

超高压与重组果胶甲酯酶抑制剂联合应用对鲜榨橙汁果胶甲酯酶活性及品质的影响

王晓丽^{1,2}, 郭 藏³, 梅晓宏^{1,2,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 农业部农业转基因生物安全评价(食用)重点实验室, 北京 100083;

3. 北京联合大学, 北京 100023)

摘要:为了探究超高压与重组果胶甲酯酶抑制剂(recombinant pectin methylesterase inhibitor, rPMEI)联合处理对鲜榨橙汁中果胶甲酯酶(pectin methylesterase, PME)活性及品质的影响,研究了超高压(400、500和600 MPa, 5 min, 20 ℃)与重组果胶甲酯酶抑制剂对橙汁微生物、PME酶活、色泽和V_C含量的影响。结果表明:超高压处理条件为500 MPa/5 min, rPMEI添加浓度为0.06 mg/mL时,橙汁中的菌落总数、霉菌与酵母菌数均能达到农业行业标准《NY/T 434-2016 绿色食品、果蔬汁饮料》所规定的要求,同时PME被完全钝化;橙汁色泽变化显著小于热处理组(ΔE^* = 1.22 < 2.26);V_C保留率为85.1%,显著高于热处理组(保留率=8.33%)。

关键词:超高压,重组果胶甲酯酶抑制剂,果胶甲酯酶,鲜榨橙汁,品质

Effect of Ultra High Pressure Combined with Recombinant Pectin Methylesterase Inhibitor on Pectin Methylesterase Activity and Quality of Fresh Orange Juice

WANG Xiao-li^{1,2}, GUO Cang³, MEI Xiao-hong^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Key Laboratory of Safety Assessment of Genetically Modified Organism

(Food Safety), Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China;

3. Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Abstract: To investigate the effects of ultra-high pressure and recombinant pectin methylesterase inhibitor (rPMEI) on the activity and quality of pectin methylesterase (PME) in freshly squeezed orange juice, the effects of ultra-high pressure (400, 500 and 600 MPa, 5 min, 20 ℃) and recombinant pectin methylesterase inhibitor on orange juice microorganisms, PME activity, color and V_C content were studied. The results showed that when the ultra-high pressure treatment condition was 500 MPa/5 min and the rPMEI concentration was 0.06 mg/mL, the total number of colonies, mold and yeast in the orange juice could reach the agricultural industry standard NY/T 434-2016 Green Food-Fruit and Vegetable Drinks, PME was completely passivated; the color change of orange juice was significantly lower than that of the heat treatment group (ΔE^* = 1.22 < 2.26); the V_C retention rate was 85.1%, which was significantly higher than the heat treatment group (retention rate = 8.33%).

Key words: ultra high pressure; recombinant pectin methylesterase inhibitor; pectin methylesterase; fresh orange juice; quality

中图分类号: TS255.44

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)11-0115-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.11.020

引文格式: 王晓丽, 郭藏, 梅晓宏. 超高压与重组果胶甲酯酶抑制剂联合应用对鲜榨橙汁果胶甲酯酶活性及品质的影响 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(11): 115-119, 125.

橙汁混浊态是橙汁重要的感官特征之一,混浊态赋予橙汁独特的口感与质构,混浊态属于热力学不稳定体系,在橙汁加工与贮存过程中,混浊态易出现消失现象,造成橙汁感官品质降低^[1]。橙汁混浊态消失主要是由于橙汁中内源性果胶甲酯酶(pectin

methylesterase, PME)对果胶的脱甲酯化作用,低甲酯化的果胶与钙离子结合生成难溶性的果胶酸盐,从而导致橙汁分层、混浊态消失^[2-3]。

橙汁加工企业通常采用热处理方法(如巴氏杀菌、高温瞬时杀菌)钝化PME,但是热处理会使橙汁

收稿日期: 2018-09-07

作者简介: 王晓丽(1993-),女,硕士研究生,研究方向:营养递送系统的研究及应用, E-mail: 942685139@qq.com。

* 通讯作者: 梅晓宏(1971-),女,博士,副教授,研究方向:营养递送系统的研究及应用, E-mail: mxh@cau.edu.cn。

产生蒸煮味,且品质变差。与传统热处理方法相比,超高压是一种新型的非热加工技术,它不但能有效对果汁进行杀菌、钝酶,同时能避免由于热处理引起的果汁营养成分损失、风味改变等不良反应^[4]。将超高压技术应用到橙汁中的研究表明,由于橙汁中耐高压 PME 的存在,常规超高压处理(400~500 MPa)不能完全钝化橙汁 PME^[5],从而限制了超高压技术在橙汁产业中的广泛应用。1990年,Castaldo等^[6]从猕猴桃果实中分离纯化出对 PME 活性有抑制作用的蛋白质,并将其命名为果胶甲酯酶抑制剂(pectin methylesterase inhibitor, PMEI),PMEI能够与植物中的 PME 形成 1:1 非共价型可逆复合物,从而有效抑制植物 PME 活性,为提升果蔬汁的浑浊稳定性提供了新思路。然而,从植物体中直接提取 PMEI 相当困难,且提取量很低。梅晓宏等^[7-8]利用基因重组技术构建了含有猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂基因的重组毕赤酵母 GS115 菌株,其中该基因的 C 末端引入了编码六个组氨酸的标签,高效表达并纯化出重组果胶甲酯酶抑制剂(recombinant pectin methylesterase inhibitor, rPMEI)。本研究拟采用非热加工技术超高压与 rPMEI 联合处理橙汁,并对处理后的橙汁品质进行测定,具有一定创新性。

基于超高压钝化橙汁 PME 存在的问题,本研究将超高压与 rPMEI 联合作用于鲜榨橙汁中,初步探究二者联合作用对橙汁色泽、维生素 C 保留率及 PME 活性的影响及变化规律,并与热处理进行比较,以期超高压与重组 PMEI 联合应用于鲜榨橙汁加工产业提供理论基础及技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

赣南脐橙 北京市美廉美超市(学清路店);含有猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂基因的重组毕赤酵母 GS115 菌株(-80℃甘油中保存) 中国农业大学食品科学与营养工程学院转基因生物安全评价(食用)重点实验室;平板计数琼脂培养基、孟加拉红培养基 北京奥博星生物技术有限公司;0.1% 溴麝香草酚兰水溶液 山东临沂永安化验室;果胶(来源为柑橘,70%酯化度)、维生素 C 标准品 美国 Sigma 公司;金属镍螯合琼脂糖凝胶(Ni Sepharose 6 Fast Flow) 美国 GE Healthcare 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、无氨基酵母氮源(YNB) 美国 Amresco 公司;生物素 北京畅华志诚科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

HZQ-X160 型全温振荡培养箱 江苏太仓市实验设备厂;HSW 智能型恒温恒湿培养箱 宁波江南仪器厂;WJU-MS501J 型榨汁机 惠而浦(中国)投资有限公司;CC-K6 型水浴锅 德国 HUBER 有限公司;700-7L-6 型超高压设备 包头科发高压科技有限公司;TGL-16M 型医用离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;全波长酶标仪 美国 Thermo 公司;S210 型 pH 计 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;SC-80C 全自动色差仪 北京康光仪器公司;

DY24A 型垂直板电泳槽、DYY-6C 型电泳仪 北京六一仪器厂;GelDoc-ItTM Imaging System 型 UVP 凝胶成像仪 美国 UVP 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 rPMEI 的诱导表达与纯化 rPMEI 诱导表达参照李晓红等^[9]实验方法。将实验室保存的 kwPMEI-GS115 在 YPD 平板上划线进行种子活化,30℃倒置培养 2 d;挑取一个单菌落,接入 25 mL BMGY 液体培养基中(在 500 mL 三角瓶中进行),28℃、225 r/min 培养至细胞浓度达到 $OD_{600} = 2 \sim 6$;将上述培养基 3000 × g 冷冻离心 5 min,弃去上清液,收集菌体细胞,然后用 20 mL BMMY 培养基重悬细胞(在 250 mL 三角瓶中进行),30℃、250 r/min 诱导表达 96 h,注意每隔 24 h 补加 1% 甲醇;表达完成后,将发酵液置于离心管中,4℃、15000 × g 离心 5 min,将上清液转移至新离心管,-20℃贮存。

rPMEI 纯化参照 Liu 等^[8]的实验方法。加入 10 mL Ni Sepharose 6 Fast Flow 凝胶于砂芯漏斗中抽滤,以除去凝胶中的乙醇;向砂芯漏斗中加入 50 mL 的结合液,用药勺搅拌一下,用于平衡凝胶,抽滤;将凝胶刮至容器中,加入 10 mL 表达上清液,4℃、175 r/min 振荡 15 min,抽滤;将凝胶再次刮至容器中,加入 20 mL 结合液,4℃、175 r/min 振荡 10 min,抽滤,去掉杂质;在刮下的凝胶中加入 50 mL 的洗脱液,4℃、175 r/min 振荡 10 min,抽滤,重复两次。合并两次滤液,4℃过夜透析去盐,使用截留分子量为 10 kDa 的超滤离心管超滤浓缩。纯化后 rPMEI 溶解于 0.02 mol/L Tris-HCl(pH7.0),-80℃贮存备用。

按照 Laemmli 的方法进行蛋白质 SDS-PAGE 检测^[10]。电泳的分离胶和浓缩胶的条件如下:分离胶浓度 12.5%,浓缩胶浓度 5%,将 40 μL 上清液和 10 μL 5 × 上样缓冲液混合均匀后置于沸水浴中 10 min,样品溶液上样量为 30 μL,标准蛋白质 Marker 上样量为 8 μL。电泳电压 120 V,当染料前沿距橡胶框底边 1 cm 时,停止电泳。在固定液中固定 30 min 后,用考马斯亮蓝 R250 染色 2 h 后再进行脱色 1 h。电泳胶用凝胶成像仪拍照。

1.2.2 蛋白质浓度测定 根据 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒的方法,测定纯化后的 rPMEI 的浓度。

1.2.3 橙汁制备及处理 取新鲜赣南脐橙清洗、沥干水分、去皮,用榨汁机榨成汁,备用。

1.2.3.1 热处理 取榨好的橙汁 50 mL 放入 100 mL 耐热试管中,将试管放入 90℃水浴中,用温度计置于中心测定温度,当橙汁中心温度达到 90℃时,计时 1 min。处理完毕立即放入冰浴中冷却,尽快进行相关指标的测定。

1.2.3.2 超高压处理 取榨好的橙汁 20 mL 分装于高温蒸煮袋中,此过程尽量减少进入气泡,分装完成后用真空封口机封口,尽量避免样品与热封机封口条接触。将分装好的样品放入高压反应釜中,浸没于传压介质(本实验为水)中,设定温度、压力和时间。按照向晨晔^[14]的研究结果设置实验参数为:温

度为 20 ℃, 压力分别为 400、500、600 MPa, 在每个压强下保压 5 min。压力升高至设定压力开始计时, 到达处理时间后设备自动泄压, 超高压处理结束后, 样品立即放入冰浴中冷却, 尽快进行相关指标的测定。对照组为未经过超高压处理的橙汁样品。

1.2.3.3 超高压联合 rPMEI 处理 取榨好的橙汁 20 mL, 分别加入 0、0.30、0.60、0.90、1.20 mg rPMEI (即浓度分别为 0、0.015、0.030、0.045、0.060 mg/mL), 按照 1.2.3.2 的方法进行 500 MPa 超高压处理 5 min。处理完毕立即放入冰浴中冷却, 尽快进行相关指标检测。

1.2.4 不同处理后鲜榨橙汁相关指标的测定

1.2.4.1 橙汁菌落总数、霉菌与酵母菌测定 橙汁菌落总数检测按照 GB 4789.2.2016 的方法进行, 以无菌吸管吸取 25 mL 样品置盛有 225 mL 磷酸盐缓冲液的无菌锥形瓶中, 充分混匀, 制成 1:10 的样品匀液, 用 1 mL 微量移液器吸取 1:10 样品匀液 1 mL, 沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中, 充分混匀, 制成 1:100 的样品匀液; 同理制备 1:1000 的样品匀液。吸取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内, 每个稀释度做两个平皿。同时分别吸取 1 mL 空白稀释液, 加入两个无菌平皿内作空白对照。及时将 15~20 mL 冷却至 46 ℃ 的平板计数琼脂培养基 (可放置于 (46 ± 1) ℃ 恒温水浴箱中保温) 倾注平皿, 并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后, 将平板翻转, (36 ± 1) ℃ 培养 (48 ± 2) h。用肉眼观察, 记录稀释倍数和相应的菌落数量。

霉菌与酵母菌检测按照 GB 4789.15-2016 的方法进行。按照上述菌落总数检测方法制备样品梯度稀释液, 及时将 20~25 mL 冷却至 46 ℃ 的孟加拉红培养基 (可放置于 (46 ± 1) ℃ 恒温水浴箱中保温) 倾注平皿, 并转动平皿使其混合均匀。待琼脂凝固后, 置 (36 ± 1) ℃ 培养箱中培养, 观察并记录培养至第 5 d 的结果。用肉眼观察, 记录稀释倍数和相应的菌落数量。

1.2.4.2 橙汁 PME 活性测定 橙汁中 PME 活性测定参考 Hagerman 等^[11]的方法, 略作改动。将鲜榨橙汁与 1 mol/L 氯化钠溶液按照体积比 1:2 混匀, 于 4 ℃、150 r/min 恒温振荡 1 h。于 4 ℃、10610 × g 条件下离心 10 min。收集上清液即为粗酶液, 调 pH 为 7.5。取 5 mL 预先配制好的 1% 果胶溶液于 10 mL 离心管中, 加入 100 μL 0.1% 溴麝香草酚蓝水溶液指示剂, 充分混匀; 再加入上述 1 mL 粗酶液, 充分混匀。取 200 μL 混合液于 96 孔板中, 1 min 内连续检测其 OD₆₂₀ 的变化, 间隔时间 0.3 s。

一个 PME 酶活单位定义为 1 min 引起 OD₆₂₀ 变化 10⁻³ 所需的酶量。

1.2.4.3 橙汁色泽测定 参照 Lozano 等^[12]的方法对橙汁色泽进行测定。色泽是反应橙汁优劣的重要依据, 一般用色差值 $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ 表征样品色泽变化程度的高低, 其中 L^* 表示明亮值, a^* 表示红绿值, b^* 表示黄蓝值, ΔE^* 越大, 表明色泽变化程度越高。

分别取待测的橙汁样品 5 mL, 利用全自动色差

仪测定样品的 L^* 、 a^* 、 b^* 值。

1.2.4.4 橙汁 V_c 测定 参照 GB 5009.86-2016 中 2、6-二氯酚酚滴定法进行测定。准确量取橙汁 20 mL 于烧杯中, 用草酸溶液将样品转移至 100 mL 容量瓶, 并稀释至刻度, 摇匀, 加 8 g 超细高岭土脱色后再过滤, 并进行测定。

1.3 统计分析

所有数据均为三次平行实验的平均值, 实验结果使用 Excel 和 SPSS 19 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 rPMEI 的诱导表达与纯化

蛋白表达与纯化的电泳结果如图 1 所示。纯化前后均有一明显的分子量约为 16 kDa 蛋白质条带, 该条带与之前报道的天然猕猴桃 PMEI 的分子量基本吻合^[13]。本课题组前期对编码猕猴桃 PMEI 的基因进行了密码子优化, 同时在该基因的碳末端引入了编码六个组氨酸的标签^[8], 所表达出来的目的蛋白可以特异性地与含有镍离子的凝胶结合, 因此本研究已成功表达出 rPMEI, 同时经镍亲和层析纯化出该蛋白质, 并且纯度很高, 几乎不含其它杂质。同时表达上清液中杂蛋白质较少, 目的蛋白质占表达产物的绝大多数, 这也非常有利于重组蛋白质的纯化。通过 BCA 试剂盒测定纯化后洗脱液中的蛋白质浓度, 结果为 0.15 mg/mL。

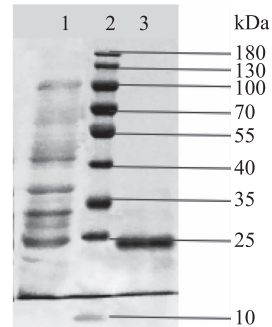


图 1 纯化前后 rPMEI 的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of rPMEI before and after purification

注: 1: 重组毕赤酵母菌株表达上清液; M: 标准蛋白质, 从上到下分子量分别是 180、130、100、70、55、40、35、25、10 kDa; 2: 纯化浓缩后的 rPMEI。

2.2 超高压处理对鲜榨橙汁微生物的影响

超高压处理对鲜榨橙汁微生物的影响结果如表 1 所示, 与未经过超高压处理的对照组橙汁相比, 当超高压分别为 400、500、600 MPa 处理橙汁, 同时保压时间为 5 min 时, 橙汁中菌落总数随压力增加而显著下降 ($p < 0.05$)。当处理条件为 500 MPa/5 min 时, 菌落总数对数值为 1.98 lg (CFU/mL), 符合我国农业行业标准:《NY/T 434-2016 绿色食品、果蔬汁饮料》中规定的菌落总数 (≤ 2 lg (CFU/mL))。而橙汁中的酵母菌、霉菌在压力为 400 MPa 以上均不能检出, 满足《NY/T 434-2016 绿色食品、果蔬汁饮料》所规定的霉菌、酵母菌数目 (≤ 20 CFU/mL)。向晨茜研究了超高压对橙汁菌落总数的影响, 发现当处理压

力为 400 MPa、处理时间为 5 min 时,菌落总数显著降低($p < 0.05$)^[14]。Ogawa 等证实了超高压 300~400 MPa 处理对细菌、霉菌、酵母菌的营养体有明显的杀灭效果^[15]。以上结论与本实验结果基本符合。研究表明,超高压处理能够破坏微生物细胞膜的通透性,导致细胞内部的营养物质随着细胞质一起流失,因此改变微生物的生理功能,使其不能进行正常的新陈代谢,从而杀灭微生物^[16]。综上所述,为了保证超高压联合 rPMEI 作用时,橙汁中的微生物指标满足《NY/T 434-2016 绿色食品、果蔬汁饮料》所规定的要求,同时尽量减少较高压力所带来的生产成本的增加及对超高压设备的损耗,本研究在后续的实验中将超高压处理条件设置为 500 MPa/5 min。

表 1 超高压处理对鲜榨橙汁微生物的影响

Table 1 Effects of ultra high pressure treatments on microorganisms of fresh orange juice

处理压力 (MPa)	菌落总数对数值 lg(CFU/mL)	霉菌、酵母菌对数值 lg(CFU/mL)
对照	5.33 ± 0.03 ^a	3.89 ± 0.03
400	2.53 ± 0.06 ^b	未检出
500	1.98 ± 0.05 ^c	未检出
600	1.60 ± 0.04 ^d	未检出

注:同一列中不同英文字母表示有显著性差异($p < 0.05$, $n = 3$)。下同。

2.3 rPMEI 添加量对橙汁 PME 活性的抑制情况

在超高压 500 MPa、处理时间为 5 min 条件下, rPMEI 添加量对橙汁 PME 活性抑制情况的实验结果如表 2 所示。相比于未处理组,超高压处理能够有效降低橙汁 PME 活性,与未处理组存在显著性差异($p < 0.05$)。但单一的超高压处理不足以完全抑制 PME 活性,这与橙汁存在耐压的 PME 同工型有关^[5]。当超高压联合 rPMEI 作用于橙汁中,若 rPMEI 添加浓度较低(如 0.015、0.030 mg/mL),相比于超高压处理组,并不能显著降低橙汁 PME 活性($p > 0.05$)。当 rPMEI 添加浓度为 0.045 mg/mL 及以上时,超高压联合 rPMEI 处理相比于超高压处理,能够有效降低 PME 活性($p < 0.05$)。当 rPMEI 添加浓度为 0.06 mg/mL 及以上时,超高压联合 rPMEI 能够完全抑制橙汁中 PME 活性。此外对橙汁在 90 °C 条件下热处理 1 min 后,能够完全钝化 PME 活性,这可能是由于橙汁 PME 对热比较敏感^[17]。高效体积排阻色谱法和表面等离子共振技术的研究结果表明, PMEI 与 PME 二者之间可形成 1:1 非共价型可逆复

合物,该复合物的形成可能阻止 PME 与果胶底物的结合,从而抑制 PME 的活性^[18-20]。本课题组前期的实验结果表明,超高压处理对 rPMEI 的抑制活性影响较小^[21]。因此将超高压与 rPMEI 联合应用于橙汁中,既可以发挥超高压对橙汁杀菌钝酶的效果,又可以运用 rPMEI 对 PME 活性的抑制作用。根据本实验结果在后续研究超高压联合 rPMEI 对橙汁品质影响时, rPMEI 的添加量设置为 0.06 mg/mL。

表 2 rPMEI 添加量对橙汁 PME 活性的抑制

Table 2 Inhibition of rPMEI addition on PME activity of fresh orange juice

处理方式	酶活(U/mL)
未处理组	29.12 ± 0.37 ^a
500 MPa/5 min	24.08 ± 1.02 ^b
500 MPa/5 min + 0.30 mg rPMEI	25.23 ± 1.81 ^b
500 MPa/5 min + 0.60 mg rPMEI	25.46 ± 0.53 ^b
500 MPa/5 min + 0.90 mg rPMEI	5.74 ± 0.71 ^d
500 MPa/5 min + 1.20 mg rPMEI	未测出
90 °C/1 min	未测出

2.4 热处理、超高压、超高压联合 rPMEI 对橙汁色泽的影响

热处理、超高压和超高压联合 rPMEI 对橙汁色泽影响的实验结果如表 3 所示,相比于对照组,上述三种处理方式均会显著升高橙汁的 L^* 值、 b^* 值($p < 0.05$),同时显著降低橙汁的 a^* 值($p < 0.05$),也会显著改变 ΔE^* 值($p < 0.05$),但超高压处理对橙汁的 L^* 值、 b^* 值、 a^* 值、 ΔE^* 值的影响程度显著小于热处理($p < 0.05$)。同时相比于超高压处理,超高压联合 rPMEI 并不会显著改变橙汁的 L^* 值、 b^* 值、 a^* 值、 ΔE^* 值($p > 0.05$),表明 rPMEI 加入到橙汁中并没有对其色泽产生影响,因此超高压联合 rPMEI 处理能较好地保护橙汁的色泽。研究表明,超高压能够钝化橙汁中一些不耐压的内源酶,且高压能促进呈色物质溶出,在一定程度上起到改善橙汁色泽的作用^[22]。

2.5 超高压联合 rPMEI 对橙汁 V_c 的影响

超高压联合 rPMEI 对橙汁 V_c 的影响结果如表 4 所示,超高压和热处理都会显著降低橙汁中的 V_c 含量($p < 0.05$)。与超高压处理相比,热处理造成橙汁中 V_c 损失更大,经热处理的橙汁 V_c 保留率仅为 8.3%,远小于超高压处理后橙汁 V_c 保留率(87.6%),该结果与其他文献的实验结果基本相似^[23-24]。同时 rPMEI 在橙汁中的加入并没有显著降低其 V_c 的含量($p > 0.05$),表明超高压联合 rPMEI 能

表 3 不同处理对橙汁色泽的影响

Table 3 Effects of different treatments on color quality of fresh orange juice

处理方式	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
对照	47.72 ± 0.17 ^a	1.94 ± 0.04 ^c	15.55 ± 0.15 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
90 °C/1 min	49.49 ± 0.12 ^c	0.65 ± 0.06 ^a	16.10 ± 0.10 ^c	2.26 ± 0.05 ^c
500 MPa/5 min	48.53 ± 0.13 ^b	1.05 ± 0.08 ^b	15.88 ± 0.05 ^b	1.25 ± 0.07 ^b
500 MPa/5 min + 0.06 mg/mL rPMEI	48.35 ± 0.19 ^b	0.91 ± 0.05 ^b	15.64 ± 0.06 ^b	1.22 ± 0.05 ^b

较好地保留橙汁中 V_c 含量。橙汁中含有丰富的 V_c ，但经传统热处理后，损失率高达 95%，即使在加工过程中额外添加抗氧化剂或者螯合剂，损失率仍会 50% 以上^[25]。热处理会激活 V_c 氧化酶，破坏小分子中的共价键，而超高压处理不会破坏 V_c 中的共价键^[26]，从而对 V_c 具有很好的保持作用。

表 4 不同处理条件对橙汁 V_c 含量的影响Table 4 Effects of different treatments on V_c content of orange juice

处理方式	V_c 含量 (mg/100 mL)	保留率 (%)
对照	18.00 ± 0.33 ^a	-
90 °C/1 min	1.50 ± 0.12 ^b	8.3
500 MPa/5 min	15.77 ± 0.21 ^c	87.6
500 MPa/5 min +0.06 mg/mL rPMEI	15.32 ± 0.10 ^c	85.1

3 结论

对鲜榨橙汁进行 500 MPa 超高压处理 5 min，菌落总数、霉菌与酵母菌数均在《NY/T 434-2016 绿色食品、果蔬汁饮料》所规定的范围内。超高压 (500 MPa/5 min) 处理能够明显降低橙汁中 PME 活性，但不能完全钝化 PME。向每毫升橙汁中添加 0.06 mg 及以上 rPMEI，再进行超高压处理 (500 MPa/5 min) 能够完全钝化 PME。超高压联合 rPMEI 对橙汁色泽的影响程度显著小于热处理组 ($p < 0.05$)。同时超高压联合 rPMEI 对橙汁 V_c 保留率 (85.1%) 远高于热处理对橙汁 V_c 保留率 (8.3%)。综上所述，超高压 (500 MPa/5 min) 联合 rPMEI (0.06 mg/mL) 作用于橙汁不但能够达到商业无菌要求，同时能够完全抑制 PME 活性，并且能够显著改善橙汁的品质，从而从根本上解决了常规热处理及超高压处理所存在的问题。本研究所获得的实验结果有望解决当今果蔬汁加工产业所面临的关键问题。

参考文献

[1] 向晨茜, 蒋和体. 橙汁混浊的稳定性[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 106-110.

[2] Shomer I. Protein coagulation cloud in citrus fruit extract. I. formation of coagulates and their bound pectin and neutral sugars [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1992, 39(39): 2267-2273.

[3] Baker R A. The role of pectin in citrus quality and nutrition [C]//ACS Symposium Series, 1980.

[4] 安虹, 谭炜. 超高压技术在食品加工中的研究进展[J]. 北方农业学报, 2017(5): 130-134.

[5] Nienaber U, Shellhammer T H. High-pressure processing of orange juice: Combination treatments and a shelf life study [J]. Journal of Food Science, 2010, 66(2): 332-336.

[6] Balestrieri C, Castaldo D, Giovane A, et al. A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*) [J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 193: 183-187.

[7] 梅晓宏, 郝彦玲, 朱鸿亮, 等. 猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(12): 1528-1528.

[8] Liu Q, Xu W, Han S, et al. Production and optimization of a kiwi pectin methylesterase inhibitor in *Pichia pastoris*, GS115 [J]. Food Science & Biotechnology, 2014, 23(6): 1971-1976.

[9] 李晓红, 柳倩, 王蓓, 等. 重组果胶甲酯酶抑制剂发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2016, 37(3): 160-169.

[10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.

[11] Hagerman A E, Austin P J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1986, 34(3): 440-444.

[12] Lozano J E, Drudis Iscarri R, Ibarz Ibas A. Enzymatic browning in apple pulps [J]. Journal of Food Science, 2010, 59(3): 564-567.

[13] Camardella L, Carratore V, Ciardiello M A, et al. Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase amino-acid sequence and structural importance of two disulfide bridges [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(14): 4561-4565.

[14] 向晨茜. 超高压处理对鲜榨橙汁品质影响研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.

[15] Ogawa H, Fukuhisa K, Kubo Y, et al. Pressure inactivation of yeasts, molds, and pectinesterase in satsuma mandarin juice: Effects of juice concentration, pH, and organic acids, and comparison with heat sanitation [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2006, 54(5): 1219-1225.

[16] 施卢晋. 超高压处理对橙囊胞杀菌效果和品质影响研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2014.

[17] Wicker L, Temelli F. Heat inactivation of pectinesterase in orange juice pulp [J]. Journal of Food Science, 2010, 53(1): 162-164.

[18] Di M A, Giovane A, Raiola A, et al. Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein [J]. Plant Cell, 2005, 17(3): 849-858.

[19] Jolie R P, Duvetter T, Houben K, et al. Carrot pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: Study of activity, stability and inhibition [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(4): 601-609.

[20] Jolie R P, Duvetter T, Van Loey A M, et al. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: A review [J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(18): 2583.

[21] Mei X, Shpigelman A, Verrijssen T A J, et al. Recombinant kiwi pectin methylesterase inhibitor: Purification and characterization of the interaction with plant pectin methylesterase during thermal and high-pressure processing [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 29(2): 295-301.

[22] 张微. 超高压和热处理对热带果汁品质影响的比较研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010.

[23] 赵玉生, 赵俊芳. 猕猴桃汁的超高压杀菌效果 [J]. 食品科技, 2007, 32(4): 146-148.

(下转第 125 页)

- 究[J].食品研究与开发,2011,32(7):19-21.
- [7]宋琳琳,黄蓓蓓,张朝晖.金花葵花中总黄酮的超声波提取工艺[J].贵州农业科学,2016,44(2):70-72.
- [8]张路,于慧敏,杜凤沛,等.金花葵中总黄酮的分离提取及含量测定[J].吉林师范大学学报,2015(4):104-107.
- [9]陈亮,辛秀兰,苏东海,等.金花葵花总黄酮的精制工艺研究[J].江苏农业科学,2016,44(8):339-343.
- [10]申利英,高玉红,任立伟,等.响应曲面法优化金花葵总黄酮超声提取工艺[J].煤炭与化工,2017,40(9):24-31.
- [11]云成悦,李潇彬,郑奎玲,等.头花蓼多酚不同极性溶剂萃取物的抗氧化活性[J].食品工业科技,2018,39(3):61-64.
- [12] Viacava G E, Roura S I. Principal component and hierarchical cluster analysis to select natural elicitors for enhancing phytochemical content and antioxidant activity of lettuce sprouts[J].Scientia Horticulturae,2015,193:13-21.
- [13] Priyanka C, Kadam D A, Kadam A S, et al. Free radical scavenging (DPPH) and ferric reducing ability (FRAP) of some gymnosperm species[J].Ijbpas Com,2013,3(2):34-36.
- [14] Chen R Z. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*[J].Food Chemistry,2011,127(2):434-440.
- [15] Yildirim A, Oktay M, Bilaloglu V. The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris* [J]. Turkish Journal of Medical Sciences,2001,31(1):23-27.
- [16] Liang D, Zhou Q, Gong W, et al. Studies on the antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Talinum triangulare*[J].J Ethnopharmacol,2011,136(2):316-321.
- [17] 刘丹丹,李炳奇,陈韩英,等.沙枣不同果、叶中多酚类物质抗氧化能力比较的研究[J].食品工业科技,2011,32(12):93-95.
- [18] 刘继攀,张紫华,关振华,等.两种真姬菇不同溶剂提取物的抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2018,39(11):56-61.
- [19] 罗磊,张冰洁,马丽苹,等.金银花叶黄酮体外抗氧化能力及对H₂O₂诱导RAW264.7巨噬细胞损伤的保护作用[J].食品科学,2018,39(11):139-145.
- [20] 甘芝霖,倪元颖,郭悦,等.大孔树脂分离纯化玫瑰果多酚及其抗氧化性[J].农业工程学报,2015,31(24):298-306.
- [21] 杨琼琼,刘雄民,赖芳,等.柿木皮单宁不同极性组分对油脂抗氧化作用研究[J].中国油脂,2016,41(5):45-49.
- [22] 徐连巧,曹剑锋,谢之英,等.响应面法优化小春花根黄酮提取工艺及其抗油脂氧化活性研究[J].食品安全质量检测学报,2018,9(5):985-992.
- [23] 王晓静,陈莉华,黄玉龙,等.火棘果黄酮对油脂的抗氧化活性[J].天然产物研究与开发,2015,27:909-914.
- [24] 关海宁,刁小琴,乔秀丽,等.提取方式对玉米须总多酚抗氧化活性的影响研究[J].食品工业,2018,39(8):25-29.
- [25] 张锦华,徐蔓,白宝清,等.响应面法优化提取无花果干果中多酚和总黄酮物质及其抗氧化活性[J].食品工业科技,2018,39(16):183-190.
- [24] Dede S, Alpas H, Bayindirli A. High hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: Antioxidant activity and microbial safety[J].Journal of the Science of Food & Agriculture,2007,87(5):773-782.
- [25] 胡友栋,励建荣,蒋跃明.超高压处理影响果蔬品质的研究进展[J].食品科学,2009,30(9):235-240.
- [26] 陆海霞,胡友栋,励建荣,等.超高压和热处理对胡柚汁理化品质的影响[J].中国食品学报,2010,10(2):160-166.

(上接第119页)

因本刊已被《中国知网》
(包括“中国知网”优先数字出版库)
独家全文收录,所以所付稿酬中
已包含该网站及光盘应付的稿酬。