

新型生物防腐剂——苯乳酸在食品中的应用*

李兴峰¹, 江波¹, 潘蓓蕾²

1(江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏无锡, 214122)

2(中国食品科学技术学会, 北京, 100833)

摘要 苯乳酸是乳酸菌等微生物产生的一种新型的小分子抗菌物质, 对多种食源性致病菌、导致食品变质的腐败菌包括产生毒素的丝状真菌有很强的抑菌作用。作为一种新型生物防腐剂, 苯乳酸在食品工业中具有潜在的应用价值。文中对苯乳酸的理化性质、抑菌性能、抑菌机理、生物合成以及应用领域的最新进展进行了综述, 并展望了苯乳酸今后的研究方向。

关键词 苯乳酸, 生物防腐剂, 食品, 乳酸菌, 抑菌性质

防腐剂是食品工业中最重要的添加剂之一, 我国目前使用的主要是以苯甲酸钠、山梨酸钾等为代表的化学防腐剂。但是随着人们生活水平的提高和对食品安全的日益重视, 消费者要求降低化学防腐剂的使用和追求安全性高的天然食品, 这使得寻求天然、广谱、低毒的生物防腐剂成为食品工业中的重要发展方向。在天然防腐剂中, 微生物防腐剂主要以天然农产品为原料, 用发酵等生物技术制备, 具有安全无毒、适用性广、性能稳定等优点, 成为食品科学研究中的热点之一。

苯乳酸(phenyllactic acid, PLA)是近年来人们发现的乳酸菌产生的一种新型抑菌物质, 与 Nisin 等细菌素相比, 具有较广的抑菌谱, 能抑制食源性致病菌、腐败菌, 特别是能抑制真菌的污染; 溶解性好、易于在食品体系中扩散; 稳定性高、具有宽广的 pH 范围和热稳定性; 这些优点开始引起了人们的关注^[1]。文中对苯乳酸的理化性质、抑菌性能、抑菌机理、生物合成及在食品中的应用进行了概述。

1 苯乳酸抑菌活性的发现

新西兰麦卢卡树 (*Leptospermum scoparium*: Myrtaceae) 的麦卢卡蜂蜜 (Zealand manuka honeys) 具有独特的抗菌作用, 用作腿部溃烂的敷料有很好的疗效^[2]。Molan^[3]发现, 该蜂蜜在排除高渗透压、酸度和过氧化氢影响的情况下, 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 有显著的抑制作用, 并且具有较强的热稳定性。Russel^[4]在麦卢卡蜂蜜中找到了许多有较强抗菌活性的芳香酸。Wilkins^[5]进一步确定其中的丁香酸和苯乳酸的含量最丰富, 因此他

们认为丁香酸和苯乳酸是蜂蜜中主要的非过氧化氢抗菌特性物质。但也有人对此持不同意见^[6]。

直到 1998 年, Dieuleveux^[7]发现使用白地霉 (*Geotrichum candidum*) 发酵的干酪在成熟过程中对食源性致病菌单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 具有很强的抑制作用, 经分离、纯化及结构鉴定, 确定苯乳酸是其中的主要抑菌物质, 这是首次证明苯乳酸对 *L. monocytogenes* 有抑菌作用的报道。Lavermicocca^[8]从植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum* 21B) 发酵的酸面团中分离出苯乳酸, 发现了苯乳酸对多种引起食品腐败的真菌有广谱的作用。

2 苯乳酸的性质

2.1.1 结构

苯乳酸, 也称 β -苯乳酸或 3-苯基乳酸, 即 2-羟基-3-苯基丙酸, 分子式为 $C_9H_{10}O_3$ 。相对分子质量为 166, 是一种小分子抑菌物质^[7]。有 2 种对映异构体, 包括 D-苯乳酸和 L-苯乳酸, 结构见图 1。

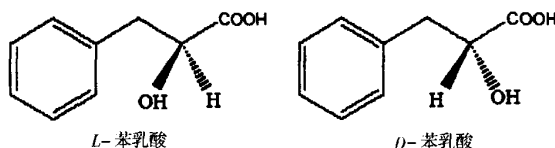


图 1 苯乳酸的结构^[9]

D-苯乳酸和 L-苯乳酸的抑菌性质报道不一。Dieuleveux^[10]认为 D-苯乳酸稍强于 L-苯乳酸; 而 Lavermicocca^[8]发现两者无明显差别。

2.1.2 溶解度和稳定性

令人注意的是苯乳酸的溶解性和稳定性。其他生物防腐剂如 Nisin, 亲水性差、不易扩散, 在中性、碱性条件下几乎不溶解; Nisin 的稳定性依赖于温度和

第一作者: 博士研究生(江波教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金重点项目(20436020)

收稿日期: 2007-01-22, 改回日期: 2007-03-15

pH, 中性条件下 116℃ 灭菌后 90% 失活^[11]。而苯乳酸亲水性较大, 能在各种食品体系中均匀扩散^[7]。苯乳酸的稳定性好, 熔点 121~125℃, 对酸、热稳定。Dieuleveux^[7] 报道其在广泛的 pH 范围内稳定, 121℃ 保持 20 min 也不被破坏。

2.2 苯乳酸的抑菌性能及作用机制

2.2.1 抑菌谱

苯乳酸抑菌谱广, 对 G^+ 细菌、 G^- 细菌和真核微生物均有抑制作用。Dieuleveux^[10] 发现苯乳酸可抑制多种食源性致病菌, G^+ 致病菌如 *S. aureus*、*L. monocytogenes*; G^- 致病菌如致病性大肠杆菌 (*Escherichia coli* O157:H7)、斯氏普罗威登斯菌 (*Providencia stuartii*)、产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*) 等。Lavermicocca^[12] 研究了苯乳酸对多种引起焙烤食品腐败的真菌的作用, 结果显示了宽广的抑菌谱, 如曲霉属的黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*); 青霉属的娄地青霉 (*Penicillium roqueforti*)、*P. polonicum*、*P. commune*; 以及红色散菌霉 (*Eurotium rubrum*)、匍匐散囊菌 (*Eurotium repens*)、好食丛梗孢菌 (*Monilia sitophila*) 等。

由此可见, 苯乳酸是一种广谱抑菌物质, 这与 Nisin 等细菌素显著不同。大部分细菌素只对与产生菌分类学上相近的细菌有作用, 如 Nisin 抑制许多除乳酸菌以外的 G^+ 细菌, 但对绝大部分 G^- 细菌和酵母菌、霉菌没有作用^[7]。

2.2.2 作用机制

关于苯乳酸抑菌机理的研究报道很少。1998 年, Dieuleveux 用扫描电镜观察了苯乳酸作用前后 *L. monocytogenes* 的超微结构, 首次报道其作用机理^[10]。将 *L. monocytogenes* 在含有不同苯乳酸浓度的培养基中培养 14 和 27h 后观察发现, 生长在 1mg/mL 苯乳酸培养基中的菌体 (0.54 μ m) 明显要比对照 (0.42 μ m) 大, 而且其细胞壁结构已被破坏或完全改变 (图 2); 而生长在含有 7mg/mL 苯乳酸培养基中的菌体高度丝状化, 并且细胞壁上有裂口, 其细胞内含物流出而剩余细胞壁残留物。进一步研究苯乳酸对不同生长期菌体的作用, 发现其抑菌性能与细胞的生长周期无关。在此基础上他推测, 苯乳酸的作用位点是细胞壁, 与溶菌酶的抑菌机理相似, 而与 Nisin 等细菌素作用于细胞膜不同^[10]。

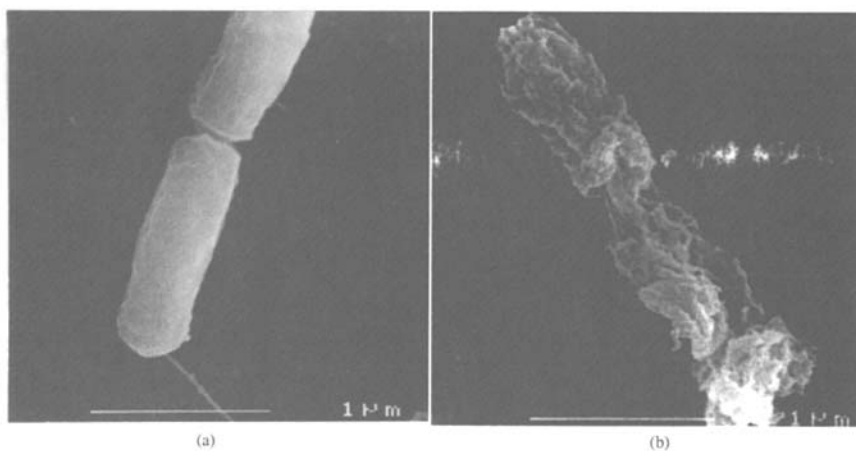


图 2 苯乳酸作用前后 *L. monocytogenes* 细胞的扫描电镜观察^[10]

2005 年, Strom^[13] 等研究了苯乳酸对丝状真菌 *A. nidulans* 蛋白质组学的影响, 发现苯乳酸改变了其蛋白质的表达。同年, 他推测, 苯乳酸可能作用位点之一是真菌细胞中的苯丙氨酸脱氢酶, 该酶催化苯丙氨酸脱氢产生嘧啶以合成核苷, 根据是苯乳酸与苯丙氨酸脱氢酶的一般底物相似而产生抑制^[14]。关于苯乳酸的作用位点、如何破坏细胞壁等抑菌机制有待于进一步研究。

2.3 苯乳酸的安全性

苯乳酸是一种天然抑菌物质, 对人和动物细胞无

毒^[5, 6, 12], 在自然界中, 有多种存在形式, 如存在于天然蜂蜜、干酪; 更重要的是可以由乳酸菌生物合成, 而乳酸菌是 GRAS (公认为安全) 微生物, 广泛用于食品加工、保藏。因此, 它被认为是继乳酸菌产生的第 1 代抑菌物质如乳酸、醋酸, 第 2 代抑菌物质如 Nisin 等细菌素以外, 可用于食品体系的新型抑菌物质^[12]。

2.4 苯乳酸的药理作用

苯乳酸是丹参素 (3,4-二羟基苯乳酸, Danshen-su) 的结构类似物, 与丹参素的药理作用相同, 具有扩张冠状动脉的作用。王钰英^[15] 等研究发现, 苯乳酸

对家兔急性心肌梗塞有一定疗效,对缺血性心脏病的防治作用是有利的,与普萘洛尔作用相似;其扩张冠状动脉作用可能是通过提高 PGI₂(血浆前列环素) / TXA₂(血栓素)的比值,或者是直接作用于血管的作用。此外,苯乳酸具有抑制血小板聚集、抑制血栓形成及改善微循环的作用。

3 苯乳酸的生物合成

3.1 产苯乳酸的微生物菌株

表 1 产生苯乳酸的微生物

微生物	菌株来源	报道时间	文献来源
<i>Geotrichum candidum</i>	干酪	1998	[7]
<i>Lactobacillus plantarum</i> 21B	酸面团	2000	[8]
<i>L. plantarum</i> MiLAB393	青贮饲料	2002	[20]
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	干酪	2002	[16]
<i>L. coryniformis</i> Si3	青贮饲料	2003	[9]
<i>L. plantarum</i>	酸面团	2004	[19]
<i>L. rhamnosus</i>	人体	2004	[19]
<i>L. alimentarius</i>	酸面团、鱼制品	2004	[19]
<i>L. fermentum</i>	酸面团	2004	[19]
<i>L. sanfranciscensis</i>	酸面团	2004	[19]
<i>L. acidophilus</i>	酸面团、人体	2004	[19]
<i>L. brevis</i>	酸面团、人体	2004	[19]
<i>Weissella confusa</i>	酸面团	2004	[19]
<i>Enterococcus faecium</i>	干酪	2004	[19]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	酸面团、发酵橄榄	2004	[19]
<i>L. citreum</i>	酸面团	2004	[19]
<i>P. thoenii</i>	乳制品	2005	[21]
<i>P. acidipropionici</i>	乳制品	2005	[21]
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	乳制品	2005	[21]
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	乳制品	2005	[21]
<i>L. plantarum</i> VLT01	DIPROVAL collection (Bologna University)	2006	[20]

当前,乳酸菌来源的苯乳酸成为研究的热点。Lavermicocca^[8]从酸面团中分离到 *L. plantarum* 21B,产生的苯乳酸量为 56 mg/L,这是关于乳酸菌产生苯乳酸的首次报道。随后陆续发现不同种属的乳酸菌能够产生苯乳酸,如 Katrin^[18]等从青贮饲料中分离到了 1 株 *L. plantarum* MiLAB393;Magnusson^[9]从青草中分离出苯乳酸产生菌株,鉴定为棒状乳杆菌(*Lactobacillus coryniformis*)。Valerio^[19]等对用于发酵食品中的多种乳酸菌进行了筛选,根据在 MRS 培养基中的苯乳酸和羟基苯乳酸的产生情况将乳酸菌分为 3 个类群:(1)既产生苯乳酸又产生羟基苯乳酸的乳酸菌,苯乳酸浓度范围在 26.56~76.36 mg/L、羟基苯乳酸在 12.74~52.78 mg/L。(2)只产生苯乳酸的乳酸菌,浓度为 28.22~94.62 mg/L。(3)苯乳酸和羟基苯乳酸均不产生的乳酸菌,苯乳酸

苯乳酸可由多种微生物产生,如乳酸菌^[8]、丙酸菌^[16]和白地霉^[7]。Kamata^[17]专利报道用经诱变选育的乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)产生 1.94g/L 的苯乳酸,用于苯丙氨酸的合成。Dieu-leveux^[7]从干酪中分离到 1 株 *G. candidum*,产生苯乳酸为 0.6~1g/L。Thierry^[18]报道费氏丙酸菌(*Propionibacterium freudenreichii*)在干酪成熟过程中检测到苯乳酸。

≤16.6 mg/L、羟基苯乳酸 ≤3.64 mg/L。Armaforte^[20]对苯乳酸产生菌 *L. plantarum* VLT01 进行研究,认为苯乳酸是乳酸菌抗真菌的有效标志之一。

目前国内还没有乳酸菌产生苯乳酸的报道。江南大学食品科学与安全教育部重点实验室在我国传统食品——自然发酵泡菜中分离、筛选获得 1 高产菌株,经 16S rDNA 初步鉴定为乳杆菌,命名为 *Lactobacillus* sp. SK007,GenBank 登陆号为 DQ534529。目前正在进行发酵优化及分离纯化方面的研究。

3.2 苯乳酸的生物合成途径

细菌可以由对羟基苯丙酮酸^[22]或苯丙酮酸^[16]产生苯乳酸。苯乳酸也是乳酸菌、丙酸菌和瘤胃微生物利用苯丙氨酸的代谢产物,代谢途径为苯丙氨酸经转氨反应生成苯丙酮酸,后者进一步转化为苯乳

酸^[22,23]。

4 苯乳酸的应用

4.1 苯乳酸在食品中的应用

4.1.1 乳品工业

L. monocytogenes 是乳制品中重要的食源性致病菌。Dieuleveux^[24]将苯乳酸用于 UHT 乳(超高温瞬时灭菌乳)和 Saint-Paulin 干酪(一种半硬质干酪)中,可以使 *L. monocytogenes* 降低 4.5 个对数值,杀菌作用不受菌体生长周期的限制。

4.1.2 焙烤工业

苯乳酸对通过食品传播的各种霉菌,包括产毒素的 *A. flavus* 有广泛的抑制作用。面包工业限制化学防腐剂的使用,但其营养丰富,很容易污染霉菌而变质。Lavermicocca^[12]研究了苯乳酸对霉菌的作用,测试菌株从面包产品、面粉、谷物中分离得到,属于曲霉属、青霉属和镰孢霉属的 14 个种 23 株菌。结果发现,所有菌株 90% 生长抑制所需的苯乳酸浓度低于 7.5mg/mL。与其他常用食品防腐剂比较,0.3~3 mg/mL 的丙酸钙无抑制真菌活性,而欧盟标准对切片面包和黑面包中丙酸钙的指导限量为 3mg/mL;山梨酸钠在 3mg/mL 时才有抑制真菌的活性,而且其抑菌谱与苯乳酸的也略有不同;欧盟标准对山梨酸钾的指导限量为 2mg/mL,这一浓度并不抑制 *A. niger*、*P. roqueforti* 等真菌。

Lavermicocca 等^[8]分别用产苯乳酸的 *L. plantarum* 21B 和不产苯乳酸的 *L. brevis* 发酵生产酸面团,焙烤后切片并接种引起面包腐败的 *A. niger* FTDC3227,聚乙烯袋包装后恒湿条件下 20℃ 储存 7d。结果使用 *L. plantarum* 21B 发酵的面包能够使 *A. niger* FTDC3227 延迟 7d 生长。

4.2 苯乳酸在医药中的应用

4.2.1 替代丹参,用于冠心病的临床治疗

由于丹参的来源有限,提取分离步骤繁琐,研究人员致力于其替代品的研究。苯乳酸是丹参素的类似物,药理作用与其相同,临床上替代丹参素,可用于冠心病的治疗^[15]。

4.2.2 作为带节育器出血的治疗药物

薛芬^[25]专利报道,苯乳酸可作为临床治疗带节育器出血的药物。药理实验表明,苯乳酸副作用小、毒性低、抗炎作用强、止血、止痛疗效好,可制成栓剂肛塞或片剂口服。同时可用于临床抗血小板聚集,扩张冠状动脉及缩小心肌梗塞范围等防治和提高红细

胞变形能力,制备抗衰老保健药物。

4.3 苯乳酸在化妆品中的应用

苯乳酸用于化妆品可去除皱纹^[26]。果酸是从各种水果中提炼出有的有机酸。据美国研究公布,现在已经提取出来并申请专利的有 21 种果酸。苯乳酸作为果酸的一种,具有除皱、亮肤的美容功效。

5 展望

苯乳酸是一种新型的生物防腐剂,具有安全性高、抑菌能力强的特点,开发苯乳酸作为生物防腐剂在食品工业的应用研究,应着眼于 2 个方面。一方面,将苯乳酸添加到食品中抑制食源性致病菌、腐败菌以延长食品的货架期;另一方面筛选能够产生苯乳酸的安全菌株用于发酵食品的生产,也可以有效防止微生物的污染达到生物防腐的目的。随着苯乳酸高产菌株的选育、代谢调控、分离提取、抑菌机理的研究深入以及应用领域的扩展,苯乳酸将会在更广泛的领域得到应用。

参考文献

- 1 Schnurer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives[J]. Trends Food Sci Technol, 2005, 16: 70~78
- 2 Allen K L, Molan P C, Reid G M. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys[J]. J Pharm Pharmacol, 1991, 43(12): 817~822
- 3 Molan P, Russell K. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys[J]. J Apic Res, 1988, 27(1): 62~67
- 4 Russell K M, Molan P C, Wilkins A L, et al. Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey[J]. J Agric Food Chem, 1990, (38): 10~13
- 5 Wilkins A L, Lu Y, Molan P C. Extractable organic substances from New Zealand unifloral manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys[J]. J Apic Res, 1993, 32: 3~9
- 6 Weston R J, Mitchell K R, Allen K L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey[J]. Food Chem, 1999, 64(3): 295~301
- 7 Dieuleveux V, der Van P, Chataud J, et al. Purification and characterization of anti-Listeria compounds produced by *Geotrichum candidum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(2): 800~803
- 8 Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B

- [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 4 084~4 090
- 9 Magnusson J. Antifungal activity of lactic acid bacteria [D]. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 2003
 - 10 Dieuleveux V, Lemarinier S, Gueguen M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid[J]. Intern J Food Microbiol, 1998, 40(3): 177~183
 - 11 Gupta R K, Prasad D N. Antibiotic activity of nisin in food preservation[J]. Microbiol Aliment Nutrit, 1989, (7): 199~208
 - 12 Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 634~640
 - 13 Strom K, Schnurer J, Melin P. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 246(1): 119~124
 - 14 Brunhuber N M, Thoden J B, Blanchard J S, et al. Rhodococcus *L*-phenylalanine dehydrogenase: kinetics, mechanism, and structural basis for catalytic specificity [J]. Biochemistry, 2000, 39(31): 9 174~9 187
 - 15 王珏英, 张渊博. β -苯基乳酸对心血管系统的实验研究[J]. 上海医科大学学报, 1991, 18(4): 295~297
 - 16 Thierry A, Maillard M B. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*[J]. Lait, 2002, 82: 17~32
 - 17 Kamata M, Toyomasu R, Suzuki D, et al. D-phenyllactic acid production by *Brevibacterium* or *Corynebacterium* [P]. JP 86108396, 1986(5)
 - 18 Strom K, Sjogren J, Broberg A, et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(9): 4 322~4 327
 - 19 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 Microbiol Lett, 2004, 233(2): 289~295
 - 20 Armaforte E, Carri S, Ferri G, et al. High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth[J]. J Chromatogr A, 2006, 1131(10): 281~284
 - 21 Strom K. Fungal inhibitory lactic acid bacteria-characterization and application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393[D]. Uppsala, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, 2005
 - 22 Khan R I, Onodera R, Amin M R, et al. Aromatic amino acid biosynthesis and production of related compounds from p-hydroxyphenylpyruvic acid by rumen bacteria, protozoa and their mixture[J]. Amino Acids, 2002, 22(2): 167~177
 - 23 Kieronczyk A, Skeie S, Langsrud T, et al. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(2): 734~739
 - 24 Dieuleveux V, Gueguen M. Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese[J]. J Food Prot, 1998, 61(10): 1281~1285
 - 25 薛 芬, 邵以德. 一种带节育器出血的治疗药物及其制备方法[P]. CN 1141772, 1995(8)
 - 26 Yu R J, Van S E J. Method of using 3-phenyllactic acid for treating wrinkles[P]. US 5643953, 1997(6)

Research and Application in Food of Phenyllactic Acid as a Novel Biopreservative: a Review

Li Xingfeng¹, Jiang Bo¹, Pan Beilei²

1(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

2(Chinese Institute of Food Science and Technology, Beijing 100833, China)

ABSTRACT Phenyllactic acid (PLA) is a novel antimicrobial compound that has a low molecular mass and is produced by lactic acid bacteria or some other microorganisms. The inhibitory properties of PLA have been demonstrated against some food-borne pathogenic bacteria and against several fungal species including some mycotoxigenic species. As a novel biopreservative, PLA has potential applications in the preservation of food. In this paper, we reviewed advances in structure, stability, antimicrobial activities, inhibition mechanism and biosynthesis of PLA. Some advices were also put forward for further research of PLA.

Key words phenyllactic acid, biopreservative, food, lactic acid bacteria, antimicrobial activity