

超高压对植物乳杆菌能量代谢影响的研究

高瑀珑¹ 鞠兴荣¹ 江汉湖²

(¹ 南京财经大学食品与工程学院 南京 210003)

(² 南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

摘 要 :以植物乳杆菌 ATCC8014 为试材,研究超高压对其能量代谢的影响。建立了用氯化碘硝基四唑紫测定 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性的比色法。用比色法测定了超高压对 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性与葡萄糖利用的影响。试验结果表明,150~250MPa 作用 15min 在 MRS 琼脂培养基上随着压力的增大菌落数显著降低,INT 代谢还原活性降低显著,葡萄糖的利用变化不明显,超过 300MPa 后,葡萄糖的利用才显著降低,400MPa 处理 15min,尽管在 MRS 琼脂培养基上菌落数低于检测限,INT 代谢还原活性为 0%,而葡萄糖的利用能力仍为对照组的 56.1%,超高压作用下 ATCC8014 的灭活与 INT 代谢还原活性的降低的相关性较好。说明 ATCC8014 的细胞膜上参与葡萄糖的吸收和运输的酶、糖酵解的酶与调节系统比三羧酸循环的酶与调节系统较耐压。三羧酸循环比糖酵解对超高压敏感,三羧酸循环的抑制是超高压灭活其的重要原因,这为了探讨超高压杀灭植物乳杆菌的机制提供了一定的理论依据。

关键词 超高压 植物乳杆菌 能量代谢 葡萄糖利用 INT 代谢还原活性

中图分类号 :Q689 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)01-0068-06

超高压杀菌技术是一种有效的低温灭菌物理手段,同时作为研究生物大分子的有效工具在生物技术方面有很多应用,已成功的应用于生物工程的多个领域,如研究大分子结构与功能的关系、修饰酶活性、改变微生物代谢及基因表达^[1,2],疫苗的研制,血制品的制备^[3]。

与湿热杀菌相比,超高压杀菌技术对食品作用均一、迅速,且无体积和形状的限制,对风味物质、色素等小分子物质的天然结构无影响^[4,5],能较好地保持食品的原汁、原味及营养成分等^[6,7];使酶失活^[8]。20 世纪 90 年代,日本明治屋食品公司将超高压技术应用于食品杀菌研究。1991 年 4 月,高压食品果酱在日本问世,引起世界轰动。超高压杀菌技术是食品加工工业的一次重大技术进步^[6]。

Ritz^[9]认为细胞膜损伤及其蛋白质变性是超高压失活沙门氏菌的主要原因,超高压引起微生物一系列变化,如细胞形态、细胞壁、细胞膜、基因的表达蛋白质的合成及其应激反应^[10,11]。然而至今为止,超高压杀菌机理尚未研究清楚^[10-14],探讨超高压杀菌机理为超高压技术在食品工业、医学、生物化学等领域的应用奠定理论基础^[15,16]。

糖酵解和三羧酸循环为乳酸菌细胞的一切生命

活动提供所需能量,能量代谢的破坏必然导致细胞的死亡。本研究以发酵工业生产中常见的污染菌植物乳杆菌为试材,因此探讨超高压对植物乳杆菌产能代谢的影响,研究超高压作用下植物乳杆菌产能代谢中葡萄糖利用及 INT 代谢还原活性的变化,旨在从能量代谢角度来分析超高压对植物乳杆菌的灭活机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) ATCC8014 购自中国科学院微生物研究所。

1.1.2 培养基 :采用 MRS 培养基^[17]。

1.1.3 主要试剂和仪器 :Glucose 试剂盒购自 Sigma 公司,氯化碘硝基四唑紫(INT;2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazotium chloride)购自 Sigma 公司。超高压设备(内蒙古包头市五十二所研制,压力范围 0~800MPa),Allegra64R 型高速低温离心机(Beckman 公司,美国),DG5032 型全自动酶联免疫检测仪(南京华东电子集团),722 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),96 孔微量酶标板(Costar,美国)。

基金项目 :财政部、农业部农业科技跨越计划资助项目(2003-12)

作者简介 :高瑀珑(1975-),男,山西静乐县人,博士,讲师。主要从事食品微生物及生物技术研究。Tel :86-25-83493936 ; Fax :86-25-83495837 ; E-mail :yulonggao19762001@yahoo.com.cn

收稿日期 :2005-06-24 ;接受日期 :2005-09-07 ;修回日期 :2005-09-11

1.2 植物乳杆菌样品的制备

植物乳杆菌经牛奶活化后,接入 MRS 液体培养基,37℃ 静置培养 12h,5000r/min 离心 15min,弃上清液,沉淀下的菌体以缓冲液 1(KCl 1.10g, MgSO₄·7H₂O 0.71g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.77g, CaSO₄·2H₂O 1.00g, CaCl₂ 0.86g, 柠檬酸 2.18g, 乳糖 52.0g, 重蒸水 1000mL, pH 6.8, 过滤法除菌)洗涤一次,再以缓冲液 1 制成菌悬液,调整细胞浓度,使起始菌数 N₀ 为 10⁹ cfu/mL,将其分装于 5mL 的医用无菌塑料瓶,热封口(不留顶隙),冷藏备用。按照试验设计控制高压介质温度(20℃),待样品温度与高压介质温度达到平衡后,进行超高压处理,升压速度及卸压速度分别为 150MPa/min、300 MPa/s,每 1 处理重复 3 次,以未经超高压处理的菌悬液作为对照。

1.3 植物乳杆菌存活的测定

本试验所用的压力为 50、100、150、200、250、300、350、400 MPa,处理时间 15min,温度 20℃。植物乳杆菌的样品菌悬液经高压处理后立即进行菌落总数的测定,以无菌缓冲液 2(6.8g KH₂PO₄, 0.1g MgSO₄·7H₂O, 0.05g MnSO₄·H₂O, 4.0g 葡萄糖,重蒸水 1000mL, pH 6.8, 过滤法除菌)适当稀释对照及超高压处理后的供试菌悬液,于 MRS 琼脂培养基平板 37℃ 培养 72h 后,按文献 [18] 进行菌落记数,检测限为 1cfu/mL。

1.4 植物乳杆菌 ATCC8014 对葡萄糖利用的测定

1.4.1 原理:植物乳杆菌 ATCC8014 对葡萄糖利用的测定原理参见文献 [19]。

1.4.2 植物乳杆菌 ATCC8014 对葡萄糖利用的测定:参照文献 [20] 的方法,并进行适当修改。具体方法如下:取适量的 37℃ 静置培养 12h 的植物乳杆菌培养液,离心(5000r/min, 4℃, 15min)收集菌体,在同样的条件下,用缓冲液 3(20mmol/L KH₂PO₄-NaOH 缓冲液, pH 7.0, 含 1.0mmol/L 的 MgCl₂)洗涤一次。将其悬浮在细胞密度为 10⁹ cfu/mL 缓冲液 3 中,37℃ 保温 30min 后,离心(5000r/min, 10min)收集菌体,并悬浮于等体积缓冲液 4 中(100mmol/L KH₂PO₄-NaOH 缓冲液, pH 7.0, 含 1.0mmol/L 的 MgCl₂, 16.7mmol/L 葡萄糖)。

将其分装于 5mL 的无菌医用塑料瓶,热封口(不留顶隙)控制高压介质温度,待样品温度与高压介质温度(20℃)达到平衡后,以 50、100、150、200、250、300、350、400MPa 进行超高压处理 15min。样品经高压处理后再 37℃ 保温 120min,立即离心

(5000r/min, 15min)取上清液,于 722 可见分光光度计下测定其中葡萄糖的含量。每一种处理重复 3 次,未经超高压处理的菌悬液作为对照组 CK。

1.5 植物乳杆菌 ATCC8014 对 INT 代谢还原活性的测定

1.5.1 测定方法:氧化还原比色法,参照文献 [21~23] 的方法。

1.5.2 用氯化碘硝基四唑紫(INT)法测定 ATCC8014 对 INT 代谢还原活性的原理:参见文献 [22~27]。

1.5.3 标准样品的制备及其对 INT 代谢还原活性标准曲线的制作:以 1.2 节中所制备的未经超高压处理的对照组菌悬液细胞的代谢还原活性为 100% 及对照组菌悬液经 80℃ 加热处理 30min 后细胞代谢还原活性为 0% 作为标准样品,配制成代谢还原活性为 0、10、25、50、90、100% ATCC8014 一系列菌悬液,离心(5000r/min, 15min, 0℃),去上清液,再分别以等体积的缓冲液 2 制成一系列菌悬液,加入平底 96 孔微量酶标板,每一样品加 6 孔,每孔 100μL,各孔再加入 100μL 的 4mmol/L INT 溶液,每隔 5min 用酶标仪检测波长 540nm 处酶标板各孔的 OD 值。以 OD 值作为纵坐标,反应时间作横坐标,绘制出甲臌的生成量随时间变化曲线,所以曲线的斜率就表示甲臌的生成速率。再以曲线的斜率为纵坐标,ATCC8014 细胞对 INT 代谢还原活性为横坐标,数据经回归处理后,作为 ATCC8014 对 INT 代谢还原活性的标准曲线。

1.5.4 样品的制备及其对 INT 代谢还原活性测定:将 1.2 节中的经超高压处理过的样品立即离心(5000r/min, 15min, 0℃),去上清液,以等体积缓冲液 2 制成菌悬液,加入平底 96 孔微量酶标板,每份样品加 6 孔,每孔 100μL,各孔再加入 100μL 的 4mmol/L INT 溶液,每隔 5min 用酶标仪检测 540nm 波长处酶标板各孔的 OD 值。以 OD 值为纵坐标,测定时间作横坐标,数据经回归处理后,求得直线的斜率,按照 1.5.3 节中所制的 ATCC8014 对 INT 代谢还原活性标准曲线将所求得直线的斜率换算出代谢还原活性。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 软件(version 10.0, SPSS Inc.)来进行数据分析、回归模型的建立,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据用 *t* 检验进行差异显著性分析, *P* < 0.05 为差异显著。

2 结果和讨论

2.1 超高压作用下植物乳杆菌细胞的灭活曲线

对大多数不耐压的微生物而言,在超高压作用下,微生物的死亡曲线遵循一级反应动力学^[28,29]。芽孢菌及大肠杆菌的超高压失活曲线呈倒 S 型曲线^[30,31]。本研究发现植物乳杆菌的失活曲线也呈倒 S 型,从图 1 的超高压作用 15min 后植物乳杆菌的失活曲线可以看出,小于 150MPa 的压力下 ATCC8014 在 MRS 琼脂培养基上失活不明显($P > 0.05$),当压力超过 150MPa 以后,细胞急剧死亡,由于 ATCC8014 细胞内部物种的多样性,即使在同一种压力下其耐压能力也不同,所以死亡曲线呈倒 S 型。只有在 400 MPa 作用 15min 后,在 MRS 培养基上植物乳杆菌菌落数低于检测限。

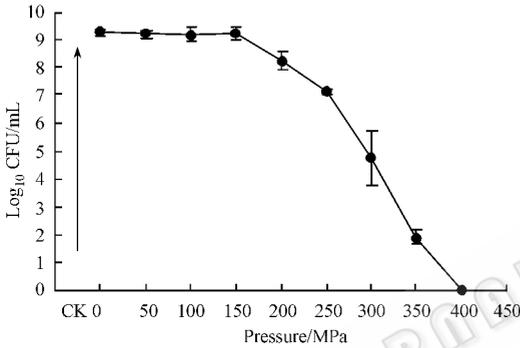


图 1 20°C 时超高压作用 15min 植物乳杆菌的失活曲线

Fig.1 Kinetic of HHP inactivation of *L. Plantarum* ATCC8014 at 20°C for 15min

2.2 超高压对植物乳杆菌 ATCC8014 对葡萄糖利用的影响

由单因子预备试验的研究结果表明缓冲液 4 中 16.7mmol/L 的葡萄糖正好用以被对照组中的 10^9 cfu/ml ATCC8014 细胞所利用的最适浓度(试验数据未列出)。从图 2 可以看出,50 ~ 250MPa 作用 15min ATCC8014 几乎彻底的分解了缓冲液 4 中 16.7mmol/L 的葡萄糖,与对照组相比差异不显著($P > 0.05$),这表明 ATCC8014 经 250MPa 作用 15min 后葡萄糖的利用能力仍然正常。而图 1 失活曲线显示 200、250MPa 作用 15min 分别约为 1、2 个数量级的 ATCC8014 失活,说明这些失活的细胞仍然可以进行正常的利用葡萄糖。400 MPa 作用 15min ATCC8014 基本全部失活,却有 56.1% 葡萄糖被降解,这也说明对于超高压杀菌,细胞的死亡与失去利用葡萄糖能力相关性不好,部分细胞在 MRS 琼脂培养基上不能生长,但是还可以利用葡萄糖。同时通

过 80°C 处理 ATCC8014 细胞 30min,发现其失去利用葡萄糖能力与细胞的死亡高度相关($r^2 = 0.9990$,试验数据未列出),表明超高压作用下失去利用葡萄糖能力不是其死亡的主要原因。

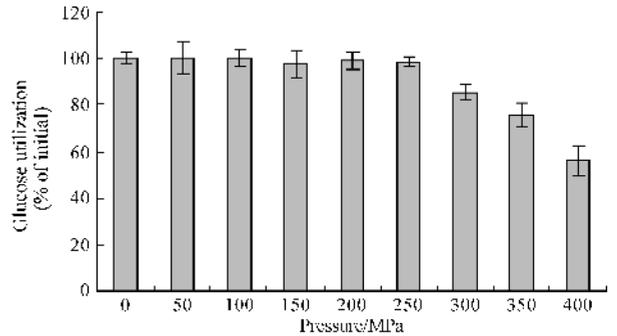


图 2 超高压对植物乳杆菌 ATCC8014 的葡萄糖利用的影响(20°C 15min)

Fig.2 The effect of HHP on glucose utilization of ATCC8014 at 20°C for 15min

2.3 氯化碘硝基四唑紫(INT)进行检测 ATCC8014 对 INT 代谢还原活性比色法的建立

以四唑盐测定活细胞对 INT 代谢还原活性的原理是活细胞在三羧酸循环的电子传递系统中脱氢酶的作用下生成一种活化氢离子,该离子可将 INT 还原成稳定的红色甲臃^[32,33]。Thom^[34]在研究酵母菌与铜绿假单胞菌以及 Gomez^[26]研究分支杆菌的三羧酸循环时发现,于显微镜下观察到细胞内有红色甲臃晶体沉淀。迄今,以 INT 法测定植物乳杆菌三羧酸循环的代谢活性国内外报道不多见。ATCC8014 的 INT 代谢还原活性的高低反应了其细胞的能量代谢水平的高低。在研究超高压杀灭 ATCC8014 机理的过程中,需大量的测定其代谢活性,因而有必要探讨能否将 INT 的还原产物甲臃的生成速率来推测 ATCC8014 细胞对 INT 代谢还原活性。

以 1.2 节中所制备的未经超高压处理的对照组菌悬液的细胞对 INT 代谢还原活性为 100% 及对照组菌悬液经 80°C 加热处理 30 min 后细胞为 0% 作为标准样品,配制代谢还原活性为 0、10、25、50、90、100% ATCC8014 系列菌悬液,每隔 5min 用酶标仪检测 540nm 波长下酶标板各孔的 OD 值。以 OD 值作为纵坐标,反应时间作横坐标,作出甲臃的生成量随反应时间变化曲线,利用 SPSS 软件对该试验数据进行线性回归拟合,所得对 INT 代谢还原活性为 0 ~ 100% 的 ATCC8014 细胞的还原产物甲臃对反应时间线性回归方程见表 1。表 1 可以看出,5 个回归方程皆极显著,相关性好,在 0 ~ 35min 的范围内,反应时

间与甲臜的生成量呈直线正相关。

以表 1 中的 5 个回归方程的斜率为纵坐标, ATCC8014 细胞对 INT 代谢还原活性为横坐标, 作为 ATCC 8014 对 INT 代谢还原活性的标准曲线(图 3), 数据经回归处理后, 获得甲臜的生成速率对 INT 代谢还原活性线性回归方程为: $Y = 0.017x - 0.0006$, 该方程极显著 ($P < 0.0001$), 相关系数 $r = 0.9983$ 。因此, 可以用 INT 的还原产物甲臜的生成速率来推测 ATCC8014 细胞对 INT 代谢还原活性。

表 1 植物乳杆菌 ATCC8014 还原产物甲 对反应时间的线性回归方程

Table 1 Linear regression equation of reduction formazan by *L. plantarum* ATCC8014 viable cells versus reaction time

Activity of deoxidization/%	Linear regression equation	P value	R^2_{Adj}	r
100	$Y = 0.0167x + 0.0063$	< 0.0001	0.9981	0.9992
90	$Y = 0.0147x - 0.0026$	< 0.0001	0.9976	0.9990
50	$Y = 0.0076x + 0.0122$	< 0.0001	0.9931	0.9970
25	$Y = 0.0031x + 0.0080$	< 0.0001	0.9837	0.9930
10	$Y = 0.0011x + 0.0063$	0.0001	0.9158	0.9632

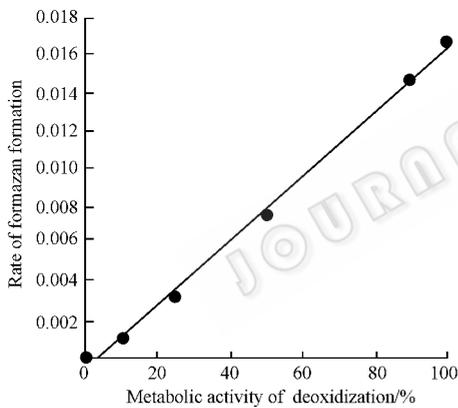


图 3 细胞的 INT 的代谢还原活力对甲 的生成速率的影响

Fig.3 Effect of cell INT metabolic activity of deoxidization on rate of formazan formation

2.4 超高压对植物乳杆菌 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性的影响

乳酸菌主要是依靠葡萄糖降解途径中底物水平磷酸化及其三羧酸循环获得的能量来维持其生长及生理活动^[35]。因此, 研究超高压作用下植物乳杆菌的糖酵解与三羧酸循环对了解超高压灭活植物乳杆菌具有重要的意义。

三羧酸循环为 ATCC8014 细胞的一切生命活动提供所需能量, 其中间产物是合成细胞内重要有机物质的原料。乳酸菌是通过三羧酸循环的一系列 NADH 脱氢酶、琥珀酸脱氢酶等脱氢酶把 INT 还原

成甲臜, INT 的还原需要三羧酸循环代谢产生的 NADH, ATCC8014 还原 INT 的过程还被用来指示整个细胞代谢活性^[36-38]。为了探讨超高压灭活植物乳杆菌 ATCC8014 的机制, 以 INT 比色法测定超高压作用后植物乳杆菌 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性的变化情况(图 4)。图 4 显示, ATCC8014 细胞经 100MPa、150MPa 作用 15min, 其 INT 代谢还原活性与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 分别为对照组活性的 98.5%、98.2%, 而图 1 的失活曲线表明, 在 MRS 琼脂培养基上失活不显著 ($P > 0.05$)。而 200MPa 作用 15min ATCC8014 的 INT 代谢还原活性显著降低, 为对照组活性的 10.3%, 由图 1 的失活曲线显示约有 1 个数量级的细胞失活。这就说明在超高压作用下 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性的降低与细胞的死亡相关性好。350MPa 作用 15min ATCC8014 的 INT 代谢还原活性几乎为零, 失活曲线显示约有两个数量级的细胞存活, 其原因可能是这些细胞处于亚致死受伤状态, 其中起还原 INT 关键作用的酶的可逆性失活, 而在 MRS 培养基上经过一段时间的伤修复而恢复活性。同时通过 80°C (30min) 处理 ATCC8014, 发现其 INT 代谢还原活性的降低与死亡高度相关 ($r^2 = 0.9995$, 试验数据未列出), 说明 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性的降低是超高压灭活其的重要原因, 从而可以推测超高压的作用使得 ATCC8014 三羧酸循环受到损伤是超高压灭活其的重要原因。

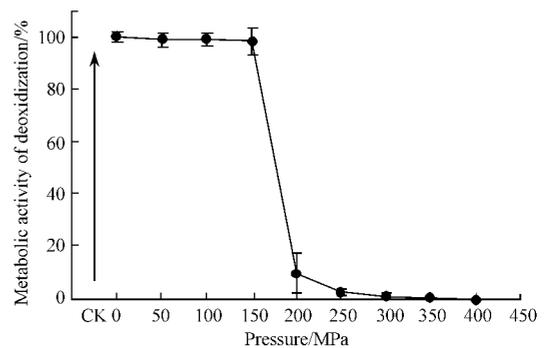


图 4 超高压对 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性的影响 (20°C, 15min)

Fig. 4 Effect of HHP on TCA metabolic activity of ATCC8014 deoxidization at 20°C for 15min

ATCC8014 对葡萄糖利用包括两个过程, 首先葡萄糖作为营养物质通过细胞壁和细胞膜进入细胞内, 其次是进入细胞内的葡萄糖作为能源物质进行分解代谢——糖酵解。

结合超高压对 ATCC8014 的失活曲线与葡萄糖

利用影响的研究,我们发现,50~150 MPa 作用 15min, ATCC8014 在 MRS 琼脂培养基上随压力的增大失活不明显,而 ATCC8014 的 INT 代谢还原活性基本不变,葡萄糖利用正常,说明在此条件下 ATCC8014 三羧酸循环途径的一系列脱氢酶、糖酵解的酶、细胞膜上参与葡萄糖吸收运输的酶未受影响;150~250 MPa 作用 15min ATCC8014 在 MRS 琼脂培养基上随压力的增大菌落数显著降低,INT 代谢还原活性显著降低,葡萄糖利用保持不变;当压力达到 300MPa 时,ATCC8014 的葡萄糖利用水平才明显降低,说明此时细胞膜上参与葡萄糖吸收运输的一系列酶以及调节系统才受到影响;400MPa 作用 15min,在 MRS 琼脂培养基上 ATCC8014 菌落数低于检测限,INT 代谢还原活性为 0,而葡萄糖利用能力还很高。这就说明细胞膜上参与 ATCC8014 葡萄糖的吸收、运输的酶以及糖酵解的酶与调节系统较三羧酸循环的酶与调节系统耐压。可以推测超高压杀灭 ATCC8014 的过程中,能量代谢首先受到破坏的是三羧酸循环,然后糖酵解才受到影响,糖酵解的抑制不是超高压灭活其的主要原因,此结论在其他微生物中是否也存在,相关工作正在研究。通过本研究看出超高压为研究生物代谢途径提供了一个新思路。

另外,对于超高压的作用下糖酵解与三羧酸循环的一系列酶的失活情况及其先后顺序;ATCC8014 的超高压失活中那些酶是起关键作用的酶,相关工作我们将作进一步的报道。

参 考 文 献

- [1] Lullien-Pellerin V, Balny C. High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2002, **3**(3): 209-221.
- [2] Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, *et al.* Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 1994, **12**(12): 493-501.
- [3] Silva JL, Oliveira AC, Gomes AM, *et al.* Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1595**(1-2): 250-265.
- [4] Matser AM, Krebbers B, Berg RWVD, *et al.* Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science & Technology*, 2004, **15**(2): 79-85.
- [5] Matser AM, Knott ER, Teunissen PGM, *et al.* Effects of high isostatic pressure on mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 2000, **45**(1): 11-16.
- [6] Trujillo AJ, Capellas M, Saldo J, *et al.* Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2002, **3**(4): 295-307.
- [7] Butz P, Edenharder R, Fernández García A, *et al.* Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Research International*, 2002, **35**(2-3): 295-300.
- [8] López-Malo A, Palou E, Barbosa-Cánovas GV, *et al.* Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 1998, **31**(8): 549-556.
- [9] Ritz M, Freulet M, Orange N, *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, **55**(1-3): 115-119.
- [10] Elo MA, Sironen RK, Kaamiranta K, *et al.* Differential regulation of stress proteins by high hydrostatic pressure, heat shock, and unbalanced calcium homeostasis in chondrocytic cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2000, **79**(4): 610-619.
- [11] Smelt JPPM, Hellemons JC, Wouters PC, *et al.* Physiological and mathematical aspects in setting criteria for decontamination of foods by physical means. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, **78**(1-2): 57-77.
- [12] Ulmer HM, Herberhold H, Fahsel S, *et al.* Effects of pressure-induced membrane phase transitions on inactivation of HorA, an ATP-dependent multidrug resistance transporter, in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(3): 1088-1095.
- [13] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertuccio A. Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2002, **22**(1): 55-63.
- [14] Linton M, McClements JMJ, Patterson MF. Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skimmed milk using high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2001, **2**(2): 99-104.
- [15] Gao Y, Wang Y, Jiang H. Effect of high pressure and mild heat on *Staphylococcus aureus* in milk using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2005, **40**(5), 1849-1854.
- [16] Gao Y, Jiang H. Optimization of process conditions to inactivate *Bacillus subtilis* by high hydrostatic pressure and mild heat using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, **24**(1), 43-48.
- [17] Jenkins JK, Courtney PD. *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Can J Microbiol*, 2003, **49**(1): 51-57.
- [18] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2000: 92-94.
- [19] Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 3rd ed. Washington, DC: AACC Press, 1990, 3: 168-182.
- [20] Turkusic E, Kalcher J, Kahrovic E, *et al.* Amperometric determination of bonded glucose with an MnO₂ and glucose oxidase bulk-modified screen-printed electrode using flow-injection analysis. *Talanta*, 2005, **65**(2): 559-564.
- [21] Fukui M, Takki S. Reduction of tetrazolium salts by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1989, **62**(1): 13-19.
- [22] Thom SM, Horobin RW, Seidler E, *et al.* Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *J Appl Bacteriol*, 1993, **74**(4): 433-443.
- [23] Walsh S, Lappin SHM, Stockdale H, *et al.* An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes. *J Microbiol Methods*, 1995, **24**(1): 1-9.
- [24] Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*, 1991, **142**(2): 257-265.

- [25] Meshulam T, Levitz SM, Christin L. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye. *J Infect Dis*, 1995, **172** (4): 1153 – 1156.
- [26] Gomez FR, Gupta S, Tamez GR, et al. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. *J Clin Microbiol*, 1995, **33** (7): 1842 – 1846.
- [27] Lu S, Sun X, Shi C, et al. Determination of tricarboxylic acid cycle acids and other related substances in cultured mammalian cells by gradient ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, 2003, **1012** (2): 161 – 168.
- [28] Gervilla R, Ferragut MMV, Guamis B. Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated in ewe's milk by high hydrostatic pressure. *Food Microbiology*, 1999, **16** (2): 173 – 184.
- [29] Zook CD, Parish ME, Braddock RJ, et al. High pressure inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores in orange and apple juices. *J Food Sci*, 1999, **64** (3): 533 – 535.
- [30] Hauben KJA, Bernaerts K, Michiels CW. Protective effect of calcium on inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure. *J Appl Microbiol*, 1998, **85** (4): 678 – 684.
- [31] Heinz V, Knorr D. High pressure inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* cells by a three-state-model considering distributed resistance mechanisms. *Food Biotechnol*, 1996, **10** (2): 149 – 161.
- [32] Roslev P, King GM. Application of a tetrazolium salt with a water soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (9): 2891 – 2896.
- [33] Haslama G, Richter M, Wyatta D, et al. Estimating the number of viable animal cells in multiwell Culture-a tetrazolium-based assay. *Analytical Biochemistry*, 2005, **336** (2): 187 – 195.
- [34] Thom SM, Horobin RW, Seidler E, et al. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *J Appl Bacteriol*, 1993, **74** (4): 433 – 443.
- [35] Poolman B. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 1993, **12** (1–3): 125 – 148.
- [36] Smart JB, Thomas TD. Effect of oxygen on lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53** (3): 533 – 541.
- [37] Marty-Teyssset F, Torre FDL, Garel JR. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (1): 262 – 267.
- [38] Sakamoto M, Komagata K. Aerobic growth of and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *J Ferment Bioeng*, 1996, **82** (3): 210 – 216.

Effects of high hydrostatic pressure on energy metabolism of *Lactobacillus plantarum*

GAO Yu-long^{1*}, JU Xing-rong¹, JIANG Han-hu²

(¹ College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210003, China)

(² College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Effects of high hydrostatic pressure on energy metabolism were investigated with *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 as the test microorganism in this work. An INT colorimetric method of oxidation-reduction was established to measure INT metabolic activity of deoxidization of *L. plantarum* ATCC8014 cells. The utilization of glucose and INT metabolic activity of deoxidization of the cells after HPP treatment were determined using colorimetric methods. The experimental results showed that survival counts of ATCC8014 cells on MRS agar medium and INT metabolic activity of deoxidization decreased significantly, and little changes of utilization of glucose took place with increasing pressure ranging from 150 to 250 MPa for 15 min. Utilization of glucose also reduced evidently at high pressure (> 300 MPa) for 15 min. Whereas survival cell counts on MRS agar medium were below the detection limit and INT metabolic activity of deoxidization of ATCC8014 was 0% after a 15-min pressure holding time at 400MPa, utilization of glucose of the cells retained 56.1% compared with that of untreated cells. In summary, it can be concluded that enzymes absorbing and transporting glucose in cellular membrane appear to have a high resistance to pressure, enzymes and biological regulating systems involved in glycolysis are more resistant to pressure than those in TCA (tricarboxylic acid cycle) system, TCA of ATCC8014 is more sensitive to pressure than glycolysis, and the decrease of INT metabolic activity of deoxidization is highly related to cell reduction during HHP, which provide some theoretical evidences for mechanisms of HHP sterilization. Inhibition of TCA metabolism is a very important cause of ATCC8014 inactivation by HHP. High hydrostatic pressure can be used as an effective tool to explore pathways of biological metabolism.

Keywords: High hydrostatic pressure (HHP); *Lactobacillus plantarum*; Energy metabolism; Utilization of glucose; INT metabolic activity of deoxidization