

研究报告

原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用

贾振宇 孙怡 陈怡飞 夏效东* 石超*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院 陕西 杨凌 712100)

摘要:【背景】阪崎克罗诺肠杆菌是一种食源性条件致病菌，它能够引起新生儿、婴幼儿及免疫能力低下的成年人罹患多种疾病，致死率高达 50%–80%。【目的】探究天然植物源物质原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用及可能的抑制机理。【方法】采用琼脂稀释法确定原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度，并检测其对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线的影响。为探究原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜的损伤，实验测定了细菌胞内 pH、膜电位、胞内 ATP 浓度、细胞膜完整性，并利用扫描电镜观测原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的改变。【结果】原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度为 2.5–5.0 mg/mL，原儿茶酸降低了阪崎克罗诺肠杆菌的生长速率。原儿茶酸作用后阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 降低，细胞膜电位发生超级化/去极化，胞内 ATP 浓度降低，细胞膜完整性降低，细胞形态发生变化，这说明原儿茶酸改变了细胞膜通透性。【结论】原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌具有良好的抑制效果，其可能的抑菌机理是影响细胞膜的通透性及细胞形态。综合考虑原儿茶酸的多种生物活性，它有潜力作为天然抑菌物质在婴幼儿乳粉等其他食品中开发使用。

关键词: 阪崎克罗诺肠杆菌，原儿茶酸，细胞膜，细胞形态

Antimicrobial activity of protocatechuic acid against *Cronobacter sakazakii*

JIA Zhen-Yu SUN Yi CHEN Yi-Fei XIA Xiao-Dong* SHI Chao*

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

Abstract: [Background] *Cronobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen transmitted by food, which affects mainly newborns, infants and immune compromised adults, with reported case fatality rates of 50%–80%. [Objective] The aim of this work was to investigate the antimicrobial effect of a natural plant-derived compound protocatechuic acid (PCA), and its effects on cell membrane permeability of *C. sakazakii* strains. [Methods] We determined the Minimum Inhibitory Concentrations

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31772084); The Twelve-Five Science and Technology Support Program of China (2015BAD16B08); The New Century Excellent Talent Support Plan of Ministry of Education of China (NCET-13-0488); The Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2452017146)

*Corresponding authors: E-mail: XIA Xiao-Dong: foodscixiaodong@yahoo.com; SHI Chao: meilixinong@126.com

Received: June 05, 2017; Accepted: September 13, 2017; Published online (www.cnki.net): October 20, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31772084); “十二五”国家科技支撑计划项目(2015BAD16B08); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-13-0488); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2452017146)

*通信作者: E-mail: 夏效东: foodscixiaodong@yahoo.com; 石超: meilixinong@126.com

收稿日期: 2017-06-05; 接受日期: 2017-09-13; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-10-20

(MICs) using agar dilution method, and growth curves were also measured. Changes in intracellular pH, membrane potential, intracellular ATP concentration, membrane integrity and cell morphology were measured to elucidate the cell membrane damage induced by PCA. **[Results]** The experimental results indicated that the MICs of PCA against *C. sakazakii* strains were 2.5–5.0 mg/mL. PCA decreased growth rate of *C. sakazakii* and increased the cell membrane permeability of cells, as evidenced by reduction of pH_{in}, occurrence of cell membrane hyperpolarization/depolarization, intracellular ATP concentration decrease, reduction of membrane integrity and changes of cellular morphology in *C. sakazakii* cells after exposure to PCA. **[Conclusion]** These findings demonstrated that PCA had antimicrobial activity against *C. sakazakii*. It exerted antimicrobial action partly through causing cell membrane dysfunction and changes in cellular morphology. Considering its antimicrobial properties, together with its well-known nutritional functions, PCA has potential to be developed as a supplement in infant formula or other foods.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, Protocatechuic acid, Cell membrane, Membrane morphology

阪崎克罗诺肠杆菌是一种革兰氏阴性、能运动、兼性厌氧的无芽孢杆菌^[1]。它最初被认为是肠杆菌科肠杆菌属中阴沟肠杆菌的生物变形菌,被命名为黄色阴沟肠杆菌(*Yellow pigmented Enterobacter cloacae*)。直至2008年,克罗诺菌属被定义为一个新属,包含7个种,而阪崎克罗诺肠杆菌则是其中的一个种^[2]。阪崎克罗诺肠杆菌污染范围广,婴幼儿配方奶粉是其疫情暴发的重要来源。它能够引起新生儿脑膜炎、菌血症、坏死性小肠结肠炎等多种疾病,致死率为50%–80%;而且,20%的被感染新生儿在治愈后存在神经后遗症,包括脑积水、四肢麻痹和智力发展缓慢等^[3]。

目前控制食品中的致病菌主要采用添加化学防腐剂的方式,但由于合成的物质往往具有潜在的毒性,近年来部分研究者将目光聚焦于探究植物来源的活性物质上^[4]。植物源活性物质具有天然、营养、多功能的优点,并且来源广泛,消费者接受程度高^[5]。

原儿茶酸(3,4-二羟基苯甲醛, CAS: 99-50-3)是天然存在于许多蔬菜、水果、坚果中的一种酚酸类物质,也是丹参、杜仲、芙蓉等多种中药的有效活性成分^[6-8]。与此同时,原儿茶酸还是水果中广泛存在的花青素-糖苷类物质及黄酮类物质在人体中的主要代谢产物^[9-10]。前期研究表明,原儿茶酸具有多种生物活性,如较强的抗氧化^[11]及广泛的抗癌^[12]、抗炎^[13]等作用。原儿茶酸还表现出较

强的抑菌作用,对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度分别为0.9、1.0和3.0 mg/mL^[14]。近年来,原儿茶酸被广泛关注并已成为膳食补充剂添加于一些保健食品中^[15]。

本研究旨在探讨原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的抑菌作用及可能的抑制机理,探究原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的抑菌效果,并通过检测最小抑菌浓度的原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线、胞内pH、细胞膜电位、胞内ATP、细胞膜完整性、细胞形态的影响,从而探究其可能的抑制机理。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂和培养基

阪崎克罗诺肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*) ATCC 29544、ATCC 29004、ATCC 12868 以及 ATCCBAA-894 均购自美国模式菌株收集中心。阪崎克罗诺肠杆菌分离菌株 12-2、14-15、18-7、18-8 和 18-13 由西北农林科技大学食品科学与工程学院食品微生物研究团队分离自市售婴幼儿奶粉及米粉。

原儿茶酸(HPLC≥98%)购于成都曼斯特生物科技有限公司; LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 细菌活性检测试剂盒购于赛默飞世尔科技公司; DIBAC₄(3)荧光探针和 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; 磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered saline, PBS) (g/L): 氯化钠 8.0, 氯化钾 0.2, 十二水合磷酸氢钠 3.62, 磷

酸二氢钾 0.24;其他所用有机溶剂均为国产分析纯。

胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptone soya agar, TSA) (g/L): 胰蛋白胨 15.0, 植物蛋白胨 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0; 胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptone soya broth, TSB) (g/L): 胰蛋白胨 17.0, 植物蛋白胨 3.0, 氯化钠 2.5, 磷酸氢钾 2.5。

1.2 主要仪器

细菌培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; 低温冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 分光光度计 Smart SpecTM 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; 多功能酶标仪 InfiniteTM M200 PRO, 瑞士帝肯集团公司; 超声波裂解仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 场发射扫描电镜 S-4800, 日本 Hitachi 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化

将冻存于 -80°C 的阪崎克罗诺肠杆菌通过划线法在 TSA 平板上活化, 随后挑取单菌落接种于 30 mL TSB 中, 将培养液于 37°C 、120 r/min 培养 18 h, 培养后的菌悬液经 4°C 、 $5\ 000\times g$ 离心 15 min 去除上清液, 用 PBS 洗涤菌体沉淀, 反复洗涤 2 次后, 用一定量的 PBS 悬浮菌体沉淀, 测定并调整菌悬液的 OD_{600} 为 0.5, 使菌悬液浓度约为 10^8 CFU/mL。

1.3.2 最小抑菌浓度的测定

最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentrations, MIC)的测定采用琼脂稀释法^[16], 首先按照前述 1.3.1 中的方法制备菌悬液(OD_{600} 为 0.5), 备用。高压灭菌 TSA 培养基并冷却至 45°C 左右, 加至 24 孔细胞培养板中, 再向其中加入原儿茶酸并进行等倍稀释, 使原儿茶酸浓度为 10.0、5.0、2.5、1.25 和 0.625 mg/mL, 充分吹打混匀, 等待培养基在室温下凝固。吸取 2 μL 菌悬液接种至 24 孔板各孔中央。将细胞培养板置于 37°C 培养箱中培养 24 h 后观测结果, 其中 1 MIC 为抑制阪崎克罗诺肠杆菌出现增长的原儿茶酸的最低浓度。实验以不含有原儿茶酸的 TSA 培养基作为阴性对照, 含有 1 mg/mL 氨苄西林的 TSA 培养基作为阳性对照。

1.3.3 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线影响的测定

原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌在 TSB 中生长曲线的影响参照 Silva-Angulo 等的方法^[17]。首先按照前述 1.3.1 中的方法制备菌悬液, 使用 TSB 调整菌悬液 OD_{600} 为 0.5 并稀释 100 倍, 使菌悬液浓度约为 10^6 CFU/mL。向 96 孔细胞培养板每孔加入相同体积(125 μL)的菌悬液和原儿茶酸溶液(TSB 配置), 使原儿茶酸的浓度为 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、1/8 MIC、1/16 MIC 和 1/32 MIC。样品对照组添加 125 μL 菌悬液及 125 μL TSB, 背景空白对照组添加 250 μL TSB。设置微生物全自动生长曲线分析仪培养温度为 37°C 并每隔 1 h 检测波长为 600 nm 的吸光度, 连续检测 24 h。以时间(h)为横坐标, 菌悬液 OD_{600} 的值为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.3.4 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 的影响

胞内 pH 的测定参照 Li 等^[18]的方法, 菌液制备同 1.3.1, 将培养后的菌液于 4°C 、 $5\ 000\times g$ 离心 5 min, 弃去上清, 用磷酸钾缓冲溶液洗涤 1 次, 并调整菌悬液的 OD_{600} 为 0.5。使用 50 mmol/L HEPES 缓冲溶液(含有 5 mmol/L EDTA, pH 8.0)洗涤菌体 2 次并重悬于 20 mL HEPES 缓冲溶液。加入 3 $\mu\text{mol/L}$ cFDA-SE 荧光探针, 菌悬液在 37°C 培养箱中孵育 20 min, 用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液(含有 10 mmol/L MgCl_2 , pH 7.0)洗涤 1 次。为消除非共轭的 cFSE 荧光探针, 加入葡萄糖溶液(10 mmol/L)并将菌液在 37°C 培养 30 min。最后, 使用 PBS 缓冲溶液(pH 7.0)洗涤菌体 2 次, 将菌体在冰上保存。实验使用磷酸钾缓冲溶液配制原儿茶酸溶液, 将原儿茶酸溶液添加至菌悬液中, 使原儿茶酸浓度为 0 (对照组)、1/2 MIC 和 1 MIC, 将样品置于 37°C 培养箱中培养 20 min。将样品加入黑色细胞酶标板中, 使用多功能酶标仪测定激发波长为 490 nm 和 440 nm 及发射波长为 520 nm 的荧光强度, 激发和发射缝宽度分别为 9 nm 和 20 nm, 检测温度为 25°C 。检测不含菌悬液的 PBS 缓冲溶液(原儿茶酸浓度分别为 0、1/2 MIC 和 1 MIC)的背景空白荧光值,

测得的各组荧光值均减去对应背景空白荧光值。

使用 cFSE 荧光探针检测不同 pH 缓冲溶液的荧光强度, 构建标准曲线。pH 缓冲溶液的组分包括甘氨酸(50 mmol/L)、柠檬酸(50 mmol/L)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mmol/L)和 KCl (50 mmol/L), 用 NaOH 和 HCl 调整 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0。使用缬氨霉素(10 $\mu\text{mol/L}$)和尼日利亚菌素(10 $\mu\text{mol/L}$)调整细菌细胞 pH, 使胞内 pH 及胞外 pH 相等。

1.3.5 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌膜电位的影响

细菌膜电位的测定参照 Sánchez 等^[19]的方法, 具体如下: 菌液制备同 1.3.1, 以 PBS 缓冲溶液洗涤菌体 2 次并调整菌悬液 OD_{600} 为 0.5。将 125 μL 菌悬液加入黑色细胞酶标板中, 置于 37 °C 培养 30 min。随后向菌悬液中添加原儿茶酸溶液(PBS 缓冲溶液配制), 使原儿茶酸的浓度为 0、1/2 MIC 和 1 MIC, 将细胞培养板置于 37 °C 培养 30 min。向每孔中加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 荧光染料 DIBAC₄(3), 5 min 后使用多功能酶标仪检测荧光强度, 激发/发射波长为 492/515 nm, 激发和发射缝宽度分别为 3 nm 和 5 nm。检测实验背景空白荧光值, 测得的各组荧光值均减去对应背景空白荧光值。

1.3.6 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 的影响

胞内 ATP 浓度的测定方法^[19]具体如下: 按照前述 1.3.1 中的方法制备菌悬液, 使用 PBS 缓冲溶液洗涤菌体 2 次并调整菌悬液的 OD_{600} 为 0.5。向离心管中加入 2 mL 菌悬液, 并添加不同浓度的原儿茶酸溶液(PBS 缓冲溶液配制), 使原儿茶酸浓度为 0、1/2 MIC 和 1 MIC, 将样品置于 37 °C 培养 30 min。随后对样品进行超声处理, 裂解菌体。每个样品超声结束后立即将离心管于 100 °C 处理 2–3 min 使样品中 ATP 酶灭活。将样品用离心机分离(5 000 $\times g$, 5 min), 取上清液加入白色细胞酶标板中, 根据 ATP 检测试剂盒说明书进行检测, 使用多功能酶标仪测定样品上清液的荧光强度。同时, 使用 ATP 检测裂解液将 ATP 标准溶液稀释成 0.01、0.1、1 和

10 $\mu\text{mol/L}$ 的 4 个浓度梯度, 绘制荧光强度与 ATP 浓度间的标准曲线, 并根据标准曲线计算样品中 ATP 的浓度。

1.3.7 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响

参照 Shi 等^[20]的方法, 使用 LIVE/DEAD[®] BacLight 细菌活性检测试剂盒检测原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响。具体方法如下: 菌液制备同 1.3.1, 将菌液于 4 °C、10 000 $\times g$ 离心 15 min, 使用 0.85% NaCl 溶液洗涤菌体 2 次, 随后加入 2 mL 的 0.85% NaCl 溶液。将重悬浮的菌悬液分别取 1 mL 加入到 20 mL 的 0.85% NaCl 溶液(活菌组)和 70% 的异丙醇溶液(死菌组)中, 于 25 °C 培养 1 h。使用 0.85% NaCl 洗脱 2–3 次后将 2 组样品调整至 OD_{600} 为 0.5 (2 组误差不超过 0.01)。添加原儿茶酸于 0.85% NaCl 溶液处理的菌液中, 使原儿茶酸浓度分别为 0、1/2 MIC 和 1 MIC, 并在 37 °C 下放置 30 min 后, 4 °C、10 000 $\times g$ 离心 1 min 后弃去上清, 加入相同体积的 0.85% NaCl 溶液。

以不同体积活菌组菌悬液和死菌组菌悬液配制不同活菌比例的菌悬液(0、10%、50%、90% 和 100%), 向 96 孔黑色酶标板中设置样品空白对照孔(0.85% NaCl 溶液)、样品孔和标准曲线孔, 并向所有孔内加入相同体积 SYTO/PI 的 2 \times 染料, 充分吹打混匀。将 96 孔酶标板置于 25 °C 培养 5–10 min。使用多功能酶标仪检测荧光强度, SYTO 染料的激发/发射波长为 485/542 nm, PI 染料的激发/发射波长为 485/610 nm。

1.3.8 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响

场发射扫描电镜对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的观测参照 Li 等^[21]的方法, 具体如下: 按照前述 1.3.1 中的方法制备菌悬液, 将添加不同浓度原儿茶酸(0、1/2 MIC 和 1 MIC)的菌液(OD_{600} 为 0.5)置于 37 °C 培养, 在 2 h 取出样品。随后, 使用 PBS 洗涤菌体 2 次, 并将菌体重新悬浮于 2.5% 戊二醛-PBS

溶液中固定(4 °C)。12 h 后依次使用 PBS、无菌水洗涤菌体,并将菌体置于 1% (体积比) 钼酸中固定 5 h, 随后使用不同浓度(30%、50%、70%、80%、90% 和 100%) 的乙醇梯度脱水, 每步脱水时间为 10 min。将样品滴加至专用玻片并贴附于场发射扫描电镜载物台, 样品抽真空脱水 2 h 后镀金, 使用场发射扫描电镜观测细菌细胞形态。

1.3.9 数据处理

数据以平均值±标准差的形式表示(n=3), 使用 SPSS 软件(Version 19.0)对数据进行统计分析, 采用 Duncan's ANOVA 对结果间的显著性进行比较, $P \leq 0.05$ 则认为显著, $P \leq 0.01$ 则认为极显著。

2 结果与分析

2.1 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度

结果如表 1 所示, 原儿茶酸对 9 株阪崎克罗诺肠杆菌有良好的抑制作用。原儿茶酸对实验中的 6 株阪崎克罗诺肠杆菌的 MIC 为 5.0 mg/mL, 原儿茶酸对食品来源的分离菌株 12-2、18-7 和 18-13 的 MIC 是 2.5 mg/mL。实验选择 ATCC 29544 进行后续的研究。

2.2 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌生长曲线的影响

由图 1 可知, 浓度为 1/16 MIC 至 1 MIC 的原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的生长有明显的抑制作用。

表 1 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的最小抑菌浓度

Table 1 Minimum inhibitory concentrations of protocatechuic acid against *Cronobacter sakazakii*

Strain	Origin	MIC (mg/mL)
ATCC 29544	儿童咽喉	5.0
ATCC 29004	婴幼儿配方奶粉	5.0
ATCC 12868	婴幼儿配方奶粉	5.0
ATCC BAA-894	人体临床标本	5.0
12-2	婴幼儿米粉	2.5
14-15	婴幼儿配方奶粉	5.0
18-7	婴幼儿米粉	2.5
18-8	婴幼儿配方奶粉	5.0
18-13	婴幼儿配方奶粉	2.5

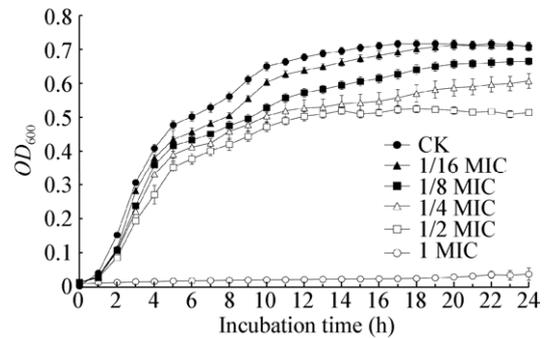


图 1 阪崎克罗诺肠杆菌在含有不同浓度原儿茶酸的 TSB 中的生长曲线

Figure 1 Growth curves of *C. sakazakii* ATCC 29544 cultured in TSB with various concentrations of protocatechuic acid

浓度为 1 MIC 的原儿茶酸基本可以完全抑制阪崎克罗诺肠杆菌 24 h 内的生长, 浓度为 1/16 MIC 至 1/2 MIC 的原儿茶酸使阪崎克罗诺肠杆菌的生长速率减小(对数生长期菌悬液吸光度值增长速度减小), 菌悬液最大吸光度值减小。

2.3 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 的影响

实验结果表明 490 nm 与 440 nm 的荧光比值与阪崎克罗诺肠杆菌的胞内 pH 有良好的线性关系, 线性拟合方程为: $y = -0.7332x + 4.8268$ ($R^2 = 0.9859$), 因此可通过荧光比值推算细菌胞内 pH。由图 2 可知, 经原儿茶酸处理后, 阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 的降低极显著($P \leq 0.01$)。未经原儿茶酸处理的阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 为 6.87 ± 0.06 , 经浓度为 2.5 mg/mL 的原儿茶酸处理后, 阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 降至 4.72 ± 0.06 , 经浓度为 5.0 mg/mL 的原儿茶酸处理后, 阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 降低到 3.83 ± 0.11 。而且, 2 个浓度的原儿茶酸处理组其胞内 pH 也存在极显著的差异($P \leq 0.01$)。

2.4 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜电位的影响

实验所使用的阴离子荧光染料 DIBAC₄(3) 本身无荧光, 当进入细胞后与胞浆内的蛋白质结合可发出荧光。DIBAC₄(3) 进入细胞, 细胞内荧光强度增加, 说明细胞膜电位增加, 表示细胞去极化; 反之,

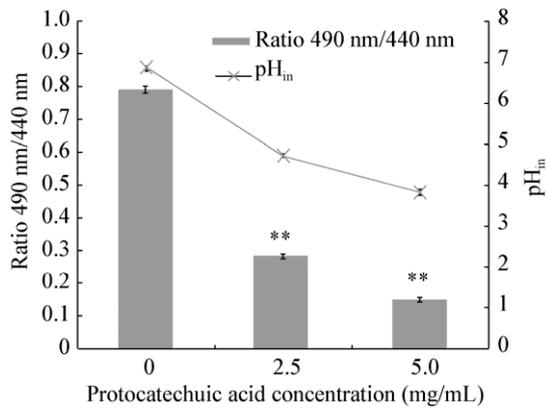


图2 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 胞内 pH 的影响

Figure 2 Effects of protocatechuic acid on the intracellular pH of *C. sakazakii* ATCC 29544

注: **: 与对照组相比, 差异极显著($P \leq 0.01$).

Note: **: Difference is extremely significant compared with the control group ($P \leq 0.01$).

细胞内荧光强度降低, 即膜电位降低, 表示细胞超极化^[22]。从图3可知, 原儿茶酸处理后阪崎克罗诺肠杆菌膜电位有极显著的改变($P \leq 0.01$)。经 2.5 mg/mL 原儿茶酸处理后, 细菌细胞膜电位出现超极化(相对荧光强度负值)。经 5.0 mg/mL 原儿茶酸处理后, 细菌细胞膜电位出现去极化(相对荧光强度正值)。

2.5 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 的影响

经测定, 细菌 ATP 浓度与相对荧光强度有良好的线性关系($y = 1896x + 98.69$, $R^2 = 0.999$), 可通过相对荧光强度的变化确定细菌 ATP 浓度的增减。实验结果显示, 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 浓度有极显著的降低作用($P \leq 0.01$) (图4)。未经原儿茶酸处理的阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 浓度为 1.824 $\mu\text{mol/L}$ 。经浓度为 2.5 mg/mL 原儿茶酸处理后, 阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 浓度降至 0.053 $\mu\text{mol/L}$, 而经 5.0 mg/mL 原儿茶酸处理后, 胞内 ATP 浓度降至 0.011 $\mu\text{mol/L}$ 。而且, 2.5 mg/mL 与 5.0 mg/mL 原儿茶酸处理组之间的胞内 ATP 浓度差异也极显著($P \leq 0.01$)。

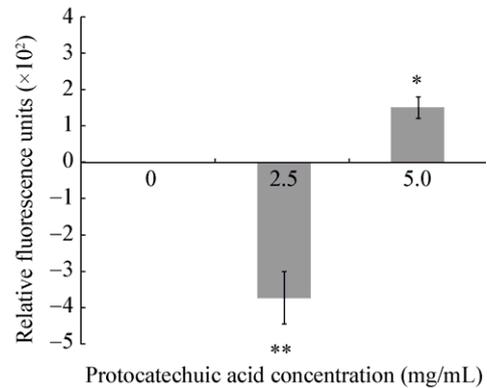


图3 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜电位的影响

Figure 3 Effects of protocatechuic acid on the membrane potentials of *C. sakazakii* ATCC 29544

注: **: 与对照组相比, 差异极显著($P \leq 0.01$).

Note: **: Difference is extremely significant compared with the control group ($P \leq 0.01$).

2.6 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性的影响

实验结果表明, 绿色荧光强度与细胞膜完整的细菌百分比有着良好的线性关系, 线性拟合方程为: $y = 28580x + 11704$ ($R^2 = 0.9929$), 从荧光强度能够反映出含有完整细胞膜的细菌比例。由表2可知, 与对照组相比, 原儿茶酸处理对阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜的完整性有明显破坏作用。经 2.5 mg/mL 原儿茶酸处理后, 阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性降

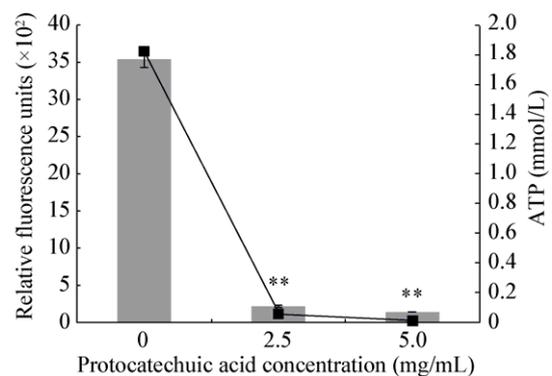


图4 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 胞内 ATP 的影响

Figure 4 Effects of protocatechuic acid on intracellular ATP production by *C. sakazakii* ATCC 29544

注: **: 与对照组相比, 差异极显著($P \leq 0.01$).

Note: **: Difference is extremely significant compared with the control group ($P \leq 0.01$).

表 2 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 细胞膜完整性的影响

Table 2 Effects of protocatechuic acid on the membrane integrity of *C. sakazakii* ATCC 29544

Concentration of protocatechuic acid (mg/mL)	Green fluorescence units	Percent viable cell fluorescence (%)	Percent reduction of viable cell fluorescence (%)
0 (CK)	42451	99	1
2.5	29699	63	37
5.0	25316	48	52

低到 63%，经 5.0 mg/mL 原儿茶酸处理后，阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜完整性降低至 48%。

2.7 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响

原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的细胞形态有明显的影响，如图 5 所示。未经原儿茶酸处理的阪崎克罗诺肠杆菌(图 5A)呈杆状，形态饱满，胞体光滑。经 2.5 mg/mL 原儿茶酸处理后，部分细菌出现表面塌陷，菌体变形(图 5B)。经 5.0 mg/mL 原儿茶酸处理后，细菌细胞表面出现严重的皱缩和塌陷，部分细菌干瘪并丧失了原本的杆状形态(图 5C)。原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌细胞形态的影响随浓度升高而增大。

3 讨论

全球范围内，食源性致病菌引起的感染对各国公共健康卫生均有严重危害，而抗生素的广泛使用

又导致耐药菌株不断出现。因此，随着人们生活水平的提高，消费者对于食品的安全性提出了更高的要求。在此条件下，寻求安全、高效而又不导致耐药的植物源天然抑菌剂已成为研究热点，使用植物源天然物质预防和控制食品中致病性及腐败性微生物已成为流行趋势。原儿茶酸是多种水果、蔬菜的主要成分，也是多种中草药的活性成分，并且已被证明对多种细菌有抑制作用，但原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制作用及机理鲜有报道。本实验首先发现原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌具有良好的抑菌作用，并借助多种荧光探针及场发射扫描电镜探究原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌可能的抑制机理。在实验中，荧光探针扩散进入细胞，可以指示细菌存活生长的重要指标——细胞膜的通透性及完整性是否发生改变。场发射扫描电镜能够观察不同处理对细胞膜损伤的类型及程度，与实验中的探针技术结合分析，综合阐释原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌的抑制机理。

ATP 是细菌最重要的能量分子，在细菌主动运输、繁殖等多种生理过程中起着重要作用，影响 ATP 浓度是抑菌物质发挥抑菌作用的重要目标途径。本实验根据萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase)催化荧光素(D-luciferin)产生荧光时需要 ATP 提供能量的原理，通过检测样品与荧光素酶和荧光素产生的荧光强度计算 ATP 浓度^[23]。在本研究中，相对荧光强

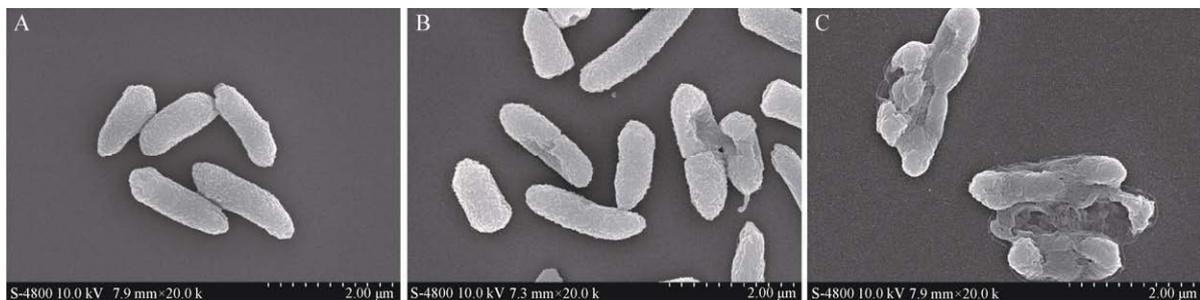


图 5 扫描电镜观测未经原儿茶酸处理(A)、经浓度为 1/2 MIC 原儿茶酸处理 2 h (B)、经浓度为 1 MIC 原儿茶酸处理 2 h (C)阪崎克罗诺肠杆菌 ATCC 29544 的形态

Figure 5 Scanning electron micrographs of *C. sakazakii* ATCC 29544 untreated (A), treated with protocatechuic acid at 1/2 MIC for 2 h (B), treated with protocatechuic acid at 1 MIC for 2 h (C)

注：标尺为 2 μm，放大倍数为 20 000。

Note: The scaleplate is 2 μm and magnification times is 20 000.

度与阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 浓度呈现良好的线性关系, 并且结果表明, 原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌胞内 ATP 浓度具有极显著的降低作用。胞内 ATP 浓度降低的可能原因是: (1) 质子泵水解 ATP 速率增大, 导致 ATP 的快速消耗; (2) 细胞膜通透性改变使胞内 ATP 通过细胞膜泄露^[24]。

实验通过 cFDA-SE 荧光探针技术检测胞内 pH, 其原理是 cFDA-SE 进入细胞后, 可被胞浆内的酯酶催化生成羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE), 发出绿色荧光。同时, CFSE 自发地与细胞内的氨基结合从而偶联到细胞蛋白质上, 过量且未被偶联的探针可通过加入葡萄糖孵育而被清除^[25]。实验结果表明, 原儿茶酸可使阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 显著降低。类似地, 经百里酚和香芹酚等酚类物质处理的金黄色葡萄球菌, 胞内 pH 也呈现明显下降^[26]。胞内 pH 的下降说明细胞膜通透性发生了改变或细胞膜产生了损伤。

细胞膜电位是细胞生命活动过程中伴随的电现象, 存在于细胞膜两侧的电位差称为膜电位。DiBAC₄(3)是一种对细胞膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料, 通常被用作细胞膜电位的指示染料^[27]。本实验发现, 原儿茶酸能够改变阪崎克罗诺肠杆菌的静息膜电位, 产生超级化和去极化。膜电位超级化或去极化的可能原因有: (1) pH 的改变; (2) 细胞膜通透性改变后, K⁺为保持细胞内外电位均衡导致膜电位改变^[28]。类似研究报道证明绿原酸使痢疾志贺氏菌、肺炎链球菌细胞膜发生去极化^[29], 使金黄色葡萄球菌细胞膜出现超级化现象^[30]。

LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 细菌活性检测试剂盒已被广泛用于检测细胞膜完整性的定性和定量研究。PI 和 SYTO[®]9 是其中的 2 种核酸染料。SYTO[®]9 是一种绿色荧光小分子染料, 它能够穿透完整的细胞膜, 可用于识别具有完整细胞膜的菌体, PI 为大分子红色荧光染料, 仅能穿过不完整的细胞膜, 用于识别细胞膜受损的菌体^[31]。国内外研究者也常用检测紫外 260–280 nm 波长下吸光度的方法来检测

细胞质中核酸和蛋白分子的释放, 从而反映细菌细胞膜的损伤^[31]。这种方法简单、快捷且经济, 但是很多天然抑菌物质, 如酚酸类物质本身在 260–280 nm 波长下也有较大吸收峰, 导致在实验中难以准确检测核酸及蛋白质的吸收峰, 从而干扰实验的测定, 因此该方法具有一定的局限性。在本实验中, 原儿茶酸显著影响了阪崎克罗诺肠杆菌细胞膜的完整性, 这可能是由于酚类物质的疏水性基团羟基(–OH)能够结合细胞膜的脂质双分子层, 破坏细胞膜磷脂与蛋白质的相互作用, 改变细胞膜结构、功能和通透性, 使细胞内容物加速流出, 破坏质子动力, 影响电子流入, 从而破坏细菌细胞膜的完整性并使抑菌物质进入细胞^[32]。为了进一步探究原儿茶酸影响细胞膜通透性的原因, 我们使用 ACD/ChemSketch (2012)软件分析了其疏水性及亲水性特征。结果表明, 原儿茶酸的油水分配系数(log Po/w)是 1.16±0.24, 说明原儿茶酸亲油性强于亲水性。因此, 我们综合推测原儿茶酸的抑菌能力是基于其疏水性及其含有羟基的化学结构。

4 结论

原儿茶酸对阪崎克罗诺肠杆菌具有良好的抑制效果, 从实验结果推测其主要是通过影响细胞膜的通透性及细胞功能紊乱来实现抑菌作用。原儿茶酸能够显著增长阪崎克罗诺肠杆菌的生长延滞期, 使阪崎克罗诺肠杆菌胞内 pH 减小、细胞膜电位出现去极化、胞内 ATP 浓度降低、细胞膜的完整性降低以及细胞形态发生改变。因此, 原儿茶酸有潜力作为天然抑菌剂被应用于食品中, 发挥其控制阪崎克罗诺肠杆菌的作用。

REFERENCES

- [1] Iversen C, Waddington M, On SLW, et al. Identification and phylogeny of *Enterobacter sakazakii* relative to *Enterobacter* and *Citrobacter* species[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(11): 5368-5370
- [2] Liu M, Yang BW, Xia XD, et al. Progress in understanding the pathogenic mechanism of *Cronobacter sakazakii*[J]. *Food Science*, 2014, 35(9): 329-333 (in Chinese)
刘咪, 杨保伟, 夏效东, 等. 阪崎克罗诺肠杆菌致病性机理研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 329-333

- [3] Forsythe SJ. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula[J]. *Maternal & Child Nutrition*, 2005, 1(1): 44-50
- [4] Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 38(2): 99-107
- [5] Joshi SS, Howell AB, D'Souza DH. *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins[J]. *Food Microbiology*, 2014, 39: 127-131
- [6] Lin WL, Hsieh YJ, Chou FP, et al. Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage[J]. *Archives of Toxicology*, 2003, 77(1): 42-47
- [7] Pacheco-Palencia LA, Mertens-Talcott S, Talcott ST. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Acai (*Euterpe oleracea* Mart.)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(12): 4631-4636
- [8] Chan K, Chui SH, Wong DY, et al. Protective effects of Danshensu from the aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against homocysteine-induced endothelial dysfunction[J]. *Life Sciences*, 2004, 75(26): 3157-3171
- [9] Galvano F, Vitaglione P, Li Volti G, et al. Protocatechuic acid: the missing human cyanidins' metabolite[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2008, 52(3): 386-387
- [10] Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides[J]. *Journal of Nutrition*, 2007, 137(9): 2043-2048
- [11] Palafox-Carlos H, Gil-Chávez J, Sotelo-Mundo RR, et al. Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'Ataulfo' mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids[J]. *Molecules*, 2012, 17(11): 12657-12664
- [12] Yin MC, Lin CC, Wu HC, et al. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(14): 6468-6473
- [13] Del CM, Varano B, Scaccocchio B, et al. Protocatechuic acid inhibits human dendritic cell functional activation: role of PPAR γ up-modulation[J]. *Immunobiology*, 2014, 219(6): 416-424
- [14] Gutiérrez-Larraínzar M, Rúa J, Caro I, et al. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria[J]. *Food Control*, 2012, 26(2): 555-563
- [15] Xie LW, Guo JF, Zhang YP, et al. Efficient determination of protocatechuic acid in fruit juices by selective and rapid magnetic molecular imprinted solid phase extraction coupled with HPLC[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(32): 8221-8228
- [16] Shi C, Song KK, Zhang XR, et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e159006
- [17] Silva-Angulo AB, Zanini SF, Rosenthal A, et al. Comparative study of the effects of citral on the growth and injury of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e114026
- [18] Li GH, Xu YF, 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
- [19] Sánchez E, García S, Heredia N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(20): 6888-6894
- [20] Shi C, Zhang XR, 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
- [21] Li GH, Wang X, Xu YF, et al. Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*[J]. *European Food Research & Technology*, 2014, 238(4): 589-596
- [22] Lacombe A, McGivney C, Tadepalli S, et al. The effect of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) constituents on the growth inhibition, membrane integrity, and injury of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in comparison to *Lactobacillus rhamnosus*[J]. *Food Microbiology*, 2013, 34(2): 352-359
- [23] Bajpai VK, Sharma A, Baek KH. Antibacterial mode of action of seed essential oil of *Eleutherococcus senticosus* against foodborne pathogens[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2013, 48(11): 2300-2305
- [24] Mempin R, Tran H, Chen C, et al. Release of extracellular ATP by bacteria during growth[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 301
- [25] Urbani S, Caporale R, Lombardini L, et al. Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human mesenchymal stem cells[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(3): 243-253
- [26] Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(3): 453-462
- [27] Suzuki H, Wang ZY, Yamakoshi M, et al. Probing the transmembrane potential of bacterial cells by voltage-sensitive dyes[J]. *Analytical Sciences*, 2003, 19(9): 1239-1242
- [28] Bot C, Prodan C. Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy[J]. *European Biophysics Journal*, 2009, 38(8): 1049-1059
- [29] Lou ZX, Wang HX, Zhu S, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(6): M398-M403
- [30] Li GH, Qiao MY, Guo Y, et al. Effect of subinhibitory concentrations of chlorogenic acid on reducing the virulence factor production by *Staphylococcus aureus*[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014, 11(9): 677-683
- [31] Campos FM, Couto JA, Figueiredo A R, et al. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 135(2): 144-151
- [32] Char CD, Guerrero SN, Alzamora SM. Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2010, 3(5): 752-761