

绿原酸对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败特性的抑制作用

王虹懿^{1,2}, 吴海虹², 张新笑², 刘芳^{2,3}, 孙芝兰^{2,3,*}, 诸永志², 王道营², 徐为民², 彭景^{1,*}

(1.扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127;

2.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014;

3.省部共建国家重点实验室培育基地-江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:首先以群体感应报告菌株紫色杆菌 CV026 检测模型, 确定绿原酸的群体感应抑制活性, 结合 HPLC-MS/MS 检测其对荧光假单胞菌释放信号分子的影响。以胞外酶活性、嗜铁素、群集与泳动为评价指标, 通过添加外源信号分子分析绿原酸对荧光假单胞菌群体感应活性及腐败特性的调控作用。结果表明: 在不影响荧光假单胞菌正常生长的剂量下, 绿原酸可以减少其信号分子的产生, 明显抑制荧光假单胞菌嗜铁素的产生、胞外蛋白酶、胞外脂肪酶活性、群集与泳动等相关腐败特性, 且随着绿原酸浓度的升高, 抑制效果更趋明显。因此, 绿原酸具有较好的群体感应抑制活性, 该研究为绿原酸作为群体感应抑制剂的开发提供了理论支持。

关键词:群体感应, 绿原酸, 荧光假单胞菌, 腐败特性

Inhibitory Activity of Chlorogenic Acid on the Quorum Sensing of *Pseudomonas fluorescens* and its Spoilage Activity

WANG Hong-yi^{1,2}, WU Hai-hong², ZHANG Xin-xiao², LIU Fang^{2,3}, SUN Zhi-lan^{2,3,*},
ZHU Yong-zhi², WANG Dao-ying², XU Wei-min², PENG Jing^{1,*}

(1.College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;

2.Institute of Agricultural Products Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3.Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State

Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology, Nanjing 210014, China)

Abstract: Firstly, the inhibitory activity of quorum sensing of chlorogenic acid was determined by the detection model of *Chromobacterium violaceum* CV026 strain, and the effect of chlorogenic acid on the signal molecules released by *Pseudomonas fluorescens* was detected by HPLC-MS/MS. Based on the evaluation indexes of extracellular enzyme activity, ferritin, colony and swimming, the regulation of chlorogenic acid on colony induction activity and putrefaction of *Pseudomonas fluorescens* were analyzed by adding exogenous signal molecules. The results showed that chlorogenic acid could reduce the AHLs released by *Pseudomonas fluorescens*. Chlorogenic acid could effectively inhibit siderophore production, extracellular protease and lipase, swarming and swimming motility of *Pseudomonas fluorescens*. The concentration was positively correlated with its inhibitory effect. These results showed that chlorogenic acid had a great inhibitory activity, this study provided a basis for expanding the industrial application of chlorogenic acid as a novel inhibitor of spoilage bacteria.

Key words: quorum sensing; chlorogenic acid; *Pseudomonas fluorescens*; spoilage characteristics

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)07-0095-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020.07.017

引文格式: 王虹懿, 吴海虹, 张新笑, 等. 绿原酸对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败特性的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 95-101.

细菌的群体感应也称自身诱导, 是指细菌通过产生和感应信号分子浓度的变化来检测其群体密

收稿日期: 2019-06-17

作者简介: 王虹懿(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: Nikki95215@163.com.

* 通讯作者: 孙芝兰(1984-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 肉品安全与质量控制, E-mail: zhilan408@163.com.

彭景(1962-), 女, 本科, 副教授, 研究方向: 营养与食品卫生学, E-mail: yzupj@163.com.

基金项目: 江苏省农业自主创新基金(CX(18)1006); 江苏省克氏原螯虾产业技术体系(JFRS-03); 国家自然科学基金(31601530); 江苏省食品质量与安全重点实验室自主研究课题(jg201701); 江苏省政策引导类计划(苏北科技专项, SZ-SQ2018033)。

度,进而调控群体行为的过程。自身诱导物随着细菌密度的增高而增高,当自身诱导物达到某一阈值后,会与一些转录调节子结合,从而诱导或抑制多种基因的表达。研究发现群体感应系统(quorum sensing system, QS)主要参与调控细菌胞外酶的分泌、毒力因子的表达和细菌运动等生理性状^[1-2]。经研究发现,大多数革兰氏阴性菌通过QS机制分泌并感应酰基高丝氨酸内酯类分子类信号分子(N-acylhomoserine lactones, AHLs)来判断菌群密度,并以此浓度阈值来调节细菌相关腐败基因的表达,进而在食品腐败过程中发挥致腐作用^[3]。群体感应抑制剂(quorum sensing inhibitors, QSIs)指对细菌间信息交流具有阻碍作用,干扰或抑制QS现象,且对细菌正常生命活动不造成破坏的物质。天然来源的QSI浓度低且毒性小,利用天然QSI阻断细菌群体感应系统,降低腐败菌致腐能力成为当前人类研究的热点。研究发现阿魏精油作为一种新型的QSI可显著抑制紫色杆菌的QS现象^[4]。Chow等^[5]报道了水杨酸对铜绿假单胞菌QS现象具有抑制作用,可有效降低其毒力效应。目前已从药用植物、果蔬、海洋藻类中分离出具有抑制群体感应的天然活性物质。绿原酸是具有生物抑菌活性的天然植物源生物防腐剂^[6],目前已有研究表明绿原酸对多种腐败菌起到一定的抑制效果^[7-8],但将其作为QSI研究其对腐败菌致腐特性的影响却鲜见报道。绿原酸作为新型植物源QSI与传统的防腐剂相比,首先并不妨碍细菌的正常生长,仅在适当浓度时对靶细胞的QS系统起到调控作用,在避免细菌产生耐药性的情况下抑制细菌腐败因子的表达,降低细菌的致腐能力。

致腐微生物的生长是引起肉品腐败变质的关键因素,其中假单胞菌属通常被鉴定为肉类优势腐败菌,假单胞菌在冷鲜肉中的生长速率比其他细菌快三分之一左右^[9-10]。荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)为假单胞菌属嗜冷革兰氏阴性菌,是引起低温条件下高蛋白和高脂肪食品腐败变质的优势腐败菌群^[11]。细菌胞外蛋白酶、脂肪酶作为毒力因子在腐败菌的侵染过程中起重要作用,可降解肉品中的蛋白质、脂肪等物质,产生多种腐败代谢产物,进而使肉类食品风味和品质发生腐败变性。因此,通过干扰或阻断腐败菌之间的信息传递来抑制其致腐特性的表达成为肉品保鲜领域重要的研究课题。本文以*P. fluorescens*为研究对象,探究绿原酸在不抑制其正常生长的条件下,对产生嗜铁素、胞外蛋白酶、胞外脂肪酶、群集泳动等致腐特性的抑制作用,以期拓宽绿原酸在肉品防腐保鲜方面的应用范围,为其作为天然群体感应抑制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试菌株:荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)由江苏省农业科学院农产品加工所自主从冷鲜鸡肉中分离得到;紫色杆菌 *Chromobacterium violaceum* 026 (CV026) 培养时需添加卡那霉素 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,由本实验室保藏;绿原酸(杜仲提取物,98%) 陕西慧科

植物开发有限公司;蛋白酶活性检测试剂盒 索莱宝公司;AHLs类信号分子标准品(C_4 -HSL、 C_6 -HSL、 3-oxo-C_8 -HSL、 C_{10} -HSL、 3-oxo-C_{12} -HSL、 C_{12} -HSL、 C_{14} -HSL) Sigma公司;无水甲醇(HPLC纯) 国药集团;脱脂乳粉、对硝基苯酚、对硝基苯酚棕榈酸酯、Tris-HCl、铬天青S(CAS)、十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA) 生工生物工程有限公司。

JY5002型电子天平 海良平仪器仪表有限公司;SW-CJ-1FD型单人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司;UniCenMR台式高速冷冻离心机 德国 Herolab公司;LDZX-50KBS立式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂;SPX-250B-Z型生化培养箱 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;II-ZX-40高效液相色谱串联质谱分析仪 美国 Agilent公司;Gen5全波长酶标仪 美国伯腾仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 绿原酸对*P. fluorescens*的最小抑菌浓度(MIC)及群体感应抑制活性的检测 将菌株*P. fluorescens*过夜活化两次后,按2%接种量接种于新鲜LB液体培养基中,培养至对数期后收集菌株,用磷酸盐缓冲液(PBS)将细菌重悬至 OD_{600} 为0.5,按2%(V/V)的比例将菌悬液加入到LB液体培养基中混匀。采用二倍稀释法,向上述培养基中加入绿原酸使终浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10 mg/mL ,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后测定 OD_{600} ,以抑制菌株生长的最低绿原酸的质量浓度为MIC。

报告菌株CV026过夜活化两次,按2%的接种量接种于含有20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的新鲜LB液体培养基中,于28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养(180 r/min)至对数生长期,按2%接种量接种于含有20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C_4 -HSL信号分子的LB半固体琼脂培养基,混合均匀后倒平板,待培养基凝固后缓慢放入牛津杯,杯中加入200 μL 1.5 mg/mL 的绿原酸,以体积分数50%甲醇溶液作为空白对照,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后观察紫色素的产生情况。

1.2.2 绿原酸对*P. fluorescens*产信号分子AHLs的影响 AHLs粗提液的制备:活化后的*P. fluorescens*接种于LB液体培养基中,分别添加终浓度为1.5、2、2.5、3 mg/mL 的绿原酸,以未添加绿原酸的液体培养基作为空白对照组。置于30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养(200 r/min)12 h,12000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20 min,取上清液,用等体积乙酸乙酯(含0.1 mL/L乙酸)萃取,吸出有机相,旋转蒸发蒸干有机溶剂(35 $^{\circ}\text{C}$,真空度0.1 MPa),用甲醇充分润洗蒸发瓶,所得甲醇溶液即为AHLs粗提液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

AHLs的检测:以甲醇为溶剂制备含有7种AHLs标准品的混合标准溶液,由HPLC-MS检测确定各AHLs的保留时间,参照马晨晨等^[12]的方法设置色谱、质谱条件,将提取的AHLs粗提液做进一步鉴定。色谱条件:Waters Sunfire C_{18} 色谱柱(50 mm \times 2.1 mm,3.5 μm);流速:0.2 mL/min;进样量:10 μL ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;流动相为甲醇:水(50:50, V/V)等梯度洗脱。质谱条件:离子源温度:120 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂温度

350 ℃;脱溶剂气和锥孔气 N₂,脱溶剂气流速 500 L/h,锥孔气流速 50 L/h;毛细管电压 3.5 kV。样品经 C₁₈ 色谱柱分离后进入质谱,采用电喷雾离子源正离子模式和多反应监测模式,外标法进行定量分析。

1.2.3 绿原酸对 *P.fluorescens* 生长曲线的影响 过夜活化得到的指示菌株按 2% 的接种量接种于 LB 液体培养基中,分别添加终浓度为 1.5、2、2.5、3 mg/mL 的绿原酸,设置未添加绿原酸的液体培养基作为空白对照组,添加 C₄-HSL 信号分子为阳性对照组。将菌液置于 28 ℃ 条件下 200 r/min 摇床培养,每隔 1 h 测定其 OD₆₀₀ 值,记录并绘制生长曲线。

1.2.4 绿原酸对 *P.fluorescens* 腐败特性的影响

1.2.4.1 CASAD 嗜铁素平板法检测嗜铁素含量 无菌上清液处理方法:将过夜活化的 *P.fluorescens* 菌株接种至含有不同浓度绿原酸(1.5、2、2.5、3 mg/mL)和添加外源 C₄-HSL 信号分子(2 μg/mL)的 LB 液体培养基中,于 28 ℃,200 r/min 培养 24 h 后,4 ℃,12000 r/min 离心 2 min,吸取上清液并用 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌备用。

嗜铁素检测平板配制参照参考文献[13],待固体培养基凝固后缓慢放入牛津杯,每孔加入培养液上清 200 μL,28 ℃ 培养 24 h 后观察。由于嗜铁素竞争结合培养基中的铁,使杯周围的培养基由原来的蓝色变成黄色,黄色晕圈的大小代表菌株分泌嗜铁素的含量。

1.2.4.2 绿原酸对 *P.fluorescens* 胞外蛋白酶活性的影响 本研究蛋白酶活性定性检测参照文献采用牛奶平板法^[14],并稍做修改。本研究蛋白酶活性的定量检测使用碱性蛋白酶试剂盒。

牛奶平板法:15% 的脱脂乳粉用纯水溶解后单独灭菌(115 ℃,30 min),取 10 mL 脱脂乳与 90 mL 含 0.85% 琼脂的 LB 半固态营养培养基混合均匀,倾注到水琼脂平板中。待培养基凝固后缓慢放入牛津杯,每孔加入菌液上清 200 μL,28 ℃ 静置培养 24 h 后观察其水解圈直径,设置未添加绿原酸的液体培养基作为空白对照组,添加 C₄-HSL 信号分子为阳性对照组。

蛋白酶含量测定:参照 1.2.4.1 方法制备菌液上清并过滤除菌,根据碱性蛋白酶活性检测试剂盒说明书进行操作,测定 680 nm 处吸光度,按照蛋白浓度计算蛋白酶活性。

1.2.4.3 绿原酸对 *P.fluorescens* 胞外脂肪酶活性的影响 采用对硝基苯酚(p-NP)法进行脂肪酶活性的定量检测^[15],取 90 mg 对硝基苯酚棕榈酸酯(p-NPO)溶解于 30 mL 乙腈溶液中,作为底物溶液存于-20 ℃ 备用。取 100 μL 底物溶液加入 900 μL 50 mmol/L 的 Tris-HCL 缓冲液(pH8.0)中,摇匀后于 37 ℃ 保温 5 min,然后向其加入 50 μL 适当稀释的脂肪酶待测样品,设置相应体积的灭活样品作为空白对照,37 ℃ 振荡反应 5 min。反应结束后,立即加入 300 μL 10% 的三氯乙酸中止反应,摇匀后静置 5 min,加入 300 μL 10% Na₂CO₃ 溶液,摇匀,于 4 ℃,13500 r/min 离心 2 min,取反应液测定 OD₄₁₀ 值。1 个酶活单位定义为:在 37 ℃ 条件下,每分钟水解

p-NPO 释放 1 μmol p-NP 所需的酶量,以 U 表示。计算脂肪酶活性公式如下:

$$X = \frac{cV}{tv}$$

式中:X 为脂肪酶活性,U·mL⁻¹;c 为 p-NP 浓度,μmol·mL⁻¹;V 为终止后总体积,mL;v 为酶液用量,mL;t 为反应时间,min。

1.2.4.4 绿原酸对 *P.fluorescens* 群集运动和泳动的影响 参照文献[16]配制群集琼脂培养基(1% 蛋白胨(质量分数计,下同)、0.5% 氯化钠、0.5% 琼脂和 0.5% 葡萄糖)和泳动琼脂培养基(1% 胰蛋白胨、0.5% 氯化钠、0.3% 琼脂),将不同浓度的绿原酸经 0.22 μm 的滤膜过滤除菌后,与冷却至 40 ℃ 的群集泳动琼脂培养基混匀,倒平板,使平板中绿原酸的终浓度为 1.5、2、2.5、3 mg/mL,设置未添加绿原酸的液体培养基作为空白对照组,添加 C₄-HSL 信号分子为阳性对照组。向冷却的平板中央加入 5 μL 过夜活化的 *P.fluorescens* 菌液,无菌风吹干后 28 ℃ 静置培养 24 h,观察供试菌株的迁移情况。

1.3 数据分析

每组实验均设置 3 个平行并重复操作三次,结果均表示为平均值 ± 标准偏差(n ≥ 3),利用 SPSS 16.0 统计软件,采用最小显著差异法(LSD)分析均值的差异性,显著性水平为 0.05。使用分析软件 Origin 8.5 进行作图。

2 结果与分析

2.1 绿原酸的最小抑菌浓度及 QSIs 活性

采用二倍稀释法观察绿原酸浓度梯度为 0.625~10 mg/mL 时 *P.fluorescens* 和 CV026 菌株的生长情况,确定了绿原酸对 *P.fluorescens* 和 CV026 菌株的最小抑菌浓度均为 5 mg/mL。因此,为保证后续实验效果非绿原酸本身的抑菌作用,绿原酸浓度均设置为亚抑菌浓度^[17],即 1.5、2、2.5、3 mg/mL。

图 1 表示在亚抑菌剂量下绿原酸对紫色杆菌 CV026 QS 活性的影响。紫色杆菌 CV026 紫色素的产生受其群体感应系统的调控,当存在信号分子时,其群体感应系统被激发,产生紫色表型^[17];若样品中含有群体感应抑制剂,则会抑制 CV026 产生紫色素的能力。图 1 显示,加入绿原酸的牛津杯周围出现浑浊、不透明的抑制圈,表明绿原酸在不影响菌株生长的情况下,具有抑制 CV026 群体感应活性的能力。

2.2 绿原酸对 *P.fluorescens* 产 AHLs 的影响

2.2.1 HPLC-MS/MS 检测 AHLs 标准品 HPLC-MS/MS 在所述条件下分别对 7 种 AHLs 信号分子标准品进行检测,得到 AHLs 混合标准品的色谱图(图 2)。可以看出峰分离良好,C₄-HSL、C₆-HSL、3-oxo-C₈-HSL、C₁₀-HSL、3-oxo-C₁₂-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL 标准品保留时间分别为 1.009、1.922、2.421、4.808、4.904、5.306 和 5.928 min。

2.2.2 *P.fluorescens* 释放 AHLs 的检测 *P.fluorescens* 所产生信号分子的种类为:C₄-HSL、C₆-HSL、C₁₀-HSL、C₁₂-HSL 和 3-oxo-C₈-HSL。各类信号分子的质量浓度见表 1,荧光假单胞菌分泌量较高的信号分

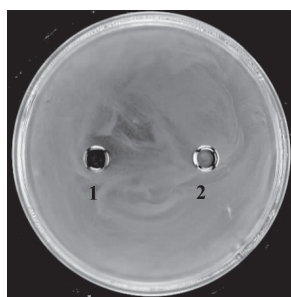


图1 绿原酸对紫色杆菌 CV026 紫色素产生的抑制作用

Fig.1 Effect of chlorogenic acid on violacein production of CV026

注:1:2.5 mg/mL 绿原酸;2:50% 甲醇溶液。

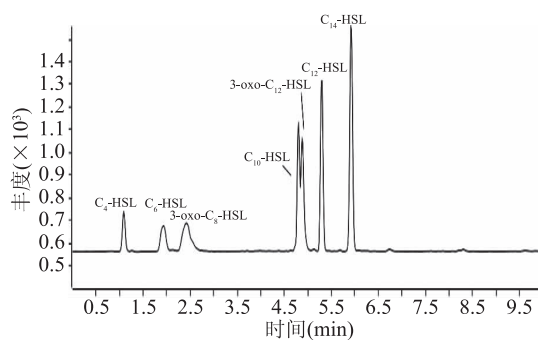


图2 AHLs 混合标准品离子流图

Fig.2 Chromatograms of mixture of AHLs

子为 C_4 -HSL 和 C_6 -HSL。与空白组相比,经绿原酸处理的实验组释放 AHLs 的种类未发生明显变化,但随着绿原酸浓度的增加,各 AHLs 质量浓度明显下降,提示绿原酸能够抑制 *P.fluorescens* 群体感应信号分子的表达或释放,可能是抑制了信号分子合成酶基因(LuxR/LuxI)的表达,使 AHLs 的催化合成释放减少。

表1 荧光假单胞菌 AHLs 信号分子水平($\mu\text{g/L}$)Table1 The AHLs level of *P.fluorescens*($\mu\text{g/L}$)

AHLs	绿原酸浓度(mg/mL)				
	0	1.5	2	2.5	3
C_4 -HSL	3.19	2.70	2.53	0.20	0.14
C_6 -HSL	1.17	1.09	0.81	0.53	0.40
C_{10} -HSL	0.18	0.18	0.12	0.08	0.09
C_{12} -HSL	0.11	0.05	0.04	0.04	0.03
3-oxo- C_8 -HSL	0.12	0.06	0.05	0.05	0.03

2.3 绿原酸对 *P.fluorescens* 生长曲线影响

对生长曲线进行测定能够更加深入地观察菌株的生长情况。由图3可知,低于3 mg/mL 绿原酸浓度处理的 *P.fluorescens* 与对照组的生长趋势基本一致,0~2 h 为细菌生长的迟缓期,2 h 后开始进入生长对数期,经绿原酸处理的菌株生长稍缓于 C_4 -HSL 处理组和空白对照组,至12 h 菌株生长趋于稳定,此时 C_4 -HSL 处理组的 OD_{600} 值为1.40,空白对照组为1.41,添加1.5、2、2.5 mg/mL 绿原酸的处理组 OD_{600} 值分别为1.35、1.37、1.36,与空白对照组几乎保持一致,菌株的生长水平并没有受到明显影响。而经3 mg/mL

绿原酸处理的 *P.fluorescens* 生长明显放缓,于3~4 h 后开始进入生长对数期,在12 h 时其菌体密度 OD_{600} 为1.28。上述结果表明浓度低于3 mg/mL 的绿原酸不影响 *P.fluorescens* 的生长,浓度到达3 mg/mL 时能一定程度减缓 *P.fluorescens* 生长,但对最终的菌体浓度未造成显著影响($P > 0.05$)。

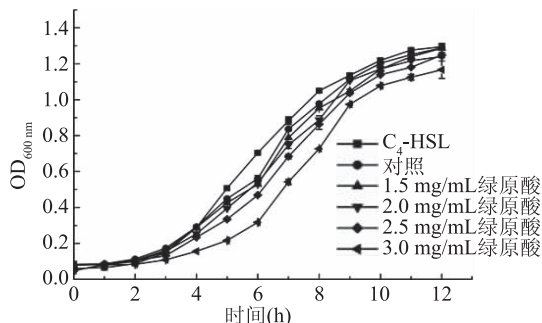


图3 绿原酸对荧光假单胞菌的生长曲线的影响

Fig.3 Effect of chlorogenic acid on the growth curve of *P.fluorescens*

2.4 绿原酸对 *P.fluorescens* 腐败特性的影响

2.4.1 绿原酸对 *P.fluorescens* 嗜铁素产生的影响 嗜铁素的产生是腐败细菌拮抗竞争的一种方式^[18],其作为 *P.fluorescens* 成为优势腐败菌的重要因子,主要通过竞争铁离子影响其他细菌的生长。荧光假单胞菌产生的嗜铁素络合食品基质中的铁离子,使其他微生物得不到足够的铁营养,生长发育受到抑制,从而使其能够维持自身的菌体密度^[19]。李婷婷等^[3]发现 AHLs 对温和气单胞菌嗜铁素产生具有调控作用。Stintzi 等^[20]报道了铜绿假单胞菌通过 QS 调控嗜铁素的产生量。CASAD 嗜铁素平板法检测 *P.fluorescens* 嗜铁素晕圈,结果如图4所示。相比对照组,添加外源 C_4 -HSL 时嗜铁素水解圈直径明显增大,表示嗜铁素生成量增多,而绿原酸处理组嗜铁素的生成量明显降低,且呈浓度效应关系。这表明绿原酸可能通过干扰 *P.fluorescens* 由 AHLs 介导的群体感应系统有效抑制嗜铁素的产生,进而降低其致腐能力。

2.4.2 绿原酸对 *P.fluorescens* 蛋白酶活性的影响 *P.fluorescens* 是肉产品中主要的蛋白分解菌,具有产生高活性蛋白水解酶的能力^[21]。其致腐机理是利用蛋白酶降解肉品中蛋白质,促进自身生长繁殖,同时产生异味和挥发性盐基氮并使肉软化,导致肉品风味和品质发生劣变,甚至产生有毒有害物质^[22]。本文探究不同浓度绿原酸对 *P.fluorescens* 胞外蛋白酶活性的抑制作用,结果如图5所示。与未添加绿原酸处理的对照组相比, C_4 -HSL 处理组水解圈直径更大,经绿原酸处理后蛋白酶水解圈直径明显减小,且水解圈直径与绿原酸浓度呈负相关。

相关研究表明,细菌蛋白酶的分泌受到 QS 系统的调控^[6],且通过添加姜油酮^[23]、富马酸钠^[24]等 QSI 发现,细菌胞外蛋白酶分泌量明显降低。牛奶平板法能初步定性显示蛋白酶的含量,为了定量细菌所产胞外蛋白酶,进一步确定受 AHLs 介导的 QS 系统是否参与调控 *P.fluorescens* 胞外蛋白酶的分泌,探究

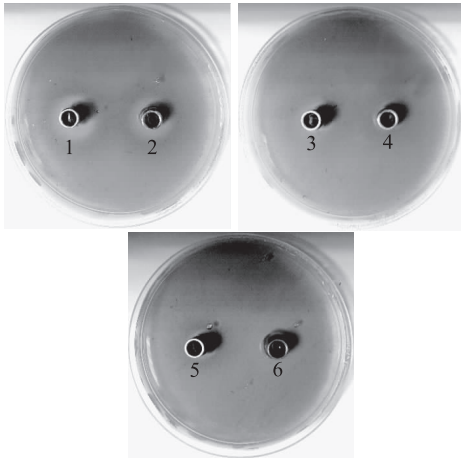


图4 C₄-HSL 和绿原酸对荧光假单胞菌嗜铁素产生的影响

Fig.4 Effect of chlorogenic acid on the siderophore production of C₄-HSL and *P.fluorescens*

注:1:C₄-HSL;2:对照;3:1.5 mg/mL;4:2 mg/mL;5:2.5 mg/mL;6:3 mg/mL。

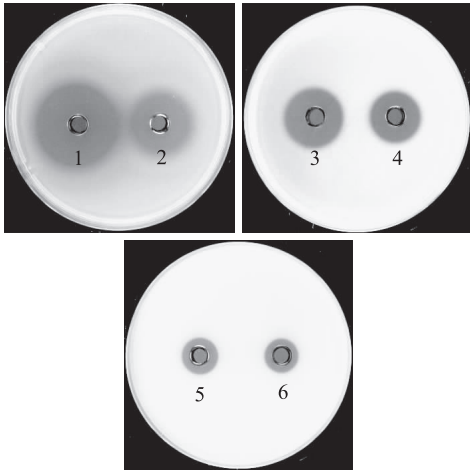


图5 C₄-HSL 和绿原酸对荧光假单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

Fig.5 The effects of C₄-HSL and chlorogenic acid on extracellular protease activity of *P.fluorescens*

注:1:C₄-HSL;2:对照;3:1.5 mg/mL;4:2 mg/mL;5:2.5 mg/mL;6:3 mg/mL。

不同浓度绿原酸对 *P.fluorescens* 胞外蛋白酶活性的影响,采用蛋白酶试剂盒检测蛋白酶活性。结果如图6所示,经外源 C₄-HSL 诱导的细菌菌液上清中蛋白酶活性显著高于包括空白组在内的其他处理组 ($P < 0.05$),高达 0.834 U/mg prot,提示 QS 系统参与调控其胞外蛋白酶的产生。且随着添加绿原酸浓度的升高,*P.fluorescens* 胞外蛋白酶活性逐渐降低,除 2 和 2.5 mg/mL 绿原酸处理组间差异无统计学意义之外 ($P > 0.05$),其余绿原酸处理组之间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。绿原酸浓度为 3 mg/mL 时,胞外蛋白酶活性降低为 0.26 U/mg prot。表明绿原酸可通过干扰 AHLs 介导的 QS 系统来抑制 *P.fluorescens* 胞外蛋白酶活性,且浓度越高,抑制作用越强。

2.4.3 绿原酸对 *P.fluorescens* 脂肪酶活性影响 肉品

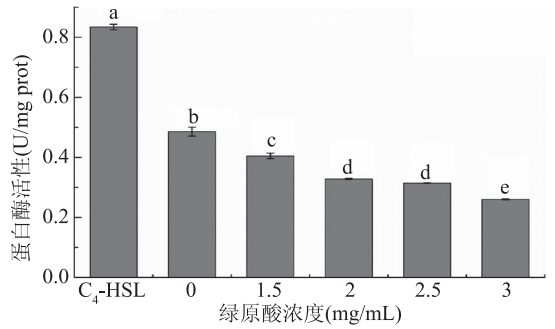


图6 C₄-HSL 和绿原酸对荧光假单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

Fig.6 The effect of C₄-HSL and chlorogenic acid on extracellular protease activity of *P.fluorescens*

注:不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图7同。

中的腐败菌能产生降解肌肉组织的脂肪酶,将甘油三酯降解为甘油或脂肪酸,从而改变禽畜肉组织结构导致腐败。脂肪酶活性可能受到由 AHLs 介导的 QS 系统参与调控,为探究不同浓度绿原酸对 *P.fluorescens* 胞外脂肪酶活性的影响,采用 p-NPP 比色法测定不同处理菌株的脂肪酶活性,结果由图7可知。通过比较分析发现,当 C₄-HSL 存在时脂肪酶活性最高,达 0.49 U/mL,其余实验组酶活性均显著低于 C₄-HSL 处理组 ($P < 0.05$),提示其胞外脂肪酶的产生受到 QS 系统影响。各浓度绿原酸处理组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中经 3 mg/mL 绿原酸处理后 *P.fluorescens* 酶活性最低,仅为 0.074 U/mL。说明绿原酸能明显抑制荧光假单胞菌胞外脂肪酶活性,且浓度越高,抑制作用明显。研究中发现 *P.fluorescens* 脂肪酶活性普遍偏低,可能与培养基和发酵等培养条件相关;其次有研究表明细菌脂肪酶的分泌需要同源分泌系统,但细菌脂肪酶基因一般受到严格的表达调控,其机制和途径复杂,导致细菌脂肪酶(特别是假单胞菌属脂肪酶)产量普遍不高^[25]。

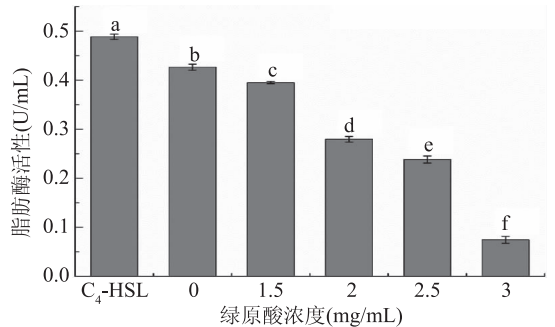


图7 C₄-HSL 和绿原酸对荧光假单胞菌胞外脂肪酶活性的影响

Fig.7 The effect of C₄-HSL and chlorogenic acid on extracellular lipase activity of *P.fluorescens*

2.4.4 绿原酸对 *P.fluorescens* 群集与泳动的影响 群集和泳动作为细菌的两种迁移方式,其区别在于前者是群体行为,指细菌在大于 0.45% 的琼脂培养基上的表面迁移,后者则是一种个体行为,指细菌在小于 0.45% 的琼脂培养基表面迁移^[26-27]。细菌鞭毛介导的运动特性在定殖到宿主表面及后续生物被膜形

成过程中起到重要作用^[28]。细菌的运动性被证实定植到宿主表面后菌体聚集导致微菌落及后继形成生物膜的过程中发挥关键作用^[29]。图8、图9为不同浓度下绿原酸对 *P. fluorescens* 群集与泳动的抑制效果图。由图8、图9可以看出,添加 C_4 -HSL 的处理组菌株运动能力明显强于对照组和其他任何浓度绿原酸处理的菌株,其群集与泳动直径分别为 27.26、30.10 mm,进一步说明了 AHLs 可调控 *P. fluorescens* 的运动能力,而经绿原酸处理后荧光假单胞菌的运动性受到明显的抑制,且 *P. fluorescens* 群集和泳动运动特性与绿原酸的添加量呈负相关。表明 *P. fluorescens* 运动能力受群体感应系统调控,且绿原酸可能干扰了荧光假单胞菌鞭毛粘附至接触面的能力^[28],进而影响其致病能力。

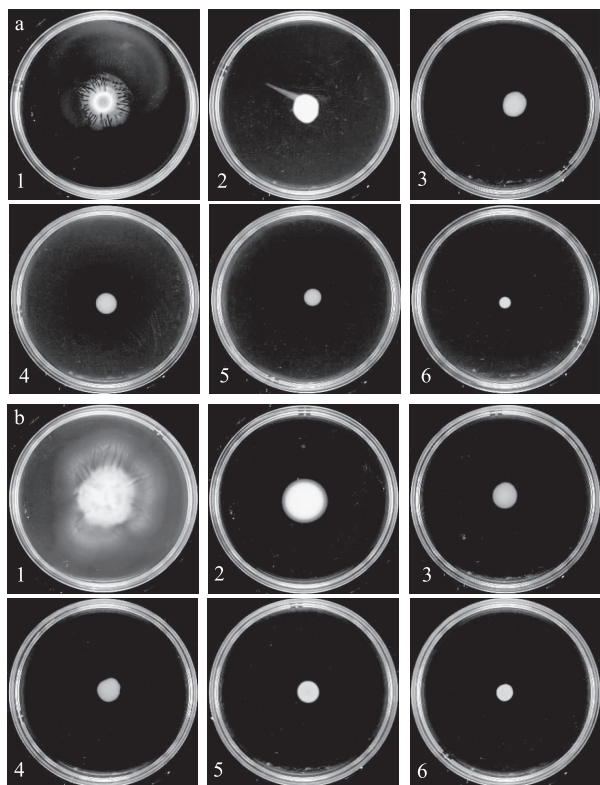


图8 C_4 -HSL 和绿原酸对荧光

假单胞菌群集(a)和泳动(b)的影响

Fig.8 The effects of C_4 -HSL and chlorogenic acid

on swarming and swimming of *P. fluorescens*

注:1: C_4 -HSL;2:对照;3:1.5 mg/mL;

4:2 mg/mL;5:2.5 mg/mL;6:3 mg/mL。

3 结论

利用紫色杆菌 CV026 检测模型证明了绿原酸具有群体感应抑制活性;绿原酸在不影响 *P. fluorescens* 正常生长的条件下明显抑制了 *P. fluorescens* 与腐败相关的生物特性。*P. fluorescens* 这些腐败特性的表达均受由信号分子介导的 QS 的调控,当添加 3 mg/mL 以下亚抑菌浓度的绿原酸时,嗜铁素、蛋白酶活性、脂肪酶活性、群集和泳动能力均受到明显的抑制,且随着绿原酸浓度的增加,抑制效果更趋明显。此外, HPLC-MS/MS 检测结果表明,绿原酸能够有效降低

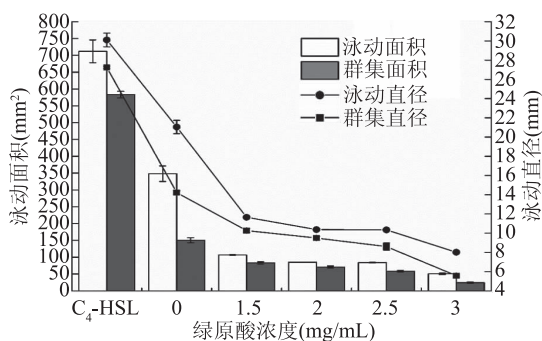


图9 C_4 -HSL 和绿原酸对荧光假单胞菌运动区直径和面积的影响

Fig.9 The effect of C_4 -HSL and chlorogenic acid

on diameter and area of the motility zone of *P. fluorescens*

P. fluorescens AHLs 的释放。因此推测绿原酸可能通过降解 *P. fluorescens* 信号分子的方式来阻断 *P. fluorescens* 的群体感应系统,从而减弱其腐败特性的表达,证实了绿原酸良好的群体感应抑制活性,但对其调节细菌 AHLs 的分泌进而抑制致病能力的分子机制尚未明了,因此可以进一步解析绿原酸对腐败菌 QS 系统的调控靶点及作用方式,为其作为新型 QSI 的开发提供理论支撑,促进其在食品防腐保鲜中发挥优势作用。

参考文献

- [1] Whitehead N A, Barnard A M L, Slater H, et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2001, 25: 364-404.
- [2] 蔡国红,董明盛,陈晓红,等.鱼源假单胞菌群体感应信号分子与腐败特性相关关系的研究[J].中国农业科学,2007(7):1486-1491.
- [3] 李婷婷,崔方超,马艳,等.群体感应 AHLs 对温和气单胞菌体外致腐因子分泌的影响[J].食品与发酵工业,2017,43(3):54-60.
- [4] 王锦利,周爱莲,林其洋,等.阿魏植物精油对紫色杆菌群体感应的抑制影响[J].现代食品科技,2016(10):90-95.
- [5] Chow S, Gu K, Jiang L, et al. Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation [J]. Mccarthy, 2011, 15: 22-29.
- [6] 王文龙,文超越,郭秋平,等.绿原酸的生物活性及其作用机制[J].动物营养学报,2017,29(7):2220-2227.
- [7] Xiong J, Li S, Wang W, et al. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves [J]. Food Chemistry, 2013, 138(1): 327-333.
- [8] Li G, Wang X, Xu Y, et al. Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus* [J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(4): 589-596.
- [9] Kim J S. The inhibitory effect of natural bioactives on the growth of pathogenic bacteria [J]. Nutrition Research & Practice, 2007, 1(4): 273-278.
- [10] 章彬.冷鲜鸡加工及贮藏过程中的微生物调查及气调保鲜技术应用研究[D].扬州:扬州大学,2017.
- [11] Olanya O M, Ukuku D O, Niemira B A. Effects of

temperatures and storage time on resting populations of *Escherichia coli* O157: H7 and *Pseudomonas fluorescens* in vitro [J]. Food Control, 2014, 39(1): 128-134.

[12] 马晨晨, 欧杰, 王婧. 肉类腐败性假单胞菌群体感应信号分子的研究[J]. 微生物学报, 2013, 40(11): 2005-2013.

[13] Shin S H, Lim Y, Lee S E, et al. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(1): 89-95.

[14] Vijayaraghavan P, Vincent S G P. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresol green dye [J]. Journal of Biochemical Technology, 2013, 4(3): 628-630.

[15] 方倩, 谢芝玲, 陈汉娜, 等. 脂肪酶 lipAB 操纵子在防御假单胞菌中的克隆、表达及活性研究[J]. 激光生物学报, 2018, 27(5): 62-70.

[16] Zhang J, Rui X, Wang L, et al. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation [J]. Food Control, 2014, 42: 125-131.

[17] 陈桂芳, 李学鹏, 王彦波, 等. 肉桂油对大菱鲆荧光假单胞菌腐败能力的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2016, 37(8): 313-317.

[18] 李学鹏, 陈桂芳, 仪淑敏, 等. 基于群体感应研究丹皮提取物对嗜水气单胞菌致腐性的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2018, 18(3): 196-204.

[19] 崔方超, 李婷婷, 刘明爽, 等. 大菱鲆荧光假单胞菌的群体感应现象及不同碳源培养下的腐败特性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(12): 49-55.

[20] Stintzi A, Evans K, Meyer J, et al. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasRllasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis [J]. FEMS

Microbiology Letters, 1998, 166(2): 341-345.

[21] Hinton A, Cason J A, Ingram K D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(2): 155-165.

[22] Myszka K, Schmidt M T, Majcher M, et al. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens*, KM121 by *Thymus vulgare*, essential oil and its major bioactive compounds [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 114: 252-259.

[23] Lokender K, Sanjay C, Rajnish K, et al. Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Fitoterapia, 2015, 102: 84-95.

[24] 孙晓佳, 李婷婷, 赫彬彬, 等. 富马酸钠对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 7-13.

[25] Rosenau F, Jaeger K E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion [J]. Biochimie, 2000, 82(11): 1023-1032.

[26] 赵龙华, 杨维青. 细菌群集运动与生物被膜和耐药性的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(17): 1986-1988.

[27] Servant A, Qiu F, Mazza M, et al. Controlled *in vivo* swimming of a swarm of bacteria-like microrobotic flagella [J]. Advanced Materials, 2015, 27(19): 2981-2988.

[28] Packiavathy I A S V, Priya S, Pandian S K, et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa* [J]. Food Chemistry, 2014, 148: 453-460.

[29] 郭俏. 铜绿假单胞菌致病因子抑制剂及喹诺酮信号分子介导的调节途径研究[D]. 西安: 西北大学, 2013.

(上接第 88 页)

[34] Isa K, Oka K, Beauchamp N, et al. Safety assessment of the *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588(R) probiotic strain including evaluation of antimicrobial sensitivity and presence of *Clostridium* toxin genes *in vitro* and teratogenicity *in vivo* [J]. Human & Experimental Toxicology, 2016, 35(8): 818-832.

[35] Bryan L E, Kwan S. Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically

[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1981, 8(suppl D): 1-8.

[36] Nicolaou S A, Gaida S M, Papoutsakis E T. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation [J]. Metabolic Engineering, 2010, 12(4): 307-331.

(上接第 94 页)

as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 1809-1813.

[26] Comitini F, De J I, Pepe L, et al. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts [J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 238(1): 235-240.

[27] Wang L, Yue L, Chi Z M, et al. Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus* [J]. Dis Aquat Organ, 2008, 80(3): 211-8.

[28] Buzdar M A, Chi Z, Wang Q, et al. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91(6): 1571-1579.

[29] Liu G L, Chi Z, Wang G Y, et al. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications [J].

Crit Rev Biotechnol, 2015, 35(2): 222-234.

[30] Izgü F, Altınbay D. Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an $\text{exo-}\beta\text{-1, 3-glucanase}$ [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(3): 685-693.

[31] Takasuka T, Komiya T, Furichi Y, et al. Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin - 1 on *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Cell Mol Biol Res, 1995, 41: 575-581.

[32] Klassen R, Paluszynski J P, Wemhoff S, et al. The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA Gln [J]. Mole Microbiol, 2008, 69(3): 681-697.

[33] 郭凤君. 海洋嗜杀酵母 *Wickerhamomyces anomalus* YF07b 菌株新型嗜杀因子的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 11-20.