

文章编号: 1000-5692(2005)05-0553-05

茶多酚的抑菌活性研究

唐裕芳, 张妙玲, 冯波, 陈权, 刘新乐, 邓孝平

(湘潭大学 化工学院, 湖南 湘潭 411105)

摘要: 采用平板计数法和滤纸片法研究了茶多酚对细菌、酵母和霉菌的抑菌活性及茶多酚质量浓度、pH 值、温度和食盐质量浓度对抑菌活性的影响。结果表明: 茶多酚对细菌有较强的抑菌活性, 而对供试的酵母和霉菌抑制作用不明显; 茶多酚对供试菌种的最低抑菌质量浓度不超过 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最佳抑菌质量浓度为 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 在自然 pH 值和中性偏碱性环境中的抑菌活性比强碱性环境的抑菌活性强; 一定温度内处理不影响茶多酚的抑菌活性; 食盐可增强茶多酚的抑菌活性。表 6 参 18

关键词: 茶多酚; 抑菌活性; 抑菌浓度

中图分类号: TS201.3; S718.43 **文献标识码:** A

茶多酚是茶叶中酚类物质及衍生物的总称, 其中主体儿茶素类为 2-苯基苯并吡喃的衍生物^[1,2]。现代科学已证实它有止渴提神、延缓衰老^[3,4]、抗肿瘤和抗辐射^[5]等作用, 是很强的天然抗氧化剂, 同时对微生物具有较强的抑制作用^[8~11], 现已大量应用于食品、医疗、日用化工、轻工等多方面^[12~16]。本文主要报道茶多酚的抑菌活性及茶多酚质量浓度、pH 值、温度和食盐质量浓度对茶多酚抑菌活性的影响, 以期茶多酚作为一种天然食品防腐剂奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

供试茶多酚由浙江大学提供, 茶多酚 $> 950 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 儿茶素 $> 800 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, EGCG $> 400 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 咖啡碱 $< 2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

供试细菌、霉菌和酵母均由湘潭大学微生物实验室提供。其中细菌有大肠杆菌 *Escherichia coli*, 枯草芽孢杆菌 *Baillus subtilis*, 变形杆菌 *Proteus vuigatis*, 蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*; 霉菌有橘青霉 *Penicillium citrinum*, 黄曲霉 *Aspergillu flaws*, 总状毛霉 *Mucor racenosus*, 米根霉 *Rhizopus oryzae*; 啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。

1.2 实验方法

1.2.1 圆滤纸片的准备 将滤纸剪成直径为 9 mm 的圆片, 高温蒸汽杀菌后烘干备用。

1.2.2 菌悬液的制备 ①细菌和酵母菌悬液的制备: 用接种环挑取 3~4 环培养 20 h 左右的大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和培养 40 h 的酵母分别于带无菌玻璃珠的无菌水中制成菌体浓度为 $10^{11-12} \text{ cfu} \cdot \text{L}^{-1}$ 的菌悬液。②霉菌孢子悬液的制备。用接种环挑取 4~

收稿日期: 2005-01-10; 修回日期: 2005-06-03

作者简介: 唐裕芳, 讲师, 从事食品生物技术研究 E-mail: cexecc@sohu.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

5 环培养 5 d 左右的青霉、曲霉和根霉孢子于带无菌玻璃珠的无菌水中制成孢子浓度为 10^{11-12} cfu \cdot L $^{-1}$ 的孢子悬液。③含菌平板的制作。将融化并冷却到 50 $^{\circ}$ C 左右的牛肉膏蛋白胨培养基倾入滴有 0.5 mL 菌悬液或孢子悬液的培养皿中约 15.0 mL, 迅速摇匀制成含菌平板; 或将融化的牛肉膏蛋白胨培养基倾入灭菌培养皿中待凝固后滴入 0.5 mL 菌悬液, 用灭菌涂布环将菌悬液涂布均匀即成含菌平板。待用。

1.2.3 茶多酚抑菌效果的定性实验 采用滤纸片法^[17]。将茶多酚配成质量浓度为 3, 5 和 8 g \cdot L $^{-1}$ 的水溶液(表 1), 将已杀菌烘干的圆滤纸片浸入茶多酚溶液中 8~12 h, 捞出沥干, 贴于含菌平板中。一平板贴 3 片滤纸片, 呈正三角形, 重复 2 个平板, 倒置培养 24 h, 测定茶多酚抑菌圈大小, 同时以水做空白试验。

1.2.4 茶多酚的 MIC 测定 采用平板计数法^[18]。将茶多酚配成质量浓度为 1.0 g \cdot L $^{-1}$ 以下的水溶液, 分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 和 1.0 g \cdot L $^{-1}$ 等质量浓度, 移取一定体积的各质量浓度的茶多酚溶液于灭菌平板中, 再滴入一定体积的菌悬液, 倾入 15 mL 融化后冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右的牛肉膏蛋白胨培养基, 让它们充分混匀, 待含菌培养基凝固后倒置培养 24 h 后计菌落数。重复 2 个平板。以不加茶多酚溶液只加菌悬液为对照。

1.2.5 茶多酚最佳抑菌质量浓度 将茶多酚配制成质量浓度为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 和 8 g \cdot L $^{-1}$ 的水溶液(pH 为自然 pH 值), 如 1.2.3 所述的操作, 确定茶多酚最佳抑菌质量浓度。

1.2.6 pH 值对茶多酚抑菌活性的影响

将茶多酚水溶液用氢氧化钠和盐酸调配成 7 个 pH 值梯度(4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9, 9~10, 10~11), 然后用滤纸片法观察 pH 值对茶多酚抑菌活性的影响。重复 2 个平板。

表 1 茶多酚抑菌作用的定性实验结果

Table 1 The result of tea polyphenol's anti-microbial activities

| 测试菌体 | 茶多酚质量浓度/(g \cdot L $^{-1}$) | 滤纸圆片法抑菌圈直径/mm | 抑制作用 |
|---------|--------------------------------|---------------|---------|
| 金黄色葡萄球菌 | 3 | 13.5 | 有抑制作用 |
| | 5 | 13.4 | 有抑制作用 |
| | 8 | 11.4 | 有抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 大肠杆菌 | 3 | 13.0 | 有抑制作用 |
| | 5 | 14.8 | 有抑制作用 |
| | 8 | 14.8 | 有抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 变形杆菌 | 3 | 12.0 | 有抑制作用 |
| | 5 | 13.2 | 有抑制作用 |
| | 8 | 16.0 | 有抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 沙门氏菌 | 3 | 11.7 | 有抑制作用 |
| | 5 | 14.3 | 有抑制作用 |
| | 8 | 15.8 | 有抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 蜡状芽孢杆菌 | 3 | 12.6 | 有抑制作用 |
| | 5 | 12.0 | 有抑制作用 |
| | 8 | 18.0 | 有抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 枯草芽孢杆菌 | 3 | 15.1 | 有抑制作用 |
| | 5 | 13.5 | 有抑制作用 |
| | 8 | 11.4 | 有抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 黄曲霉 | 3 | — | 无明显抑制作用 |
| | 5 | — | 无明显抑制作用 |
| | 8 | — | 无明显抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 橘青霉 | 3 | — | 无明显抑制作用 |
| | 5 | — | 无明显抑制作用 |
| | 8 | — | 无明显抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 米根霉 | 3 | — | 无明显抑制作用 |
| | 5 | — | 无明显抑制作用 |
| | 8 | — | 无明显抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 总状毛霉 | 3 | — | 无明显抑制作用 |
| | 5 | — | 无明显抑制作用 |
| | 8 | — | 无明显抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |
| 啤酒酵母 | 3 | — | 无明显抑制作用 |
| | 5 | — | 无明显抑制作用 |
| | 8 | — | 无明显抑制作用 |
| | 0 | 0 | 无抑制作用 |

1.2.7 温度对茶多酚抑菌活性影响 将茶多酚水溶液在 $-20, 4, 24, 70, 85, 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 等 6 个温度下处理一定时间, 同样采用滤纸片法观察温度对茶多酚抑菌活性的影响。重复 2 个平板。

1.2.8 食盐质量浓度对茶多酚抑菌活性的影响 用食盐(氯化钠)将配制好的茶多酚水溶液调制质量浓度为 $0, 30, 50, 100, 150, 200,$ 和 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐溶液, 然后使用滤纸片法观察食盐质量浓度对茶多酚抑菌活性的影响。

2 实验结果与分析

2.1 茶多酚抑菌作用的定性试验

从表 1 可知, 试验的几种质量浓度的茶多酚溶液对供试的霉菌和酵母无明显的抑制作用, 而对细菌如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌和蜡状芽孢杆菌有较为明显的抑制作用。被抑制的细菌中既有革兰氏阳性菌又有革兰氏阴性菌, 既有球菌, 又有杆菌, 可见茶多酚有着广谱的抑菌作用。

2.2 茶多酚的最小(MIC)和最佳抑菌质量浓度

由表 2~3 可知, 随着质量浓度的增加, 茶多酚的抑菌活性增强, 当茶多酚质量浓度增加到 $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 用平板计数法观察到对某些细菌就有较明显的抑制作用, 如枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和变形杆菌等, 但用滤纸片法观察不到明显的抑菌圈, 当茶多酚质量浓度增加到 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对有些供试的细菌有较明显的抑菌圈, 当茶多酚质量浓度增加到 $4.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以后抑菌圈的大小增大就已经比较平缓。考虑到经济成本, 茶多酚对大多数供试细菌的最佳抑菌质量浓度为 $4.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, MIC 不超过 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这也符合食品添加剂卫生标准。

表 2 平板计数法测得不同茶多酚质量浓度对细菌作用后的菌落数

Table 2 The colony forming units of different contents of TP on bacteria by plating count

| 菌种 | 菌落数/(cfu $\cdot\text{L}^{-1}$) | | | | | | |
|---------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------------------|
| | 对照(无菌水) | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| 金黄色葡萄球菌 | 400 | 280 | 220 | 240 | 140 | 40 | 30 |
| 大肠杆菌 | 400 | 180 | 160 | 160 | 130 | 140 | 40 |
| 枯草芽孢杆菌 | 400 | 100 | 90 | 80 | 84 | 12 | 10 |
| 蜡状芽孢杆菌 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 38 | 30 |
| 变形杆菌 | 400 | 270 | 120 | 130 | 100 | 60 | 50 |
| 沙门氏菌 | 400 | 400 | 400 | 240 | 239 | 160 | 100 |

表 3 滤纸片法测得不同质量浓度茶多酚对细菌的抑菌圈直径

Table 3 The diameters of inhibition zone of different contents of TP to bacteria by the paper filtering method

| 菌种 | 抑菌圈直径/mm | | | | | | | |
|---------|----------|------|------|------|------|------|------|--------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| 大肠杆菌 | 9.2 | 9.5 | 12.7 | 15.1 | 15.1 | 15.3 | 15.3 | 15.2 |
| 枯草芽孢杆菌 | 9.5 | 18.0 | 15.1 | 15.4 | 13.5 | 15.1 | 11.3 | 15.8 |
| 沙门氏菌 | 9.7 | 13.2 | 11.7 | 14.4 | 14.3 | 13.7 | 14.9 | 15.8 |
| 金黄色葡萄球菌 | 12.5 | 16.7 | 13.5 | 18.8 | 13.4 | 12.9 | 15.0 | 11.4 |
| 变形杆菌 | 9.0 | 9.0 | 12.3 | 12.3 | 13.3 | 14.8 | 15.6 | 15.5 |
| 蜡状芽孢杆菌 | 9.0 | 10.2 | 13.1 | 16.0 | 12.9 | 19.2 | 16.7 | 17.2 |

2.3 pH 值对茶多酚抑菌活性的影响

由表 4 可知, pH 值对茶多酚抑菌活性的影响较大, 在酸性和中性环境中抑菌活性较好并且较稳定。pH 值为 7~8 的时候抑菌活性最强, 但随着碱性的增强, 茶多酚的抑菌活性下降。

2.4 温度对茶多酚抑菌活性的影响

由表 5 可知, 经低温长时间放置和高温短时间加热处理后茶多酚的抑菌圈变化不大, 即低温长时

间放置和高温短时加热对茶多酚抑菌活性影响不大。

表4 不同pH值的茶多酚溶液对细菌的抑菌圈直径

Table 4 The diameters of inhibition zone of different pH of TP to bacteria

| 菌种 | 抑菌圈直径/mm | | | | | | |
|---------|----------|------|------|------|------|------|------|
| | pH=4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 沙门氏菌 | 14.0 | 13.8 | 13.8 | 14.3 | 15.5 | 14.6 | 12.5 |
| 枯草芽孢杆菌 | 14.5 | 14.6 | 15.2 | 17.0 | 16.3 | 15.0 | 13.4 |
| 蜡状芽孢杆菌 | 16.0 | 15.5 | 14.7 | 15.7 | 17.4 | 15.6 | 13.5 |
| 大肠杆菌 | 11.8 | 12.9 | 12.7 | 13.8 | 15.0 | 14.4 | 12.8 |
| 金黄色葡萄球菌 | 15.7 | 13.9 | 12.4 | 13.3 | 11.6 | 10.3 | 10.1 |
| 变形杆菌 | 16.2 | 16.0 | 14.6 | 15.4 | 11.2 | 9.0 | 9.2 |

说明: 茶多酚质量浓度为 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表5 不同温度处理后的茶多酚对细菌的抑菌圈直径

Table 5 The diameters of inhibition zone of TP treated by different temperatures to bacteria

| 菌种 | 抑菌圈直径/mm | | | | | |
|---------|--|---|--|--|--|--|
| | $-20 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ d}$ | $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ 30 d}$ | $24 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ 10 d}$ | $70 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ 20 min}$ | $85 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ 10 min}$ | $100 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ 2 min}$ |
| 大肠杆菌 | 14.2 | 14.8 | 14.0 | 13.0 | 14.0 | 12.8 |
| 金黄色葡萄球菌 | 11.9 | 11.3 | 12.3 | 12.1 | 11.7 | 11.2 |
| 枯草芽孢杆菌 | 11.5 | 11.0 | 11.8 | 11.6 | 11.0 | 12.0 |
| 蜡状芽孢杆菌 | 11.3 | 11.3 | 11.0 | 11.3 | 11.6 | 11.4 |
| 沙门氏菌 | 12.9 | 13.0 | 14.4 | 11.4 | 11.6 | 11.4 |
| 变形杆菌 | 12.9 | 12.7 | 12.4 | 12.1 | 12.3 | 104.0 |

说明: 茶多酚质量浓度为 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 食盐质量浓度对茶多酚抑菌活性的影响

从表6可知, 茶多酚中加一定量的食盐可增强它的抑菌活性, 并在一定范围内随食盐质量浓度的增加, 茶多酚抑菌活性增强具量效关系。

表6 加不同质量浓度食盐的茶多酚对细菌的抑菌圈直径

Table 6 The diameters of inhibition zone of TP added NaCl to bacteria

| 菌种 | 抑菌圈直径/mm | | | | | | |
|---------|----------|------|------|------|------|------|-------------------------------------|
| | 0 | 30 | 50 | 100 | 150 | 200 | $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 金黄色葡萄球菌 | 15.8 | 15.0 | 17.3 | 16.8 | 15.8 | 16.8 | 17.5 |
| 大肠杆菌 | 16.5 | 18.1 | 17.1 | 17.5 | 20.0 | 20.0 | 20.3 |
| 枯草芽孢杆菌 | 14.9 | 17.0 | 17.5 | 15.2 | 15.9 | 15.0 | 16.8 |
| 沙门氏菌 | 15.5 | 17.0 | 15.0 | 17.5 | 15.7 | 17.9 | 19.3 |
| 蜡状芽孢杆菌 | 15.3 | 15.0 | 14.4 | 15.5 | 13.9 | 17.0 | 16.0 |
| 变形杆菌 | 15.0 | 17.4 | 15.9 | 15.2 | 17.7 | 17.0 | 19.4 |

说明: 所有处理中茶多酚的质量浓度均为 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 结论

茶多酚对细菌有较强的抑制作用, 对霉菌和酵母没有很明显的抑制作用, 对细菌的最低抑制质量浓度(MIC)不超过 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 最佳抑菌质量浓度为 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

低温长时间放置和高温短时间加热对茶多酚的抑菌活性影响不大。

pH值影响茶多酚的抑菌活性, 茶多酚在酸性和中性环境的抑菌活性较碱性环境稳定, 但抑菌活性最强的pH值范围为7~8, 随着碱性的增加茶多酚抑菌活性下降。

食盐能增强茶多酚的抑菌活性, 并随食盐质量浓度的增加, 茶多酚抑菌活性呈量效关系。

致谢: 特别感谢浙江大学杨贤强教授和浙江理工大学胡秀芳教授的支持和帮助。

参考文献:

[1] 安徽农业大学. 茶叶生物化学[M]. 北京: 农业出版社, 1988.

[2] 陈为钧, 万圣勤. 茶叶中多酚类物质的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1994, 6(3): 75-80.

- [3] 傅锦坤, 于腊佳. 茶多酚对自由基抑制效应[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1998, 37(5): 727-731.
- [4] 方若莹, 方国明, 俞越汉, 等. 茶多酚和槲皮素对全血吞噬细胞产生活性氧的抑制作用[J]. 浙江大学学报: 工学版, 1998, 32(2): 163-167.
- [5] 朱孝峰, 刘宗潮, 潘启超, 等. 绿茶提取物对肿瘤细胞 DNA 引物酶——多聚酶 A 复合体活性的影响[J]. 癌症, 1997, 16(3): 161-164.
- [6] 曹明富. 茶多酚对小鼠辐射损伤的防护效应[J]. 茶叶科学, 1998, 18(2): 139-144.
- [7] 周才琼, 程道梅, 谢静. 茶多酚对菜籽色拉油的抗氧化作用研究[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(4): 350-352.
- [8] 黄祖法, 唐明德, 温琼英. 茶叶的抑菌效果研究初报[J]. 茶叶通讯, 1991, (1): 19-22.
- [9] 王济安. 茶汤抑菌作用的试验报告[J]. 茶报, 1998(1): 12-13.
- [10] 董金萼, 李瑶卿, 洪绍梅. 茶多酚对 8 种致病菌最低抑制浓度的研究[J]. 食品科学, 1995, 16(1): 6-12.
- [11] 杨贤强. 茶多酚化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
- [12] 杨贤强. 天然抗氧化剂——茶多酚的开发与应用[J]. 福建茶叶, 1990, (3): 9-13.
- [13] 白城聪, 原征彦. 茶カテキン类の抗酸化作用とその利用[J]. 食品工业, 1992, 35(18): 34-39.
- [14] 董士林. 茶叶天然抗氧化剂的开发应用研究[J]. 茶叶通讯, 1991, (1): 21-24.
- [15] 舒庆龄. 茶多酚在化妆品中的应用研究[J]. 茶叶通报, 1996, (2): 39-40.
- [16] 余铀. 两种天然抗氧化剂对猪肉保鲜效果的比较研究[J]. 食品科学, 1995, 16(10): 69-71.
- [17] 钱存柔. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- [18] 张文治. 新编食品微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.

Anti-microbial activities of tea-polyphenol

TANG Yu-fang, ZHANG Miao-ling, FENG Bo, CHEN Quan, LIU Xin-le, DENG Xiao-ping

(College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, Hunan, China)

Abstract: The anti-microbial activities of tea-polyphenol and the effects of the factors including concentration, pH value, temperature, NaCl concentration on the anti-microbial activities were studied by plate count and filtering paper method. The results showed that tea-polyphenol had strong inhibition on bacteria activities but no distinct inhibition on yeast and mold. The minimum anti-microbial concentration of tea-polyphenol was no more than $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the optimum anti-microbial concentration was $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Anti-microbial activities in natural pH value, neutral and low alkali environment were stronger than those in the high alkali environment. Anti-microbial activities of tea-polyphenol would not be affected in a certain temperature scope. NaCl could strengthen the anti-microbial activity of tea-polyphenol. [Ch, 6 tab. 18 ref.]

Key words: tea-polyphenol; anti-microbial activity; anti-microbial concentration