

文章编号:1673-1689(2008)04-0024-06

声热处理灭酶试验

许韩山¹, 张 愨^{*1}, 孙金才²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 浙江海通食品有限公司, 浙江 慈溪 315300)

摘 要: 研究了声热处理钝化毛豆过氧化物酶。实验条件为: 温度 60~90 ℃、超声波频率 25 kHz、功率 800 W。以在不同温度(60~100 ℃)下热处理过氧化物酶的活性作为对照, 研究超声波协同热力灭酶的机理。响应面分析结果表明: 在 25 kHz、800 W 的超声波、83 ℃ 下处理 1.52 min, 过氧化物酶钝化效果最佳。目前的研究有助于声热作用作为新加工工艺逐渐取代传统热加工处理。

关键词: 过氧化物酶; 超声波; 声热作用; 毛豆

中图分类号: TS 205.9

文献标识码: A

Study on Thermosonication Treatments on Peroxidase Inactivation

XU Han-shan¹, ZHANG Min^{*1}, SUN Jin-cai²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Zhejiang Haitong Food Company, Cixi 315300, China)

Abstract: The effect of high power ultrasound and heat on the activity of peroxidase from edamane in water was studied. The experiment were performed in the temperature range of 60 ℃ to 90 ℃ using power ultrasounds having frequencies of 25 kHz and powers of 800 W. The peroxidase resistances to heat(60~100 ℃), which was as control, and to ultrasound have been studied. The response surface analysis was used for the analyzing by the SAS software. The activity of peroxidase of green soybean after treatment was lower when 800 W ultrasound power was applied for 1.52 min at the medium temperature of 83 ℃. The results presented here will help to evaluate the efficiency of thermosonication as a novel process to replace the classical heat treatment.

Key words: peroxidase; ultrasound; thermosonication; edamane

大多数蔬菜冻结前要进行漂烫处理, 目的是钝化蔬菜中酶的活性, 防止蔬菜在冻藏过程中产生褐变、风味流失、质构破坏等品质劣变现象。蔬菜中含有多种酶, 其中过氧化物酶最耐热, 因此速冻蔬

菜加工中, 常以过氧化物酶的活性是否被钝化作为漂烫是否彻底的衡量指标^[1-3]。

声热处理(超声波辅热处理): 即在一定温度下对食品施加超声波处理^[2,4,6]。超声波频率高于 20

收稿日期: 2007-09-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目(20776062).

作者简介: 许韩山(1982-), 女, 浙江苍南人, 食品科学硕士研究生.

* 通讯作者: 张 愨(1962-), 男, 浙江平湖人, 工学博士, 教授, 博士生导师. 主要从事农副产品加工与贮藏的研究.

Email: min@jiangnan.edu.cn

kHz,是不引起听觉的弹性波。现在普遍认为空化效应、热效应和机械作用是超声技术的三大理论依据^[2-7]。超声波分为两类:一是MHz级的高频低能的诊断用超声波,二是低频高能超声波。超声波辅热处理主要是低频功率超声波,应用于食品的杀菌及钝化酶工艺。超声波在高温下作业,微生物存活率与酶活性易受其空穴效应的影响^[7,9]。

作者主要研究声热处理(超声波辅热处理)钝化酶机理,并找出毛豆仁在超声波辅热作用下的最佳灭酶工艺参数。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

毛豆:采用台湾292品种的白毛毛豆为原料,豆荚饱满,肉质鲜嫩。不得使用有病虫害及受污染的原料。试验所用其它分析试剂均为分析纯。

JY98-3D型超声波细胞破碎仪:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;TDL-60B台式离心机:上海安亭科学仪器厂产品;HH-4型数显恒温水浴锅:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司产品;721型紫外可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品; Φ 1mm铠式热电偶:宁波奥琪自动化仪表设备有限公司产品;温度数字记录仪:浙江联泰仪表有限公司产品;实验室常规玻璃仪器等。

1.2 实验方法

1.2.1 热水漂烫 将新鲜原料放入蒸馏水中漂烫(原料与水质量比=1:10),置于水浴锅,漂烫温度控制在60~100℃。每组实验重复3次。

1.2.2 声热作用 将新鲜原料以原料与蒸馏水质量比=1:30,置于相对隔热的反应容器(超声波作用专用玻璃杯,外壁有3cm厚的棉花隔热层)中处理;温度控制在60~90℃;25kHz的超声波探头离物料距离30~45mm,功率为800W。其中超声波作用时间5s,超声波间歇时间5s,即超声波脉冲值为50%;超声波全程时间为这两部分时间之和。在每组实验中温度由热电偶控制。每组实验重复3次。在较高温度下由于超声波工作时间短,其产生的热量对环境温度影响大概在1~4℃,物料的投入也会使反应温度波动1~3℃。两者恰好抵消。

分别经上述两种处理方式后,立即将原料在冰水中冷却,使毛豆仁中心温度下降至10℃。用普通温度计和热电偶控制温度。

1.2.3 检测方法

1) 酶的提取:取10g原料,在预先冷却后的研

钵内,加10mL 0.1mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.0),以少量石英砂在冰浴中研磨10min,浸泡30min;然后加40mL 0.1mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.0),将过氧化物酶溶出,用4层纱布过滤。在滤液中加入0.5g活性炭脱色,用双层纱布过滤,再用滤纸在低温下过滤^[9-10]。滤液保存于4℃冰箱中备用。

2) POD活性衡量:原料POD的活性是通过测定提取液在430nm处吸光度来衡量。所有POD的活性都是检测3mL反应混合液的活性,其中包括2.6mL 0.1mol/L的磷酸钠缓冲液(pH 6.0),0.2mL质量分数1%的邻苯二胺-乙醇溶液,0.2mL质量分数0.3%的H₂O₂和0.1mL制备酶液,用721型紫外可见分光光度计进行测量^[9-10]。酶活性单位(U)以每克鲜毛豆每分钟0.001吸光度的变化来表示。

$$\text{POD 活性} = \frac{D}{0.001 \times F_w} \times \frac{dA}{dt} \quad (1)$$

式中:A是在430nm下吸光度的变化;t为吸光度变化的时间;D为稀释倍数;F_w为样品鲜重(g)。

1.3 应用动力学原理

酶残余活力(RA)为经处理的原料中过氧化物酶的酶活占鲜毛豆中原过氧化物酶酶活的比例。即:

$$\text{RA} = \text{经处理的 POD 活性} / \text{原 POD}_0 \text{ 活性} \quad (2)$$

过氧化物酶的活性随时间和温度的变化^[10]

$$\text{RA} = e^{-kt} \quad (3)$$

由方程(2)、(3)推导出

$$2.3 \lg(\text{RA}) = -kt \quad (4)$$

其中的k变化趋势基本遵循Arrhenius模型。Arrhenius模型描述温度对反应速度的影响^[2,4,7]。

$$k = k_{\text{ref}} e^{\left[-\frac{E_A}{r} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right]} \quad (5)$$

由于毛豆在声热处理下,过氧化物酶失活表现为双相失活,因此其失活动力学模型由两个方程组成。分别代表两个阶段POD失活动力学模型

$$k_1 = k_{1,\text{ref}} e^{\left[-\frac{E_A}{r} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right]} \quad (6)$$

$$k_2 = k_{2,\text{ref}} e^{\left[-\frac{E_A}{r} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right]} \quad (7)$$

以上各公式中:k为POD活性变化的速率常数;T_{ref}为参考温度,一般是取实验温度范围的中间值;k_{ref}为T_{ref}下POD活性变化的速率常数;k₁为声热处理前一阶段的速率常数;k₂为声热处理后一阶段的速率常数;E_A为POD酶活化能;T为反应温度;r为气体常数8.314。

2 结果与讨论

2.1 热处理对 POD 活性的影响

图1为温度和时间对毛豆中过氧化物酶钝化的影响。过氧化物酶在60~100℃下失活的曲线,POD活性按时间的指数级递减。

过氧化物酶热失活遵循一级衰减过程。上述曲线的 R^2 都在0.92~0.95之间。过氧化物酶是一种热稳定性较强的酶^[8],在60℃下, d_i 大约要31 min, ($R^2=0.957$, $d_i=2.3/k$, d_i 为过氧化物酶RA值为10%的热处理时间)。在100℃的高温下 d_i 值为1.2 min ($R^2=0.949$)。高温短时是一种比较温和的热处理方式,虽然它能使过氧化物酶较快失活,但是它往往会引起失活酶的再生^[10]。

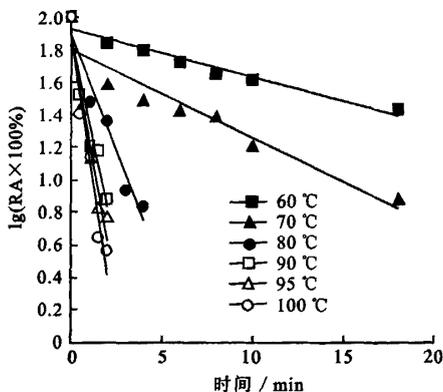


图1 热处理对毛豆过氧化物酶活性的影响

Fig. 1 Peroxidase inactivation by heat at: 60~100℃

根据图1绘POD变化速率常数的对数值与热处理的温度间关系曲线(图2中横坐标温度的单位由℃转换为K),根据曲线得出线性斜率,求 E_A 值。其中 $k_{80℃}=0.659/\text{min}$; $E_A=89.2\text{ kJ/mol}$ 。

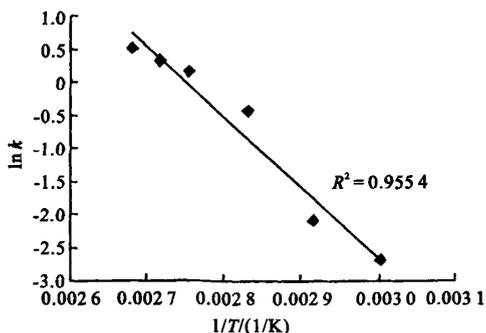


图2 毛豆过氧化物酶热失活的 Arrhenius 方程图

Fig. 2 Arrhenius plot of the inactivation rates of green soybean POD for thermal inactivation

2.2 超声波对 POD 活性的影响

在超声波的处理下过氧化物酶的活性与处理温度的关系见图3。在25℃水温下POD失活的速率很低,声热处理10 min基本上对POD酶活无显著影响。15 min时POD的RA值仍然很高。在25℃的水温下协同超声长时间处理,毛豆在微观上可能会出现植物细胞壁的机械破坏甚至细胞膜、细胞器的外膜损坏,从而改变植物细胞渗透性及细胞的结构。但对毛豆过氧化物酶中结合酶的致失活能力却不强。

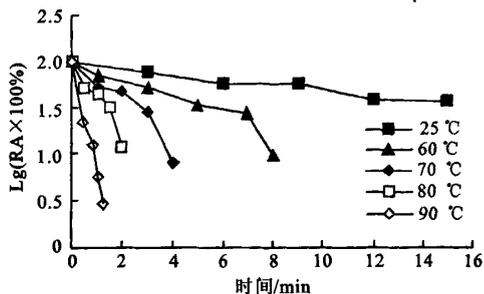


图3 声热处理对毛豆过氧化物酶活性的影响

Fig. 3 Peroxidase inactivation by thermosonication (25 kHz, 800 W) at: 25℃, 60℃~90℃

当水温为60℃以上,随着声热处理中温度的上升,POD酶活钝化效果显著提高。在70~90℃的高温下,POD失活曲线的斜率加大,失活所需的时间短。在90℃,POD的RA值为10%,处理时间为40 s。原因可能是由于在超声波作用下,植物细胞的形态结构及细胞的渗透性的改变,导致过氧化物酶所处环境的pH值等情况的改变,加之过氧化物酶三维结构改变使其热敏感性增强,因此相较于单一的热处理,在超声波的协同作用下即声热处理下,过氧化物酶更易失活。

在超声波和高温作用下,过氧化物酶的钝化不完全遵循单相一级动力衰减(见图1和图3),随着时间的延长过氧化物酶残余活力曲线斜率有一个跳跃变化。毛豆的过氧化物酶在声热处理过程遵循双阶段动力学衰减模式,见图3所示的70℃、80℃和90℃的声能钝化酶活曲线。

主要原因可能是在声热处理下POD酶失活分为两个步骤,在第一阶段由于超声波的作用POD酶分子失去了物理的稳定性但是保存微弱的催化能力;热效应起主导作用,导致酶的失活;处理的时间与媒介的温度成正比。在第二阶段,随着超声波在媒介中传播的时间的延长,其超声波的空化气泡的产生、长大、内爆破产生的瞬间的高压高温,使POD酶的热敏性提高,在高温作用下酶活性中心会

快速失去催化能力,处于失活状态,在后续阶段加速酶的钝化速率。因此声热处理是结合处理,能有效使过氧化物酶失活,降低在热烫过程中使酶失活所需的热处理强度。

根据以上的实验数据,过氧化物酶失活动力学遵循一级动力学这点与已有(López 和 Burgos, 1995)文献所报道的研究相符合。

方程(4)、(5)动力学模型描述毛豆中过氧化物酶在声热处理过程中活性衰减的规律。根据图 3 做 POD 失活速率的对数与声热处理两个阶段的温度的曲线(图 4 和图 5),求得 E_{A1} 和 E_{A2} 分别为 44.65 kJ/mol ($R^2 = 0.925$) 和 112.11 kJ/mol ($R^2 = 0.936$)。

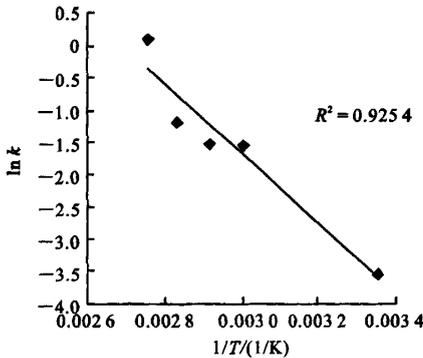


图 4 毛豆过氧化物酶声热失活第一阶段的 Arrhenius 方程图

Fig. 4 Arrhenius plot of the inactivation rates of green soybean for thermal inactivation

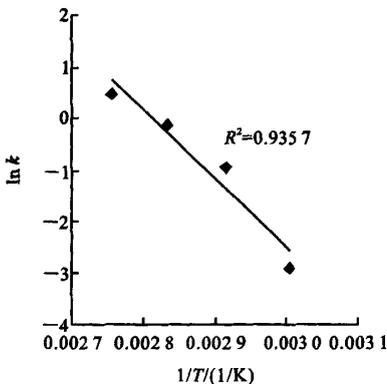


图 5 毛豆过氧化物酶声热失活第二阶段的 Arrhenius 方程图

Fig. 5 Arrhenius plot of the inactivation rates of green soybean POD for thermal inactivation

E_{A2} 增大与超声波产生的瞬间的、局部的高温高压有一定的关系,活化能是自由能与温度确定的值。并且在 POD 酶失活的第二阶段主要对过氧化物

酶酶的耐热部分钝化。在所有的双阶段失活效应中,主要是由于超声波的空穴效应的两种机制:一是由于空化气泡的瞬间爆破产生的超高压、强剪切力和微气流,导致对酶分子的机械破坏;二是由于超声波在水介质中传播产生的自由基。Vercet 等人认为, H^+ 、 OH^{\cdot} 、 HO_2^{\cdot} 等自由基主要是在较低的温度下由高强度的超声波产生。但 POD 在较低温度下酶的钝化效果并不是很理想(如图 3 所示在常温 25 °C 下的钝化曲线),因此认为超声波钝化酶起关键作用为其机械作用,而自由基只是一个辅助作用^[1-2]。

在声热处理的酶的失活第二阶段,由于超声波作用使酶分子的对热敏感性增加,因此在较高的温度下辅助超声波处理比常温下超声波处理时 POD 酶更易失活,如图 3 所示,在较高的温度下如 70 °C、80 °C、90 °C,酶的失活速率较高。

根据图 1 至图 3 的数据得出热处理和声热作用下钝化 90% 的过氧化物酶(残余活力 10%)所需的时间曲线,如图 6 所示。从图 6 曲线趋势得出,与传统热水漂烫相比较,过氧化物酶在高温下稳定性高于在声热作用下的。

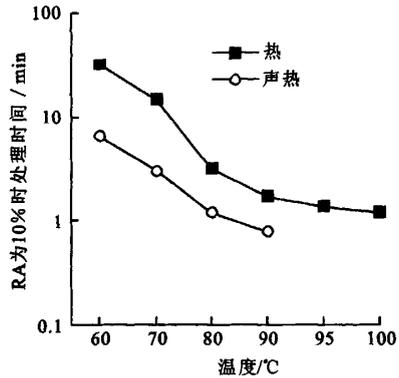


图 6 毛豆过氧化物酶残余活力为 10% 时的时间曲线

Fig. 6 Time-course for 90% Peroxidase inactivation by heat and by thermosonication (25 kHz, 800W) in soybean

2.3 声热作用工艺的优化

研究中应用响应面分析方法^[13],通过中心优化组合设计,选取因素漂烫温度 x_1 为 75、80、85 °C (-1, 0, 1) 和漂烫时间 x_2 为 0.5、1、1.5 min (-1, 0, 1) 作为优化因子,选择速冻果蔬产品保藏中最敏感的因素 POD(过氧化物酶)活性 y 为优化指标,比较在 25 kHz、800 W 的超声波作用下不同的温度、时间条件下毛豆中 POD 酶活的变化,建立在超声波协同热作用下处理时间、处理温度和过氧化物酶酶活的数学回归模型。该中心水平的选择是基于

图 6。其试验设计和结果见表 1。通过 SAS 软件对所得酶活数据进行分析,参数估计和回归分析结果分别见表 2 和表 3,响应面分析结果见图 7。

表 1 中心组合设计及其优化结果

Tab. 1 The design of the central composite experiment and its result

处理	x_1	x_2	y/U
1	1	1	74
2	1	0	168.5
3	1	-1	205.5
4	0	1	127.5
5	0	0	147
6	0	-1	277.5
7	-1	1	243
8	-1	0	300
9	-1	-1	414
10	0	0	116
11	0	0	130

表 2 参数估计表

Tab. 2 Parameter estimates

参数	自由度	参数估计值	标准误差	t 值	$P_r > t $
截距	1	146.078 947	15.919 420	9.18	0.000 3
x_1	1	-84.833 333	12.669 031	-6.70	0.001 1
x_2	1	-75.416 667	12.669 031	-5.95	0.001 9
$x_1 \times x_1$	1	65.552 632	19.497 228	3.36	0.020 1
$x_2 \times x_1$	1	9.875 000	15.516 331	0.64	0.552 5
$x_2 \times x_2$	1	33.802 632	19.497 228	1.73	0.143 5

表 3 二次回归模型的方差分析

Tab. 3 Quadratic regression model analysis of variance

回归	自由度	总平方和	R^2	F 值	$P_r > F$
线性	2	77 306	0.768 7	40.14	0.000 8
平方项	2	18 059	0.179 6	9.38	0.002 03
交互项	1	390.062 5	0.003 9	0.41	0.552 5
总回归	5	95 755	0.952 1	19.89	0.002 6
总误差	5	4 815.13			
总和	10	196 325.19			

由表 2 可知,一次项 x_1 和 x_2 显著。从表 3 的二次回归模型的方差分析结果可以看出,该模型能

较好地解释实验数据的变异性。单因子、因子的平方和交互因子对酶活的影响都极显著,该模型的 $R^2 = 0.952 1$,说明该模型能解释 95.21% 实验数据的变异性。经 F 检验,回归方程一次项的影响是显著的。能很好地预测实际声热作用过程中的 POD 酶活性的变化。

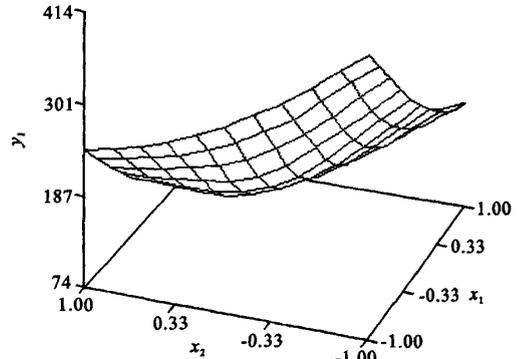


图 7 在超声波作用下温度和时间对 POD 酶活影响的响应面图

Fig. 7 Effect of temperature and time on peroxidase inactivation by response surface plot

由上述实验,利用 SAS 软件中 RSREG 程序对表 1 数据进行处理和回归分析,可得二次拟合回归方程

$$y = 146.079 - 84.833x_1 - 75.417x_2 + 9.875x_1x_2 + 65.533x_1^2 + 33.803x_2^2 \quad (8)$$

对方程求二阶偏导,模型预测在超声波频率为 25 kHz,功率为 800 W,处理温度为 83 °C,时间为 1.52 min 条件下,毛豆 POD 活性处于最低点。酶活为 91 U,其 RA 值为 1.8%。速冻蔬菜经漂烫后,过氧化物酶 RA 值应控制小于 5%。

3 结 语

声热处理作为冷冻前处理能显著地缩短加工时间。在温度为 85 °C 下,热水漂烫灭酶时间大约为 4.5 min,而超声波辅助处理下漂烫温度为 83 °C,漂烫时间为 1.52 min,不仅温度较低且处理时间缩短了。由于处理时间缩短、处理温度相对较低,使毛豆仁的受热程度下降,对提高毛豆仁营养物质保留率及改善细胞质构都有显著影响。本文主要报道在固定超声波工艺参数的前提下,考察处理温度和时间两工艺参数。根据上述响应面分析结果得出:25 kHz,800 W、脉冲模式为 50% 的探头超声波,温度 83 °C,时间 1.52 min,在此条件下,毛豆仁的 POD 活性处于最低点。

参考文献(References):

- [1] Antonio Vercet, Pascual Lopez, Justino Burgos. Free radical production by manothermosonion[J]. *Ultrasonic*, 1998, 36: 615-618.
- [2] Antonio Verceta, Justino Burgosa, Simon Crelier B, et al. Inactivation of proteases and lipases by ultrasound[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2001(2): 139-150.
- [3] Manas P, Munoz B, Sanz D, et al. Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39: 1177-1182.
- [4] Rui M S Cruz, Margarida C Vieira, Cristina L M Silva. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*) [J]. *Journal of Food Engineering*, 2006, 72: 8-15.
- [5] Rui M S Cruz, Margarida C Vieira, Cristina L M Silva. Modeling kinetics of watercress (*Nasturtium officinale*) color changes due to heat and thermosonication treatments[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2007(8): 244-252.
- [6] Berlan J, Mason T J. Dosimetry for power ultrasound and sonochemistry[J]. *Advances in Sonochemistry*, 1996(4): 1.
- [7] Gennaro L De, Cavella S, Romano R, et al. The use of ultrasound in food technology I: inactivation of peroxidase by thermosonication[J]. *Journal of Food Engineering*, 1999, 39: 401-407.
- [8] 王璋. 食品酶学试验讲义[M]. 无锡: 无锡轻工大学, 2000.
- [9] 王璋. 食品酶学 [M]. 无锡: 无锡轻工大学, 2000.
- [10] 周运华, 张慇. 蒲菜热烫的工艺条件[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术), 2004, 23(6): 90-95.
ZHOU Yun-hua, ZHANG Min. The study of heat-treatment condition of typha latifolia L[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry(Food Science and Biotechnology)*, 2004, 23(6): 90-95. (in Chinese)
- [11] 大连轻工学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002.
- [12] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002.
- [13] 何国庆, 刘翔, 单晓敏. 速冻青花菜速冻前处理工艺研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(5): 155-158.
HE Guo-qing, LIU Xiang, SHAN Xiao-min. Pretreatment process of quick-freezing broccoli [J]. *Transactions of the CSAE*, 2005, 21(5): 155-158.

(责任编辑:秦和平,杨萌)