

文章编号: 0253-2239(2010)01-0262-05

植物乳杆菌的吸收和荧光光谱研究

武浩¹ 朱拓^{1,2} 孔艳¹ 陈卫³ 张灏³ 杨建磊⁴

¹ 江南大学理学院, 江苏 无锡 214122; ² 河海大学理学院, 江苏 南京 210098
³ 江南大学食品科学与技术学院 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122
⁴ 江南大学通信与控制工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要 采用光谱分析技术对益生菌中植物乳杆菌的吸收和荧光光谱特性进行分析,并应用于益生菌的研究以及菌种鉴别。研究发现,植物乳杆菌对紫外波段的光有明显的吸收,峰值位于 215 nm,在 280 nm 附近有一个对吸收光谱产生扰动的肩峰。对植物乳杆菌的荧光光谱检测发现,该菌种吸收紫外光后发射荧光。对荧光强度和菌液浓度关系的进一步研究,揭示了峰值强度随浓度变化的规律,并根据其变化规律,进行数据拟合,给出了相应的函数表达式。

关键词 生物光学; 荧光光谱; 吸收光谱; 拟合; 植物乳杆菌

中图分类号 Q632; Q682 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/AOS20103001.0262

Study on the Absorption and Fluorescence Spectra of Lactobacillus Plantarum

Wu Hao¹ Zhu Tuo^{1,2} Kong Yan¹ Chen Wei³ Zhang Hao³ Yang Jianlei⁴

¹ School of Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

² School of Science, Hehai University, Nanjing, Jiangsu 210098, China

³ State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

⁴ School of Communication and Control Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract The absorption spectra and fluorescence spectra of lactobacillus plantarum are measured and studied by spectral analysis technique, and the results will be applied to the study and classification of probiotic bacteria. The results show that lactobacillus plantarum obviously absorbs ultraviolet rays and emits obvious fluorescence. The peak of absorption spectra is at 215 nm, and there is a shoulder peak at 280 nm which disturb the absorption spectra. The studies of the spectra show relevant information in cells about lactobacillus plantarum. The relations between fluorescence intensities and the concentrations are also studied and the change law of intensity with increasing concentration is found. The functions of data fitting based on the law are shown.

Key words biological optics; fluorescence spectra; absorption spectra; fitting; lactobacillus plantarum

1 引 言

光与生物组织的相互作用已成为当前科学研究的热点之一,在此方面诸多的研究成果且已被应用于实际,比如激光在眼科、牙科、皮肤科、胃肠病、神经外科等方面的应用^[1]。在微生物研究领域——微生物与光的相互作用,还没有被系统地研究过,光与益生菌的相互作用更是微乎其微。益生菌是否存在一种被动发光模式,是一个值得深入研究的课题,它为我们提供一种全新的研究手段,同时提供一种快

速、有效、低成本的菌种鉴别方法。国外有些学者已经就此课题开展研究^[2~8],德国的 Stephan Determann 等^[2]对海水中菌类的荧光激发、发射光谱与菌的浓度的关系作了研究报道;美国的 R. C. Chin 等^[3]对空气、水中传播的致病菌的荧光作了研究,开发出可以检测出这些菌的荧光寿命并作初步鉴别的仪器;英国的 S. Elliot 等^[4]报道了水中浮游菌类的荧光光谱的与温度的关系,从温度对荧光强度、峰值位置作了具体研究,但是在国内还没有看到

收稿日期: 2008-11-30; 收到修改稿日期: 2009-04-01

基金项目: 国家 863 计划、中国博士后科学基金和江苏省博士后科研资助计划资助课题。

作者简介: 武浩(1986—),男,硕士研究生,主要从事益生菌的荧光光谱方面的研究。E-mail: wuhao860811@126.com

导师简介: 朱拓(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事现代光学方面的研究。E-mail: tzhu@jiangnan.edu.cn

相关的报道。我们对从低到高不同浓度的植物乳杆菌溶液作了研究,发现在低浓度时实验结论和文献报道的微生物的荧光光谱一致,研究从浓度方面对植物乳杆菌的荧光光谱做了扩展,深化了对植物乳杆菌的荧光光谱的认识。本文针对植物乳杆菌的吸收和荧光光谱这一重要领域的研究,对植物乳杆菌的吸收光谱和荧光光谱进行了检测和分析。

2 实验装置和方法

2.1 实验试剂、样品及装置

实验所用生理盐水(9 g/L)由浙江巨能乐斯公司生产。植物乳杆菌菌种来源于江南大学食品科学与技术国家重点实验室。植物乳杆菌在 MRS 培养基中生长(12±1) h,在 3000 r/min,5 min 条件下离心洗涤两次。对洗涤好的菌液进行平板计数,测得的基础浓度为 $2.52 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$ 。将菌液保存在 4 ℃ 冰箱中备用^[9]。

实验仪器为日本岛津 UV-240 紫外可见分光光度计;美国 Roper Scientific 公司的 SP2558 多功能光谱测量系统,经单色仪系统选定的紫外光照射到样品池中的样品上,样品发射的荧光经单色仪系统再由 CCD 采集信号,再经计算机实时采集并处理输出实验结果。该系统中的激发单色仪光栅为 1200 刻线的闪耀光栅(闪耀波长为 300 nm),发射单色仪中的光栅为 150 刻线的闪耀光栅(闪耀波长为 500 nm)。实验中使用的 320 nm 滤光片为 SP2558 多功能光谱测量系统自带的滤光片^[10~12]。

2.2 实验方法

1) 将菌液用生理盐水稀释至澄清状态,取 3 ml 放入石英比色皿中,并以生理盐水作参比,用 UV-240 紫外可见分光光度计测得植物乳杆菌的吸收光谱。

2) 将配好的样品用石英比色皿盛放,放入样品池中。待仪器启动至稳定状态后开始实验。实验参数设置为:分光元件为 150 刻线/mm 的光栅,扫描时间为 2 s,扫描范围为 300~650 nm,激发范围为 200~310 nm,每隔 5 nm 激发一次。

3) 将菌液稀释至不同的浓度,以 290 nm 为激发波长,分别测量其荧光光谱,研究浓度与荧光强度的关系^[15~17]。

3 实验结果

3.1 吸收光谱

采用 UV-240 紫外可见分光光度计测量菌的吸

收光谱,以生理盐水为参比,光谱带宽 2 nm,取样间隔 2 nm,用 190~700 nm 波段的光照射,所得的数据经计算机处理得到吸收光谱如图 1 所示。

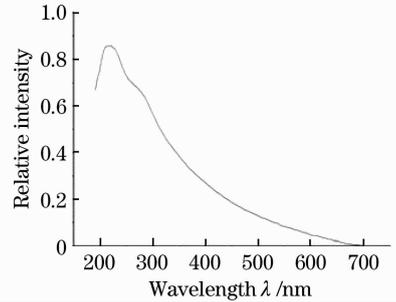


图 1 植物乳杆菌的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of lactobacillus plantarum

由图中可以看出,植物乳杆菌的吸收光谱很宽,在紫外可见范围内都有吸收,其主峰值位于 215 nm 附近,在 280 nm 附近有一个扰动,主要是蛋白质中的芳香族氨基酸残基在 280 nm 附近产生的吸收导致的。

3.2 荧光光谱

图 2 是生理盐水的光谱图,由图中可以看出只有瑞利散射以及拉曼光谱,其中拉曼光谱强度很小,对要测量的荧光光谱影响很小,可以忽略不计。

图 3 是植物乳杆菌的三维荧光光谱,由图中可以看出在紫外光的激发下,植物乳杆菌有明显的荧

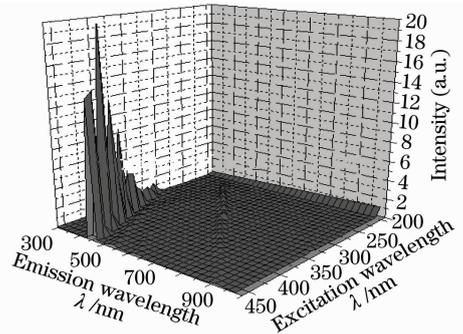


图 2 生理盐水的光谱图

Fig. 2 Spectra diagram of saline solution

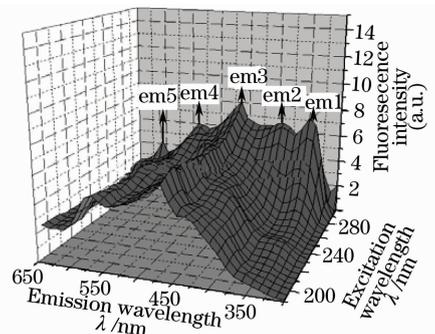


图 3 植物乳杆菌的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of lactobacillus plantarum

光光谱,标注了 5 个峰值,分别为 em1,em2,em3,em4 和 em5,其中 em5 是瑞利散射的二级衍射,余下的 4 个峰为荧光峰,分别位于 338,387,465 和 538 nm 附近。当用 200 nm 光激发时,em1,em2 没有显现出来,随着激发波长增加,荧光光谱变化不是很大,当激发波长超过 260 nm 时,em1,em2 两处的峰值逐渐显现,并在激发波长达到 290 nm 时,荧光

强度达到最大值,但是 em3,em4 两处的强度变化不是很大,没有明显的峰值。

以 290 nm 附近的光为激发波长,研究不同浓度下植物乳杆菌的荧光光谱。图 4 是浓度分别为基础浓度的 5%,10%,25%,50%,75%,100%时的植物乳杆菌的二维荧光光谱图。

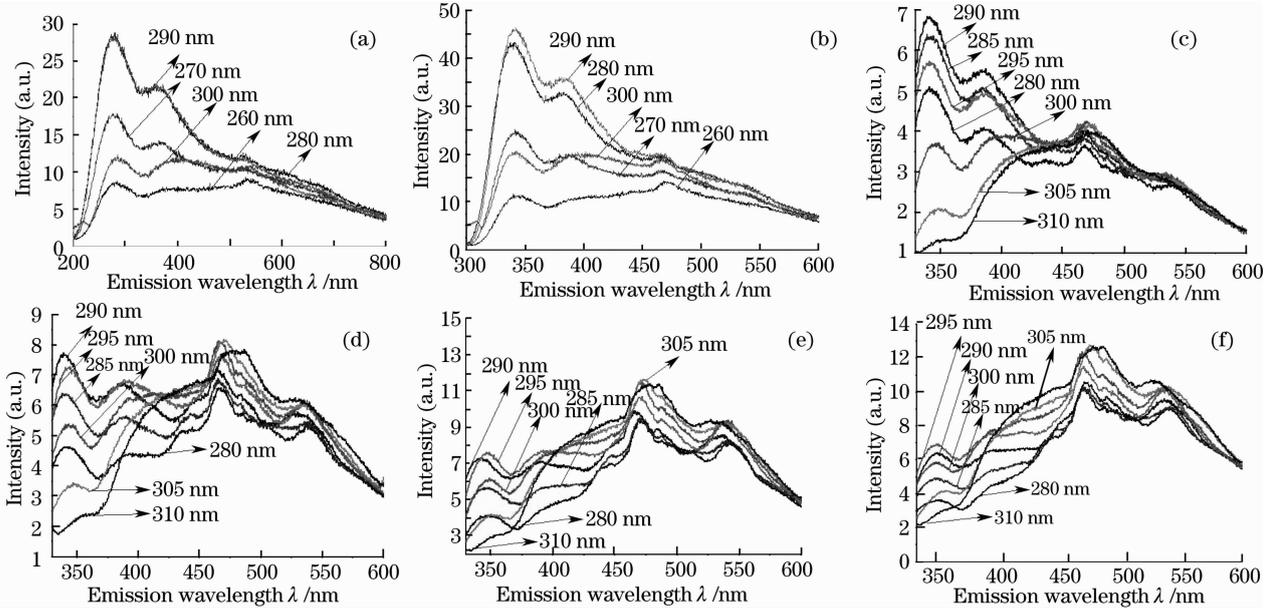


图 4 不同浓度植物乳杆菌的荧光光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of lactobacillus plantarum with different concentration

由图中可以看出浓度的变化影响到了荧光峰值的位置和强度,290 nm 是最佳的激发波长,选择不同浓度下菌液的光谱图比较,如图 5 所示。

em4 随浓度变化的拟合曲线,其中(c)和(d)中不包含浓度为 100%的数据。

在图 7(a)的拟合公式为

$$y = 954.13 + 441.97x - 10.44x^2 + 0.11x^3 - 0.0004x^4,$$

其相关系数 $R=0.9977$ 。(b)的拟合公式为

$$y = 1281.28 + 234.27x - 3.01x^2 + 0.01x^3,$$

其相关系数 $R=0.9958$ 。(c)的拟合公式为

$$y = 772.03 + 124.32x,$$

相关系数为 0.9981,呈现很好的线性相关性。(d)的拟合公式为

$$y = 220.02 + 111.12x,$$

相关系数为 0.9987,呈现很好的线性相关性。

从图 7(b)中可以看到,浓度较低时,峰值个数较少,这与相关文献中的结论一致,即只在 330 nm 附近出现峰值,随着浓度的增加,峰值个数也增加,荧光峰值的位置也会有所变动,但大致的位置几乎不变。

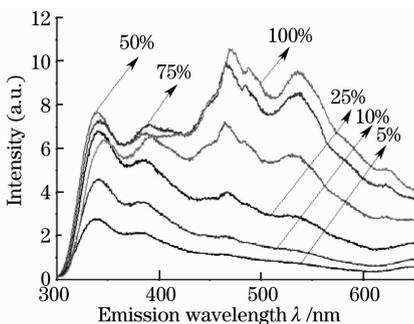


图 5 不同浓度植物乳杆菌的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of lactobacillus plantarum with different concentration

从图 5 中提取相关数据,得到荧光强度、峰值位置与浓度的关系曲线,如图 6 所示。

使用 Origin 软件,对图 6(a)中数据作了拟合,如图 7 所示,分别得到了峰值强度 em1,em2,em3,

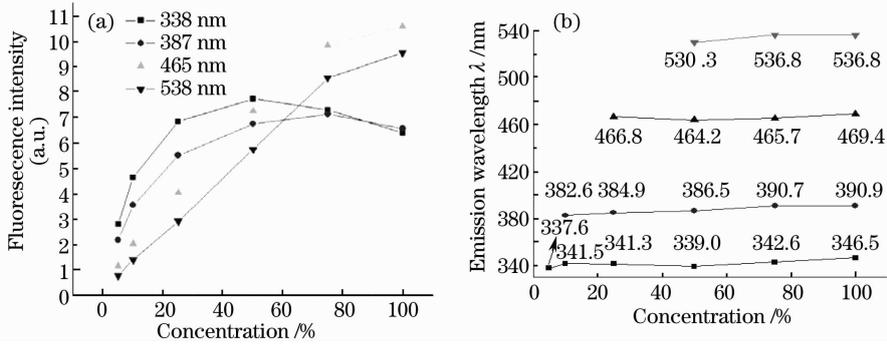


图 6 荧光强度(a)和峰值位置(b)随浓度变化图

Fig. 6 Variation of fluorescence intensity (a) and peak wavelengths (b) with concentration

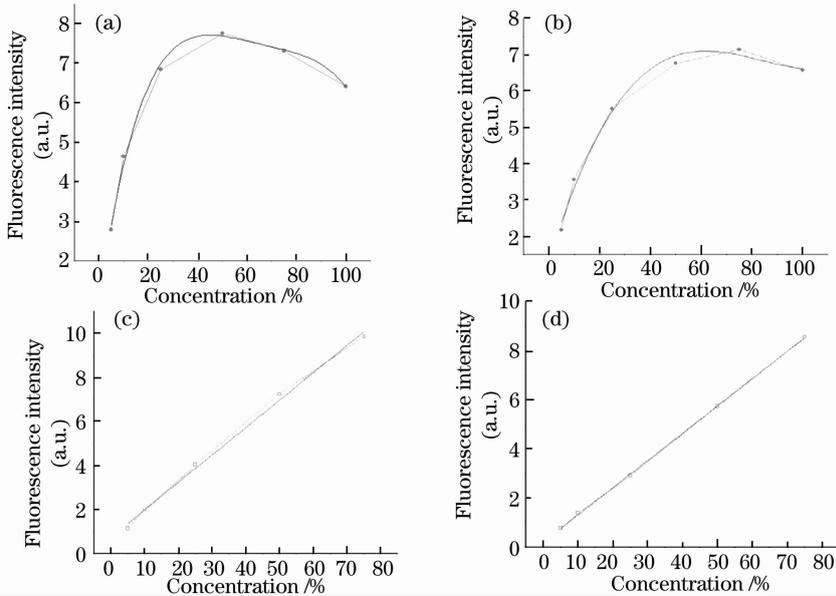


图 7 峰值强度随浓度变化的拟合曲线

Fig. 7 Fitting line of peak intensity change with concentration

4 讨论分析

综合上述的光谱图,可进行如下的讨论:

1) 从植物乳杆菌的紫外吸光谱来看,图 1 反映了该菌种能够很好地吸收紫外光。紫外-可见吸收光谱都属于电子光谱,它们都是由于价电子的跃迁而产生的。在有机化合物分子中有形成单键的 σ 电子、有形成双键的 π 电子、有未成键的孤对 n 电子。当分子吸收一定能量的辐射能时,这些电子就会跃迁到较高的能级。由于植物乳杆菌是以细胞为单位的,细胞中含有很多有机物质,比如蛋白质、糖类、脂类等这些物质含有大量的发色团结构,如 $C=C$, $C=O$, $C\equiv C$, $C-H$, $-N=O$, $-N=N-$, $C=N$ 等。图中的吸收峰主要位于 200 nm 到 400 nm,可以看出主要是由分子中的双键的 π 电子以及未成键的 n 电子吸收光子,发生 $\pi-\pi^*$, $n-\sigma^*$ 的跃迁产生

的,再考虑到分子中的共轭结构以及助色团,如 $-OH$, NH_2 等的影响,使得吸收峰出现红移现象,所以在植物乳杆菌的吸收光谱中会有一个很宽的谱峰,覆盖紫外和可见光部分区域。在 280 nm 出现的微扰是由于蛋白质中的芳香族氨基酸残基在 280 nm 附近产生的吸收导致的,主峰是由芳香族化合物的 E 吸收带和有机化合物中的 $C=C-C=C$, $C=C-C=O$ 等结构上的 π 电子吸收光子产生 $\pi-\pi^*$ 跃迁形成的^[13-15]。由于细胞中所含有机物复杂繁多,所以吸收光谱是复合后的光谱,是个带宽比较宽的谱线。

2) 根据已有的文献报道,细胞中的主要荧光物质分别为蛋白质中的氨基酸残基(主要为色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸,峰值位置分别在 350, 300 和 280 nm),酶和辅酶(主要为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),

黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD), 荧光峰值分别位于440, 460, 464 和 535 nm), 核酸(荧光峰值位于390 nm附近)^[14~16]等。图3及图4中的荧光峰值位置分别位于338, 387, 465 和 538 nm, 正好对应几种主要荧光物质的峰值位置。338 nm附近的荧光峰值是在蛋白质中的氨基酸的共同作用下产生的, 其中苯丙氨酸的量子产率较低, 在实验中没有观察到其峰值, em1 主要是由色氨酸和酪氨酸的残基发出的荧光叠加得到的。

3) 荧光峰值位置的强度随浓度变化的曲线中, em1 和 em2 呈现非线性关系, em3 和 em4 呈现良好的线性关系。细胞中的主要物质为蛋白质(55%)、多糖(5%)、类脂(9.1%)、DNA/RNA(23.6%)^[17]。NADH、NADPH 和 FAD 属于辅酶和酶类物质, 在细胞中的含量很少, 结合荧光分析法中荧光的强度在溶液浓度很低时和溶液的浓度呈线性关系的知识, 可以解释图7中 em1 和 em2 与浓度呈非线性关系, em3 和 em4 与浓度呈线性关系。浓度低时, em1 和 em2 也接近是线性关系, 浓度增加, 蛋白质、核酸的浓度也增加, 出现了荧光淬灭现象, 所以浓度增加时, 荧光强度的增加不那么明显, 甚至出现强度减弱现象。至于 em3 和 em4, 其对应的荧光物质在细胞中的含量很少, 在实验的浓度中, 其荧光强度与浓度关系满足线性关系, 但是图6(a)中可以看到在浓度达到100%时, 也出现了非线性的关系, 这组数据没有在拟合范围内。

5 结 论

得到了植物乳杆菌的吸收光谱和荧光光谱, 从实验结果可知植物乳杆菌对紫外光有很好的吸收, 吸收系数在215 nm达到最大值, 在可见光范围内虽然有吸收, 但是吸收系数较低, 而且都是在接近紫外的波段。荧光光谱共有4个峰值, 分别对应细胞中的主要荧光物质, 通过对不同浓度益生菌的荧光光谱的研究, 得到了荧光强度与浓度的关系, 338 和 387 nm附近的峰值随浓度的变化呈非线性关系, 465 和 535 nm附近的峰值强度呈线性变化, 这主要是峰值对应的荧光基团在细胞中的含量不同导致的。

参 考 文 献

- Markolf H. Niemz Laser-Tissue Interaction Fundamentals and Applications [M]. Zhang Zhenxi Transl. Xi'an Jiaotong University Press, 1999. 120~188
- Markolf H. Niemz. 激光与生物组织的相互作用-原理及与应用[M]. 张镇西等译, 西安交通大学出版社, 1999. 120~188
- S. Determann, J. M. L. R. Reuter, J. Rullkötter. Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria [J]. *Marine Chemistry*, 1998, **62**(1-2): 137~156
- R. C. Chin, M. W. Mayo, W. Hallidy *et al.*. Compact phase resolved fluorescence spectrometer for detection and discrimination of airborne bacteria [C]. *SPIE*, 1996, **2836**: 158~169
- S. Elliott, J. R. Lead, A. Baker. Thermal quenching of fluorescence of freshwater, planktonic bacteria [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, **564**(2): 219~225
- Martin F. Hohmann-Marriott, Robert E. Blankenship. Variable fluorescence in green sulfur bacteria [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1767**(1): 106~113
- Héctor Enrique Giana, Landulfo Silveira Jr, Renato Amaro Zangaro *et al.*. Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal components analysis [J]. *J. Fluorescence*, 2003, **13**(6): 489~493
- Mohammed Salim Ammor. Recent advance in the use of intrinsic fluorescence for bacterial identification and characterization [J]. *J. Fluorescence*, 2007, **17**(5): 455~459
- Salim Ammor, Kaoutar Yaakoubi, Isabelle Chevalliter *et al.*. Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages [J]. *J. Microbiological Methods*, 2004, **59**(2): 271~281
- J. Nicklin, K. Graeme-Cook, T. Paget *et al.*. Microbiology [M]. Bios Scientific Publishers Limited, 1999. 99~105
- Chen Guoqing, Zhu Tuo, Wu Yamin *et al.*. Identification of liquor using fluorescence spectra [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(s2): 139~142
- 陈国庆, 朱拓, 吴亚敏等. 用荧光光谱鉴别白酒 [J]. *光学学报*, 2008, **28**(s2): 139~142
- Shi Aimin, Zhu Tuo, Gu Endong *et al.*. Study on fluorescent spectra of amaranth and ponceau 4R [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(11): 2237~2242
- 史爱敏, 朱拓, 顾恩东等. 苋菜红与胭脂红荧光光谱的比较分析 [J]. *光学学报*, 2008, **28**(11): 2237~2242
- Liu Zhouyi, Zhu Tuo, Gu Endong *et al.*. Acid orange II detection by fluorescence spectra [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(6): 1106~1110
- 刘周忆, 朱拓, 顾恩东等. 荧光光谱检测的酸性橙 II 的研究 [J]. *光学学报*, 2008, **28**(6): 1106~1110
- Ke Yikan, Dong Huiru. The Manual of Analytical Chemistry-the Third Part: Spectral Analysis [M]. Chemical Industry Press, 1998. 628~632
- 柯以侃, 董慧茹. 分析化学手册-第三分册光谱分析 [M]. 化学工业出版社, 1998. 628~632
- Guo Yaojun. Fluorescence Experimental Techniques and Its Application in Molecular Biology [M]. Science Press, 1979. 123~177
- 郭尧君. 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用 [M]. 科学出版社, 1979. 123~177
- Gao Zhenheng. Organic Photochemistry [M]. People's Education Press, 1979. 7~12
- 高振衡. 有机光化学 [M]. 人民教育出版社, 1979. 7~12
- G. Farabegoli, C. Helinga, J. J. Heijnen *et al.*. Study on the use of NADH fluorescence measurements for monitoring wastewater treatment systems [J]. *Water Research*, 2003, **37**(11): 2732~2738
- Li Fudi, Hu Zhengjia. Microbiology [M]. China Agriculture Press, 2000. 5~10
- 李阜棣, 胡正嘉. 微生物学 [M]. 中国农业出版社, 2000. 5~10