

UVC-GA 抑制牡蛎肉质表面 *E. coli* O157:H7 生长

甘晖¹, 关意寅¹, 王园园², 阮志德³, 杨琼³, 陈秀荔³, 卢小花³, 马华威³, 吕敏³

(1. 广西水产畜牧学校水产专业科, 广西南宁 530021) (2. 广西小研人生物科技有限公司, 广西南宁 530000)

(3. 广西水产科学研究院, 广西南宁 530021)

摘要: 紫外辐射食没子酸抑菌液 (UVC-GA) 是通过紫外线短波 (UV-C) 辐照没食子酸 (GA) 开发一种新型光诱导增强 GA 抑菌的方法, 将 UV-C 辐照 GA 12 h 形成新型 UVC-GA 抑菌液, *E. coli* O157: H7 减少量达 3.57 log cfu/mL, 比 GA 显著高 22.33 倍。UVC-GA 的抑菌活性受辐照时间、波长和 pH 的影响, 60 min 辐照后使 *E. coli* O157: H7 减少 4.42 log cfu/mL, 比紫外线中波 UVB-GA 和紫外线长波 UVA-GA 显著高 64.25% 和 223.47%, pH 3 下比 pH 7 和 pH 11 分别高 94.23 倍和 87.62 倍。UVC-GA 加入苯磺酸 (BSA) 后抗菌活性显著降低至 0.63 log cfu/mL ($p < 0.05$), 说明 UVC-GA 内的醌类化合物增强了其抗菌活性。加入活性氧 (ROS) 猝灭剂, UVC-GA 比二甲基亚砷 (DMSO) 和甘露醇处理组比 UVC-GA 抗菌效果显著降低了 4.56% 和 8.15% ($p < 0.05$), 且 UVC-GA 内有过氧化氢的生成及 *E. coli* O157: H7 氧化应激水平增加, 表明 ROS 在 UVC-GA 的抗菌作用中也起着一定的作用。结果表明, UVC-GA 可有效抑制牡蛎肉质表面 *E. coli* O157: H7, 正确处理 UV-C 辐照的 GA 可作为一种新型抑菌液应用于牡蛎或其它食品的抑菌。

关键词: 牡蛎; 没食子酸; UV-C; *E. coli* O157: H7; 活性氧; 醌

文章编号: 1673-9078(2020)11-61-69

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.11.0421

UV-C-irradiated Gallic Acid Solution (UVC-GA) Inhibited the Growth of *E. coli* O157:H7 on the Surface of Oyster Flesh

GAN Hui¹, GUAN Yi-yin¹, WANG Yuan-yuan², RUAN Zhi-de³, YANG Qiong³, CHENG Xiu-li³, LU Xiao-hua³, MA Hua-wei³, LYU Min³

(1. Guangxi Aquatic Animal and Husbandry College, Fisheries Division, Nanning 530021, China) (2. Guangxi Little Scientist Biotech Company, Nanning 530000, China) (3. Guangxi Academy of Fishery Science, Nanning 530021, China)

Abstract: A novel ultraviolet-irradiated gallic acid antibacterial solution (UVC-GA) was developed using a new method of light-induced enhancement of GA antibacterial activity through exposing gallic acid (GA) to UV-C for 12 h. The GA solution obtained after UVC-GA for 12 h could reduce *E. coli* O157: H7 by 3.57 log cfu/mL (which was 22.33 times higher than that of GA). The antibacterial activity of UVC-GA solution was affected by the irradiation duration, wavelength and pH. After 60 min of irradiation, UVC-GA reduced *E. coli* O157: H7 by 4.42 log cfu/mL, which was significantly higher than UVB-GA and UVA-GA by 64.25% and 223.47%; The reduction of *E. coli* O157: H7 by UVC-GA at pH 3 was 94.23 and 87.62 times, respectively, higher than those at pH 7 and pH 11. The addition of benzenesulfonic acid (BSA) to UVC-GA lowered *E. coli* O157: H7 to 0.63 log cfu/mL ($p < 0.05$), indicating that quinone compounds in UVC-GA enhanced its antibacterial activity. The addition of reactive oxygen species (ROS) quencher to UVC-GA significantly ($p < 0.05$) reduced the antibacterial effect by 4.56% and 8.15%, respectively, compared with those of the DMSO-treated group and the mannitol-treated group ($p < 0.05$). The generation of hydrogen peroxide and the increase of *E. coli* O157: H7-induced oxidative stress indicated the contribution of ROS to the antibacterial effect of UVC-GA. The results showed that UVC-GA could effectively inhibit *E. coli* O157: H7 on the surface of oyster flesh, and correctly treated UV-C irradiated

引文格式:

甘晖,关意寅,王园园,等.UVC-GA 抑制牡蛎肉质表面 *E. coli* O157:H7 生长[J].现代食品科技,2020,36(11):61-69

GAN Hui, GUAN Yi-yin, WANG Yuan-yuan, et al. UV-C-irradiated gallic acid solution (UVC-GA) inhibited the growth of *E. coli* O157: H7 on the surface of oyster flesh [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(11): 61-69

收稿日期: 2020-05-07

基金项目: 广西重点研发计划项目 (2018AB45010); 广西科技重大创新项目 (AA17204095-4); 广西重点实验室自主创新项目 (AA19204095-1)

作者简介: 甘晖 (1976-), 女, 高级工程师, 研究方向: 水产品加工与贮藏

通讯作者: 马华威 (1986-), 男, 工程师, 研究方向: 水产食品生物技术与加工贮藏; 吕敏 (1977-), 女, 工程师, 研究方向: 水产加工与贮藏工程

GA can be used as a novel antimicrobial solution for sterilization of oyster products and other foods.

Key words: oyster; gallic acid; UV-C; *E. coli* O157:H7; reactive oxidative species; quinone

由于微生物的耐药性及其对食品保鲜处理方式的耐受度增强,寻找有效抑菌杀菌的新型抗菌物在食品领域受到极大重视^[1]。新型天然抗菌活性物是一种有效替代物,其不仅能减少食品中的致病微生物、腐败微生物,还能保证食品的质量安全^[1-3]。酚类化合物是植物化合物中最多样的一类具有高效抗菌性能的天然活性物,广泛存在于各种水果、蔬菜、种子、茶叶和葡萄酒^[4,5]。然而,当这些酚类化合物单独使用时抑菌活性不足,不能在较短时间内迅速抑制或杀死食品中有害病菌^[6]。为了提高天然抑菌药物的抑菌效力,如酚类物,目前常采用温和抗菌物与其他干预方法相结合的协同抑菌抗菌方法^[7]。

没食子酸(GA, 3,4,5-三羟基苯甲酸)是从各种植物、水果和蔬菜中提取的一种天然多羟基苯酚化合物,对人体安全无害^[8,9]。GA能抑制多种浮游细菌、生物膜和真菌,这与它产生活性氧(ROS)和分解细菌膜的能力有关^[10-12]。然而,GA对大肠杆菌(*Escherichia coli*) O157: H7等食品病原体的杀菌作用较弱,因为需要GA浓度高、处理时间长,并且无法灭活高密度稳定期菌群。据研究称,稳定期*E. coli* CETE 434在15 mM GA暴露60 min后,仅减少1 log cfu/mL^[13]。另有研究表明,GA抑制稳定期的金黄色葡萄球菌和*E. coli* O157: H7的最小抑制浓度均为2500 mg/L^[14]。因此,单独使用GA保鲜食品有局限性。

基于光谱学的杀菌技术是一种新型非热抗菌方法,包括紫外线辐照、蓝光辐照及其他光谱技术^[15]。Nakamura等研究了不同类型光辐照的多种多酚类溶液,获得高抗菌的新型杀菌溶液,如咖啡酸、GA和花青素均与蓝光结合能有效抑制革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌^[16-18]。Cossu等人建立了GA和紫外线长波UV-A协同作用技术,能破坏菠菜表面的*E. coli* O157: H7生物膜^[19]。苯甲酸或姜黄素与UV-A或可见光结合可致抑制菠菜表面细菌^[20,21]。然而,上述研究均要求光源和受光辐照的化合物同时发挥抑菌活性,由于光源要求严格,这可能会限制光使用。

本研究旨在开发一种新型光增强抗菌技术,以牡蛎肉质为研究对象,采用UV-C辐照GA生成UVC-GA抗菌液,采用*E. coli* O157:H7模型细菌,评价了UVC-GA的杀菌特性,并研究了其增强抗菌活性的潜在机制,为该技术应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

由广西小研人生物科技有限公司提供,鲜活牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)平均壳长为10±1.32 cm。2019年8月份采样,将收集的牡蛎装入放有生物冰袋的聚乙烯袋,然后1 h内运至实验室。在实验室内,活牡蛎用清水冲洗以清除贝壳和肉中的泥浆、沙子和污垢物。随后挑取牡蛎肉质放置保鲜专用塑料袋中,-18℃存放备用。

模型菌*E. coli* O157:H7(ATCC #700728),广东微生物研究所提供。

GA(食品级)、甘油、DMSO、甘露醇、过氧化氢酶、碘化丙啶(PI),北京博奥拓达科技有限公司;胰蛋白酶大豆汤、缓冲蛋白胨水、胰蛋白酶大豆琼脂,北京金克隆生物技术有限公司;Fe(II)、 α -(4-吡啶基-1-氧化物)-N-叔丁基硝基酮(POBN)、过氧化氢酶(300 U/mL,源于牛肝脏)、Amplex™ Red 过氧化氢检测试剂盒,上海阿拉丁生化科技有限公司;二苯砷酸-2-氨基乙酯(DPBA)、伊红亚甲基蓝琼脂(EMBA)、磷酸盐缓冲液、二甲酚橙,北京威瑞克化工有限公司。

1.2 仪器与设备

17I-331 UV-C,北京金克隆生物技术有限公司;SpectraMax M5e 平板阅读器、0.25 μ m 无菌过滤器、无菌晶体 petri 培养皿,广州基准科技服务有限公司;Miniscope MS 400 X-band 光谱仪,德国 Magnetech;电子顺磁共振仪器(EPR),美国 VWR international 公司;LC-2010A HPLC、内置 LC-2010 泵、LC-2010 自动采样仪、LC-2010 UV-Vis 检测仪、LabSolution V5.81 软件,日本 Kyoto 公司;CellROX® Green Reagent 荧光探针, Cayman Chemical 公司;C18 Phenomenex 柱子(250 mm×4.6 mm, 10 μ m),美国 Torrance 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 制备 UVC-GA 溶液

实验采用台式UV-C间歇式光源,波长为254 nm,平均强度为4540 μ W/cm²,最大液体穿透力为17 cm。将GA用去离子水(DI)稀释至0.15 mol/L的标准浓

度, 转移至灭菌晶体培养皿, 在 UV 室中以 4 J/cm^2 强度持续辐照 12 h。采用 $0.25 \mu\text{m}$ 孔径的无菌过滤器过滤辐照后的 GA, 获得 UVC-GA 抗菌液并黑暗处室温储存, 为保证 UVC-GA 抗菌活性的稳定性, 储存不超过 4 周。

1.3.2 模型细菌选择、培养和抗菌效果测定

实验采用非致病性 *E. coli* O157:H7 为模型菌, 菌株接种在含 20% 甘油的胰蛋白酶大豆汤 (TSB) -18 °C 保存。使用前将保存菌株转移到胰蛋白酶大豆琼脂培养基 (TSA) 中重新活化, 4 °C 储藏 4 周。实验时, 将菌株在胰蛋白酶大豆肉汤 (TSB) 37 °C 培养 20 h, 以获得稳定期菌群 (约 $9 \log \text{cfu/mL}$)。为测定 UVC-GA 对稳定期菌群的抑菌效果, 将细菌用缓冲蛋白胨水稀释、悬浮后, 孵育至初始浓度达到 $7 \log \text{cfu/mL}$, 并接种在 TSA 培养基中 37 °C 培养 24 h, 测定菌落总数。

1.3.3 测定 UVC-GA 的紫外-可见光谱 (UV-Vis) 吸收谱

根据 Du 等人方法^[22]检测 UVC-GA 中新化合物形成。将所有待测样品转移至透明紫外试管中, 并设置未辐照的 GA 溶液为空白对照组。利用 SpectraMax M5e 平板阅读器以 1 nm 为间隔距离记录各样品的 UV-vis 波谱, 检测波长范围为 200~800 nm。

1.3.4 UVC-GA 溶液中半醌自由基和羟基自由基的电子顺磁共振 (EPR) 分析

利用 EPR 方法测定 UVC-GA 的半醌自由基生成量^[22]。20 mL GA (0.15 mol/L) 加入直径为 200 nm 的无菌晶体 petri 培养皿, UV-C 波长和辐照强度分别为 254 nm 和 10 W, GA 被辐照 30 min, 移至 50 μL 校正吸液管, 采用 Miniscope MS 400 X-band 光谱仪记录 EPR 波谱。检测条件为: 扫场域 335.51~337.24 mT, 场调制宽度 0.02 mT, 扫描期 60 s, 微波频率 9.743 GHz, 接收器增益量 200~900。用 10 mol/L 的 NaOH 调天然 GA ($\text{pH}=3$) 至中性 ($\text{pH}=7$) 或碱性 ($\text{pH}=11$)。同时, 制备无辐照阳性对照样品^[23]。

采用 EPR 旋转追踪技术测定 UVC-GA 的羟基自由基生成量^[17]。将 1 mL GA (0.15 mol/L)、30 μL POBN (0.2 mol/L) 和 20 μL Fe (II) ($5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 混合, 倒入封闭石英管, 用 UVC 辐照 (254 nm, 10 W) 30 min。移至 50 μL 校正吸液管, 采用 Miniscope MS 400 X-band 光谱仪记录 EPR 波谱。检测条件为: 扫场域 330.96~341.31 mT, 场调制宽度 0.1 mT, 扫描期 60 s, 微波频率 9.743 GHz, 接收器增益量 200~900。用 10 mol/L 的 NaOH 调节 GA 溶液的 pH 至 7 和 11^[24]。将 1 mL 过氧化氢 ($183 \mu\text{M}$)、30 μL POBN、20 μL Fe (II) 混合反应 30 min, 以制备无辐照的阳性对照样品。

1.3.5 ROS 清除剂对 UVC-GA 抗菌液活性的影响

采用 Bektaşoğlu 等方法研究^[25]ROS 清除剂对 UVC-GA 的影响。将过氧化氢清除剂过氧化氢酶 (300 U/mL) 及羟基自由基清除剂 DMSO (0.7 mol/L) 与甘露醇 (0.1 mol/L) 分别加入 0.15 mol/L UVC-GA。然后将悬浮菌液加至上述各混合溶液中孵育 30 min, 并设置不含过氧化氢酶的 UVC-GA、GA 和 DI 三个对照组。

1.3.6 UVC-GA 溶液中过氧化氢的测定

过氧化氢能将亚铁离子转化为铁离子, 并与二甲酚橙形成显色复合物, 通过分光光度计测定含量^[26]。本实验采用亚铁离子-二甲酚橙 (FOX) 显色法检测 UVC-GA 的过氧化氢含量。将 15 mM UVC-GA 溶液与过氧化氢酶 (300 U/mL) 混合反应作为目标测试样品, 不含过氧化氢酶的 UVC-GA 作为对照组。FOX 测试体系由 0.01 mol/L 二甲酚橙、 0.01 mol/L 硫酸亚铁、 0.25 mol/L 硫酸构成。 $100 \mu\text{L}$ FOX 加入各待测样品 ($300 \mu\text{L}$) 后, 室温孵育 30 min, 用 SpectraMax M5e 平板阅读器在波长 560 nm 处记录反应液吸收波谱, 基于系统内置标准曲线测定过氧化氢浓度。采用 Amplex™ Red 过氧化氢试剂盒验证过氧化氢浓度。用 DMSO 制备 Amplex™ Red 储存液制备, 避光存放并当天使用。测试溶液含有 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ Amplex™ Red reagent、 0.2 U/mL 过氧化氢酶、各待测样品, 并以 1:1 比例加入 96 孔平板, 室温孵育 30 min, 用 SpectraMax M5e 平板阅读器在波长 560 nm 处测定其吸收波谱, 根据同一试剂盒的标准曲线测定过氧化氢浓度。

1.3.7 模型菌 *E. coli* O157:H7 细胞内氧化应激分析

CellROX® Green Reagent 是一种检测细胞内氧化应激的荧光探针, 可用于测定不同处理条件下 *E. coli* O157:H7 细胞内氧化应激反应状况, 细胞内发生氧化时探针显示稳定性绿色荧光^[27]。稳定期 *E. coli* O157:H7 (约 $9 \log \text{cfu/mL}$) 被 0.15 mol/L UVC-GA 抗菌液和 GA 溶液分别处理, 另外设置两个对照组 HCl ($\text{pH}=3$) 和 DI。CellROX® Green probe 加入各待测样品中, 最终浓度达 $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, 37 °C 孵育 30 min。然后, 各样品用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 再悬浮, 并转移至 96 孔平板, 用 SpectraMax M5e 平板阅读器在 485/520 (吸收波长/发射波长) 测定荧光强度。校正荧光强度 (CF) 指处理组样品荧光强度 (TFG) 减去对照组荧光强度 (CFG), 公式如下。

$$CF = TFG - CFG$$

1.3.8 *E. coli* O157:H7 吸收 GA 分析

二苯硼酸-2-氨基乙酯 (DPBA) 是一种细胞渗透染料, 与细胞内类黄酮类化合物结合后能发出稳定荧光^[28]。本实验采用 Wang 等人方法^[29]测定 *E. coli* O157:H7 的 GA 吸收量。用 15 mM UVC-GA 抗菌液和 GA 溶液分别处理 *E. coli* O157:H7 (9 log cfu/mL) 5 min, 随后 10000 g 离心 2 min。用 DI 冲洗 2 次去除未被吸收 GA 后, 加入 DMSO 制备 450 μ L 0.2% DPBA 检测溶液。最后加入 96 孔平板, 用 SpectraMax M5e 平板阅读器在 405/465 nm (吸收波长/发射波长) 测定荧光强度, 荧光校正采用公式 (a)。

1.3.9 *E. coli* O157:H7 膜损伤分析

本实验采用碘化丙啶 (PI) 法检测 UVC-GA 处理后的 *E. coli* O157:H7 膜损伤程度^[29]。用 0.15 mol/L UVC-GA 和 GA 溶液分别处理 *E. coli* O157:H7 (9 log cfu/mL) 5 min, 接着 10000 g 离心 2 min, 用 DI 冲洗 2 次后加入 PI, 使待测样品最终浓度为 5×10^{-6} mol/L, 24 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加入 96 孔平板, 用 SpectraMax M5e 平板阅读器在 490/635 nm (吸收波长/发射波长) 测定荧光强度, 荧光校正采用公式 (a)。

1.3.10 抑制牡蛎肉质表面 *E. coli* O157:H7

按照 Ding 方法^[21]将 *E. coli* O157:H7 接种于牡蛎肉质表面。备用牡蛎肉 4 $^{\circ}$ C 解冻, DI 水冲洗, 无菌吸水纸吸去肉质表面水份, 生物烟罩 26 $^{\circ}$ C 烘干 30 min。浸入 *E. coli* O157:H7 初始菌液 (7 log cfu/mL) 20 min, 再次生物烟罩 26 $^{\circ}$ C 烘干 30 min。其中一组样品用于测定初始菌群量, 其它样品用于实验处理, UVC-GA (0.15 mol/L) 作为处理组, 等量的 GA 和 DI 分别为 2 个对照组, 每组 10 个样品, 分别浸泡对应溶液 15 min 后, 每个样品单独放置在含有 2 mL 蛋白胨水的无菌袋, 用手反复摩擦无菌袋 5 min, 样品取出后, 放入伊红亚甲基蓝琼脂培养基 (EMBA), 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 统计菌群。

1.3.11 统计分析

每个样品做三次重复, 并采用 GraphPad Prism 8 软件对采样数据进行了 *t*-test 分析, 当 $p < 0.05$ 为样品间显著性差异。

2 结果和讨论

2.1 UVC-GA 抗菌活性

GA 抑制 *E. coli* O157:H7 的方式主要是使细菌膜损伤和氧化产生 ROS^[12,17]。本研究发现 GA 抑制 *E. coli* O157:H7 效果不显著, 与 Xu 等人、Zhang 等人认为 GA 的抑菌性能有限的观点一致^[3,14]。Wang 等人研究表明, UV-A 和 GA 单用的抑菌效果不显著, 同时处

理 *E. coli* O157:H7 时具有较好的协同抑菌效果^[29]。研究人员已建立基于特定天然活性物与 UV 或可见光组合的协同抑菌技术, 其机理主要由于天然活性物受光辐照后发生光氧化, 产生光氧化物 ROS^[19], 或两种亚致死抑菌方法的协同抑菌效应^[30]。

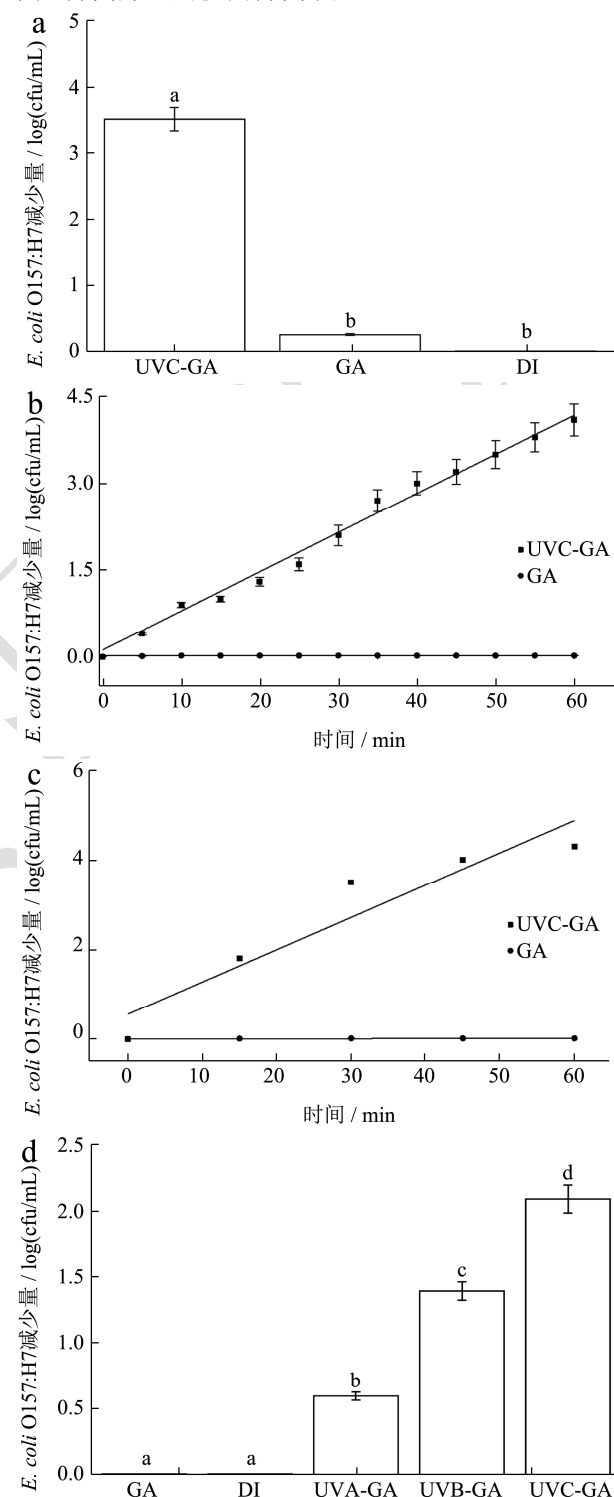


图1 UVC-GA 的抗菌效果

Fig.1 Effectiveness of antimicrobial activity of UVC-GA

注: (a) UVC-GA、GA 和 DI 对 *E. coli* O157:H7 的抑制效果; (b) UVC-GA 的 *E. coli* O157:H7 抑制动力曲线; (c)

辐照时间对 UVC-GA 抑菌活性的影响; (d) 不同光辐照形成的 GA 抑菌液的抑菌效果。不同字母表示显著性差异 ($p < 0.05$)。

本研究发现, UVC-GA 使 *E. coli* O157:H7 显著减少 3.57 log cfu/mL ($p < 0.05$), 比 GA (0.15 log cfu/mL) 的效果高 22.33 倍 (图 1a)。说明 UV-C 辐照显著增强了 GA 的抑菌能力。实验结果显示, UVC-GA 抑菌动力学曲线的 D 值为 12.6 min, R_2 值为 0.98 (图 1b), 说明 UVC-GA 抑菌过程遵循典型一级动力学, 抑菌效果较高。本实验结果发现, UVC-GA 抗菌活性随其辐照持续时间长而增加, 60 min 后使 *E. coli* O157:H7 减少 4.42 log cfu/mL (图 1c), 在相同辐照水平 (4 J/cm^2), UVC-GA 对 *E. coli* O157:H7 的抗菌显著最强, 比 UVB-GA 和 UVA-GA 显著高 64.25% 和 223.47% ($p < 0.05$) (图 1d)。结果表明, UVC-GA 抑菌能力随着辐照时间增加而增强, 也随着与 *E. coli* O157:H7 接触时间延长而增强, 说明 UVC-GA 波长依赖性可能是由于 GA 对 UV 光吸收有差异, 主要因为 UV 的强度和波长极大地影响羟基自由基的生成, 进而影响 GA 的光氧化物和降解中间体的产生, 最终影响了其抑菌效果^[31]。

由于未被辐照的 GA 的抑菌效果不显著 ($p > 0.05$), 酸性条件可能不是抑菌因素。本研究发现, UVC-GA 在 pH 7 和 pH 11 的抑菌效果均不显著 ($p > 0.05$), pH 3 比两者分别高 94.23 倍和 87.62 倍, 相同 pH 3 下, 磷酸盐缓冲液和 HCl 分别处理的 *E. coli* O157:H7 无显著性差异 ($p > 0.05$) (图 2a)。说明在相同酸性条件下, UV-C 分别辐照的 HCl 和磷酸盐缓冲液与未被辐照的 GA 的抑菌效果同样不显著, 但 UVC-GA 在同样酸性条件下抑菌能力得到保持, 说明酸性条件是 UVC-GA 的必要因子。当 GA 的 pH 调至 7 和 11 时, UVC-GA 和 GA 的抑菌能力均显著降低, 表明可能 UV-C 和 GA 之间存在一种特定相互作用。

由于酸性条件是 UVC-GA 中 GA 不解离的必须条件, 我们假设 UVC-GA 渗透细菌细胞膜才能发挥其抑菌活性, 或者 UVC-GA 比 GA 造成膜损伤程度更高, 从而增加其在细胞内的摄取, 导致比 GA 抗菌效果好。本实验结果发现, 与 GA 相比, UVC-GA 的校正荧光显著高 237.61% ($p < 0.05$), GA 和 UVC-GA 比对照组的膜损伤程度分别显著高 56.34 倍和 59.57 倍 ($p < 0.05$), 但两组之间未有显著差异 ($p > 0.05$) (图 2b)。实验结果证实了上述假设。但是, UVC-GA 中的 DPBA-GA 复合物与 GA 的校正荧光值差异显著, 说明 UVC-GA 比 GA 更具有较高被吸收潜力, 我们认为这种差异不因为 UVC-GA 具有高抑菌能力所驱动。Wang 等人研究发现 *E. coli* O157:H7 吸收 GA 能力增

加可能与细菌膜高损伤程度有关^[29], 而本研究发现 UVC-GA 和 GA 的膜损伤程度未有显著差异, 推测 UVC-GA 吸收增加或膜损伤不是 UVC-GA 具有较抑菌能力的原因。UVC-GA 的抑菌能力一种原因可能是 GA 被 UV-C 辐照时不断产生了抗菌化合物, 如醌类。另一种原因可能是 UVC-GA 产生了 ROS, 并诱导 *E. coli* O157:H7 产生氧化应激反应。

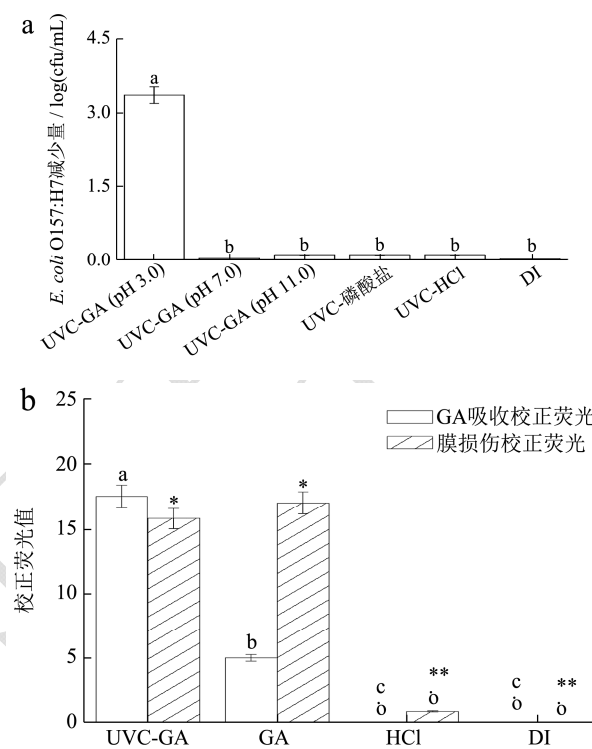


图2 UVC-GA 的抗菌特性

Fig.2 Characteristics of antimicrobial activity of UV-GA

注: (a) UVC-GA 分别调整为酸性 (pH=3)、中性 (pH=7) 和碱性 (pH=11) 对 *E. coli* O157: H7 抑制效果; (b) *E. coli* O157: H7 的膜损伤程度及对 GA 和 UVC-GA 吸收量。不同的*表示膜损伤差异显著; 不同字母表示 GA 吸收显著性差异 ($p < 0.05$)。

2.2 UVC-GA 抗菌活性机制研究

2.2.1 GA 被 UV-C 辐照后的醌类化合物形成

本研究发现, UV-C 辐照 GA 后, UVC-GA 颜色变黄, 且稳定持续 12 个月以上。推测 UVC-GA 持久呈黄色表明有醌生成, 可能因为 GA 的三个芳香羟基受到光氧化诱导而被氧化成醌类或过氧化氢^[32]。本研究发现, UVC-GA 和 GA 的波谱有重叠, 但均未出现峰值, 当 GA 被 UV-C 辐照 2 h, 其浓度减少仅 1%, 未有新降解物生成 (3a), 具体原因尚不明。图 3b 所示为 UVC-GA 中半醌自由基的 EPR 测定结果。UVC-GA 在碱性条件下 (pH=11) 能检测出 GA 衍生的半醌自由基, 但在酸性条件 (pH=3) 下未观察到相应 EPR 信号, 主要原因是 GA 作为酚类在碱性条件下

氧化敏感强,容易生成半醌类初级氧化产物^[32]。而半醌自由基在酸性条件下未有检测出,其原因可能因为 UVC-GA 在酸性条件不稳定^[16,33],产物生成量低于仪器检出限,具体原因有待进一步深入研究。

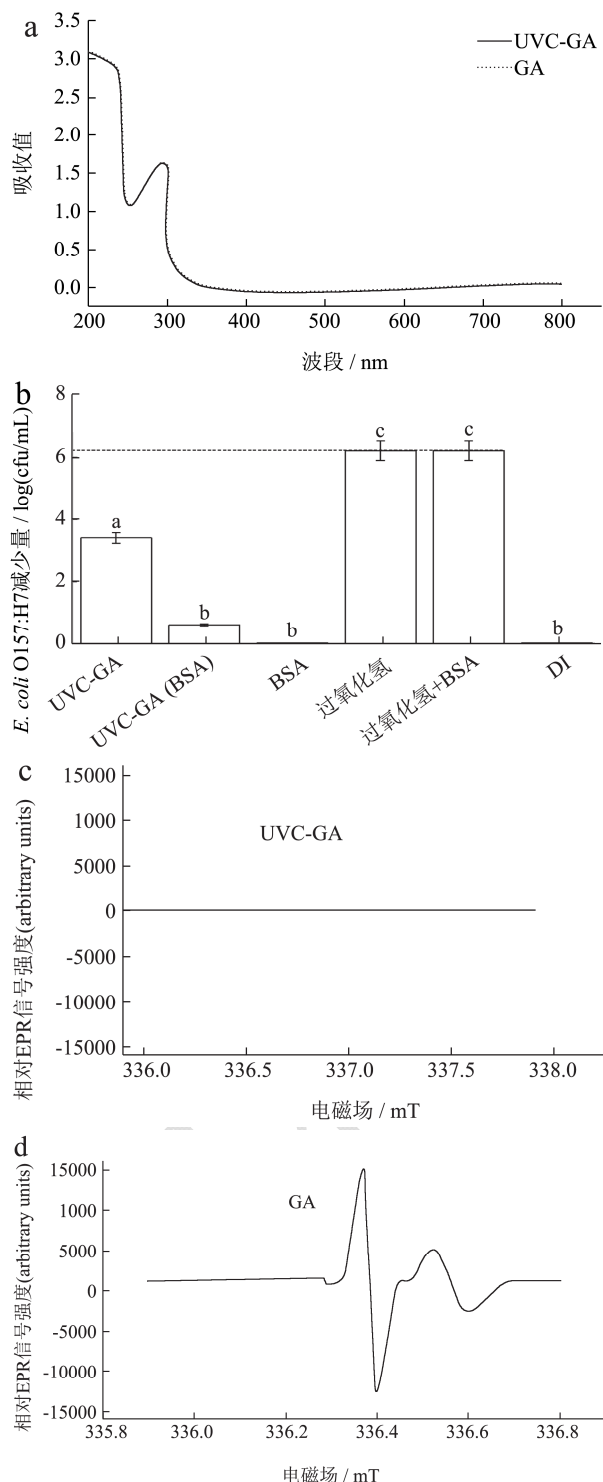


图3 UVC-GA 的醌类分析

Fig.3 Analysis of quinone from UVC-GA

注:(a) UVC-GA 和 GA 的 UV-vis 波谱图;(b) *E. coli* O157:H7 分别被 UVC-GA、UVC-GA (BSA)、过氧化氢、过氧化氢 (BSA) 处理后的 *E. coli* O157:H7 对数减少量;(c、d) UVC-GA

的 GA 半醌自由基的 EPR 旋转跟踪结果分析。不同字母表示显著性差异 ($p < 0.05$)。

Quici 等研究称,用 UV 作为氧化源,伴随着氧等氧化催化剂作用,醌类可以通过羟基自由基的亲电攻击或溶解在水中的氧直接氧化为 GA 氧化反应的中间体^[34,35]。因此,推测 UV 光介导的 GA 氧化物(如醌类)可能是 UVC-GA 具有较高抑菌能力的原因。为了证实这一观点,向 UVC-GA 抗菌液中加入与亲电醌类能形成加合物的亲核 BSA^[36],并评价抑菌效果。实验结果显示,BSA 加入 UVC-GA, *E. coli* O157:H7 菌群减少对数从 3.57 log cfu/mL 显著降至 0.63 log cfu/mL ($p < 0.05$),而仅单用 BSA 未有显著抗菌效果($p > 0.05$) (图 3b)。为了检测 BSA 是否也能与醌类以外的亲电分子反应,如 ROS,本实验将 0.3%过氧化氢加 BSA 溶液中,测定其对 *E. coli* O157:H7 的抑制影响。结果显示,有无 BSA 添加下, *E. coli* O157:H7 减少量均约 6.53 log cfu/mL,说明过氧化氢的抑菌效果不受 BSA 影响。结果发现,加入 BSA 的 UVC-GA 溶液的抑菌效果显著降低,证实了 UVC-GA 所形成的醌类是其高抑菌能力的原因。在 UVC-GA 中形成醌类的假设解释了其抑菌活性的相对稳定性。虽然醌引起毒性机制较复杂,但已证明所有醌类都是通过氧化还原循环与相应半醌自由基生成 ROS^[37]。醌一旦渗透到细胞膜中,就会与呼吸电子转移链迅速反应,导致细菌内氧化应激^[38,39],CellROX 检测发现 UVC-GA 使细菌细胞内氧化应激显著增加,印证了上述观点。

2.2.2 评价 UVC-GA 中 ROS 的抑菌活性

图 4a 所示为 ROS 清除剂对 UVC-GA 抗菌效果的影响, UVC-GA 中加入过氧化氢酶后,抑菌效果显著降低 ($p < 0.05$), *E. coli* O157:H7 减少量小于 0.95 log cfu/mL,分别加 DMSO 和甘露醇处理组比 UVC-GA 抑菌效果显著降低了 4.56%和 8.15% ($p < 0.05$)。FOX 结果显示,新鲜 UVC-GA 抑菌液中含有 7.24 μ M 的过氧化氢,Amplex red 方法证实该结果。储存 4 周后,过氧化氢浓度与初始浓度无显著变化,当过氧化氢酶加入 UVC-GA 后,过氧化氢浓度低于检测限,且与 DI 对照组未显著差异 ($p > 0.05$),过氧化氢不能在新鲜 GA、过氧化氢酶、HCl (pH 3.0)、DI 等 4 组中检测出。ERS 检测 UVC-GA 溶液中羟自由基形成结果如图 4c、4d 所示,过氧化氢与亚铁离子组成的阳性对照组触发了 Fenton 反应,ERS 捕捉到羟自由基的特征信号。CellROX 方法测定了细胞内氧化应激反应结果如图 4b 所示, UVC-GA 处理组的细胞氧化应激反应强度比 GA 处理组显著高约 2.5 倍,比 DI 组显著高 5.1 倍 ($p < 0.05$),而 GA 组和 HCl 组 (pH=3.0) 未有

显著差异 ($p>0.05$)。

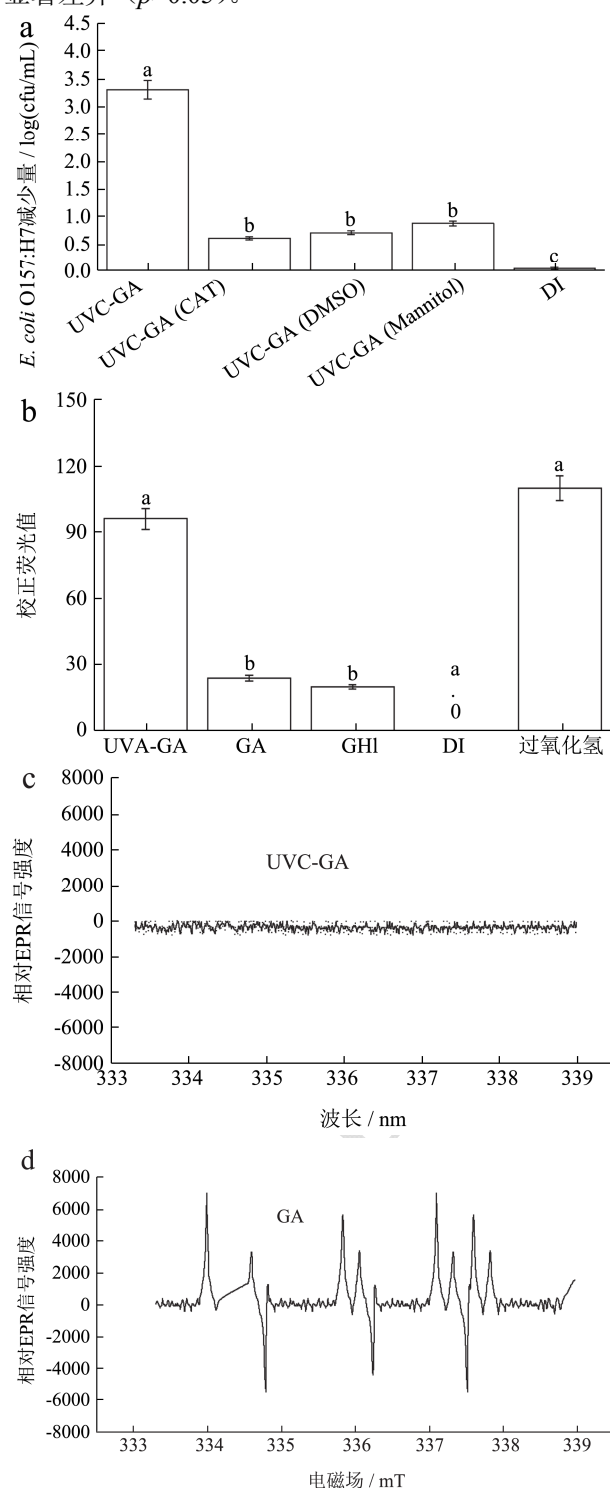


图4 UVC-GA 的 ROS 分析

Fig.4 Analysis of ROS from UVC-GA

注: (a) UVC-GA 中添加 ROS 猝灭剂的 *E. coli* O157: H7 对数减少量; (b) *E. coli* O157: H7 分别被 UVC-GA、GA、HCl、DI 和过氧化氢处理后的细胞氧化应激反应, 0 表示校正荧光检测值为 0; (c、d) UVC-GA 的羟自由基的 EPR 旋转跟踪结果分析。不同字母表示显著性差异 ($p<0.05$)。

研究表明, 酚类化合物能在紫外/可见光下产

生 ROS 而抑菌能力增强, 如过氧化氢和羟基自由基。GA 被 400 nm 蓝色 LED 辐照 15 min 后, 产生过氧化氢和羟基自由基, 使金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 失活量大于 5 log cfu/mL^[17]。咖啡酸、绿原酸、表没食子儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯和原花青素等多酚类被不同波长的 UV-A 或蓝光不同程度地辐照后, 同样发现抑菌能力显著增强^[16]。Wang 等也发现 GA 被辐照后产生过氧化氢^[29]。因此, 可能 ROS 也是 UVC-GA 具有高抑菌能力的一个原因。本研究将过氧化氢清除剂 (氧化氢酶)、羟基自由基清除剂 (DMSO 和甘露醇) 分别加入 UVC-GA 后, 抑菌能力降低, 证实过氧化氢和羟基自由基构成了 UVC-GA 抑菌活性。检测结果显示 UVC-GA 有约 7 μ M 的过氧化氢, 表明 UVC-GA 产生 ROS。但是 UVC-GA 的氧化氢含量较低。另外, 羟基自由基不能检测出, 可能由于其含量太低。除了 ROS 的有限检测外, UVC-GA 的持久抑菌活性 (至少 4 周) 不能用 ROS 来解释, 因为 ROS 通常具有较短半衰期。因此, 虽然 UVC-GA 的 ROS 参与了其抑菌活性, 但它不能用于完全解释其抑菌机制。

2.3 分析 UVC-GA 对牡蛎表面 *E. coli* O157:H7

UVC-GA 对牡蛎表面 *E. coli* O157:H7 的抑菌结果如图 5 所示, 初始接种菌量约为 5.23 log cfu/mL, 15 min 后, DI 组菌减少量约 0.8 log cfu/mL, GA 组菌减少量约 2.24 log cfu/mL, 而 UVC-GA 组菌减少量超过 4.14 log cfu/mL, 比 GA 组和 DI 组显著高 1.75 倍和 5.5 倍 ($p<0.05$)。当孵育时间延至 1 h, GA 组和 UVC-GA 组的牡蛎表面 *E. coli* O157:H7 减少量高于 4.12 log cfu/mL, 说明两者均有高抑菌能力。本实验采用 EMB 琼脂培养基替代 TSA, 是因为 EMB 能够抑制牡蛎肉质表面其它腐败菌生长, 更能有效研究 UVC-GA 对 *E. coli* O157:H7 的抑制作用。由于 EMB 是一种选择性的差异培养基, 能影响亚致死性损伤细菌的恢复。因此, 用该培养基检测 UVC-GA 的抑菌有效性与先前使用 TSA 获得的结果不能媲美。然而, UVC-GA 是一种很有潜力的抑菌药物, 可用于抑制新鲜产品的细菌污染和产品腐败。

3 结论

牡蛎肉质表面抑菌实验表明, GA 被 UV-C 辐照后, 其抑菌能力受 pH 和 UV-C 波长影响, ROS 和光诱导氧化物如醌类是 GA 被辐照后产生抑菌活性物。

ROS 在 UVC-GA 的抗菌作用中也起着一定的作用,但具有较短的半衰期,抑菌效果需要进一步探讨。而 UVC-GA 在碱性 (pH=11) 产生持续稳定的醌类自由基,增强 *E. coli* O157:H7 的抑制效果。说明正确处理 UV-C 辐照的 GA 有可能作为一种新型抑菌剂应用于新鲜水产品保鲜,特别是需要抑菌时效持久的产品。

参考文献

- [1] Gyawali R, Ibrahim S A. Natural products as antimicrobial agents [J]. Food Control, 2014, 46: 412-429
- [2] Gutiérrez-Larraínzar, M, Rúa, J, Caro, 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
- [3] ZHANG Ju-fang, YANG Hong-shun. Effects of potential organic compatible sanitisers on organic and conventional fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa* var. *Crispa* L) [J]. Food Control, 2017, 72: 20-26
- [4] 史海燕,郝艳丽.没食子酸生物活性研究进展[J].吉林医药学院学报,2020,41(2):146-149
SHI Hai-yan, XI Yan-li. Advances in bioactivity of gallic acid [J]. Journal of Jilin Medical College, 2020, 41(2): 146-149
- [5] Cetin-Karaca H, Newman M C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli* [J]. Food Bioscience, 2015, 11: 8-15
- [6] Ricke S C, Kunderling, M M, Miller D R, et al. Alternatives to antibiotics: Chemical and physical antimicrobial interventions and foodborne pathogen response [J]. Poultry Science, 2005, 84(4): 667-675
- [7] Sanhueza L, Melo R, Montero R, et al. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2017, 12(2): 1-15
- [8] 郭晓丹,宋京久,王东,等.没食子酸及其衍生物的生理活性及研究现状[J].化学世界,2020,9:585-593
GUO Xiao-dan, SONG Jing-jiu, WANG Dong, et al. GALLIC ACID and its derivatives physiological activities and research status [J]. The world of Chemistry, 2020, 9: 585-593
- [9] Varela-López A, Bullón P, Giampieri F, et al. Non-nutrient, naturally occurring phenolic compounds with antioxidant activity for the prevention and treatment of periodontal diseases [J]. Antioxidants, 2015, 4(3): 447-481
- [10] 吴佳欣,周波,邓萌萌,等.加热时间对余甘子水煎液中没食子酸的影响[J].中成药,2020,42(3):702-708
WU Jia-xin, ZHOU Bo, DENG Meng-meng, et al. Effect of heating time on gallic acid in Yuganzi decoction [J]. Chinese Patent Drug, 2020, 42(3): 702-708
- [11] 袁悦,赵永强,杨贤庆,等.表没食子儿茶素没食子酸酯对冷冻罗非鱼鱼糜抗冻作用机制[J].食品科学,2019,40(24):79-85
YUAN Yue, ZHAO Yong-qiang, YANG Xian-qing, et al. Anti-freezing mechanism of epigallocatechin gallate on frozen tilapia surimi [J]. Food Science, 2019, 40(24): 79-85
- [12] Borges A, Ferreira C, Saavedra M J, et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria [J]. Microbial Drug Resistance, 2013, 19(4): 256-265
- [13] Nohynek L J, Alakomi H L, Kähkönen M P, et al. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens [J]. Nutrition and Cancer, 2006, 54(1): 18-32
- [14] XU Chang-mou, Yagiz Y, Hsu W Y, et al. Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) Pomace against selected foodborne pathogens [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(28): 6640-6649
- [15] YIN Rui, DAI Tian-hong, Avci P, et al. Light based anti-infectives: Ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2013, 13(5): 731-762
- [16] Nakamura K, Ishiyama K, Sheng H, et al. Bactericidal activity and mechanism of photoirradiated polyphenols against grampositive and negative bacteria [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(35): 7707-7713
- [17] Nakamura K, Yamada Y, Ikai H, et al. Bactericidal action of photoirradiated gallic acid via reactive oxygen species formation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(40): 10048-10054
- [18] Narayanan M, Leung S. A, Inaba Y, et al. Semiquinone intermediates are involved in the energy coupling mechanism of *E. coli* complex I [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1847(8): 681-689
- [19] Cossu A, Ercan D, WANG Qing-yang, et al. Antimicrobial effect of synergistic interaction between UV-A light and gallic acid against *Escherichia coli* O157:H7 in fresh produce wash water and biofilm [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016, 37: 44-52
- [20] de Oliveira E F, Tosati J V, Tikekar R V, et al. Antimicrobial

- activity of curcumin in combination with light against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria innocua*: Applications for fresh produce sanitation [J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 137: 86-94
- [21] DING Qiao, Alborzi S, Bastarrachea, L J, Tikekar R V. Novel sanitization approach based on synergistic action of UV-A light and benzoic acid: Inactivation mechanism and a potential application in washing fresh produce [J]. Food Microbiology, 2018, 72: 39-54
- [22] DU Ying-xun, CHEN Hui, ZHANG Yuan-yuan, et al. Photodegradation of gallic acid under UV irradiation: Insights regarding the pH effect on direct photolysis and the ROS oxidation-sensitized process of DOM [J]. Chemosphere, 2014, 99: 254-260
- [23] Elias R J, Andersen M L, Skibsted L H, et al. Key factors affecting radical formation in wine studied by spin trapping and EPR spectroscopy [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2009, 60(4): 471-476
- [24] Benitez F J, Real F J, Acero J L, et al. Gallic acid degradation in aqueous solutions by UV/H₂O₂ treatment, Fenton's reagent and the photo-Fenton system [J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, 126(3): 31-39
- [25] Bektaşoğlu B, Esin Ç S, Özyürek M, et al. Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 345(3): 1194-1200
- [26] Wolff S P. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides [J]. Methods in Enzymology, 1994, 233: 182-189
- [27] Choi H, YANG Zhi-lin, Weisshaar J C. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide CM15 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(3): E303-E310
- [28] Schwalm K, Aloni R, Langhans M, et al. Flavonoid-related regulation of auxin accumulation in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors [J]. Planta, 2003, 218(2): 163-178
- [29] WANG Qing-yang, Oliveira, E F, Alborzi S, et al. On mechanism behind UV-A light enhanced antibacterial activity of gallic acid and propyl gallate against *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-11
- [30] Corbo M R, Bevilacqua A, Campaniello D, et al. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches-A review [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2009, 44(2): 223-241
- [31] Son H S, Choi S B, Zoh K D, et al. Effects of ultraviolet intensity and wavelength on the photolysis of triclosan [J]. Water Science and Technology, 2007, 55(2): 209-216
- [32] Eslami A C, Pasanphan W, Wagner B A, et al. Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study [J]. Chemistry Central Journal, 2010, 4(1): 15
- [33] SONG Yang, Wagner B A, Lehmler H J, et al. Semiquinone radicals from oxygenated polychlorinated biphenyls: Electron paramagnetic resonance studies [J]. Chemical Research in Toxicology, 2008, 21(7): 1359-1367
- [34] Quici N, Litter M I. Heterogeneous photocatalytic degradation of gallic acid under different experimental conditions [J]. Photochemical & Photobiological Sciences, 2009, 8(7): 975
- [35] Wysocka I, Kowalska E, Trzciński K, et al. UV-Vis-induced degradation of phenol over magnetic photocatalysts modified with Pt, Pd, Cu and Au nanoparticles [J]. Nanomaterials, 2018, 8(28): 1-20
- [36] Oliveira C M, Ferreira, A C S, De Freitas V, et al. Oxidation mechanisms occurring in wines [J]. Food Research International, 2011, 44(5): 1115-1126
- [37] Ensafi A A, Jamei H R, Heydari-Bafrooei E, et al. Electrochemical study of quinone redox cycling: A novel application of DNA-based biosensors for monitoring biochemical reactions [J]. Bioelectrochemistry, 2016, 111: 15-22
- [38] Yang G, Sau C, Lai W, et al. Affinity and activity of non-native quinones at the QB site of bacterial photosynthetic reaction centers [J]. Photosynthesis Research, 2014, 120(1-2): 181-196
- [39] Yasukawa T, Uchida I, Matsue T. Permeation of redox species through a cell membrane of a single, living algal protoplast studied by microamperometry [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 1998, 1369(1): 152-158