

溴代山梨酸的合成与抗菌作用研究*

黄志良 宁正祥 郭新竹

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

摘 要 针对山梨酸使用过程中存在的问题,首次合成了溴代山梨酸,研究了它对不同种类微生物的抗菌性能,并与山梨酸的抗菌性能进行了比较。山梨酸经化学修饰合成溴代山梨酸后,抗菌作用显著增强,抗菌作用稳定性显著提高,半衰期延长了 3.3 倍,在水中溶解性得到明显改善,具有一定的开发应用前景。

关键词 溴代山梨酸 合成 抗菌作用

山梨酸是目前国内外广泛使用的一种食品防腐剂,对霉菌、酵母及需氧菌均有抑制作用,对哺乳动物的毒性极低。但仅适宜偏酸性条件下使用,而在酸性到中性水溶液中溶解度又很小,使用范围受到很大限制。山梨酸对乳酸菌及厌氧性芽孢杆菌基本无效,对一些种类的微生物抑制能力也很有限。本试验首次采用化学修饰的方法,合成山梨酸的溴代物,研究溴代山梨酸对不同种类微生物的抑制作用,探讨提高其抗菌性能,扩大其使用 pH 范围的有效方法。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

实验用菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由华南农业大学微生物教研室提供,牛乳酸败菌取于华南农业大学乳品厂变质鲜乳。

肉汤培养基:牛肉膏 5 g、NaCl 5 g、蛋白胨 10 g、葡萄糖 10 g,加水至 1 000 mL,调整 pH 为 7.6~7.8。用于大肠杆菌和牛乳酸败菌的培养。

豆芽汁培养基:取黄豆芽 200 g,切碎,加水煮沸,取其汁,加葡萄糖 20 g,加水至 1 000 mL。用于酿酒酵母的培养。

山梨酸、冰醋酸、溴为分析纯试剂。

1.2 山梨酸溴代物的制备方法

在干燥的三颈瓶上安装滴液漏斗和温度计。加入 0.1 mol 山梨酸和 100 mL 冰醋酸,用冰/水浴冷却并维持温度低于 4℃,用磁力搅拌器不断搅拌,同时通过滴液漏斗缓慢滴加 Br₂ 0.1 mol,滴加完后,保持 10 h 左右,使颜色褪至淡黄色。缓慢加入无水 K₂CO₃,待无气泡发生后,用水浴加热至 70℃,并保持 2 h,冷却,用有机溶剂萃取,收集萃取液,用旋转蒸发仪在 30℃ 下蒸去溶剂。

1.3 微生物生长抑制试验

采用分光光度法。在大小一致的三角瓶内加入 100 mL 培养基,高压灭菌,在无菌条件下,接种处于平稳生长期的供试菌液 0.2 mL,分别加入不同量的溴代山梨酸和山梨酸(钾盐)溶液,使培养基中溴代山梨酸和山梨酸达到所要求的浓度,并设一无添加抗菌剂的空白对照组。置于 37℃ 水浴摇床培养,按一定时间间隔取出菌液,测定其在 560 nm 下的吸光度。按下式计算接种后 t 小时的抑菌率 I_R :

$$I_R(\%) = \frac{\Delta A_{t,c} - \Delta A_{t,l}}{\Delta A_{t,c}} \times 100$$

式中: $\Delta A_{t,c}$ 和 $\Delta A_{t,l}$ 分别是对照与处理样品在 t 小时的 $A_{560\text{nm}}$ 值和接种时($t=0$) $A_{560\text{nm}}$ 的差值。

第一作者:博士研究生,讲师。

* 广东省自然科学基金资助项目(No. 980542)

收稿时间 2001-04-03

1.4 抗菌剂抑菌效果衰减函数的回归分析

一般情况下,抗菌剂的抑菌效果是时间的衰减函数 $I_R = Ae^{-\mu t}$, 式中 e 为自然对数, A 为抗菌剂在供试浓度下的最高理论抑菌率, μ 为衰减系数, I_R 为抑菌率。利用抗菌剂在 t 时刻对应的抑菌率等一系列数据,可回归分析得到衰减函数。从衰减函数可求知抗菌剂抗菌作用的半衰期 $t_{0.5}$ 值。 $t_{0.5}$ 可定义为防腐剂抑菌率下降到初始抑菌率一半时所需要的时间。

2 结果与讨论

2.1 山梨酸的溴代反应

山梨酸容易发生溴代反应,要控制在低温下进行。通过对几种 α, β -不饱和羰基类化合物溴代反应过程的研究,发现可有 2 种反应机理来解释山梨酸的溴代反应,一是加成-消除反应机理;二是 $\alpha-H$ 的卤代反应机理^[15]。

加成-消除反应机理的第 1 步是亲电加

成反应,当溴分子与 $C=C$ 双键接近时,发生极化,溴分子发生异裂,形成正负溴离子,溴正离子与烯键生成环状活性中间体—— σ 配合物。 σ 配合物与溴负离子反应,生成二溴加成产物。第 2 步是二溴加成产物按双分子消除反应机理消去 HBr ,得到一溴代物。 $\alpha-H$ 的卤代反应机理则是:山梨酸中的 $\alpha-H$ 由于受羧基的影响,比较活泼,在酸或碱的催化下,容易被卤素取代,生成 α 卤代山梨酸,属于亲电取代反应,卤素与山梨酸接近时,分子发生极化,形成亲电正离子,正离子接近 α -碳时,会形成一个不稳定的碳正离子中间体,碳正离子中间体消去一个 H^+ ,恢复稳定的共轭结构, H^+ 则与 Br^- 结合形成 HBr 。

产物溴代山梨酸为浅黄色油状液体,在水中可均匀分散。

2.2 溴代山梨酸的抗菌性能

山梨酸、溴代山梨酸对大肠杆菌、酿酒酵母、牛奶酸败菌的生长抑菌试验结果见表 1~3。

表 1 对大肠杆菌的抑菌率

%

培养时间 /h	山梨酸 500 mg·L ⁻¹	山梨酸 700 mg·L ⁻¹	溴代山梨酸 500 mg·L ⁻¹	溴代山梨酸 600 mg·L ⁻¹	溴代山梨酸 700 mg·L ⁻¹
3	33	44	100	100	100
5	22	26	100	100	100
6.5	23	25	100	100	100
8.5	20	25	99	100	100
11	20	24	86	100	100
14	20	24	72	100	100
24	20	24	31	100	100
48	21	21	24	100	100

表 2 对酿酒酵母的抑菌率

%

培养时间 /h	山梨酸 200 mg·L ⁻¹	山梨酸 400 mg·L ⁻¹	溴代山梨酸 200 mg·L ⁻¹	溴代山梨酸 400 mg·L ⁻¹	溴代山梨酸 600 mg·L ⁻¹
6	61	77	30	60	100
8.5	56	72	31	50	100
11	49	69	33	54	100
13.5	39	60	27	56	99
16	18	43	21	51	99

从表中可看出, 0.06%~0.07% 溴代山梨酸可完全抑制大肠杆菌和酿酒酵母的生长,而同浓度的山梨酸抑菌率则很低。牛乳

酸败菌是很难抑制的一类菌群,山梨酸对其抑制作用很小。经溴代后,抗菌作用显著增强,微生物的生长量明显减小,滞后期明显延

长(见图 1)。

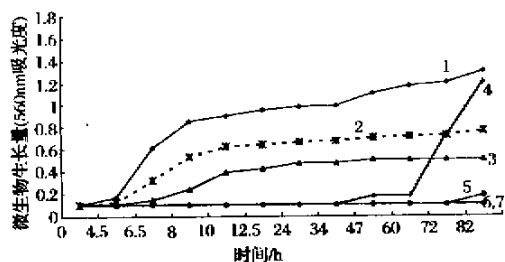
通过对山梨酸和溴代山梨酸对牛乳酸败

菌抑菌效果的衰减函数回归分析,其抑菌效果的参数见表 4。

表 3 对牛乳酸败菌的抑菌率

%

培养时间 /h	山梨酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		溴代山梨酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			
	700	900	600	700	800	900
4.5	64	93	100	100	100	100
6.5	57	91	100	100	100	100
8	43	81	100	100	100	100
10	35	64	100	100	100	100
12.5	36	62	100	100	100	100
24	36	58	100	100	100	100
34	36	58	100	100	100	100
47	40	60	93	100	100	100
60	43	63	93	100	100	100
72	43	63	43	100	100	100
82	45	66	8	93	100	100



1—对照 2—山梨酸 700 mg/L; 3—山梨酸 900 mg/L;
4—溴代山梨酸 600 mg/L 5—溴代山梨酸 700 mg/L;
6—溴代山梨酸 800 mg/L 7—溴代山梨酸 900 mg/L

图 1 溴代山梨酸对牛乳酸败菌生长量的影响

表 4 山梨酸与溴代山梨酸抗菌性能的比较

抗菌剂	质量 浓度 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	最高理论 抑菌率 (A)/%	衰减系数 (μ)	半衰期 ($t_{0.5}$ 值) /h
山梨酸	700	79	6.03×10^{-3}	114.9
溴代山梨酸	700	101	1.39×10^{-3}	498

最高理论抑菌率反映了抗菌剂的抑菌强度,而衰减系数和半衰期反映了抑菌作用的稳定性。由表 4 可见,与山梨酸相比,溴代山梨酸的半衰期延长了 3.3 倍,衰减系数减小了 3.3 倍,理论抑菌率有所提高,说明了溴代山梨酸的抗菌性能要显著优于山梨酸。

对肉桂醛、肉桂酸的研究也发现,肉桂醛、肉桂酸经溴代后,抗菌作用会显著增强^[2,3]。

根据防腐剂结构与抗菌活性关系的理论,认为山梨酸溴代后,溴的 p 电子参与原山梨酸 α, β -不饱和羰基结构的共轭体系而使抗菌活性中心电子云密度增加,电子共轭能力增强,抑菌强度增加;另一方面,山梨酸为机体正常存在的有机酸,是酶促合成的天然有机化合物,容易被微生物代谢分解,稳定性较低,在菌体内难以长存,而溴代山梨酸在生物体内一般不存在,微生物体内缺乏相应的代谢酶类,抗代谢性增强,从而使抗菌活性提高^[4]。

3 结 论

通过实验发现,山梨酸经溴代后抑菌性能显著增强,抑菌作用半衰期延长,稳定性大大提高。在水中溶解性得到明显改善,具有一定的开发应用前景。

参 考 文 献

- 王芹珠,杨增家. 有机化学. 北京:清华大学出版社,1997.213~230
- 宁正祥,谭龙飞,张德聪等. 应用化学,1996,13(1):38~42
- 宁正祥,高建华,黄凯玲等. 食品与发酵工业,1994(1):39~43
- 宁正祥,高建华. 广州食品工业科技,1997,13(3):1~4
- 居逸周,陶永红. 化学工程师,1998(3):49~50

Study on Bromosorbic Acid Synthesis and Its Antimicrobial Activity

Huang Zhiliang Ning Zhengxiang Guo Xinzhu

(College of Food and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

ABSTRACT In this paper, the bromosorbic acid was firstly synthesized and its antimicrobial activity toward different microorganisms was studied. It was found that the bromosorbic acid had higher antimicrobial activity and stability when compared with sorbic acid.

Key words bromosorbic acid, synthesis, antimicrobial activity

本期封面介绍

上海兆光生物工程设计研究院

上海兆光生物工程设计研究院是在上海兆光喷射液化技术有限公司及淮海工学院生物技术研究中心基础上正在组建的世界一流的研发中心,是中国公认的酶法制糖技术的先驱,其专利“连续喷射液化酶法制糖技术”(实用新型专利号:ZL97 2 10691.X)已被味精(莲花集团、菱花集团)、赖氨酸(川化味之素有限公司、希望集团公司)、柠檬酸(蚌埠柠檬酸厂、黑龙江甘南柠檬酸厂、四〇四厂、山海关实业总公司)、乳酸(河南郸城乳酸厂)、青霉素(江西东风制药厂、石家庄制药集团、河北张家口制药总厂、山东鲁抗集团公司)、甘油(山东邹平甘油厂)、活性干酵母(河南睢县活性干酵母厂)、衣康酸(青岛琅琊台酒业集团股份有限公司)、黄原胶(黑龙江甘南柠檬酸厂)、果葡糖浆(安徽丰原生化公司、山东保龄保生物技术有限公司、湖北荆州果葡糖厂、吉发集团淀粉糖公司)、高麦芽糖浆(山东省青援食品集团公司、山东诸城兴贸公司、大成集团长春帝豪公司、山东鲁州食品集团公司、台湾旺旺集团、上海喔喔食品集团公司)、饴糖(上海饴糖厂、北京饴糖厂)、麦芽糊精(安徽丰原生化公司、山东西王集团公司、山东鲁州食品集团公司、黑龙江华冠科技公司、山东都庆集团公司、天津麦特生物食品公司)、全糖粉(山东六合食品公司、山东鲁州食品集团公司、黑龙江旺豪集团)、结晶葡萄糖(丰原生化公司、山东西王集团公司、河北宁晋玉峰淀粉糖业有限公司、河北宁晋健民淀粉葡萄糖厂、河北抚宁淀粉葡萄糖厂、山东曲阜葡萄糖厂)、山梨醇(吉林省公主岭市甜味剂厂)、焦糖色素(河南洛阳焦糖色素厂)、变性淀粉(广东佛山溶剂厂)等二十二个行业六百八十多家单位采用。目前,此项技术已被玉米深加工国家工程研究中心采用,并荣获中国轻工科技进步二等奖。国内淀粉深加工所采用的连续喷射液化酶法制糖技术95%由上海兆光生物工程设计研究院提供。并且台湾台南县正裕麦芽厂、泰国C. S. C. FOODS(THAI LAND)CL. LTD等也采用上海兆光生物工程设计研究院提供的连续喷射液化酶法制糖技术。

经过10年的不懈努力,上海兆光生物工程设计研究院已发展为一个集技术转让、工程设计、工程施工、技术服务于一体的综合性的以淀粉糖为主的工程公司,同时还涉足于环保及生物发酵行业(已建立菌种库及全自控15~150L发酵罐)。

另外,上海兆光公司投巨资建立了兆光生物工程(山东)有限公司,它将被建成现代化的中试及生产基地。

上海兆光生物工程设计研究院拥有以下国际先进的酶法制糖技术:

- (1) 低压蒸汽喷射液化技术;
- (2) 智能化高压蒸汽喷射液化技术;
- (3) 多效降膜蒸发技术;
- (4) 大型压力喷雾干燥技术;
- (5) 先进分离技术——连续离交技术;
- (6) 全糖粉切削技术。

地址:上海浦东张江高科技园区

郭守敬路351号

邮编 201203 电话 021-68561199

手机 013901778416 传真 021-68568768

中文短信息 021-1258-13901778416

王兆光

上海兆光生物工程设计研究院
上海兆光喷射液化技术有限公司
淮海工学院生物技术研究中心
中国发酵协会淀粉糖分会
中国发酵协会
中国食协发酵工程研究会
中国淀粉协会

院长
总工
总经理
副会长
常务理事
专家组成员
理事