

文章编号: 1000-5773(2009)05-0377-07

超高压处理对海参自溶酶活性影响的研究*

夏远景¹, 刘志军¹, 李 宁², 陈淑花¹, 邓记松¹, 刘学武¹, 李志义¹

(1. 大连理工大学流体与粉体工程研究设计所, 辽宁大连 116012;

2. 大连理工大学生物科学与工程系, 辽宁大连 116023)

摘要: 海参的超高压处理与传统的处理方法相比有许多优越性, 具有十分广阔的应用前景。研究了超高压处理过程中压力(0.1~550 MPa)、保压时间(0~30 min)、温度(24~62 °C)及保压方式对海参自溶酶活性的影响。在室温、保压 20 min 的条件下, 200 MPa 左右较低压力下酶活性降低, 相对残存活性为 88.25%; 250 MPa 较高压力下自溶酶被激活, 酶活性为 106.77%; 550 MPa 高压下酶活性最低为 29.81%。自溶酶活性随保压时间和温度的增加先上升后下降; 保压方式对自溶酶活性的影响不大。同时利用误差反向传播神经网络(Back Propagation Neural Network, BP 人工神经网络), 模拟了超高压钝酶效果, 与实验结果比较, 平均相对误差为 0.9%, 可以获得较好的预测结果。研究表明, 在一定的压力、保压时间和温度下, 酶被激活, 其活性上升; 而在一定的压力、保压时间和温度下, 酶被钝化, 活性降低。对优化海参超高压钝酶工艺具有一定的参考价值。

关键词: 超高压; 海参; 自溶酶; 神经网络

中图分类号: O521.9; TS254.4; Q502

文献标识码: A

1 引言

海参的营养价值和药用价值很高, 是高蛋白、低胆固醇、低脂肪, 富含多种生理活性物质的营养保健佳品, 具有抗肿瘤^[1-2]、抗病毒^[3]、降血脂^[4]及抗凝血^[5]的作用, 经常食用海参不但健身, 而且能够防治很多疾病, 因而被人们视为重要的海珍品, 具有较高的经济价值^[6]。然而鲜海参由于含有自溶酶, 使其在一定条件下会水解^[7], 所以采用传统加工方法海参只能制作成干参或盐渍参, 大量的活性成分在加工过程中流失或损失。虽然采用现代的科学技术, 能通过水解或冷冻干燥制造一些保健品, 但鲜参的保存问题一直是一个尚未解决的难题。

超高压处理食品保鲜技术是一项具有广阔应用前景的食品加工新技术。超高压处理可以杀灭食品中的微生物, 还可以抑制酶的活性^[8-9], 同时可以保持食品原有的风味、色泽和营养成分^[10]。

采用超高压加工技术可将海参自溶酶钝化, 从而延长鲜参的保质期, 是解决海参加工难题的一条有效途径。然而超高压处理海参的钝酶技术要实现工业化, 还有许多问题有待深入研究。本工作拟对影响超高压钝酶效果的相关因素进行实验研究, 并利用神经网络对钝酶效果进行模拟。

2 实验材料和方法

2.1 实验材料

原料: 市售新鲜刺参。

* 收稿日期: 2008-11-30; 修回日期: 2009-05-26

作者简介: 夏远景(1972—), 女, 博士研究生, 讲师, 主要从事超高压食品技术研究. E-mail: xiayuanjing@dl.cn

通讯作者: 李志义(1959—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事超高压与超临界流体过程及特殊流动过程研究. E-mail: lizy@dlut.edu.cn

试剂:磷酸二氢钠,分析纯,天津市博迪化工有限公司提供;磷酸氢二钠,分析纯,天津市博迪化工有限公司提供;干酪素(酪蛋白),生化试剂,北京奥博星生物技术有限公司提供;三氯乙酸,分析纯,沈阳新兴试剂厂提供;无水碳酸钠,分析纯,天津市津东天正精细化学试剂厂提供;Folin-酚试剂,北京索莱宝科技有限公司提供。

2.2 仪器设备

采用自制超高压设备,压力范围为0~600 MPa;HWS12型电热恒温水浴锅;5804R型冷冻式离心机;DZ-280/2SD型多功能真空封装机;JENCO6173精密酸度计;UV762型紫外/可见分光光度计。

2.3 实验方法

试样制备:将新鲜刺参剖开去除内脏,剔除夹杂的泥沙,用去离子水冲洗2遍,切碎,分组,真空密封于聚乙烯塑料袋中,备用。

超高压处理:把样品置于高压容器内,进行超高压处理。为了保证每组实验样品中自溶酶数量一致,每次实验所用试样均一次性制备,每组取3个平行样。

酶活性测定^[7]:

(1) 取5 g样品,匀浆(加冷冻去离子水适量),加入40 mL(5~8倍体积)磷酸盐缓冲溶液浸提,4℃下静置过夜。次日4000 r/min离心8 min,收集上清液,冰箱中备用。

(2) 取4支10 mL比色管,分别吸取1.0 mL稀释酶液,加入到3支比色管中,另一支定为空白管,加1.0 mL蒸馏水。

(3) 将比色管置入30℃恒温水浴中预热5 min,再各取0.5%的酪蛋白溶液2.0 mL,分别加入到4支比色管中,置入30℃恒温水浴中准确计时,保温10 min,立即加入2.0 mL的10%三氯乙酸溶液,使蛋白质变性,终止反应。

(4) 4000 r/min离心8 min,各取滤液1.0 mL放入到4支比色管中,依次加入5.0 mL的0.55 mol/L Na₂CO₃溶液,最后加入0.5 mL Folin-酚试剂,摇匀,放入30℃恒温水浴中显色15 min。

(5) 在650 nm下,用紫外分光光度计测定样品的吸光度(OD)值。

酶活性的定义^[11]:单位时间内,每毫升酶液,吸光度变化0.001定义为1个酶活性单位。相对酶活性的定义:相对残存活性=(处理样品活性/未处理对照样品活性)×100%。

3 结果与讨论

3.1 压力对海参自溶酶活性的影响

为考察海参自溶酶活性随压力的变化特性,选择的实验条件为:室温、保压时间20 min、海参为自然酸度,进行8种压力(200、250、300、350、400、450、500和550 MPa)的超高压处理,实验结果如图1所示。

由图1可见,在200 MPa下保压20 min,海参自溶酶相对残存活性为88.25%;之后随压力升高酶活性开始上升,到250 MPa酶相对残存活性达到最高为106.77%;250 MPa过后酶活性随压力升高开始下降;到550 MPa酶相对残存活性降低到29.81%,其对应的钝酶率为70.19%。

产生上述现象的主要原因是:酶的化学本质是蛋白质,生物活性产生于由分子的三维结构所产生的活性中心,三维结构的改变与体积变化有关,而超高压促进体积减小的反应,抑制体积增加的反应,因

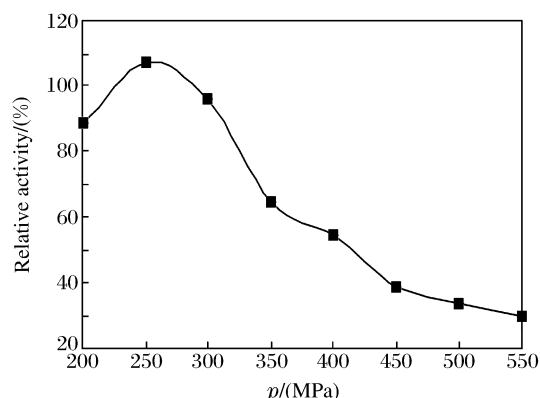


图1 压力对海参自溶酶活性的影响
Fig. 1 Effect of pressure on holothurians autoenzyme activity

此酶受超高压影响。在 200 MPa 左右的较低压力下,压力促使海参中的游离酶产生变性,酶活性下降;同时,由于酶液中还有一定数量的海参细胞碎片,因此部分处于附着状态的自溶酶(处于这种状态的酶稳定性较高)还未解脱出来。当压力增加到 250 MPa 左右时,压力足以促使酶从海参细胞碎片附着而被束缚的状态中解离出来,其中先游离出来的部分酶也可能变性失活,还有一部分未能失活,综合效果是提高了酶的活性。当压力高于 250 MPa 时,游离(即没有与生物大分子(蛋白质、淀粉和多糖等)结合(或称为生物大分子保护))的自溶酶,其构象和活性中心被破坏,随着压力的增加,使部分酶逐渐丧失活性。压力越大,丧失活性的自溶酶分子越多,酶的残存活性越低。

以上实验结果分析表明,超高压对海参自溶酶的影响有 3 个阶段:(1)较低的压力(如 200 MPa)降低酶的活性;(2)较高的压力(如 250 MPa)使酶的活性增强;(3)非常高的压力(如 550 MPa)导致酶失活。

3.2 保压时间对海参自溶酶活性的影响

为考察超高压处理时保压时间对海参自溶酶活性的影响,选择的实验条件为:400 MPa、室温、海参自然酸度,进行 6 种保压时间(5、10、15、20、25 和 30 min)的超高压处理。实验结果如图 2 所示。

由图 2 可见,保压 5 min 海参自溶酶残存活性为 41.45%;之后随着保压时间的延长,自溶酶活性上升,保压 15 min 酶残存活性达最高为 68.71%;保压时间超过 15 min 后,酶活性随时间增加开始下降,到保压 30 min 时下降为 59.21%。

产生上述现象的原因可能是:保压时间较短时,压力促使海参中的游离酶产生变性,酶活性较低;增加保压时间,附着在海参细胞碎片上的自溶酶开始解离出来,所以酶的活性上升;随着保压时间的进一步增加,丧失活性的自溶酶分子增多,所以酶的活性又开始下降。

3.3 温度对海参自溶酶活性的影响

为考察超高压处理时温度对海参自溶酶活性的影响,选择的实验条件为:海参自然酸度、400 MPa 下保压 20 min,进行 5 种温度(24、30、40、48 和 62 °C)下的超高压处理。实验结果如图 3 所示。

由图 3 可见,自溶酶活性随温度升高先上升,从室温 24 °C 时的 62.10% 上升到 40 °C 时的 76.94%,活性达最高值,之后开始下降,62 °C 酶残存活性降为 42.14%。实验结果说明,海参自溶酶在 40 °C 左右活性较高,此时酶蛋白构象最稳定、耐压能力最强,即使在 400 MPa 高压下,依然表现出较高的活性。从钝酶的角度看,超高压处理时室温 24 °C 或 60 °C 以上钝酶效果较好。但考虑到在较高的温度下,海参的活性成分可能受到破坏,因此海参的超高压钝酶处理应在接近室温为宜。

3.4 保压方式对海参自溶酶活性的影响

为考察保压方式对海参自溶酶活性的影响,实验采用 400 MPa 下 15 min 连续保压与间断保压(3 次,每次 5 min)的方式进行对比。实验结果如图 4 所示。

从图 4 中可以发现,保压方式对酶活性的影响不大,连续保压和间断保压两种保压方式相差不多,间断保压酶残存活性稍低。

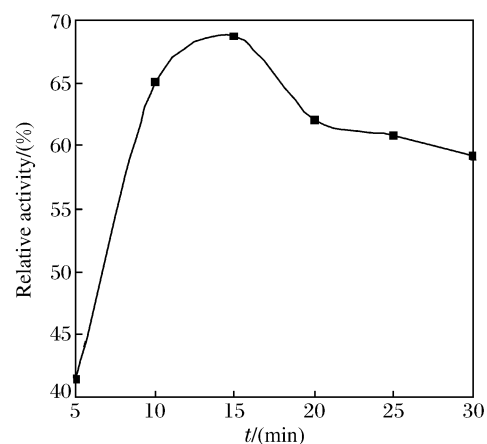


图 2 保压时间对海参自溶酶活性的影响
Fig. 2 Effect of pressure-keeping time on holothurians autoenzyme activity

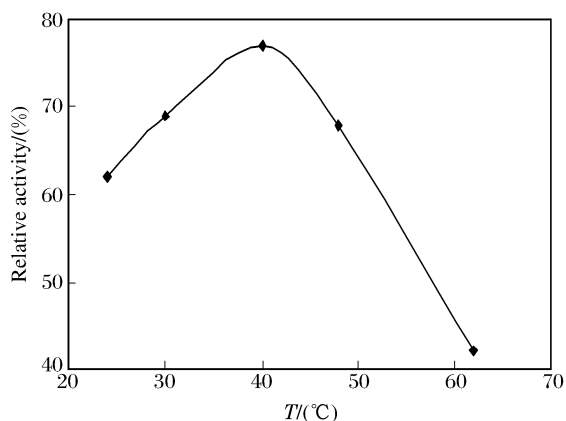


图 3 温度对海参自溶酶活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on holothurians autoenzyme activity

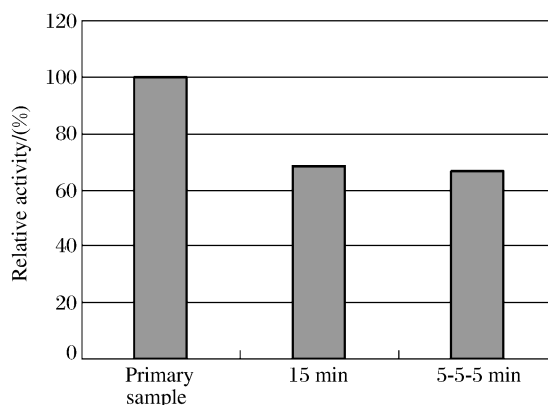


图 4 保压方式对海参自溶酶活性的影响

Fig. 4 Effect of pressure-keeping mode on holothurians autoenzyme activity

4 人工神经网络模拟

近年来,不少学者应用响应曲面法预测和优化超高压灭菌条件^[12-14],取得了较好的结果,但考虑到超高压处理参数和海参自溶酶残存活性之间存在很强的非线性关系,而神经网络在解决多影响因子的复杂非线性问题方面具有显著的优势,因而不需要有明确的数学物理模型就能得出比较精确的计算结果。而且近十几年来,人工神经网络技术在各个方面有了较好的应用,国外已有人将人工神经网络特别是 BP 网络应用于食品处理领域^[15-16]。因此,本工作尝试把人工神经网络用于超高压钝酶效果的预测。

本工作采用目前应用最为广泛的误差反向传播神经网络(Back Propagation Neural Network),即 BP 神经网络进行模拟研究。

4.1 网络参数的初步确定

(1) 确定网络层数

在闭区间的任何一个连续函数都可以用一个隐层 BP 网络逼近,一个 3 层的 BP 网络可以完成任意的 N 维到 M 维的映射,本模型采用 3 层网络^[17]。

(2) 确定网络输入层节点数 i

输入层的节点多少与预测指标个数相对应。本工作选择影响超高压钝酶效果最显著的两个因素(压力和保压时间)作为输入层的预测指标,输入层节点为 2 个。

(3) 确定隐含层(中间层)节点数 j

考虑到单隐含层网络的非线性映射能力较弱,为了达到预定的映射关系,隐含层节点宜适量增加,以增加网络的可调参数,最终确定隐含层节点为 12 个。

(4) 确定输出层节点数 k

采用海参自溶酶残存活性作为网络的输出,输出层节点为 1 个,即选用网络结构为 2-12-1 的 BP 神经网络。

(5) 确定转换函数

选择各神经元的传递函数均为 Logsig,设置 BP 网络的反传函数为 Trainlm。

4.2 样本集的选择与网络训练

4.2.1 样本集选择

选择实验中 8 组处理压力(200、250、300、350、400、450、500 和 550 MPa)、6 组保压时间(5、10、15、20、25 和 30 min)组合共 48 组数据作为样本集数据。其中温度条件为室温,海参为自然酸度。

4.2.2 训练集与测试集的选取

选择处理压力 400 MPa 与保压时间(5、10、15、20、25 和 30 min)组合共 6 组数据作为测试数据集,其余 40 组数据作为训练数据集。

4.3 网络训练、检验与模拟

4.3.1 网络训练

确定上述参数后,输入训练样本数据进行网络训练,图 5 为网络训练误差下降曲线图。经 2000 步训练后,训练误差达到 5×10^{-4} ,停止训练。

4.3.2 网络检验

网络训练结束后,利用检验样本集对网络进行测试,预测值与实验值进行比较,以验证预测结果的准确性,结果如表 1 所示。

由表 1 可知,用本研究提出的模型对室温条件下超高压处理钝酶效果的预测取得了较好效果,绝对误差在 0.69% 以下,最大相对误差为 1.28%,平均相对误差仅为 0.9%。

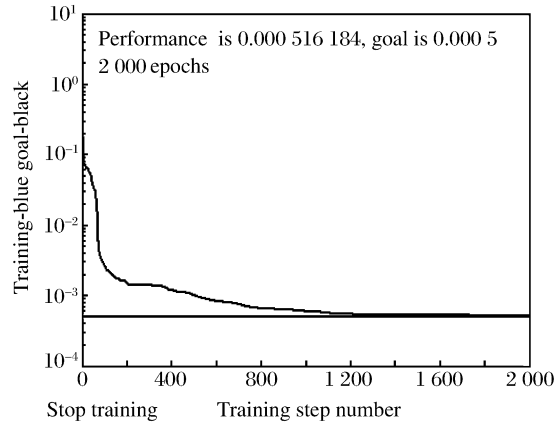


图 5 网络误差曲线

Fig. 5 Deviation curve of neural network

表 1 钝酶效果的预测值与实验值比较结果

Table 1 A comparison of predicted values with experimental ones

400 MPa test samples/(min)	Experimental values/(%)	Predicted values/(%)	Absolute error/(%)	Relative error/(%)
5	41.45	41.98	0.53	1.28
10	65.06	65.73	0.67	1.03
15	68.71	68.02	0.69	1.00
20	62.10	61.78	0.68	1.10
25	60.82	60.43	0.39	0.64
30	59.21	59.43	0.22	0.37

5 结 论

压力、保压时间和温度对钝酶效果具有显著影响。在保压时间为 20 min 的条件下,随着压力的增加,酶的残存活性先上升后下降,550 MPa 时自溶酶残存活性最低,为 29.81%,对应的钝化率为 70.19%。400 MPa 压力时,酶的残存活性在保压 5min 时较低,为 41.45%;之后酶活性随保压时间的增加反而升高,保压 15 min 达到最高值 68.71%;之后开始下降;保压 30 min 时酶残存活性下降到 59.21%。温度对酶活性的影响是随着温度的增加先升高,之后又下降,24 °C 室温和 62 °C 为酶活性较低点,分别为 62.10% 和 42.14%,40 °C 酶活性最高为 76.94%。保压方式对酶残存活性影响不显著。

利用 BP 神经网络预测室温条件下超高压钝酶效果,预测值与实测值比较,平均相对误差为 0.9%,表明神经网络系统性能良好,可以获得较好的预测结果。

References:

- [1] Wu R P, Chen Y, Fang J R, et al. Studies on the Chemical Constituents from Sea Cucumber *Mensamaria Intercedens* IV Isolation, Properties and Antitumor Activity of the Glycoprotein from *Mensamaria Intercedens* [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2000, 19(5): 4-6. (in Chinese)
吴萍茹, 陈 粤, 方金瑞, 等. 二色桌片参的化学成分研究 IV 二色桌片参糖蛋白的分离性质及抗肿瘤活性的研究 [J]. 中国海洋药物, 2000, 19(5): 4-6.
- [2] Huang Y L, Zheng Z H, Su W J, et al. Studies on the Chemical Composition of Sea Cucumber *Mensamaria Intercedens* III. Immunomodulative Effects of PMI-1 [J]. Marine Science Bulletin, 2001, 20 (1): 88-91. (in Chinese)
黄益丽, 郑忠辉, 苏文金, 等. 二色桌片参的化学成分研究: III 二色桌片参多糖-1——岩藻聚糖的免疫调节作用 [J]. 海洋通报, 2001, 20 (1): 88-91.
- [3] Maier M S, Roccatagliata A J, Kuriss A, et al. Two New Cytotoxic and Virucidal Trisulfated Triterpene Glycosides from the Antarctic Sea Cucumber *Staurocucumis Liouvillei* [J]. J Nat Prod, 2001, 64(6): 732-736.
- [4] Rodriguez E, Gonzalez M, Caride B, et al. Nutritional Value of *Holothuria Forskali* Protein and Effects on Serum Lipid Profile in Rats [J]. J Physiol Biochem, 2000, 56(1): 39-43.
- [5] Pacheco R G, Vicente C P, Zancan P, et al. Different Antithrombotic Mechanisms among Glycosaminoglycans Revealed with a New Fucosylated Chondroitin Sulfate from an Echinoderm [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2000, 11 (6): 563-573.
- [6] Shen H, Chen J, Li H, et al. Progress of Studies on the Culture Techniques of Sea Cucumber Worldwide [J]. Hebei Fisheries, 2007, (6): 3-5. (in Chinese)
沈 辉, 陈 静, 李 华, 等. 国内外海参养殖技术研究概况 [J]. 河北渔业, 2007, (6): 3-5.
- [7] Zhu B W, Han B. Characterization and Purification of *Holothurians* Autoenzyme [J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(4): 132-137. (in Chinese)
朱蓓薇, 韩 冰. 海参自溶酶的分离纯化和部分性质研究 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 132-137.
- [8] Anese M, Nicoli M C, Dallpaglio G, et al. Effect of High Pressure Treatments on Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities [J]. J Food Biochemistry, 1995, 18(4): 285-293.
- [9] 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.
- [10] Gomes M R A, Ledward D A. Effect of High-Pressure Treatment on the Activity of Some Polyphenoloxidases [J]. Food Chemistry, 1996, 56(1): 1-5.
- [11] Zeng Q M, Pan J, Xie H M, 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)
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.
- [12] Gao Y L, Wang Y X, Jiang H H. Optimization of Inactivation Conditions of High Hydrostatic Pressure Using Response Surface Methodology [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(10): 1544-1549. (in Chinese)
高瑛珑, 王允祥, 江汉湖. 超高压杀菌条件的响应曲面法优化研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1544-1549.
- [13] Gao Y L, Wang Y X, Jiang H H. Optimization of Conditions to Sterilize *Staphylococcus Aureus* by Ultra-High Hydrostatic Pressure Using Response Surface Methodology [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2004, 18 (3): 273-278. (in Chinese)
高瑛珑, 王允祥, 江汉湖. 响应曲面法优化超高压杀灭金黄色葡萄球菌条件的研究 [J]. 高压物理学报, 2004, 18 (3): 273-278.
- [14] Huang X D, Pan J, Xie H M, et al. Effects of Bacteria Concentration on Sterilization of *Escherichia Coli* in High Pressure Process [J]. Food Science, 2007, 28(2): 169-173. (in Chinese)
黄训端, 潘 见, 谢慧明, 等. 菌液浓度对大肠杆菌超高压杀灭效果的影响 [J]. 食品科学, 2007, 28(2): 169-173.

- [15] Otero L, Antonio D, Molina G. A Model for Real Thermal Control in High-Pressure Treatment of Foods [J]. *Bio-technol Prog*, 2002, 18(4): 904-908.
- [16] Torrecilla J S, Otero L, Sanz P D. A Neural Network Approach for Thermal/Pressure Food Processing [J]. *Journal of Food Engineering*, 2004, 62(1): 89-95.
- [17] Yu S, Wang H X, Ma Y J. Three-layer BP Network Model for Estimation of Casualties in an Earthquake [J]. *Journal of Earthquake Engineering and Engineering Vibration*, 2005, 25(6): 113-117. (in Chinese)
于山, 王海霞, 马亚杰. 三层BP神经网络地震灾害人员伤亡预测模型 [J]. *地震工程与工程振动*, 2005, 25(6): 113-117.

Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on Holothurians Autoenzyme Activity

XIA Yuan-Jing¹, LIU Zhi-Jun¹, LI Ning², CHEN Shu-Hua¹,
DENG Ji-Song¹, LIU Xue-Wu¹, LI Zhi-Yi¹

(1. *R&D Institute of Fluid and Powder Engineering,*
Dalian University of Technology, Dalian 116012, China;

2. *Department of Bioscience and Bioengineering,*
Dalian University of Technology, Dalian 116023, China)

Abstract: The high hydrostatic pressure treatment on sea cucumber has many advantages over traditional processes and it has a promising future. Effects of processing parameters on holothurians autoenzyme activity were investigated within the range of the parameters: the processing pressure of 0.1~550 MPa, the pressure-keeping time of 0~30 min, the processing temperature of 24~62 °C. Under the room temperature and pressure-keeping time of 20 min, the autoenzyme activity decreased to 88.25% at 200 MPa, increased to 106.77% at 250 MPa, and reached the lowest level of 29.81% at 550 MPa. The holothurians autoenzyme activity increased first and then decreased with the increasing of pressure-keeping time and temperature. The effect of pressure-keeping mode on holothurians autoenzyme activity was not significant. The BP artificial neural network was used to predict the effects of high pressure on holothurians autoenzyme. Compared with the experimental results, the average relative error of predicted results was 0.9%. The experimental results show that the holothurians autoenzyme can be activated and inactivated at certain pressure, pressure-keeping time and temperature. The study provides some valuable information for optimizing the high hydrostatic pressure treatment of holothurians autoenzyme inactivation.

Key words: high hydrostatic pressure treatment; sea cucumber; autoenzyme; artificial neural network