

普洱茶不同提取物体外抑菌活性研究

胡永金¹, 韩小溪¹, 薛桥丽², 杨华松³

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201)

(2. 云南农业大学图书馆, 云南昆明 650201) (3. 云南农业大学人事处, 云南昆明 650201)

摘要: 研究了不同溶剂普洱茶提取物及萃取物的体外抑菌活性。论文采用滤纸片扩散法和最低抑菌浓度检测了水提、75%和95%乙醇普洱茶提取物对 *S. aureus*、*E. coli*、*P. aeruginosa* 及 *B. subtilis* 体外抑菌效果。同时分析了95%醇提物的不同溶剂萃取物对供试菌的影响。结果表明: 95%乙醇浸提物抑菌效果最好, 尤其对 *S. aureus*、*E. coli* 最为明显, 抑菌圈分别为 19.58 ± 0.24 mm、 14.58 ± 0.24 mm, MIC 分别为 0.63 mg/mL, 0.39 mg/mL, 但对 *B. subtilis* 抑菌效果差。在95%醇提物的不同溶剂萃取物中, 萃取物抑菌活性为: 乙酸乙酯>正丁醇>石油醚>氯仿。乙酸乙酯萃取物对 *S. aureus* 抑制效果最好, 其抑菌圈直径为 31.88 ± 0.24 mm, MIC 为 0.47 mg/mL。普洱茶提取物的醇提乙酸乙酯萃取物能显著抑制革兰氏阴性菌和阳性菌的生长, 研究结果为普洱茶抗菌活性成分的开发利用提供一定的实践和数据参考。

关键词: 普洱茶; 提取物; 抑菌活性; 最小抑菌浓度

文章篇号: 1673-9078(2013)8-1770-1773

Antibacterial Activity of Pu'er Tea Extracts *in Vitro*

HU Yong-jin¹, HAN Xiao-xi¹, XUE Qiao-li², YANG Hua-song³

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

(2. Library, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(3. Personal Office, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The antibacterial activity of the solvent extracts from Pu'er tea *in vitro* was studied in this paper. Filter paper disc diffusion method and minimal inhibition concentrations (MIC) were employed to determine the antibacterial activities of Pu'er tea extracts by water, 75% and 95% ethanol on *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis*. The 95% ethanol extracts showed the highest antibacterial effect, especially to *S. aureus* and *E. coli* with the inhibition radius being of 19.58 ± 0.24 mm and 14.58 ± 0.24 mm, respectively. The MIC was 0.63 mg/mL, 0.39 mg/mL. But 95% ethanol extracts showed little inhibitory effect on the growth of *B. subtilis*. The extracts obtained using different solvent showed different antibacterial effects, among which the ethyl acetate extracts showed the strongest antibacterial activities, followed with the extracts of n-butyl alcohol, petroleum ether and chloroform. For different bacteria tested, the ethyl acetate extracts showed the strongest effects on the growth of *S. aureus* with the inhibition zone diameter being of 31.88 ± 0.24 mm and the MIC being of 0.473 mg/mL. The ethyl acetate extract of Pu'er tea could significantly inhibit the growth of gram-positive and gram-negative bacteria. This study provided the references for the development and utilization of antibacterial active ingredients from Pu'er tea.

Key words: Pu'er tea; extract; antibacterial activity; minimal inhibition concentrations

普洱茶, 是一种原产于我国云南西双版纳思茅一带的历史名茶^[1]。它以云南大叶茶 (*Camellia sinensis* Kuntze. var. *assamica* Kitamura) 的鲜叶为原料制成的, 分为生茶、陈茶、熟茶^[2]。通常所说的普洱茶大多指普洱熟茶, 它是在特殊的地理环境及微生物的作用下,

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31060270); 云南省自然科学基金 (2011FZ091)

作者简介: 胡永金(1972-), 男, 博士, 教授, 硕导, 主要从事功能性食品与生物技术研究

通讯作者: 杨华松, 男, 副教授, 主要从事功能性活性成分的研究

伴随着生物转化、酶促氧化、非酶促自动氧化等系列的化学变化, 从而形成了一系列具有特殊功能的物质^[3-5], 也使其富含的独特韵味而闻名天下。近些年的研究发现普洱茶除了具有抗氧化、降脂、抗癌、抗突变等诸多药理作用之外, 也具有广谱、高效的抗菌抑菌作用^[6-8]。但由于其活性成分很多, 各成分间功能上的协同效应复杂, 针对普洱茶尤其是普洱熟茶提取物体外抑菌活性的研究尚不多见。另一方面, 我国目前使用的防腐剂绝大多数都是人工合成的, 其中许多品种从发现到使用时间尚短, 其毒副作用或长期过量摄入会对人体健康造成的影响尚不清楚。另外抗生素类物

质也常应用于畜牧产品保鲜中,但随着人类健康、环保意识的增强,抗生素的使用对人体抗药性及环境的影响受到了更多人的关注。由此,近年来天然抑菌防腐物质成为世界各国研究的热点,主要是基于它的安全性。正是基于这样的社会需要,在普洱茶中寻找一种或一组有效活性成分作为食品保鲜剂,使其能够更加安全地应用于食品工业中,也必将成为食品保鲜及贮藏的研究热点。本研究针对几种不同的食品工业污染菌,尤其是致病菌,通过对比不同提取物对受试菌的抑制作用,及对最小抑制浓度(MIC)的测定,旨在为普洱茶提取物的抑菌作用及进一步在食品工业中的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验原料

普洱茶(散装),产于云南西双版纳,云南滇南古韵茶叶有限公司。

1.2 试剂与仪器

乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、盐酸、氢氧化钠等均为分析纯。

1.3 仪器与设备

RE-52A型旋转蒸发仪、真空泵、冷冻干燥仪、pH计、LDZX-40B1高压灭菌锅、恒温水浴锅、生化培养箱、鼓风式干燥箱、SW-CJ-2F超净工作台、BS110S电子天平、微量移液枪、中药粉碎机、游标卡尺(规格(0~150)mm×0.02mm),等。

1.4 受试菌种类、来源及培养基

本实验所用供试菌大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和假单胞菌(*Pseudomonadaceae*)均为云南农大动物科学学院实验室保藏菌种,活化培养基除大肠杆菌(*E. coli*)采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)外,其余菌种均采用营养琼脂进行活化。

1.5 普洱茶抑菌活性筛选样品编号

分别采用蒸馏水、75%乙醇和95%乙醇对普洱茶进行提取,提取物分别编号为T1、T2、T3,95%乙醇提取物(T3)依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,各萃取物分别依次编号为C1、C2、C3、C4,最后所得到的萃取剩余物编号为C5。

1.6 试验方法

1.6.1 普洱茶提取物的制备

普洱茶浸提物:普洱茶样品100g通过粉碎,过80目筛。浸提的固液比为1:10(m/V),溶剂分别为蒸馏水、75%乙醇、95%乙醇。以蒸馏水作为浸提溶剂时,将温度维持在80℃左右,浸泡4h。其余两种溶剂浸提时在室温条件下,浸泡4h左右。浸提两次,经旋转蒸发再冷冻干燥至恒重,得到普洱茶浸提物,于4℃冰箱中备用。

普洱茶萃取物:对上述3种溶剂获得的粗提物进行抑菌效果的评定,选择出其中抑菌效果最优的,再依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,并制成茶粉备用。

1.6.2 抑菌效果的测定

1.6.2.1 滤纸片法^[9]

选择适宜浓度的菌悬液0.2mL转移至之前倒好的平板培养基表面,均匀涂布。用无菌镊子夹取已备好的滤纸片(直径6mm),置于上诉含受试菌的培养基表面,每个平皿放三片。在37℃的条件下培养24h后,用游标卡尺采用十字交叉法量取抑菌圈直径(mm)。通过测定抑菌圈直径大小评价不同组分对不同受试菌抑制作用。

1.6.2.2 最低抑菌浓度(MIC)的测定

用对倍稀释法^[10-11]将不同浸提及萃取获得的提取物稀释200mg/mL~3.125mg/mL7个浓度梯度,然后吸取1mL,并加入19mL融化的营养琼脂培养基,充分混匀使药物浓度在10mg/mL~0.1563mg/mL。待培养基冷凝后转移0.2mL受试菌菌悬液进行涂布。每个样液浓度做三个平行,并做一个未接种对照。不断缩小梯度,在37℃条件下培养24h,无细菌生长的培养基即为最低抑菌浓度的培养基,此皿的提取物浓度即为MIC值。

2 结果与讨论

2.1 普洱茶浸提物的抑菌效果

由蒸馏水、75%乙醇、95%乙醇浸提获得的普洱茶浸提物浓度为100mg/mL时对4种受试菌(*E. coli*、*S. aureus*、*B. subtilis*、*Pseudomonadaceae*)的抑制效果进行分析,筛选出抑制效果最优的组分。

结果如表1所示,不同溶剂浸提物对不同受试菌的抑菌效果有较大差异。其中95%乙醇浸提物对4种受试菌抑菌圈直径由大到小分别为:*S. aureus* 19.58

±0.24 mm、*E. coli* 14.58±0.24 mm、*S. typhimurium* 9.23±0.21 mm, 而3组浸提物均未对*B. subtilis*表现出抑制作用。由抑菌圈直径的大小直接表现组分的抗菌能力大小,直径越大,则抑菌效果越强。由此可知在浓度相同的条件下,95%乙醇浸提物的抑菌效果能力最强,且对*S. aureus*的抑制作用最为明显。

表1 普洱茶不同溶剂浸提物抑菌圈直径 (mm)

Table 1 Inhibition zone diameters of the extracts at different solvent against 4 bacteria

受试菌名称	提取物		
	T ₁	T ₂	T ₃
<i>E. coli</i>	9.04±0.17	11.49±0.23	14.58±0.24
<i>B. subtilis</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	14.17±0.23	18.85±0.33	19.58±0.24
<i>Pseudomonadaceae</i>	6.25±0.09	7.38±0.32	7.37±0.07

注:表1中“-”表示无抑菌圈生成。

抑制效果相对较为明显的组分95%乙醇浸提物对4种不同受试菌的抑制效果如图1。

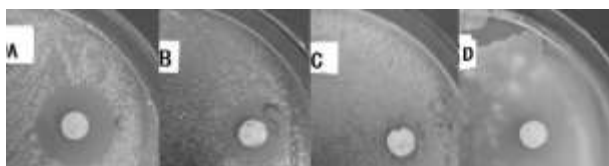


图1 95%乙醇浸提物对4种受试菌的抑菌

Fig.1 Inhibition activity of 95% ethanol extract against 4 bacteria

注:A: *S. aureus*; B: *E. coli*; C: *Pseudomonadaceae*; D: *B. subtilis*。

以受抑制最明显的*S. aureus*为例,由蒸馏水、75%乙醇、95%乙醇浸提获得的普洱熟茶浸提物对其抑菌效果如图2。

表3 萃取组分抑菌直径测试结果 (mm)

Table 3 Inhibition zone diameters of the extracts against 5 bacteria

受试菌名称	萃取组分				
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
<i>E. coli</i>	13.43±0.17	12.89±0.21	18.69±0.19	22.81±0.31	9.74±0.07
<i>B. subtilis</i>	-	-	7.49±0.31	6.23±0.13	-
<i>S. aureus</i>	13.32±0.15	10.94±0.09	31.88±0.24	27.42±0.3	13.61±0.09
<i>Pseudomonadaceae</i>	7.02±0.23	6.72±0.21	20.01±0.29	11.08±0.18	6.32±0.1

注:表3中“-”表示无抑菌圈生成。

乙酸乙酯萃取物对4种不同受试菌的抑制效果如图3。

以生长受抑制最明显的*S. aureus*为例,由5种不同极性溶剂萃取获得的萃取物,对其抑菌效果如图4。

选择抑菌效果最好的乙酸乙酯萃取提物,测定其对4种受抑制的受试菌的最小抑制浓度(MIC)。实验

选择抑菌效果最好的95%乙醇浸提物,测定4种受试菌的最小抑制浓度(MIC)。实验结果如表2,其中的*E. coli*的MIC值最小为0.39 mg/mL。



图2 三种不同溶剂浸提物对金黄色葡萄球菌的抑制

Fig.2 Inhibition activity of the extracts with different solvent against *S. aureus*

注:G1:蒸馏水浸提物;G2:75%乙醇浸提物;G3:95%乙醇浸提物。

表2 普洱茶95%乙醇浸提物最小抑制浓度

Table 2 MICs of 95% ethanol extract against 4 bacteria

菌种	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>B. subtilis</i>
MIC/(mg/mL)	0.63	0.39	0.94	≥5

2.2 萃取组分的抑菌效果

在95%乙醇提取物的基础上,用不同极性的有机溶剂依次进行萃取,得到不同萃取部分,在萃取物浓度(100 mg/mL)相同的条件下并对不同组分的抑菌活性进行评价。由表3可知,普洱茶醇提乙酸乙酯萃取组分的抑菌活性最强,测得其对4种受试菌的抑菌直径由大到小分别为:*S. aureus* 31.88±0.24 mm、*Pseudomonadaceae* 20.01±0.29 mm、*E. coli* 18.69±0.19 mm和*B. subtilis* 7.49±0.31 mm。抑菌效果其次为正丁醇萃取物、石油醚萃取物、氯仿萃取物,抑菌效果最弱的为萃取剩余物。

结果如表4,其中*E. coli*的MIC值最小为0.35 mg/mL。

普洱茶对食品中病原微生物有明显抑制作用。于不同类型的受试菌,普洱茶提取物均表现出不同程度的抑制作用。本研究选择的几种食品工业中常见污染致病菌,无论在发达国家还是在发展中国家,由以上几种受试菌引起的细菌性食物中毒占有较大比例。以

本研究中受抑制最为明显的金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 为例,它在自然环境下极为常见,但也是一种常见的致病菌。能引起一系列疾病从轻微的皮肤和伤口感染到严重的败血症,心内膜炎及骨炎。高毒力的金黄色葡萄球菌菌株甚至可导致慢性金黄色葡萄球菌病的传播。与此同时,其毒素能刺激淋巴细胞,导致免疫系统疾病^[12]。其次大肠杆菌对普洱茶提取物也表现出了较为明显的受抑制效果。与金黄色葡萄球菌相类似,大肠杆菌也是自然界中的常见菌。近些年,因食品污染该菌导致的数起大爆发格外引人注目。即使在欧美发达国家,通过分离得到的肠道致病菌中,目前它也排在前三位。某些血清型菌株的致病性很强,能引起腹泻及炎症反应甚至发展成为溶血性尿毒综合症。而受试菌中的枯草芽孢杆菌受普洱茶提取物的抑制很小,这可能与其芽孢结构有关。本研究针对普洱茶提取物对几种常见致病微生物的抑制效果进行比较分析,为普洱熟茶提取物作用于食品、化工和医药行业,以及进一步研究和开发有效安全的食品保鲜级提供一些理论依据。

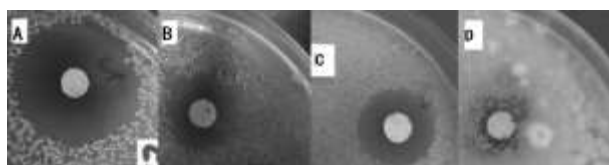


图3 乙酸乙酯萃取组分对4种受试菌的抑菌效果

Fig.3 Inhibition activity of acetic ether extract against 4 bacteria

注: A: *S. aureus*; B: *E. coli*; C: *Pseudomonadaceae*; D: *B. subtilis*。

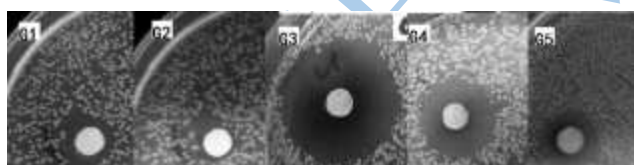


图4 不同萃取物对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Fig.4 Inhibition activity of the ethyl acetate extracts against *S. aureus*

注: G1: 石油醚萃取物; G2: 氯仿萃取物; G3: 乙酸乙酯萃取物; G4: 正丁醇萃取物; G5: 萃取后剩余物。

表4 普洱茶95%醇提的乙酸乙酯萃取物最小抑制浓度

Table 4 MICs of the ethyl acetate extracts against 4 bacteria

菌种	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>B. subtilis</i>
MIC/(mg/mL)	0.47	0.35	0.94	2.87

3 结论

不同溶剂浸提物对不同的微生物菌种的抑制作用效果不同。在100 mg/mL相同浓度下,三种浸提物

对受试菌抑制作用由强到弱分别为:95%乙醇浸提物、75%乙醇浸提物、蒸馏水浸提物。其中95%乙醇浸提物对4种受试菌的抑菌圈直径从大到小排列为:*S. aureus* 19.58±0.24 mm、*E. coli* 14.58±0.24 mm、*Pseudomonadaceae* 7.37±0.07 mm、*B. subtilis* 无抑菌圈。其MIC分别为:*S. aureus* 0.63 mg/mL、*E. coli* 0.39 mg/mL、*Pseudomonadaceae* 0.94 mg/mL。95%乙醇的普洱茶浸提物的不同有机物萃取物对受试菌抑制作用不同,由强到弱分别为:乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物、石油醚萃取物、氯仿萃取物、萃取剩余物。乙酸乙酯萃取物对*S. aureus*抑制效果最好。

参考文献

- [1] Chen Y S, Liu B L, Chang Y N. Bioactivities and sensory evaluation of Pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109(6): 557-563
- [2] Zhang L, Ma Z Z, Che Y Y, et al. Protective effect of a new amide compound from Pu-erh tea on human micro-vascular endothelial cell against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide [J]. Fitoterapia, 2011, 82(2): 267-271.
- [3] Abe M, Takaoka N, Idemoto Y, et al. Characteristic fungi observed in the fermentation process for Puer tea [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124, (2): 199-203
- [4] Kut K M, Kim J Y, Park H J, et al. Application of metabolomics in the analysis of manufacturing type of Pu-erh tea and composition changes with different postfermentation year [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 345-352
- [5] Xu X Q, Yan M C, Zhu Y. Influence of fungal fermentation on the development of volatile compounds in the Pu-erh tea manufacturing process [J]. Engineering in Life Sciences, 2005, 5(4): 382-386
- [6] 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
- [7] Hu Y J, Jia J J, Qiao J L, et al. Antimicrobial activity of pu-erh tea extracts *in vitro* and its effects on the preservation of cooled mutton [J]. Journal of Food Safety, 2010, 30(1): 177-195
- [8] 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

- [9] Hu Y J, Qiao J L, Zhang X, et al. Antimicrobial activity of *magnolia officinalis* extracts in vitro and its effects on the preservation of chilled mutton [J]. Journal of Food Biochemistry, 2011, 35(2): 425-441
- [10] 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
- [11] Bancirova M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea [J]. Food Research International, 2010, 43(5): 1379-1382
- [12] Vancraeynest D, Haesebrauck F, Hermans K. Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains [J]. Veterinary microbiology, 2007, 121 (3-4): 368-372

现代食品科技