

# $N^{\alpha}$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐对 5 种果蔬 腐败菌的抑菌活性

Antibacterial activity of  $N^{\alpha}$ -lauroyl-L-arginate ethylester  
against five pathogenic microorganisms of fruits and vegetables

李 阳<sup>1</sup> 徐晓卉<sup>2</sup> 李 杨<sup>1</sup> 冯凤琴<sup>1</sup>

LI Yang<sup>1</sup> XU Xiao-hui<sup>2</sup> LI Yang<sup>1</sup> FENG Feng-qin<sup>1</sup>

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310058; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China;

2. Food Science and Technology School, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**摘要:**通过体外抑菌试验评价  $N^{\alpha}$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐 ( $N^{\alpha}$ -lauroyl-L-arginate ethylester, LAE) 的抑菌活性。以果蔬腐败菌中具有代表性的指状青霉、意大利青霉、灰葡萄孢、链格孢、胡萝卜软腐病坚固杆菌为模式菌,测定 LAE 对 5 种腐败菌的最低抑制浓度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC), 并测定 LAE 对霉菌的菌丝生长抑制率以及对细菌的杀菌效果。同时探究 LAE 和其他几种果蔬防腐剂的联合抑菌效果。结果表明: LAE 对 4 种真菌性腐败菌灰葡萄孢、链格孢、意大利青霉、指状青霉的 MIC 分别为 400, 200, 400, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 当 LAE 浓度达到对各菌的 MIC 后, 能对各霉菌保持较高的菌丝抑制率, 分别为 100% (16 h), 78.2% (48 h), 81.8% (48 h), 79.1% (48 h); LAE 对细菌性腐败菌胡萝卜软腐病坚固杆菌的 MIC 为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 且 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LAE 能在 90 min 内完全杀灭受试菌; LAE 与尼泊金甲酯钠共同使用时对模式菌有最佳的联合抑制效果。

**关键词:**  $N^{\alpha}$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐; 果蔬腐败菌; 抑菌活性; 防腐剂

**Abstract:** Antibacterial activity of  $N^{\alpha}$ -lauroyl-L-arginate ethylester (LAE) against five pathogenic microorganisms of fruits and vegetables were investigated in this study. Bacteriostatic test in vitro was taken to research the antibacterial activity of LAE. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* were treated as the model bacteria of pathogenic microorganisms of fruits

and vegetables, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of LAE against these model bacteria were determined. The inhibition of LAE to the hypha growth for moulds and the bactericidal effect of LAE for bacteria were also determined. Then the combined antibacterial effects of LAE and other preservative were explored. The results showed that the MIC of LAE against *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Penicillium italicum*, and *Penicillium digitatum* were 400, 200, 400, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. When the concentration of LAE reached the MIC of each strain, the high mycelial inhibition rate of the four molds could be maintained at 100% (16 h), 78.2% (48 h), 81.8% (48 h), and 79.1% (48 h) respectively. The MIC of LAE against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* was 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and LAE with the concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  could completely kill the tested bacteria within 90 min. Moreover, the combination of LAE and sodium chloride could exert the best inhibitory effect on the model bacteria.

**Keywords:**  $N^{\alpha}$ -lauroyl-L-arginate ethylester (LAE); pathogenic microorganisms of fruits and vegetables; antibacterial activity; preservative

$N^{\alpha}$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐 ( $N^{\alpha}$ -lauroyl-L-arginate ethylester, LAE) 是一种阳离子表面活性剂, 具有很强的抑菌能力, 其结构式见图 1。LAE 具有阳离子的头部和非极性的尾部, 水溶性好 (20  $^{\circ}\text{C}$  溶解性 24.7 g/100 mL), 能够在产品的水相中富集, 所以 LAE 在水基质的体系中有更强的抑菌效果。2005 年, LAE 被 FDA 批准为一般公认安全类 (Generally Recognized as Safe, GRAS) 食品添加剂。2007 年, LAE 通过了欧洲食品安全管理局的安全食品认证。2011 年, 国际食品法典委员会将 LAE 列入食品添加剂通用法典标准中, 许可 LAE 作为防腐剂用于 20 多种食品及生鲜农产品中。

**基金项目:** “十二五”农村领域国家科技计划 (编号: 2015BAD16B03)

**作者简介:** 李阳, 男, 浙江大学助理实验师, 硕士。

**通信作者:** 冯凤琴 (1964—), 女, 浙江大学教授, 博士。

E-mail: fengfq@zju.edu.cn

**收稿日期:** 2018-01-17

目前,对于 LAE 在食品中的应用,研究者们主要关注了其在乳制品体系<sup>[2]</sup>和肉制品体系<sup>[3]</sup>中的作用效果,为 LAE 在食品中的应用奠定了一定的理论基础,但目前还未见将其应用于果蔬防腐保鲜方面的文献。

柑橘类水果、番茄和青椒是目前食用非常广泛的果蔬,很容易出现腐烂现象,不易保藏。而这类带皮食用的果蔬对防腐剂的安全性要求也更高,因此防腐保鲜难度会更大。真菌是引起果蔬腐烂的主要微生物。目前已证明意大利青霉(*Penicillium italicum*)和指状青霉(*Penicillium digitatum*)是柑橘类水果上的主要腐败菌,分别引起柑橘类水果的绿霉病和青霉病。在合适的温度、水分等条件下,这 2 种菌在一周内可导致全果的腐烂<sup>[4]</sup>。灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和链格孢(*Alternaria alternata*)分别是引起番茄黑腐病和灰霉病的主要微生物。同时这几种腐败菌也可侵染苹果、梨、葡萄和黄瓜等多种果蔬,带来较大的经济损失<sup>[5]</sup>。除了真菌外,假单胞菌、欧文氏菌等细菌也是引起果蔬腐烂的微生物<sup>[6]</sup>。其中胡萝卜软腐病坚固杆菌胡萝卜软腐病亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)属于果胶杆菌属。它是革兰氏阴性菌,是引起青椒软腐病的细菌<sup>[7]</sup>,也是其他多种植物细菌性软腐病的腐败菌。胡萝卜软腐病坚固杆菌能以腐生的方式在土壤中存活,并在合适的条件下产生多种酶,引起植物和果蔬的腐烂<sup>[8]</sup>。

为探索 LAE 在果蔬防腐保鲜上的应用,本研究拟通过体外抑菌试验<sup>[9-10]</sup>分析 LAE 对柑橘类水果、番茄和青椒上几种主要腐败菌的抑菌活性,并探究 LAE 和其他几种果蔬防腐剂的联合抑菌效果,旨在为后续 LAE 果蔬防腐剂的开发提供依据。

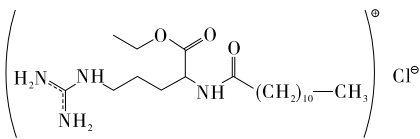


图 1 LAE 结构式

Figure 1 Structure of LAE

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 菌株与培养基

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*) CGMCC 3.4584、链格孢(*Alternaria alternata*) CGMCC 3.7809、意大利青霉(*Penicillium italicum*) CGMCC 3.8284、指状青霉(*Penicillium digitatum*) CGMCC 3.7771、胡萝卜软腐病坚固杆菌胡萝卜软腐亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) CGMCC 1.3614;中国普通微生物保藏中心;

胰酪胨大豆肉汤培养基(Trypticase Soy Broth, TSB)、营养肉汤培养基(Nutrient Broth, NB)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA)、平板计数琼脂(Plate Count Agar, PCA);国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 试剂

LAE(纯度 96.48%);食品级,北京华威锐科化工有限公司;

尼泊金甲酯钠:食品级,绿森化工有限公司;

乳酸:食品级,济宁百川化工有限公司;

山梨酸钾:食品级,宁波王龙有限公司;

稳定态二氧化氯:食品级,天津张大科技发展有限公司;

其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.3 仪器与设备

超净工作台:ZHJH-C1112B 型,上海智诚公司;

光学显微镜:B203LED 型,重庆奥特光学仪器有限公司;

恒温调速回转式摇床:QYC-2102C 型,上海福玛实验设备有限公司;

移液枪:YE4A211164 型,芬兰 Dragon 公司;

酶标仪:MK3 型,芬兰雷勃公司;

高压灭菌锅:LDZX-30KBS 型,上海申安医疗器械厂。

### 1.2 方法

1.2.1 孢子悬浮液和细菌菌悬液的制备 将低温保藏的真菌划线接种于 PDA 斜面培养基中,28 ℃ 恒温恒湿培养 5 d。用无菌水冲洗斜面培养基并用无菌棉过滤去除菌丝得到孢子悬浮液。用血球计数板计数,并调节浓度至  $1.5 \times 10^5$  CFU/mL,4 ℃ 保存备用<sup>[11]</sup>。其中用于联合抑菌试验的樱桃番茄上的混合菌为灰葡萄孢和链格孢按孢子悬液浓度 1:1 的混合菌液,柑橘类水果上的混合菌为意大利青霉和指状青霉按孢子悬液浓度 1:1 的混合菌液。将甘油管中的胡萝卜软腐病坚固杆菌接入 NB 培养基中,于 37 ℃ 下活化 2 次。取处于对数生长期的菌株,于 4 ℃、6 000 r/min 下离心 10 min,收集菌体,复悬于 PBS(pH 7.4)中,调节菌液浓度为  $10^7$  CFU/mL,4 ℃ 保存备用。

1.2.2 LAE 对常见果蔬腐败菌 MIC 的测定 采用琼脂稀释法<sup>[12]</sup>。将 LAE 储备液与 PDA 培养基混合,使 LAE 最终浓度为 50~800 μg/mL,121 ℃ 灭菌 20 min。倾注法将孢子悬液和含药培养基加入平皿中,28 ℃ 培养,48 h 后观察真菌生长情况。以使培养基上无肉眼可见菌落生长时的最低 LAE 浓度为 MIC。试验重复 3 次。对于细菌 MIC 的测定,采用微量肉汤二倍稀释法<sup>[13]</sup>。将 LAE 溶液和菌液加入 96 孔板中,在波长 600 nm 下测定光密度(Optical density, OD)值,37 ℃ 培养 24 h 后再次测定  $OD_{600\text{ nm}}$ ,将  $\Delta OD_{600\text{ nm}} < 0.05$  时的最低 LAE 浓度定义为 MIC。以未加 LAE 的液体培养基为空白对照,试验重复 3 次。

1.2.3 LAE 对霉菌菌丝生长抑制率的测定 参考张辉<sup>[14]</sup>的生长速率法。100 μL 的孢子悬液在 PDA 培养基上均匀涂布,28 ℃ 培养 5 d,备用。将 LAE 和 PDA 配置成浓度为 100~800 μg/mL 的含药培养基,灭菌后倒入平皿,冷却备用。用无菌打孔器在已经培养 5 d 的霉菌培养基上取直径 5 mm 的菌块,转移到含药培养基中央,28 ℃ 培养。接种后每隔一段时间测定 4 种霉菌的菌斑直径。以未加 LAE 的 PDA 培养基为空白对照,试验重复 3 次。菌丝抑制率按式(1)计算:

$$c = \frac{m_0 - m_T}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$c$ ——菌丝抑制率, %;

$m_0$ ——空白对照组菌斑直径(减去 5), mm;

$m_T$ ——不同 LAE 浓度下的菌斑直径(减去 5), mm。

1.2.4 LAE 对细菌杀菌曲线的测定 参考买尔巴哈<sup>[15]</sup>的方法。分别配置含 LAE 浓度为 MIC、2MIC、4MIC(即 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 TSB 培养基, 各浓度培养基中加入等量供试菌使菌液浓度约为  $10^7$  CFU/mL, 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床培养。分别在不同时间点取菌液进行菌落计数。以不加 LAE 的营养肉汤培养基为空白对照, 并以加了系列浓度 LAE 但不加菌液的培养基为溶剂对照, 试验重复 3 次。

1.2.5 联合抑菌效果的测定 测定尼泊金甲酯钠、食品级乳酸、山梨酸钾、稳定态二氧化氯单独使用时对各腐败菌的 MIC。将 LAE 溶液与各防腐剂按棋盘法稀释并混合<sup>[16]</sup>; 在方阵的横列和纵列中, 分别将 LAE 和另一种防腐剂进行二倍稀释。测定 2 种防腐剂联合使用时的 MIC, 真菌和细菌 MIC 测定方法同 1.4.2。利用部分抑菌浓度指数( $FIC_I$ )判定防腐剂复配效果<sup>[17]</sup>, 防腐剂复配效果按式(2)计算:

$$FIC_I = FIC_A + FIC_B, \quad (2)$$

式中:

$FIC_I$ ——防腐剂复配效果,  $FIC_I \leq 0.5$  为协同,  $0.5 < FIC_I \leq 4$  为累加或无关,  $FIC_I > 4$  为拮抗<sup>[18]</sup>;

$FIC_A$ ——A、B 两药联合试验时 A 药的 MIC 与 A 药单独试验时的 MIC 的比值;

$FIC_B$ ——A、B 两药联合试验时 B 药的 MIC 与 B 药单独试验时的 MIC 的比值。

1.2.6 数据统计与分析 数据均为 3 次独立试验平均值, 结果以均数士标准差表示, 使用 SPSS 20.0(SPSS Inc, Chicago, IL)进行数据分析(One-Way ANOVA, Turkey)。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAE 对果蔬腐败菌的 MIC

通过琼脂扩散法和微量肉汤稀释法分别测得了 LAE 对

霉菌和细菌的 MIC, 结果见表 1。分析表 1 可知, LAE 对柑橘类水果上 2 种主要腐败菌(指状青霉和意大利青霉)的 MIC 均为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而 LAE 对樱桃番茄上的 2 种主要腐败菌抑制能力有差别。LAE 对灰葡萄孢的 MIC 也是 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 链格孢对 LAE 更敏感, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LAE 就能有效抑制其生长。在细菌方面, LAE 对胡萝卜软腐病坚固杆菌的 MIC 为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 抑菌活性是其他 4 种霉菌的 8~16 倍。

目前关于 LAE 对霉菌的抑菌活性研究较少。巴塞罗那大学实验室报道 LAE 对黑曲霉和产黄青霉的 MIC 分别为 32, 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[19]</sup>, 略低于本研究 LAE 对 4 种霉菌的 MIC。对细菌来说, LAE 对英诺克李斯特菌、肠炎沙门氏菌、大肠杆菌的 MIC 都为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[20]</sup>, 与研究结果一致。在本试验 5 种果蔬腐败菌中, LAE 对细菌的抑菌活性高于对霉菌的, 可能与 LAE 的作用机理和微生物自身的结构有关。

表 1 LAE 对 5 种果蔬腐败菌的 MIC 测定结果

Table 1 MICs of LAE against pathogenic microorganisms of fruits and vegetables

菌株	MIC/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
灰葡萄孢	400
链格孢	200
意大利青霉	400
指状青霉	400
胡萝卜软腐病坚固杆菌	25

### 2.2 LAE 对霉菌的菌丝生长抑制率

从表 2 中可以看到, 不同霉菌菌丝生长的速度有较大的差异。因为灰葡萄孢生长较快, 所以在 16, 32, 48 h 时测定其菌丝直径。而其他 3 种菌生长较慢, 每 48 h 测定一次菌丝直径。

由表 2 可见, 一定浓度的 LAE 对 4 种霉菌菌丝的生长抑制效果显著, 且抑制效果与霉菌种类、LAE 浓度和作用时

表 2 LAE 对 4 种霉菌的菌丝抑制率<sup>†</sup>

Table 2 Inhibition of LAE to the hypha growth for moulds

菌株	取样时间/h	LAE 的浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )					%
		100	200	400	600	800	
灰葡萄孢	16	84.3 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	81.2 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	
	32	54.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	57.2 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	69.8 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	80.5 $\pm$ 6.6 <sup>c</sup>	79.1 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	
	48	43.2 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	46.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	65.2 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	76.2 $\pm$ 3.9 <sup>c</sup>	78.6 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	
	48	48.7 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	78.2 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	93.4 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	
链格孢	96	49.9 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	74.1 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	89.9 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	
	144	32.1 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	68.4 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	82.9 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>	99.0 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	
	48	33.3 $\pm$ 11.0 <sup>a</sup>	49.0 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	81.8 $\pm$ 1.8 <sup>c</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	
意大利青霉	96	24.8 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	46.4 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>	77.9 $\pm$ 8.3 <sup>c</sup>	84.7 $\pm$ 14.9 <sup>c</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	
	144	22.5 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	37.0 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	78.8 $\pm$ 6.9 <sup>c</sup>	87.9 $\pm$ 10.5 <sup>c</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	
	48	35.1 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	42.2 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	79.1 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>	90.2 $\pm$ 0.8 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	
指状青霉	96	32.6 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>	41.4 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	77.5 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>	89.2 $\pm$ 3.8 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	
	144	30.6 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	39.3 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	75.4 $\pm$ 1.9 <sup>c</sup>	86.5 $\pm$ 1.0 <sup>d</sup>	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	

<sup>†</sup> 不同字母表示同行数据差异显著( $P < 0.05$ )。

间有关。总体而言,对同一种霉菌,随着 LAE 浓度的升高,菌丝抑制率上升;当 LAE 浓度在 0~600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,不同浓度的 LAE 对各霉菌菌丝抑制率有显著性差异( $P < 0.05$ )。但当 LAE 浓度到 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及以上时,再升高 LAE 浓度,菌丝抑制率无显著上升( $P > 0.05$ )。对于链格孢、意大利青霉和指状青霉而言,800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LAE 能完全抑制其菌丝的生长。综上所述,LAE 浓度达到其对 4 种菌的 MIC 后,都有较高的菌丝抑制率。

### 2.3 LAE 对细菌的杀菌曲线

在图 2 中可以看到,空白对照中的胡萝卜软腐病坚固杆菌正常生长。而 LAE 浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,胡萝卜软腐病坚固杆菌活菌数在 30 min 时略有升高后缓慢下降,在 90 min 时活菌数下降了 1.28 lg CFU/mL。说明在 MIC 的浓度下,LAE 有效抑制了胡萝卜软腐病坚固杆菌的生长,但在短时间内还没有起到完全杀菌的作用。LAE 浓度为 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,能分别在 90, 15 min 内使胡萝卜软腐病坚固杆菌致死率达到 100%。

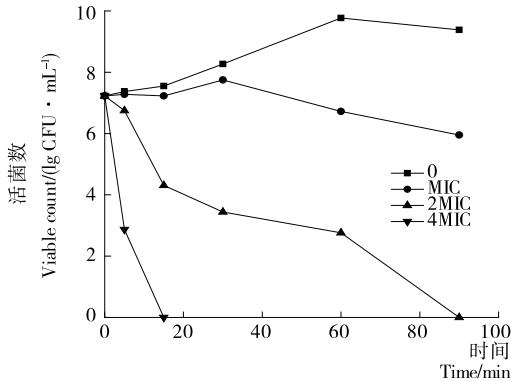


图 2 LAE 对胡萝卜软腐病坚固杆菌的杀菌曲线  
Figure 2 The time-sterilizing curve of LAE against *P. carotovorum*

Soni 等<sup>[21]</sup>研究了 LAE 对李斯特菌的抑制效果,发现在 TSB 培养基中 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LAE 能在 30 min 内将其完全杀灭。而 Coronel-Le 等<sup>[22]</sup>的研究表明 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LAE 能在 60 min 内使植物乳杆菌完全失活。同时,图 2 也表明 LAE 对胡萝卜软腐病坚固杆菌的最低杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,是 MIC 的 2 倍。而 Becerril 等<sup>[21]</sup>的研究结果表明,LAE 对大肠杆菌、英诺克李斯特菌、铜绿假单胞菌的 MBC 与 LAE 对各菌的 MIC 相等。但是 LAE 对金黄色葡萄球菌的 MBC 为对其 MIC 的 4 倍。综上所述,LAE 对多种细菌都有完全抑制和杀灭的作用,但其对不同微生物的杀菌效果略有差异。

### 2.4 LAE 与其他防腐剂联合对果蔬腐败菌的抑菌效果

考虑到防腐剂使用的安全性和经济性,本研究从 GB 2760—2014 上允许使用的果蔬防腐保鲜剂中选择尼泊金甲酯钠、食品级乳酸、山梨酸钾及稳定态二氧化氯与 LAE 进行联合抑菌试验<sup>[23]</sup>,初步筛选出能与 LAE 有协同抑菌效果的防腐剂。通过棋盘稀释法测定 LAE 与其他防腐剂联用时的  $FIC_I$ ,见表 3~5。

根据 Odds<sup>[18]</sup>的研究, $FIC_I$  越小表明 2 种防腐剂之间的联合抑菌效果越好。结合表 3、4 可以得知,对櫻桃番茄上 2 种主要腐败菌(灰葡萄孢和链格孢)的混合菌,LAE 与所选取的 4 种防腐剂联用的抑菌效果是无关或累加效果;而对柑橘类水果上 2 种主要腐败菌(意大利青霉和指状青霉)的混合菌,LAE 与尼泊金甲酯钠及乳酸的联用均有不错的增效作用;相对而言,LAE 与尼泊金甲酯钠的  $FIC_I$  最小。比较表 3、4 发现,LAE 与几种防腐剂联用时对青霉意大利青霉和指状青霉混合菌的抑制效果均好于其对灰葡萄孢和链格孢混合菌的。

对于细菌胡萝卜软腐病坚固杆菌而言,当 LAE 与尼泊金甲酯钠、食品级乳酸、山梨酸钾和稳定态二氧化氯联合使

表 3 LAE 与不同防腐剂联用时对灰葡萄孢和链格孢混合菌的抑制效果<sup>†</sup>

Table 3 The effect of LAE cooperated with several preservatives against *B. cinerea* and *A. alternata*

防腐剂	MIC <sub>Ca</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>b</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>Cb</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$FIC_I$
LAE+尼泊金甲酯钠	100	800	400	0.75
LAE+乳酸	200	32 000	16 000	1.00
LAE+山梨酸钾	200	1 600	800	1.00
LAE+稳定态二氧化氯	200	400	>200	>1.00

<sup>†</sup> LAE 单独使用时的最低抑菌浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;MIC<sub>Ca</sub>表示 LAE 和不同防腐剂联用时 LAE 的最低抑菌浓度;MIC<sub>b</sub>表示各防腐剂单独使用时的最低抑菌浓度;MIC<sub>Cb</sub>表示与 LAE 联用时各防腐剂的最低抑菌浓度。

表 4 LAE 与不同防腐剂联用时对意大利青霉和指状青霉混合菌的抑制效果<sup>†</sup>

Table 4 The effect of LAE cooperated with several preservatives against *P. italicum* and *P. digitatum*

防腐剂	MIC <sub>Ca</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>b</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>Cb</sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$FIC_I$
LAE+尼泊金甲酯钠	50	800	200	0.375
LAE+乳酸	100	32 000	8 000	0.500
LAE+山梨酸钾	50	3 200	1 600	0.625
LAE+稳定态二氧化氯	50	100	100	1.125

<sup>†</sup> LAE 单独使用时的最低抑菌浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;MIC<sub>Ca</sub>表示 LAE 和不同防腐剂联用时 LAE 的最低抑菌浓度;MIC<sub>b</sub>表示各防腐剂单独使用时的最低抑菌浓度;MIC<sub>Cb</sub>表示与 LAE 联用时各防腐剂的最低抑菌浓度。

表 5 LAE 与不同防腐剂联用时对胡萝卜软腐病坚固杆菌的抑制效果<sup>†</sup>Table 5 The effect of LAE cooperated with several preservatives against *P. carotovorum*

防腐剂	MIC <sub>C<sub>a</sub></sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>C<sub>b</sub></sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	MIC <sub>C<sub>b</sub></sub> /( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	FIC <sub>I</sub>
LAE+尼泊金甲酯钠	6.25	3 200	200	0.375
LAE+乳酸	12.50	2 000	250	0.625
LAE+山梨酸钾	12.50	12 800	1 600	0.625
LAE+稳定态二氧化氯	12.50	200	100	1.000

<sup>†</sup> LAE 单独使用时的最低抑菌浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; MIC<sub>C<sub>a</sub></sub> 表示 LAE 和不同防腐剂联用时 LAE 的最低抑菌浓度; MIC<sub>C<sub>b</sub></sub> 表示各防腐剂单独使用时的最低抑菌浓度; MIC<sub>C<sub>b</sub></sub> 表示与 LAE 联用时各防腐剂的最低抑菌浓度。

用时, LAE 与尼泊金甲酯钠的 FIC<sub>I</sub> 值最小 (FIC<sub>I</sub> < 0.5)。所以相对于其他几种防腐剂来说, LAE 和尼泊金甲酯钠复配的抑菌效果最佳。

综上所述, 从体外联合抑菌试验的结果可知, LAE 与尼泊金甲酯钠联合使用时具有最小的 FIC<sub>I</sub>, 即二者对果蔬上这 5 种腐败菌有较好的协同抑制效果, 可以作为后续复配的选择。

### 3 结论

LAE 能显著抑制指状青霉、意大利青霉、灰葡萄孢、链格孢、胡萝卜软腐病坚固杆菌 5 种果蔬腐败菌的生长, 表现出较好的抑菌活性。当 LAE 浓度达到各霉菌的 MIC 后, 能对该霉菌保持较高的菌丝抑制率, 而 2MIC 浓度的 LAE 能在 90 min 内完全杀死胡萝卜软腐病坚固杆菌, 且 LAE 对细菌胡萝卜软腐病坚固杆菌的抑制活性高于 4 种霉菌。Swan 等<sup>[19]</sup>的研究也表明 LAE 对啤酒酵母和产黄青霉的 MIC 要显著高于金黄色葡萄球菌的。LAE 对细菌的抑菌活性相对高于霉菌的, 可能是因为细菌和霉菌的细胞结构不同, 因而 LAE 对细菌和霉菌的抑菌机理有所不同, 导致细菌细胞和真菌细胞对 LAE 的敏感性不同。而且霉菌普遍通过孢子繁殖, 也导致 LAE 对霉菌的 MIC 要高于细菌。并且, 由于 LAE 自身所带的阳离子基团, 其抑菌活性也会受到环境的影响。关于 LAE 对果蔬腐败菌的抑菌机理还需要进一步研究, 以期 LAE 在果蔬防腐保鲜中的应用提供充足的理论依据。

联合药敏性试验证明 LAE 与尼泊金甲酯钠具有很好的协同抑菌效果, 这也为 LAE 与尼泊金甲酯钠及其他防腐剂的后续复配使用提供理论依据。同时, LAE 的相关体外试验<sup>[24]</sup>和人体口服毒理试验<sup>[25]</sup>表明 LAE 有较好的安全性。后续研究将继续探索 LAE 在果蔬防腐保鲜中的具体应用前景与价值, 开发相关的 LAE 果蔬防腐剂产品。

### 参考文献

[1] MURIEL-GALET V, LOPEZ-CARBALLO G, GAVARA R, et al. Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(2): 239-244.

[2] HIGUERAS L, LOPEZ-CARBALLO G, HERNANDEZ-MUNOZ P, et al. Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-*N* alpha-dodecanoyl-*L*-arginate)

and its application to fresh chicken[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 165(3): 339-345.

- [3] MURIEL-GALET V, LOPEZ-CARBALLO G, GAVARA R, et al. Antimicrobial effectiveness of lauroyl arginate incorporated into ethylene vinyl alcohol copolymers to extend the shelf-life of chicken stock and surimi sticks[J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(1): 208-217.
- [4] 陈倩茹. 植物精油对樱桃番茄主要病原菌抑制效果的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014: 3.
- [5] SOYLU E M, KOSE F. Antifungal activities of essential oils against citrus black rot disease agent *alternaria alternata*[J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2015, 18(4): 894-903.
- [6] RAYMOND L V, ZHANG M, KARANGWA E, et al. Mixed noble gas effect on cut green peppers[J]. International Agrophysics, 2013, 27(1): 75-79.
- [7] 包英才, 王丹, 赵晓燕, 等. 鲜切青椒优势腐败菌的分离纯化及鉴定[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 332-334, 338.
- [8] 崔崇士, 远屈. 一株新的胡萝卜软腐欧文氏菌的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2004(2): 136-140.
- [9] 刁明明, 齐丹萍, 张充, 等. 半乳糖基甘油月桂酸单酯的抑菌活性和稳定性[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 1-6.
- [10] 刘国荣, 邵亚昆, 王欣, 等. 双歧杆菌细菌素 Bifidocin A 对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及其机制[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 1-7.
- [11] RUIZ-PEREZ N J, GONZALEZ-AVILA M, SANCHEZ-NAVARETE J, et al. Antimycotic Activity and genotoxic evaluation of citrus sinensis and citrus latifolia essential oils[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 25 371.
- [12] JOUSIMIES-SOMER H. Wadsworth-Ktl anaerobic bacteriology manual[M]. Singapore: Star Publishing Pte Ltd, 2002: 114-118.
- [13] XU Wen-tao, QU Wei, HUANG Kun-lun, et al. Antibacterial effect of Grapefruit Seed Extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables[J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 45(1): 126-133.
- [14] 张辉. 食品级月桂酸单甘油酯微乳体系的构建及其抑菌研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009: 38-39.
- [15] 买尔哈巴·塔西帕拉提. 百里香酚微乳体系构建及其抑菌、抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015: 36.
- [16] 李贵玲, 刘根焰, 陈寅, 等. 大蒜素联合不同药物对多重耐药鲍曼不动杆菌的体外抗菌作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(10): 752-754.

(下转第 193 页)

- 景[J]. 中国食物与营养, 2007(1): 22-24.
- [7] 周文辉. 菊糖及低聚果糖的代谢及生理特性[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(2): 155-157.
- [8] 张名涛, 顾宪红, 杨琳. 菊粉的原生素作用研究进展[J]. 动物营养学报, 2003, 15(4): 12-18.
- [9] NINESS K R. Inulin and oligofructose; what are they? [J]. Journal of Nutrition, 1999, 29: 1 402S-1 406S.
- [10] KIM Y, FAQIH M N, WANG S S. Factors affecting gel formation of inulin[J]. Carbohydrate Polymers, 2001, 46(2): 135-145.
- [11] KAUR N, GUPTA A K. Applications of inulin and oligo fructose in health and nutrition[J]. Journal of Biosciences, 2002, 27: 703-714.
- [12] 刘宏. 菊粉的功能特性与开发应用[J]. 中国食物与营养, 2010(12): 25-27.
- [13] LOPEZ-MOLINA D, NAVARRO-MARTINEZ M D, ROJAS-MELGAREJO F, et al. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynarascolumus*, L.) [J]. Phytochemistry, 2005, 66(12): 1 476-1 484.
- [14] 胡娟. 菊芋菊糖的纯化及在植物搅奶油中的应用[D]. 无锡: 江南大学, 2007: 33-35.
- [15] 陈光鹏. 菊芋酸奶工艺优化及营养学评价[D]. 郑州: 郑州大学, 2011: 36-43.
- [16] RONKART S N, PAQUOT M, DEROANNE C, et al. Development of gelling properties of inulin by microfluidization[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(4): 318-324.
- [17] 罗登林, 许威, 袁海丽, 等. 菊粉加工性质的研究[J]. 粮油加工, 2009(9): 142-144.
- [18] 方志林. 马铃薯交联淀粉的制备及理化性质的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2009: 9-11.
- [19] 肖昱. 变性淀粉湿法生产工艺与影响产品质量和稳定的重要因素探讨[J]. 食品工业科技, 2003(3): 60-62.
- [20] 邬应龙, 王瑶. 抗性淀粉的结构及生理功能研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(3): 63-72.
- [21] 张宏志, 马燕弘, 黄开红, 等. 菊芋菊糖的提取、聚合度分布及抗氧化活性的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(10): 1 069-1 077.
- [22] PAULA G, CRISTINA V, PAZ R. Release kinetic in yogurt from gallic acid microparticles with chemically modified inulin[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(10): 2 147-2 152.
- [23] LI Su-ping, HU Tao, CHEN Ya-li, et al. Cross-linked inulin as a potential plasma expander; Biochemical properties and physiological characterization in a rabbit model[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82: 1 054-1 060.
- [24] KIM M, LEE S J. Characteristics of crosslinked potato starch and starch filled linear low-density polyethylene films[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 50: 331-337.
- [25] 许威. 菊粉物化特性的研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2012: 10-12.
- [26] 于济洋, 李新华, 王琳, 等. 菊芋全粉凝胶特性的比较研究[J]. 核农学报, 2014, 28(3): 478-484.
- [27] SIBGH J, SINGH N, SHARMA T R, et al. Physicochemical, rheological and cookie making properties of corn and potato flours[J]. Food Chemistry, 2003, 83(3): 387-393.
- [28] 崔媛, 罗菊香, 崔国星. 马铃薯交联淀粉的制备及交联剂的影响分析[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(2): 33-35.
- [29] 方志林. 马铃薯交联淀粉的制备及理化性质的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2009: 17.
- [30] 季佳佳. 三偏磷酸钠交联玉米淀粉的理化性质测定[D]. 天津: 天津科技大学, 2009: 23-25.
- [31] 刘丽君. 脱支交联马铃薯淀粉的制备及性能研究[D]. 沈阳: 沈阳工业大学, 2015: 23-27.
- [32] 程亚娇, 郭婷, 李本姣, 等. 改性纳米薯渣纤维素的制备优化及其形貌表征[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(3): 142-149.
- [33] 王思远, 刘学铭, 杨晓泉, 等. 交联大豆多糖的制备及性能研究[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12): 33-36.
- [34] 刘言佳. 不同聚合度菊粉的制备及对乳酸杆菌生长的影响[D]. 大连: 大连工业大学, 2013.

(上接第 131 页)

- [17] DE SOUSA J P, DE AZEREDO G A, TORRES R D, et al. Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 154(3): 145-151.
- [18] ODDS F C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(1): 1.
- [19] SWAN G, DEAN G, HOCKRIDGE M, et al. Antimicrobial susceptibility in terms of the minimal inhibitory concentration (MIC) of LAE and Mirenat-N[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 17(1): 28-39.
- [20] BECERRIL R, MANSO S, NERIN C, et al. Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria[J]. Food Control, 2013, 32(2): 404-408.
- [21] SONI K A, NANNAPANENI R, SCHILLING W, et al. Bactericidal activity of lauric arginate in milk and Queso Fresco cheese against *Listeria monocytogenes* cold growth[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(10): 4 518-4 525.
- [22] CORONEL-LEON J, LOPEZ A, ESPUNY M J, et al. Assessment of antimicrobial activity of N-alpha-lauroyl arginate ethyl-ester (LAE (R)) against *Yersinia enterocolitica* and *Lactobacillus plantarum* by flow cytometry and transmission electron microscopy[J]. Food Control, 2016, 63: 1-10.
- [23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760—2014 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 201-268.
- [24] SHAW D, SWAN G, HOCKRIDGE M, et al. N<sup>α</sup>-lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride *In vitro* stability[J]. Food and Chemical Toxicology, 2003, 30(2): 145-159.
- [25] RUCKMAN S A, ROCABAYERA X, BORZELLECA J F, et al. Toxicological and metabolic investigations of the safety of N-alpha-lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE) [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(2): 245-259.