

文章编号:1000-8551(2012)01-0086-05

高密度 CO₂ 处理对 *E. coli* 细胞膜渗透性的影响

王莹莹 张德权 李淑荣 李娟 饶伟丽

(中国农业科学院农产品加工研究所/农业部农产品加工与质量控制重点开放实验室,北京 100193)

摘要:以 *E. coli* 菌悬液为研究对象,通过测定高密度 CO₂ 处理(DPCD)后 *E. coli* 上清液中蛋白质、核酸、Mg²⁺、K⁺ 离子和丙二醛的含量,辅助透射电镜观察,研究 DPCD 对 *E. coli* 细胞膜渗透性的影响。在 7MPa、37℃ 条件下,*E. coli* 经高密度 CO₂ 处理 10min 后,99% 以上的 *E. coli* 失活,同时研究发现蛋白质、核酸及 Mg²⁺、K⁺ 离子等胞内物质均发生了不同程度的泄漏,丙二醛含量增加,*E. coli* 胞内物质密度降低。密度 CO₂ 处理造成 *E. coli* 细胞膜渗透性的增加,这也是导致 *E. coli* 死亡的原因之一。

关键词:高密度 CO₂; *E. coli*; 细胞膜渗透性

EFFECT OF DENSE PHASE CARBON DIOXIDE ON MEMBRANE PERMEABILIZATION OF *E. coli*

WANG Ying-ying ZHANG De-quan LI Shu-rong LI Juan RAO Wei-li

(Key Laboratory of Agricultural Product Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture/Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: To study the effects of dense phase carbon dioxide (DPCD) on membrane permeability of *E. coli*, the content of protein, nucleic acid, Mg²⁺, K⁺ and malondialdehyde (MDA) of *E. coli* were studied coupled with Transmission Electron Micrographs (TEM) technique. Under the DPCD condition of 7MPa, 37℃ for 10min, 99% of *E. coli* was inactivated. After DPCD treatment, proteins, nucleic acid and Mg²⁺, K⁺ leaked from cells, and the content of MDA increased and the density of substances inside the cell decreased through the TEM view. The results indicated that DPCD treatment caused the membrane permeability of *E. coli* increased which was also an important cause of cell death.

Key words: dense phase carbon dioxide; *E. coli*; membrane permeabilization

食品杀菌技术可分为热力杀菌和非热力杀菌技术。热力杀菌技术虽能杀灭微生物、延长产品货架期,但高温会破坏热敏性营养成分,影响食品质构、色泽和风味。辐照、超高压、脉冲电场、高密度 CO₂ (DPCD)、脉冲磁场等非热力杀菌技术因具有杀菌温度低、杀菌条件温和、能较好地保持食品固有的营养成分、色泽和新鲜度等优势,是目前食品领域的研究热点^[1~5]。DPCD 杀菌技术是一种新型的食品非热力杀菌技术,近年来研究日益增多。目前的研究主要集中在 DPCD

的杀菌效果上^[6],而对其杀菌机理的研究尚不多见^[7]。目前认为,DPCD 导致微生物死亡的因素有 2 个方面,一是高压和萃取等物理因素造成微生物形态和结构破坏^[6,7];二是 DPCD 破坏微生物的新陈代谢^[8~14]。此外,有学者发现,DPCD 对微生物的杀灭作用可能并非完全源于压力的物理破坏作用,也可能与 DPCD 的萃取效应和低 pH 值效应有关,认为 DPCD 不仅可使微生物细胞崩溃、细胞形态破坏、细胞膜脂质双分子层破裂,还可移除细胞膜上的关键组分,增加磷脂

收稿日期:2011-03-03 接受日期:2011-05-20

基金项目:国家现代农业产业技术体系

作者简介:王莹莹(1985-),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,主要从事食品非热加工技术研究。E-mail: yingying1985054@126.com

通讯作者:张德权(1972-),男,河南信阳人,研究员,主要从事肉品加工与质量控制技术研究。Tel: 010-62818740;E-mail: dqzhang0118@

126.com

双分子层的流动性和渗透性,造成细胞内容物泄漏、胞内外 pH 降低,引起细胞死亡^[15-17],但目前尚未有明确一致的结论,而阐明 DPCD 对微生物细胞膜渗透性的影响,对于揭示 DPCD 杀菌机理至关重要。为此,本研究以 *E. coli* 为研究对象,通过测定 DPCD 处理后 *E. coli* 上清液中蛋白质、核酸、Mg²⁺、K⁺ 离子和丙二醛 (MDA) 的含量,辅助透射电镜 (TEM) 的观察,研究大肠杆菌细胞膜渗透性的变化,为探索 *E. coli* 杀菌机理提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 *E. coli* CICC 购于中国工业微生物菌种保藏中心;CO₂ 纯度为 99.99%,购于北京市华元气体有限公司;葡萄糖、氯化钠、氢氧化钠等购于北京化学试剂公司;Tris-base 购于 GibcoBRL 公司;考马斯亮蓝染料 G-250 购于 Amersham Pharmacia 公司;微量丙二醛 (MDA) 测定试剂盒购于南京建成研究所。

1.1.2 仪器 高密度 CO₂ 装置,杀菌釜 1L,美国 Speed SFE 公司;LS-B100L 立式压力蒸汽灭菌器,江阴滨江医疗设备有限公司;Neofuge 15R 台式高速冷冻离心机,上海力申科学仪器有限公司;DHP-600 电热恒温培养箱,天津市中环实验电炉有限公司;T6 分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;AA-6300 原子吸收分光光度计,岛津(香港)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种培养 将冻干管内的菌体溶解,转入盛有 5ml 液体培养基(每 1L 培养基含 10g 蛋白胨,10g 牛肉膏,5g 葡萄糖,5g NaCl)的试管中,37℃ 恒温培养 2d。再将菌体接种于斜面培养基充分培养,然后置 4℃ 冰箱中保存,1 个月移植 1 次。将斜面培养基上单菌落 *E. coli* 接种到 100ml 液体培养基中,37℃ 培养 8h 达到对数期后期(OD_{600nm} = 0.7)。

1.2.2 DPCD 处理 取 30ml 对数期后期的菌液于 4℃,3500g 离心 10min,弃上清液,所得菌体用生理盐水洗涤 2 次(离心同上)。菌体悬浮于 15ml pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液中,进行 DPCD 处理。在临界压力及菌生长的最适宜温度条件下,DPCD 不同时间。处理条件为:压力 7MPa,温度 37℃,处理时间 5~30min,重复 3 次。

1.2.3 指标测定

1.2.3.1 菌落总数测定 采用平板记数法测定。分别取未处理和经 DPCD 处理的菌液,摇匀后采用 10 倍稀释法逐级稀释菌。根据细菌数量选择合适的稀释度

进行逐级稀释,吸取连续 3 个不同稀释度的稀释样 1.0ml 于无菌培养皿中,每梯度 3 个重复。倒入 50℃ 左右的琼脂培养基,摇匀并于 37℃ 条件下培养 48h 后,进行菌落计数并计算存活率。

$$\text{存活率}(\%) = (\text{DPCD 处理后 } E. coli \text{ 数} / \text{处理前 } E. coli \text{ 数}) \times 100\%$$

1.2.3.2 蛋白质分析 将 *E. coli* 菌悬液在 5000g 条件下离心 10min,参照 Bradford 的方法^[18],取 0.01ml 上清液加入 5ml 考马斯亮蓝 G-250 显色液(含 0.01% 考马斯亮蓝 G-250、4.7% 乙醇及 8.5% 磷酸),振荡混匀,5min 后测其在 595nm 处的吸光值,重复 3 次。

1.2.3.3 核酸物质分析 吸取 1.2.3.2 中离心所得上清液 1ml,加入 3ml 蒸馏水,在 260nm 处测量其吸光值,每个样品重复 3 次。

1.2.3.4 MDA 测定 采用 MDA 试剂盒进行测定。取 1.2.3.2 中离心所得上清液 0.1ml,测定 532nm 处吸光值,计算 MDA 含量,每个样品重复 3 次。MDA 含量计算公式为:

$$\text{MDA 含量}(\text{nmol/mgprot}) = (\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}) \times \text{标准品浓度}(10\text{nmol/ml})$$

1.2.3.5 Mg²⁺、K⁺ 离子分析 原子吸收光谱法测定。配置不同梯度浓度 Mg²⁺、K⁺ 离子标准溶液(Mg²⁺ 标准液稀释为 0、1、2、3 和 5mg/L;K⁺ 离子标准液稀释为 0、10、20、30 和 50mg/L),以吸光值为纵坐标,浓度为横坐标,绘制 Mg²⁺、K⁺ 离子标准曲线,得到 Mg²⁺、K⁺ 离子标准方程分别为 $y_K = 0.3547X + 0.0177$ ($r = 0.9943$)、 $y_{Mg} = 0.1154X + 0.0099$ ($r = 0.9961$)。吸取上清液 3ml,用火焰原子化法测定 Mg²⁺、K⁺ 离子吸光度,并依据绘制的标准曲线计算 Mg²⁺、K⁺ 离子浓度,重复 3 次。

1.3 TEM 观察

用载网沾取少量菌液,用双蒸水冲洗 3 次;用醋酸双氧铀对铺展在载网上的样品进行染色 3 次,每次 3min;吸去染料,样品干燥后,在透射电镜下观察。

1.4 统计分析

试验数据采用 DPS v7.55 软件进行统计处理。

2 结果与分析

2.1 DPCD 处理对 *E. coli* 的杀菌效果

DPCD 处理 *E. coli* 的失活动力学曲线如图 1 所示。从图中可以看出,在 7MPa 的压力下,DPCD 处理的前 10min 内,*E. coli* 的存活率呈直线下降趋势,当处

理 10min 时, *E. coli* 失活达 99% 以上, 10min 后 *E. coli* 的存活率下降平缓, 与 Hong 等的研究结论基本一致^[19]。

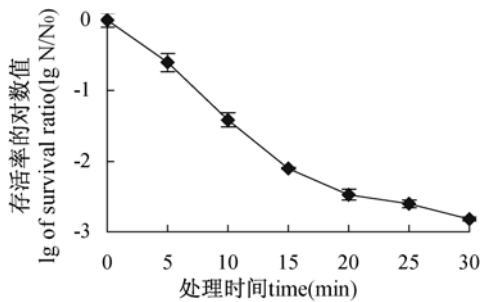


图 1 DPCD 处理时间对杀菌作用的影响

Fig. 1 Effect of DPCD treating time on inactivation of *E. coli*

2.2 DPCD 处理对 *E. coli* 胞内蛋白质泄漏的影响

细胞内物质的泄漏是细胞膜破损的重要指标之一, 蛋白质是细胞内的主要物质, 了解 DPCD 处理后 *E. coli* 胞内蛋白质泄漏情况, 可以间接反映细胞膜的破损程度。 *E. coli* 经 DPCD 处理不同时间后, 胞内蛋白质的泄漏情况如图 2 所示。从图 2 可以看出, 经 DPCD 处理 5min 后蛋白质基本没有泄漏, 可能由于处理时间较短, DPCD 还未对细胞膜的渗透性造成很大影响。 DPCD 处理 5~15min 时细胞内蛋白质明显泄漏, 原因可能是由于细胞膜受到破坏, 通透性发生改变, 造成蛋白质从细胞内渗透出。 15min 后, 细胞内蛋白质的泄漏趋于平缓, 表明 15min 时细胞膜可能已遭到最大程度的破坏, 而后再延长处理时间对细胞膜的通透性基本没有影响, 从而造成细胞内蛋白质泄漏增加缓慢。此结果与 DPCD 处理 *E. coli* 的失活动力学曲线相一致。 Bertoloni 等研究也发现 DPCD 处理 *E. coli* 后, 细胞内的酶发生了严重泄漏^[20], 与本试验结果基本一致。

2.3 DPCD 处理对 *E. coli* 胞内核酸泄漏的影响

核酸及其衍生物是细胞的重要生命物质, 正常细胞的核酸物质不会泄漏到细胞外, 因此, 监测细胞外核酸物质含量, 可以间接反应细胞膜的受损程度。由于核酸在 260nm 处有最大吸收峰^[22], 为此本试验对 DPCD 处理后, *E. coli* 上清液在 260nm 处的吸收峰进行了检测, 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, DPCD 处理的前 10min 内, 随着处理时间的增加, 菌悬液中的核酸物质迅速增加, 而处理 10min 后核酸的泄漏开始趋于平缓, 这与蛋白质的泄漏情况基本一致。从 2.1 的试验结果可知, 在前 10min 内, 已有 99% 以上的细胞死亡, 因此, *E. coli* 在 DPCD 下死亡的原因可能在

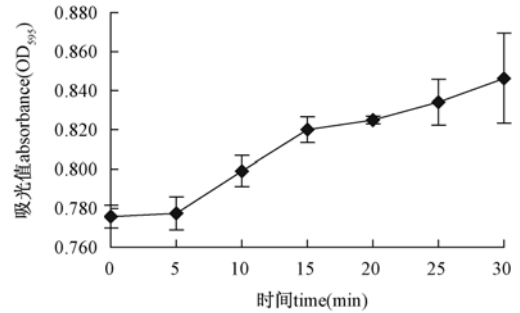


图 2 DPCD 处理时间对 *E. coli* 胞内蛋白质泄漏的影响

Fig. 2 Effect of DPCD treating time on proteins leaking of *E. coli*

于细胞膜受到损伤造成细胞内物质泄漏所致。 Lin 等研究表明, 在一定压力促使下, CO₂ 进入细胞积累到一定程度后会将细胞内物质移出细胞, 进而改变细胞膜的结构或生物系统的稳定性, 引起细胞死亡^[21-24], 与本试验结果基本一致。

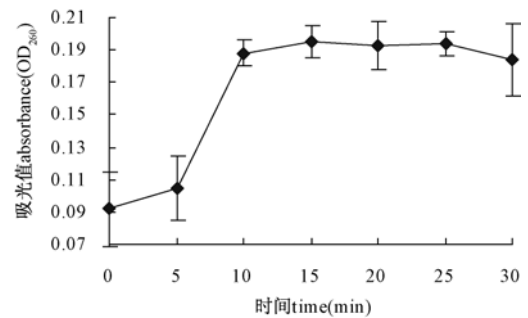
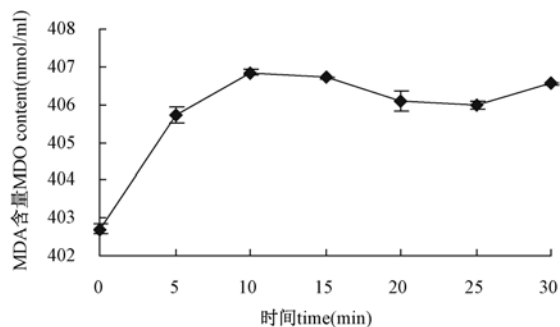


图 3 DPCD 处理时间对 *E. coli* 胞内核酸泄漏的影响

Fig. 3 Effect of DPCD treating time on nucleic acid leaking of *E. coli*

2.4 DPCD 处理对 *E. coli* 脂质过氧化程度的影响

菌体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基, 后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用, 形成脂质过氧化物, 如 MDA, 因此, 测试 MDA 的含量常常可以反映细胞内脂质过氧化的程度, 间接地反应细胞受损伤的程度, DPCD 处理后 *E. coli* 上清液中 MDA 的含量如图 4 所示。从图 4 可以看出, 在 DPCD 处理 *E. coli* 10min 内, 上清液中 MDA 含量随着处理时间的增加而增加, 10min 后则趋于平缓, 与细胞内蛋白质、核酸泄漏情况基本一致, 说明 DPCD 处理确实导致了 *E. coli* 细胞膜的损伤。 Kim 等研究表明, 45℃、10MPa DPCD 处理沙门氏菌后, 细胞膜中脂肪酸总量急剧下降, 认为可能是由于细胞膜中的多不饱和脂肪酸发生了脂质过氧化反应, 使得细胞膜受到损伤, 进而引起细胞的死亡^[25]。

图4 DPCD处理时间对 *E. coli* 脂质过氧化程度的影响Fig. 4 Effect of DPCD treating time on lipid peroxidation of *E. coli*

2.5 DPCD 处理对 *E. coli* 胞内 Mg²⁺、K⁺ 泄漏的影响

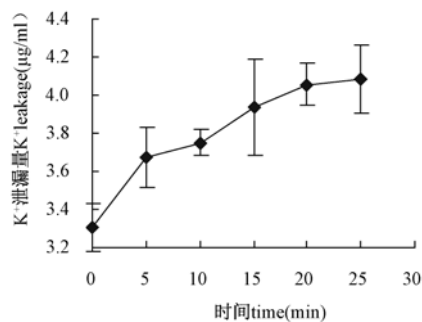
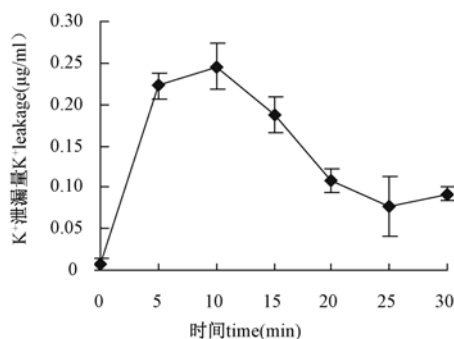
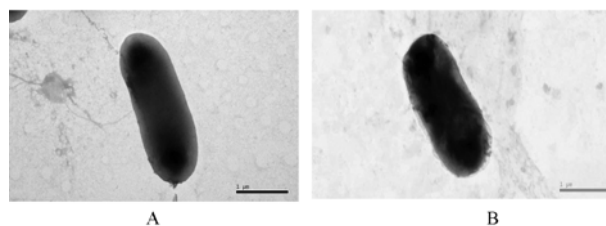
Mg²⁺、K⁺ 是维持细胞渗透压平衡的重要盐类物质,若 Mg²⁺、K⁺ 大量泄漏到细胞外,表明细胞膜受到了损伤,DPCD 处理对 *E. coli* 胞内 Mg²⁺、K⁺ 泄漏的影响如图 5、图 6 所示。可以看出,在 DPCD 处理的前 15min 内,*E. coli* 细胞内 K⁺ 离子泄漏呈上升趋势,而后趋于平缓,说明 DPCD 处理 *E. coli* 确实造成了细胞膜受损,导致细胞膜渗透性发生改变,这一现象与蛋白质的泄漏情况基本一致。从图 5、图 6 中还可以看出,在 DPCD 处理的前 10min 内, Mg²⁺ 离子的泄漏呈上升趋势,而后却呈下降趋势,直到 20min 后趋于平缓。分析其原因可能是由于 DPCD 处理之初,细胞膜受损,泄漏增加;但随着处理时间的延长,CO₂ 在菌悬液中的浓度增加,CO₃²⁻ 形成增多,与 Mg²⁺ 离子形成 MgCO₃ 沉淀,进而造成 DPCD 处理 10min 后 *E. coli* 上清液中 Mg²⁺ 离子含量降低;20min 后,CO₃²⁻ 可能沉淀掉了 *E. coli* 上清液中所有的 Mg²⁺ 离子,造成 25min 后 Mg²⁺ 离子的泄漏趋于平缓。

2.6 DPCD 处理对 *E. coli* 形态的影响

采用扫描电镜观察了 DPCD 处理对 *E. coli* 形态的影响见图 7。从图 7 可以看出,*E. coli* 经 DPCD 处理后,细胞干瘪,细胞形态和结构发生了显著变化,细胞内物质密度显著降低,与蛋白质、核酸、Mg²⁺、K⁺ 泄漏结果相一致,表明 DPCD 处理导致了细胞膜受损,造成细胞膜渗透性增加,细胞内物质从细胞内大量地泄漏到细胞外,可能是 DPCD 造成 *E. coli* 死亡的重要原因之一。

3 讨论

细胞内物质的泄漏可以作为细胞膜破损、渗透性

图5 DPCD处理时间对 *E. coli* 胞内 K⁺ 泄漏的影响Fig. 5 Effect of DPCD treating time on K⁺ leakage of *E. coli*图6 DPCD处理时间对 *E. coli* 胞内 Mg²⁺ 泄漏的影响Fig. 6 Effect of DPCD treating time on Mg²⁺ leakage of *E. coli*图7 未经 DPCD 处理的 *E. coli* 细胞(A)与经 DPCD 处理的 *E. coli* 细胞(B)的透射电镜图Fig. 7 TEM of *E. coli* treated by DPCD treatment(B) and control (A)

改变的指示指标,研究指出 DPCD 处理 *E. coli* 能引起胞内物质的泄漏,存在对细胞膜的破坏作用。

Ishikawa 等研究指出 CO₂ 在压力作用下可能进入细胞膜并深入亲脂内层,同时指出 CO₂ 对脂质双分子层的破坏作用可能是 DPCD 高密度 CO₂ 处理微生物致使其死亡的原因。其认为由于 HCO₃⁻ 可能会与细胞膜表面的磷脂和蛋白质反应,进而改变其选择渗透

性的功能^[26]。Spilimbergo 等研究指出 CO₂ 和质膜有很高的亲和力,并计算出 CO₂ 可以在很大程度上溶解于细胞膜上的磷脂^[27]。由于 DPCD 的作用使得脂链顺序改变,进而改变细胞膜的结构和功能,增加了细胞膜的流动性和渗透性^[28~30]。同时,有可能是由于细胞膜的损害和在压力作用下 CO₂ 的渗透导致内部 pH 值的降低共同导致细胞的死亡,还需要进一步的研究给出 DPCD 杀菌的确切机理。

4 结论

DPCD 处理使 *E. coli* 菌内部的蛋白质、核酸及 Mg²⁺、K⁺ 离子泄漏到细胞外,菌内物质密度降低,一定程度上反映了经 DPCD 处理后细胞渗透性发生改变。DPCD 处理使细胞膜发生一定程度的破损,也是细胞死亡的重要原因。

参考文献:

- [1] 乔宇,范刚,潘思轶,程薇,王少华,熊光权,廖李,陈学玲. 锦橙汁辐照和巴式灭菌处理后相关品质的分析[J]. 核农学报, 24(3): 562-568
- [2] Juneja V K, Thayer D W. Irradiation and other physically based control strategies for foodborne pathogens [J]. Microbial Food Contamination, 2000, 12: 2229-2235
- [3] Toepfl S, Mathys A, Heinz V, et al. Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing [J]. Food Reviews International, 2006, 22: 405-423
- [4] Zhang J, Davis T A, Matthews M A, et al. Sterilization using high-pressure carbon dioxide[J]. J of Supercritical Fluids, 2006, 38: 354-372
- [5] Cinquemani C, Boyle C, Bach E, et al. Inactivation of microbes using compressed carbon dioxide—An environmentally sound disinfection process for medical fabrics[J]. Journal of Supercritical Fluids, 2007, 42: 392-397
- [6] Kaliyan N, Gayathri P, Alagusundaram K, et al. Applications of carbon dioxide in food and processing industries: current status and future thrusts[J]. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2007, 6: 17-20
- [7] Garcia G L, Geeraerd A H, Spilimbergo S, et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117: 1-28
- [8] Ballestra P, Abreuda S A, Cuq J L. Inactivation of *Escherichia coli* by CO₂ under pressure[J]. J Food Sci, 1996, 61: 829-836
- [9] Hong S, Park W, Pyun Y. Non-thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* as influenced by pressure and temperature of pressurized carbon dioxide[J]. Int J Food Sci. Technol, 1999, 34: 125-130
- [10] Spilimbergo S, Bertucco A, Basso G, et al. Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO₂ treatment[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 92: 447-451
- [11] Hong S, Pyun Y. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 63: 19-28
- [12] Dillow A K, Dehghani F, Hrkach J S, et al. Bacterial inactivation by using near- and supercritical CO₂[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10344-10352
- [13] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertucco A. Inactivation of microorganisms by supercritical carbon dioxide in a semi-continuous process[J]. Italian Food and Beverage Technology, 2004, 37: 21-27
- [14] Angela W, David B, Tim W C. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123: 504-515
- [15] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertucco A. Inactivation of microorganisms by supercritical carbon dioxide in a semi-continuous process[J]. Italian Food and Beverage Technology, 2004, 37: 21-27
- [16] Angela W, David B, Tim W C. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 4: 504-515
- [17] 骆新峥,马海乐,高梦祥. 脉冲磁场杀菌机理分析[J]. 食品科技, 2004, (4): 11-13
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [19] Hong S I, Pyun Y R. Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment [J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 63: 19-28
- [20] Bertoloni G, Bertucco A, De Cian V, et al. A study on the inactivation of micro-organisms and enzymes by high pressure CO₂ [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 95: 155-160
- [21] Lin H M, Yang Z Y, Chen L F. An improved method for disruption of microbial cells with pressurized carbon dioxide[J]. Biotechnology Progress, 1992, 8: 165-166
- [22] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 2002
- [23] Lin H M, Yang Z Y, Chen L F. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by supercritical and subcritical carbon dioxide [J]. Biotechnology Progress, 1992, 8: 458-461
- [24] Lin H M, Yang Z Y, Chen L F. Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure [J]. Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal, 1993, 52: 29-34
- [25] Kim S R, Kim H T, Park H J, et al. Fatty acid profiling and proteomic analysis of *Salmonella enterica serotype typhimurium* inactivated with supercritical carbon dioxide [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 6: 1-6
- [26] Ishikawa H, Shimoda M, Shiratsuchi H, Osajima Y. Sterilization of microorganisms by the supercritical carbon dioxide micro-bubble method [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1995, 59: 1949-1950

