张甜甜, 刘瑞玲, 牛犇, 等. 五倍子提取物对桔青霉的抑制作用及相关机制研究 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 178−185. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030148

ZHANG Tiantian, LIU Ruiling, NIU Ben, et al. Inhibitory Effect of *Galla chinensis* Extract on *Penicillium citrinum* and Its Related Mechanisms[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 178−185. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030148

· 生物工程 ·

五倍子提取物对桔青霉的抑制作用及相关机制研究

张甜甜[1,2], 刘瑞玲[2,+], 牛　犇[2], 房祥军[2], 陈慧芝[2], 沈超怡[2], 陈杭君[2], 吴伟杰[2,*], 郜海燕[2,*]

（1.浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江舟山 316022;
2.浙江省农业科学院食品科学研究所, 农业农村部果品采后处理重点实验室, 农业农村部蔬菜采后保鲜与加工重点实验室（部省共建）, 全省生鲜食品智慧物流与加工重点实验室, 中国轻工业果蔬保鲜与加工重点实验室, 浙江杭州 310021）

摘　要: 本研究系统探讨了五倍子提取物中的抑菌活性成分及其作用机制。采用硅胶柱色谱法对五倍子醇提物进行梯度洗脱分离，利用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱（UPLC-QTOF MS）对抑菌成分进行分析。通过测定细胞膜完整性、氧化应激、线粒体功能以及细胞超微结构等指标，阐明五倍子提取物抑制桔青霉的作用机制。结果表明，分离获得的 Fr.3 流分对桔青霉的抑菌圈直径为 17.85 mm。UPLC-QTOF MS 从 Fr.3 流分中鉴定出鞣花酸、没食子酸、（-）-表没食子儿茶素等 12 种活性成分。体外抑菌实验表明，第 6 d 时，没食子酸和（-）-表没食子儿茶素对桔青霉生长抑制率分别为 53.99% 和 45.75%。进一步研究表明，没食子酸通过破坏细胞膜完整性，使得相对电导率增加了 78.80%，丙二醛含量增加了 60.16%；通过诱导氧化应激反应，使得 ROS 水平升高，进而破坏了胞内氧化还原稳态；通过抑制线粒体功能，使得 ATP 酶活性降低 76.88%，线粒体膜电位下降，去极化程度升高至对照组的 17.31 倍；同时，损伤了细胞超微结构，出现质壁分离等现象。该研究从分子互作层面揭示了五倍子活性成分的多靶点抑菌机制，为开发天然抑菌剂提供了理论依据。

关键词: 五倍子, 桔青霉, 抑菌活性, 细胞膜通透性, 天然抑菌剂

中图分类号: S482.292　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)07−0178−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030148

本文网刊:

Inhibitory Effect of *Galla chinensis* Extract on *Penicillium citrinum* and Its Related Mechanisms

ZHANG Tiantian[1,2], LIU Ruiling[2,+], NIU Ben[2], FANG Xiangjun[2], CHEN Huizhi[2], SHEN Chaoyi[2], CHEN Hangjun[2], WU Weijie[2,*], GAO Haiyan[2,*]

（1.College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;
2.Key Laboratory of Post-harvest Handling of Fruits, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Postharvest Preservation and Processing of Vegetables (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhejiang Key Laboratory of Smart Logistics and Processing of Fresh Food, Key Laboratory of Postharvest Preservation and Processing of Fruits and Vegetables, China National Light Industry, Food Science Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China）

Abstract: This study investigated the antibacterial components and underlying mechanisms of action of gallic (*Galla*

收稿日期: 2025−03−13　　+并列第一作者

基金项目: 国家重点研发计划（2021YFD2100505）。

作者简介: 张甜甜（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品物流与品质调控, E-mail: 18234332487@163.com。
刘瑞玲（1988−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品物流与品质调控, E-mail: ruilingliu2005@163.com。

*** 通信作者:** 吴伟杰（1987−）, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品物流保鲜与品质调控, E-mail: wuweijie87@163.com。
郜海燕（1958−）, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品物流保鲜与品质调控, E-mail: spsghy@163.com。

chinensis) extracts. The ethanol extract was separated into different fractionations by using silica gel column chromatography, followed by analysis via ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF MS). The mechanism underlying the inhibitory effect of gallic extract on *Penicillium citrinum* was elucidated by assessing of cell membrane integrity, oxidative stress, mitochondrial function, and cellular ultrastructure. The results demonstrated that the Fr.3 fraction exhibited an maximum inhibition zone against *P. citrinum* with the diameter of 17.85 mm. UPLC-QTOF MS analysis identified 12 bioactive compounds in Fr.3, including ellagic acid, gallic acid, and (-)-epigallocatechin, among others. Antifungal assays demonstrated that gallic acid and (-)-epigallocatechin inhibited *P. citrinum* growth by 53.99% and 45.75%, respectively, after 6 days of culture at 28 ℃. Gallic acid impaired cell membrane integrity, leading to a 78.80% increase in relative conductivity and a 60.16% increase in malondialdehyde content. Gallica acid also induced oxidative stress, resulting in elevated reactive oxygen species (ROS) levels, which subsequently disrupted intracellular redox homeostasis in *P. citrinum* cells. Additionally, gallic acid inhibited mitochondrial function of *P. citrinum*, resulting in a 76.88% decrease in ATPase activity, a decline in mitochondrial membrane potential, with depolarization increased to 17.31-fold of the control. Furthermore, the *P. citrinum* cell ultrastructure was compromised and plasmolysis was observed. These findings elucidate the multitarget inhibitory mechanism of *G. chinensis* at the molecular level and provide a theoretical framework for natural antifungal agent development.

Key words: *Galla chinensis*; *Penicillium citrinum*; antibacterial activity; cell membrane permeability; natural antibacterial agent

桔青霉(*Penicillium citrinum*)是一种广泛分布于自然界的丝状真菌，常通过分泌细胞壁降解酶破坏植物或水果的组织结构[1]。其侵染水果时，会分解细胞壁成分，导致果实软化和腐烂，同时产生桔霉素(citrinin)，这种毒素不仅对植物细胞具有破坏作用，还会污染农产品，对食品安全构成严重威胁[2]。由桔青霉引起的腐烂病害不仅造成巨大的经济损失，还严重制约鲜切产业的发展[3]。目前，病害防治主要依赖农业防治和化学药物，但长期使用化学杀菌剂可能导致病原菌产生抗药性，并带来环境污染和健康风险。因此，寻求安全高效的绿色抑菌方法成为研究热点。近年来，研究发现多种植物源天然产物具有显著的抗真菌活性，为果蔬采后病害防治提供了极具前景的绿色替代方案[4−5]。特别是中草药提取物，凭借高效、低毒、易降解、环保以及低成本的优势，已在果蔬采后保鲜领域展现出重要应用价值[6−7]。因此深入解析其多靶点抑菌机制，对推动绿色保鲜产业发展具有重要的科学意义和实践价值。

五倍子(*Galla chinensis*)是由五倍子蚜虫(*Schlechtendalia chinensis*)寄生在盐肤木(*Rhus chinensis*)等植物上形成的虫瘿[8]，根据外形不同，可分为肚倍和角倍[9]。其富含鞣质[10−11]、没食子酸[12]、多酚[13−14]、氨基酸[15]等多种生物活性成分，因此在传统医药、食品、化工等领域有广泛应用。近年来，五倍子的抗菌、抗氧化和抗真菌特性也受到广泛关注[16−17]。团队前期将五倍子提取物应用于蓝莓果实的采后保鲜处理，证实其对果实品质保持具有显著效果[18]。通过体外抑菌实验，发现五倍子提取物对灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)表现出明显的抑制作用。然而，目前对于五倍子提取物中发挥抑菌作用的具体活性成分及其分子作用机制尚未明确，这限制了该提取物在果蔬采后保鲜中的进一步开发与应用。

本文以五倍子作为研究对象，通过对五倍子的活性物质进行分离纯化及鉴定，再对桔青霉进行抑菌机理的研究，为探索五倍子作为一种抑菌剂在食品中的应用提供了理论支持。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

桔青霉(*P. citrinum*)　浙江省农业科学院食品科学研究所食品物流保鲜与营养品质调控团队进行分离纯化，经形态学观察和分子生物学鉴定，确定该菌株为桔青霉；野生五倍子　湖南省张家界野生药材店；PDA、PDB　上海盛思生物科技有限公司；ATP 酶试剂盒　南京建成生物工程研究所；硅胶(AR，300~400 目)　上海阿拉丁生化科技股份有限公司；所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

MLS-3781L-P 高压蒸汽灭菌器　日本松下健康医疗器；Mettler-Toledo XS105 型电子分析天平　瑞士 METTLER TOLEDO 公司；MJX-160B-Z 恒温培养箱　上海博讯实业有限公司；R214 旋转蒸发仪　上海申生科技有限公司；DDS-307 电导率仪　上海精密科学仪器有限公司；医疗器械厂无菌超净台　江苏苏晶集团有限公司；H7650 透射电子显微镜　日本日立公司；Vion IMS QTof 超高分辨液质联用仪　美国 Waters Corporation。

1.2　实验方法

1.2.1　五倍子醇提物制备　将五倍子破壳，去除虫尸，粉碎，在 50 ℃ 干燥箱中干燥至恒重，用 75%(V/V，下同)乙醇，料液比 1∶5(g·mL^{-1})室温超声提取(功率 350 W)1 h，3000 r/min，离心 10 min，取上清液，40 ℃ 旋转蒸发去除溶剂，真空冷冻干燥(−80 ℃，48 h)得到五倍子醇提物粉末，密封避光保存于−20 ℃ 备用。

1.2.2 萃取五倍子醇提物 参考孙莎[18]的方法并稍作修改。取上述 1.2.1 中的冻干粉末，按料液比 1∶15(g·mL^{-1})用蒸馏水复溶，向溶液中加入等体积的 99.7% 乙酸乙酯(1∶1, V/V)，置于萃取瓶中，振荡混匀 3 min，静置 5 min 使两相分层，收集上层乙酸乙酯相，经旋转蒸发(40 ℃)浓缩后，真空冷冻干燥(−80 ℃，48 h)得萃取物，密封保存于−20 ℃ 备用。

1.2.3 五倍子活性成分的柱层析分离与抑菌活性组分筛选 参照郑曙明等[19]的方法稍作修改，称取 1.2.2 中得到的冻干物 2 g 进行硅胶(600 目)柱层层析，首先用石油醚洗脱直至出现液体，依次按石油醚∶丙酮(10∶0、8∶2、6∶4、4∶6、2∶8、0∶10, V/V)梯度洗脱，每组洗脱剂用量 100 mL，流速 1 mL/min，再按甲醇∶水(10∶0、8∶2、6∶4、4∶6、2∶8、0∶10, V/V)梯度洗脱，每组洗脱剂用量 100 mL，每 5 min 收集一管流分，根据颜色变化共收集到 12 种流分，进行薄层层析，将 R_f 值相近的流分进行合并，得到 5 个组分，编号分别为 Fr.1、Fr.2、Fr.3、Fr.4、Fr.5，将收集好的组分旋转蒸发(40 ℃)后，所得浓缩物进行冷冻干燥(−80 ℃, 48 h)获得干燥粉末。为筛选抑菌活性组分，取上述各组分冻干粉，用无菌蒸馏水复溶至终浓度 0.2 g/mL[20]，采用牛津杯法进行抑菌活性检测，最终确定抑菌效果最佳的活性组分。

1.2.4 体外抑菌实验 参考李东昱等[21]的牛津杯法，测定五倍子不同流分对桔青霉的抑菌圈。无菌培养皿中加入 15 mL 灭菌融化后的 PDA 培养液，吸取 1×10^6 CFU/mL 桔青霉菌悬液 100 μL 于加入培养液的培养皿中，取 0.2 g/mL 的提取物 200 μL 于牛津杯中，以加无菌水为空白对照，做 3 组平行实验。28 ℃ 条件下培养 48 h，采用十字交叉法测定抑菌圈直径，按照抑菌圈直径大小进行敏感性评判。

1.2.5 流分化学成分分析

1.2.5.1 LC 条件 ACQUITY UPLC-BEH C_{18} 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm)，柱温为 40 ℃，进样体积为 3 μL。流动相 A: 98% 水，2% 乙腈，0.1% 甲酸；流动相 B: 98% 乙腈，2% 水，0.1% 甲酸。流速 0.4 mL/min，流动相梯度：0~0.5 min, 5%B; 0.5~16 min, 5%~100%B; 16~18.5 min, 100%B; 18.5~18.6 min, 100%~5%B; 18.6~20 min, 5%B。

1.2.5.2 MS 条件 采集分析模式: Sensitivity; 毛细管电压: ESI^+ 2.5 kV, ESI^- 2 kV; 离子源温度 120 ℃; 脱溶剂气温度 500 ℃; 脱溶剂气气流 800 L/h; 反向锥孔气流 50 L/h。采集质量范围 50~1000 m/z，每个循环采集时间为 0.3 s，碎裂能 10~45 eV，正负离子模式分别采集。采集过程同时注入亮氨酸-脑啡肽(正离子模式下: 556.2766 m/z; 负离子模式下: 554.2620 m/z)作为在线质量校准物以保持质量准确度。

1.2.6 化合物抗真菌活性测定 根据 Wang 等[22]的方法并稍作修改用于测定抗真菌活性。将没食子酸(Gallic Acid, GA)、(-)-表没食子儿茶素((-)-Epigallocatechin, EGC)及鞣花酸(Ellagic Acid, EA)分别与二甲基亚砜溶液(DMSO)及 20 mL PDA 培养基在灭菌的培养皿中混合，使得 GA、EGC 及 EA 的浓度为 1000 mg/L，用 1% 灭菌的 DMSO 作为空白对照。使得 PDA 中 DMSO 的最终浓度为 1%，在培养皿上接种 5 mm 直径的病原真菌菌丝，在 28 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d 记录真菌生长。每隔 1 d 用十字交叉法测定菌落直径，重复测定 6 次。使用公式(1)计算生长抑制率：

$$生长抑制率(\%) = \frac{D_{0n} - D_n}{D_{0n}} \times 100 \quad 式（1）$$

式中，D_{0n} 为第 n 天对照组菌落平均直径，mm; D_n 为第 n 天处理组菌落平均直径，mm。

1.2.7 不同活性物质处理后桔青霉细胞膜通透性指标测定 将菌丝接种于 PDB 中，分别加入 0.2 g/mL 的 GA 与 EGC 各 200 μL，28 ℃、180 r/min 摇床培养 24 h，测定菌丝细胞内容物的丙二醛含量和菌丝培养液的上清液的相对电导率。在 0、3、6、9、12 h 收集菌丝，用硫代巴比妥酸法[23]测定丙二醛含量，将经过处理的桔青霉菌丝细胞匀浆液加入 20% TCA 溶液中，4 ℃ 条件下 10000 r/min 离心 15 min，在 532 nm 处测定上清液的吸光度。在 0、3、6、9、12 h 收集上清液，用电导率仪测定上清液的电导率，用沸水煮沸处理 10 min，冷却至室温，再次测定电导率，重复测定 3 次，相对电导率按公式(2)计算。

$$相对电导率(\%) = \frac{e - e_0}{e_1 - e_0} \times 100 \quad 式（2）$$

式中，e_0 为 0 h 的电导率，μS/cm; e_1 为沸水处理后的电导率，μS/cm; e 为不同处理时间的电导率，μS/cm。

1.2.8 不同活性物质处理后桔青霉线粒体 ATP 酶活力测定 使用试剂盒测定 ATPase 活力。

1.2.9 不同活性物质处理后桔青霉活性氧(ROS)测定 GA 与 EGC 处理后，在 28 ℃ 条件下培养 6 d，测定 ROS 水平。使用荧光染料 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)作为 ROS 指示剂，DCFH-DA 为膜通透性非荧光探针，用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗菌丝体 3 次后。置于 10 μmol/mL DCFH-DA 溶液中。在 37 ℃ 黑暗条件下染色 20 min，通过激光共聚焦在 488 nm 的激发波长、525 nm 的发射波长下观察菌丝体荧光信号。

1.2.10 不同活性物质处理后桔青霉线粒体膜电位(MMP)测定 使用 MMP 测定试剂盒测定各组 MMP。GA 与 EGC 处理后，在 28 ℃ 下孵育 6 d，测定菌丝线粒体膜电位。使用 JC-1 染色 20 min，JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次，通过激光共聚焦观察菌丝体染色。JC-1 单体和 JC-1 聚集体的荧光激发/发射波长分别为 514/529 和 585/590 nm。

1.2.11　透射电子显微镜观察不同活性物质处理后桔青霉形态　根据 Bonora 等[24] 描述的方法处理样品。将样品用 PBS 冲洗，固定，脱水，包埋，透化，并再次用 PBS 冲洗，最后取出菌丝体样品，置于离心管中，干燥、聚合、切片、染色，在透射电子显微镜下观察拍照。

1.3　数据处理

实验数据使用 Excel、SPSS 20 软件进行统计分析，组间比较采用独立样本 t 检验，结果以“平均值±标准差”表示，$P<0.05$ 表示差异显著，利用 Origin 2021 软件作图。

2　结果与分析

2.1　乙酸乙酯萃取相分离及抑菌效果分析

将五倍子提取物的乙酸乙酯萃取冻干物用于后续分离实验，进行硅胶柱层析分离，收集得到 5 个组分见图 1，分别编号为 Fr.1、Fr.2、Fr.3、Fr.4、Fr.5，通过抑菌活性实验对 5 个分离组分进行评价，实验结果如表 1 所示。Fr.3 抑菌圈直径（17.85±0.45 mm）大于 Fr.5（13.04±0.65 mm），抑菌活性明显强于 Fr.5；其余组分未显示抑菌活性，因此选取 Fr.3 用于后续化合物定性分析。

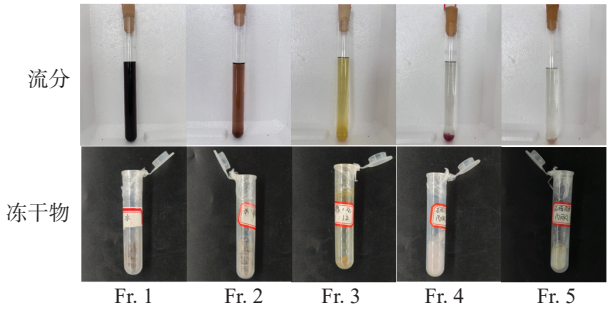


图 1　五倍子乙酸乙酯萃取物分离所得活性物质

Fig.1　Isolation of active substances from ethyl acetate extract of *Galla chinensis*

表 1　不同流分的抑菌圈直径

Table 1　Inhibitory zone diameter of different flow fractions

组分	抑菌圈直径(mm)	敏感度
Fr.1	0	−
Fr.2	0	−
Fr.3	17.85±0.45	++
Fr.4	0	−
Fr.5	13.04±0.65	+
CK	0	−

注：抑菌圈直径<10 mm，表示低敏感，用−表示；10 mm≤抑菌圈直径<15 mm，表示中敏感，用+表示；15 mm≤抑菌圈直径<20 mm，表示高敏感，用++表示。

2.2　液质组分分析

通过 UPLC-QTOF MS 进行非靶向分析鉴定了 Fr.3 的化合物如图 2。本研究采用抑菌活性导向的分析策略，将目标化合物限定于单宁类、黄酮类、苯及取代衍生物和苯骈吡喃类四类具有抑菌活性的物质。随后通过匹配保留时间、质荷比及评估二级质谱碎片化分数（Fragmentation Score≥60）筛选鉴定出 12 种目标化合物如表 2。在这 12 种化合物中，鞣花酸、没食子酸及(-)-表没食子儿茶素在以往的研究中发现具有较好的抑制真菌的效果。这些物质都属于是多酚类化合物，其中鞣花酸属于鞣质中的没食子

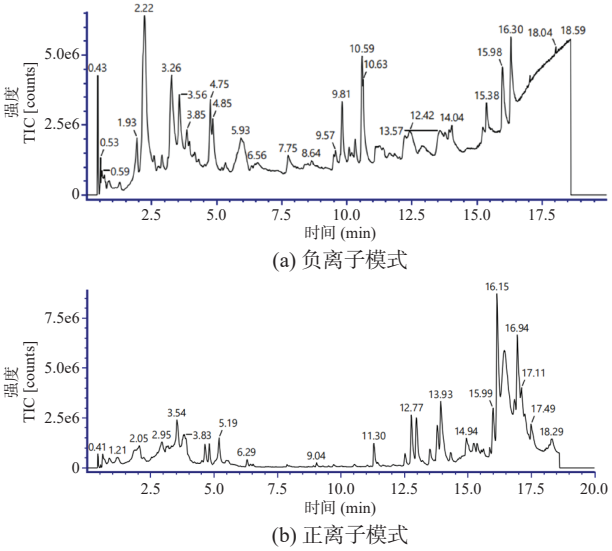


图 2　Fr.3 LC-MS 离子谱图

Fig.2　LC-MS total ion spectrum of Fr.3

表 2　Fr.3 化合物成分鉴定

Table 2　Identification of flavonoid compounds in Fr.3

英文名称	中文名称	分子式	保留时间(s)	质荷比(m/z)	碎片化分数	相对含量(%)
ellagic acid	鞣花酸	$C_{14}H_6O_8$	0.81325	300.9979	85.9	11.96
gallic acid methyl ester	没食子酸甲酯	$C_8H_8O_5$	2.2449	183.029	83.4	11.33
galloylglucose	没食子酰葡萄糖	$C_{13}H_{16}O_{10}$	2.2449	331.0659	94.4	0.25
gallic acid	没食子酸	$C_7H_6O_5$	2.60235	171.0284	95.2	9.06
luteic acid	黄烯酸	$C_{14}H_8O_9$	2.79638	321.0238	73.3	0.01
pentagalloylglucose	五没食子酰葡萄糖	$C_{41}H_{32}O_{26}$	2.9597	939.1112	67.8	5.53
myricetin	杨梅素	$C_{15}H_{10}O_8$	3.8847	363.0348	63.3	3.12
mulberrofuran	桑黄苏	$C_{30}H_{36}O_5$	4.64688	475.2466	89	0.09
(-)-epigallocatechin	(-)-表没食子儿茶素	$C_{15}H_{14}O_7$	9.5183	329.0656	89.5	6.03
tetrahydroxyxanthone	四羟基氧杂蒽酮	$C_{13}H_8O_6$	11.7073	305.0322	74.4	0.01
pentahydroxy-methylxanthone	五羟甲基氧杂蒽酮	$C_{14}H_{10}O_7$	14.9598	335.0401	75.3	1.87
pinifolic acid	松叶酸	$C_{20}H_{32}O_4$	15.3561	381.2313	85	1.10

单宁的降解产物，没食子酸是没食子酸类，(-)-表没食子儿茶素属于黄酮类化合物。研究表明，这些类化合物均有一定的抑菌效果[25−26]。EA 可通过诱导真菌膜的损伤，从而增加细胞渗透性从而达到抑制白色念珠菌的效果[27]。GA 对根霉、灰霉、镰刀菌和炭疽病菌均表现出较强的抗真菌活性[28]，GA 通过改变膜结构和细菌代谢来抑制细菌生长，并抑制生物膜形成[29]。EGC 对黑曲霉、灰葡萄孢霉、青霉菌抑制方式不是生长抑制，而是通过真菌菌丝损伤和孢子管细胞损伤来实现[30]。因此本研究选取这 3 种物质进行后续的抗真菌活性实验，观察 3 种活性物质对桔青霉的抑制效果。

2.3 不同活性物质处理对桔青霉生长的影响

通过观察菌丝体及孢子的生长状况，可有效评估不同活性成分对桔青霉的抑制效果。如图 3(a)所示，经 GA 和 EGC 处理的实验组菌落直径显著低于对照组(P<0.05)。在整个培养周期内，各组菌落均呈现持续增长的趋势。培养至第 6 d 时，GA 处理组的菌落直径达到 14.83 mm，EGC 处理组为 16.43 mm，相比之下，EA 处理组和对照组的菌落直径分别为 22.07 mm 和 25.20 mm。根据菌落直径计算菌丝的生长抑制率如图 3(b)，第 6 d GA 与 EGC 处理组的菌丝生长抑制率分别为 53.99%、45.75%，分别是 EA 处理组菌丝生长抑制率的 3.31 倍、2.81 倍。这些结果表明，相比于 EA 处理，GA 和 EGC 可以更有效抑制桔青霉的生长，因此在后续的实验中选取两种抑菌效果较好的单体活性物质用于抑菌机理分析。

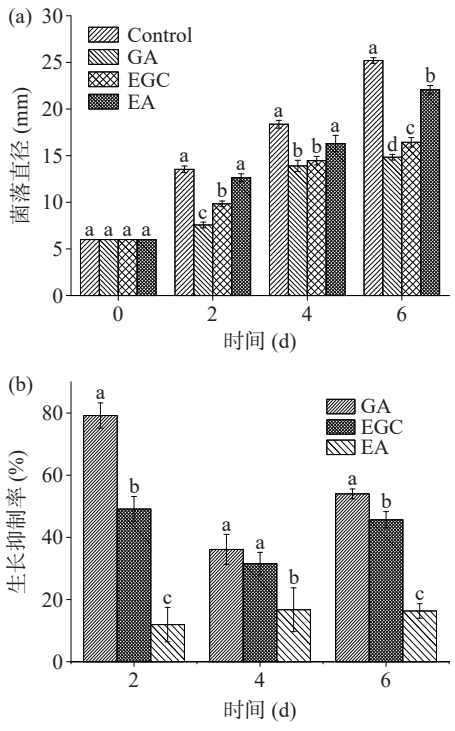


图 3 不同活性物质对桔青霉菌落直径(a)和生长抑制率(b)的影响

Fig.3 Effects of different active substances on colony diameter (a) and growth inhibition rate (b) of *P. citrinum*

注：不同小写字母代表同一时间不同处理组之间差异显著(P<0.05)。

2.4 抑菌机理研究

2.4.1 细胞膜通透性测定 相对电导率可反映三色胺的泄露程度，可以用来评价细胞膜的完整性[31]。丙二醛是细胞膜过氧化的产物，可以间接反映细胞膜的损伤程度[32]。如图 4(a)所示随着处理时间的延长，相对电导率整体呈上升趋势，其中在处理 3 h 后，GA 和 EGC 处理组的相对电导率已经显著高于对照组(P<0.05)。在处理 12 h 后，CK、GA 处理组、EGC 处理组的相对电导率分别为 9.33%、44%、30.73%，GA 处理组显著高于 EGC 处理组及 CK 组(P<0.05)，GA 处理组较初始阶段增加了 78.80%。如图 4(b)所示，丙二醛含量与处理时间呈正相关。其中在处理 12 h 后，CK、GA 处理组、EGC 处理组的丙二醛含量分别 0.51、1.28、0.75 nmol/g，GA 处理组较初始阶段增加了 60.16%，CK 组丙二醛含量最低，显著低于处理组(P<0.05)，其中 GA 处理组丙二醛含量显著高于 EGC 处理组(P<0.05)。Lu 等[33]研究发现，没食子酸通过破坏嗜水曲霉和曲霉的膜完整性而表现出抗菌作用。综上所述，GA 处理能够加剧桔青霉膜脂过氧化，破坏桔青霉的细胞膜完整性。

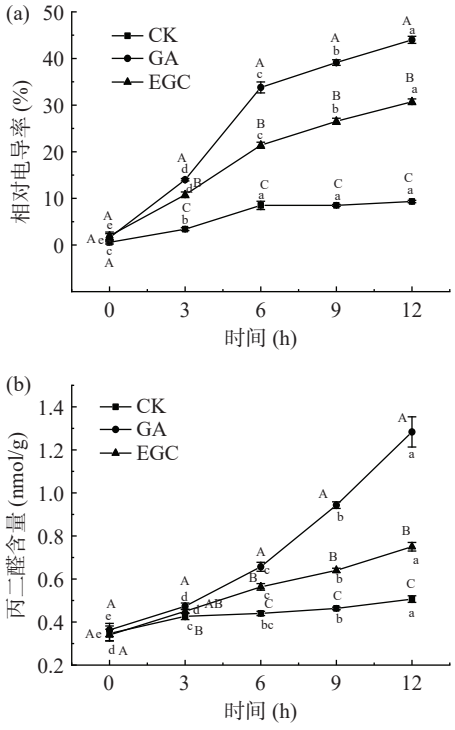


图 4 不同活性物质对桔青霉相对电导率(a)及丙二醛含量(b)的影响

Fig.4 Effect of different active substances on the relative conductivity (a) and malondialdehyde content (b) of *P. citrinum*

注：不同小写字母代表同一处理组不同时间之间差异显著(P<0.05)，不同大写字母代表同一时间不同处理组之间差异显著(P<0.05)。

2.4.2　ATP 酶活力变化　ATP 酶是线粒体膜中不可或缺的一部分，在能量代谢、物质运输、信息传递和维持重要细胞功能方面起着关键作用[34]。从图 5 可以看出不同活性物质处理对线粒体 ATP 酶活力的影响不同，CK、GA 与 EGC 处理后 ATP 酶活力分别为 11.42、2.64 和 6.48 U/mg pro，GA 处理组较对照组下降了 76.88%，对照组显著高于处理组（P<0.05）。处理组中，EGC 处理组的 ATP 酶活力显著高于 GA 处理组（P<0.05），表明 GA 处理桔青霉后细胞膜的通透性和结构损伤程度最大，GA 可能抑制桔青霉中的某些膜蛋白的功能以及破坏细胞膜的完整性，进而破坏桔青霉细胞膜的选择透过性，从而进一步抑制线粒体 ATP 酶活力，这种破坏会影响物质运输、能量供应以及代谢过程，并最终导致细胞死亡[35]。

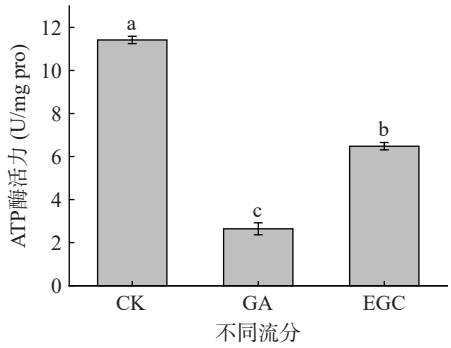


图 5　不同活性物质对桔青霉 ATPase 活力的影响

Fig.5　Effect of different active substances on the ATPase activity of *P. citrinum*

注：不同字母代表具有显著差异（P<0.05），图 7 同。

2.4.3　激光共聚焦测定　ROS 是机体氧化代谢的副产物，在细胞信号转导和体内平衡中起着重要作用，可以对细胞器造成损伤，最终中断细胞的生理功能[36]。因此，可以通过检测 ROS 的积累来判断不同组分对菌丝的损伤程度[37]。为了探索不同活性物质对桔青霉菌丝的损伤程度，使用氧化敏感荧光探针（DCFH-DA）检测细胞内 ROS 的产生，DCFH-DA 探针可被菌丝中的 ROS 氧化成 2′, 7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯（DCFH）[38]，产生绿色荧光，荧光强度代表着 ROS 水平的高低，荧光越强，表示桔青霉细胞被损坏的越严重，表明活性物质对桔青霉的抑制效果越强。如图 6 所示，GA 处理组的荧光强度高于 EGC 处理组，表明 ROS 在 GA 处理组的菌丝中积累更多，对细胞器的损伤更严重，对桔青霉细胞的损坏更严重。ROS 的过量产生是由氧化系统和抗氧化系统之间的不平衡引起的[39]。由此可以推断，GA 是通过破坏生物系统的氧化还原平衡来抑制桔青霉的生长。

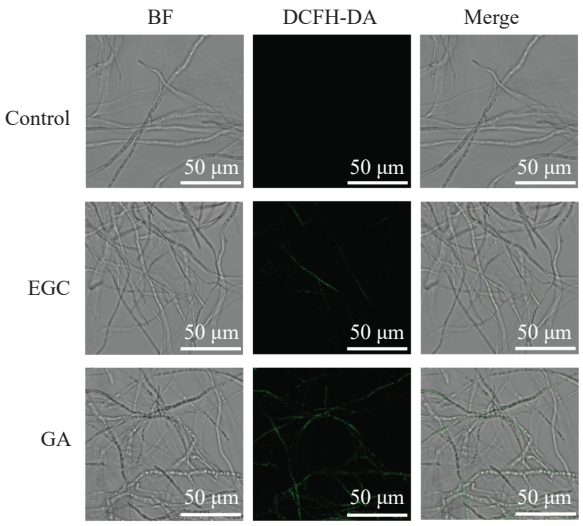


图 6　不同活性物质处理对桔青霉细胞内 ROS 的影响

Fig.6　Effect of different active substances on intracellular ROS in *P. citrinum*

2.4.4　线粒体膜电位分析　线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个关键特征[40]，使用 JC-1 探针测量线粒体膜电位。如图 7（a）所示，在对照组中，经 GA 和 EGC 处理后的菌丝，JC-1 分布在受损菌丝的线粒体膜中，产生绿色荧光。如图 7（b）所示，529 nm/590 nm 的强度可以反映线粒体去极化程度，线粒体去极化程度可以作为评价线粒体功能和细胞健康状态的重要指标。不同的去极化程度代表着细胞面临不同程度的损伤，从轻微的功能障碍到严重的细胞死亡，经 GA 处理后，529 nm/590 nm 的强度最大为 2.12，是对照组的 17.31 倍，表明去极化程度明显升高。结果表示，经 GA 处理后细胞凋亡最为严重。GA 可能通过影响离子通道功能，导致离子流动异常，从而破坏了线粒体膜电位的平衡[41]，不平衡的电位加剧了活性氧的产生，抑制了菌丝的生长。

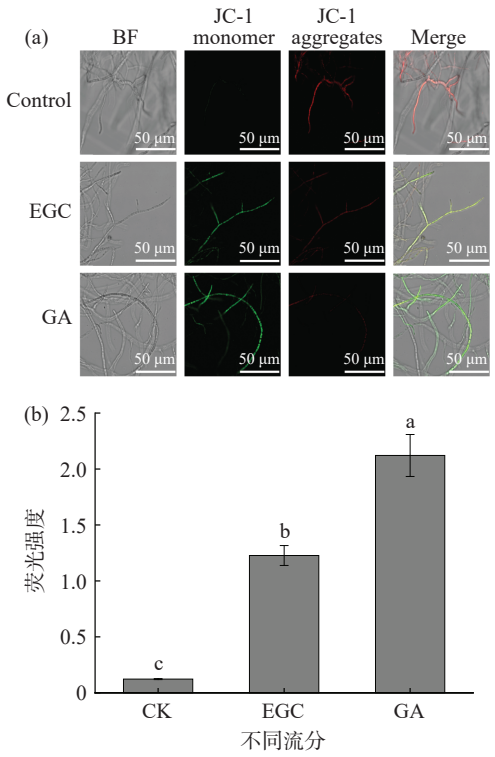


图 7　不同活性物质处理桔青霉线粒体膜电位图（a）及荧光强度（b）

Fig.7　Mitochondrial membrane potential of *P. citrinum* mitochondria treated with different active substances (a) and fluorescence intensity (b)

2.4.5 透射电镜分析 透射电镜可以从微观上直接反映桔青霉菌丝的超微结构[42]。如图 8 对照组细胞结构连续,形态清晰,细胞壁与细胞膜完整,细胞器形态饱满,无损伤。经不同抑菌物质处理后,细胞结构发生了明显的变化,经 EGC 处理的桔青霉细胞壁结构遭到破坏,部分出现了质壁分离现象;而经 GA 处理后桔青霉出现了较为明显的质壁分离与细胞器模糊,表明 GA 处理组严重破坏了桔青霉细胞结构,增加了细胞的通透性。综上所述,五倍子活性物质处理可以破坏桔青霉细胞的超微结构。李瑞一等[43]研究发现紫苏醛有效抑制桔青霉生长,其抑菌作用主要表现为桔青霉细胞壁被破坏,导致细胞器受损,出现质壁分离现象。

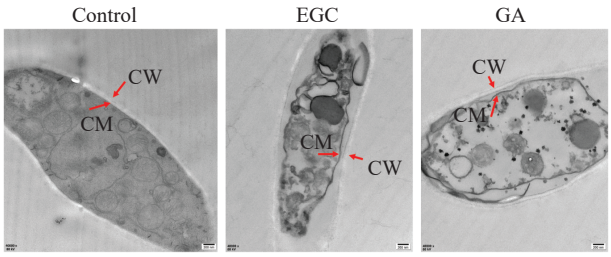


图 8 不同活性物质处理桔青霉透射电镜图

Fig.8 Transmission electron microscopy (TEM) of *P. citrinum* in different active substances treatments

注:CW:细胞壁,CM:细胞膜;红色箭头表示细胞膜和细胞壁的位置。

3 结论

本研究揭示五倍子中没食子酸与(-)-表没食子儿茶素是其抑制桔青霉的关键活性成分,其中没食子酸通过破坏了细胞膜完整性,使得相对电导率增加了 78.80%,丙二醛含量增加了 60.16%;通过诱导氧化应激反应,使得 ROS 水平升高,进而破坏了胞内氧化还原稳态;通过抑制线粒体功能,使得 ATP 酶活性降低 76.88%,线粒体膜电位下降,去极化程度升高至对照组的 17.31 倍;同时,损伤了细胞超微结构,出现质壁分离等现象。该研究首次从多靶点互作层面系统解析了 GA 的抑菌机制,为五倍子作为天然抑菌剂的开发提供了关键成分与作用机制依据,然而,五倍子中关键抑菌成分的提取工艺仍需优化,且微量成分间的协同效应尚未明确,这些都需要进一步研究。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 黄欣娅, 郭婷, 戴宏杰. 柑橘采后青霉菌的侵染及产毒机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 389−395. [HUANG X Y, GUO T, DAI H J. Research on infection and toxin producing mechanism of postharvest penicillium in citrus[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 389−395.]

[2] 吴申懋, 于华宁. 桔霉素生物合成及调控的研究进展[J]. 中国调味品, 2017, 42(8): 175−180. [WU S M, YU H N. Research progress on biosynthesis and regulation of citrinin[J]. China Condiment, 2017, 42(8): 175−180.]

[3] 刘程惠, 马涛, 胡文忠, 等. 鲜切苹果腐败霉菌的分离鉴定及致腐力的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(7): 131−136. [LIU C H, MA T, HU W Z, et al. Isolation and identification of spoilage molds from fresh-cut apple and their rot abilities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(7): 131−136.]

[4] 顾媛媛, 华国栋, 巩颖, 等. 中草药及其有效成分体外抗菌作用研究进展[J]. 中国药物经济学, 2018, 13(5): 123−125. [GU Y Y, HUA G D, GONG Y. Progress of *in vitro* antimicrobial effects of Chinese herbal medicines and their active ingredients[J]. China Journal of Phaarmaceutical Economics, 2018, 13(5): 123−125.]

[5] 朱红梅, 温海, 李斌. 外用抗真菌中草药的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2019, 14(5): 316−320. [ZHU H M, WEN H, LI B. Advance on traditional Chinese herb in the topical antifungal therapy[J]. Chinese Journal of Mycology, 2019, 14(5): 316−320.]

[6] 吴小虎, 艾启俊, 肖艺. 天然中草药果蔬防腐保鲜剂的研究与应用[J]. 保鲜与加工, 2006(2): 4−6. [WU X H, AI Q J, XIAO Y. Study and application of natural Chinese herbal medicine asfruit and vegetable antistaling agent[J]. Storage and Process, 2006(2): 4−6.]

[7] 李晓菲, 徐政. 植物源杀菌剂研究进展[J]. 南方农业, 2018, 12(13): 40−42,45. [LI X F, XU Z. The research progress on botanical fungicides[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 12(13): 40−42,45.]

[8] 堂格斯, 丁文博, 黄艳红, 等. 五倍子的主要成分、生物学功能及在水产养殖业中的应用[J]. 饲料研究, 2025, 48(15): 157−162. [TANG G S, DING W B, HUANG Y H, et al. The main components, biological functions of *Galla chinensis* and its application in aquaculture[J]. Feed Research, 2025, 48(15): 157−162.]

[9] 邓召国, 杨斌. 民国时期贵州地区五倍子资源的开发利用[J]. 六盘水师范学院学报, 2024, 36(2): 32−40. [DNEG Z G, YANG B. Development and utilization of gallnut resources in Guizhou during the republic of China[J]. Journal of Liupanshui Normal University, 2024, 36(2): 32−40.]

[10] DHANANIA Y, SINGHEE D, SAMANTA A K. Optimization of dyeing process variables for eco-friendly dyeing of cotton fabric with babul bark extract as a natural dye and gallnut extract as a bio-mordant[J]. Journal of Natural Fibers, 2022, 19(13): 5478−5495.

[11] REN Y Y, ZHANG X R, LI T N, et al. *Galla chinensis*, a traditional chinese medicine: comprehensive review of botany, traditional uses, chemical composition, pharmacology and toxicology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 278: 114247.

[12] XI Q P, WANG X F. The study of the inhibitory effect of different components of Chinese galnut on oral pathogenic bacteria[J]. Electronic Journal of General Stomatology, 2018, 5(11): 8−10.

[13] ZOU L, ZHANG L L, LI J Z, et al. Effect of *Galla chinensis* extract and chemical fractions on demineralization of bovine enamel *in vitro*[J]. Journal of Dentistry, 2008, 36(12): 999−1004.

[14] 张凌琳, 李继遥, 周学东, 等. 中药五倍子多酚性化合物促脱矿牙釉质和人工羟磷灰石再矿化作用的观察[J]. 四川大学学报(医学版), 2010, 41(5): 844−848. [ZHANG L L, LI J Y, ZHOU X D, et al. Role of enamel organic matrix in the remineralization of initial demineralized enamel and artificial hydroxylapatite treated with *Galla chinensis*[J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2010, 41(5): 844−848.]

[15] 梁正, 徐强, 张倩, 等. 五倍子化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(18): 5908−5919. [LIANG Z, XU Q, ZHANG Q, et al. Research progress on chemical constituents and

pharmacological effects of *Galla chinensis*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(18): 5908−5919.]
[16] JIANG S X, XU J H, LEI L. *Galla chinensis* extract based membranes with effective antibacterial performance[J]. Industrial Crops & Products, 2024, 217: 118842.
[17] 陈依琳, 罗志军, 胡鹏刚, 等. 天然五倍子提取物及其衍生物复合保鲜剂在冷鲜猪肉中的应用研究[J]. 食品与发酵科技, 2023, 59(1): 55−61,72. [CHEN Y L, LUO Z J, HU P G, et al. Application of natural gallnut extract and its derivative compound preservative inchilled fresh pork[J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2023, 59(1): 55−61,72.]
[18] 孙莎. 五倍子提取液对蓝莓采后病害抑制及贮藏品质研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2018. [SUN S. The inhibition effect of *Galla chinensis* extract on postharvest disease of blueberry and its storage quality[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.]
[19] 郑曙明, 黄建军, 吴青, 等. 复方五倍子有效成分的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(1): 57−64. [ZHENG S M, HUANG J J, WU Q, et al. Studies on separation and antibacterial activity of the effective components of Chinese herbal compounds gallnut for fishery antimicrobial agent[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(1): 57−64.]
[20] 黄海英, 郑海武, 李正英, 等. 五倍子抑制番茄晚疫病原菌物提取分离与作用机理初步分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 71−75. [HUANG H Y, ZHENG H W, LI Z Y, et al. Extraction and isolation of nutgall against pathogenic bacteria of tomato late pathogen and preliminary analysis of its mechanism[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 71−75.]
[21] 李东昱, 胡爱心, 黄雯霞, 等. 植物乳杆菌培养上清对不同血清型沙门氏菌的抑制效果及作用机理[J]. 微生物学报, 2023, 63(1): 220−232. [LI D Y, HU A X, HUANG W X, et al. Inhibitory mechanism of *Lactobacillus plantarum* culture supernatant on *Salmonella* of different serotypes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(1): 220−232.]
[22] WANG Y, WU W J, LIU R L, et al. Silk protein: A novel antifungal and edible coating for strawberry preservation[J]. Food Chemistry, 2025, 463(2): 141179.
[23] CARVAJAL F, PALMA F, JIMÉNEZ-MUÑOZ R, et al. Unravelling the role of abscisic acid in chiling tolerance of zucchini during postharvest cold storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2017, 133: 26−35.
[24] BONORA A, PANCALDI S, GUALANDRI R, et al. Carotenoid and ultrastructure variations in plastids of *Arum italicum* Miller fruit during maturation and ripening[J]. Journal of experimental botany, 2000, 51(346): 873−884.
[25] RASHIDINEJAD Ali. Bioactive compounds from New Zealand's native edible plants: Their role in future functional foods [J]. Future Postharvest and Food, 2024, 1(4): 435−440.
[26] SINGH P, SINGH A. Indian hidden tuber "Ram Kand Mool" (*Maerua oblongifolia* A. Rich): Cultivation, phytochemistry and potential applications—A comprehensive review[J]. Future Postharvest and Food, 2024, 1(4): 380−392.
[27] GATTO L J, VEIGA A, GRIBNER C, et al. *Myrcia hatschbachii*: Antifungal activity and structural elucidation of ellagic and 3-O-methyl ellagic acids[J]. Natural Product Research, 2020, 35(23): 5540−5543.
[28] de LEÓN-ZAPATA, MIGUEL A, PASTRANA-CASTRO L, et al. Experimental protocol for the recovery and evaluation of bioactive compounds of tarbush against postharvest fruit fungi[J]. Food Chemistry, 2016, 198: 62−67.
[29] KEYVANI-GHAMSARI, SAEEDEH, RAHIMI M, et al. An update on the potential mechanism of gallic acid as an antibacterial and anticancer agent[J]. Food Science & Nutrition, 2023, 11(10): 5856−5872.
[30] MUTHU M, GOPAL J, MIN S X, et al. Green tea versus traditional Korean teas: Antibacterial/antifungal or both[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology Part A Enzyme Engineering & Biotechnology, 2016, 180(4): 780−790.
[31] UMAMAHESWARI K, ABIRAMI N. Assessment of antifungal action mechanism of green synthesized gold nanoparticles (AuNPs) using *Allium sativum* on *Candida species*[J]. Materials Letters, 2022, 333: 133616.
[32] KONG W W, HUANG C Y, CHEN Q, et al. Nitric oxide alleviates heat stress-induced oxidative damage in *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*[J]. Fungal Genetics Biology, 2012, 49(1): 15−20.
[33] LU J, WANG Z N, REN Z N, et al. Antibacterial effect of gallic acid against aeromonas hydrophila and *Aeromonas sobria* through damaging membrane integrity[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 17(13): 1153−1158.
[34] MENG X L, WU W J, NIU B, et al. Inhibitory effect and action mechanism of perillaldehyde on the *Fusarium graminearum* in postharvest fresh ginger[J]. Postharvest Biology and Technology, 2024, 209: 112674.
[35] YANG G R, NIU B, ZONG Z H, et al. Microbicidal effect of negative air ion against *Penicillium citrinum* and quality control of Chinese bayberry[J]. Food Control, 2024, 162: 110476.
[36] KAUSHIK N, MITRA S, BAEK E J, et al. The inactivation and destruction of viruses by reactive oxygen species generated through physical and cold atmospheric plasma techniques: Current status and perspectives[J]. Journal of Advanced Research, 2023, 43: 59−71.
[37] DHARMARAJA, ALLIMUTHU T. Role of reactive oxygen species (ROS) in therapeutics and drug resistance in cancer and bacteria[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 60(8): 3221−3240.
[38] YU D, ZHA Y Y, ZHONG Z, et al. Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 339: 129878.
[39] ZHANG Y H, XU S, LI K, et al. TBBPA induced ROS overproduction promotes apoptosis and inflammation by inhibiting autophagy in mice lung[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 252: 114607.
[40] CHEN T, RUAN D D, ZHANG J H, et al. Eucarbwenstols A–H, eight novel compounds from Eucalyptus robusta prevents MPC-5 injury via ROS modulation and regulation of mitochondrial membrane potential[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 129: 106159.
[41] GALHARDO T S, UENO A K, COSTA-SILVA T A, et al. New derivatives from dehydrodieugenol B and its methyl ether displayed high anti-Trypanosoma cruzi activity and cause depolarization of the plasma membrane and collapse the mitochondrial membrane potential[J]. Chemico-Biological Interactions, 2022, 366: 110129.
[42] WANG J Y, BIE M, ZHOU W J, et al. Interaction between carboxymethyl pachyman and lotus seedpod oligomeric procyanidins with superior synergistic antibacterial activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 212: 11−20.
[43] 李瑞一, 吴伟杰, 房祥军, 等. 紫苏醛对杨梅主要致病菌桔青霉的抑菌活性及作用机制[J]. 食品科学, 2023, 44(15): 196−203. [LI R Y, WU W J, FANG X J, et al. Antifungal Activity and mechanism of perillaldehyde against *Penicillium citrinum*, a Major fungal pathogen of *Myrica rubra*[J]. Food Science, 2023, 44(15): 196−203.]