

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.09.026

# 高静压和热处理对蘑菇多酚氧化酶的钝化动力学分析\*

易建勇 姜斌 董鹏 王蓉蓉 胡小松 张燕

(中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京 100083)

**【摘要】** 研究了高静压处理 HHP(100 ~ 1 600 MPa, 0.2 ~ 25 min) 和热处理(55 ~ 80 °C, 0.2 ~ 20 min) 对双孢蘑菇多酚氧化酶(polyphenoloxidase, 简称 PPO) 的钝化效果, 并分析了钝化动力学。随着处理压力、温度的升高和处理时间的延长, 钝化效果增强。在 600 MPa 以下压力处理后, PPO 活性残存率均大于 88%, 表明 600 MPa 以下处理压力对 PPO 的钝化效果较差。而 800、1 000、1 200、1 400 和 1 600 MPa 压力下处理 25 min, PPO 活性残存率分别下降到 66.42%、52.83%、27.20%、2.20% 和 0.01%, 表明 800 MPa 以上压力能有效钝化蘑菇 PPO。应用一级动力学模型拟合热处理对 PPO 的钝化动力学, 各温度条件下拟合的决定系数  $R^2$  都在 0.960 以上, 表明 PPO 的热钝化符合一级动力学模型; 应用两段式模型对 HHP 钝化蘑菇 PPO 的动力学进行拟合, 决定系数  $R^2$  均大于 0.982, HHP 钝化蘑菇 PPO 符合两段式钝化动力学。

**关键词:** 蘑菇 多酚氧化酶 高静压 钝化 动力学

**中图分类号:** TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)09-0136-07

## Effect of High Hydrostatic Pressure and Heat Treatment on PPO Inactivation and Kinetic Analysis

Yi Jianyong Jiang Bin Dong Peng Wang Rongrong Hu Xiaosong Zhang Yan

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

### Abstract

The effect of high hydrostatic pressure (HHP) treatment and heat treatment on the stability of *Agaricus bisporus* mushroom polyphenoloxidase (PPO) was studied. Residual activities of the PPO were investigated after HHP treatment at 100 ~ 1 600 MPa for 0.2 ~ 25 min and heat treatment at 55 ~ 80 °C for 0.2 ~ 20 min. The HHP and heat inactivation kinetic of mushroom PPO were analyzed by first-order and biphasic model. The results showed that the effect of inactivation was improved with the pressure and temperature increasing, as well as the treatment time increasing. The residual activities were all higher than 88% when treated at pressure lower than 600 MPa, indicated that treatment at pressure lower than 600 MPa had limited influence on the activity of PPO. After HHP treatment at 800, 1 000, 1 200, 1 400 and 1 600 MPa for 25 min, the residual activity reduced to 66.42%, 52.83, 27.20%, 2.20% and 0.01%, respectively. The first-order model was used to analyze the survival curves of heat treatment. All of the coefficients of determination ( $R^2$ ) were higher than 0.960, which proved that the first-order model fit the microbial inactivation kinetics curve well. However, as  $R^2$  were all higher than 0.982, the biphasic model was proved to be more suitable than the first-order model to describe the kinetics of PPO inactivation treated by HHP.

**Key words** Mushroom, Polyphenoloxidase, High hydrostatic pressure, Inactivation, Kinetics

收稿日期: 2011-10-16 修回日期: 2011-12-14

\* 国家自然科学基金资助项目(30972067)和“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2011AA100801)

作者简介: 易建勇, 博士生, 主要从事非热加工技术及装备研究, E-mail: yijianyong515@126.com

通讯作者: 张燕, 副教授, 主要从事农产品加工研究, E-mail: zhangyan-348@hotmail.com

## 引言

多酚氧化酶(PPO, EC1.14.18.1)是导致果蔬、果蔬制品和果汁等制品发生酶促褐变的一种主要的内源酶<sup>[1]</sup>。PPO可以使单酚羟基化为邻苯二酚,也可催化邻苯二酚氧化为醌类物质。这种醌类物质不稳定,进一步形成黑色素<sup>[2]</sup>。此外,PPO催化酚类物质发生的氧化反应还可以影响产品的风味和香气<sup>[3]</sup>。目前,工业上主要利用热加工、冷冻、降低pH值、添加护色剂或酶抑制剂来抑制PPO活性。通常,果蔬制品需要经过80℃以上的热处理来灭活腐败菌和钝化PPO等氧化酶类。然而,这些加工方式导致果蔬制品的营养和风味损失严重。

高静压(high hydrostatic pressure, 简称HHP)技术是一种新兴的非热加工技术,在保证食品微生物安全性的同时,也可保持其风味、色泽、营养、口感等方面的品质<sup>[4-5]</sup>。HHP技术应用于食品领域进行杀菌时,压力仅作用于对生物大分子立体结构有贡献的氢键、离子键和疏水键等非共价键,而对维生素、色素和风味物质等小分子化合物的共价键无明显影响<sup>[6]</sup>。

目前,应用于食品加工的HHP处理压力都低于700 MPa。这是由于当压力高于700 MPa后,常压下存在的液态水将转化为固态冰,可能造成设备损伤<sup>[7]</sup>。细菌、霉菌、酵母菌和大肠杆菌等具有细胞结构的微生物对压力较为敏感,600 MPa压力就可以将其杀灭;然而,PPO等食品内源酶对压力的耐受性则相对较高,许多研究表明1 000 MPa压力以下的HHP处理仍不能有效钝化果蔬中与品质相关的酶<sup>[1, 3, 8-10]</sup>。1 000 MPa以上压力下HHP处理对PPO钝化效果的报道较少,因此有必要研究该压力范围下HHP技术对PPO的钝化效果,系统分析HHP对PPO的钝化动力学。

本文研究HHP技术对双孢蘑菇PPO的钝化效果,分别应用一级动力学和两段式动力学模型分析HHP和热处理钝化蘑菇PPO的规律,为HHP技术在果蔬加工上的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)多酚氧化酶(T-3824)购置于美国Sigma公司。邻苯二酚、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器设备

试验检测仪器包括:UV-1800型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);868型pH计(美国奥立龙

公司)。试验设备为HHP-1600型超高静压设备(包头科发高压科技有限责任公司),如图1所示。设备为直压式结构,主要由高压承压容器和增压系统组成。设计容器体内径为25 mm;外径为350 mm;长度320 mm;壁厚比为14。传压介质为癸二酸辛二酯。最大工作压力为1 600 MPa;设计压力为1 840 MPa;该设备的升压速率为85~95 MPa/s,卸压速率为90~100 MPa/s。

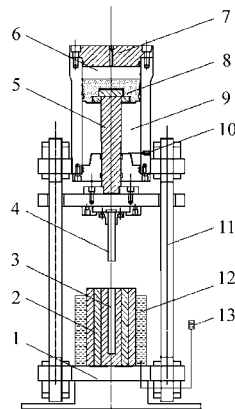


图1 高静压设备结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of HHP experimental system

1. 容器底座 2. 高压容器体 3. 容器腔 4. 柱塞杆 5. 联动杆  
6. 油缸Ⅰ部 7. 顶部支架 8. 柱塞杆 9. 油缸Ⅱ部 10. 油缸进油口  
11. 承压框架 12. 加热套 13. 温控系统

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 试样制备

将23.4 mg蘑菇PPO固体粉末溶解于234 mL的0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH值6.5)中,配成的酶液质量浓度为0.1 mg/mL。取上述酶液3 mL装于尼龙软袋(15 cm×3 cm)中,然后真空热封。相对压力为-0.1 MPa,抽真空时间为15 s,热封时间为1.5 s,延时2 s。为了排除热封时高温对酶活性的影响,热封时将装有酶液的尼龙软袋的末端置于0℃冰水浴中。

#### 1.3.2 热处理

热处理在恒温水浴中进行。设定处理温度梯度为55、60、65、70、75和80℃;处理时间分别为0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、5、10、15和20 min。所有处理均重复3次。

#### 1.3.3 HHP处理

利用上述HHP-1600型超高静压设备处理PPO酶液,处理压力分别为100、200、300、400、500、600、800、1 000、1 200、1 400和1 600 MPa,处理时间为0.2、0.5、0.75、1.0、2.5、5、10、15、20和25 min。酶液在恒定的压强下进行处理,处理时间达到后立即卸压。处理后的酶液置于0℃冰水浴,并于4 h内测定酶活性。所有处理均重复3次。

### 1.3.4 PPO 活性测定

采用比色法测定 PPO 活性残存率<sup>[10]</sup>。用 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 值 6.5) 配成 0.1 mol/L 的邻苯二酚作为反应液。反应液现配现用,并置于 30℃ 水浴中预热。将 0.05 mL 蘑菇 PPO 酶液 (0.1 mg/mL) 加入到 2.95 mL 上述反应液中,迅速混匀后置于 420 nm 波长下测定其吸光度的变化,测定时间为 1 min,测定温度为 (30 ± 1)℃。利用吸光度曲线初始部分的斜率计算酶活性。将 1 mL 酶液在 1 min 内吸光度变化 0.001 个单位定义为一个酶活性单位 (1 U)。通常用 PPO 活性残存率表示酶钝化的效果,计算公式为

$$A = \frac{A_t}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中  $A$ ——时间  $t$  时 PPO 活性残存率  
 $A_t$ ——HHP 处理后 PPO 的活性  
 $A_0$ ——HHP 处理前 PPO 的活性

## 1.4 数据统计与分析

### 1.4.1 动力学分析

高静压钝化食品中微生物的动力学可用 Weibull 模型拟合<sup>[11]</sup>,而高静压对酶活性的钝化则采用一级动力学模型分析<sup>[12]</sup>,模型表示为

$$A = A_0 \exp(-kt) \quad (2)$$

式中  $k$ ——在设定的压强和温度下的钝化速率常数,  $\text{min}^{-1}$

对于钝化速率呈现前快后慢的分段变化特征,可采用两段式动力学模型。此模型适用于当样品中存在两种稳定性不同的同工酶,即稳定型和敏感型<sup>[13]</sup>。模型为

$$A = A_s \exp(-k_s t) + A_L \exp(-k_L t) \quad (3)$$

式中  $A_s, A_L$ ——稳定型、敏感型所占比例

$k_s, k_L$ ——稳定型、敏感型钝化速率常数

$D$  值表示指数递减时间 (单位 min),即在设定的压强和温度下酶活性降低 90% 所需要的时间,即

$$D = 2.303/k \quad (4)$$

同理,  $D_L = 2.303/k_L, D_s = 2.303/k_s$ 。

$Z_p$  和  $Z_T$  表示  $D$  值对压强和温度的敏感性,即  $D$  值变化一个对数时对应的压强或温度的变化幅度。 $p_1$  和  $p_2$  为  $D_1$  和  $D_2$  对应的压强,  $T_1$  和  $T_2$  为  $D_1$  和  $D_2$  对应的温度,即

$$\lg \frac{D_1}{D_2} = \frac{p_2 - p_1}{Z_p} \quad (5)$$

$$\lg \frac{D_1}{D_2} = \frac{T_2 - T_1}{Z_T} \quad (6)$$

压强  $p$  和温度  $T$  对酶钝化反应的影响分别用 Arrhenius 公式和 Eyring 公式分析<sup>[6]</sup>。活化体积

( $V_a$ , 单位  $\text{cm}^3/\text{mol}$ ) 和活化能 ( $E_a$ , 单位  $\text{kJ}/\text{mol}$ ) 表示压强和温度对反应常数  $k$  的影响,  $p_2$  和  $p_1, T_2$  和  $T_1$  表示对应  $k_1$  和  $k_2$  的压强和绝对温度。

Arrhenius 公式为

$$k = k_{\text{ref}} \exp \left( \frac{E_a}{R_T} \left( \frac{1}{T_{\text{ref}}} - \frac{1}{T} \right) \right) \quad (7)$$

Eyring 公式为

$$k = k_{\text{ref}} \exp \left( \frac{-V_a}{R_p T} (p - p_{\text{ref}}) \right) \quad (8)$$

式中  $R_p, R_T$ ——气体常数,为  $8.31 (\text{cm} \cdot \text{MPa}) / (\text{mol} \cdot \text{K})$ 、 $8.31 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$

$k_{\text{ref}}$ ——压强  $p$  和参照温度下的钝化速率常数,  $\text{min}^{-1}$

$T_{\text{ref}}$ ——参照温度, K

$p_{\text{ref}}$ ——参照压强,取 0.1 MPa

### 1.4.2 数据分析

数据采用方差分析,用平均值表示。动力学分析和拟合使用 SPSS 17.0 软件,绘图使用 Software Microcal Origin 8.0 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 热处理对蘑菇 PPO 钝化效果的影响

图 2 为热处理 (55 ~ 80℃) 对蘑菇 PPO 的钝化效果。随着热处理温度升高,处理后 PPO 的残存活性下降速度明显加快 ( $P < 0.05$ )。55℃ 和 60℃ 处理 20 min 后, PPO 活性残存率分别为 65.33% 和 34.40%,说明蘑菇 PPO 在 60℃ 及以下温度条件下仍然较为稳定。65℃ 处理 15 min 和 70℃ 处理 5 min 后, PPO 活性残存率分别为 1.13% 和 0.70%,说明 PPO 在 65℃ 及以上温度环境中较容易失活。当处理温度从 60℃ 增加到 65℃ 时,钝化效果明显增强。80℃ 处理 1 min 后, PPO 活性残存率仅为 1.98%。此外,随着热处理时间的延长钝化效果明显增强 ( $P < 0.05$ )。例如 60℃ 下,随着处理从 1 min 延长至 20 min, PPO 活性残存率从 88.9% 逐渐降低到 34.4%。

### 2.2 蘑菇 PPO 的热钝化动力学分析

图 3 为不同压力条件下应用一级动力学模型拟

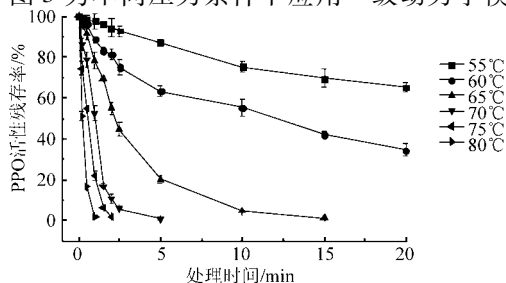


图 2 热处理对蘑菇多酚氧化酶的钝化效果

Fig. 2 Effect of heat treatment on activity of mushroom PPO

合的热处理钝化 PPO 的动力学。在一级动力学模型中,酶活的下降与时间的变化呈现出线性关系。在较低的温度下(55℃、60℃),热处理对 PPO 的钝化动力学直线较为平缓。随着处理温度的增加,直线斜率迅速增加,表明热处理温度升高后对 PPO 的钝化效果增强。

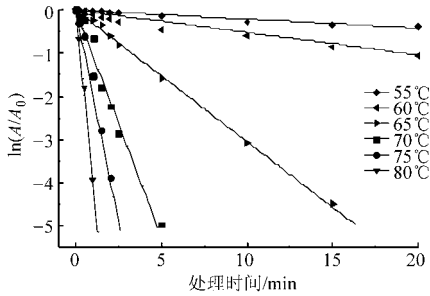


图3 蘑菇 PPO 的热钝化动力学

Fig.3 Heat inactivation kinetics of mushroom PPO

表1为利用一级动力学模型拟合热处理钝化蘑菇 PPO 的动力学参数。模型拟合参数中的决定系数  $R^2$  反应了模型拟合的效果。 $R^2$  越大,模型拟合度

越高。由表1可见,不同处理温度下,模型的决定系数  $R^2$  值都在 0.960 以上,表明热处理对 PPO 的钝化规律符合一级动力学。随着处理温度的升高,钝化速率常数  $k$  逐渐增大。当处理温度从 65℃ 提高到 70℃,  $k$  值增加了 14.6 倍。60℃ 处理条件下的  $D$  值为 44.36 min,而当处理温度上升到 65℃ 时  $D$  值迅速下降到 3.28 min,表明 65℃ 热处理可以有效地钝化蘑菇中的 PPO。 $Z_T$  值表示  $D$  值对温度的敏感性,由表1可见,  $Z_T$  值为 10.64℃,即热处理钝化蘑菇 PPO 的  $D$  值变化一个对数所对应的温度的变化为 10.64℃。 $E_a$  表示压强和温度对反应常数  $k$  的影响。热处理钝化 PPO 的  $E_a$  值为 206.93 kJ/mol,即钝化 1 mol PPO 分子需要 206.93 kJ 的能量。Weemaes 等研究表明<sup>[14]</sup>,常压下钝化鳄梨 PPO 的活化能为 319.28 kJ/mol,大于本文中的  $E_a$  值,说明蘑菇 PPO 的热稳定性要高于鳄梨 PPO。李子和梨的  $E_a$  分别为 130.57 kJ/mol 和 117.44 kJ/mol,  $Z_T$  分别为 17.60 和 18.90℃<sup>[15]</sup>,说明李子和梨中 PPO 的热稳定性低于双孢蘑菇和鳄梨。

表1 应用一级动力学模型拟合的热钝化蘑菇 PPO 的动力学参数

Tab.1 Kinetic parameters for thermal inactivation of mushroom PPO

温度/℃	$k/\text{min}^{-1}$	$D/\text{min}$	$R^2 (P < 0.05)$	$Z_T/℃$	$E_a/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
55	0.021 ± 0.001	109.21 ± 7.49	0.960		
60	0.052 ± 0.003	44.36 ± 2.62	0.970		
65	0.072 ± 0.004	3.28 ± 0.22	0.998	10.64 ± 1.64	206.93 ± 29.10
70	1.050 ± 0.071	2.19 ± 0.15	0.977	( $R^2 = 0.919$ )	( $R^2 = 0.930$ )
75	1.961 ± 0.115	1.17 ± 0.07	0.990		
80	3.957 ± 0.131	0.58 ± 0.02	0.997		

### 2.3 HHP 处理对 PPO 钝化效果的影响

图4为 HHP 处理对蘑菇 PPO 的钝化效果。随着处理压力的增加,HHP 处理对细菌的杀灭效果显著增强( $P < 0.05$ )。在压力 100、200、300、400、500 和 600 MPa 下处理 25 min 后,PPO 活性残存率分别为 99.57%、97.75%、96.51%、93.27%、91.23% 和 88.35%,表明 600 MPa 以下压力对 PPO 的钝化效果较差。而在 800、1 000、1 200、1 400 和 1 600 MPa 压力下处理 25 min 后,PPO 的活性残存率分别为 66.42%、52.83%、27.20%、2.20% 和 0.01%,表明 800 MPa 以上压力能有效钝化 PPO。1 600 MPa 处理 1 min 后 PPO 几乎完全被钝化(活性残存率为 0.77%),由此可见 HHP 处理可以用于钝化 PPO 酶。与热处理不同,HHP 技术是一种非热加工技术,不仅能钝化果蔬中的酶,同时还可以较大限度地保留食品原有的色泽、质地和营养<sup>[5,16]</sup>。

对于热处理,80℃ 条件下处理 1 min 后 PPO 活

性残存率为 1.98%,PPO 基本上被完全钝化。而要达到同样的效果,需要 HHP 处理的条件为 1 400 MPa 处理 25 min 或 1 600 MPa 处理 1 min,处理后两者的 PPO 活性残存率分别为 2.2% 和 0.77%。

目前,国际上已有一些研究报道了 HHP 对 PPO 钝化效果的研究,但是这些结果之间却存在着较大的差异。Weemaes 等报道<sup>[15]</sup>,25℃、900 MPa 下处理不能有效钝化李子中的 PPO。Garcia-Palazon 等研究发现 18~22℃ 条件下,800 MPa 下处理 15 min 可以使树莓 PPO 下降 29%,但不能有效地钝化梨中的 PPO<sup>[17]</sup>。Sun 等<sup>[8]</sup> 研究则表明 35℃ 条件下,800 MPa 处理 10 min 就能使蘑菇 PPO 酶活下降 28%。Gomes 等<sup>[18]</sup> 发现处理压力超过 400 MPa 后,随着压力的继续增加蘑菇 PPO 的活性开始被钝化,当处理压力增加至 800 MPa 后,处理 10 min 就可以完全钝化蘑菇中的 PPO。HHP 钝化 PPO 效果间存在的这些差异可能是由以下 4 个原因造成的:

① PPO 的来源不同。来源不同的 PPO 分子存在着氨基酸组成和顺序上的差异<sup>[2, 19]</sup>, 这种 PPO 酶分子结构上的差异导致了其耐压性的不同。此外, PPO 分子亚基数量和聚合度也影响着 PPO 的耐压性。例如, 有研究发现 HHP 激活 PPO 的现象仅在单体蛋白质分子上被发现, 而经过 HHP 处理后多聚体蛋白分子的活性会降低<sup>[16]</sup>。② PPO 酶蛋白前处理中的真空热封步骤可能导致酶活性的损失, 这可能造成 PPO 被 HHP 处理钝化的假象。一般情况下, 真空热封的温度为 120 ~ 150℃。如果这个热封过程

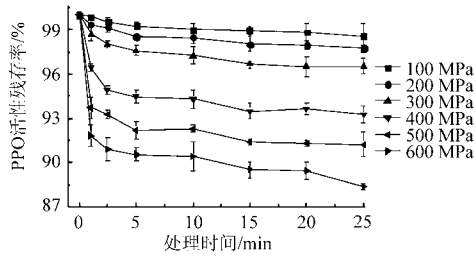


图4 高静压处理对蘑菇多酚氧化酶的钝化效果

Fig. 4 Effect of HHP treatment on activity of mushroom PPO

## 2.4 蘑菇 PPO 的 HHP 钝化动力学分析

表2为应用一级动力学模型拟合 HHP 钝化蘑菇 PPO 的动力学参数。由表2可见, 利用一级动力学模型拟合后, 仅100、200、800和1 000 MPa 这4个

控制不当, 热封时产生的高温将迅速使 PPO 酶蛋白失活。③ 不同的传压介质有不同的压致升温特性, 这也可能影响钝酶效果。从同样的初始温度增压至同样的压力后, 不同的传压介质所达到的温度差异较大, 这种温度上的差异将造成钝酶效果的差异。④ 不同的压力设备具有不同的升压和卸压速率, 设备的差异也可能使钝酶效果产生差异。这是因为增压速率的不同不仅可以对酶结构造成直接的影响, 还间接影响了容器、传压介质和样品间的热交换时间, 改变了处理时的环境温度, 导致钝酶效果的差异。

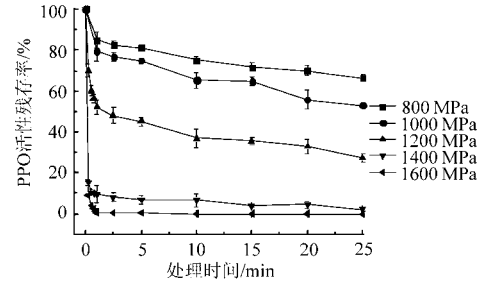


表2 应用一级动力学模型拟合的 HHP 钝化蘑菇 PPO 的动力学参数

Tab. 2 Kinetic parameters for HHP inactivation of mushroom PPO

压力/MPa	$k/\text{min}^{-1}$	$R^2 (P < 0.05)$	压力/MPa	$k/\text{min}^{-1}$	$R^2 (P < 0.05)$
100	$0.00052 \pm 0.00008$	0.865	800	$0.013 \pm 0.002$	0.800
200	$0.00081 \pm 0.00013$	0.854	1000	$0.021 \pm 0.003$	0.852
300	$0.0012 \pm 0.0003$	0.703	1200	$0.036 \pm 0.007$	0.716
400	$0.0018 \pm 0.0007$	0.464	1400	$0.080 \pm 0.025$	0.481
500	$0.0022 \pm 0.0010$	0.357	1600	$0.28 \pm 0.05$	0.755
600	$0.0028 \pm 0.0012$	0.357			

表3为两段式模型拟合 HHP 钝化 PPO 的动力学参数。由表3可见, 不同压力条件下, 利用两段式模型拟合 PPO 的钝化动力学的决定系数  $R^2$  都在 0.982 以上, 表明 HHP 对 PPO 的钝化动力学符合两段式模型。

由表3可见, 100 MPa 处理条件下, 敏感型和稳定型 PPO 所占的比例分别为 0.78% 和 99.28%, 表明 99% 以上的 PPO 在该压力条件下比较稳定。随着压力的增加, 敏感型 PPO 的比例逐渐上升, 而稳定型所占的比例下降。当压力上升至 1 600 MPa 后, 敏感型和稳定型 PPO 所占的比例分别为 80.66% 和 19.35%, 表明大部分 PPO 在该压力条件

处理条件下模型拟合的决定系数  $R^2 \geq 0.800$ , 表明利用一级动力学模型拟合 HHP 钝化 PPO 的拟合度较低。因此, 改用两段式模型对 HHP 钝化 PPO 的动力学进行拟合。

下不稳定, 容易被钝化。此外, 随着压力的升高反应速率常数也呈现上升趋势。处理压力小于 1 400 MPa 时, 稳定型 PPO 的反应速率常数  $k_s$  都小于  $0.06 \text{ min}^{-1}$ , 而处理压力提高到 1 600 MPa 以后,  $k_s$  也从  $0.055 \text{ min}^{-1}$  迅速上升到了  $2.38 \text{ min}^{-1}$ 。这表明当处理压力超过 1 400 MPa 后, 稳定型 PPO 也变得对压力较为敏感。

敏感型和稳定型的  $Z_p$  分别为 756.67 MPa 和 433.48 MPa, 敏感型和稳定型的  $V_a$  分别为  $-0.76 \text{ cm}^3/\text{mol}$  和  $-13.18 \text{ cm}^3/\text{mol}$ 。HHP 处理对稳定型和敏感型 PPO 的钝化速率差别较大, 这可能是由蘑菇中存在的同工酶造成的。Buckow 等利用

表3 应用两段式模型拟合的 HHP 钝化蘑菇 PPO 的动力学参数  
Tab.3 Kinetic parameters of mushroom PPO inactivation treated by HHP

压力/MPa	$A_L/\%$	$A_S/\%$	$k_L/\text{min}^{-1}$	$k_S/\text{min}^{-1}$	$D_L/\text{min}$	$D_S/\text{min}$	$R^2 (P < 0.05)$
100	0.78 ± 0.20	99.28 ± 0.20	0.31 ± 0.05	0.000 26 ± 0.000 05	7.45 ± 1.22	8 891.89 ± 1 890.88	0.985
200	1.23 ± 0.24	98.74 ± 0.22	0.48 ± 0.12	0.000 41 ± 0.000 07	4.80 ± 1.29	5 608.34 ± 1 038.46	0.982
300	2.27 ± 0.25	97.71 ± 0.20	0.70 ± 0.18	0.000 56 ± 0.000 12	3.28 ± 0.88	4 090.59 ± 919.93	0.990
400	5.26 ± 0.28	94.74 ± 0.21	1.10 ± 0.15	0.000 64 ± 0.000 13	2.10 ± 0.29	3 609.72 ± 795.04	0.993
500	7.03 ± 0.49	92.97 ± 0.31	2.10 ± 0.55	0.000 86 ± 0.000 22	1.10 ± 0.31	2 671.69 ± 732.31	0.990
600	8.76 ± 0.33	91.25 ± 0.21	2.54 ± 0.47	0.001 17 ± 0.000 15	0.91 ± 0.17	1 968.38 ± 259.64	0.997
800	15.73 ± 1.41	84.27 ± 0.92	2.72 ± 1.31	0.009 9 ± 0.000 8	0.85 ± 0.55	233.10 ± 18.23	0.994
1 000	19.72 ± 2.59	80.28 ± 1.71	3.87 ± 1.55	0.017 ± 0.001 6	0.59 ± 1.05	134.68 ± 12.75	0.990
1 200	46.71 ± 2.63	52.55 ± 1.57	4.16 ± 0.61	0.027 ± 0.002 8	0.55 ± 0.08	86.25 ± 9.26	0.991
1 400	89.90 ± 0.84	10.10 ± 0.42	14.17 ± 0.80	0.055 ± 0.007	0.16 ± 0.01	42.18 ± 5.25	0.989
1 600	80.66 ± 6.34	19.35 ± 6.32	108.59 ± 2.43	2.38 ± 0.54	0.021 ± 0.001	0.97 ± 0.23	0.991

一级动力学模型拟合了 HHP 钝化苹果汁中 PPO 的钝化规律,结果表明 600 MPa 下的钝化速率常数为  $3.764 \text{ min}^{-1}$ <sup>[3]</sup>,略高于本文的  $2.54 \text{ min}^{-1}$ ,说明来源不同的酶或者同工酶其耐压性存在差异。因此,如果蘑菇 PPO 中的同工酶的耐压性存在较大差异,将导致其钝化曲线呈现明显的两段式;另一方面,虽然本文使用的蘑菇 PPO 是钝化后的商业化标准品酶,但这种标准品酶的组分仍然不够单一,其中可能存在一些漆酶、葡萄糖苷酶等蘑菇中常见的杂蛋白酶<sup>[20]</sup>。漆酶也是含有 4 个铜离子的酶,它也能氧化酚类化合物(同时可以氧化芳香族氨基酸),其作用底物中有几种和多酚氧化酶一样,例如邻苯二酚和邻氨基苯酚<sup>[20]</sup>。此外,如果样品中存在  $\beta$ -葡糖糖苷酶, $\beta$ -葡糖糖苷酶可以催化生成一些 PPO 的底物或者抑制剂,这些产物与 PPO 或者漆酶发生作用也可以影响钝酶结果。

由于热处理钝化蘑菇 PPO 的动力学符合一级反应动力学,说明无论是蘑菇 PPO 标准品中存在同工酶还是存在其他相近的酶类,这些酶对热处理的

耐受能力可能比较接近,因此热处理钝化 PPO 的速率能符合一级动力学模型。

### 3 结论

(1) 随着处理压力的升高和时间的延长,HHP 对蘑菇 PPO 的钝化效果增强;经过较低压力的 HHP (600 MPa 以内)处理后,PPO 活性残存率均大于 88%,说明 600 MPa 以下压力对 PPO 的钝化效果较差。而 800、1 000、1 200、1 400 和 1 600 MPa 压力下处理 25 min,PPO 活性残存率分别下降到 66.42%、52.83%、27.20%、2.20% 和 0.01%,说明 800 MPa 以上处理压力对 PPO 的钝化效果较好。

(2) 应用一级动力学模型拟合热处理对 PPO 的钝化动力学,不同处理温度下模型的决定系数  $R^2$  都在 0.960 以上,表明热处理钝化 PPO 符合一级动力学;应用两段式模型拟合不同处理压力下 PPO 的钝化动力学,决定系数  $R^2$  均大于 0.982,表明 HHP 处理对 PPO 的钝化过程符合两段式钝化动力学。

### 参 考 文 献

- 1 曾庆梅,潘见,谢慧明,等.超高压处理对多酚氧化酶活性的影响[J].高压物理学报,2004,18(2):144~148.  
Zeng Qingmei, Pan Jian, Xie Huiming, et al. Effect of high pressure (HP) treatments on polyphenoloxidase (PPO) activity in pear juices [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18(2): 144~148. (in Chinese)
- 2 Ismaya W T, Rozeboom H J, Weijn A, et al. Crystal structure of agaricus bisporus mushroom tyrosinase; identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone[J]. Biochemistry, 2011, 50(24): 5 477~5 486.
- 3 Buckow R, Weiss U, Knorr D. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2009, 10(4): 441~448.
- 4 姜绍通,钟昔阳,潘丽军.超高压改性谷朊粉对面条加工品质的影响[J].农业机械学报,2010,41(3):153~158.  
Jiang Shaotong, Zhong Xiyang, Pan Lijun, et al. Effect of addition of ultra-high pressure treated wheat gluten on the quality of noodle [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(3): 153~158. (in Chinese)
- 5 闫雪峰,赵有斌.超高压处理对树莓汁杀菌效果的影响[J].农业机械学报,2010,41(增刊):212~216.

- Yan Xuefeng, Zhao Youbin. Effect of ultra-high pressure processing on sterilization of raspberry juice [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(Supp.): 212 ~ 216. (in Chinese)
- 6 Aertsen A, Meersman F, Hendrickx M E, et al. Biotechnology under high pressure: applications and implications [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(7): 434 ~ 441.
- 7 Hartmann C, Delgado A. Momentum and energy transfer during phase change of water under high hydrostatic pressure [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2006, 7(3): 161 ~ 168.
- 8 Sun N K, Song K B. Effect of nonthermal treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(5): 1 639 ~ 1 643.
- 9 Eisenmenger M J, Reyes-De-Corcuera J I. High pressure enhancement of enzymes: a review [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 45(5): 331 ~ 347.
- 10 Terefe N S, Yang Y H, Knoerzer K, et al. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(1): 52 ~ 60.
- 11 靳志强, 王顺喜, 韩培. 微波杀灭霉变玉米中寄生曲霉动力学模型[J]. 农业机械学报, 2011, 42(12): 148 ~ 153, 170.  
Jin Zhiqiang, Wang Shunxi, Han Pei. Inactivation kinetics model of aspergillus parasiticus in mouldy maize by microwave processing [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011, 42(12): 148 ~ 153, 170. (in Chinese)
- 12 Basak S, Ramaswamy H S. Ultra high pressure treatment of orange juice: a kinetic study on inactivation of pectin methyl esterase [J]. Food Research International, 1996, 29(7): 601 ~ 607.
- 13 Nunes C S, Castro S M, Saraiva J A, et al. Thermal and high-pressure stability of purified pectin methylesterase from plums (*Prunus domestica*) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2006, 30(2): 138 ~ 154.
- 14 Weemaes C A, Ludikhuyze L R, Van de Broeck I, et al. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 60(3): 292 ~ 300.
- 15 Weemaes C, Ludikhuyze L, Van Den Broeck I, et al. High pressure inactivation of polyphenoloxidases [J]. Journal of Food Science, 1998, 63(5): 873 ~ 877.
- 16 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 & Technology, 1998, 9(5): 197 ~ 203.
- 17 Garcia-Palazon A, Suthanthangjai W, Kajda P, et al. The effects of high hydrostatic pressure on beta-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*) [J]. Food Chemistry, 2004, 88(1): 7 ~ 10.
- 18 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.
- 19 Virador V M, Grajeda J P, Blanco-Labra A, et al. Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(2): 1 189 ~ 1 201.
- 20 Rescigno A, Zucca P, Flurkey A, et al. Identification and discrimination between some contaminant enzyme activities in commercial preparations of mushroom tyrosinase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(5): 620 ~ 627.