

利用光镊拉曼光谱研究环境因素对葡萄球菌黄素生物合成的影响

陶站华, 柯珂, 师德强, 竺利波

广西科学院生物物理实验室, 广西 南宁 530007

摘要 利用光镊拉曼光谱(LTRS)技术研究了不同环境因素对葡萄球菌黄素合成的影响。分别在温度范围为22~37 °C、pH范围为4.5~8.5、葡萄糖质量浓度范围为0~10.0 g/L以及黄酮质量浓度为0~175 mg/L的条件下培养金黄色葡萄球菌,利用拉曼光谱1523 cm⁻¹特征峰强度表征细菌细胞内葡萄球菌黄素的相对含量。结果表明:在22~37 °C范围内,温度对葡萄球菌黄素合成的影响不大;中性pH最有利于葡萄球菌黄素的合成;葡萄糖在一定质量浓度范围内(0.2~5.0 g/L)可剂量依赖性地促进葡萄球菌黄素的合成,黄酮也会剂量依赖性地抑制葡萄球菌黄素的合成。LTRS技术可作为快速可靠的葡萄球菌黄素定量检测方法以及葡萄球菌黄素合成抑制剂的有效筛选和评价手段。

关键词 光谱学; 定量检测; 光镊拉曼光谱; 葡萄球菌黄素; 金黄色葡萄球菌

中图分类号 O433 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP54.123001

Effect of Environmental Factors on Staphyloxanthin Biosynthesis Based on Laser Tweezers Raman Spectroscopy

Tao Zhanhua, Ke Ke, Shi Deqiang, Zhu Libo

Laboratory of Biophysics, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

Abstract Laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) is used to study the effects of various environmental factors on staphyloxanthin biosynthesis. *Staphylococcus aureus* cells are cultivated at the temperature ranging from 22 °C to 37 °C, pH from 4.5 to 8.5, glucose mass concentration from 0 g/L to 10.0 g/L, and flavone mass concentration from 0 mg/L to 175 mg/L. The intensity of Raman band at 1523 cm⁻¹ is used to characterize the relative content of staphyloxanthin in bacterial cells. The experimental results show that the temperature ranging from 22 °C to 37 °C has no significant effect on staphyloxanthin biosynthesis, the neutral pH is most favorable for staphyloxanthin biosynthesis, and glucose in a certain mass concentration range (0.2-5.0 g/L) promotes staphyloxanthin synthesis in a dose-dependent manner whereas flavone inhibits staphyloxanthin synthesis in a dose-dependent manner. The LTRS technology can serve as a rapid and reliable method for quantitative determination of staphyloxanthin content as well as an effective approach to screening and evaluating inhibitors of staphyloxanthin biosynthesis.

Key words spectroscopy; quantitative determination; laser tweezers Raman spectroscopy; staphyloxanthin; *Staphylococcus aureus*

OCIS codes 300.6450; 140.3550; 170.1530

1 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是造成社区和医院内细菌感染的重要致病菌^[1],既可引起轻微感染,如皮肤和软组织感染,也可引起危及生命的全身感染,如菌血症和心内膜炎^[2]。抗生素的广泛应用致使耐药菌株尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)大量出现,美国疾病控制和预防中心的一项研

收稿日期: 2017-05-26; 收到修改稿日期: 2017-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(31760036)、广西自然科学基金(2014GXNSFAA118193)

作者简介: 陶站华(1971—),男,博士,副研究员,主要从事光谱学方面的研究。E-mail: taozhanhua@163.com

究显示,美国每年死于侵袭性 MRSA 的人数高于死于艾滋病的人数^[2]。金黄色葡萄球菌细胞中使菌体呈现亮黄色的色素——葡萄球菌黄素(STX)属于 C30 类胡萝卜素,是一种重要的毒力因子,对帮助金黄色葡萄球菌逃避宿主固有免疫系统的清除具有重要作用。葡萄球菌黄素的作用机制如下:1) 葡萄球菌黄素具有很强的抗氧化活性,能有效中和宿主吞噬细胞释放的有毒氧化物,保护细菌免受活性氧分子的损伤^[3];2) 葡萄球菌黄素具有稳定细胞膜的作用,可增强金黄色葡萄球菌对抗微生物阳离子肽的抵抗作用^[4]。由于葡萄球菌黄素在金黄色葡萄球菌感染宿主过程中对病原菌的特殊保护作用,该色素的生物合成途径已经成为开发抗金黄色葡萄球菌感染药物的一个新靶点^[5-7]。

金黄色葡萄球菌是一种环境适应能力很强的微生物,既可以在无生命的体外环境中生存,也可以寄居于动物宿主体内的不同部位。金黄色葡萄球菌这种广泛的环境适应性与其基因表达调控系统响应环境信号,从而调节数目众多的毒力因子协调、有序合成的能力密不可分。目前,环境信号对金黄色葡萄球菌蛋白质类毒力因子表达的影响已有多篇文献进行了报道,然而研究人员对环境信号如何影响葡萄球菌黄素生物合成的认识仍然有限。了解体外或宿主体内环境信号如何激活或抑制葡萄球菌黄素的合成,可以加深对葡萄球菌黄素生物合成途径及其基因调控规律的认识,同时可以加深对病原菌致病机理的了解。

传统的葡萄球菌黄素检测方法是甲醇提取后再用高效液相色谱法或紫外可见分光光度法进行分析,但 these 方法比较繁琐,且容易引起色素降解,影响结果的重现性。葡萄球菌黄素分子中多个共轭双键的预共振效应会引发很强的拉曼散射,因而利用拉曼光谱检测该色素具有很高的灵敏度。光镊拉曼光谱(LTRS)技术整合了光镊技术和拉曼光谱技术,利用同一束激光囚禁溶液中的活细胞并激发该细胞内分子的拉曼散射,是研究单个活细胞化学组成和生命周期变化以及进行医学诊断的有力工具^[8-14]。本文利用 LTRS 研究了生长条件(温度、pH、葡萄糖浓度)对金黄色葡萄球菌细胞中葡萄球菌黄素合成的影响,并以黄酮作为模型化合物,探讨了利用 LTRS 技术筛选和评价葡萄球菌黄素合成抑制药物的可行性。

2 材料与方法

2.1 实验材料

产色素的金黄色葡萄球菌菌株由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供。选用胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)液体培养基,其配方为大豆胨 3 g/L,胰化蛋白胨 17 g/L,NaCl 5 g/L,葡萄糖 2.5 g/L, K_2HPO_4 2.5 g/L;固体培养基选用大豆酪蛋白琼脂(TSA)培养基,在 TSB 培养基的基础上加入琼脂粉 15 g/L。

2.2 色素合成的环境条件

将生长于 TSA 固体培养基上的单菌落接种于装有 5 mL TSB 液体培养基的试管中,在 200 r/min 振荡条件下预培养 16 h,培养温度为 37 °C。

将上述培养物以 1:50 的比例接种于装有 50 mL TSB 液体培养基的 250 mL 摇瓶中,在 200 r/min 振荡条件下培养 16 h,然后将菌体样品于 4 °C 保存,用于后续的光谱分析。

在研究温度对色素合成的影响时,分别在 22,27,32,37 °C 下培养细菌,pH 固定为 7.5;在研究 pH 对色素合成的影响时,各摇瓶中 TSB 培养基的初始 pH 分别调整为 4.5,5.5,6.5,7.5,8.5,温度固定为 37 °C;在研究葡萄糖质量浓度对色素合成的影响时,固定温度为 37 °C,pH 为 7.5,各摇瓶 TSB 培养基中葡萄糖的初始质量浓度分别为 0.2,0.5,1.0,2.5,5.0,10.0 g/L;在研究黄酮对色素合成的抑制作用时,在各摇瓶 TSB 培养基中分别添加初始质量浓度分别为 0,50,100,175 mg/L 的黄酮,在 37 °C 和 pH 7.5 的条件下培养细菌。

2.3 拉曼光谱收集及数据处理

所用 LTRS 系统按照 Xie 等^[15]描述的方法搭建。

制备待测细胞悬液时移取 10 μ L 菌液,然后加入 990 μ L 无菌水,再混入终浓度为 0.1%(体积分数)的 Tween-80,剧烈涡旋分散 30 s 以获取更多的单细胞。收集细胞光谱时将细菌悬液添加于自制的样品槽内,上方以盖玻片密封。在 100 倍油浸物镜下利用光镊随机捕获单个菌细胞,入射激光强度为 45 mW,细胞拉曼光谱信号收集时间为 30 s,每个样品收集 50 个单细胞的拉曼光谱,期间每收集 10 个细胞的光谱后收集 1 个背景光谱。光谱数据预处理使用 MATLAB 7.0 编写的程序完成,每个细胞的原始光谱扣除背景光谱后,分别经过多项式拟合基线校正以及 5 点 Savitzky-Golay 平滑的预处理过程,目的是进一步减小杂散光和

热噪声等对信号的干扰,提高定量结果的准确性。预处理后的光谱以 1523 cm^{-1} 处的峰高对细胞内的葡萄球菌黄素进行定量分析,光谱图的绘制及光谱数据的统计分析在软件 Origin 8.5 中进行。

3 结果与讨论

3.1 金黄色葡萄球菌细胞和葡萄球菌黄素的拉曼光谱

为了确定用于色素定量的拉曼光谱特征峰,实验测定了葡萄球菌黄素粉末和培养 6 h 的金黄色葡萄球菌单细胞的拉曼光谱,如图 1 所示。葡萄球菌黄素由于异戊二烯结构共轭双键的预共振效应,拉曼光谱信号很强(谱线 A),其中最强的 3 个特征峰分别为归属于 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动的 1523 cm^{-1} 特征峰,归属于 $\text{C}-\text{C}$ 伸缩振动的 1160 cm^{-1} 特征峰和归属于 $\text{C}=\text{C}$ 面内摇摆振动的 1001 cm^{-1} 特征峰^[16]。在金黄色葡萄球菌单细胞光谱(谱线 B)中,虽然金黄色葡萄球菌的培养时间较短(6 h),菌细胞内色素含量偏低,但上述 3 个来源于葡萄球菌黄素的主要特征峰强度依然远高于细胞内其他化学成分的拉曼散射强度,这表明 LTRS 技术对金黄色葡萄球菌细胞内色素具有很高的检测灵敏度。在葡萄球菌黄素的 3 个特征峰中, 1523 cm^{-1} 特征峰的强度较高,形状尖锐、对称,且该特征峰附近没有其他拉曼信号的干扰,适合用于色素的定量分析,因此在后续实验中用 1523 cm^{-1} 特征峰强度表征细胞内葡萄球菌黄素的相对含量。

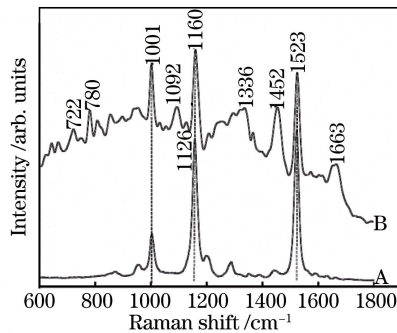


图 1 葡萄球菌黄素固体粉末(谱线 A)和培养 6 h 的金黄色葡萄球菌单细胞的拉曼光谱(谱线 B)

Fig. 1 Raman spectra of staphyloxanthin powder (spectrum A) and *Staphylococcus aureus* single cell cultivated for 6 h (spectrum B)

3.2 温度对葡萄球菌黄素合成的影响

温度是影响微生物生存和生长最重要的外部因素之一,它可以通过改变酶促反应速度进而极大地影响微生物中某些物质的合成和分解代谢。22, 27, 32, 37 °C 下金黄色葡萄球菌细胞内的色素合成情况如图 2 所示,可见,在一定温度范围内(22~37 °C),金黄色葡萄球菌细胞内均积累了较高浓度的葡萄球菌黄素,且温度对金黄色葡萄球菌合成色素能力的影响并不显著。上述结果表明,在中等温度范围内(22~37 °C),金黄色葡萄球菌细胞内参与葡萄球菌黄素合成的相关酶在体外及宿主体内常见温度环境下都能高效地催化合成该色素,帮助金黄色葡萄球菌有效抵御环境中的各种氧化胁迫因子,提高金黄色葡萄球菌对各种环境的适应能力。

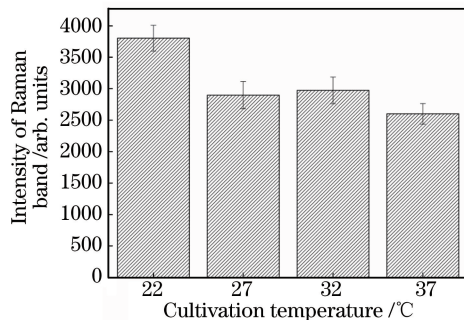


图 2 温度对葡萄球菌黄素合成的影响

Fig. 2 Effect of temperature on staphyloxanthin biosynthesis

3.3 pH 对葡萄球菌黄素合成的影响

金黄色葡萄球菌广泛地存活于无生命的体外环境及动物宿主体内的不同部位,对于偏离中性的弱酸及弱碱性环境具有一定的耐受力。图 3 所示为 pH 在 4.5~8.5 区间内葡萄球菌黄素的合成情况。由图 3 可知:金黄色葡萄球菌在接近中性环境中的色素含量最高,随着环境酸度增加(pH 从 7.5 降至 4.5),色素含量逐渐降低;与之形成鲜明对比的是,当环境由近中性变为弱碱性时(pH 由 7.5 升高至 8.5),金黄色葡萄球菌细胞内的葡萄球菌黄素含量急剧降低,下降幅度接近 75%。一般动物宿主体内环境的酸碱度是接近中性的,金黄色葡萄球菌在近中性酸碱度环境中具有最大的色素合成能力,有助于金黄色葡萄球菌逃避宿主免疫吞噬过程中的氧化损伤。与偏碱性环境相比,金黄色葡萄球菌在偏酸性环境中的色素含量更高,这一现象的生物学意义仍有待进一步研究。

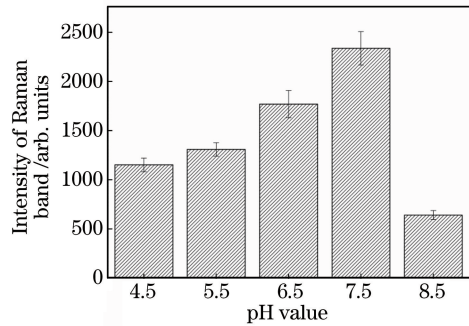


图 3 pH 对葡萄球菌黄素合成的影响

Fig. 3 Effect of pH on staphyloxanthin biosynthesis

3.4 葡萄糖浓度对葡萄球菌黄素合成的影响

葡萄糖是微生物生长所需的重要碳源之一,其分解代谢产生的乙酰辅酶 A 是葡萄球菌黄素合成的起始原料^[17]。在葡萄糖初始质量浓度分别为 0, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 g/L 的 TSB 培养基中培养金黄色葡萄球菌,以拉曼光谱 1523 cm^{-1} 特征峰强度表征细胞内的色素含量,结果如图 4 所示(由于在不添加葡萄糖的培养基中培养的菌体用 LTRS 无法检出色素含量,菌体呈现白色,故图 4 中没有显示该组样品)。在不含葡萄糖的条件下,金黄色葡萄球菌几乎不合成色素,并且葡萄糖在一定质量浓度范围内(0.2~5.0 g/L)可剂量依赖性地促进色素合成,过高的葡萄糖浓度(如 10.0 g/L)会轻度抑制色素的合成。上述葡萄糖促进葡萄球菌黄素合成的发现可以为解释某些生理或病理条件会增加金黄色葡萄球菌感染机会提供线索。研究表明,糖尿病和其他急性疾病导致的高血糖会增加罹患金黄色葡萄球菌感染的风险^[18-21],既然葡萄球菌黄素在帮助金黄色葡萄球菌逃避宿主固有免疫清除的过程中发挥着重要作用,那么或许糖尿病患者对金黄色葡萄球菌的易感性增强与宿主体液中增高的糖浓度促进金黄色葡萄球菌色素合成,进而提高病原菌对宿主氧化损伤的抵抗能力有关,当然这种推测还需要更多的实验证据予以支持。

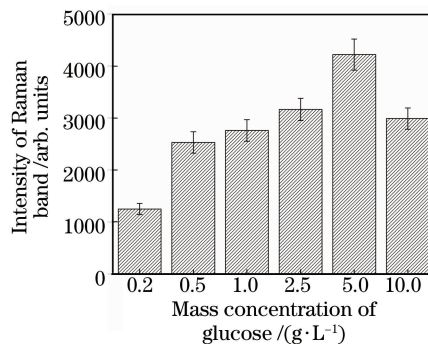


图 4 葡萄糖质量浓度对葡萄球菌黄素合成的影响

Fig. 4 Effect of mass concentration of glucose on staphyloxanthin biosynthesis

3.5 黄酮对葡萄球菌黄素合成的抑制作用

目前,MRSA 对绝大多数传统的 β -内酰胺类抗生素耐药,对万古霉素、达托霉素、利奈唑胺等抗生素产生耐药菌株的报道也日渐增多^[7]。因此,开发全新作用机制的 MRSA 治疗药物已成为当务之急,葡萄球菌黄素生物合成途径是很有前景的开发 MRSA 感染治疗药物的新靶点^[2,5,22-24]。黄酮类物质是一类广泛存在于植物中的具有多种生物活性的化合物。本课题组利用 LTRS 技术探索了不同剂量黄酮对葡萄球菌黄素合成的抑制作用,结果如图 5 所示。由图 5 可以看出:黄酮可剂量依赖性地抑制葡萄球菌黄素的生物合成,随着培养基中黄酮浓度的增加,细菌拉曼光谱 1523 cm^{-1} 特征峰强度逐渐降低,从不添加黄酮时的 5213 下降至黄酮质量浓度为 175 mg/L 时的 965,下降幅度超过 80%。该结果也表明 LTRS 可以成为筛选和评价葡萄球菌黄素合成抑制药物的有效手段。与基于化学提取之后用分光光度法和高效液相色谱法进行检测的传统方法相比,LTRS 法不但能显示药物对色素合成的平均抑制效果,还能提供不同色素含量的细胞在群体内的分布信息,从而揭示隐藏在群体平均值中的单细胞信息。

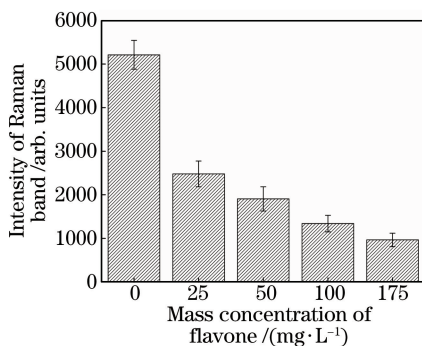


图 5 黄酮质量浓度对葡萄球菌黄素合成的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of mass concentration of flavone on staphyloxanthin biosynthesis

4 结 论

利用 LTRS 技术研究了不同环境条件(温度、pH、葡萄糖浓度)下葡萄球菌黄素生物合成的规律,同时以黄酮作为模型化合物探索了 LTRS 用于葡萄球菌黄素合成抑制剂筛选和评价的可能性。结果表明:在 22~37 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,温度对葡萄球菌黄素合成的影响不大;中性 pH 最有利于色素的合成,碱性条件下细胞色素含量急剧下降;葡萄糖在一定质量浓度范围内(0.2~5.0 g/L)可剂量依赖性地促进色素合成,过高的葡萄糖质量浓度(如 10 g/L)可轻度抑制色素合成;黄酮可剂量依赖性地抑制葡萄球菌黄素的生物合成。LTRS 技术可作为快速可靠的葡萄球菌黄素定量检测方法以及葡萄球菌黄素合成抑制剂的有效筛选和评价手段。

参 考 文 献

- [1] Kenny J G, Ward D, Josefsson E, *et al.* The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: Survival mechanisms and virulence implications[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4344.
- [2] Wang Y, Chen F, Di H, *et al.* Discovery of potent benzofuran-derived diapophytoene desaturase (CrtN) inhibitors with enhanced oral bioavailability for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 59(7): 3215-3230.
- [3] Clauditz A, Resch A, Wieland K P, *et al.* Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(8): 4950-4953.
- [4] Mishra N N, Liu G Y, Yeaman M R, *et al.* Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(2): 526-531.
- [5] Musthafa K S, Voravuthikunchai S P. Anti-virulence potential of eugenyl acetate against pathogenic bacteria of medical importance[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 107(3): 703-710.
- [6] Lee J H, Cho H S, Kim Y, *et al.* Indole and 7-benzoxylindole attenuate the virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(10): 4543-4552.

- [7] Fitzgerald-Hughes D, Devocelle M, Humphreys H. Beyond conventional antibiotics for the future treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: Two novel alternatives [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2012, 65(3): 399-412.
- [8] Tao Z, Zhang P, Qin Z, et al. Poly(3-hydroxybutyrate) anabolism in *Cupriavidus necator* cultivated at various carbon-to-nitrogen ratios: Insights from single-cell Raman spectroscopy [J]. Journal of Biomedical Optics, 2016, 21(9): 097005.
- [9] Tao Z, Peng L, Zhang P, et al. Probing the kinetic anabolism of poly-beta-hydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 using single-cell Raman spectroscopy [J]. Sensors (Basel), 2016, 16(8): s16081257.
- [10] Li Y, Igne B, Drennen J K, et al. Method development and validation for pharmaceutical tablets analysis using transmission Raman spectroscopy [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 498(1/2): 318-325.
- [11] Yuan Yufeng, Tao Zhanhua, Liu Junxian, et al. Raman tweezers-based analysis of carotenoid synthesis in *Rhodotorula glutinis* [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(4): 1001-1005.
袁玉峰, 陶站华, 刘军贤, 等. 拉曼镊子分析红酵母合成类胡萝卜素 [J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(4): 1001-1005.
- [12] Chen Yue, Wang Luwei, Tao Zhanhua, et al. Novel application of optical techniques: Revealing the mechanism of germination of bacterial spores [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2015, 52(10): 100002.
陈越, 王璐玮, 陶站华, 等. 光学技术的创新应用: 细菌芽孢萌发机理研究 [J]. 激光与光电子学进展, 2015, 52(10): 100002.
- [13] Qin Zhaojun, Peng Lixin, Zhu Libo, et al. Raman spectral profiles of PHB synthesis by *Cupriavidus necator* H16 at different fructose levels [J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(3): 0315003.
覃赵军, 彭立新, 竺利波, 等. 碳源浓度影响微生物 PHB 合成代谢的单细胞拉曼光谱分析 [J]. 中国激光, 2015, 42(3): 0315003.
- [14] Qin Zhaojun, Tao Zhanhua, Liao Wei, et al. Raman spectral profiles of PHB synthesis influenced by different nitrogen sources [J]. Acta Optica Sinica, 2016, 36(4): 0417001
覃赵军, 陶站华, 廖威, 等. 氮源影响 PHB 合成代谢的拉曼光谱分析 [J]. 光学学报, 2016, 36(4): 0417001.
- [15] Xie C G, Dinno M A, Li Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells [J]. Optics Letters, 2002, 27(4): 249-251.
- [16] Tao Zhanhua, Liu Junxian, Shi Deqiang, et al. Analysis of staphyloxanthin biosynthesis using single cell Raman spectroscopy [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(3): 456-461.
陶站华, 刘军贤, 师德强, 等. 基于单细胞拉曼光谱技术的葡萄球菌黄素生物合成分析 [J]. 分析化学, 2016, 44(3): 456-461.
- [17] Pelz A, Wieland K P, Putzbach K, et al. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(37): 32493-32498.
- [18] Hanses F, Roux C, Dunman P M, et al. *Staphylococcus aureus* gene expression in a rat model of infective endocarditis [J]. Genome Medicine, 2014, 6(10): 93.
- [19] Garnett J P, Braun D, Mccarthy A J, et al. Fructose transport-deficient *Staphylococcus aureus* reveals important role of epithelial glucose transporters in limiting sugar-driven bacterial growth in airway surface liquid [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71(23): 4665-4673.
- [20] Redel H, Gao Z, Li H, et al. Quantitation and composition of cutaneous microbiota in diabetic and nondiabetic men [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2013, 207(7): 1105-1114.
- [21] Bader M S. Hyperglycemia and mortality in elderly patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia [J]. Southern Medical Journal, 2007, 100(3): 252-256.
- [22] Wang Y, Di H, Chen F, et al. Discovery of benzocycloalkane derivatives efficiently blocking bacterial virulence for the treatment of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infections by targeting diapophytoene desaturase (CrtN) [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2016, 59(10): 4831-4848.
- [23] Chen F, Di H, Wang Y, et al. Small-molecule targeting of a diapophytoene desaturase inhibits *S. aureus* virulence [J]. Nature Chemical Biology, 2016, 12(3): 174-179.
- [24] Bindu B S C, Mishra D P, Narayan B. Inhibition of virulence of *Staphylococcus aureus*—a food borne pathogen—by squalene, a functional lipid [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 224-234.