文章编号:1000-5773(2012)03-0281-08

温压协同处理黑莓 β-葡萄糖苷酶失活动力学研究*

魏本喜,马永昆,马善丽,严 蕊,张 龙,白 洁

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013)

摘要:以黑莓 β-葡萄糖苷酶为对象,研究其温压协同条件下的失活动力学规律,可为超高压食品处理技术的工业化和花色苷的保留提供有力的技术支持。实验压力为 300～600 MPa,温度为 35～55 ℃。结果表明:β-葡萄糖苷酶在温压协同条件下的失活过程为两个阶段,第一阶段用瞬时失活值描述,压力和温度影响其大小,不受保压时间影响;第二阶段将 β-葡萄糖苷酶分为稳定部分和敏感部分,β-葡萄糖苷酶的失活过程用双相一级反应动力学模型描述,其失活速率常数随温度、压力的升高而增大。敏感部分和稳定部分在 400 MPa、55 ℃条件下,失活速率常数 K_L 和 K_S 分别为 2.777 和 0.047 min^{-1},二者失活 90%所需时间 D_L 和 D_S 分别为 0.83 和 49.1 min。在 400 MPa 条件下,敏感部分的 D 值减少 90%所需增加的温度 T_Z 和活化能 E_a 分别为 23.36 ℃和 81.95 kJ/mol;在 45 ℃条件下 D 值减少 90%所需增加的压力 p_Z 和活化体积 V_a 分别为 1111 MPa 和 −5.02 cm^3/mol。

关键词:温压协同;黑莓;β-葡萄糖苷酶;失活;动力学

中图分类号:O521.9 **文献标识码**:A

1 引 言

黑莓(Blackberry)原产北美,属蔷薇科(*Rosaceae*)、悬钩子属(*Rubus L*),其果实成熟后颜色紫黑,其中的色素主要是花色苷。研究证实,花色苷具有抗氧化[1]、抗癌[2]、抗真菌[3]、抗突变[4]和清除自由基[5]的生物活性,因此黑莓具有很高的经济利用价值。

花色苷很不稳定,其稳定性与加工和贮藏过程中的一些理化因子,如 pH 值、温度、光、氧、酶和抗坏血酸等密切相关[6-7]。β-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21,β-Glu)是引起花色苷降解的重要酶类之一,它属于水解酶类,可水解结合于末端、非还原性的 β-D-糖苷键。1995 年,Huang[8] 和 Wightman 等[9] 发现,β-Glu能水解花色苷的糖苷键,生成糖和花色苷配基。大量研究表明:β-Glu 可降解荔枝[10]、茄子[11]、西西里血橙[12]等的花色苷。采用加热处理可使 β-Glu 失活,从而减少花色苷的酶解损失,但大于 60 ℃的加热处理会导致黑莓花色苷较大程度的损失[13]。超高压(High Hydrostatic Pressure, HHP)作为一种非热物理加工技术,可破坏维持蛋白质三级结构的盐键、疏水键和氢键等化学键,导致其空间结构发生变化,甚至变性,但对蛋白质一级、二级结构的共价键影响较小[14]。在此基础上,研究发现超高压处理可以钝化 β-Glu[15],从而增加树莓汁[16]、草莓汁[17]、石榴汁[18]等果汁中花色苷的稳定性,达到较好的保

* **收稿日期**:2011-01-14;**修回日期**:2011-02-25

基金项目:国家 863 计划项目(2007AA100405)

作者简介:魏本喜(1985—),男,硕士,主要从事食品非热加工、食品风味化学的研究. E-mail:wbx0412@163.com

通讯作者:马永昆(1963—),男,博士,教授,主要从事食品非热加工、食品风味化学与食品发酵工程的研究. E-mail:mayongkun@ujs.edu.cn

持产品的色泽和抗氧化等功能的目的。

本工作研究超高压在较低温度条件下黑莓 β-Glu 的失活动力学，以确定黑莓 β-Glu 的最佳灭酶参数，可为超高压食品处理技术的工业化和花色苷的保留提供有力的技术支持。

2 材料和方法

2.1 材料及试剂

黑莓：购于南京溧水，2009 年 6 月收获，品种 hull，－20 ℃冻藏保存。

试剂：4-硝基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷（pNPG）购于 Sigma 公司；Na_2CO_3、$(NH_4)_2SO_4$、柠檬酸、Na_2HPO_4 均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司。

2.2 实验设备

UHPF-800MPa-3L 型超高压设备，循环水浴精确控温，增压速率为 200 MPa/min，传压介质为癸二酸二辛酯（包头科发新型高技术食品机械有限责任公司）；UV-1600 型紫外分光光度计（北京瑞利分析仪器有限公司）；Avanti Centrifuge J-25 型冷冻离心机（Beckman 公司）；50161N 型打浆机（Hamilton Beach 公司）。

2.3 实验方法

2.3.1 β-Glu 的提取及初步纯化

将黑莓与 0.1 mol/L 柠檬酸与 0.2 mol/L Na_2HPO_4（pH 值 4.6）缓冲液混合（质量体积比为 1∶1）打浆后提取 2 h，离心（11 325g，30 min）取上清液经纱布过滤，滤液加 3%活性炭于 190 r/min 摇床脱色 50 min，离心（17 696g，20 min）取上清液过滤。滤液缓慢添加 $(NH_4)_2SO_4$ 至 30%饱和度盐析 1 h 后离心（17 696g，20 min），取上清液。继续添加 $(NH_4)_2SO_4$ 至 80%饱和度，盐析 2 h 后离心（17 696g，20 min），取酶活性较高部分溶于上述相同缓冲液（溶解后体积为打浆时缓冲液体积的 1/7），于－20 ℃下冷冻备用。以上步骤均在 4 ℃下进行。

2.3.2 超高压处理

取 1 mL 粗酶液封装于特制高压袋中，置超高压处理腔经 2 min 的温度平衡后开始升压，达到设计压力后自动计时，保压时间达到后自动卸压，卸压时间 $t \leqslant 3$ s。黑莓 β-Glu 在 45 ℃、300～600 MPa 条件下和 400 MPa、35～55 ℃条件下处理 1～30 min，样品取出后立即置于冰水中冷却，4 ℃冰箱中保存待酶活分析。保压时间为零（温度平衡后升至所需压力立即手动卸压）的样品作为空白样品。

2.3.3 酶活分析

β-Glu 酶活的测定采用 Orruno 等的方法[19]。200 μL 粗酶样品加入到 400 μL 5 mmol/L pNPG 溶液和 400 μL 0.1 mol/L 柠檬酸-0.2 mol/L Na_2HPO_4（pH 值 4.6）缓冲液的混合液中，40 ℃下酶解 1 h，取出立即加入 2 mL 1 mol/L Na_2CO_3 终止反应，405 nm 下测定其吸光度。空白样以 200 μL 蒸馏水代替粗酶。

β-Glu 在上述条件下酶解 pNPG 1 min 内生成 1 μmol 对硝基苯酚定义为一个酶活力单位。此条件下对硝基苯酚的摩尔消光系数为 18 350 L/(mol·cm)。

2.3.4 失活可逆性研究

将 45 ℃条件下经 300 和 600 MPa 压力处理 10 min 后的粗酶样品放入 20 ℃的恒温水浴锅内保温并开始计时，分别取 0、2、4、6、8、12 h 时的酶样进行酶活分析，相对酶活 A_R 表示为

$$A_R(\%) = \frac{A_t}{A_{t0}} \times 100 \tag{1}$$

式中：A_t 为保温时间为 t 时的样品酶活，A_{t0} 为保温时间为零时的酶活。

2.4 数据分析方法

酶的失活过程通常可以用一级反应动力学进行描述

$$\ln(A/A_0) = -kt \tag{2}$$

式中:A_0 为处理时间为零时的酶活;A 为处理时间为 t 时的酶活;k 为温压协同条件下 β-Glu 的失活速率常数(min^{-1});t 为处理时间(min)。

当酶的钝化速率呈现前快后缓的趋势时,可用双相一级反应动力学模型(Two Fraction Model)描述其失活过程[20-21]。此模型假设样品中存在两类同工酶,分别为稳定部分(Stable Fraction,SF)和敏感部分(Labile Fraction,LF),一部分可能比另一部分更为耐压或耐热[22],都遵循一级反应动力学且相互之间没有影响。由方程(3)表示

$$A = A_L\exp(-k_L t) + A_S\exp(-k_S t) \tag{3}$$

式中:A_L 和 A_S 分别为 β-Glu 中 SF 和 LF 的质量分数;k_L 和 k_S 为 SF 和 LF 的失活速率常数(min^{-1})。

在一定温压协同条件下,酶失活 90%所需要的时间定义为 D 值

$$D = \frac{\ln(10)}{k} \tag{4}$$

D 值减少 90%所需增加的压力或温度分别用 p_Z(MPa)和 T_Z(℃)表示,由如下两方程求得

$$\lg\left[\frac{D_1}{D_2}\right] = \frac{p_1 - p_2}{p_Z} \tag{5}$$

$$\lg\left[\frac{D_1}{D_2}\right] = \frac{T_1 - T_2}{T_Z} \tag{6}$$

Eyring 方程(方程(7))和 Arrhenius 方程(方程(8))经常用来评价温度和压力对酶失活过程的影响[23-24],表现为反应活化体积 V_a(cm^3/mol)和反应活化能 E_a(kJ/mol)。

$$\ln\left[\frac{k_1}{k_2}\right] = \frac{V_a}{R_p T}[p_2 - p_1] \tag{7}$$

$$\ln\left[\frac{k_1}{k_2}\right] = \frac{E_a}{R_T}\left[\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right] \tag{8}$$

式中:p_2 和 p_1、T_2 和 T_1 分别为对应于 D_2 和 D_1、k_2 和 k_1 的压力(MPa)与绝对温度(K)。R_p 和 R_T 为常数,分别为 8.314 cm^3 · MPa/(mol · K)和 8.314 J/(mol · K)。借助 Sigma Plot 的线性回归程序,p_Z 和 T_Z 为 lg D 分别与 p 和 T 线性回归所得直线斜率的倒数;V_a 通过 ln k 对压力 p 线性回归所得直线的斜率求得,E_a 通过 ln k 与 $1/T$ 线性回归所得的斜率求得。

瞬时灭活值(Instantaneous Pressure Kill Value,IPK)[25]:温压协同瞬时处理所引起酶活降低的百分率,不受处理时间影响。以 $\lg[(A_t \times 100)/A_{control}]$对处理时间 t 线性回归,所得直线后推至 0 min 时所得截距的值记为 a,则有

$$瞬时灭活值(IPK) = (100 - 10^a)\% \tag{9}$$

3　结果与分析

3.1　温压协同处理黑莓 β-Glu 失活可逆性研究

在 45 ℃下经 300、600 MPa 条件处理 10 min 后,样品在 20 ℃水浴中相对酶活随保温时间的变化趋势,见图 1。由于压力诱导蛋白质变性是高度可逆的,大多数酶溶液当压力下降到 0.1 MPa 时,因压力诱导的酶变性而失去的酶活完全再生需要几个小时[26]。黑莓 β-Glu 在经过 12 h 的保温后相对酶活没有发生显著变化($p > 0.05$),说明超高压协同温度钝化黑莓 β-Glu 的过程是不可逆的。

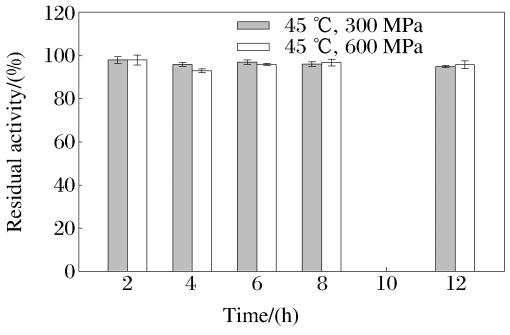


图 1　超高压处理后样品相对酶活与保温时间的关系

Fig. 1　Relationship between relative enzyme activity and treatment time of the sample with HHP processing

3.2 45 ℃条件下压力处理对黑莓 β-Glu 酶活的影响

在 45 ℃条件下，β-Glu 经不同压力处理后残留酶活 $(A_t \times 100)/A_{control}$ 对时间的半对数图如图 2(a)所示，残留酶活和时间具有良好的线性关系($R^2 \geqslant 0.914$)，说明黑莓 β-Glu 在 1～10 min 内符合一级反应动力学。根据方程(9)由各回归线后推至 0 min 所得的截距可计算出 IPK。在 45 ℃条件下，经 300～500 MPa 处理后黑莓 β-Glu 的 IPK，见表 1，可见随压力升高，IPK 增大。

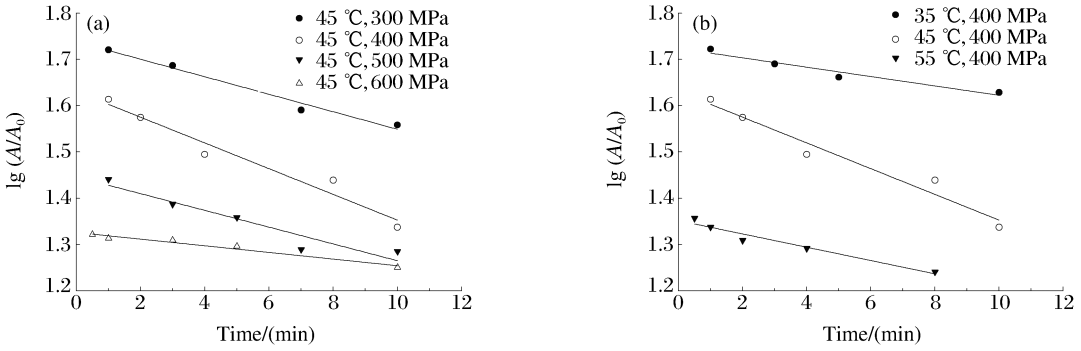


图 2 黑莓 β-Glu 在不同温压协同条件下的失活动力学(各回归线后推至时间 0 min 的截距用来计算 IPK)

Fig. 2 Inactivation kinetics of blackberry β-Glu in different pressure-temperature domains (Extrapolated intercept to time zero is used in calculating the instantaneous pressure kill value)

黑莓 β-Glu 相对酶活在 0～10 min 内下降较快，10 min后相对酶活下降趋于平缓，见图 3，与 Vila-Real 等[27]研究结果一致。45 ℃条件下，经 300～600 MPa 不同压力处理 3 min 后，β-Glu 失活率分别为 39%、68%、86%、90%；而处理 10 min 后 β-Glu 失活率分别为 41%、90%、96%、98%，且不再显著变化，失活过程符合双相一级反应动力学模型($R^2 \geqslant 0.960$)，说明黑莓β-Glu存在一种或几种同工酶，他们对压力或温度的敏感性不同而呈现出不同的失活速率，从而导致失活过程呈现先快后缓的趋势。β-Glu 在 45 ℃、300 MPa 条件下，最终失活率为 41%；而在 45 ℃、400 MPa 条件下，最终失活率则迅速增加至 90%；继续增加压力，黑莓β-Glu的最终失活率无显著变化，说明 45 ℃条件下大于 300 MPa 的压力对黑莓 β-Glu 失活速率常数影响较大。

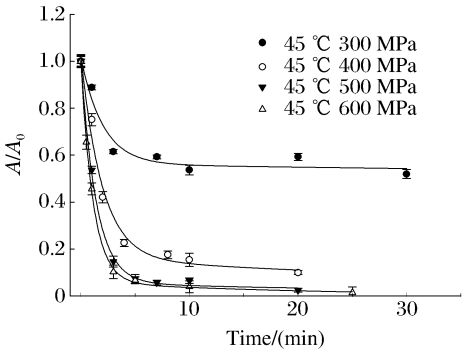


图 3 45 ℃条件下压力处理黑莓 β-Glu 相对酶活随保压时间的变化(曲线由双相一级反应动力学模型作出)

Fig. 3 Residual activity of blackberry β-glucosidase after pressure processing as a function of treatment time at 45 ℃ (Modeled curves are given based on the two-fraction model)

在 45 ℃、不同压力条件下黑莓 β-Glu LF 的 K_L 和 D_L 见表 1，压力越高其失活速率常数 K_L 越大(D_L 越小)，K_L 和压力的线性相关系数 $R^2=0.960$。另外，β-Glu SF 的 k_S 远小于 LF 的 k_L(D_S 远大于 D_L)，说明温压协同条件下黑莓 β-Glu LF 的失活速度大于 SF 的失活速度，这可能由于黑莓 β-Glu LF 对温度和压力较为敏感导致。

p_Z 表示压力变化对 β-Glu D 值的影响，黑莓 β-Glu LF 和 SF 的 D 值变化一个对数所需压力的变化 $p_{Z,L}$ 和 $p_{Z,S}$ 分别为 1 111 MPa 和 333 MPa，见图 4(a)。根据方程(7)可得，黑莓 β-Glu 在 45 ℃条件下的反应活化体积 V_a 分别为 $V_{a,L}=-5.02$ cm^3/mol；$V_{a,S}=-17.98$ cm^3/mol，见图 6(b)。由于 $V_{a,S}<V_{a,L}$，说明黑莓 β-Glu 中 LF 比 SF 具有更高的压力稳定性。

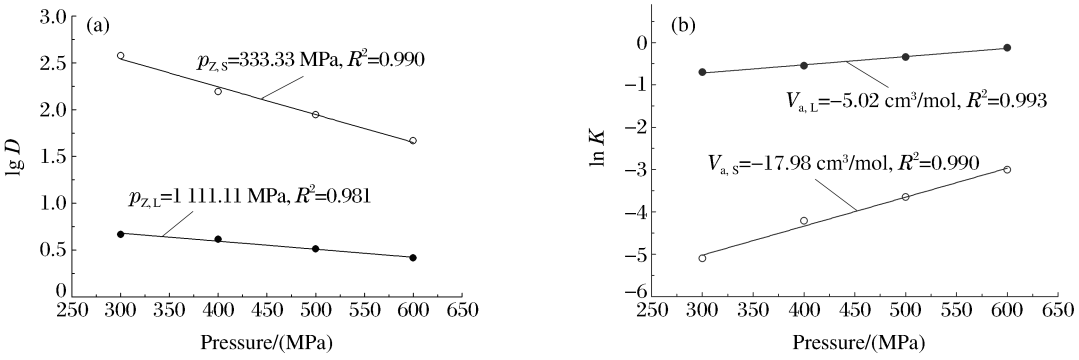


图 4　45 ℃条件下压力处理黑莓 β-Glu 稳定和敏感部分的 p_Z 和 V_a 值

Fig. 4　p_Z and V_a for pressure-dependence inactivation of the stable fraction and labile fraction for β-glucosidase in blackberry at 45℃

3.3　400 MPa 条件下中温处理对黑莓 β-Glu 酶活的影响

在 400 MPa 条件下,β-Glu 经不同温度处理后残留酶活$(A_t\times100)/A_{control}$对时间的半对数图如图 2(b)所示,根据方程(9)计算出 400 MPa 下 35、45 和 55 ℃的 IPK 值分别为 47%、57%和 77%,见表 1,随温度的升高 IPK 增大。

在 400 MPa 条件下,黑莓 β-Glu 相对酶活在不同温度条件下随保压时间的变化如图 5 所示,黑莓 β-Glu酶活在 1～10 min 内下降较快,10 min 后酶活下降趋于平缓,相对酶活随时间变化的曲线与方程(1)的拟合度不理想($R^2\leqslant0.898$),而双相一级反应动力学模型则可以较好的描述黑莓 β-Glu 在此条件下的失活过程($R^2\geqslant0.985$),进一步说明黑莓 β-Glu 存在同工酶,从而导致其失活过程呈现先快后缓的趋势。400 MPa 条件下,经 35～55 ℃不同温度处理 2 min 后黑莓 β-Glu 酶活失活率分别为 20%、68%和 86%,保压时间延长对其最终失活率无显著影响,其最终失活率分别为 45%、90%和 93%。

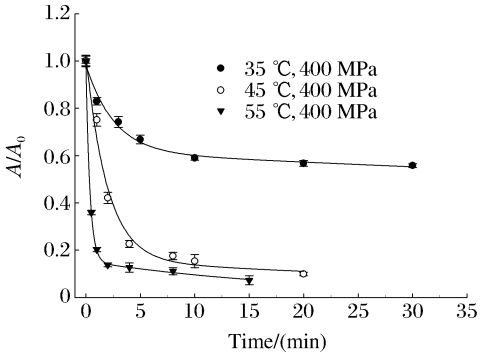


图 5　400 MPa 条件下加热处理黑莓 β-Glu 相对酶活随保压时间的变化(曲线由双相一级反应动力学模型作出)

Fig. 5　Residual activity of blackberry β-glucosidase at different temperatures as a function of time at 400 MPa (Modeled curves are given based on the two-fraction model)

在 400 MPa 条件下、不同温度处理后黑莓 β-Glu LF 的 K_L 和 D_L 见表 1,温度越高其失活速率常数 K_L 越大(D_L 越小),K_L 和温度的线性相关系数 $R^2=0.803$,小于 K_L 和压力的线性相关系数($R^2=0.960$),说明黑莓 β-Glu LF 的失活速率常数受压力的影响更大。本实验中 400 MPa 协同 55 ℃处理 β-Glu 所得 K_L(2.777 0 min^{-1})远大于杏仁 β-Glu 经 55 ℃处理[28]时的 K_L(0.051 8 min^{-1}),这可能由于处理方式、酶来源、酶纯度等条件的不同而导致。

T_Z 表示温度变化对 β-Glu D 值的影响,黑莓 β-Glu LF 和 SF 的 D 值减少一个对数所需温度的变化 $T_{Z,L}$和 $T_{Z,S}$分别为 23.36 ℃和 17.76 ℃,见图 6(a)。根据方程(8)计算可得,黑莓 β-Glu 在 400 MPa 条件下的反应活化能 E_a 分别为 $E_{a,L}=81.59$ kJ/mol 和 $E_{a,S}=107.88$ kJ/mol,见图 6(b)。由于 $E_{a,L}<E_{a,S}$,说明黑莓 β-Glu 中 SF 比 LF 具有更高的热稳定性。

表 1 温压协同处理黑莓 β-葡萄糖苷酶的动力学参数(1)及不同条件下的 IPK 值(2)

Table 1 Estimation of the kinetic parameters for β-glucosidase from blackberry base on the two-fraction model and the instantaneous pressure kill time value at different pressure-temperature domains

T/(℃)	p/(MPa)	A_L/(%)	A_S/(%)	K_L/(min^{-1})	K_S/(min^{-1})	D_L/(min)	D_S/(min)	R^2($p<0.05$)	IPK/(%)
35	400	37.00±5.02	61.42±4.89	0.387±0.011	0.004±0.000	5.95	657.88	0.9873	47.07
45	400	82.50±9.71	21.02±8.91	0.557±0.035	0.015±0.001	4.13	155.58	0.9856	57.25
55	400	84.65±5.12	15.33±4.09	2.777±0.058	0.047±0.004	0.83	49.10	0.9994	77.54
45	300	45.80±8.00	56.13±6.94	0.496±0.021	0.006±0.001	4.64	377.47	0.9603	45.24
45	500	94.77±3.44	5.71±3.10	0.709±0.057	0.026±0.005	3.24	88.56	0.9972	72.06
45	600	93.99±2.33	5.95±2.18	0.885±0.045	0.049±0.004	2.60	46.61	0.9989	78.83

Note: (1) Two-fraction model: $A=A_L\exp(-k_Lt)+A_S\exp(-k_St)$. A_S and A_L: Activity of the labile and stable fractions in relation to total enzyme inactivation. k_L and k_S: Inactivation rate constants of both labile and stable fraction. D_S and D_L: Decimal reduction times of both labile and stable fraction which are estimated by Eq. (5) based on the respective mean values of k. Data represent means ±SD, $n=3$.

(2) IPK: The oretical value of IPK.

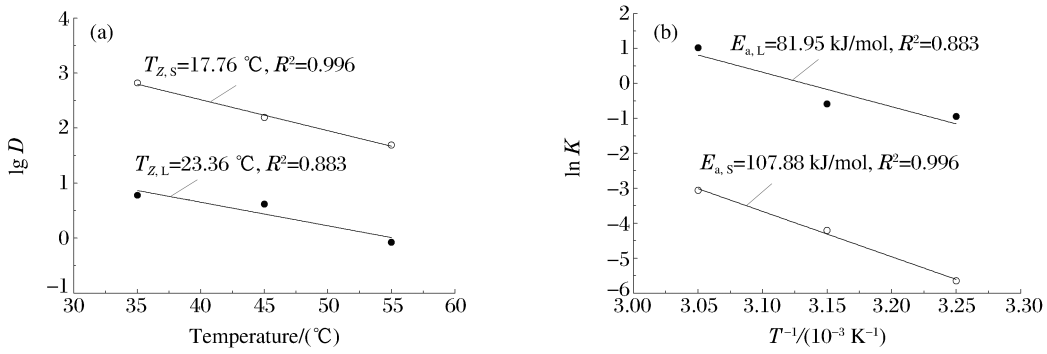


图 6 400 MPa 条件下加热处理黑莓 β-葡萄糖苷酶稳定和敏感部分的 T_Z 和 E_a 值

Fig. 6 T_Z and E_a for temperature-dependence inactivation of the labile fraction and stable fraction for β-glucosidase from blackberry at 400 MPa

4 结 论

(1) 温压协同处理黑莓 β-Glu 的失活过程不可逆,失活速率常数随温度和压力的升高而增大。

(2) 温压协同条件下 β-Glu 的失活过程分为两个阶段:第一阶段用瞬时失活值描述,其大小不受保压时间影响,随温度或压力的升高而增大;第二阶段为 IPK 后的失活过程,用双相一级反应动力学模型描述,不同温压协同条件处理黑莓 β-Glu,其酶活在 1～10 min 内下降较快,10 min 后处理时间的延长对酶活无显著影响。

(3) 黑莓 β-Glu SF 表现出比 LF 更高的热稳定性,LF 表现出比 SF 更高的压力稳定性,温压协同条件下 LF 的失活速度大于 SF 的失活速度。

References:

[1] Boateng J, Verghese M, Shackelford L, et al. Selected fruits reduce azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in fisher 344 male rats [J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(5): 725-732.

[2] Serraino I, Dugo L, Dugo P, et al. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure [J]. Life Sci, 2003, 73(9): 1097-1114.

[3] Sistia M, Fraternale M D. Antifungal activity of rubus ulmifolius schott standardized in vitro culture [J]. Food Sci Tech, 2007, 5: 1-4.

[4] Koide T, Hashimoto Y, Kamei H, et al. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo [J]. Cancer Biother Radio, 1997, 12(4): 277-280.

[5] Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, et al. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyaniding 3-O-β-D-glucoside and cyanidin [J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 2407-2410.

[6] Francis F J. Food colorants: Anthocyanins [J]. Crit Rev Food Sci, 1989, 28: 273-314.

[7] Jackman R L, Yada R Y, Tung M A, et al. Anthocyanins as food colorants—A review [J]. J Food Biochem, 1987, 11: 201-247.

[8] Huang H T. Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes [J]. J Agric Food Chem, 1955, 3(2): 141-146.

[9] Wightman J D, Wrolstad R E. Anthocyanin analysis as a measure of glycosidease activity in enzymes for juice processing [J]. J Food Sci, 2006, 60(4): 862-867.

[10] Zhang Z Q, Pang X Q, Ji Z L, et al. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning [J]. Food Chem, 2001, 75: 217-221.

[11] Sakamura S, Obata Y. Anthocyanase and anthocyanins occurring in eggplant, solanum melongena [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1965, 25: 750-756.

[12] Barbagallo R N, Palmeri R, Fabiano S, et al. Characteristic of β-glucosidase from sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation [J]. Enzyme Microb Tech, 2007, 41: 570-575.

[13] Wang W D, Xu S Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate [J]. J Food Eng, 2007, 82(3): 271-275.

[14] Morild E. The theory of pressure effect on enzymes [J]. Adv Protein Chem, 1981, 34: 93-166.

[15] Garciapalazon 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 Chem, 2004, 88(1): 7-10.

[16] Suthanthangjai W, Kajda P, Zabetakis I. The effect of high hydrostatic pressure on the anthocyanin of raspberry (*Rubus idaeus*) [J]. Food Chem, 2005, 90(1-2): 193-197.

[17] Zabetakis I, Leclerc D, Kajda P. The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins [J]. Food Chem, 2000, 48: 2749-2754.

[18] Ferrari G, Maresca P, Ciccarone R. The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice [J]. J Food Eng, 2010, 100(2): 245-253.

[19] Orruno E, Apenten R O, Zabkis I. The role of β-glucosidase in the biosynthesis of 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3(2h)-furanone in Strawberry (Fragaria × ananassa cv. Elsanta) [J]. Flavour Frag J, 2001, 16: 81-84.

[20] Castro S M, Loey V A, Saraiva J A, et al. Inactivation of pepper (Capsicum annuum) pectin methy-lesterase by combined high-pressure and temperature treatments [J]. J Food Eng, 2006, 75: 50-58.

[21] Ling A C, Lund D B. Determining kinetic parameters for thermal inactivation of heat resistant and heat labile isoenzymes from thermal destruction curves [J]. J Food Sci, 1978, 43: 1307-1310.

[22] Indrawati A V, Ludikhuyze L R, Hendrickx M E. Single, combined, or sequential action of pressure and temperature on lipoxygenase in green beans (Phaseolus vulgaris L.): A kinetic inactivation study [J]. Biotechnol Prog, 1999, 15(2): 273-277.

[23] Broeck V D, Ludikhuyze L R, Loey V A, et al. Inactivation of orange pectinesterase by combined high-pressure and temperature treatments: A kinetic study [J]. J Agr Food Chem, 2000, 48: 1960-1970.

[24] Weemaes C A, Ludikhuyze L R, Broeck I V, et al. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation avocado polyphenoloxidase [J]. Biotechnol Bioeng, 1998, 60(3): 292-300.

[25] Basak S, Ramaswamy H S. Ultra high pressure treatment of orange juice: A kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase [J]. Food Res Int, 1996, 29(7): 601-607.

[26] Wang Z, Xu S Y, Tang J. Food Chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 145-146. (in Chinese)
王 璋, 许时婴, 汤 坚. 食品化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 145-146.

[27] Vila-Real H, Alfaia A, Calado A, et al. Beta-glucosidase inactivation from naringinase, using a combined thermal and pH approach [J]. New Biotechnology, 2009, 25(Suppl 1): S148.

[28] Chang M Y, Kao H C, Shin J R. Thermal inactivation and reactivity of β-glucosidase immobilized on chitosan-clay composite [J]. Int J Biol Macromol, 2008, 43: 48-53.

Inactivation Kinetics of Blackberry β-Glucosidase by Combined High Hydrostatic Pressure and Temperature Treatments

WEI Ben-Xi, MA Yong-Kun, MA Shan-Li,
YAN Rui, ZHANG Long, BAI Jie

(*School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang* 212013, *China*)

Abstract: The inactivation kinetics of β-glucosidase in blackberry were investigated at high hydrostatic pressure (300-600 MPa) combined with moderate temperature (35-55 ℃). Analysis of the obtained kinetic data revealed a dual-effect of combined pressure-temperature inactivation: the first one, designated as an instantaneous pressure kill value (IPK), which depended on temperatures and pressures, but was independent of treatment time; and the second one, a labile and stable fraction of β-glucosidase from blackberry are present and the inactivation kinetics of β-glucosidase by high hydrostatic pressure combined with temperatures are adequately described by the two-fraction model. The kinetic rate constants K_L and K_S of labile and stable fractions are 2.777 and 0.047 min^{-1}, and the decimal reduction times D_L and D_S are 0.83 and 49.1 min at 400 MPa and 55 ℃. T_Z representing the needs of temperature increase for a 90% reduction of the D value and the activation energy E_a of the labile fraction at 400 MPa are 23.36 ℃ and 81.95 kJ/mol, p_Z representing the needs of pressure increase for a 90% reduction of the D value and the activation volume V_a at 45 ℃ are 1111 MPa and −5.02 cm^3/mol.

Key words: high hydrostatic pressure; blackberry; β-glucosidase; inactivation; kinetics