

高压中温协同处理对菠萝汁活性和致敏性的影响

梁娟, 吴泽宇, 潘见*, 葛梅, 徐金凤

(合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要: 为探讨高压协同中温对鲜菠萝汁活性和致敏性的影响,将鲜榨菠萝汁经不同压力组合温度处理后,测定其蛋白质水解活性、纤溶活性和致敏性的变化。结果表明:高压条件下,温度对蛋白质水解活性的影响削弱并变得不显著。400 MPa 组合温度有利于纤溶活性的增加,而 500 MPa 组合温度使纤溶活性降低。致敏性则随着压力和温度的增加下降,500 MPa 和 50 ℃时致敏性降至 51.39%。因此,压力组合中温对蛋白质水解活性、纤溶活性和致敏性影响各不相同,选择合适的温度和压力可以同时实现鲜菠萝汁的保活和减敏。

关键词: 超高压;中温;菠萝汁;活性;致敏性

中图分类号: TS 255.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)08—0849—06

Effect of Combined High Pressure and Thermal Treatment on Activities and Allergenicity of Pineapple Juice

LIANG Juan, WU Zeyu, PAN Jian*, GE Mei, XU Jinfeng

(Engineering Research Centre of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In order to investigate the effect of high pressure combined with moderate temperature on the activity and allergenicity of pineapple juice, after treated by different pressures and temperatures, the proteolytic activity, fibrinolytic activity and allergenicity change of fresh squeezed pineapple juices were detected. The results showed that the effect of temperature on proteolytic activities were weaken and not significant under high pressure. The fibrinolytic activities increased under 400 MPa treatment combined with different temperatures, while decreased under 500 MPa treatment combined with a series of temperatures. Allergenicity decreased with the increase of pressure and temperature, and fell to 51.39% at 500 MPa and 50 ℃. Therefore, the effect of high pressure combined with moderate temperature on proteolytic activity, fibrinolytic activity and allergenicity was different. Preserving activity and reducing allergenicity of pineapple juice could be achieved simultaneously with the selection of appropriate temperature and pressure.

Keyword: ultra-high pressure, moderate temperature, pineapple juice, activity, allergenicity

收稿日期: 2015-06-11

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1708085QC77)。

* 通信作者: 潘见(1955—),男,安徽合肥人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事功能食品研究。E-mail: hfut20022013@sina.com

引用本文: 梁娟,吴泽宇,潘见,等. 高压中温协同处理对菠萝汁活性和致敏性的影响[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(08):849-854.

菠萝(*Ananas comosus* L.Merr)属于凤梨科多年生植物,是热带和亚热带地区的主要水果品种,我国菠萝产量居世界第四位^[1]。菠萝中除含有丰富的营养成分,还含有一种蛋白水解酶菠萝蛋白酶(bromelain, EC 3.4.22.3)^[2]。菠萝蛋白酶具有抗血小板聚集、溶解纤维蛋白、抗炎、抑制癌细胞生长和转移及清创等功能等,被广泛应用于食品和医药行业^[3-6]。除此之外,菠萝蛋白酶也是一种常见的水果的过敏原,国内学者报道了很多由菠萝蛋白酶引起的菠萝过敏的案例,菠萝过敏尤其容易出现在婴幼儿以及其他免疫力较弱的人群^[7-8]。

菠萝汁是果汁市场上仅次于橙汁的大宗果汁^[9]。传统的热杀菌不仅会破坏菠萝汁的风味和营养,也会完全钝化菠萝汁中的主要生物活性成分菠萝蛋白酶^[10-11]。超高压杀菌可以避免热杀菌带来的上述问题,最大程度的保留其风味、营养和菠萝蛋白酶的活性^[12-13],但同时也会部分残留了致敏性。通过研究高压协同中温处理对菠萝汁活性和致敏性影响,总结超高压条件下菠萝汁活性和致敏性的变化规律,可以为高活性低致敏性功能菠萝汁的开发提供相关的理论与数据支持。

商业菠萝蛋白酶的活性是通过其对不同底物如酪蛋白、明胶等的蛋白质水解活性来进行表征的。而菠萝蛋白酶的某些活性如菠萝蛋白酶抑制癌细胞的生长、转移及其清创作用主要与纤溶活性有关^[5-6]。抗血小板聚集和纤维蛋白溶解也是基于菠萝蛋白酶的纤溶活性^[14-15]。因此本文作者在考察菠萝汁的致敏性的同时,以超高压菠萝汁的酪蛋白水解活性和纤溶活性 2 个指标来评价菠萝汁的功能活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 菠萝:购自合肥市周谷堆农产品批发市场;低相对分子质量标准蛋白质:购自美国 Thermo Fisher 公司;牛纤维蛋白原、凝血酶(酶活力 62 U/mg)和 4-氯-1-萘酚:购自 Sigma 公司;尿激酶(酶活力 1240 U/支):购自中国食品药品检定研究院;福林酚试剂:购自索莱宝科技有限公司;致敏者血清:取自安徽医科大学;羊抗人 IgE:购于美国 Abcam 公司;ELISA 盒:购于美国 Costa 公司;PVDF 膜:购自美国 Pall corporation 公司;超滤离心管:购于美国 Millipore 公司;其余试剂购于上海生工和国

药集团。

1.1.2 仪器 1 L 超高压釜:包头科发科技有限公司产品;超高压系统:上海大隆超高压设备厂制造;3K15 高速冷冻离心机:德国 SIGMA 公司产品;Thermo TSE320 低温冰箱:美国 Thermo 公司产品;Epoch 微孔板分光光度计:美国 BioTek 公司产品;DZ-400/2S 真空包装机:浙江金华市包装机械有限公司产品;SHP-250 恒温培养箱:上海精宏实验设备有限公司产品。Epoch 微孔板分光光度计:美国 BioTek 公司产品;JASCO J-810 圆二色光谱仪:日本 JASCO 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 试样的处理 选择新鲜的 8 成熟的菠萝,去皮去目,将果肉破碎成小块榨汁,用 6 层纱布过滤,除去纤维和其他杂质。然后 4 000 r/min 于 4 ℃离心 30 min 去除大分子杂质。保留上清液,弃去沉淀。

用于酪蛋白水解活性和纤溶活性检测的样品,取离心的上清液分装于无菌 PE 瓶中,PE 瓶用密封袋密封,密封袋中充满水以排除空气。然后至于 1 L 的高压容器中加压。用于致敏性测定的样品,取离心后的菠萝汁缓慢加入硫酸铵粉末提取致敏蛋白质,边加边搅拌,直至加到饱和度为 40%后停止,继续搅拌 2 h 后,放入离心管中,6 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,沉淀用双蒸水复溶,然后用超滤离心管脱盐和定量复溶,最后调节 pH 和添加不同含量的 NaCl。所有提取和分离步骤均在 4 ℃条件下进行,处理好的所有样品于 -20 ℃贮存备用。

1.2.2 蛋白质水解活性测定 蛋白质水解活性采用 Forlin-酚法测定,参照蛋白酶活力测定法商业标准 SB/T10317-1999^[16]。蛋白质水解活力计算方法为:每 mL 菠萝汁在 40 ℃下每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸,定义为 1 个蛋白酶活力单位。

样品蛋白酶活力单位(U/g)= $A/10 \times 4 \times N$ (1)
式中: A 为样品平行试验的平均吸光度;4 为反应试剂的总体积, mL;10 为反应时间 10 min; N 为稀释倍数。

相对蛋白质水解活性如式(2),

$$\text{相对蛋白质水解活性} = \frac{M_1}{M_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中, M_1 为待测样品的蛋白质水解活性; M_2 为对照品的蛋白质水解活性。

1.2.3 纤溶活性测定 参考 Astrup T^[17]等采用的纤

纤维素平板法测定菠萝汁的纤溶活性,并根据本实验情况适当改变了凝血酶和纤维蛋白原的比例。以尿激酶为标准品,以尿激酶活力单位数 $C(\text{U/mL})$ 的对数 $\log C$ 为横坐标,裂解圈的面积 $A(\text{mm}^2)$ 的对数值 $\log A$ 为纵坐标,绘制标准曲线。测定样品时取待测样品 $10\ \mu\text{L}$ 点样于纤维蛋白平板样孔中,按上述方法进行的操作,测定裂解圈的直径后取平均值,根据尿激酶标准曲线求出样品的纤溶活性。每个样品做 3 个平行。

$$\text{相对纤溶活性} = \frac{M_3}{M_4} \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中, M_3 为待测样的纤溶活性; M_4 为对照样的纤溶活性。

1.2.4 致敏性测定 采用间接酶联免疫法。包被:每孔包被 $100\ \mu\text{L}$ 抗原稀释液, $4\ ^\circ\text{C}$ 放置过夜或者 $37\ ^\circ\text{C}$ 保温 $2\ \text{h}$ 。用 $200\ \mu\text{L}$ PBST 洗涤液洗涤 3 次,每次 $5\ \text{min}$ 。封闭:每孔加入封闭液 $200\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 $2\ \text{h}$,倒出封闭液。加一抗:每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 致敏者血清(1:200), $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 $1\ \text{h}$,洗涤 3 次,每次 $5\ \text{min}$ 。加酶标二抗:每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgE(1:2 000), $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 $1\ \text{h}$ 。洗涤 5 次,每次 $5\ \text{min}$ 。显色:取出酶标板,每孔加入底物液 TBS $200\ \mu\text{L}$,置于室温黑暗处放置 $15\ \text{min}$ 。终止:取出酶标板,向每孔中加入终止液 $50\ \mu\text{L}$ 。用酶标仪在 $450\ \text{nm}$ 的吸光度下检测。

$$\text{相对致敏性} = \frac{\text{待测样抗原浓度}}{\text{对照样抗原浓度}} \times 100\% \quad (4)$$

1.2.5 不同影响因素的选择 实验所用菠萝汁的天然 pH 值为 pH 3.65,超高压处理保压时间均设为 $20\ \text{min}$,常压下选择 $10, 20, 30, 40, 50, 60, 70\ ^\circ\text{C}$ 7 个不同温度, $400\ \text{MPa}$ 和 $500\ \text{MPa}$ 压力条件下 $10, 20, 30, 40, 50\ ^\circ\text{C}$ 5 个温度。每个实验平行测定 3 次,以未经超高压处理菠萝汁的蛋白质水解活性、纤溶活性和致敏性作为参照,相对值定义为 100%。考察超高压组合温度对菠萝汁的蛋白质水解活性,纤溶活性和致敏性的影响时,选择温度范围是 $10\sim 50\ ^\circ\text{C}$,主要是考虑到温度高于 $50\ ^\circ\text{C}$ 时,会影响菠萝汁的风味和香气成分^[18-19]。超高压选择 $400\ \text{MPa}$ 和 $500\ \text{MPa}$ 的主要原因是 2 个,首先超高压用于果汁杀菌一般选择 $400\ \text{MPa}$ 或者以上,其次根据之前的研究结果, $400\ \text{MPa}$ 压力以上时,菠萝汁活性和致敏性的差异较大且致敏性下降速度较快,有利于同时实现

菠萝汁的保活和减敏。

1.2.6 数据处理 采用 EXCEL2007 和 Design-expert 8.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 高压中温协同对蛋白质水解活性的影响

根据蛋白质水解活性标准曲线,菠萝汁原样的蛋白质水解活性为 $(74.67 \pm 2.66)\ \text{U/mL}$,其相对值定义为 100%。图 1 显示了常压、 $400\ \text{MPa}$ 和 $500\ \text{MPa}$ 的压力下不同温度对蛋白质水解活性的影响。从该图可以看出,常压下,相对蛋白质水解活性随温度的升高先增加后降低,并于 $50\ ^\circ\text{C}$ 时达到最大值 112.59% 。这与文献报道的菠萝蛋白酶的最适酶活为 $55\ ^\circ\text{C}$ 基本一致^[20]。当温度高于酶的最适温度范围时,温度升高,酶蛋白的氢键、疏水作用、离子键和静电相互作用会弱化,三维构象受到破坏,酶出现热失活,使得酶活力降低甚至完全钝化。常压下,温度对蛋白质水解活性的影响显著($p < 0.05$)。

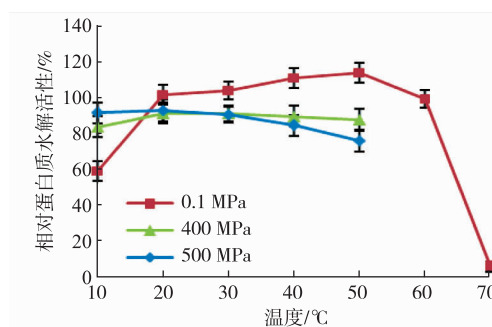


图 1 压力协同不同温度对蛋白质水解活性的影响

Fig. 1 Effects of high pressure combined with temperature on proteolytic activity of pineapple juice

$400\ \text{MPa}$, $10\sim 50\ ^\circ\text{C}$ 时,蛋白质水解活性变化不明显, $500\ \text{MPa}$, $10\sim 50\ ^\circ\text{C}$,蛋白质水解活性随压力的略有降低。另外,高压条件下温度较低时(如 $10\ ^\circ\text{C}$),高压能够增加菠萝蛋白酶的活性。这与 Sun 等^[21]认为的在一定温度范围内,温度恒定时提高压力将导致分子有序性的形成相符合。

数据分析显示压力组合中温对蛋白质水解活性的影响不显著($p > 0.05$)且压力和温度之间存在交互作用($p < 0.05$)。Fang^[22]等研究高压协同中温对过氧化物酶活力的影响时也发现了类似的结果。以上分析说明超高压减弱了温度对蛋白质水解活性的影响,使得二者的组合效应对蛋白质水解活性的影

响不明显不显著。

2.2 高压中温协同对纤溶活性的影响

根据纤溶活性标准曲线,菠萝汁原样纤溶活性为 (247.88 ± 13.21) U/mL,其相对值定义为 100%。从图 2 可以看出常压下,菠萝汁的相对纤溶活性和相对蛋白质水解活性曲线的变化趋势相似,这和 Morita^[23]等认为的菠萝蛋白酶纤溶活性和蛋白水解活性有关的研究结果相似;但温度对二者的影响程度不同,纤溶活性受温度的影响更大,50 ℃时相对纤溶活性达到最高值 121.33%。常压下,温度对菠萝汁纤溶活性的影响显著($p < 0.05$)。

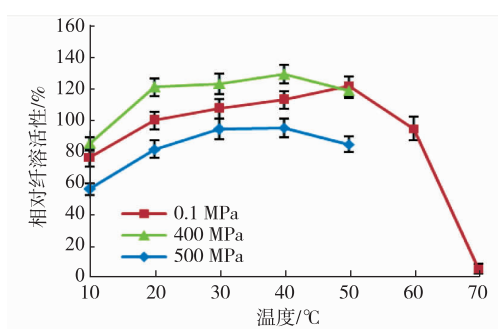


图 2 压力协同不同温度对纤溶活性的影响

Fig. 2 Effects of high pressure combined with temperature on fibrinolytic activity of pineapple juice

超高压组合温度对纤溶活性的影响则不同于对蛋白水解活性的影响。400 MPa、20~50 ℃条件下,纤溶活性几乎是无差别的;500 MPa、10~40 ℃之间纤溶活性随着温度上升而上升,50 ℃时略有下降。400 MPa 组合温度有利于纤溶活性的增加,而 500 MPa 组合温度使得纤溶活性低于常压下的值。50 ℃,400 MPa 和 500 MPa 条件下的纤溶活性分别为 118.63%和 84.57%。400 MPa 时纤溶活性增强,可能是由于该压力促使菠萝蛋白酶的结构微调,从而形成更有利于酶与其纤溶活性底物相结合的构型。而更高的压力(如 500 MPa)则会破坏菠萝蛋白酶的高级结构,从而使酶的活性降低。张瑜^[24]等通过对脂肪酶活性的研究发现,压力和温度对酶分子排列和空间构象存在拮抗关系,认为不同加工条件下,加压或升温对酶的影响不同。低温低压,适度地增加温度和压力都能使酶保持其稳定性;高温高压,温度和压力任一增加都会破坏酶的稳定;低温高压,增加压力使酶变性,增加温度能够稳定酶活,

高温低压作用相反。Eisenmenger 等^[25]报道了具有类似变化曲线的食品酶还有胰凝乳蛋白酶、多酚氧化酶、果胶甲酯酶、柚苷酶、 β -葡聚糖酶、淀粉酶等。数据分析显示超高压组合温度对纤溶活性的影响显著($p < 0.05$)且压力和温度对纤溶活性的影响具有交互作用($p < 0.05$)。

2.3 高压中温协同对致敏性的影响

根据致敏性检测方法标准曲线,菠萝汁原样的致敏原质量浓度为 (0.955 ± 0.043) mg/mL,相对值定义为 100%。从图 3 可以看出常压下,与蛋白质水解活性和纤溶活性在 50 ℃时最高不同,致敏性在 20 ℃时达到最大值。常压下温度对致敏性的影响显著($p < 0.05$)。

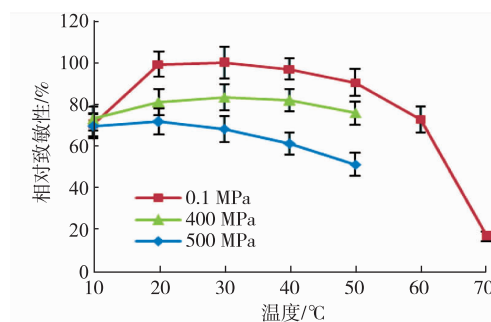


图 3 压力协同不同温度对致敏性的影响

Fig. 3 Effects of high pressure combined with temperature on allergenicity of pineapple juice

不同压力组合温度使得致敏性均低于常压下的值,但 400 MPa 时,致敏性曲线变化较平缓,500 MPa 时随着温度增加的致敏性下降速率加快,500 MPa 和 50 ℃时,相对致敏性降至 51.39%。说明在较高温度和较高压力时有利于致敏性的降低。数据分析显示常压下温度对致敏性的影响显著($p < 0.05$)。400 MPa 时温度对致敏性影响不显著($p > 0.05$),500 MPa 时温度对致敏性影响显著($p < 0.05$),压力组合温度对致敏性的影响具有交互作用($p < 0.05$)。

比较图 1—图 3 可以看出,超高压条件下,温度对蛋白质水解活性和致敏性的影响相似,这和 Hale 等^[26]等发现的菠萝蛋白酶和其他半胱氨酸蛋白酶的蛋白质水解活性和致敏性有一定的关系,并发现钝化菠萝蛋白酶可以降低其致敏性的研究结果相似。但超高压对致敏性的影响程度更大。500 MPa 时,蛋白质水解活性和致敏性均随着温度的升高而降低,致敏性下降速率更快;在 500 MPa、50 ℃时蛋白质

水解活性降至 75.10%,而致敏性则降至 51.39%。超高压组合中温对纤溶活性的影响则不同,400 MPa 组合中温可以提高纤溶活性,500 MPa 组合中温则使纤溶活性降低。

引起菠萝蛋白酶蛋白水解活性、纤溶活性和致敏性变化的均是菠萝蛋白酶,但是压力组合中温对三者的影响的不同。这可能是由于菠萝蛋白酶对三者的作用机制不同。蛋白质水解活性的作用目标物是酪蛋白,纤溶活性是同时直接降解纤溶蛋白和把血纤维蛋白溶酶原转化成溶纤维蛋白酵素来降解纤维蛋白^[27]。而菠萝蛋白酶的致敏性则是由抗原表位决定的,但关于菠萝蛋白酶致敏性的抗原表位和作用机制的研究目前并未见相关报道。除此之外,菠萝蛋白酶的活性位点和抗原表位也可能受到基质组成的影响而表现出各自的变化特征。方亮^[28]研究发现猕猴桃汁中的过氧化物酶在不同缓冲溶液和真实的食品体系中表现出不同的活性,Basak^[29]和 Rastogi^[30]认为由于不同的食品具有不同的 pH 值和化学组成成分,同种酶自不同食品基质中所表现的耐压特性有不同。对于本研究来说,我们主要是考察超高压菠萝汁的特性,而非单纯的菠萝蛋白酶溶液,超高压菠萝汁是一个具有复杂基质的体系。

3 结 语

常压下温度对蛋白质水解活性影响显著,50 ℃ 时蛋白质水解活性达到最大值;超高压能减弱温度对蛋白质水解活性的影响,使高压下条件温度对蛋白质水解活性的影响不显著,400 MPa 时,蛋白质水解活性几乎无变化,500 MPa 时,蛋白质水解活性随温度的增加略有降低。

常压下菠萝汁的纤溶活性和蛋白质水解活性的变化趋势相似,但温度对纤溶活性的影响程度更大。400 MPa、20~50 ℃ 时,纤溶活性几乎是无差别的;500 MPa、10~40 ℃ 之间纤溶活性随着温度上升而上升,50 ℃ 时略有下降。且 400 MPa 组合温度有利于纤溶活性的增加,而 500 MPa 组合温度则使纤溶活性降低。50 ℃、400 MPa 和 500 MPa 条件下的纤溶活性分别为 118.63% 和 84.57%。

常压下致敏性于 20 ℃ 时达到最大值;高压条件下,随着压力和加压温度的增加致敏性逐渐下降,500 MPa、50 ℃ 时降至 51.39%。

综上,压力组合中温对蛋白质水解活性、纤溶活性和致敏性影响各不相同,选择合适的温度和压力可以同时实现鲜菠萝汁的保活和减敏。

参考文献:

- [1] LIU Haiqing, LI Guanghui, HUANG Yuanyuan. Development situation of pineapple industry in China in 2011 [J]. **Chinese Journal of Tropical Agricultural**, 2012, 32(3): 79-84. (in Chinese)
- [2] 波莱纳. 工业酶: 结构、功能与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 148-160.
- [3] KULPREET B, SAHDEO P, JASMINE G, et al. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway [J]. **Cancer Letter**, 2009, 282(2): 167-176.
- [4] CHEN Xiaoli, HUANG Zhuolie. Purification of stem bromelain and mechanism of effect of ultrasound on its catalysis activity[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(5): 173-178. (in Chinese)
- [5] TAUSSIG S J, SZEKERECZES J, BATKIN S. Inhibition of tumour growth in vitro by bromelain, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosus*) [J]. **Planta Medica**, 1985, 51(6): 538-539.
- [6] 阎隆飞, 梁鸿秋. 菠萝蛋白酶脱酶制剂及其制备方法: 中国, CN94116530.2[P]. 1996-9-18.
- [7] LIU Xiangping, ZENG Dongliang, LIN Jitao. In vitro test and analysis of allergen of the children [J]. **Practical Clinical Medicine**, 2006, 7(3): 139-141. (in Chinese)
- [8] 邵明军, 刘传合, 沙莉, 等. 北京城区 0-14 岁儿童食物过敏患病率调查: 中华医学会第十三届全国儿科呼吸学术会议论文汇编[C]. 南昌: 中华医学会, 2012: 152.
- [9] JAMES K B, TIEN N Q. Manganese in pineapple juices[J]. **Food Chemistry**, 2000, 68: 37-39.
- [10] MOSQUEDA M J, RAYBAUDI M R M, MARTIN B O. Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices [J]. **Food Microbiology**, 2008, 25(3): 479-491.

- [11] BHATTACHARYA R, BHATTACHARYA D. Preservation of natural stability of fruit “bromelain” from *Ananas comosus* (pineapple)[J]. **Journal of Food Biochemistry**, 2009, 33(1): 1-19.
- [12] HENDRICKX M, KNORR D. Ultra high pressure treatment of foods[M]. **Frederick: Kluwer Academic**, 2002.
- [13] BUTZ P, FERNANDEZ G A, LINDAUER R, et al. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products[J]. **Journal of Food Engineering**, 2003, 56: 233-236.
- [14] BHATTACHARYA B K. Bromelain: an overview[J]. **Natural Product Radiance**, 2008, 7(4): 359-363.
- [15] KELLY G S. Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications [J]. **Alternative Medicine Review**, 1996, 1(4): 243-257.
- [16] 中华人民共和国国家标准. SB/T 10317-1999 蛋白酶活力测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [17] ASTRUP T, MULLERTZ S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity [J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1952, 40(2): 346-351.
- [18] RATTANATHANALERK M, CHIEWCHAN N, SRICHUMPOUNG W. Effect of thermal processing on the quality loss of pineapple juice[J]. **Journal of Food Engineering**, 2005, 66: 259-265.
- [19] RUNGTIP J, SANGUANSRI C. Effect of temperature on the stability of fruit bromelain from smooth cayenne pineapple[J]. **Kasetsart J(Nat Sci)**, 2010, 44: 943-948.
- [20] 马超. 菠萝蛋白酶提取、分离纯化及稳定性研究[D]. 山东: 山东农业大学, 2009.
- [21] SUN M M C, CLARK D S. Pressure effects on activity and stability of hyperthermophilic enzymes[J]. **Methods in Enzymology**, 2001, 334: 316-327.
- [22] FANG L, JIANG B, ZHANG T. Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase [J]. **Food Chemistry**, 2008, 109: 802-807.
- [23] MORITA A H, UCHIDA D A, TAUSSIG S J. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain[J]. **Alternative Medicine Review**, 1979, 239: 340-350.
- [24] ZHANG Yu, MIAO Ming, JIANG Bo, et al. The effects of ultra high pressure on the activity and conformation of lipase [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2012, 5(3): 130-135. (in Chinese)
- [25] 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.
- [26] HALE L P, FITZHUGH D J, STAATS H F. Oral immunogenicity of the plant proteinase bromelain [J]. **International Immunopharmacology**, 2006, 6: 2038-2046.
- [27] TAUSSIG S J, BATKIN S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 1988, 22(2): 191-203.
- [28] 方亮. 超高压处理对猕猴桃果汁杀菌钝酶效果和品质的影响[D]. 无锡: 江南大学 食品学院, 2008.
- [29] 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.
- [30] RASTOGI N K, ESHTIAGHI M N, KNORR D. Effect of combined high pressure and heat treatment on the reduction of peroxidase and polyphenoloxidase activity in red grapes[J]. **Food Biotechnology**, 1999, 2(13): 195-208.