

高静压处理对绿芦笋生理特性的影响

冯海红^{1,2}, 易建勇¹, 毕金峰¹, 周林燕¹, 李军²

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工重点实验室, 北京 100193)

(2. 河北科技师范学院食品科技学院, 河北秦皇岛 066600)

摘要: 为深入了解高静压处理对绿芦笋细胞形态和膜结构的影响, 分析了高静压 10~600 MPa 处理 0.17~20 min 对绿芦笋呼吸速率的影响, 在此基础上深入研究了 10~600 MPa 处理 2 min 对绿芦笋微观结构变化、细胞膜结构完整性、细胞膜渗透率以及绿芦笋表面机械破坏程度的影响。结果表明: 200 MPa 处理 2 min 的绿芦笋呼吸强度开始变得微弱, 且随着压力的升高和处理时间的延长, 绿芦笋呼吸强度越来越微弱, 甚至消失。100 MPa 及以下高静压处理对绿芦笋细胞的破坏较小, 200 MPa 高静压处理的绿芦笋细胞受到损伤, 400 MPa 及以上高静压处理的绿芦笋细胞损伤严重, 甚至丧失生理活性。且由照片显示 100 MPa 以下高静压处理的绿芦笋组织状态与对照组相似, 而经高静压 200 MPa 及以上压力处理的绿芦笋组织表现出“水浸渍”状态。基于本文结果, 推测 200 MPa 高静压处理可能为导致绿芦笋机体代谢“失活”或细胞死亡的压力范围。

关键字: 高静压; 绿芦笋; 呼吸强度; 细胞损伤; 微观结构

文章编号: 1673-9078(2017)6-189-194

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.028

Effect of High Hydrostatic Pressure Processing on the Physiological Characteristics of Green Asparagus

FENG Hai-hong^{1,2}, YI Jian-yong¹, BI Jin-feng¹, ZHOU Lin-yan¹, LI Jun²

(1. Institute of Food Science and Technology, CAAS, Key Laboratory of Agro-products Processing, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China) (2. Institute of Food Science and Technology Hebei Normal University of Science and Technology Qinhuangdao 066600, China)

Abstract: In order to elucidate the effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on the cell morphology and membrane structure of green asparagus, HHP treatments were administered at a pressure range of 300~600 MPa for 0.17~20 min, and the respiration rate in green asparagus was studied. Based on the obtained results, an in-depth study of the effects of two minutes of HHP treatment at a pressure range of 10~600 MPa on microstructural changes, cell membrane structural integrity, relative membrane permeability, and the degree of apparent mechanical damage of green asparagus was performed. The results showed that the respiratory intensity of the samples treated with HHP at 200 MPa for two minutes was relatively low [5.66 mg/(kg·h)], and respiration became weaker and even disappeared with increasing pressure and treatment time. The cell damage in samples treated with HHP at 100 MPa or lower was limited, but the samples treated with HHP at 200 MPa, 400 MPa, or higher were severely damaged, and the physiological activity even disappeared. Imaging showed that the cell morphology of the samples treated with HHP at ≤100 MPa was similar to that of the untreated sample, but the samples treated with HHP at ≥400 MPa exhibited a “water immersion” state. In summary, it was suggested that 200 MPa is the threshold for causing metabolic inactivation or cell death in asparagus spears treated with HHP.

Key words: high hydrostatic pressure processing; green asparagus; intensity of respiration; cell damage; microstructure

高静压技术作为一种新型的非热加工方式已逐渐在果蔬加工中应用,但主要集中在其对加工制品理化、

收稿日期: 2016-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31301528)

作者简介: 冯海红 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬精深加工技术

通讯作者: 毕金峰 (1970-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 果蔬精深加工与副产物综合利用技术

感官和营养指标的影响, 针对高静压处理后植物组织的生理特性如何变化的研究较少, 目前已有的一些学者进行了探索性的研究。Eggleston 等^[1]通过研究高静压处理对胡萝卜呼吸强度的影响, 提出了高静压处理后果蔬是“有代谢活性的有机体”还是“无代谢活性的加工制品”这一科学问题。已有相关研究不同程度上说明了较低压力高静压 (<300 MPa) 处理后的果蔬在一段时间内仍为“活的有机体”, 其生理生化代谢在一定程

度上仍将继续进行。基于此结论, 尽管高静压是一种加工技术, 但因为植物组织仍然具有生理代谢活性, 在某种程度上(或短暂的时间段内)也可将其视为一种保鲜技术, 这也拓宽了对最少加工(Minimal processing)概念的理解^[2]。有研究报道, 高静压可作为一种采后检疫(Quarantine)手段用于杀灭生鲜果蔬表面的虫卵(egg)和幼虫(larvae)。Neven等^[3]研究发现250 MPa及以上处理的高静压可有效杀灭樱桃表面的虫卵和幼虫。Velazquez等^[4]研究表明150 MPa处理20 min可将水果表面上的虫卵和幼虫全部杀灭。同样高静压处理只作用于对生物大分子立体结构有贡献的氢键、离子键和疏水键等非共价键, 对维生素、色素和风味物质等小分子化合物的共价键无明显影响, 从而使果蔬较好地保持了原有的营养、色泽和风味。本文通过研究高静压对绿芦笋呼吸强度及细胞完整性等生理特征的影响, 探寻绿芦笋是否为“活的有机体”的高静压处理压力临界范围, 为高静压作为一种采后贮藏保鲜方法提供科学理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

绿芦笋品种为UC157F₂, 购于天津市静海县绿芦笋种植基地。绿芦笋为当天采集, 于3 h内运输至实验室并进行处理。选取笋尖无开散、无畸形、无机械损伤及病虫害的绿芦笋。

1.2 试验仪器设备

HPP.L2-600/2 高静压杀菌设备, 天津市华泰森淼生物工程技术有限公司; GC7890F 气相色谱, 安捷伦科技有限公司; HITACHI S-570 电镜扫描机, 日本日立公司; TCS SP5 II 激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司; FE30/EL30 梅特勒-托利多实验室电导率仪, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; UV-1800 紫外分光光度计, 岛津企业管理(中国)有限公司; Ta-XT2i/50 物性分析仪, 美国 Stable Micro Systems 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备与贮藏

取长度23±2 cm、直径10±1 mm的绿芦笋洗净, 采用自封袋包装, 放入高静压处理仓, 设定压力为10、20、50、100、200、400、600 MPa, 保压时间为0.17、0.5、1、2、5、10、20 min, 于室温(25℃)下处理样品。处理后的绿芦笋用尼龙纱布擦干表面水分, 用于测定各项指标。

1.3.2 呼吸强度测定

参考曹建康等^[5]方法适当调整。称取50±0.5 g绿芦笋, 用尼龙布擦干样品表面水分, 放置于经空气平衡的1.4 L储气盒中, 密封30 min, 抽取1.0 mL顶空气体, 用于气相色谱检测。气相色谱(GC7890F)配置FID检测器、不锈钢填充柱(Porapak80-100, 2 m×2 mm)和CO₂转化炉, 载气N₂。CO₂检测条件: 进样温度120℃, 柱温60℃, 检测温度360℃。每个样品重复3次, 单位mg/(kg·h)。

1.3.3 中性红染色

参考Gonzalez等^[6]方法适当调整。首先称取适量的氯化钾、氯化钠和氯化钙溶于蒸馏水中配制成Ringer溶液, 再将中性红药品溶解于Ringer试剂中, 在35℃的磁力搅拌器上不断搅拌溶解, 最后用抽滤器过滤, 配制成1%的中性红染液, 并放入暗处保存备用。将切好的绿芦笋薄片浸泡于中性红染液中2 h, 再放入Ringer溶液中漂洗3 h, 期间每隔一小时更换一次漂洗液, 最后进行样品显微镜观察, 收集有效图片。

1.3.4 细胞膜渗透率的测定

参考姚佳^[7]和王庆新^[8]的方法适当调整。样品用尼龙纱布擦干, 从顶尖测量9~10 cm处取样, 切成2±0.1 mm厚的小圆片, 原片要大小一致, 薄厚均匀, 并用滤纸吸干表面水分, 快速称取10±0.1 g小圆片于50 mL烧杯中, 加20 mL蒸馏水, 于室温下缓慢搅拌20 min, 测定浸提液的电导率(C₁), 将浸提液连同小圆片煮沸5 min, 冷却至室温后加蒸馏水至原有刻度摇匀, 再次测定浸提液的电导率(C₂), 用相对电导率表示细胞膜渗透率 ω , 计算公式如下:

$$\omega = \frac{C_1}{C_2} \times 100\%$$

1.4 数据处理

采用Origin 8.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, USA)软件作图, 用SPSS软件进行方差分析, $p < 0.05$ 为显著性, $p < 0.01$ 为极显著性。

2 结果与分析

2.1 高静压处理对绿芦笋呼吸强度的影响

由图1可知, 高静压处理压力和时间均对处理后绿芦笋的呼吸强度有显著影响。处理时间在0.17~1 min范围时, 高静压10~100 MPa处理的绿芦笋呼吸强度较强, 200~600 MPa处理的绿芦笋呼吸强度较弱, 呼吸强度不同的原因可能与细胞膜物理损伤或是蛋白质变形聚集影响了呼吸链中酶活的生理功能有关^[10]。

处理时间上升至 2 min 以上时, 高静压 10~100 MPa 处理后的绿芦笋仍有呼吸作用, 但经过 200 MPa 高静压处理后样品的呼吸强度较弱, 表明经 400~600 MPa 高静压处理后样品可能不再是“活的有机体”, 其呼吸代谢已经非常微弱或停止。Eisenmenger 等^[11]发现高静压处理可破坏植物细胞的膜结构, 导致原属于不同功能分区的底物、离子和酶相互接触并反应, 而酶的激活或抑制则使得机体的生理生化反应更加复杂。Osuna-García 和 Zamora 等^[10,12]推测高静压改变呼吸速率的原因可能是细胞膜遭受物理损伤, 或者高静压引发蛋白质的变性和聚集影响了呼吸链中酶的活性和功能。

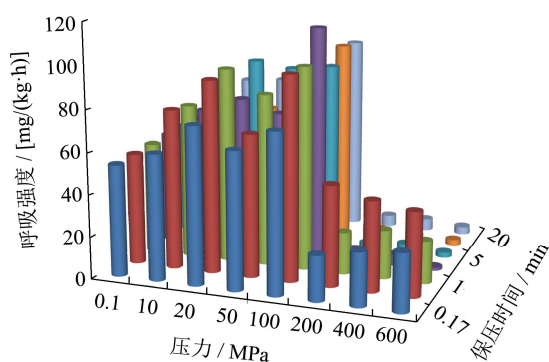


图1 高静压处理对绿芦笋呼吸强度的影响

Fig.1 Effect of HHP treatment on respiratory intensity in green asparagus spears

2.2 高静压处理对绿芦笋细胞膜完整性的影响

中性红染料可与活体细胞液中的阴离子结合留于细胞中, 并在洗涤过程中不被洗脱, 因此该方法广泛用于检测细胞的完整性^[13,14]。本文通过中性红染色宏观表征不同高静压处理对绿芦笋细胞膜完整性的影响。完整的细胞可与中性红染液结合, 因此显微镜下可观测到细胞鲜红光滑的表面, 而死亡的细胞因为外界的机械损伤, 不能与中性红染液结合而呈现浅黄色; 此外, 细胞碎片和细胞壁与中性红染液结合出现粉红色颗粒, 此现象也可表明细胞膜的完整性遭到破坏^[15]。由图 2 可见, 未经高静压处理的绿芦笋细胞全部被染成红色, 10~100 MPa 处理样品与对照组之间无显著性差异, 而 200 MPa 处理后红细胞比例下降, 说明有少量细胞的细胞膜遭到破坏, 当高静压升至 400 MPa 或 600 MPa 时, 细胞整体呈浅黄色, 表明细胞全部死亡。上述结果说明, 高静压处理压力越大, 浅黄色细胞的数量越多, 细胞完整性的损伤程度越严重。Zhang 等^[16]探讨了超高压对莴笋细胞的影响, 研究发

现, 100 MPa 处理的莴笋细胞完整性良好, 300 MPa 处理的莴笋部分细胞出现破损, 500 MPa 处理的莴笋细胞全部死亡。Gonzalez 等^[17]报道表明 200 MPa 处理的洋葱部分细胞出现损伤, 300 MPa 及以上处理的洋葱细胞全部死亡。

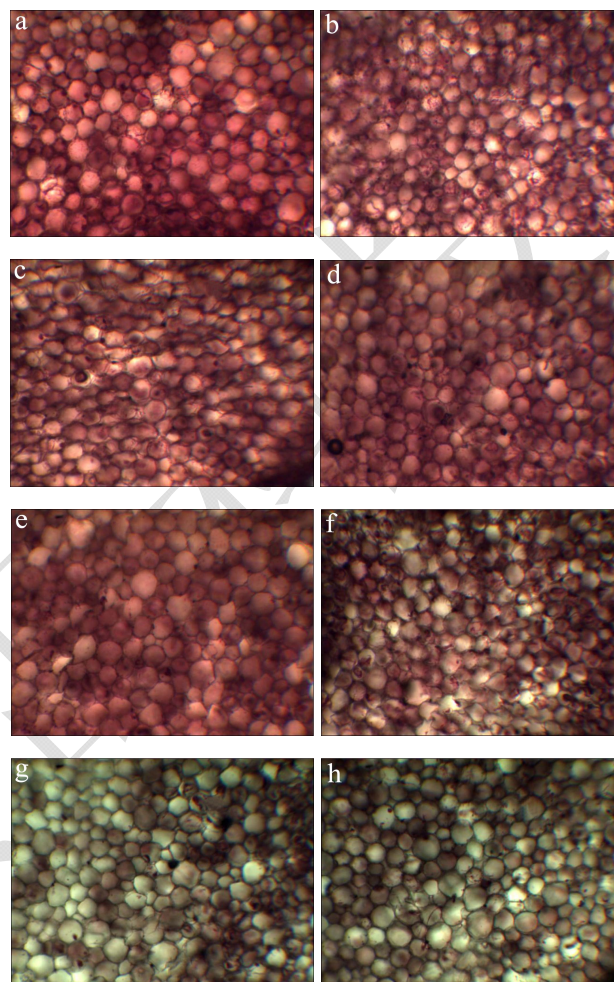


图2 高静压处理对绿芦笋细胞膜完整性的影响

Fig.2 Effect of HHP treatment on cell membrane integrity in green asparagus spears

注: a 表示鲜样; b 表示 10 MPa; c 表示 20 MPa; d 表示 50 MPa; e 表示 100 MPa; f 表示 200 MPa; g 表示 400 MPa; h 表示 600 MPa; 处理时间: 2 min。

2.3 高静压处理对绿芦笋细胞微观结构的影响

采后处理、加工或贮藏期间细胞受损的微观分析可以很好地解释果蔬品质变化与细胞结构之间的关系, 这对于果蔬采后品质保持的研究具有重要的意义, 也可作为果蔬采后货架期评价的工具^[18]。了解高静压对嫩茎蔬菜组织完整性的影响, 有助于改善嫩茎蔬菜品质和产品的货架期^[19]。图 3 为 7 组高静压处理与对

照组扫描电镜图。

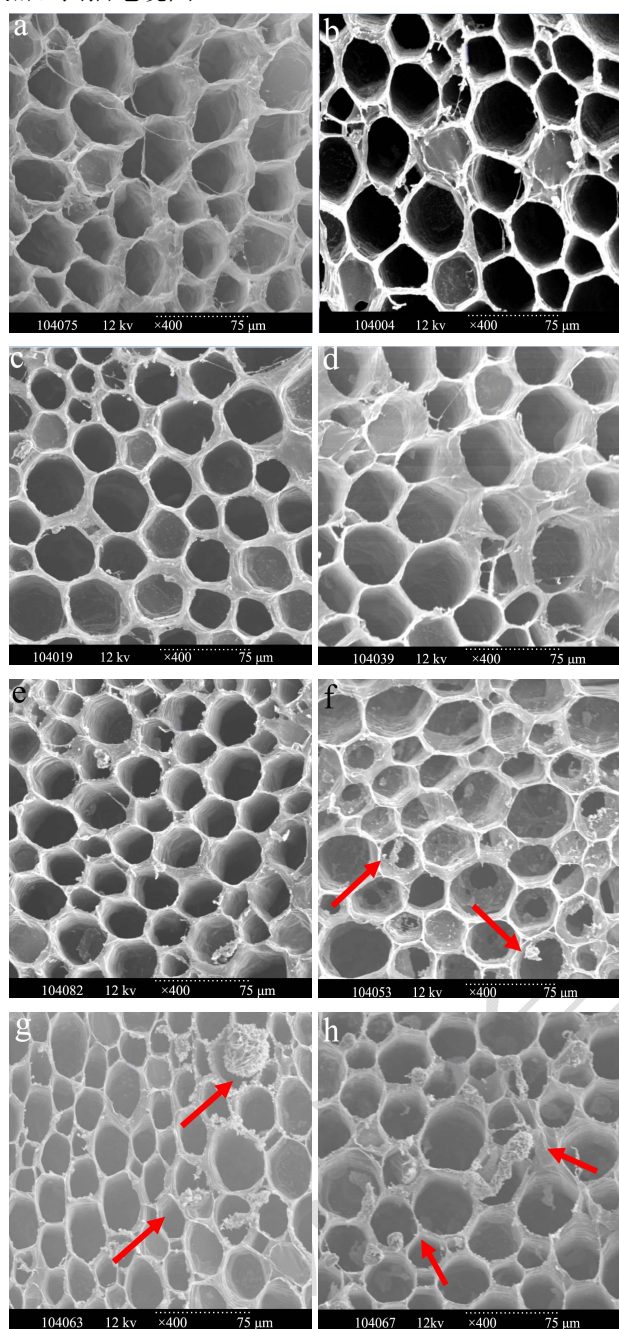


图3 高静压处理对绿芦笋微观结构变化的影响

Fig.3 Effect of HHP treatment on the microstructure of green asparagus spears

注: a 表示鲜样; b 表示 10 MPa; c 表示 20 MPa; d 表示 50 MPa; e 表示 100 MPa; f 表示 200 MPa; g 表示 400 MPa; h 表示 600 MPa; 处理时间: 2 min。

如图3可知, 鲜样的扫描电镜图中几乎每一个细胞都是等轴的多面体, 均匀地分布成蜂窝状, 细胞与细胞间几乎没有间隙; 从10 MPa到100 MPa随着压力的增加, 绿芦笋的细胞微观结构并没有受到太大影响, 细胞虽出现大小不一, 但仍均匀分布。当高静压升至200 MPa时, 细胞形状明显变形, 并出现较多细

胞破碎颗粒; 高静压为400 MPa或600 MPa时, 细胞结构有所改观, 这有可能是细胞膜瞬间完全破裂, 细胞内外压力平衡, 因此表现为细胞结构的恢复。但仍有细胞破碎颗粒出现, 且体积较大。众所周知, 活体细胞内部物质是不断运动的, 细胞与周围的环境通过物质交换, 保持生命活性。正常情况下, 细胞内部环境保持动态平衡, 当细胞遭受外界压力时, 若其大于渗透压, 则细胞内部动态平衡被打破, 胞内物质流动加速, 如果细胞膜遭到破坏, 则会发生胞内物质渗出, 引起细胞变形, 体积减小。由于嫩茎蔬菜细胞内水分和气室占有较大空间, 因此高静压处理后更容易发生细胞形变^[20]。

2.4 高静压处理对绿芦笋细胞膜渗透率的影响

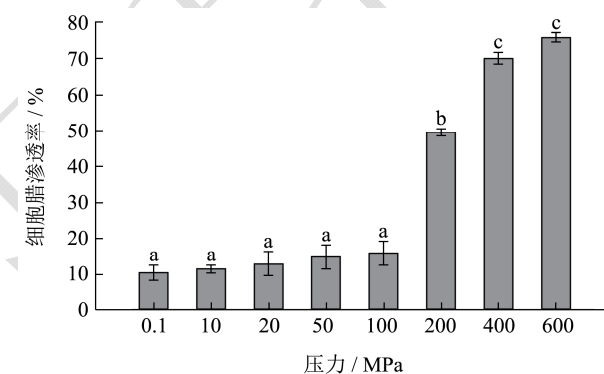


图4 高静压处理对绿芦笋细胞膜渗透率的影响

Fig.4 Effect of HHP treatment on the cell membrane permeability of green asparagus spears

果蔬组织遭受机械损伤时, 细胞膜的完整性和功能就会受到影响, 往往表现为膜透性增加和电解质外渗速度加快, 导致细胞膜渗透率增大。由图5可见, 100 MPa以下高静压处理的绿芦笋组织状态与对照组相似, 而经高静压200 MPa、400 MPa和600 MPa处理的绿芦笋组织表现出“水浸渍”状态, 这与图4显示的细胞膜渗透率结果相符。细胞膜渗透率可较好评估细胞破损的程度。由图4可知, 对照组绿芦笋的细胞膜渗透率为10.2%, 高静压处理后, 绿芦笋的细胞膜渗透率随着压力的增大而增加。10~100 MPa处理的绿芦笋细胞膜的损伤程度较小, 且各处理与对照组之间差异不显著($p > 0.05$), 当高静压为200 MPa及以上时, 压力越大细胞膜的损伤程度越大, 且各处理与对照组之间差异显著($p < 0.05$), 此现象的原因可能为高静压破坏了细胞膜蛋白, 从而改变了细胞膜的通透性^[21]。Galla和Dornenburg等^[22,23]认为高静压可以破坏磷脂双分子层膜结构, 改变了控制离子通透性的膜结合蛋

白的功能。

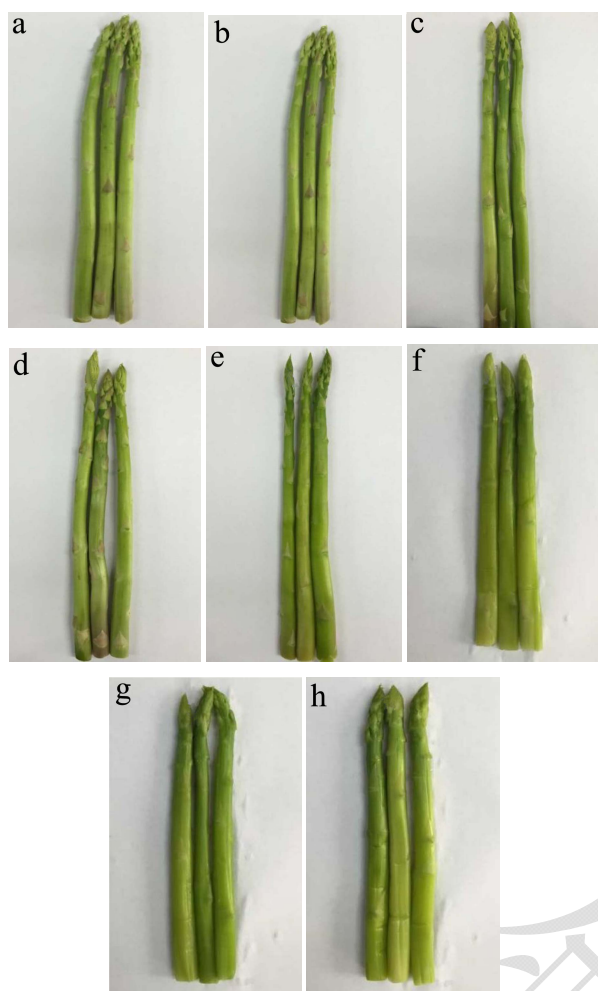


图5 高静压对绿芦笋表现的影响

Fig.5 Effect of HHP treatment on the appearance of green asparagus spears

注: a表示鲜样; b表示10 MPa; c表示20 MPa; d表示50 MPa; e表示100 MPa; f表示200 MPa; g表示400 MPa; h表示600 MPa; 处理时间: 2 min。

3 结论

本文采用不同条件高静压处理采后绿芦笋, 分析了绿芦笋的生理特性, 探讨了高静压处理导致绿芦笋组织细胞“失活”的临界压力范围。结果表明, 200 MPa及以上压力处理2 min的绿芦笋呼吸强度急剧下降, 甚至消失; 200 MPa处理2 min的绿芦笋, 显微观察可见较大细胞碎片, 表明细胞呈现不同程度破损; 对于细胞膜相对渗透率而言, 200 MPa处理2 min的绿芦笋开始出现“水浸渍”的外观, 细胞膜透性增加。基于上述结果, 推测200 MPa高静压处理可能为导致绿芦笋机体代谢“失活”或细胞死亡的临界压力范围。

参考文献

- [1] Eggleston V, Tanner D J. Are carrots under pressure still alive? -The effect of high pressure processing on the respiration rate of carrots [J]. *Acta Horticulture*, 2005, 687: 371-374
- [2] 廖小军. 果蔬汁非热加工技术进展[J]. *饮料工业*, 2002, 5(6): 4-7
LIAO Xiao-jun. Review of non-thermal processing for fruit and vegetable juices [J]. *Beverage Industry*, 2002, 5(6): 4-7
- [3] Neven L, Follett P A, Raghubeer E. Potential for high hydrostatic pressure processing to control quarantine insects in fruit [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2007, 100(5): 1499-1503
- [4] Velazquez G, Candelario H E, Ramirez J A, et al. High hydrostatic pressure at low temperature as a quarantine treatment to improve the quality of fruits [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(3): 287-292
- [5] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007
CAO Jian-kang, JIANG Wei-bo, ZHAO Yu-mei. Experiment guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007
- [6] Gonzalez M E, Jernstedt J A, Slaughter D C, et al. Microscopic quantification of cell integrity in raw and processed onion parenchyma cells [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(7): E402-E408
- [7] 姚佳. 超高压下莴笋质构的变化及机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014
YAO Jia. Change and mechanism of asparagus lettuce texture under high pressure processing [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014
- [8] 王庆新. 超高压处理对微加工茭白货架期影响的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008
WANG Qing-xin. Study on extending the shelf-life of minimally processed water bamboo shoots by ultra high pressure treatment [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008
- [9] Li W X, Zhang M, Wang S J. Effect of three-stage hypobaric storage on membrane lipid peroxidation and activities of defense enzyme in green asparagus [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(10): 2175-2181
- [10] García J A O, Robles M L G, Gómez B T, et al. Calidad del mango Ataulfo producido en Nayarit, México [J]. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 2002, 25(4): 367-374
- [11] 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

- [12] Cienfuegos E Z, García H S, de Oca M M M, et al. Aceleración de la maduración en mango " Kent" refrigerado [J]. Revista Fitotecnia Mexicana, 2004, 27(4): 359-366
- [13] Guttenberger M. Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots [J]. Planta, 2000, 211(3): 299-304
- [14] Repetto G, del Peso A, Zurita J L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity [J]. Nature Protocols, 2008, 3(7): 1125-1131
- [15] Gonzalez M E, Jernstedt J A, Slaughter D C, et al. Influence of cell integrity on textural properties of raw, high pressure, and thermally processed onions [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(7): E409-E416
- [16] Zhang L, Yao J, Zhang Y, et al. Microstructural and morphological behaviors of asparagus lettuce cells subject to high pressure processing [J]. Food Research International, 2015, 71: 174-183
- [17] Gonzalez M E, Jernstedt J A, Slaughter D C, et al. Influence of cell integrity on textural properties of raw, high pressure, and thermally processed onions [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(7): 409-416
- [18] 张学杰. 高压对鲜切生菜品质与微生物的影响及机理研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012
ZHANG Xue-jie. Effect of high hydrostatic pressure on quality and microorganism of fresh cut lettuce and its mechanism [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012
- [19] Gonzalez M E, Barrett D M. Thermal, high pressure, and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(7): R121-R130
- [20] 徐树来. 高压加工对蔬菜组织影响的研究 [J]. 中国食品学报, 2007, 7(4): 62-67
XU Shu-lai. Studies on the HPP's influence on the tissue of vegetables [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2007, 7(4): 62-67
- [21] Ritz M, Freulet M, Orange N, et al. Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 55(1): 115-119
- [22] Galla H J, Trudell J R. Pressure-induced changes in the molecular organization of a lipid-peptide complex. Polymyxin binding to phosphatidic acid membranes [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1980, 602(3): 522-530
- [23] Dörnenburg H, Knorr D. Cellular permeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites [J]. Food Biotechnology, 1993, 7(1): 35-48