

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2012.04.006

# 蛋清溶菌酶与茶多酚联合抑菌作用研究

豆丽丽

(天津科技大学 包装与印刷工程学院, 天津 300222)

**摘要:** 采用滤纸片扩散法分别测定了蛋清溶菌酶和茶多酚对供试菌的抑菌圈直径, 并对其抑菌作用的持久性进行了观察与记录。采用对倍稀释的方法, 分别测定了单独使用和联合使用蛋清溶菌酶和茶多酚时的最低抑菌浓度 (MIC), 利用 FIC 值对两者联合使用后的抑菌效果进行了评价, 并确定其最佳复配比例。研究表明: 蛋清溶菌酶和茶多酚联合使用时, 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果表现出相加作用, 对大肠杆菌及沙门氏菌表现出强烈的相加作用。

**关键词:** 蛋清溶菌酶; 茶多酚; 联合抑菌

中图分类号: Q553

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2012)04-0026-05

## Research of Joint Bacteriostasis of Egg White Lysozyme and Tea Polyphenols

Dou Lili

(Packaging and Printing Engineering Institute, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

**Abstract:** The bacteriostatic circles of the egg-white lysozyme and tea polyphenols were measured by filter paper dispersion, and the bacteriostasis effect of durability was observed. Using the double dilution method, the individual and combined minimum inhibitory concentration (MIC) of the egg-white lysozyme and tea polyphenols were determined respectively. The joint bacteriostasis effects of them were evaluated by FIC value. Then, the best mixed proportions were ensured. The results show that: the combined application of the egg-white lysozyme and tea polyphenols displayed that they had addition effect for *staphylococcus aureus* and a strong addition effect for *escherichia coli* with *salmonella*.

**Key words:** egg-white lysozyme; tea polyphenols; joint antibacterial

## 0 引言

溶菌酶 (lysozyme) 又称胞壁质酶, 主要作用于肽聚糖分子中 N-乙酰胞壁酸 (N-acetylmuramic acid, NAM) 与乙酰葡萄糖氨 (acetyl glucosamine, NAG) 之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键, 使细菌细胞壁松弛, 从而失去对细胞的保护作用, 最后导致细胞溶解死亡<sup>[1-2]</sup>。溶菌酶在鸡蛋清中约含 3.5%, 分子量为 14 000, 其等电点在 pH 值为 10.8 左右, 最适效应温度为 50 °C。其化学性质较稳定, pH 值在 1.2~11.3 之间改变时, 对其

结构影响很小; pH 值在 4.0~7.0 范围内, 于 100 °C 条件下处理 1 min, 仍有近 100% 的活力, 且在 210 °C 条件下加热 1.5 h 仍具有活性; 但其在碱性环境条件下的稳定性较差<sup>[3-6]</sup>。由于目前的抗生素滥用及化学防腐剂的毒副作用, 迫切需要安全的抑菌试剂。溶菌酶作为小分子蛋白质, 具有天然无毒、易分解、不残留等优点, 因此可被作为天然抑菌剂用于食品等体系的抑菌、防腐和保鲜。

茶多酚 (tea polyphenol, TP) 是从茶叶中提取的

收稿日期: 2012-06-01

作者简介: 豆丽丽 (1985-), 女, 河北邢台人, 天津科技大学硕士生, 主要研究方向为包装材料与技术,

E-mail: dll0921@126.com

一种活性物质,最初主要被作为食品天然抗氧化剂,用于油脂和含油食品生产中。随着研究的不断深入,人们发现,茶多酚具有特殊的结构,易溶于水及各种有机溶剂(如甲醇、乙醇、丙酮等),微溶于油脂,不溶于氯仿。茶多酚的安全性较好,对热和酸较稳定,对近百种细菌有抑制作用,且其抑菌能力与浓度呈正相关<sup>[7-8]</sup>,因而,其在很多领域均得到了广泛应用。

以上2种物质对食品保鲜均有较好的作用,相关研究较多,但对于茶多酚的抑菌研究较少,且尚未见将其联合应用的相关报导,故本文拟对蛋清溶菌酶与茶多酚的联合抑菌作用进行初步研究,以期对食品保鲜和抑菌包装技术等行业的发展提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

溶菌酶,活性为20 000 U/mg,商通协和生物科技有限公司生产;茶多酚,郑州市鑫意化工产品有限公司生产;金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌,均由天津科技大学食品与生物工程学院提供。

电子分析天平, HY34, 奥豪斯仪器有限公司生产;真空干燥箱, DZF-6050, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产;移液枪, 大龙医疗设备有限公司生产;比色管、玻璃涂布棒, 天津市江天化工技术有限公司生产;立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博迅事业有限公司生产;电热恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司生产。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 培养基的制备

本实验采用细菌培养用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,它的具体配方为:牛肉膏3.0 g,蛋白胨10 g,氯化钠5.0 g,琼脂15~20 g,水1 000 mL。制备培养基时,先将所有的配方物质加热融化,然后调节其pH值至7.4~7.6。将调节好pH值的培养基物质分装后,于高压湿热(120 ℃)条件下灭菌20 min,备用。

#### 1.2.2 供试菌株的制备

本实验选取的供试菌株为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌。将所有供试菌种移接入相对应的试管斜面培养基上,且每种菌种接种多支进行重复实验。将接种细菌后的试管置于37 ℃的电热恒温培养箱中,培养24 h。每种菌种取2支供实验用,其余冷藏备用。

#### 1.2.3 菌悬液的制备

挑取各菌落接种平皿,接种前首先将培养24 h后

的细菌用无菌生理盐水洗脱,再分别制成含菌约 $10^7$  CFU/mL的菌悬液。具体的制备方法如下:分别挑取少量细菌至无菌生理盐水中洗出,再用玻璃珠打散,制成菌悬液,然后将菌悬液的浓度调节为 $10^7$ ~ $10^8$  CFU/mL,备用<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.4 抑菌活性研究

采用滤纸片扩散法,对蛋清溶菌酶和茶多酚的抑菌活性进行研究,具体操作如下:

1) 试验前,对试验所需物品进行高压灭菌消毒或者紫外杀菌处理,培养皿在164 ℃下高温灭菌2 h。试验在无菌操作台上进行。

2) 用移液枪分别吸取各菌悬液200  $\mu$ L,用玻璃涂布器均匀涂布于营养培养基上,然后用镊子取一片滤纸片平贴于平板中央。

3) 用移液枪吸取20  $\mu$ L质量浓度分别为40.0, 20.0, 10.0, 5.0, 2.5 mg/mL的蛋清溶菌酶,滴加在滤纸片上,并设2个平行组,同时设置1个菌液空白对照,做好区分标记。待抑菌剂被滤纸片充分吸收后,倒放入生化培养箱中,于37 ℃恒温条件下培养24 h。最后,采用十字交叉法量取抑菌圈的直径,取平均值,并观察其持久性。

4) 用移液枪吸取20  $\mu$ L质量分数分别为2%和1%的茶多酚溶液,滴加在滤纸片上,并设2个平行组,同时设置1个菌液空白对照组,做好区分标记。待液体被滤纸片充分吸收后,放入生化培养箱中,在37 ℃恒温条件下培养24 h。最后,以十字交叉法量取抑菌圈直径,取平均值,并观察其持久性。

#### 1.2.5 最低抑菌浓度的测定

采用液体培养基对倍稀释的方法,对每个浓度重复2次,同时做空白对照。

量取1 mL浓度为 $10^7$  CFU/mL的菌悬液及1 mL的抑菌剂,加入8 mL固体用培养基中,并置于电热恒温培养箱中培养。

将细菌置于37 ℃下培养48 h,观察测试菌种的生长情况,以完全没有菌生长的最低浓度作为该精油/抑菌剂的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

#### 1.2.6 联合抑菌效果的评价

将2种抑菌剂分别以各自最低浓度的1/4, 1/2, 1倍复配后,采用三因子二次正交方法复配,以得出其最优复配比例。

2种抑菌剂的联合抑菌效果可用分级抑制浓度(fractional inhibitory concentration, FIC)指数加以评价。FIC指数按下式计算<sup>[10]</sup>:

$$FIC_{\text{指数}} = MIC_{\text{复合}} / MIC_{\text{单一-A}} + MIC_{\text{复合}} / MIC_{\text{单一-B}}$$

FIC 指数的判断标准如下:

- 若  $FIC_{\text{指数}} \leq 0.5$ , 则其抑菌效果为协同作用;
- 若  $0.5 < FIC_{\text{指数}} \leq 1.0$ , 则其抑菌效果为相加作用;
- 若  $1.0 < FIC_{\text{指数}} < 4.0$ , 则其抑菌效果无相关作用;
- 若  $FIC_{\text{指数}} \geq 4.0$ , 则其抑菌效果为拮抗作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋清溶菌酶与茶多酚对供试菌的抑菌圈直径及其持久性测定

#### 2.1.1 蛋清溶菌酶

实验所得蛋清溶菌酶对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌的抑菌圈直径随时间的变化结果如图 1~3 所示。

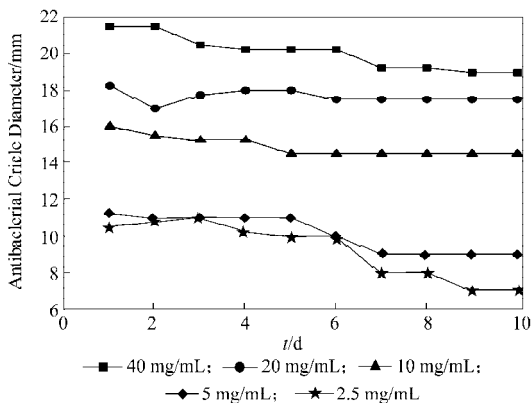


图 1 蛋清溶菌酶对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径随时间的变化关系

Fig. 1 Relationship between change of time and egg white lysozyme in *staphylococcus aureus* inhibition zone diameters

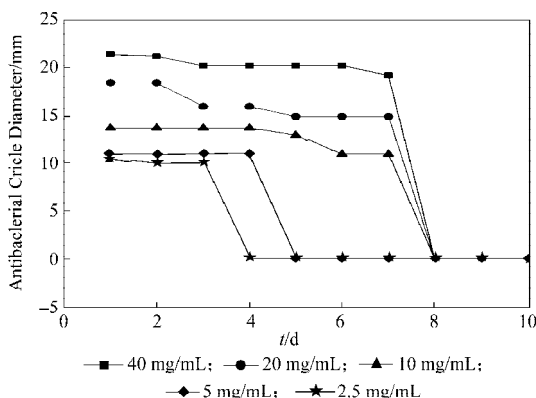


图 2 蛋清溶菌酶对大肠杆菌的抑菌圈直径随时间的变化关系

Fig. 2 Relationship between change of time and egg white lysozyme in *escherichia coli* inhibition zone diameters

由图 1 可知, 40 mg/mL 蛋清溶菌酶对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最强, 抑菌圈直径为 21.5 mm, 且随着时间的增加, 抑菌趋势趋于稳定。这表明蛋清溶菌酶对金黄色葡萄球菌的抑菌作用具有较好的持

久性, 即抑菌持久性较好, 且基本稳定。

由图 2 可知, 蛋清溶菌酶对大肠杆菌的抑菌持久性较差, 各质量浓度下, 在第 6 天就已经有部分菌落侵入抑菌圈内; 质量浓度为 40, 20, 10 mg/mL 的蛋清溶菌酶的抑菌作用从第 7 天开始出现下降, 且幅度较大, 出现了曲线突变。

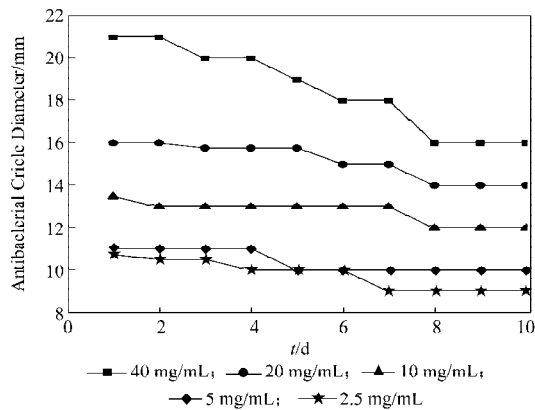


图 3 蛋清溶菌酶对沙门氏菌的抑菌圈直径随时间的变化关系

Fig. 3 Relationship between change of time and egg white lysozyme in *salmonella* inhibition zone diameters

由图 3 可知, 蛋清溶菌酶对沙门氏菌的抑菌效果比较稳定, 但在后期也出现了部分的降低。

由图 1~3 所示蛋清溶菌酶对不同细菌的抑菌圈直径随时间的变化关系可知, 随着蛋清溶菌酶浓度的增加, 抑菌圈直径成正比增大, 这表明其抑菌效果成正比增加<sup>[11]</sup>。

#### 2.1.2 茶多酚

表 1 所示为实验所得不同质量分数的茶多酚对供试菌的抑菌圈直径。

表 1 茶多酚抑菌圈测定  
Table 1 bacteria circle of tea polyphenol

茶多酚 质量分数 / %	抑菌圈直径 / mm		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	沙门氏菌
2	17.00	13.75	11.00
1	13.25	12.75	9.25

由表 1 可知, 茶多酚的抑菌作用也是随其浓度的增大而增加的, 但对各供试菌的抑菌作用表现为金黄色葡萄球菌 > 大肠杆菌 > 沙门氏菌, 并且在第 10 天观察抑菌圈时几乎未发生变化, 这表明茶多酚的抑菌作用的持久性也较稳定<sup>[12]</sup>。

### 2.2 蛋清溶菌酶及茶多酚的 MIC 测定结果

表 2 所示为溶菌酶及茶多酚对各供试菌的最低抑菌浓度测定结果。由表 2 可知, 溶菌酶对 3 种供试菌的最低抑菌浓度均为 0.5 mg/mL, 但抑菌圈测试的实验结果表明, 其对大肠杆菌的抑菌持久性是最差

的；茶多酚的最低抑菌浓度值与抑菌圈的变化趋势是一致的。

表2 溶菌酶及茶多酚对各供试菌的最低抑菌浓度

Table 2 MIC of lysozyme or TP on several bacteria

供试菌种类	MIC/(mg · mL <sup>-1</sup> )	
	溶菌酶	茶多酚
金黄色葡萄球菌	0.5	0.6
大肠杆菌	0.5	0.8
沙门氏菌	0.5	1.0

### 2.3 蛋清溶菌酶与茶多酚联合抑菌 MIC 测定结果

通过测定的蛋清溶菌酶与茶多酚联合抑菌时的最低抑菌浓度，计算相应的 FIC 值，并对两者联合作用效果进行评价<sup>[13]</sup>，所得结果见表3。其中，复配比例 1-1 为最低抑菌浓度 (0.5 mg/mL) 溶菌酶和最低抑菌浓度 (0.8 mg/mL) 茶多酚复配；1-2 为 MIC 溶菌酶和 1/2MIC 茶多酚复配；1-3 为 MIC 溶菌酶和 1/4MIC 茶多酚复配；2-1 为 1/2MIC 溶菌酶和 MIC 茶多酚复配；2-2 为 1/2MIC 溶菌酶和 1/2MIC 茶多酚复配；2-3 为 1/2MIC 溶菌酶和 1/4MIC 茶多酚复配；3-1 为 1/4MIC 溶菌酶和 MIC 茶多酚复配；3-2 为 1/4MIC 溶菌酶和 1/2MIC 茶多酚复配；3-3 为 1/4MIC 溶菌酶和 1/4MIC 茶多酚复配。

表3 蛋清溶菌酶与茶多酚联合抑菌复配结果

Table 3 The combined anti-bacteria proportion of lysozyme and TP

供试菌种类	复配比例								
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
金黄色葡萄球菌	-	-	+	-	-	++	-	-	+++
大肠杆菌	-	-	+	-	-	++	-	-	+++
沙门氏菌	-	-	+	-	-	++	-	-	+++

注：- 表示未长菌，+ 有极少量的菌，++ 有部分菌，+++ 有大量的菌。

由表3可以看出，蛋清溶菌酶与茶多酚的最佳复配比例为 3-2 组，即 1/4MIC 蛋清溶菌酶和 1/2MIC 的茶多酚复配，复配比例为 0.125 mg/mL : 0.4 mg/mL，即 5 : 16。在此复配比例条件下，蛋清溶菌酶与茶多酚的联合抑菌效果最好。

表4所示为蛋清溶菌酶与茶多酚联合复配后的抑菌效果指标 FIC 值与抑菌评价。

由表4所示联合复配后抑菌效果指标 FIC 值可知，蛋清溶菌酶和茶多酚对3种供试菌的抑菌效果指数  $0.5 < FIC < 1$ ，表现为强烈的相加作用。联合抑菌效果的明显性表现为：对沙门氏菌 > 大肠杆菌 > 金黄色葡萄球菌，且相对于蛋清溶菌酶或茶多酚单独抑菌效果来说效果尤为明显。

表4 蛋清溶菌酶与茶多酚联合抑菌效果评价

Table 4 The joint antibacterial effect assessment of egg white lysozyme and TP

细菌	MIC/(mg · mL <sup>-1</sup> )				FIC	抑菌评价
	溶菌酶	茶多酚	溶菌酶复合	茶多酚复合		
金黄色葡萄球菌	0.5	0.6	0.125	0.4	0.92	相加作用
大肠杆菌	0.5	0.8	0.125	0.4	0.75	相加作用
沙门氏菌	0.5	1.0	0.125	0.4	0.65	相加作用

## 3 结语

随着人民生活水平及安全意识的不断提高，天然抑菌剂的研究与发展已成为必然趋势，尤其是在食品工业的研究中，将发挥举足轻重的作用。

本文所研究的蛋清溶菌酶属于动物源抑菌剂类型<sup>[14]</sup>，而茶多酚属于植物源抑菌剂类型，两者的有效结合，表现出了强烈的相加抑菌效果，且这2种抑菌剂溶于水后无色无味，不会影响食品本身的风味等特点<sup>[15]</sup>。因而，对于高效、光谱、无毒、天然食品抑菌剂的寻找和筛选有着重要的科学意义和应用价值，为食品保鲜和抑菌包装技术的发展与应用提供了一定的参考价值。

### 参考文献：

- [1] 王跃军, 孙 谧, 张云波, 等. 海洋低温溶菌酶的制备及酶学性质[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(4): 54-63. Wang Yuejun, Sun Mi, Zhang Yunbo, et al. Studies on Preparation and Characteristic of the Marine Low Temperature Lysozyme[J]. Marine Fisheries Research, 2000, 21(4): 54-63.
- [2] Valerie A P, Cunningham F E. The Chemistry of Lysozyme and Its Use as a Food Preservative and a Pharmaceutical[J]. Food Science and Nutrition, 1988, 26(4): 359-395.
- [3] 吴京平. 新型微生物源天然食品防腐剂及其抑菌性能[J]. 江西食品工业, 2011(1): 47-48, 40. Wu Jingping. Reviews on Natural Biological Preservatives and Their Antibacterial Action[J]. Jiangxi Food Industry, 2011(1): 47-48, 40.
- [4] 李英辉, 丛丽娜, 朱蓓薇. 海参肠中溶菌酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 大连工业大学学报, 2008, 27(3): 193-196. Li Yinghui, Cong Lina, Zhu Beiwei. Purification and Characterization of Lysozyme from the Intestine of Sea Cucumber[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2008, 27(3): 193-196.
- [5] 冯学珍, 郑 媛, 孙 谧, 等. 海洋溶菌酶高产菌株发酵条件探讨及培养基优化[J]. 食品工业科技, 2008, 29

- (11) : 57-60.  
Feng Xuezheng, Zheng Yuan, Sun Mi, et al. Optimization of Fermentation Conditions of High Marine Lysozyme-Producing Strain[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(11) : 57-60.
- [6] 刘 慧, 王凤山, 楚 杰. 蛋清溶菌酶部分酶学性质及酶活性的影响因素研究[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6) : 385-391.  
Liu Hui, Wang Fengshan, Chu Jie. Study on Some Enzymological Properties and Activity Influencing Factors of Egg White Lysozyme[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2008, 29(6) : 385-391.
- [7] 潘素君, 李向荣, 谭周进, 等. 茶多酚的抑菌作用研究[J]. 湖南农业科学, 2009(11) : 96-97.  
Pan Sujun, Li Xiangrong, Tan Zhoujin, et al. Inhibitory Effect of Tea-Polyphenol against Pathogenic Bacteria[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2009(11) : 96-97.
- [8] 李仕剑, 黄 瀚. 茶多酚生物学效应的作用机制[J]. 科技信息, 2007(15) : 87-88.  
Li Shijian, Huang Han. Tea Polyphenol Biology Effect Mechanism of Action[J]. Science and Technology Information, 2007(15) : 87-88.
- [9] 许志刚. 普通植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 7.  
Xu Zhigang. The General Plant Pathology[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1997: 7.
- [10] 宫 霞, 乐国伟, 李云飞. 家蝇幼虫抗菌肽的抗菌谱及其与抗生素的协同作用研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(4) : 516-520.  
Gong Xia, Le Guowei, Li Yunfei. Antibacterial Spectrum of Antibacterial Peptides from *Musca Domestica* Larvae and Synergic Interaction between the Peptides and Antibiotics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(4) : 516-520.
- [11] 黄 敏, 孔明航, 王丽明. 鸡蛋清中溶菌酶的提取与抑菌作用[J]. 中国食品添加剂, 2010(3) : 154-157.  
Huang Min, Kong Minghang, Wang Liming. The Extraction and Antibacterial Effect of Lysozyme from Hen-Egg White[J]. China Food Additives, 2010(3) : 154-157.
- [12] 张旭光, 李婷婷, 朱军莉, 等. 茶多酚处理对冷藏养殖大黄鱼品质的影响[J]. 茶叶科学, 2011, 31(2): 105-111.  
Zhang Xuguang, Li Tingting, Zhu Junli, et al. The Influence on Quality of *Pseudosciaena Crocea* Dip by Tea Polyphenol during Cold Storage[J]. Journal of Tea Science, 2011, 31(2) : 105-111.
- [13] Annelise P L. Role of Hydration in Lysozyme Structure and Activity: Relevance in Protein Engineering and Design[J]. Journal of Food Engineering, 2000, 22(1/2/3/4): 349-365.
- [14] Scaman C, Nakai S, Aminlari M. Effect of pH, Temperature and Sodium Bisulfite or Cysteine on the Level of Maillard-Based Conjugation of Lysozyme with Dextran, Galactomannan and Mannan[J]. Food Chemistry, 2006, 99: 368-380.
- [15] Mitsumoto M, O'Grady M D, Kerry J P, et al. Addition of Tea Catechins and Vitamin C on Sensory Evaluation, Colour and Lipid Stability during Chilled Storage in Cooked or Raw Beef and Chicken Patties[J]. Meat Science, 2005, 69(4) : 773-779.

(责任编辑: 廖友媛)

