

# 超高压对酱曲多酚氧化酶激活和钝化作用动力学研究\*

苏光明 朱松明 胡菲菲 徐梦龙 于 勇

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058)

**摘要:** 研究了超高压处理(100~500 MPa, 1~20 min)和热处理(40、60、90℃, 1~20 min)对酱曲多酚氧化酶(Polyphenoloxidase, PPO)活性的影响,并分析了PPO的压变动力学。试验结果表明:较低的超高压加工(HPP)处理(100~300 MPa)对酱曲PPO有激活作用,200 MPa处理10 min能最大限度地激活酱曲PPO,相对活性为135%;较高的HPP处理(350~500 MPa)对酱曲PPO有显著的钝化作用,且钝化效果随着压力的增加和处理时间的延长而逐渐增强,但随着处理时间的延长,钝化作用趋于一个最大值,该最大值在350、400、450、500 MPa时分别为74.0%、55.4%、62.8%、66.5%。通过动力学模型拟合发现:酱曲PPO的激活/钝化特征在不同压力范围表现不同。100~200 MPa的HPP处理对酱曲PPO的钝化符合两段式一级动力学模型( $R^2 \geq 0.970$ );250~300 MPa的HPP处理对酱曲PPO的激活作用符合一级分数转换模型( $R^2 \geq 0.994$ );而350~500 MPa的HPP钝化处理符合两段式动力学模型与一级动力学模型的混合模型( $R^2 \geq 0.995$ )。试验结果为更进一步的探索研究奠定了理论基础。

**关键词:** 黄豆酱曲 多酚氧化酶 超高压处理 动力学模型

**中图分类号:** TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2015)10-0257-09

## Kinetics of Polyphenoloxidase Activation and Inactivation in Soybean Paste Koji by Ultra-high Pressure

Su Guangming Zhu Songming Hu Feifei Xu Menglong Yu Yong

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** In order to investigate the possibility of applying HPP in the production of soybean paste, the effects of HPP treatments (100~500 MPa, 1~20 min) and heat treatments (40, 60, 90℃, 1~20 min) on koji PPO activity were studied, which are important in forming the color of final product. The activation or inactivation kinetics of PPO following HPP treatment was also evaluated. Results showed that HPP treatment at low pressure (100~300 MPa) could activate the PPO activity with maximum relative activity of 135% at 200 MPa for 10 min. While at a higher pressure between 350 MPa and 500 MPa, koji PPO can be inactivated significantly; a larger degree of inactivation was obtained at a higher pressure with a longer pressure holding time. Moreover, the degree of inactivation could approach a maximum level with an endless pressure treatment, the maximum inactivation differed with different pressure levels, which could be expressed as 74.0%, 55.4%, 62.8%, 66.5% at 350, 400, 450, 500 MPa, respectively. Kinetic analysis indicated that the patterns of koji PPO activation or inactivation could be expressed in a different way at different pressure levels. The PPO activation pattern following HPP treatment at 100~200 MPa could be described well by a two-step first-order model with coefficient of determination ( $R^2$ ) higher than 0.970. The survival curves with 250~300 MPa HPP treatment followed the fractional conversion model with  $R^2$  higher than 0.994. The biphasic model was proved to be suitable to describe the kinetics of koji PPO inactivation treated by HPP between 350 MPa and 500 MPa, with  $R^2$  higher than

收稿日期: 2014-11-05 修回日期: 2014-11-30

\* 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2011AA100801)

作者简介: 苏光明, 博士生, 主要从事食品非热加工技术研究, E-mail: roger.sugm@gmail.com

通讯作者: 于勇, 副教授, 博士生导师, 主要从事农产品加工技术与装备研究, E-mail: yyuzju@zju.edu.cn



霉菌种(质量分数 0.1%),均匀混合后于恒温恒湿箱进行两段式培养。第 1 阶段培养条件为:温度 30℃、相对湿度 95%,培养 36 h;第 2 阶段培养条件为:温度 28℃、相对湿度 95%,培养 36 h。培养完成后按照料液质量比 1:1 添加 10% 的盐水混合均匀,即成酱曲。酱曲的 pH 值调整至 7.3。制成的酱曲用聚乙烯塑料袋分装,每袋 200 g,密封后 25℃ 放置 6 h 待处理。

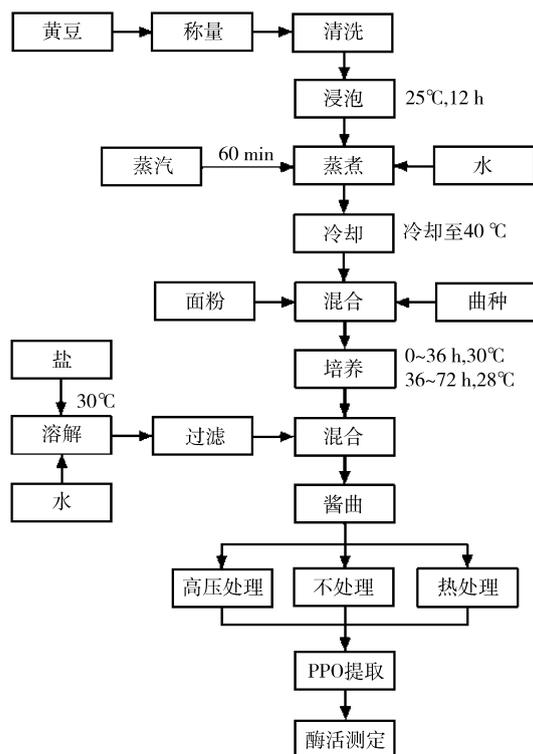


图 2 黄豆酱酱曲制备过程及试验流程图

Fig. 2 Preparation of soybean paste koji and schematic of experiment process

### 1.3.2 热处理

热处理在恒温水浴中进行。设定处理温度分别为 40、60、90℃,处理时间分别为 1~20 min。热处理的时间为样品中心温度达到既定温度时开始计时。样品温度的测定方法如下:在样品中心插入一根“K”型热电偶,真空密封包装后与数据采集仪相连接;数据采集仪的设置如下:测量项目设为温度(单位:℃);传感器类别设为“K”型热电偶;测量间隔为 1 s。热处理前,开启数据采集仪的自动扫描功能,样品的温度变化显示并记录在与数据采集仪相连的计算机上。样品经过热处理后,4℃ 冷却保存,2 h 内进行 PPO 提取和测定。所有处理重复 4 次。

### 1.3.3 HPP 处理

利用图 1 所示超高压设备处理酱曲。将 3 袋密封的酱曲样品同时置于高压腔,在相对恒定的压力和温度下进行处理。处理压力分别为 100、150、200、250、300、350、400、450、500 MPa,保压时间分别

为 1、2、3、4、5、7.5、10、15、20 min,所有处理均重复 2 次。高压腔和传压介质容器按图 1 所示与恒温循环器相连。恒温循环器温度设定为 26.5℃,HPP 处理时传压介质实际的初始温度为(25±0.5)℃。样品经过 HPP 处理后,4℃ 冷却保存,2 h 内进行 PPO 提取和测定。

HPP 处理时,同批次处理的 3 个样品中,2 个样品用于 PPO 的提取和活性测定,1 个样品用于测定 HPP 处理过程中的温度变化。用于温度测定的样品在放入高压腔前,于样品中心位置插入一根“K”型热电偶,并用封口机密封,连接至安装在超高压设备下堵头的转接口,如图 1 所示。经过转接口的“K”型热电偶与数据采集仪相连接,数据采集仪的设置与热处理的设置相同。

### 1.3.4 PPO 粗提液的提取和活性测定

PPO 活性采用比色法测定<sup>[15]</sup>。取 50 g 酱曲与 100 mL McIlvaine 缓冲液(pH 值 6.5)混合 1 min。混合后离心分离 20 min(12 000 g,4℃),上清液用滤纸过滤。取 2 mL 邻苯二酚(0.33 mmol/L),添加 1 mL 上述滤液,迅速混合后置于 420 nm 波长下测定混合液吸光度的变化,测定时间为 5 min。酶活性的计算基于吸光度曲线初始部分的斜率。将 1 g 样品在 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 活性残存率表示酶的变化,计算公式为

$$A = A_t/A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中  $A$ ——时间  $t$  时 PPO 活性残存率

$A_t$ ——HPP 处理后 PPO 的活性

$A_0$ ——HPP 处理前 PPO 的活性

当  $A < 1$  时,表示 PPO 经过 HPP 处理后被钝化,活性降低;当  $A > 1$  时,表示 PPO 经过 HPP 处理后被激活,活性增加。

### 1.4 数据统计与分析

等温或等压条件下,压力和温度对食品中酶的钝化特征呈现不同的趋势,酶活变化通常分为 3 类:

(1) 一级动力学模型:酶的钝化曲线与时间呈线性正比关系,即

$$A = -A_0 e^{-kt} \quad (2)$$

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

(2) 一级分数转换模型:当处理时间无限延长时,酶的钝化或激活无限趋于一个最大值,即

$$A = A_\infty + (A_0 - A_\infty) e^{-kt} \quad (3)$$

式中  $A_\infty$ ——处理时间无限延长时 PPO 的活性,即不可钝化酶

式(3)可以简化为

$$A = A_{\infty} + ae^{-kt} \quad (4)$$

其中

$$a = A_0 - A_{\infty}$$

(3) 两段式动力学模型:当样品中存在2种稳定性不同的同工酶时,即稳定性和敏感性,酶活变化速率呈现前快后慢的分段式特征,即

$$A = A_S e^{-k_S t} + A_L e^{-k_L t} \quad (5)$$

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

数据处理采用方差分析,以平均值  $\pm$  标准差表示。酶活性变化曲线和动力学拟合使用 OriginPro 8 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 热处理对酱曲 PPO 活性的影响

图3描述了热处理(40、60、90℃)钝化酱曲PPO的残存曲线。由图可知,热处理的温度对PPO的残存活性有显著影响( $P < 0.01$ ),随着热处理温度的提高,处理后PPO的残存活性逐渐降低。40℃的热处理对酱曲PPO活性影响不大,20 min后PPO的活性是未处理组的89%。60℃处理20 min后,PPO活性残存率为48%,说明PPO在中温环境中较容易失活。当热处理温度增加到90℃时,PPO钝化效果明显增强。90℃处理4 min后,PPO活性残存率为31%,当时间延长到10 min时,PPO完全被钝化。

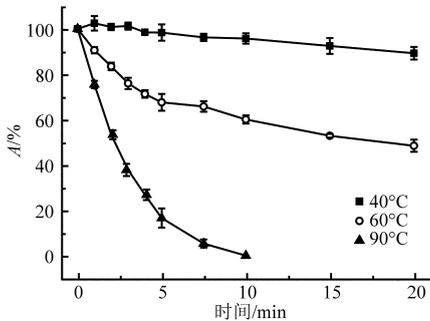


图3 热处理对酱曲PPO活性的影响

Fig.3 Effect of heat treatment on activity of koji PPO

### 2.2 HPP处理过程中样品温度的变化

图4为酱曲样品(200 g)在HPP处理过程中(400 MPa、1 min)典型的温度变化示意图。由图可知,样品中心温度随着压力的增加呈逐渐上升的趋势。当压力升至400 MPa时,样品的温度从初始的25℃增加至32℃,温度随压力增加的平均值为2℃/MPa。由于本试验所用HPP设备的倍加器为间歇性加压系统,所以温度随压力一同呈现阶梯形变化。如图4所示,在增压过程中的保压阶段,样品的温度会出现小幅的降低。当倍加器完成一个脉冲增压(图4中点a),样品温度增加到点A,在间歇性保

压阶段(a-b),样品的温度从点A降低到点B。这种温度的降低主要由于样品的绝热增温较传压介质的快而导致样品与环境之间形成了温差,从而出现了局部的热交换现象。样品经历1 min的保压阶段后,样品的温度由32℃降低至30.5℃。泄压过程中,样品的温度在短时间内出现局部的绝热膨胀而急剧降低,在0.1 MPa时降低至23℃。同样,泄压后的样品在高压腔外恒温循环器的作用下,温度逐渐上升(若时间足够长,可达25℃)。

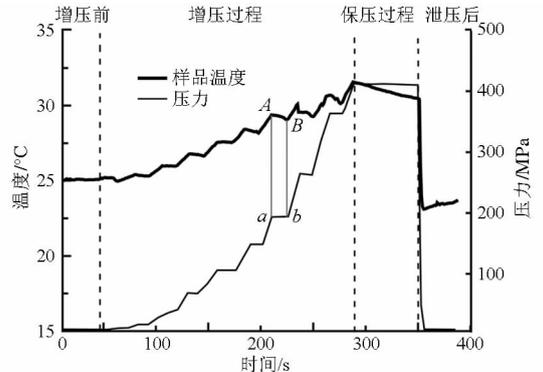


图4 HPP(400 MPa、1 min)过程中压力和样品温度变化示意图

Fig.4 Pressure and sample temperature changes during a cycle of HPP of koji sample at 400 MPa for 1 min

分别测定了100、200、300、400、500 MPa的HPP处理时样品中心温度增加值,样品温度随压力增加的平均值分别为1.5、1.8、1.9、2.0、2.1℃/MPa。Rasanayagam等报道了碳水化合物在25℃时的压致升温值为每100 MPa升温2.6~3.6℃,大豆油的压致升温值为6.3~8.3℃<sup>[16]</sup>。本试验的压致升温值与文献报道的有所不同,主要因为:样品的组分不同;增压速率不同;样品与传压介质间的热交换速率不同;高压腔规格与测温点不同。研究表明:温度场对压致升温值影响显著。高压腔内不同位置在增压和泄压过程中温度变化均有不同<sup>[17-20]</sup>,通常高压腔中心位置的压致升温值较外层位置温度高<sup>[21]</sup>。

本研究中,压致升温的最大值为500 MPa处理时的10.5℃,500 MPa的HPP处理可导致样品在短时间内温度达到35.5℃。由前文可知,40℃的热处理对酱曲PPO活性影响不大,20 min后PPO的残存活性是未处理组的89%。因此,根据热酶钝化试验(图3)压致升温对PPO的活性没有显著影响。

### 2.3 HPP处理对酱曲PPO活性的影响

图5为不同HPP处理对酱曲PPO的激活和钝化效果。在较低的压力范围(100~300 MPa),HPP处理能不同程度地激活酱曲PPO的活性,在较高的压力范围(350~500 MPa),HPP处理对酱曲PPO有钝化作用。由图5可知:样品经过100、150、200 MPa的

HPP 处理, PPO 活性随着处理时间的延长呈现先增加后降低的趋势, 分别在第 5、7.5、10 分钟时出现最大值, 为 130%、133%、135%, 而在 20 min 的保压时间处理后, PPO 活性分别回落至 117%、118% 和 119%。当样品经过 250 MPa 和 300 MPa 的 HPP 处理时, 随着处理时间的延长, PPO 活性的增加速率由快变慢, 并逐渐趋于一个最大值 (118%)。而随着处理压力的增加, HPP 对酱曲 PPO 酶活性由激活作用转为钝化作用, 当处理压力为 350、400、450、500 MPa 时, PPO 活性随着处理时间的延长呈现降低的趋势, PPO 酶的钝化速率先快后慢, 在处理时间为 20 min 时, PPO 活性的残存率分别为 79%、70%、68%、66.5%。

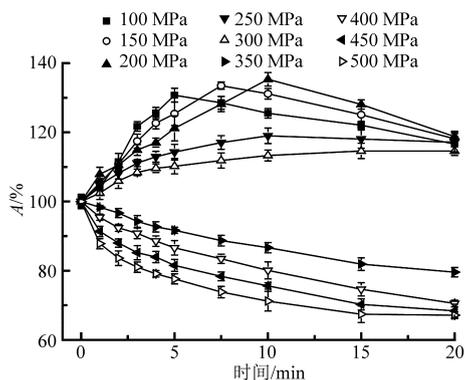


图 5 HPP 处理对酱曲 PPO 活性的影响

Fig. 5 Effect of HPP on activity of koji PPO

PPO 是一种核编码的铜金属酶, 其本质是蛋白质。PPO 的催化特性和耐压性受氨基酸的组成和顺序的影响<sup>[22-23]</sup>。通过上述分析可知, 较低压力的 HPP 处理, 可激活酱曲 PPO 活性。有学者通过试验证实 HPP 激活酶的主要原因为: 低压处理可使酶蛋白发生部分解离, 使酶分子的活性中心暴露率增加, 从而加速了酶促反应速率<sup>[24]</sup>; 酶分子因在体系中受环境的影响, 常以一种复合物状态存在 (前体或抑制态), 而低压处理使酶复合物释放出酶分子, 从而增加了酶的总量, 提高了单位样品中酶的活性<sup>[6]</sup>。

相反, 较高压力的 HPP 处理, 可钝化酱曲 PPO 活性。研究认为, 高压可导致蛋白质三级结构崩溃, 使酶活性中心的氨基酸组成发生改变或丧失活性中心, 从而使酶活性降低<sup>[25-26]</sup>。易建勇等研究了 HPP 对 PPO 的钝化机理, 认为: ①高压处理使 PPO 中二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量降低, 引起天然构象中的氢键结构紊乱, 活性中心的特定构象改变, 使 PPO 的底物键合位点减少或导致底物不能与之结合, 导致 PPO 催化活性下降。②高压处理可致 PPO 致密球状结构变得疏松, 一些包埋于分子内部的氨基酸残基暴露到表面, 分子表面的电负性下降, 蛋白质分子间的斥力降低, 这将引发分子间的聚集, 引发蛋白质

沉淀, 并使部分酶的活性中心掩埋到聚集体内部, 无法接触到周边环境中的底物分子, 从而丧失了催化活性<sup>[9,27]</sup>。

关于 HPP 对 PPO 激活和钝化的研究, 目前国内外已有较多学者进行了相关研究, 本文作者将前人研究结果归纳为 2 类:

第 1 类是 PPO 在较低压力下被激活, 在较高压力时被钝化。韩永斌等、赵光远等分别研究了山药和桃汁 PPO 活性在 HPP 作用下的变化, 结果表明: PPO 在 400 MPa 时有一个峰值, 但其他范围的压力处理对 PPO 活性有不同程度的钝化作用<sup>[28-29]</sup>; Wang 等研究了 HPP 对菠菜 PPO 的影响, 结果表明: 不同压力 (200、400、600 MPa) 的 HPP 处理对 PPO 活性有显著影响, 200 MPa 处理 15 min, PPO 的相对活性增加至 116%, 而其余处理均不同程度地钝化 PPO, 残存率最低约 25%<sup>[30]</sup>; 刘军伟等研究了超高压结合温度处理对紫薯 PPO 活力的影响, 研究发现 500 MPa 的压力处理 10 min, PPO 活性高于自然酶活力<sup>[31]</sup>。

第 2 类是较低和较高压力的 HPP 处理均能使 PPO 钝化。易建勇等研究了 HPP 对蘑菇 PPO 的钝化效果。低于 600 MPa 的压力处理, PPO 活性变化较小, 残存率均大于 88%, 而在 800、1 000、1 200、1 400、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%、0.01%, 表明 800 MPa 以上压力可有效钝化蘑菇 PPO<sup>[9,27]</sup>; 陈小强等测定了 HPP 处理对 PPO 活性的影响, 研究发现 100、300、500 MPa 的 HPP 处理 (10 min) 使得 PPO 相对活性分别降低为 93%、87%、86%<sup>[32]</sup>; 张波波等研究了不同压力和温度处理对草莓汁 PPO 活性的影响, 结果表明不同压力、处理时间、协同温度和间歇次数对 PPO 均有不同程度的钝化效果<sup>[33]</sup>; Falguera 等研究了苹果汁中 PPO 的压变动力学, 结果表明 400、500、600 MPa 的 HPP 处理可钝化苹果汁中大部分 PPO, 使其活性降低至 11.1%~61.5%<sup>[34]</sup>。

虽然上述都是关于 HPP 对 PPO 活性的影响研究, 但结果的差异却较大, 究其原因主要是 PPO 的来源及其所处环境不同<sup>[27,35]</sup>。酶的活性中心主要由结合基团和催化基团组成, 对于大多数酶, 其活性中心内部是非极性的 (或相对非极性), 由氨基酸残基组成的活性中心空间结构被低介电环境所包围, 在一般情况下能排除极性较高的介质分子, 有利于底物分子的特异基团和酶的结合基团之间的偶合作用。反应介质的溶剂特性, 如 pH 值、盐分、糖分等<sup>[36]</sup>, 会影响酶活性中心的微环境, 可改变底物特

异基团与酶活性中心的结合基团之间的偶合过程,从而影响了酶促反应,在表观上体现为酶活性的变化。Weemaes 等报道在较低 pH 值时压力对 PPO 钝化速率加快,而  $\text{CaCl}_2$  和苯甲酸的存在也能增强压力对 PPO 的钝化作用<sup>[37]</sup>。本文虽然控制酱曲的 pH 值(7.3),但盐分、糖分等因素因微生物发酵的差异而难以精准控制,这也是试验结果不一致的主要因素之一。

HPP 对 PPO 的影响是主要通过压力调节酶活性中心的构象而改变酶的活性。随着压力的增加酶活变化一般有 2 种情况:逐步下降;先上升后下降,图形呈钟形,存在一个最适压力<sup>[14]</sup>。图 6 为保压时间分别为 1、5、10、20 min 时压力对酱曲 PPO 活性的影响。在 1 min 和 20 min 时,压力对酶活影响的图形呈现先平缓后下降;而保压时间为 5 min 时,压力对酶活影响呈逐步下降的趋势,但当保压时间为 10 min 时,压力对酶活影响呈钟形,活性先增加而后再下降,200 MPa 为最适压力。

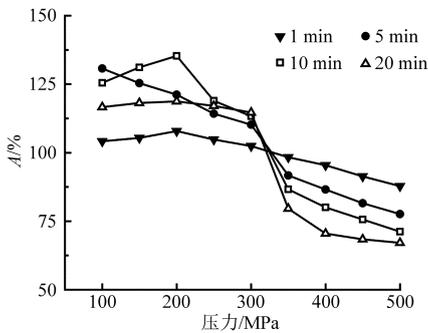


图 6 压力对酱曲 PPO 酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pressure on PPO activity of soybean paste koji

## 2.4 酱曲 PPO 活性的压变动力学分析

近年来,国内外学者研究 HPP 对 PPO 活性的影响,其主要目的之一是拟合 HPP 处理对 PPO 的钝化动力学,寻找钝化 PPO 的最优条件,以提高食品品质并延长保质期。例如,PPO 的活性对果蔬汁的褐变有至关重要的影响,HPP 对 PPO 有效地钝化对防止果蔬汁的褐变,延长产品贮藏期具有重要意义

义<sup>[38-39]</sup>。但研究 PPO 激活动力学报道却较少。

通过动力学分析,低压 HPP 处理(100 ~ 200 MPa)对酱曲 PPO 激活作用符合两段式一级动力学模型,如图 7 所示,PPO 活性随着处理时间的延长而线性增加,但达到一个最大值后开始线性下降。表 1 为应用两段式一级动力学模型拟合 100、150、200 MPa 时的动力学参数( $R^2 \geq 0.970$ )。由表 1 可知: $k_1$  为负值,说明 PPO 活性随着时间的延长而增加, $k_2$  为正值,说明 PPO 活性随着时间的延长而降低;随着压力的增加, $k_1$  的绝对值逐渐不断下降, $k_2$  逐渐增加。

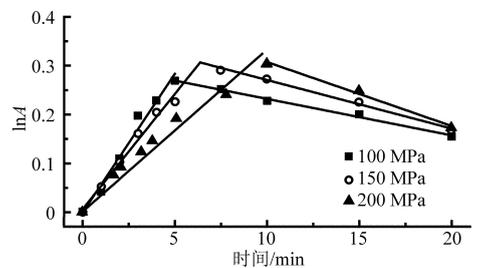


图 7 低压处理对酱曲 PPO 的激活动力学分析

Fig. 7 Activation kinetics of koji PPO at low pressures

中压 HPP 处理(250 MPa 和 300 MPa)对酱曲 PPO 的激活模型符合一级分数转换模型( $R^2 \geq 0.994$ ),动力学参数见表 2。通过分析可知: $a$  值均为负值,表明在 HPP 处理过程中,随着保压时间的延长 PPO 活性不断增加;压力越高, $k$  值越小,PPO 激活速率越小;250 MPa 和 300 MPa 处理时, $A_\infty$  分别为 1.184 和 1.160,说明当处理时间无限延长时,酱曲 PPO 的激活程度最大值分别为 118% 和 116%。

高压 HPP 处理(350 ~ 500 MPa)对酱曲 PPO 钝化作用符合两段式动力学模型与一级动力学模型的混合模型,即: $A = A_s \exp(-k_s t) + A_L \exp(-k_L t) + A_\infty$ ,模型的拟合度  $R^2 \geq 0.995$ ,说明模型的拟合效果较好。表 3 为模型拟合的动力学参数。当 HPP 处理的压力为 350 ~ 500 MPa 时,酱曲 PPO 可分为 3 类:敏感型、稳定型和不可钝化酶( $A_\infty$ )。这与目

表 1 应用一级动力学模型拟合的 HPP 激活 PPO 的动力学参数

Tab. 1 Kinetics parameters for HPP activation of koji PPO

压力/MPa	$k_1/\text{min}^{-1}$	$R_1^2$	$k_2/\text{min}^{-1}$	$R_2^2$
100	$-0.056 \pm 0.002 (t=0 \sim 5 \text{ min})$	0.992	$0.007 0 \pm 0.000 4 (t=5 \sim 20 \text{ min})$	0.991
150	$-0.040 \pm 0.002 (t=0 \sim 7.5 \text{ min})$	0.994	$0.009 8 \pm 0.000 6 (t=7.5 \sim 20 \text{ min})$	0.990
200	$-0.034 \pm 0.002 (t=0 \sim 10 \text{ min})$	0.970	$0.013 0 \pm 0.001 2 (t=10 \sim 20 \text{ min})$	0.985

表 2 应用一级分数转换模型拟合的 HPP 激活 PPO 的动力学参数

Tab. 2 Kinetics parameters for HPP activation of koji PPO

压力/MPa	$k^{-1}/\text{min}$	$A_\infty$	$a$	$R^2$
250	$3.256 \pm 0.119$	$1.184 \pm 0.002$	$-0.186 \pm 0.003$	0.998
300	$5.835 \pm 0.421$	$1.160 \pm 0.004$	$-0.162 \pm 0.004$	0.994

前的研究报道有所不同<sup>[9]</sup>,酱曲 PPO 的不可钝化酶的比例随着处理压力的改变而不同,在 350 ~ 500 MPa 分别为 74%、55.4%、62.8% 和 66.5%。350 MPa 的 HPP 处理过程中,敏感型和稳定型 PPO 比例相同,两者的钝化速率常数也相同,表明在较低的压力下,酱曲 PPO 的敏感型与稳定型区分不明显,也说明了酱曲 PPO 对压力不敏感,而不可钝化

酶的比例较高也侧面证明了这一点。HPP 处理的压力从 400 MPa 增加到 500 MPa 的过程中,敏感型比例逐渐增加(从 4.3% 增加到 8.2%),说明 PPO 对压力的敏感性不断提高,而稳定型同工酶的比例随压力的提高逐渐减小(从 40.3% 减小到 25.3%)。两种酶的钝化速率常数随着压力的不断增加也呈现增加的趋势。

表 3 应用两段式动力学模型与一级动力学混合模型拟合的 HPP 钝化 PPO 的动力学参数

Tab. 3 Kinetics parameters for HPP inactivation of koji PPO using combination of biphasic and fractional conversion model

压力/MPa	$A_L$	$A_S$	$k_L^{-1}/\text{min}$	$k_S^{-1}/\text{min}$	$A_\infty$	$R^2$
350	0.130 ± 0.012 1	0.130 ± 0.012 1	13.003 ± 1.244 6	13.003 ± 1.244 6	0.740 ± 0.077 2	0.995
400	0.043 ± 0.008 1	0.403 ± 0.032 4	1.072 ± 0.320 7	20.416 ± 3.538 8	0.554 ± 0.039 2	0.999
450	0.079 ± 0.011 3	0.293 ± 0.012 6	0.649 ± 0.197 6	11.641 ± 1.861 6	0.628 ± 0.019 3	0.998
500	0.082 ± 0.017 5	0.253 ± 0.013 9	0.374 ± 0.274 5	5.028 ± 0.584 2	0.665 ± 0.006 2	0.997

### 3 结论

(1) 在 100 ~ 500 MPa 的压力范围内,HPP 处理过程中由绝热压缩导致的温度增加最高为 35.5℃,因此压致升温对 PPO 的活性没有显著影响。

(2) 酱曲 PPO 在不同的压力范围进行 HPP 处理时呈现不同的变化特征。100 ~ 200 MPa 的 HPP 处理对酱曲 PPO 有激活作用,随着保压时间延长,PPO 活性先升后降;250 MPa 和 300 MPa 的 HPP 处理对酱曲 PPO 同样有激活作用,随着保压时间的延长,PPO 活性逐渐趋于一个最大值,相对活性为 118%;而 350 ~ 500 MPa 的 HPP 处理对酱曲 PPO 有钝化作用,随着压力和保压时间的延长,HPP 的钝化效果增强,在 500 MPa,保压时间为 20 min 时,PPO

的残存率最低,为 66.5%。

(3) 通过模型拟合,PPO 的钝化动力学在不同压力范围内呈现不同特征。100 ~ 200 MPa 的 HPP 处理对酱曲 PPO 的钝化符合两段式一级动力学模型( $R^2 \geq 0.970$ );250 ~ 300 MPa 的 HPP 处理对酱曲 PPO 的钝化符合一级分数转换模型( $R^2 \geq 0.994$ );而 350 ~ 500 MPa 的 HPP 钝化处理符合两段式动力学模型与一级动力学模型的混合模型( $R^2 \geq 0.995$ )。

(4) 试验证明了 HPP 处理可以不同程度地增加 PPO 活性,酱曲经过 200 MPa 的 HPP 处理 10 min 后,其含有的 PPO 活性增加到 135%,为试验范围内最佳工艺参数。

### 参 考 文 献

- 孙常雁. 自然发酵黄豆酱中主要微生物酶系的形成及作用[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2007.  
Sun Changyan. The formation and function of mainly microbial enzymes in naturally fermented soybean paste[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- 张兰威. 发酵食品工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2011.
- 樊明涛,张文学,葛武鹏,等. 发酵食品工艺学[M]. 北京:科学出版社,2014.
- 徐莹. 发酵食品学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2011.
- Lertsiri S, Phontree K, Thepsingha W, et al. Evidence of enzymatic browning due to laccase-like enzyme during mash fermentation in Thai soybean paste[J]. Food Chemistry, 2003, 80(2): 171 - 176.
- Gomes M, Ledward D. Effect of high pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases[J]. Food Chemistry, 1996, 56(1): 1 - 5.
- 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)
- 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 × ananassa*) [J]. Food Chemistry, 2004, 88(1): 7 - 10.
- 易建勇,姜斌,董鹏,等. 高静压和热处理对蘑菇多酚氧化酶的钝化动力学分析[J]. 农业机械学报,2012,43(9): 136 - 142.  
Yi Jianyong, Jiang Bin, Dong Peng, et al. Effect of high hydrostatic pressure and heat treatment on PPO inactivation and kinetic

- analysis[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(9): 136 - 142. (in Chinese)
- 10 Ko B K, Kim K M, Hong Y S, et al. Metabolomic assessment of fermentative capability of soybean starter treated with high pressure [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(15): 8738 - 8747.
- 11 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.
- 12 Asaka M, Hayaszhu R. Activation of polyphenoloxidase in pear fruits by high pressure treatment [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(9): 2439 - 2440.
- 13 Cano M, Hernandez A, Ancos B. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products [J]. Journal of Food Science, 1997, 62(1): 85 - 88.
- 14 Anese M, Nicolim C, Dall'aglio G, et al. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities [J]. Journal of Food Biochemistry, 1994, 18(4): 285 - 293.
- 15 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 & Emerging Technologies, 2010, 11(1): 52 - 60.
- 16 Rasanayagam V, Balasubramaniam V, Ting E, et al. Compression heating of selected fatty food materials during high pressure processing [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 254 - 259.
- 17 Otero L, Ramos A, De Elvira C, et al. A model to design high-pressure processes towards an uniform temperature distribution [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(4): 1463 - 1470.
- 18 Denys S, Van Loey A M, Hendrickx M E. A modeling approach for evaluating process uniformity during batch high hydrostatic pressure processing: combination of a numerical heat transfer model and enzyme inactivation kinetics [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2000, 1(1): 5 - 19.
- 19 Denys S, Ludikhuyze L R, Van Loey A M, et al. Modeling Conductive heat transfer and process uniformity during batch high-pressure processing of foods [J]. Biotechnology Progress, 2000, 16(1): 92 - 101.
- 20 Otero L, Sanz P D. Modelling heat transfer in high pressure food processing: a review [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2003, 4(2): 121 - 134.
- 21 Ardia A, Knorr D, Heinz V. Adiabatic heat modelling for pressure build-up during high-pressure treatment in liquid-food processing [J]. Food and Bioproducts Processing, 2004, 82(1): 89 - 95.
- 22 Virador V M, Reyes 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, 2009, 58(2): 1189 - 1201.
- 23 Halim D H, Montgomery M. Polyphenol oxidase of d'Anjou pears (*Pyrus communis* L.) [J]. Journal of Food Science, 1978, 43(2): 603 - 608.
- 24 Asaka M, Aoyama Y, Nakanishi R, et al. Purification of a latent form of polyphenoloxidase from La France pear fruit and its pressure-activation [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1994, 58(8): 1486 - 1489.
- 25 Sun N, Song K. Effect of nonthermal treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase [J]. Journal of Food Science, 2003, 68(5): 1639 - 1643.
- 26 Morild E. The theory of pressure effects on enzymes [J]. Advances in Protein Chemistry, 1981, 34: 93 - 166.
- 27 易建勇. 超高压对软包装蘑菇杀菌、钝酶及品质影响的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2012.  
Yi Jianyong. Effects of high hydrostatic pressure on sterilization, enzyme inactivation and related quality of pouched mushroom [D]. Beijing: China Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- 28 韩永斌, 刘桂林, 冯莉, 等. 超高压和酶抑制剂对山药泥中多酚氧化酶活性的影响 [J]. 食品科学, 2005, 26(5): 111 - 115.  
Han Yongbin, Liu Guilin, Feng Li, et al. Effect of high hydrostatic pressure and browning inhibitors on polyphenoloxidase activity in Yam puree [J]. Food Science, 2005, 26(5): 111 - 115. (in Chinese)
- 29 赵光远, 纵伟. 超高压处理对鲜榨桃汁中多酚氧化酶活力影响的研究 [J]. 饮料工业, 2007, 10(3): 24 - 27.  
Zhao Guangyuan, Zong Wei. Research on effect of ultra high pressure treatment on activity of PPO in fresh peach juice [J]. The Beverage Industry, 2007, 10(3): 24 - 27. (in Chinese)
- 30 Wang R, Wang T, Zheng Q, et al. Effects of high hydrostatic pressure on color of spinach puree and related properties [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(7): 1417 - 1423.
- 31 刘军伟, 胡志和. 超高压处理对紫甘薯中多酚氧化酶活力的影响 [J]. 食品科学, 2012, 33(15): 262 - 265.  
Liu Junwei, Hu Zhihe. Effect of ultra high pressure treatment on polyphenol oxidase activity in purple sweet potato [J]. Food Science, 2012, 33(15): 262 - 265. (in Chinese)
- 32 陈小强, 章银军, 张士康, 等. 超高压处理对毛栓菌多酚氧化酶的影响 [J]. 高压物理学报, 2012, 26(2): 235 - 240.  
Chen Xiaoqiang, Zhang Yinjun, Zhang Shikang, et al. Effect of high pressure processing on polyphenol oxidase from *Trametes trogii* [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2012, 26(2): 235 - 240. (in Chinese)
- 33 张波波, 王丹, 马越, 等. 超高压和 UHT 对草莓汁中多酚氧化酶活性的影响 [J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 145 - 148.  
Zhang Bobo, Wang Dan, Ma Yue, et al. Effect of ultra high pressure and ultra high-temperature treatment on polyphenol oxidase activity in strawberry beverage [J]. Food & Machinery, 2014, 30(1): 145 - 148. (in Chinese)
- 34 Falguera V, Gatiús F, Ibarz A, et al. Kinetic and multivariate analysis of polyphenol oxidase inactivation by high pressure and

- temperature processing in apple juices made from six different varieties[J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(9): 2342 – 2352.
- 35 刘建华. 瞬时高压作用对多酚氧化酶活性与构象影响的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2007.  
Liu Jianhua. Study on effect of instantaneous high pressure treatment on conformation of polyphenol oxidase [D]. Nanchang: Nanchang University, 2007. (in Chinese)
- 36 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.
- 37 Weemaes C A, De Cordt S V, Ludikhuyze L R, et al. Influence of pH, benzoic acid, EDTA, and glutathione on the pressure and/or temperature inactivation kinetics of mushroom polyphenol oxidase[J]. Biotechnology Progress, 1997, 13(1): 25 – 32.
- 38 Mújica-Paz H, Valdez-Fragoso A, Samson C T, et al. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods[J]. Food and Bioprocess Technology, 2011, 4(6): 969 – 985.
- 39 Keenan D F, Röbke C, Gormley R, et al. Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies[J]. LWT—Food Science and Technology, 2012, 45(1): 50 – 57.
- 40 胡菲菲, 朱瑞, 杨楠, 等. 胡萝卜汁中大肠杆菌脉冲式超高压杀菌动力学研究[J]. 农业机械学报, 2014, 45(1): 178 – 183, 190.  
Hu Feifei, Zhu Rui, Yang Nan, et al. Pulse mode high-pressure destruction kinetics of *E. coli* in carrot juice[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(1): 178 – 183, 190. (in Chinese)
- 41 朱松明, 苏光明, 王春芳, 等. 水产品超高压加工技术研究与应用[J]. 农业机械学报, 2014, 45(1): 168 – 177.  
Zhu Songming, Su Guangming, Wang Chunfang, et al. Research and application on high-pressure processing of aquatic products [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(1): 168 – 177. (in Chinese)
- 42 刘芳, 甘芝霖, 赵金红, 等. 富士苹果中膜结合态多酚氧化酶分离纯化方法[J]. 农业机械学报, 2015, 46(2): 193 – 197, 246.  
Liu Fang, Gan Zhilin, Zhao Jinhong, et al. Isolation and purification method of membrane-bound polyphenol oxidase in fuji apple [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(2): 193 – 197, 246. (in Chinese)
- 43 罗磊, 周燕燕, 朱文学, 等. 金银花多酚氧化酶特异性与抑制剂动力学研究[J]. 农业机械学报, 2014, 45(7): 202 – 208.  
Luo Lei, Zhou Yanyan, Zhu Wenxue, et al. Specificity and inhibition kinetics of polyphenol oxidase from honeysuckle [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(7): 202 – 208. (in Chinese)

~~~~~

(上接第 151 页)

- 21 周罕觅, 张富仓, 李志军, 等. 桃树需水信号及产量和果实品质对水分的响应研究[J]. 农业机械学报, 2014, 45(12): 171 – 180.  
Zhou Hanmi, Zhang Fucang, Li Zhijun, et al. Response of water demand signal, yield and fruit quality of peach tree to soil moisture[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(12): 171 – 180. (in Chinese)
- 22 Qin W, Chi B, Oenema O. Long-term monitoring of rainfed wheat yield and soil water at the Loess Plateau reveals low water use efficiency[J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e78828.
- 23 Kang S Z, Zhang L, Liang Y L, et al. Effects of limited irrigation on yield and water use efficiency of winter wheat in the Loess Plateau of China[J]. Agricultural Water Management, 2002, 55(3): 203 – 216.
- 24 Geerts S, Raes D, Garcia M, et al. Introducing deficit irrigation to stabilize yields of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [J]. European Journal of Agronomy, 2008, 28(3): 427 – 436.
- 25 Xue Q, Zhu X, Musick J T, et al. Physiological mechanisms contributing to the increased water-use efficiency in winter wheat under deficit irrigation[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(2): 154 – 164.
- 26 Fereres E, Soriano M A. Deficit irrigation for reducing agricultural water use[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(2): 147 – 159.
- 27 Geerts S, Raes D, Garcia M, et al. Could deficit irrigation be a sustainable practice for quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in the Southern Bolivian Altiplano? [J]. Agricultural Water Management, 2008, 95(8): 909 – 917.
- 28 Molden D, Oweis T, Steduto P, et al. Improving agricultural water productivity: between optimism and caution[J]. Agricultural Water Management, 2010, 97(4): 528 – 535.
- 29 申孝军, 孙景生, 张寄阳, 等. 水分调控对麦茬棉产量和水分利用效率的影响[J]. 农业机械学报, 2014, 45(6): 150 – 160.  
Shen Xiaojun, Sun Jingsheng, Zhang Jiyang, et al. Effects of different water treatment on yield and water use of transplanted cotton following wheat harvest[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(6): 150 – 160. (in Chinese)