

# 冷冻干燥对乳酸菌细胞膜通透性的影响

王 飏<sup>1</sup> 田丰伟<sup>1</sup> 励建荣<sup>2</sup> 陈 卫<sup>1\*</sup> 张 灏<sup>1</sup>

(1. 江南大学 食品学院 食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 浙江工商大学 食品生物与环境工程学院 浙江 杭州 310018)

**摘 要:** 对细胞膜通透性变化的研究是认识冷冻干燥过程对乳酸菌损伤机理的途径之一。用荧光探针检测冻干过程前后细胞内 $H^+$ 和 $Ca^{2+}$ 浓度的变化,可以精确的表征细胞膜通透性的改变。利用荧光探针BCECF-AM和Fluo3-AM对德氏乳杆菌保加利亚亚种在冻干前后的细胞膜通透性进行研究,并对比菌种在冻干过程中的活力损失,发现细胞膜在冻干前后通透性有显著增加,并与活力的损失成反相关关系。说明在冻干过程中细胞受到了生理性损伤,细胞膜通透性的改变可能是导致乳酸菌在冻干过程中致死和失活的原因之一。

**关键词:** 乳酸菌, 冷冻干燥, 荧光探针

## Impact of Membrane Permeability in Lactic Acid Bacteria During Freeze-drying

WANG Biao<sup>1</sup> TIAN Feng-Wei<sup>1</sup> LI Jian-Rong<sup>2</sup> CHEN Wei<sup>1\*</sup> ZHANG Hao<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. College of Food Science, Biotechnology and Environmental Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

**Abstract:** Alteration of cell membrane permeability is speculated to be one of the damage mechanisms to Lactic Acid Bacteria during freeze-drying. It has been reported that the  $H^+$  and  $Ca^{2+}$  alteration may be accurately detected by using fluorescent probe. The *Lactobacillus bulgaricus* permeability is studied by using fluorescent probe BCECF-AM and Fluo3-AM. The membrane permeability has a significant increase which is anti-related to the loss of vitality. These results suggest that alteration in cell membrane permeability contributes to the physical damage, it may be one of the reasons that lead to the cell death and loss of activity.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Freeze-drying, Fluorescent probe

冷冻干燥是一种将样品在低温下冷冻,然后在减压条件下利用升华去除水分从而使样品处于干燥状态的单元操作<sup>[1]</sup>。在生物制造和加工中,冷冻干燥广泛应用在工业微生物菌种和生物活性物质的高效

制备上。与其他干燥方式相比,冷冻干燥是乳酸菌发酵剂生产的有效方法。以乳酸菌主导的食品生物制造与加工过程要求乳酸菌能够保持较高的细胞存活数量和较高的细胞活力,以充分发挥乳酸菌的功

能性质。

目前我国国内关于乳酸菌冷冻干燥的研究主要集中在遴选有效的冷冻干燥保护剂、保护剂作用机制以及预冻及冻干条件对乳酸菌存活率的影响上,涉及到细胞生理水平上的乳酸菌冷冻干燥理论研究则相对较少。细胞膜是整个细胞保持正常生理条件的基础,也是维持细胞完整性及保持正常物质能量代谢的基础。细胞正常代谢所需的一些关键酶、胞内外离子交换所需的离子梯度、pH梯度等,都必须依靠一个完整的细胞膜结构<sup>[1,2]</sup>。因此,研究细胞膜在冻干前后的完整性和通透性的变化,对了解冷冻干燥对细胞损伤的机理,以及保护剂的保护机理等非常关键<sup>[2]</sup>。本研究中主要利用荧光探针法检测了冻干前后细胞膜对氢离子、钙离子的通透性变化,并对比菌体细胞在冻干前后的活力,探讨细胞膜通透性变化对菌体细胞活力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 为本实验室保藏菌种; BCECF-AM 即 2',7'-bis(2-carboxylethyl)-5(6)-carboxy-fluorescein acetoxymethyl ester, Fluo3-AM, 购于日本同仁化学。

隔水式电热恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂; 荧光分光光度计, 日立 650-60; 冷冻离心机, 德国 Hettich 公司; 冷冻干燥机, 77530-30LABCONCO6L, 美国照生有限公司; 其余是实验室常规仪器。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 培养基:** (1)MRS液体(固体)培养基<sup>[3]</sup>; (2)脱脂乳培养基<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 冷冻干燥制备菌粉:** 菌种经活化和传代后, 对数后期取菌, 离心获得浓缩菌体后添加海藻糖作保护剂<sup>[4]</sup>, 以不加保护剂的菌体作对照, 预冻后冷冻干燥 40 h, 制得实验所需菌粉。

**1.2.3 荧光探针BCECF-AM测定细胞内pH:** (1)荧光探针 BCECF-AM 负载。将 1 mmol/L 的 BCECF-AM/DMSO 溶液加入到复水后的细胞悬液中, 加入量为细胞悬液体积的 1/300, 终浓度为 3  $\mu$ mol/L, 37°C 培养 30 min, 离心(10000 g, 5 min)去上清, 用生理盐水洗涤 1 次后, 重悬于 3 mL 生理盐水中<sup>[5]</sup>。

(2)细胞内 pH 荧光检测。将负载好的溶液置于

荧光分光光度计上用双波长比例法检测<sup>[5]</sup>, 激发波长是 490 nm 和 440 nm, 发射波长是 530 nm, FIR=490 nm/440 nm。

**1.2.4 荧光探针Fluo3-AM检测细胞内Ca<sup>2+</sup>:** (1)荧光探针 Fluo3-AM 负载。将 1 mmol/L 的 Fluo3-AM 加入到复水后的菌液中, Fluo3-AM 的终浓度为 3 mmol/L, 避光条件下, 37°C 孵育 30 min, 然后离心(10000 g, 5 min)去上清, 用生理盐水洗涤 1 次后, 重悬于 3 mL 生理盐水中<sup>[6]</sup>。

(2)胞内Ca<sup>2+</sup>的测量。将负载好的样品置于荧光分光光度计内, 以 490 nm 为激发波长, 观察 528 nm 处的荧光强度。

**1.2.5 发酵剂活力的测定:** 发酵剂活力可以用乳酸菌在单位时间内产酸的多少来评定, 即酸度测定法。在灭菌后的脱脂乳中加入 3% 的发酵剂, 并在 37°C~38°C 的培养箱内培养 3.5 h, 然后用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液测定其酸度。计算公式如下:

$$\text{活力} = \frac{c \times v_1 \times 0.09}{\rho v_2} \times 100$$

C-NaOH 浓度;  $V_1$ -所用体积;  $V_2$ -所用灭菌乳体积;  $\rho$ -脱脂乳相对密度, 一般认为, 活力在 0.7% 以上为好, 并以 0.7 表示其酸度。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光强度比值 FIR 的测定

1.0 mg 的 BCECF 完全溶于 1 mL DMSO 后, 取 1  $\mu$ L 加到 1 mL NaCl 生理溶液中, 在荧光分光光度计下扫描可知其最大激发光在 502 nm, 最大发射光在 528 nm 处<sup>[5,7]</sup>。另外, 测定 pH 一般采用双波长比例测量法测定, 440 nm 激发时其发射光强度与 pH 无关, 而 490 nm 处的高度随 pH 的升高而增加, 这两处的荧光强度的比值是(FIR)是 pH 的函数。图 1 是 BCECF 添加到不同 pH 生理溶液中的荧光扫描图, 从下至上 pH 依次为 6.0、7.0、7.5 和 8.5。

因为在 440 nm 激发时荧光值没有变化, 所以其它 pH 溶液只需扫描 490 nm 激发时的发射强度。根据计算在不同 pH 溶液在 490 nm 和 440 nm 激发时的 528 nm 处的荧光发射强度, 就可得出 FIR 与 pH 的关系图, 如图 2, 得到的各点的线性关系较好, 根据得出的 FIR-pH 关系图, 对比样品在 490 nm 的发射光强度, 就可得出所测样品的 pH 值。

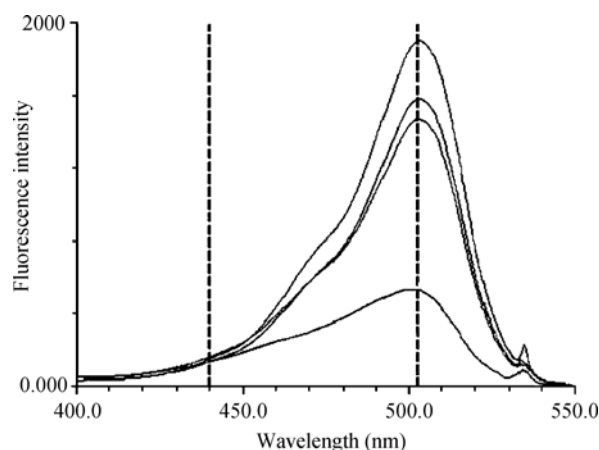


图1 BCECF 在不同 pH 生理溶液中的发射光谱

Fig. 1 The emission spectra of BCECF in different pH salt solution

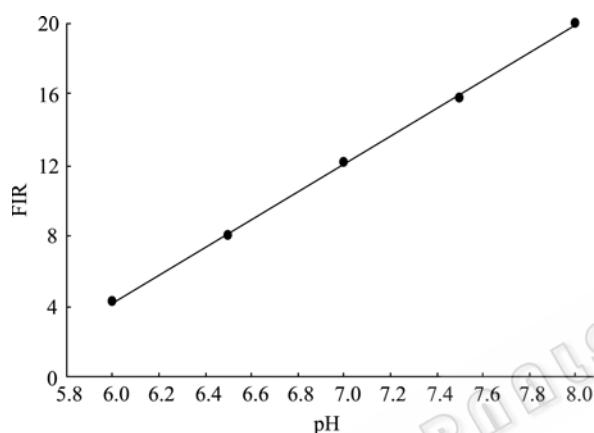


图2 FIR 与 pH 的关系图

Fig. 2 Relationship of FIR and pH

## 2.2 BCECF 测定乳酸菌细胞内的 pH

分别测量正常菌体, 添加与未添加海藻糖保护剂的冻干菌体细胞在 490 nm 处和 440 nm 处的荧光值, 计算 FIR, 分别与 FIR-pH 曲线对比, 得出正常菌体的胞内 pH 的均值为 6.357, 冻干时未加保护剂的菌体的胞内 pH 是 6.152, 而冻干时加保护剂的则为 6.244, 如表 1 所示。正常菌体的胞外 pH 为 6.102, 与之相比, 冻干后的菌体的胞内外的 pH 梯度遭到

了破坏, 由于细胞膜的通透性发生了变化, 膜内维持细胞内外 pH 梯度的酶失活, 膜上运输离子需要的载体遭到了破坏, 致使胞外的  $H^+$  进入细胞, 胞内的 pH 降低。另外, 添加保护剂的细胞的胞内 pH 均值与正常菌体相差不大, 说明保护剂在保护细胞膜完整性上起很重要的作用, 使得维持细胞正常生命活动的胞内外 pH 梯度能够有所保留, 减少了冻干过程中活菌数和菌活力的降低。

## 2.3 细胞内 $Ca^{2+}$ 的浓度变化的测定

利用荧光探针 Fluo3-AM 分别测量正常菌体、未添加保护剂冻干菌体、添加保护剂冻干菌体以及冷冻菌体的胞内  $Ca^{2+}$ 。Fluo3-AM 是一种新型的高度特异性钙离子荧光指示剂。它进入细胞后经非特异性酯酶脱去 AM 酯, 成为脂溶性的 Fluo3 留在细胞内。Fluo3 与细胞内游离钙结合后, 在激发光的激发下, 其 528 nm 附近的荧光强度会随钙离子浓度不同而发生变化, 浓度大, 荧光强度就大, 并与钙离子浓度成正比<sup>[8]</sup>。

由图 3 可知, 冻干后的细胞内的钙离子浓度远

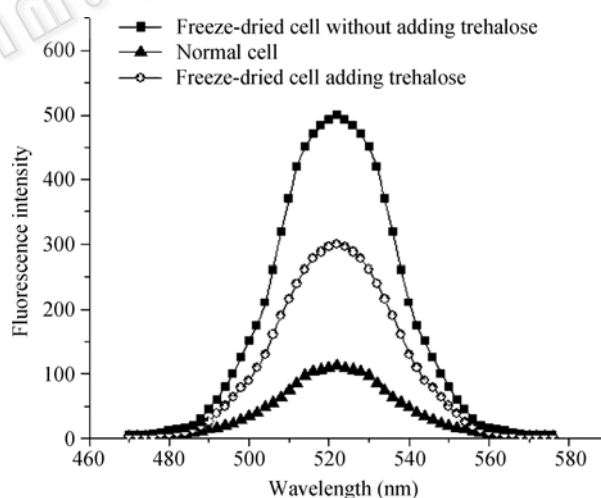


图3 常与冻干菌体的  $Ca^{2+}$  荧光扫描图

Fig. 3 The  $Ca^{2+}$  fluorescence scanning of normal and freeze-dried cells

表1 不同处理条件下乳酸菌细胞内外 pH 值  
Table 1 The  $pH_{in}$  and  $pH_{out}$  of Lactic acid bacteria in different treatment

| 处理条件<br>Treatment                  | pH 值<br>pH Value   |  |                                      |
|------------------------------------|--|--|--------------------------------------|
| 正常菌体胞内<br>$pH_{in}$ of normal cell | 冻干时不添加保护剂菌体胞内<br>$pH_{in}$ of Freeze-dried cell without adding trehalose | 冻干时加保护剂菌体胞内<br>$pH_{in}$ of Freeze-dried cell adding trehalose | 正常菌体细胞外<br>$pH_{out}$ of normal cell |
| 6.357 ± 0.017                      | 6.152 ± 0.010  | 6.244 ± 0.013  | 6.102 ± 0.011                        |

远高于正常细胞内的钙离子浓度; 正常菌体胞内钙离子浓度仅为冻干菌体的 22.4%; 添加保护剂的冻干菌体胞内的钙离子浓度相对未添加保护剂的菌体降低约 40.0%, 即在冻干过程中, 未添加保护剂的细胞的胞膜受到了更大的破坏, 通透性较加有海藻糖保护剂的细胞的胞膜增大了 67.7%; 保护剂在保护细胞膜完整性和胞内非特异性酯酶等重要酶系中起到了很重要的作用。

冻干前期需先将菌体冷冻处理, 这时细胞膜的完整性其实已经遭到破坏, 若不加保护剂, 冷冻后的菌体在冰体融化后立即测量其膜内的钙离子, 发现冷冻后细胞的通透性较正常菌体细胞有了较大的变化, 如图 4 所示。这可能因为在冰冻过程中细胞内和细胞外形成的冰晶破坏了细胞膜的完整性。另外, 冻干后, 菌体细胞的通透性进一步增大, 说明在冻干过程中, 细胞膜的完整性会遭到更大的破坏。较冷冻菌体而言, 膜的通透性增大了 12.4%。

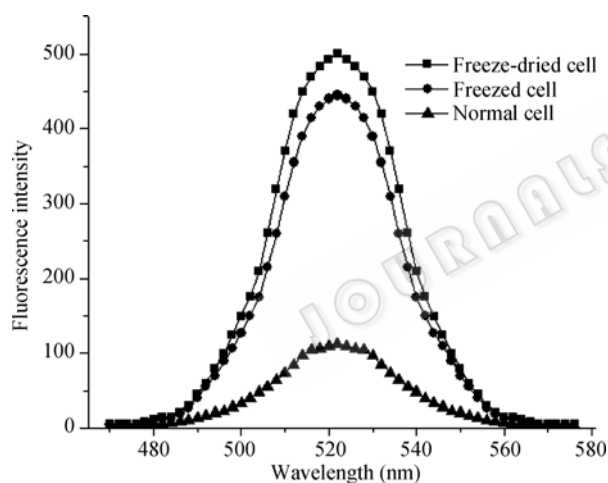


图 4 菌体在正常、冷冻及冻干条件下的 $\text{Ca}^{2+}$ 荧光扫描图  
Fig. 4 The  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence scanning of normal, freeze and freeze-dried cells

#### 2.4 冻干后乳酸菌的活力检测

根据活力检测公式, 用标定好为 0.106 mol/L 的 NaOH 溶液滴定, 测定冷冻、冻干时未添加保护剂和冻干时添加保护剂时的菌体活力。结果显示, 正常菌体的活力平均为 0.44, 冷冻菌体活力平均为 0.12, 未加保护剂冻干菌体为 0.08, 而添加保护剂的冻干菌体的活力则为 0.20。通过通透性指标和各菌体活力作对比, 发现菌体活力的降低与通透性发生变化有一定的相关性, 如图 5。菌体细胞通透性增大后,

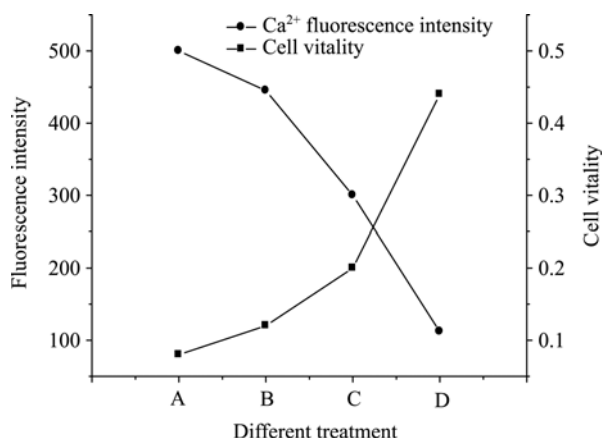


图 5 胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度与菌体活力的关系

Fig. 5 The relationship between  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in cell and cell vitality

注: A: 冻干时未添加保护剂的菌体; B: 冷冻菌体; C: 冻干时添加保护剂的菌体; D: 正常菌体。

Note: Freeze-dried cell adding trehalose; B: Frozen cell; C: Freeze-dried cell without adding trehalose; D: Normal cell.

胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增大, 而相对应的细胞活力会下降; 通过不同的处理方法(图中A、B、C和D), 能够看到冻干时添加保护剂能够有效的减少对细胞膜的损伤, 并且能够降低乳酸菌细胞活力的损失。

### 3 讨论

鉴于细胞膜在细胞生理中具有的重要作用, 本研究中主要通过特异性荧光探针法, 检测了乳酸菌细胞膜在冷冻干燥过程中完整性的变化, 测定了冻干过程中细胞膜对氢离子和钙离子的通透性变化。结果显示, 在冻干前后, 细胞内pH值有明显下降, pH梯度遭到了破坏, 细胞膜对 $\text{H}^+$ 的通透性增大, 与Castro等人<sup>[2]</sup>研究的以麦芽糊精为干燥介质的冷冻干燥乳酸菌细胞的 pH有损失相类似。另外, 在冻干过程中, 钙离子浓度也有较大程度的增加, 亦说明细胞膜完整性在冻干前后遭到了破坏, 通透性增大。正常菌体的胞内钙离子浓度仅为冻干菌体的 22.4%。在菌悬液中添加海藻糖等保护剂, 发现保护剂能够有效地降低冷冻干燥对乳酸菌细胞膜通透性的破坏, 进而保护细胞的正常生理状态。将通透性指标与冻干前后菌体的活力作对比, 发现细胞膜通透性的变化同菌体细胞活力成反相关关系, 通透性增大, 菌活力就会明显降低, 说明细胞膜完整性的破坏和通透性的变化可能是导致菌体细胞致死和菌体细胞活力下降的关键因素之一。

## 参 考 文 献

- [1] Folkert AH, Willern FW. Membrane stabilization in the Dry State. *Biochem Physiol*, 1997, **117A**(3): 335–341.
- [2] HP Castro, PM Teixeira, R Kirby. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. *Journal of Applied Microbiol*, 1997, **82**: 87–94.
- [3] 房兴利, 晋 津. 酸奶生产液体发酵剂的研究. 中国乳品工业, 2004, **32**(1): 47–50.
- [4] Danforth PM, Rebecca EA. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze-Thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. *Pharmaceutical Research*, 1998, **15**(8): 1215–1221.
- [5] David AR, Roy HP, Dennis PV. *In vivo* spectroscopic properties of fluorescent pH indicator biscarboxyethyl carboxyfluorescein. *J of photochem and photobiol*, 1995, **B29**: 17–22.
- [6] 张均田, 李锡明, 石成璋. 用 Fura/AM 测定细胞内游离钙浓度的方法. 中国药理学杂志, 1991, **26**(11): 655–658.
- [7] Hideaki Matsuoka, Yuri Kosai, Mikako Saito. Simultaneous imaging of multiple fluorescent probes in bio-cells. *Analytical sciences*, 2002, **18**: 1321–1324.
- [8] Chrzanowskith, Crotty RD, Hubbard JG. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microb Ecol*, 1984, **10**: 179–185.

## 稿件书写规范

### 高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“精品教学”版块,原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿!欢迎对本栏目多提宝贵意见!