

苯乳酸与食品防腐剂联合抑菌效果

Study on antibacterial activity of phenyllactic acid combined with food preservatives

宁亚维¹ 闫爱红¹ 王世杰²

NING Ya-wei¹ YAN Ai-hong¹ WANG Shi-jie²

王志新¹ 李兴峰¹ 朱宏² 贾英民³

WANG Zhi-xin¹ LI Xing-feng¹ ZHU Hong² JIA Ying-min³

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 石家庄君乐宝乳业有限公司, 河北 石家庄 050221; 3. 北京工商大学食品学院, 北京 102488)

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. Shijiazhuang Junlebao Dairy Co., Ltd., Shijiazhuang, Hebei 050221, China;

3. Beijing Technology and Business University, School of Food and Chemical Engineering, Beijing 102488, China)

摘要:以食源性病原菌 *Escherichia coli* 和 *Listeria monocytogenes* 为指示菌,研究了苯乳酸与常用食品防腐剂的联合抑菌作用。采用微量二倍稀释法和棋盘法分别测定苯乳酸与 6 种防腐剂的最小抑菌浓度及联合抑菌指数,并通过时间—杀菌曲线进一步考察复配较优组合的协同抑菌效果。结果显示:苯乳酸与乳酸链球菌素联用对 *E. coli* 和 *L. monocytogenes* 分别表现为无关和相加作用;苯乳酸与对羟基苯甲酸乙酯联用对 2 株指示菌均为相加作用;与 EDTA-Na₂ 和 ϵ -聚赖氨酸联用对 2 株指示菌均为无关作用;苯乳酸分别与苯甲酸钠和山梨酸钾联用对 *E. coli* 均表现为协同作用,对 *L. monocytogenes* 均表现为相加作用。苯乳酸分别与苯甲酸钠和山梨酸钾联合使用后,苯乳酸使用剂量降低 75%,苯甲酸钠和山梨酸钾的使用剂量均可以降低 50%。

关键词:苯乳酸;食品防腐剂;协同抑菌

Abstract: The antibacterial activity of phenyllactic acid (PLA) combined with food preservatives against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* was studied. The minimal inhibitory concentrations were determined by broth microdilution method and the interaction of PLA with food preservatives was determined using the checkerboard test. Furthermore, the syn-

ergistic effect of the optimized combination was evaluated through the time-kill assay. Results showed that PLA combined with nisin showed indifference effect against *E. coli* and additive effect against *L. monocytogenes*. The interaction of PLA and ethyl *p*-hydroxybenzoate showed an additive effect against *E. coli* and *L. monocytogenes*. PLA combined with EDTA-Na₂ or ϵ -poly-L-lysine was observed indifference against *E. coli* and *L. monocytogenes*. PLA combined with sodium benzoate or potassium sorbate exhibited synergistic effect against *E. coli*, and additive effect against *L. monocytogenes*. The dosage of PLA was decreased 75%, and that of sodium benzoate or potassium sorbate reduced 50%, when PLA combined with sodium benzoate or potassium sorbate against *E. coli*.

Keywords: phenyllactic acid; food preservatives; synergistic antibacterial effect

苯乳酸(Phenyllactic acid, PLA)是近年来发现的一种新型天然抑菌物质,存在于蜂蜜^[1]、酸面团^[2]、泡菜^[3]等食品中,可由乳酸菌代谢产生^[2,4]。苯乳酸具有广谱抑菌性,不仅能够抑制革兰氏阳性菌(如 *Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*)和革兰氏阴性菌^[5-6](如 *Escherichia coli*、*Salmoella enterica*、*Providencia atuartii*、*Klebsiella oxytoca*),而且能够有效抑制多种真菌^[7](如 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Aspergillus flavus*、*Penicillium expansum*、*Botrytis cinerea* 等)。此外,苯乳酸具有溶解性好、易于在食品体系中扩散、酸与热稳定性高^[5]等优点。然而苯乳酸的抑菌效力较低,如对细菌的最小抑菌浓度为 1.25~5.00 mg/mL,对真菌的最小抑菌浓度为 5~10 mg/mL^[8],较 Nisin、 ϵ -聚赖氨酸

基金项目:河北省杰出青年基金(编号:C2016208142);河北省自然科学基金(编号:C2016208150);国家自然科学基金(编号:31401653)

作者简介:宁亚维,女,河北科技大学副教授,博士。

通信作者:贾英民(1961—),男,北京工商大学教授,博士。

E-mail: jiatingmin@btbu.edu.cn

收稿日期:2017-03-23

酸等生物防腐剂对应的最小抑菌浓度高数十倍。因此苯乳酸作为生物防腐剂使用价格相对较高,限制了其商业化应用。

“栅栏技术”在食品防腐剂的应用,通常是通过使用少量、多种防腐剂以达到良好防腐效果。多项研究表明防腐剂之间存在协同抑菌效应。如 Liu 等^[9]研究了 ϵ -聚赖氨酸与 Nisin 的联合抑菌作用,结果表明二者联合作用于 *E. coli*、*B. subtilis* 和 *S. aureus* 均表现出协同抑菌作用; Manalhães 等^[10]研究了鼠李糖脂与 Nisin 对 *L. monocytogenes* 的协同作用,研究结果显示鼠李糖脂与 Nisin 联用可分别降低 2 种抑菌剂的使用浓度;高玉荣等^[11]研究了纳他霉素与山梨酸钾、苯甲酸钠、对羟基苯甲酸、硝酸钠和脱氢乙酸钠 5 种化学防腐剂的联合抑菌效果,发现纳他霉素与除苯甲酸钠之外的 4 种防腐剂之间存在协同抑菌作用;莫树平等^[12]研究了 ϵ -聚赖氨酸与乳酸链球菌素和那他霉素三者复配对食品中常见的腐败菌与致病菌的抑制效果,结果表明生物防腐剂的联合使用可显著增强 ϵ -聚赖氨酸的抑菌效果。因此,通过多种防腐剂的联用可以减少单一防腐剂的添加量,降低成本,提高食品安全性。

本研究拟以常见食源性病原菌大肠杆菌(*E. coli* ATCC 44752)和单核细胞增生李斯特菌(*L. monocytogenes* 10403s)为指示菌,考察了苯乳酸与常用食品防腐剂山梨酸钾、苯甲酸钠等的联合抑菌效果,以期苯乳酸与防腐剂在食品防腐中的联合使用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验菌种

E. coli ATCC 44752 和 *L. monocytogenes* 10403s; 河北科技大学食品生物技术与安全实验室保藏。

1.2 试剂与培养基

苯乳酸:纯度 98%,美国 Sigma 公司;
 苯甲酸钠:纯度 99.9%,西陇化工股份有限公司;
 山梨酸钾:纯度 99.9%,国药集团化学试剂有限公司;
 EDTA-Na₂:纯度 99%,天津博迪化工股份有限公司;
 对羟基苯甲酸乙酯:纯度 99%,国药集团化学试剂有限公司;

Nisin:≥900 IU/mg,上海麦克林生化科技有限公司;
 ϵ -聚赖氨酸:生物试剂,美国 AMRESCO 公司;
 TSB:生物试剂,北京索莱宝科技有限公司;
 NB:生物试剂,北京奥博星生物技术责任有限公司。

1.3 仪器与设备

紫外分光光度计:Evolution 220 型,美国 Thermo 公司;
 酶标仪: SpectraMax Plus 384 型,美国 Molecular Devices 公司;

恒温摇床:ZHWHY 型,上海智城分析仪器制造公司;
 恒温培养箱:ZSD-A1160 型,上海智城分析仪器制造公司;

超净台:ZHJH-C110913 型,上海智城分析仪器制造公司。

1.4 方法

1.4.1 最小抑菌浓度 参照 Wiegand 等^[13]的方法采用二倍

稀释法测定苯乳酸及 6 种食品防腐剂的最小抑菌浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)。向无菌 96 孔板的前 11 列中加入灭菌培养基,食品防腐剂从第 1~10 列依次进行二倍梯度稀释;第 11 列不加入食品防腐剂,作为阳性对照;第 12 列只加入培养基,作为阴性对照;最后每孔加入等体积的指示菌,终浓度约为 5×10^5 CFU/mL,37 °C 培养 24 h,用 SpectraMax Plus 384 酶标仪进行测定。

1.4.2 联合抑菌作用 根据各防腐剂的 MIC 值,参考 Segal 等^[14]的方法略作修改进行联合抑菌活性测定。用微量移液器沿无菌 96 孔微孔板的 X 轴方向(从左到右)在第 2~8 列每列孔中依次加入 8 倍 MIC 至 1/8 MIC 的苯乳酸(A);同样,沿 Y 轴方向(从上到下)在第 B~F 行每行孔中加入 8 倍 MIC 至 1/8 MIC 的食品防腐剂(B);最终得到 A(2 倍 MIC 至 1/32 MIC)× B(1/32 MIC 至 2 倍 MIC)49 种联用组合,第 1 列和第 A 行分别为单独加入 A/B 的对照组;然后加入 1.0×10^6 CFU/mL 的菌悬液,37 °C 培养 24 h 后,用酶标仪进行测定。

通过计算部分抑菌浓度指数(Fractional Inhibitory Concentration Index, FIC₁)判断协同作用效果,计算方法为:

$$FIC_1 = FIC_A + FIC_B = MIC_{A\text{联用}} / MIC_{A\text{单独}} + MIC_{B\text{联用}} / MIC_{B\text{单独}}, \quad (1)$$

式中:

FIC₁——苯乳酸与食品防腐剂联用时的部分抑菌浓度指数;

FIC_A——苯乳酸和食品防腐剂联合使用时苯乳酸的部分抑菌浓度指数;

FIC_B——苯乳酸和食品防腐剂联合使用时食品防腐剂的部分抑菌浓度指数;

MIC_{A联用}——苯乳酸和食品防腐剂联合使用时苯乳酸的 MIC,mg/mL;

MIC_{A单独}——苯乳酸单独使用时的 MIC,mg/mL;

MIC_{B联用}——苯乳酸和食品防腐剂联合使用时食品防腐剂 MIC,mg/mL;

MIC_{B单独}——食品防腐剂单独使用时的 MIC,mg/mL。

当 $FIC_1 \leq 0.5$ 时,为协同作用;当 $0.5 < FIC_1 \leq 1$ 时,为部分协同或相加作用;当 $1 < FIC_1 \leq 2$ 时,为无关作用;当 $FIC_1 > 2$ 时,为拮抗作用。

1.4.3 时间-杀菌曲线 以棋盘法试验结果作为参考,进一步考察了苯乳酸与苯甲酸钠和山梨酸钾较优组合下的联合抑菌效果。将菌悬液浓度调至 1.0×10^6 CFU/mL 分别加入含有苯乳酸、苯甲酸钠、山梨酸钾以及苯乳酸和苯甲酸钠、山梨酸钾两两混合培养液的试管中,使菌悬液终浓度为 5×10^5 CFU/mL。将上述含有防腐剂的菌悬液于 37 °C 恒温培养箱中培养,分别于 0,2,4,6,9,12,24 h 取样,并采用平板计数法测定活菌数。以时间为横坐标,lg CFU/mL 为纵坐标绘制时间-杀菌曲线。

2 结果与分析

2.1 最小抑菌浓度

分别测定了苯乳酸和 6 种常见食品防腐剂对 *E. coli* 和

L. monocytogenes 的最小抑菌浓度。结果表明,苯乳酸对 *E. coli* 的 MIC 值为 1.25 mg/mL,对 *L. monocytogenes* 的 MIC 值为 2.25 mg/mL,与袁景环等^[8]的研究结果一致; ϵ -聚赖氨酸对 2 株指示菌的抑菌效果强于苯乳酸等其余 6 种防腐剂,其对 *E. coli* 和 *L. monocytogenes* 的 MIC 值分别为 0.156 0, 0.007 8 mg/mL, ϵ -聚赖氨酸对 *L. monocytogenes* 的 MIC 值显著低于对 *E. coli* 的,与 Geornaras 等^[15]的研究结果一致;其次是 Nisin,但其只能够抑制革兰氏菌 *L. monocytogenes*,其 MIC 值为 0.25 mg/mL,而对革兰氏阴性菌 *E. coli* 无抑菌作用;EDTA- Na_2 对 2 株指示菌的 MIC 值相同均为 0.625 mg/mL;对羟基苯甲酸乙酯对 *E. coli* 和 *L. monocytogenes* 的 MIC 值分别为 0.625, 1.000 mg/mL;山梨酸钾对 *E. coli* 和 *L. monocytogenes* 的 MIC 值分别为 12.5, 28.0 mg/mL;苯甲酸钠对 *E. coli* 和 *L. monocytogenes* 的 MIC 值分别为 10.5, 25.0 mg/mL。上述结果表明,各防腐剂间抑菌效应差异显著, ϵ -聚赖氨酸和 EDTA- Na_2 对 2 株指示菌抑制效果均较好;而食品中常用的化学防腐剂苯甲酸钠和山梨酸钾对细菌的抑制效果则较差。防腐剂的抑菌效果差异同其抑菌作用机制相关,而不同作用机制的防腐剂间联合使用,更易于发挥协同增效抑菌作用。因此,有必要考察苯乳酸与上述防腐剂的联合使用效应,以筛选能同苯乳酸发

挥协同抑菌作用的防腐剂。

2.2 联合抑菌作用

通过微量棋盘法考察了苯乳酸与食品防腐剂的联合抑菌效应,结果见表 1。对于 *L. monocytogenes* 本研究所选防腐剂均不能与苯乳酸联用发挥协同抑菌作用,对于 *E. coli* 苯乳酸分别与苯甲酸钠和山梨酸钾联用具有协同抑菌作用。山梨酸钾和苯甲酸钠主要用于抑制霉菌和酵母菌,对细菌抑制作用相对较弱。而苯乳酸与苯甲酸钠联用后,苯乳酸的浓度降为单独使用时的 1/2~1/4,苯甲酸钠的浓度则降为单独使用时的 1/2~1/16,苯甲酸钠的使用量由单独使用时的 10.50 mg/mL 降为 0.65 mg/mL,使其使用量低于食品添加剂使用标准最大使用量 1 g/kg(GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》),可作为抑制细菌的防腐剂用于食品加工中。因此,苯乳酸与苯甲酸钠联用可以扩大苯甲酸钠的抑菌谱,降低两者的使用剂量。同样,山梨酸钾与苯乳酸联用后,苯乳酸使用量降为单独使用时的 1/2~1/4,山梨酸钾使用量降为单独使用时的 1/2~1/8。上述结果表明苯乳酸分别与山梨酸钾和苯甲酸钠联用后,生物防腐剂苯乳酸和化学防腐剂苯甲酸钠、山梨酸钾使用剂量均显著降低,因此若将其作为复合食品防腐剂可显著降低使用成本,提高使用安全性。

表 1 苯乳酸与食品防腐剂联合抑菌活性

Table 1 Determination of the antibacterial activity of PLA in combination with preservatives

抑菌物质	<i>E. coli</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
	FIC_A	FIC_{PLA}	FIC_1	FIC_A	FIC_{PLA}	FIC_1
苯甲酸钠	0.062	0.25	0.312	0.5	0.5	1
山梨酸钾	0.125	0.25	0.375	0.5	0.5	1
对羟基苯甲酸乙酯	0.500	0.50	1.000	0.5	0.5	1
EDTA- Na_2	1.000	1.00	2.000	1.0	1.0	2
Nisin	无	1.00	>1.000	0.5	0.5	1
ϵ -polylysine	1.000	1.00	2.000	1.0	1.0	2

2.3 时间—杀菌曲线

通过时间—杀菌曲线对棋盘法选出的复配较优组合的联合抑菌效果进行考察。由图 1 可知,1/4 MIC 浓度苯乳酸对 *E. coli* 没有抑菌作用,1/2 MIC 浓度苯甲酸钠作用 *E. coli* 24 h 后,与对照组相比活菌数降低了 1.69 个对数值,然而二者联合作用 6 h 后,菌落数降低了 3.41 个对数值,表现出显著抑菌作用;作用 9 h 后,联用组与 MIC 浓度苯甲酸钠对 *E. coli* 抑菌趋势基本相同,表明苯乳酸与苯甲酸钠具有显著协同抑菌作用。

由图 2 可知,1/4 MIC 浓度苯乳酸和 1/2 MIC 浓度山梨酸钾分别作用于 *E. coli* 均不能抑制其生长。然而 1/4 MIC 浓度苯乳酸与 1/2 MIC 浓度山梨酸钾联合作用 6 h 后,活菌数降低了 3.63 个对数值;联合作用 24 h 后,菌落总数较初始值没有显著增加,表明苯乳酸与山梨酸钾联用可以有效抑制 *E. coli* 的生长繁殖。

苯乳酸可增加环境中氢离子的浓度,山梨酸钾和苯甲酸

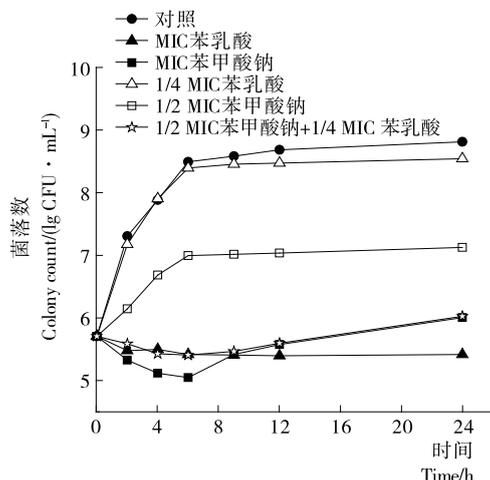


图 1 苯乳酸与苯甲酸钠联用对 *E. coli* 的时间—杀菌曲线
Figure 1 Time-kill curve of PLA in combination with sodium benzoate against *E. coli*

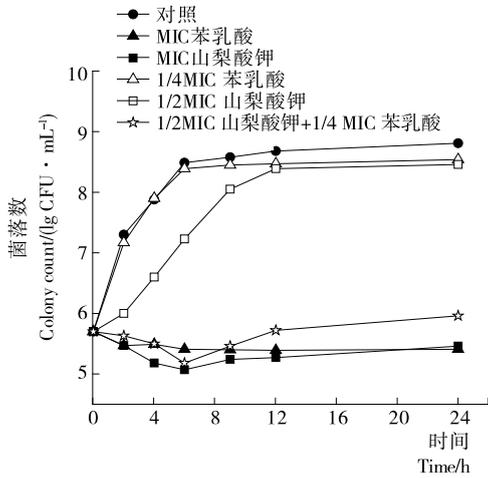


图2 苯乳酸与山梨酸钾联用对 *E. coli* 的时间—杀菌曲线
Figure 2 Time-kill curve of PLA in combination with potassium sorbate against *E. coli*

钠的抑菌活性会随介质 pH 降低而增加,因此苯乳酸可以增强苯甲酸钠和山梨酸钾的抑菌作用效果;此外,苯甲酸钠的作用机理是抑制微生物细胞呼吸酶系的活性,尤其能够阻碍乙酰辅酶 A 缩合反应,从而起到抑菌作用;山梨酸钾的抑菌机制在于它能与微生物细胞中酶的巯基形成共价键,使酶丧失活性,破坏许多重要酶系^[16];苯甲酸钠和山梨酸钾顺利进入微生物细胞是发挥抑菌作用的前提,苯乳酸能够破坏细菌的屏障结构——细胞壁^[5],从而有利于苯甲酸钠和山梨酸钾进入细胞内发挥抑菌作用。因此,苯乳酸与山梨酸钾和苯甲酸钠联合使用具有协同抑菌作用。

3 结论

本试验研究了苯乳酸与常用食品防腐剂的联合抑菌效果,其中苯乳酸与所选用的 6 种防腐剂联用对 *L. monocytogenes* 均不产生协同抑菌作用,而苯乳酸与 2 种化学防腐剂——苯甲酸钠和山梨酸钾联用对 *E. coli* 具有协同增效作用, FIC_1 分别为 0.312, 0.375;联用后,苯乳酸使用剂量降低 75%,苯甲酸钠和山梨酸钾均降低 50%。本研究筛选了能与苯乳酸联合使用发挥协同抑菌作用的食物防腐剂,可为苯乳酸在食品防腐中的应用研究提供理论依据;下一步工作将考察苯乳酸与常用食品防腐剂联用对食品基质的保鲜防腐效应。

参考文献

[1] TUBERTOSO C I G, BIFULCO E, CABONI P, et al. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (*Galactites tomentosa* Moench) honey[J]. Journal Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 364-369.
[2] LAVERMICOCA P, VALERIO F, EVIDENTE A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 4 084-4 090.
[3] LI Xing-feng, NING Ya-wei, LIU Dou, et al. Metabolic mechanism of phenyllactic acid naturally occurring in Chinese pickles

[J]. Food Chemistry, 2015, 186: 265-270.
[4] VALERIO F, LAVERMICOCA P, PASCALE M, et al. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 233(2): 289-295.
[5] DIEULEVEUX V, LEMARINIER S, GUEGUEN M. Antimicrobial spectrum and target site of *D*-3-phenyllactic acid[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 40 (3): 177-183.
[6] DOMÍNGUEZ J M, RODRÍGUEZ N, SALGADO J M, et al. Antimicrobial activity of *D*-3-phenyllactic acid produced by fed-batch process against *Salmonella enterica* [J]. Food Control, 2012, 25: 244-284.
[7] LÓPEZ-MALO A, CORTÉS-ZAVALETA O, HERNÁNDEZ-MENDOZA A, et al. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 173: 30-35.
[8] 袁景环, 贡汉生, 孟祥晨. 苯乳酸的抗菌作用及其抗菌机理的初步研究[J]. 食品工业, 2009(5): 14-17.
[9] LIU Hong-xia, PEI Hou-bao, HAN Zhi-nan, et al. The antimicrobial effects and synergistic antibacterial mechanism of the combination of ϵ -Polylysine and nisin against *Bacillus subtilis* [J]. Food Control, 2015, 47: 444-450.
[10] MANALHÃES L, NITSCHKE M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin [J]. Food Control, 2013, 29: 138-142.
[11] 高玉荣, 王雪平. 食品化学防腐剂与纳他霉素的协同抑菌作用研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(6): 558-561.
[12] 莫树平, 王惠惠, 柏建玲, 等. ϵ -聚赖氨酸复合防腐剂对常见致病菌和污染菌的抑制作用[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 109-111.
[13] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. Nat Protocols, 2008, 3(2): 163-175.
[14] SEGAL E, SEMIS R, NAHMIAS M, et al. Evaluation of antifungal combinations of nystatin-intralipid against *Aspergillus terreus* using checkerboard and disk diffusion methods [J]. Journal de Mycologie Médicale, 2015, 25: 63-70.
[15] GEORNARAS I, YOON Y, BELK K E, et al. Activity of ϵ -Polylysine against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts[J]. Journal of Food Science, 2007, 72: 330-334.
[16] 侯振建. 食品添加剂及应用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 126-127.