

高压二氧化碳 对鲜榨梨汁贮藏稳定性的影响研究

廖红梅¹, 丁占生¹, 钟葵^{2,*}, 赵俊杰³, 廖小军⁴

(1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193;
3.总后勤部军需军事代表局, 北京 100071; 4.国家果蔬加工工程技术研究中心, 北京 100083)

摘要:研究了高压二氧化碳(HPCD)对梨汁中多酚氧化酶(PPO)酶活钝化效果、透明度、色泽和褐变度的影响,并分析贮藏期酶活、透明度和色泽稳定性。结果表明,经 HPCD(30MPa-40℃-60min)处理后梨汁中 PPO 残存酶活为 19%;其钝酶效果显著高于相同温度的热处理($p < 0.05$),说明 HPCD 钝酶过程中温度和 CO₂ 形成的压力具有协同灭酶作用;且在 4℃ 条件下贮藏 8 周也能较好抑制 PPO 酶活。HPCD 处理能抑制贮藏期梨汁透光率降低和梨汁酶促褐变、保持鲜榨梨汁的色泽,对保持鲜榨梨汁品质贮藏稳定性有较好效果。90℃-10min 热处理也能有效钝化 PPO 酶活,但是在高温加热过程中促进非酶褐变,并且使梨汁透光率下降,增大梨汁浊度,对梨汁品质保持不利。

关键词:高压二氧化碳,梨汁,贮藏稳定性,多酚氧化酶,色泽

Study on effect of high pressure carbon dioxide on storage stability of fresh pear juice

LIAO Hong-mei¹, DING Zhan-sheng¹, ZHONG Kui^{2,*}, ZHAO Jun-jie³, LIAO Xiao-jun⁴

(1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2.Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
3.The Quartermaster Delegate Bureau of the General Logistics Department of the PLA, Beijing 100071, China;
4.National Fruit and Vegetable Processing Technology Center, Beijing 100083, China)

Abstract: The effect of high pressure carbon dioxide (HPCD) on polyphenoloxidase (PPO) activity, light transmission rate, color, browning degree of fresh pear juice were investigated, its storage stability was also analyzed. The result showed that the residual PPO activity was 19% as exposed to HPCD (30MPa-40℃ for 60min), which was much lower than that as exposed to thermal treatment at 40℃ for 60min, indicating that there was positive synergistic effect of temperature and pressure come from CO₂ during inactivation of enzyme by HPCD. The PPO activity was stable during storage at 4℃ for 8 weeks. HPCD inhibited reduction of light transmission rate and browning, maintained excellent color, and obtained excellent quality during storage at 4℃ for 8 weeks. The PPO was also inactivated by thermal treatment at 90℃ for 10min effectively. Though nonenzymic browning was facilitated, light transmission rate was decreased, turbidity was accelerated by high temperature treatment, it was unfavourable for maintaining good quality of pear juice.

Key words: high pressure carbon dioxide; pear juice; storage stability; polyphenoloxidase; color

中图分类号: TS255.44 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2013)23-0131-04

高压二氧化碳(High pressure carbon dioxide, HPCD)技术是一项具有极大潜力的新型杀菌技术。该技术主要利用 50MPa 以下、温度在 5~60℃ 之间的包括亚临界和超临界 CO₂ 达到杀菌钝酶、并保持食品良好风味、色泽和营养物质的目的。在前人的综述中已表明其杀菌效果可以达到降低 12 个对数^[1],表明该技术应用到商业化生产将带来巨大潜力。已有研究将该技术应用到食品的杀菌、灭酶和保持新

鲜品质,主要针对各种果蔬汁(橙汁、葡萄汁、苹果汁、荔枝汁)和牛奶^[2-5]。例如, Liao 等^[6]采用间歇式 HPCD 处理系统对苹果浊汁中大肠杆菌进行杀菌,在 30MPa, 42℃ 下处理 75min 能使其中大肠杆菌降低 7.6 个对数,达到完全灭菌。Werner 等^[5]报道采用连续式 HPCD 处理系统在 30℃、20.7MPa 处理 10min 使原料乳中的细菌总数降低 3.8 个对数。本课题组在前期实验中将 HPCD 应用到鲜榨苹果汁的杀菌,并观察了贮藏期间微生物生长状态。结果表明,在 20MPa 下处理 30min,当处理温度达到 52℃ 时苹果浊汁中细菌能够达到完全灭菌,对于霉菌和酵母则在 42℃ 时达到完全灭菌^[7]。鲜榨梨汁营养丰富,因而也容易引起腐败变质;由于其中含有丰富还原糖和多酚氧化酶(Polyphenoloxidase, PPO),容易引起褐变,导致

收稿日期:2013-05-15 * 通讯联系人

作者简介:廖红梅(1983-),女,博士,讲师,主要从事食品非热加工技术方面研究。

基金项目:国家自然科学基金项目(31101360);中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP21125);江苏高校优势学科建设工程资助项目。

色泽败坏。热杀菌对于风味物质含量高的热敏性食品如梨汁等,热处理后其风味、色泽会受到不良影响,例如色泽褐变、产生蒸煮味等^[8]。基于前期研究中得到结果,即在 30MPa、40℃ 下处理 60min,梨汁中细菌菌落总数的残存率最大降低了 2.66 个对数^[9]。本文以鲜榨梨汁为原料,研究在该条件下 HPCD 对梨汁中 PPO 酶活、透明度、色泽和褐变度的影响,并分析其稳定性。并设置 40℃ 热处理 60min、以及 90℃ 高温热处理 10min 对照,以阐明 HPCD 处理效果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鸭梨 市售新鲜鸭梨;邻苯二酚、磷酸、磷酸钠均为分析纯 购于北京化学试剂公司。

高压二氧化碳装置 江苏华安科研仪器有限公司;TGL-16G 型高速台式离心机 上海安亭科学仪器有限公司;722 型分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;SC-280C 型色差仪 上海实验仪器总厂。

1.2 实验方法

1.2.1 梨汁的制取 采用李思越等的方法^[10]。新鲜鸭梨,清水清洗表皮、切成 1cm³ 小块,立即用 0.3% 抗坏血酸护色液浸泡并榨汁,随后采用四层纱布(相当于 200 目绢布)过滤。取得梨汁混匀后于 4℃ 冷藏备用,冷藏时间不超过 8h。

1.2.2 高压二氧化碳、热处理梨汁 取出在 4℃ 冷藏的鲜榨梨汁(初始细菌菌落总数为 10² ~ 10³ CFU/mL),在无菌操作台中无菌操作量取 25mL 梨汁于已灭菌的 50mL 塑料离心管中,每个处理准备 3 个离心管,共 75mL。立即将分装好的样品置于已经预热好的处理釜中。密闭处理釜后进行升压,达到设定压强(30MPa)后进行保温(40℃)、保压处理 60min,缓慢卸压并将装有梨汁的离心管取出,放置在冰箱中冷却,以备测定梨汁中相关参数。在不通入高压 CO₂ 的情况下,将鲜榨梨汁在 40℃ 处理 60min 以及在 90℃ 处理 10min,作为 HPCD 处理的热对照。

1.2.3 PPO 活性测定 参考 Weemaes 等的方法^[11]。邻苯二酚为反应底物,用浓度为 0.05mol/L, pH 为 6.0 的磷酸缓冲液配成 0.05mol/L 的邻苯二酚溶液作为底物溶液。将 0.5mL 梨汁和 2.5mL 的底物溶液混合放置 30℃ 保温 30min,然后以 0.5mL 在 95℃、90s 的条件下热失活的梨汁和 2.5mL 底物溶液的混合液作为对照,在常温下用分光光度计测定混合液在 420nm 下的吸光值。残存酶活按照下列公式计算:

$$\text{残存酶活}(\%) = \frac{\text{HPCD 处理后 PPO 活性}}{\text{HPCD 处理前 PPO 活性}} \times 100$$

1.2.4 透光率测定 采用李思越等的方法^[10]。用分光光度计于 550nm 处测定处理前后梨汁透光率。每 7d 测定一次。

1.2.5 褐变度测定 采用 Roig 等^[12] 方法。梨汁在 4℃ 下以 10000r/min 离心 30min,取上清液通过 0.45μm 的滤膜过滤,在 25℃、420nm 处测定其吸光值。

1.2.6 色差值测定^[12] 用色差计测定其亮度(L*),红度(a*)和黄度(b*)值。每 7d 测定一次。色差值按照公式计算:

$$\Delta E = [(L_i^* - L_0^*)^2 + (a_i^* - a_0^*)^2 + (b_i^* - b_0^*)^2]^{1/2}$$

为方便阐明 L* 值变化过程,采用一级反应动力

学公式分析其变化过程: $\ln \frac{L_t^*}{L_0^*} = -k_L \cdot t$, 其中 t 是贮藏时间, k_L 是一级反应动力学常数^[10]。

1.2.7 数据处理 实验所得数据采用软件 Origin7.5 进行处理分析绘图。

2 结果与分析

2.1 鲜榨梨汁贮藏期 PPO 酶活变化

如图 1 所示,为 30MPa、40℃ 下 HPCD 处理 60min 和热处理对照在 40℃ 下处理 60min,以及 90℃ 热处理 10min 的鲜榨梨汁在 4℃ 贮藏 8 周期间 PPO 酶活变化。结果表明,HPCD 处理后鲜榨梨汁与未处理组相比 PPO 活性显著降低(p < 0.05),残存酶活为 19%,90℃-10min 的梨汁酶活显著低于 HPCD 处理(p < 0.05);40℃-60min 处理后梨汁中 PPO 酶活仅降低了 20%,钝酶效果显著低于相同温度下 HPCD 效果,说明 HPCD 钝酶过程中温度和 CO₂ 形成的压力具有协同灭酶作用。在 4℃ 贮藏下,未处理梨汁中 PPO 活性在 3 周贮藏期间逐渐下降到 80% 以下,这是由于低温环境抑制了 PPO 活性;由于在贮藏 3 周后鲜榨梨汁的微生物超标,果汁腐败变质,因而后续无法继续测定 PPO 活性。40℃-60min 热处理对照样品在 8 周贮藏期间,PPO 活性逐渐降低,是由于低温环境抑制酶活性。90℃-10min 热处理和 HPCD 处理的鲜榨梨汁在 8 周贮藏期内 PPO 活性无显著变化(p > 0.05),这是由于经过处理后残存酶活较低,进而立即进入 4℃ 贮藏,抑制了 PPO 活性。

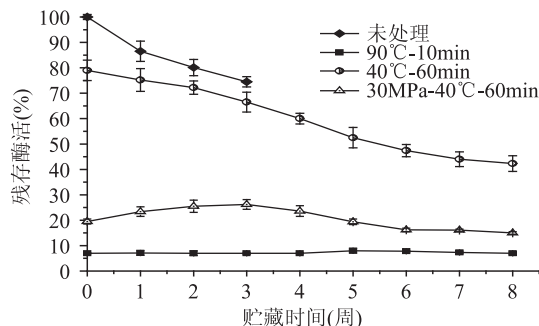


图 1 不同处理梨汁在 4℃ 贮藏期内 PPO 活性变化
Fig.1 The change of activity of PPO in pear juice as exposed to heat or HPCD treatment during storage at 4℃

2.2 鲜榨梨汁贮藏期透光率变化

果汁透光率 T 值和果汁混浊稳定性有关,T 值越大,浊度越小^[10]。未经处理的梨汁透光率为 16.56%,经过 HPCD(30MPa-40℃-60min)和热(40℃-60min)处理后梨汁透光率分别为 16.8% 和 16.0%,差异不显著(p > 0.05)。而经过 90℃-10min 热处理后梨汁透光率为 10.5%,表明其浊度显著增加(p < 0.05)。由图 2 可知,在 4℃ 贮藏条件下,几种处理梨汁透光率表现出下降趋势。其中未处理样品贮藏期内透光率降低最快,贮藏 1 周后 T 值显著下降,随贮藏时间延长进一步显著下降(p < 0.05),由最初的 16.56% 降低至 3 周后的 12.17%,降低了 4.39%。90℃-10min 处理组梨汁透光率下降,浊度增大,原因可能是加热使多酚物质氧化聚合成大分子,或与蛋

白质形成聚合物,沉淀下来影响梨汁透明度。40℃-60min 处理组梨汁和 HPCD 处理组梨汁 T 值分别在 4 周和 6 周内变化不显著($p > 0.05$)。随贮藏时间延长三组梨汁透光率缓慢下降,HPCD 处理样品 8 周后的透光率比最初降低了 2.90%,而 40℃-60min 处理和 90℃-10min 处理样品透光率分别降低了 4.32% 和 2.79%。可见,HPCD 对贮藏期梨汁透光率降低有抑制效应,有效减缓梨汁浊度增加。

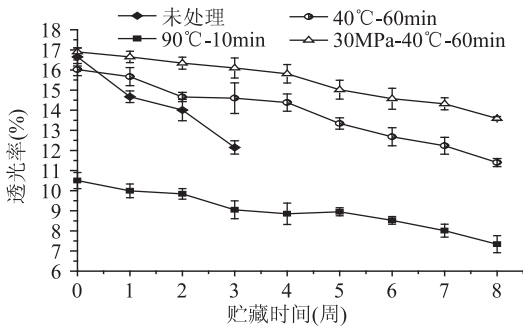


图2 不同处理梨汁4℃贮藏期内透光率的变化
Fig.2 The change of light transmission rate of pear juice as exposed to heat or HPCD treatment during storage at 4℃

2.3 鲜榨梨汁贮藏期色泽变化

如图3所示,为热处理和 HPCD 处理后梨汁在贮藏期间 L^* 值的变化。在几种处理之间,HPCD 处理和 90℃-10min 处理样品 L^* 值下降幅度较小,也即亮度与鲜榨梨汁相差较小。除 90℃-10min 热处理样品外,其余样品 L^* 值线性拟合程度良好, $R^2 > 0.9457$ 以上,表明一级反应动力学公式能较好地分析不同处理后贮藏期内梨汁 L^* 值的变化。HPCD 处理的梨汁 k_t 显著低于未处理对照组,表明 HPCD 处理能显著抑制 L^* 值的下降(图3)。

图4是不同处理后梨汁在4℃贮藏期间 ΔE 值的变化。HPCD 处理和 40℃-60min 热处理后梨汁的 ΔE 分别为 1.17 和 0.83,表明 HPCD 处理和低温长时间处理能使梨汁色泽变化保持在可接受范围内。而经过 90℃-10min 热处理后梨汁的 ΔE 为 2.58,色泽变化比较明显。在4℃下贮藏8周过程中,HPCD 处理后梨汁8周贮藏期内 $\Delta E < 1.5$,表明色泽变化不显著($p > 0.05$);90℃-10min 热处理贮藏8周后 $\Delta E = 2.90 < 3$,颜色差别为“稍明显”。未处理和 40℃-60min 热处理样品在贮藏期间变化较大,其中未处理样品贮藏3周后 $\Delta E = 8.10$,40℃-60min 热处理样品的 ΔE 由贮藏初期 0.83 升高至第8周的 5.51,说明这两组贮藏期间色泽变化较大,这与残存 PPO 酶活较高($> 80%$)有关,酶促褐变影响了梨汁色泽。

2.4 鲜榨梨汁贮藏期褐变度变化

图5为不同处理后梨汁在贮藏期间褐变度的变化。处理后立即测定褐变度,结果 HPCD 处理和 40℃-60min 热处理后梨汁褐变度为 0.42、0.43,其褐变度低于未处理样品;90℃-10min 热处理后梨汁褐变为 0.508,较未处理样品大;这种结果与前述梨汁色泽变化 ΔE 一致。经 90℃-10min 热处理后梨汁褐变度较大是由于高温加热过程中导致非酶褐变,这与前人研究

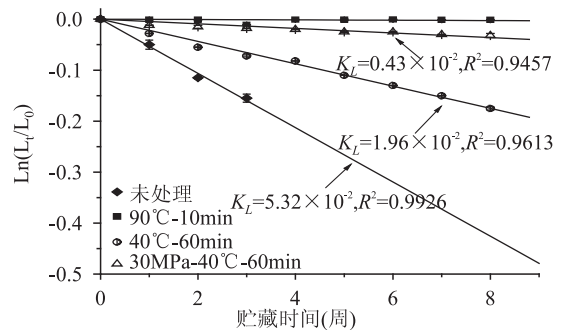


图3 不同处理梨汁4℃贮藏期内亮度 L^* 值的变化
Fig.3 The change of L^* value of pear juice as exposed to heat or HPCD treatment during storage at 4℃

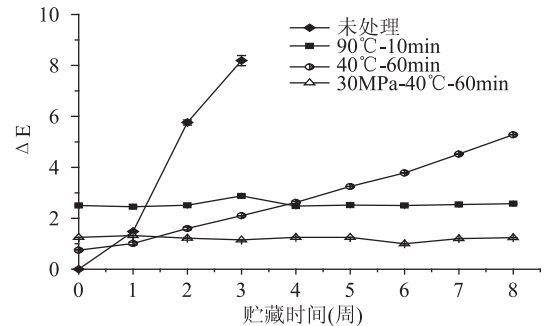


图4 不同处理梨汁4℃贮藏期内 ΔE 值的变化
Fig.4 The change of ΔE value of pear juice as exposed to heat or HPCD treatment during storage at 4℃

一致^[14]。在4℃条件下进行贮藏,未处理梨汁褐变度显著增大($p < 0.05$),40℃-60min 热处理梨汁的褐变度也快速增大,90℃-10min 热处理和 HPCD 处理梨汁贮藏期内褐变度也有所增大,但变化并不显著($p > 0.05$),表明这两组处理可以显著抑制梨汁褐变。

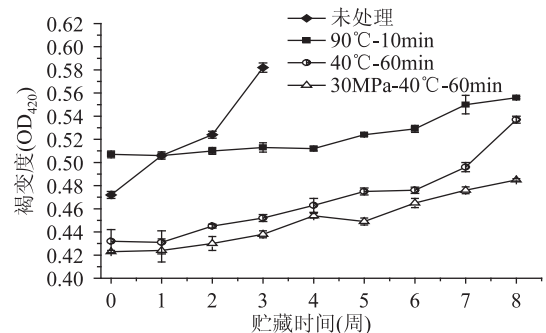


图5 不同处理的梨汁在4℃贮藏期间褐变度的变化
Fig.5 The change of browning degree of pear juice as exposed to heat or HPCD treatment during storage at 4℃

3 结论

HPCD(30MPa-40℃-60min)处理有效钝化梨汁中 PPO 酶活;其钝酶效果比相同温度热处理显著增强($p < 0.05$),钝酶过程中温度和 CO_2 形成的压力具有协同灭酶作用;且在4℃条件下贮藏8周也能较好抑制 PPO 酶活。HPCD 处理能抑制贮藏期梨汁透光率降低,保持鲜榨汁混浊度。HPCD 处理能保持鲜榨梨汁的色泽,在8周贮藏期内 $\Delta E < 1.5$,色泽变化不显著($p > 0.05$);梨汁褐变度为 0.42,且在4℃下贮藏

(下转第 142 页)

州:福建师范大学,2004.

- [15] 杨向东,王汉中,胡赞民,等.毛白杨 4CLcDNA 的克隆表达及活性分析[J].华中农业大学学报,2006,25(2):101-105.
- [16] 范丙友,胡诗宇,陆海,等.毛白杨 4-香豆酸辅酶 A 连接酶可溶性原核表达及活性检测[J].北京林业大学学报,2006,28(2):1-8.
- [17] 刘勇.葡萄白藜芦醇合酶基因的克隆及原核表达研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [18] 韩晶晶,刘炜,毕玉平.花生白藜芦醇合酶基因 PNRS1 的克隆及其在原核中的表达[J].作物学报,2010,36(2):341-346.
- [19] 倪志勇,王娟,吕萌,等.棉花 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因克隆及原核表达[J].西北植物学报,2010,30(3):0429-0436.
- [20] 梁乃国,崔杰,李滨胜,等.蛇白藜芦醇合酶基因 CNRS2 的克隆与原核表达[J].生物信息学,2010,8(3):279-283.
- [21] Watts K, Lee P, Schmidt-Dannert C. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. BMC biotechnology, 2006, 6(22):1-12.
- [22] Beekwilder J, Wolswinkel R, Jonker H, et al. Production of reseratrrol in recombiant microorganisms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8):5670-5672.
- [23] Lim CG, Fowler ZL, Hueller T, et al. High-Yield Resveratrol Production in Engineered *Escherichia coli* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10):3451-3460.
- [24] 宫强,关道明,王耀兵,等.大肠杆菌总 DNA 快速提取方法的比较研究[J].海洋环境科学,2005,24(4):61-66.

- [25] Guy B, Christiane B. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gap gene Different evolutionary behavior of the NAD⁺-binding domain and of the catalytic domain of glyceraldehyde-3-phosphated ehydrogenase [J]. Eur J Biochem, 1985, 150:61-66
- [26] 柴冉,孙强,邱立友.降落-重叠 PCR 法四重融合构建平菇同源重组片段[J].中国生物化学与分子生物学报,2012,28(4):375-379.
- [27] Larrick J W, Thomas D W. Producing proteins in transgenic plant and animals [J]. CurrOp in Biotechnol 2001, 12(4):411-418.
- [28] Jan M, Michael B. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 163:166-178.
- [29] Wang Y, Coralie Halls, Zhang J, et al. Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering [J]. Metabolic Engineering, 2011, 13:455-463.
- [30] Zhang W, Rubin-Pitel SB, Shao Z, et al. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering [J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(3):192-198.
- [31] Oksik Choi, Wu C, Sun Y, et al. Biosynthesis of plant-specific phenylpropanoids by construction of an artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli* [J]. Microbiol Biotechnol, 2011, 38:1657-1665
- [32] Zhang Y, Li S, Li J, et al. Using Unnatural Protein Fusions to Engineer Resveratrol Biosynthesis in Yeast and Mammalian Cells [J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(40):13030-13031.

(上接第 133 页)

8 周褐变度变化不显著 ($p > 0.05$)。HPCD 通过钝化 PPO 酶活保持了鲜榨梨汁色泽,抑制酶促褐变;90℃-10min 热处理也能有效钝化 PPO 酶活,但是在高温加热过程中促进了非酶褐变,并且使梨汁透光率下降,增大梨汁浊度。

参考文献

- [1] Damar S, Balaban M O. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(1):R1-R11.
- [2] Parton T, Bertucco A, Bertoloni G. Pasteurisation of grape must and tomato paste by dense-phase CO₂ [J]. Italian Journal of Food Science, 2007, 19(4):425-437.
- [3] Arreola A G, Balaban M O, Wei CI, et al. Effect of supercritical carbon dioxide on microbial populations in single strength orange juice [J]. Journal of Food Quality, 1991, 14(4):275-284.
- [4] Del Pozo-Insfran D, Balaban M O, Talcott S T. Microbial stability, phytochemical retention, and organoleptic attributes of dense phase CO₂ processed muscadine grape juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(15):5468-5473.
- [5] Werner B G, Hotchkiss J H. Continuous flow nonthermal CO₂ processing: The lethal effects of subcritical and supercritical CO₂ on total microbial populations and bacterial spores in raw milk [J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(3):872-881.

- [6] Liao H M, Zhang Y, Hu X S, et al. Behavior of inactivation kinetics of *Escherichia coli* by dense phase carbon dioxide [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126:93-97.
- [7] Liao H M, Zhang L Y, Hu X S, et al. Effect of high pressure CO₂ and mild heat processing on natural microorganisms in apple juice [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 137(1):81-87.
- [8] 赵瑾,杨瑞金,赵伟.高压脉冲电场对梨汁杀菌及钝化酶的研究[J].食品工业科技,2008,29(11):65-67.
- [9] 廖红梅,钟葵,龙飞翊,等.高压二氧化碳对鲜榨梨汁杀菌效果及动力学研究[J].食品工业科技,2013,34(24):83-87.
- [10] 李思越,钟葵,黄文.热处理对鸭梨汁色泽和稳定性影响研究[J].食品工业科技,2011,32(11):117-122.
- [11] Weemaes C, Ludikhuyze L, Broeck I V D, et al. High pressure inactivation of polyphenoloxidases [J]. Journal of Food Science, 1998, 63(5):873-877.
- [12] Roig M G, Bello J F, Rivera Z S, et al. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice [J]. Food Research International, 1999, 32:609-619.
- [13] Gui F Q, Wu J H, Chen F, et al. Change of polyphenol oxidase activity, color, and browning degree during storage of cloudy apple juice treated by supercritical carbon dioxide [J]. European Food Research and Technology, 2006, 223:427-432.
- [14] 赵光远,王璋.破碎时蒸汽热处理对混浊梨汁稳定性的影响[J].郑州轻工业学院学报,2008,23(1):28-30.