

D-苯基乳酸结合涂膜处理对贮藏期葡萄防腐保鲜效应的影响

The effect of D-phenyllactic acid combined with coating treatment on anti-microbial and preservation of grapes during storage

万玉莲 陈刘顺 谢丹 朱益波 朱东兴 齐斌

WAN Yu-lian CHEN Liu-shun XIE Dan ZHU Yi-bo ZHU Dong-xing QI Bin

(常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏常熟 215500)

(School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500, China)

摘要:以巨峰葡萄为试材,研究采后浸果处理对常温贮藏果实表面微生物数量与果实腐烂率的影响。结果表明:与清水处理(CK₁)、单独涂膜处理(CK₂) 2组对照相比,D-苯基乳酸结合涂膜处理可有效抑制果实表面微生物的增加,至贮藏结束时,处理组果实较CK₁和CK₂的表面细菌总数分别降低了99%(P<0.05)和99.3%(P<0.05),霉菌总数分别降低了75%(P<0.05)和94.17%(P<0.05),酵母菌总数分别降低了98.13%(P<0.05)和97.45%(P<0.05),果实腐烂率分别降低了20.65%(P<0.05)和23.68%(P<0.05),大肠菌群数量也明显减少。D-苯基乳酸结合涂膜处理比单独涂膜能显著降低微生物引起的葡萄腐烂,表明其在鲜食葡萄生物保鲜技术领域具有较好的应用潜能。

关键词:D-苯基乳酸;葡萄;抑菌潜力;防腐保鲜

Abstract: The research was done in order to evaluate the effect of D-3-Phenyllactic acid (D-PLA) on preservation of grape and provide reference for SO₂-free storage of table grapes. 'Kyoho' grapes were treated through post-harvest dipping before room temperature storage so that inhibitory potentials of microbial population on fruit surface were evaluated avoiding the fruit decay. The results showed that compared with the two control groups of purified water soakage and coating treatment, the D-PLA combined with coating treatment could effectively inhibit the growth of microorganism on fruit surfaces. It was found that the bacterial population were reduced by 99% and 99.3% respectively (P<0.05), and the mould population were reduced by 75% and 94.17% respectively (P<0.05). Moreover, the yeast population were found reduced by 98.13% and 97.45% respectively (P<0.05), and the coliform population on fruit surfaces of the D-PLA combined with coating treatment were also

suppressed. Consequently, the fruit decay rate of the D-PLA combined with coating treatment was reduced by 20.65% and 23.68% (P<0.05) at the end of room temperature storage. These findings indicated the D-PLA combined with coating treatment was much better than individual coating treatment on antisepsis and the fresh-keeping of the grape, and D-PLA has a great application potential in its biological preservation field.

Keywords: D-3-phenyllactic acid; grape; anti-microbial potentialities; preservation

苯基乳酸也称β-苯基乳酸或2-羟基-3-苯基丙酸,有两种对映异构体(D-苯基乳酸以及L-苯基乳酸),均具有抑菌性^[1],但由于空间结构不同,两种构型功效有明显差异,有研究认为D-苯基乳酸(D-3-phenyllactic acid, D-PLA)抑菌性较L-苯基乳酸强^[2-3],也强于常用食品化学防腐剂如苯甲酸钠、山梨酸钾^[4],其抑菌机理是通过破坏菌体细胞壁使其裂解^[2],或改变菌体蛋白表达与代谢^[5],而对引起食品腐败的许多霉菌^[6]、酵母菌^[7],以及致病细菌具有广谱抑制性^[2,8],比同为细菌素的乳酸链球菌肽(nisin)抑菌性更广^[9],D-PLA可由益生菌——乳酸菌代谢产生^[10],对人体和动物细胞无害^[11-12],作为新型广谱安全抑菌剂,在食品防腐保鲜领域具有潜在应用价值^[9]。

目前,有关苯基乳酸研究多集中在微生物合成^[4,10-11,13-14]、抑菌性方面^[2,5,15-16],用于延长食品保藏期,以乳品与烘焙食品较多^[9]。将D-PLA用于灭菌乳和干酪中,可使李斯特菌降低4.5个对数值^[3],也可延长全脂奶粉保质期^[17],在面包酸面团发酵中接种产苯基乳酸的不同乳酸菌菌株,可使焙烤后面包保质期延长2~7d不等^[18-19]。相比之下其用于果蔬防腐保鲜研究较少,仅见国外在鲜切荔枝、菠萝与柑橘保藏上的少量报道^[20-21],D-PLA用于葡萄防腐保鲜的研究至今未见报道。

葡萄采收后极易受霉菌(尤其是灰霉)侵害而产生腐烂

作者简介:万玉莲,女,常熟理工学院学士。

通信作者:朱东兴(1977—),男,常熟理工学院副教授,硕士。

E-mail: eastar@cslg.edu.cn

收稿日期:2017-09-07

和落粒,在中国南方产区,采收期高温多雨更易遭病菌侵染^[22]。目前葡萄贮运中应用较多的熏硫处理技术(即 SO₂ 防腐剂)因存在许多安全与环保缺陷^[23],在欧美等国家已被限用^[24]。因此探索鲜食葡萄无害化硫替代防腐技术势在必行。天然食品防腐剂与可食性涂膜结合是天然食品防腐剂发展的新方向之一,国外用 β-环糊精作为抗菌物缓释被膜载体,有利于抗菌物均匀喷布与持久性作用^[25],但其用于葡萄防腐保鲜的研究至今未见报道。本研究拟用 D-PLA 结合 β-环糊精为主剂的复配涂膜处理中国南方产区葡萄,研究其防腐保鲜效果,旨在为鲜食葡萄硫替代贮运技术,探索新的生物保鲜途径。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料与试剂

葡萄:巨峰品种,采自江苏常熟葡萄主产区,选择颗粒大小与色泽均匀、成熟度等质量性状相近,无病虫害的果实为供试材料;

D-苯基乳酸、抗坏血酸:分析纯,国药集团化学试剂(北京)有限公司;

β-环状糊精、氯化钙:食品级,市售;

平板计数琼脂培养基、孟加拉红培养基、月桂基硫酸盐胰蛋白胨(LST)肉汤培养基、煌绿乳糖胆盐(BGLB)肉汤培养基:杭州微生物试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

恒温培养箱:HH-600型,上海跃进医疗器械厂;

分析天平:HTP312型,上海菲克苏工具有限公司;

均质器:BA-2S型,上海本昂科学仪器有限公司;

菌落计数器:XK97-A型,上海海恒机电仪表有限公司;

高压蒸汽灭菌锅:LDZX-75KBS型,上海申安医疗器械厂;

超净工作台:SW-CJ-2G型,苏州苏洁净化设备公司。

1.2 试验方法

1.2.1 葡萄采后预处理 在借鉴文献^[20,25]及 GB 2760—2011 使用标准规范基础上,通过预试验确定采后预处理方案。将当天采摘的葡萄及时运回实验室分为 3 组,每组 15 穗,进行以下处理。

(1) 清水处理(CK₁):将待处理葡萄用蒸馏水浸泡 5 min。

(2) 单独涂膜处理(CK₂):将待处理葡萄用配好的普通涂膜液(含 1%氯化钙、1% β-环状糊精、1%抗坏血酸)浸泡 5 min。

(3) D-PLA 结合涂膜处理(T):将 D-PLA 用少量乙醇溶解后,再用配好的涂膜溶液(1%氯化钙、1% β-环状糊精、1%抗坏血酸)稀释为 1%苯基乳酸浓度的防腐保鲜液,将待处理葡萄浸泡 5 min。

将上述 3 组浸泡处理后的葡萄取出自然晾干后,统一用市售 PE 食品包装袋包装,置室温[(25±3)℃]贮藏,定期取样测定相关微生物与腐烂指标,各组指标重复测定 3 次。

1.2.2 测定方法

(1) 细菌菌落总数测定:按 GB 4789.2—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定》执行。

(2) 霉菌与酵母菌菌落总数测定:按 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》执行。

(3) 大肠菌群测定:按 GB 4789.3—2010《食品安全国家标准食品微生物学检验 大肠菌群计数》执行。

(4) 腐烂率测定:参照文献^[26]。以葡萄果实表面出现水渍状病斑作为果实腐烂的判别依据,按果实腐烂面积大小将果实划分为 4 级:0 级,无腐烂;1 级,果面有 1~3 个小腐烂斑点;2 级,腐烂面积占果实面积的 25%~50%;3 级,腐烂面积大于果实面积的 50%。按式(1)计算腐烂率。

$$D = \frac{\sum (l \times n_i)}{l_{\max} \times n_{\text{total}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D——每重复组腐烂率, %;

l——腐烂级别, 0~3;

n_i——每重复组该腐烂级别对应的果粒数;

l_{max}——最高腐烂级别, 3;

n_{total}——每重复组总果粒数。

1.3 数据统计与分析

本试验测定指标重复 3 次,结果以“平均值±标准差”表示,所得数据采用 Excel 软件进行数据处理、分析与作图。

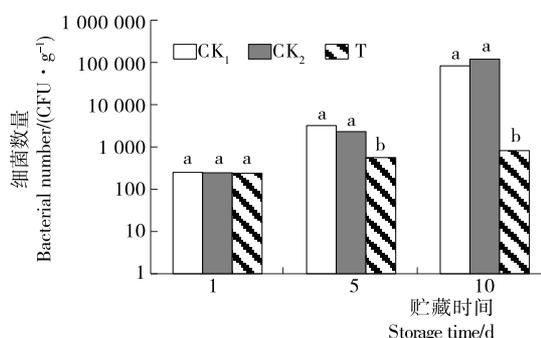
2 结果与分析

2.1 对贮藏期葡萄表面细菌数量的影响

由图 1 可知,巨峰葡萄果粒表面细菌菌落总数随贮藏时间的延长而明显增加,常温贮藏至第 10 天,对照 CK₁ 组与 CK₂ 组果实表面菌落总数分别增加为贮藏首日的 332 倍和 428.57 倍,而 D-PLA 结合涂膜处理(T)菌落总数仅为贮藏首日的 3.42 倍,有效抑制了贮藏期果实表面菌落总数的增长,使处理组菌落总数在第 10 天低于同期 CK₁ 组 99.0% (P<0.05)、CK₂ 组 99.3% (P<0.05),在贮藏第 5 天低于 CK₁ 组 82.5% (P<0.05)、CK₂ 组 75.7% (P<0.05);整个常温贮藏期,普通涂膜的 CK₂ 组较清水处理的 CK₁ 组果实表面菌落总数差异不显著 (P>0.05),而 D-PLA 结合涂膜处理有效抑制了果实表面细菌菌落数的增长。

2.2 对贮藏期葡萄表面霉菌数量的影响

由图 2 可知,经 D-PLA 结合涂膜处理(T)显著抑制了



不同字母表示差异显著, P<0.05

图 1 D-PLA 结合涂膜处理对葡萄贮藏期果实表面细菌数量的影响

Figure 1 Effect D-PLA combined with coating on bacterial number of table grape during storage

贮藏期果实霉菌数量的增加($P < 0.05$),第 5 天时处理组(T)霉菌菌落总数低于 CK₁ 组 90.15% ($P < 0.05$)、CK₂ 组 96.12% ($P < 0.05$),第 10 天时处理组(T)霉菌菌落总数也显著低于两对照组($P < 0.05$),分别较 CK₁ 与 CK₂ 组降低 75.00% 与 94.17%。相比之下,单独涂膜的 CK₂ 组较清水处理的 CK₁ 组有促进果实表面霉菌总数的作用($P < 0.05$),可能是与涂膜中含有利于霉菌生长的淀粉类被膜剂(β -环状糊精)^[27]有关。而本试验中 D-PLA 结合涂膜处理(T)能有效消除这种效应,抑制巨峰葡萄贮藏期霉菌数量的增长。

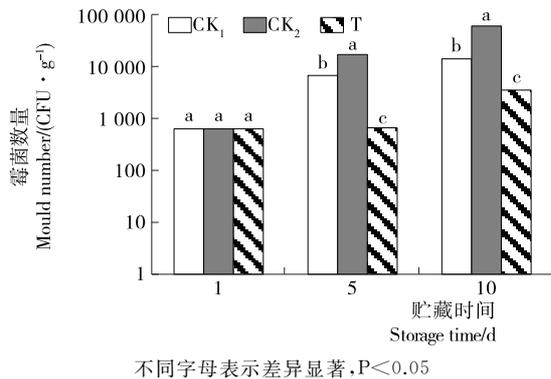


图 2 D-PLA 结合涂膜处理对葡萄贮藏期果实表面霉菌数量的影响

Figure 2 Effect of D-PLA combined with coating on mould number of table grape during storage

2.3 对贮藏期葡萄表面酵母菌数量的影响

由图 3 可知,巨峰葡萄对照果实表面酵母菌总数随贮藏时间的延长而明显增加,D-PLA 结合涂膜处理(T)果实表面酵母菌数量随贮藏时间的延长增加缓慢,使其始终低于中后期两对照组($P < 0.05$)。第 10 天,对照 CK₁ 组与 CK₂ 组果实表面酵母菌总数分别增加到贮藏首日的 84.21 倍与 61.84 倍,而处理组(T)菌落总数仅为贮藏首日的 1.58 倍,有效抑制了贮藏期果实表面酵母菌的增加。第 5 天,处理组果实表面酵母菌总数较对照 CK₁ 与 CK₂ 组降低了 88.57% ($P < 0.05$)和 84.91% ($P < 0.05$);第 10 天,酵母菌数量较对照 CK₁ 与 CK₂ 组降低了 98.13% ($P < 0.05$)和 97.45% ($P < 0.05$)。

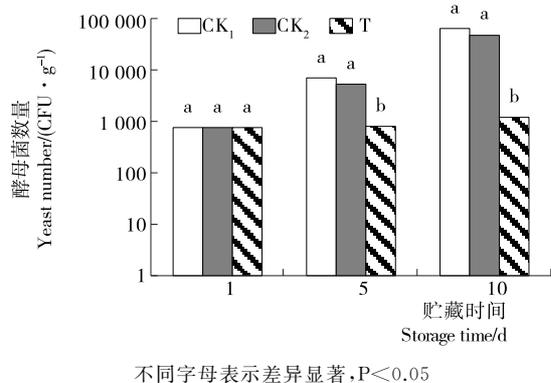


图 3 D-PLA 结合涂膜处理对葡萄贮藏期果实表面酵母菌数量的影响

Figure 3 Effects of D-PLA combined with coating on yeast number of table grape during storage

在两对照组中,单独涂膜(CK₂)组较清水处理(CK₁)组果实表面酵母菌总数有所降低,但差异不显著($P > 0.05$),可见 D-PLA 结合涂膜处理可显著抑制巨峰葡萄贮藏期果实表面酵母菌的增长。

2.4 对贮藏期葡萄表面大肠菌群数量的影响

由表 1 可知,对照 CK₁ 组与 CK₂ 组的大肠菌群 MPN 值随贮藏时间的延长而明显增加,CK₁ 组和 CK₂ 组在贮藏第 5 天后检出大肠菌群阳性,MPN 值均达到 3.6 MPN/g,而 D-PLA 结合涂膜处理组(T)在常温贮藏期间大肠菌群的 MPN 值始终低于 3.0 MPN/g,可见 D-PLA 结合涂膜处理可有效抑制巨峰葡萄常温贮藏期果实表面大肠菌群数量的增长。

表 1 贮藏期各组葡萄果实表面大肠菌群 MPN 值

Table 1 Effect of D-PLA combined with coating on MPN of coliforms in grape

贮藏天数/d	CK ₁ / (MPN · g ⁻¹)	CK ₂ / (MPN · g ⁻¹)	T/ (MPN · g ⁻¹)
1	<3.0	<3.0	<3.0
5	3.6	3.6	<3.0
10	3.6	3.6	<3.0

2.5 对葡萄贮藏期果实腐烂率的影响

由图 4 可以看出,果实腐烂率随贮藏时间的延长而明显上升,至常温贮藏末期的第 10 天,对照 CK₁ 组果实腐烂率较首日增加了 40.7%;单独涂膜(CK₂)对果实腐烂率无抑制效果,甚至促进了中后期腐烂率的提高,使第 8 天果实腐烂率高于同期清水处理(CK₁)组 2.2 倍($P < 0.05$),第 10 天也明显高于同期 CK₁ 组,与 2.2 中促进中后期霉菌增长结果相符,说明单独涂膜(含淀粉类环状糊精被膜剂)对抑制葡萄腐烂率效果不佳,甚至有后期促进作用。相比之下,D-PLA 结合涂膜处理抑制了常温贮藏后期(6~10 d)腐烂率的上升,尤其在贮藏第 10 天,达到显著水平($P < 0.05$),处理组(T)果实腐烂率分别较 CK₁ 和 CK₂ 组低 20.65% 与 23.68%,果穗外观品质也明显优于两对照组。

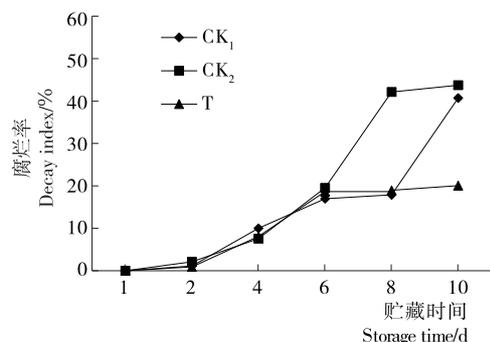


图 4 D-PLA 结合涂膜处理对贮藏期葡萄果实腐烂率的影响
Figure 4 Effect of D-PLA combined with coating on decay index of grape during storage

3 结论

微生物是导致果蔬采收后腐烂的主要诱因,安全高效的天然防腐剂研发是今后应对的热点策略^[25]。D-PLA 作为一

种广谱安全的生物防腐保鲜剂^[9],将其应用于水果防腐保鲜的研究仍较少,本研究表明巨峰葡萄常温贮藏期间,D-PLA结合涂膜处理显著抑制了果实表面细菌菌落总数的增加(P<0.05),并降低了霉菌与酵母菌数量(P<0.05),使大肠杆菌群数量始终保持较低水平,从而降低了由这些微生物导致的果实贮藏中后期腐烂率的增加,与国外在荔枝^[20]、菠萝与柑橘^[21]防腐保鲜上的研究结果相符。这些研究结论将有助于针对葡萄硫替代保鲜技术的苯基乳酸安全生物复合保鲜剂的研发。

已有研究^[25]认为,可食性涂膜等技术与天然食品防腐剂结合用于果蔬保鲜效果更好。国外有用β-环糊精作为抗菌物的缓释被膜体系^[25]。本试验发现,单独涂膜处理对葡萄防腐效果不及D-PLA与涂膜结合使用,甚至含β-环糊精成分的涂膜处理有促进霉菌增长及后期果实腐烂的效应,可能是霉菌在含淀粉类营养源中作用明显^[27],这是与被膜剂中β-环状糊精恰为淀粉类水解中间成分有关,还是与其它因素有关,值得进一步探索。因此在保鲜剂成分的选择上要根据产品劣变诱因等贮藏特性有针对性地进行。

参考文献

[1] 程璐, 缪铭, 张涛, 等. 食品生物防腐剂——抗真菌乳酸菌研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 129-133.

[2] 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.

[3] DIEULEVEUX V, GUEGUEN M. Antimicrobial effects of D-3-Phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese[J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(10): 1 281-1 285.

[4] 蒋卓越, 季伟, 钱蓓蓓, 等. 乳酸脱氢酶突变体 D-LDHY52L 在大肠杆菌中的重组表达及其合成 D-苯基乳酸的研究[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(1): 1-6.

[5] STORM K, SCHNURER J, MELIN P. Co-cultivation of anti-fungal *Lactobacillus Plantarum* MiLAB 393 and *AsPergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression[J]. FEMS Microbial Letters, 2005, 246(1): 119-124.

[6] LAVERMICOCCA P, VALERIO F, VIACONTI A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 634-640.

[7] SCHWENNINGER S M, LACROIX C, TRUTTMANN S, et al. Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(12): 2 481-2 487.

[8] OHHIRA I, KUWAKI S, MORITA H, et al. Identification of 3-phenyllactic acid as a possible antibacterial substance produced by *Enterococcus faecalis* TH10[J]. Biocontrol Science, 2004, 9(3): 77-81.

[9] 李兴峰, 江波, 潘蓓蕾, 等. 新型生物防腐剂—苯基乳酸在食品中的研究与应用[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 87-91.

[10] VALERIO F, LAVERMICOCCA 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.

[11] 芦夏霏, 刘华琴, 柳陈坚, 等. 乳酸菌苯基乳酸的合成及其代谢调控机制研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(11): 177-181.

[12] OBERDOERSTER J, GUIZZETTI M, COSTA L G. Effect of phenylalanine and its metabolites on the proliferation and viability of neuronal and astroglial cells: possible relevance in maternal phenylketonuria[J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 2000, 295(1): 295-301.

[13] 朱益波, 蒋卓越, 郭倩, 等. 重组融合蛋白大肠杆菌不对称合成 (R)-2-羟基-3-苯基丙酸[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 49-54.

[14] 王颖, 何禾, 胡发根. 响应面法优化重组大肠杆菌全细胞合成 D-苯基乳酸[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 88-92.

[15] RODRIGUEZ N J, SALGADO M S, DOMINGUEZ M, et al. Antimicrobial activity of D-3-phenyllactic acid produced by fed-batch process against *Salmonella enterica* [J]. Food Control, 2012, 25(1): 274-284.

[16] 袁景环, 贡汉生, 孟祥晨. 苯基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.

[17] DIEULEVEUX V, VAN D P D C, GUEGUEN M. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum* [J]. Dalton Transactions, 1998, 64(2): 800-803.

[18] LAVERMICOCCA P, VALERIO F, EVIDENTE A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus Plantarum* strain 21B [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 4 084-4 090.

[19] AXEL C, BROSNAN B, ZANNINI E, et al. Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 239(12): 86-94.

[20] BUI K T, NGUYEN D L. Effect of pre-treatment by phenyllactic acid combined with food additives on quality of minimally processed litchi fruits [J]. Journal of Science and Technology, 2014, 52(5C): 334-339.

[21] BUI K T, NGUYEN D L. The study on production of phenyllactic acid by fermentation and its application in preservation of fresh cut pineapple and orange fruit [J]. Journal of Science and Technology, 2013, 51(6A): 283-289.

[22] 朱东兴, 杭夫梅, 李娜, 等. 臭氧在鲜食葡萄无硫贮藏技术中的防腐保鲜效果[J]. 中国食品添加剂, 2010(3): 199-202.

[23] 秦丹, 石雪晖, 林亲录, 等. 葡萄采后病害生物防治研究进展 [J]. 食品与机械, 2007, 23(6): 142-144.

[24] ARTES H F, TOMAS B F A, ARTES F. Modified atmosphere packaging preserves quality of SO₂-free 'Superior seedless' table grapes [J]. Postharvest Biology & Technology, 2006, 39(2): 146-154.

[25] 李燕, 戴佳锐, 马赛箭, 等. 天然食品防腐剂及其在鲜切果蔬中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 230-233.

[26] 陈学红, 郑永华, 杨震峰, 等. 高氧处理对草莓采后腐烂和品质的影响[J]. 农业工程学报, 2004, 20(5): 200-202.

[27] 钟秋平, 周文化, 傅力. 食品保藏原理[M]. 北京: 中国计量出版社, 2010: 4.