

茶叶儿茶素的益生元活性研究

杨阳, 张鑫, 翁佩芳, 吴祖芳

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 近年来, 茶叶儿茶素调节肠道微生态的效果受到广泛关注。本研究通过大孔树脂柱层析分离纯化, 制备得到纯度大于 98% 的茶叶儿茶素 EGCG、EGCG3''Me、ECG、ECG3''Me。通过测定不同发酵时间点 (0、6、12、24 h) 体外培养中肠道菌群的变化以及短链脂肪酸的含量, 评价茶叶儿茶素调节肠道微生态的作用。茶叶儿茶素在体外厌氧发酵 24 h 时, 对于肠道有益细菌 (双歧杆菌和乳酸菌) 的增殖均起到了显著的促进作用 ($P < 0.05$), 对于梭状菌和拟杆菌的增殖发挥了显著的抑制作用 ($P < 0.05$), 对肠道总菌群数量影响不显著 ($P > 0.05$)。此外对于发酵过程中各种短链脂肪酸含量的变化进行了测定, 发现添加儿茶素样品的培养基中, 短链脂肪酸含量在各个发酵时间点都比对照组有显著提高 ($P < 0.05$)。实验同时对于茶叶儿茶素发酵过程中的代谢产物进行了结构鉴定。研究表明, 包括甲基化儿茶素在内的儿茶素及其代谢产物, 对于改善人体肠道环境、维护人体肠道平衡具有重要作用。

关键词: 乌龙茶; 茶叶儿茶素; 短链脂肪酸; 肠道微生态

文章编号: 1673-9078(2015)4-128-136

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.021

In vitro Monitoring of the Probiotic Activity of Tea Catechins on Human Intestinal Flora

YANG Yang, ZHANG Xin, WENG Pei-fang, WU Zu-fang

(Department of Food Science, School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Recently, tea catechins have been reported to have certain regulatory effect on intestinal microecology. In this study, high purity (>98%) of EGCG, EGCG3''Me, ECG and ECG3''Me were prepared from Guangdong Oolong tea by purification procedures of macroporous resins. Then, the regulation effects of EGCG, EGCG3''Me, ECG and ECG3''Me on intestinal microecology *in vitro* were evaluated by monitoring the bacterial populations and analyzing the concentrations of short-chain fatty acids (SCFA) at different fermentation times (0, 6, 12 and 24 h). The results showed that tea catechins had significant proliferate effect ($P < 0.05$) on beneficial bacteria (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus/Enterococcus* spp.), significant inhibitory effect ($P < 0.05$) on *Bacteroids-Prevotella* group and *Clostridium histolyticum* group, while they did not affect the population of total bacteria ($P > 0.05$). The total SCFA concentrations in cultures with tea catechins were significant higher ($P < 0.05$) than that of the control in each fermentation time point. Moreover, the metabolites of tea catechins during the fermentation were also identified. Together, these results suggest that tea catechins, including methylated tea catechins have potential prebiotic-like activity by modulating intestinal microbiota and generating SCFA, contributing to the improvements of host health.

Key words: Oolong tea; tea catechins; short-chain fatty acid; intestinal microecology

茶多酚是茶叶中多酚类物质及其衍生物的总称, 其中茶叶儿茶素是茶多酚中的重要活性成分^[1-2]。茶叶儿茶素主要包括表儿茶素 (EC)、表没食子儿茶素 (EGC)、表儿茶素没食子酸酯 (ECG) 和表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG), 其中 EGCG 是茶叶中含量最高、生物活性最强的一种儿茶素, 具有多种显

著的生理活性^[3]。而 EGCG 的甲基化形式, (-)-epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3''Me, Fig.1), 据报道只存在于少数几种乌龙茶和绿茶中^[4]。研究发现, 甲基化儿茶素对治疗花粉过敏等过敏反应症具有显著效果, 而且其生物学功能已经在临床实验中得以证实^[5]。

肠道微生物在机体的食物消化、吸收、免疫调节和阻止病原微生物感染等方面发挥着重要的作用, 对宿主的健康具有深远的影响。动物肠道微生物分为有益菌和有害菌两大类, 有益菌占总数的 90% 以上, 主体是双歧杆菌、乳酸杆菌等^[6]。微生物与动物之间组成了一种相互依赖、相互制约的关系, 这种生态关系

收稿日期: 2014-08-18

基金项目: 宁波市自然科学基金项目 (2014A610189); 宁波大学人才工程项目 (zx2013000782); 宁波大学校学科项目 (xk1141055); 宁波大学校级科研项目 (XYL14026)

作者简介: 杨阳 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向食品生物技术

通讯作者: 张鑫 (1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向食品生物技术

就是微生态。近年来,医药领域逐渐开始关注通过调节动物肠道微生物区系来改善动物机体的健康状态,进而增强机体潜在的疾病抵抗能力。

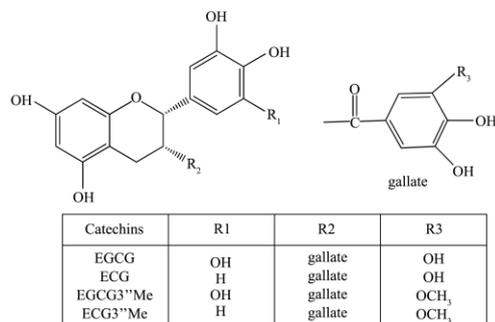


图1 EGCG、EGCG3''Me、ECG和EGCG3''Me的化学结构式

Fig.1 Chemical structures of EGCG, EGCG3''Me, ECG and EGCG3''Me

目前有研究表明,植物来源的绿豆抗性淀粉具有较好的益生作用^[7],富含多酚的蓝莓水提取物在体内也可以发挥类似益生元的作用^[8]。然而茶叶中的儿茶素类物质,关于其摄入后在人体肠道中对于调节肠道微生态的作用,目前还鲜有报道。由于茶叶儿茶素的生物利用率低,直接被小肠吸收的茶叶儿茶素只占人体摄入的茶叶儿茶素的较少部分,可以推测人体摄入的茶叶儿茶素绝大部分进入了大肠,并被肠道微生物分解、代谢,发挥生理作用。作为茶叶儿茶素在体内的重要转化产物,甲基化儿茶素与人体肠道菌群之间的关系,需要进行深入的研究。本研究拟在实验室之前的工作基础上,利用体外厌氧粪样混合培养方式对于分离纯化得到的茶叶儿茶素单体进行发酵培养,通过荧光原位杂交技术(FISH)分析厌氧发酵过程中双歧杆菌、乳酸菌、拟杆菌、梭状菌以及总菌群的数量变化,研究其对于调节肠道微生态的作用;另一方面利用HPLC(高效液相色谱)技术对发酵过程中各种短链脂肪酸

(SCFA)种类和含量的变化进行测定,并对于茶叶儿茶素发酵过程中的代谢产物进行了结构鉴定,研究茶叶儿茶素对于人体肠道微生态的调节作用,为茶叶儿茶素的综合利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

富含甲基化儿茶素的茶叶购于广东潮州; Toyoparl HW-40S 葡聚糖凝胶树脂购于日本 TOSOH 公司; 聚酰胺层析树脂购于江苏临江化学试剂公司; 低聚果糖(FOS)购于美国 Sigma 公司; EGCG、ECG、gallic acid(没食子酸)标准样购于日本 Funakoshi 公司; EGCG3''Me 及(-)-3-O-甲基-表儿茶素没食子酸酯(ECG3''Me)根据 Hu 等^[9]报道的方法制备。厌氧混合气体(10% H₂、10% CO₂和 80% N₂)和高纯 N₂购于宁波甬兴化工气体有限公司; 4,6-联咪-2-苯基吡啶二盐酸(DAPI)荧光染料购于德国 Roche 公司; 表 1 所示的 FISH 专用 16S rRNA 寡核苷酸单链探针由上海生工生物工程技术有限公司合成,序列 5'端所接荧光基团为吡啶二羧菁(Cy3),使用的探针是文献报道中已经成功使用、成熟的探针序列^[10]。

Agilent 1100 高效液相色谱仪包括 G1328B 手动进样器、G1311A 四元泵、G1379A 真空脱气机、G1316A 柱温箱和 G1315B 二极管阵列检测器(DAD)(美国安捷伦公司); Laborota 4000 真空旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司); 冷冻干燥机(宁波新芝公司); AY-120 电子精密天平、BL-220H 分析天平(日本 Shimadzu 公司); YQX-I 厌氧培养箱(上海跃进医疗器械厂); Zeiss Axio Imager A1 型荧光正置显微镜系统(德国 Carl Zeiss 公司); 电喷雾飞行时间质谱仪(美国 Applied Biosystems)。

表 1 16S rRNA 探针的靶细菌种/属和探针序列

Table 1 The sequences, target genera or species of 16S rRNA-based probes

探针名称	靶细菌种/属	探针序列(5'→3')
Bif164	<i>Bifidobacterium</i> spp. 双歧杆菌属	CATCCGGCATTACCACCC
Bac303	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group 拟杆菌-普雷沃勒氏菌属	CCAATGTGGGGGACCTT
His150	<i>Clostridium histolyticum</i> group (clusters I and II) 溶组织梭状菌属	TTATGCGGTATTAATAT(C/T) CCTT
Lab158	<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> spp. 乳酸菌/肠球菌属	GGTATTAGCA YCTTCCA

1.2 实验方法

1.2.1 茶叶儿茶素样品的分离纯化

茶叶通过研钵磨碎后过40目筛,称取适量粉碎茶样,按照实验室前期研究确定的最佳提取条件,以料液比1:20加入热水,在90℃恒温振荡器中振荡提取40 min,离心得上清液,茶渣用同样方法再次浸提,合并两次上

清液并浓缩、冻干,得到茶多酚粗提物。

将茶多酚粗提物制成一定质量分数的料液,经0.45 μm滤膜过滤后上聚酰胺层析柱(1.6 × 30 cm)。首先用水洗去水溶性杂质,洗脱2个柱床体积(BV)后换用95%的乙醇洗脱,收集2 BV洗脱液,浓缩并冷冻干燥,得到纯度为90%的茶多酚样品。将纯化后得到的茶多酚样品上Toyoparl HW-40S柱(5.0 × 50 cm),用80%的乙醇洗脱,

采用自动部分收集器收集洗脱液(10 mL/管),并利用HPLC分析洗脱液中儿茶素的组成,合并合适的组分,进行浓缩和冷冻干燥,得到各茶叶儿茶素单体成分。

1.2.2 茶叶儿茶素含量的测定

采用HPLC外标法测定分离纯化得到的茶叶儿茶素样品的纯度^[9]。色谱条件:TSKgel ODS-100Z色谱柱(4.6×150 mm, 5 μm),柱温40℃,检测波长280 nm;梯度洗脱(流动相A: CH₃COOH, pH 2.5; 流动相B: CH₃OH),洗脱时间15 min,流动相A的比例由80%降至40%,流动相B的比例由20%升至60%,流速1.0 mL/min;进样量20 μL。

茶叶儿茶素标准曲线的制备:精确称取各茶叶儿茶素的标准品,溶解于水中,配制成一系列不同浓度梯度的标准溶液,经0.45 μm针头式滤膜过滤后,按浓度从低到高的顺序进行HPLC检测,记录各个浓度对应的峰面积并以峰面积对浓度作图,得到各种茶叶儿茶素的标准曲线。

1.2.3 体外厌氧粪样混合培养

体外厌氧粪样混合培养按照文献报道的方法进行^[11]。首先称取受试的茶叶儿茶素及FOS溶解于高压灭菌后的含氮基础培养基中,得到终质量浓度为1 mg/mL的底物溶液。然后取粪便样液150 μL悬浮于1.35 mL含有各种茶叶儿茶素样品的底物培养基溶液中,混合均匀后放入厌氧培养箱(10% H₂、10% CO₂、80% N₂)中,37℃发酵培养。在培养时间为0、6、12、24 h时分别取250 μL样液,其中150 μL用于SCFA的分析,100 μL用于细胞FISH计数。

1.2.4 菌体计数

参考文献报道的方法,菌体计数采用FISH法^[11]。根据试样浓度以及稀释倍数等计算出细菌总数,并取其以10为底的对数。

1.2.5 短链脂肪酸含量的测定

采用HPLC外标法测定SCFA的含量。色谱条件:Beckman Ultrasphere色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm),柱温30℃,检测波长210 nm;流动相A为超纯水,流动相B为甲醇,洗脱梯度:0~10 min, A: 从90%到70%, B: 从10%到30%; 10~15 min, A: 70%, B: 30%; 流速0.8 mL/min;进样量20 μL。

SCFA标准曲线的制备:精确称取各SCFA的标准品,溶解于水中,配制成一系列不同浓度梯度的标准溶液,经0.45 μm针头式滤膜过滤后,按浓度从低到高的顺序进行HPLC检测,记录各个浓度对应的峰面积并以峰面积对浓度作图,得到各种SCFA的标准曲线。

1.3 数据分析

实验数据采用SPSS软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 茶叶儿茶素样品的制备

据报道^[9~10], Toyopearl HW-40S葡聚糖凝胶树脂对于分离茶叶儿茶素单体具有良好效果。本实验将茶多酚分别经过聚酰胺树脂以及Toyopearl HW-40S葡聚糖凝胶树脂分离纯化,通过HPLC检测,分别制备得到了纯度大于98%的EGCG、EGCG3''Me、ECG和ECG3''Me,说明茶叶儿茶素样品的制备方法简便、有效。

2.2 茶叶儿茶素样品对肠道菌群增殖的作用

2.2.1 茶叶儿茶素样品对肠道中双歧杆菌和乳酸菌的增殖作用

表2为以不同儿茶素样品为底物时,在不同发酵时间有益菌群(双歧杆菌和乳酸菌)的增殖情况。与对照组相比,在不同发酵时间点,EGCG、EGCG3''Me、ECG和ECG3''Me样品都可以更好的促进双歧杆菌和乳酸菌的增长,并且差异性显著($P < 0.05$),说明儿茶素样品对于双歧杆菌和乳酸菌的增殖,具有显著促进作用。

在每个发酵时间点,阳性对照FOS与对照组相比,都具有显著促进双歧杆菌增殖的效果。在所有加入儿茶素样品的培养基中,双歧杆菌数量在0、6、12和24 h显著增加,与空白对照相比也增加显著($P < 0.05$)。当培养12和24 h时,EGCG3''Me都显示了最佳的促进双歧杆菌增殖的效果,但是培养6 h时,儿茶素样品之间差异不显著($P > 0.05$)。可以发现,在培养12和24 h时,EGCG3''Me发挥了相对于EGCG更好的促进双歧杆菌生长的效果($P < 0.05$),ECG3''Me与ECG之间同样差异显著($P < 0.05$)。

如表2所示,随着发酵时间的延长,乳酸菌的数量逐渐增多。在空白对照组中,乳酸菌数量在12和24 h之间差异不显著($P > 0.05$),而在所有加入儿茶素样品的培养基中,乳酸菌数量在0、6、12和24 h均显著增加,而且与空白对照相比差异显著($P < 0.05$)。培养6和12 h时,对于促进乳酸菌的增殖,EGCG与EGCG3''Me,以及ECG与ECG3''Me之间差异不显著($P > 0.05$);培养24 h时,EGCG3''Me发挥了最好的促进乳酸菌增殖的效果,而且与阳性对照FOS相比差异不显著($P > 0.05$)。

2.2.2 茶叶儿茶素对肠道中拟杆菌和梭状菌的

增殖作用

以不同儿茶素样品为底物, 测定不同发酵时间拟杆菌和梭状菌的增殖情况, 结果如表 3 所示。结果表明在空白对照组, 随着发酵时间的延长, 拟杆菌和梭

状菌的数量逐渐增多。在不同的发酵时间点, 与对照组相比, 儿茶素样品以及 FOS 均对于拟杆菌和梭状菌的增殖发挥了显著的抑制作用。

表 2 EGCG、ECG、EGCG3''Me 和 EGCG3''Me 体外厌氧发酵 0、6、12、24 h 后双歧杆菌和乳酸菌数量

Table 2 The number of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus/Enterococcus* spp. in anaerobic fermentation broth with EGCG, EGCG3''Me, ECG and ECG3''Me at 0, 6, 12 and 24 h.lg (CFU/mL)

探针类型	样品	厌氧发酵时间/h			
		0	6	12	24
Bif 164	Control	8.03 ± 0.02 ^A	8.09 ± 0.02 ^{a,B}	8.16 ± 0.02 ^{a,C}	8.18 ± 0.03 ^{a,C}
	FOS		8.51 ± 0.03 ^{c,B}	8.68 ± 0.03 ^{e,C}	8.75 ± 0.02 ^{e,D}
	EGCG		8.18 ± 0.01 ^{b,B}	8.30 ± 0.03 ^{bc,C}	8.39 ± 0.02 ^{c,D}
	EGCG3''Me		8.20 ± 0.02 ^{b,B}	8.39 ± 0.01 ^{d,C}	8.45 ± 0.02 ^{d,D}
	ECG		8.19 ± 0.01 ^{b,B}	8.26 ± 0.01 ^{b,C}	8.30 ± 0.02 ^{b,D}
	ECG3''Me		8.20 ± 0.02 ^{b,B}	8.32 ± 0.02 ^{c,C}	8.36 ± 0.02 ^{c,D}
Lab 158	Control	7.78 ± 0.02 ^A	7.84 ± 0.02 ^{a,B}	7.98 ± 0.02 ^{a,C}	8.00 ± 0.03 ^{a,C}
	FOS		8.02 ± 0.02 ^{e,B}	8.23 ± 0.01 ^{d,C}	8.28 ± 0.02 ^{d,D}
	EGCG		7.96 ± 0.02 ^{cdB}	8.12 ± 0.01 ^{bc,C}	8.23 ± 0.02 ^{c,D}
	EGCG3''Me		7.97 ± 0.02 ^{d,B}	8.15 ± 0.02 ^{c,C}	8.27 ± 0.03 ^{d,D}
	ECG		7.90 ± 0.01 ^{b,B}	8.09 ± 0.03 ^{b,C}	8.18 ± 0.02 ^{b,D}
	ECG3''Me		7.93 ± 0.02 ^{bc,B}	8.12 ± 0.01 ^{bc,C}	8.22 ± 0.02 ^{c,D}

注: 同列不同小写字母代表同一时间不同样品之间对于该种菌属有显著性差异 ($P < 0.05$); 同行不同大写字母代表同一样品对于该种菌属在不同发酵时间有显著性差异 ($P < 0.05$)。对照为不加任何茶叶儿茶素样品的处理。下同。

表 3 EGCG、ECG、EGCG3''Me 和 EGCG3''Me 体外厌氧发酵 0、6、12、24 h 后拟杆菌和梭状菌数量

Table 3 The number of *Bacteroids-Prevotella* spp. and *Clostridium histolyticum* group in anaerobic fermentation broth with EGCG, EGCG3''Me, ECG and ECG3''Me at 0, 6, 12 and 24 h.lg (CFU/mL)

探针类型	样品	厌氧发酵时间/h			
		0	6	12	24
Bac 303	Control	7.29 ± 0.03 ^A	7.46 ± 0.04 ^{a,B}	7.86 ± 0.03 ^{a,C}	7.97 ± 0.03 ^{a,D}
	FOS		7.35 ± 0.03 ^{b,B}	7.44 ± 0.04 ^{d,C}	7.46 ± 0.03 ^{e,C}
	EGCG		7.36 ± 0.02 ^{b,B}	7.75 ± 0.03 ^{bc,C}	7.84 ± 0.03 ^{c,D}
	EGCG3''Me		7.35 ± 0.02 ^{b,B}	7.71 ± 0.04 ^{c,C}	7.78 ± 0.03 ^{d,D}
	ECG		7.37 ± 0.03 ^{b,B}	7.81 ± 0.02 ^{b,C}	7.89 ± 0.01 ^{b,D}
	ECG3''Me		7.38 ± 0.02 ^{b,B}	7.79 ± 0.01 ^{b,C}	7.82 ± 0.01 ^{cd,D}
His 150	Control	7.16 ± 0.02 ^A	7.25 ± 0.03 ^{a,B}	7.45 ± 0.03 ^{a,C}	7.53 ± 0.02 ^{a,D}
	FOS		7.19 ± 0.02 ^{b,B}	7.28 ± 0.03 ^{d,C}	7.30 ± 0.02 ^{d,C}
	EGCG		7.22 ± 0.02 ^{abB}	7.38 ± 0.02 ^{bc,C}	7.44 ± 0.03 ^{c,D}
	EGCG3''Me		7.20 ± 0.01 ^{b,B}	7.34 ± 0.02 ^{c,C}	7.32 ± 0.03 ^{d,D}
	ECG		7.23 ± 0.02 ^{abB}	7.39 ± 0.03 ^{b,C}	7.50 ± 0.02 ^{b,D}
	ECG3''Me		7.22 ± 0.02 ^{abB}	7.38 ± 0.02 ^{bc,C}	7.42 ± 0.03 ^{c,D}

与对照组相比, 阳性对照 FOS 在每个发酵时间点均显著抑制拟杆菌的增殖 ($P < 0.05$)。在不同发酵时间点, 加入儿茶素的培养基中, 拟杆菌数量都显著少于空白对照。可以认为在厌氧粪样培养过程中, EGCG、EGCG3''Me、ECG 和 ECG3''Me 抑制了拟杆

菌的增殖。在厌氧发酵培养 12 和 24 h 时, FOS 对于拟杆菌显示了最强的抑制效果, 而培养 6 h 时, FOS 与儿茶素发挥的抑制拟杆菌增殖的效果差异不显著 ($P > 0.05$)。可以发现, 在培养 12 h 时, EGCG 与 EGCG3''Me, 以及 ECG 与 ECG3''Me 之间, 抑制拟

杆菌增殖的效果差异不显著,而培养 24 h 时,相对于 EGCG, EGCG3''Me 发挥了更好的抑制拟杆菌增殖的效果 ($P < 0.05$),而 ECG 与 ECG3''Me 之间同样差异显著 ($P < 0.05$)。

如表 3 所示,与对照组相比,在不同发酵时间点不同儿茶素样品对于梭状菌增殖的抑制作用具有显著差异 ($P < 0.05$)。在厌氧发酵培养的不同时间点, FOS 均显示了对于梭状菌增殖最强的抑制效果,同时,在 12 和 24 h 之间,梭状菌数量差异不显著 ($P > 0.05$),说明 FOS 显著抑制了梭状菌的增殖。在培养 12 h 时,

表 4 EGCG、ECG、EGCG3''Me 和 ECG3''Me 体外厌氧发酵 0、6、12、24 h 后总菌群数量

Table 4 Total bacteria number in anaerobic fermentation broth with EGCG, EGCG3''Me, ECG and ECG3''Me at 0, 6, 12 and 24 h.

探针类型	样品	厌氧发酵时间/h			
		0	6	12	24
DAPI	Control	8.68 ± 0.03 ^A	8.86 ± 0.04 ^{b,B}	8.94 ± 0.02 ^{a,C}	9.01 ± 0.03 ^{a,D}
	FOS		8.79 ± 0.04 ^{a,B}	8.92 ± 0.03 ^{a,C}	9.02 ± 0.02 ^{a,D}
	EGCG		8.85 ± 0.04 ^{b,B}	8.94 ± 0.04 ^{a,C}	9.00 ± 0.03 ^{a,D}
	EGCG3''Me		8.84 ± 0.02 ^{b,B}	8.91 ± 0.02 ^{a,C}	9.01 ± 0.04 ^{a,D}
	ECG		8.82 ± 0.03 ^{b,B}	8.90 ± 0.02 ^{a,C}	9.01 ± 0.02 ^{a,D}
	ECG3''Me		8.84 ± 0.04 ^{b,B}	8.92 ± 0.03 ^{a,C}	9.02 ± 0.03 ^{a,D}

从表 4 可以看出,随着发酵时间延长,肠道内菌群的数量在慢慢增多,各样品发酵时间 0、6、12 和 24 h 具有差异显著性 ($P < 0.05$),而在各个时间点,与对照组相比,不同儿茶素样品及 FOS 对于肠道内总菌群影响差异不显著 ($P > 0.05$),说明儿茶素基本不会影响肠道内总菌群的数量。结合前面实验数据可以得出,儿茶素只是改变了肠道内菌体的组成,对总菌群数量基本没有影响。

人体消化道内的正常微生物群大部分寄居于结肠内,而人类结肠由 400 多种细菌构成,其数量达到 10^{14} 个以上。研究证实,双歧杆菌的部分菌属 (*Bifidobacterium* spp.)、乳酸菌/肠球菌的部分菌属 (*Lactobacillus/Enterococcus* spp.) 是两类对人体有益的微生物;此外,绝大多数的拟杆菌以及梭状菌对维持肠道的生态平衡也具有非常重要的作用,它们是在人体肠道内长期定植的菌群,但是其中的某些种属数量过多会破坏人体肠道内菌群的平衡,引发腹泻、感染等疾病^[12]。肠道微生物广泛参与了膳食中多种营养成分如糖类、脂类、酚类的代谢,其代谢产物及其代谢所引起的肠道微生物菌群变化与机体的健康水平密切相关。从基因层面上看,肠道微生物编码了大约 330 万个基因,约为人体自身基因的 150 倍,涵盖了糖苷水解、脂肪酸代谢、多酚类降解和修饰相关酶等基因,且多为人不具的代谢功能基因,表明肠道微生物

EGCG 和 EGCG3''Me, 以及 ECG 和 ECG3''Me 之间抑制梭状菌增殖的效果不显著 ($P > 0.05$),培养 24 h 时, EGCG3''Me 相对于 EGCG 发挥了更好的抑制梭状菌增殖的效果 ($P < 0.05$),而 ECG3''Me 相对于 ECG 同样发挥了更为显著的效果 ($P < 0.05$)。同时在培养 24 h 时, EGCG3''Me 显示了与 FOS 类似的效果 ($P > 0.05$)。

2.2.3 茶叶儿茶素对肠道总菌群的增殖作用

以不同茶叶儿茶素样品为底物,测定在不同发酵时间对于肠道总菌群数的影响,结果如表 4 所示。

在膳食物质代谢中具有丰富的潜在功能^[13]。肠道菌群构成以及菌群产生的代谢产物可以因膳食组成的改变而改变,进而对机体营养代谢和健康水平产生重要影响^[14]。研究证明,富含植物多酚的膳食可以对人体健康产生有益作用^[15],但鉴于植物多酚较低的生物利用率及其生物转化过程还不清楚,其作用机制还未得到科学解释。益生元是指通过选择性的增殖一种或少数种菌落中的细菌的生长与活性,而对寄主产生有益的影响从而改善寄主健康的不可被消化的食品成分。益生元往往通过刺激人体肠道内有益菌的生长,如双歧杆菌、乳酸菌等而对人体健康起到积极的作用^[16]。在目前的研究中, FOS 对于有益菌的生长起到了最明显的增殖作用,同时 EGCG、EGCG3''Me、ECG 和 ECG3''Me 对于肠道有益菌(双歧杆菌和乳酸菌)的生长起到了类似的促进作用,而且对于肠道中拟杆菌和梭状菌的增殖产生了抑制作用。研究结果表明,茶叶儿茶素能够作为肠道细菌发酵利用的合适底物,生成适于肠道细菌利用的代谢产物,从而对于肠道菌群组成起到调节作用。

2.3 茶叶儿茶素对于短链脂肪酸和乳酸生成的作用

表 5 为以不同茶叶儿茶素样品为底物时,不同发

酵时间对于厌氧发酵样液中 SCFA 和乳酸生成的影响。在体外厌氧粪样发酵过程中, 添加 EGCG、EGCG3''Me、ECG 以及 ECG3''Me 的培养基中, SCFA

和乳酸的含量相对于空白对照显著增加, 而且均随着发酵时间的延长显著增加。FOS 在每个发酵时间点, 均产生了最高含量的乳酸和除了丙酸之外的 SCFA。

表 5 EGCG, EGCG3''Me, ECG, ECG3''Me 体外厌氧发酵 0、6、12、24 h 后短链脂肪酸和乳酸的产量

Table 5 The production of SCFA and lactic acid in anaerobic fermentation broth with EGCG, EGCG3''Me, ECG and ECG3''Me at 0, 6, 12 and 24 h

SCFA 类型	样品	厌氧发酵时间/h			
		0	6	12	24
甲酸/mM	Control	3.92 ± 0.27 ^A	7.53 ± 0.51 ^{a,B}	10.22 ± 0.64 ^{a,C}	11.77 ± 0.81 ^{a,C}
	FOS		12.46 ± 1.03 ^{e,B}	18.66 ± 0.92 ^{e,C}	22.34 ± 1.78 ^{e,D}
	EGCG		9.64 ± 0.47 ^{c,B}	15.49 ± 0.76 ^{c,C}	18.46 ± 1.14 ^{c,D}
	EGCG3''Me		10.13 ± 0.56 ^{d,B}	17.72 ± 0.88 ^{d,C}	20.74 ± 1.09 ^{d,D}
	ECG		9.04 ± 0.51 ^{b,B}	14.42 ± 0.73 ^{b,C}	17.32 ± 0.88 ^{b,D}
	ECG3''Me		9.82 ± 0.72 ^{c,B}	15.68 ± 1.09 ^{c,C}	18.89 ± 0.77 ^{c,D}
乙酸/mM	Control	7.36 ± 0.28 ^A	10.33 ± 0.48 ^{a,B}	14.28 ± 0.74 ^{a,C}	16.62 ± 0.68 ^{a,D}
	FOS		23.04 ± 1.77 ^{d,B}	34.46 ± 1.82 ^{e,C}	40.07 ± 2.26 ^{e,D}
	EGCG		18.98 ± 1.23 ^{c,B}	22.47 ± 1.74 ^{b,C}	32.88 ± 2.31 ^{c,D}
	EGCG3''Me		19.24 ± 1.54 ^{c,B}	24.93 ± 2.02 ^{c,C}	36.43 ± 2.92 ^{d,D}
	ECG		17.63 ± 0.72 ^{b,B}	24.37 ± 1.86 ^{c,C}	30.29 ± 1.78 ^{b,D}
	ECG3''Me		17.90 ± 1.04 ^{b,B}	25.81 ± 2.06 ^{d,C}	35.88 ± 1.87 ^{d,D}
丙酸/mM	Control	0.00 ± 0.00 ^A	3.34 ± 0.24 ^{a,B}	5.62 ± 0.43 ^{a,C}	8.56 ± 0.57 ^{a,D}
	FOS		4.58 ± 0.38 ^{c,B}	6.83 ± 0.27 ^{b,C}	11.37 ± 0.72 ^{b,D}
	EGCG		4.33 ± 0.17 ^{b,B}	7.68 ± 0.35 ^{d,C}	14.51 ± 1.12 ^{e,D}
	EGCG3''Me		4.51 ± 0.32 ^{c,B}	7.31 ± 0.29 ^{c,C}	12.94 ± 0.76 ^{c,D}
	ECG		4.54 ± 0.37 ^{c,B}	7.93 ± 0.22 ^{e,C}	14.78 ± 0.97 ^{e,D}
	ECG3''Me		4.27 ± 0.22 ^{b,B}	7.66 ± 0.51 ^{d,C}	14.02 ± 0.66 ^{d,D}
丁酸/mM	Control	0.00 ± 0.00 ^A	0.00 ± 0.00 ^{a,A}	0.76 ± 0.04 ^{a,B}	1.38 ± 0.11 ^{a,C}
	FOS		5.24 ± 0.34 ^{d,B}	7.78 ± 0.57 ^{e,C}	10.62 ± 0.79 ^{e,D}
	EGCG		3.26 ± 0.19 ^{b,B}	4.51 ± 0.32 ^{c,C}	7.26 ± 0.41 ^{c,D}
	EGCG3''Me		3.88 ± 0.25 ^{c,B}	5.13 ± 0.27 ^{d,C}	7.73 ± 0.52 ^{d,D}
	ECG		3.19 ± 0.27 ^{b,B}	4.13 ± 0.21 ^{b,C}	6.49 ± 0.39 ^{b,D}
	ECG3''Me		3.33 ± 0.22 ^{b,B}	4.58 ± 0.36 ^{c,C}	6.38 ± 0.43 ^{b,D}
乳酸/mM	Control	5.05 ± 0.37 ^A	11.29 ± 0.88 ^{a,B}	13.70 ± 0.54 ^{a,C}	14.64 ± 1.13 ^{a,D}
	FOS		22.72 ± 1.42 ^{e,B}	29.24 ± 2.38 ^{e,C}	33.21 ± 2.42 ^{e,D}
	EGCG		20.43 ± 1.19 ^{d,B}	26.11 ± 1.87 ^{c,C}	29.54 ± 1.79 ^{c,C}
	EGCG3''Me		20.16 ± 0.88 ^{c,B}	27.37 ± 2.15 ^{d,C}	31.63 ± 1.26 ^{d,C}
	ECG		18.28 ± 1.33 ^{b,B}	24.69 ± 2.02 ^{b,C}	27.66 ± 2.04 ^{b,C}
	ECG3''Me		19.95 ± 0.76 ^{c,B}	25.97 ± 1.44 ^{c,C}	29.63 ± 2.39 ^{c,C}

在体外厌氧粪样发酵过程中产生的 SCFA 中, 乙酸在 24 h 时含量最高。乙酸含量可能与双歧杆菌、乳酸菌、拟杆菌和梭状菌的增殖状况相关。在不同发酵时间点, 虽然空白对照中乙酸的含量也在缓慢增加, 但是显著低于添加茶叶儿茶素培养基中的含量 ($P < 0.05$), 说明茶叶儿茶素有效促进了发酵过程中乙酸的产生。

在空白对照和添加茶叶儿茶素的培养基中, 乳酸的产量均缓慢增加。在空白对照中, 乳酸的产量在每个发酵时间点, 均显著低于添加茶叶儿茶素的培养基 ($P < 0.05$)。在发酵起始阶段乳酸产量的增加, 可能与高含量的双歧杆菌和乳酸菌相关。在发酵过程中, 乳酸是通过同型发酵或异型途径产生的关键中间体, 同时也是乙酸、丙酸和丁酸等物质形成过程中的前体物

质。研究中，我们发现乳酸含量在 12 到 24 h 之间缓慢增加，同时其他 SCFA 的含量对应开始慢慢增加。在发酵过程中细菌的作用下，乳酸在肠道中快速转化为其他 SCFA。

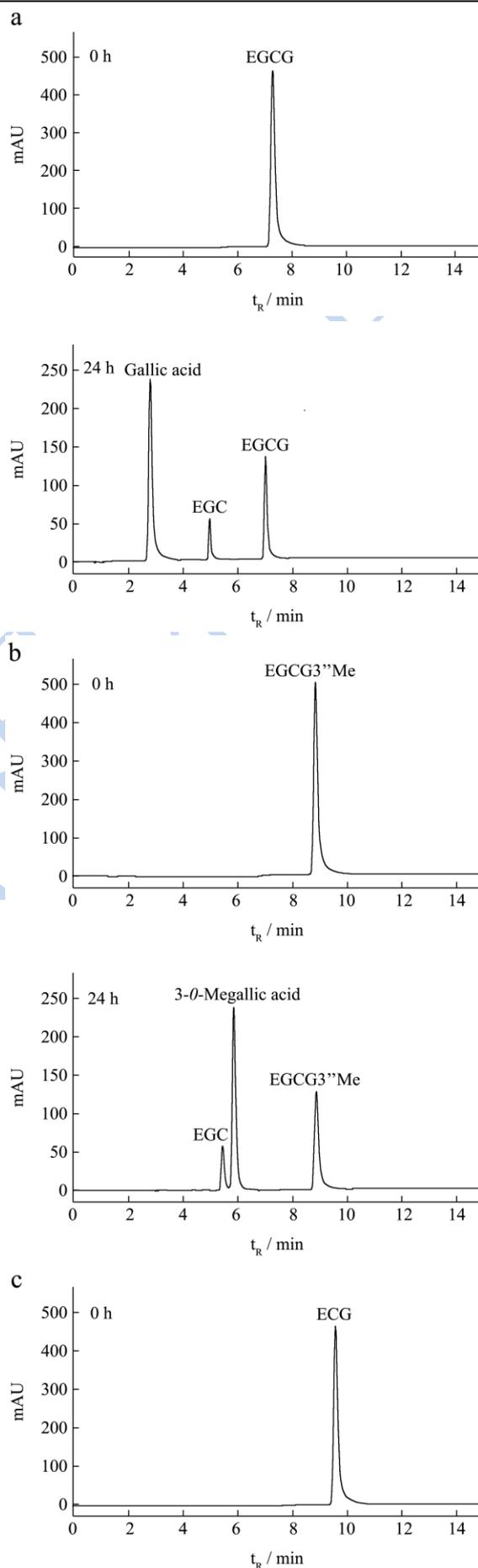
在发酵过程中，丁酸在每个培养基中含量都随着发酵时间的延长而增长，然而，在 SCFA 中丁酸只占了很小的比例，丁酸的产生是在发酵的后期阶段，意味着其产生可能与发酵过程中形成的其他细菌的代谢物的转化密切相关。如表 5 所示，添加了茶叶儿茶素的培养基，相比空白对照都生成了更多的甲酸和丙酸 ($P>0.05$)。在发酵的起始阶段，甲酸、乙酸和乳酸都是 SCFA 的主要成分，而在发酵的后期，主要 SCFA 转变成了甲酸、乙酸和丙酸。

膳食中有些成分在人体的上消化道不能被消化吸收，如膳食纤维、抗性淀粉、低聚糖等，在结肠内细菌分解发酵，最终产生 SCFA。包括甲酸、乙酸、琥珀酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、乳酸和一些相应的支链脂肪酸，其中乙酸、丙酸及丁酸约占 80% 以上。SCFA 的生成对人体有重要生理功能，对于维持大肠的正常生理功能，防止病原菌具有重要意义^[17]。主要是因为酸化结肠的环境，可以防止潜在致癌和致病细菌，而且有利于矿物质的吸收。

特别值得指出的是，丁酸对于维持肠道平衡具有重要的功能，在结肠中高浓度的丙酸和丁酸，对于防止低胆固醇血症和肿瘤的发生具有良好的效果。本研究结果表明，茶叶儿茶素能够促进肠道微生物发酵产生 SCFA，对于改善人体肠道环境有积极作用。

2.4 茶叶儿茶素在体外厌氧发酵过程中的结构变化

图 3 为 EGCG、EGCG3''Me、ECG、ECG3''Me 及其代谢产物在发酵过程中变化的 HPLC 图谱。可以看出，在体外厌氧发酵培养 24 h 之后，各茶叶儿茶素单体的结构发生了显著的变化，酯键被肠道微生物水解，产生了对应的代谢产物。EGCG 经过肠道微生物代谢之后，产生了对应的 gallic acid 和 EGC，而 ECG 在发酵之后，产生了对应的 gallic acid 和 EC。EGCG3''Me 在厌氧发酵 24 h 之后，同样产生了 EGC 和未知物 X。ESI-TOF-MS 图谱表明，未知物 X 具有特征性的 m/z 204.97 $[M+Na]^+$ 和 182.97 $[M+H]^+$ ，因此 X 的分子量为 184，与甲基化的 gallic acid 分子量相符。因此，X 确定为 3-O-Me gallic acid，其分子结构如图 3 所示。类似于 EGCG3''Me，ECG3''Me 经过微生物发酵，产生了 EC 和 3-O-Me gallic acid。



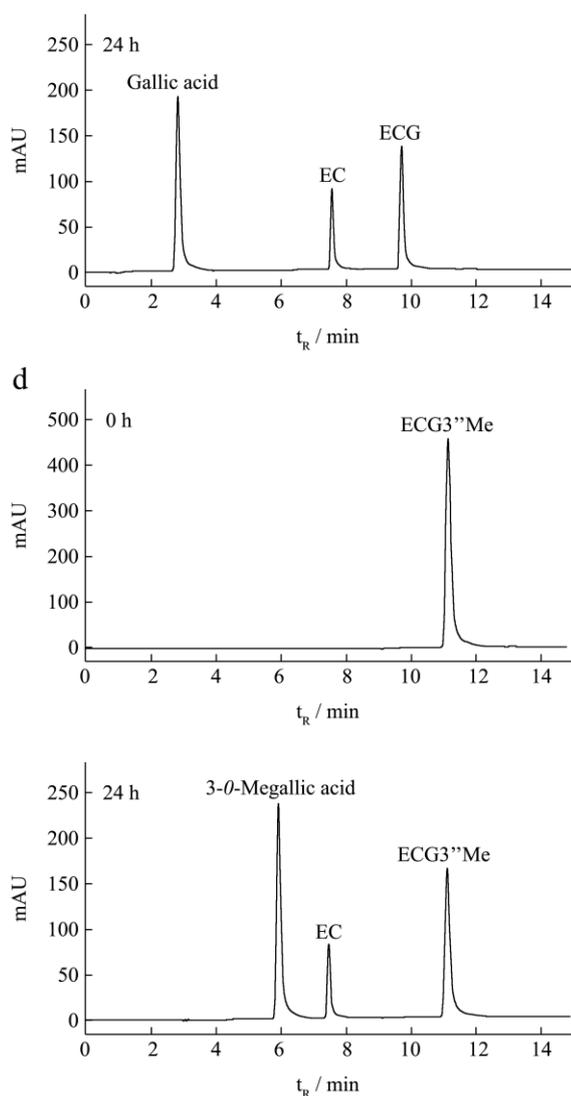


图2 EGCG(a)、EGCG3''Me(b)、ECG(c)、ECG3''Me(d)及其代谢产物在发酵过程中变化的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms showing changes of EGCG(a), EGCG3''Me(b), ECG(c), ECG3''Me(d) and their metabolites during the fermentation

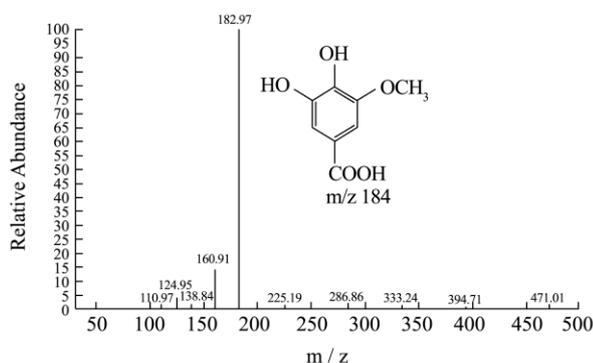


图3 在EGCG3''Me体外发酵过程中产生的化合物X的质谱图
Fig. 3 ESI-MS/MS spectrum of compound X generated during the *in vitro* fermentation of EGCG3''Me

通过研究可以发现，肠道细菌对于儿茶素在人体

肠道内的生物转化起到了重要作用。之前研究报道，儿茶素可能是肠道细菌在肠道内通过对于酚类化合物去糖基化从而释放苷元，同时催化甲氧基脱甲基反应^[18]。多酚的代谢产物可以到达结肠被肠道微生物利用，从而对肠道微生物的数量以及构成产生影响。肠道内的双歧杆菌、乳酸菌等益生菌通过调节肠道生态平衡来发挥益生作用，同时双歧杆菌、乳酸菌等有益菌的增殖，可以有效抑制大肠内氨、粪臭素以及胺类致癌物等的形成。有可能以上所述，就是加入茶叶儿茶素之后，体外厌氧发酵培养基中菌群产生数量变化，同时儿茶素结构发生改变的原因。

3 结论

本研究以广东乌龙茶为原料，通过聚酰胺树脂以及 Toyopearl HW-40S 葡聚糖凝胶色谱柱层析，分离纯化得到了纯度大于98%的EGCG、EGCG3''Me、ECG和EGCG3''Me样品。通过体外人粪样厌氧发酵，并利用FISH技术检测，发现添加茶叶儿茶素的培养基中，肠道有益菌双歧杆菌和乳酸菌的增殖得到了有效促进，同时肠道中拟杆菌和梭状菌的生长被抑制。此外利用HPLC技术，对于发酵过程中各种SCFA含量的变化进行了测定。发现添加儿茶素样品的培养基中，SCFA含量在各个发酵时间点，都比对照组有显著提高，而且产量都随着发酵时间的延长显著提高。同时对于茶叶儿茶素体外厌氧发酵的代谢产物进行了结构鉴定。研究表明，茶叶儿茶素发挥了益生元的功效，包括甲基化儿茶素在内的茶叶儿茶素及其代谢产物可以有效促进肠道有益菌群的增殖，维护人体肠道生态平衡，对于改善人体肠道环境、保护人体健康具有重要作用。

参考文献

- [1] Bolling BW, Chen CYO, Blumberg JB. Tea and health: preventive and therapeutic usefulness in the elderly [J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic, 2009, 12(1): 42-48
- [2] Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion [J]. Life Science, 2007, 81(7): 519-533
- [3] Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications [J]. Biochemical Pharmacology, 2011, 82(12): 1807-1821
- [4] Maeda-Yamamoto M, Ema K, Shibuichi I. In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and ginger extract enhancement [J].

- Cytotechnology, 2007, 55(2-3): 135-142
- [5] Maeda-Yamamoto M, Ema K, Monobe M, et al. Epicatechin-3-O-(3'-O-methyl)-gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its in vitro inhibitory effect on histamine release [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(9): 2165-2170
- [6] 刘平, 李宗军, 许爱清. 胃肠道微生态系统及其功能研究[J]. *中国微生物学杂志*, 2010, 22(3): 277-281
- LIU Ping, LI Zong-jun, XU Ai-qing. Study on gastrointestinal microbiota and its functions [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 22(3): 277-281
- [7] 谢涛, 张儒. 绿豆抗性淀粉消化前后益生作用与结构变化的比较[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(12): 2834-2838
- XIE Tao, ZHANG Ru. Probiotic functions and structural changes of mung bean resistant Starch before and after digestion [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(12): 2834-2838
- [8] Molan AL, Lila MA, Mawson J, et al. In vitro and in vivo evaluation of the prebiotic activity of water-soluble blueberry extracts [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(7): 1243-1249
- [9] Hu B, Wang L, Zhou B, et al. Efficient procedure for isolating methylated catechins from green tea and effective simultaneous analysis of ten catechins, three purine alkaloids, and gallic acid in tea by high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(15): 3223-3231
- [10] Zhang X, Zhu XL, Sun YK, 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
- [11] 张鑫, 马丽苹, 张芸, 等. 茶叶儿茶素对肠道微生态的调节作用[J]. *食品科学*, 2013, 34(5): 232-237
- ZHANG Xin, MA Li-ping, ZHANG Yun, et al. Regulatory effect of tea catechins on intestinal microecology [J]. *Food Science*, 2013, 34(5): 232-237
- [12] Rastall RA. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(8): 2022S-2026S
- [13] Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 585-588
- [14] David LA, Maurice C, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome [J]. *Nature*, 2013, 505(7484): 559-563
- [15] Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(2): 492-501
- [16] Grizard D, Barthelemy C. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health [J]. *Reproduction Nutrition Development*, 1999, 39(5-6): 563-588
- [17] Kim HJ, White PJ. In vitro fermentation of oat flours from typical and high β -glucan oat lines [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(16): 7529-7536
- [18] Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, et al. In vitro fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(8): 2024-2032