

微波杀菌过程中大肠杆菌与金黄色葡萄球菌 细胞膜通透性的改变

陈 卫^{1,2} 杭 锋² 赵建新² 田丰伟² 张 灏^{1,2}

(江南大学¹食品学院²食品科学与安全教育部重点实验室 无锡 214122)

摘 要 对细胞膜通透性变化的研究是认识微波杀菌机理的途径之一。用荧光探针检测微波处理后细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化,可以精确地表征细胞膜通透性的改变。选用二乙酸荧光素(FDA)和 Fluo-3/AM 两种荧光染料,对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)经微波处理后的酯酶活性及细胞膜通透性进行研究,结果表明大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的胞内非特异性酯酶(NSE)活性及细胞膜通透性的变化情形有所不同。在 50℃、55℃、60℃和 65℃微波处理条件下,大肠杆菌细胞膜通透性分别增加了 20.7%、28.1%、74.8%、89.8%,而金黄色葡萄球菌的增加不显著,分别比对照组提高了 4.1%、6.0%、21.9%和 19.7%。细胞膜通透性的改变与微生物致死率有一定的相关性,也可能是微波杀菌非热效应的表现之一。

关键词: 大肠杆菌,金黄色葡萄球菌,微波杀菌,细胞膜通透性,荧光探针

中图分类号: Q932 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0697-05

近年来,微波技术作为一种新型的加热技术,广泛用于食品的解冻、干燥、焙烤、灭酶以及杀菌等^[1,2],尤其是利用微波对食品进行杀菌具有更大的优势^[3,4]。与基于缓慢热传递的传统杀菌相比,微波加热可以在更短的时间内达到所需的处理温度,这一点对固体和半固体食品而言更为显著。因此,微波加热可以实现高温短时杀菌而对食品中的热敏性物质破坏降低^[5]。

有关微波加热对不同食品中微生物进行减菌化处理的研究报道已较多,其中包括:植物食品^[6,7],肉制品^[8,9],乳制品^[10,11],多组分食品^[12]等。所有这些研究得到一个相同的结论:微波辐照可以降低食品中微生物的数量从而延长食品的保质期。目前,已经报道能够为微波杀灭的细菌包括大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、腊状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、腐败假单胞菌(*Pseudomonas putrefaciens*)等。

尽管关于微波杀菌的研究很多,但是微波辐照杀菌的机理还不是很清楚,关于微波杀菌的热效

应^[13,14]之外是否存在非热效应^[15,16]一直存在争议。本文试图从细胞膜通透性改变的角度来认识微波杀菌的一些机理,如果微波辐照能引起细胞膜的损伤,势必引起细胞内的一些物质如蛋白质、核酸等外泄,同时胞外的物质(如 Ca^{2+})等也可能进入胞内。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: *E. coli* AS 1.72,光明乳业股份有限公司技术中心提供; *S. aureus* AS 1.543,光明乳业股份有限公司技术中心提供。

1.1.2 培养基: ①营养肉汤培养基:每升水含蛋白胨 10g,牛肉膏 3g,氯化钠 5g, pH7.2~7.4; ②营养琼脂培养基:每升水含蛋白胨 10g,牛肉膏 3g,氯化钠 5g,琼脂粉 15g, pH7.2~7.4^[17]。

1.1.3 主要试剂和仪器: Fluo-3/AM 荧光探针(美国 Biotium 公司);二乙酸荧光素(Sigma 公司);F96C 荧光分光光度计(上海棱光有限公司);恒温水浴锅(德国 JulaboTW20);超速冷冻离心机(德国 Hettich 公司);MWS-8 微波工作站(加拿大 Fiso 公司)。

1.2 培养条件

挑取斜面保藏的菌种转接至营养肉汤液体培养基中,37℃培养 6h,按 1%接种量接种三角瓶中,大

肠杆菌 37℃ 培养 12h,金黄色葡萄球菌 37℃ 培养 16h。

1.3 菌悬液的微波处理

离心收集(5000 × g, 10min)培养好的菌液得到菌体,重新悬浮于 pH7.0、浓度 8.5g/L 的生理盐水中,加热至所需温度。

1.4 活菌计数

使用营养肉汤固体培养基采用浇注平板法,37℃ 培养 48h,计数。

菌体的致死率 = [(空白样品活菌数 - 微波处理样品活菌数) / 空白样品活菌数] × 100%

1.5 胞内非特异性酯酶活性变化的测定

二乙酸荧光素(3,6-二乙酰荧光素)是荧光素与 2 个醋酸根共轭形成的一种不带电荷的脂质分子,通过简单扩散透过细胞膜胞内^[18]。进入细胞后可被细胞内的非特异性酯酶水解,释放出能发黄绿色荧光的荧光素分子(最佳激发波长 490nm,发射波长 515nm)。

1.6 荧光探针 Fluo-3/AM 的负载和荧光分析

用 2450MHz,900W 微波处理大肠杆菌、金黄色葡萄球菌菌液,使其温度分别达到 50℃、55℃、60℃ 和 65℃。取 1mL 微波处理后的菌液(1 × 10⁹ cfu/mL)离心(10min),获得菌体;用 1mL 无菌生理盐水洗涤一次,加 1mmol/L Fluo-3/AM 储备液至终浓度为 3μmol/L,37℃ 避光下孵育 30min^[19],离心(10000 × g, 5min)去上清,用生理盐水清洗 1 次后重悬于 3mL 生理盐水。405nm 为激发波长,380 ~ 430nm 进行扫描,408nm 有一吸收高峰,用此波长作为观测波长监测细胞内钙的变化。

1.7 细胞膜通透性变化率的计算

按照下面公式计算。细胞膜通透性变化率 = [(样品的荧光强度 - 空白的荧光强度) / 空白的荧光强度] × 100%

2 结果

2.1 菌悬液的微波处理

为了确定 150mL 菌悬液在 900W 微波加热条件下,菌液温度随时间的变化关系,分别测定了其经 900W 微波加热 20s、40s、60s、80s、100s 后的温度,通过回归分析,结果显示(图 1)。微波加热的升温曲线呈线性。以时间为横坐标,温度为纵坐标,通过线性拟合得到回归方程为 $y = 0.92236x$, $R^2 = 0.99643$ 。由此可以在后续实验中方便地计算出菌液由初始温度上升至目的温度所需要的时间。

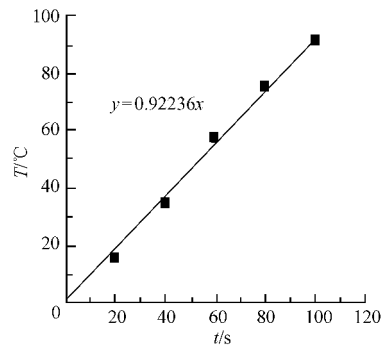


图 1 150mL 菌悬液在 900W 连续微波场中温度变化曲线
Fig. 1 The standard curve of temperature-time of 150mL bacterial suspension in the continuous microwave field under 900W power.

2.2 微波处理后胞内非特异性酯酶活性变化

Fluo-3/AM 为一新型的高度特异性钙离子荧光指示剂。首先,需要进入细胞后经非特异性酯酶脱去 AM 酯,成为脂溶 Fluo-3 留在细胞内;Fluo-3 与细胞内游离钙结合后,其荧光强度是本身的 40 倍以上,当用 405nm 波长激发时,荧光强度与游离钙离子浓度成正比。为了确定胞内非特异性酯酶活性变

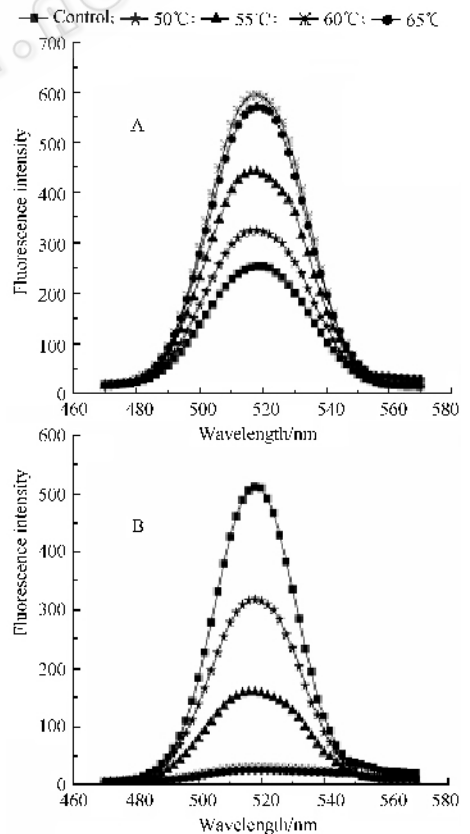


图 2 900W 微波处理后 *E. coli* (A) 与 *S. aureus* (B) 胞内非特异性酯酶活性变化

Fig. 2 The activity changes of intracellular non-specific esterase in *E. coli* (A) and *S. aureus* (B) after 900 W microwave treatment. The proper detecting condition of the fluorescence spectrum were A: sensitivity × 3, magnification × 2; B: sensitivity × 2, magnification × 2.

化 利用二乙酸荧光素 (FDA) 测定其活性的变化。

由图 2 可知,金黄色葡萄球菌胞内非特异性酯酶的活性显著高于大肠杆菌胞内非特异性酯酶的活性。经微波处理后大肠杆菌胞内非特异性酯酶的活性均高于对照组,在 50℃、55℃、60℃、65℃ 条件下分别比对照组高出 28.3%、74.7%、135.2%、125.6%,非特异性酯酶的活性与温度的升高呈正相关,且在 60℃ 时达到最大值;而金黄色葡萄球菌胞内非特异性酯酶的特性与大肠杆菌胞内非特异性酯酶的特性截然相反,其随着微波处理温度的升高活性逐渐下降且均低于对照组,在 50℃、55℃、60℃、65℃ 条件下分别比对照组下降了 37.8%、68.8%、94.0%、94.9%。

2.3 细胞膜通透性的变化

将微波处理后的大肠杆菌与金黄色葡萄球菌经 Fluo-3/AM 负载、孵育后,分别测定其荧光强度。由图 3 可见,大肠杆菌胞内 Fluo-3 荧光强度随温度的增加而明显升高,50℃ 时增加了 20.7%,55℃ 增加 28.1%,60℃ 增加 74.8%,65℃ 增加 89.8%,说明细

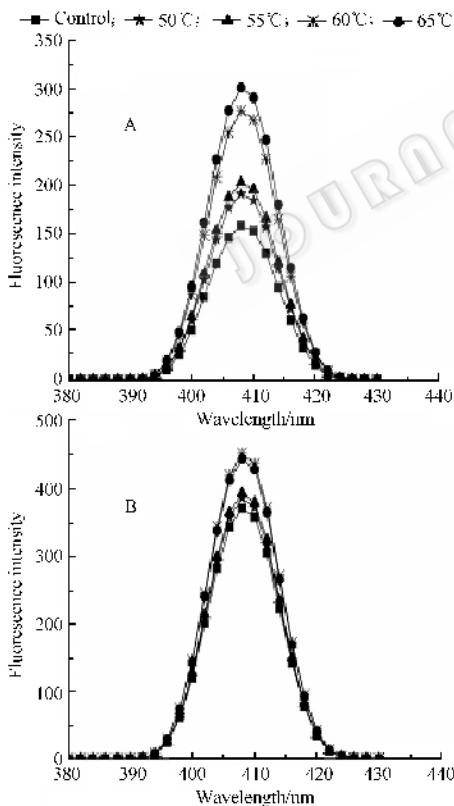


图 3 Fluo-3/AM 测定 *E. coli* (A) 和 *S. aureus* (B) 微波处理后胞内荧光强度

Fig.3 The fluorescent intensity of *E. coli* (A) and *S. aureus* (B) determined by Fluo-3/AM after microwave treatment. The proper detecting condition of the fluorescence spectrum were A: sensitivity $\times 1$, magnification $\times 1$; B: sensitivity $\times 1$, magnification $\times 1$.

胞内钙离子浓度增加,细胞膜通透性发生明显变化;而金黄色葡萄球菌胞内 Fluo-3 荧光强度随温度增加变化不显著,但均比对照组略高,分别为 4.1%、6.0%、21.9% 和 19.7%,说明非特异性酯酶的酶活水平能将 Fluo-3/AM 水解并与内流的 Ca^{2+} 结合,细胞膜也存在一定的通透性变化。

2.4 细胞膜通透性与细胞致死率的关系

为了研究细胞膜通透性与致死率的关系,分别对不同微波处理条件下的残存菌数进行计数。由图 4 可见,随着温度的升高,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的细胞膜通透性与致死率有一定的相关性,细胞膜通透性的改变也是微波致死的因素之一。

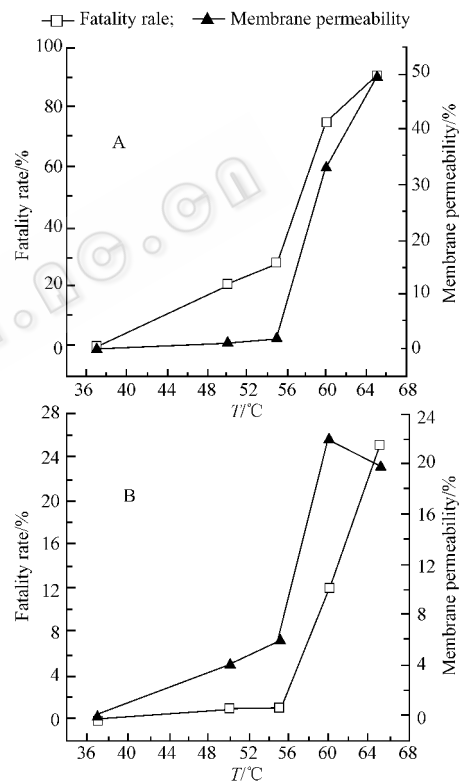


图 4 *E. coli* (A) 与 *S. aureus* (B) 细胞膜通透性与细胞致死率关系

Fig.4 The relationship between the cell membrane permeability and fatality rate of *E. coli* (A) and *S. aureus* (B)

3 讨论

微波对微生物细胞膜通透性影响的研究,目前尚处于利用电镜和紫外分光光度法测定胞内蛋白质及核酸泄漏含量的水平。Woo 等^[13]用扫描电子显微镜和蛋白质、核酸测定研究微波处理对细胞膜通透性的变化,通过观察经微波处理后 *E. coli* 和 *B. subtilis* 发现,未用微波处理的 *E. coli* 细胞表面光滑,经过微波处理的 *E. coli* 细胞表面粗糙并且肿

胀对于 *B. subtilis* ,不管微波处理与否均未发现细胞表面结构损伤;用 Bradford 法测定上清液蛋白质含量以及在 260nm 和 280nm 处分别测定菌体上清液的紫外吸收,发现微波处理后的菌体悬浮液的 OD_{260} 和 OD_{280} 均增加。由此推断微波辐射可引起细胞膜通透性的改变。

电镜观察可以直观地反映细胞的形态但不能精确地显示细胞膜通透性的变化,而紫外分光光度法由于胞内蛋白及核酸泄漏量很低,影响测定结果的准确性,并且微波处理可能导致蛋白质、核酸的部分变性引起紫外生色团的暴露,从而引起紫外吸收增强,因此此方法的精确性和灵敏度都不理想。荧光光谱法具有灵敏度高、选择性强、用样量少、方法简便等优点,通过荧光探针检测微波处理后细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化,可以精确地表征细胞膜通透性的变化。对于活细胞而言, Ca^{2+} 作为第二信使,其运动受到了严格的调控,细胞膜内的 Ca^{2+} 浓度小于膜外的浓度(两者的分布比例大约为 1/10000)^[20]。细胞膜受损表现为通透性增加、 Ca^{2+} 内流等。Fluo-3/AM 作为 Ca^{2+} 检测探针,不带电荷,易浸入细胞,一旦进入细胞后经非特异性酯酶脱去 AM 酯,成为脂溶性 Fluo-3 留在细胞内,与细胞内游离钙结合后其荧光强度显著增强。

大肠杆菌细胞内荧光强度随处理温度升高呈增加趋势,由于水解 Fluo-3/AM 的非特异性酯酶活性没有因微波处理而降低(图 2-A),因此可以推测大肠杆菌经微波处理可促进钙离子通道的打开^[21],从而导致 Ca^{2+} 内流,而金黄色葡萄球菌尽管酯酶活性随微波处理温度升高而降低,但综合比较图 2 和图 3 可以发现,此时胞内酯酶仍可以将 Fluo-3/AM 水解并与内流的 Ca^{2+} 结合,使得胞内荧光强度增加。特别是 55℃、60℃ 和 65℃ 3 个实验点,酯酶活性明显降低,而荧光强度均比对照组高,可以推测细胞膜通透性也有所提高。

比较大肠杆菌与金黄色葡萄球菌发现,在相同温度条件下,微波处理对大肠杆菌(G^-)损伤程度显著高于金黄色葡萄球菌(G^+),说明微波对两者具有不同的效果。这可能与其细胞壁结构成分有关,大肠杆菌为革兰氏阴性菌,细胞壁上蛋白质组成较多,在微波场中高温易使其变性脱落,促进钙离子通道的打开,使通透性增加。

通过本实验发现微波处理可使微生物细胞膜通透性发生变化,且不同微生物通透性的改变有差异,革兰氏阴性的大肠杆菌要高于革兰氏阳性的金黄色

葡萄球菌。细胞膜通透性的改变也可能是微波杀菌对微生物致死的非热效应因素之一。

参 考 文 献

- [1] Ayoub JA, Berkowitz D, Kenyon EM, et al. Continuous microwave sterilization of meat in flexible pouches. *J Food Sci*, 1974, **39**: 309 - 313.
- [2] Chipley JR. Effects of Microwave irradiation on microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 1980, **26**: 129 - 145.
- [3] Sieber R, Eberhard P, Gallmann PU. Heat treatment of milk in domestic microwave ovens. *Int Dairy J*, 1996, **6**: 231 - 246.
- [4] Heddleson RA, Doores S. Factors affecting microwave heating of foods and microwave induced destruction of foodborne pathogens-a review. *J Food Prot*, 1994, **57**: 1025 - 1037.
- [5] Clare DA, Bang WS, Cartwright G, et al. Comparison of sensory, microbiological, and biochemical parameters of microwave versus indirect UHT fluid skim milk during storage. *J Dairy Sci*, 2005, **88** (12): 4172 - 4182.
- [6] Nikkel S, Chen CS, Parish ME, et al. Pasteurization of citrus juice with microwave energy in a continuous-flow unit. *J Agric Food Chem*, 1993, **41**: 2116 - 2119.
- [7] Tajchakavit S, Ramaswamy HS, Fustier P. Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Res Int*, 1998, **31**(10): 713 - 722.
- [8] Paterson JL, Cranston PM, Loh WH. Extending the storage life of chilled beef: Microwave processing. *J Microw power Electromagn Energy*, 1995, **30**(2): 97 - 101.
- [9] Fruin JT, Guthertz LS. Survival of bacteria in food cooked by microwave oven, conventional oven and slow cookers. *J Food Prot*, 1982, **45**: 695 - 698.
- [10] Thompson JS, Thompson A. In-home pasteurization of raw goat's milk by microwave treatment. *Int J Food Microbiol*, 1990, **10**: 59 - 64.
- [11] Knutson KM, Marth EH, Wagner MK. Use of microwave ovens to pasteurize milk. *J Food Prot*, 1988, **51**: 715 - 719.
- [12] Hollywood NW, Varabioff Y, Mitchell GE, et al. Effect of microwave heating on microbial flora of frozen convenience foods. *Food Austr*, 1991, **43**(4): 160 - 163.
- [13] Woo IS, Rhee IK, Park HD. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(5): 2243 - 2247.
- [14] Hong SM, Park JK, Lee YO. Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids. *Water Res*, 2004, **38**: 1615 - 1625.
- [15] Phelan AM, Neubauer CF, Timm R, et al. Athermal alterations in the structure of the canalicular membrane and ATPase activity induced by thermal levels of microwave radiation. *Radiat Res*, 1994, **137**(1): 52 - 58.
- [16] Zhao YL, Song JP, Yang YH, et al. Effects of microwave irradiation on ATPase activity and voltage dependent ion channel of rat hippocampus cell membrane. *Space Med Med Eng*, 2003, **16**

- [17] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京:高等教育出版社,1999.
- [18] Chrzanowski TH, Crotty RD, Hubbard JG, *et al.* Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microb Ecol*, 1984, **10**: 179 – 185.
- [19] 张均田,李锡明,石成璋,等. 用 Fura/AM 测定细胞内游离钙浓度的方法. 中国药学杂志,1991, **26**(11): 655 – 658.
- [20] Bruce A, Dennis B, Alexander J, 等著. 基础细胞生物学 – 细胞分子生物学入门. 赵寿元,金承志,丁小燕,等译. 第13版. 上海:科学出版社,2002.
- [21] Geletyuk VI, Kazachenko VN, Chemeris NK, *et al.* Dual effects of microwaves on single Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured kidney cells Vero. *FEBS Letters*, 1995, **359**: 85 – 88.

Alterations of membrane permeability in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* under microwave

CHEN Wei^{1,2*}, HANG Feng², ZHAO Jian-xin², TIAN Feng-wei², ZHANG Hao^{1,2}

(¹ School of Food Science & Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

(² Key Laboratory of Food Science & Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

Abstract :Alteration of cell membrane permeability is speculated to be one of the mechanisms by which microwave kills microorganisms. It has been reported that permeability alteration may be reflected by cell shape changes observed under electron microscopy, or detected by measuring the leakage of intracellular protein and DNA using spectrophotometry. These methods, however, suffer from accuracy and sensitivity. Calcium is an important cell signaling molecule. Its level is tightly regulated with an intracellular to extracellular differential of approximately 1 to 10,000. Damage of cells will lead to alterations in membrane permeability and consequently influx of extracellular Ca^{2+} . In the present study two probes, fluorescein diacetate (FDA) and fluo-3/AM, were used to quantify membrane permeability of *E. coli* and *S. aureus* after microwave treatment. These chemical probes, after metabolized by intracellular esterases and binding to Ca^{2+} , emit strong fluorescence. Our data showed 20.7%, 28.1%, 74.8% and 89.8% increases in cell membrane permeability of *E. coli* after 50, 55, 60 and 65°C microwave treatment, respectively, compared to untreated controls. Modest membrane permeability increases of 4.1%, 6.0%, 21.9% and 19.7% were seen for *S. aureus*. The permeability levels correlate with the fatality rates of microbes. These results suggest that alteration in cell membrane permeability contributes, in part, to the nonthermal-effect of cell killing by microwave.

Keywords : *E. coli* ; *S. aureus* ; microwave inactivation ; membrane permeability ; fluorescent probe

Foundation item : National Natural Science Foundation of China(20436020)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-510-85912155 ; E-mail : weichen@sytu.edu.cn

Received : 27 November 2006 / Accepted : 4 April 2007 / Revised : 4 March 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>