

茶多酚对植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的双向调节作用

江福林, 卢云浩, 何强

Dual-directional Regulation of Tea Polyphenols on the Growth of *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*

JIANG Fulin, LU Yunhao, and HE Qiang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040081>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

发酵冬瓜对感染金黄色葡萄球菌小鼠肠道菌群的调节作用

Regulation of Fermented Wax Gourd on Intestinal Microflora of Mice Infected with *Staphylococcus aureus*

食品工业科技. 2021, 42(20): 149-156 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040128>

茶多酚-肉桂精油复合保鲜剂抗氧化活性及抑菌作用

Antioxidant activity and antimicrobial effect of tea polyphenols-cinnamon essential oil compound preservatives

食品工业科技. 2017(22): 226-230 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.22.044>

迷迭香酸协同 ϵ -聚赖氨酸对金黄色葡萄球菌的抑菌机理初探

Primary Exploration on Antibacterial Mechanism of the Combination of Rosmarinic Acid and ϵ -polylysine Against *Staphylococcus aureus*

食品工业科技. 2020, 41(14): 192-196,227 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.031>

超声处理对羊乳中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀灭效果

Effect of Ultrasonic Treatment on the Bactericidal Effect of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in Goat Milk

食品工业科技. 2021, 42(18): 126-133 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120270>

食品中金黄色葡萄球菌生物被膜形成基因分析及影响因素研究

Analysis of biofilm formation related genes and its influence factors for *Staphylococcus aureus* food isolates

食品工业科技. 2017(15): 129-133 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.15.025>

腐植酸钠对植物乳杆菌生长、抑菌和黏附能力的影响

Effects of Sodium Humate on the Growth, Bacteriostasis and Adhesion Ability of *Lactobacillus plantarum*

食品工业科技. 2019, 40(22): 115-119,124 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.021>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

江福林, 卢云浩, 何强. 茶多酚对植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的双向调节作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 152–159. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040081

JIANG Fulin, LU Yunhao, HE Qiang. Dual-directional Regulation of Tea Polyphenols on the Growth of *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 152–159. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040081

· 生物工程 ·

茶多酚对植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的双向调节作用

江福林¹, 卢云浩², 何 强^{1,*}

(1. 四川大学轻工科学与工程学院, 四川成都 610065;

2. 成都大学食品与生物工程学院, 四川成都 610106)

摘 要: 增强益生菌产品中益生菌的活力, 同时抑制食源性致病菌及腐败菌的生长能够提升产品品质稳定性。在单培养及共培养条件下, 采用传统计数法和高通量测序比较研究了不同浓度的茶多酚对益生菌植物乳杆菌、致病菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的影响。单培养结果显示, 随着茶多酚浓度增加, 植物乳杆菌活菌数先增加后降低, 在浓度为 2.0 mg/mL 时活菌数最多, 而两株致病菌的存活率不断降低, 其中金黄色葡萄球菌更为明显。在共培养体系中 (金黄色葡萄球菌/大肠杆菌-植物乳杆菌), 随着培养时间延长, 植物乳杆菌的生物量不断增加, 而致病菌数量和培养基 pH 不断降低。此外, 高通量测序进一步表明植物乳杆菌与致病菌共存时, 在茶多酚的作用下, 乳酸菌的相对丰度高于对照组, 而致病菌的相对丰度则低于对照组。综上, 适宜浓度 (2–4 mg/mL) 的茶多酚对植物乳杆菌和致病菌的生长具有双向调节作用, 其可增殖植物乳杆菌, 同时抑制致病菌。

关键词: 茶多酚, 植物乳杆菌, 金黄色葡萄球菌, 抑菌, 双向调节

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)22-0152-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040081



本文网刊:

Dual-directional Regulation of Tea Polyphenols on the Growth of *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*

JIANG Fulin¹, LU Yunhao², HE Qiang^{1,*}

(1. College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: Enhancing the vitality of probiotics in probiotic product while inhibiting the growth of food-borne pathogenic and spoilage bacteria can improve product quality stability. Under mono-culture and co-culture conditions, the effects of different concentrations of tea polyphenols on the growth of *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* were comparatively investigated by culture-dependent method and high-throughput sequencing. Mono-culture result showed that with the increase of tea polyphenols concentration, the viable count of *L. plantarum* first ascended and then decreased, reaching the maximum at the concentration of 2.0 mg/mL. However, the survival rate of the two pathogens decreased continuously, with *S. aureus* decreasing more significantly. In the co-culture system (*S. aureus*/*E. coli*-*L. plantarum*), the biomass of *L. plantarum* showed a significant increase with culture time, coupled with a general decrease in the number of the pathogen and pH of the medium. In addition, Illumina Miseq sequencing further showed that the relative abundance of *Lactobacillus* was higher than that of the control when coexisted with the pathogen in the presence of tea polyphenols, while the relative abundance of the pathogen was lower than that of the control. The results indicated that tea polyphenols at an appropriate concentration (2–4 mg/mL) had a dual-directional regulation on the growth

收稿日期: 2023-04-16

基金项目: 四川省重点研发项目 (2020YFNO149, 2020YFNO151)。

作者简介: 江福林 (1997–), 女, 硕士研究生, 研究方向: 健康食品工程, E-mail: jiangfl9916@163.com。

* 通信作者: 何强 (1971–), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工及质量安全, E-mail: heq361@163.com。

of *L. plantarum* and pathogens, that was, proliferating *L. plantarum* while inhibiting the growth of pathogens.

Key words: tea polyphenols; *Lactobacillus plantarum*; *Staphylococcus aureus*; antibacterial; dual-directional regulation

益生菌,是指摄入一定量会给宿主带来健康益处的活的微生物,通常包括乳酸杆菌、双歧杆菌、芽孢杆菌和酵母菌^[1]。植物乳杆菌是益生菌中使用最普遍的细菌种类之一,因其良好的生物活性和保健功能被广泛应用于各类食品生产中,如乳制品、发酵肉制品、饮料以及焙烤制品等^[2-4]。然而,在食品加工过程中,益生菌的增殖及代谢活性会因处理温度、加工方式、水分含量以及生长环境酸碱度等生产条件的影响而降低,进而给产品品质带来负面影响^[5]。此外,食源性致病菌及腐败菌的污染也会导致品质劣变、安全性降低,引发食品安全问题^[6]。因此,增强益生菌产品中益生菌的活性,同时抑制其中腐败菌以及致病菌的生长繁殖,能够提高产品的品质及安全性,增强其经济效益。

茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称,其主要活性成分包括表儿茶素、表没食子儿茶素(Epigallocatechin, EGC)、表儿茶素没食子酸酯(Epicatechin gallate, ECG)和表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)^[7]。茶多酚具有良好的广谱抗菌性,可以有效地抑制常见食源性致病菌的生长及毒素的产生^[8]。如 EGCG 可以抑制金黄色葡萄球菌对葡萄糖的摄入,并且能够与细胞膜蛋白结合,导致细胞损伤及破裂^[9]。王文娟等^[10]也发现随着茶多酚浓度增加,其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌生长的抑制效果不断增强。除了能限制致病菌等微生物的生长外,茶多酚还能发挥益生元的作用,刺激某些益生菌的生长,如嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌等^[11]。Tabasco 等^[12]研究发现,浓度为 0.25~1.0 mg/mL 的多酚(包括儿茶素、表儿茶素和黄烷-3-醇)可以有效刺激乳酸菌的生长。此外,EGCG 能够促进肠道内乳杆菌属的增殖及短链脂肪酸和乳酸的合成^[13]。然而,有研究表明,当浓度超过乳酸菌的耐受范围,茶多酚仍然会发挥抗菌作用。如潘冬梅等^[14]发现当培养基中的茶多酚添加量超过 0.6% 时会抑制植物乳杆菌的生长。因此,控制好茶多酚的用量是决定其发挥益生作用或抑菌作用的重要因素。

从上述研究可以看出,已有研究者关于茶多酚对益生菌的益生作用以及对致病菌的抑菌作用分别展开了研究,但目前关于茶多酚同时发挥益生作用和抑菌作用的边界浓度的研究鲜有报道。基于此,本研究选择益生菌植物乳杆菌、致病菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为目标菌株,探究茶多酚发挥双向调节作用的边界浓度,以期茶多酚在益生菌产品中的应用提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum* CICC 6253)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)

和大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 43889) 中国工业微生物菌种保藏管理中心;茶多酚(纯度:98%)

上海源叶生物科技有限公司;甲酸、乙腈 色谱纯,成都金山化学试剂有限公司;MRS 肉汤培养基、MRS 琼脂培养基、营养肉汤、营养琼脂、乳酸杆菌选择培养琼脂(LBS)、Baird-Parker 琼脂培养基(BP)、伊红美蓝琼脂培养基(EMB) 青岛海博生物有限公司。

SQP QUINTIX213-1CN 电子天平 德国赛多利斯科学仪器有限公司;ZWY-2102C 恒温振荡培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司;BG-160 恒温培养箱 上海博迅医疗生物仪器有限公司;D3024R 台式冷冻离心机 美国赛洛捷克(SCIOLOGEX)公司;Varian 1200LC/MS Var 液相色谱-质谱联用仪 美国 Varian 公司;FiveEasy plus pH 计 德国梅特勒托利多公司。

1.2 实验方法

1.2.1 高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)测定茶多酚成分 用超纯水配制浓度为 1.0 mg/mL 的茶多酚,经 0.22 μm 滤膜过滤,使用 Eclipse Plus C18 色谱柱(Agilent, 4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 μm)测定茶多酚中所含儿茶素成分,并根据峰面积计算其相对含量^[15]。色谱条件:柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相 A 为 0.5% 甲醇-水溶液, B 为乙腈,流速 1 mL/min,进样量 10 μL ,检测波长 260 nm。洗脱程序为 0~50 min,流动相 B 由 2% 线性增至 25%。质谱条件:负离子模式,辅助气压力 3.0 $\times 10^5$ Pa,雾化气压力 1.5 $\times 10^5$ Pa,毛细管电压 4.5 kV,毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,质量扫描范围 m/z 100~1000。

1.2.2 菌种活化 将保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 的植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别接种于 MRS 肉汤培养基、营养肉汤培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,反复活化 2 次。实验前用无菌磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH6.8)将不同菌液进行适度稀释,得到浓度约为 0.5 $\times 10^8$ CFU/mL 的菌悬液。

1.2.3 单培养 将 1 mL 植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌悬液分别接种于 50 mL 含有不同质量浓度茶多酚(0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mg/mL)的 MRS 肉汤培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 条件下培养 24 h。培养结束后,对菌液进行适度稀释,将稀释菌液分别均匀涂布于 MRS 琼脂培养基(植物乳杆菌)和营养琼脂培养基(金黄色葡萄球菌和大肠杆菌)上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h 后,进行计数。实验重复三次。

1.2.4 共培养 准确称取 0.10、0.20 g 茶多酚溶解于 50 mL MRS 肉汤培养基中,得到浓度分别为 0、2.0、4.0 mg/mL 的培养基。吸取植物乳杆菌和金

色葡萄球菌菌悬液各 1 mL 同时接种于该培养基中,于 37 ℃、120 r/min 条件下培养。分别于 0、5、15、20、25、30、35 h 取样,测定 pH 和活菌数。对共培养菌液进行适度稀释,将稀释菌液均匀涂布于 LBS 培养基和 BP 培养基上,于 37 ℃ 下培养 48 h 后,对植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌进行计数。植物乳杆菌与大肠杆菌的共培养采用同样的方法,选用 EMB 琼脂培养基对大肠杆菌进行计数。实验重复三次。

1.2.5 微生物群落的测定

1.2.5.1 PCR 扩增和 Illumina Miseq 测序 基于实验 1.2.3, 收集茶多酚浓度为 0、2.0 mg/mL 条件下,共培养 0、35 h 时的菌液,于 4 ℃、8000 r/min 下离心 15 min,收集沉淀物用于后续实验。分组如下:金黄色葡萄球菌-植物乳杆菌: S0: 无茶多酚, 0 h; S: 无茶多酚, 培养 35 h; ST: 含茶多酚, 培养 35 h; 大肠杆菌-植物乳杆菌: E0: 无茶多酚, 0 h; E: 无茶多酚, 培养 35 h; ET: 含茶多酚, 培养 35 h。使用 E.Z.N.A.® soil DNA 试剂盒 (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 提取微生物群落总 DNA。使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增。扩增程序如下: 95 ℃ 预变性 3 min, 27 个循环 (95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s), 然后在 72 ℃ 稳定延伸 10 min。

将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,利用 AxyPrep DNA Gel Extraction 试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行回收产物纯化,2% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Quantus™ Fluorometer (Promega, USA) 对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq 试剂盒进行建库: 接头链接; 使用磁珠筛选去除接头自连片段; 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; 磁珠回收 PCR 产物得到最终的文库。利用 Illumina 公司的 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台进行测序 (上海美吉生物医药科技有限公司)。

1.2.5.2 测序数据处理 使用 FASTP 0.20.0^[16] 对原始测序序列进行质控,使用 FLASH 1.2.7^[17] 进行拼接: 过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基,设置 50 bp 的窗口,如果窗口内的平均质量值低于 20,从窗口开始截去后端碱基,过滤质控后 50 bp 以下的 reads,去除含 N 碱基的 reads; 根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对 reads 拼接成一条序列,最小 overlap 长度为 10 bp; 拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2,筛选不符合序列; 根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品,并调整序列方向,barcode 允许的错配数为 0,最大引物错配数为 2。使用 UPARSE 7.1 对相似度为 97% 的操作分类单位进行聚类并删除嵌合序列^[18]。利用 RDP classifier 2.2 对每条序列进行物种分类注释,比对 Silva 16S rRNA 数据库 (v138),设置比对阈值为 0.7^[19]。

1.3 数据处理

实验结果均以平均值±标准差表示。使用 SPSS 26.0 进行方差分析、显著性分析, $P < 0.05$ 时为差异显著; 使用 Origin 2021 进行绘图。所有实验重复三次,每个实验设置三个平行样品。使用美吉云平台 (<https://cloud.majorbio.com/>) 对共培养微生物进行 PCoA 分析,并基于 Kruskal-Wallis 秩和检验进行组间物种差异分析。

2 结果与分析

2.1 茶多酚的色谱图

茶多酚的 HPLC 图如图 1 所示,经对比鉴定,本实验茶多酚的主要酚类物质为没食子儿茶素 (Gallocatechin, GC)、EGC、EGCG、ECG,各相对含量分别为 4.25%、6.62%、38.87% 和 11.11%,总儿茶素含量为 60.85%。

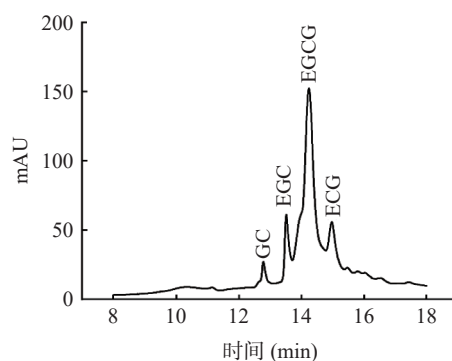


图 1 茶多酚的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of tea polyphenols

2.2 单培养条件下茶多酚对微生物的影响

在单培养条件下,茶多酚对益生菌植物乳杆菌、致病菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长的影响如图 2 所示。对植物乳杆菌而言,培养结束后,对照组的活菌数为 9.15 lg CFU/mL; 当茶多酚浓度小于 2.0 mg/mL 时,与对照组相比,植物乳杆菌的活菌数增加量并不显著 ($P > 0.05$); 而当茶多酚浓度为 2.0、4.0 mg/mL 时,植物乳杆菌活菌数分别增加了 0.25 和 0.21 lg CFU/mL,说明该浓度范围的茶多酚对植

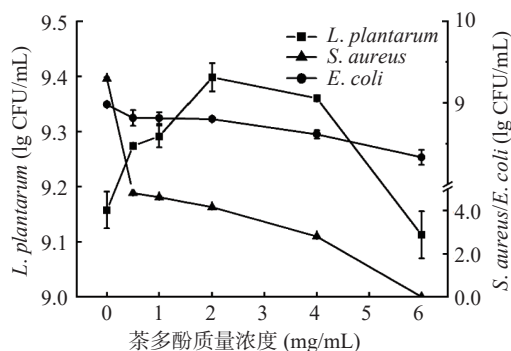


图 2 茶多酚对植物乳杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌活菌数的影响

Fig.2 Effects of tea polyphenols on the viable counts of *L. plantarum*, *S. aureus*, and *E. coli*

物乳杆菌具有显著的益生作用($P<0.05$)。Zhao 等^[20]在含副干酪乳杆菌的发酵豆浆中添加了 2%(w/v) 绿茶提取物, 菌株的生物量增加了 0.21 lg CFU/mL ($P<0.05$)。张雪婷等^[21]也发现添加量为 0.75%(w/v) 的茶多酚能够显著提高嗜酸乳杆菌的存活率。多酚对乳酸菌的益生作用可以归因于其抗氧化能力, 因为酚类化合物可以防止膜脂质过氧化, 保护膜的流动性^[22]。另一方面, 酚类化合物能够引起乳酸菌的基因表达发生变化, 例如负责碳水化合物代谢、特定酶合成以及细胞壁和膜合成的基因表达增加^[11]。然而, 当茶多酚浓度增大至 6.0 mg/mL 时, 植物乳杆菌活菌数减少了 0.05 lg CFU/mL, 说明此浓度的茶多酚抑制了植物乳杆菌的生长, 这与 Alberto 等^[23]的研究结果一致, 3 mg/mL 的没食子酸使得希氏乳杆菌的存活率降低了 26%, 这可能是因为高浓度多酚破坏了细菌细胞壁的完整性, 阻碍乳酸菌的代谢^[24]。结果表明, 茶多酚对植物乳杆菌生长的影响是呈浓度依赖性的, 即适宜浓度的茶多酚能够促进植物乳杆菌的生长, 而高浓度则抑制生长。

金黄色葡萄球菌和大肠杆菌是引起人类感染和食物中毒的常见腐败菌和致病菌^[25-26], 抑制其在食品中的生长繁殖对于食品卫生和消费者健康至关重要。茶多酚对金黄色葡萄球菌生长的影响如图 2 所示。可以看出, 金黄色葡萄球菌的活菌数随着茶多酚浓度的增加而不断减少。培养结束后, 金黄色葡萄球菌对照组的活菌数达到了 9.30 lg CFU/mL, 而茶多酚浓度为 0.5 mg/mL 时, 活菌数为 4.82 lg CFU/mL, 相比对照组而言减少了 4.48 lg CFU/mL。当茶多酚浓度为 2.0、4.0 mg/mL 时, 金黄色葡萄球菌活菌数分别减少了 5.14 和 6.50 lg CFU/mL; 在 6.0 mg/mL 时则检测不到金黄色葡萄球菌活菌数。

茶多酚对大肠杆菌生长的影响如图 2 所示。与金黄色葡萄球菌类似, 大肠杆菌的活菌数随着茶多酚浓度的增加而不断降低。培养结束后, 对照组的活菌数为 8.98 lg CFU/mL, 当茶多酚浓度为 2.0 mg/mL 时, 大肠杆菌活菌数减少了 0.18 lg CFU/mL, 不存在显著性差异($P>0.05$); 而当茶多酚浓度增大至 6.0 mg/mL 时, 大肠杆菌活菌数降低了 0.66 lg CFU/mL。由此可以看出, 金黄色葡萄球菌对茶多酚的敏感性大于大肠杆菌, 这与 Bouarab-Chibane 等^[27]的研究结果一致, 其发现 EGCG 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性高于大肠杆菌。两株致病菌对多酚呈现出差异敏感性可能是因为二者细胞壁结构不同。与大肠杆菌不同, 金黄色葡萄球菌不含覆盖细胞壁的脂多糖外膜, 因此, 多酚可以更容易破坏金黄色葡萄球菌细胞壁的完整性, 从而阻碍其代谢和生物合成^[28-29]。

2.3 共培养条件下茶多酚对活菌数及 pH 的影响

为了说明共培养过程中茶多酚对益生菌和致病菌生长的影响, 进一步研究了茶多酚浓度为 0、2.0、4.0 mg/mL 时植物乳杆菌与金黄色葡萄球菌或大肠杆菌共培养时的生长曲线。如图 3A~图 3C 所示, 当植物乳杆菌与金黄色葡萄球菌以初始比例为 1:1 共培养时, 无论茶多酚是否存在, 乳酸菌的数量均随着培养时间的推移而不断增加, 最终活菌数分别为 9.45、9.60 和 9.57 lg CFU/mL, 这与单培养时的结果一致, 说明茶多酚促进了植物乳杆菌的增殖。有研究表明植物乳杆菌自身能够合成相关酶类以代谢某些酚类化合物, 进而促进生长代谢^[11]。然而, 在共培养过程中, 含茶多酚的培养基中的金黄葡萄球菌数量不断减少, 且始终显著低于对照组($P<0.05$), 说明其生长受到抑制。培养基 pH 受植物乳杆菌代谢产酸的影响, 随着培养时间增加而不断降低, 最后趋于稳定,

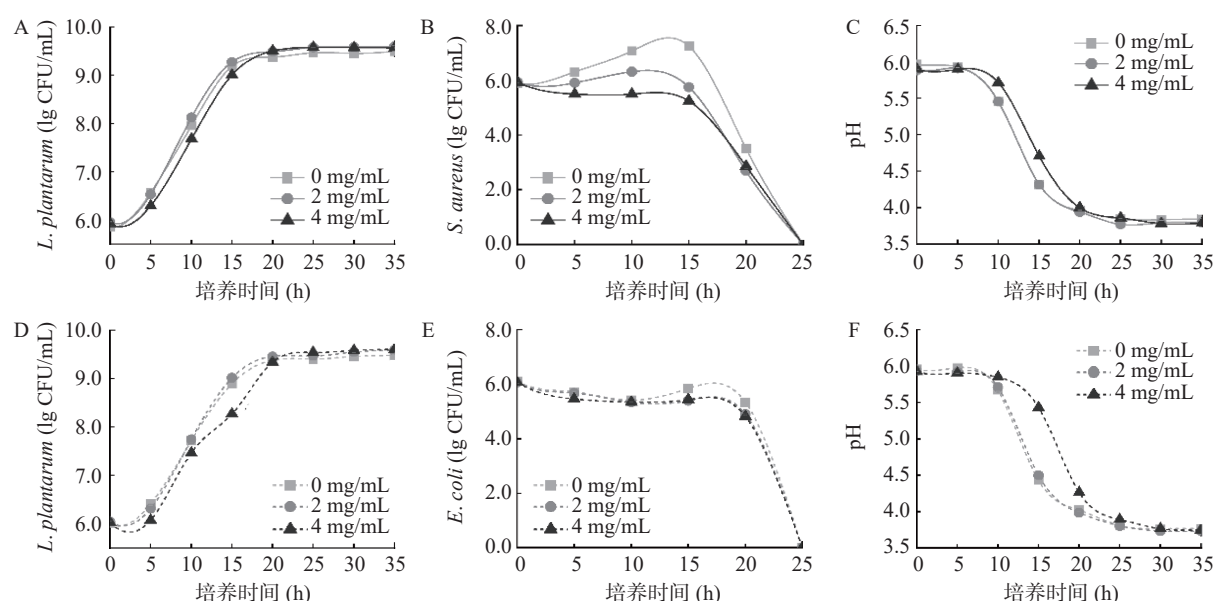


图 3 茶多酚对益生菌与致病菌共培养过程中的活菌数和培养基 pH 的影响

Fig.3 Effects of tea polyphenols on the number of viable bacteria and pH of medium during the co-culture of probiotic with pathogen

注: 初始接种量均为 6 lg CFU/mL; A~C: 金黄色葡萄球菌-植物乳杆菌; D~F: 大肠杆菌-植物乳杆菌。

最终 pH 分别为 3.84、3.79 和 3.78,说明茶多酚促进了植物乳杆菌的代谢产酸量。乳酸菌产生有机酸会降低生长环境 pH,对其竞争对手产生不利影响^[30]。

当大肠杆菌与植物乳杆菌共培养时,也观察到类似的现象。如图 3D~图 3F 所示,植物乳杆菌的活菌数随着培养时间的增加而不断增加,大肠杆菌活菌数和培养基 pH 不断下降,并且含茶多酚的培养基中的大肠杆菌数量显著低于对照组($P<0.05$)。值得注意的是,无论茶多酚是否存在,共培养中致病菌的数量都明显低于单培养体系中的数量($P<0.05$),说明植物乳杆菌与茶多酚可能存在协同抑菌效果。Bauza-Kaszewska 等^[31]研究发现大肠杆菌与鼠李糖乳杆菌在含树莓多酚的培养基中共培养时,大肠杆菌的存活率显著降低($P<0.05$),而鼠李糖乳杆菌的生长不受影响甚至得到促进。共培养条件下致病菌的生长受到抑制,一方面是因为酚类化合物可能会导致致病菌的细胞壁和 DNA 受损,从而抑制其生长^[32];另一方面,乳酸菌的代谢产物,如细菌素和有机酸,可以限制致病菌在共培养时的生长繁殖^[11]。结果表明,在共培养条件下,适宜浓度的茶多酚对益生菌植物乳杆菌、致病菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有双向调节作用,即它在促进植物乳杆菌生长的同时能够抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长。

2.4 微生物群落分析

为了避免传统计数造成的误差,使用高通量测序进一步研究了益生菌与致病菌共培养时微生物的组成。采用 PCoA 和 ANOSIM 分析不同样本之间

的差异性, $P<0.05$ 表示差异显著,且 R 值越大,组间差异越大。如图 4 所示,在金黄色葡萄球菌和植物

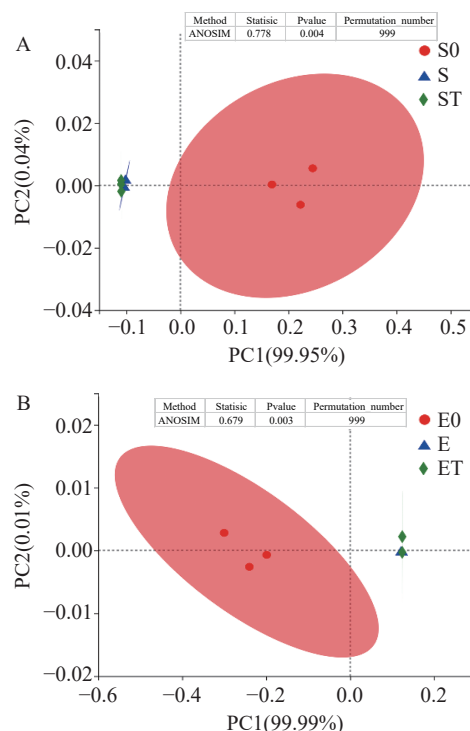


图 4 基于 OTU 水平的 PCoA 分析

Fig.4 PCoA at the OTU level

注: A: 金黄色葡萄球菌-植物乳杆菌; B: 大肠杆菌-植物乳杆菌; S0: 无茶多酚, 0 h; S: 无茶多酚, 培养 35 h; ST: 含茶多酚, 培养 35 h; E0: 无茶多酚, 0 h; E: 无茶多酚, 培养 35 h; ET: 含茶多酚, 培养 35 h; 图 5~图 6 同。

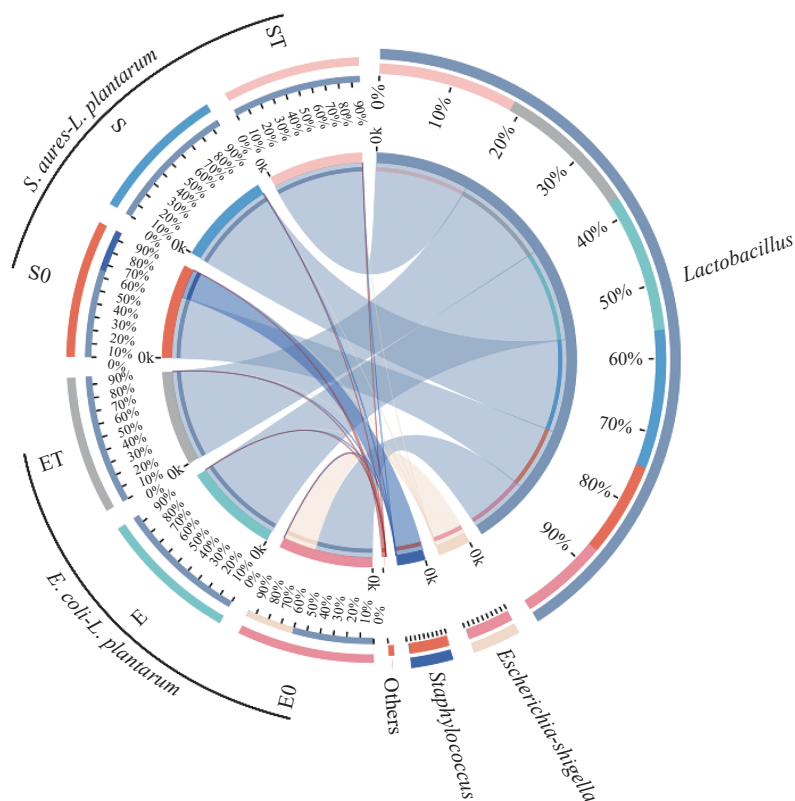


图 5 基于属水平的样本与物种关系图

Fig.5 Relationship between sample and species at the genus level

乳杆菌共培养体系中, 样品 S0 与 S、ST 呈离散分布 ($R=0.778$, $P=0.004$), 在大肠杆菌和植物乳杆菌共培养体系中也可以观察到类似的结果 ($R=0.679$, $P=0.003$), 说明共培养 35 h 后微生物群落组成发生明显变化, 并且各组之间存在显著性差异。

样本与物种关系图是一种描述样本与物种之间对应关系的可视化圈图, 该图能够反映每组样本的优势物种组成比例以及各优势物种在不同样本中的分布比例^[33]。由图 5 可知, 在两组共培养体系中, 乳杆菌属的相对丰度均显著增加 ($P<0.01$), 并且在培养结束后成为优势微生物, 而葡萄球菌属和大肠埃希氏菌属的相对丰度则显著减少 ($P<0.01$)。

基于样本中群落丰度数据, 评估了不同样本之

间物种差异的显著性, 结果如图 6 所示。当植物乳杆菌和金黄色葡萄球菌共培养结束后, 乳杆菌属在样本 S(不含茶多酚)和 ST(含茶多酚)的相对丰度差异在 5% 水平上显著, 在样本 S 与 S0、ST 与 S0 的相对丰度差异在 1% 的水平上显著。葡萄球菌属在各样本之间的差异水平与乳杆菌属相同。在植物乳杆菌和大肠杆菌的共培养体系中, 乳杆菌属和大肠埃希氏菌属在样本 E 与 E0、ET 与 E0 的相对丰度差异均在 1% 水平上显著。因此, 高通量测序结果进一步阐明, 在共培养条件下, 两株致病菌的生长因茶多酚的存在而受到抑制, 而植物乳杆菌仍然可以很好地增殖, 这与 2.3 的研究结果一致, 说明了茶多酚对益生菌和致病菌的生长具有双向调节作用。

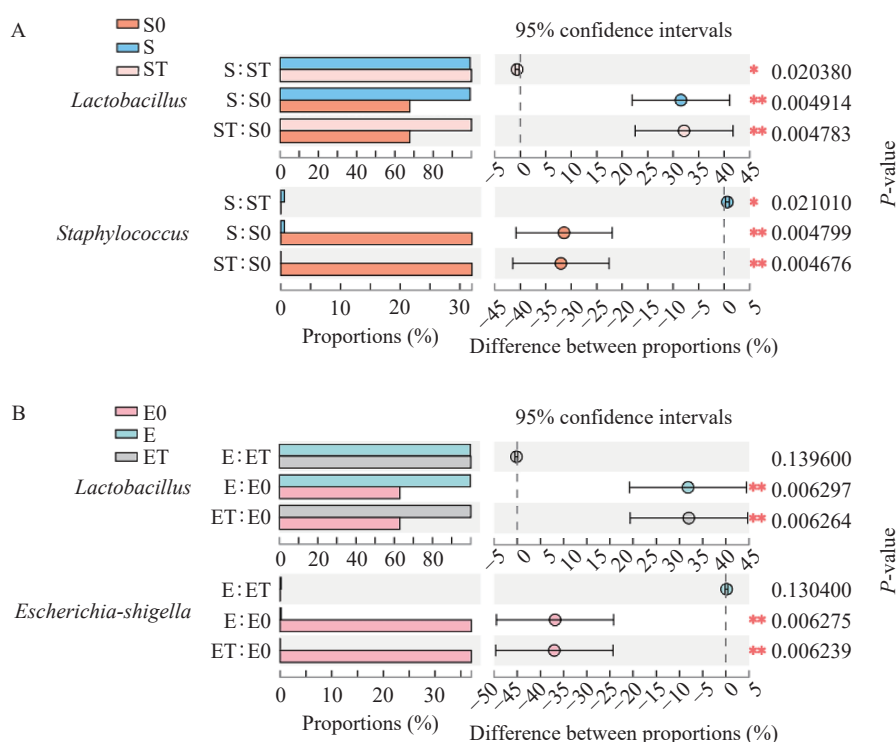


图 6 基于属水平的组间物种差异

Fig. 6 Species differences among groups at the genus level

3 结论

本研究探讨了不同质量浓度的茶多酚对益生菌植物乳杆菌、致病菌金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的影响。在单培养体系中, 适宜浓度(2.0~4.0 mg/mL)的茶多酚能够显著促进植物乳杆菌的增殖, 而高浓度则体现抑制效果。茶多酚对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有显著的抑菌活性, 且对金黄色葡萄球菌的抑菌性显著强于大肠杆菌。当益生菌与致病菌共培养时, 受茶多酚和生长环境 pH 的双重影响, 致病菌数量随着培养时间延长而不断减少, 益生菌数量则不断增加, 并且茶多酚能够促进益生菌的生长。综上所述, 适宜浓度的茶多酚对益生菌和致病菌的生长具有双向调节作用, 该研究结果对于茶多酚在益生菌产品中的应用具有积极意义, 有望提升食品的生物安全性。

本文初步研究了茶多酚对益生菌和致病菌的双向调节作用, 但其调节机制尚不明确, 后续可以从代谢、基因表达等层面深入阐明茶多酚发挥双向调节作用的详细机制。另外, 将双向调节浓度下的茶多酚应用于食品实际生产中, 探究其对食品品质及风味的影响也是未来的研究重点。

参考文献

- [1] 白慧慧. 母乳婴儿源益生菌筛选鉴定及其潜在益生特性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2022. [BAI H H. Screening and identification of breast-feeding probiotics and their potential probiotics [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2022.]
- [2] DAHIYA D, NIGAM P S. Clinical potential of microbial strains, used in fermentation for probiotic food, beverages and in synbiotic supplements, as psychobiotics for cognitive treatment through gut-brain signaling[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1687.
- [3] KUMAR S, RATTU G, MITHARWAL S, et al. Trends in

- non-dairy-based probiotic food products: Advances and challenges[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2022, 46(9): 16578.
- [4] 杨滔, 张晓东, 刘红梅, 等. 不同发酵剂对发酵猪肉香肠品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(1): 101-109. [YANG T, ZHANG X D, LIU H M, et al. Effect of different starters on the quality of fermented pork sausage[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(1): 101-109.]
- [5] 严涛, 陈珂可, 杨恒飞, 等. 益生菌菌粉贮存活性影响因素研究[J]. *生物技术通报*, 2022, 39(4): 56-63. [YAN T, CHEN K K, YANG H F, et al. Study on factors affecting the storage survival rates of probiotic bacteria powder[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 39(4): 56-63.]
- [6] 李卓思, 高彬茹, 吴梦洁, 等. 低聚糖拮抗食源性致病菌的研究及应用进展[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(12): 394-401. [LI Z S, GAO B R, WU M J, et al. Research and application progress of oligosaccharides against foodborne pathogens[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(12): 394-401.]
- [7] 王睿, 王琦, 周敏, 等. 茶多酚和 EGCG 对风干金鲳鱼品质相关理化指标的改善效果比较[J]. *食品科学*, 2023, 44(2): 54-63. [WANG R, WANG Q, ZHOU M, et al. Comparison of the effects of tea polyphenols and epigallocatechin gallate on improving physicochemical indexes related to quality of air-dried golden pomfret[J]. *Food Science*, 2023, 44(2): 54-63.]
- [8] ZHANG Q L, ZHANG J, ZHANG J Q, et al. Antimicrobial effect of tea polyphenols against foodborne pathogens: A review[J]. *Journal of Food Protection*, 2021, 84(10): 1801-1808.
- [9] KITICHALERMKIAT A, KURAHACHI M, NONAKA A, et al. Effects of epigallocatechin gallate on viability and cellular proteins of *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Science and Technology Research*, 2019, 25(2): 277-285.
- [10] 王文娟, 孙京新, 罗欣, 等. 茶多酚对肉源腐败菌和致病菌的抑制效果[J]. *食品科技*, 2010, 35(2): 102-105. [WANG W J, SUN J X, LUO X, et al. Inhibitory effect of tea polyphenols on spoilage organisms and pathogens of meat origin[J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35(2): 102-105.]
- [11] PIEKARSKA-RADZIK L, KLEWICKA E. Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: A review[J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 247(1): 9-24.
- [12] TABASCO R, SANCHEZ-PATAN F, MONAGAS M, et al. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism[J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(7): 1345-1352.
- [13] ZHANG X, ZHU X L, SUN Y K, et al. Fermentation *in vitro* of EGCG, GCG and EGCG3'Me isolated from Oolong tea by human intestinal microbiota[J]. *Food Research International*, 2013, 54(2): 1589-1595.
- [14] 潘冬梅, 吴怡瑾, 王玉露, 等. 茶多酚辅助植物乳杆菌 FQR 降解亚硝酸盐效应的研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(5): 131-134. [PAN D M, WU Y J, WANG Y L, et al. Effect of tea polyphenols-assisted *Lactobacillus plantarum* FOR on nitrite degradation[J]. *China Brewing*, 2020, 39(5): 131-134.]
- [15] 倪倩, 佟玲, 高钧, 等. 高效液相色谱-质谱法及模式识别法用于鉴别普洱生茶与熟茶[J]. *理化检验(化学分册)*, 2012, 48(2): 171-174. [NI Q, TONG L, GAO J, et al. Identification of raw and ripe Pu-Er tea by HPLC-MS/MS with pattern recognition[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2012, 48(2): 171-174.]
- [16] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): 884-890.
- [17] MAGOČ T, SALZBERG S L. Flash: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [18] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [19] WANG Q, GARRITY G M, TIEDJE J M, et al. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [20] ZHAO D Y, SHAH N P. Effect of tea extract on lactic acid bacterial growth, their cell surface characteristics and isoflavone bio-conversion during soymilk fermentation[J]. *Food Research International*, 2014, 62: 877-885.
- [21] 张雪婷, 柯婷玉娟, 李宜春, 等. 提高益生菌存活率影响因素的研究[J]. *食品工业*, 2017, 38(12): 146-150. [ZHANG X T, KE T Y W, LI Y C, et al. Study on the factors of the survival rate of probiotics[J]. *The Food Industry*, 2017, 38(12): 146-150.]
- [22] MARGINA D, ILIE M, MANDA G, et al. Quercetin and epigallocatechin gallate effects on the cell membranes biophysical properties correlate with their antioxidant potential[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2012, 31(1): 47-55.
- [23] ALBERTO M R, FARÍAS M E, MANCA DE NADRA M C. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 4359-4363.
- [24] FILANNINO P, GOBBETTI M, DE ANGELIS M, et al. Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: An energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(24): 7574-7582.
- [25] LI Q C, LI Y, TANG Y Y, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* in chicken from retail markets in China[J]. *Food Control*, 2019, 96: 158-164.
- [26] 温燕龙, 李文云, 张楠, 等. 紫云英苷对大肠杆菌的抑制作用及其机制研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2022, 37(3): 471-477. [WEN Y L, LI W Y, ZHANG N, et al. The inhibitory effect of astragalin on *Escherichia coli* and its mechanism[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2022, 37(3): 471-477.]
- [27] BOUARAB-CHIBANE L, FORQUET V, LANTERI P, et al. Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) models[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 829-852.
- [28] SHI Y G, ZHANG R R, ZHU C M, et al. Antimicrobial mechanism of alkyl gallates against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and its combined effect with electrospun nanofibers on Chinese Taihu icefish preservation[J]. *Food Chemistry*, 2021, 346: 128949.
- [29] CUI Y, OH Y J, LIM J, et al. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-

gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria [J]. *Food Microbiology*, 2012, 29(1): 80–87.

[30] 袁先铃, 周莺茹, 郑连强, 等. 酸菜中乳酸菌生长曲线、产酸性能及抑菌性能探究[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(14): 199–203. [YUAN X L, ZHOU Y R, ZHENG L Q, et al. Investigation into the growth curve, acid-production ability, and bacterial inhibition of lactic acid bacteria in sauerkraut[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(14): 199–203.]

[31] BAUZA-KASZEWSKA J, ŻARY-SIKORSKA E, GUGOLEK A, et al. Synergistic antimicrobial effect of raspberry (*Rubus idaeus* L., Rosaceae) preparations and probiotic bacteria on enteric

pathogen[J]. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2021, 71: 51–59.

[32] BOUARAB CHIBANE L, DEGRAEVE P, FERHOUT H, et al. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(4): 1457–1474.

[33] 吴晓宗. 烟草青枯病发病对植烟根际土壤微生态的影响[D]. 郑州: 郑州大学, 2020. [WU X Z. The effect of tobacco bacterial wilt on the rhizosphere soil microecology of tobacco[D]. Zhengzhou: Zhouzheng University, 2022.]