

EGCG 对虹鳟鱼源杀鲑气单胞菌的抑制作用

李颖畅¹, 段巾瑞¹, 马荣荣², 赵楠¹, 李学鹏^{1*}

(¹渤海大学食品科学与工程学院生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013)

(²山东省荣成市技术转移服务中心 山东荣成 264323)

摘要 目的:虹鳟鱼通常含有较多的游离氨基酸和含氮化合物,容易产生生物胺。从虹鳟鱼中分离杀鲑气单胞菌,研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对杀鲑气单胞菌的抑制作用。方法:通过杀鲑气单胞菌细胞形态、碱性磷酸酶活性(AKP)、细胞内 Na⁺K⁺-ATP 酶、细胞外蛋白酶和细胞外总蛋白含量,研究 EGCG 对杀鲑气单胞菌细胞的抑制作用。结果:EGCG 对杀鲑气单胞菌的最小抑菌浓度为 0.25 mg/mL。EGCG 对杀鲑气单胞菌的生物胺(BAs)生成有良好的抑制作用,且 BAs 含量随着 EGCG 浓度的增加而降低。EGCG 能够破坏杀鲑气单胞菌的细胞壁,增强细胞膜的通透性,导致细胞内 AKP、Na⁺K⁺-ATP 酶和蛋白质泄漏,引起菌体死亡。EGCG 还能抑制细胞外蛋白酶的分泌并降低总蛋白含量,1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 组对蛋白酶的抑制率分别为 9.89%,34.53%,40.12%。电子显微镜显示细菌细胞结构被破坏,并伴随细胞胞质溶解。结论:EGCG 对虹鳟鱼源杀鲑气单胞菌具有抑制作用,为 EGCG 在水产品保鲜中的应用提供理论依据。

关键词 虹鳟鱼;产胺菌;杀鲑气单胞菌;EGCG;抑菌机制

文章编号 1009-7848(2025)03-0329-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2025.03.032

虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)是鲑鱼科的一种淡水鱼,其富含蛋白质、氨基酸、微量元素,不含胆固醇^[1]。虹鳟鱼的高水活性、适宜的 pH 值和丰富的游离氨基酸为微生物的生长繁殖创造了有利条件。此外,微生物产生氨基酸脱羧酶,导致游离氨基酸脱羧,产生生物胺。生物胺(BAs)是一种低分子质量的氮化合物,包括组胺(HIS)、尸胺(CAD)、腐胺(PUT)、苯乙胺(PEA)、酪胺(TYR)、色胺、色胺、精胺、亚精胺和胍丁胺^[2],存在于水产品、肉制品、水果、坚果等多种食品中。生物胺的积累对人体健康构成威胁,并伴有轻度中毒。当生物胺中毒严重时会危及生命。鱼体内丰富的营养物质使生物胺产生菌快速生长和繁殖,产生更多的生物胺。研究水产品中生物胺产生菌尤为重要。

目前主要通过改变温度、pH 值、压力和辐照技术等物理方法控制生物胺含量。从植物、动物和藻类中获得天然防腐剂,因高安全性和强抗菌效果而被许多消费者所接受。根皮素可有效控制大西洋鲑鱼中酪胺、组胺、尸胺和腐胺的含量^[3]。肉桂

皮油能有效延长草鱼鱼片在冷藏时的保质期,延缓尸胺和腐胺的生长^[4]。Cai 等^[5]发现,精油可有效抑制微生物繁殖,控制红鼓(海螺)鱼片中生物胺的形成,延长保质期。此外,葡萄籽提取物能显著抑制黑鱼体内的生物胺和游离氨基酸含量^[6]。茶多酚,也被称为茶单宁,是茶中多酚类化合物的总称。茶多酚不仅具有较强的抗菌作用^[7],也有望用于肥胖、抗癌、消炎、抗肿瘤和抗动脉粥样硬化动脉^[8-10]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate,EGCG)约占儿茶素的 50%~80%,是一种白色或灰色粉末,具有良好的水溶性,经人体代谢后可降解为 EGC 和没食子酸^[11]。EGCG 对杀鲑气单胞菌的抑菌作用报道较少。本文通过测定杀鲑气单胞菌内总蛋白含量、胞外蛋白酶含量、碱性磷酸酶活性(AKP)和 Na⁺K⁺-ATP 酶活性,阐明 EGCG 对杀鲑气单胞菌的抗菌机制,这对控制虹鳟鱼中生物胺具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

虹鳟鱼,质量(1.55 ± 0.11)kg,购于辽宁省锦州市林西路水产市场。EGCG(≥98%),北京索莱宝生物科技有限公司;LB 肉汤培养基、LB 营养琼脂、生化试剂,军科弘创(北京)生物技术有限公

收稿日期:2024-03-27

基金项目:辽宁省教育厅项目(JYTMS20231619)

第一作者:李颖畅,女,博士,教授

通信作者:李学鹏 E-mail: xuepengli8234@163.com

司;二乙酸荧光素($\geq 98\%$)、磷酸盐缓冲液,上海麦克林生化科技股份有限公司;超微量 ATP 酶(Na^+ 、 K^+)测试盒、碱性磷酸酶测试盒、总蛋白定量测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 仪器与设备

PE Victor X3 型多功能酶标仪,美国 Perkin Elmer 公司;UV-1880 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;F7000 型荧光分光光度计,日本日立公司;Scientz-IID 超声波细胞粉碎机,广州宝汇生物科技有限公司;Biofuge Stratos 冷冻高速离心机、Legend Micro21R 台式微量离心机,美国赛默飞世尔科技公司;CZCJ-2S 型超净工作台,北京赛欧华创科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 生物胺产生菌的分离、纯化及鉴定 将虹鳟鱼在无菌操作台中切成 $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 的鱼片,置于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮藏 18 d。在第 18 天取 10.0 g 上述虹鳟鱼鱼片,加入 90 mL 的无菌生理盐水,拍打摇匀,将匀浆进行 10 倍递增稀释,取适宜稀释度的菌液 $100\text{ }\mu\text{L}$,将其均匀的涂布于生物胺初筛培养基上, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。观察菌落形态,选择蓝紫色或蓝色的菌落,在生物胺初筛培养基中连续纯化 3 次,并保存菌种。生物胺初筛培养基的组成参考 Bover-Cid 等^[12]的方法。将活化后的产胺菌利用 DNA 提取试剂盒中的吸附柱法进行 DNA 提取,在 PCR 扩增仪上对 DNA 进行扩增,扩增条件参考 Lerfall 等^[13]的方法。将扩增产物送至上海生工生物科技有限公司进行测序,鉴定菌株。

1.3.2 EGCG 对杀鲑气单胞菌最小抑菌浓度及时间抑菌曲线 采用倍数稀释法确定 EGCG 的最小抑菌浓度(MIC),参考朱璐丹^[14]的方法,将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 活化的菌液加入 96 孔板中,然后向孔中加入不同质量浓度的 EGCG,使孔中质量浓度分别为 2,1,0.5,0.25,0.125,0.0625 mg/mL。将 96 孔板在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 10 h 后,用酶标仪测定其在 $\text{OD}_{595\text{ nm}}$ 处的吸光值,吸光值出现显著下降时 EGCG 的浓度为 MIC。将 $1/2\text{ MIC}$ 、 1 MIC 、 2 MIC 浓度的 EGCG 与细菌在 LB 液体培养基中培养,以加入无菌水的菌液作为空白对照。放置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的生长曲线仪中培

养 24 h,每间隔 1 h 测定 1 次 $\text{OD}_{595\text{ nm}}$ 的值。

1.3.3 生物胺的测定 生物胺的测定参考 Bover-Cid 等^[12]的方法。将杀鲑气单胞菌接种于 LB 肉汤培养基中培养 12 h。再将 0.2 mL 菌悬液接种于 LB 肉汤培养液中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 160 r/min 培养 2 d。量取 1 mL 菌悬液,加入 1 mL 5%三氯乙酸,将该混合溶液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\text{ }000\text{ r/min}$ 下离心 10 min。量取 1 mL 上清液分别与 0.125,0.25,0.5 mg/mL EGCG 混合,不加 EGCG 为对照,加 0.3 mL 磺酰氯(Dns-Cl)衍生(10 mg/mL)。该混合物用乙腈溶液定容至 1.5 mL ,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤。同时,制备不同浓度的混合标准溶液,并衍生。以超纯水(A)和乙腈(B)为流动相,梯度洗脱。 C_{18} 柱(Agilent ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} $4.6\text{ nm}\times 250\text{ nm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$,DAD 检测波长为 254 nm ,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$,流速为 1.0 mL/min 。

1.3.4 细胞内二乙酸荧光素的测定 细胞膜通透性的测定采用二乙酸荧光素(FDA)染色法,量取活化的菌液 $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min,弃上清液,用等体积的无菌 PBS 重悬,将不同质量的 EGCG 与其混合,使其终质量浓度为 0.1 25,0.25,0.5 mg/mL,以无菌水作为对照。 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 8 h 后, $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min,再用 PBS 重悬菌体并离心,重复 3 次。向沉淀中加入 2 mg/mL FDA $250\text{ }\mu\text{L}$,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,无菌 PBS 洗涤 3 次,然后重悬于 PBS 中。测定梅佳林等^[15]的方法,用荧光分光光度计测定荧光强度。

1.3.5 细胞中碱性磷酸酶和 Na^+K^+ -ATP 酶的测定 细胞的前处理参考梅佳林等^[15]的方法,用碱性磷酸酶(AKP)试剂盒测定破碎的菌液中碱性磷酸酶含量。使用超微量 Na^+K^+ -ATP 酶试剂盒测定破碎的菌悬液中 Na^+K^+ -ATP 酶活性。

1.3.6 细胞内总蛋白含量的测定 细胞的前处理参考梅佳林等^[15],用总蛋白定量(TP)试剂盒测定破碎的菌悬液中总蛋白的含量。

1.3.7 细胞产胞外蛋白酶的测定 参考刘佳宜等^[16]的方法,将脱脂奶粉配成的牛奶 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌后,取 10 mL 与 90 mL 的琼脂溶液(1.5%)混合,用牛津杯打孔,制成脱脂奶琼脂培养基。将活化的菌液接种至 0.125,0.25,0.5 mg/mL 质量浓度的 EGCG 溶液中,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 160 r/min 下振荡培养 12

h. 将 200 μL 的上述菌液加入脱脂奶琼脂培养基的牛津杯孔中,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,测量培养基中的透明圈直径。

1.3.8 细胞的微观结构的测定 扫描电镜的观察菌体参考梅佳林等^[15]的方法。

1.4 数据分析

使用 Origin 2019 和 SPSS 19.0 进行数据分析与作图。

2 结果与分析

2.1 EGCG 对杀鲑气单胞菌最小抑菌浓度及时间抑菌曲线

EGCG 的最低抑菌浓度是能显著抑制细菌生长的最低浓度,可以准确反映 EGCG 对杀鲑气单胞菌的抑制作用。如图 1 所示,OD 值随着 EGCG 浓度的增加而降低,0.0625,0.125 mg/mL EGCG 的 OD 值与对照性差异。然而,当 EGCG 质量浓度为 0.25 mg/mL 时,OD 值与对照组有显著性差异($P < 0.05$),EGCG 对杀鲑气单胞菌的最低抑菌浓度为 0.25 mg/mL,表明 EGCG 对杀鲑气单胞菌具有明显的抑菌作用。据报道,红茶多酚(RTP)对紫色色杆菌 026 的 MIC 值为 1.8 mg/mL^[17],EGCG 对杀鲑气单胞菌的最低抑菌浓度与 RTP 有显著差异。图 2 所示,对照组中杀鲑气单胞菌在 2~10 h 进入对数生长期,10 h 之后菌体生长进入稳定期。加入 1/2 MIC EGCG 时杀鲑气单胞菌在培养 4~8 h 时进入对数生长期,与对照组相比推迟进入对数生长期的时间。加入 1 MIC 和 2 MIC EGCG 的培养液在 24 h 的培养期间细菌吸光值均低于 0.5,且菌体未进入对数生长期,由此可见,EGCG 对杀鲑气单胞菌的生长有明显的抑制效果。黑莓皮的乙醇提取物对单核细胞增生李斯特菌,恶臭假单胞菌和空肠弯曲菌具有明显抑制作用,6.6%,3.3%,1.65%乙醇提取物能很有效地抑制其生长^[18],这与我们的研究结果相一致。

2.2 生物胺含量的变化

杀鲑气单胞菌可产生苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺、精胺和其它生物胺。总生物胺含量的变化如图 3,对照组生物胺含量最高,EGCG 处理组生物胺含量较对照组显著降低($P < 0.05$)。此外,生物胺含量随 EGCG 浓度的增加而降低,表

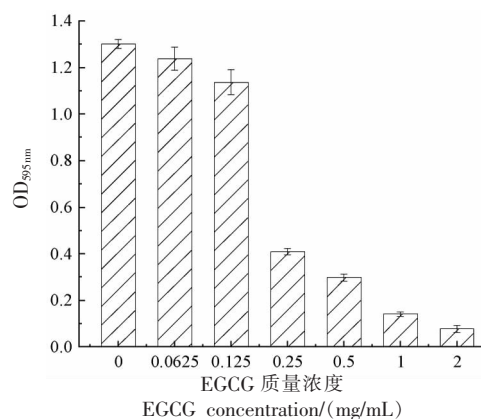


图 1 EGCG 对杀鲑气单胞菌的抑制作用

Fig.1 Antibacterial effect of EGCG on *Aeromonas salmonicida*

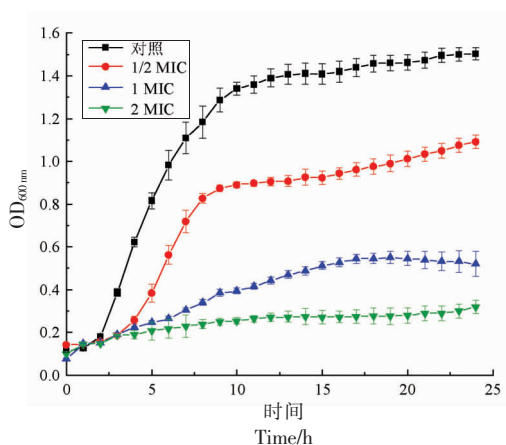


图 2 EGCG 对杀鲑气单胞菌的时间抑菌曲线

Fig.2 Time inhibitory curve of EGCG on *Aeromonas salmonicida*

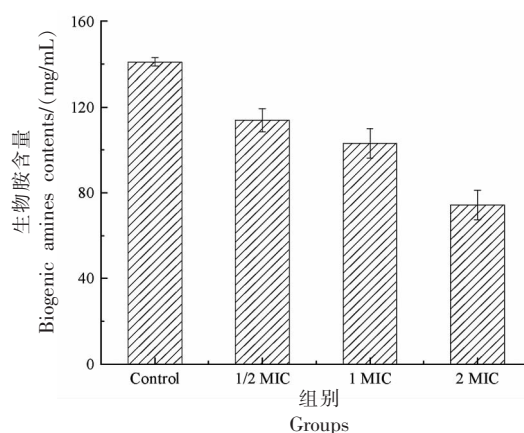


图 3 EGCG 对杀鲑气单胞菌生物胺的抑制作用

Fig.3 Effect of EGCG on the inhibition of biogenic amines by *Aeromonas salmonicida*

明 EGCG 对鲑鱼气单胞菌的抑制作用随 EGCG 浓度的增加而增加。因此,EGCG 可以有效抑制杀鲑

气单胞菌产生生物胺的能力。生物胺是由游离氨基酸通过脱羧酶脱羧产生的。EGCG引起杀鲑气单胞菌的损伤,并使氨基酸脱羧酶失活,导致生物胺含量的降低。Burgut 等^[19]发现蜂胶提取物可以显著抑制耐冷摩根氏菌生物胺的产生。

2.3 EGCG 对杀鲑气单胞菌细胞膜通透性的影响

真核细胞质膜的结构完整性对其细胞生物学功能和细胞的存活非常重要。非荧光荧光素二乙酸酯(FDA)可以穿过完整的细胞膜,并被细胞内酯酶水解生成黄绿色荧光素,激发波长为 488 nm,发射波长为 530 nm^[20]。当细胞膜完整时,这种荧光素会存在于细胞内,但是当细胞膜被破坏后,黄绿色荧光素很快流失,导致细胞内部荧光强度降低。细胞膜是保护细菌生长和代谢的屏障。同时,细胞膜也是抗菌药物的靶点,当遇到强抑制剂时,就会破坏细胞膜的结构,导致细胞内容物泄露,因此,因此可以凭借 FDA 的荧光强度反映出细胞膜被破坏的程度。图 4 显示了不同浓度的 EGCG 对培养 8 h 杀鲑气单胞菌菌膜通透性的影响。与对照组相比,1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 组在 500~530 nm 范围内的荧光强度下降,可能的原因是 EGCG 中含有酚羟基,酚羟基上的氢原子可以供给到细胞膜上,从而打破原有的细胞膜结构,使细胞膜变通透^[21]。随着 EGCG 浓度的增加荧光强度迅速降低。因此,EGCG 可以改变细胞结构,增加杀鲑气单胞菌的细胞膜通透性,导致 FDA 外流,这与李远颂等^[22]探究芳樟醇对梅实假单胞菌的细胞膜通透性的研究结果相一致。Han 等^[23]通过荧光素二乙酸染色实验发现,柠檬烯能损伤金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)的细胞膜,增加细胞膜的通透性。此外,3-烯炔破坏了溴丝菌和荧光假单胞菌的细胞膜结构,显著降低了荧光强度^[24],这与本文的结果相一致。

2.4 EGCG 对杀鲑气单胞菌碱性磷酸酶活性的影响

碱性磷酸酶(AKP)是存在于细胞膜与细胞壁之间的一种水解酶,当细胞壁完整时,AKP 不会分泌到外界环境中,而当细胞壁受损时,AKP 就会通过细胞壁泄露至细胞外,使细胞内的 AKP 活性降低^[25]。因此可以通过测定 AKP 的活性来判断细胞膜的完整性,EGCG 对杀鲑气单胞菌胞内 AKP 的

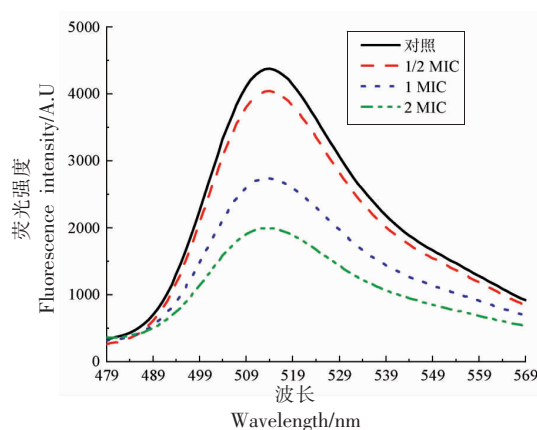


图 4 EGCG 对杀鲑气单胞菌二乙酸荧光素荧光强度的影响

Fig.4 Effect of EGCG on fluorescence intensity of diacetate fluorescein by *Aeromonas salmonicida*

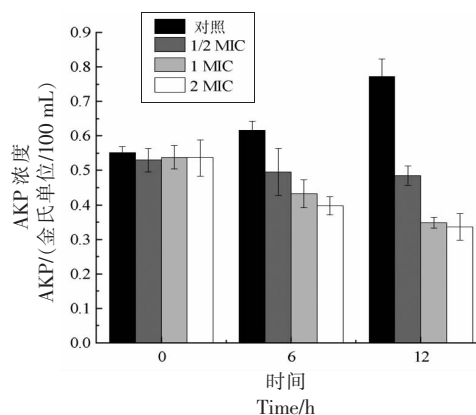


图 5 EGCG 对杀鲑气单胞菌 AKP 活性的影响

Fig.5 Effect of EGCG on AKP of *Aeromonas salmonicida*

影响如图 5 所示,在对照组中,随着时间的延长 AKP 的活性呈现上升趋势,原因可能是由于杀鲑气单胞菌的生长繁殖导致 AKP 活性增强。在 1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 组中,AKP 随着时间的延长呈现下降趋势,EGCG 浓度越大,AKP 下降的越快。在培养 12 h 时,对照组、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 组中 AKP 活性为 0.77、0.48、0.35 和 0.34 金氏单位/100 mL。结果表明,EGCG 破坏杀鲑气单胞菌细胞壁,使 AKP 外泄,EGCG 浓度越大对细胞壁破坏越严重。肽聚糖是构成细胞壁的一种重要结构,酚类物质可以与细胞壁上的肽聚糖结合来破坏细胞壁^[26]。因此 EGCG 破坏杀鲑气单胞菌的细胞壁可能是因为它可以与细胞壁上的肽聚糖结合。这也与 Nisin 与乳酸钠通过破坏蜡状芽孢杆菌和乳酸菌的细胞壁使 AKP 泄露至细胞外相一

致^[27]。

2.5 EGCG 对细胞内 Na^+K^+ -ATP 酶活性的影响

腺苷三磷酸(ATP)是细胞承担呼吸、增殖、分化、凋亡等基本功能的主要能量来源, Na^+K^+ -ATP 酶则是一种跨膜载体蛋白,存在于细胞质膜的磷脂双分子层中,可以催化 ATP 水解产生能量,维持细胞正常代谢功能^[28]。完整细胞中的 Na^+K^+ -ATP 酶水平处于稳定状态。然而,当细胞的通透性和完整性被破坏时,会导致细胞内 Na^+K^+ -ATP 酶浓度的变化。因此可以凭借细胞内 Na^+K^+ -ATP 酶的活力来衡量 EGCG 对杀鲑气单胞菌细胞生长代谢的影响。如图 6 所示,在对照组中 Na^+K^+ -ATP 酶活力在 0~12 h 内呈现上升趋势,原因可能是细胞随着时间的延长不断繁殖,导致 Na^+K^+ -ATP 酶增加。与对照组相比,经过 EGCG 处理后,杀鲑气单胞菌的细胞内 Na^+K^+ -ATP 酶活力显著下降 ($P<0.05$),在第 12 小时时,1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 组与对照组相比降低了 11.08,19.13 U/mg 和 20.99 U/mg,说明 EGCG 浓度越高对 Na^+K^+ -ATP 酶活力的抑制效果越强。因此 EGCG 会对细胞膜产生破坏作用,导致 Na^+K^+ -ATP 酶外渗,进而抑制了杀鲑气单胞菌细胞内 ATP 水解,造成能量供给不足,导致细胞凋亡。相似研究,钱雄锋等^[29]研究发现乙醛降低了荧光假单胞菌细胞内 Na^+K^+ -ATP 酶的活力并且加速了细胞死亡。

2.6 EGCG 对细胞内总蛋白的影响

蛋白质是维持细胞生命活动至关重要的物质,是构成细胞最基础的成分之一,当细胞膜完整时,大分子的蛋白质不会穿透细胞膜,但是当细胞膜受损时,蛋白质就会通过破损的细胞膜泄露至菌液中^[30]。如图 7 所示,在对照组中,随着时间的延长,杀鲑气单胞菌的蛋白浓度缓慢上升,原因是杀鲑气单胞菌大量繁殖,代谢旺盛。在处理组,蛋白浓度随着时间的延长呈现下降趋势,且随着 EGCG 浓度的增大蛋白浓度下降的越迅速;在 0~6 h,3 个处理组中的蛋白浓度均下降迅速,而在 6 h 后蛋白浓度下降缓慢,原因可能是在前 6h EGCG 破坏了细胞壁和细胞膜使大量的胞内蛋白已经流失,6 h 后细胞内的蛋白含量较少。在培养 12 h 时,对照组、1/2 MIC、1 MIC 和 2 MIC 组中蛋白浓度分别为 0.54,0.44,0.37 和 0.35 mg prot/mL,对

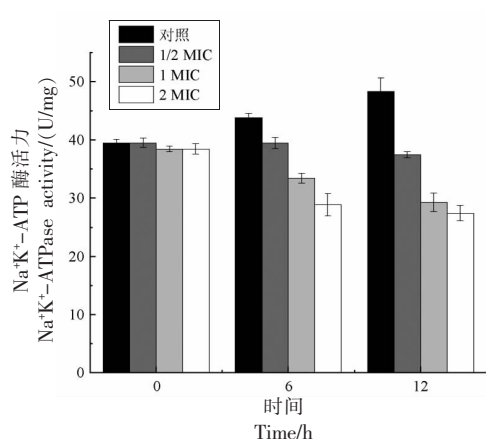


图 6 EGCG 对杀鲑气单胞菌 Na^+K^+ -ATP 酶活力的影响

Fig.6 Effect of EGCG on Na^+K^+ -ATPase activity of *Aeromonas salmonicida*

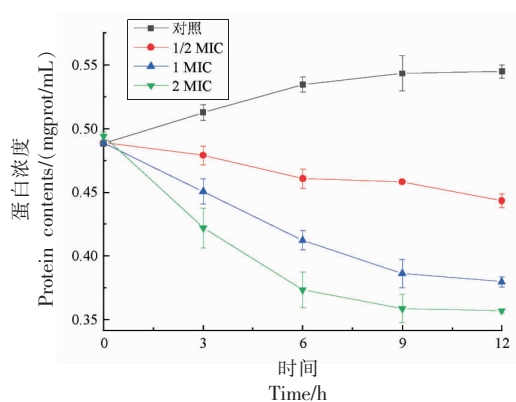


图 7 EGCG 对杀鲑气单胞菌总蛋白浓度的影响

Fig.7 Effect of EGCG on total protein concentration of *Aeromonas salmonicida*

照组与处理组的蛋白含量具有差异性,原因可能是酚类物质能与细胞膜蛋白相互作用影响其表达,还会进入细胞内抑制蛋白质的合成^[26]。结果表明,EGCG 增加杀鲑气单胞菌的细胞膜通透性,使胞内蛋白质外漏。Yin 等^[30]发现肉桂醛可以改变嗜水气单胞菌的细胞膜的通透性,使蛋白质流失,造成细胞死亡。

2.7 EGCG 对细胞产胞外蛋白酶的影响

细菌侵染水产品后会首先消耗水产品中的小分子营养物质,当这些小分子营养物质被消耗殆尽后,细菌会开始分泌蛋白酶进一步分解鱼肉中的蛋白质,使鱼风味劣变,变质腐败^[31]。EGCG 对杀鲑气单胞菌分泌蛋白酶的活性影响如图 8 所示,对照组中,杀鲑气单胞菌可以在脱脂牛奶平板中产生非常明显的水解圈。而处理组的水解圈直径

均小于对照组,且随着 EGCG 浓度的增加,水解圈直径越小。1/2 MIC、1 MIC、2 MIC 组对蛋白酶的抑制率分别为 9.89%、34.53%、40.12%。说明 EGCG 可以显著抑制杀鲑气单胞菌分泌蛋白酶,并且与浓度呈正相关。这也与孙晓佳等^[32]的研究一致,随着富马酸钠浓度的增加,蛋白酶活性越

小。细菌分泌的蛋白酶活性是受到群体感应的调控,因此 EGCG 可能是通过抑制了信号分子的生成进而抑制了杀鲑气单胞菌的蛋白酶活性。刘楠^[33]研究发现了香芹酚通过干扰 PF-08 的信号分子从而抑制了其蛋白酶的生成。

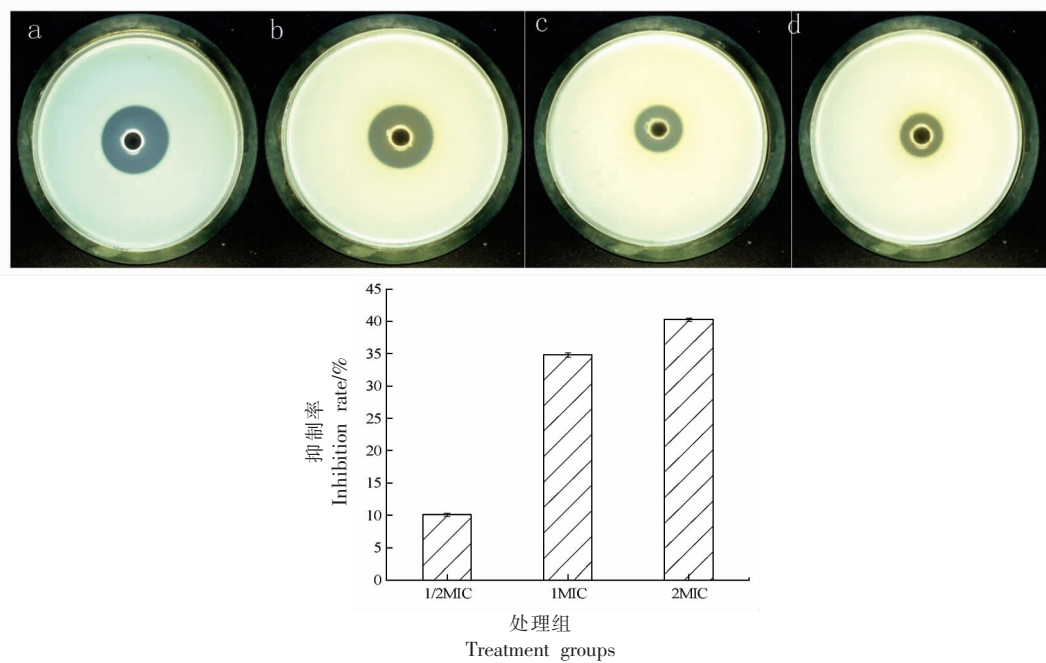


图 8 EGCG 对杀鲑气单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

Fig.8 Effect of EGCG on extracellular protease activity of *Aeromonas salmonicida*

2.8 EGCG 对细胞微观结构的影响

由图 9 可知,未经 EGCG 处理的杀鲑气单胞菌的菌体饱满且形态完整;经过 1/2 MIC EGCG 处理的杀鲑气单胞菌表面出现轻微孔洞;经过 1MIC EGCG 处理的杀鲑气单胞菌菌体凹陷,表面出现较大破损,细胞整体结构坍塌;经过 2 MIC EGCG 处理后,细菌形态严重受损,细菌细胞减少,细胞畸变增加,细胞明显破裂和黏附,基本未出现形态正常的细胞,这与 AKP 和 Na⁺K⁺-ATP 的

泄漏相一致。孙晋跃等^[34]发现超声结合 2%的绿原酸可以使杀鲑气单胞菌的细胞结构遭到严重破坏。Bikels-Goshen 等^[35]发现 EGCG 对葡萄球菌有破坏性作用,改变了葡萄球菌的形态。Akter 等^[36]报道,法地榄仁果提取物对细菌细胞壁有明显的损伤作用。Yao 等^[37]研究表明,黄酮严重破坏铜绿假单胞菌和荧光假单胞菌的细胞膜结构,导致严重的浆溶解。

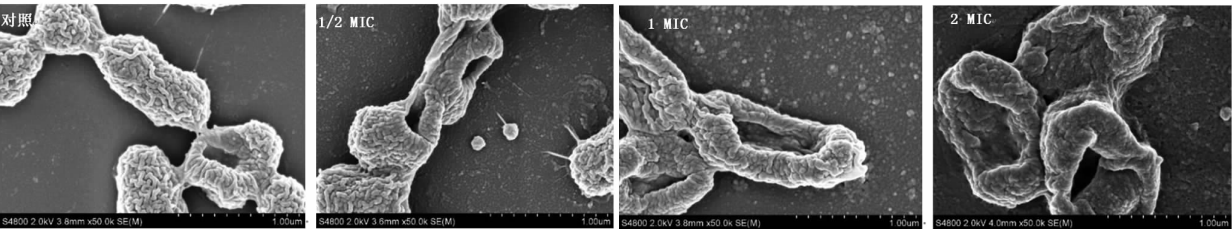


图 9 EGCG 对杀鲑气单胞菌的扫描电镜图

Fig.9 Scanning electron micrographs of EGCG against *Aeromonas salmonicida*

3 结论

EGCG 对杀鲑气单胞菌的最低抑菌浓度为 0.25 mg/mL。EGCG 对杀鲑气单胞菌的生物胺生成能力有良好的抑制作用,且抑制率随 EGCG 浓度的增加而增加。EGCG 可破坏杀鲑气单胞菌的细胞壁,增强细胞膜的通透性,导致细胞内 AKP、 Na^+K^+ -ATP 酶和蛋白质的泄漏,导致细菌死亡。EGCG 还可以通过抑制杀鲑气单胞菌的胞外蛋白酶活性来抑制细胞外蛋白酶的分泌。该研究结果也为开发一种很有前途的天然抗菌剂提供了一种方法,它在食品工业中有潜在的应用前景。从食品安全的角度来看,也是至关重要的。

参 考 文 献

- [1] D'AGARO E, GIBERTONI P P, ESPOSITO S. Recent trends and economic aspects in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sector[J]. Applied Sciences, 2022, 12(17): 8773.
- [2] HOUICHER A, BENSID A, REGENSTEIN J M, et al. Control of biogenic amine production and bacterial growth in fish and seafood products using phytochemicals as biopreservatives: A review[J]. Food Bioscience, 2021, 39: 100807.
- [3] WANG J, FANG J, WEI L N, et al. Decrease of microbial community diversity, biogenic amines formation, and lipid oxidation by phloretin in Atlantic salmon fillets[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 101: 419-426.
- [4] HUANG Z, LIU X C, JIA S L, et al. Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodonidellus*) fillets during chilled storage[J]. Food Control, 2017, 82: 316-324.
- [5] CAI L Y, CAO A L, LI Y C, et al. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets[J]. Food Control, 2015, 56(3): 1-8.
- [6] AKAN S, OCAK Ö Ö. Evaluation of storage time and grape seed extract addition on biogenic amines content of tarhana: A cereal-based fermented food[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 861-868.
- [7] SÁNCHEZMC, RIBEIRO-VIDAL H, ESTEBAN-FERNÁNDEZ A, et al. Antimicrobial activity of red wine and oenological extracts against periodontal pathogens in a validated oral biofilm model[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2019, 19(1): 145.
- [8] SINGH M, THRIMAWITHANA T, SHUKLA R, et al. Managing obesity through natural polyphenols: A review[J]. Future Foods, 2020, 1/2(1): 100002.
- [9] MOJZER E B, HRNCIC M K, ŠKERGET M, et al. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects[J]. Molecules 2016, 21(7): 901.
- [10] SHAUKAT H, ALI A, ZHANG Y, et al. Tea polyphenols: Extraction techniques and its potency as a nutraceutical[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2023, 7: 1175893.
- [11] KHAROUF N, HAIKEL Y, BALL V. Polyphenols in dental applications[J]. Bioengineering, 2020, 7: 72.
- [12] BOVER-CID S, HOLZAPFEL W H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 53(1): 33-41.
- [13] LERFALL J, SHUMILINA E, JAKOBSEN A N. The significance of *Shewanella* sp. strain HSO12, Photobacterium *phosphoreum* strain HS254 and packaging gas composition in quality deterioration of fresh saithe fillets[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112636.
- [14] 朱璐丹. 秦皮素对嗜水气单胞菌的抗感染机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- [14] ZHU L D. Study on the anti-infective mechanism of fraxetin on *Aeromonas hydrophila* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [15] 梅佳林, 李婷婷, 张星晖, 等. 芳樟醇对三文鱼源莓实假单胞菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 199-206.
- [15] MEI J L, LI T T, ZHANG X H, et al. Antibacterial mechanism of linalool against *Pseudomonas fragi* from salmon[J]. Food Science, 2022, 43(9): 199-206.
- [16] 刘佳宜, 李婷婷, 励建荣, 等. 乙基麦芽酚对杀鲑气单胞菌群体感应及腐败活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 27-33.
- [16] LIU J Y, LI T T, LI J R, et al. Inhibitory effect of ethyl maltol on quorum sensing and spoilage ca-

- capacity of *Aeromonas salmonicida*[J]. Food Science, 2021, 42(17): 27–33.
- [17] ZHANG J M, 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.
- [18] TAMKUTÈ L, VAICEKAUSKAITÈ R, GIL B M, et al. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) pomace extracts inhibit food pathogenic and spoilage bacteria and increase the microbiological safety of pork products[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(1): e15220.
- [19] BURGUT A, KULEY E, UCARY, et al. Suppression effects of aqueous and ethanolic extracts of propolis on biogenic amine production by *Morganella psychrotolerans*[J]. LWT–Food Science and Technology, 2020, 131(2): 109771.
- [20] 耿一鸣, 李婷婷, 励建荣, 等. 松油烯-4-醇对荧光假单胞菌抑菌能力及作用机理[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 30–36.
- GENG Y M, LI T T, LI J R, et al. Antibacterial activity and mechanism of terpinene-4-ol against *Pseudomonas fluorescens*[J]. Food Science, 2022, 43(1): 30–36.
- [21] 唐杰. 没食子酸及其酯类衍生物的抗氧化机理研究: 分子模拟与实验[D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
- DANG J. Study on the antioxidant mechanism of gallic and its ester derivatives: molecular imulation and experiment[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2021.
- [22] 李远颂, 何荣荣, 蔡佳欣, 等. 芳樟醇对莓实假单胞菌的抑菌活性及机制[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(4): 55–63.
- LI Y S, HE R R, CAI J X, et al. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas fragi*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(4): 55–63.
- [23] HAN Y J, CHEN W X, SUN Z C. Antimicrobial activity and mechanism of limonene against *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Food Safety, 2021, 41(2): e12918.
- [24] SHU H Z, CHEN H M, WANG X L, et al. Antimicrobial Activity and proposed action mechanism of 3-Carene against *Brochothrix thermosphacta* and *Pseudomonas fluorescens*[J]. Molecules, 2019, 24(18): 3246.
- [25] 蓝蔚青, 车旭, 谢晶, 等. 复合生物保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌活性及作用机理[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 159–165.
- LAN W Q, CHE X, XIE J, et al. Antibacterial activity and mechanism of composite biological preservatives against *pseudomonas fluorescens* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(8): 159–165.
- [26] 欧凯玉, 逢建龙, 张一敏, 等. 天然酚类化合物的抑菌作用及在肉与肉制品中应用研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 1–14.
- OU K Y, FENG J L, ZHANG Y M, et al. A Review of the antimicrobial activity of natural phenolic compounds and their applications in meat and meat products[J]. Food Science, 2023, 44(9): 1–14.
- [27] 薛琪. 乳酸链球菌素、乳酸钠对酱卤鸭脖腐败菌的协同抑菌作用与机理研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
- XUE Q. Study on the synergistic antibacterial effect and mechanism of Nisin and sodium lactate on spoilage bacteria of sauced duck neck[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022.
- [28] VENKADESAPERUMAL G, SAMBREY R, KOTH-ANDAPANI S, et al. Anti-quorum sensing activity of spice oil nanoemulsions against food borne pathogens[J]. LWT Food Science and Technology, 2016, 66: 225–231.
- [29] 钱雄锋, 罗怡, 张岳玥, 等. 乙醛对荧光假单胞菌的抑菌活性及机理[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 104–111.
- QIAN X F, LUO Y, ZHANG Y Y, et al. Bacteriostatic activity of acetaldehyde against *Pseudomonas fluorescens* and the associated mechanism[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 104–111.
- [30] YIN L, CHEN J, WANG K, et al. Study the antibacterial mechanism of cinnamaldehyde against drug-resistant *Aeromonas hydrophila in vitro*[J]. MicrobPathog, 2020, 145: 104208.
- [31] 郝素旗. 基于群体感应研究 EGCG 对铜绿假单胞菌毒力的影响及机制[D]. 成都: 四川农业大学, 2022.
- HAO S Q. Effect of EGCG on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* and mechanism study based on quorum sensing[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2022.
- [32] 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.
- SUN X J, LI T T, HE B B, et al. Inhibitory effect of sodium fumarate on quorum sensing and spoilage capacity of *Pseudomonas fluorescens*[J]. Food Science, 2019, 40(11): 7-13.
- [33] 刘楠. 香芹酚对荧光假单胞菌 PF-08 群体感应的抑制作用及其在保鲜中的应用[D]. 锦州: 渤海大学, 2018.
- LIU N. Study on inhibition of quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* PF-08 in chilled turbot by carvacrol and its preservation[D]. Jinzhou: Bohai University, 2018.
- [34] 孙晋跃, 刘芳, 吴海虹, 等. 超声和绿原酸联用对杀鲑气单胞菌生物膜的协同杀菌作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(3): 97-104.
- SUN J Y, LIU F, WU H H, et al. Synergistic bactericidal effect of the combined use of ultrasound and chlorogenic acid against *Aeromonas salmonicida* biofilms[J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(3): 97-104.
- [35] BIKELS-GOSHEN T, LANDAU E, SAGUY S, et al. Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(1/2): 26-31.
- [36] AKTER S, NETZEL M E, TINGGI U, et al. Antioxidant rich extracts of *Terminalia ferdinandiana* inhibit the growth of foodborne bacteria[J]. Foods, 2019, 8(8): 281.
- [37] YAO X L, ZHU X R, PAN S Y, et al. Antimicrobial activity of nobiletin and tangeretin against *Pseudomonas*[J]. Food Chemistry, 2012, 132(4): 1883-1890.

Antimicrobial Mechanism of Epigallocatechin Gallate against *Aeromonas salmonicida* from Rainbow Trout

LI Yingchang¹, DUAN Jinrui¹, MA Rongrong², ZHAO Nan¹, LI Xuepeng^{1*}

(¹College of Food Science and Technology, Bohai University, National and Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology of Fresh Agricultural Products, Jinzhou 121013, Liaoning

²Shandong Province Rongcheng Technology Transfer Service Center, Rongcheng 264323, Shandong)

Abstract Objective: Rainbow trout usually contains more free amino acids and nitrogen compounds, so it is easier to produce biogenic amines. *Aeromonas salmonicida* was isolated from rainbow trout, and the inhibitory activities of EGCG has been investigated against *Aeromonas salmonicida*. Methods: Cell morphology, alkaline phosphatase activity (AKP), intracellular ATP enzyme, extracellular protease content extracellular total protein content were examined to elucidate their antibacterial effects. Results: The minimum inhibitory concentration of EGCG against *Aeromonas salmonicida* was 0.25 mg/mL. In addition, EGCG has a good inhibitory effect on the biogenic amine-producing of *Aeromonas salmonicida*, and BAs content decreased with increasing EGCG concentration. EGCG could destroy the cell wall of *Aeromonas salmonicida* and enhance the permeability of the cell membrane, resulting in the leakage of intracellular AKP, Na⁺K⁺-ATPase and protein, leading to the cell pyknosis and death of the bacteria. EGCG could also inhibit the secretion of extracellular protease. Electron microscopy revealed that the structure of the bacterial cells was destroyed and accompanied with induced cells plasmolysis. The inhibition rates of protease in 1/2 MIC, 1 MIC and 2 MIC groups were 9.89%, 34.53% and 40.12%, respectively. Conclusions: EGCG has inhibitory effect on *Aeromonas salmonicida* from rainbow trout, which provides theoretical basis for the application of EGCG in the preservation of aquatic products.

Keywords rainbow trout; biogenic amine-producing bacteria; *Aeromonas salmonicida*; epigallocatechin gallate; antimicrobial activity