

茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢细胞结构与能量代谢的影响

毕可, 刘月, 杨杰, 张变飞, 辛伟山, 章中*

(宁夏大学食品与葡萄酒学院 银川 750021)

摘要 使用不同温度结合 0.8 g/L 和 1.6 g/L 茶多酚处理枯草杆菌芽孢, 采用平板计数法测定处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果; 由核酸泄露量、电导率与扫描电子显微镜研究芽孢结构的变化; 通过测定三磷酸腺苷(ATP)酶、琥珀酸脱氢酶(SDH)及苹果酸脱氢酶(MDH)活力分析对枯草杆菌芽孢能量代谢的影响。结果表明: 茶多酚结合热对芽孢有明显的协同杀灭作用, 且随浓度和温度的增加, 其杀灭效果更好。1.6 g/L 茶多酚结合 100 °C 处理芽孢后, 菌落总数下降 2.45 lg(CFU/mL), 核酸泄露量及电导率显著增加($P < 0.05$), OD_{260nm} 从 0.05 升至 1.08, 电导率从 6.61 ms/cm 增至 71.46 ms/cm, 说明该处理可以破坏枯草杆菌芽孢的细胞膜。扫描电子显微镜观察发现, 经茶多酚结合热处理的枯草杆菌芽孢菌体形态发生皱缩、凹陷, 其 ATP、SDH 与 MDH 活力均显著降低($P < 0.05$), 具体表现为: ATP 酶活力下降 0.16 U/mg, SDH 酶活力下降 5.3 U/mg, MDH 酶活力下降 18.7 U/mg, 说明该方法能破坏枯草杆菌芽孢的能量代谢, 破坏枯草杆菌芽孢的细胞结构, 同时抑制呼吸代谢途径中相关酶的活性, 影响菌体正常生长, 最终导致其死亡。

关键词 茶多酚; 热处理; 芽孢; 细胞结构; 能量代谢

文章编号 1009-7848(2023)03-0138-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.015

细菌芽孢广泛分布于土壤、空气、水、草及一些腐败物中。芽孢对高温、高静压、干燥及辐射等极端条件都具有极强的抗逆性^[1-2], 在有利的条件下它们可能会转化为营养细胞, 引起食物的腐败, 甚至导致人类疾病^[3-4]。

茶多酚是从茶叶中提取的一种重要的天然化合物, 主要由儿茶素、类黄酮和花青素等成分组成, 其中, 儿茶素占 60%~80%^[5]。大量研究表明, 茶多酚中对人体健康有许多有益的功能^[6-7]。茶多酚和茶提取物被证明对人和动物疾病相关的细菌、植物致病菌和食源性致病菌都具有抗菌活性^[8]。汪金莲等^[9]研究发现, 茶多酚对真菌的菌丝生长和孢子萌发均有显著的抑制作用。除抗真菌活性外, 茶多酚对各种植物病原菌感染也有抑制作用^[10]。化学物质可用于食品本身的杀菌, 也可用于食品生产环境和生产用水的杀菌。热杀菌是最古老和常用的杀菌方法, 然而, 会损害食品品质。本文使用茶多酚结合热处理方法处理枯草杆菌芽孢, 以期达到更佳的杀灭效果的同时也能降低杀菌温度, 从而更好地保留食品的品质。

迄今为止, 鲜有关于茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果及抑菌机理方面的研究报道。本研究将茶多酚与热处理相结合, 以对枯草杆菌芽孢细胞膜的影响为出发点, 通过紫外泄露量、电导率结合扫描电子显微镜观察, 研究茶多酚与热处理相结合对枯草杆菌芽孢细胞结构的影响。通过检测琥珀酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶等以及三磷酸腺苷酶研究关键酶活性变化, 探究茶多酚与热处理相结合对枯草杆菌芽孢细胞结构与能量代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 编号 As1.433, 中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGM-CC)。

硫酸锰(分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; 茶多酚(分析纯), 美国 Sigma-Aldrich 公司; ATP 酶试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒以及 SDH、MDH 试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司。营养琼脂, 天津市大茂化学试剂厂; TSA-YE 培养基, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 设备与仪器

DSX-280B 型高压灭菌锅, 上海申安医疗器

收稿日期: 2022-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760474)

第一作者: 毕可, 女, 硕士生

通信作者: 章中 E-mail: zhangzhong99@126.com

械厂;LRH 系列生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;TGL-10B 型离心机,上海安亭科学仪器有限公司;电子恒温不锈钢水浴锅,上海宜昌仪器纱筛厂;DL-CJ-1F 试验医用型洁净工作台,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;DHG-9245A 电热鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司产品;722 型可见分光光度计,上海驰唐电子有限公司;EY-300A 分析天平,UV-2450 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司产品;EnSpire 酶标仪,美国 PerkinElmer 公司产品;ZEISS EVO18 钨丝灯扫描电子显微镜(T-SEM);德国卡尔蔡司;DDB-11A 电导率仪,杭州奇威仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 枯草杆菌芽孢的培养及菌悬液的制备 将活化至少 3 代以上的枯草芽孢杆菌在已灭菌的促芽孢生长锰盐营养琼脂(营养琼脂培养基 33 g,硫酸锰 0.1538 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7,加热煮沸 3 次,分装试管内,121 °C 灭菌 15 min)试管斜面划线接种,在恒温培养箱中 37 °C 培养 7 d 后,使用相差显微镜观察芽孢。当芽孢比例达到 95% 时,向每支试管斜面中加入 2 mL 无菌蒸馏水洗涤并收集芽孢。将芽孢离心(4 °C,9 000 r/min,15 min),洗涤 3 次,于 80 °C 加热 20 min。离心浓缩后,将芽孢浓度调节为 1.5×10^9 CFU/mL,4 °C 保存,1 个月内使用。使用时将菌悬液浓度稀释至 1×10^8 CFU/mL^[11]。

1.3.2 茶多酚结合热处理枯草杆菌芽孢悬浮液

取枯草杆菌芽孢悬浮液,离心,取上清液后,分别加入 0.8 g/L 和 1.6 g/L 茶多酚,热处理,即:处理组:80 °C、1.6 g/L、60 min;90 °C、0.8 g/L、30 min;90 °C、1.6 g/L、30 min;90 °C、0.8 g/L、60 min;90 °C、1.6 g/L、60 min;90 °C、0.8 g/L、90 min;90 °C、1.6 g/L、90 min;100 °C、1.6 g/L、60 min。对照组:80 °C、60 min,不加茶多酚;90 °C 30,60 min 和 90 min,不加茶多酚;100 °C、60 min,不加茶多酚;空白。

1.3.3 茶多酚处理对枯草杆菌芽孢细胞膜通透性的影响 将菌悬液 9 000 r/min 离心 15 min,取上清液,测定上清液在波长 260 nm 处的吸光度值,研究茶多酚对细胞膜通透性的影响^[12]。取处理前、后 20 mL 枯草杆菌芽孢菌悬液,于 4 °C,9 000 r/min 离心 10 min,取上清液,稀释 20 倍,测定其电导率^[13]。

1.3.4 扫描电镜观察枯草杆菌芽孢的形态 采用扫描电子显微镜观察茶多酚结合热处理后芽孢形态的变化。取处理前、后的菌悬液 8 mL 于灭菌的 EP 管中,9 000 r/min 离心 15 min,去上清液,收集菌体沉淀,加入等体积无菌水清洗 3 次,经冷冻干燥 5 h 得到粉末,用导电胶将样品粘贴在金属样品台上,真空镀膜,使用扫描电镜(scanning electron microscope,SEM) 观察^[14]。

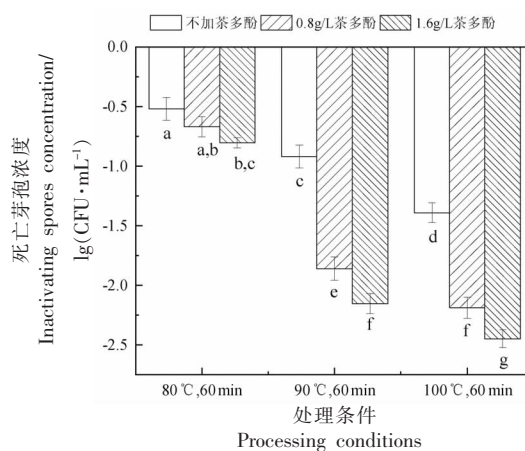
1.3.5 茶多酚结合热处理后枯草杆菌芽孢酶活力的测定 SDH 和 MDH 活力的测定参 Pei 等^[13]的方法并做一些修改。SDH 和 MDH 活性使用试剂盒测定。取 1 mL 处理前、后的芽孢悬浮液,于 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定酶活性。

1.3.6 统计分析 所有试验至少重复 3 次,通过 SPSS 17.0 分析数据,以 $P < 0.05$ 表示差异性显著。用 Origin 8.0 软件对试验结果进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢的杀灭效果

图 1 为不同质量浓度茶多酚(0.8,1.6 g/L)结合热(80,90,100 °C)处理后枯草杆菌芽孢的存活情况。结果表明:茶多酚结合热处理对杀灭枯草杆



注:标有不同字母的处理之间具有显著性差异($P < 0.05$),下同。

图 1 不同浓度茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢杀灭效果的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of tea polyphenol combined with heat treatment on the inactivating of *Bacillus subtilis* spores

菌芽孢有协同作用,且与茶多酚浓度成正比。80, 90, 100 °C处理孢子 60 min 可以杀灭芽孢的数量分别为 0.52lg (CFU/mL), 0.92lg (CFU/mL), 1.39 lg (CFU/mL); 使用 0.8 g/L 的茶多酚结合 80, 90, 100 °C处理 60 min 可以杀灭芽孢的数量分别为 0.67lg (CFU/mL), 1.86lg (CFU/mL), 2.18lg (CFU/mL); 使用 1.6 g/L 的茶多酚结合 80, 90, 100 °C处理 60 min 可以杀灭芽孢的数量分别为 0.8lg (CFU/mL), 2.15 lg (CFU/mL), 2.44 lg (CFU/mL)。由此可见, 茶多酚结合热处理对杀灭枯草杆菌芽孢有协同作用, 且茶多酚浓度越高, 对芽孢造成的杀灭作用越大。Sakanaka 等^[8]研究发现: 茶多酚对嗜热脂肪芽孢杆菌有杀灭效果, 且随茶多酚浓度的增加, 细菌存活率逐渐下降。刘剑侠^[15]研究发现: 茶多酚能有效抑制假单胞菌的增殖, 使菌体生长缓慢, 对数期缩短。此外, 本试验结果与任小青^[16]、赵海鹏^[17]研究结果一致。

2.2 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢紫外吸

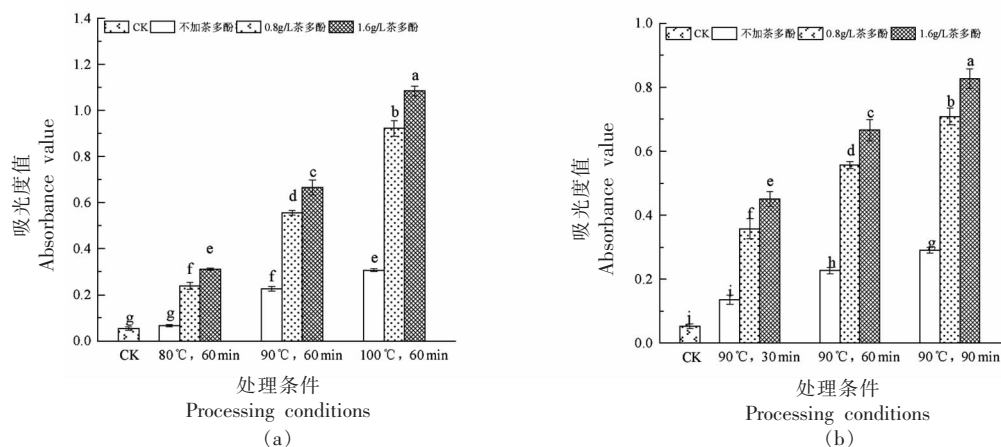


图2 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢细胞膜完整性的影响

Fig.2 Effect of tea polyphenol combined with heat treatment on the membrane integrity of *Bacillus subtilis* bacteriophage cells

2.3 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢电导率的影响

当枯草杆菌芽孢的细胞膜被破坏后, 电解质泄露使芽孢悬浮液电导率值增大。可以通过测定电导率的变化来分析细胞膜的通透性^[20]。由图3可知, 不同处理后, 枯草杆菌芽孢的电导率随温度、时间、浓度的增加而显著增加 ($P < 0.05$)。未处理样品的电导率为 6.61 ms/cm, 90 °C处理孢子 60 min 后电导率为 23.77 ms/cm, 0.8 g/L 和 1.6 g/L 的

收物质泄露量的影响

由图2a可知, 加入茶多酚处理枯草杆菌芽孢后, 核酸泄露量明显增加。90 °C处理孢子 60 min 后, OD_{260nm} 为 0.142。加入 0.8 g/L 和 1.6 g/L 茶多酚后, OD_{260nm} 为 0.65 和 0.72, 说明增大茶多酚浓度可以加剧对细胞膜的破坏, 导致核酸物质泄露量增多。当茶多酚浓度和时间一定时, 随着温度的上升, OD_{260nm} 显著增加, 说明热处理对枯草杆菌芽孢的内膜破坏强度与温度成正比。当热处理温度为 90 °C, 使用 1.6 g/L 茶多酚处理 30, 60, 90 min 时, OD_{260nm} 分别为 0.61, 0.72, 0.883, 说明增加热结合茶多酚的处理时间可以加剧细胞膜的损伤。Cox 等^[18]研究发现: 儿茶素能破坏细胞膜磷脂层结构, 引起细胞死亡。此外, 有研究发现: 茶多酚可以通过损伤细胞膜有效抑制粘质沙雷氏菌的生长, 且抑制效果与茶多酚的剂量在一定范围内呈正相关, 与本试验结果相同^[19]。

茶多酚经 90 °C 热处理 60 min, 电导率分别为 58.66 ms/cm 和 61.03 ms/cm。随着茶多酚浓度的增大, 样品电导率增加, 表明细胞膜被破坏, 导致胞内大量物质如钠、钾离子泄露。这一结果与刘剑侠^[15]研究结果一致。1.6 g/L 的茶多酚经 90 °C 热处理 30, 60, 90 min 后电导率分别为 57.6, 61.03, 75.03 ms/cm。随着茶多酚结合热处理时间的增长, 电导率显著增大, 加剧了对细胞膜的破坏。据报道, 延长茶多酚的作用时间可致菌液的电导率显著上升^[21]。

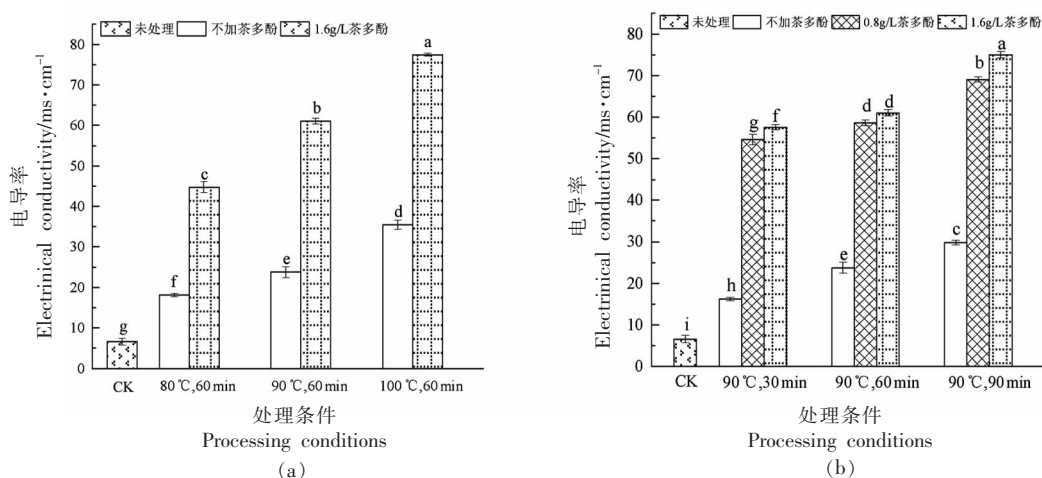


图 3 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢细胞膜通透性的影响

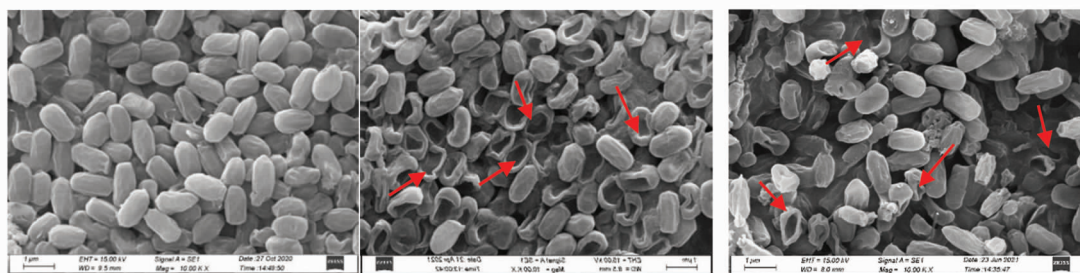
Fig.3 Effect of tea polyphenol combined with heat treatment on membrane permeability of *Bacillus subtilis* cells

2.4 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢形态的影响

图 4 为枯草杆菌芽孢的扫描电镜图。由图 4a 观察到:未经处理的枯草杆菌芽孢形态规则,表面饱满圆滑,大小分布均匀。经 90 °C 热处理 60 min 后的枯草杆菌芽孢(图 4b),边缘有较薄的深凹痕,表明孢子是沿着纵向轴分裂的,使得内部区域可见。深凹痕的存在表明孢子失去内容物和体积。

这一图像与 Molva 等^[22]获得的图像一致。

经 1.6 g/L 的茶多酚 90 °C 热处理 60 min 的枯草杆菌芽孢(图 4c)具有不规则、枯萎和粗糙的表面。这一结果与 Yi 等^[23]相似。据报道,腐败希瓦氏菌经茶多酚处理后,细胞的完整性遭到破坏,细胞内物质泄露^[10]。Si 等^[24]在电镜下观察到表没食子儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯可致鼠伤寒杆菌细胞膜受损。



(a) 未处理对照芽孢

(b) 90 °C 处理 60 min 的芽孢

(c) 1.6g/L 茶多酚 90 °C 处理 60 min 的芽孢

图 4 茶多酚结合热处理前、后枯草杆菌芽孢扫描电子显微镜

Fig.4 Scanning electron micrographs of *Bacillus subtilis* spores before and after tea polyphenol combined with heat treatment

2.5 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢 ATP 酶的影响

ATP 通过糖酵解过程在细菌的细胞壁和细胞膜中产生。细胞膜有多种酶,可以促进三磷酸腺苷的产生和代谢。ATP 酶是这种机制中最重要的酶^[25]。

图 5a 为 1.6 g/L 茶多酚结合不同温度热处理

孢子 60 min 后 ATP 酶的变化。可以看出,随着温度的升高,ATP 酶活力降低。Zheng 等^[26]报道,高温处理后,白假丝酵母菌细胞 ATP 含量显著降低。Sui 等^[27]也得到类似的结论,他们发现酵母菌的 ATP 酶在 45 °C 热处理后呈下降趋势。

从图 5b 可观察到:随着热结合茶多酚处理时间的增长,ATP 酶活力下降十分显著,90 °C 时使用

1.6 g/L 茶多酚处理 30, 60, 90 min 后酶活力分别为 0.0149, 0.0138, 0.006 U/mg。90 °C 时使用 0.8, 1.6 g/L 茶多酚处理 90 min 后酶活力分别为 0.0158, 0.0138 U/mg。说明枯草杆菌芽孢对茶多酚敏感, 茶多酚对呼吸产生浓度依赖性抑制作用。枯草杆菌芽孢的呼吸链可能是茶多酚的作用目标之一, 茶多酚对呼吸链的干扰可能导致枯草杆菌芽孢 ATP

耗竭, 并进一步引发由电子泄漏引起的氧化应激, 使细胞成分受损。仪淑敏等^[28]研究发现: 经茶多酚处理的假单胞菌 ATP 酶由未处理的 83.07 U/g 降至 46.36 U/g。此外, 有研究表明: 多酚类物质可能通过降低膜的稳定性, 增加膜的通透性, 抑制胞外酶的活性, 直接作用于微生物的新陈代谢, 剥夺微生物生长所必需的物质等途径抑制细菌^[29]。

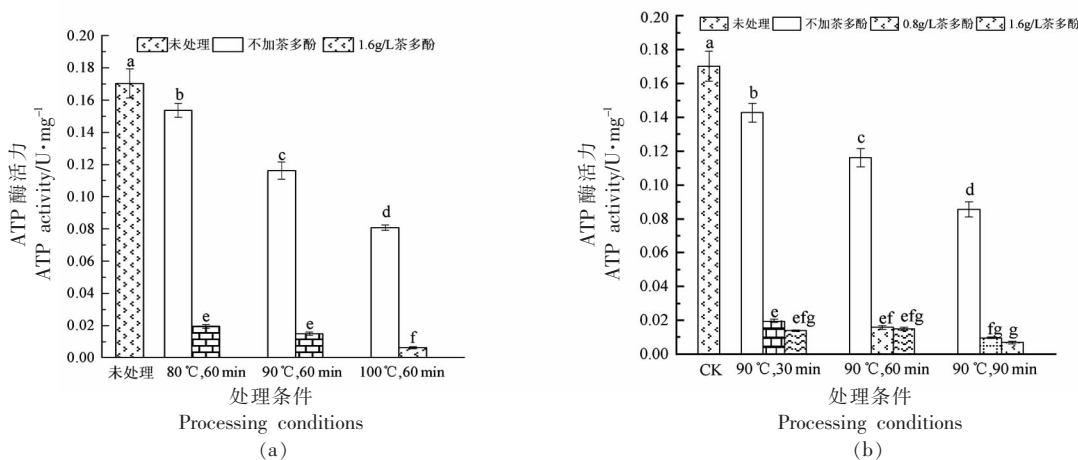


图5 茶多酚结合热对枯草杆菌芽孢 ATP 酶活力的影响

Fig.5 Effect of tea polyphenol combined with heat treatment on *Bacillus subtilis* ATPase activity

2.6 茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢 MDH 和 SDH 活力的影响

本文通过 SDH 和 MDH 活力的变化来衡量茶多酚结合热处理对芽孢能量代谢的抑制效果。MDH 是 TCA 循环中的关键酶之一, 其可以催化 L-苹果酸生成草酰乙酸, 同时产生 NADH^[30]。MDH 在产生 ATP 的途径中发挥重要功能^[31]。如图 6 所示, 茶多酚结合热处理后, 显著降低了 MDH 的活性。样品未处理前 MDH 活力为 24.66 U/mg, 与单独热处理相比, 加入 1.6 g/L 茶多酚后 MDH 活力显著下降。90 °C 热处理 60 min 时 MDH 活力为 16.12 U/mg, 加入 1.6 g/L 茶多酚后 MDH 活力为 7.85 U/mg。MDH 可以催化 L-苹果酸生成草酰乙酸, 同时产生 NADH^[32]。这些酶为细胞提供辅助因子和能量, 活性的降低可能会阻碍碳水化合物的代谢, 进而阻碍细胞生长, 导致细胞死亡^[13]。钱丽

红等^[21]研究发现: 茶多酚通过降低细菌对磷的消耗, 阻碍磷酸、磷脂的合成以及影响糖的代谢, 进而使细胞能量代谢受阻。Joshi 等^[33]研究发现: 茶多酚可以破坏细胞代谢, 与本研究结果一致。

SDH 可以催化琥珀酸生成反丁烯二酸, 同时将 FAD 转化为 FADH₂, FADH₂ 是呼吸链中的电子供体^[13]。茶多酚结合热处理后, 枯草杆菌芽孢的 SDH 活性降低, 导致功能状态障碍, 枯草杆菌芽孢无法维持膜电位, 如前所述发生核酸泄露和相对电导率的增加。这一研究结果与 Pecsí 等^[34]一致。Pei 等^[35]研究发现经黄连素处理过的桃褐腐病菌的 SDH、MDH 活力显著下降。此前的报道表明, 热应激会诱导细胞线粒体和氧化损伤^[27, 36]。Evensen 等^[37]研究发现: 绿茶多酚可以影响白色念珠菌的代谢活力。儿茶素可能影响白色念珠菌除蛋白酶外的代谢途径。

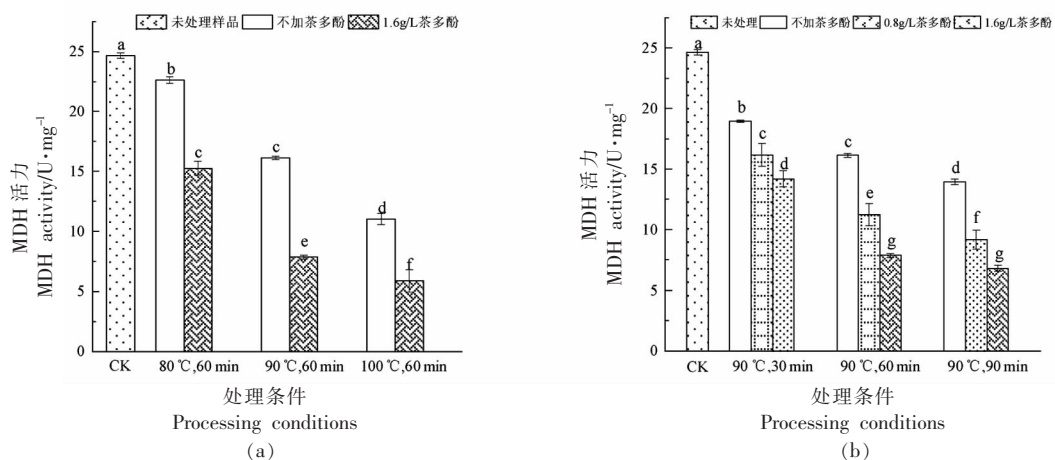


图 6 茶多酚结合热对枯草杆菌芽孢 MDH 活力的影响

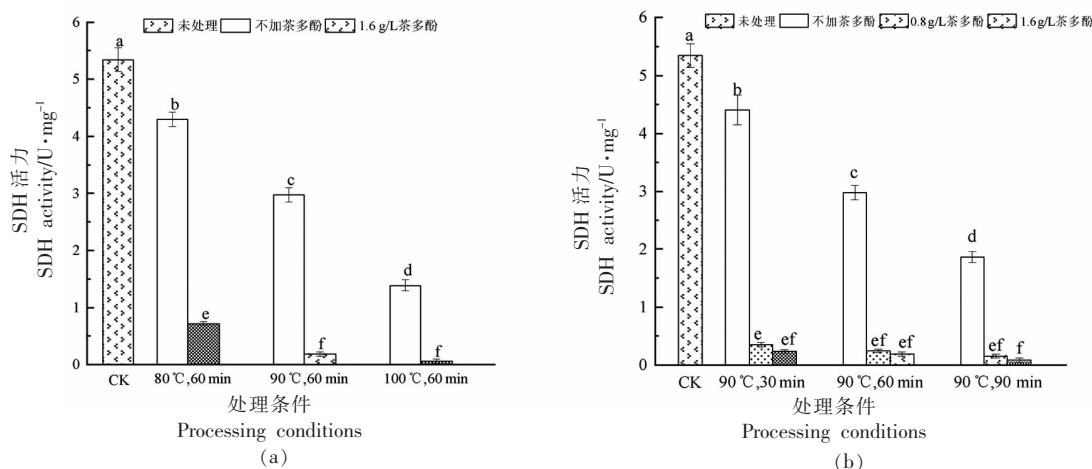
Fig.6 Effect of tea polyphenol combined with heat treatment on the viability of *Bacillus subtilis* MDH

图 7 茶多酚结合热对枯草杆菌芽孢 SDH 活力的影响

Fig.7 Effect of tea polyphenol combined with heat treatment on the viability of *Bacillus subtilis* SDH

3 结论

茶多酚结合热处理可以协同杀灭枯草杆菌芽孢,破坏枯草杆菌芽孢的细胞膜,致芽孢内部物质如核酸泄露出来,并通过抑制 SDH 和 MDH 的活力及 ATP 的产生来破坏芽孢的能量代谢。这些结果表明,茶多酚结合热处理对枯草杆菌芽孢作用模式的特点是破坏孢子的细胞膜,抑制孢子呼吸和同时干扰芽孢的能量稳态,导致孢子的代谢紊乱,最终引起孢子死亡。未来研究中,可使用 Laurdan 荧光探针研究茶多酚结合热处理后芽孢内膜磷脂相态的变化。

参 考 文 献

- [1] COLEMAN W H, ZHANG P, Li Y Q, et al. Mechanism of killing of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* by wet heat[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(5): 507-514.
- [2] RAO L, XU Z Z, WANG Y T, et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by high pressure CO₂ with high temperature[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 205:73-80.
- [3] KATJA N, ANTONINA O K, ANNE D J, et al. Identification of differentially expressed genes during *Bacillus subtilis* spore outgrowth in high-salinity en-

- vironments using RNA sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1564.
- [4] TRUNET C, NGO H, COROLLER L. Quantifying permeabilization and activity recovery of *Bacillus* spores in adverse conditions for growth[J]. *Food Microbiology*, 2018, 81: 115–120.
- [5] HASAN M, NIHAL A. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71(6): 1698S–1702S.
- [6] KONARIKOVA K, JEZOVICOVA M, KERESTES J, et al. Anticancer effect of black tea extract in human cancer cell lines[J]. *Springerplus*, 2015, 4: 127.
- [7] JIANG X D, FENG K J, YANG X P. *In vitro* antifungal activity and mechanism of action of tea polyphenols and tea saponin against *Rhizopus stolonifer*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(4): 269–276.
- [8] SAKANAKA S, JUNEJA L R, TANIGUCHI M. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria[J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2000, 90(1): 81–85.
- [9] 汪金莲, 邱业先, 陈宏伟, 等. 茶多酚对几种植物病原真菌的抑制作用及机理研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2008, 20(4): 5.
WANG J L, QIU Y X, CHEN H W, et al. Inhibitive action of tea-polyphenol on some plant pathogenic *Fungi*[J]. *Natural Products Research and Development*. 2008, 20(4): 5.
- [10] YANG Y, ZHANG T. Antimicrobial activities of tea polyphenol on phytopathogens: A review[J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 816.
- [11] MENG J, GONG Y, QIAN P, et al. Combined effects of ultra-high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation of *Bacillus subtilis*[J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2016, 68: 59–66.
- [12] YANG S Z, LIU L M, LI D M, et al. Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 610–618.
- [13] PEI Q, LI Y, GE X Z, et al. Multipath effects of berberine on peach brown rot fungus *Monilinia fructicola*[J]. *Crop Protection*, 2019, 116: 92–100.
- [14] TAN Z L, SHI Y F, XING B, et al. The antimicrobial effects and mechanism of epsilon-polylysine against *Staphylococcus aureus*[J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2019, 6(1): 1–10.
- [15] 刘剑侠. 茶多酚处理对冷藏大菱鲆的品质变化影响及其抑菌机理研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2014.
LIU J X. Study on the effect of tea polyphenol treatment on the quality change of frozen turbot and its bacterial inhibition mechanism[D]. Jingzhou: Bohai University, 2014.
- [16] 任小青. 鲶鱼骨酶解物的制备, 抑菌性能, 抑菌机理及其在食品中的应用研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
REN X Q. Preparation of catfish bone enzymatic digest, bacteriostatic properties, bacteriostatic mechanism and its application in food[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012.
- [17] 赵海鹏. 生物保鲜剂在南美白对虾保鲜中的应用及菌相研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
ZHAO H P. Application of biological preservatives in the preservation of South American white shrimp and study of the bacteriological phase[D]. 上海: Shanghai Ocean University, 2010.
- [18] COX S D, MANN C M, MARKHAM J L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(3): 492–497.
- [19] YI S M, WANG W, BAI F L, et al. Antimicrobial effect and membrane-active mechanism of tea polyphenols against *Serratia marcescens*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(2): 451–460.
- [20] PENG L T, YANG S Z, CHENG Y J, et al. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*[J]. *Food science and biotechnology*, 2012, 21(6): 1533–1539.
- [21] 钱丽红, 陶妍, 谢晶. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(11): 1628–1633.
QIAN L H, TAO Y, XIE J. Antibacterial mechanism of tea polyphenols against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbiology Bulletin*, 2010, 37(11): 1628–1633.
- [22] MOLVA, C, BAYSAL A H. Effect of sporulation medium on wet-heat resistance and structure of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922-type strain spores and modeling of the inactivation kinetics in apple juice[J]. *International Journal of Food Microbi-*

- ology, 2014, 189: 82–88.
- [23] YI S M, ZHU J L, FU L L, et al. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1): 111–117.
- [24] SI W D, GONG J, TSAO R, et al. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1125(2): 204–210.
- [25] NAZZARO F, FRATIANNI F, LAURA D M, et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria[J]. Pharmaceuticals, 2013, 6(12): 1451–1474.
- [26] ZHENG F L, ZHANG W W, SUI Y, et al. Sugar protectants improve the thermotolerance and biocontrol efficacy of the biocontrol Yeast, *Candida oleophila*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10:187.
- [27] SUI Y, LIU J. Effect of glucose on thermotolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Pichia guilliermondii*[J]. Biological Control, 2014, 74: 59–64.
- [28] 仪淑敏, 王嵬, 励建荣, 等. 茶多酚对假单胞菌抑菌机理研究[J]. 渤海大学学报(自然科学版) 2011, 32(4): 376–382.
- YI S M, WANG W, LI J R, et al. Study on the mechanism of inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by tea polyphenols[J]. Journal of Bohai University (Natural Science Edition) 2011, 32(4): 376–382.
- [29] DAGLIA M. Polyphenols as antimicrobial agents [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2012, 23 (2): 174–181.
- [30] SIEROTZKI H, SCALLIET G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides[J]. Phytopathology, 2013, 103(9): 880–887.
- [31] YAO Y X, LI M, ZHAI H, et al. Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(5): 474–480.
- [32] JOURNET E P, NEUBURGER M, DOUCE R. Role of glutamate-oxaloacetate transaminase and malate dehydrogenase in the regeneration of NAD for glycine oxidation by spinach leaf mitochondria[J]. Plant Physiology, 1981, 67(3): 467–469.
- [33] JOSHI S S, HOWELL A B, D'SOUZA D H. *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins[J]. Food Microbiology, 2014, 39: 127–131.
- [34] PECSI I, HARDS K, EKANAYAKA N, et al. Essentiality of succinate dehydrogenase in mycobacterium smegmatis and its role in the generation of the membrane potential under hypoxia[J]. Mbio, 2015, 5(4): e01093–01014.
- [35] PEI Q, LI Y, GE X Z, et al. Multipath effects of berberine on peach brown rot fungus *Monilinia fructicola*[J]. Crop Protection, 2019, 116: 92–100.
- [36] LIU J, WISNIEWSKI M, DROBY S, et al. Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 905: 227–232.
- [37] EVENSEN N A, BRAUN P C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(9): 1033–1039.

Effect of Tea Polyphenols Combined with Heat Treatment on the Cellular Structure and Energy Metabolism of *Bacillus subtilis*

Bi Ke, Liu Yue, Yang Jie, Zhang Bianfei, Xin Weishan, Zhang Zhong*
(School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract In this paper, *Bacillus subtilis* spores were treated with 0.8 g/L and 1.6 g/L tea polyphenols at different temperatures, and the inactivating effect of tea polyphenols combined with heat treatments on *Bacillus subtilis* spores was determined by plate counting method. The effect of tea polyphenol combined with heat on the energy metabolism of *Bacillus subtilis* was analyzed by measuring the activity of adenosine triphosphate (ATP) enzymes and tricarboxylic acid metabolizing enzymes (succinate dehydrogenase (SDH) and malate dehydrogenase (MDH)). The results showed that tea polyphenols combined with heat had a significant synergistic effect on *Bacillus subtilis* spores, and the inactivating effect

was more pronounced as the concentration and temperature increased. After 1.6 g/L tea polyphenol combined with 100 °C treatment of spores, the total number of colonies decreased by 2.45 lg(CFU/mL), nucleic acid leakage and conductivity increased significantly ($P < 0.05$), OD_{260nm} increased from 0.05 to 1.08, and conductivity increased from 6.61 ms/cm to 71.46 ms/cm, indicating that the treatment could disrupt the cell membrane of *Bacillus subtilis* spores. Scanning electron microscopy revealed that the morphology of *Bacillus subtilis* spores subjected to the tea polyphenol combined with heat treatment was wrinkled and depressed, and their ATP, SDH and MDH activities were significantly reduced ($P < 0.05$), as shown by a decrease of 0.16 U/mg in ATPase activity, 5.3 U/mg in SDH enzyme activity and 18.7 U/mg in MDH enzyme activity, indicating that the tea polyphenol combined with heat treatment could well disrupt the energy metabolism of *Bacillus subtilis* spores. In conclusion, tea polyphenol combined with heat treatment can disrupt the cell structure of *Bacillus subtilis* spores, and at the same time inhibit the activity of related enzymes in the respiratory metabolic pathway, which affects the normal growth of the bacterium and eventually leads to its death.

Keywords tea polyphenols; heat treatment; spores; cell structure; energy metabolism