

原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用及机理

石超, 郭都, 张文婷, 刘志远, 郭晓, 郝旭昇, 杨逸菲, 孙怡, 夏效东

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 本文通过检测原儿茶醛(PC)对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度及对生长曲线的影响, 分析其抑菌效果; 利用场发射扫描电镜, 观测PC对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响; 利用多种荧光探针检测PC对细菌细胞膜完整性、胞内pH、胞内ATP浓度、膜电位的作用, 探明其可能的抑菌机理。结果表明: PC对阪崎肠杆菌的最小抑菌浓度为0.625~1.25 mg/mL, PC使细菌生长速率和最大菌体浓度显著减小。扫描电镜结果表明PC使菌体干瘪皱缩, 丧失原本的棒状杆菌形态。同时, 浓度为2MIC和4MIC的PC使细胞膜完整性分别降低49.0%和50.7%, 使胞内pH由6.87降低为5.67和4.47, 使胞内ATP浓度由1.824 $\mu\text{mol/L}$ 降低为0.01 $\mu\text{mol/L}$ 以下, 并且使细菌细胞膜出现去极化。综上所述, PC对阪崎克罗诺肠杆菌有良好的抑制效果, 其可能的抑菌机理是影响细胞膜的通透性, 原儿茶醛有潜力作为天然抑菌剂在婴幼儿食品或其他食品中使用。

关键词: 阪崎克罗诺肠杆菌; 原儿茶醛; 细胞膜; 胞内ATP

文章编号: 1673-9078(2017)7-105-111

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.016

Antibacterial Activity of Protocatechualdehyde against *Cronobacter sakazakii* and its Possible Mechanism of Action

SHI Chao, GUO Du, ZHANG Wen-ting, LIU Zhi-yuan, GUO Xiao, HAO Xu-sheng, YANG Yi-fei, SUN Yi, XIA Xiao-dong

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To investigate the antibacterial activity of protocatechualdehyde (PC), the minimum inhibitory concentrations (MICs) of PC against *C. sakazakii* strains and the effect of PC on *C. sakazakii* growth curves were determined. The effect of PC on the cell morphology of *C. sakazakii* was observed under field emission scanning electron microscope. In addition, the impacts of PC on cell membrane integrity, intracellular pH (pH_{in}), intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration and membrane potential were measured using multiple fluorescent probes to elucidate its possible antibacterial mechanism. The results showed that the MICs of PC against *C. sakazakii* strains ranged from 0.625 to 1.25 mg/mL, and the addition of PC significantly reduced the specific growth rate and the maximum optical density of *C. sakazakii*. Electronic microscopy observations indicated that *C. sakazakii* cells exposed to PC had a wrinkled surface and lost the typical structure of *Corynebacterium* spp. In addition, PC treatments at concentrations of 2MIC and 4MIC reduced cell integrity by 49.0% and 50.7%, respectively, and caused a decrease in pH_{in} of *C. sakazakii* from 6.87 to 5.67 and 4.47, respectively; the PC treatments reduced the intracellular ATP concentration from 1.824 $\mu\text{mol/L}$ to less than 0.01 $\mu\text{mol/L}$. In addition, cells treated with PC showed depolarized cell membranes. In conclusion, PC had good antibiotic activity against *C. sakazakii*, and its possible mechanism of action was to affect the permeability of the cell membrane. PC has the potential to be used as a natural antibacterial agent in infant formula or other foods.

Key words: *Cronobacter sakazakii*; protocatechualdehyde; cell membrane; intracellular adenosine triphosphate (ATP)

阪崎克罗诺肠杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种食源性条件致病菌, 它能够引起新生儿、婴幼儿、

收稿日期: 2016-10-08

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划项目 (2015BAD16B08); “浙江省植物有害生物防控重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 (2010DS700124-ZM1608)” 项目; 教育部“新世纪优秀人才支持计划” (NCET-13-0488)

作者简介: 石超 (1989-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食源性致病微生物

通讯作者: 夏效东 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全

免疫能力低下的成年人患有脑膜炎、菌血症和坏死性小肠结肠炎等多种疾病, 致死率高达 50~80%^[1], 并且, 幸存者常引发长期且严重的神经并发症^[2]。2008 年, Iversen 等将阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 重新定义为一个新的属-克罗诺菌属, 目前, 克罗诺菌属包括 7 个种: 阪崎克罗诺杆菌、丙二酸盐克罗诺杆菌、都柏林克罗诺杆菌、莫金斯克罗诺杆菌、尤尼沃斯克罗诺杆菌、康帝蒙提克克罗诺杆菌和苏黎世克罗诺杆菌。其中, 阪崎克罗诺肠杆菌是婴幼儿乳粉中最常见

的菌种^[3]。阪崎克罗诺肠杆菌也在其他自然环境中广泛存在着,如土壤、水、食品加工环境、乳制品、肉干、蔬菜和米,其污染途径非常广泛^[4]。

食品保藏常使用化学防腐剂来防治污染或腐败的发生,延长保鲜期,但由于化学防腐剂易导致病原菌产生抗药性、造成环境污染、存在毒副作用和残留问题,影响到食品的安全性,直接威胁到消费者的人身安全和健康^[5]。在实际生产中,控制阪崎克罗诺肠杆菌也常用热杀菌的方式^[6],然而,热处理方式通常会影响产品的感官品质和营养,不被消费者广泛接受。除了物理及化学的灭活方法,近年来使用植物源抑菌剂控制食源性致病菌的污染备受关注。植物源抑菌物质是指可以直接利用或提取植物的根、茎、叶、花、果、种子或其次生代谢物质具有杀菌作用的活性物质^[7]。植物源抑菌物质在自然界分布广泛,并且存在多种生理活性,符合国内外一贯提倡的“天然、营养、多功能”的食品添加剂的发展方针。

原儿茶醛(3,4-二羟基苯甲醛, $C_7H_6O_3$)是葡萄藤叶和大麦中的一种多元酚,也是中草药丹参的水溶性成分之一^[8]。研究表明,原儿茶醛具有抑制动脉粥样硬化,抗氧化和抗炎等多种生物活性^[9]。已有研究表明原儿茶醛对土传性病原细菌青枯雷尔氏菌有着良好的抑制效果,原儿茶醛改变了青枯雷尔氏菌的细胞结构和形态,并且能够降低其生物膜的形成能力^[10]。Prachayasittikul等^[11]研究表明原儿茶醛对邻单胞痢疾杆菌的最小抑菌浓度 $\leq 60 \mu\text{g/mL}$,然而抑菌机制并未报道。原儿茶醛对食源性致病菌阪崎克罗诺肠杆菌的抑菌效果并未研究,并且其对细菌生长及对细胞膜通透性的影响鲜有报道。

本试验首先评价原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用,随后通过检测其对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线和生长动力模型、细胞形态、细胞膜完整性、胞内 pH、胞内 ATP 及膜电位的影响,以探讨其对阪崎克罗诺肠杆菌的抑菌机制,旨在为研究植物源抑菌剂对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用及机理提供新的思路,也为原儿茶醛的开发、使用提供可靠的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

原儿茶醛(HPLC $\geq 98\%$)购于成都曼斯特生物科技有限公司;胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone soya agar, TSA),胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptone soya broth, TSB)购于北京陆桥技术有限公司;LIVE/DEAD[®] BacLight[™]细菌活性检测试剂盒购于赛默飞世尔科技

公司;cFDA-SE 荧光探针购于美国 Sigma 公司;ATP 检测试剂盒购于碧云天生物技术公司;DIBAC₄(3)荧光探针购于美国 Sigma 公司;其他所用有机溶剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

细菌培养箱 GHX-9050B-2 上海福玛试验设备有限公司;低温冷冻离心机 5804R 德国 Eppendorf 公司;分光光度计 Smart Spec[™] plus 美国 BIO-RAD 公司;微生物全自动生长曲线分析仪芬兰 Bioscreen 公司;场发射扫描电镜 S-4800 日本 Hitachi 公司;多功能酶标仪 Infinite[™] M200 PRO 瑞士帝肯集团公司;超声波裂解仪 SCIENTZ-IIID 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化

将冻存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 的阪崎克罗诺肠杆菌采用划线法在 TSA 平板上活化,随后挑取单菌落接种于 30 mL TSB 中,将培养液置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 18 h,培养后的菌悬液经离心(5000 r/min , 15 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$)去除上清液,用磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered saline, PBS)洗涤菌体沉淀,反复两次洗涤后,用一定量 PBS 的悬浮菌体沉淀,测定并调整菌悬液的 $OD_{600\text{nm}}=0.5$,使菌液浓度约为 10^8 CFU/mL 。

1.3.2 最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)的测定

菌液制备同 1.3.1,使用 PBS 缓冲溶液洗涤菌体两次,并重悬浮于 PBS 缓冲溶液中,测定并调整菌悬液的 $OD_{600\text{nm}}=0.5$ 。将 24 孔酶标板中添加 1 mL 无菌 TSA 培养基,冷却至 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 。添加原儿茶醛于 TSA 中,使原儿茶醛的浓度为 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 和 0 mg/mL(对照组)。待培养基冷却凝固后,将 2 μL 菌悬液滴加至培养基中央,将样品置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24 h 后观察结果。将肉眼观察不到阪崎克罗诺肠杆菌生长的原儿茶醛的最低浓度作为原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度。同时,试验设置阴性对照(不含原儿茶醛的 TSA 培养基)和阳性对照(含有 1 mg/mL 氨苄西林的 TSA 培养基)。

1.3.3 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线及生长动力模型影响的测定

菌液制备同 1.3.1,使用 TSB 肉汤洗涤菌体两次,并重悬浮于 TSB 肉汤中,测定并调整菌悬液的 $OD_{600\text{nm}}=0.5$,并将菌悬液稀释 100 倍,使菌液浓度为 10^6 CFU/mL ,将菌悬液加入 96 孔酶标板中,每孔 125

μL 。使用 TSB 肉汤配制原儿茶醛溶液,在加样孔中分别添加 125 μL 原儿茶醛溶液,使原儿茶醛的浓度为 MIC、1/2MIC、1/4MIC、1/8MIC、1/16MIC 和 0。将原儿茶醛溶液与菌悬液吹打混匀,将样品置于微生物全自动生长曲线分析仪中,设置培养温度 37 $^{\circ}\text{C}$,培养时间 24 h,每 1 h 检测 1 次吸光度,波长为 600 nm。以时间(h)为横坐标,菌悬液 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 的值为纵坐标,绘制生长曲线。

选取修正 Gompertz 模型拟合阪崎克罗诺肠杆菌的生长状况,并表征其生长参数。修正 Gompertz 的模型表达式为:

$$\text{OD}_t = A + (B - A) \exp\{-\exp[-\mu(t - M)]\} \quad (1)$$

$$\mu_{\max} = (B - A)\mu/e \quad (2)$$

其中, OD_t 表示在 t 时的菌液浓度; t 表示培养时间(h); B 表示最大的菌液浓度; A 表示初始菌液浓度; M 为菌株达到指数期所用的时间(h); μ 为指数期的相对生长速率($\Delta\text{OD}_{600}/\text{h}$); μ_{\max} 为最大生长速率(OD_{600}/h); 利用 SPSS 软件中的非线性回归方法拟合 A , B , μ , M 和 μ_{\max} 等参数值,以相关系数 R^2 作为评估因子模型的拟合度。

1.3.4 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响

菌液制备同 1.3.1, 使用 PBS 洗涤菌体, 并调整菌悬液 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$ 。向菌悬液中添加不同浓度的原儿茶醛, 使原儿茶醛的浓度为 0、2MIC 和 4MIC, 将样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 4 h。随后离心(5000 r/min, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 去除上清液, 使用 PBS 清洗菌体并离心。使用 2.5% 的戊二醛-PBS 溶液悬浮细菌并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 中静置 12 h。随后以 PBS 和无菌水分别清洗菌体, 并加入 1% 的锇酸浸泡细菌进行固定。5 h 后去除锇酸, 使用 30%、50%、70%、80% 和 90% 的酒精梯度洗脱菌体。最后使用 100% 酒精悬浮菌体。吸取菌悬液滴加至洁净的玻璃片上干燥, 将玻片贴附在载物台上, 表面喷金处理, 放入场发射电子显微镜中进行观察拍照。

1.3.5 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响

菌液制备同 1.3.1, 使用 0.85% 的生理盐水洗涤菌体两次, 并重新悬浮于 0.85% 的生理盐水中。将相同体积菌悬液分别加入 20 mL 的生理盐水和 70% 的异丙醇溶液中, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 1 h。将生理盐水处理组定义为活菌组, 异丙醇溶液处理组定义为死菌组。随后使用 0.85% 生理盐水洗脱菌体 3 次, 并对两种处理后的菌悬液进行吸光度的调节, 使两种菌液的 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$, 且二者的 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 吸光度值相差不超过 0.01。

取活菌组菌悬液并添加原儿茶醛, 使原儿茶醛的浓度为 0、2MIC 和 4MIC, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。随后菌液离心(10000 r/min, 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 并用生理盐水洗涤菌体一次, 并重新悬浮于生理盐水中。将样品添加于黑色酶标板中, 同时以不同体积活菌组菌悬液和死菌组菌悬液设置标准曲线组(活菌比例: 0%、10%、50%、90% 和 100%)。将 SYTO/PI 的 2X 染料加入加样孔中, 充分吹打混匀。将样品置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 使用多功能酶标仪检测荧光强度。其中绿色荧光染料 SYTO 的激发波长为 485 nm, 发射波长为 542 nm。红色荧光染料 PI 的激发波长为 485 nm, 发射波长为 610 nm。含有原儿茶醛(0、2MIC 和 4MIC) 但不含有菌悬液的 0.85% 生理盐水为背景空白组, 各试验组的荧光强度均减去对应背景荧光强度。

1.3.6 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 的影响

菌液制备同 1.3.1, 使用磷酸钾缓冲溶液洗涤菌体, 并调整菌悬液 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$ 。使用 HEPES 缓冲溶液洗涤菌体两次, 并将菌体重新悬浮于磷酸钾缓冲溶液中。菌悬液中加入 cFDA-SE 荧光探针使其终浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 20 min, 随后使用磷酸钾缓冲溶液洗涤一次, 重新悬浮, 加入葡萄糖使其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min, 最后用磷酸钾缓冲溶液洗涤菌体两次, 加入磷酸钾缓冲液重浮菌体。在菌悬液中添加原儿茶醛, 使原儿茶醛的浓度为 0、2MIC 和 4MIC, 将样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 20 min。

试验设置标准曲线组: 使用甘氨酸(50 mmol/L)、氯化钾(50 mmol/L)、柠檬酸(50 mmol/L)、磷酸二氢钠(50 mmol/L) 配制 pH 缓冲液, 并用氢氧化钠, 盐酸调节 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0。使菌体悬浮于不同 pH 缓冲液中, 并添加尼日利亚菌素溶液和缬氨霉素溶液, 使阪崎克罗诺肠杆菌胞内外 pH 相等。将样品及标准曲线组添加于黑色酶标板中, 使用多功能酶标仪检测样品的荧光强度, 分别设定激发波长为 490 nm 和 440 nm, 发射波长为 520 nm, 绘制试验标准曲线并计算样品的胞内 pH。

1.3.7 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 的影响

菌液制备同 1.3.1, 使用 PBS 洗涤菌体两次, 并调整菌悬液 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$ 。将原儿茶醛加入菌悬液中, 使原儿茶醛的浓度为 0、2MIC 和 4MIC, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min。取出培养箱中的样品, 进行冰浴超声(超声机探头插入菌悬液, 每超声 3 s, 停止

7 s; 60 个循环) 裂解菌体, 随后将样品在 100 °C 温度下处理 2 min 灭活 ATP 酶。将样品离心(5000 r/min, 5 min, 4 °C) 并取上清液保存于冰上以防止 ATP 损失。胞内 ATP 检测使用 ATP 检测试剂盒, 在 96 孔白色酶标板中添加 125 μL 检测工作液及 125 μL 样品上清液, 使用多功能酶标仪检测化学发光强度。含有原儿茶醛(0、2MIC 和 4MIC) 但不含有菌悬液的 PBS 溶液为背景空白组, 各试验组的荧光强度均减去对应背景荧光强度。

1.3.8 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌膜电位的影响

菌液制备同 1.3.1, 使用 PBS 洗涤菌体两次, 测定并调整菌悬液的 OD_{600nm}=0.5。将菌悬液加入黑色酶标板中, 并置于 37 °C 培养箱中孵育 30 min。将 1 μmol/L 的荧光染料 DiBAC₃(3) 添加至加样孔中吹打混匀, 置于 37 °C 培养箱中孵育 30 min。随后在加样孔中添加原儿茶醛, 使原儿茶醛的浓度为 0、2MIC 和 4MIC, 5 min 后使用多功能酶标仪检测荧光强度, 激发波长为 492 nm, 发射波长为 515 nm。检测含有原儿茶醛(0、2MIC 和 4MIC) 的 PBS 溶液的荧光强度为背景荧光强度, 各处理组的荧光强度减去对应背景荧光强度。

1.3.9 数据处理

所有试验均进行三次重复, 使用 SPSS 软件 (Version 19.0; SPSS, Inc., Chicago, IL) 处理试验数据。数据以平均值±标准差(n=3) 呈现且结果采用 t 检验进行分析。样本差异若达到 p≤0.05 则认为是显著, 差异若达到 p≤0.01 则认为是极显著。

2 结果与讨论

2.1 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度

试验选取 4 株 ATCC 标准菌株及 5 株婴幼儿配方米粉及奶粉分离菌株用于检测原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度。试验结果(表 1) 表明: 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌有着良好的抑制效果, 对标准菌株 ATCC 29544 的 MIC 为 1.25 mg/mL, 对其他 3 株标准菌株 ATCC 29004、ATCC 12868、ATCC BAA-894 的最小抑菌浓度为 0.625 mg/mL。原儿茶醛对 5 株分离菌株的最小抑菌浓度均为 1.25 mg/mL。

已有研究证明部分植物源活性物质, 包括: 蓝莓花青素和市售蓝莓果汁^[12], 辛酸、柠檬酸和香草醛^[13], 反式肉桂醛^[14], 葡萄籽水提物^[15], 硫辛酸和阿魏酸^[16,17]

对阪崎克罗诺肠杆菌有良好的抑菌效果。这些天然植物源活性物质对阪崎克罗诺肠杆菌的抑菌作用大多是在复原婴幼儿食品模型中评价的, 然而, 天然植物源抑菌剂对阪崎克罗诺肠杆菌的抑菌机制鲜有报道。为探究原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制机理, 试验选取 ATCC 29544 进行后续的检测。

表 1 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentrations of protocatechualdehyde against *Cronobacter sakazakii*

菌株	来源	最小抑菌浓度/(mg/mL)
ATCC 29544	儿童咽喉	1.25
ATCC 29004	婴幼儿配方奶粉	0.625
ATCC 12868	婴幼儿配方奶粉	0.625
ATCC BAA-894	人体临床标本	0.625
12-2	婴幼儿米粉	1.25
14-15	婴幼儿配方奶粉	1.25
18-7	婴幼儿米粉	1.25
18-8	婴幼儿配方奶粉	1.25
18-13	婴幼儿配方奶粉	1.25

2.2 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌生长动力模型的影响

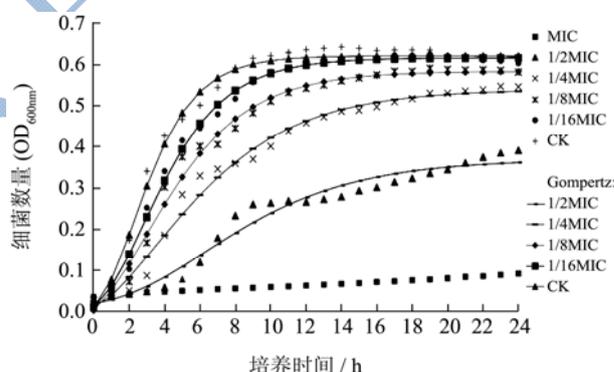


图 1 阪崎克罗诺肠杆菌在含有不同浓度原儿茶醛的 TSB 中的生长曲线

Fig.1 Growth curves of *C. sakazakii* ATCC 29544 cultured in TSB with various concentrations of protocatechualdehyde

试验采用肉汤稀释法检测不同浓度原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线的影响(图 1), 并利用 Gompertz 数学模型拟合阪崎克罗诺肠杆菌生长状况, 并表征其生长动力参数(表 2)。结果表明: 浓度为 MIC 的柠檬醛几乎完全抑制阪崎克罗诺肠杆菌的生长, 1/2 MIC~1/16 MIC 浓度的原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的生长也有明显的抑制作用, 在 24 h 时, 光密度值(OD_{600 nm}) 分别降低 38.64%、14.38%、8.82% 和 5.43%。由阪崎克罗诺肠杆菌的生长动力参

数可知(表2),与对照组相比,原儿茶醛使阪崎克罗诺肠杆菌最大生长速率减小,最大菌体浓度减小,且呈现浓度依赖性。因此,原儿茶醛抑制阪崎克罗诺肠杆菌的生长的方式为减小其最大生长速率。

表2 阪崎克罗诺肠杆菌在含有不同浓度原儿茶醛的TSB中生长动力学参数

Table 2 Growth kinetic parameters of *C. sakazakii* cells in tryptic soy broth with different concentrations of protocatechualdehyde

原儿茶醛浓度	$\mu_{max} \pm SE$	OD _{max}
1/2MIC	0.028±0.001 ^A	0.361±0.004 ^A
1/4MIC	0.052±0.004 ^B	0.535±0.001 ^B
1/8MIC	0.073±0.003 ^C	0.583±0.001 ^C
1/16MIC	0.092±0.002 ^D	0.617±0.002 ^D
0(CK)	0.121±0.004 ^E	0.622±0.004 ^D

注: μ_{max} 为最大生长速率(OD₆₀₀/h); OD_{max} 为最大菌体浓度; 相同指标中标示的不同大写字母表示差异显著(n=6)。

2.3 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响

试验利用场发射扫描电镜观测原儿茶醛处理后阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的变化,结果如图2所示。未经原儿茶醛处理的阪崎克罗诺肠杆菌细胞完整,菌体呈现棒状,饱满光滑,边缘明显且平滑(图2a)。阪崎克罗诺肠杆菌在2MIC浓度的原儿茶醛作用后如图2b所示,细菌菌体表面凹凸不平,出现皱缩。经4MIC原儿茶醛作用后细菌出现严重受损,已丧失阪

崎克罗诺肠杆菌固有的棒状杆菌形态,出现畸形(图2c)。阪崎克罗诺肠杆菌细胞的受损程度和数量随原儿茶醛浓度的增加而增大。

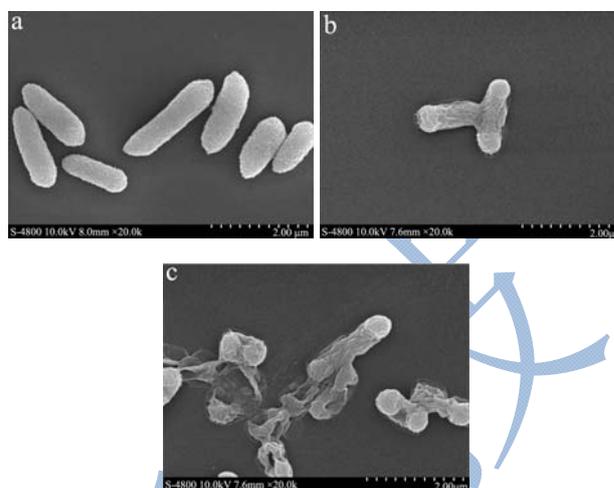


图2 扫描电镜观测未经原儿茶醛处理(a),经浓度为2MIC原儿茶醛处理4h(b)及经浓度为4MIC原儿茶醛处理4h(c)阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 的形态

Fig.2 Scanning electron micrographs of *C. sakazakii* ATCC 29544: untreated (a), treated with protocatechualdehyde at 2× MIC for 4 h (b), treated with protocatechualdehyde at 4× MIC for 4 h (c)

注: 标尺为2 μm, 放大倍数20000×。

2.4 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响

表3 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜完整性的影响

Table 3 Effects of protocatechualdehyde on the membrane integrity of *C. sakazakii* ATCC 29544

原儿茶醛浓度	绿色荧光	细胞膜完整的荧光比例/%	细胞膜完整性降低比例/%
0(CK)	42451±549	99.0±1.6	1.0±1.6
2MIC	26479±268	51.0±0.8	49.0±0.8
4MIC	25903±224	49.3±0.7	50.7±0.7

试验利用 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 细菌活性检测试剂盒检测原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响。试验结果表明:原儿茶醛使阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性明显下降,经2MIC原儿茶醛处理的阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整的荧光比例为51.0%,经4MIC原儿茶醛处理后阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整的细菌为全部细菌的49.3%(见表3)。

2.5 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 的影响

试验利用能够穿过细胞膜的 cFDA-SE (分子式: C₂₉H₁₉NO₁₁) 荧光探针与胞内蛋白结合发出绿色荧光的原理,通过检测荧光染料在敏感激发波长(490 nm)与不敏感激发波长(440 nm)的比值构建与胞内 pH 的标准曲线从而通过检测荧光反映阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 的变化。试验结果表明:原儿茶醛使阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 极显著降低(p≤0.01):未经原儿茶醛作用的阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 为 6.87±0.06,经浓度为 2MIC 的原儿茶醛处理后,胞内 pH 降低为 5.67±0.07,经浓度为 4MIC 原儿茶醛处理后,胞内 pH 降低为 4.47±0.16(图3)。两种浓度原儿茶醛处理后,

阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 与对照组相比均有极显著差异 ($p \leq 0.01$)。

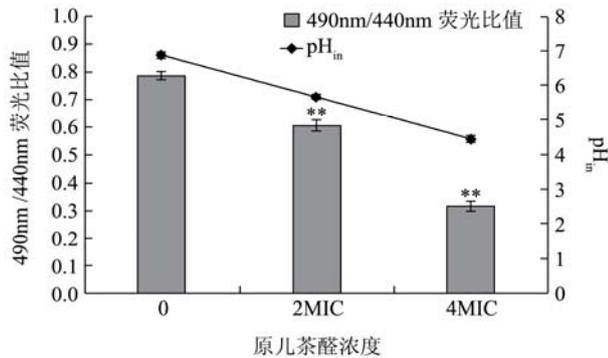


图3 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 胞内 pH 的影响
Fig.3 Effects of protocatechualdehyde on the intracellular pH of *C. sakazakii* ATCC 29544

注: **表示与对照组相比, 差异极显著 ($p \leq 0.01$)。

2.6 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 的影响

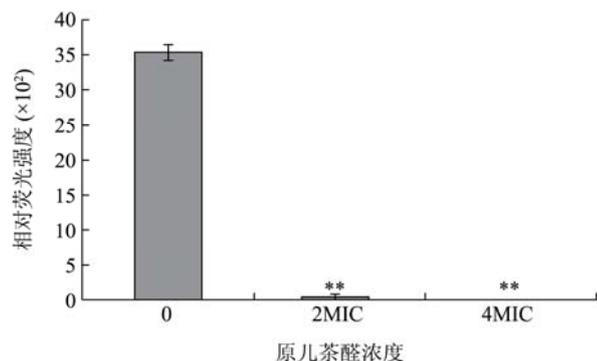


图4 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 胞内 ATP 的影响

Fig.4 Effects of protocatechualdehyde on intracellular ATP production by *C. sakazakii* ATCC 29544

注: **表示与对照组相比, 差异极显著 ($p \leq 0.01$)。

试验利用萤火虫荧光素酶催化荧光素需要 ATP 的原理, 通过裂解阪崎克罗诺肠杆菌检测其胞内 ATP 的浓度。试验结果表明: 原儿茶醛对胞内 ATP 有着极显著的降低作用 ($p \leq 0.01$) (图 4)。由相对荧光强度与 ATP 标准溶液浓度之间的拟合方程:

$$y = 1896x + 98.69; R^2 = 0.999$$

得到: 未经原儿茶醛作用的阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 浓度为 $1.824 \mu\text{mol/L}$, 而经原儿茶醛作用后, 相对荧光强度已低于标准曲线的检测下限, 即阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 浓度低于 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 。

2.7 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜电

位的影响

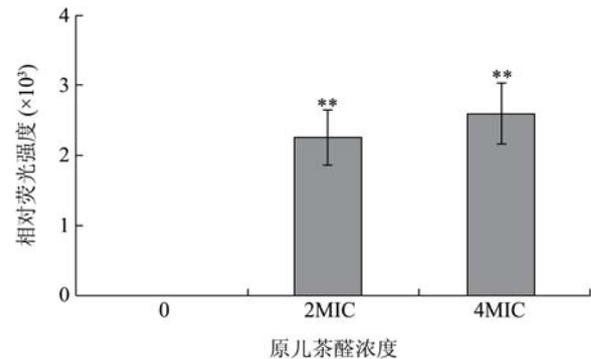


图5 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜电位的影响

Fig.5 Effects of protocatechualdehyde on the membrane potentials of *C. sakazakii* ATCC 29544

注: **表示与对照组相比, 差异极显著 ($p \leq 0.01$)。

试验通过检测负电荷阴离子荧光染料 DiBAC₄(3) 与胞浆内蛋白结合发出荧光的强度, 从而反映细胞膜电位的状态。未经原儿茶醛处理 (对照组) 的细胞膜两侧外负内正的状态称为膜的极化状态, 此时 Na⁺ 与 K⁺ 电压门控通道关闭。在原儿茶醛作用后, 阪崎克罗诺肠杆菌的膜电位发生了变化, 细胞膜处于不同的电位状态。当膜电位向膜内负值增大方向变化, 此时 K⁺ 不断流出细胞, 细胞内荧光强度降低表示细胞超极化。相反, 膜电位向膜内负值减小方向变化, 此时 Na⁺ 通道打开, 胞内 Na⁺ 浓度升高, 细胞内荧光强度升高表示细胞去极化。试验结果表明, 原儿茶醛使阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜电位出现去极化 (图 5)。

细胞膜是细菌细胞内外物质交换的主要屏障和介质^[18]。本实验证明, 原儿茶醛能够影响阪崎克罗诺肠杆菌的细胞形态, 降低细胞膜的完整性, 降低阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 的含量, 引起阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜去极化, 并降低菌体胞内 pH。这说明原儿茶醛能够引起阪崎克罗诺肠杆菌自身水解 ATP 速率的增加并能够改变细胞膜的通透性, 从而达到抑菌效果。类似的, 拓树果实精油被证明能够影响单核细胞增生李斯特菌 ATCC 7644 和鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 43174 的细胞膜形态并显著增高胞外 ATP 的浓度^[19] 从而引起细胞功能紊乱。石榴皮单宁被证明能够引起单核细胞增生李斯特菌的细胞膜电位超级化并显著降低胞内 pH 说明影响了细胞膜的通透性^[20]。然而, 抑菌剂对细菌的作用机制是多方面的, 原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的其他抑菌机制有待进一步研究。

3 结论

3.1 本文以原儿茶醛为研究对象,通过检测其对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度判定其抑菌效果;通过测定原儿茶醛作用后阪崎克罗诺肠杆菌的生长曲线,并拟合 Gompertz 数学模型探究原儿茶醛对细菌生长的影响及影响方式;利用场发射扫描电镜观测原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响;利用多种荧光探针检测原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性、胞内 pH、胞内 ATP 浓度、膜电位的作用,探究其可能的抑菌机理。试验结果表明:原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度为 0.625~1.25 mg/mL,表明其具有良好的抑菌作用;浓度为 MIC 的原儿茶醛完全抑制阪崎克罗诺肠杆菌的生长,1/2MIC~1/16MIC 浓度的原儿茶醛使细菌最大生长速率显著减小,最大菌体浓度显著减小;扫描电镜结果表明原儿茶醛使阪崎克罗诺肠杆菌干瘪皱缩,出现畸形;同时,两种检测浓度的原儿茶醛(2MIC 和 4MIC)使细菌细胞膜完整性分别降低 49.0%和 50.7%,使细菌胞内 pH 由 6.87 降低为 5.67 和 4.47,使细菌胞内 ATP 浓度由 1.824 $\mu\text{mol/L}$ 降低为 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 以下,并且使细菌细胞膜出现去极化。

3.2 综上所述,原儿茶醛对阪崎克罗诺肠杆菌有良好的抑制作用,它是通过影响阪崎克罗诺肠杆菌的细胞膜通透性来达到其抑菌效果。结合其多种生物活性,原儿茶醛有潜力作为天然抑菌物质在食品中应用。

参考文献

- [1] Healy B, Cooney S, O'Brien S, et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(4): 339-350
- [2] Lai K K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults—case reports and a review of the literature [J]. *Medicine*, 2001, 80(2): 113-122
- [3] Fei P, Man C, Lou B, et al. Genotyping and source tracking of *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolates from powdered infant formula and an infant formula production factory in China [J]. *Applied Environmental and Microbiology*, 2015, 81(16): 5430-5439
- [4] Friedemann M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder) [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116(1): 1-10
- [5] 高海生,李春华,蔡金星,等.天然果蔬保鲜剂研究进展[J].河北科技师范学院学报,1995,3(4):52-57
GAO Hai-sheng, LI Chun-hua, CAI Jin-xing, et al. Advances on the study of natural fresh-keeping agents for fruits and vegetables [J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 1995, 3(4): 52-57
- [6] Amalaradjou M A, Venkitanarayanan K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces [J]. *Journal of Food Protection*, 2011, 74(2): 200-208
- [7] Saile E, Mcgarvey J A, Schell M A, et al. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum* [J]. *Phytopathology*, 1997, 87(12): 1264-1271
- [8] Etoh H, Murakami K, Yogoh T, et al. Anti-oxidative compounds in barley tea [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68(12): 2616-2618
- [9] Chang Z Q, Gebru E, Lee S P, et al. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of protocatechualdehyde isolated from *Phellinus gilvus* [J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2011, 57(1): 118-122
- [10] Li S L, Yu Y M, Chen J N, et al. Evaluation of the antibacterial effects and mechanism of action of protocatechualdehyde against *Ralstonia solanacearum* [J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 754
- [11] Prachayasittikul S, Buraparauangsang P, Worachartcheewan A, et al. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack [J]. *Molecules*, 2008, 13(4): 904-921
- [12] Joshi S S, Howell A B, D'Souza D H. *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins [J]. *Food Microbiology*, 2014, 39(5): 127-131
- [13] Choi M J, Kim S A, Lee N Y, et al. New decontamination method based on caprylic acid in combination with citric acid or vanillin for eliminating *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in reconstituted infant formula [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(3): 499-507
- [14] Amalaradjou M A R, Hoagland T A, Venkitanarayanan K. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula by trans-cinnamaldehyde [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129(2): 146-149
- [15] Kim K J, Kim M A, Jung J H. Antitumor and antioxidant activity of protocatechualdehyde produced from *Streptomyces lincolnensis* M-20 [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2008, 31(12): 1572-1577
- [16] Shi C, Sun Y, Zhang X R, et al. Antimicrobial effect of lipoic acid against *Cronobacter sakazakii* [J]. *Food Control*, 2016, 59: 352-358

- [17] Shi C, Zhang X R, Sun Y, et al. Antimicrobial activity of ferulic acid against *Cronobacter sakazakii* and possible mechanism of action [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2016, 13(4): 196-204
- [18] Salton M R. Structure and function of bacterial cell membranes [J]. Microbiology, 1967, 21(21): 417-442
- [19] Bajpai V K, Sharma A, Baek K H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens [J]. Food Control, 2013, 32(2): 582-590
- [20] Li G H, Xu Y F, Wang X, et al. Tannin-Rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes* [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(4): 313-319

现代食品科技