

## 超高压处理对副溶血性弧菌的影响

杭瑜瑜, 陆海霞, 励建荣\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 杭州 310035)

**摘要:**【目的】探讨超高压致死微生物的机理。【方法】本文以副溶血性弧菌为对象, 研究了超高压处理对副溶血性弧菌的灭菌效果、对副溶血性弧菌细胞超微结构、细胞无机盐离子含量以及细胞膜蛋白的影响。【结果】结果表明, 在 20℃ 下分别经 100、200 MPa 高压处理 10min 后, 副溶血性弧菌致死率为 40%、84.7%, 经 300 MPa 及以上的压力处理, 副溶血性弧菌的致死率为 100%。超高压处理对细菌细胞形态结构造成明显的损伤: 局部细胞壁遭到破坏, 出现缺口; 胞质内含物结构紊乱, 出现泄漏, 细胞中部出现透电子区; 细胞结构不完整, 细胞膜消失; 细菌细胞拟核凝聚和细菌细胞蛋白凝聚。超高压处理破坏了细菌细胞膜蛋白的高级结构, 从而对细菌细胞膜的通透性产生了较大影响, 引起无机盐等内含物的流失。【结论】研究表明细菌细胞膜的损伤是超高压致死微生物的主要原因, 从而为微生物的高压致死机制的研究奠定了理论基础。

**关键词:** 超高压处理; 副溶血性弧菌; 细胞膜损伤

**中图分类号:** Q935    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1489-05

超高压处理是一种新的冷杀菌方式, 在灭菌的同时可以最大限度地保持食品的新鲜味道和营养成分等, 可以应用于食品的保鲜<sup>[1-3]</sup>。不同微生物具有不同的耐压性, 同时杀菌效果与微生物的种类、压力大小、处理温度、保压时间以及缓冲液成分有关<sup>[4-6]</sup>。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<sup>[7-8]</sup>。普遍认为, 超高压损伤微生物的主要部位是细胞膜<sup>[9-13]</sup>。然而明确的超高压杀菌机理还有待研究。深入研究微生物的高压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。

本文以副溶血性弧菌为研究对象, 研究了超高压处理对副溶血性弧菌活细胞总数、细胞超微结构、细胞主要无机盐含量以及细胞膜通透性的影响。从而为微生物的高压致死机制寻找理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 试验菌种:** 副溶血性弧菌 (*Vibrio Parahaemolyticus* ZJGSMC001), 由浙江工商大学食品与生物工程学院提供, 购于中国科学院微生物所。

**1.1.2 培养基:** 固体培养基: 嗜盐菌选择性琼脂(蛋白胨 20 g, 氯化钠 40 g, 琼脂 17 g, 0.01% 结晶紫溶液 5 mL, 蒸馏水 1000 mL, 校正 pH 值至 8.7)。分装后 121℃ 高压灭菌 15 min 备用。

液体培养基: 氯化钠结晶紫增菌液(蛋白胨 20 g, 氯化钠 40 g, 0.01% 结晶紫溶液 5 mL, 蒸馏水 1000 mL, 校正 pH 值至 9.0)。分装后 121℃ 高压灭菌 15 min 备用。

**1.1.3 试验试剂:** 无菌生理盐水(0.85% NaCl 水溶液); 2.5% 戊二醛溶液; 0.1 mol/L, pH7.0 的磷酸缓

基金项目: 国家“863 计划”——加工水产品质量与安全控制技术(2007AA091806)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-88056656; E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn

作者简介: 杭瑜瑜(1984-), 女, 河南灵宝人, 硕士研究生, 研究方向食品质量与安全。E-mail: hangyuyu@126.com

收稿日期: 2009-07-16; 修回日期: 2009-08-26

冲液; 1%的钼酸溶液; 50%, 70%, 80%, 90%和 95%的乙醇溶液; 无水乙醇; 丙酮; VCD 树脂; DER736; NSA ;DMAE; 柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀。

**1.1.4 试验设备:** 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; JEM-1230 透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司; ULTRACUTE 冷冻超薄切片机, 奥地利 Reichert-Jung 公司; M6 原子吸收分光光度计, 日本岛津公司; GS-800 凝胶成像分析系统、Mini-Protein cell II 电泳系统美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 超高压处理

供试菌种经过活化后, 接入氯化钠结晶紫增菌液中, 于 37℃, 140 r/min 振荡培养 24 h。

10000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 以无菌生理盐水制成菌悬液, 调整细胞浓度, 使起始菌落数为  $10^8$  cfu/mL。分装于 50 mL 的无菌塑料袋中, 真空封口, 冷藏备用。每一样品重复 3 次。

## 1.3 微生物数量测定

采用平板倾注计数法进行菌落总数的测定<sup>[14]</sup>。以无菌生理盐水适当稀释超高压处理后和未处理作为对照的供试菌悬液, 于嗜盐菌选择性琼脂平板在 37℃ 培养 48 h 后, 进行菌落记数。

## 1.4 透射电镜观察

分别取未高压处理的对照样和高压处理样的液体培养物 40 mL, 经离心处理后将沉淀的菌体在 2.5%的戊二醛溶液中 4℃ 固定过夜, 0.1 mol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品三次; 1%的钼酸溶液固定 1~2 h; 磷酸缓冲液漂洗样品 3 次; 乙醇溶液(包括 50%, 70%, 80%, 90%和 95%五种浓度)对样品进行脱水处理, 再用 100%的乙醇处理 20 min; 最后过度到纯丙酮处理 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, 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, 即可在日本 JEOL 公司的 JEM-1230 型透射电镜中观察。

## 1.5 超高压处理对细菌细胞内外无机盐离子的影响

用原子吸收分光光度计测定高压处理前后副溶血性弧菌细胞内外  $K^+$ 、 $Na^+$  含量。分别取未高压处理的对照样和高压处理样的液体培养物 40 mL, 在离心管中以 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 沉淀用去离子水洗 2 遍。上清液和沉淀均用 1:4 的硝

酸和高氯酸混合液消化至透明澄清, 冷却后定容待测。

## 1.6 超高压处理对细菌膜蛋白的影响

膜蛋白的提取参考 Ritz 等人的方法<sup>[15]</sup>, 稍有改动。采用 Mini-Protein cell II 系统(BioRad) 进行 SDS-PAGE 电泳, 3% 浓缩胶, 15% 分离胶。蛋白质采用考马斯亮兰 R-250 染色, 电泳参考文献<sup>[16]</sup>进行。电泳结果在全自动凝胶成像分析系统上观察拍照。

## 2 结果和分析

### 2.1 超高压处理对副溶血性弧菌存活量的影响

供试的副溶血性弧菌经分别经 100~500 MPa, 20℃, 10 min 处理后, 立即进行微生物数量测定, 同时取未处理的试样做对照。超高压处理对副溶血性弧菌存活量的影响如图 1 所示:

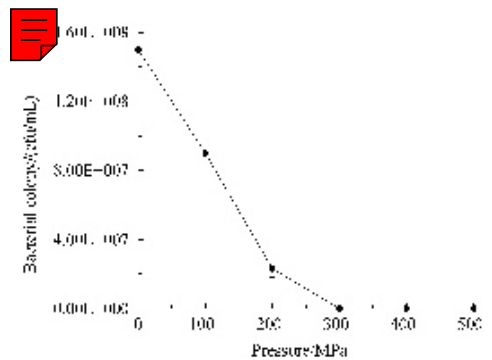


Fig.1 超高压处理对副溶血性弧菌存活量的影响

Effect of ultra high pressure on the survival number of *Vibrio parahaemolyticus*

由图 1 可以看出, 未经高压处理的副溶血性弧菌的菌落总数是  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL, 经 100、200 MPa 高压处理后菌落总数分别降至  $9 \times 10^7$  cfu/mL、 $2.3 \times 10^7$  cfu/mL。致死率分别为 40%、84.7%。经 300 MPa 及以上的压力处理, 副溶血性弧菌全部致死, 说明超高压处理对微生物有很好的灭活作用。

### 2.2 超高压处理对副溶血性弧菌超微结构的影响分析

超高压处理会对微生物的细胞形态结构造成影响, 破坏微生物的细胞结构。未经高压处理和经 300 MPa, 20℃, 10 min 处理的副溶血性弧菌的超微结构透镜观察如图 2 所示:

图 2 中, A、C、E、G、I 为未经超高压处理的副溶血性弧菌的超微结构图。B、D、F、H、J 为 300 MPa, 20℃ 处理 10 min 后副溶血性弧菌的超微结构图。从图中可以看出, 未经高压处理的细菌细胞胞壁完整

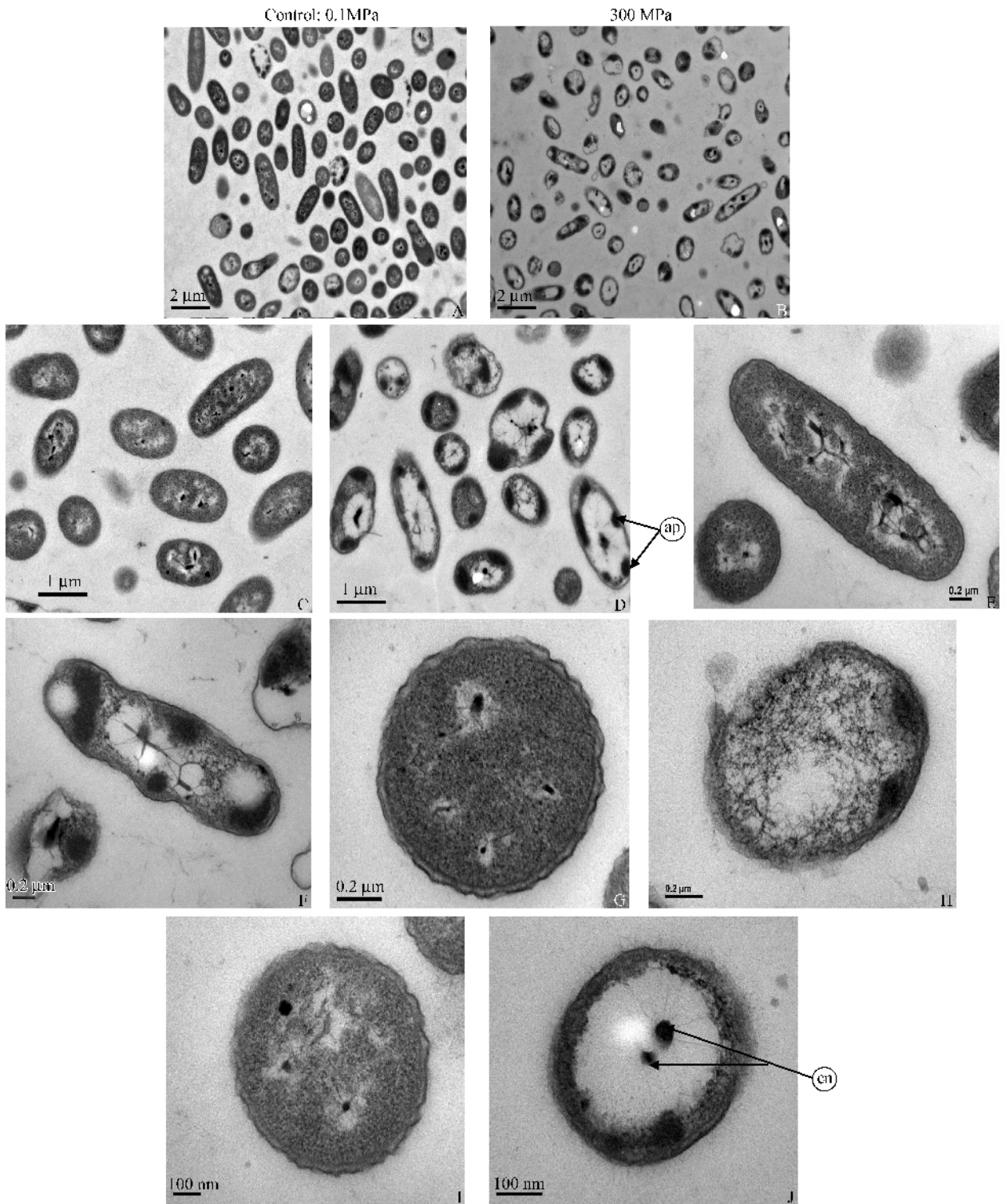


图2 超高压处理前后副溶血性弧菌的超微结构透射电镜观察图

Fig.2 Transmission electron microscopy (TEM) micrographs of *Vibrio parahaemolyticus* cells untreated and treated by ultra high pressure. (A) Untreated cells, (B) Cells treated with 300 MPa at 20°C for 10 min, original magnification,  $\times 10000$ . (C) Untreated cells, (D) Cells treated with 300 MPa at 20°C for 10 min, original magnification,  $\times 25000$ . (E) Untreated cells, (F) Cells treated with 300 MPa at 20°C for 10 min, original magnification,  $\times 60000$ . (G) Untreated cells, (H) Cells treated with 300 MPa at 20°C for 10 min, original magnification,  $\times 100000$ . (I) Untreated cells, (J) Cells treated with 300 MPa at 20°C for 10 min, original magnification,  $\times 150000$ . Arrows show condensed nucleoids (cn) and aggregated proteins (ap).

光滑,胞浆分布均匀有序,部分细胞胞浆中心部位有规则的低电子密度区,可以看到完整的细菌拟核。

超高压处理对细菌细胞形态结构造成明显的损伤。细胞壁局部破坏,出现缺口(如图D所示);胞质内

含物结构紊乱、出现泄漏、细胞中部出现透电子区(图 B、D、F、H、J 均有所显示),从图 H 可以看出细胞的内含物正在泄露;细胞结构不完整,细胞膜消失(如图 F 所示);细菌细胞拟核凝聚(如图 J 所示);细菌细胞蛋白凝聚(如图 D 所示)。

从以上细菌细胞的受损情况分析,细胞膜的损伤是导致微生物死亡的关键。细胞膜使细胞具有一个相对稳定的内环境,同时在细胞和环境之间进行

物质和能量的交换及在信息的传递过程中起着决定性的作用。细胞膜受损,导致通透性增大,会加速细菌细胞的死亡。

### 2.3 超高压处理对细菌细胞内外无机盐离子的影响

高压处理会引起细菌细胞内无机盐离子的流失,不同压力的超高压处理对细菌细胞内外  $K^+$ 、 $Na^+$  浓度的影响如表 1 所示:

表 1 超高压处理对副溶血性弧菌细胞内外  $K^+$ 、 $Na^+$  含量的影响

Table 1 The effect of ultra high pressure on the concentration of  $K^+$ 、 $Na^+$  of *vibrio parahaemolyticus*

pressure (MPa)		0.1	200	300	400
$K^+$ concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	bacteria	1.021 $\pm$ 0.01	0.8332 $\pm$ 0.009	0.7526 $\pm$ 0.006	0.4949 $\pm$ 0.01
	supernatant	1.835 $\pm$ 0.02	1.989 $\pm$ 0.05	2.985 $\pm$ 0.03	3.782 $\pm$ 0.02
$Na^+$ concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	bacteria	22.43 $\pm$ 0.22	12.56 $\pm$ 0.18	10.70 $\pm$ 0.11	7.284 $\pm$ 0.07
	supernatant	226.1 $\pm$ 0.25	242.5 $\pm$ 0.16	267.7 $\pm$ 0.21	283.3 $\pm$ 0.18

从表 1 可以看出,超压处理过的细菌细胞内的  $K^+$ 、 $Na^+$  的浓度随处理压力的升高而降低,而上清液的  $K^+$ 、 $Na^+$  含量随着处理压力的升高而升高,这与压力对细菌细胞的灭菌效果相一致。说明超高压处理对细菌细胞膜的通透性产生了较大影响,致使菌体内的无机盐等物质泄露,从而对微生物死亡造成影响。

### 2.4 超高压处理对细菌膜蛋白的影响

图 3 为超高压处理前后的副溶血性弧菌的膜蛋白的 SDS-PAGE 电泳图。从图中可以看出,经 200、300 和 400 MPa 高压处理后的副溶血性弧菌膜蛋白在分子量大约为 35 kDa 附近出现了新的谱带。而且经 400 MPa 高压处理后的副溶血性弧菌膜蛋白分子量大约为 97.2 kDa 的条带完全消失,在分子量大约为 23 kDa、18 kDa 和 15 kDa 附近出现了新的谱带,这充分说明了细菌膜蛋白的解离程度与超高压处理的压力成正比,处理压力越高,蛋白质变性现象越明显。

超高压处理对菌体造成明显的损伤,最严重的是细胞膜的破坏。高压处理破坏了细菌膜蛋白的高级结构,使蛋白质分子变性,而且压力越高,这种现象越明显。进而导致细胞膜的通透性增大,细胞体内物质泄露,引起细菌的死亡。

## 3 结论

(1) 在 20℃ 下经 100、200 MPa 高压处理 10 min 后,副溶血性弧菌致死率分别为 40%、84.7%。经 300 MPa 及以上的压力处理,副溶血性弧菌全部

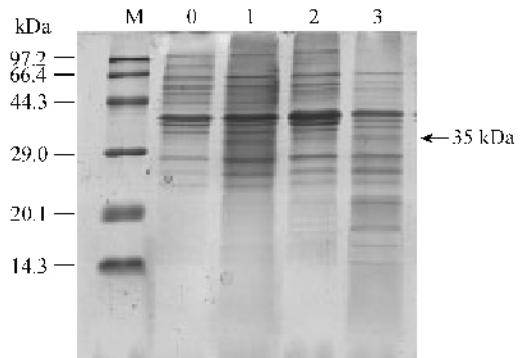


图 3 超高压处理前后的副溶血性弧菌膜蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE patterns of *Vibrio parahaemolyticus* untreated and treated by ultra high pressure

(M) Molecular Weight. (0) Untreated cells. (1) Cells treated with 200 MPa at 20℃ for 10 min. (2) Cells treated with 300 MPa at 20℃ for 10 min. (3) Cells treated with 400 MPa at 20℃ for 10 min.

死亡。

(2) 超高压处理对细菌细胞形态结构等造成明显的损伤:细胞壁局部破坏,出现缺口;胞质内含物结构紊乱、出现泄漏、细胞中部出现透电子区;细胞结构不完整,细胞膜消失;细菌细胞拟核凝聚和细菌细胞蛋白凝聚。

(3) 高压破坏了细菌细胞膜蛋白的高级结构,从而对细菌细胞膜的通透性产生了较大影响,导致细胞膜的通透性增大,致使菌体内的无机盐等物质泄露,引起细菌的死亡。

## 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. *Critical Revolution of Food Science& Nutrition*, 2002, 42(3):627 – 645.
- [ 3 ] Raso J, Barbosa G. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Revolution of Food Science& Nutrition*, 2003, 43(2):265 – 285.
- [ 4 ] Akihiro I, Takako S, Masaaki W, et al. Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton polymers in vivo and in vitro. *Food 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. *Applied and Environment Microbiology*, 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. *Applied and Environment Microbiology*, 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 Science and Technology International*, 1995, 38(1):75 – 90.
- [ 9 ] Ganzle MG, Vogle RF. On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli*. System. *Applied and Environment Microbiology*, 2001, 24:477 – 485.
- [ 10 ] Manas P, Mackey BM. 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, 70:1545 – 1554.
- [ 11 ] Pagan R, Mackey B. Relationship between membrane damage and cell death in pressure treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, 66:2829 – 2834.
- [ 12 ] Ulmer HM, Ganzle MG, Vogel RF. Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1.460. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, 66:3966 – 3973.
- [ 13 ] 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*. *Applied and Environment Microbiology*, 2002, 68:1088 – 1095.
- [ 14 ] 中华人民共和国国家标准食品微生物学检验菌落总数测定 GB/T 4789.2 – 2008. 北京: 中国标准出版社. 2009.
- [ 15 ] Rütz M, Freulet M, Orange N, et al. Effect of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 55:115 – 119.
- [ 16 ] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社. 2000.

Effect of ultra high pressure treatment on *Vibrio Parahaemolyticus*

Yuyu Hang, Haixia Lu, Jianrong Li\*

(College of Food science &amp; Biotechnology Engineering of Zhejiang Gongshang University; Key Laboratory of Food Safety of Zhejiang Province, Hangzhou 310035, China)

**Abstract:** [Objective] We explored the mechanism of the microbial inactivation by high hydrostatic pressure. [Methods] We investigated the effect of ultra high pressure treatment on inactivation of *Vibrio Parahaemolyticus* cells, and the damages inflicted on the microstructure and the membrane proteins of the *Vibrio Parahaemolyticus* cells. [Results] The result indicated that after pressure treatment at 100 MPa, 200 MPa and 20°C for 10 min, the viable cell was reduced to 60% and 15.3% respectively, viable cell counts were not detected following pressure treatment at 300 MPa and 20°C for 10 min. High pressure treatment at 300 MPa also caused changes in the microstructure of the cell, such as the cell wall of *Vibrio Parahaemolyticus* was shrunk, breached and cytoplasm leaked out, the layer structure of cytoplasm disappeared, and a large electron transmission area appeared in the cell after compression, the membrane disappeared, the nucleoids condensed and the proteins aggregated after compression. At the same time, the membrane proteins of cells were damaged, and the cell membrane permeability increased, resulting in leakage of the cell. [Conclusion] This study showed that the damaged cell membrane was the major reason of the mechanism of microbial inactivation by high hydrostatic pressure.

**Keywords:** ultra-high pressure treatment; *vibrio parahaemolyticus*; the cell membrane damage

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) for the quality and safety control technology of the aquatic products(2007AA091806)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-88056656; E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn

Received: 16 July 2009/ Revised: 26 August 2009