

普洱茶与绿茶提取物体外抑菌效应的研究

胡永金¹, 乔金玲², 葛长荣^{2,*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘 要: 采用滤纸片扩散法分别研究不同浓度的普洱茶和绿茶提取物对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、猪粪链球菌(*S. faecalis*)、大肠杆菌(*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和炭疽杆菌(*B. anthracis*) 6株食源性微生物和致病菌的抑制效果及其最小抑菌浓度(MIC)。结果表明: 普洱茶提取物在1%~7%(m/V)范围内对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)有较强的抑制作用, 其MIC为0.07mg/ml, 在5%~7%范围内对所有供试菌种均有抑制作用, 对炭疽杆菌的抑制效果最好。绿茶提取物在1%~2%(m/V)范围内仅对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)有抑制作用, 其MIC为0.09mg/ml, 在3%时仅对炭疽杆菌(*B. anthracis*)无抑制作用, 在4%~7%范围内对所有供试菌种都有抑制作用, 对猪粪链球菌抑制效果最好。

关键词: 普洱茶; 绿茶; 致病菌; 体外抑菌活性; 最小抑菌浓度(MIC)

in vitro Antibacterial Activity of Pu'er Tea and Green Tea Extracts

HU Yong-jin¹, QIAO Jin-ling², GE Chang-rong^{2,*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Animal Sciences and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The filter paper disc diffusion method was employed to determine the *in vitro* antibacterial activities of water extracts from Pu'er tea and green tea against 6 foodborne pathogenic bacterial species including *L. monocytogenes*, *S. faecalis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* and *B. anthracis* and the minimal inhibition concentrations (MICs). The results showed that the extract from Pu'er tea displayed higher antibacterial activity against *L. monocytogenes* within the concentration range of 1%—7% (m/V) and the MIC was 0.07 mg/ml, and this extract presented inhibitory activity against all the 6 bacterial species within the concentration range of 5%—7%, especially against *B. anthracis*. However, the green tea extract only demonstrated inhibitory activity within the range of 1%—2% against *L. monocytogenes*, with the MIC of 0.09 mg/ml, but at the concentration of 3% this extract exhibited inhibitory activity against other 5 bacterial species except *B. anthracis*, while it exhibited inhibitory activity against all the 6 bacterial species within the range of 4%—7%, having the highest activity against *S. faecalis*.

Key words: Pu'er tea; green tea; pathogenic bacteria; *in vitro* antibacterial activity; minimum inhibitory concentration (MIC)

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)13-0056-04

茶叶除具有抗氧化、抗突变、抗肿瘤、降脂、护肝、抗衰老、调节免疫等多种药理学作用外, 还具有广谱、强效的抗菌作用, 国内外的学者对其具有抑菌作用的化学组分和机理有一定的研究^[1-3]。唐裕芳等采用平板计数法和滤纸片法研究了茶多酚对细菌等微生物的抑菌活性, 结果表明茶多酚对细菌具有较强的抑菌活性^[4]。郭远华等采用微生物学方法检测了几茶素对细菌的抑制作用并提出了几茶素抑菌作用的可能机制^[5]。严赞开等采用一系列真菌和细菌考察咖啡因的抑菌作用, 结果表

明, 咖啡因对食品常见污染菌有明显的抑菌作用^[6]。

普洱茶和绿茶独特的化学组成预示着它们的体外抑菌作用在食品工业和医药行业的应用具有相当广阔的前景, 但目前国内外对茶叶特别是普洱茶粗提物的体外抑菌效应的研究还很少, 大多研究停留在对茶叶中的某个或几个单体化学成分的单一体抑菌效应, 而普洱茶和绿茶的化学活性成分很多, 各个成分之间在功能上的协同效应是不可忽略的, 且单体化学活性成分的研究和应用的成本较高, 作为开发新一代防腐剂的应用和推广程度不

收稿日期: 2008-11-16

基金项目: 云南省自然科学基金项目(2005C0040M)

作者简介: 胡永金(1972—), 男, 副教授, 博士, 主要从事食品质量与安全研究。E-mail: huyjin@126.com

* 通讯作者: 葛长荣(1962—), 男, 教授, 主要从事畜产品加工与品质的研究。E-mail: gcrzal@126.com

高。因此,无论是通过普洱茶和绿茶提取其有效活性成分作为食品的保鲜剂,还是直接利用其深加工的产品作为中药的辅助治疗配方,都将作为今后食品行业和医药行业研究开发新产品的发展方向。本研究针对不同的腐败菌或致病菌,通过对比不同浓度普洱茶和绿茶提取物的体外抑菌效应和最小抑菌浓度(MIC),旨在为茶叶提取物在食品中的进一步开发和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

普洱茶、绿茶均由云南农业大学龙润普洱茶学院提供。

琼脂培养基 上海山浦化工有限公司;结晶紫胆盐培养基、麦康凯培养基 杭州天和试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

电热鼓风干燥箱 上海市实验仪器总厂;电热恒温培养箱 泸南实验仪器厂;LDZX-40B1型立式自动电热压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂;RE-52型旋转式蒸发器 上海安亭电子仪器厂;BS110S型电子天平 北京赛多利斯天平有限公司;游标卡尺(规格(0~150)mm×0.02 mm) 安徽桐城量具厂;Synergy185超纯水系统(Uv) 美国Millipore公司;恒温水浴锅 太仓实验设备厂;微量移液枪 德国Brand公司;超净工作台、植物粉碎机。

1.3 供试菌种及活化培养基

本实验所使用的6种菌种其来源及活化培养基见表1。

表1 菌种类来源及活化培养基

Table 1 Provider of 6 bacterial species and media used for activating them

菌种名称	来源	活化培养基
大肠杆菌(<i>E.coli</i>)	云南农大食品学院微生物实验室	马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)
鼠伤寒沙门氏菌(<i>S.typhimurium</i>)	云南农大动物科学学院实验室	伊红美蓝琼脂(EMB)
金黄色葡萄球菌(<i>S.aureus</i>)	云南农大食品学院微生物实验室	营养琼脂
李斯特氏菌(<i>L.monocytogenes</i>)	云南农大食品学院微生物实验室	营养琼脂
猪粪链球菌(<i>S.faecalis</i>)	云南农大食品学院微生物实验室	营养琼脂
炭疽杆菌(<i>B.anthraxis</i>)	云南农大动物科学学院实验室	营养琼脂

1.4 方法

1.4.1 普洱茶和绿茶提取物制备

普洱茶或绿茶样品通过植物粉碎机粉碎,过80目筛。取茶粉以1:10(m/V)的茶水比在沸蒸馏水中30min浸提2次,浸提液合并,真空旋转干燥至恒重,得到普洱茶或绿茶提取物样品,贮藏于4℃备用。

1.4.2 菌悬液制备

供试菌从4℃冰箱中取出后,接种于新鲜斜面培养基上,细菌经37℃恒温24h培养活化后,用无菌生理盐水制备菌悬液。吸取1.00ml菌悬液加入9.00ml无

菌生理盐水中,得到稀释10倍的菌悬液,依次采用二倍管法进行梯度稀释。将不同稀释度的菌悬液各吸取0.20ml分别加入到灭菌冷却的各自适宜的平板培养基表面,涂布均匀,按上述条件培养。根据观察结果,选取各自适宜的菌液浓度,要求在该浓度下菌能长满整个培养皿且分布均匀。

1.4.3 滤纸片扩散法

采用打孔机将滤纸制成直径为9mm的圆纸片,灭菌后分别置于不同质量分数(1%~7%)的茶粉提取物溶液中浸泡12h,取出滤纸片逐个贴于倾注了金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)、猪粪链球菌(*S.faecalis*)、大肠杆菌(*E.coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*)、李斯特氏菌(*L.monocytogenes*)和炭疽杆菌(*B.anthraxis*)菌悬液的培养基表面。以无菌水接种作为对照。置于37℃恒温培养箱24h后测定抑菌圈直径,以抑菌圈直径作为茶粉提取物抑菌活性指标,直径越大抗菌活性越强。

1.4.4 最小抑菌浓度测定

参照文献[7]方法,配制10个浓度梯度的普洱茶和绿茶提取物溶液,并与涂布了李斯特氏菌(*L.monocytogenes*)、猪粪链球菌(*S.faecalis*)、大肠杆菌(*E.coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和炭疽杆菌(*B.anthraxis*)的选择培养基混合均匀,接种后在相同条件下培养。逐渐缩小提取物浓度,直到第一个没有菌落生长的培养皿出现为止,记录下该培养皿中倾注的提取物的浓度,即为该提取物的最小抑菌浓度(MIC)。

2 结果与分析

2.1 普洱茶提取物的抑菌效应

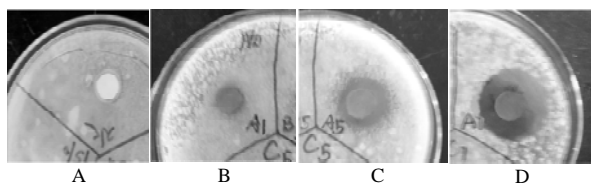
普洱茶对李斯特氏菌(*L.monocytogenes*)、猪粪链球菌(*S.faecalis*)、大肠杆菌(*E.coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S.typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)和炭疽杆菌(*B.anthraxis*)的抑菌效果分别见表2、3和图1。

表2 普洱茶抑菌圈直径测量结果(mm)

Table 2 Inhibition zone diameters of Pu'er tea extract at different concentrations against 6 bacterial species (mm)

供试菌	质量分数(%)						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>E. coli</i>	—	—	9.22	9.82	12.38	12.24	14.22
<i>S. typhimurium</i>	—	11.02	11.24	11.92	12.21	12.38	13.18
<i>S. aureus</i>	—	—	11.68	11.32	12.18	12.76	12.92
<i>L. monocytogenes</i>	10.44	11.22	11.62	12.64	12.86	13.98	14.12
<i>S. faecalis</i>	—	—	—	—	11.00	12.66	13.88
<i>B. anthracis</i>	—	—	—	10.53	12.60	14.68	17.21

注:“—”表示无抑菌现象。



A. 对照组(水); B.1% 普洱茶提取物; C. 5% 普洱茶提取物; D.7% 普洱茶提取物。

图1 普洱茶提取物对大肠杆菌的抑菌圈

Fig.1 Images of inhibition zone of Pu'er tea extract at different concentrations against *E. coli*

从表2可看出,不同浓度的普洱茶提取物对不同的菌种其抑菌效果不完全相同,当普洱茶提取物的浓度为1%时,仅对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)有抑制作用且效果不显著;当普洱茶提取物的浓度为4%时,仅对猪粪链球菌(*S. faecalis*)没有抑菌作用;当普洱茶提取物的浓度达到5%时,对所有供试菌种均有明显的抑制作用,其中效果最明显的是李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)。抑菌效果随普洱茶提取物浓度的升高而呈现递增趋势,在普洱茶提取物浓度在7%时,对不同供试菌种的抑菌效果从大到小排列为:炭疽杆菌(*B. anthracis*)、大肠杆菌(*E. coli*)、李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、猪粪链球菌(*S. faecalis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)。

表3 普洱茶最小抑菌浓度测定结果

Table 3 MICs of Pu'er tea extract against 6 bacterial species

菌种	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>B. anthracis</i>
MIC(mg/ml)	0.48	0.18	0.74	0.07	0.42	0.50

由表3可见,普洱茶提取物的最小抑菌浓度结果表明,抑菌效果最好的是李斯特氏菌(*L. monocytogenes*),这与抑菌圈实验结果完全吻合。

2.2 绿茶提取物的抑菌效果

表4 绿茶抑菌圈直径测定结果 (mm)

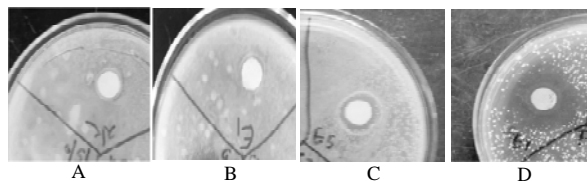
Table 4 Inhibition zone diameters of green tea extract at different concentrations against 6 bacterial species (mm)

供试菌	质量分数(%)						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>E. coli</i>	—	—	9.14	10.22	10.66	12.00	14.26
<i>S. typhimurium</i>	—	—	9.38	10.26	11.00	12.00	12.00
<i>S. aureus</i>	—	—	11.70	12.00	12.86	13.70	14.84
<i>L. monocytogenes</i>	10.10	10.98	11.46	12.68	13.48	14.20	15.34
<i>S. faecalis</i>	—	—	9.78	10.76	11.78	14.92	24.44
<i>B. anthracis</i>	—	—	—	11.84	12.62	14.56	15.02

注:“—”表示无抑菌现象。

绿茶对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、猪粪链球菌(*S. faecalis*)、大肠杆菌(*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S.*

typhimurium)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和炭疽杆菌(*B. anthracis*)的抑菌效果分别见表4、5和图2。



A. 对照组(水); B.1% 绿茶提取物; C.5% 绿茶提取物; D.7% 绿茶提取物。

图2 绿茶提取物对大肠杆菌的抑菌圈

Fig.2 Images of inhibition zone of green tea extract at different concentrations against *E. coli*

绿茶提取物对于不同的菌种其抑菌效果也不完全相同,当绿茶提取物的浓度在1%和2%时,仅对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)有较小的抑制作用;当绿茶提取物的浓度在3%时,仅对炭疽杆菌(*B. anthracis*)没有抑菌作用;当绿茶提取物的浓度达到4%时,对所有供试菌种均有明显的抑制作用,其中效果最明显的是李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)。总体上其抑菌效果随绿茶提取物浓度的升高而呈现递增趋势,在绿茶提取物为7%时,对不同供试菌种的抑菌效果从大到小排列为:猪粪链球菌(*S. faecalis*)、李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、炭疽杆菌(*B. anthracis*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)。

表5 绿茶最小抑菌浓度测定结果

Table 5 MICs of green tea extract against 6 bacterial species

菌种	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>B. anthracis</i>
MIC(mg/ml)	0.42	0.28	0.20	0.09	0.28	0.28

由表5可知,绿茶提取物抑菌效果最好的也是李斯特氏菌(*L. monocytogenes*),这与抑菌圈实验结果完全吻合。

3 讨论

从抑菌圈直径趋势来看,随着两种茶叶提取物浓度的增大,抑菌圈的直径呈上升趋势,其中普洱茶提取物对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑菌效果随浓度的变化趋势不大,对大肠杆菌(*E. coli*)、猪粪链球菌(*S. faecalis*)、炭疽杆菌(*B. anthracis*)的抑菌效果随浓度的变化较为急剧,特别对于炭疽杆菌(*B. anthracis*)的抑菌效果随浓度的变化呈明显上升的趋势。与普洱茶提取物相比,绿茶提取物对6种微生物的抑制作用除粪链球菌(*S. faecalis*)较为明显外,其余5种效果一般。但两种茶叶对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)的最小抑菌浓度在所有供试菌种中均是最低的。李斯特氏菌(*L.*

monocytogenes)是一种广泛存在于动物性食品中的人畜共患病的病原体,该菌在4℃的环境中仍可生长繁殖,是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一,通过普洱茶和绿茶提取物对冷却制品(如肉制品)的处理,可望有效解除这些制品受李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)污染的安全隐患。

4 结 论

4.1 普洱茶和绿茶对不同的微生物菌种的抑制作用效果不同,在1%~7%的浓度范围内,对不同供试菌种的抑菌效果随提取物浓度的增大而逐渐增大,其抑菌圈直径从大到小排列,普洱茶为:炭疽杆菌(*B. anthracis*)、(*S. typhimurium*)、大肠杆菌(*E. coli*)、李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、猪粪链球菌(*S. faecalis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*);绿茶为:猪粪链球菌(*S. faecalis*)、李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)、炭疽杆菌(*B. anthracis*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)。

4.2 普洱茶和绿茶对6种供试菌的最小抑菌浓度低于

0.8mg/ml;其中绿茶对6种供试菌种中的5种菌种MIC均小于0.3mg/ml;两种茶叶对李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)的MIC在所有供试菌种中最小,普洱茶为0.07mg/ml,绿茶为0.09mg/ml。

参考文献:

- [1] WU S C, YEN G C, WANG B S. Antimutagenic and antimicrobial activities of Pu-erh tea[J]. Food Science and Technology, 2007, 40(3): 506-512.
- [2] TIWARI R P, BHARTI S K, KAUR H D, et al. Synergistic antimicrobial activity of tea and antibiotics[J]. Indian J Med Res, 2005, 122: 80-84.
- [3] LEE H C, JENNER A M, LOW C S, et al. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(9): 876-884.
- [4] 唐裕芳, 张妙玲, 冯波, 等. 茶多酚的抑菌活性研究[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(5): 553-557.
- [5] 郭远华, 邹国林. 儿茶素的抑菌作用及其与铁离子相互作用研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(4): 63-64.
- [6] 严赞开. 咖啡因的抑菌试验[J]. 中国农学通报, 2004, 20(3): 65-66.
- [7] 廖玉婷, 曹光群. 两种天然植物提取物的抑菌效果的快速评价与比较[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(4): 626-630.