文章编号:1000-5773(2012)06-0700-09

超高压杀菌机制研究进展*

王蓉蓉,孙传范,王婷婷,胡小松,张　燕,廖小军

(中国农业大学食品科学与营养工程学院,国家果蔬加工工程技术研究中心,
农业部果蔬加工重点开放实验室,北京　100083)

摘要:食品中微生物是导致食品品质降低的重要因素之一,超高压作为一种灭菌方式已取得了显著的效果。介绍了超高压杀菌基本原理,着重分析了超高压对微生物细胞形态结构、代谢、遗传物质等造成的影响,并展望了超高压在食品工业中的应用前景。

关键词:超高压;杀菌机制;研究进展

中图分类号:O521.9;Q936　　**文献标识码**:A

1　引　言

随着对食品品质要求的不断提升,促进了对高热敏性食品色、香、味及营养成分影响较少的食品非热加工技术的发展。一些非热加工技术如超高压(Ultra-High Pressure,UHP)、高压脉冲电场(Pulsed Electric Field,PEF)、高压二氧化碳(High Pressure Carbon Dioxide,HPCD)等的研究和应用得到广泛关注,其中UHP技术是目前研究较多、应用效果较好,也是商业化前景最广的一种非热加工技术[1]。

从1895年Roger等发现UHP能杀灭大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)等微生物[2]至今,对UHP技术的研究已有一个多世纪的时间。但从1895年至1989年,大量的研究工作主要集中在UHP的杀菌效果研究,如Hite等于1899年研究了450 MPa对牛乳的保藏效果[3],于1914年研究了高压灭活微生物保存果蔬[4];Wilson等于1974年研究了压力和巴氏杀菌对低酸性食品中微生物的杀灭作用[5]。此后,为了进一步明确UHP的杀菌机制,大量工作开始集中到探索UHP对微生物的形态结构(如细胞壁、细胞膜)、代谢和遗传物质的影响。但到目前为止,研究者们依然未能清楚地解释UHP杀菌的机制,也未见有对UHP杀菌机制研究的系统总结和阐述。基于此,本研究以不同种类微生物为对象,从微生物细胞结构、代谢和遗传3个角度,系统阐述UHP杀菌机制的研究进展。

2　UHP杀灭细菌的机制研究

细菌是UHP杀菌研究的主要目标菌[3],也是从细胞学角度研究UHP杀菌机制较为系统的一种微生物。就细胞结构而言,细菌营养体包括细胞壁、细胞膜、细胞质和核质体等。某些种类的细菌还具有特殊的结构,如芽孢、荚膜、鞭毛和菌毛等,而在UHP杀灭细菌时,尤以芽孢耐压性最强。

2.1　UHP对细菌细胞壁的影响

细胞壁是细菌外表面的一种坚韧而具有弹性的结构层,其主要功能是保护细胞免受机械性或渗透

*　**收稿日期**:2011-03-15;**修回日期**:2011-06-03

基金项目:国家自然科学基金(30972067);北京市科技计划重点项目(D101105046610000);中央高校基本科研业务费专项资金(KYCX2011059)

作者简介:王蓉蓉(1985—),女,博士研究生,主要从事食品非热加工技术理论与应用研究. E-mail:sdauwrr@163.com

通讯作者:张　燕(1977—),女,博士,副教授,主要从事食品非热加工技术理论与应用研究.
E-mail:zhangyan-348@hotmail.com

压的破坏,维持细胞特定外形等。压力作用下,细菌的细胞形态首先发生改变从而影响细菌的细胞壁功能。如球菌在压力作用下,由于挤压会损伤细胞壁使之发生变形,变成杆状。池元斌等人研究了高压对鲜牛奶中细菌行为的影响,鲜牛奶中细菌菌落尺寸取决于处理压力的高低以及保压时间的长短。保压时间越长,处理压力越高,细菌菌落直径越小[6]。冯艳丽等证实 *E. coli* 的长度在常压下为 1～2 μm,而在 40 MPa 下为 10～100 μm。压力处理后细菌表面不均匀,出现凹陷和褶皱等。Ritz 等证实 400 MPa 下鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)出现细胞形态的改变,如凹陷和肿胀[7]。已在 *E. coli* 中证实,用溶菌酶前处理细胞壁后能显著影响 400 MPa 下机体的耐压性[8],可见细胞壁对于细菌在高压下能起到保护作用,但此种保护作用并不明确。Schreck 等通过实验表明,无细胞壁结构的肺炎支原体(*M. pneumoniae*)耐压性较有细胞壁的革兰氏阳性菌更高[9],甚至有研究证实细胞壁的存在对于某种高压处理下的细菌还能起到破坏作用,Ludwig 等研究表明,压力可能会对微生物细胞壁产生机械应力,反过来影响微生物灭活机制[10]。目前关于 UHP 杀菌中细胞壁对细菌耐压性的贡献和影响还缺乏深入研究。

2.2　UHP 对细菌细胞膜的影响

细胞膜是位于细胞壁与细胞质间的一层柔软而富有弹性的半透性膜,其由蛋白和磷脂组成,是高度选择透性膜,负责物质运输、渗透屏障,维持正常渗透压,是细菌重要的物质代谢中心。Ritz 等通过扫描电镜观察,经压力处理后细胞表面存在芽痕,证实细胞膜是高压作用的目标之一[11]。目前研究已证实,UHP 主要通过影响细菌细胞膜的流动性和渗透性破坏大多数细菌的细胞膜,从而改变细胞膜的部分功能,最终导致细胞死亡。

Yaldagard 等证实,压力升高膜的流动性降低,暗示膜流动性较低的微生物对压力更为敏感[12]。Smelt 等通过研究乳杆菌,也得出细胞膜流动性越强,细胞耐压性越强的结论,同时还发现,经 UHP 处理后细胞 ATP 泄漏,且较高强度压力处理下细菌不能够重新合成 ATP,中等强度压力处理后细菌则可以重新合成 ATP。研究认为 UHP 对细胞膜的影响还可能与位于细胞膜上的以 ATP 为介导的燃料排斥体系钝化有关,该体系的降解能降低细胞在非选择培养基上繁殖和形成菌落[13]。

李宗军等研究了李斯特菌(*L. monocytogenes*)NCTC 11994 和 *E. coli* ATCC 80739 经高压处理后的变化,表明 400 MPa 以上压力处理 10 min,会导致细胞内 pH 值的变化,使膜电位下降,细胞膜完整性受损,细胞膜维持细胞动态平衡功能丧失,胞内钾流失,ATP 浓度降低[14]。压力不够高时,其引起的形态结构变化不会导致细胞死亡,而在压力升高到导致细胞膜破坏使细胞质泄漏时会造成细胞死亡。但膜完整性的损失并不足以解释杀菌过程。Tholozan 等也发现,高压处理后一些菌株中膜破坏的出现要晚于细胞死亡,甚至在最高压力下膜破坏仍未出现[15],所以高压对于细胞膜的影响可能还涉及一些其它的机制。鉴于此,研究者们开始关注高压对膜结合蛋白的影响。Pilavtepe 等通过扫描电镜观察证实,经压力钝化后细胞平均面积和体积增加,该现象与膜特性如膜结合蛋白或膜脂双层相变的改变有关[16]。压力通过钝化膜结合蛋白和引起磷脂双分子层相变而影响细胞膜的功能,当压力大于 400 MPa 时,高压引起膜蛋白结构变化,尤其是膜结合酶的变化,Smelt 等已证实,压力能引起与质子外排有关的膜结合酶钝化。此外,通过钝化 ATPase 及使维持细胞动态平衡功能的细胞膜 ATP 浓度和膜电位的降低也能影响膜结合蛋白,该过程中也涉及几种转录蛋白[7];Rite 等也利用 SDS-PAGE 研究了 UHP 处理对 *S. typhimurium* 膜蛋白含量的影响。

2.3　UHP 对细菌细胞代谢的影响

细胞核内 DNA 转录出 RNA(或直接没有 DNA,就是 RNA),RNA 钻出核膜,翻译出蛋白质,蛋白质控制代谢过程。研究证明,某些细菌(如 *E. coli*)的稳定性图形呈椭圆型,这类图形和之前蛋白变化后的形状相似,但不同于膜的变化情况,表明蛋白是压力杀灭微生物的主要目标,尤其是与 DNA 复制和转录有关的酶,如 100 MPa 时 *E. coli* 中的几种脱氢酶、参与膜主动运输的位于磷脂层上的依赖于 Na^+/K^+ 的 ATPase 等,通过酶活性的变化使细胞内生化反应受抑制,影响微生物正常代谢[17-18]。研究表明,*E. coli* 的天冬氨酸酶活性在 68 MPa 压力下提高,100 MPa 下失去活性;200 MPa 下琥珀酸脱氢酶会失活;45 MPa 下半乳糖苷酶的合成停止[1]。最近研究表明,升高压力也可能提高某些酶的活性,如

嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)在 150 MPa 时活性增加 6 倍、梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)在17 MPa时活性也逐渐增加。升高压力也可能影响其它用于检测核酶功能的核酸、作为酶或催化化学反应的 RNA 分子等。适当增加压力能抑制腺嘌呤依赖的发夹核酶Ⅰ及与水分子释放有关的正活化体积,方便核酶机制的研究。Bang 等研究了 UHP 处理 *E. coli*(ATCC 11229)后,胞内酶活性的变化,发现高压处理能完全钝化酯酶、酯合成脂肪酶、脂肪酶、缬氨酸芳基酰胺酶、胱氨酸芳基酰胺酶、胰岛素、α-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖醛酸酶,而亮氨酸芳基酰胺酶和 β-半乳糖苷酶仍有部分活性[19],这些酶参与微生物糖代谢、脂类代谢、氨基酸代谢、碳代谢等,对维持细菌生存有重要意义。鉴于 UHP 处理会影响代谢的相关酶活从而影响代谢能力,这为杀菌机制的研究提供重要的依据。

2.4 UHP 对遗传物质的影响

高压处理后的细菌,细胞内部结构也被改变,主要反映在核酸的凝集和细胞蛋白的聚合,这已经在 *E. coli* 和 *L. monocytogenes* 中被证实,然而两者与细胞钝化的相关性还未明确证实。核酸的凝集可能因受到细胞中与 DNA 功能损伤无关的 DNA 组装的直接影响,或者通过压力引起蛋白-DNA 复合物的变化而产生。DNA 和 RNA 对压力抗性强,*L. monocytogenes* 和伤寒沙门氏菌(*S. typhi*)菌体经压力处理后,发现有核物质大量凝集,认为在高压条件下,DNA 与核酸内切酶得以充分接触,核酸内切酶打开了 DNA 双螺旋结构,但这一过程可修复,推测这一过程与一种负责修复活性的酶有关;而细胞蛋白的结合可能与压力下蛋白变性有关。同时,DNA 的凝集及蛋白变性也可能由膜破坏所引起。事实上,蛋白-DNA 复合物及内部蛋白,如核糖体,维持稳定性所必需的二价金属离子在膜破坏时,该离子很可能从细胞中释放,从而导致这些实体的不稳定[20]。正常情况下,遗传物质和核糖体均匀分布在整个细胞,受压后遗传物质凝集成块,胞浆 RNA 漏出,胞浆内部分区域核糖体消失,且出现密度斑,这些明显变化发生在细胞静止期和对数生长中期[1]。Kalctunc 等研究了 UHP 处理对肠膜明串珠菌(*L. mesenteroides*)的影响,发现高压处理后核糖体发生了变性。目前关于高压处理对于细菌遗传物质的影响还没有系统的研究。

2.5 UHP 对孢子的影响

芽孢(内生孢子)是细菌的一种,对物理处理(热、UV 辐照、干燥、放射等)和化学处理具有非常高抵抗性的休眠形式,在生理和形态上均与营养细胞不同。与营养细胞含水高达 80%～90%相比较,孢子的核心高度脱水(仅含 10%～25%水),使得它对热和化学物质抵抗力强。吡啶-2,6-二羧酸 Ca^{2+} 复合体和一些与 DNA 结合的小分子酸可溶性蛋白质(SASP)也增加芽孢对热、干燥和 UV 辐照的抵抗力。芽孢在室温下甚至能抵抗 1000 MPa 压力,这主要是由于其若干层形成的特殊结构。其中,皮层含有大量的芽孢肽聚糖,负责芽孢中心低水分浓度的形成和维持,这可能是芽孢耐压性的主要来源[21-22],高压下完全钝化芽孢需要的条件是 75 ℃、827 MPa、30 min[23]。曾庆梅等在 500 MPa、60 ℃下保温保压 20 min 对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)进行 UHP 处理后,观察其超微结构变化。结果表明:芽孢外壳被破坏、出现缺口,芽孢内含物结构紊乱、泄露、出现部分透电子区;其内含物质甚至完全泄露,出现细胞壁或孢子外壳残留[24]。为了有效利用高压杀灭芽孢,常将杀菌过程分为两步,首先是在较低压力下(50～300 MPa)促使芽孢发芽,然后在大于 400 MPa 压力下杀灭发芽的芽孢[25]。适度的高压处理能使存在于芽孢内膜表面的营养激活受体发芽,但高压处理条件如何激活受体仍然备受争议,它们可能通过直接作用受体引起结构改变或者作用于受体存在的内膜,仍需要进一步的研究。

3 UHP 杀灭真菌机制研究

真菌基于其营养结构可分为酵母和生产菌丝的霉菌两类。酵母菌是一个通俗的名称,一般泛指能够发酵糖类的各种单细胞真菌。霉菌是对形成菌丝的真菌的统称,霉菌一般存在于温暖湿润的条件,任何菌丝的一小片都能在适宜的条件下生长繁殖,更重要的是霉菌能够产生抗逆性强的孢子,因此在食品中对真菌的杀灭非常重要。高压对于真菌的灭活机制与细菌相似,高压能影响细胞膜的渗透性和细胞结构,从而使蛋白发生变性。高压灭活酵母中尤以酿酒酵母(*S. cescerevisiae*)的研究最为广泛,其容易生长是一种基因表达明确的微生物,属于子囊菌属,而高压条件下霉菌的灭活研究仍较少,以下主要以

高压下酿酒酵母的细胞结构变化为例进行灭活机制分析。

3.1　UHP 对真菌细胞壁的影响

酿酒酵母有坚固的细胞壁,其占细胞干重的 15%～25%。酵母细胞壁有很多功能,包括协助位于里层脆弱的细胞膜抵抗环境因素的物理保护、提供抵抗内部膨压的作用力、提供胞外蛋白支架及指导细胞间粘附。酿酒酵母的细胞壁有一个层状结构,其属动力结构含有很多的甘露蛋白、β-1,3-葡聚糖、β-1,6-葡聚糖、几丁质等。研究表明,适度的高压处理(300 MPa/15 min/25 ℃)能改变 *S. cescerevisiae* 的细胞壁[26];Shimada 等也证实,在 400～500 MPa 压力范围进行高压处理时,使 *S. cescerevisiae* 细胞壁发生断裂,细胞形态发生改变,表明细胞壁是高压作用的目标之一。有研究表明,细胞壁在高压条件下会保护细胞膜免受破坏。Brul 为了研究 *S. cescerevisiae* 细胞壁成分对其抗压性的保护作用,分析了不同细胞壁突变体的耐压性,不同突变体耐压性不同,其对压力的敏感性与 β-1,6-葡聚糖的浓度直接相关[25]。Baldwin 等利用多糖降解酶前处理产朊假丝酵母(*G. utilis*)后经高压均质处理发现,经处理后的细胞壁受损能显著增加高压均质破碎细胞的速度[26],这一点也在上述 *E. coli* 的研究中得到证实。细胞壁的组成和完整性是否是影响其耐压性的主要因素仍需进一步研究。

3.2　UHP 对真菌细胞膜的影响

细胞膜是高压灭活微生物的首要目标已被大量证实。UHP 对真菌细胞膜的影响与细菌相似,高压处理能改变酿酒酵母的细胞膜,证实细胞膜是高压灭活酵母的首要目标。高压通过加快细胞体积的降低而影响膜渗透性,暗示如果细胞膜变得更易渗透,在允许内部分子存在时会产生一个水通量[27]。当膜脂双层在高压条件下充分扰乱时,自身及周边的膜蛋白更易与质膜脱离。在 100 MPa 压力下,酵母的核膜会受到影响,尤其在大于 300 MPa 压力时有金属离子释出[28]。高压也能引起膜结合酶变性,且每种酶在高压下的最适温度不尽相同,这与细菌和噬菌体的发现一致,证明膜蛋白酶可能是压力灭活的主要目标,此方面的工作仍需进一步研究。

3.3　UHP 对真菌细胞代谢的影响

酵母的细胞代谢与胞内蛋白尤其是参与代谢的相关酶及内部细胞器有关。已有研究表明,448 MPa/30 s/23 ℃下,在 *S. cescerevisiae* 中不同酶的变化是不同的。UHP 处理能完全钝化脂肪酶、胱氨酸芳基酰胺酶、糜蛋白酶,适度钝化酯酶、酯合成脂肪酶、异亮氨酸芳基酰胺酶、缬氨酸芳基酰胺酶、α-葡萄糖苷酶等[25]。此外,随着压力的增加,细胞内细胞器(如线粒体、内质网、液泡等)也会发生变性或破坏,且当压力高达 500 MPa 时,细胞内细胞器甚至无法辨认。研究证实,当压力增大到 60 MPa 时能促进 *S. cescerevisiae* 液泡的酸化,压力引起的液泡酸化随着二氧化碳的产生而引起。图 1 展示 H_2CO_3 的电离随压力的增加而加快,这主要是由于该反应通过体积的降低而完成。压力增加时,由于体积降低,H_2CO_3($HCO_3^- + H^+$)电离加快,导致细胞质中产生大量的质子,形成酸性环境。为了维持适宜的细胞质 pH,已提出模型对液泡功能进行分析,液泡可能会占有来自于细胞质中的质子,在高压条件下作为一个质子螯合剂。通过高压条件下引起的细胞质酸化,对基因表达和蛋白合成的改变进行控制[29]。

需要特别注意的是,与细菌相比,真核细胞拥有线粒体,其可能是压力钝化过程中发生改变的因素之一。线粒体在细胞凋亡中占据重要地位,蛋白酶 Caspases 家族在细胞凋亡中发挥重要作用。如线粒体在 Caspases 依赖性的细胞凋亡的内源途径中处于中心地位,当细胞受到内部或外部凋亡信号刺激时,其外膜通透性发生改变,向细胞质基质中释放凋亡相关的因子,经内源途径引起凋亡;线粒体在 Caspases 非依赖性的细胞凋亡中也同样发挥关键作用,凋亡诱导 AIF 位于线粒体外膜,在凋亡过程中,从线粒体转移到细胞质内进入细胞核,引起核内 DNA 聚集并断裂成 50 kb 大小的片段,线粒体释放限制性核酸内切酶 G,引发蛋白酶非依赖性细胞凋亡。已有研究证明,高压能引起细胞色素 C 从线粒体中释放[25],细胞色素 C 是细胞凋亡内源途径的关键步骤,是线粒体电子传递链的成员之一,当细胞接受凋亡信号刺激时,细胞色素 C 从线粒体转移到细胞质中,与 Apaf-1 结合后启动 Caspases 级联反应,激活 Caspases-3 和其它下游 Caspases,引起细胞死亡,但这方面的工作有待于进一步研究。

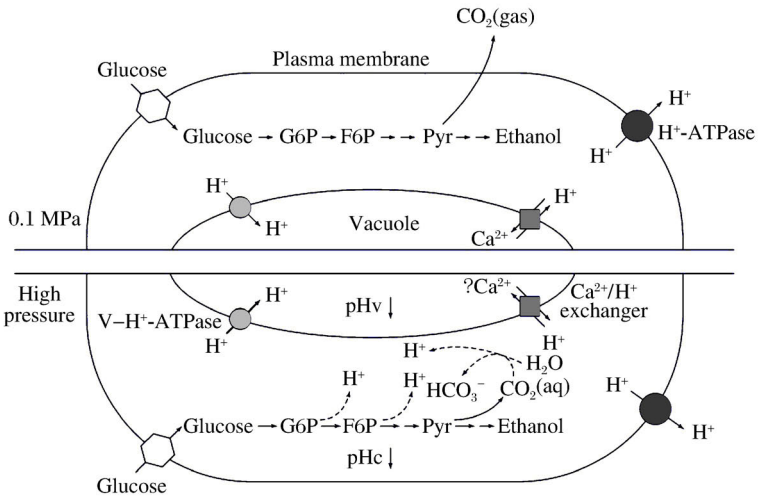


图 1 高压下反应酿酒酵母细胞内变化的模型(虚线箭头表明平衡朝着产生质子的方向发生可能是由于压力升高引起,G6P:葡萄糖-6-磷酸;F6P:果糖-6-磷酸;Pyr:丙酮酸;pHv:液泡 pH;pHc:细胞质 pH)

Fig. 1 A model for explaining the intracellular events in *Saccharomyces cerevisiae* at high pressure (Dashed arrows indicate the equilibrium shifts toward generating protons induced by elevated pressure. Abbreviations: G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; Pyr, pyruvic acid; pHv, vacuolar pH; pHc, cytoplasmic pH; Fumiyoshi Abe, *et al*.)

3.4 UHP 对真菌遗传物质的影响

有研究认为,30～50 MPa 之间的高压能影响基因的表达和蛋白质的合成。高压能导致酿酒酵母产生四倍体,证明高压能影响 DNA 的复制。Shimada 等观察到当压力达到 400～600 MPa 时,酿酒酵母线粒体和细胞质均发生了变化,且在 200 MPa、－20 ℃处理 3 h 后,核膜几乎完全消失[30]。研究了代表 3 个不同生命领域的嗜热甲烷球菌、紫串珠酵母属和埃希氏大肠杆菌,证实它们在经过压力处理后都发现了诱导蛋白。目前对于真菌而言,高压条件下遗传物质的研究仍然较少。

4 UHP 杀灭病毒机制研究

病毒在很低感染剂量下就可能导致严重的食品安全问题。由于其能在食品中存活数天甚至数周而不丧失感染性,且许多抑制食品中微生物的工艺,如温度、水分活度等,也不能有效控制病毒繁殖[31-32],因此关于食源性病毒的预防和控制措施已得到研究者的广泛关注。已证实的食源性病毒有诺瓦克病毒、甲型肝炎病毒、腺病毒、轮状病毒等[33]。目前,高压灭活病毒的研究与细菌相比较少,仍处于起步阶段,且大多研究都集中在高压灭活病毒条件及效果的研究,有关机制方面的研究较少。病毒主要由核酸和蛋白质外壳组成,有些病毒有囊膜和刺突,如流感病毒等。其蛋白质外壳由很多的蛋白亚基组成,与核酸的中心紧密相连,其也可能包含小部分的酶负责宿主细胞的感染。病毒的耐压性随菌株的不同而显著不同[34],根据病毒的结构是否被包膜分为两类:包膜和非包膜病毒。以下主要从病毒结构分析高压条件下的灭活机制。

4.1 UHP 对病毒包膜的影响

有包膜病毒的包膜是包围在病毒核衣壳外面的双层膜,其主要含蛋白质、多糖及脂类。病毒有无包膜对压力的敏感性不同,包膜病毒较非包膜病毒对压力更为敏感。因为包膜是病毒装配时从宿主细胞的原生质膜获得,对物理和化学处理很敏感。高压处理后,病毒的整体结构并未改变,用电子显微镜观察唯一明显的变化就是在其表面存在一个凸出,如 Silva 等在对滤泡口炎病毒(VSV)进行加压处理后发现了包膜上有突出部分的存在,这可能是由于在脂质和蛋白膜下衣壳亚基的位移[35-36],压力处理后的

这些改变可能导致病毒灭活。虽然病毒形状在压力处理后并未改变,但其加压处理后的膜破裂会导致核蛋白外漏。

4.2　UHP 对病毒衣壳的影响

病毒衣壳是包围在病毒核酸外的一层蛋白质,由一定数量壳粒组成,在电镜下可观察到壳粒彼此呈对称性排列。壳粒是衣壳的形态学亚单位,每个壳粒可由一个或几个多肽组成。通过电镜观察发现,经过加压的轮状病毒的大致形态未改变,Kingsley 等也发现甲型肝炎病毒(HAV)衣壳经 UHP 灭活后仍然完整存在,推断 UHP 灭活病毒机制很可能是通过阻止附着在适当细胞受体的衣壳蛋白变性、阻塞渗透和病毒附着之后的脱壳机制发挥作用。此后大量的研究也都证实,UHP 灭活病毒主要是通过影响宿主细胞附着到引发感染的衣壳蛋白的变性,进一步阻止其结合到宿主细胞[37-40]。但仔细检查外层衣壳可发现,很多失去连续性的部分,表现为微弱的环状结构,该结果反映外层衣壳部分从内层衣壳脱离[41]。衣壳是否完整可影响对压力的稳定性,具有完整衣壳的病毒更能抵抗压力对其危害[42]。由高压引起的病毒衣壳蛋白或者包膜糖蛋白微小构象改变,模仿病毒颗粒结合到宿主细胞受体的过程称作融合-活动状态[43-44],膜融合状态的转换阻碍了病毒与宿主受体的结合,因此阻止内吞作用和病毒感染[34]。压力也能引起病毒颗粒的分离,这取决于病毒的种类和处理条件,压力引起的病毒颗粒分离可能完全可逆或完全不可逆[45],此现象已在很多病毒中被观察到。

4.3　UHP 对病毒核酸的影响

核酸是病毒的遗传物质,携带着病毒的全部遗传信息,是病毒遗传和感染的物质基础。一种病毒的病毒颗粒只含有一种核酸,DNA 或 RNA,它们以单链、双链或环状多核苷酸组成,其外包有蛋白质外壳,以保护核酸不受核酸酶或其它破坏性因素的影响。当蛋白质外壳受到破坏时,RNA 敏感性将大幅度提高。池元斌等研究了静水压对有包膜病毒-犬瘟热病毒(CDV)的影响,发现 CDV 病毒衣壳和囊膜在 150 MPa 静水压作用 30 min 便出现了明显的变化,而即使 510 MPa 的静水高压也没能使所选取的基因片段断裂[46]。压力主要对核酸空间结构,即二级结构、三级结构、四级结构和超分子结构有作用;而对大分子的一级结构,即使压力达到 100～200 MPa 也不能影响[42]。已有实验证明,UHP 处理似乎并没有影响病毒的核酸,因为其在高压处理后仍能被检测[47]。然而,当检测分子前对核酸进行酶处理后将不能再检测到核酸,该酶处理能消除裸露的或者被扰乱的病毒颗粒的全部核酸,只有来自于完整颗粒的核酸能被检测到,此方面的工作有待于进一步研究。

5　展　望

有效杀灭食品中的有害微生物,对食品安全保障有至关重要的影响。同时,UHP 技术作为一项新兴的非热加工技术已越来越强地展现出其商业利用价值。只有从理论上清楚地了解 UHP 杀菌的机制,才能保证 UHP 杀菌的有效性。从 20 世纪 70 年代至今,研究者采用不同的目标微生物,从 UHP 对微生物的细胞壁、细胞膜、细胞代谢、遗传物质影响等方面对 UHP 杀菌的机制开展了广泛的研究。但从上述分析可以看到,UHP 杀菌机制的很多领域还有待于应用现代微生物学、基因组学、细胞组学、蛋白组学的方法和手段进一步深入,如 UHP 如何影响膜结合酶及胞内主要酶的活性,如何影响细胞内参与代谢的相关蛋白质、基因的表达等,今后可重点研究。另外,鉴于微生物在高压下的逆境响应,从胞内基因表达、蛋白质及细胞代谢等方面分析应激机制并对其进行控制可进一步完善高压杀菌机制。

References:

[1]　Zhang H F,Bai J,Liu S S,et al. High hydrostatic pressure on the impact of microbes in food [J]. Journal of Agricultural Science,2008,29(2):25-28. (in Chinese)
张海峰,白　杰,刘珊珊,等. 超高压对食品中微生物的影响 [J]. 农业科学研究,2008,29(2):25-28.

[2]　Roger H. Action des hautes pressions sur quelques bacteries [J]. Arch Phys Norm Physiol,1895,7:12-17.

[3] Hite B H. The effect of pressure in the preservation of milk: A preliminary report [J]. Bull West Virginia Univ Agric Exper Stn, 1899, 58: 15-35.

[4] Hite B H, Giddings N J, Weakly C E. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables [J]. Bull West Virginia Univ Agric Exper Stn, 1914, 146: 1-67.

[5] Wilson D C. High pressure sterilization [A] //34th Annual Meeting of the Institute of Food Technologists [C]. New Orleans, LA, 1974.

[6] Chi Y B, Chen L X. The effect of high pressure on the behavior of bacteria [A] //The First Seminar on the High Pressure Food and Technology of China [C]. Baotou, 2000: 48-50. (in Chinese)
池元斌, 陈立学. 高压对鲜牛奶中细菌行为的影响 [A] //全国首届高压食品暨超高压技术应用研讨会 [C]. 包头, 2000: 48-50.

[7] Ritz M, Tholozan J L, Federighi M, et al. Physiological damages of Listeria monocytogenes treated by high hydrostatic pressure [J]. Int J Food Microbiol, 2002, 79(1-2): 47-53.

[8] Knorr D. Hydrostatic pressure treatment of food: microbi-ology [A]//Gould G W. New Methods of Food Preservation [C]. London: Blackie Academic & Professional, 1995: 159-175.

[9] Schreck C, Layh-Schmidt G, Ludwig H. Inactivation of mycoplasma pneumoniae by high hydrostatic pressure [J]. Pharma- Ceutical Industry, 1999, 61(8): 759-762.

[10] Ludwig H, Van A G, Schreck C. The effect of high hydrostatic pressure on the survival of microorganisms [A]// Taniguchi Y, Stanley H E, Ludwig H. Biological Systems under Extreme Conditions [C]. Berlin: Springer, 2002: 239-256.

[11] Moussa M, Perrier-Cornet J M, Gervais P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(65): 8-18.

[12] Yaldagard M, Mortazavi S A, Tabatabaie F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects [J]. Afr J Biotechnol, 2008, 7(27): 39-67.

[13] Ananta E, Knorr D. Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103 by flow cytometry analysis [J]. Food Microbiol 2009, 26(54): 2-6.

[14] Li Z J, Xu J X. Effect of high hydrostatic pressure on microbial physiological characteristics [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(4): 521-525. (in Chinese)
李宗军, 徐建兴. 超高压处理对微生物生理特性的影响 [J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 521-525.

[15] Tholozan J L, Ritz M, Jugiau F, et al. Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* [J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(20): 2-12.

[16] Pilavtepe-Celik M, Balaban M O, Yousef A E. Image analysis based quantification of bacterial volume change with high hydrostatic pressure [J]. J Food Sci, 2008, 73(9): 3-9.

[17] Heremans K. Protein dynamics: Hydration and cavities [J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38(11): 57-65.

[18] Smeller L. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules [J]. BBA-Protein Struct Mol, 2002, 159(5): 11-29.

[19] Bang W S, Chung H J. Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* [J]. New Biotechnol, 2010, 27(4): 440-444.

[20] Moussa M, Perrier-Cornet J M, Gervais P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(650): 8-18.

[21] Black E P, Setlow P, Hocking A D, et al. Response of spores to high-pressure processing [J]. Comp Rev Food Sci F, 2007, 6(10): 3-19.

[22] Setlow P. Effects of high pressure on bacterial spores [A]//Michiels C W. High Pressure Microbiology [C]. Washington: ASM Press, 2008: 35-51.

[23] Reddy N R, Tetzloff R C, Solomon H M, et al. Inactivation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B spores by high pressure processing at moderate to elevated high temperatures [J]. Innov Food Sci Emerg, 2006, 7(1): 69-75.

[24] Zeng Q M,Xie H M,Pan J,et al. Effect of Ultra-High Pressure Processing(UHPP) on the Microstructure of *Bacillus subtilis* [J]. Chinese Journal of High Pressure Physics,2006,20(1):83-87. (in Chinese)
曾庆梅,谢慧明,潘　见,等. 超高压处理对枯草芽孢杆菌超微结构的影响 [J]. 高压物理学报,2006,20(1):83-87.

[25] Brul S,Rommens A J,Verrips C T. Mechanistic studies on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by high pressure [J]. Innov Food Sci Emerg,2000,1(2):99-108.

[26] Baldwin C V,Robinson C W. Enhanced disruption of Candida-utilis using enzymatic pre-treatment and high-pressure homogenization [J]. Biotechnol Bioeng,1994,43:46-56.

[27] Perrier-Cornet J M,Maréchal P A,Gervais P. A new design intended to relate high-pressure treatment to yeast cell mass transfer [J]. J Biotechnol,1995,4(1):49-58.

[28] Hamada S,Andou M,Naito N. Direct induction of tetraploids or homogezygous diploids in the industry yeast *Saccharomyces cerevisiae* by hydrostatic pressure [J]. Curr Opin Genet Dev,1992,(22):371-376.

[29] Fumiyoshi A,Chiaki K,Koki H. Pressure-regulated metabolism in microorganisms [J]. Trends Microbiol,1999,7(11):447-452.

[30] Shimada S,Andou M,Naito N,et al. Effects of hydrostatic pressure on the ultra-structure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Microbiol Biot,1993,40(1):123-131.

[31] Grove S F,Lee A,Lewis T,et al. Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes [J]. J Food Protect,2006,69(4):957-968.

[32] Rzezutka A,Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food [J]. Fems Microbiol Rev,2004,28(4):441-453.

[33] Sun Y E,Sun Y. Prevention and control of foodborne viruses [J]. Food Science,2010,31(20):405-408. (in Chinese)
孙月娥,孙　远. 食源性病毒及其预防与控制 [J]. 食品科学,2010,31(20):405-408.

[34] Smelt J P P M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing [J]. Trends Food Sci Tech,1998,9(4):152-158.

[35] Gaspar L P,Mendes Y S,Yamamura A M,et al. Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus:Implications for vaccine development [J]. J Virol Methods,2008,150(2):57-62.

[36] Silva J L,Luan P,Glaser M,et al. Effects of hydrostatic pressure on membrane-enveloped virus:High immunogenicity of the pressure-inactivated virus [J]. J Virol,1992,66:2111-2117.

[37] Hogan E,Kelly A L,Sun D W. High pressure processing of foods:An overview [A]//Wen S D. Emerging Technologies for Food Processing [C]. Waltham Massachusetts:Academic Press,2005:3-31.

[38] Kingsley D H,Hoover D G,Papfragkou E,et al. Inactivation of hepatitis a virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure [J]. J Food Protect,2002,65:1605-1609.

[39] Li D,Tang Q,Wang J,et al. Effects of high-pressure processing on murine norovirus-1 in oysters (*Crassostrea gigas*) in situ [J]. Food Control,2009,20(11):992-996.

[40] Tang Q,Li D,Xu J,et al. Mech-anismof inactivation of murine norovirus-1 by high pressure processing [J]. Int J Food Microbiol,2010,137(203):186-189.

[41] Pontes L,Cordeiro Y,Giongo V,et al. Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with change in the spike protein VP4 [J]. J Mol Biol,2001,307(5):1171-1179.

[42] Zheng X H. The effect of high hydrostatic on virues [J]. Foreign Medical Sciences(Section of Virology),2004,11(2):59-61. (in Chinese)
郑贤红. 超高压对病毒的影响 [J]. 国外医学病毒学分册,2004,11(2):59-61.

[43] Aertsen A,Meersman F,Hendrickx M E,et al. Biotechnology under high pressure:Applications and implications [J]. Trends Biotechnol,2009,27(4):4-41.

[44] Gaspar L P,Silva A C,Gomes A M,et al. Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses [J]. J Biol Chem,2002,277(843):3-9.

[45] da Poian A T,Johnston J E,Silva J L. Differences in pressure stability of the three components of cowpea mosaic virus:Implications for virus assembly and disassembly [J]. Biochemistry,1994,33:8339-8346.

[46] Chi Y B, Xia X Z, Wang X M, et al. The effect of high hydrostatic pressure on CDV virues [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2001, 21 (1): 51-53. (in Chinese)
池元斌, 夏咸柱, 王雪梅, 等. 静水压对有包膜病毒-犬瘟热病毒的作用 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(1): 51-53.
[47] Khadre M A, Yousef A E. Susceptibility of human rotavirus, to ozone, high pressure and pulsed electric field [J]. J Food Protect, 2002, 65(9): 1441-1446.

Research on Mechanism of Ultra-High Pressure Sterilization

WANG Rong-Rong, SUN Chuan-Fan, WANG Ting-Ting,
HU Xiao-Song, ZHANG Yan, LIAO Xiao-Jun

(*College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University;*
National Engineering Research Center for Fruits and Vegetables Processing;
Key Laboratory of Fruits and Vegetables Processing,
Ministry of Agriculture, Beijing 100083, *China*)

Abstract: Microorganism in food is one of the most important factors which cause food to decay. As one method of sterilization, ultra-high pressure has achieved significant effect in food manufactory. After a brief introduction to fundamental principle of ultra-high pressure sterilization technology, this review laid stress on the effects of high pressure on microbiological cellular configuration, metabolism, and hereditary mechanism. Finally, applications of ultra high pressure in food industry were prospected.

Key words: ultra-high pressure; sterilization mechanism; research advance