DOI:10.12441/spyswjs.20230322004 [文章编号] 1673-1689(2025)04-0053-10

阪崎肠杆菌 *crtZ* 缺失对细胞特性和环境抗逆性的影响

杨 希[1] 吴 越[1] 王小元[1,2] 顾林林[3] 胡晓清[1,2*]

(1. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品安全国际合作联合实验室,江苏 无锡,214122; 3. 山东菩元生物工程有限公司,山东 济南 250119)

摘要:【目的】阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*,*C. sakazakii*)是高致死率的奶源性致病菌,在乳品加工中控制难度较大,这归因于其特殊的细胞特性和较强的环境抗逆性。*C. sakazakii* 细胞膜上存在类胡萝卜素,然而其在细胞生理过程中的功能尚未明晰。因此,探究与色素合成相关的 *β*-胡萝卜素羟化酶基因(*crtZ*)缺失及回补对细胞特性和抗逆性的影响及机制。**【方法】**采用 Red 同源重组,在 *C. sakazakii* BAA-894(BAA-894)基础上构建 BAA-894Δ*crtZ*(Δ*crtZ*),同时借助 pWSK29 回补 *crtZ* 得到 BAA-894Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*(Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*),进一步分析各菌株细胞特性和脂肪酸谱。**【结果】**与 BAA-894 相比,Δ*crtZ* 细胞膜渗透性增强、流动性减小、生物膜形成减少且环境抗逆性降低,而 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 变化较小;Δ*crtZ* 不饱和脂肪酸种类和质量分数增加,而 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 变化不大。**【结论】***crtZ* 基因缺失极有可能是影响 *C. sakazakii* 细胞特性和环境胁迫耐受性的重要原因。该研究将有助于丰富 *C. sakazakii* 的抗逆机制理论和食品安全控制研究。

关键词:阪崎肠杆菌;环境抗逆性;*crtZ*;类胡萝卜素;细胞特性;脂肪酸

Influences of *crtZ* Deletion on Cell Characteristics and Environmental Stress Resistance of *Cronobacter sakazakii*

YANG Xi[1] *WU Yue*[1] *WANG Xiaoyuan*[1,2] *GU Linlin*[3] *HU Xiaoqing*[1,2*]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Shandong Puyuan Bioengineering Co., Ltd., Jinan 250119, China)

Abstract: [**Objective**] *Cronobacter sakazakii* (*C. sakazakii*), a milk-borne pathogen leading to high mortality, is hard to be controlled in dairy processing due to its special cell characteristics and strong environmental stress resistance. *C. sakazakii* produces carotenoids which are located in the cell membrane, while there are few studies on the physiological role of *C. sakazakii* carotenoids. This study aims to explore the effects of *β*-carotene hydroxylase gene (*crtZ*) deletion and complementation on cell characteristics and stress resistance and decipher the potential mechanisms. [**Method**] Using Red homologous recombination, the BAA-894Δ*crtZ* (Δ*crtZ*) mutant was constructed from *C. sakazakii* BAA-894 (BAA-894), and *crtZ* was complemented with pWSK29 to generate BAA-894Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* (Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*). The cellular characteristics and fatty acid profiles of these strains were then analyzed. [**Result**] Compared with BAA-894, Δ*crtZ* exhibited enhanced outer membrane permeability, reduced membrane fluidity and biofilm formation, and attenuated resistance to various environmental stresses, whereas these changes were diminished in Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*. In addition, the number and mass fraction of unsaturated fatty acids increased significantly in Δ*crtZ*, while they showed no notable changes in

基金项目:国家重点研发计划政府间国际科技创新合作项目(2023YFE0104400)。

通信作者:胡晓清(1978—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食源性致病菌研究。E-mail: xiaoqinghu@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-03-22 **修回日期:**2023-05-20

Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*. [**Conclusion**] Deletion of *crtZ* may be a critical factor influencing the cellular characteristics and environmental stress resistance of *C. sakazakii*. This study contributes to the theoretical understanding of stress resistance mechanisms in *C. sakazakii* and provides insights for food safety control strategies.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*; environmental stress resistance; *crtZ*; carotenoids; cell characteristics; fatty acids

*C. sakazakii*是一种重要的食源性致病菌[1]，主要污染婴幼儿配方奶粉，易导致新生儿患脑膜炎、菌血症及坏死性小肠结肠炎等，致死率高达40%~80%[2]。*C. sakazakii*对极端环境的耐受性较强，这与其特殊的细胞特性和较高的环境抗逆性有关[3]，游离态细胞能通过形成生物膜来抵御外界刺激，表现出对高温、高渗透压、酸性和干燥环境的强耐受性[4]，甚至在婴幼儿配方奶粉加工环境中能存活至少4年[5]。

*C. sakazakii*菌体呈黄色，该色素来源于其细胞膜上的类胡萝卜素[6]。类胡萝卜素是异戊二烯结构的亲脂性色素[7]，其在*C. sakazakii*中的生物合成途径由*crtE-idi-crtXYIBZ*基因簇控制[8]，其中*crtZ*是类胡萝卜素合成途径中的重要下游基因，可通过羟基化作用将非极性*β*-胡萝卜素转化为极性玉米黄质[8]。在体外磷脂双分子层模型中，不同类胡萝卜素对外膜渗透性的影响存在差异[9]，如玉米黄质对调节膜流动性和小分子跨膜屏障有积极作用，而*β*-胡萝卜素作用较小[10]。然而，有关类胡萝卜素对细菌细胞膜影响的研究较少，尤其是类胡萝卜素对生物膜形成的影响及作用机制尚缺乏深入探索。

基于此，作者针对类胡萝卜素合成途径的关键基因*crtZ*，研究其缺失对菌株色素合成、细胞特性和环境抗逆性的影响。首先以BAA-894为出发菌株，敲除*crtZ*基因，运用LC-MS分析突变株色素组分，系统评价细胞膜的渗透性、流动性、生物膜形成和环境抗逆性，并从细胞膜脂肪酸谱的变化中探讨可能的作用机制。该研究有利于拓展*C. sakazakii*色素的生理功能研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BAA-894：美国Type Culture Collection公司；Δ*crtZ*、Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*：作者所在实验室构建；*E. coli* JM109感受态细胞、质粒pKD13、pBluescript II SK（+）、pKD46、pCP20、pWSK29：作者所在实验室保藏；蛋白胨、酵母粉：英国OXOID公司；琼脂、NaOH、HCl、NaCl、二甲苯、甲醇、氯仿、四氢呋喃、体积分数30% H_2O_2水溶液、PBS速溶颗粒、结晶紫：国药集团化学试剂有限公司；*β*-胡萝卜素标准品、*N*-苯基-1-萘胺（NPN）、1，6-二苯基-1，3，5-己三烯（DPH）：美国Sigma公司。

细菌基因组试剂盒、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒：生工生物工程（上海）股份有限公司；2×Hieff Canace®高保真酶预混液：上海翌圣生物科技股份有限公司；ClonExpresss® II一步克隆试剂盒：南京诺唯赞生物科技有限公司；氯霉素（chloramphenicol）、氨苄青霉素（ampicilin，）、卡那霉素（kanamycin）、异丙基硫代半乳糖苷（isopropyl *β*-*D*-thiogalactoside，IPTG）：上海源叶生物科技有限公司。

LB液体培养基：1.0 g蛋白胨、0.5 g酵母粉、1.0 g NaCl，去离子水定容至100 mL，121 ℃灭菌20 min；LB固体培养基在LB液体培养基的基础上制备，每100 mL添加1.5~2.0 g琼脂粉，121 ℃灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

分光光度计：UV-1800型，上海Mapada公司；常温台式离心机：Micro 17型，美国Thermo Fisher Scientific公司；冷冻离心机：SL16R型，美国Thermo Fisher Scientific公司；超高效液相色谱-高分辨质谱联用仪：Vanquish Q Exactive Plus型，美国Thermo Fisher Scientific公司；全二维气相色谱-高分辨飞行时间质谱仪：Pegasus GC-HRT+4D型，美国LECO公司；恒温调速摇床：ZQTY-70s型，上海知楚公司；PCR热循环仪：C1000 Touch型，美国Bio-Rad公司；电穿孔仪：MicroPulser型，美国Bio-Rad公司；核酸凝胶电泳仪：DYY-8C型，北京六一生物科技有限公司；核酸凝胶成像仪：Tanon-1600型，上海天能公司；酶标仪：Bio Tek Synergy 2型，美国Bio-Tek公司；荧光分光光度计：F2700型，日

本日立有限公司；超声波清洗机：JPS-040S型，深圳结盟清洗设备有限公司。

1.3　菌株培养

所有菌株均用LB培养基培养，温度30 ℃。培养过程中通过在培养基中添加抗生素（卡那霉素30 mg/L、氯霉素30 mg/L、氨苄西林100 mg/L）进行菌株筛选。另外，在回补株（Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*）菌液的OD_{600}值为0.4时，添加终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导回补质粒表达。

1.4　突变株Δ*crtZ*及回补株Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*的构建

以*C. sakazakii* ES5序列作为模板，借助BLASTP和BLASTN工具对BAA-894进行同源搜索，确定BAA-894中*ESA_RS01525*基因为*C. sakazakii* ES5中*crtZ*基因的同源基因。采用Red同源重组在BAA-894中无痕敲除*ESA_RS01525*基因（以下简称：*crtZ*），敲除和回补过程所用引物见表1。

表1　研究中所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称	引物序列（5′—3′）	退火温度/℃	扩增片段大小/bp
crtZ-U-F	CGAATTGGGTACCGGGCCCGCACGGCTGGTGGATGAA	56	461
crtZ-U-R	AACTGCAGGTCGACGGATGGTTATCTGAAGCGGCTCTA	58	
crtZ-D-F	GCCTACACAATCGCTCAAGACGGCAGCACAATCGCCACGTTA	61	564
crtZ-D-R	GCAGGAATTCGATATCAAGCTCGTCGCCAAAGTGCGTGAA	60	
crtZ-kan-F	TAGAGCCGCTTCAGATAACCATCCGTCGACCTGCAGTT	60	1 349
crtZ-kan-R	TAACGTGGCGATTGTGCTGCCGTCTTGAGCGATTGTGTAGGC	53	
crtZ-pBS-F	TTCACGCACTTTGGCGACGAGCTTGATATCGAATTCCTGC	54	2 963
crtZ-pBS-R	TTCATCCACCAGCCGTGCGGGCCCGGTACCCAATTCG	62	
H-*crtZ*-F	CGAATTGGGTACCGGGCACCAGCAAGGCCGAGAAACT	59	659
H-*crtZ*-R	GCAGGAATTCGATATCAAGCTCAACAGGACGTTCCGTTGC	55	
pWSK29-*crtZ*-F	GCAACGGAACGTCCTGTTGAGCTTGATATCGAATTCCTGC	56	5 446
pWSK29-*crtZ*-R	AGTTTCTCGGCCTTGCTGGTGCCCGGTACCCAATTCG	58	

首先构建敲除片段，以BAA-894为模板，分别用引物*crtZ*-U-F/*crtZ*-U-R和*crtZ*-D-F/*crtZ*-D-R扩增得到上同源臂*crtZ*-U和下同源臂*crtZ*-D；以pKD13为模板，用引物*crtZ*-kan-F/*crtZ*-kan-R扩增得到抗性片段*crtZ*-Kan；以片段*crtZ*-U、*crtZ*-Kan、*crtZ*-D为模板，在引物*crtZ*-U-F和*crtZ*-D-R作用下通过重叠PCR得到片段*crtZ*-UKD。其次，构建敲除质粒，以pBluescript II SK（+）为模板，使用引物*crtZ*-pBS-F和*crtZ*-pBS-R扩增得到线性化pBS片段；通过一步克隆将线性化pBS和*crtZ*-UKD连接，得到敲除质粒pBS-*crtZ*-UKD。之后扩增敲除片段，以敲除质粒为模板，用引物*crtZ*-U-F和*crtZ*-D-R扩增得到高浓度、高纯度的敲除片段*crtZ*-UKD。然后敲除基因，将片段*crtZ*-UKD转入含pKD46质粒的BAA-894电转感受态细胞，在含卡那霉素和氨苄西林的双抗性平板上筛选阳性转化子，并在42 ℃培养15 h去除pKD46。接着去除抗性标记，将pCP20转入含*crtZ*-Kan的*C. sakazakii*化学感受态细胞，使用氯霉素抗性平板筛选阳性子，并于42 ℃过夜培养去除pCP20，得到无抗性菌株Δ*crtZ*。最后，进行基因敲除验证，使用引物*crtZ*-U-F和*crtZ*-D-R对Δ*crtZ*进行PCR和测序验证，确认无标记敲除菌株Δ*crtZ*的正确性。

为了进一步检验*crtZ*基因的功能，借助表达质粒pWSK29构建回补株Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*。首先，以BAA-894基因组为模板，使用引物H-*crtZ*-F和H-*crtZ*-R扩增得到*crtZ*片段；其次，以pWSK29为模板，使用引物pWSK29-*crtZ*-F和pWSK29-*crtZ*-R扩增得到线性化pWSK29片段；之后在一步克隆酶作用下，使*crtZ*片段和线性化pWSK29片段连接成完整回补质粒pWSK29-*crtZ*；然后将pWSK29-*crtZ*通过电击转入Δ*crtZ*中；最

后，以 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 为模板、H-*crtZ*-F 和 H-*crtZ*-R 为引物，通过 PCR 琼脂糖凝胶电泳和 DNA 测序，判断 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 的正确性。

1.5 突变株 Δ*crtZ* 的类胡萝卜素合成鉴定

1.5.1 类胡萝卜素提取

取活化菌株接种于 1 L 新鲜 LB 液体培养基中，控制初始 OD_{600} 值为 0.02，于 30 ℃下 200 r/min 培养 27 h，然后 4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体，无菌水清洗 2 次，离心称量得到菌体湿质量。

菌体经−80 ℃冷冻后，于超声清洗仪中 30 ℃超声 30 min 进行破壁处理。超声结束后添加 10 mL/g 甲醇（甲醇添加量以菌体湿质量计），于 37 ℃搅拌萃取 2 h，离心收集萃取液。重复萃取 2~3 次，直到菌体为白色，合并萃取液并经旋转蒸发仪蒸干。最后，加 2~3 mL 甲醇复溶，得到 Δ*crtZ* 的类胡萝卜素提取物。

1.5.2 薄层层析分离

将 BAA-894 和 Δ*crtZ* 的类胡萝卜素提取物点样于 TLC 硅胶板上，以甲醇−氯仿（体积比 25∶65）作为展层剂进行 TLC 分离，并以 *β*-胡萝卜素标准品溶液作为对照，观察样品的分离情况。

1.5.3 色素鉴定

取 Δ*crtZ* 的类胡萝卜素提取物进行 LC-MS 分析，鉴定 BAA-894 和 Δ*crtZ* 的类胡萝卜素组成。

1.6 细胞特性测定

1.6.1 细胞膜渗透性

细胞膜渗透性采用 NPN 荧光探针法，并略微调整[11]。取活化的 BAA-894、Δ*crtZ* 和 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 接种于 50 mL 的 LB 液体培养基中，初始 OD_{600} 值为 0.02，培养至 OD_{600} 值为 1.20，以 4 000 r/min 离心 10 min，PBS 缓冲液清洗 2 次，然后使用 PBS 缓冲液重悬菌体并调整 OD_{600} 值为 0.50。在 24 孔板中，取 1.92 mL 菌悬液与 80 μL 10 μmol/L NPN 溶液混合，迅速在酶标仪中测定相对荧光强度，激发波长 350 nm，发射波长 428 nm，缝宽 10 nm。渗透性以每单位 OD_{600} 值（即 OD_{600} 值为 1）的样品所对应的相对荧光强度来表征。

1.6.2 细胞膜流动性

细胞膜流动性通过测定荧光偏振度来确定[12]。将活化的 BAA-894、Δ*crtZ* 和 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中，初始 OD_{600} 值为 0.02，当 OD_{600} 值为 2.00 时，取 5 mL 菌液以 12 000 r/min 离心 2 min，收集菌体，PBS 缓冲液清洗 2 次，然后用 PBS 缓冲液重悬菌体并调整 OD_{600} 值为 0.50。在 2 mL 菌悬液中加入 3 μL 浓度为 2 mmol/L 的 DPH 溶液（溶剂：四氢呋喃），30 ℃黑暗孵育 30 min，4 000 r/min 离心 5 min，PBS 缓冲液洗涤 1 次，12 000 r/min 离心 2 min，用 2 mL PBS 缓冲液重悬菌体，然后在荧光分光光度计中测定相对荧光强度，激发波长 360 nm，发射波长 450 nm，裂缝 10 nm，按式（1）~（2）计算荧光偏振度。

$$G=\frac{I_{HV}}{I_{HH}} \tag{1}$$

$$P=\frac{I_{VV}-G\times I_{VH}}{I_{VV}+G\times I_{VH}} \tag{2}$$

式中：

I_{HV}——起偏器和检偏器光轴分别为水平和垂直方向时测得的相对荧光强度；

I_{HH}——起偏器和检偏器光轴同为水平方向时测得的相对荧光强度；

G——光栅校正因子；

I_{VV}——起偏器和检偏器光轴同为垂直方向时测得的相对荧光强度；

I_{VH}——起偏器和检偏器光轴分别为垂直和水平方向时测得的相对荧光强度；

P——荧光偏振度。

1.6.3 生物膜形成能力

采用结晶紫染色法测定菌株细胞膜形成能力[13]。将 BAA-894、Δ*crtZ* 和 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中，初始 OD_{600} 值为 0.02，过夜培养，用 LB 液体培养基调整菌液 OD_{600} 值为 2.00。在 96 孔板中，每孔加 10 μL 菌液和 190 μL LB 液体培养基，30 ℃下静置培养 72 h。用移液器小心去除培养液，每孔用去离子水洗涤 3 次，去除洗涤液后加入 200 μL 结晶紫溶液，室温孵育 5 min。最后用去离子水清洗 96 孔板以去除染料，使用酶标仪在 595 nm 处测定吸光度，通过 OD_{595} 值判断菌株生物膜形成情况。

1.7 环境抗逆性测定

1.7.1 酸、碱、氧化和高渗透压的耐受性测定

将活化的 BAA-894、Δ*crtZ* 和 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 接种于 5 mL 的 LB 液体培养基中，初始 OD_{600} 值为 0.02，在 30 ℃、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值为

2.00，12 000 r/min离心2 min收集菌体，PBS缓冲液清洗2次，用LB液体培养基重悬菌体，并控制菌悬液OD_{600}值为0.10，30 ℃静置孵育。孵育结束后，以12 000 r/min离心2 min，收集菌体，PBS缓冲液清洗1次并重悬菌体。将重悬液于PBS缓冲液中连续稀释，取合适浓度的100 μL菌液涂布于LB固体平板上，24 h后进行活菌计数。酸胁迫的耐受性测定：用10 mol/L HCl调节LB液体培养基，使其pH为3，菌株孵育30 min。碱胁迫的耐受性测定：用4 mol/L NaOH调节LB液体培养基，使其pH为11，菌株孵育30 min。氧化胁迫的耐受性测定：用体积分数30%的H_2O_2调节LB液体培养基，使其有效H_2O_2浓度为30 mmol/L，菌株孵育15 min。高渗透压胁迫的耐受性测定：将LB液体培养基中NaCl质量分数调整为10%，菌株孵育90 min。对照组不经孵育处理直接进行活菌计数。菌落对数减少值按式(3)计算，菌落对数减少率按式(4)计算。

$$B = lg\,A_1 - \lg A_2 \tag{3}$$

$$C = \frac{B}{lg\,A_1} \times 100\% \tag{4}$$

式中：

A_1——对照组菌落数，CFU/mL；

A_2——试验组菌落数，CFU/mL；

B——菌落对数减少值，lg（CFU/mL）；

C——菌落对数减少率，%。

1.7.2　蓝光敏感性

蓝光敏感性的测定参照文献[14]的方法进行。

1.8　细菌脂肪酸提取及分析

脂肪酸提取及分析参考Li等[15]的方法进行。

1.9　数据统计分析

各组试验均设置3次平行，数据用平均值±标准差表示。采用GraphPad Prism 4软件进行统计分析，数据通过单因素方差分析和多重比较法进行差异显著性分析。

2　结果与讨论

2.1　*crtZ*缺失及回补株鉴定

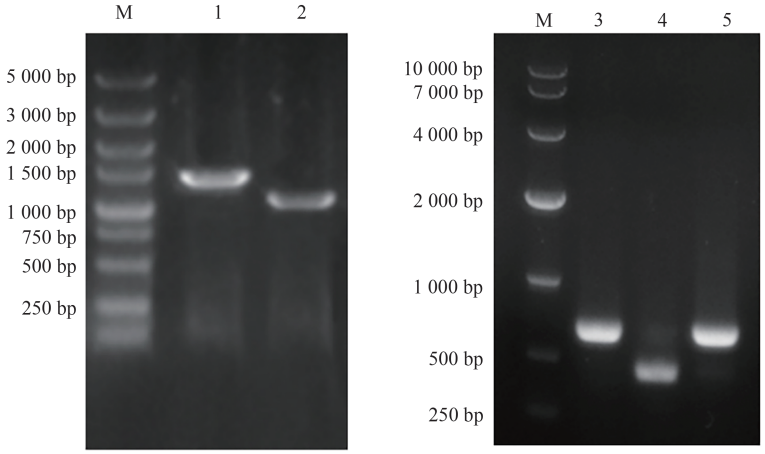
采用琼脂糖凝胶电泳验证Δ*crtZ*和Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*的正确性。如图1(a)所示，通过引物*crtZ*-U-F和*crtZ*-D-R验证*crtZ*基因是否成功敲除，泳道1为BAA-894的产物，条带约1 500 bp，大小正确；泳道2为Δ*crtZ*的产物，条带约1 000 bp，大小正确；泳道1和泳道2的条带差异表明*crtZ*基因成功敲除。图1(b)是通过引物H-*crtZ*-F和H-*crtZ*-R验证*crtZ*基因是否成功回补，泳道3为BAA-894的产物，条带约650 bp，大小正确；泳道4为Δ*crtZ*的产物，条带约350 bp，大小正确；泳道5为*crtZ*/pWSK29-*crtZ*的产物，条带约650 bp，大小正确；泳道3、4、5之间的条带差异证实*crtZ*基因在Δ*crtZ*中成功回补。进一步的测序结果表明Δ*crtZ*和Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*构建成功。

2.2　*crtZ*缺失前后对菌株合成色素的影响

为了检验突变株Δ*crtZ*合成类胡萝卜素的情况，使用甲醇提取Δ*crtZ*产生的类胡萝卜素，然后通过TLC和LC-MS鉴定成分组成。如图2(a)所示，对比BAA-894和Δ*crtZ*菌体沉淀的颜色发现，Δ*crtZ*黄色色度降低，菌体颜色改变。如图2(b)所示，在TLC硅胶板中，BAA-894有3种色素成分，Δ*crtZ*仅有一种，且Δ*crtZ*的色素成分及迁移位置均与β-胡萝卜素标准品接近。如图2(c)所示，BAA-894中主要色素成分的相对分子质量为893.5，碎片裂解规律如下：*m*/*z* 893.5为母离子峰(M^+)，910.5(M-17)、801.5(M-92)、731.5(M-162)、713.5(M-180)、569.4(M-180.1-162+18)、551.4(M-180.1-162)、533.4(M-180.1-180)。BAA-894碎片裂解规律与Zhang等[16]的描述一致，因此推测BAA-894产生的类胡萝卜素为双糖玉米黄质，相对分子质量为892.5，分子式为$C_{52}H_{76}O_{12}$。如图2(d)所示，突变株Δ*crtZ*中主要色素成分的相对分子质量为537.5，其碎片裂解规律如下：*m*/*z* 537.5(M^+)，453.3(M-84.2)、436.3(M-101.2)、282.3(M-84.2-171)，符合β-胡萝卜素裂解规律。β-胡萝卜素的相对分子质量为536.5，进一步结合TLC和LC-MS结果，判断Δ*crtZ*中的色素成分为β-胡萝卜素，分子式为$C_{40}H_{56}$。以上结果表明，*crtZ*基因缺失中断了双糖玉米黄质合成途径，改变了BAA-894中的类胡萝卜素组成。

2.3　*crtZ*缺失对菌株细胞特性的影响

细胞特性与细胞膜功能密切相关，包括细胞膜渗透性、流动性、生物膜形成等[17-19]。研究表明，细胞膜渗透性反映了水、离子、分子氧和其他小离子穿过细胞膜屏障的速率，结构稳定时渗透



M—DNA Marker；1—BAA-894；2—Δ*crtZ*。

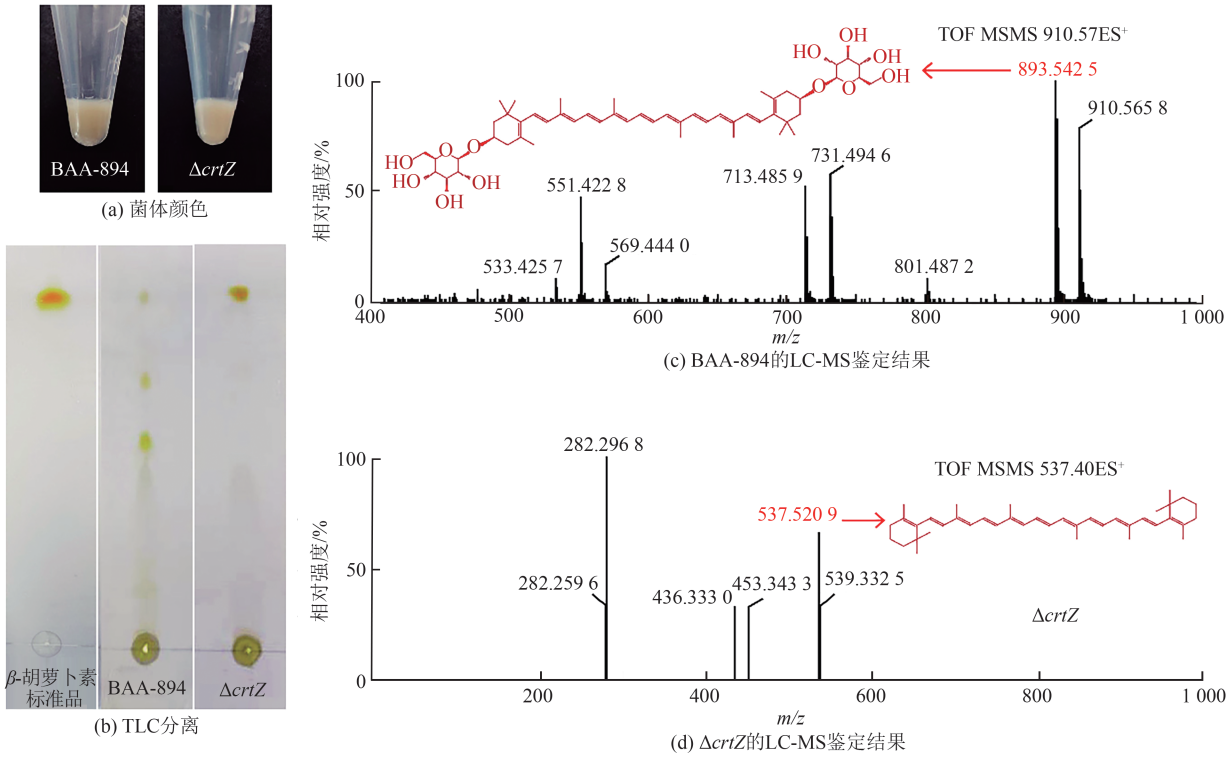
(a) 突变株Δ*crtZ*验证

M—DNA Marker；3—BAA-894；4—Δ*crtZ*；5—Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*。

(b) 回补株Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*验证

图 1　不同菌株的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis diagram of different strains



(a) 菌体颜色

(b) TLC分离

(c) BAA-894的LC-MS鉴定结果

(d) Δ*crtZ*的LC-MS鉴定结果

图 2　不同菌株的类胡萝卜素合成鉴定

Fig. 2　Identification of carotenoid synthesis in different strains

率低，结构不稳定时渗透率高[17]。Δ*crtZ*细胞膜渗透性升高表示细胞膜被破坏。细胞膜流动性与细胞膜功能密切相关[20]，细胞膜流动性降低可能导致细胞功能受损。生物膜形成有利于提高菌株对环境胁迫的耐受性[21]。

为了判断*crtZ*基因缺失对*C. sakazakii*细胞特性的影响，对BAA-894和Δ*crtZ*细胞膜渗透性、流动性和生物膜形成进行比较，见图3。与BAA-894相比，Δ*crtZ*细胞膜渗透性增加了19.8%，而Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*无显著变化（*P*>

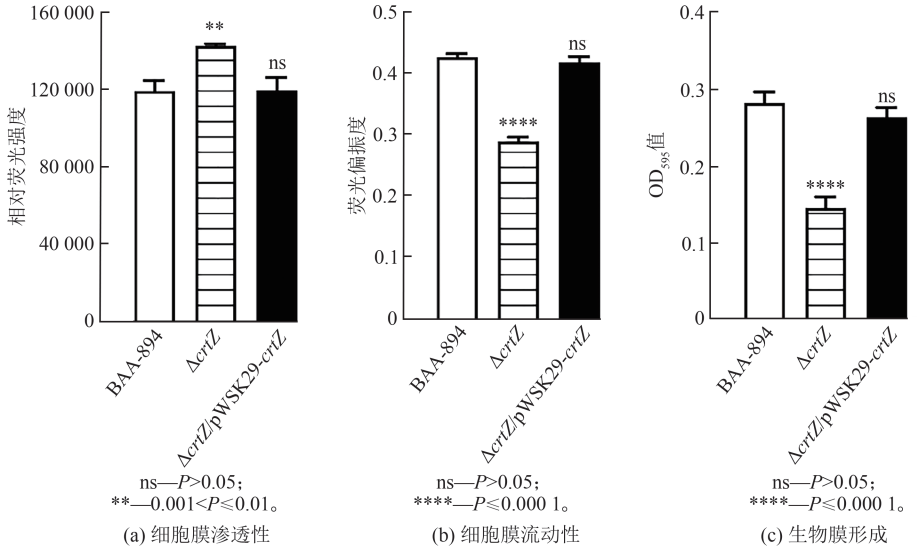
0.05）。Δ*crtZ*细胞膜流动性减少了31.2%，生物膜形成能力降低了48.8%。结果显示，Δ*crtZ*产生的类胡萝卜素成分发生改变后，其细胞特性受到影响，表现为渗透性增强、膜流动性和生物膜形成能力减弱。

2.4　*crtZ*缺失对菌株环境抗逆性的影响

2.4.1　不同环境胁迫条件下菌株的失活情况

*C. sakazakii*毒力机制与其在极端环境下的适应性密切相关[3]。为了明确*crtZ*基因缺失对菌株环境抗逆性的影响，比较了BAA-894、Δ*crtZ*和Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*在酸、碱、氧化和高渗透压胁迫下的失活情况。

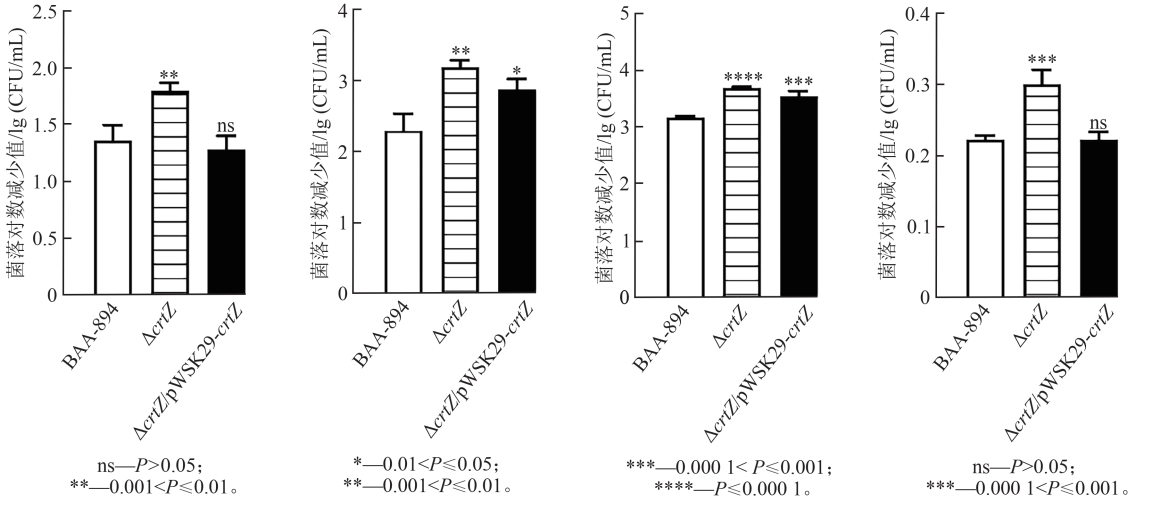
如图4所示，pH为3时，BAA-894在30 min内减少了1.361 lg（CFU/mL），Δ*crtZ*减少了1.799 lg（CFU/mL），Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*减少了1.284 lg（CFU/mL）。Δ*crtZ*比BAA-894的菌落对数减少值高32.18%，且显著高于Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*（P<0.05）。pH为11时，Δ*crtZ*在30 min内减少了3.203 lg（CFU/mL），Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*减少了2.899 lg（CFU/mL），Δ*crtZ*的菌落对数值减少最多，



(a) 细胞膜渗透性　(b) 细胞膜流动性　(c) 生物膜形成

图3　不同菌株的细胞特性比较

Fig. 3　Comparison of cell characteristics of different strains



(a) pH=3, 30 min　(b) pH=11, 30 min　(c) 30 mmol/L H_2O_2, 15 min　(d) 质量分数10% NaCl, 90 min

图4　不同菌株在不同环境胁迫条件下的菌落对数减少情况

Fig. 4　Reductions in logarithm number of different strains under different enviromental conditions

差异明显。在 30 mmol/L H_2O_2 条件下，Δ*crtZ* 在 15 min 内的菌落对数减少了 3.688 lg（CFU/mL），BAA-894 的菌落对数减少了 3.168 lg（CFU/mL），Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 减少了 3.544 lg（CFU/mL），可见 Δ*crtZ* 的菌落对数减少最多。在质量分数 10% 的 NaCl 环境下孵育 90 min 后，Δ*crtZ* 的菌落对数减少值为 0.301 lg（CFU/mL），比 BAA-894 高出 35.59%，Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 与 BAA-894 无显著差异（P>0.05）。结果表明，在酸、碱、氧化和高渗透压胁迫下，BAA-894 和 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 的菌落对数减少值均比 Δ*crtZ* 低。

2.4.2 *crtZ* 对菌株蓝光敏感性的影响

蓝光辐照作为一种新型杀菌方法，具有非特异性杀菌作用[22]。415 nm 的蓝光可以有效灭活 *C. sakazakii*[23]。为了比较 *crtZ* 基因缺失对 *C. sakazakii* 蓝光敏感性的影响，测定了不同蓝光辐照时间下的菌落对数减少值。

如图 5 所示，对照组（无光照）菌落对数几乎不随时间变化，蓝光辐照组的菌落对数减少值随辐照时间增加而增多。当蓝光辐照 45 min 时，BAA-894 菌落对数减少值为 3.133 lg（CFU/mL），菌落对数减少率为 28.64%；Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 的菌落对数减少值为 4.250 lg（CFU/mL），菌落对数减少率为 49.42%；Δ*crtZ* 的菌落对数减少值为 8.315 lg（CFU/mL），菌落对数减少率为 100%，表明 Δ*crtZ* 完全被蓝光灭活。当蓝光辐照 60 min 后，Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 的菌落对数减少值为 8.600 lg（CFU/mL），菌落对数减少率为 100%。当蓝光辐照 120 min 后，BAA-894 的菌落对数减少值为 8.036 lg（CFU/mL），菌落对数减少率为 100%。

BAA-894、Δ*crtZ* 和 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 在 415 nm 处的蓝光敏感性存在差异。BAA-894 经蓝光辐照 120 min 时完全灭活，对应蓝光剂量为 218.88 J/cm^2，Δ*crtZ* 经蓝光辐照 45 min 时完全失活，对应蓝光剂量为 54.72 J/cm^2，Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 经蓝光辐照 60 min 时完全失活，对应蓝光剂量为 82.08 J/cm^2。可见，Δ*crtZ* 的蓝光敏感性最高，其次是 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*，*crtZ* 基因缺失显著提高了 *C. sakazakii* 的蓝光敏感性。

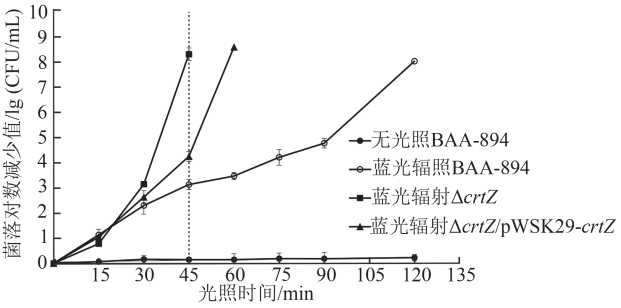


图 5 不同菌株的蓝光杀菌动力曲线

Fig. 5 Inactivation kinetics of blue light illumination on different strains

2.5 *crtZ* 缺失对脂肪酸谱的影响

为了探究 *crtZ* 基因缺失对细胞膜脂肪酸组成的影响，进一步提取各菌株细胞膜脂肪酸并通过 GC-MS 分析，结果如表 2 所示。

表 2 不同菌株的脂肪酸组成

Table 2 Fatty acid profiles of different strains

菌株	脂肪酸质量分数/%															
	C4:1	C8:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:3	C16:5	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:3	C19:0	C20:5	C21:0	C22:1
BAA-894	0.19±0.01	0.62±0.02	0.55±0.02	0.91±0.07	18.37±1.52	0.94±0.09	1.00±0.07	0.52±0.03	1.51±0.11	10.03±0.24	11.71±0.68	—	31.16±0.81	—	22.49±1.23	—
Δ*crtZ*	—	1.06±0.05	0.49±0.04	0.70±0.08	17.66±0.50	0.99±0.04	—	0.45±0.04	0.67±0.09	9.40±0.49	14.62±0.86	1.78±0.08	28.40±0.69	2.90±0.02	19.76±1.39	1.14±0.08
Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*	0.21±0.02	0.36±0.01	0.58±0.06	0.81±0.15	16.22±1.02	0.61±0.02	1.11±0.03	0.56±0.03	1.67±0.12	8.41±0.35	12.93±0.48	—	32.30±0.87	—	24.22±1.25	—

注：脂肪酸质量分数，即脂肪酸质量占总脂肪质量的百分比，以%表示；“—”表示未检出。

在 BAA-894 和 Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ* 中检出 13 种脂肪酸（8 种饱和脂肪酸和 5 种不饱和脂肪酸），在 Δ*crtZ* 中检出 14 种脂肪酸（8 种饱和脂肪酸和 6 种不饱和脂肪酸），其中 C16:0、C18:0、C18:1、

C19：0和C21：0是3个菌株中质量分数较高的5种脂肪酸。分析脂肪酸种类的变化发现，与BAA-894相比，Δ*crtZ*中新出现了3种脂肪酸（C18：3、C20：5和C22：1），缺少了2种脂肪酸（C4：1和C16：5），Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*与BAA-894脂肪酸种类一致。

分析脂肪酸质量分数发现，BAA-894中饱和脂肪酸质量分数为84.63%，不饱和脂肪酸质量分数为15.37%；Δ*crtZ*中饱和脂肪酸质量分数为77.90%，不饱和脂肪酸质量分数为22.10%；Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*中饱和脂肪酸质量分数为83.47%，不饱和脂肪酸质量分数为16.53%。与BAA-894相比，Δ*crtZ*饱和脂肪酸质量分数降低，不饱和脂肪酸质量分数增加，其中C19：0减少最多（2.76%），C18：1增加最多（2.91%），而Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*脂肪酸质量分数变化较小。

结果表明，*C. sakazakii*以饱和脂肪酸为主，*crtZ*基因缺失会导致饱和脂肪酸质量分数降低、不饱和脂肪酸种类与质量分数增加。而回补*crtZ*基因后，脂肪酸种类和质量分数与BAA-89相近。可见，BAA-894中*crtZ*基因缺失会改变脂肪酸谱，这可能是引起细胞特性和环境抗逆性改变的原因。

3　结论

将BAA-894的*crtZ*基因进行无痕敲除和基因回补，通过菌体颜色观察、TLC色素分离和LC-MS分析，发现*crtZ*基因缺失会导致菌体颜色改变，菌株色素成分由双糖玉米黄质变成*β*-胡萝卜素。通过细胞特性测定可知，*crtZ*缺失使菌株细胞膜渗透性增加19.8%，细胞膜流动性减少31.2%，生物膜形成减少48.8%，而*crtZ*回补之后菌株细胞特性恢复。环境胁迫试验结果显示，相较于Δ*crtZ*/pWSK29-*crtZ*，Δ*crtZ*在酸、碱、氧化、高渗透压和蓝光辐照等胁迫条件下表现出更高的敏感性，表明*crtZ*基因的缺失显著削弱了BAA-894菌株的环境抗逆性；为进一步揭示可能的影响机制，通过GC-MS对菌株细胞膜脂肪酸谱分析，发现*crtZ*基因缺失使菌株饱和脂肪酸质量分数降低，不饱和脂肪酸种类和质量分数增加，尤其是新增了脂肪酸C18：3、C20：5和C22：1。而*crtZ*回补后，脂肪酸种类及质量分数恢复。综上，*crtZ*基因缺失极有可能是影响*C. sakazakii*细胞特性和环境抗逆性的重要原因。

参考文献

[1] 王彦人，焦敬波，张钧森，等. LAMP在阪崎克罗诺杆菌检测中的研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2022，41（2）：1-7.
WANG Y R，JIAO J B，ZHANG J S，et al. Progress of loop-mediated isothermal amplification in detection of *Cronobacter sakazakii*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41（2）：1-7.（in Chinese）

[2] JOSEPH S，FORSYTHE S J. Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp.，generated by multilocus sequence typing and analysis[J]. Frontiers in Microbiology，2012，3：397.

[3] PHAIR K，PEREIRA S G，KEALEY C，et al. Insights into the mechanisms of *Cronobacter sakazakii* virulence[J]. Microbial Pathogenesis，2022，169：105643.

[4] LU J，CHEN Q M，PAN B L，et al. Efficient inhibition of *Cronobacter* biofilms by chitooligosaccharides of specific molecular weight[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology，2019，35（6）：87.

[5] CHASE H R，GOPINATH G R，ESHWAR A K，et al. Comparative genomic characterization of the highly persistent and potentially virulent *Cronobacter sakazakii* ST83，CC65 strain H322 and other ST83 strains[J]. Frontiers in Microbiology，2017，8：1136.

[6] NAZAROWEC-WHITE M，FARBER J M. *Enterobacter sakazakii*：a review[J]. International Journal of Food Microbiology，1997，34（2）：103-113.

[7] 杨成，姜欣，李晨妍，等. 类胡萝卜素立体异构体构效关系及其应用研究进展[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（4）：1-15.
YANG C，JIANG X，LI C Y，et al. Structure-activity relationship and applications of carotenoids stereoisomers：a review[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（4）：1-15.（in Chinese）

[8] SEDKOVA N，TAO L，ROUVIÈRE P E，et al. Diversity of carotenoid synthesis gene clusters from environmental Enterobacteriaceae strains[J]. Applied and Environmental Microbiology，2005，71（12）：8141-8146.

[9] CEREZO J，ZÚÑIGA J，BASTIDA A，et al. Conformational changes of *β*-carotene and Zeaxanthin immersed in a model membrane through atomistic molecular dynamics simulations[J]. Physical Chemistry Chemical Physics，2013，15（17）：6527-6538.

[10] GRUSZECKI W I，STRZAŁKA K. Carotenoids as

modulators of lipid membrane physical properties[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2005, 1740(2): 108-115.

[11] HELANDER I M, MATTILA-SANDHOLM T. Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(2): 213-219.

[12] MYKYTCZUK N C S, TREVORS J T, LEDUC L G, et al. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress [J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2007, 95(1/2/3): 60-82.

[13] O'TOOLE G A, KOLTER R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds *via* multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis [J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(3): 449-461.

[14] 罗双华. 脂多糖结构对沙门氏菌蓝光敏感性的影响及机制[D]. 无锡: 江南大学, 2022.

[15] LI Y Y, WU S F, WANG L P, et al. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(8): 1380-1383.

[16] ZHANG W, HU X Q, WANG L Q, et al. Reconstruction of the carotenoid biosynthetic pathway of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 in *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86739.

[17] NASR G, GREIGE-GERGES H, ELAISSARI A, et al. Liposomal membrane permeability assessment by fluorescence techniques: main permeabilizing agents, applications and challenges[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2020, 580: 119198.

[18] FULAZ S, VITALE S, QUINN L, et al. Nanoparticle-biofilm interactions: the role of the EPS matrix [J]. Trends in Microbiology, 2019, 27(11): 915-926.

[19] 王洲, 李烨, 任格, 等. 核心多糖结构变异对大肠杆菌自凝集特性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(6): 569-575.
WANG Z, LI Y, REN G, et al. Effect of core oligosaccharide structural transformation on autoaggregation in *Escherichia coli* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2017, 36(6): 569-575. (in Chinese)

[20] SINGER S J. Membrane fluidity and cellular functions [M]. New York: Springer US, 1975.

[21] GAO J X, HAN Z H, LI P, et al. Outer membrane protein F is involved in biofilm formation, virulence and antibiotic resistance in *Cronobacter sakazakii* [J]. Microorganisms, 2021, 9(11): 2338.

[22] HADI J, WU S Y, BRIGHTWELL G. Antimicrobial blue light versus pathogenic bacteria: mechanism, application in the food industry, hurdle technologies and potential resistance[J]. Foods, 2020, 9(12): 1895.

[23] 褚召娟, 李磊, 闵世豪, 等. 蓝光对阪崎肠杆菌的杀菌及机制研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 13-17, 210.
CHU Z J, LI L, MIN S H, et al. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by blue light and the mechanism [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 13-17, 210. (in Chinese)

(责任编辑: 史润东东)