

茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的 抑菌机理

钱丽红 陶妍* 谢晶

(上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要: 以革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性的铜绿假单胞菌为试验菌, 通过测定茶多酚与两种菌作用前后细菌培养液的电导率和可溶性总糖的变化, 以及菌体在磷代谢和蛋白质表达方面的变化, 初步阐明了茶多酚对这两种菌的抑菌机理。研究表明, 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均有抑菌活性, 但对金黄色葡萄球菌的抑菌活性更强。经茶多酚处理后, 细菌培养液的电导率和总糖浓度均增大, 表明了茶多酚可破坏细胞膜的结构、导致细胞通透性增加, 进而使细胞内容物外泄。另一方面, 经茶多酚处理后的两种菌对磷的消耗量降低, 以致严重影响了核酸、磷脂等细胞重要成分的合成以及能量代谢; 通过 SDS-PAGE 分析, 证实茶多酚可以阻碍细菌蛋白质的正常表达, 以致影响其细胞的结构组成以及酶的催化活性, 最终导致细菌正常生理功能的丧失。

关键词: 茶多酚, 金黄色葡萄球菌, 铜绿假单胞菌, 抑菌机理

Antimicrobial Mechanisms of Tea Polyphenol Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

QIAN Li-Hong TAO Yan* XIE Jing

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The antimicrobial mechanisms of tea polyphenol against Gram-positive *S. aureus* and Gram-negative *P. aeruginosa* were investigated by determining the changes in electric conductivity and total sugar concentration of broth for bacteria treated by tea polyphenol, as well as the changes in phosphorous metabolism and protein expression of bacteria. As the results showed, tea polyphenol had antimicrobial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, but stronger against the former. The facts that the electric conductivity and total sugar concentration of microbial broth increased indicated that tea polyphenol could damage the structure of cell membrane, which resulted in the increase of permeability of cell membrane and release of cell components. Besides, the consumption of phosphorous decreased in the tea-polyphenol-treated bacteria, which seriously influenced the synthesis of important cell components such as nucleic acid and phospholipid and energy metabolism. SDS-PAGE assay

demonstrated that tea polyphenol could block the protein expression in bacteria, which influenced the cell structure composition and catalyzing activity of enzyme, and finally leading to the lost of normal physiological function of bacterium.

Keywords: Tea polyphenol, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, Antimicrobial mechanism

茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称, 含黄烷醇类、花色苷类、黄酮类、黄酮醇类和酚酸类等成分, 其中以儿茶素类化合物的黄烷醇类含量最高, 占茶多酚总量的 60%–80%^[1]。茶多酚的抑菌谱广, 对有细胞壁和无细胞壁的革兰氏阳性、阴性菌均有抑制作用, 如对肉制品中常见的致病菌金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌都有抑菌活性^[2–3]; 近年来茶多酚在水产品保鲜中的应用也时有报道^[4–6], 而引起水产品腐败变质的主要细菌是假单胞类腐败菌^[7], 但是迄今为止, 关于食品保鲜剂对假单胞菌的抑菌效果及抑菌机理方面的研究报道甚少。国内在抑菌剂对一些致病菌的抑菌机理方面有一些报道, 如吕淑霞等认为乳酸链球菌素可能对金黄色葡萄球菌的蛋白质表达产生抑制作用^[8]; 国外 María 等研究了茶多酚对假丝酵母的抑菌机理^[9], Weiduo 等通过扫描电镜观察了茶多酚对金黄色葡萄球菌菌体形态的影响^[10]。然而, 茶多酚作为一种天然生物保鲜剂, 其抑菌机理目前尚不完全明了, 亦无较系统的关于抑菌机理方面的研究报道。据此, 本文以常见的革兰氏阳性致病菌金黄色葡萄球菌和水产品中典型的革兰氏阴性的腐败菌假单胞菌为检测对象, 通过测定茶多酚与两种菌作用前后细菌培养液的电导率和可溶性总糖的变化, 以及菌体在磷代谢和蛋白质表达方面的变化, 旨在较系统地考察茶多酚对菌体细胞膜的通透性和胞内分子代谢的影响作用, 进而探明茶多酚的抑菌机理和模式, 为茶多酚用于食品包括水产品的保鲜提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

纯化的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由上海市疾病预防控制中心提供; 茶多酚(分析纯)由上海康九化工有限公司提供; 营养琼脂、营养肉汤来自上海市疾病预防控制中心; 其他化学试剂为分析纯, 来自上海凌峰化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 茶多酚的抑菌活性测定: 将活化后的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌转接到营养肉汤中, 37°C 培养 12 h 后离心(5000 r/min, 10 min), 去上清, 用营养肉汤适当稀释菌体, 获得 10⁴ CFU/mL 的菌液, 加入茶多酚使其终浓度为 2 g/L, 在常温下孵育 5、10、20、40 和 80 min, 分别取出 50 μL 用于平板涂布, 于 37°C 下倒置培养 24 h, 观察菌落生长情况; 以无菌水替代茶多酚作为空白对照。平行实验 3 次。

抑菌率 = (对照菌落总数 - 处理菌落总数) / 对照菌落总数 × 100%

1.2.2 菌液电导率的测定: 根据张新虎等^[11]的方法, 将生长到对数期的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤 3 次, 菌液浓度调到 10⁸ CFU/mL, 取 5 mL, 分别与 1 g/L 和 2 g/L 的茶多酚等体积混合, 每隔 10 min 测一次电导率; 以无菌水替代茶多酚作为空白对照。平行实验 3 次。

1.2.3 菌体可溶性总糖的测定: 根据陈毓荃^[12]的方法, 将生长到对数期的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌 5 mL 与等体积茶多酚(1 g/L 和 2 g/L)混合, 分别在 0、1、2、4、6、8、10、12 h 时取 1 mL 混合液离心(11000 r/min, 2 min), 取上清液稀释 5 倍后, 取 50 μL 于离心管中, 加入 200 μL 蒽酮试剂, 迅速置于冰浴中冷却 5 min, 再置于沸水浴中精确煮沸 10 min, 冷却后室温放置 10 min, 通过酶标仪测定其在 620 nm 处的吸光值; 以标准葡萄糖溶液作标准曲线; 以无菌水替代茶多酚作为空白对照。平行实验 3 次。

1.2.4 菌体磷代谢的测定: 根据翟培等^[13]的方法, 将活化后的细菌转接到营养肉汤中, 37°C 培养 12 h 后离心(5000 r/min, 10 min), 弃上清, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)稀释菌体, 获得 10⁶ CFU/mL 的菌液; 取 0.5 mL 菌液和 0.5 mL 葡萄糖溶液(1 g/L)于离心管内, 加入 200 μL 磷标准溶液和 200 μL 茶多酚(2 g/L)后, 分别在 0、1、2、4、6、8、10、12 h 时吸取悬浮液 0.1 mL, 用三氯乙酸-硫酸亚铁和钼酸

铵处理后,通过酶标仪测定处理液在 630 nm 处的吸光值。以无菌水替代茶多酚作为空白对照。平行实验 3 次。

1.2.5 菌体总蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 根据 Ke 等^[14]的方法,将生长到对数期的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤,并稀释成 $OD_{600} = 0.5$ 的菌液,取 5 mL 与等体积茶多酚(2 g/L)混合后,分别在 1、2、3、4、5、6 h 时取样 5 mL 离心(10000 r/min, 5 min),取沉淀加入 50 mL 无菌水和 200 μ L 上样缓冲液,混匀后于沸水浴中加热 5 min,再次离心后取 40 μ L 上清液用于 SDS-PAGE 电泳。以无菌水替代茶多酚作为空白对照。浓缩胶和分离胶的浓度分别为 4% 和 10%;电泳结束后用 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250 进行凝胶染色,用 25% 的甲醇和 7% 的醋酸混合液脱色。

2 结果与分析

2.1 茶多酚对两种菌的抑菌活性

图 1 显示了茶多酚与金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌经不同时间作用后对两种菌的抑菌效果。结果显示,茶多酚对两种菌均有抑菌作用,且随着与细菌作用时间的延长,抑菌率呈增长趋势。经 2 g/L 茶多酚处理 20 min 时对金黄色葡萄球菌的抑菌率已达到 45.2%,而对铜绿假单胞菌的抑菌率仅为 18.0%,直至 40 min 时抑菌率才开始明显上升 ($P < 0.05$),表明茶多酚对革兰氏阳性菌的抑菌效果较革兰氏阴性菌更强。茶多酚对金黄色葡萄球菌的抑菌效果与 Negi 等^[15]的研究结果是一致的。

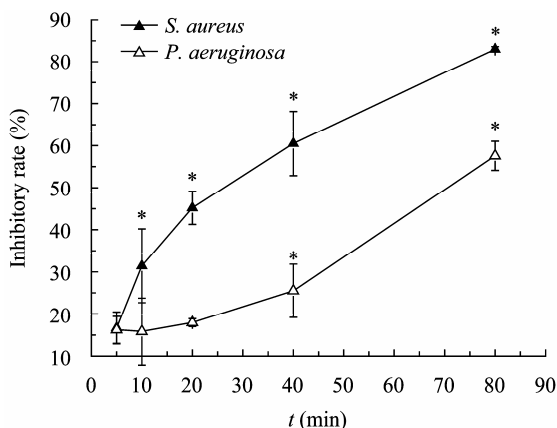


图 1 茶多酚对两种菌的抑菌活性
Fig. 1 Antimicrobial activity of tea polyphenol against two types of bacteria

2.2 茶多酚对菌体细胞膜通透性的影响

2.2.1 经茶多酚处理后细菌培养液电导率的变化: 细胞膜是细菌的保护屏障,当细菌遇到强抑菌剂而使细胞膜遭到破坏时,菌体的保护屏障被打破,使其内部电解质外泄至培养液中,进而使培养液的电导率上升,因此,菌液电导率的变化反映了细菌细胞膜通透性的变化^[16]。图 2 和图 3 显示了经不同浓度茶多酚处理不同时间后,对两种菌菌液电导率的测定结果。当茶多酚浓度为 2 g/L 时,在不同处理时间下两种菌菌液的电导率均高于对照,但金黄色葡萄球菌与对照之间显示了更大的电导率差异,其原因可能是金黄色葡萄球菌较铜绿假单胞菌的离子泄露程度更高,表明茶多酚对金黄色葡萄球菌的细胞膜破坏程度高于铜绿假单胞菌。另一方面,当茶多

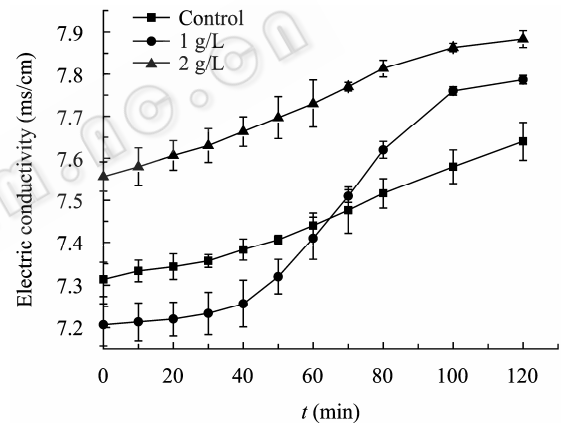


图 2 茶多酚处理后金黄色葡萄球菌菌液的电导率变化
Fig. 2 Changes in electric conductivity of broth for *S. aureus* treated by tea polyphenol

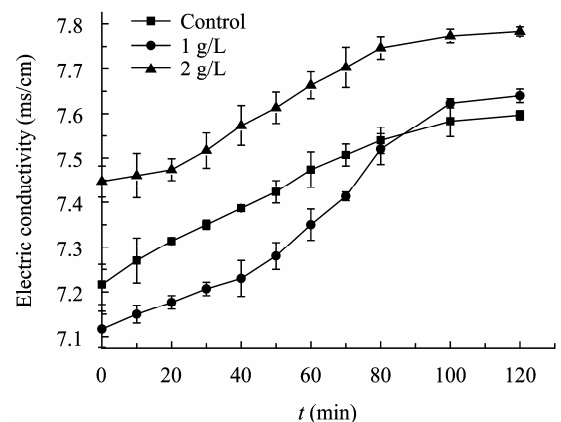


图 3 茶多酚处理后铜绿假单胞菌菌液的电导率变化
Fig. 3 Changes in electric conductivity of broth for *P. aeruginosa* treated by tea polyphenol

酚浓度为 1 g/L、与金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的作用时间分别在 60 min 和 80 min 之内时, 两种菌菌液的电导率均低于对照, 其原因可能是在上述条件下, 茶多酚并没有破坏细胞膜, 而是与细胞膜外表面发生了静电结合, 导致带电离子减少, 使培养液的电导率降低^[17]; 随着作用时间的延长, 茶多酚对细胞膜逐渐产生破坏作用, 致使两种菌菌液的电导率逐渐上升, 但与铜绿假单胞菌相比, 金黄色葡萄球菌与对照之间的电导率差异更大, 进一步说明了茶多酚对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌具有更明显的抑菌作用。

2.2.2 经茶多酚处理后细菌培养液中总糖浓度的变化: 糖类是微生物首要的碳源和能源储备物质。当细菌处于正常生理状态时, 会吸收利用外源的营养成分, 而当膜结构遭到破坏时, 细胞内容物包括糖类发生外泄, 通过测定细菌培养液中糖浓度的变化, 可以了解细菌膜结构的完整性^[18]。如图 4、5 所示, 当两种菌与 2 g/L 的茶多酚作用后, 培养液中总糖的浓度随着作用时间的延长逐渐上升, 表明它们的细胞膜结构遭到破坏, 胞内的糖类物质逐渐渗漏到胞外; 然而, 两种菌的对照组均显示了培养液中总糖浓度的下降, 其原因是由于正常细菌在增殖过程中需要吸收利用培养基中的糖类物质。值得注意的是, 当茶多酚浓度为 1 g/L、与两种菌的作用时间为 1 h 时, 培养液与对照中的总糖浓度是相似的, 说明此时细菌的膜结构尚未完全破坏, 与上述电导率的测定结果与推测基本上是相符的。

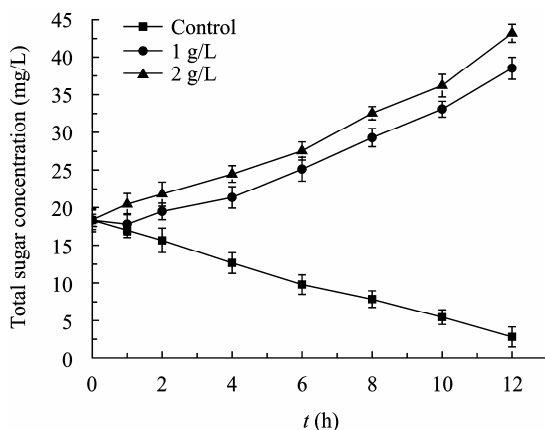


图 4 茶多酚处理后金黄色葡萄球菌菌液中总糖浓度的变化
Fig. 4 Changes in total sugar concentration of broth for *S. aureus* treated by tea polyphenol

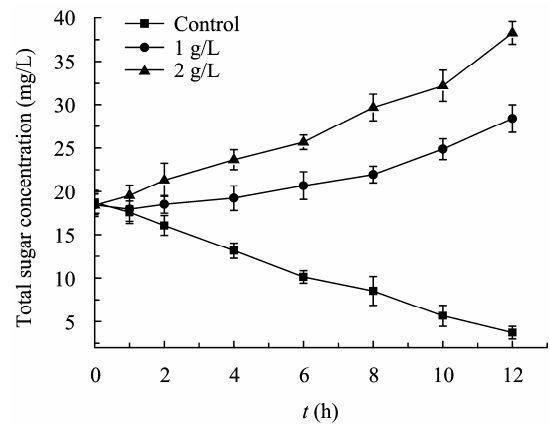


图 5 茶多酚处理后铜绿假单胞菌菌液中总糖浓度的变化
Fig. 5 Changes in total sugar concentration of broth for *P. aeruginosa* treated by tea polyphenol

2.3 茶多酚对细菌磷代谢的影响

磷是包括微生物在内的所有生物需要的微量元素, 是核酸、磷脂及糖代谢的中间产物的重要组成部分, 且在细胞能量代谢中起核心的作用^[19]。细菌利用葡萄糖经过一系列磷酸化反应, 为生长繁殖提供所需能量, 因此, 通过检测细菌代谢活动中磷的消耗状况可反映细胞的整体代谢功能和生长状态^[13]。如图 6、7 所示, 与对照相比, 当两种菌与茶多酚作用后, 磷消耗量均随着作用时间的延长而逐渐降低, 表明它们的磷代谢受到严重影响, 证明茶多酚不仅可以破坏细胞膜, 还可以影响细胞代谢。

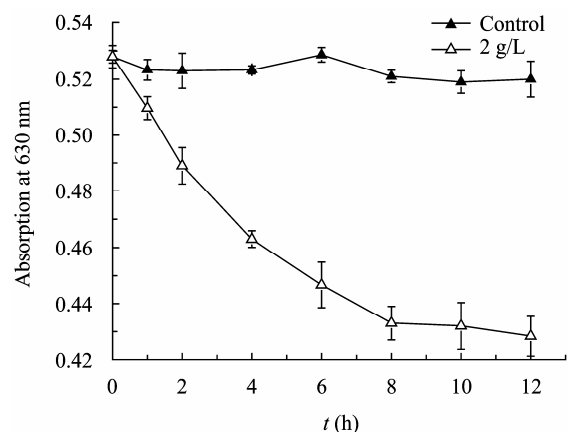


图 6 茶多酚处理后金黄色葡萄球菌的磷代谢变化
Fig. 6 Changes in phosphorous metabolism for *S. aureus* treated by tea polyphenol

2.4 茶多酚对细菌蛋白质表达的影响

如图 8 中 1-4 所示, 金黄色葡萄球菌与茶多酚作用 1-3 h 时, 菌体绝大多数蛋白质谱带几乎不存在, 仅可见少数明显变浅的谱带, 表明茶多酚严重

阻碍了金黄色葡萄球菌的蛋白质表达。相比之下,茶多酚与铜绿假单胞菌的作用时间达 6 h 时,虽然各谱带较对照略变浅,但依然清晰可见(图 8 中 5-11)。

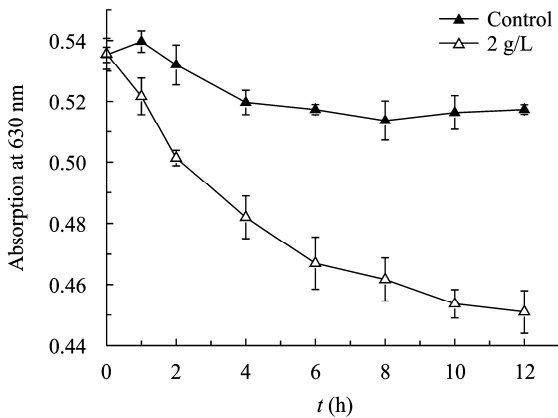


图 7 茶多酚处理后铜绿假单胞菌的磷代谢变化
Fig. 7 Changes in phosphorous metabolism for *P. aeruginosa* treated by tea polyphenol

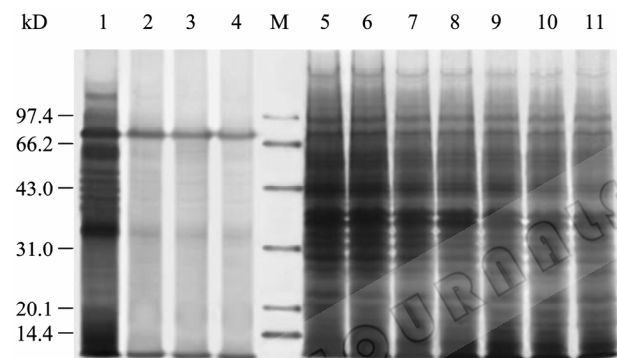


图 8 茶多酚处理后两种菌菌体总蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱
Fig. 8 SDS-PAGE patterns of total proteins for two types of bacteria treated by tea polyphenol

注: 1-4: 金黄色葡萄球菌作用 0-3 h; 5-11: 铜绿假单胞菌作用 0-6 h; M: 标准分子量蛋白。

Note: 1-4: 0-3 h of *S. aureus*; 5-11: 0-6 h of *P. aeruginosa*; M: Molecular mass markers.

3 讨论

属儿茶素类化合物的黄烷醇类是茶多酚的主要成分。本文对茶多酚处理后的两种菌培养液的电导率和总糖测定结果证明了当低浓度的茶多酚与细菌作用初期时,只是先与细菌的膜表面发生静电作用,影响其正常生理功能,然后逐渐破坏细胞膜,达到抑菌的作用;而较高浓度的茶多酚可在较短时间内破坏细胞膜结构,增加细胞的通透性,以致使电解质外泄,胞内糖类物质逐渐渗漏到胞外,进而直接

影响到细胞结构的稳定性和能量代谢,最终使细胞逐渐死亡。上述结果和推测与曾亮等认为儿茶素会增加细菌细胞膜的通透性,造成细菌胞内蛋白质和糖类物质渗漏的报道基本上是一致的^[18]。茶多酚的结构基础主要为多酚基及多环结构,它对生物大分子如脂类、蛋白质、碳水化合物和核酸有高度的亲和力,以致可以破坏细菌细胞膜的结构^[17]。对两种菌的磷代谢分析表明,茶多酚可通过降低细菌对磷的消耗,阻碍核酸、磷脂的合成以及影响糖的代谢,进而使细胞能量代谢受阻。另一方面,对菌体总蛋白的 SDS-PAGE 分析证明了茶多酚可影响和阻碍细胞内蛋白质的表达。虽然迄今为止几乎未见关于茶多酚如何抑制细菌蛋白质表达方面的研究报道,但贾旭东等发现茶多酚可显著抑制人肝癌细胞株 HepG2 的细胞凋亡蛋白 Bcl-2 的表达^[20]。众所周知,蛋白质除了参与微生物细胞的结构组成之外,还以酶的形式催化细胞内的各种生化反应,其表达受阻必然会影响细胞的结构和正常生理功能。

本文对两种菌的一系列实验结果还证明了茶多酚对革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌较革兰氏阴性的铜绿假单胞菌的抑菌效果更强,其原因可能与两种菌在细胞壁结构组成上的差异有关。一般革兰氏阳性菌细胞壁的主要成分是肽聚糖和少量磷壁酸,它对糖类、氨基酸和大部分离子来说容易透过;而革兰氏阴性菌的细胞壁结构复杂,由肽聚糖层和外膜构成,不太容易被破坏,且外膜的负电荷较强,能控制某些物质的进出^[21]。目前,我们正在通过透射电镜观察茶多酚处理后的细菌菌体形态及内部结构的变化,以期在微观上进一步探明茶多酚的抑菌机理。

参考文献

- [1] 严鸿德,汪东风,王泽衣,等. 茶叶深加工技术. 第 1 版. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 174-175.
- [2] 白传记,孔德荣,张淑伟,等. 茶多酚抑菌活性的实验研究. 肉品卫生, 1997(5): 3-5.
- [3] Almajano MP, Carbó R, Jiménez JAL, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 2008, **108**(1): 55-63.
- [4] 刘焱,丁玉珍,娄爱华,等. 茶多酚在鱼糜贮藏中的应用. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, **34**(6): 724-727.

- [5] 汪兴平, 刘勤晋. 茶多酚应用于鲜鱼保鲜效果研究. 湖北民族学院学报, 1996, 14(2): 53-54.
- [6] 廖丹, 朱旗, 刘焱, 等. 茶多酚对淡水鱼肉保鲜作用的研究. 茶叶通讯, 2009, 36(3): 3-5.
- [7] 郭全友, 许钟, 杨宪时. 养殖大黄鱼加工和冰藏过程中鲜度和细菌类型的变化. 海洋渔业, 2008, 30(3): 261-267.
- [8] 吕淑霞, 白泽朴, 代义, 等. 乳酸链球菌素(Nisin)抑菌作用及其抑菌机理的研究. 中国酿造, 2008, 186(9): 87-91.
- [9] Tumay Y, Belma A, Sahlan O. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(8): 2052-2056.
- [10] Weiduo S, Joshus G, Rong T, et al. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1125(2): 204-210.
- [11] 张新虎, 何静, 沈慧敏. 苍耳提取物对番茄灰霉病菌的抑制作用及抑菌机理初探. 草业学报, 2008, 17(3): 99-104.
- [12] 陈毓荃. 生物化学研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1995: 171-174.
- [13] 翟培, 韩晋辉, 侯丽霞, 等. 家蝇抗菌肽的抑菌动力学研究及其机理初探. 中国生物工程杂志, 2006, 26(11): 33-39.
- [14] Ke X, Xi GC, Ming K, et al. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76(1): 17-22.
- [15] Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 2003(3): 393-397.
- [16] MT 马迪根, JM 马丁克. 微生物生物学. 第 11 版. 李明春, 等译. 北京: 科学出版社, 2009: 95-113.
- [17] 吴勇. 茶多酚作用的分子机理与闽东绿茶发展前景. 茶叶科学技术, 2008(2): 40-43.
- [18] 曾亮, 黄建安, 李赤翎, 等. 儿茶素的抑菌效果及机理研究. 食品工业科技, 2009, 30(5): 89-92.
- [19] 刘志恒. 现代微生物学. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2008: 459-519.
- [20] 贾旭东, 韩驰, 陈君石. 茶多酚和茶色素对人肝癌细胞株 HepG2 细胞凋亡的影响. 卫生研究, 2005, 34(1): 73-75.
- [21] 孙军德, 杨幼慧, 赵春燕. 微生物学. 南京: 东南大学出版社, 2009: 18-21.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。