物理学报》编辑部