

茶叶提取物的抑菌作用研究

赵艳琳¹, 张正健^{1,2}, 杨立颖¹

(1.天津科技大学, 天津 300222; 2.中国轻工业食品包装材料与技术重点实验室, 天津 300222)

摘要: **目的** 分析浸提温度、料液比、浸提时间、乙醇质量分数等条件对茶叶提取物抑菌性能的影响, 并研究茶叶提取物的抑菌能力。**方法** 利用超声波辅助浸提法提取茶叶中的有效成分, 利用纸片扩散法、两倍稀释法对提取物进行抑菌和稳定性分析。**结果** 茶叶的最佳提取条件中浸提温度为 70 ℃, 料液比(茶叶粉末质量与乙醇体积的配比)为 1:10 g/mL, 浸提时间为 30 min, 乙醇质量分数为 75%。茶叶提取物抑制 4 种供试菌生长时的最小体积分数均为 2.5%, 且在 1 个月内其抑菌能力均保持在 95%以上。**结论** 茶叶提取物具有较好的抑菌性能。

关键词: 超声波辅助浸提; 茶叶提取物; 抑菌

中图分类号: TB484.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3563(2017)11-0030-04

Antibacterial Property of Tea Extract

ZHAO Yan-lin¹, ZHANG Zheng-jian^{1,2}, YANG Li-ying¹

(1.Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China;

2.China Light Industry Key Laboratory of Food Packaging Materials and Technology, Tianjin 300222, China)

ABSTRACT: The work aims to analyze the effects of extraction temperature, solid-liquid ratio, extraction time and ethanol mass fraction, etc. on tea extract and study the antibacterial properties of tea extract. The active components of tea were extracted by ultrasonic assisted extraction. The antimicrobial properties and stability of the extract were analyzed by the method of paper diffusion and the double dilution method. The optimal extraction conditions of tea were extraction temperature of 70 ℃, solid-liquid ratio (ratio of tea powder mass and ethanol volume) of 1:10 g/mL, extraction time of 30 min and ethanol mass fraction of 75%. The minimum volume fraction of tea extracts for inhibiting the growth of 4 kinds of tested bacteria was 2.5%. Within one month, the antibacterial ability was stable and kept above 95%. The tea extract has good antibacterial properties.

KEY WORDS: ultrasonic assisted extraction; tea extract; antibacterial

随着我国科技水平的不断提高,具有抑菌能力的绿色环保、安全性高的茶叶提取物成为人们研究的热点^[1-5]。茶叶提取物的主要活性成分为茶多酚^[6],其中包含的表没食子儿茶素没食子酸酯和表儿茶素没食子酸酯具有抑菌作用^[7]。文中利用超声波辅助提取茶叶中的有效成分,得出茶叶活性成分的最佳提取条件,并对茶叶提取物进行抑菌性能研究。为新型抑菌产品的开发提供借鉴和参考。

1 实验

1.1 材料与设备

材料:绿茶(炒青茶叶),湖南星火茶叶有限公司。主要试剂:无水乙醇、NaCl,天津市景泓鑫商贸有限公司;琼脂粉、牛肉膏、蛋白胨,北京澳博星生物有限公司。供试菌种:金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌,天津科技大学食品工程与

收稿日期:2017-03-29

基金项目:天津市应用基础与前沿技术 Research 计划(15JCQNJC42300)

作者简介:赵艳琳(1992—),女,天津科技大学硕士生,主攻包装材料缓释抗菌。

通讯作者:张正健(1981—),男,天津科技大学副教授,主要研究方向为纳米纤维材料的制备和改性。

生物技术学院。主要实验仪器: 数控超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; 高速离心机(TG16G), 湖南凯达科学仪器有限公司; 旋转蒸发仪(RE-52A), 上海亚荣生化仪器厂; 全自动菌落计数系统(HICC-V), 杭州万深检测科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 茶多酚的提取实验

文中实验采用超声波辅助浸提技术提取茶叶中的有效成分, 具体实验步骤: 配置相应质量分数的乙醇溶液; 将茶叶粉末过 40 目筛后装入密封袋备用; 称取 10 g 粉末与乙醇溶液按照不同的料液比在锥形瓶中进行配比; 设置不同的超声温度和超声时间进行超声波浸提实验; 将冷却到室温的浸提物放入离心机中, 并在 3500 r/min 转速下离心 10 min; 将离心管中物质倒入真空抽滤装置中, 获得的滤液用旋转蒸发仪旋转减压蒸馏, 得到浸膏状液体提取物。

1.2.2 茶叶提取物抑菌性

1) 最低抑菌浓度的测定^[8]。用无菌营养肉汤将茶叶提取物对倍稀释成系列浓度, 然后用移液枪吸取 250 μL 供试菌液与各浓度的茶叶提取物混匀, 然后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 24 h, 最后以完全没有细菌生长的最低茶叶提取物的浓度为其最低抑菌浓度。

2) 抑菌活性的测定^[9]。首先将培养基倒入无菌培养皿中约 1/3 高度处。等培养基凝固后, 吸取 100 μL 的菌悬液(10^7 CFU/mL)滴在培养基表面, 用无菌的三角涂布棒涂布均匀。待菌悬液被完全吸收后, 用灭菌的镊子将直径为 6 mm 的无菌滤纸放在培养基上, 然后在每个滤纸片上加入 20 μL 的抑菌剂(用 20 μL 的无菌水作为空白对照), 待吸收完全后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h, 最后用游标卡尺测定各个提取条件下的抑菌圈直径大小。

3) 抑菌稳定性测定。将茶叶提取物储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中, 每隔一定时间采用抑菌圈法对茶叶提取物进行抑菌稳定性测试。

2 结果与分析

2.1 茶叶的超声辅助单因素提取实验

1) 浸提温度的确定。在料液比为 1:10 g/mL、浸提时间为 30 min、乙醇质量分数为 75%的条件下, 超声浸提温度对茶叶提取物抑菌效果的影响见表 1。可知, 随着温度的增加, 茶叶提取物的抑菌性能提高, 并在 70 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大, 说明温度的升高有利于有效成分的溶解, 提取出的活性成分增加, 抑菌圈直径增大。在 80 $^{\circ}\text{C}$ 时抑菌圈直径显著降低, 这是因为空穴气泡的产生、破裂等行为影响超声强度, 浓度和压力差等因素影响气泡爆破量。当温度太高时, 不利于气

泡的生成和爆破, 因此活性成分提取率下降, 抑菌圈直径变小^[10]。

2) 料液比的确定。在浸提温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 、浸提时间为 30 min、乙醇质量分数为 75%的条件下, 料液比对茶叶提取物抑菌效果的影响见表 1。可以看出, 茶叶提取物对 4 种供试菌的抑菌圈直径都在料液比为 1:10 g/mL 时达到最大。这是因为溶剂量增大时, 溶剂中的有效成分浓度变低, 与物料及溶剂边界层的有效成分浓度差增大, 有利于茶叶活性成分溶出, 因而提取率增大, 抑菌圈直径也相应增加^[11]。当料液比继续增大时, 抑菌圈直径下降, 是由于在提取过程中, 溶剂的量太多, 造成茶叶提取物发生了不可避免的流失^[12]。

3) 浸提时间的确定。在浸提温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比为 1:10 g/mL、乙醇质量分数为 75%的条件下, 浸提时间对茶叶提取物抑菌效果的影响见表 1。可以看出, 随着浸提时间的延长, 茶叶提取物的抑菌活性逐渐升高, 当浸提 30 min 时茶叶提取物的抑菌性最强, 这是因为增加浸提时间有利于组织细胞壁的完全破裂, 使得内容物易于溶出, 抑菌圈直径增加。继续增加浸提时间, 抑菌圈直径反而降低, 原因在于浸提时间过长, 超声波对细胞膜的破碎作用加大, 杂质含量也相应增加, 影响活性成分的提取质量, 最终导致抑菌圈直径下降。

4) 乙醇质量分数的确定。在浸提温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比为 1:10 g/mL、浸提时间为 30 min 的条件下, 乙醇质量分数对茶叶提取物抑菌效果的影响见表 1。可知, 在起始阶段, 随着乙醇质量分数的增加, 抑菌圈直径逐渐增大, 当乙醇质量分数为 75%时, 茶叶提取物的抑菌性最好, 这是因为茶叶提取物是醇溶性有机溶剂, 当乙醇质量分数增加时, 有利于有效抑菌成分的溶出, 抑菌圈直径增大。继续增大乙醇质量分数, 所对应的抑菌圈直径明显下降。这是因为茶叶提取物的主要抑菌成分为多酚类化合物, 其极性较强, 而乙醇质量分数太大时, 溶液极性变小, 所以提取率降低, 抑菌性能下降^[13]。

2.2 抑菌及稳定性分析

抑菌浓度是指抑制细菌生长所需要的抗菌药物的用量。文中实验采用两倍稀释法测定茶叶提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、枯草杆菌的最低抑菌浓度。由实验结果得出, 对于 4 种供试菌, 每毫升无菌营养肉汤中要达到完全没有细菌生长, 此时茶叶提取物最少用量均为 25 μL , 即茶叶提取物在无菌营养肉汤中所占的体积分数达到 2.5%及以上时, 对 4 种供试细菌表现出良好的抑菌效果。其抑菌机制可能是由于茶叶提取物中的主要成分能特异性地凝固细菌蛋白、破坏细菌细胞膜结构等, 从而抑制

4 种供试菌的生长^[14—16]。

供试菌在不同储存时间下抑菌圈直径的变化见表 2。可以看出,在 1 个月的存储时间内,茶叶提取

物对 4 种供试菌的抑菌活性基本保持不变,且抑菌能力均保留在原本的 95%以上,这表明茶叶提取物的抑菌成分具有较强的稳定性。

表 1 不同因素对茶叶提取物抑菌效果的影响
Tab.1 Influence of different factors on antibacterial effects of tea extract

不同因素		供试菌抑菌圈直径/mm			
		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	沙门氏菌	枯草杆菌
浸提温度/℃	40	12.75	11.06	13.10	12.07
	50	13.77	13.10	15.80	13.94
	60	14.79	13.26	14.10	14.62
	70	15.30	16.83	14.62	15.63
	80	10.00	10.00	10.00	8.00
料液比/ (g·mL ⁻¹)	1∶5	12.00	10.00	13.00	11.00
	1∶10	15.80	16.14	18.01	14.62
	1∶15	11.38	15.80	13.77	13.77
	1∶20	11.22	11.22	11.22	12.92
	1∶25	10.90	9.87	8.00	10.90
浸提时 间/min	10	13.00	12.00	12.00	14.00
	20	13.77	13.43	14.29	14.29
	30	16.53	15.46	14.62	13.60
	40	13.25	14.29	13.60	12.92
	50	13.10	14.01	12.42	11.45
乙醇质量 分数/%	40	10.79	8.00	8.00	8.00
	50	11.22	10.38	10.04	10.55
	60	13.26	12.92	12.42	10.55
	75	16.99	18.85	18.51	15.80
	85	12.00	8.00	8.00	14.00

表 2 储存时间对茶叶提取物抑菌活性的影响
Tab.2 Effect of storage time on antibacterial activity of tea extract

mm

供试菌种	储存时间/d						
	1	6	11	16	21	26	31
金黄色葡萄球菌	15.92	16.45	16.46	16.10	15.92	15.79	15.77
大肠杆菌	15.60	15.60	14.06	14.92	15.30	15.25	14.94
沙门氏菌	14.75	15.26	14.42	15.26	15.30	15.42	15.13
枯草杆菌	14.42	15.10	14.75	14.40	14.45	14.18	14.45

3 结语

茶叶在浸提温度为 70 ℃,料液比为 1:10 g/mL,浸提时间为 30 min,乙醇质量浓度为 75%的超声辅助提取条件下得到的活性成分具有较好的抑菌效果。茶叶提取物在无菌营养肉汤中所占的体积分数达到 2.5%及以上时,对 4 种供试细菌表现出良好的抑菌效果,且在 1 个月的储存时间里,茶叶提取物对 4 种细菌的抑菌能力均保留在最初的 95%以上,抑菌效果稳定。

参考文献:

[1] TRINDADE R A, MANCINIFILHO J, ALCH V. Nat-

ural Antioxidants Protecting Irradiated Beef Burgers from Lipid Oxidation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2010, 43(1): 98—104.

[2] 吴嶂,谢吉蓉,宋琴,等.茶树油作为天然剂的研究进展[J].中国药理学杂志,2013(21):1803—1807.

WU Di, XIE Ji-rong, SONG Qin, et al. Advances in Studies of Tea Tree Oil as a Natural Antimicrobial Agent[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013(21): 1803—1807.

[3] 董璐,代增英,韩晴,等.茶多酚对大肠杆菌抑菌机理的研究[J].生物学杂志,2015(1):72—75.

DONG Lu, DAI Zeng-ying, HAN Qing, et al. Research on the Antibacterial Mechanism of Tea Polyphenols on

- Escherichia Coli[J]. Journal of Biology, 2015(1): 72—75.
- [4] JOVANOVIĆ S V, STEENKEN S, HARA Y, et al. Reduction Potentials of Flavonoid and Model Phenoxyl Radicals, Which Ring in Flavonoids is Responsible for Antioxidant Activity[J]. Journal of the Chemical Society Perkin Transactions, 1996, 2(11): 2497—2504.
- [5] 王海丽, 杨春香, 杨福馨, 等. 抑菌及抗氧化活性食品包装膜的研究进展[J]. 包装工程, 2016, 37(23): 83—88. WANG Hai-li, YANG Chun-xiang, YANG Fu-xin, et al. Research Progress in Antimicrobial and Antioxidant Active Food Packaging Film[J]. Packaging Engineering, 2016, 37(23): 83—88.
- [6] 陆锦时. 茶树儿茶素含量及组成特性与品种品质的关系[J]. 西南农业学报, 1994(S): 6—12. LU Jin-shi. The Relationship between the Content and Composition of Catechins in Tea Plant and the Quality of Tea Varieties[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 1994(S): 6—12.
- [7] HOF K H, WISEMAN S A, YANG C S, et al. Plasma and Lipoprotein Levels of Tea Catechins Following Repeated Tea Consumption[J]. Experimental Biology and Medicine, 1999(4): 203.
- [8] 张宏, 甘雨, 乔敏, 等. 射干提取物抑菌实验研究[J]. 实验动物科学, 2012, 29(2): 5—7. ZHANG Hong, GAN Yu, QIAO Min, et al. Experimental Study on Bacteriostasis of Belamcanda chinensis Extract[J]. Laboratory Animal Science, 2012, 29(2): 5—7.
- [9] 曾祥吉, 李东霞. 中药抑菌实验方法的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2011(4): 518—520. ZENG Xiang-ji, LI Dong-xia. Study on the Bacteriostatic Experiment of Traditional Chinese Medicine[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2011(4): 518—520.
- [10] CACACE J E, MAZZA G. Mass Transfer Process during Extraction of Phenolic Compounds from Milled Berries[J]. Journal of Food Engineering, 2003, 59(4): 379—389.
- [11] 郑捷, 胡爱军. 超声对提取海藻二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸的影响[J]. 声学技术, 2007, 26(1): 75—79. ZHENG Jie, HU Ai-jun. Various Factors in Ultrasonic Extraction of DHA and EPA from Algae and Effect of Ultrasound Enhancement[J]. Technical Acoustics, 2007, 26(1): 75—79.
- [12] 李大伟. 迷迭香叶活性成分超声辅助提取与分离的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2012. LI Da-wei. Study on Ultrasound-assisted Extraction and Isolation of Bioactive Components from Rosemary Leaves[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2012.
- [13] 段文贵, 耿哲, 覃柳妹. 黑荆树皮中缩合单宁的提取[J]. 广西大学学报, 2007, 32(2): 138—142. DUAN Wen-gui, GENG Zhe, QIN Liu-mei. Extraction of Condensed Tannins from Black Wattle Bark[J]. Journal of Guangxi University, 2007, 32(2): 138—142.
- [14] 陈敏, 何敏. 茶多酚抗菌作用研究进展[J]. 饲料研究, 2015(22): 10—12. CHEN Min, HE Min. Advances in Antimicrobial Effects of Tea Polyphenols[J]. Feed Research, 2015(22): 10—12.
- [15] 马森. 武夷岩茶茶多酚抑菌作用的研究[J]. 畜牧兽医杂志, 2012, 31(1): 24—26. MA Sen. Study on Wuyi Rock Tea-polyphenol Antibacterial Activity[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2012, 31(1): 24—26.
- [16] SHARMA A, GUPTA S, SARETHY I P, et al. Green Tea Extract: Possible Mechanism and Antibacterial Activity on Skin Pathogens[J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 672—675.