

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2023.81302

表没食子儿茶素没食子酸酯对食源性致病菌抑菌机理及应用研究

陈小敏¹ 黄泽璇² 谭礼浩³ 余以刚²

(1. 广东省轻工业技师学院, 广东 广州 511330; 2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东 广州 510006;
3. 广州市技师学院, 广东 广州 510000)

摘要: [目的] 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和沙门氏菌(*S. typhimurium*)的抑菌机理, 以及对紫淮山片中*S. aureus*和*S. typhimurium*的清除效果。[方法] 通过微量肉汤梯度稀释法确定EGCG的体外抑菌效果, 并进一步通过钾离子测定、PI染色、OD_{260 nm}值、OD_{280 nm}值以及细胞形态观察明确EGCG的抑菌机制。最后探讨EGCG结合巴氏杀菌对紫淮山片中*S. aureus*和*S. typhimurium*的清除率。[结果] EGCG对*S. aureus*和*S. typhimurium*的最小抑菌质量浓度(MIC)分别为0.512, 0.256 mg/mL, 最小杀菌质量浓度分别为1.024, 0.512 mg/mL。*S. aureus*经MIC和2MIC处理后, K⁺质量浓度分别上升到2.26, 2.39 mg/L, 而*S. typhimurium*经MIC及2MIC处理后, K⁺质量浓度分别上升到1.79, 1.84 mg/L, 均高于未经EGCG处理的菌株。EGCG能破坏*S. aureus*和*S. typhimurium*细胞膜, 促使细胞膜通透性增加, 进而出现细胞内容物泄露以及细胞皱缩的现象, 最终导致细菌死亡。2MIC EGCG结合巴氏杀菌处理对紫淮山片中*S. aureus*和*S. typhimurium*清除率达到100%。[结论] EGCG对食源性致病菌具有体外抑菌效果, 可作为天然抑菌保鲜剂应用于食品中。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 金黄色葡萄球菌; 沙门氏菌; 抑菌机理; 紫淮山片

Study on the inhibitory mechanism of epigallocatechin gallate against foodborne pathogens and its application

CHEN Xiaomin¹ HUANG Zexuan² TAN Lihao³ YU Yigang²

(1. Guangdong Technician College of Light Industry, Guangzhou, Guangdong 511330, China; 2. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China;
3. Guangzhou Technician College, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: [Objective] The bacteriostatic mechanism of epigallocatechin gallate (EGCG) against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) and the elimination effect of *S. aureus* and *S. typhimurium* in purple yam chip were studied. [Methods] The bacteriostatic effect of EGCG *in vitro* was determined by microbroth gradient dilution method, and the bacteriostatic mechanism of EGCG was further determined by potassium ion determination, PI staining, OD_{260 nm} value, OD_{280 nm} value and cell morphology observation. Finally, the clearance rate of *S. aureus* and *S. typhimurium* in purple yam chip was studied by EGCG combined with pasteurization. [Results] The minimum inhibitory concentration (MIC) of EGCG for *S. aureus* and *S. typhimurium* was 0.512 mg/mL and 0.256 mg/mL, and the minimum bactericidal concentration was 1.024 mg/mL and 0.512 mg/mL, respectively. After MIC and 2MIC treatment, the K⁺ concentration of *S. aureus* increased to 2.26 mg/L and 2.39 mg/L, respectively, while after MIC and 2MIC treatment, the K⁺ concentration of *S. typhimurium* increased to 1.79 mg/L and 1.84 mg/L, respectively. All strains were higher than those without EGCG treatment. EGCG could destroy the cell membranes of *S. aureus* and *S. typhimurium*, promote the increase of membrane permeability, and then appear the phenomenon of cell contents leakage and cell shrinkage, resulting in bacterial death. The clearance rate

基金项目: 广州市科技计划项目(编号:202206010177); 广东省农业农村厅农业科研类及技术推广示范类项目(编号:2023-440000-58010200-9645)

通信作者: 余以刚(1968—), 男, 华南理工大学教授, 博士。E-mail: yuyigang@scut.edu.cn

收稿日期: 2023-12-30 **改回日期:** 2024-08-05

of *S. aureus* and *S. typhimurium* in purple yam chip was 100% after treatment with EGCG at MIC combined with pasteurization. [Conclusion] EGCG has antibacterial effect on foodborne pathogens *in vitro*, and can be used as a natural antibacterial preservative in food.

Keywords: epigallocatechin gallate; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella typhimurium*; bacteriostatic mechanism; purple yam chip

紫淮山是一种草本蔓生性植物,属于淮山的紫红肉品种群,因其富含花青素和多糖等功能活性成分,深受广大消费者喜爱。由于紫淮山上市季节性强,在贮藏期间容易腐烂变质,且其黏液接触皮肤会引起瘙痒等问题,严重影响了紫淮山的销售^[1]。因此,常将紫淮山制成预包装食品,如作为馅料应用于月饼、面包制作中。然而,在紫淮山加工过程及贮藏期间,易受微生物如金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和沙门氏菌(*S. typhimurium*)感染,不仅造成严重的经济损失,还极大危害人类身体健康。

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗衰老以及抗癌等功效^[2-3],常应用在食品保健、抑菌、保鲜和化妆品等领域^[4]。100多年前,Mc Naught证明了茶可以杀死 *S. typhimurium* 和羊布鲁氏杆菌^[5],而茶多酚及其单体的抗菌效用近 30 年才开始深入研究。EGCG 作为茶多酚的主要活性成分,在抑菌方面发挥重要作用。Knidel 等^[6]通过评估 EGCG 对 9 株具有不同遗传特征和抗菌敏感性的 *S. aureus* 抗菌潜力,发现 EGCG 不仅能够有效杀死 *S. aureus*,还可显著降低被 *S. aureus* 感染的大蜡螟幼虫死亡率。此外,Wang 等^[7]研究发现 EGCG 对副溶血性弧菌 17802 具有抑制效果,且能阻碍其生物膜的形成。目前对 EGCG 抑菌方面的研究仅局限于其对不同微生物抑菌效果的探索,关于其抑菌机制的内容却鲜有报道,极大限制了 EGCG 的应用范围。

研究旨在探究 EGCG 对 *S. aureus* 及 *S. typhimurium* 的抑菌活性,并明确其对细菌细胞膜的作用机制,探索 EGCG 作为抑菌剂对紫淮山片中微生物的清除效果,进一步为 EGCG 在食品工业中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

S. aureus (ATCC 6538)、*S. typhimurium* (ATCC 14028):华南理工大学食品科学与工程学院食品安全与检测实验室;

紫淮山:龙门县绿天源生态农业发展有限公司;

EGCG:纯度 95%,上海麦克林生化科技有限公司;

戊二醛:上海麦克林生化科技有限公司;

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB):广东环凯微生物科技有限公司;

碘化丙啶(PI):生工生物工程(上海)股份有限公司;

无水乙醇:分析纯,广州试剂化学厂。

1.1.2 主要仪器设备

超净工作台:SW-CJ-1FD 型,苏州净化设备有限公司;

分析天平:FA2104 型,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;

多功能酶标仪:Cytation5 型,美国 BioTek 公司;

高速冷冻离心机:H1750R 型,湖南湘仪离心机有限公司;

高温高压灭菌锅:SHZ-88A 型,江苏太仓实验设备厂;

原子吸收分光光度计:Z-2000 型,日本日立公司;

扫描时电子显微镜:MVE064606-60020-S 型,思玛科技(广州)有限公司;

恒温振荡培养箱:SPX-250B-Z 型,苏州培英实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌与沙门氏菌菌悬液制备 用接种环蘸取受试菌冻存液,分别接种于 TSA 上,在恒温培养箱 37℃培养 24 h。挑取单菌落于 TSB 中,在 37℃恒温振荡培养箱培养 16 h(*S. typhimurium*)/24 h(*S. aureus*)至稳定期。最后 8 000×g 离心 3 min 获得沉淀物,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,重悬于 TSB 培养基中,得到 6.0 lg(CFU/mL)菌液。

1.2.2 EGCG 对受试菌最小抑菌质量浓度(MIC)及最小杀菌质量浓度(MBC)测定 根据临床和实验室标准协会(CLSI 2009)指南^[8],采用微量肉汤梯度稀释法测定 EGCG 对受试菌的 MIC 和 MBC。

首先用去离子水配制质量浓度为 4.096 mg/mL 的 EGCG 母液,取无菌 TSB 加入 96 孔板中,在首孔中加入 EGCG 母液,进行 2 倍梯度稀释。然后分别加入菌悬液 [6.0 (lg CFU/mL)],再次混匀,得到终质量浓度为 2.048, 1.024, 0.512, 0.256, 0.128, 0.064, 0.032, 0.016 mg/mL 的 EGCG 系列培养体系。其中阳性对照组不加入受试菌悬液,阴性对照组不加 EGCG 溶液。随后在 37℃培养 24 h,记录待测样品在 600 nm 处的吸光值,记为 OD_{600 nm},并与阴性对照组进行比较。最后再分别从 96 孔板中无明显浑浊菌体的孔中取 100 μL 混合菌液加入 20 mL TSB 培养基中,置于 37℃恒温振荡培养箱复苏 24 h(180 r/min),若复苏培养后无细菌生长,则该 EGCG 浓度为 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 的 MBC。

1.2.3 EGCG 处理对受试菌胞内小分子泄漏的影响 根

据文献[9],修改如下:首先分别取5 mL培养至稳定期的两种受试菌悬液,12 000 r/min、4 °C下离心5 min得到沉淀物。清洗后重悬于50 mL含有不同浓度EGCG的生理盐水中,得到终浓度为1/2MIC、MIC和2MIC的EGCG培养体系。对照组为无EGCG溶液体系。然后在37 °C、180 r/min条件下培养,分别在0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 h时取样,以12 000 r/min、4 °C离心5 min后,取上清液过0.22 μ m滤膜备用(-20 °C保存)。最后使用原子吸收分光光度计测定待测样品中钾离子浓度。

1.2.4 EGCG处理对受试菌胞内大分子泄漏的影响

(1) PI染色试验:根据文献[10],修改如下:取受试菌菌液5 mL于12 000 r/min、4 °C离心5 min。用等量无菌生理盐水清洗沉淀物,分别加入5 mL用无菌PBS配制浓度为1/2MIC、MIC和2MIC的EGCG溶液,充分混匀,37 °C培养4 h。将孵育后的菌液离心(8 000 r/min, 5 min)获得沉淀,清洗后重悬于PBS中。然后添加PI染液,震荡混匀,并在37 °C黑暗条件下培养30 min。孵育结束后,在激发波长495 nm和发射波长625 nm下检测其荧光光谱。以无菌生理盐水代替EGCG作为对照组。

(2) 核酸及蛋白泄漏量的测定:根据文献[11],修改如下:分别配制两种受试菌的菌悬液和1/2MIC、MIC和2MIC浓度EGCG溶液,将不同浓度的EGCG溶液分别加入*S. aureus*和*S. typhimurium*菌悬液中,37 °C恒温下培养8 h,每隔60 min取样测定上清液OD_{260 nm}和OD_{280 nm}值。以不含EGCG的菌液作为对照。

1.2.5 EGCG处理对受试菌细胞形态的影响 根据文献[12],首先制备*S. aureus*和*S. typhimurium*菌悬液,培养至稳定期[6.0 lg(CFU/mL)],使用无菌PBS缓冲液稀释菌液至5.0 lg(CFU/mL)。分别取1 mL受试菌液,离心5 min(8 000 r/min, 25 °C),弃去上清,加入1 mL含不同浓度EGCG的无菌PBS缓冲液重悬菌体沉淀,得到1/2MIC、MIC和2MIC的EGCG处理体系。将样品置于37 °C恒温培养箱孵育8 h。孵育结束后用无菌PBS清洗离心后的菌体沉淀,再分别加入1 mL 2.5%戊二醛溶液,充分混匀置于4 °C过夜固定。次日将固定好的菌悬液离心5 min(8 000 r/min, 25 °C),以PBS清洗沉淀。然后依次加10%, 30%, 50%, 70%, 90%的乙醇溶液后静置10 min, 8 000 r/min离心5 min,最后用1 mL无水乙醇重悬菌体沉淀。提前将盖玻片用无水乙醇进行浸泡灭菌,再贴上导电胶置于扫描电镜载物台。取5 μ L菌悬液滴在盖玻片上,待其干燥后喷金,置于扫描电镜下观察,拍照记录。以加入等体积的无菌水作为对照组。

1.2.6 EGCG处理结合巴氏杀菌对紫淮山片中受试菌的杀菌效果 将新鲜紫淮山清洗后沥干,去皮切成厚约1 cm的片状。随后将其装进高温灭菌袋,121 °C高温下灭菌15 min,并随机挑选6片进行无菌检查。若无菌化处理

后紫淮山片中活菌数<1.0 lg(CFU/g)则认为该组紫淮山片基本无菌,可用于后续试验。采用浸泡法分别接种*S. aureus*和*S. typhimurium*到灭菌后的紫淮山中,接种量约为4.0 lg(CFU/g)。将接*S. aureus*样品分别随机分为7组,首先在1/2MIC、MIC和2MIC EGCG溶液中浸泡5 min后晾干,对照组用无菌水处理,然后将其中3组密封在无菌袋中85 °C巴氏杀菌15 min,最后取样进行*S. aureus*计数。接种*S. typhimurium*的样品操作步骤同上。取1 g样品,加入0.85%无菌生理盐水9 mL充分震荡混合后,取稀释后样品涂布于TSA培养基,37 °C培养48 h后分别计算*S. aureus*和*S. typhimurium*的活菌数。

1.2.7 数据统计与分析 所有试验数据均使用SPSS Statistics 25.0软件进行统计学分析,各组数据的显著性分析通过独立样本*t*检验以及Duncan多重比较实现。 $P < 0.05$ 时有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 EGCG对受试菌的MIC和MBC

选取绿茶中主体儿茶素EGCG作为抑菌剂,测定其对*S. aureus*和*S. typhimurium*的MIC和MBC。与阴性对照组比较,OD_{600 nm}下降50%及以上的第一个稀释浓度为EGCG的MIC。如表1所示,随着质量浓度的降低,EGCG对*S. aureus*和*S. typhimurium*生长抑制能力逐渐减小。在质量浓度为0.512 mg/mL时,*S. aureus*的OD_{600 nm}下降 $\geq 50\%$,由此可判断EGCG对*S. aureus*的MIC为0.512 mg/mL。在质量浓度为0.256 mg/mL时,*S. typhimurium*的OD_{600 nm}下降 $\geq 50\%$,由此可判断EGCG对*S. typhimurium*的MIC为0.256 mg/mL。

相关研究表明,绿茶茶多酚对*S. typhimurium*的MIC为1.0 mg/mL^[13],对*S. aureus*的MIC为8.0 mg/mL^[14]。而EGCG作为绿茶茶多酚中的主要活性成分,对*S. typhimurium*和*S. aureus*的抑菌效果优于绿茶茶多酚。相比于其他抑菌剂,EGCG对*S. aureus*和*S. typhimurium*的抑制效果具有优势。如绿原酸对*S. typhimurium*的MIC为32 mg/mL,五味子乙醇提取液对*S. aureus*的MIC为1.25 mg/mL^[15],月桂酸对两种菌的MIC均为10 mg/mL^[16]。由扩大培养试验可知,EGCG对*S. aureus*和*S. typhimurium*的MBC分别为1.024, 0.256 mg/mL。由此可见,EGCG对*S. aureus*和*S. typhimurium*具有良好的抑菌活性。

2.2 EGCG处理对受试菌胞内小分子泄漏的影响

如图1(a)所示,*S. aureus*上清液中K⁺初始质量浓度为0.48 mg/L,8 h后其质量浓度为1.66 mg/L。1/2MIC、MIC及2MIC处理组上清液中的K⁺质量浓度均有快速增长趋势,8 h后MIC和2MIC处理组的K⁺质量浓度分别上升到2.26, 2.39 mg/L,与对照组相比有显著性差异($P <$

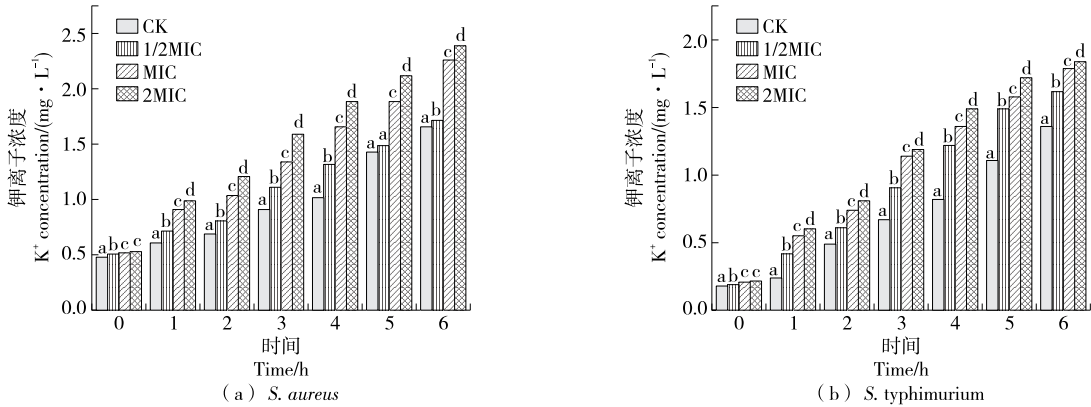
表 1 EGCG 处理后 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 菌悬液的 OD_{600 nm}[†]
Table 1 The OD_{600 nm} of *S. aureus* and *S. typhimurium* suspension treated by EGCG

EGCG 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	EGCG 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>
2.048	+	+	0.064	—	—
1.024	+	+	0.032	—	—
0.512	+	+	0.016	—	—
0.256	—	+	0.008	—	—
0.128	—	—	0.004	—	—

[†] “+”表示生长对照比较 OD_{600 nm} 下降 ≥50% ; “—”表示生长对照比较 OD_{600 nm} 下降 <50%。

0.05), 分别升高 0.60, 0.73 mg/L。由图 1(b) 可知, *S. typhimurium* 上清液中 K⁺ 初始质量浓度为 0.18 mg/L, 同样呈缓慢增加趋势, 8 h 后达到 1.36 mg/L。而经 1/2MIC、MIC 与 2MIC EGCG 处理后, 上清液中的 K⁺ 浓度呈较快上升趋势, 8 h 后 MIC 及 2MIC 处理组的 K⁺ 质量浓度分别

上升到 1.79, 1.84 mg/L, 与对照组相比分别升高 0.43, 0.48 mg/L, 均具有显著差异 ($P < 0.05$)。上述结果表明, 不同浓度 EGCG 处理会改变 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 细胞膜通透性, 进而导致胞内小分子物质泄漏量增加, 且呈浓度依赖性, 即 EGCG 浓度越高, 影响越明显。



字母不同表示同一时间下不同菌悬液浓度具有显著性差异 ($P < 0.05$)
图 1 EGCG 对 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 胞外 K⁺ 质量浓度的影响

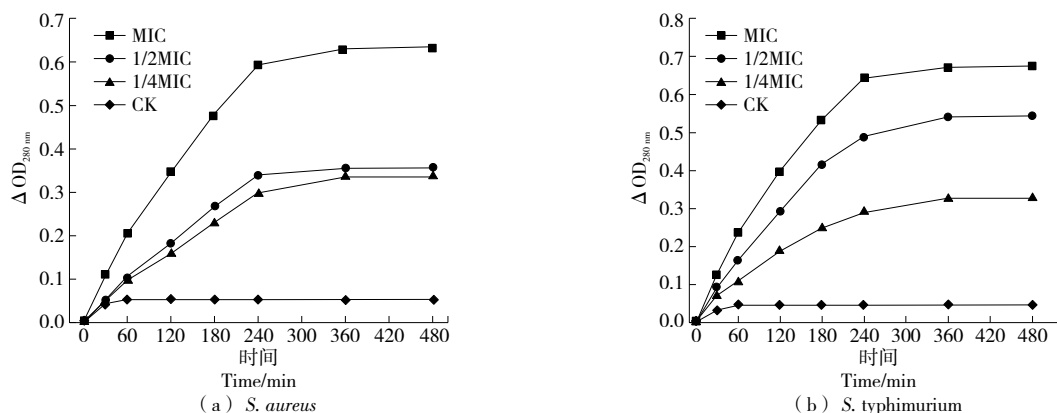
Figure 1 Effects of EGCG on extracellular K⁺ concentration of *S. aureus* and *S. typhimurium*

2.3 EGCG 处理对受试菌胞内大分子泄漏的影响

2.3.1 EGCG 处理对受试菌胞内蛋白泄漏的影响 蛋白质是细胞中酶和结构蛋白的重要组成成分, 也是细菌重要的生命物质, 在 280 nm 处有最大吸光值。由图 2 可知, 0~240 min 时, *S. typhimurium* 和 *S. aureus* 的 OD_{280 nm} 值随时间延长均呈不同程度的升高趋势 ($P < 0.05$)。经 EGCG 处理 240 min 后, MIC 处理组 *S. aureus* 的 OD_{280 nm} 值升高至 0.593 ± 0.01 , MIC 处理组 *S. typhimurium* 的 OD_{280 nm} 值升高至 0.643 ± 0.01 。表明较高浓度 EGCG 处理可破坏 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 的细胞膜结构, 造成细胞膜损伤, 改变其通透性, 进而导致胞内蛋白的泄漏。此外, 当 EGCG 质量浓度为 1/2MIC 时, *S. typhimurium* 的 OD_{280 nm} 值增加幅度较大, 说明 EGCG 对 *S. typhimurium* 细胞膜通透性具有更显著的影响。

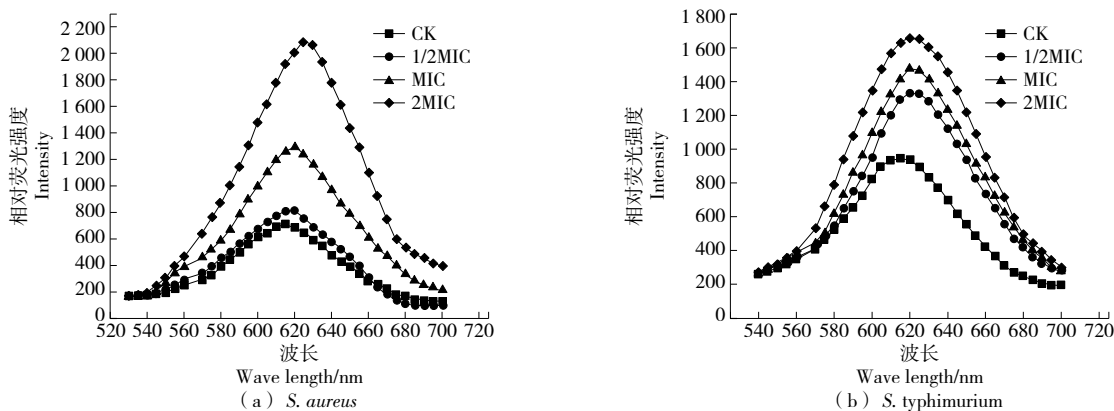
2.3.2 PI 染色试验 PI 作为 DNA 嵌入荧光探针, 可穿

过受损的细胞膜与胞内 DNA 嵌合, 通过特定波长光源激发下可以发出荧光^[17]。由图 3(a) 可知, 3 个处理组的荧光光谱强度均呈不同程度的增加, 其中 MIC 和 2MIC 组均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。1/2MIC 组的荧光强度变化幅度较小, 可能是因为 1/2MIC 的 EGCG 浓度较低, 对 *S. aureus* 细胞膜的破坏效果不强。在 620 nm 处 MIC 及 2MIC 处理组的相对荧光强度分别为 1 298.2, 2 009.7 RFU, 相较于对照组 (相对荧光强度为 689 RFU) 分别升高了 609.2, 1 320.7 RFU ($P < 0.05$), 说明 *S. aureus* 细胞膜完整性受到破坏, PI 染料进入胞内与大量 DNA 结合, 导致相对荧光强度升高。由图 3(b) 可知, 1/2MIC、MIC 和 2MIC 处理组的荧光强度显著高于对照组 ($P < 0.05$)。证明不同浓度的 EGCG 处理均能破坏 *S. typhimurium* 细胞膜完整性, 导致胞内 DNA 大量泄漏并与 PI 结合, 相对荧光强度增加。有研究^[18]表明, EGCG 能够

图2 EGCG对 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 胞外蛋白的影响Figure 2 Effects of EGCG on extracellular protein of *S. aureus* and *S. typhimurium*

与细菌细胞膜蛋白特异性结合,以特定的代谢方式如通过其分子的疏水性干扰细胞膜磷脂双分子层的流动性对细胞膜造成损伤,导致细菌生命代谢受阻,进而引起细菌

死亡。据此推测,EGCG可能通过作用于细菌细胞膜的靶点,破坏受试菌的细胞膜结构、改变其通透性,从而达到抑菌效果。

图3 EGCG对 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 基因组DNA的影响Figure 3 Effects of EGCG on genomic DNA of *S. aureus* and *S. typhimurium*

2.3.3 EGCG处理对受试菌胞内核酸泄漏的影响 核酸在260 nm处具有最大吸收值^[19]。由图4可知,0~240 min时,*S. aureus*和*S. typhimurium*的OD_{260 nm}值随着不同浓度EGCG处理时间的延长而显著增加,而对照组无明显变化。其中*S. aureus*的MIC处理组在培养过程中OD_{260 nm}值均迅速上升,增加到 0.63 ± 0.01 ,显著区别于对照组($P < 0.05$)。*S. typhimurium*的1/2MIC和MIC处理组在培养过程中OD_{260 nm}值均呈快速升高趋势,分别增加到 0.801 ± 0.01 , 0.633 ± 0.01 ,与1/2MIC、对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。由此可见,EGCG作用于*S. aureus*和*S. typhimurium*后,其细胞膜通透性发生变化,造成胞内核酸泄漏,进而影响菌体的正常生长繁殖。因此EGCG对*S. aureus*和*S. typhimurium*细胞膜具有一定损伤作用,且损伤程度呈浓度依赖性,即EGCG浓度越高,损伤程度越大。

2.4 EGCG处理对受试菌细胞形态的影响

如图5所示,未经EGCG处理的*S. aureus*细胞为球状,表面光滑完整,呈葡萄串状排布。其中部分*S. aureus*细胞处于二分裂状态,说明对照组具有正常的细胞形态。不同浓度EGCG处理的*S. aureus*细胞形态发生明显变化。1/2MIC处理组中小部分细胞表面出现凹陷,表面发生黏结,MIC处理组的细胞变形严重,大部分细胞皱缩凹陷,小部分细胞内容物完全泄漏。而高浓度处理组(2MIC)的细胞呈现大面积破裂,呈现粘连状态,周围出现大量内泄物。相关研究^[20]表明,经过花生壳乙酸乙酯萃取物处理的*S. aureus*细胞形态也呈现表面粗糙、皱缩、黏结趋势。

如图6所示,对照组*S. typhimurium*细胞形态完整,呈杆状,无明显损伤。不同浓度EGCG处理对*S. typhimurium*影响显著,1/2MIC处理组中大部分菌体表

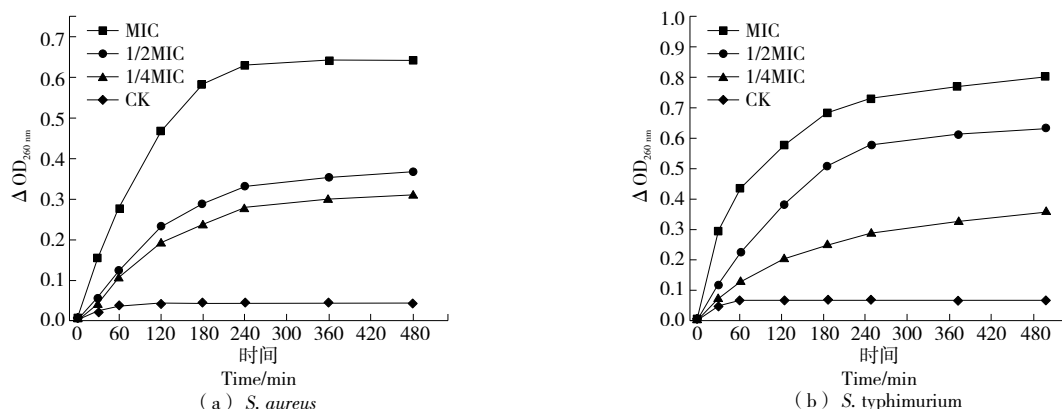

 图4 EGCG对*S. aureus*和*S. typhimurium*胞外核酸的影响

 Figure 4 Effects of EGCG on nucleic acid of *S. aureus* and *S. typhimurium*

面出现凹陷、溶洞,呈扁平状,MIC及2MIC处理组的菌体细胞皱缩、塌陷更加严重,部分细胞黏结成团,细胞边界模糊。何荣荣等^[21]研究茶皂素对*S. typhimurium*的抑菌效果时也发现,茶皂素能使*S. typhimurium*外观发生明显变化,出现塌陷、溶洞、表面轮廓不完整等现象。Tang等^[22]发现黑胡椒石油提取物能破坏对*S. typhimurium*细胞壁的完整性,改变细胞膜通透性,并抑制细胞内酶活性,进而杀死细菌。

较高浓度EGCG处理通过破坏*S. aureus*和*S. typhimurium*细胞结构与通透性,导致细胞凹陷、破裂及内容物泄漏等,进而杀死细菌。EGCG质量浓度越大,菌体细胞膜损伤越明显,与上述细胞膜损伤试验结果一致。当细胞膜受损,细胞内容物会泄漏,影响细菌新陈代谢,进而导致细胞死亡。结合受试菌胞内大分子泄漏、小分子泄漏细胞形态的影响试验可知,EGCG可能通过作用于*S. aureus*和*S. typhimurium*细胞膜上的靶点,破坏细胞膜完整性,改变其细胞膜通透性,导致小分子物质钾离子以及大分子物质核酸、蛋白质等泄漏量显著增加,影响细菌的正常代谢,进而引起细菌死亡。

2.5 EGCG结合巴氏杀菌处理对紫淮山片中受试菌的杀菌效果

通过探究不同浓度EGCG结合巴氏杀菌处理对紫淮山片中两种致病菌的清除效果,结果如图7所示。经测定紫淮山片的初始接菌量:*S. aureus*为 $(4.21 \pm 0.11) \lg(\text{CFU/g})$ 、*S. typhimurium*为 $(4.13 \pm 0.16) \lg(\text{CFU/g})$ 。

由图7(a)可知,单独使用1/2MIC、MIC及2MIC处理后,紫淮山片中*S. aureus*的计数值分别下降了 (1.15 ± 0.01) , (2.89 ± 0.03) , $(3.80 \pm 0.03) \lg(\text{CFU/g})$ 。而不同浓度EGCG结合巴氏杀菌处理后,紫淮山片中*S. aureus*下降更为显著($P < 0.05$),分别下降了 (2.60 ± 0.01) , (3.69 ± 0.02) , $(4.21 \pm 0.03) \lg(\text{CFU/g})$,其中2MIC EGCG结合

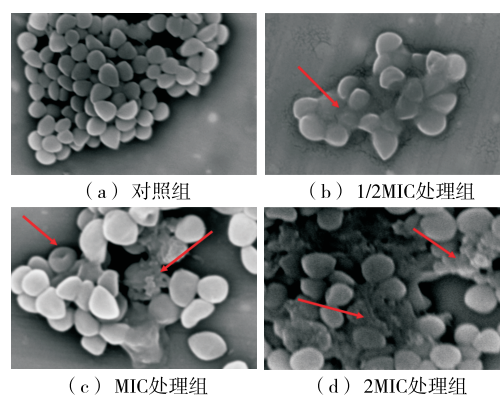

 图5 EGCG对*S. aureus*细胞形态的影响

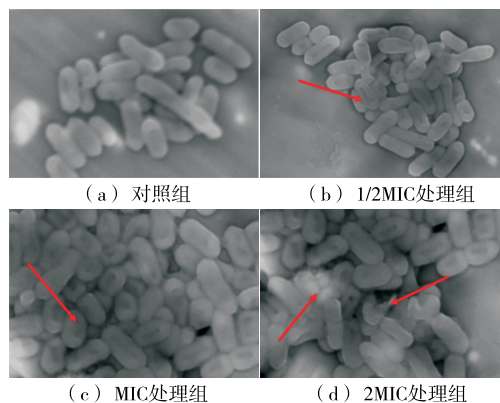
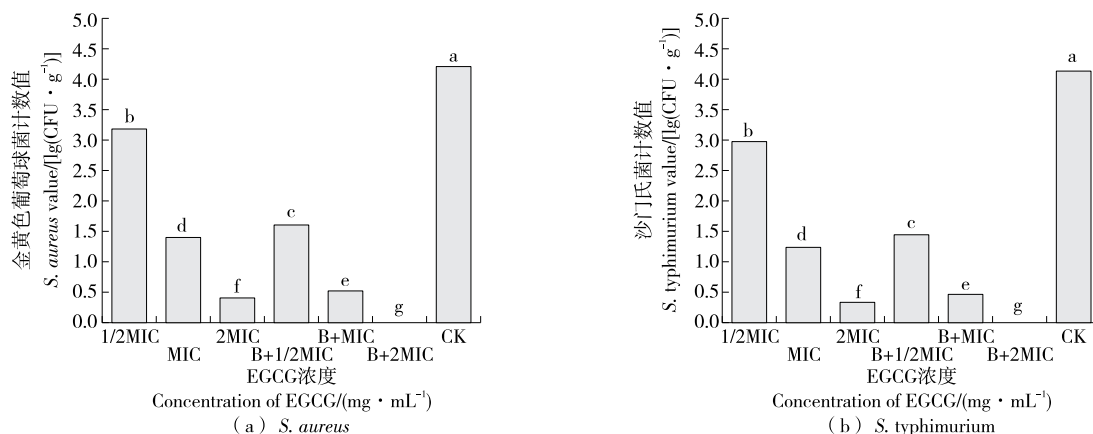
 Figure 5 Effects of EGCG on the morphology of *S. aureus* cells

 图6 EGCG对*S. typhimurium*细胞形态的影响

 Figure 6 Effects of EGCG on the morphology of *S. typhimurium* cells

巴氏杀菌处理组对*S. aureus*的清除率达到了100%。由图7(b)可知,单独使用1/2MIC、MIC及2MIC处理后,紫淮山片中*S. typhimurium*的计数值分别下降了约 $(1.02 \pm$

图7 不同处理对紫淮山片中 *S. aureus* 和 *S. typhimurium* 的影响Figure 7 Effects of different processing on *S. aureus* and *S. typhimurium* in purple yam chips

0.01), (2.80±0.01), (3.79±0.02) lg(CFU/g)。而不同浓度的EGCG结合巴氏杀菌处理后, *S. typhimurium* 显著减少 ($P<0.001$), 分别下降了 (2.68±0.02), (3.68±0.01), (4.13±0.02) lg(CFU/g), 其中2MIC EGCG结合巴氏杀菌处理组对 *S. typhimurium* 的清除率达到了100%。综上, EGCG结合巴氏杀菌处理对紫淮山片中 *S. aureus* 清除率高于单独使用EGCG处理。需要较高浓度EGCG处理 *S. aureus* 才能达到良好的清除效果, 而MIC EGCG结合巴氏杀菌处理的抑菌率达到了88.41%, 2MIC EGCG结合巴氏杀菌的抑菌率达到了100%。同样, 单独使用EGCG对紫淮山片中污染的 *S. typhimurium* 的抑制效果不理想, 而MIC EGCG结合巴氏杀菌处理就可达到89.11%, 2MIC EGCG结合巴氏杀菌的抑菌率达到了100%。因此, 在紫淮山片生产加工中, 采用EGCG结合巴氏杀菌的杀菌方法可以有效清除其 *S. aureus* 和 *S. typhimurium*, 达到紫淮山片致病菌减控效果。

3 结论

针对表没食子儿茶素没食子酸酯对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌活性及细胞膜的破坏作用进行研究, 证明表没食子儿茶素没食子酸酯可以有效抑制微生物的生长, 且对金黄色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度为0.512 mg/mL、最小杀菌质量浓度为1.024 mg/mL, 对沙门氏菌的最小抑菌质量浓度为0.256 mg/mL、最小杀菌质量浓度为0.512 mg/mL, 具有良好的抑菌活性。进一步研究表没食子儿茶素没食子酸酯对金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑菌机制, 发现表没食子儿茶素没食子酸酯处理后导致致病菌细胞膜通透性和完整性均发生破坏, 首先是小分子泄露如K⁺泄露, 然后是大分子泄露如DNA和蛋白泄露, 且出现皱缩、凹陷现象, 最终导致细菌的正常新陈代谢紊乱, 甚至失活。将表没食子儿茶素没食子酸

酯与巴氏杀菌相结合, 可完全灭活紫淮山片中的金黄色葡萄球菌和沙门氏菌。但研究仅从细胞水平研究表没食子儿茶素没食子酸酯对食源性致病菌的抑制机理, 未来可通过组学技术全面揭示表没食子儿茶素没食子酸酯对食源性致病菌的关键代谢途径和作用靶点。

参考文献

- [1] 郑棉文, 王锋, 苏小军, 等. 紫淮山的营养价值及加工研究进展[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(1): 210-214.
- ZHENG M W, WANG F, SU X J, et al. Nutritional value and processing research progress of purple yam[J]. Food Research and Development, 2018, 39(1): 210-214.
- [2] KIM E, HWANG K, LEE J, et al. Skin protective effect of epigallocatechin gallate[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(1): 173.
- [3] 曾露, 张帅, 艾静. 表没食子儿茶素没食子酸酯研究进展[J]. 神经药理学报, 2021, 11(1): 38-56.
- ZENG L, ZHANG S, AI J. Research progress of epigallocatechin gallate[J]. Acta Neuropharmacologica, 2021, 11(1): 38-56.
- [4] STEINMANN J, BUER J, PIETSCHMANN T, et al. Antiinfective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea[J]. British Journal of Pharmacology, 2013, 168(5): 1 059-1 073.
- [5] YANG Y H, ZHANG T. Antimicrobial activities of tea polyphenol on phytopathogens: a review[J]. Molecules, 2019, 24(4): 816.
- [6] KNIDEL C, PEREIRA M F, BARCELOS D H F, et al. Epigallocatechin gallate has antibacterial and antibiofilm activity in methicillin resistant and susceptible[J]. Natural Product Research, 2021, 35(22): 4 643-4 647.
- [7] WANG H, ZOU H, WANG Y, et al. Inhibition effect of

- epigallocatechin gallate on the growth and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2022, 75(1): 81-88.
- [8] NOVY P, RONDEVALDOVA J, KOURIMSKA L, et al. Synergistic interactions of epigallocatechin gallate and oxytetracycline against various drug resistant *Staphylococcus aureus* strains in vitro[J]. Phytomedicine International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology, 2013, 20(5): 432-435.
- [9] KATAOKA N, MATSUTANI M, MURATA R, et al. Potassium ion leakage impairs thermotolerance in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 133(2): 119-125.
- [10] PARK I K, KANG D H. Effect of electroporation on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Serovar typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and apple juice[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(23): 7122-7129.
- [11] 毕可. 热力场中化学物质对枯草杆菌芽孢杀灭作用的影响[D]. 银川: 宁夏大学, 2022: 15.
- BI K. Effects of chemical substances in thermal field on inactivating of *Bacillus subtilis* spores[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022: 15.
- [12] KANG J M, LIU L, LIU M H, et al. Antibacterial activity of gallic acid against *Shigella flexneri* and its effect on biofilm formation by repressing *mdoH* gene expression[J]. Food Control, 2018, 94: 147-154.
- [13] 张昊雪, 屠焰, 胡发明, 等. 植物提取物对犊牛致病菌的体外抑菌效果研究[J]. 饲料工业, 2022, 43(4): 15-20.
- ZHANG H X, TU Y, HU F M, et al. The antibacterial effect of plant extracts on calf pathogenic bacteria in vitro[J]. Feed Industry, 2022, 43(4): 15-20.
- [14] 綦国红, 张佳怡, 杨志萍, 等. 茶多酚对金黄色葡萄球菌生物膜产生的影响[J]. 食品工业, 2021, 42(2): 48-50.
- QI G H, ZHANG J Y, YANG Z P, et al. Effect of tea polyphenols on development biofilm in *Staphylococcus aureus* [J]. Food Industry, 2021, 42(2): 48-50.
- [15] 张媛媛. 五味子抗菌物质的提取、抑菌机理及在食品中的应用研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2016: 27.
- ZHANG Y Y. Study on the extraction, antibacterial mechanism of antibacterial substances from *fructus schisandrae chinensis* and its application on food[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2022: 27.
- [16] 张笑薇. 没食子酸和百里香酚协同对鲜切番茄表面主要致病菌的杀菌效应及其杀菌机制[D]. 广州: 华南理工大学, 2021: 18.
- ZHANG X W. Synergistic efficacy of gallic acid and thymol against major foodborne pathogens on fresh-cut tomatoes and their antibacterial mechanism[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021: 18.
- [17] CHAKOTIYA A S, TANWAR A, NARULA A, et al. Zingiber officinale: its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 107: 254-260.
- [18] 王睿飞. 曲酸和茶多酚的协同抑菌机理及其在冷鲜水产品中的应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2021: 57.
- WANG R F. Synergistic antibacterial mechanism of kojic acid and tea polyphenols in combination and their application on chilled aquatic products[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021: 57.
- [19] 陈雪琴, 赵圆圆, 张珍, 等. 肉桂精油的化学成分分析及其对沙门氏菌细胞膜损伤机制的研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14): 24-32.
- CHEN X Q, ZHAO Y Y, ZHANG Z, et al. Analysis of cinnamon essential oil composition and its mechanism of cell membrane damage in *Salmonella enterica*[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(14): 24-32.
- [20] 曹瑶, 戚馨月, 汪海峰, 等. 花生壳乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌抗菌作用及机理[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(2): 138-144.
- CAO Y, QI X Y, WANG H F, et al. Bacteriostatic effect and mechanism of ethyl acetate extracts from peanut shell on *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(2): 138-144.
- [21] 何荣荣, 谭运寿, 张美虹, 等. 茶皂素对沙门氏菌的抑菌机理及对鸡胸肉的保鲜效果[J]. 热带生物学报, 2019, 10(4): 360-366.
- HE R R, TAN Y S, ZHANG M H, et al. Antibacterial mechanism of tea saponin against *Salmonella* sp. and its application in chicken breast preservation[J]. Journal of Tropical Biology, 2019, 10(4): 360-366.
- [22] TANG H, CHEN W, DOU Z M, et al. Antimicrobial effect of black pepper petroleum ether extract for the morphology of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(7): 1-10.