

$N\alpha$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐与山梨酸钾对榨菜的协同保鲜及诱导致腐菌的氧化应激作用

陈山乔, 孙志栋

(宁波市农业科学研究院, 浙江宁波 315040)

摘要: 为了开发更安全有效的榨菜用保鲜剂, 需要测试山梨酸钾 (PS) 和 $N\alpha$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐 (LAE) 以及其复配的抑菌性和应用效果, 并探索其机理。本研究从腐烂榨菜分离出致腐菌作为研究对象, 应用棋盘格法体外抑菌实验测试了不同 pH 环境下, LAE 和 PS 对其最小抑菌浓度 (MIC), 以及测试了两者联合抑菌作用, 并在榨菜保鲜中验证了效果。此外以分离出的最主要致腐菌为研究对象, 对 LAE 胁迫下其过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、DPPH 自由基清除率、蛋白质含量、丙二醛 (MDA) 含量进行了测定。分离得到主要致腐菌: 盐脱氮枝芽胞杆菌 (*Virgibacillus halodenitrificans*), 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 和微紫青霉菌 (*Penicillium janthinellum*) 作为被试菌, 结果显示 LAE 对其 MIC 为 16~32 mg/L, PS 对其 MIC 为 256~1024 mg/L, PS 表现出抑菌强度和酸度正相关, LAE 则相反。PS 和 LAE 对被试菌株表现出加合或协同联合抑菌作用。在袋装榨菜中 LAE 和 PS 复配使用能够抑制微生物增殖达 1~2 个数量级。在 LAE 胁迫下, 细菌 POD、CAT、SOD 活性上升, DPPH 自由基清除率、蛋白质和 MDA 含量下降。LAE 和 PS 能够有效抑制榨菜中的致腐菌, 并且拥有复配提效的潜力。此外, LAE 潜在的抑菌机理可解释为其使微生物细胞膜完整性降低、氧化应激水平升高。

关键词: 山梨酸钾; $N\alpha$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐; 榨菜; 协同抑菌

文章编号: 1673-9078(2020)10-125-132

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0395

Synergistic Actions of $N\alpha$ -Lauroyl-L-Arginine Ethyl Ester Hydrochloride and Potassium Sorbate in Preserving Pickled Mustard Tubers and Inducing Oxidative Stress against Spoilage Bacteria

CHEN Shan-qiao, SUN Zhi-dong

(Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China)

Abstract: In order to develop a safer and more effective preservative for pickled mustard tubers, it is necessary to examine the antimicrobial activities, applications and underlying mechanisms of potassium sorbate (PS) and $N\alpha$ -lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE) as well as their mixture. In this research, spoilage bacteria were isolated from the rotten mustard tuber and used as the research object. *In vitro* antimicrobial experiments based on the checkerboard assay were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of LAE and PS at different pHs, and the joint antimicrobial effect was examined and verified in the preservation of pickled mustard tuber. In addition, taking the most dominant isolated spoilage microorganisms as the research object, the peroxidase (POD), catalase

引文格式:

陈山乔, 孙志栋. $N\alpha$ -月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐与山梨酸钾对榨菜的协同保鲜及诱导致腐菌的氧化应激作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 125-132

CHEN Shan-qiao, SUN Zhi-dong. Synergistic actions of $N\alpha$ -lauroyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride and potassium sorbate in preserving pickled mustard tubers and inducing oxidative stress against spoilage bacteria [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 125-132

收稿日期: 2020-04-28

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2015BAD16B03); 国家农业科技成果转化资金重点项目 (2014GBC220152); 宁波市农科院院长基金项目 (2020NKYP001)

作者简介: 陈山乔 (1987-), 男, 博士, 工程师, 研究方向: 食品加工与贮藏

通讯作者: 孙志栋 (1962-), 男, 教授级高工, 研究方向: 食品与生物工程

(CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, the DPPH free radical scavenging rate, the protein content, and the malondialdehyde (MDA) content were determined under the action of LAE. The major spoilage microorganisms isolated were used as the test bacteria (inducing *Virgibacillus halodenitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* and *Penicillium janthinellum*). The results showed that the MICs of LAE and PS were 16~32 mg/L and 256~1024 mg/L, respectively, with PS exhibiting shows a positive correlation between antimicrobial activities and acidity, and LAE acting oppositely. PS and LAE exhibited an additive or synergistic effect in the antimicrobial activities towards the test bacteria. The combined use of LAE and PS could inhibit (by 1 to 2 orders of magnitude) the proliferation of the microorganisms in packed pickled mustard tubers. Under the press of LAE, the POD, CAT and SOD activities, DPPH radical scavenge rate, protein content and MDA content decreased. LAE and PS can effectively inhibit the spoilage microorganisms in pickled mustard tuber, and their mix has a promising potential of enhancing preservation performance. Furthermore, the potential antimicrobial mechanisms of LAE might involve the decrease of membrane integrity and increase of oxidative stress of the microbial cells.

Key words: potassium sorbate; N- α -lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride; pickled mustard tuber; synergistic antimicrobial activity

随着消费者对低盐健康概念的崇尚,低盐化已经成为即食腌渍榨菜的趋势。而由于即食腌渍榨菜的盐度降低,为了满足消费者对其货架期的需求,贮藏保鲜成为了巨大的挑战。添加食品保鲜剂是在低成本下提高即食腌渍榨菜耐贮藏性能的有效手段。苯甲酸钠得益于低廉的成本和高效的抑菌性,曾是即食腌渍榨菜中应用最广泛的防腐添加剂,然而其对人体健康的潜在负面影响^[1],其安全性颇为争议^[2]。因此,业界对能够替代苯甲酸钠的高安全性保鲜剂有着迫切的需求。其中山梨酸钾(Potassium sorbate, PS)作为高安全性保鲜剂,在诸多领域得到了应用。但是由于PS的抑菌性能较苯甲酸钠尚存在差距^[3],因此在诸如榨菜等食品中,并没有形成完全的替代。另外,Na-月桂酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(N- α -lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride, LAE)是一种在腌渍蔬菜中有应用潜力的新型保鲜剂。由精氨酸,月桂酸和乙醇合成的LAE能够在人体内快速分解为这三种天然物质,因此LAE在食品中的应用有着极高的安全性^[4]。因此,通过PS和LAE的复配来形成更强、更稳定的保鲜效果是一种促进这两者实用性的有效方法。此外,有诸多报道显示,LAE在不同的基质中呈现不同的抑菌活性^[5],因此也需要对其影响因素和具体的抑菌机理进行探索。

本研究选用即食腌渍榨菜,作为应用对象。从腐烂榨菜中对优势腐败微生物进行分离。之后考察山梨酸钾和LAE在不同pH下对其抑菌效果,并验证了PS和LAE共同作用时的抑菌性,据此设计并验证了LAE和PS的复配榨菜保鲜配方。最后对LAE对榨菜腐败菌的抑菌机理,进行了细胞膜损伤层面,以及氧化应激层面的探究。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

实验所用榨菜来自余姚市阿姚皇食品有限公司(宁波,中国);生化试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司(上海,中国);超声波破碎仪型号为U-250购自新芝生物科技股份有限公司(宁波,中国);拍打均质机型号为Scienzt-09,购自新芝生物科技股份有限公司(宁波,中国);酶标仪购自南京德铁实验设备有限公司(南京,中国);山梨酸钾购自宁波王龙科技有限公司(宁波,中国);所使用的检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(南京,中国);所用水皆为自制蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 腐败菌分离

将均质后的腐烂榨菜滤液稀释 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 后,分别涂布于平板菌落计数(PCA)培养基(细菌)和孟加拉红培养基(真菌)上。PCA和孟加拉红平板分别于 37°C 和 28°C 下培养3~5 d后,选取其中大量出现的单菌落进行划线分离培养。经过3次以上划线培养的单菌落即为纯培养。

1.2.2 腐败菌的鉴定

将分离得到的细菌和真菌分别接种至营养肉汤培养基和改良马丁培养基中液体培养至菌量最大,使用生理盐水清洗重悬后,超声破碎15 min,之后使用氯仿:异戊醇(24:1)提取,加0.6倍体积预冷的异丙醇, -20°C 静置过夜。离心后,用70%乙醇洗涤沉淀,重悬于60 μL TE缓冲液中。样品送上海生工生物工程股份有限公司进行核糖体DNA测序,进行菌种鉴定。

1.2.3 体外抑菌实验

将被试微生物在液体培养基培养至菌量最大。使用pH分别为5、6、7的PBS缓冲液配置液体培养基

并灭菌。在 96 孔细胞培养板中依次加入 20 μL 逐级 2 倍稀释的 LAE 或 PS 水溶液,之后在每孔中加入对应 pH 的培养基 160 μL ,最后根据麦氏比浊法将培养好的微生物稀释至 1×10^5 个/mL 后向每孔接种 20 μL 。将配置好的微孔板置于对应温度(细菌: 37 $^{\circ}\text{C}$, 真菌: 28 $^{\circ}\text{C}$)的培养箱中培养 2 h,之后在 600 nm 波长下读板,相对空白孔的光密度值变化既为微生物增长程度,选取其中的最小抑菌浓度(MIC)作为抑菌性的评价指标。

1.2.4 体外联合抑菌实验

将被试微生物在液体培养基培养至菌量最大。在 96 孔细胞培养板中依次加入逐级 2 倍稀释的 LAE 和 PS 水溶液(横向为 LAE 逐级稀释,纵向为 PS)各 10 μL ,再以 1.2.3 中相似的方法加入 pH 7 的培养基和菌悬液,培养并读板。通过公式(1)计算 FIC 值,以 $\text{FIC} \leq 0.5$ 评价为两者存在协同作用, $0.5 < \text{FIC} \leq 0.75$ 为部分协同作用, $0.75 < \text{FIC} \leq 1$ 为加合作用, $1 < \text{FIC} \leq 4$ 为无关作用, $4 < \text{FIC}$ 为拮抗作用[6]。

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC}_{\text{LAE-PS}}}{\text{MIC}_{\text{LAE}}} + \frac{\text{MIC}_{\text{PS-LAE}}}{\text{MIC}_{\text{PS}}} \quad (1)$$

式中: FIC: 部分抑菌浓度; MIC_{LAE} : LAE 单独作用的最小抑菌浓度; $\text{MIC}_{\text{LAE-PS}}$: 与 PS 共同作用时 LAE 的最小抑菌浓度; MIC_{PS} : PS 单独作用的最小抑菌浓度; $\text{MIC}_{\text{PS-LAE}}$: 与 LAE 共同作用时 PS 的最小抑菌浓度。

1.2.5 复配保鲜剂在袋装榨菜中的保鲜效果评价

腌制完成的榨菜使用切片机切成厚度为 2 mm 的薄片后,于淡水中漂洗 10 min 进行漂淡。漂淡后的榨菜添加 0.2 g/kg 柠檬酸+1 g/kg 赤藓糖醇+10 g/kg 蔗糖进行调味,此外分别添加国标限量的 PS (1000 mg/kg)[7]; 美国食药监局限量的 LAE (225 mg/kg)[8]; 复配 LAE 和 PS (LAE: 112 mg/kg, PS: 500 mg/kg); 以及空白对照。搅拌均匀后将榨菜分装进行真空包装,之后在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下水热巴氏灭菌 10 min。待榨菜冷却后,将其置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中进行加速贮藏试验。分别在 15、30、45 d 时取样,以稀释平板法(细菌: PCA, 真菌: 孟加拉红)检测菌落总数。

1.2.6 LAE 胁迫下被试菌株的生理生化指标检测

将被试菌株接种于营养肉汤培养基中培养至最大菌量后,向培养基中加入 MIC/2、MIC、MIC $\times 2$ 浓度的 LAE,待继续培养 12 h 后,将培养的菌体离心后,以生理盐水清洗重悬。重悬后的菌体使用超声波破碎机将菌体破碎后离心取上清液。将菌体提取液使用对应的试剂盒进行过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶

(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、DPPH 自由基清除率、丙二醛(MDA)含量、蛋白质含量的检测。

1.2.7 数据分析

实验中数据处理基于 R^[9]进行,处理间差异显著性基于单因素方差分析-图奇事后检验(One way ANOVA-Tukey HSD)进行计算,图形绘制基于 ggplot2 软件包^[10]。

2 结果与分析

2.1 致腐菌的分离与鉴定

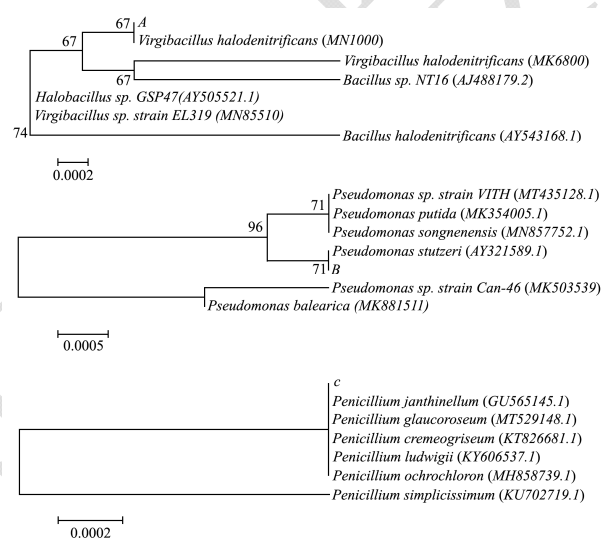


图1 盐脱氮枝芽胞杆菌(A), 施氏假单胞菌(B)和微紫青霉菌(C)的进化树

Fig.1 The phylogenetic tree of *Virgibacillus halodenitrificans* (A), *Pseudomonas stutzeri* (B) and *Penicillium janthinellum* (C)

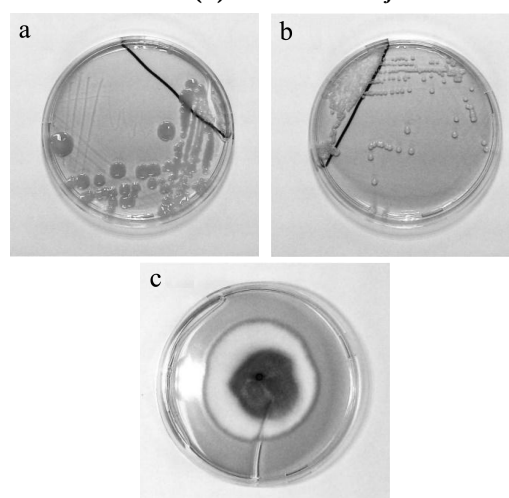


图2 盐脱氮枝芽胞杆菌(a), 施氏假单胞菌(b)和微紫青霉菌(c)的菌落形态

Fig.2 The colony morphology of *Virgibacillus halodenitrificans* (a), *Pseudomonas stutzeri* (b) and *Penicillium janthinellum* (c)

经过平板涂布培养,发现 PCA 培养基中有 2 种菌

落大量存在, 标记为 A 和 B, 孟加拉红培养基中则有 1 种菌落大量存在, 标记为 C。经过核糖体 DNA 测序后, 检索 BLAST 数据库, 将其分别鉴定为: 盐脱氮枝芽胞杆菌 (*Virgibacillus halodenitrificans*), 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 和微紫青霉菌 (*Penicillium janthinellum*), 其进化树如图 1 所示。如图 2 所示, 盐脱氮枝芽胞杆菌为白色圆形菌落, 表面光滑, 施氏假单胞菌菌落形态为白色点状菌落, 微紫青霉菌的菌落形态为边缘略带紫色的大片菌丝。

通过致腐菌分离鉴定后可知榨菜中最主要的致腐细菌为盐脱氮枝芽胞杆菌, 是一种嗜盐性的营兼性厌氧的反硝化细菌, 并且在极端生境下能够产生芽胞^[11]。先前的研究文献也有报道, 榨菜中的致腐菌多为芽胞杆菌^[12]。盐脱氮枝芽胞杆菌的嗜盐性是导致其在高盐度的榨菜内能够占据主要的最可能原因之一, 并且其反硝化能力有可能是榨菜贮藏保鲜中经常能观察到亚硝酸盐含量在后期下降^[13]的原因之一。

2.2 体外抑菌

3 种微生物在不同 pH 下经过培养后, 其相对空白的 OD₆₀₀ 如图 3 所示。图中相对空白 OD₆₀₀ 值为 0 并处于拐点的浓度, 即为抑菌剂对被试微生物的最小抑菌浓度 (MIC) 如图 3 所示。LAE 对三种被试微生物的 MIC 在 16~32 mg/L, 而 PS 则为 256~1024 mg/L。

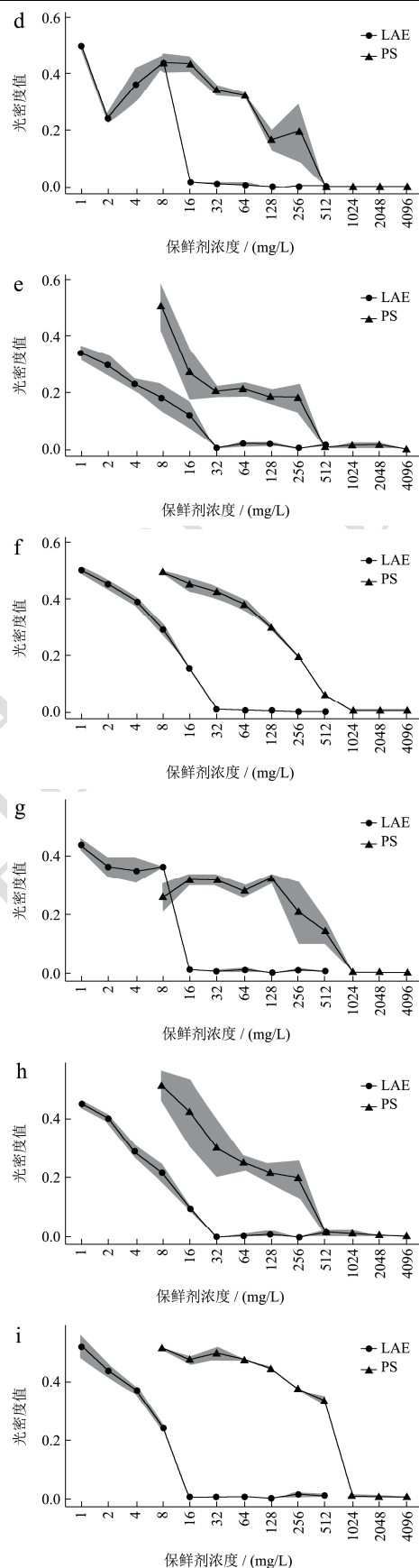
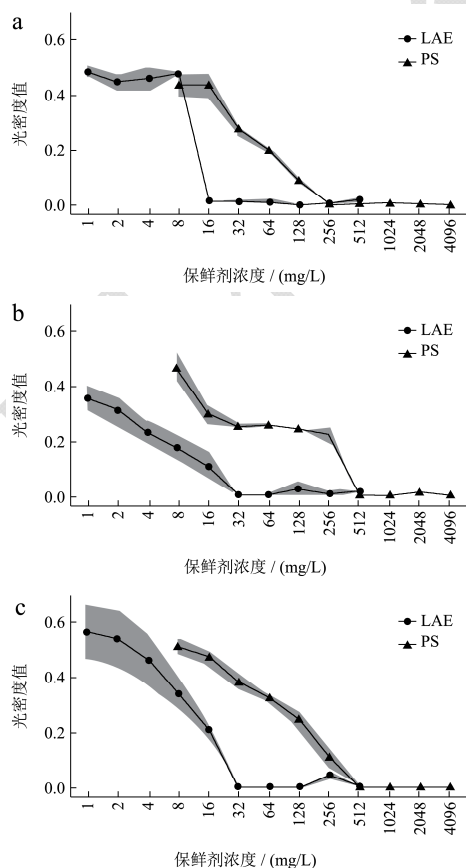


图 3 pH 5~7 环境下 LAE 和 PS 对不同被试菌的最小抑菌浓度

Fig.3 The MICs of LAE and PS against subjects in pH 5~7

注: a-c: pH=5; d-f: pH=6; g-i: pH=7。a、d、g: 施

氏假单胞菌; b、e、h: 微紫青霉菌; c、f、i: 盐脱氮枝芽孢杆菌。

PS 对两种细菌的抑菌实验中, 与文献报道^[14]类似, 均表现出其抑菌性能随 pH 降低而升高的趋势。相关的研究将这一现象归因为 PS 需要酸性环境解离出山梨酸阴离子, 从而发挥抑菌活性^[15]。而 LAE 在酸性环境下对盐脱氮枝芽孢杆菌的抑菌性能相较中性环境有所下降。虽然 LAE 作为季铵盐型碱性表面活性剂, 从理论上推断, 其发挥抑菌活性的最佳 pH 较低^[16-18], 并且随着 pH 上升其抑菌活性会受到很大的抑制, 这种现象的成因可能原因是 LAE 的抑菌性能受到了诸如细菌表面电位^[19]等其他因素的瓶颈限制, 其影响强于胍基季铵的解离度。

2.3 联合抑菌

三种微生物在 LAE 和 PS 相互作用下, 表现出的联合抑菌性能, 如表 1 所示。从 FIC 数值可知, 对于被试的两种细菌, LAE 和 PS 存在着加合作用, 两者的抑菌性能能够以近似线性的方式叠加; 而对于微紫青霉菌, 这两者则表现出强烈的协同作用, LAE 的存在大幅提高了 PS 的抑菌能力。这可能是由于 LAE 对膜系统的破坏作用, 使得 PS 能够更有效地进入菌体内部发挥活性所致^[20]。综上所述, 根据体外联合抑菌的结果, LAE 和 PS 的共同作用, 具有潜在的抑菌增效作用, 适合于复配保鲜剂的开发。目前已有文献报道, LAE 与其他保鲜剂存在着协同效应, 如双乙酸钠、乳酸钠^[21-23]、柠檬酸钠、香芹酚^[24]、植物精油^[25]等, 其中和 PS 同属羧酸盐类保鲜剂的双乙酸钠-LAE 复方已经有相关产品上市。

表 1 LAE 和 PS 在 pH7 环境下的 MIC 和联合抑菌相互作用(mg/L)

Table 1 The combined antimicrobial activities of LAE and PS in condition with pH7

	盐脱氮枝芽孢杆菌	施氏假单胞菌	微紫青霉菌
MIC _{LAE}	16	16	32
MIC _{PS}	1024	1024	512
MIC _{LAE-PS}	8	8	8
MIC _{PS-LAE}	512	512	64
FIC	1	1	0.5
相互作用	加合	加合	协同

2.4 袋装榨菜中 LAE 和 PS 的保鲜效果验证

添加保鲜剂后不同处理组在各取样时间点中的菌落总数和真菌菌落总数如图 4 所示。PS 在贮藏初期有一定的抑菌能力, 但是随着贮藏时间的延长, 微生物的增殖无法被抑制; LAE 在贮藏全程能够将菌落总数

相对对照降低 1~2 个数量级。在贮藏初期 PS 对于真菌的抑制能力与 LAE 较接近, 但在长期贮藏过程中, PS 的抑菌能力大幅降低。然而对于复合保鲜剂来说, 贮藏全程有着更优良的性能。可见在实际应用中, 进行复配是行之有效的减量增效手段。

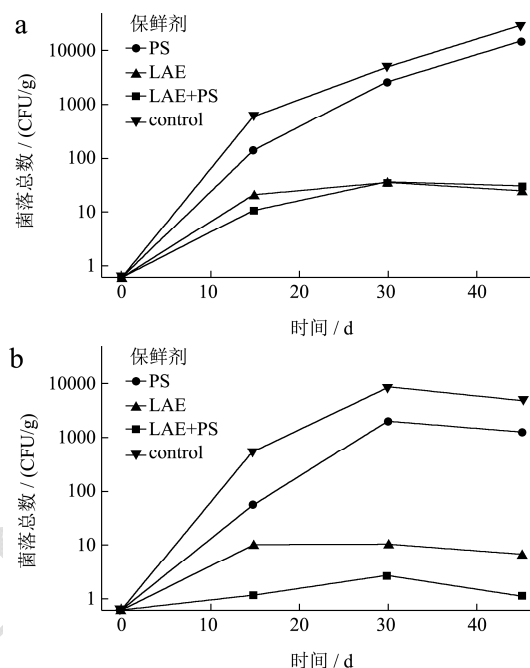


图 4 添加不同保鲜剂后榨菜的菌落总数和真菌菌落总数的变化

Fig.4 The colony counts and fungi colony counts alterations in pickled mustard tubers added with preservatives

注: a: 菌落总数; b: 真菌菌落总数

2.5 LAE 对盐脱氮枝芽孢杆菌的抑菌机理研究

作为腐烂榨菜中分离出菌落最多的致腐菌, 本研究将盐脱氮枝芽孢杆菌作为 LAE 抑菌机理研究的对象。经过不同浓度 LAE 处理的盐脱氮枝芽孢杆菌的 CAT、POD、SOD 活性、DPPH 自由基清除率、MDA 含量、菌体蛋白含量见图 5。如图所示, 经过 16 mg/L 以上 LAE 处理的盐脱氮枝芽孢杆菌相比对照, 其 CAT 活性极显著升高, 由对照的 4.02×10^5 U/g 升至最高 6.91×10^5 U/g, 16 mg/L 和 32 mg/L 浓度处理其 CAT 活性极显著高于 8 mg/L, CAT 活性升高随 LAE 浓度呈正相关; 经过 32 mg/L LAE 处理相比对照, 其 POD 活性显著升高由对照的 8.67×10^5 U/g 升至最高 1.44×10^4 U/g, 各处理浓度之间的 POD 活性呈现极显著差异, POD 活性的升高随 LAE 浓度呈正相关量效关系; 经过 16 mg/L 的 LAE 处理相比对照, 其 SOD 活性显著升高, 相比对照的 7.47 U/g, 上升至最多 12.15 U/g, SOD 活性随 LAE 浓度呈非线性或无量效关系; 经过 32 mg/L 的 LAE 处理相比对照其菌体蛋白含量显

著降低, 由对照的 $72.62 \mu\text{g/g}$ 降低至最少 $40.43 \mu\text{g/g}$, 蛋白含量的降低随 LAE 浓度呈正相关量效关系; 经过所有被试浓度 LAE 处理相比对照, 均未在 MDA 水平上有显著变化, 但是 32 mg/L 处理组相比 8 mg/L 处理组 MDA 水平显著降低, 总体来说, MDA 水平降低与 LAE 浓度呈正相关量效关系; 经过 16 mg/L 以上 LAE 处理的相比对照, 其 DPPH 自由基清除率显著降低由对照的 13.92% 降低至最少 1.84% , DPPH 自由基清除率的降低随 LAE 浓度呈正相关量效关系。

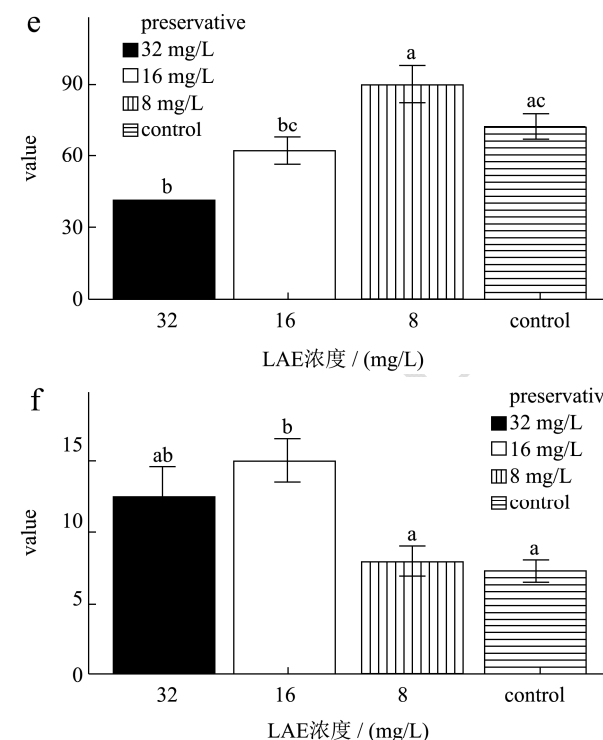
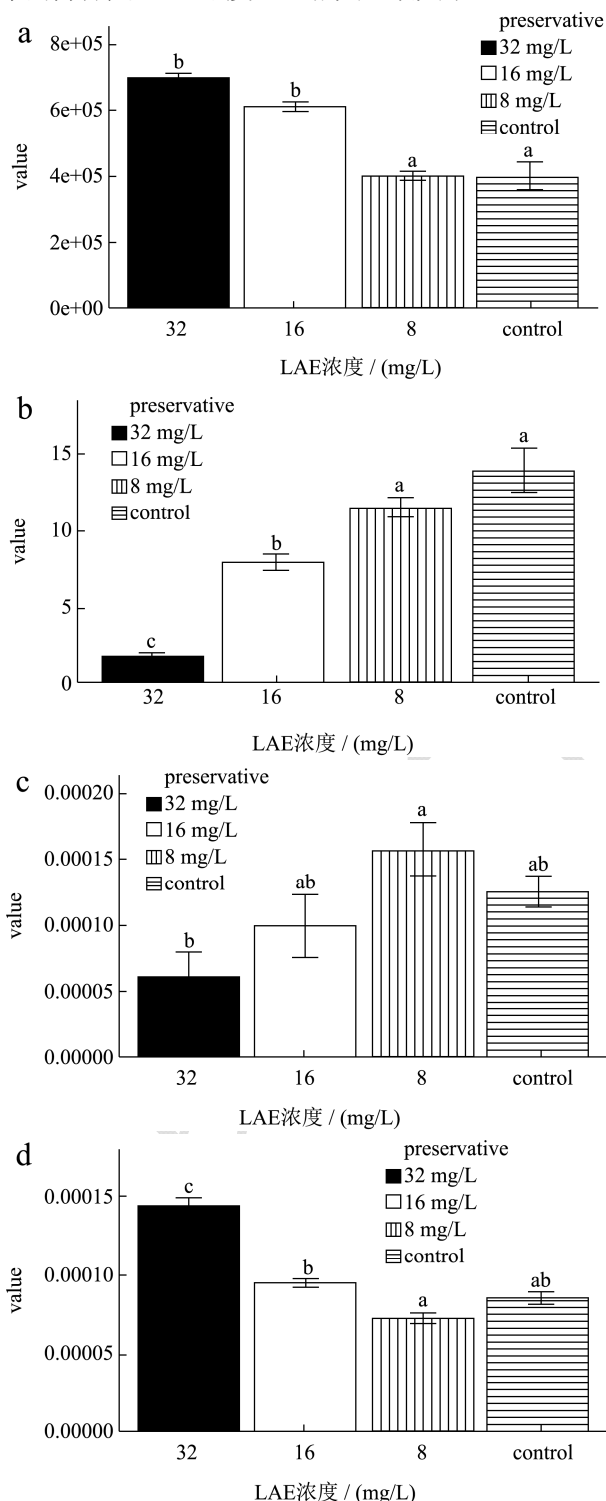


图5 不同浓度 LAE 处理后盐脱氮枝芽孢杆菌的 CAT、POD、SOD 活性、DPPH 自由基清除率、MDA 含量、菌体蛋白含量

Fig.5 The POD activities, CAT activities, SOD activities, DPPH radical scavenging rate, protein levels and MDA levels of *Virgibacillus halodenitrificans* during LAE stress

注: a: CAT 活性; b: DPPH 自由基清除率; c: MDA 含量; d: POD 活性; e: 菌体蛋白含量; f: SOD 活性。误差线代表各组数据的标准误, 字母代表 $p=0.01$ 显著水平下 ANOVA-Tukey HSD 的差异显著性。

从实验结果来看, 蛋白水平的降低说明经过 LAE 处理, 盐脱氮枝芽孢杆菌的细胞膜完整性受到了降低, 有胞内物质泄漏发生^[26]。在而从各个抗氧化酶系的活性变化来看, POD, SOD, CAT 三种主要的细菌抗氧化酶活性发生了上调。通常生物体在受到氧化应激时, 会上调其抗氧化酶系统进行应对^[27], 以这三种酶活性为代表的抗氧化系统上调, 说明了 LAE 对细菌存在着氧化应激。DPPH 自由基清除率的下调说明 LAE 消耗了细菌本身的自由基清除能力, 其可能原因是 LAE 在胞内诱导了自由基的产生, 而对于其他化合物抑菌剂机理研究中, 也报道了细胞膜损伤和活性氧自由基的产生有着关联性^[28]。然而 MDA 水平变化则与其他结果矛盾, 表现出在 LAE 处理下, 脂质过氧化水平受到了降低, 但是考虑到 LAE 对细胞膜的作用^[20], MDA 的降低可能是由于 LAE 破坏了细胞膜, 导致细胞膜脂质流失所引起的, 因此 MDA 的反常降低可能并不是由于过氧化水平的减轻所导致的。由于 LAE 本身的化学性质并不活泼并且不具有生物学意义的氧化性, 所

以 LAE 引起的氧化应激可能是由于 LAE 破坏了细胞内的膜结构, 导致胞内自由基和氧化性物质的扩散; 以及 LAE 在降解细胞膜的过程中, 可能诱导了过氧化脂质自由基的产生。

3 结论

本研究中, 榨菜的主要致腐菌得到了分离和鉴定, 分别为盐脱氮枝芽胞杆菌 (*Virgibacillus halodenitrificans*), 施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*), 和微紫青霉菌 (*Penicillium janthinellum*)。其中盐脱氮枝芽胞杆菌是最主要的致腐菌。LAE 和 PS 在不同 pH 下对分离得到的微生物的抑菌性能通过 MIC 指标进行了表征, 实验结果表明 LAE 的抑菌性能不会随着 pH 接近中性而降低, 而中性条件下其对部分微生物的抑菌性能得到了加强。本研究还对 LAE 和 PS 的复配抑菌效果在体外实验和实际应用于榨菜上进行了验证, 实验结果表明 LAE 和 PS 复配能够有效控制细菌和真菌的增殖, 减量增效。最后通过对 LAE 处理后盐脱氮枝芽胞杆菌的生理生化分析总结得出, LAE 除了能够通过破坏细胞膜完整性抑制微生物生长外, 还能够加强菌体受到的氧化应激, 消耗菌体的自由基清除能力, 表明了 LAE 与氧化性抗菌剂存在着协同效应的潜力。

参考文献

- [1] Hickman M. E211 Revealed: Evidence Highlights New Fear Over Drinks Additive [M]. Caution: some soft drinks may seriously harm your health. London; Independent Print Limited, 2007
- [2] McCann D, Barrett A, Cooper A, et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial [J]. The Lancet, 2007, 370(9598): 1560-1567
- [3] 林陈强, 林戎斌, 蔡海松, 等. 虎奶菇抑菌物质与食品防腐剂抑菌活性的比较[J]. 食用菌学报, 2007, 14(3): 62-66
LIN Chen-qiang, LIN Jie-bin, CAI Hai-song, et al. Anti-microbial activity of ethyl acetate extracts of pleurotus tuber-regium spent culture liquid [J]. Acta Edulis Fungi, 2007, 14(3): 62-66
- [4] Hawkins D R, Rocabayera X, Ruckman S, et al. Metabolism and pharmacokinetics of ethyl N-alpha-lauroyl-L-arginate hydrochloride in human volunteers [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(11): 2711-5
- [5] Terjung N, Holzwarth S, Loeffler M, et al. Antimicrobial efficacy of a spice ferment in emulsion and restructured ham [J]. Food Control, 2016, 59(8): 139-147
- [6] Ouedrhiri W, Mounyr B, Harki E H, et al. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils [J]. International Journal of Food Properties, 2017, 20(12): 3149-3158
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760-2014 食品添加剂使用标准[S]. National Health and Family Planning Commission. GB 2760-2014 Chinese Standards for Food Additives [S].
- [8] Tarantino L M. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000164 [EB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=164&sort=GRN_No&order=ASC&startrow=1&type=basic&search=22 2005
- [9] R Core Team R Foundation for Statistical Computing [CP/DK]. <https://www.r-project.org/>, 2013
- [10] Hadley Wickham. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [M]. New York, USA: Springer New York, 2009
- [11] Yoon J H, OH T K, Park Y H. Transfer of *Bacillus halodenitrificans* denariuz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(6): 2163-2167
- [12] 蒋高强. 榨菜腐败微生物的分离、鉴定及其特性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006
JIANG Gao-qiang. Studies on the isolation, identification and characteristics of spoilage microbes from mustard tubers [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006
- [13] 张静, 李阿敏, 张碧莹, 等. 保藏条件对低盐方便榨菜品质及保藏特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(3): 239-246
ZHANG Jing, LI A-min, ZHANG Bi-ying, et al. The effects of preservation conditions on qualities and storage characteristics of instant low-sodium pickled tuber mustard [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(3): 239-246
- [14] Guynot M E, Ramos A J, Sanchis V, et al. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5) [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 101(2): 161-168
- [15] Sofos J N, Pierson M D, Blocher J C, et al. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores [J]. International Journal of Food Microbiology, 1986, 3(1): 1-17
- [16] Infante R, Dominguez J G, Erra P, et al. Surface active

- molecules: preparation and properties of long chain N-acyl-L-alpha-amino-omega-guanidine alkyl acid derivatives [J]. International Journal of Cosmetic Science, 1984, 6(6): 275-282
- [17] Infante M, Molinero J, Erra P, et al. A comparative study on surface active and antimicrobial properties of some Na - lauroyl - L α , ω dibasic aminoacids derivatives [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 1985, 87(8): 309-313
- [18] Bakal G, Diaz A. The lowdown on lauric arginate [J]. Food Qual, 2005, 12(1): 54-61
- [19] Kang J H, Wiedmann M, Boor K J, et al. VirR-mediated resistance of *Listeria monocytogenes* against food antimicrobials and cross-protection induced by exposure to organic acid salts [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(13): 4553-4562
- [20] Rodriguez E, Seguer J, Rocabayera X, et al. Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N-alpha-lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* [J]. J Appl Microbiol, 2004, 96(5): 903-912
- [21] Suksathit S, Tangwatcharin P. Activity of organic acid salts in combination with lauric arginate against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Rissen* [J]. Scienceasia, 2013, 39(4): 346-355
- [22] Stopforth J D, Visser D, Zumbrink R, et al. Control of *Listeria monocytogenes* on cooked cured ham by formulation with a lactate-diacetate blend and surface treatment with lauric arginate [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(3): 552-555
- [23] Soni K A, Desai M, Oladunjoye A, et al. Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(1-2): 82-88
- [24] Oladunjoye A, Soni K A, Nannapaneni R, et al. Synergistic activity between lauric arginate and carvacrol in reducing *Salmonella* in ground turkey [J]. Poultry Science, 2013, 92(5): 1357-1365
- [25] MA Qiu-ming, Davidson P M, ZHONG Qi-xin. Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(1): 77-84
- [26] 周敏,陆维克,陆金金,等.超高压处理对副溶血性弧菌胞内蛋白质的影响[J].食品科学,2017,38(1):99-104
ZHOU Ming, LU Wei-ke, LU Jin-jin, et al. Effect of high hydrostatic pressure treatment on intracellular protein profile of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Science, 2017, 38(1): 99-104
- [27] Jakubovics N S, Smith A W, Jenkinson H F. Oxidative stress tolerance is manganese (Mn²⁺) regulated in *Streptococcus gordonii* [J]. Microbiology-(UK), 2002, 148(10): 3255-3263
- [28] ZHANG Li, WU Ling-li, MI Ya-zhu, et al. Silver nanoparticles induced cell apoptosis, membrane damage of *Azotobacter vinelandii* and *Nitrosomonas europaea* via generation of reactive oxygen species [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2019, 103(1): 181-186

(上接第 235 页)

- [31] 马越,王丹,郑青云,等.热风干燥温度对脱水胡萝卜品质的影响[J].食品工业,2017,38(11):83-86
MA Yue, WANG Dan, ZHENG Qing-yun, et al. Effect of hot air drying temperature on the quality of dehydrated carrots [J]. Food Industry, 2017, 38(11): 83-86
- [32] Fabiano F A N Fernandes, Maria Izabel Gallão, et al. Effect of osmotic dehydration and ultrasound pre-treatment on cell structure: melon dehydration [J]. LWT - Food Science and Technology, 2007, 41(4): 604-610
- [33] Fereshteh Nadery Dehsheikh, Somayeh Taghian Dinani. Coating pretreatment of banana slices using carboxymethyl cellulose in an ultrasonic system before convective drying [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 52: 401-413