

超高压处理对副溶血性弧菌胞内蛋白质的影响

周 敏¹, 陆维克², 陆金金¹, 陆海霞^{1,*}

(1. 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, 浙江 杭州 310018;

2. 杭州奥泰生物技术有限公司, 浙江 杭州 310018)

摘 要: 通过研究超高压处理对水产品源副溶血性弧菌细胞内可溶性蛋白质的影响, 进一步探讨超高压处理灭活微生物的机理。从水产品中分离获得的副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus* D) 和其经超高压驯化后的副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus* NYD) 两株菌经0、100、150、200、250 MPa压力处理后, 进行活菌计数, 胞内蛋白质十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 以及细胞内溶物泄漏量测定和胞内蛋白质和总巯基含量测定。结果表明, 在250 MPa条件下处理10 min, 菌株D和菌株NYD完全失活, 培养上清液中核酸物质和蛋白质泄漏量达到最大。随着处理压力的增加, 两株菌胞内分离得到的蛋白质的蛋白含量和总巯基含量下降。SDS-PAGE分析结果表明, 超高压处理对两株菌分子质量为140~180 kD的胞内蛋白质影响最大。超高压处理可造成副溶血性弧菌细胞内蛋白质变性从而导致细胞死亡。

关键词: 副溶血性弧菌; 超高压; 蛋白序列; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Effect of High Hydrostatic Pressure Treatment on Intracellular Protein Profile of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHOU Min¹, LU Weike², LU Jinjin¹, LU Haixia^{1,*}

(1. Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China; 2. Hangzhou All Test Biotech Co. Ltd., Hangzhou 310018, China)

Abstract: This research attempted to investigate the effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on the change of intracellular soluble proteins in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquatic products for the purpose of further understanding the mechanisms of microorganism inactivation under HHP. *Vibrio parahaemolyticus* D, isolated from aquatic products, and *V. parahaemolyticus* NYD, obtained by subjecting *Vibrio parahaemolyticus* D to high-pressure acclimatization, were treated at different pressures (0, 100, 150, 200 and 250 MPa). Then viable cell counts were measured, intracellular proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the leakage of cellular contents as well as intracellular soluble proteins and total sulphydryls were determined. The results showed that the strains D and NYD were completely inactivated under 250 MPa treatments for 10 min, leaving the leakage of intracellular substances including nucleic acids and proteins into the culture supernatant reaching the maximum level. Soluble protein and total sulphydryl contents in intracellular protein extracts from both strains decreased with the pressure increasing. SDS-PAGE analysis revealed the changes of intracellular proteins of 140~180 kD to be affected most by high pressure processing for the two strains. These data suggest that the inactivation of *V. parahaemolyticus* by high pressure treatment is associated with intracellular protein denaturation and the leakage of intracellular substances.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; high hydrostatic pressure (HHP); protein profiles; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701016

中图分类号: Q935

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 01-0099-06

引文格式:

周敏, 陆维克, 陆金金, 等. 超高压处理对副溶血性弧菌胞内蛋白质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 99-104.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701016. <http://www.spkx.net.cn>

ZHOU Min, LU Weike, LU Jinjin, et al. Effect of high hydrostatic pressure treatment on intracellular protein profile of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Science, 2017, 38(1): 99-104. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201701016. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-03-17

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD29B06); 浙江工商大学研究生创新项目 (14060101008)

作者简介: 周敏 (1991—), 女, 硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 1614460500@qq.com

*通信作者: 陆海霞 (1977—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产品加工和安全控制。E-mail: sea_wind770@163.com

超高压处理 (high hydrostatic pressure processing, HPP) 是一种冷杀菌方式, 可用于食品保藏, 在低温条件下可以灭活食品中的微生物和酶, 但不会破坏有机化合物中的共价键。因此, 高压处理后的食品通常可以保持其处理前的新鲜营养和生物活性状态^[1-2]。副溶血性弧菌是一种肠道病原菌, 广泛分布在海洋和河口环境, 这种病原菌经常可以从贝类和生的或部分煮熟的海鲜中分离得到^[3]。副溶血性弧菌属于耐压性较弱的细菌, 但在研究中发现如果对副溶血性弧菌采用从80~250 MPa超高压多次驯化可以使其对超高压有一定的耐受性^[4]。

超高压处理导致微生物细胞死亡, 是由于细胞不同部分的大量损伤累加导致的^[5]。超高压对微生物的影响是多目标的^[6-7], 在超高压处理过程中, 高压介导细胞膜损坏, 蛋白质变性和细胞内pH值下降, 导致微生物失活^[8]。相关研究表明超高压处理会导致微生物细胞形态改变、细胞壁破裂、细胞膜脂质热相变, 核糖体分解, 从而导致对微生物起作用的基因功能丧失^[9]。在压力条件下, 微生物细胞可能发生许多变化, 包括细胞膜完整性、细胞形态、相关生化反应等^[10-11]。有研究通过测定超高压处理后细菌细胞内ATP的减少量^[12]、紫外吸收物质的泄漏量^[13]、荧光染料吸收的增加量^[14]及胞内蛋白含量的测定^[15]等将细胞膜的破坏和细菌生存能力的丧失联系起来。Bartlett等^[16]认为非高压环境下的微生物可以通过诱导相应“应激”蛋白质的合成来响应高压。Welch等^[17]研究表明高压降低翻译能力。超高压可以破坏疏水性和静电相互作用, 但氢键不受压力的影响^[18]。蛋白质变性能够导致膜结合酶活性和膜成分发生改变^[12,19]。

本实验以不同超高压条件处理一株水产品源副溶血性弧菌D和其经超高压驯化获得的耐压株NYD, 研究两菌株细菌细胞内蛋白的变化来进一步阐明超高压对副溶血性弧菌的灭活机制。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

副溶血性弧菌分离菌株 (*V. parahaemolyticus* D), 分离于市售水产品八爪鱼中, 是所有分离株中压力耐受性较强的一个菌株, 保藏在含体积分数30%甘油的3% (质量分数) 氯化钠-碱性蛋白胨水培养基中, -80℃超低温冰箱冻存。副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus* NYD) 是菌株*V. parahaemolyticus* D经超高压驯化后的耐压菌株。

硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂培养基、3%氯化钠碱性蛋白胨水培养基、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂培养基 杭州微生物试剂有限公司; 一步法细菌活性蛋白提取试剂盒、蛋白Marker 上海生工生物工程

技术有限公司; 蛋白质量浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 蛋白上样缓冲液等蛋白电泳相关试剂 美国Bradford公司; β -巯基乙醇 (2-hydroxy-1-ethanethiol, BME)、*N*-乙基马来酰亚胺 (*N*-ethylmaleimide, NEM) 日本TCI公司; 其他所用到的化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV2550紫外-可见分光光度计 日本Shimadzu公司; HPB.A2-600/0.6超高压处理设备 天津华泰森森有限公司; infinite M200酶标仪 瑞士Tecan公司; Mini-PROTEAN Tetra蛋白电泳仪、Gel Doc 2000凝胶成像分析系统 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备

从-80℃冰箱中取出保藏的菌株D和NYD, 经活化扩培14 h后, 于8 000 r/min, 4℃条件下离心5 min, 弃去上清液; 用无菌的0.85%生理盐水洗涤2次, 再稀释成 10^8 CFU/mL的菌悬液置于备好的无菌蒸煮袋中, 热封机封口, 4℃保存备用。

1.3.2 超高压处理

室温条件下样品分别于100、150、200、250 MPa压力下保压处理5 min或10 min, 升压时间不超过2 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。

1.3.3 副溶血性弧菌存活量的测定

菌悬液经100、150、200、250 MPa压力处理, 处理时间10 min, 温度25℃, 采用平板倾注计数法进行菌落总数的测定, 37℃恒温倒置培养48 h后, 未处理组作为对照组, 进行菌落计数。

1.3.4 副溶血性弧菌细菌悬浮液中核酸物质和蛋白质泄漏量测定

菌悬液经150、200、250 MPa压力分别处理5 min和10 min后, 将经高压处理和未经高压处理的菌悬液于10 000 r/min, 4℃离心15 min。收集上清液后, 紫外-可见分光光度计测其在260 nm和280 nm波长处的吸光度, Bradford蛋白质量浓度测定试剂盒测其上清液中蛋白质含量。

1.3.5 副溶血性弧菌可溶性活性总蛋白含量的测定

将经100、150、200、250 MPa高压处理10 min和未经高压处理的菌悬液于10 000 r/min, 4℃条件下离心15 min富集后, 用一步法细菌活性蛋白提取试剂盒提取可溶性蛋白。试剂盒中含有溶菌酶和脱氧核糖核酸酶I。Bradford蛋白质量浓度测定试剂盒测定总蛋白含量。

1.3.6 副溶血性弧菌胞内蛋白质分布的测定

将经0、100、150、200、250 MPa压力处理10 min后提取的菌体蛋白, 采用非连续变性SDS-PAGE, 12%质量分数的分离胶, 4%质量分数的浓缩胶。上样前在上样缓

冲液中提前加BME或NEM（BME破坏二硫键，NEM保护二硫键），沸水浴中5 min后冷却上样。电泳结束后考马斯亮蓝R-250染色，脱色后拍照观察。

1.3.7 副溶血性弧菌细胞分离蛋白中总巯基含量的测定

副溶血性弧菌细胞分离蛋白中总巯基含量的测定参照Hamada等^[20]的实验方法。蛋白样品处理后加入Ellman试剂（即5,5'-二巯基双2-硝基苯甲酸），保温反应及离心后上清液在412 nm波长处测定吸光度，以含Ellman试剂的Tris-Gly缓冲液为空白对照。

1.4 数据分析

所有实验数据均为3次平行测定的平均值，数据统计采用SPSS 7.0软件进行ANOVA单因素方差分析，绘图采用软件Origin 8.0。

2 结果与分析

超高压处理对 *V. parahaemolyticus* D 和 *V. parahaemolyticus* NYD 存活率的影响

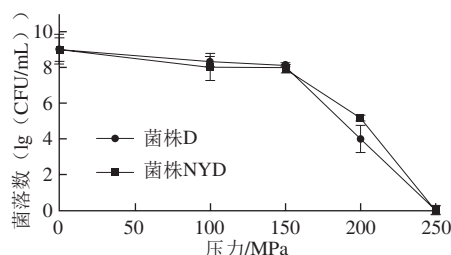


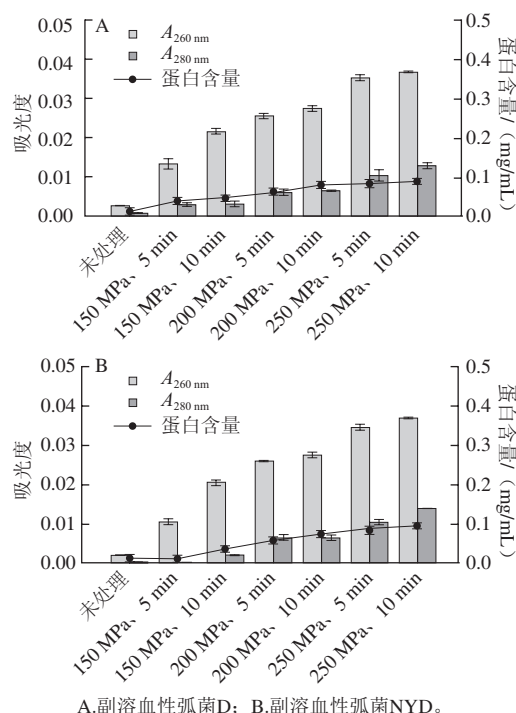
图1 超高压处理对菌株D与菌株NYD的存活率的影响

Fig. 1 Effect of high pressure treatment on the inactivation of *V. parahaemolyticus* D and *V. parahaemolyticus* NYD

副溶血性弧菌菌株D与菌株NYD在不同压力条件处理后菌株的存活率结果见图1。250 MPa高压处理后两菌株全部灭活，活菌数从 10^8 CFU/mL下降到未检测到活菌，说明两菌株的最高耐受压力为250 MPa；100 MPa和150 MPa压力处理对两菌株存活率影响不大，菌落数下降了1 (lg (CFU/mL))；随着压力的升高，活菌数以指数下降，200 MPa压力处理下，菌株NYD菌落数下降了3.93 (lg (CFU/mL))，菌株D菌落数下降了5.01 (lg (CFU/mL))，说明菌株NYD压力敏感性较菌株D弱。

Berlin等^[21]研究表明在25 °C、200 MPa压力下处理10 min，可以使生牡蛎匀浆中副溶血性弧菌活菌数下降6 (lg (CFU/mL))。Kural等^[22]报道称若将鲜活牡蛎中的副溶血性弧菌数减少5 (lg (CFU/mL))，处理条件为1~35 °C、350 MPa、2 min或是40 °C、300 MPa、2 min。Wang等^[23]研究表明，250 MPa、5 min处理条件下，副溶血性弧菌菌落数下降3.9 (lg (CFU/mL))，而在250 MPa、10 min处理条件下，活菌数下降5.9 (lg (CFU/mL))。综上，说明超高压的灭菌效果与压力大小和处理时间直接相关。

2.1 超高压处理对副溶血性弧菌细菌悬浮液中核酸物质和蛋白质泄漏量的影响



A. 副溶血性弧菌D; B. 副溶血性弧菌NYD。

图2 超压力处理后副溶血性弧菌细菌培养上清液紫外物质泄漏及蛋白含量测定

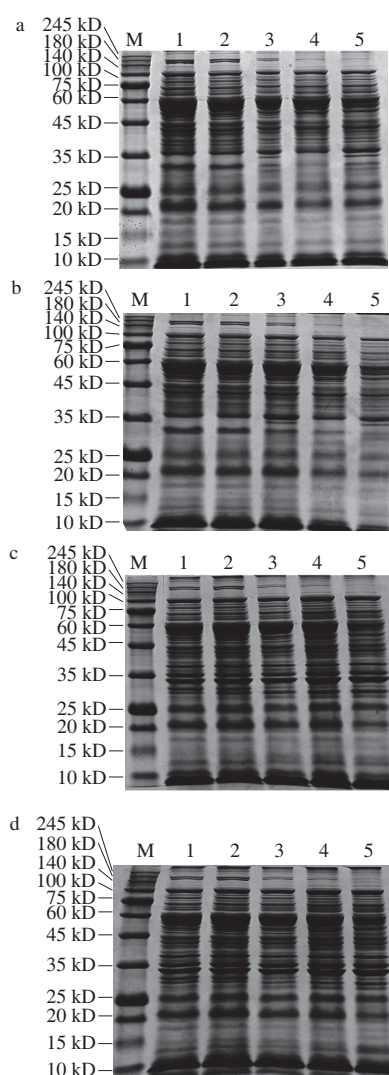
Fig. 2 Nucleic acid and protein contents in the culture supernatant of pressure-treated *V. parahaemolyticus* detected by Bradford assay

超高压处理对两株副溶血性弧菌细菌培养上清液中核酸和蛋白质泄漏的影响如图2所示。未经压力处理时，两菌株培养上清液中在260、280 nm波长处吸光度几乎为零，Bradford蛋白质质量浓度测定试剂盒未检测出有蛋白质存在（图2A）；随着处理压力的增加，菌株D上清液中在260、280 nm波长处吸光度逐渐增加，最大吸光度260 (0.038)、280 nm (0.014) 和蛋白含量 (0.094 mg/mL) 出现在250 MPa、10 min处理条件下；随着处理压力的增加，菌株NYD上清液中吸光度和蛋白含量的增加趋势与菌株D相似（图2B）。

实验结果说明随着压力的增加，细胞膜的通透性增大，更多的细胞内核酸物质流出到细胞外，从而导致细菌的死亡。同时可以发现，在相同处理压力下，处理时间长短（5 min或10 min）不同，菌株上清液紫外吸收物质泄漏量也不一样，尤其在150 MPa压力下结果更显著，说明处理时间也是影响超高压杀菌效果的一个因素。图2B中显示150 MPa压力下菌株NYD中280 nm波长处吸光度明显小于菌株D在相同条件下的吸光度，剩下几组压力条件下，菌株NYD的吸光度都略小于菌株D，这进一步证实菌株NYD较菌株D压力敏感性弱。细胞膜通透性的变化也许不是耐压菌株耐受超高压胁迫最主要的原因。菌株间的压力敏感性差异可能与细菌细胞膜蛋白差异有关^[24]。

Phuvasate等^[25]研究副溶血性弧菌10292在300 MPa、10 min处理条件下, 上清液紫外物质吸收达到最大260 nm (3.6) 和280 nm (1.9), 蛋白质含量为0.17 mg/mL, 远大于本实验的实验结果, 说明超高压处理对细菌细胞膜渗透性存在个体差异。童钰等^[26]研究结果表明400、500 MPa超高压处理单增李斯特菌后, 原始菌株和耐压菌株均无法修复而死亡, 但上清液紫外物质的泄漏程度与热处理的阳性对照 (90 ℃、10 min) 仍存在显著差异 ($P < 0.05$), 认为超高压与热处理的杀菌机理不完全相同, 超高压虽然不能使细胞膜成为全透性, 但是仍然可以使细胞膜未被彻底破坏的细菌因高压而致死^[27]。

2.2 SDS-PAGE分析细菌蛋白序列



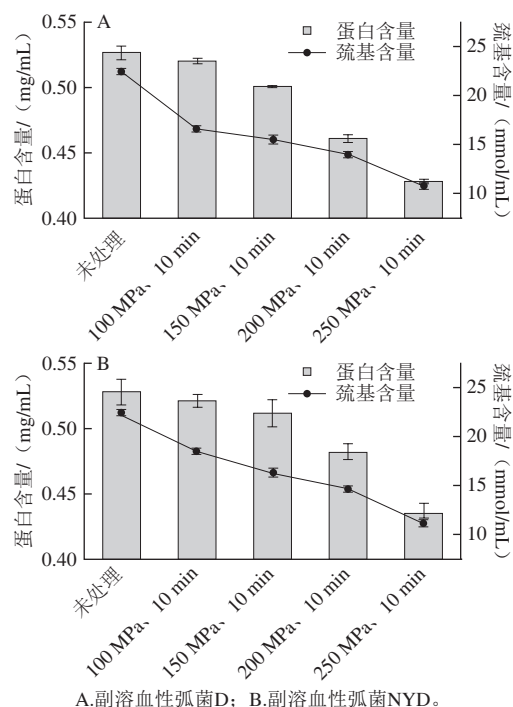
泳道M: 蛋白Marker; 泳道1: 0 MPa; 泳道2: 100 MPa, 10 min; 泳道3: 150 MPa, 10 min; 泳道4: 200 MPa, 10 min; 泳道5: 250 MPa, 10 min。
a. 菌株D, 上样缓冲液加BEM; b. 菌株D, 上样缓冲液加NEM; c. 菌株NYD, 上样缓冲液加BEM; d. 菌株NYD, 上样缓冲液加NEM。

图3 不同压力处理条件下副溶血性弧菌胞内活性蛋白SDS-PAGE分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of proteins extracted from *V. parahaemolyticus* subjected to high pressure treatment

SDS-PAGE分析超高压处理对两株菌胞内蛋白质的影响如图3所示。可以看出: 未经和经100 MPa处理的两菌株活性蛋白电泳条带没有较大的差异; 经150、200、250 MPa的高压处理后, 两菌株蛋白无论是在还原性还是在非还原性的分离凝胶中, 图谱条带均出现明显差异, 主要表现为分子质量在140~180 kD之间的条带几乎完全消失、分子质量为75~100 kD之间的条带光密度逐渐减少、分子质量大约为37 kD的条带光密度逐渐增加; 比较两组蛋白图谱可以发现菌株NYD明显比菌株D多出分子质量35 kD左右的条带。

超高压处理对菌体造成明显的损伤, 高压破坏了细菌蛋白的高级结构, 使蛋白质分子变性, 而且压力越高, 这种现象越明显。本实验结果与Phuvasate等^[25]相关研究结果大致一样, 他们通过分析两株副溶血性弧菌10290和10292细菌总蛋白图谱发现分子质量150~250 kD之间的条带逐渐消失、分子质量75~100 kD之间的条带光密度逐渐减少、分子质量为37 kD蛋白光密度逐渐增加。同时还有许多关于超高压处理对细菌外膜影响的报导。Wang等^[23]研究报道: 200~300 MPa、10 min压力处理条件下, 副溶血性弧菌外膜蛋白中大分子片段 (130 kD和140 kD) 消失, 40 kD大小的蛋白片段光密度逐渐增加。分子质量为35 kD的外膜蛋白 (OmpA) 与细菌细胞形状和完整性有关, 同时也与压力抵抗性相关^[28]。超高压处理后, 两株菌中光密度增加的37 kD蛋白和经高压驯化后的菌株NYD中光密度增加的35 kD蛋白可能是具有耐压性的外膜蛋白。

2.3 超高压处理后分离蛋白中总巯基含量变化



A. 副溶血性弧菌D; B. 副溶血性弧菌NYD。
图4 超高压处理后副溶血性弧菌提取蛋白质含量和总巯基含量
Fig. 4 Protein and sulfhydryl contents in cell pellets of *V. parahaemolyticus* subjected to high pressure treatments

超高压处理后菌株胞内蛋白质含量和总巯基含量如图4所示。可以看出, 未经高压处理的两株副溶血性弧菌的蛋白含量(菌株D: 0.526 mg/mL; 菌株NYD: 0.527 mg/mL)和巯基含量(菌株D: 22.47 mmol/mL; 菌株NYD: 22.14 mmol/mL)大致相同。随着处理压力的增加, 两株菌分离蛋白的蛋白含量和巯基含量逐渐下降。150 MPa压力处理后, 菌株D蛋白含量从0.526 mg/mL下降至0.500 mg/mL(下降了5%), 菌株NYD蛋白含量从0.527 mg/mL下降至0.511 mg/mL(下降了3%); 当处理压力增加至200 MPa时, 菌株D蛋白含量迅速下降到0.461 mg/mL(下降了12%), 菌株NYD则下降到0.482 mg/mL(下降了9%); 250 MPa高压处理后, 菌株D蛋白急剧下降到0.428 mg/mL(下降了19%), 菌株NYD下降到0.435 mg/mL(17%)。相应的, 随着处理压力的增加, 两菌株分离蛋白中总巯基含量逐渐下降。菌株D经100、150、200、250 MPa的高压处理后总巯基含量从22.47 mmol/mL分别下降至16.52、15.51、13.85、10.69 mmol/mL, 分别下降了26%、31%、38%、52%。菌株NYD经100、150、200、250 MPa的高压处理后总巯基含量从22.14 mmol/mL分别下降至18.49、16.27、14.66、11.19 mmol/mL, 分别下降了16%、26%、34%、49%。

蛋白质变性是超高压灭活机制的可能性原因之一^[29]。在超高压条件下, 蛋白质可能通过弱疏水性和静电相互作用发生变性, 导致结构改变和部分功能的丧失^[30]。蛋白变性展开, 巯基氧化形成二硫键来稳定蛋白结构。超高压处理后, 两菌株的总巯基含量下降, 表明细菌蛋白在压力条件下发生凝聚从而导致变性。

3 结 论

不同种类的微生物对超高压处理的应答大不相同, 取决于很多因素, 如: 菌株种类、菌株生长期、压力大小和处理时间等。250 MPa、10 min的处理条件可以完全灭活副溶血性弧菌D和NYD, 菌液上清液中核酸物质和蛋白质泄漏量达到最大。超高压破坏细菌蛋白的高级结构, 使蛋白质分子变性, 而且压力越高, 这种现象越明显。副溶血性弧菌的超高压灭活机制可能包括细胞膜损伤、细胞壁破裂和蛋白变性。因此, 相信本研究结果可为未来相关研究提供重要信息。

参考文献:

- [1] HAYASHI R, KAWAMURA Y, NAKASA T, et al. Application of high pressure to food processing: pressurization of egg white and yolk, and properties of gels formed[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53: 2935-2939. DOI:10.1080/00021369.1989.10869784.
- [2] STYLES M F, HOOVER D G, FARKAS D F. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure[J]. Journal of Food Science, 2006, 56(5): 1404-1407. DOI:10.1111/j.1365-2621.1991.tb04784.x.
- [3] CALIK H, MORRISSEY M T, RENO P W, et al. Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and pacific oysters[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(4): 1506-1510. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10313.x.
- [4] CHEN Haiqiang, GUAN Dongsheng, HOOVER D G. Sensitivities of foodborne pathogens to pressure changes[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(1): 130-136.
- [5] MALONE A S, SHELLHAMMER T H, COURTNEY P D. Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4357-4363. DOI:10.1128/AEM.68.9.4357-4363.2002.
- [6] CHUNG Y K, YOUSE A E. Inactivation of barotolerant strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 by ultra high pressure and tert-butylhydroquinone combination[J]. Journal of Microbiology, 2008, 46(3): 289-294. DOI:10.1007/s12275-008-0090-6.
- [7] TAHIRI I, MAKHLOUF J, PAQUIN P, et al. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure[J]. Food Research International, 2006, 39(1): 98-105. DOI:10.1016/j.foodres.2005.06.005.
- [8] SMELT J P P M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing[J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9(4): 152-158. DOI:10.1016/S0924-2244(98)00030-2.
- [9] RENDUELES E, OMER M K, ALVSEIKE O, et al. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(5): 1251-1260. DOI:10.1016/j.lwt.2010.11.001.
- [10] HOOVER D G, METRICK C, PAPINEAU A M, et al. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms[J]. Food Technology, 1989, 439(3): 99-107.
- [11] PATTERSON M F. Microbiology of pressure-treated foods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(6): 1400-1409. DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02564.x.
- [12] WOUTERS P C, GLAASKER E, SMELT J P P M. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 509-514.
- [13] SHIMADA S, ANDOU M, NAITO N, et al. Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 40(1): 123-131. DOI:10.1007/BF00170440.
- [14] RITZ M, THOLOZAN J L, FEDERIGHI M, et al. Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 79(1/2): 47-53. DOI:10.1016/S0168-1605(02)00178-2.
- [15] MALONE A S, SHELLHAMMER T H, COURTNEY P D. Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4357-4363. DOI:10.1128/AEM.68.9.4357-4363.2002.
- [16] BARTLETT D H, KATO C, HORIKOSHI K. High pressure influences on gene and protein expression[J]. Research in Microbiology, 1995, 146(8): 697-706. DOI:10.1016/0923-2508(96)81066-7.
- [17] WELCH T J, FAREWELL A, NEIDHARDT F C, et al. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(22): 7170-7177.

- [18] RIVALAIN N, ROQUAIN J, DEMAZEAU G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 659-672. DOI:10.1016/j.biotechadv.2010.04.001.
- [19] THOLOZAN J L, RITZ M, JUGIAU F, et al. Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(2): 202-212. DOI:10.1046/j.1365-2672.2000.00917.x.
- [20] HAMADA M, ISHIZAKI S, NAGAI T. Variation of SH content and kamabokogel forming ability of shark muscle protein by electrolysis[J]. *Journal of Shimonoseki University of Fisheries*, 1994, 42: 131-135.
- [21] BERLIN D L, HERSON D S, HICKS D T, et al. Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2776-2780.
- [22] KURAL A G, SHEARER A E H, KINGSLEY D H, et al. Conditions for high pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 127(1/2): 1-5. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.003.
- [23] WANG C Y, HUANG H W, HSU C P, et al. Inactivation and morphological damage of *Vibrio parahaemolyticus* treated with high hydrostatic pressure[J]. *Food Control*, 2013, 32(2): 348-353. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.12.023.
- [24] BENITO A, VENTOURA G, CASADEI M, et al. Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(4): 1564-1569.
- [25] PHUVASATE S, SU Y C. Alteration of structure and cellular protein profiles of *Vibrio parahaemolyticus* cells by high pressure treatment[J]. *Food Control*, 2015, 50: 831-837. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.10.037.
- [26] 童钰, 陆海霞. 副溶血性弧菌耐高压菌株耐压机理的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012, 25-26.
- [27] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6508-6518. DOI:10.1128/AEM.01212-07.
- [28] NIKAIDO H, VAARA M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability[J]. *Microbiological Reviews*, 1985, 49(1): 1-32.
- [29] HAYAKAWA I, KANNO T, TOMITA M. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation[J]. *Journal of Food Science*, 1994, 59(1): 159-163. DOI:10.1111/j.1365-2621.1994.tb06923.x.
- [30] GRIGERA J R, MCCARTHY A N. The behavior of the hydrophobic effect under pressure and protein denaturation[J]. *Biophysical Journal*, 2010, 98(8): 1626-1631. DOI:10.1016/j.bpj.2009.12.4298.