

超高压处理对微生物生理特性的影响

李宗军¹ 徐建兴²

(¹湖南农业大学食品科技学院 长沙 410128)

(²中国科学院生物物理研究所 北京 100101)

摘 要 单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) NCTC 11994 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 80739 经高压处理, 其生理特性发生了深刻的变化, 主要表现是: 400MPa 以上的压力处理 10min, 微生物数量下降 7 个对数单位, 压力处理还会导致细胞内 pH 值的变化, 使膜电位下降, 细胞内钾流失, ATP 浓度降低。

关键词 超高压, 微生物, 生理特性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)04-0521-05

超高压处理被认为是一种新的冷杀菌方式, 可以应用于食品的保鲜^[1~3]。不同的微生物对压力具有不同的抗性, 微生物细胞的存活率与所采用的压力大小有直接关系, 500~700MPa 能杀死细菌、酵母和霉菌的营养细胞, 但微生物的孢子具有更强的抗性^[4~6]。高压处理可能会引起微生物形态、细胞膜、细胞壁、生物化学反应和遗传物质的改变^[7,8]。细胞膜的变化可能是压力引起微生物死亡最主要的原因之一^[9,10]。了解微生物的压力致死机理可以帮助我们有效地将这一技术应用于食品保鲜与加工过程中^[11]。本文选择食品加工中常见的单核增生李斯特菌和大肠杆菌作为革兰氏阳性和阴性的代表, 对它们的压力反应进行比较, 旨在明晰压力处理对数期细胞悬液、活细胞总数、细胞体积、细胞内 pH 值、细胞内钾离子浓度等生理特性的变化, 从而为微生物的压力致死机制寻找理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) NCTC 11994 由英国巴斯大学友情提供, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 80739 购自中国科学院微生物研究所。

1.1.2 主要试剂和仪器: 苯甲酸(羧基¹⁴C)、右旋糖苷(羧基¹⁴C)、(³H)菊粉、4-³H-溴化苯磷酸、ATP、尼日利亚菌素等购自 Sigma 公司; 蛋白质和 ATP 分析

试剂盒购自南京建成生物工程公司。Facscan 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); 625 型荧光测定仪(上海精密仪器一厂); M5 型原子吸收光谱仪(美国 Thermo 公司); EPICS XL 液体闪烁仪(美国 Beckman Coulter 公司); 高速离心机(美国 Beckman 公司)。

1.2 压力处理

压力处理前两个菌株经相同的活化处理, 于 37℃、营养肉汤中培养 18h, 直至培养物浓度大约为 5×10^8 cfu/mL, 保存在同一条件下备用。单核增生李斯特菌或大肠杆菌对数后期的培养物用 100mmol/L 磷酸盐(pH7.0)或柠檬酸盐缓冲溶液按 1:5 进行稀释, 每一个稀释度的细胞悬液, 取 750mL 封入灭菌的聚乙烯薄膜袋中备压。每一个稀释度的细胞悬液在 10L 的压力釜中, 150~600MPa、20℃ 处理 10min。压力处理对细胞存活性的影响按国家标准测定菌落总数。

1.3 细胞大小的测定

用 Facscan 流式细胞仪测定细胞大小的变化, 将 100 μ L 的细菌悬液用缓冲溶液稀释到 1mL, 在 488nm 下进行分析。

1.4 生理分析用细菌悬液的制备

经压力处理的单核增生李斯特菌或大肠杆菌细胞悬液, 13000 \times g 30min 离心, 沉淀重新悬浮在 6mL 上清夜中, 目的是使细胞悬液的平均蛋白质浓度维持在 10mg/mL 左右, 蛋白质用 Folin-酚法^[12]进行测定(以牛血清蛋白做标准)。两种细菌的细胞悬液分

基金项目: 湖南省农业生物技术重大专项研究(2004NK1003)

作者简介: 李宗军(1967-)男, 湖南临湘人, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。Tel: 86-731-4617007; Fax: 86-731-4617013;

E-mail: lizongjun@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-12-02, 修回日期: 2005-03-22

别被用于细胞体积、pH 值、膜电位、钾离子浓度、腺嘌呤核苷酸的测定。

1.5 细胞体积的测定

在 2mL 蛋白质浓度为 10mg/mL 的细胞悬液中加入 100 μ L ,37kbq 的右旋糖苷(羧基¹⁴ C)和 20 μ L , 74bq 的³ H₂O , 试样混合后 ,25 $^{\circ}$ C , 80r/min , 培养 10min。分别取 300 μ L 加入含有 100 μ L ,1mol/L 高氯酸和覆盖有 300 μ L 508 V70 型硅树胶(密度为 1.03) 的 Eppendoff 管中。经 13000 \times g ,15min 离心后 ,用液体闪烁仪分别测定上清液和沉淀中放射标记探针的强度。

1.6 细胞内 pH 值的测定

单核增生李斯特菌和大肠杆菌细胞内 pH 值用荧光探针 BCECF [2 ,7-bis(2-carboxyethyl)-5(and-6) carboxyfluorescein],采用 625 型荧光测定仪按 Booth 的方法^[13]进行分析。

1.7 膜电位的测

用放射探针³ H-TPP⁺ 测定细胞悬液的膜电位。将 100 μ L ,185kbq 的³ H-TPP⁺ 加入到蛋白质浓度为 10mg/mL 的细胞悬液中 ,同时加入 100 μ L ,终浓度为 10mmol/L 没有标记的 TPP⁺ ,以阻止放射性探针在细胞内的非专一性结合。25 $^{\circ}$ C ,80r/min ,培养 10min 后 ,13000 \times g ,10min 离心收集上清和沉淀 ,用液体闪烁仪测定放射活性。数据按 Booth 的方法^[13]进行分析。

1.8 钾浓度的测定

用原子吸收光谱仪测定细胞内钾的浓度。10mL 细胞悬液加入到含有 2mL 508 V70(密度 1.03) 硅树胶的离心管中 ,13000 \times g ,离心 30min。沉淀被重新溶解在 2mL 1.4mol/L 的 H₂SO₄ 中 ,120 $^{\circ}$ C ,离子化 4h。用含有 6mmol/L CsCl 的 0.1mol/L H₂SO₄ 分别按 1:25 和 1:50 对沉淀和上清液进行稀释 ,钾浓度在 766.5nm 处测定。

1.9 ATP 的测定

在最佳条件下 ,一个光子可以产生一个 ATP 分子。1mL 细胞悬液经 13000 \times g ,5min 离心后 ,沉淀用 1mL 无菌去离子水重新溶解。取 100 μ L 加入到含有 100 μ L 核苷酸的 4mL 计数瓶中 ,向生物计数器的计数瓶中注入 100 μ L 纯的荧光素-荧光素酶试剂 ,反应立即被启动 ,用生物计数器测定反应启动后 10 ~ 30s 内的光子数。在此条件下 ,细胞内的 ATP 在 2 ~ 200pmol 内与测定的光子数成线性关系。

1.10 微生物膜囊的准备

微生物细胞膜囊按下列方法进行制备 ,1mL

OD₆₆₀ = 100 的细胞悬液用 1mL 含有 2.5mmol/L MgCl₂ 的 50mmol/L ,pH7.0 的 PIPES(哌嗪-N ,N'-二乙基磺酸钠 , Piperazine-N ,N'-bis(2-ethanesulfonate) , PIPES)缓冲溶液稀释 ,细胞用超声波进行破碎 ,振幅为 26 μ m ,处理 10min(处理 15s ,冷却 45s)。用 50mL 含有 2.5mmol/L MgCl₂ 的 50mmol/L ,pH7.0 的 PIPES 缓冲溶液进行稀释 ,7700 \times g 低速离心去除细胞碎片。收集上清的顶部 2/3 ,543000 \times g 进行高速离心。沉淀重新悬浮在 500 μ L 含有 2.5mmol/L MgCl₂ 的 50mmol/L ,pH7.0 的 PIPES 缓冲溶液中 ,内外膜囊被快速冷冻 ,并保存在液氮中备用。膜囊中蛋白质浓度用 Lowry 法进行测定。

2 结果和分析

2.1 超高压对单核增生李斯特菌和大肠杆菌存活性的影响

单核增生李斯特菌和大肠杆菌细胞在柠檬酸和磷酸缓冲溶液中经 10min ,150 ~ 600MPa 不同压力处理后 ,残存菌数见表 1。压力小于 150MPa 时 ,对大肠杆菌影响不大 ,而低于 200MPa 对单核增生李斯特菌的生存几乎没有影响。随着压力的增加 ,微生物的残存活细胞数急剧下降。经相同压力处理 ,柠檬酸缓冲溶液中的活细胞数明显低于磷酸缓冲溶液。大肠杆菌比单核增生李斯特菌对压力更为敏感。

表 1 超高压对微生物存活性的影响

Table 1 Effect of high hydrostatic pressure on viability of microorganism			
Microorganisms	Buffer	Pressure /MPa	Cell enumeration (cfu/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sodium citrate	Control	2.86 \times 10 ⁸
		200	3.77 \times 10 ⁸
		275	2.43 \times 10 ⁵
		325	3.64 \times 10 ⁴
		400	< 10
	Phosphate	Control	2.86 \times 10 ⁸
		200	2.85 \times 10 ⁸
		350	8.74 \times 10 ⁶
		425	3.12 \times 10 ³
		600	< 10
<i>Escherichia coli</i>	Sodium citrate	Control	2.70 \times 10 ⁸
		150	2.65 \times 10 ⁸
		200	2.33 \times 10 ⁷
		275	1.86 \times 10 ⁴
		350	< 10
	Phosphate	Control	2.70 \times 10 ⁸
		150	2.42 \times 10 ⁸
		250	6.73 \times 10 ⁶
		325	1.14 \times 10 ⁵
		400	< 10

2.2 细胞体积的变化

结果(表2)显示,对于单核增生李斯特菌,压力引起细胞体积的变化与缓冲溶液有关,在柠檬酸缓冲溶液中 325MPa 以下的压力处理体积变化不大;但在磷酸缓冲溶液中 200MPa 压力处理才不会引起细胞体积的改变,当压力增加到 600MPa 时,细胞体积增大了 5 倍,显微镜下可见部分细胞裂解。大肠杆菌在柠檬酸和磷酸缓冲溶液中,分别用 400MPa 和 425MPa 以下的压力处理,细胞体积都没有显著变化,未见细胞裂解现象。

表 2 高压处理引起的微生物细胞体积的变化

Table 2 Cell volume changes of microorganisms in response to high hydrostatic pressure treatment

Microorganisms	Buffer	Pressure /MPa	Cell volume (μL/mg Protein)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sodium citrate	Control	1.24 ± 0.07
		200	1.18 ± 0.03
		275	1.46 ± 0.12
		325	1.32 ± 0.07
		400	1.69 ± 0.11
	Phosphate	Control	1.18 ± 0.04
		200	1.23 ± 0.6
		350	1.67 ± 0.03
		425	1.57 ± 0.11
		600	6.08 ± 0.13
<i>Escherichia coli</i>	Sodium citrate	Control	1.36 ± 0.06
		150	1.25 ± 0.07
		200	1.36 ± 0.71
		275	1.51 ± 0.05
		350	1.48 ± 0.06
	Phosphate	Control	1.22 ± 0.14
		150	1.18 ± 0.12
		250	1.16 ± 0.21
		325	1.23 ± 0.14
		400	1.44 ± 0.05

2.3 pH 值的变化

未经处理的单核增生李斯特菌悬液在磷酸缓冲溶液中能保持 0.4 个 pH 值单位的 pH 值梯度,压力处理会引起 pH 梯度的下降。在柠檬酸缓冲溶液中即使经 325MPa 压力处理,也能保持 0.5 单位的 pH 梯度,400MPa 的压力处理会导致细胞内外 δpH ($pH_{内}-pH_{外}$) 的下降。未经压力处理的大肠杆菌在磷酸缓冲溶液中可以保持 0.8 个 pH 单位的 pH 值梯度,在 325MPa 以上的压力处理,会引起 δpH 的下降。在柠檬酸缓冲溶液中,随着压力的增加, δpH 呈有规律的下降,但 350MPa 压力下,细胞内外的 pH 保持平衡(表3)。

表 3 高压处理引起的微生物细胞内 pH 值的变化

Table 3 Intracellular pH value changes of microorganisms with high hydrostatic pressure treatment

Microorganisms	Buffer	Pressure /MPa	Intracellular pH valume
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sodium Citrate	Control	6.1 ± 0.1
		200	6.2 ± 0.1
		275	6.1 ± 0.3
		325	6.1 ± 0.1
		400	5.8 ± 0.1
	Phosphate	Control	7.4 ± 0.1
		350	7.2 ± 0.2
		425	7.2 ± 0.3
		600	7.2 ± 0.1
<i>Escherichia coli</i>	Sodium citrate	Control	6.5 ± 0.1
		200	6.2 ± 0.2
		275	5.9 ± 0.1
		350	5.6 ± 0.1
	Phosphate	Control	7.8 ± 0.1
		250	7.7 ± 0.2
		325	7.5 ± 0.2
		400	7.4 ± 0.1

2.4 细胞内钾浓度的变化

在柠檬酸和磷酸盐缓冲溶液中,高压处理会引起细胞内几乎全部钾的流失(表4)。两种供试微生物在 400MPa 的压力处理下,细胞内的钾全部流失;在柠檬酸缓冲溶液中,350MPa 处理的大肠杆菌和 325MPa 处理的单核增生李斯特菌细胞内的钾全部流失,而 275MPa 处理的单核增生李斯特菌和大肠杆菌细胞内的钾分别流失 50% 和 25%。比较而言,无论是中压(325 ~ 350MPa),还是高压(425 ~ 450MPa),压力更易导致柠檬酸缓冲溶液中细菌细胞内钾的流失,即使更低的压力处理也会引起细胞

表 4 高压处理引起的微生物细胞内钾浓度的变化

Table 4 Intracellular potassium changes of microbes induced by high hydrostatic pressure treatment

Microorganisms	Buffer	Pressure /MPa	Intracellular potassium concentration(μmol/L)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sodium citrate	Control	188 ± 9
		275	88 ± 14
		325	10 ± 12
		400	2 ± 1
	Phosphate	Control	345 ± 21
		350	243 ± 23
		425	38 ± 2
		600	2 ± 1
<i>Escherichia coli</i>	Sodium citrate	Control	332 ± 22
		200	231 ± 32
		275	91 ± 12
		350	4 ± 1
		400	5 ± 2
	Phosphate	Control	275 ± 21
		250	148 ± 11
		325	11 ± 3
		400	5 ± 1

内大量钾的流失。

2.5 膜电位的变化

在柠檬酸和磷酸盐缓冲溶液中 ,随着压力的增加 ,微生物的膜电位呈现出显著下降的趋势 ,两种实验微生物经 400 和 600MPa 的压力处理 ,都表现出极低的膜电位(表 5)。

表 5 高压处理引起的微生物细胞膜电位的变化
Table 5 Membrane potentials changes of microorganisms by a high hydrostatic pressure treatment

Microorganisms	Buffer	Pressure /MPa	Membrane potential/mV
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sodium citrate	Control	- 88 ± 11
		275	- 44 ± 2
		325	- 34 ± 7
		400	- 6 ± 3
	Phosphate	Control	- 59 ± 11
		350	- 55 ± 4
		425	- 34 ± 2
		600	- 11 ± 2
<i>Escherichia coli</i>	Sodium citrate	Control	- 90 ± 12
		200	- 74 ± 23
		275	- 38 ± 12
		350	- 12 ± 1
	Phosphate	400	- 4 ± 1
		Control	- 81 ± 12
		250	- 46 ± 8
		325	- 41 ± 11
		400	- 6 ± 2

2.6 ATP 浓度的变化

高压单核增生李斯特菌和大肠杆菌菌悬液 ,随着压力的增加 ,细胞内 ATP 浓度下降(表 6) 。 低压处理会导致单核增生李斯特菌细胞内 ATP 减少 35% ,高压处理会使细胞 ATP 浓度降低 92%。细胞内 ATP 和钾浓度对压力的变化具有平行对应关系。

表 6 高压处理引起的微生物细胞内 ATP 浓度的变化
Table 6 Intracellular ATP changes of microorganisms in response to a high hydrostatic pressure treatment

Microorganisms	Buffer	Pressure /MPa	Δ (ATP) K (μg/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sodium citrate	Control	1.21 ± 0.16
		275	1.08 ± 0.21
		325	0.21 ± 0.03
		400	0.11 ± 0.02
	Phosphate	Control	0.89 ± 0.14
		350	0.77 ± 0.10
		425	0.08 ± 0.21
		600	0.06 ± 0.03
<i>Escherichia coli</i>	Sodium citrate	Control	2.11 ± 0.34
		200	1.86 ± 0.16
		275	1.43 ± 0.12
		350	1.01 ± 0.08
	Phosphate	400	0.78 ± 0.11
		Control	3.35 ± 0.15
		250	1.89 ± 0.12
		325	0.36 ± 0.07
		400	0.24 ± 0.03

3 讨论

微生物对压力抗性的研究表明 :革兰氏阳性细菌比革兰氏阴性细菌有更强的耐压性^[14] ,本实验也得到了相似的结果。缓冲溶液的种类和溶液的 pH 值对微生物压力抗性的影响一直是人们研究的热点^[15] ,本实验还选用 pH5.6 的磷酸盐缓冲溶液和 pH5.6 的柠檬酸缓冲溶液制备微生物细胞悬液进行压力处理 ,当压力大于 200MPa 时 ,缓冲溶液的性质对大肠杆菌和单核增生李斯特菌的压力抗性有重大影响 ,磷酸盐可以提高微生物的压力抗性。240MPa 处理分别悬浮于 pH5.6 和 pH7.0 的磷酸盐缓冲溶液中的大肠杆菌 ,表现出显著的不同 ,pH7.0 缓冲溶液中的残存菌数比 pH5.6 缓冲溶液中的高 3 对数单位。250MPa 处理 pH7.0 和 pH5.6 磷酸盐缓冲溶液中的单核增生李斯特菌时 ,其残存菌数的差异为 2.3 个对数单位 ,随着处理压力的增加 ,二者残存菌数的差异增大 ,压力达到 400MPa 时 ,残存菌数有 5 个对数单位的差异。这也说明低 pH 值和压力之间对微生物失活具有协同作用 ,即 pH 值越低 ,压力越大 ,微生物越易致死 ,这与 Mackey 报道的结果一致^[16]。

高压处理微生物细胞的显著变化 ,一是细胞体积的改变 ;一是细胞膜结构与特性的变化。细胞膜的变化不仅会导致一些酶活性的变化 ,改变微生物细胞膜上的代谢过程 ,也可能改变微生物细胞膜上的脂肪酸构成。随着压力的增加细胞内 ATP 的浓度呈现下降的态势 ,这提示我们是不是压力引起了细胞膜 ATP 酶活性的变化。从实验结果中可以看出 ,随着处理压力的上升 ,大肠杆菌菌悬液细胞内外 的 δ pH 逐步下降。

高压处理的李斯特菌和大肠杆菌细胞内钾严重流失 ,δpH 和细胞内钾浓度的降低 ,可能是导致压力处理微生物细胞膜电位下降的重要因素。细胞内钾的流失在渗透休克和热敏离子通道中也可以观察到。在我们的实验中 ,中等强度的压力处理 ,微生物细胞内钾浓度是初始浓度的 10% ,而低温下 ,相同压力处理 ,可以使细胞内的钾浓度保持初始浓度的 70% 左右 ,同时细胞的形态保持不变。正是由于压力处理导致细胞内低钾状态 ,而使微生物不能存活。另外 ,中高压处理后 ,细胞内极低的 ATP 水平 ,不能驱动细胞内的钾摄入系统 ,而引起微生物的死亡。

压力食品加工技术的目的除了改善产品的营养品质特性外 ,另一个主要目的就是要抑制或杀死食

品的有害微生物。由于食品中多种因素的相互作用, 本研究中压力所表现出来的杀菌特性在实际应用中可能比我们的期望值要低, 此外还要考虑不同菌株间对压力表现出来的不同抗性。因此, 在食品加工过程中可能要更高的压力和更长的处理时间才能达到满意的杀菌效果。

参 考 文 献

- [1] Knorr D. Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 1993, **47** (1) :156 – 161.
- [2] Martin S, Barbosa C, Swanson B. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2002, **42** (3) :627 – 645.
- [3] Raso J, Barbosa G. Nonthermal preervation of foods using combined processing techniques. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, **43** (2) :265 – 285.
- [4] Akihiro I, Takako S, Masaaki W, *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers *in vivo* and *in vitro*. *Microbiology*, 2004, **150** (2) :1965 – 1972.
- [5] Pilar M, Bernard M. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential-and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with cell death. *Appl Envir Microbiol*, 2004, **70** (1) :1545 – 1554.
- [6] Wuytack E, Boven S. Comparative study of pressure-induced germination of *Bacillus subtilis* spores at low and high pressures. *Appl Envir Microbiol*, 1998, **64** (8) :3220 – 3224.

- [7] Hoover D. Pressure effects on biological systems. *Food Technology*, 1993, **47** (1) :150 – 154.
- [8] Cheftel J. Review: high pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci and Tech Intern*, 1995, **38** (1) :75 – 90.
- [9] Wouters P. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Envir Microbiol*, 1998, **64** (1) :509 – 514.
- [10] Fujii S, Iwahashi H. Characterization of a barotolerant mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Heremans K. High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology. ed. Leuven: Leuven University Press, 1997, 241 – 244.
- [11] Yuste J, Mor-Mur M. Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. *Food Microbiology*, 1998, **15** (2) :407 – 414.
- [12] Lowry O, Rosebrough N. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193** (4) :265 – 275.
- [13] Booth I, Mitchell W. Quantitative analysis of proton-linked transport systems: the lactose permease of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 1979, **182** (4) :687 – 696.
- [14] Hoover D, Metrick C. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 1989, **43** (1) :99 – 107.
- [15] Garcia-Graells G, Hauben K. High pressure inactivation and sublethal injury of pressure resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Appl Envir Microbiol*, 1998, **64** (4) :1566 – 1586.
- [16] Mackey B, Forestiere K, Isaacs N. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 2000, **18** (1) :1 – 11.

Effect of high hydrostatic pressure on microbial physiological characteristics

LI Zong-jun^{1*} XU Jian-xing²

(¹ The College of Food Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

(² The Institute of Biophysics of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Physiological characterizations of *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 and *Escherichia coli* ATCC 80739 have deeply changed by high hydrostatic pressure. The results showed that counts of both microbial strains decreased 7 log cfu at 400MPa, 10min. Pressure treatments also resulted in change of Intracellular pH value, lowered membrane potential, have internal potassium filtered out, and decreased ATP concentration.

Key words: High Hydrostatic Pressure, Microorganism, Physiological Characterization