

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (7) :746 - 753; 4 July 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.004

超高压对单增李斯特菌细胞膜的损伤和致死机理

陆海霞, 黄小鸣, 朱军莉

浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018

摘要:【目的】研究超高压对病原微生物单增李斯特菌细胞膜损伤的影响。【方法】本文以单增李斯特菌为研究对象,探讨了不同压力处理(100 - 500 MPa)对单增李斯特菌的灭活作用,利用透射电镜观察高压处理对细菌细胞超微结构的影响,通过紫外分光光度法、原子吸收分光光度法和荧光分光光度法测定高压处理对细菌细胞膜通透性的影响,采用超微量 Na^+/K^+ -ATP 酶试剂盒测定高压处理对细菌细胞膜 Na^+/K^+ -ATP 酶活力的影响。【结果】25℃经 300、350、400 MPa 压力处理 15 min 后,单增李斯特菌总数由 9.00 分别降至 5.20、3.27、1.35 个对数单位,经 450MPa 及以上的压力处理后,单增李斯特菌的致死率达到 100%。超高压处理对单增李斯特菌的细胞超微结构造成明显的损伤,细胞结构不完整,细胞壁局部被破坏,细胞膜通透性增大,细胞内物质聚合,出现透电子区。由于细胞膜的损伤使得细胞内无机盐离子、紫外吸收物质流出,细胞膜上的 Na^+/K^+ -ATPase 失活。【结论】超高压处理造成单增李斯特菌细胞形态结构明显损伤,改变细胞膜的通透性,降低细胞膜上 Na^+/K^+ -ATP 酶活力,最终使得细胞内无机盐离子和胞内大分子物质外流而死亡。

关键词:超高压,单增李斯特菌,细胞膜损伤

中图分类号:Q93-334 **文章编号:**0001-6209(2014)07-0746-08

超高压(Ultra-high pressure processing, UHP)杀菌技术是一种非热杀菌技术,与热处理相比,超高压在灭菌的同时,能更好地保持食品的生物特性、原有风味及营养成分,使病原微生物受损或者内源酶失活,延长食品的货架期^[1-3],超高压在食品保鲜和杀菌领域具有广阔的应用前景^[4-5]。在超高压杀菌过程中,因为食品的组织状态和组成成分复杂多变,需要根据不同的食品对象采取不同的处理条件。此外,不同的微生物对压力的耐受性不同,革兰氏阳性菌比阴性菌更耐压。影响超高压杀菌的主要因素

有:压力大小、加压时间、加压温度、pH 值、水分活度、食品成分、微生物生长阶段和微生物种类等^[6-7]。超高压处理可引起细菌形态、细胞壁、细胞膜、生物化学反应和核酸等遗传物质的改变^[8],有研究认为压力引起细菌的细胞膜的损伤是细菌死亡的主要原因^[9],超高压处理引起细菌细胞膜通透性的增强,使细胞内含物质渗出细胞外^[10],从而导致细菌死亡。还有研究表明,超高压通过改变蛋白质的高级结构来改变蛋白质的构象,造成蛋白质不可逆的变性^[11-12]。超高压还可以降低细菌中与维持

基金项目:“十二五”国家支撑计划项目《食品质量安全控制及检测关键技术与产品》之“水产品加工过程质量安全控制关键技术集成与示范”(2012BAD29B06)

作者简介:陆海霞(1977 -),女,吉林浑江人,博士,副教授,研究方向为食品致病微生物控制。Tel: +86-571-88071024-7588;

E-mail: luhaixia@zjgsu.edu.cn

收稿日期:2013-10-20;修回日期:2013-12-25

生命力相关酶的活力。Bang等^[13]发现超高压降低了啤酒酵母和大肠杆菌细胞膜上的脂肪酶和酯酶活力,使细菌正常的生化反应无法进行。

关于超高压杀菌致死效果的研究已经比较深入,但对于超高压杀菌的致死机理的研究仍有待深入。本文以四大食源性致病菌之一——单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)为研究对象,研究单增李斯特菌的超高压致死条件,通过透射电镜(TEM)观察其细胞超微结构的变化、细胞内外无机盐离子、核酸蛋白质物质的泄露情况以及细菌 Na^+/K^+ -ATP酶活力变化,从而探讨超高压对单增李斯特菌细胞膜和胞内大分子物质的损伤和致死机理,旨在为超高压应用于食品杀菌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和试剂:单增李斯特菌(ATCC19114-3),购自于中国科学院微生物研究所;胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂培养基(TSAYE),胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤培养基(TSBYE),购自杭州微生物公司;碘化丙锭(PI),购自杭州捷程生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器:HPB-A2-600/0.6超高压生物处理机,天津市华泰森淼生物工程技术有限公司;透射电子显微镜JEM-1230,日本JEOL公司;970CRT荧光分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;TAS-900型原子吸收分光光度计,日本岛津公司;MIR-554低温恒温培养箱,日本SANYO;3-30K台式高速离心机,Sigma;M200多功能酶标仪,TECAN。

1.2 菌悬液的制备

从-80℃冰箱中取出保藏的单增李斯特菌种,平板划线培养1d后获得单菌落,挑取一个单菌落于10 mL的胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤培养基(TSBYE)中,37℃、200 r/min摇床培养18 h,以1%接种量接入100 mL的TSBYE液体培养基中,37℃ 200 r/min摇床培养18 h,离心(6000×g,4℃,15 min),弃去上清液,沉淀用0.85%生理盐水制成菌悬液,调整细菌浓度,使起始菌数为 10^8-10^9 CFU/mL,4℃保存备用。

1.3 超高压处理

将菌悬液分装于50 mL的无菌蒸煮袋中,热封口,冷藏备用。将样品置于超高压加压釜中,分别于

100-500 MPa保压处理15 min,从0 MPa至处理压力的升压时间不超过5 min,泄压时间不超过1 min,压力处理时间不包括加压和泄压时间,每个样品做3次平行。

1.4 微生物计数

对1.2制备的菌悬液经100、150、200、250、300、350、400、450、500 MPa压力处理,处理时间15 min,温度25℃,采用平板倾注计数法进行菌落总数的测定。以无菌生理盐水适当稀释超高压处理和未处理的菌悬液,以未处理作为对照,于胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSAYE)培养基上,37℃恒温倒置培养2d后,进行菌落计数。

存活率 = 超高压处理后存活菌落数 / 未处理菌落总数

1.5 超高压处理后细菌细胞内外无机盐离子浓度的测定

参照文献[14-15]的方法。取500 mL 37℃,200 r/min摇床培养18h的单增李斯特菌培养液,离心(6000×g,4℃,15 min),沉淀用无菌去离子水洗涤两次,重悬于200 mL的无菌去离子水中,制成菌悬液($OD_{600}=0.6$),将10 mL菌悬液分装于50 mL的无菌蒸煮袋中,真空热封口,以100-500 MPa不同压力在25℃下处理15 min,每个样品做3次平行,经高压处理后立即离心,收集上清液,沉淀用无菌去离子水洗涤两遍。上清液和沉淀均用1:4的硝酸和高氯酸消化至透明澄清,用原子吸收分光光度计测定其吸光度。

1.6 超高压处理后细菌细胞内核酸物质泄漏量的测定

将超高压处理与未处理的样品于4℃、6000×g离心15 min,收集上清液,置于石英比色皿中,使用紫外分光光度计测定260 nm和280 nm处的吸光值^[16]。

1.7 超高压处理后细菌细胞PI摄取量的测定

碘化丙锭(PI)溶于去离子水中配成1 mg/mL的PI储备液,储存于4℃暗处,参照文献[17-18]的方法,用生理盐水稀释菌悬液,使其 OD_{600} 约为0.2,菌悬液一式两份,分别在加压前和加压后加入PI储备液,使其终浓度为0.29 μmol/L,将样品置于超高压设备中100-500 MPa处理15 min,处理过的样品放入37℃暗处孵化10 min,离心(4℃、6000×g,15 min),弃去上清液,沉淀用生理盐水洗涤两次,使

用荧光分光光度计测定吸光值,激发光 485 nm,发射光 625 nm,狭缝宽度 10 nm,未处理的样品和生理盐水作为空白对照。

1.8 透射电镜观察超高压对细胞造成的损伤

分别取未高压处理和经 250、450 MPa 压力处理的液体培养物 40 mL,4℃、6000 × g 离心 15 min,弃上清液,并将沉淀的菌体重悬后转移至 1.5 mL 的微量离心管中继续以 6000 × g 离心 15 min,最后将沉淀的菌体在 2.5% 的戊二醛溶液中 4℃ 固定过夜,用 0.1 mol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次,每次 15 min;用 1% 的锇酸溶液固定样品 1-2 h;倒掉固定液,用 0.1 mol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次,每次 15 min;用梯度浓度(包括 50%、70%、80%、90% 和 95% 这 5 种浓度)的乙醇溶液对样品进行脱水处理,每种浓度处理 15 min,再用 100% 的乙醇处理 20 min;最后过渡到纯丙酮处理 20 min。用 1:1 的 Spurr 包埋剂与丙酮的混合液处理样品 1 h;再用 1:1 的 Spurr 包埋剂与丙酮的混合液处理样品 3 h;最后用纯 Spurr 包埋剂处理样品过夜。样品在 Reichert 超薄切片机中切片,获得 70-90 nm 的切片,该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液各染色 15 min,透射电镜观察细胞超微结构的变化。

1.9 超高压对细菌细胞膜 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的影响

将未高压处理的对照样和高压处理样用无菌生理盐水制备成 10⁶-10⁷ cfu/mL 的菌悬液,经超声波破碎,用考马斯亮蓝试剂测定蛋白含量,以牛血清蛋白为标准品。采用超微量 Na⁺/K⁺-ATP 试剂盒测定 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性。酶活力单位定义为每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量。

1.10 数据分析

文中数据为 3 次平行测定的平均值。采用 Origin7.5 绘图,显著性分析采用 SPSS 18.0 的单因素方差分析(One-Way ANOVA, Turkey),在显著性水平 $P < 0.05$ 下进行数据分析与统计。

2 结果和讨论

2.1 超高压处理压力对单增李斯特菌存活量的影响

供试菌液经 100-500 MPa、25℃、15 min 处理

后,立即进行菌落计数,未高压处理的试样作为空白对照。从图 1 可以看出,未经超高压处理的单增李斯特菌的菌落总数对数为 9.00,当压力小于 250 MPa 处理后菌落总数对数下降并不明显($P > 0.05$),当压力超过 300 MPa 时,菌落总数对数急剧下降,经 300、350、400 MPa 高压处理后菌落总数对数分别降至 5.20、3.27、1.35,致死率分别达到 42.2%、63.7%、85.0%,经 450 MPa 及以上的压力处理,单增李斯特菌全部死亡。随着压力的升高,单增李斯特菌致死率随之增大,超高压在较高压力下可以完全杀灭单增李斯特菌。

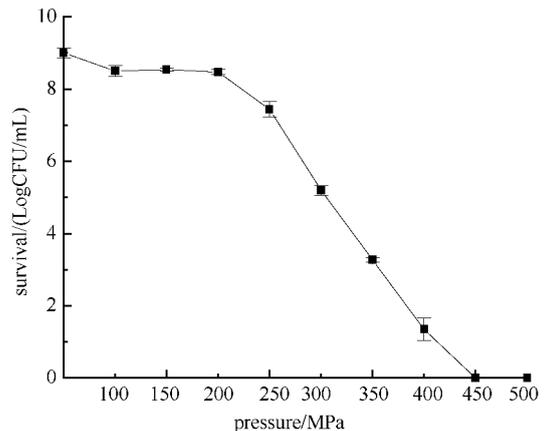


图 1. 超高压处理对单增李斯特菌存活率的影响

Figure 1. Effect of Ultra high pressure on the survival number of *Listeria monocytogenes*.

2.2 超高压处理对细菌细胞超微结构的影响

图 2 直观地反映了未高压处理、250、450 MPa 高压处理下单增李斯特菌细胞的超微结构变化。由图 2-A、B 可以看出,未高压处理的单增李斯特菌呈短杆状,细胞壁结构完整光滑,细胞内物质分布均匀。图 2-C、D 可以看出,250 MPa 压力处理后细菌细胞有一定程度的变形,细胞内细胞质局部皱缩,出现低电子区。从存活曲线可以看出,250 MPa 压力下细菌仍然存活,说明此压力下细胞虽然发生形变和细胞质皱缩,但是还不至于引起细胞死亡。图 2-E、F 可以看出,450 MPa 压力处理的细菌细胞严重变形,细胞膜完整性遭到破坏,部分出现缺口,细胞内含物结构紊乱,出现泄漏,胞浆蛋白凝固、核酸变性,细胞中出现大面积的透电子区(图中箭头标记区域即为透电子区),在此压力下细菌全部死亡。从以上细菌细胞受损情况分析,超高压引起的细胞内含物质变性凝固是导致微生物死亡的关键原因。

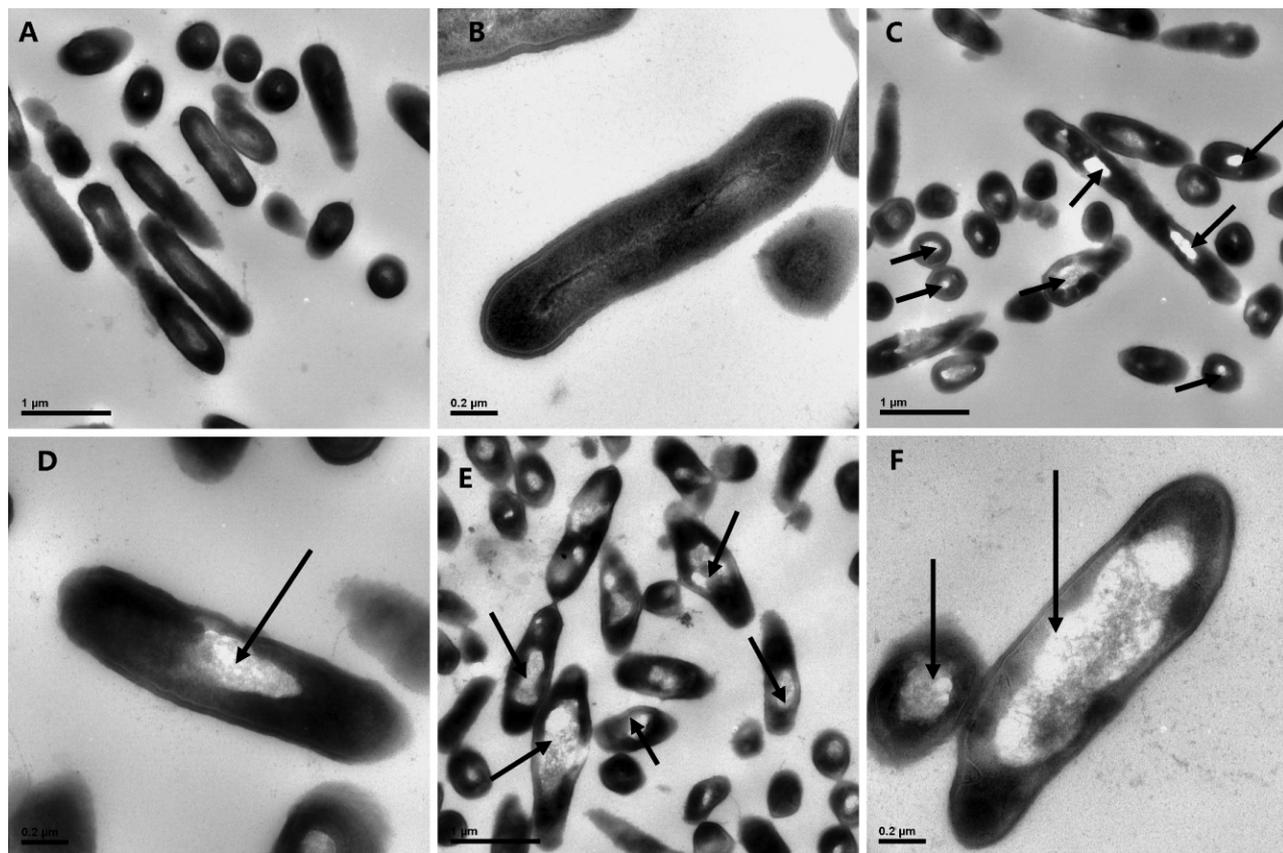


图 2. 超高压处理对单增李斯特菌细胞超微结构的影响

Figure 2. Transmission electron microscopy (TEM) (magnification, scale bars) examination of *Listeria monocytogenes* cells untreated and treated by Ultra high pressure. A and B: untreated cells; C and D: cells treated with 250 MPa of pressure at 25 °C for 15 min; E and F: cells treated with 450 MPa of pressure at 25 °C for 15 min.

2.3 超高压处理对细菌细胞膜通透性的影响

2.3.1 细胞内外无机盐离子浓度的变化: K^+ 、 Mg^{2+}

是维持细胞渗透压平衡的重要无机盐离子, 可通过测定上清液中 K^+ 、 Mg^{2+} 的浓度来观察细菌细胞膜的通透性变化^[19], 当 K^+ 、 Mg^{2+} 大量泄漏到细胞外时, 表明细胞膜受到了损伤。由表 1 可以看出, 超高压

引起单增李斯特菌细胞内 K^+ 、 Mg^{2+} 的流失。随着压力的上升, 细菌细胞内 K^+ 、 Mg^{2+} 的浓度逐渐降低, 而上清液中 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度随压力的升高而升高, 本实验结果与高瑀珑等人^[20] 的研究结果相一致。说明超高压处理使细菌细胞膜的通透性增加, 导致细胞内大量的无机盐离子流出胞外^[21]。

表 1. 超高压处理对单增李斯特菌细胞内外 K^+ 、 Mg^{2+} 浓度的影响

Table 1. The effect of ultra high pressure on the content of K^+ 、 Mg^{2+} in *Listeria monocytogenes*

pressure / (MPa)	$c(K^+) / (\mu\text{g/mL})$		$c(Mg^{2+}) / (\mu\text{g/mL})$	
	bacteria	supernatant	bacteria	supernatant
0.1	5.52 ± 0.08	4.20 ± 0.09	3.15 ± 0.16	0.25 ± 0.04
100	5.11 ± 0.15	4.80 ± 0.05	2.82 ± 0.05	0.34 ± 0.03
200	3.04 ± 0.03	5.90 ± 0.05	2.63 ± 0.08	0.49 ± 0.04
300	2.04 ± 0.02	5.88 ± 0.06	2.48 ± 0.07	0.65 ± 0.03
400	1.20 ± 0.03	6.45 ± 0.10	2.30 ± 0.07	0.78 ± 0.02
500	1.09 ± 0.03	6.63 ± 0.04	2.04 ± 0.07	0.78 ± 0.03

2.3.2 细胞内紫外吸收物质泄漏量的变化:由于核酸的组成中含有嘌呤、嘧啶碱基,蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环,这些结构都具有共轭双键(—C—C=C—C=C—),所以在紫外光区有强烈的光吸收作用,核酸和蛋白质的最大吸收峰分别在260 nm和280 nm附近。因此可通过测定260 nm和280 nm处的紫外吸收强度来确定细胞内核酸和蛋白质物质的泄漏情况。

由图3可以看出,经100–500 MPa处理的单增李斯特菌上清液中核酸(260 nm)、蛋白质(280 nm)两种物质的含量随压力的升高而逐渐增加,100 MPa高压处理对细胞膜通透性影响不显著($P > 0.05$),随着压力的增加,细胞膜通透性增大,更多的核酸和蛋白质流出到细胞外,从而导致细菌死亡。同时可以发现,样品的核酸物质在400 MPa处理时达到最大后略有减少, Moussa等^[22]推测,当细菌在一定的压力处理时,会导致细菌细胞内核酸和蛋白质物质的聚集,无法穿过细胞膜到细胞外,而使泄漏到细胞膜外的量相应减少,本实验500 MPa高压下核酸和蛋白质物质泄漏的量少于400 MPa的现象,也可以表明是因为高压导致核酸和蛋白质等大分子物质的聚合,从而使得胞外泄漏量减少。而当样品在500 MPa高压处理后,微生物已检测不到活菌,但上清液中紫外物质的泄漏程度与热处理(95°C, 15 min)相比仍存在显著差异($P < 0.05$),这说明超高压与热处理的杀菌机理不完全相同,超高压处理

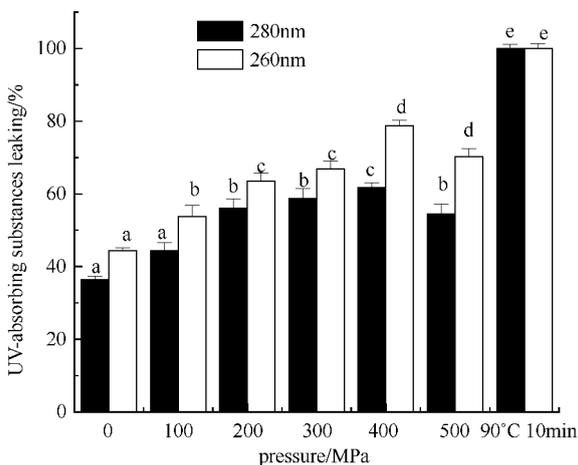


图3. 不同处理压力及热处理时单增李斯特菌细胞紫外吸收物质的泄漏量

Figure 3. Relative amount of UV-absorbing substances leaking of *Listeria monocytogenes*. The different shows significant difference ($P = 0.05$).

虽然并没有使细菌细胞膜成为全透性,但仍然能使细菌因高压而致死^[23]。

2.3.3 细胞PI摄取量的变化:PI是大分子的荧光染料,能与核酸物质结合,但是PI几乎无法穿过完整的细胞膜,只有当细胞膜被破坏,通透性发生改变,才能穿过细胞膜与核酸物质结合发出荧光。因此,可以用细胞内PI的摄取量来判断细胞膜的完整性^[24]。在压力处理之前加入PI可以检测超高压过程中细胞膜的通透性的变化情况,在压力处理之后加入PI暗培养10 min可以检测超高压处理之后细胞膜的损伤及修复情况。由图4可以看出,PI在压力处理之前加入和处理之后加入,其摄取量都是随着压力的升高而增加。比较PI两种加入方式发现,PI在处理之前加入比处理之后加入其摄取量高了20%–25%,本次实验表明由于单增李斯特菌是革兰氏阳性菌,与革兰氏阴性菌相比,由于细胞壁成分不同,对压力有一定的耐受性,在高压处理之后可以重新封装它们的细胞膜,这个现象可能与菌种个体对压力的反应有关,是由基因表达控制的^[25]。从实验结果还可以看出,超高压处理与热处理(95°C, 15 min)相比较,热处理的PI摄取量显著大于超高压的PI摄取量。由于热处理可严重破坏细胞膜的磷脂双分子层结构,使膜上的载体蛋白构象变化,细胞膜流动性改变,进而导致细菌细胞膜通透性增大^[26],而超高压处理的细菌细胞膜通透性较热处理小,因此,进一步证明超高压处理与热处理的杀菌机理存在差异。

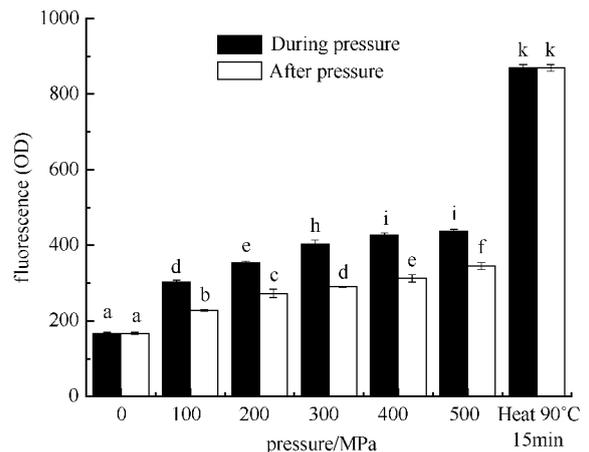


图4. 单增李斯特菌细胞PI摄取量随压力的变化

Figure 4. The change of PI uptake before or after pressure treatment in *Listeria monocytogenes*. The different shows significant difference ($P = 0.05$).

综合以上分析可知,单增李斯特菌细胞内外无机盐离子、紫外吸收物质的泄漏量,以及PI摄取量随压力的变化情况一致,均随压力的上升而增加。说明压力能引起细菌细胞膜通透性的增大,细胞因此不能维持正常的渗透压,失去细胞生长繁殖所需的无机盐离子、蛋白质和遗传物质,导致细菌无法正常生长而死亡。

2.4 超高压处理对单增李斯特菌细胞膜 Na^+/K^+ -ATPase 酶活力的影响

Na^+/K^+ -ATPase 是镶嵌在细胞质膜脂质双分子层中的一种蛋白质,通过构象变化催化 ATP 水解供能,在 Mg^{2+} 存在下,将细胞内的 Na^+ 释放到胞外同时将胞外的 K^+ 运输入细胞,由 Na^+/K^+ -ATPase 维持的离子浓度梯度不仅可维持细胞膜的膜电位,而且可调节细胞的体积并驱动某些细胞中的糖和氨基酸的运输,对维持细胞正常生理功能起着极其重要的作用^[27-28]。

由表 2 可以看出,经 200 MPa 及以上压力处理后,细菌细胞膜的 Na^+/K^+ -ATP 酶活力显著下降。未经高压处理的单增李斯特菌的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性为 $21.35 \pm 2.30 \text{ U/mgprot}$,而经 300、400 和 500 MPa 的压力处理后, Na^+/K^+ -ATP 酶活性分别降至 8.58 ± 1.73 、 7.69 ± 2.36 、 $5.22 \pm 0.97 \text{ U/mgprot}$,酶失活率分别达到 59.8%、64.0%、75.6%。表明超高压导致单增李斯特菌细胞膜 ATP 酶失活,从而使细菌胞内物质运送、能量转换、信息传递等正常生理代谢紊乱,导致细菌的死亡。Michiko 等^[29]报道超高压可以破坏细胞膜上蛋白质的结构,从而使得结合在细胞膜上的 ATP 酶活力构象改变而失活。Wouters 等人^[30]发现超高压降低了啤酒酵母和大肠杆菌细胞膜上的脂肪酶和酯酶活力,使细菌正常的生化反应无法进行。

表 2. 超高压处理对单增李斯特菌细胞膜 Na^+/K^+ -ATPase 酶活力的影响

Table 2. Effect of Ultra high pressure on membrane Na^+/K^+ -ATPase activity of *Listeria monocytogenes*

pressure/MPa	Na^+/K^+ -ATPase activity/(U · mg protein)
0.1	21.35 ± 2.30
200	19.12 ± 2.15
300	8.58 ± 1.73
400	7.69 ± 2.36
500	5.22 ± 0.97

3 结论

本文通过对细菌超微结构、细胞膜通透性以及细胞膜 Na^+/K^+ -ATP 酶活性等生理指标的检测,探讨了超高压处理对单增李斯特菌细胞膜的损伤和细胞膜通透性的影响,阐明了超高压处理对单增李斯特菌的致死机理。得出以下结论:

(1) 超高压对单增李斯特菌具有杀菌作用,在本研究条件下,当静压力达 450 - 500 MP 时, *Listeria monocytogenes* 菌株的生存率达可检测限以下。

(2) 超高压会导致细菌细胞超微结构破坏严重,450MPa 压力处理后细菌细胞变形,细胞壁局部出现缺口,细胞膜完整性被破坏,细胞内物质皱缩,蛋白质变性。

(3) 超高压使细菌细胞膜的通透性增大,细胞内无机盐离子、核酸、蛋白质等大分子物质流出细胞外。

(4) 超高压降低了细胞膜 Na^+/K^+ -ATPase 的活性。经 300、400 和 500 MPa 的压力处理后, Na^+/K^+ -ATPase 失活率分别达到 59.8%、64.0%、75.6%。

综上所述,细菌细胞膜通透性增大、细胞形态结构的损伤以及膜上 Na^+/K^+ -ATPase 的失活,是超高压处理致死微生物的重要原因。

参考文献

- [1] Tomas N, Sun DW. Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 2011, 1 (1) : 2-34.
- [2] Considine KM, Kelly AL, Fitzgerald GF, Hill C, Sleator RD. High-pressure processing effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 281 (1) : 1-9.
- [3] Evelyn RR, Gipsy TM, Juliana MC, Reyes JE, Mario PW, Ochoa-Martinez L A. Effect of high hydrostatic pressure processing on microbial inactivation and physicochemical properties of pomegranate arils. *Cytajournal of Food*, 2012, 10 (2) : 152-159.
- [4] Katarina K, Marta DV, Marta H, Peter R, David RL. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. *Trends in Food Science &*

Technology, 2010, 21 (11) : 558-568.

- [5] Javier R, Gustavo BC. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 2003, 43 (3) : 265-285.
- [6] 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. *Applied and Environment Microbiology*, 2004, 70 (1) : 1545-1554.
- [7] Chilton P, Isaacs NS, Manias P, Mackey BM. Biosynthetic requirements for the repair of membrane damage in pressure-treated *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 71 (1) : 101-104.
- [8] Arques JL, Garde S, Gaya P, Medina M, Nunez M. Short communication: Inactivation of microbial contaminants in raw milk La Serena cheese by high-pressure treatments. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89 (3) : 888-891.
- [9] Ganzle MG, Vogel RF. On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24 (4) : 477-485.
- [10] Perrier-Cornet JM, Hayert M, Gervais P. Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87 (1) : 1-7.
- [11] Ritz M, Freulet M, Orange N, Federighi M. Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55 (1-3) : 115-119.
- [12] Patrick T, Mateo CR, Brochon JC. Investigation of the effect of high hydrostatic pressure on proteins and lipidic membranes by dynamic fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1595 (1-3) : 103-115.
- [13] Bang WS, Chung HJ. Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *New Biotechnology*, 2010, 27 (4) : 440-444.
- [14] Campos FM, Couto JA, Figueiredo AR, Toth IV, Rangel AOSS, Hogg TA. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 135 (2) : 144-151.
- [15] Hang Y, Lu H, Li J. Effect of ultra high pressure treatment on *Vibrio parahaemolyticus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (11) : 1489-1493. (in Chinese)
- 杭瑜瑜, 陆海霞, 励建荣. 超高压处理对副溶血性弧菌的影响研究. *微生物学报*, 2009, 49 (11) : 1489-1493.
- [16] Klotz B, Manas P, Mackey BM. The relationship between membrane damage, release of protein and loss of viability in *Escherichia coli* exposed to high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137 (2-3) : 214-220.
- [17] Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Mast J, Briers Y, Elst K, Van GL, Van IJF, Devlieghere F. Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide Treatment. *Food Microbiology*, 2010, 27 (4) : 541-549.
- [18] Kaye JZ, Baross JA. Synchronous Effects of temperature, hydrostatic pressure and salinity on growth, phospholipid profiles and protein patterns of four halomonas species isolated from deep-sea hydrothermal-vent and sea surface environments. *Applied and Environment Microbiology*, 2004, 70 (10) : 6220-6229.
- [19] Milillo SR, Martin E, Muthaiyan A, Ricke SC. Immediate reduction of *Salmonella enterica* serotype typhimurium viability via membrane destabilization following exposure to multiple-hurdle treatments with heated, acidified organic acid salt solutions. *Applied and Environment Microbiology*, 2011, 77 (11) : 3765-3772.
- [20] Gao Y, Ju X, Qiu W, Wu D, Jiang H. High-hydrostatic pressure on the membrane damage and oxidative phosphorylation of *Listeria monocytogenes*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 (11) : 2325-2333. (in Chinese)
- 高瑀珑, 鞠兴荣, 邱伟芬, 吴定, 江汉湖. 超高压对单核细胞增生李斯特氏菌细胞膜损伤及其氧化磷酸化的影响. *中国农业科学*, 2011, 44 (11) : 2325-2333.
- [21] Hon SI, Pyun YR. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 63 (1-2) : 19-28.
- [22] Marwen M, Jean-Marie PC, Patrick G. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (20) : 6508-6518.
- [23] Ananta E, Knorr D. Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food Microbiology*, 2009, 26 (5) : 542-546.
- [24] Ritz M, Tholozan JL, Federighi M, Pilet MF.

- Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 79 (1-2) : 47-53.
- [25] Edyta M P, Ilona K, Magdalena S. Changes in bacterial cells induced by high pressure at subzero temperature. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34 (2) : 139-147.
- [26] Gonzalez ME, Barrett DM. Thermal, high pressure and electric field processing effects on plant cell membrane integrity and relevance to fruit and vegetable quality. *Journal of Food Science*, 2010, 75 (7) : 121-130.
- [27] Michiko K, Rikimaru H, Takeo T. High pressure-induced changes of biological membrane study on the membrane-bound Na^+/K^+ -ATPase as a model system. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 267 (1) : 110-118.
- [28] Blank M. An ion pump mechanism based on channel processes in the Na, K-ATPase . *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1995, 38 (2) : 275-279.
- [29] Michiko K, Rikimaru H, Takeo T. High pressure-induced changes of biological membrane. Study on the membrane-bound Na^+/K^+ -ATPase as a model system. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 2002, 269 (1) : 110-118.
- [30] Wouters PC, Glaasker E. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (2) : 509-514.

Effect of ultra high pressure on cell membrane destruction and death of *Listeria monocytogenes*

Haixia Lu^{*}, Xiaoming Huang, Junli Zhu

School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To study the effect of ultra high pressure (UHP) on the cell membrane of *Listeria monocytogenes*.

[Methods] We treated *L. monocytogenes* with different hydra high pressure from 100 to 500 MPa at 25°C for 15 min. Then we determined the rate of cell inactivation by viable cell counts. We compared the morphological changes of treated and untreated cells using transmission electron microscopy (TEM). We evaluated the membrane permeability by release of potassium ion (K^+) or magnesium ion (Mg^{2+}), UV-absorbing substances and uptake of the fluorescent dye propidium iodide (PI). We measured these parameters by spectrofluorometry, UV-spectrophotometer and atomic absorption spectrophotometer (AAS). We used Na^+/K^+ -ATPase kit to measure the activity of Na^+/K^+ -ATPase. [Results] The pressure treatment at 300, 350 and 400 MPa reduced the population of the bacteria from 9.00 to 5.20, 3.27 and 1.35 Log CFU respectively, and no viable cells could be detected at 450 MPa. The structure changes revealed by TEM show that the cell membrane was damaged, the cell wall was breached and the cytoplasm aggregated and a large electron transmission area appeared which bring about the release of UV-absorbing substances, K^+ and Mg^{2+} ions. Besides, the activity of Na^+/K^+ -ATPase was also decreased by UHP. [Conclusion] UHP could kill *L. monocytogenes*.

Keywords: ultra high pressure, *Listeria monocytogenes*, cell membrane, damage

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 12th Five-Year Science and Technology Support Plan of China (2012BAD29B06)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-571-88071024-7588; E-mail: luhaixia@zjgsu.edu.cn

Received: 20 October 2013/ Revised: 25 December 2013