

食品微生物对超高压处理的逆境响应^{*}

张 静,赵 凤,胡小松,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,
农业部果蔬加工开放重点实验室,北京 100083)

摘要:超高压(High Hydrostatic Pressure, HHP)作为一种非热杀菌技术,在食品工业中有着很广泛的应用,与传统的加热处理相比,在保持食品品质、杀菌、钝酶等方面都有其明显的优势。通过对国内外相关文献的分析,对 HHP 处理后处于亚致死状态食品微生物的细胞膜、遗传与结构物质、机体代谢等方面,以及大部分食品微生物在应对外界的多种刺激时而进行的普遍性调控机制的研究进行了总结,探讨了经过 HHP 处理后处于亚致死状态的食品微生物在逆境下存活的应激反应。

关键词:超高压;逆境响应;食品微生物;遗传与结构物质

中图分类号:O521.9;TS201.3

文献标识码:A

1 引言

随着生活水平的提高,人们越来越关注食品的质量与安全。热杀菌技术一直作为控制食品安全方面的主要手段,但是由于在热杀菌的同时高温也会导致食品品质劣变,包括颜色变化、口味改变、香气损失、营养破坏和质构变化等^[1]。非热加工技术由于在加工过程中食品没有温度的剧烈变化,能有效保持食品原有的品质。因此,非热加工技术引起了高度的重视,已成为食品科学领域一个重要的研究方向。其中,超高压(High Hydrostatic Pressure, HHP)技术是目前研究最为广泛、商业化应用程度最高的非热加工技术,近年来有关 HHP 杀菌的研究越来越多。

HHP 是指在室温或温和热条件下,利用 100~1000 MPa 的压力达到杀菌钝酶的目的,这种技术能够有效防止食品加工过程中的色、香、味、形和营养方面的变化。食品中的小分子物质,如维生素、多肽、脂质等几乎不受外界高压的影响,主要是因为共价键不受超高压的影响,并且在小于 2 000 MPa 压力时,共价键的可压缩性很小^[2-5],所以经过 HHP 处理后食品能够保持原有的品质。HHP 的杀菌效率很高,能够杀死绝大部分微生物的营养体并使细胞活力消失。目前对于 HHP 诱导食品微生物的死亡机理研究主要是关于膜和胞内酶两方面:(1) HHP 能够引起膜损伤,造成细胞内容物外渗,最终导致细胞死亡^[6],另外, HHP 也可能对膜上 ATP 介导的转运系统造成不可逆的损伤,最终导致细胞死亡^[7];(2) 微生物细胞内与细胞主要功能相关的蛋白可能是 HHP 作用的主要位点,所以在生化反应中重要酶的钝化/变性造成了细胞的死亡^[8]。然而经过 HHP 处理后的处于亚致死状态的食品微生物却拥有恢复可培养性的潜能^[9],这种情况的存在不仅仅对食品工业经济造成了损失,而且在食品安全上也造成了很大的隐患。此外,针对微生物自身则说明在经过 HHP 处理后处于亚致死状态的食品微生物机体内存在着针对这种刺激的保护反应,正因为这些保护反应的存在使食品的完全杀菌存在困难,所以通过研究

* 收稿日期:2011-03-04;修回日期:2011-07-13

基金项目:北京市科技计划项目(D101105046610000)

作者简介:张 静(1987—),女,硕士研究生,主要从事果蔬加工、非热加工技术研究。E-mail:azazhangjing@sina.com

通讯作者:廖小军(1966—),男,博士,教授,主要从事果蔬加工、非热加工技术研究。E-mail:liaoqxun@hotmail.com

微生物的逆境响应来了解在 HHP 处理条件下其保护反应是很重要的。

2 HHP 对食品微生物的影响及其逆境响应

2.1 细胞膜

细胞膜作为保护细胞的第一道屏障,主要由磷脂双分子层和蛋白质组成^[10]。其处于细胞内、外环境的交界处,起着物质运输以及能量交换的作用,在 HHP 作用下细胞膜会受到很大的影响。Braganza 等^[11]、Hübner 等^[12]研究表明,HHP 处理能够使细胞体积减小,使膜上的脂质分子(尤其是蛋白质附近的脂质分子)排列更紧密,降低了膜的流动性。此外,膜的流动性与胆固醇含量和膜脂肪酸的饱和度密切相关,Molina-Garcia^[13]的研究证明了富含胆固醇的细胞膜比胆固醇含量少的细胞膜对 HHP 处理有更高的抵抗能力。Sahara 等^[14]发现,HHP 能够诱导酵母细胞(Yeast Cells) *OLE1* 基因(编码 Δ^9 -desaturase(一种不饱和脂肪酸))的表达。

麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成成分,它在确保膜结构的完整性、与膜结合的酶活性、膜的流动性、细胞活力以及物质运输等方面起着重要作用。Fernandes 等^[15]对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)研究也发现,经 HHP 处理后,至少一种涉及麦角固醇的生物合成基因(*ERG25*)进行上调表达。此外,HHP 还可诱导多种与膜有关基因的上调表达,这些基因主要是涉及编码进行蛋白质的跨膜运输功能的转运蛋白,包括 *secEG*、*yidC*、*yajC*、*ftsY*、*ffh*、signal peptidase I、同源蛋白 lmo1269-1271 和鞭毛运输部件基因。在李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)中,Sec 结构是主要的向外分泌蛋白系统的组件,据估计这种结构能够转运 508 个蛋白质到细胞膜及细胞壁上和细胞外,经 HHP 处理后的细胞中,Sec 结构的基因上调,说明蛋白质转运频率的增加可以起到维持细胞的生存状态以及进行细胞修复等作用^[16]。

蛋白质易受 HHP 的影响,其中与细胞膜结合的 F_1 - F_0 -ATPase 在 HHP 作用下,其质子转运活力下降,导致 pH 值梯度变化,抑制了 ATP 的生物合成和质子的向外运输^[17]。

2.2 胞内基因表达

以蛋白质组学^[18-21]和转录组学^[22-24]为基础方法,研究与 HHP 相关的遗传响应,在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中已经确定出一些与耐压有关的基因,其中包括编码 RNA 聚合酶、Sigma 因子(*RpoE*、*RpoS*)、与核酸相关的类组蛋白(H-NS、StpA)等基因^[24]。Fernandes 等^[15]通过基因芯片技术对经 HHP 处理后的 *S. cerevisiae* 的基因进行总体研究,结果表明,在经过 200 MPa、30 min 处理后,涉及压力防御和碳水化合物代谢等方面的基因进行上调表达,而大部分下调的基因则是一些关于细胞周期调控和蛋白质的合成等方面的基因,说明 HHP 从整体上对微生物产生了影响。下面就 HHP 对微生物细胞基因的影响进行分类介绍。

2.2.1 转录/翻译元件基因

DNA 在细胞核内进行转录,在细胞质中进行翻译,最后形成蛋白质,这一过程都将受到 HHP 的影响。HHP 可以诱导核糖体蛋白基因和翻译相关基因的表达量上升,其中与翻译相关的基因包括编码与 tRNA 和 rRNA 的功能、组装及稳定性质上起相关作用蛋白质的基因等^[25]。此外,RNA 聚合酶亚基以及 Delta 因子的基因表达量也有所升高,可能是为了弥补在 HHP 处理条件下 RNA 合成受到抑制的影响,其中 Delta 因子在基因表达方面存在广泛的影响^[26-28],主要通过提高 RNA 聚合酶的特异性及其循环方面来维持转录的高效性^[27,29]。另外还有一些编码与转录终止/抗终止作用相关蛋白的基因也表现出上调趋势^[25]。

2.2.2 抗逆蛋白基因

当某种微生物接触到高压环境时,这种微生物将会诱导特定“压力”蛋白的合成,这种蛋白即压力诱导蛋白(Pressure-Induced Proteins,PIPs)。Welch 等人^[18]将 *E. coli* 从正常大气压下转入到 53 MPa 的环境中时,细胞的生长速度减缓,并出现特定蛋白的合成,即形成 PIPs,在这些 PIPs 中已经确定出一些

属于冷休克蛋白(Cold Shock Proteins, CSPs),一些属于热休克蛋白(Hot Shock Proteins, HSPs)和核糖体蛋白,而其它 PIPs 的功能尚不能确定,而后其又研究 *E. coli* 经超过 100 MPa 的压力处理后,体内能够诱导特异性的蛋白,大部分的诱导蛋白是 CSPs、HSPs,还包括许多伴侣蛋白(Chaperones)^[18]。对 *S. cerevisiae* 的研究表明, HSP12、HSP30(编码热休克蛋白)显著上调表达^[15],然而在其他学者的实验中,鉴定出 *S. cerevisiae* 的 6 个热休克蛋白基因中只有 HSP31 在 125 MPa 的超高压下显著上调表达^[30]。在 Bowman 等人^[25]的研究中,热休克蛋白基因在高于 100 MPa 的条件下没有上调表达或只是轻微上调表达。这些实验结果的差异可能是由菌株的种属差异和实验条件造成的。HHP 还可以诱导 CSPs 的基因 *cspB* 和 *cspL* 显著上调表达,这些基因编码 CspA 样 RNA 结合蛋白(CspA-like RNA-Binding Proteins),这种蛋白可以作为 RNA 伴侣蛋白起作用,阻止 RNA 转录过程中 RNA 次级结构(Secondary Structure)的形成^[31]。此外,50S 核糖体蛋白也可以作为 RNA 伴侣分子,其中核糖体蛋白基因 L13 和 L19 在 HHP 的环境条件下都进行显著上调表达^[32]。

2.2.3 信息加工及存储基因

细胞核内的基因在聚合酶以及相关蛋白的作用下进行转录以及进行一些 DNA 修复功能。HHP 能够抑制 DNA 的复制过程,原因在于 DNA 复制体的解离^[33]和复制叉的解聚^[34]影响了 DNA 的复制。因此,微生物通过增加 DNA 聚合酶基因的表达来弥补由于外界超高压对 DNA 复制的抑制作用,进而使复制过程维持正常水平。Barciszewski 等人的研究表明,经 HHP 处理后涉及 DNA 聚合以及 DNA 修复相关的酶类基因表达量升高,微生物的这种保护反应是针对由 HHP 引起的 DNA 形成更加紧凑稳固的结构^[35]或者被破坏的 DNA 超螺旋结构,从而导致 DNA 聚合酶-DNA 复合物起始复制的有效性降低。对 *L. monocytogenes* 的研究发现了一些修复基因,包括一些 *holB* 的同源基因、*dnaA*、*recDFNU*、*dinG*、*ruvA*、*mutS*、*ssb*、*sbcC* 基因的上调^[25],表明 HHP 直接损伤了 *L. monocytogenes* 的 DNA 结构。HHP 可以使 *E. coli* 的 DNA 双螺旋结构打开并诱导 SOS 反应^[34,36]。此外,在 HHP 条件下, *hup* (*lmo1934*)和 *flaR* (*lmo1412*)基因的表达量上升,这两个基因都是编码可能影响 DNA 拓扑结构的类组蛋白。

HHP 除了影响上述方面的基因,也能引起涉及核苷酸代谢基因的表达上调,这些基因编码一些参与核苷酸相互转化(*drm*、*pdp*、*pnp*、*guaAB*)和参与核苷酸重新利用的蛋白(*upp*、*udk*、*smbA*、*lmo1939*、*lmo1463*)^[37]。

2.3 蛋白质

各种生物化学研究表明,在 100~200 MPa 压力范围、室温条件下,经常会引起蛋白质的以下变化:(1)低聚结构解离成亚基,(2)单体结构变性、部分打开,(3)蛋白质的聚合(可能是由于蛋白质的打开所引起的),(4)蛋白质凝胶的形成(在压力和蛋白质浓度很高的时候才会发生)。

HHP 对蛋白质会造成严重的影响。Molina-Garcia 研究在低温、约 200 MPa 压力的条件下,HHP 可能导致酶反应、引起蛋白质相互作用和功能改变的蛋白质重要构象的改变^[13]。在微生物体内的一些酶也会受到抑制或者钝化,例如在 400 MPa 条件下, *E. coli* 中的脱氢酶、酵母中的羧肽酶和在磷脂双分子层上涉及主动运输方面的 Na/K 依赖的 ATP 酶等^[38]。其中,诱导蛋白是在受到高压刺激后产生的应激蛋白。

核糖体对外界压力比较敏感,核糖体功能下降对微生物针对 HHP 的逆境响应有很大程度的影响,所以可以作为一个压力感应元件,核糖体感应模型(Ribosomal Sensor Model)的建立,说明核糖体的物理状态是一个与外界刺激有联系的信号,并且增加了特定压力基因(Stress Gene)的表达增加^[39]。

在外界压力小于 100 MPa 的高压条件下,微生物会诱导 PIPs 的生成。Aertsen 等^[20]研究 *E. coli* 经过热预处理后进行 HHP 处理,菌株的抗高压逆性增加,说明热刺激产生的 HSPs 对 HHP 钝化菌株起到保护作用。他们也对 HHP 抗性突变株进行了高压处理,发现热休克蛋白的基础表达量上升,增强了 *E. coli* 的抗性作用^[25],证明 HSPs 对 HHP 钝化菌株起到保护作用的观点。HSPs 基因转录的增加

是细胞针对外界 HHP 引起蛋白质变性诱发的反应,并且相关基因产物的积累可能会帮助修复外界压力造成的损伤,HHP 诱导生成的 HSPs 对微生物适应外界的 HHP 环境是很重要的^[20]。这些 HSPs 中有许多是作为分子伴侣(Molecular Chaperones)在起作用,通过结合在新生的、错误折叠的或者是损坏的多肽上协助它们形成本应具有的构象^[40]。在 *E. coli* 中,作为分子伴侣的 HSPs 包括 Hsp60(Gro-EL)、Hsp70(DnaK)、Hsp100 和小热休克蛋白 IbpA 和 IbpB,其中 IbpB 能够协助其它伴侣蛋白对变性蛋白进行再折叠^[41]。

在 HHP 作用下,*L. monocytogenes* 会诱导 CSPs 的形成,CSPs 蛋白家族几乎存在于所有细菌中^[17,42-44],CSPs 主要是一种 7-kDa 的蛋白质,可以作为 RNA 的伴侣蛋白起作用,也可以用于抑制蛋白质的次级折叠^[43,45]。此外,CSPs 还可作为转录激活子或抗终止子,进而激活非 7-kDa 的 CSPs 产生^[46-48]。在 *E. coli* 中,经 HHP 处理后,CspA(一种 CSPs)被诱导产生^[18],该过程与 HSPs 的产生相类似,说明 CSPs 对经压力处理后的微生物对外界的适应起到了积极的作用。综上所述,在蛋白质方面,在低温、高温和高压的刺激条件下,微生物存在着联合保护机制。

Welch 等^[18]研究表明,与其它常压下合成的蛋白相比,在外界压力存在的情况下,许多微生物中的多种 PIPs 的合成保持不变或者呈上升趋势,说明 *E. coli* 和它的微生物都能够产生抵抗外界的高压逆境反应,而这种反应并不表现菌种特异性。

2.4 细胞代谢

HHP 可以抑制许多代谢基因的表达,特别是与氧化磷酸化、中间代谢(如丙酮酸盐代谢旁路等)、与碳水化合物相关的磷酸转移酶系统(Phosphotransferase System,PTS)载体(除甘露糖特异磷酸转移酶系统(PTS),一些对葡萄糖、海藻糖吸收相关的 PTS 基因和将海藻糖转换成葡萄糖的海藻糖-6-磷酸脱氢酶)以及糖酵解和脂类代谢相关的基因,一些细胞色素 bo 终端氧化酶(cyoABCD)、各种 ATP 合成酶基因(lmo0088-0092、lmo2528-2530)以及 NADH 氧化酶/脱氢酶基因(lmo2389、lmo2471)等表达下调,说明微生物经过 HHP 的处理可以引起氧化磷酸化能量转化能力的下降。在中间代谢过程中有许多基因都表现出抑制状态,包括 *pdhABCD*、*pflAC*、乙酰辅酶 A 基因(lmo2720)、*ldh*、*alsDS* 和丙酮酸盐氧化酶基因(lmo0722),此外糖酵解基因(lmo2455-2457)、甘油代谢基因(lmo348、lmo1293、lmo1538、lmo1539、lmo2695、lmo2696)和推测的纤维醇磷酸代谢基因(lmo0383-0388)也都表现出抑制状态^[25]。通过观察到上述代谢基因的表达下调,可推测在 *L. monocytogene* 中某种代谢抑制元件的表达上调,例如代谢控制基因 *ccpA*(lmo1599)^[49] 和基因 lmo2460(与 *B. subtilis* 糖酵解 *gap* 操纵子抑制子基因 *cggR* 相类似)^[50]。但是 HHP 对一些编码涉及氨基酸转运和代谢的蛋白质基因影响要小得多。

已有的以分子为基础的研究并没有证明 HHP 可以降低代谢基因的表达量。但是,对微生物的生理学研究表明,机体内的代谢活力明显下降^[51-53],但细胞对能量的需求却表现出上升的趋势。此外,涉及到碳代谢的酶,例如压力诱导的高亲和力己糖转运蛋白基因 *HXK4*、*HXK7*、*HXK6* 和 *HXK1*,糖分解旁路基因(*HXK1*)都与糖的合成相关的基因 *GPM2* 和 *TDH1* 共同表达上调。这种涉及到糖酵解、糖异生和碳代谢的基因同时诱导,可以认为是受刺激的细胞对利用碳循环代谢来促使微生物快速的适应和控制细胞内的能量稳定起到重要作用^[15]。

2.5 细胞的普遍性调控

当 *L. monocytogenes* 受到 HHP 处理后,存活菌株的抗逆机制可能与抗逆反应调节子(Regulator)的前诱导有关,例如 σ^B ,它可以在机体受到外界刺激的情况下,激活多种保护基因的表达,进而引起抗逆反应^[54]。

全酶是由核心酶和辅因子构成的,通常这个辅因子是 σ 因子起作用, σ 因子主要是用于识别并结合到聚合酶上,进而与基因上游的启动子序列结合引起转录的起始。在 *L. monocytogene* 全基因组中,共有 5 个 σ 因子^[55],编码这些因子的基因包括 *rpoD*、*sigh*、*rpoN*、*sigV*、*sigB*,其中 *sigB* 编码 σ^B 因子,它控制涉及适应外界刺激的基因转录。在多种革兰氏阳性细菌中,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、

葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、*L. monocytogenes* 等, σ^B 因子都受到广泛关注。其中关于 σ^B 因子研究最为清晰的是,在 *B. subtilis* 系统中, σ^B 因子操纵子是由 *rsbR*、*rsbS*、*rsbT*、*rsbU*、*rsbV*、*rsbW*、*sigB* 和 *rsbX* 组成的。*Rsb* 蛋白都参与 σ^B 因子活力的调节^[56],在正常的生长条件下,*RsbW* 与 σ^B 因子结合形成一种非活性复合物。*RsbW* 对 σ^B 因子和 *RsbV* 的亲合力的大小是通过两个独立的过程来实现的,这两个独立的过程可以促使 *RsbW* 与 *RsbV* 的结合,并释放出 σ^B 因子,被释放出的 σ^B 因子可以与核心酶形成全酶,进而可以引起特定基因转录的起始。在 Robey 的试验中证明了这点,即 *E. coli* 中 *rpoS*(编码静止阶段的 RNA 聚合酶的 σ 因子)的缺失降低了 *E. coli* O157:H7 对 HHP 的抗性^[57]。

除了以上所述的研究外,细胞内含碳化合物浓度的降低、当细胞进入到停滞状态时与之相关的 ATP 浓度的降低(ATP 合成酶基因(lmo0088-0092、lmo2528-2530)以及 NADH 氧化酶/脱氢酶(lmo2389、lmo2471)等表达量的下调)都会促使 *RsbW* 与 *RsbV* 结合^[56],引起微生物的抗逆反应。

3 结 束 语

以上所述几个方面能够基本揭示 HHP 诱导细胞的逆境响应,扩大了应用 HHP 作为一种新途径来研究微生物在逆境下的应激反应。然而,不同微生物对 HHP 的逆境响应机理有所差异,但如果能够确定 HHP 对微生物体内作用的靶标,可能对基于 HHP 为基础的保藏技术发展大有益处。

100~800 MPa 的压力范围足以钝化大部分的微生物和酶,压力对微生物破坏的作用主要依赖于压力处理时的一些参数,比如压力水平、持续时间以及卸压速率等;其它的环境因素,比如加酸、加入杀菌剂以及其它食品添加剂(如 Nisin 等)、升高温度等与 HHP 的相互作用都会提高对细胞的破坏作用,进而降低细胞的耐压性(抵抗外界高压的能力)。一些研究结果表明,某些细菌经过 HHP 处理后都具有复原的能力,虽然这些发现并没有进行机制方面的讨论,但是可以说明,经过 HHP 处理后的损伤细胞并没有导致永久死亡。

通过对国内外有关文献的分析,发现微生物经过 HHP 处理后,其细胞外部形态结构、胞内蛋白(如酶等)及基因表达方面有相应的改变,这些变化对处于亚致死状态的微生物能起到维持生命的作用,具体表现在改变膜结构、增加某种保护蛋白的表达量,以及诱导细胞 SOS 反应等。但是这些研究只针对 HHP 处理后微生物的单个或部分原因的分析,然而从食品微生物的机体自身来说,HHP 对微生物的刺激所引起的信号传递,以及在信号传递过程中起关键作用的物质和食品微生物的保护应激反应中起到关键作用的蛋白(或蛋白质组)或者遗传基因等还没有明确的研究结果,需要进一步通过研究加强对处于亚致死状态微生物的了解,以解析在 HHP 条件下微生物逆境响应机制。

References:

- [1] Zhou L Y, Liao H M, Hu X S, et al. Fundamental issues of non-thermal processing in food [J]. Food Science, 2010, 31(5): 328-333. (in Chinese)
周林燕, 廖红梅, 胡小松, 等. 食品非热杀菌研究中的科学问题分析 [J]. 食品科学, 2010, 31(5): 328-333.
- [2] Gross M, Jaenicke R. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes; A review of proteins under pressure [J]. Eur J Biochem, 1994, 221(2): 617-630.
- [3] van den Broeck I, Ludikhuyze L, Weemaes C, et al. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(5): 2001-2006.
- [4] Oey I, Verlinde P, Hendrickx M, et al. Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or ^[6] 5-methyl-tetrahydrofolic acid: A kinetic study [J]. Eur Food Res Technol, 2006, 223(1): 71-77.
- [5] Cheftel J C, Culioli J. Effects of high pressure on meat; A review [J]. Meat Science, 1997, 46(3): 211-236.
- [6] Brown A, Skanes I, Morrow M R. Pressure induced ordering in mixed-lipid bilayers [J]. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2004, 69(1): 011913(1)-011913(9).

- [7] 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(5): 542-546.
- [8] Tauscher B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure; Chemical aspects [J]. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und -Forschung A*, 1995, 200(1): 3-13.
- [9] Ritz M, Pilet M F, Jugiau F, et al. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments; Destruction or sublethal stress? [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42(4): 357-362.
- [10] Singer S J, Garth L N. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes [J]. *Science New Series*, 1972, 175(4023): 720-731.
- [11] Braganza L F, Worcester D L. Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused by hydrostatic pressure [J]. *Biochemistry*, 1986, 25(23): 7484-7488.
- [12] Hübner W, Wong P T T, Mantsch H H. The effect of hydrostatic pressure on the bilayer structure of phosphatidylcholines containing ω -cyclohexyl fatty acyl chains [J]. *Biochim Biophys*, 1990, 1027(3): 229-237.
- [13] Molina-Garcia A D. The effect of hydrostatic pressure on biological systems [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2002, 19: 3-54.
- [14] Sahara T, Goda T, Ohgiva S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 50015-50021.
- [15] Fernandes P M B, Domitrovic T, Kao C M, et al. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure [J]. *FEBS Lett*, 2004, 556(1-3): 153-160.
- [16] Desvaux M, Hébraud M. The protein secretion systems in *Listeria*; Inside out bacterial virulence [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(5): 774-805.
- [17] Wouters J A, Sanders J W, Kok J, et al. Clustered organization and transcriptional analysis of a family of five *csp* genes of *Lactococcus lactis* MG1363 [J]. *Microbiology*, 1998, 144: 2885-2893.
- [18] Welch T J, Farewell A, Neidhardt F C, et al. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure [J]. *J Bacteriol*, 1993, 175(22): 7170-7177.
- [19] Drews O, Weiss W, Reil G, et al. High pressure effects step-wise altered protein expression in *Lactobacillus sanfranciscensis* [J]. *Proteomics*, 2002, 2(6): 765-774.
- [20] Aertsen A, Vanoorbeek K, de Spiegeleer P, et al. Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(5): 2660-2666.
- [21] Hörmann S, Scheyhing C, Behr J, et al. Comparative proteome approach to characterize the high-pressure stress response of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451^T [J]. *Proteomics*, 2006, 6(6): 1878-1885.
- [22] Iwahashi H, Shimizu H, Odani M, et al. Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Extremophiles*, 2003, 7(4): 291-298.
- [23] Ishii A, Oshima T, Sato T, et al. Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure [J]. *Extremophiles*, 2005, 9(1): 65-73.
- [24] Malone A S, Chung Y K, Yousef A E. Genes of *Escherichia coli* O157: H7 that are involved in high-pressure resistance [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(4): 2661-2671.
- [25] Bowman J P, Claudio R, Bittencourt, et al. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing [J]. *Microbiology*, 2008, 154: 462-475.
- [26] Gao H, Aronson A I. The delta subunit of RNA polymerase functions in sporulation [J]. *Curr Microbiol*, 2004, 48(6): 401-404.
- [27] Lopez de Saro F J, Yoshikawa N, Helmann J D. Expression, abundance, and RNA polymerase binding properties of the delta factor of *Bacillus subtilis* [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(22): 15953-15958.
- [28] Seepersaud R, Needham R H V, Kim C S, et al. Abundance of the δ subunit of RNA polymerase is linked to the virulence of *Streptococcus agalactiae* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(6): 2096-2105.
- [29] Juang Y L, Helmann J D. Pathway of promoter melting by *Bacillus subtilis* RNA polymerase at a stable RNA promoter; Effects of temperature, delta protein, and sigma factor mutations [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(26): 8465-8473.
- [30] Miura T, Minegishi H, Usami R, et al. Systematic Analysis of *HSP* gene expression and effects on cell growth and

- survival at high hydrostatic pressure in *Saccharomyces Cerevisiae* [J]. *Extremophiles*, 2006, 10(4): 279-284.
- [31] Jiang W, Hou Y, Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(1): 196-202.
- [32] Semrad K, Green R, Schroeder R. RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli* [J]. *RNA*, 2004, 10: 1855-1860.
- [33] Bartlett D H. Pressure effects on in vivo microbial processes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1595(1-2): 367-381.
- [34] Aertsen A, van Houdt R, Vanoirbeek K, et al. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli* [J]. *Bacteriol*, 2004, 186(18): 6133-6141.
- [35] Barciszewski J, Jurczak J, Porowski S, et al. The role of water structure in conformational changes of nucleic acids in ambient and high-pressure conditions [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 260(2): 293-307.
- [36] Aertsen A, Michiels C W. Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2005, 58(5): 1381-1391.
- [37] Neidhardt F C, Curtiss R, Ingraham J L, et al. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology [M]. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1996.
- [38] Chong P L, Fortes P A, Jameson D M. Mechanisms of inhibition of (Na, K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(27): 14484-14490.
- [39] Vogel R F, Pavlovic M, Hörmann S, et al. High pressure-sensitive gene expression in *Lactobacillus sanfranciscensis* [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38(8): 1247-1252.
- [40] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein [J]. *Science*, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [41] Veinger L, Diamant S, Buchner J, et al. The small heat-shock protein ibpb from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(18): 11032-11037.
- [42] Etchegaray J P, Inouye M. CspA, CspB, and CspG, Major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis [J]. *J Bacteriol*, 1999, 181(6): 1827-1830.
- [43] Graumann P, Schröder K, Schmid R, et al. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis* [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178(15): 4611-4619.
- [44] Phadtare S, Alsina J, Inouye M. Cold-shock response and cold-shock proteins [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(2): 175-180.
- [45] Graumann P, Wendrich T M, Weber M H W, et al. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures [J]. *Mol Microbiol*, 1997, 25(4): 741-756.
- [46] Bae W, Xia B, Inouye M, et al. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7784-7789.
- [47] Brandi A, Pon C L, Gualerzi C O. Interaction of the main cold shock protein CS7. 4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of hns [J]. *Biochimie*, 1994, 76(10-11): 1090-1098.
- [48] LaTeana A, Brandi A, Falconi M, et al. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(23): 10907-10911.
- [49] Behari J, Youngman P. A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(23): 6316-6324.
- [50] Doan T, Aymerich S. Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: Binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by Fructose-1, 6-Bisphosphate [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 47(6): 1709-1721.
- [51] Abe F, Kato C, Horikoshi K. Pressure-regulated metabolism in microorganisms [J]. *Trends Microbiol*, 1999, 7(11): 447-453.
- [52] Ulmer H M, Ganzle M G, Vogel R F. Effects of high pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1. 460 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(9): 3966-3973.

- [53] Kilimann K V, Hartmann C, Delgado A, et al. A fuzzy logic-based model for the multistage highpressure inactivation of *Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG 1363 [J]. Int J Food Microbiol, 2005, 98(1): 89-105.
- [54] Henrike H, Wemekamp-Kamphuis, Jeroen A, et al. Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6): 3457-3466.
- [55] Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species [J]. Science, 2001, 294(5543): 849-852.
- [56] Voelker U, Voelker A, Maul B, et al. Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses [J]. J Bacteriol, 1995, 177(13): 3771-3780.
- [57] Robey M, Benito A, Hutson R H, et al. Variation in resistance to high hydrostatic pressure and rpos heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(10): 4901-4907.

Stress Response of Food Microorganisms under High Hydrostatic Pressure

ZHANG Jing, ZHAO Feng, HU Xiao-Song, LIAO Xiao-Jun

(National Engineering Research Center For Fruit and Vegetables Processing ,
Key Laboratory of Fruit and Vegetable Processing ,Ministry of Agriculture ,
College of Food Science and Nutritional Engineering ,
China Agricultural University ,Beijing 100083, China)

Abstract: As a novel non-thermal food processing technology, high hydrostatic pressure (HHP) is showing broad application in food industry. Compared to traditional technologies, this technology exhibits significant advantages in the retention of food quality, inactivation of microorganisms and enzymes. In this review, based on the comprehensive analysis, regulation of sub-lethal cells' membrane, genetic and structural components, metabolism under HHP treatment and a majority of sub-lethal food microorganisms general responses when exposed to some stresses are reviewed, and the stress response of sub-lethal food microorganisms exposed to HHP is discussed in this paper.

Key words: high hydrostatic pressure; stress response; food microorganism; genetic and structural materials