DOI: 10.11858/gywlxb.20230815

原位技术在超高静压食品加工中的应用研究进展

林颖凤[1], 付 超[2], 张司南[1], 姚雪霜[1], 郑镇洪[1], 杨嘉欣[1], 蒋 卓[1]

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642;
2. 塔里木大学食品科学与工程学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要: 超高静压加工技术可应用于食品灭菌、改良食品品质以及活性成分提取等。传统研究中, 高静压下的有机物结构及功能分析均是在压力释放后进行的, 只有在压力施加过程中发生了不可逆变化才能在卸压后被测量出来, 鲜少进行压力施加过程中的原位监测。原位测量可提供样品动态信息并了解其变化过程。基于此, 近年来发展了许多高压下的原位研究工作。本文综述了高压原位分析技术的发展及其在高静压食品加工中的应用, 主要包括高压下的蛋白质折叠与变性、淀粉糊化机理的原位研究、微生物原位监测等, 并总结了原位技术在食品加工中的挑战。

关键词: 原位技术; 蛋白质; 碳水化合物; 微生物

中图分类号: O521.9; Q518.4 **文献标志码:** A

随着高压研究的不断深入, 高压科学逐渐成为一门独立的学科, 涵盖高压物理、高压化学、高压地学、高压生物学等。早期研究主要集中于高压物理领域, 如高压合成新材料(金刚石[1] 等)、高压下化合物的物理性质(超导[2] 等)、高压下物质的结构变化(水的结构变化[3]、金属氢的形成[4–5] 等)。近年来, 高压生物学研究拓展至很多领域, 如: 高压蛋白质变性和结晶、高压生物活性成分提取、高压诱导育种、高压微生物灭活、高压冷冻和器官保藏等。在这些高压生物学研究领域中, 高静压(high hydrostatic pressure, HHP)技术在食品加工中的应用较为广泛。HHP 食品加工技术通常是指在常温或低温环境下将食品材料放置在 100～1 000 MPa 压力下处理一段时间, 以达到灭菌、钝化酶从而延长食品保存期的目的, 同时它也是改善食品品质的一种加工方法[6–7]。Deng 等[8] 发现 HHP 可引起大肠杆菌 O157:H7 的膜损伤, 且随着处理压力的增大, 活菌总数显著减少至完全灭活; Torres-Ossandón 等[9] 将 HHP 与超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)技术相结合, 从开普醋栗果肉中提取了具有抗氧化能力的生物活性化合物(酚类和 β-胡萝卜素); Qin 等[10] 研究了 HHP 处理对核桃分离蛋白的理化性质和功能特性的影响, 发现随着处理压力的升高, 溶解度、游离巯基含量和表面疏水性显著改变, 表明部分蛋白质发生变性和聚集。

目前, 对 HHP 的研究主要以非原位技术为主, 均是在卸压后进行相关指标的测量和分析, 无法实现相关指标的实时原位监测和表征。而原位技术则可以在样品处理工况下实时采集各种直接或间接指标进行分析, 提供样品更多的动态信息, 有助于更加深入地理解样品相关的变化机理。本文将结合国内外最新研究成果, 简述高压原位技术的整体发展历程, 同时结合 HHP 技术的特点, 针对性总结高压原位技术在食品加工中的应用情况, 主要包括: HHP 下蛋白质变性和酶的失活机理、高压诱导淀粉糊化、微生物的灭菌机理等。

* **收稿日期:** 2023-12-15; **修回日期:** 2024-03-03
基金项目: 国家自然科学基金(22078117)
作者简介: 林颖凤(1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事超高压灭菌研究. E-mail: 1014137257@qq.com
通信作者: 蒋 卓(1986—), 男, 博士, 副教授, 主要从事超高静压食品加工技术、高压原位技术研究. E-mail: jiangzhuo@scau.edu.cn

1　高压原位技术

高压原位装置主要由高压加载装置和监测装置两部分组成。金刚石对顶砧(diamond anvil cell, DAC)是目前应用最广泛的高压装置之一，如图 1 所示[11]。由于金刚石对大部分电磁波有良好的透射性，如 X 射线、紫外线、γ 射线以及红外光等，因此，将 DAC 与光谱系统结合，衍生出了高压拉曼光谱、高压红外光谱、高压 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)、高压荧光光谱等高压原位监测手段[12]。

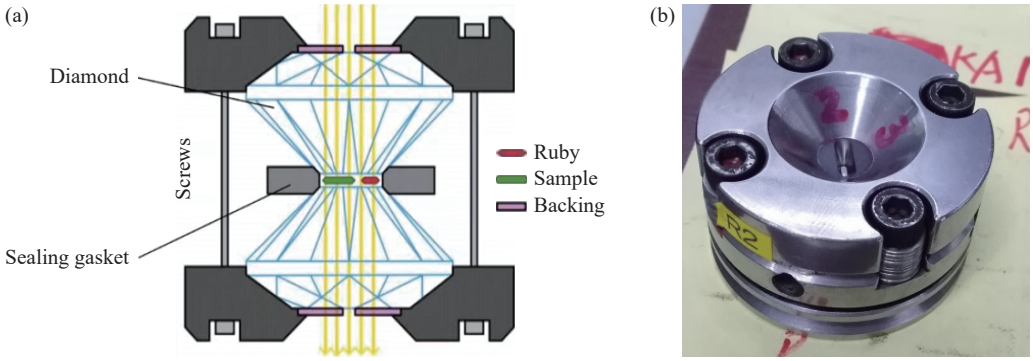
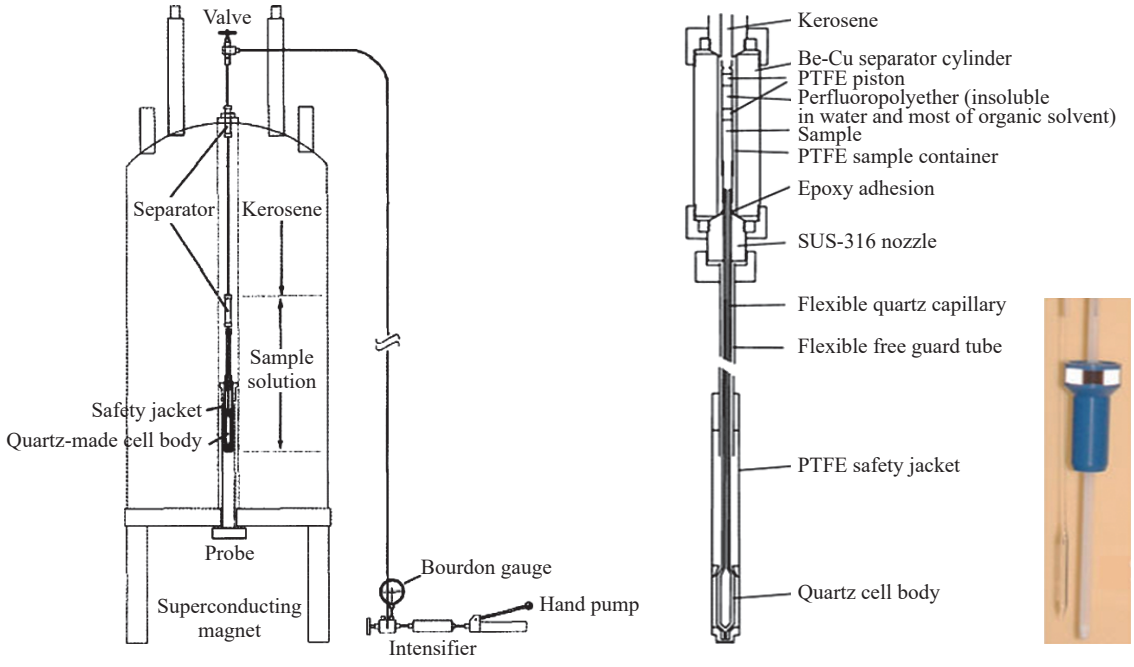


图 1　DAC 高压装置示意图(a)和实物照片(b)[11]

Fig. 1　Schematic diagram (a) and physical picture (b) of DAC high pressure device[11]

如图 2 所示，高压核磁共振(magnetic resonance imaging, NMR)的高压加载装置与 DAC 有所不同，一般选用一个强度很大、不带磁的微型高压圆管作为高压腔，采用外接手摇泵实现加压。目前，该类高压 NMR 装置的压力最高可达 700 MPa，可用来确定分子结构[13]。



(a) Online cell high pressure NMR system　　(b) Design details of the high pressure cell

图 2　高压 NMR 装置示意图[13]

Fig. 2　Schematic diagram of high-pressure NMR equipment[13]

中子不仅能很好地反映 H 原子的信息，也能准确反映酶的活性位点变化。在高压中子实验中，通常采用类似 Paris-Edinburgh 压腔(PE-cell)的装置进行加压，如图 3 所示。HHP 处理前先在球形模具里对样品进行预压，将预压后的样品装入钢制“帽子”里，将另外一个相同“帽子”的下部分与装有样品的“帽子”连在一起，内部 2 个半球形凹槽组成一个球形空间。将 2 个“帽子”一上一下整体放入 PE-cell 压

砧中，帽檐外部用钢制圆环固定。使用压机和单凹曲面碳化钨（WC）压砧在高压下对样品进行原位研究。

由于 DAC 腔体、高压 NMR、高压差示扫描量热法（differential scanning calorimetry, DSC）的高压腔体均较小，在实际操作过程中，样品的回收难度很大。另外，由于原位光谱手段有限，获得的信息多为样品的结构信息，而表面形貌及功能信息则较少。因此，为了更好地表征压力或温压协同作用对样品的影响，多采用原位与非原位手段相结合的方式。



图 3　PE-cell 实物照片

Fig. 3　Physical picture of PE-cell

2　高压原位技术在生物大分子研究中的应用

近年来，借助高压原位技术开展生物大分子的研究工作越来越多。通过结合各种原位技术手段，人们研究了高压下常见氨基酸、短肽和碳水化合物的结构变化及相变区间。研究发现，在高压作用下，常见氨基酸存在不同的结构变化和相变压力区间，且相变大多是由氢键引起的可逆变化，卸压后可恢复为原结构[14–20]。Fu 等[21] 对还原型 L-谷胱甘肽进行了研究，结果表明：在 1.8～2.2 GPa 和 4.1～5.3 GPa 两个压力区间内，氢键发生相变，晶体表面形成了较多氢键，且晶体形状逐渐趋于圆形；在高压作用下，S—H···O 氢键的强度持续增强，O—H···O 氢键的强度有微弱的改变，C—H···O 氢键的强度出现部分增强、部分减弱的现象，且晶体间的 H···H 逐渐增多，说明晶体形成的斥力逐渐增大。

HHP 处理对碳水化合物结构影响的研究工作主要是通过 DAC 结合各种光谱和 XRD 技术完成的，实现了对单糖、二糖晶体以及多糖悬浮液进行原位实时监测实现的。戴超[22] 进行了高压下 D-半乳糖和 D-乳糖的拉曼光谱研究，发现 2 种糖在高压下都具有相变压力区间，且相变的发生可能与晶格振动、分子间的氢键断裂等因素有关。此外，研究发现，葡萄糖[23]、果糖[24] 等在 HHP 下都存在相变压力区间，且在高压下的结构改变是可逆的。Zheng 等[23] 通过高压原位拉曼光谱以及高压原位红外光谱研究了葡萄糖在 0～10 GPa 内的结构变化，结果表明：正交晶型 D-葡萄糖晶体在 5.0 GPa 时发生结构改变，但仍保留原有的空间群；发生结构改变的主要原因是压力导致葡萄糖晶体产生了新的 C—H···O 氢键，同时原有的 O—H···O 氢键断裂，氢键网络重排，进而导致晶体结构对称性改变。

3　原位技术在超高静压食品加工中的应用

食品超高压加工技术最早被应用于灭菌及钝化酶研究，多用于延长食品的保存期。方亮[25] 利用 HHP 技术对猕猴桃果汁中酶的钝化工艺进行研究，发现压力在 400 MPa 以上时，过氧化物酶（peroxidase, POD）明显失活，且随着作用时间延长，酶活的降低更明显。在传统研究中，高压下有机物结构及功能分析均是在压力释放后进行的，无法观察到物质在压力变化过程中的实时情况。

越来越多的生物学家意识到生物大分子的动力学性质对其功能在更深层次上具有决定性作用[26]，江波等[27] 提出，HHP 加工过程中酶蛋白分子的原位结构分析及生化指标变化是当前困扰超高压食品加工的瓶颈问题之一，而原位监测与表征可以在样品处理工况下实时采集各种直接或间接指标进行分析，可提供更多样品的实时信息。除此之外，借助原位手段或原位与非原位相结合的手段，可以更加深入地理解高压下的淀粉糊化机理、微生物灭活机理及其动态变化等。

3.1　在蛋白质和酶中的应用

结合食品加工需求，杀菌和钝化酶是当前 HHP 研究最多的方向。相比于高压对酶结构及活性的

影响，高压下蛋白质结构和功能的变化研究更为深入[28]。在高压下，蛋白质的体积会被压缩，进而改变蛋白质的次级结构。酶或蛋白质空间结构的变化大多不是一步完成的[29]。现有的 HHP 设备难以实现准确控制卸压速度及卸压压力点，卸压过程中蛋白质构象的变化以及恢复情况难以被观察到。一些学者借助 DAC 对高压下的蛋白质结构进行了原位监测。Mangialardo 等[30] 利用高压拉曼光谱技术对不同压力下胰岛素结构变化进行研究，结果表明：胰岛素在 0～4.2 GPa 范围内具有较强的稳定性；当压力大于 4.2 GPa 时，胰岛素结构发生了不可逆变化；当压力释放时，胰岛素会呈现一种新的构象状态。

为更好地表征溶液中蛋白质结构的整体图像，小角 X 射线散射（small angle X-ray scattering, SAXS）研究越来越多。Möller 等[31] 利用 SAXS 技术原位研究了高压下蛋白质分子的相互作用，发现蛋白质的相互作用电位在很宽的温度、盐和蛋白质浓度范围内以非线性方式变化。温度、蛋白质和盐浓度均不会导致分子间相互作用电位的压力依赖性发生明显变化，说明水结构的变化主导了分子间作用力的压力依赖性。其结果对于理解蛋白质的聚集和纤颤、结晶及其相行为具有重要意义。蛋白质通常以多种构象状态存在于溶液中，高压 NMR 和高压荧光技术很适合确定这些状态。Nagae 等[32] 研究了来自陆地细菌 S. oneidensis 的 3-异丙基苹果酸脱氢酶（IPMDH）在高压下的结构变化。如图 4 所示，IPMDH 内腔被压缩，体积随着压力的升高而减小。在二聚体界面处，一个较大的空腔体积也随着压力的增大而减小。随着压力增大，在二聚体界面处的一个特定空腔体积也会增大（箭头处），超过 410 MPa 时水可以渗入腔体。此外，在超过 580 MPa 压力下，还可观察到分子表面产生新的裂隙并伴有水渗透，这些渗水现象是 IPMDH 压力变性过程的初始步骤。

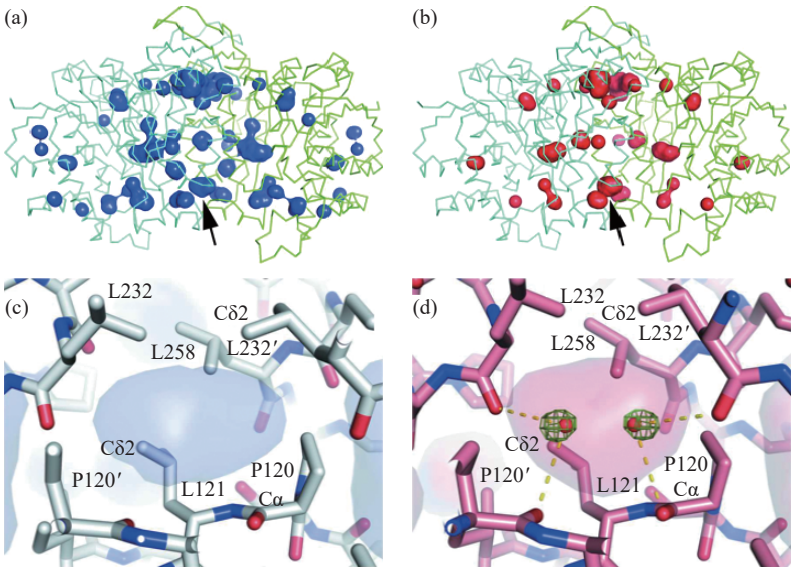


图 4　IPMDH 二聚体的内部腔和观察到的水渗透：0.1 MPa (a) 和 580 MPa (b) 下 IPMDH 二聚体的内部空腔表面表征，0.1 MPa (c) 和 580 MPa (d) 下空腔周围的放大图

Fig. 4　Internal cavities of the IPMDH dimer and observed water penetration: (a) and (b) show internal cavities of the IPMDH dimer as surface representations at 0.1 and 580 MPa, respectively; (c) and (d) are magnified views around the cavity at 0.1 and 580 MPa, respectively

Roche 等[33−34] 采用原位高压技术监测高压下葡萄球菌核酸酶超稳定变体（SNase）及其几个突变体的体积变化情况。这项研究为蛋白质化学领域中近百年具有争议的问题，即压力效应对蛋白质的影响提供了答案。如图 5 所示，高压下 SNase 的体积变化主要是由原生 SNase 三维结构内残留空腔引起的。压力使得蛋白质结构展开，蛋白质在折叠状态下存在空腔，而在展开状态下空腔消失。通过原位高压技术可探明蛋白质折叠景观的结构细节。

现有的研究表明，HHP 对部分酶（如脂肪氧化酶）具有良好的钝化效果，也有部分酶的活性在一定压力内有所提高，如脂肪酶[35]。此外，还有部分酶如多酚氧化酶（polyphenol oxidase, PPO）[36]、POD[37] 则

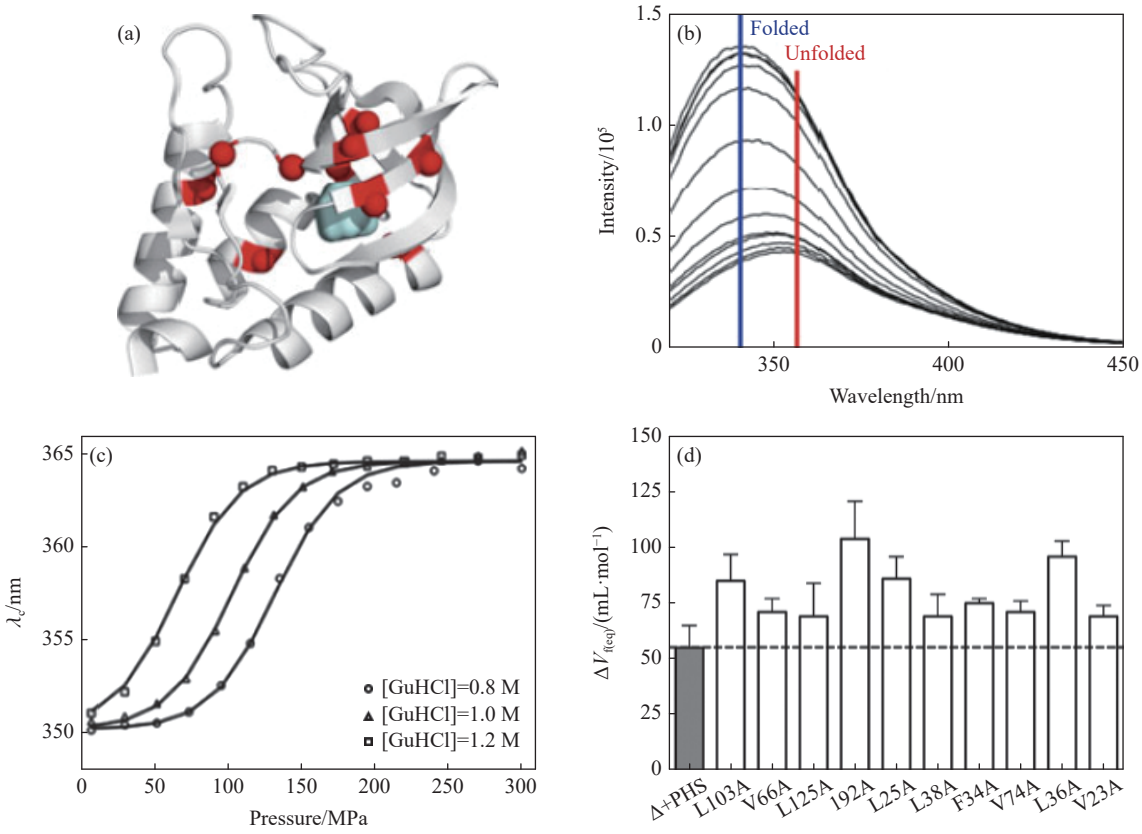


图 5　SNase 及其空腔突变体的展开: (a) SNase 3D 结构和 (b) SNase 色氨酸(trp140)荧光谱, (c) I92A 空腔突变体的高压荧光平均发射波长分布, (d) SNase 及其 10 个空腔突变体的体积

Fig. 5　Unfolding of SNase and cavity-containing variants: (a) SNase 3D structure and (b) fluorescence emission from SNase tryptophan (trp140); (c) high-pressure fluorescence average emission wavelength profile for I92A variant; (d) volume measurements were performed on SNase and its 10 cavity mutants

表现出极强的耐压性, 在 HHP 下无法完全钝化, 限制了超高压在新鲜果蔬加工中的应用。PPO 和 POD 是引起食品褐变的 2 种主要酶, 也是最耐压的 2 种酶, 因此, 如何在果蔬加工中尽量降低其活性成为研究的重点[38]。Zhang 等[39] 借助高压拉曼光谱和原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)等技术研究 HHP 对辣根过氧化物酶(HRP)活性和热稳定性的影响, 发现 HHP 能使 HRP 分子聚集形成较大的团聚体(图 6), 影响 HRP 的活性中心, 使血红素与色氨酸残基之间的距离不断减小, 并引起血红素中铁的氧化、自旋和配位状态的变化。此外, HRP 的热稳定性将随着压力的升高继续下降, 表明在室温或低温下完全灭活水果和蔬菜中的 POD 酶是可能的。Chen 等[40] 通过原位技术研究高温高压下中华根

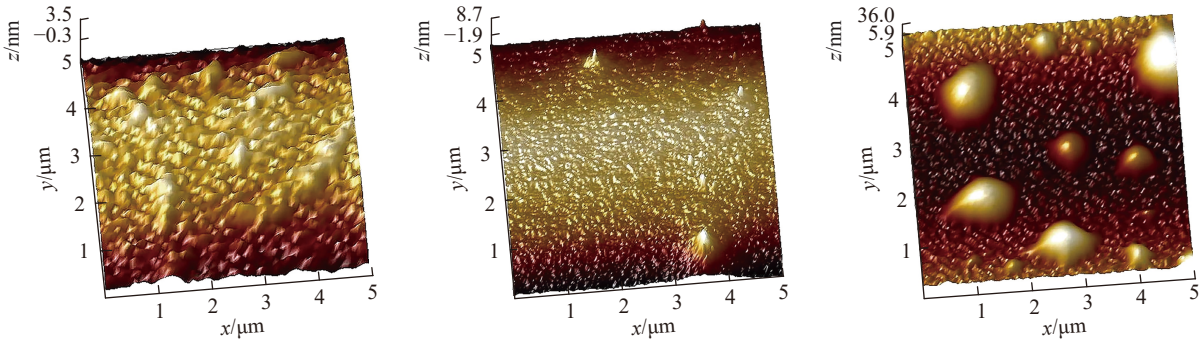


图 6　不同压力下 HRP 溶液的 AFM 图像

Fig. 6　AFM images of HRP solution under different pressures

霉脂肪酶(*Rhizopus chinensis* lipase, RCL)的构象性状和生物行为，发现高压下其荧光强度(fluorescence intensity, FI)高于大气压下，表明 HHP 改变了脂肪酶的构象状态。然而，当样品减压时，FI 仅部分恢复。FI 的增加表明，Trp 残基的深度可能发生了变化，即更容易被溶剂接近或更容易被周围的氨基酸残基掩埋。酶分子中的某些区域具有高度的柔韧性，使酶能够抵抗构象变化，并在去除外部因素后恢复其先前的构象，采用原位技术即可监测该部分现象。

3.2　在淀粉糊化中的应用

淀粉是一种典型的碳水化合物。当淀粉颗粒在有水的情况下加热时，淀粉发生糊化，较弱的无定形区域的氢键断裂并吸收水分，但结晶部分的强键保持其颗粒结构，直到断裂并完全破坏。在此过程中，直链淀粉在水中释放，悬浮液的黏度增加[41]。HHP 处理淀粉可打破或改变淀粉分子内部和分子之间的非共价化学键，水在压力作用下强制进入淀粉颗粒，能够增加其水化程度，破坏淀粉颗粒的形态，导致淀粉糊化，从而降低颗粒的双折射，获得所需的淀粉特性[42−43]。

图 7 和表 1 分别给出了土豆淀粉的高压糊化过程和非原位高压糊化实验的热力学数据。一般来说，不同结晶型的淀粉糊化所需压力不同，A-型淀粉对 HHP 最敏感，C-型淀粉次之，B-型淀粉比 A-型淀粉更耐压力[44]。Lin 等[45] 利用高压拉曼技术对 3 种不同结晶型淀粉进行原位监测，发现了糊化的动态过程：A-结晶型的玉米淀粉在 400 MPa 时体积开始膨胀发生糊化；B-结晶型的土豆淀粉在 600 MPa 下发生淀粉糊化；而 C-结晶型的豌豆淀粉在 500 MPa 时完全糊化。在常温常压下，土豆淀粉颗粒为椭圆形，

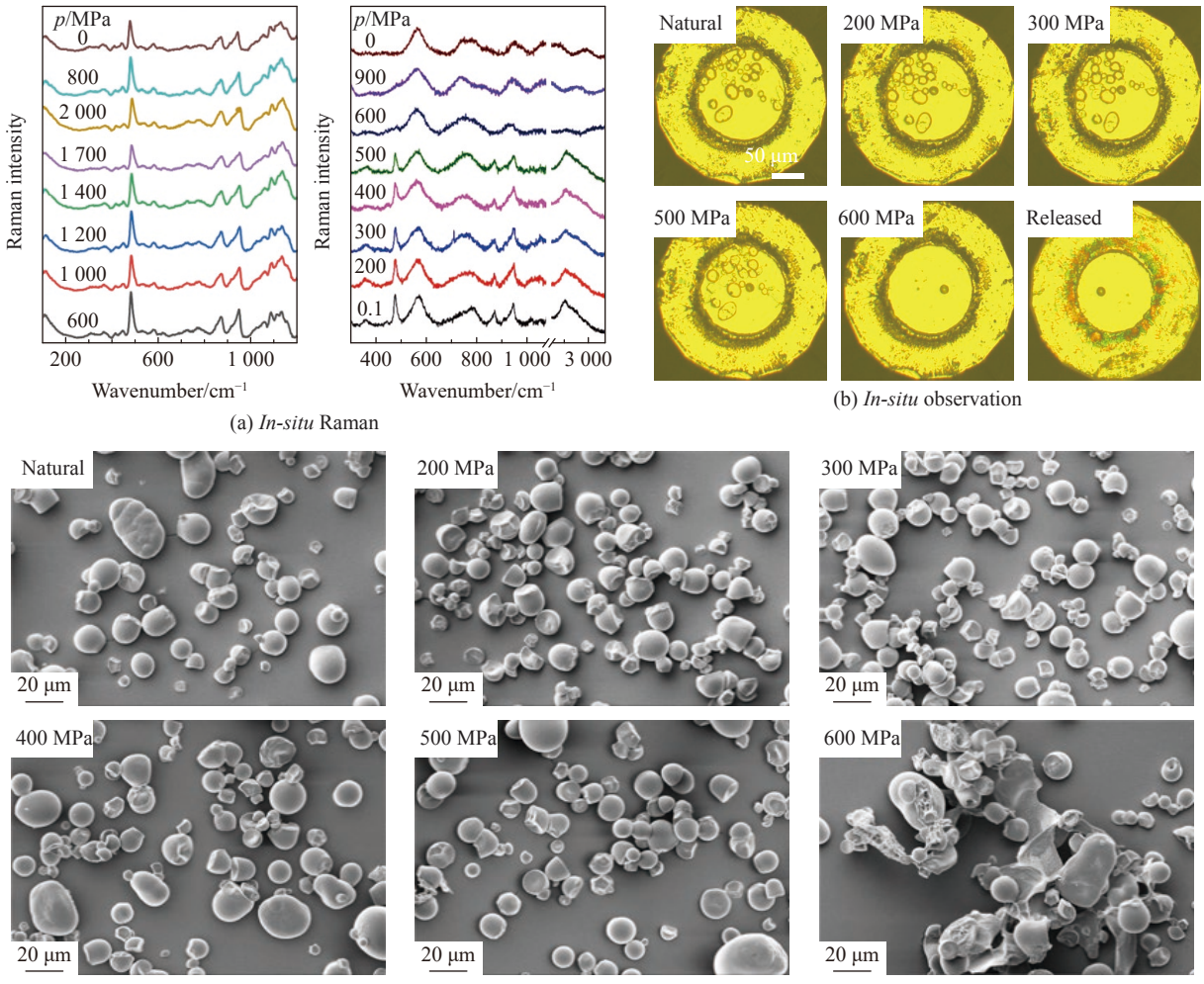


图 7　高压原位和非原位方法研究土豆淀粉的高压糊化过程

Fig. 7　High pressure gelatinization process of potato starch through combined high pressure *in-situ* and *ex-situ* study

颗粒饱满；当压力增加到 500 MPa 时，土豆淀粉依然维持现有颗粒形态，但颗粒发生些许膨胀；当压力达到 600 MPa 时，代表淀粉晶体结构有序性的拉曼峰（477 cm^{-1} 处）以及与 C—C—H 剪切振动和 C—O—H 剪切振动有关的拉曼峰（867 cm^{-1} 处）消失，说明压力处理导致淀粉分子顺序变化和结晶度损失，表明发生了土豆淀粉糊化。而在非原位状态下，无法在压力存在下测量淀粉的糊化情况，仅能在卸压后进行热力学性质测试和电子显微镜观测。将原位与非原位测量方式结合可更好地研究糖类晶体及淀粉糊化的动态过程。

表 1　土豆淀粉的非原位高压糊化实验的热力学数据[45]

Table 1　Thermodynamic data of potato starch non *in-situ* high-pressure gelatinization experiment[45]

Pressure/MPa	Onset temperature/℃	Peak temperature/℃	Conclusion temperature/℃	Enthalpy of gelatinization/($J·g^{-1}$)	Gelatinization degree/%
0	$52.7±0.3^{b}$	$58.3±0.5^{c}$	$66.2±1.0^{abc}$	$3.163±0.043^{a}$	
200	$53.3±0.2^{b}$	$59.8±0.5^{b}$	$67.0±0.2^{a}$	$2.878±0.066^{b}$	9.01
300	$52.9±0.7^{b}$	$58.8±0.9^{bc}$	$65.5±0.6^{bc}$	$2.846±0.127^{b}$	10.02
400	$53.4±0.5^{b}$	$58.7±0.8^{bc}$	$65.1±0.8^{c}$	$2.435±0.065^{c}$	23.01
500	$55.0±0.1^{a}$	$59.5±0.1^{b}$	$65.6±0.4^{bc}$	$2.188±0.037^{d}$	30.82
600	$55.9±1.6^{a}$	$62.4±1.5^{a}$	$66.5±0.5^{ab}$	$0.353±0.082^{e}$	88.84

Note: Different letters (Superscript a, b, c, d, e) in the same column indicate significant differences (P<0.05).

3.3　在微生物方面的应用

HHP 技术具有很多优点，其中之一是可杀灭食品中的微生物。HHP 可引起细胞膜破裂、菌体内成分泄漏，从而导致生命活动停止，亦可造成微生物菌体破坏而死亡。图 8 为曾庆梅等[46] 通过透射电镜（TEM）观察 HHP 处理后的枯草芽孢杆菌，发现经 HHP 处理后其营养体和芽孢呈现多种破坏形式。营养体细胞壁局部被破坏，胞质泄漏，细胞中部出现透电子区（图 8(c) 中标记 3 处）或外壳皱缩，胞浆层次消失（图 8(d) 中标记 2 处）。芽孢内含物泄漏，出现大片透电子区（图 8(c) 中标记 1 处）或内含物结构紊乱，出现部分透电子现象（图 8(c) 中标记 2 处），细胞壁或孢子外壳残留（如图 8(c) 中标记 4 处），上部芽

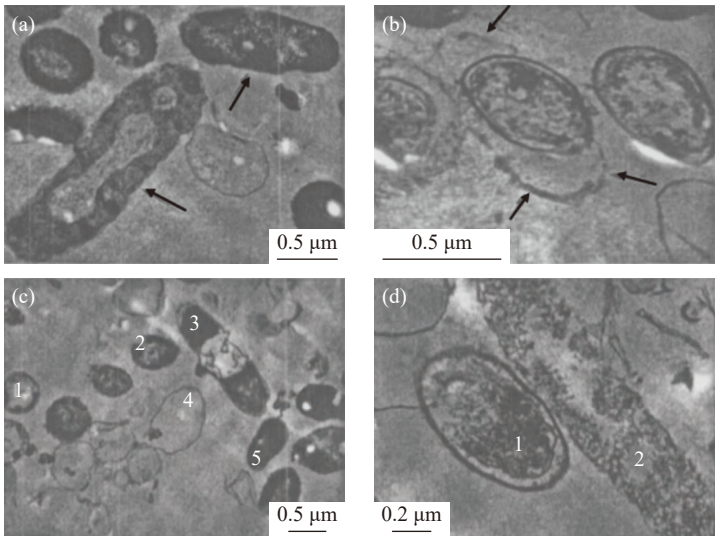


图 8　枯草芽孢杆菌的 TEM 图像：枯草芽孢杆菌的 (a) 正常营养形态和 (b) 正常孢子（箭头指向营养细胞壁的残余），(c)～(d) 高温灭菌后枯草芽孢杆菌的营养物质和孢子

Fig. 8　TEM images of *Bacillus subtilis*: (a) normal vegetative form and (b) normal spore of *Bacillus subtilis* (Arrowheads point to the remains of vegetative cell wall); (c)–(d) nutrients and spores of *Bacillus subtilis* after HHP

孢的外壳和皮质层模糊，核区出现透电子区（图 8(d) 中标记 1 处），从图 8(c) 中标记 5 处还可以看到，芽孢的内含物正在向外泄漏。上述现象说明，HHP 处理可有效杀灭食品中的微生物。然而，由于目前基本是在压力释放后才进行微生物的各项生理特性及形态结构表征检测，无法实时观测微生物在加压或泄压过程中的具体变化，因此，将原位光谱引入微生物检测具有广阔的应用前景。

原位光谱是微生物研究的重要工具之一[47–48]，可实时观测压力下微生物的具体变化。与常用的荧光显微镜相比，拉曼光谱法不需要将外源探针引入细胞，可以实现无标签成像。Oger 等[48] 为研究 HHP 处理后 DAC 下酵母的细胞周期，利用原位拉曼光谱精确动态监测了其在 DAC 下的代谢活性。如图 9 所示，选择乙醇的对称 C－C 拉伸模式（883 cm^{-1}）作为参考峰，24 h 后对称 C－C 的拉伸模式峰明显增强，说明 DAC 下培养基中的葡萄糖被利用并生成了乙醇。该结果说明，将定量拉曼光谱技术与 DAC 结合可原位监测微生物的生长。Oger 等[47] 使用改进的新型 DAC 结合 X 射线光谱，原位监测 HHP 下根癌农杆菌对亚硒酸盐的还原作用。X 射线吸收近边结构（X-ray absorption near edge structure, XANES）光谱显示，24 h 内溶液中的亚硒酸盐逐渐被取代，24 h 后还原完成，XANES 光谱不再显示亚硒酸盐的“贡献”，因此使用原位高压光谱可实时动态监测溶液中亚硒酸盐被取代的过程。以上结果表明，原位光谱分析的应用潜力巨大，可获得 HHP 下微生物原位代谢的新定量测量结果。

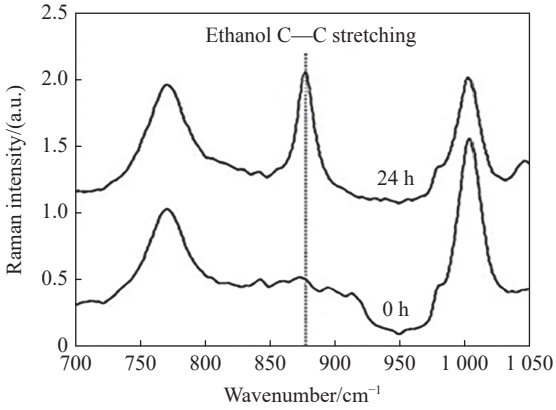
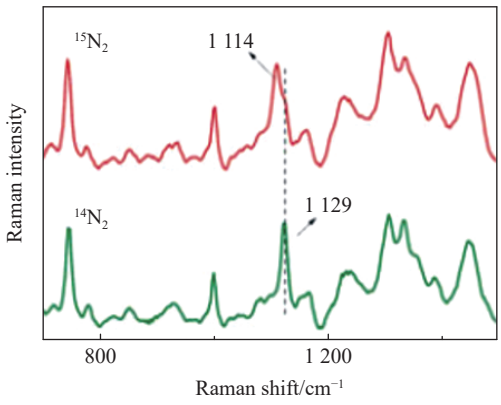


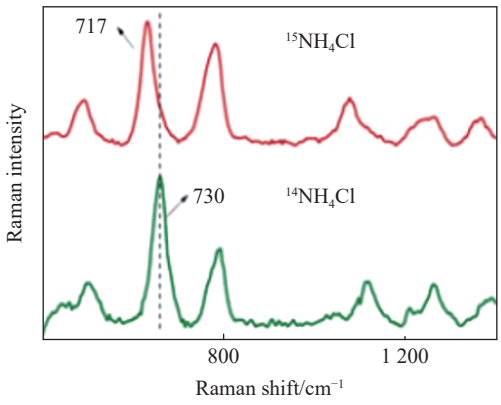
图 9　DAC 内培养液在 30 ℃、25 MPa 条件下培养 24 h 前后的拉曼光谱

Fig. 9　Raman spectra of the culture medium inside the DAC at 30 ℃ and 25 MPa before and after 24 h incubation

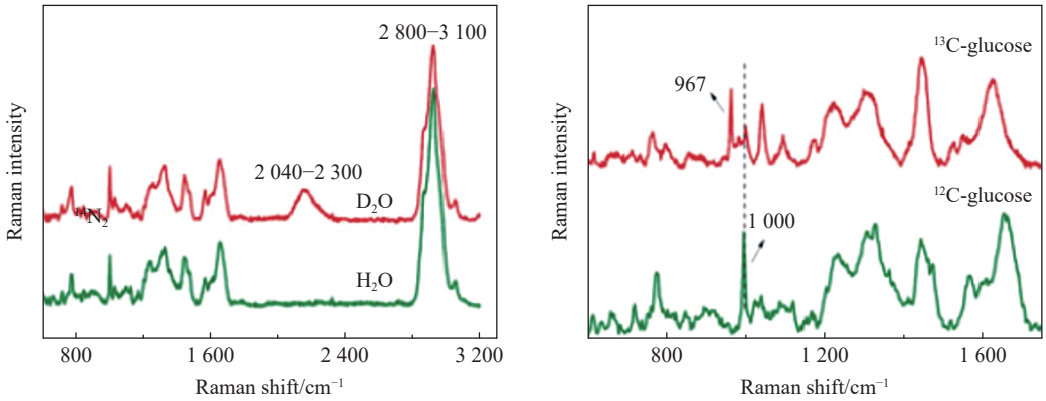
单细胞拉曼显微光谱技术是一种非破坏性、无外部标记的方法，可根据细胞内特征化学键的振动频率提供全面的内在分子轮廓[49–50]。通过与稳定同位素标记（stable isotope probing, SIP）、拉曼成像等技术结合，探究微生物细胞对物质吸收后的特征峰变化，从而推导微生物的生长过程和物质循环过程。拉曼技术与稳定同位素标记联用（Raman-SIP）主要是使用 ^{13}C、^{15}N 和 ^{2}H 取代原始同位素，目前已被广泛用于微生物识别，其中 ^{13}C 标记化合物在微生物中的应用最为广泛。通过拉曼光谱可明显观察到，微生物细胞的拉曼光谱带发生频移[51]，使得直观研究单个微生物的功能和特性成为可能。Noothalapati 等[52] 研究表明，与未标记细胞的光谱相比，随着 ^{13}C 含量的增加，麦角甾醇同位素的拉曼光谱带发生了频移，进一步证明了分配到麦角固醇的共轭 C＝C 拉伸模式。Cui 等[53] 运用 Raman-SIP 方法研究了环境样品中的功能性与活性微生物，从图 10 中可以看出，与未标记的拉曼光谱相比，同位素标记的细菌的拉曼光谱发生了明显频移，标记的拉曼峰频移可识别功能性细菌或活性细菌。



(a) Raman spectra of Azotobacter sp. labeled by $^{15}N_2$



(b) SERS spectra of *E. coli* labeled by $^{15}NH_4Cl$



(c) Raman spectra of *E. coli* labeled with D_2O　　(d) Raman spectra of *E. coli* labeled with ^{13}C-glucose

图 10　未标记(绿色)和完全同位素标记(红色)细菌的单细胞拉曼/SERS 光谱

Fig. 10　Single-cell Raman/SERS spectra of unlabeled (green) and fully isotope-labeled bacteria (red)

拉曼成像技术是基于样品的拉曼光谱生成详细的伪彩色图像，需要多个拉曼波段成像，能够揭示样品的成分及其空间分布状况[54−59]。将拉曼成像与 SIP 联用，可区分通过不同合成代谢途径和时间演变产生的微生物细胞组分。Venkata 等[60] 通过 SIP 与拉曼成像结合，利用蛋白质和脂质的特征拉曼谱带，动态观察培养基中^{13}C-葡萄糖被同化为细胞内成分的过程(图 11)。结果表明，随着细胞内脂质浓度的增加，由结合的^{13}C 底物新合成的蛋白质特异性定位于脂滴中，揭示了单分裂酵母细胞中脂滴的动态

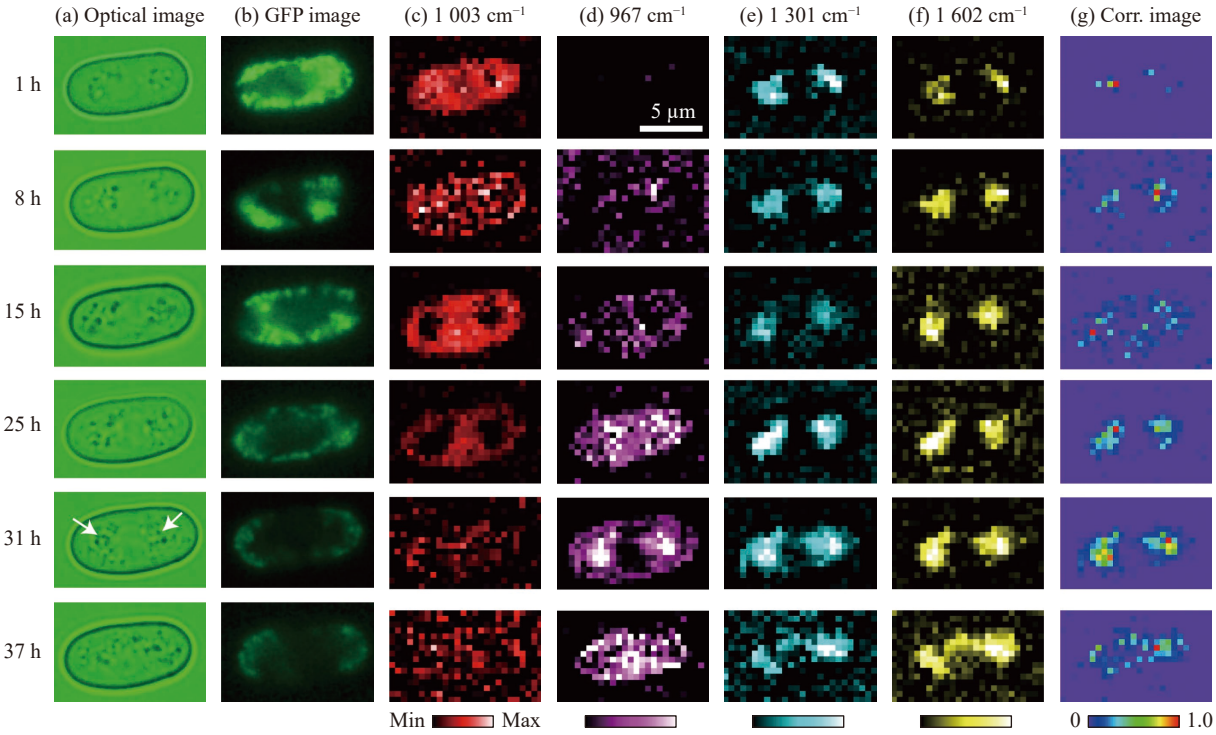


图 11　(a) 在含^{13}C-葡萄糖的培养基中生长的单个裂殖酵母活细胞的延时多模式拉曼成像目标细胞的亮场光学图像(31 h 的箭头表示脂滴，被识别为黑点)，(b) 细胞线粒体的 GFP 荧光图像，(c)～(f) 分别在 1 003 cm^{-1}(^{12}C-蛋白质的苯环呼吸模式)、967 cm^{-1}(^{13}C 取代蛋白质的苯环呼吸模式)、1 301 cm^{-1}(脂质的平面内 CH_2 扭曲)和 1 602 cm^{-1} 处的拉曼图像，(g) (d) 与 (e) 的关联图像

Fig. 11　(a) Time-lapse multimode Raman imaging of single living S. pombe cell grown in ^{13}C-glucose-containing medium bright-field optical images of the target cell. (The arrow at 31 h represents lipid droplets, which was recognized as black dots.); (b) GFP fluorescence images of the cell's mitochondria; (c)–(f) Raman images at 1 003 cm^{-1} (Phe breathing mode of ^{12}C-proteins), 967 cm^{-1} (Phe breathing mode of ^{13}C-substituted proteins), 1 301 cm^{-1} (in-plane CH_2 twist of lipids), and 1 602 cm^{-1}; (g) correlation images between (d) and (e)

蛋白质组定位。因此，若能将原位技术与 Raman-SIP 或拉曼成像技术结合起来，将会更加准确地监测有机分子和可能的微生物代谢反应，从而确定微生物代谢过程的反应速率和其他生长参数，为高压生物学开辟新的领域。

4　挑战与展望

4.1　完善技术手段

目前，基于 DAC 加载技术可获得高达 550 GPa 的压力，虽然可涵盖目前 HHP 食品加工的压力范围，但是由于 DAC 的样品腔很小，样品量很少，致使高压下样品信号很弱，国内外基于拉曼光谱、红外光谱、XRD 的有机物结构分析均采用纯度较高的晶体甚至单晶进行实验，这与食品体系中较复杂的液体环境相去甚远，因此，亟需发展可实现有机物溶液样品监测的高压原位手段，同时不断完善其他手段。

4.1.1　高压下的表面增强拉曼光谱

拉曼光谱是食品行业中常见的分析方法，但却存在一些缺点：一是固有强度较弱，在溶液中难以监测到较强的拉曼信号；二是拉曼散射通常会伴随荧光，可能“覆盖”拉曼光谱中的峰值。自 1974 年首次观察到表面增强效应以来[61]，表面增强拉曼散射（surface-enhanced Raman scattering, SERS）越来越多地被用于化学/生物检测和鉴定。作为具有超高灵敏度的分析技术，其优点在于可对分子进行痕量分析[62]，弥补了常见拉曼光谱信号弱、荧光强的问题。目前，制备的 SERS 基底在单独高压作用下具有一定的增强效果，但是高温高压下的效果有待提高，适用对象还需拓展。另外，由于 DAC 腔体较小，基于完整硅基制备后再切割装样的操作难度较高。

4.1.2　高压中子实验

中子实验能够很好地反映 H 原子信息，也能准确反映酶的活性位点变化。然而，在高压中子实验中，需要氘（^{2}H）代有机物作为样品，以排除氢元素非相干散射信号的影响。目前，若采用重水置换法或者化学合成法制备氘代生物大分子较为复杂。采用微生物代谢的方式并在需要的时候结合基因编辑是目前主要的研究方法。该方法得到的样品氘代率高，但周期长、操作繁琐，且重水驯化后表达的产量较正常培养基显著降低，导致氘代样品昂贵。同时，对于不常见微生物代谢表达的产物以及目前还不适于基因编辑表达的产物，仍存在一定的局限性。

4.1.3　高压 NMR

核磁按磁场强度可分为低场核磁和高场核磁。低场核磁主要用于测试分子与分子之间的动力学信息，通过弛豫时间得到分子运动信息、分子与分子之间的作用信息，其研究领域属于亚微观领域（分子之间），可测定玻璃态转化温度、高分子材料交联密度、造影剂弛豫率、孔径分布及孔隙度等。在食品领域，低场核磁主要用于研究物质中水分的分布情况，如自由水、半结合水、结合水在食品物料中所占的比例及分布情况。高场核磁主要用于测试分子化学结构，通过化学位移得到分子内部结构信息，研究领域属于微观领域（分子内部），可进行 ^{1}H、^{13}C 常规测量，^{31}P、^{15}N、^{29}Sz 等多核谱，活性肽、多肽类蛋白的溶液结构研究。高场核磁在医学和生物学领域的应用较广泛，对于蛋白质的研究主要是借助高场核磁技术。然而，目前，高场核磁中的高压腔还无法达到很高的压力。

4.2　应用方面

高压原位技术的发展与完善对有压力参与的其他应用也有极大的帮助。冻融加工是延长荔枝等营养价值高却不耐储水果的货架期、延伸其附加值的有效手段之一。HHP 冷冻和解冻是指在常压浸渍冷冻、解冻过程中施加压力场，通过调控水的相变温度，在冻结过程中增大过冷度和冷冻速率，从晶核形成、冰晶生长和晶体类型上整体性地改变结晶途径，以达到从本质上改善冷冻效果的冻结方式[63]。其辅助冻融具有传热传质迅速、冻结时形成的冰晶细小且均匀分布在食品组织内，解冻后汁液流失率低、保护质构和营养成分的巨大优势[64]。然而，食品中的酶在 HHP 辅助冻融过程中易发生激活，致使食品的商业价值和食用价值大大降低。目前，关于 HHP 速冻的研究主要以冰晶特性和细胞骨架完整度为

主[65−66]，HHP 解冻的研究多针对品质特性变化[67]，而 HHP 辅助冻融对蛋白质变性的影响则鲜有报道。值得注意的是，HHP 辅助冻融这种冷压协同处理方式的构成因素包括压力、时间、温度、相变、重结晶、冰晶类型，使得蛋白质压力变性与相变变性同时发生，且相互影响显著，导致酶、蛋白质的结构变化和宏观表现更为复杂。采用高压原位技术辅助非原位技术的方式，将有望更加深入地研究高压冷冻与解冻的机理。

气体水合物是在低温和高压条件下由气体分子包含在水分子的笼形空腔中形成的结晶固体[68]，该项技术广泛应用在果汁的非热浓缩领域。水合物果汁浓缩的基本原理是将气体与果汁形成固体水合物，再去除水分，从而降低果汁的含水量。研究发现，对于 11 布里糖度的苹果汁[69]，在 1.5 ℃、3.5 MPa 的条件下最高可浓缩至 27 布里糖度，且在橙汁[70] 和番茄汁[71] 中也获得了相似的浓缩结果。若将原位技术与气体水合物的形成结合起来，通过实时监测水合物，则可以较好地解释水合物的形成过程，进而拓展其应用领域。

超临界流体萃取技术（supercritical fluid extraction, SFE）是一种利用超临界流体作为溶剂萃取生物复合物的先进技术[72]，具有提取效率高、提取温度低、环保[73]、对有效成分破坏小等特点，是一种具有良好前景的萃取技术。研究加压系统中的溶剂化现象对于绿色工艺开发至关重要，然而，有限的信息量无法深入分析不同参数对溶解动力学的影响。因此，将 SFE 与原位拉曼光谱结合，可追踪模型化合物 D-柠檬烯在超临界 CO_2 中的溶解动力学，从而为加压流体中的溶剂化现象提供新的见解[74]。

总的来说，HHP 作为一种绿色的非热加工方式，通过结合原位技术，可提供样品的动态信息，掌握其变化过程。目前，将原位技术应用于食品加工中还存在很多挑战，如高压设备仍不够完善，相应的 HHP 研究尚不成熟等。相信经过研究人员的不断努力与探索，能逐步解决原位技术在食品应用中的难题，同时为其他有压力或温度参与的工况下的原位表征以及生物样品研究提供一定的借鉴。

参考文献：

[1] HUANG Q, YU D L, XU B, et al. Nanotwinned diamond with unprecedented hardness and stability [J]. Nature, 2014, 510(7504): 250–253.

[2] DUAN D F, LIU Y X, MA Y B, et al. Structure and superconductivity of hydrides at high pressures [J]. National Science Review, 2017, 4(1): 121–135.

[3] LI F F, CUI Q L, CUI T, et al. *In situ* Brillouin scattering study of water in high pressure and high temperature conditions [J]. Journal of Physics: Condensed Matter, 2007, 19(42): 425205.

[4] EREMETS M I, DROZDOV A P, KONG P P, et al. Semimetallic molecular hydrogen at pressure above 350 GPa [J]. Nature Physics, 2019, 15(12): 1246–1249.

[5] LOUBEYRE P, OCCELLI F, DUMAS P. Synchrotron infrared spectroscopic evidence of the probable transition to metal hydrogen [J]. Nature, 2020, 577(7792): 631–635.

[6] AUBOURG S P. Impact of high-pressure processing on chemical constituents and nutritional properties in aquatic foods: a review [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018, 53(4): 873–891.

[7] SYED Q A, BUFFA M, GUAMIS B, et al. Factors affecting bacterial inactivation during high hydrostatic pressure processing of foods: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(3): 474–483.

[8] DENG H T, CAO J J, WANG D F, et al. Effects of high hydrostatic pressure on inactivation, morphological damage, and enzyme activity of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Journal of Food Safety, 2022, 42(5): e12998.

[9] TORRES-OSSANDÓN M J, VEGA-GÁLVEZ A, LÓPEZ J, et al. Effects of high hydrostatic pressure processing and supercritical fluid extraction on bioactive compounds and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.) [J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2018, 138: 215–220.

[10] QIN Z H, GUO X F, LIN Y, et al. Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical and functional properties of walnut (*Juglans regia* L.) protein isolate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(5): 1105–1111.

[11] MAO H K, CHEN X J, DING Y, et al. Solids, liquids, and gases under high pressure [J]. Reviews of Modern Physics, 2018,

90(1): 015007.

[12] 韩奇钢, 班庆初. 小型超高压装置的设计原理及研究进展 [J]. 高压物理学报, 2015, 29(5): 337–346.
HAN Q G, BAN Q C. Design theory, research and development of miniature ultra-high pressure devices [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2015, 29(5): 337–346.

[13] AKASAKA K, YAMADA H. On-line cell high-pressure nuclear magnetic resonance technique: application to protein studies [J]. Methods in Enzymology, 2001, 338: 134–158.

[14] MINKOV V S, KRYLOV A S, BOLDYREVA E V, et al. Pressure-induced phase transitions in crystalline L- and DL-cysteine [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(30): 8851–8854.

[15] LUZ-LIMA C, DE SOUSA G P, LIMA J A, et al. High pressure Raman spectra of β-form of L-glutamic acid [J]. Vibrational Spectroscopy, 2012, 58: 181–187.

[16] TUMANOV N A, BOLDYREVA E V. X-ray diffraction and Raman study of DL-alanine at high pressure: revision of phase transitions [J]. Acta Crystallographica Section B: Structural Science, 2012, 68(4): 412–423.

[17] ABAGARO B T O, Freire P T C, Silva J G, et al. High pressure Raman scattering of DL-leucine crystals [J]. Vibrational Spectroscopy, 2013, 66: 119–122.

[18] HOLANDA R O, FREIRE P T C, SILVA J A F, et al. High pressure Raman spectra of D-threonine crystal [J]. Vibrational Spectroscopy, 2013, 67: 1–5.

[19] MELO W D C, FREIRE P T C, FILHO J M, et al. Raman spectroscopy of D-methionine under high pressure [J]. Vibrational Spectroscopy, 2014, 72: 57–61.

[20] KOLESNIK E N, GORYAINOV S V, BOLDYREVA E V. Different behavior of L- and DL-serine crystals at high pressures: phase transitions in L-serine and stability of the DL-serine structure [J]. Doklady Physical Chemistry, 2005, 404(1): 169–172.

[21] FU C, YAO X S, ZHANG S N, et al. High-pressure *in situ* methods revealing the effect of pressure on glutathione structure [J]. Food Chemistry, 2021, 359: 129808.

[22] 戴超. 食品小分子高压下结构变化的拉曼光谱研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
DAI C. Raman spectroscopic study on structural changes of small food molecule under high pressure [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.

[23] ZHENG Z H, YAO X S, ZHANG S N, et al. *In-situ* Raman study of α-D-glucose under different pressure and temperature [J]. Journal of Molecular Structure, 2023, 1274: 134539.

[24] YAO X S, FU C, ZHANG S N, et al. Structure investigation of β-D-fructose crystal under high pressure: Raman scattering, IR absorption, and synchrotron X-ray diffraction [J]. Journal of Molecular Structure, 2020, 1220: 128746.

[25] 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, 2008.
FANG L. Effect of high pressure treatment on sterilization, enzyme inactivation and quality of kiwifruit juice [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.

[26] 韩晶晶, 储祥蔷. 利用中子散射探索生命世界中的物理奥秘 [J]. 物理, 2019, 48(12): 780–789.
HAN J J, CHU X Q. Using neutron scattering to explore the mysteries in biophysical sciences [J]. Physics, 2019, 48(12): 780–789.

[27] 江波, 缪铭. 高静压加工优化食品酶催化体系: 现状与趋势 [J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 93–97.
JIANG B, MIAO M. Catalytic system of food enzyme under hydrostatic high pressure: status and trends [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(9): 93–97.

[28] ROCKLIN G J, CHIDYAUSIKU T M, GORESHNIK I, et al. Global analysis of protein folding using massively parallel design, synthesis, and testing [J]. Science, 2017, 357(6347): 168–175.

[29] 杨新颖. 高静压对解脂耶氏酵母脂肪酶的作用及其机理初探 [D]. 无锡: 江南大学, 2016.
YANG X Y. Tentative exploration of the effect and mechanism of high hydrostatic pressure on *Yarrowia lipolytica* lipase lip2 [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.

[30] MANGIALARDO S, PICCIRILLI F, PERUCCHI A, et al. Raman analysis of insulin denaturation induced by high-pressure and thermal treatments [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2012, 43(6): 692–700.

[31] MÖLLER J, SCHROER M A, ERLKAMP M, et al. The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense protein solutions: from nonlinear pressure response to protein crystallization [J]. Biophysical Journal, 2012, 102(11): 2641–2648.

[32] NAGAE T, KAWAMURA T, CHAVAS L M G, et al. High-pressure-induced water penetration into 3-isopropylmalate dehydrogenase [J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2012, 68(3): 300–309.

[33] ROCHE J, CARO J A, NORBERTO D R, et al. Cavities determine the pressure unfolding of proteins [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(18): 6945–6950.

[34] ROCHE J, DELLAROLE M, CARO J A, et al. Remodeling of the folding free energy landscape of staphylococcal nuclease by cavity-creating mutations [J]. Biochemistry, 2012, 51(47): 9535–9546.

[35] CHEN G, MIAO M, JIANG B, et al. Effects of high hydrostatic pressure on lipase from *Rhizopus chinensis*: Ⅰ. conformational changes [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 41: 267–276.

[36] ZHOU H L, WANG F H, NIU H H, et al. Structural studies and molecular dynamic simulations of polyphenol oxidase treated by high pressure processing [J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131243.

[37] DE JESUS A L T, LEITE T S, CRISTIANINI M. High isostatic pressure and thermal processing of açaí fruit (*Euterpe oleracea* Martius): effect on pulp color and inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase [J]. Food Research International, 2018, 105: 853–862.

[38] 李汴生, 朱悦夫, 张微, 等. 低温和中温协同超高压对鲜榨荔枝汁灭酶处理和色泽影响的研究 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 151–156.
LI B S, ZHU Y F, ZHANG W, et al. Effect of high pressure processing (HPP) combined with low and moderate temperature treatments on the color and enzyme inactivation in freshly squeezed lychee juice [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(7): 151–156.

[39] ZHANG S N, ZHENG Z H, ZHENG C Y, et al. Effect of high hydrostatic pressure on activity, thermal stability and structure of horseradish peroxidase [J]. Food Chemistry, 2022, 379: 132142.

[40] CHEN G, ZHANG Q P, CHEN H T, et al. *In situ* and real-time insight into *Rhizopus chinensis* lipase under high pressure and temperature: conformational traits and biobehavioural analysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1314–1323.

[41] TEIXEIRA A S, DELADINO L, GARCÍA M A, et al. Microstructure analysis of high pressure induced gelatinization of maize starch in the presence of hydrocolloids [J]. Food and Bioproducts Processing, 2018, 112: 119–130.

[42] CASTRO L M G, ALEXANDRE E M C, SARAIVA J A, et al. Impact of high pressure on starch properties: a review [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105877.

[43] LEITE T S, DE JESUS A L T, SCHMIELE M, et al. High pressure processing (HPP) of pea starch: effect on the gelatinization properties [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 76: 361–369.

[44] LIU P L, HU X S, SHEN Q. Effect of high hydrostatic pressure on starches: a review [J]. Starch-Stärke, 2010, 62(12): 615–628.

[45] LIN Y F, YAO X S, ZHANG S N, et al. Comprehensive investigation of pressure-induced gelatinization of starches using *in situ* and *ex-situ* technical analyses [J]. Food Chemistry, 2024, 440: 138159.

[46] 曾庆梅, 谢慧明, 潘见, 等. 超高压处理对枯草芽孢杆菌超微结构的影响 [J]. 高压物理学报, 2006, 20(1): 83–87.
ZENG Q M, XIE H M, PAN J, et al. Effect of ultra-high pressure processing (UHPP) on the microstructure of *Bacillus subtilis* [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics, 2006, 20(1): 83–87.

[47] OGER P M, DANIEL I, PICARD A. *In situ* Raman and X-ray spectroscopies to monitor microbial activities under high hydrostatic pressure [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1189(1): 113–120.

[48] OGER P M, DANIEL I, PICARD A. Development of a low-pressure diamond anvil cell and analytical tools to monitor microbial activities *in situ* under controlled *P* and *T* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2006, 1764(3): 434–442.

[49] 刘聪, 谢伟, 何林, 等. 单细胞拉曼光谱在微生物研究中的应用 [J]. 微生物学报, 2020, 60(6): 1051–1062.
LIU C, XIE W, HE L, et al. Advances in the application of Raman microspectroscopy in microbe research [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(6): 1051–1062.

[50] TAO Y F, WANG Y, HUANG S, et al. Metabolic-activity-based assessment of antimicrobial effects by D_2O-labeled single-cell Raman microspectroscopy [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(7): 4108–4115.

[51] WANG Y, HUANG W E, CUI L, et al. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 41: 34–42.

[52] NOOTHALAPATI H, SHIGETO S. Exploring metabolic pathways in vivo by a combined approach of mixed stable isotope-

labeled Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(15): 7828–7834.

[53] CUI L, YANG K, ZHU Y G. Stable isotope-labeled single-cell Raman spectroscopy revealing function and activity of environmental microbes [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 2046: 95–107.

[54] 祁亚峰, 刘宇宏, 刘大猛. 拉曼光谱技术在肿瘤诊断上的应用研究进展 [J]. 激光与光电子学进展, 2020, 57(22): 220001.
QI Y F, LIU Y H, LIU D M. Research progress on application of Raman spectroscopy in tumor diagnosis [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2020, 57(22): 220001.

[55] RANJAN R, INDOLFI M, FERRARA M A, et al. Implementation of a nonlinear microscope based on stimulated Raman scattering [J]. Journal of Visualized Experiments, 2019, 149: e59614.

[56] YANG W L, LI A, SUO Y Z, et al. Simultaneous two-color stimulated Raman scattering microscopy by adding a fiber amplifier to a 2 ps OPO-based SRS microscope [J]. Optics Letters, 2017, 42(3): 523–526.

[57] KRAFFT C, SCHIE I W, MEYER T, et al. Developments in spontaneous and coherent Raman scattering microscopic imaging for biomedical applications [J]. Chemical Society Reviews, 2016, 45(7): 1819–1849.

[58] OZEKI Y, KITAGAWA Y, SUMIMURA K, et al. Stimulated Raman scattering microscope with shot noise limited sensitivity using subharmonically synchronized laser pulses [J]. Optics Express, 2010, 18(13): 13708–13719.

[59] 刘照军, 陶亚萍. 拉曼光谱成像技术新进展及其应用 [J]. 现代仪器, 2009, 15(5): 34–37.
LIU Z J, TAO Y P. Raman spectral imaging technology: new developments and applications [J]. Modern Instruments, 2009, 15(5): 34–37.

[60] VENKATA H N N, SHIGETO S. Stable isotope-labeled Raman imaging reveals dynamic proteome localization to lipid droplets in single fission yeast cells [J]. Chemistry & Biology, 2012, 19(11): 1373–1380.

[61] WU D Y, LI J F, REN B, et al. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures [J]. Chemical Society Reviews, 2008, 37(5): 1025–1041.

[62] CIALLA D, MÄRZ A, BÖHME R, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 403(1): 27–54.

[63] CHENG L N, SUN D W, ZHU Z W, et al. Emerging techniques for assisting and accelerating food freezing processes: a review of recent research progresses [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(4): 769–781.

[64] 李立, 孙智慧, 李晓燕, 等. 超高压技术在冷冻食品加工中的应用 [J]. 食品工业, 2021, 42(6): 328–333.
LI L, SUN Z H, LI X Y, et al. Application of high pressure technology in frozen food processing [J]. The Food Industry, 2021, 42(6): 328–333.

[65] HONG G P, CHOI M J. Comparison of the quality characteristics of abalone processed by high-pressure sub-zero temperature and pressure-shift freezing [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 33: 19–25.

[66] 苏光明, RAMASWAMY H S, 于勇, 等. 牛肉高压冷冻过程中热变化和冰晶形态研究 [J]. 农业机械学报, 2014, 45(3): 206–214.
SU G M, RAMASWAMY H S, YU Y, et al. Thermal behaviors and ice crystal properties in pressure shift freezing of beef [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2014, 45(3): 206–214.

[67] 张小羽, 成培芳, 刘博, 等. 超高压处理对奶豆腐冻藏品质特性及微观结构的影响 [J]. 食品科学, 2022, 43(13): 40–47.
ZHANG X Y, CHENG P F, LIU B, et al. Effect of ultra-high pressure treatment on the quality characteristics and microstructure of frozen hurood [J]. Food Science, 2022, 43(13): 40–47.

[68] SHAHNAZAR S, BAGHERI S, TERMEHYOUSEFI A, et al. Structure, mechanism, and performance evaluation of natural gas hydrate kinetic inhibitors [J]. Reviews in Inorganic Chemistry, 2018, 38(1): 1–19.

[69] CLABEN T, JAEGER M, LOEKMAN S, et al. Concentration of apple juice using CO_2 gas hydrate technology to higher sugar contents [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 65: 102458.

[70] LI S F, SHEN Y M, LIU D B, et al. Concentrating orange juice through CO_2 clathrate hydrate technology [J]. Chemical Engineering Research & Design, 2015, 93: 773–778.

[71] LI S F, SHEN Y M, LIU D B, et al. Experimental study of concentration of tomato juice by CO_2 hydrate formation [J]. Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, 2015, 21(3): 441–446.

[72] UWINEZA P A, WAŚKIEWICZ A. Recent advances in supercritical fluid extraction of natural bioactive compounds from natural plant materials [J]. Molecules, 2020, 25(17): 3847.

［73］陈贤伟, 杨泞琪. 浅谈超临界萃取 [J]. 福建分析测试, 2021, 30(6): 43–48.
CHEN X W, YANG N Q. Discussion on supercritical fluid extraction [J]. Fujian Analysis & Testing, 2021, 30(6): 43–48.
［74］BUZOLIN C N, PALANCO M E, WENDT O F, et al. *In situ* determination of dissolution kinetics of D-limonene in supercritical carbon dioxide by Raman spectroscopy [J]. New Journal of Chemistry, 2017, 41(22): 13929–13934.

Research Progress of *In-Situ* Technology in Ultra-High Static Pressure Food Processing

LIN Yingfeng[1], FU Chao[2], ZHANG Sinan[1], YAO Xueshuang[1], ZHENG Zhenhong[1], YANG Jiaxin[1], JIANG Zhuo[1]

（1. *College of Food Science*, *South China Agricultural University*, *Guangzhou* 510642, *Guangdong*, *China*;
2. *School of Food Science and Engineering*, *Tarim University*, *Aral* 843300, *Xinjiang*, *China*）

Abstract: Ultra high static pressure processing technology holds promise for food sterilization, improving food quality, and extracting active ingredients. Traditional research typically assesses the analysis of the structure and function of organic matter under high static pressure after pressure release, capturing only irreversible changes occurring during compression. *In-situ* monitoring under pressure is rarely conducted. *In-situ* technology provides dynamic insights into sample behavior, offering a deeper understanding of its transformation process. Consequently, recent years have witnessed a surge *in-situ* studies performed under high pressure. This article reviews the advancement of high-pressure *in-situ* analysis technology and its application in high static pressure food processing. Key areas covered, include structural changes and phase transition intervals of protein folding and denaturation under high pressure, *in-situ* investigations into the mechanism of starch gelatinization, microbial *in-situ* monitoring and the challenges of *in-situ* technology in food processing.

Keywords: *in-situ* technology; protein; carbohydrates; microorganism