

山苍子精油与食品添加剂对水产品腐败菌的联合抑制作用研究

马子祯, 赵前程, 李 萌, 吕 可, 刘婧懿, 马永生*

(大连海洋大学食品科学与工程学院, 大连 116023)

摘要: **目的** 研究山苍子精油与食品添加剂对水产品腐败菌的联合抑制作用。**方法** 采用气相色谱-质谱联用法对山苍子精油的化学组分进行分析; 然后以腐败希瓦氏菌 SM-R2、莓实假单胞菌 SM-R1、摩拉维亚假单胞菌 SM-T1 为研究对象, 采用微量肉汤稀释法研究 5 种食品添加剂的抑菌活性; 通过棋盘稀释法研究山苍子精油与聚赖氨酸及柠檬酸的联合抑菌效应。**结果** 从山苍子精油中检测出 16 种单体化合物, 且主要成分为柠檬醛, 相对含量为 62.7%; 天然防腐剂聚赖氨酸和柠檬酸对 3 株受试腐败菌株具有显著抑制作用, 最小抑菌浓度分别为 0.25、2 mg/mL; 山苍子精油与聚赖氨酸联合抑菌时具有相加效应。**结论** 将山苍子精油与聚赖氨酸联合使用具有相加效应, 能有效扩大精油抑菌范围并减少其使用量, 有望应用于冷藏水产品的绿色保鲜。

关键词: 山苍子精油; 聚赖氨酸; 柠檬酸; 水产品腐败菌; 联合抑菌作用

Combined antimicrobial effects of *Litsea cubeba* essential oil and food additives against spoilage bacteria isolated from aquatic products

MA Zi-Zhen, ZHAO Qian-Cheng, LI Meng, LV Ke, LIU Jing-Yi, MA Yong-Sheng*

(College of Food Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the combined antimicrobial effects of *Litsea cubeba* essential oil and food additives against spoilage bacteria isolated from aquatic products. **Methods** The chemical components of *Litsea cubeba* essential oil were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. The microbroth dilution technique were employed to determine the antibacterial activity of 5 food additives against *Shewanella putrefaciens* SM-R2, *Pseudomonas fragi* SM-R1 and *P.moravia* SM-T1. The combined antimicrobial effects of *Litsea cubeba* essential oil and poly-lysine and citric acid were studied by checkerboard method. **Results** Totally 16 kinds of monomer compounds were detected from *Litsea cubeba* essential oil, and the main component was citral, with the relative content of 62.7%. Polylysine and citric acid showed good antimicrobial effects against the 3 strains of spoilage bacteria with a minimum inhibitory concentrations of 0.25, 2 mg/mL, respectively. The *Litsea cubeba* essential oil had additive effect when combined with polylysine to inhibit the tested spoilage bacteria. **Conclusion** The combination of *Litsea cubeba* essential oil with polylysine shows additive antimicrobial effects, which can effectively expand the antibacterial range of essential oil and reduce its dosage, and thus has the potential to be used

基金项目: 自治区重点研发计划项目(2017B01004-4)

Fund: Supported by Key R&D Project in Xinjiang Uygur Autonomous Region of China (2017B01004-4)

*通讯作者: 马永生, 博士, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: mayo@dlou.edu.cn

*Corresponding author: MA Yong-Sheng, Ph.D, Dalian Ocean University, No. 52 Heishijiao Street, Shahekou District, Dalian City, Liaoning 116023, China. E-mail: mayo@dlou.edu.cn

in the preservation of refrigerated aquatic products.

KEY WORDS: *Litsea cubeba* essential oil; polylysine; citric acid; aquatic spoilage bacteria; combined antimicrobial effects

1 引言

微生物是导致水产品腐败的主要因素, 新鲜水产品中栖息的微生物复杂多样, 但只有少数能适应后续贮藏环境而逐渐成为优势菌群, 它们代谢产生胺、硫化物、醇、醛、酮和有机酸等异味产物, 造成产品腐败, 这些少数微生物即特定腐败菌(specific spoilage organisms)^[1]。不同水产品中的特定腐败菌存在差异, 主要受鱼种、栖息水域和贮藏环境等影响, 如弧菌属等革兰氏阴性发酵型细菌是未经冷藏鲜鱼的特定腐败菌, 希瓦氏菌属是冰鲜海水鱼的特定腐败菌^[1], 假单胞菌属(*Pseudomonas* spp)是有氧冷藏水产品中的优势腐败菌之一, 如冷藏鳙鱼和大黄鱼的特定腐败菌分别为嗜冷假单胞菌(*P. psychrophila*)^[2]和莓实假单胞菌(*P. fragi*)^[3], 而冷藏金头鲷^[4]、大眼金枪鱼^[5]、北大西洋鲑^[6]及大菱鲆^[7]中的特定腐败菌为荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)。

植物精油(essential oils)是从芳香植物中提取出具有挥发性、浓郁香味的脂溶性天然混合物, 被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)认定为公认安全类产品(generally regarded as safe, GRAS)。植物精油也是我国食品添加剂使用标准 GB 2760-2014 中规定可使用的食用香料。研究证实植物精油大多具有抗菌作用, 部分兼具抗氧化功效, 目前已被尝试用于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[8]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[9]、北大西洋鲑(*Salmo salar*)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[10]等水产品的保鲜, 且取得了较显著效果。因此, 利用天然植物精油的高效抑菌活性, 将其用于低温冷藏水产品的辅助保鲜不失为一种可行选择。天然植物精油成分复杂, 包括 20~60 种含量不同的化合物, 其中 1~3 种含量较高的主要成分决定了精油的生物活性, 其含量能达到 85%左右^[11]。萜烯类化合物是绝大部分植物精油的主要活性成分, 约 90%植物精油中含有单萜类化合物, 其中典型代表为柠檬醛^[12]。

目前柠檬醛主要提取自樟科、木姜子属植物山苍子(*Litsea cubeba*)的果实, 为我国特有且生产规模最大的天然香料, 产量和出口量长期以来居世界第一位。山苍子精油及其组分柠檬醛也是我国食品添加剂使用标准 GB 2760 规定可使用的常见食用香料, 具有良好的抗菌和抗氧化功效, 因此是一种极具潜力的天然水产品保鲜剂^[10,12]。

植物精油在水产品中的保鲜作用主要通过抑制特定腐败微生物生长繁殖来实现, 但水产品中的致腐性假单胞菌对山苍子、丁香酚以及百里香酚等大部分植物精油或其

组分常表现出耐受性。澳大利亚学者 Wan 等^[13]研究显示罗勒精油对荧光假单胞及恶臭假单胞无抑菌活性; 最近 Kačániová 等^[14]研究发现 *P. agglomerans*、*P. antarctica*、*P. lundensis* 等 10 种鱼源假单胞菌对肉桂、百里香、迷迭香等多种精油呈现耐受性, 最低抑菌浓度最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)>20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。实验室前期从冷藏大菱鲆中分离得到几株致腐性假单胞菌, 体外抑菌实验同样显示这两株菌对山苍子、柠檬草、柠檬醛等精油或其单体组分均存在不同程度耐受性, 其中山苍子精油的最低抑菌浓度 MIC>4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ^[15], 这表明水产品中假单胞菌对植物精油可能存在耐受性。此外, 精油或其抗菌成分大多是脂溶性, 易被食品基质中的脂质或蛋白吸附而降低了其抑菌效果, 单用精油时需提高其使用浓度, 但也随之带来感官接受性降低的问题。为解决上述问题, 本研究尝试将山苍子精油与几种可用于水产品的食品添加剂组合, 以探究是否能对水产品致腐菌产生协同抑菌作用, 为水产品绿色保鲜剂的使用提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Bioteck Synergy H1/H1M 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); 7890A-5975C 气相色谱质谱联用仪(美国安捷伦科技公司); SW-CJ1FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); HN-25S 恒温培养箱(浙江力辰仪器科技有限公司); SHZ-82 恒温振荡器(常州国华电器有限公司); YM100A 高压灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司)。

山苍子精油(吉安市中香天然植物有限公司); 乳酸链球菌素、柠檬酸、山梨酸钾、双乙酸钠、 ϵ -聚赖氨酸(上海生物工程股份有限公司); 琼脂粉、胰蛋白胨大豆肉汤(trypsin casein soy broth, TSA)、胰蛋白胨大豆琼脂(trypsin casein soy agar, TSA, 北京索莱宝科技有限公司)。

腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens* SM-R2)、莓实假单胞菌(*P. fragi* SM-R1)和摩拉维亚假单胞菌(*P. moraviensis* SM-T1)为本实验室前期分离菌株并于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

2.2 实验方法

2.2.1 山苍子精油的提纯

采用水蒸气蒸馏法对购买的山苍子精油进行提纯, 取 20 mL 山苍子精油加入放入沸石的 1 L 圆底烧瓶中, 加入 300 mL 蒸馏水, 加热蒸馏并收集上层淡黄色油状液体,

用无水 Na_2SO_4 脱水, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后避光保存。

2.2.2 山苍子精油化学成分分析

采用气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)对山苍子精油的化学成分进行分析, 气相色谱分析条件如下: 起始温度 $50\ ^\circ\text{C}$, 保持 $1\ \text{min}$, 以 $5\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 $230\ ^\circ\text{C}$, 保持 $5\ \text{min}$; 再以 $8\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 程序升温至 $280\ ^\circ\text{C}$, 保持至完成分析, 载气为 $\text{He}(99.99\%)$, 柱流量 $1.0\ \text{mL}/\text{min}$, 进样口温度为 $250\ ^\circ\text{C}$, 分流比 $50:1$ 。质谱分析条件为: EI 源, 电子能量 $70\ \text{eV}$; 接口温度为 $280\ ^\circ\text{C}$, 离子源温度为 $230\ ^\circ\text{C}$, 四级杆温度为 $150\ ^\circ\text{C}$; 溶剂延迟时间为 $2.5\ \text{min}$; 全扫描采集模式, 质量范围 $m/z\ 50\sim 55$ 。将各色谱峰相应的质谱图在 NIST2011 标准谱库中检索定性, 并采用峰面积归一化法进行定量分析, 计算出各化合物的相对百分含量。

2.2.3 最低抑菌浓度测定

参照 Othman 等^[16]方法, 采用微量肉汤稀释法测定 5 种食品添加剂的最低抑菌浓度。以聚赖氨酸为例简述步骤如下, 将聚赖氨酸溶液用 TSB 稀释至 $8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0\ \mu\text{L}/\text{mL}$, 再依次加入 96 孔细胞培养板中, 每孔 $100\ \mu\text{L}$, 每个浓度梯度设置 3 个平行, 并设不含聚赖氨酸的培养基为空白对照组。取经过夜振荡培养的待测菌液, 用 TSB 培养基稀释至 $2\times 10^6\ \text{CFU}/\text{mL}$, 依次加入上述含聚赖氨酸培养基的 96 孔板中, 每孔加 $100\ \mu\text{L}$; 将 96 孔板置入酶标仪, 在 $28\ ^\circ\text{C}$ 条件下振荡培养, 每隔 $30\ \text{min}$ 自动检测一次 $600\ \text{nm}$ 处吸光值(OD_{600}), 连续测定 $20\ \text{h}$, 绘制细菌生长曲线, 最低抑菌浓度定义为完全抑制细菌生长时的最低聚赖氨酸浓度, 对其他食品添加剂采用类似步骤进行。

2.2.4 山苍子精油与食品添加剂的联合抑菌实验

参照 Gutierrez 等^[17]方法, 采用棋盘稀释法检测山苍子精油与食品添加剂的联合抑菌作用, 在此以山苍子精油与聚赖氨酸组合对腐败希瓦氏菌 SM-R2 的抑制作用为例, 简述步骤如下: 用 TSB 培养基对山苍子精油进行连续 2 倍梯度稀释, 配制成浓度为 $8、4、2、1、0.5$ 和 $0\ \mu\text{L}/\text{mL}$ 的悬液; 采用相同梯度稀释方法将聚赖氨酸配制为 $4、2、1、0.5、0.25$ 和 $0\ \text{mg}/\text{mL}$ 的待测溶液。按棋盘法设计将不同浓度的精油和添加剂两两组合加入 96 孔平板中, 每孔各加 $50\ \mu\text{L}$, 并补加 $100\ \mu\text{L}$ 、浓度 $2\times 10^6\ \text{CFU}/\text{mL}$ 的菌液。然后将 96 孔板置入酶标仪, 在 $28\ ^\circ\text{C}$ 条件下振荡培养, 每隔 $30\ \text{min}$ 自动检测一次 $600\ \text{nm}$ 处吸光值(OD_{600}), 连续自动检测 $20\ \text{h}$ 。以分级抑菌浓度指数(Fractional inhibitory concentration index, FIC_i)作为联合抑菌作用的判定依据^[17], 计算公式如下:

$$FIC_i = \frac{MIC_{E+P}}{MIC_E} + \frac{MIC_{P+E}}{MIC_P}$$

公式中 MIC_E 和 MIC_P 分别代表精油和添加剂单独应用时的最低抑菌浓度, 单位分别为 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、 mg/mL ; MIC_{E+P} 和

MIC_{P+E} 分别表示精油和添加剂联合使用时各自的最低抑菌浓度, 单位分别为 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、 mg/mL 。当 $FIC_i < 0.5$ 时, 判定为协同作用; $0.5 \leq FIC_i \leq 1$ 为相加作用; $1 < FIC_i \leq 4$ 为无关作用; $FIC_i > 4$ 为拮抗作用。

3 结果与分析

3.1 山苍子精油的成分分析与鉴定

本研究所用山苍子精油中共检测出 16 种化合物(如表 1 所示), 占精油总量的 95.47% , 且主要为萜类化合物, 其中含量较高的 3 种单体成分依次为香叶醛(37.91%)、橙花醛(24.83%)和 *D*-柠檬烯(18.08%), 总离子色谱图如图 1。橙花醛和香叶醛又称柠檬醛 b 和柠檬醛 a, 为柠檬醛的顺反异构体, 可见本研究中山苍子精油的主要成分为柠檬醛, 含量为 62.7% , 高于已有文献报道^[18], 这可能是提取原料差异造成。研究证实新鲜山苍子果实提取的精油中柠檬醛能达到 74.1% , 但同一产地山苍子干果中柠檬醛相对含量仅为 33% 左右, 这是由于贮藏过程中柠檬醛挥发损失所致^[19]。此外, 以往部分研究中山苍子精油中能鉴定出 $20\sim 30$ 多种化合物, 占精油总量的 $91\%\sim 93\%$, 显示含有较多的微量化合物^[18,19]。而本研究对山苍子精油进行了二次蒸馏提纯, 有效去除了一些杂质化合物, 提高了精油的纯度, 这有利于其作为保鲜剂应用于食品中。

山苍子精油对食品腐败菌的抑制作用在我们前期研究中已得到证实, 如山苍子精油能有效抑制腐败希瓦氏菌、热死环丝菌、气单胞菌等水产品致腐菌, 最低抑菌浓度为 $0.5\sim 2\ \mu\text{L}/\text{mL}$, 但致腐性假单胞菌对山苍子精油具有明显耐受性, $MIC > 4\ \mu\text{L}/\text{mL}$ ^[15]。鉴于引起水产品腐败的微生物种类多样, 有必要将山苍子精油与一些食品添加剂组合使用, 以扩展其抑菌谱, 或实现协同增效的目的。

3.2 食品添加剂对腐败菌株的最低抑菌浓度

依据 GB 2760-2014《食品添加剂使用标准》^[20], 本研究选取聚赖氨酸、乳酸链球菌素、柠檬酸、山梨酸钾及双乙酸钠 5 种可用于水产品的添加剂, 其中聚赖氨酸、双乙酸钠、山梨酸钾和乳酸链球菌素为食品防腐剂; 柠檬酸虽为酸度调节剂但具有抑菌功效, 且具有良好的感官接受性, 故也纳入其中。

本研究以 1 株腐败希瓦氏菌和 2 株假单胞菌为对象, 采用微量肉汤稀释法对 5 种食品添加剂的抑菌效果进行检测, 由图 2~4 可见, 5 种添加剂对 3 株腐败菌具有不同程度的抑制作用, 其中聚赖氨酸抗菌活性最强, 对 3 株致腐菌的 MIC 为 $0.25\ \text{mg}/\text{mL}$; 其次为柠檬酸和双乙酸钠, MIC 值均为 $2\ \text{mg}/\text{mL}$ 。聚赖氨酸是由白色链霉菌(*Streptomyces albus*)好氧发酵产生的一种天然食品防腐剂, 结构上是由 $25\sim 35$ 个 *L*-赖氨酸通过 $\alpha\text{-COOH}$ 和 $\epsilon\text{-NH}_2$ 脱水缩合的酰胺键连接而成, 对食品中的细菌、酵母和霉菌具有广谱抑制

作用^[21]。Hyldgaa 等^[22]测得聚赖氨酸对大肠杆菌(*Escherichia coli*)和肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)的 MIC 值分别为 0.11 和 0.22 mg/mL, 对荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)和恶臭假单胞菌(*P. putida*)的 MIC<0.1 mg/mL, 与本研究结果类似。目前聚赖氨酸已被尝试用于牡蛎(*Crassostrea virginica*)^[23]、海鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[24]及美国红鱼(*Sciaenops*

ocellatus)^[25]等水产品的冷藏保鲜, 具有安全有效、水溶性好、稳定性高等优势。柠檬酸也是微生物发酵产生的一种有机酸, 主要通过改变 pH 来抑菌, 且常和其他食品添加剂复配后使用, 如乳酸链球菌素、氯化钠等^[26]。此外, 双乙酸钠对受试菌株也显示出良好抑菌效果, 但其带有乙酸气味, 若加到水产品中可能会影响风味。

表 1 山苍子精油中的主要化学成分
Table 1 Chemical constituents of *Litsea cubeba* essential oil

序号	保留时间/min	相对含量/%	分子式	化合物
1	9.299	1.76	C ₁₀ H ₁₆	α -蒎烯(α -pinene)
2	9.720	0.64	C ₁₀ H ₁₆	莰烯(camphene)
3	10.558	1.97	C ₁₀ H ₁₆	β -蒎烯(β -pinene)
4	11.043	0.35	C ₁₀ H ₁₆ O	2, 3-脱氢-1, 8-桉树脑(2, 3-dehydro-1, 8-cineole)
5	12.172	18.08	C ₁₀ H ₁₆	D-柠檬烯(D-limonene)
6	14.527	1.92	C ₁₀ H ₁₈ O	3, 7-二甲基-1, 6 辛二烯-3-醇, (1, 6-octadien-3-ol, 3, 7-dimethyl-)
7	16.110	1.32	C ₁₀ H ₁₈ O	香茅醛(citronellal)
8	16.658	0.42	C ₁₀ H ₁₆ O	马鞭草烯醇(verbenol)
9	16.818	0.22	C ₁₀ H ₁₈ O	松油烯-4-醇(terpinen-4-ol)
10	16.98	0.54	C ₁₀ H ₁₆ O	顺式马鞭草烯醇(cis-verbenol)
11	17.21	1.4	C ₁₀ H ₁₈ O	α -松油醇(α -terpineol)
12	18.53	24.83	C ₁₀ H ₁₆ O	橙花醛(2, 6-octadienol, 3, 7-dimethyl-(z)-)
13	19.37	37.91	C ₁₀ H ₁₆ O	香叶醛(2, 6-octadienol, 3, 7-dimethyl-(e)-)
14	22.31	1.62	C ₁₅ H ₂₄	β -榄香烯(cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2, 4-bis(1-methylethenyl)-)
15	23.05	1.86	C ₁₅ H ₂₄	石竹烯(caryophyllene)
16	23.95	0.63	C ₁₅ H ₂₄	顺- α -红没药烯(cis- α -bisabolene)

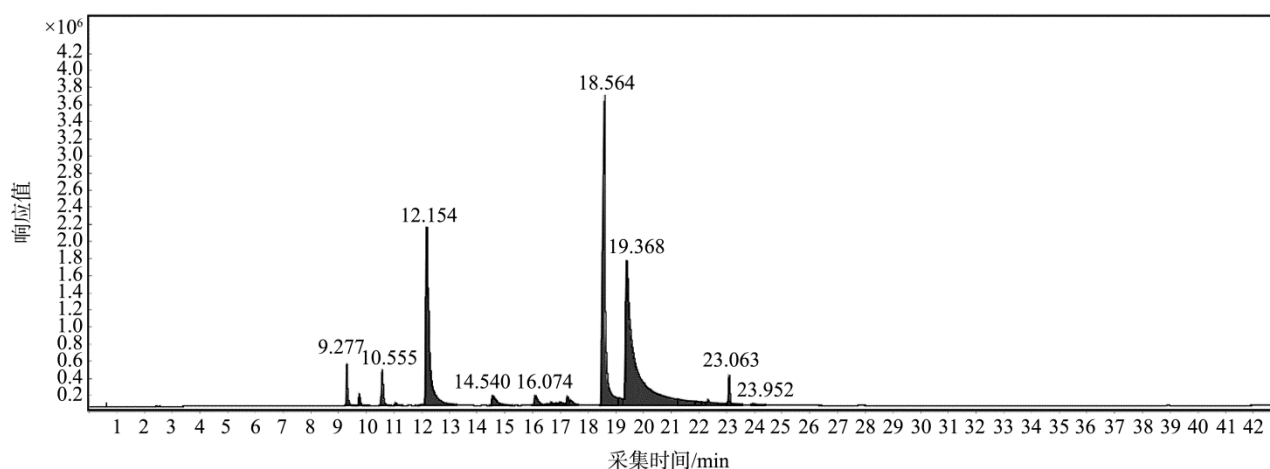
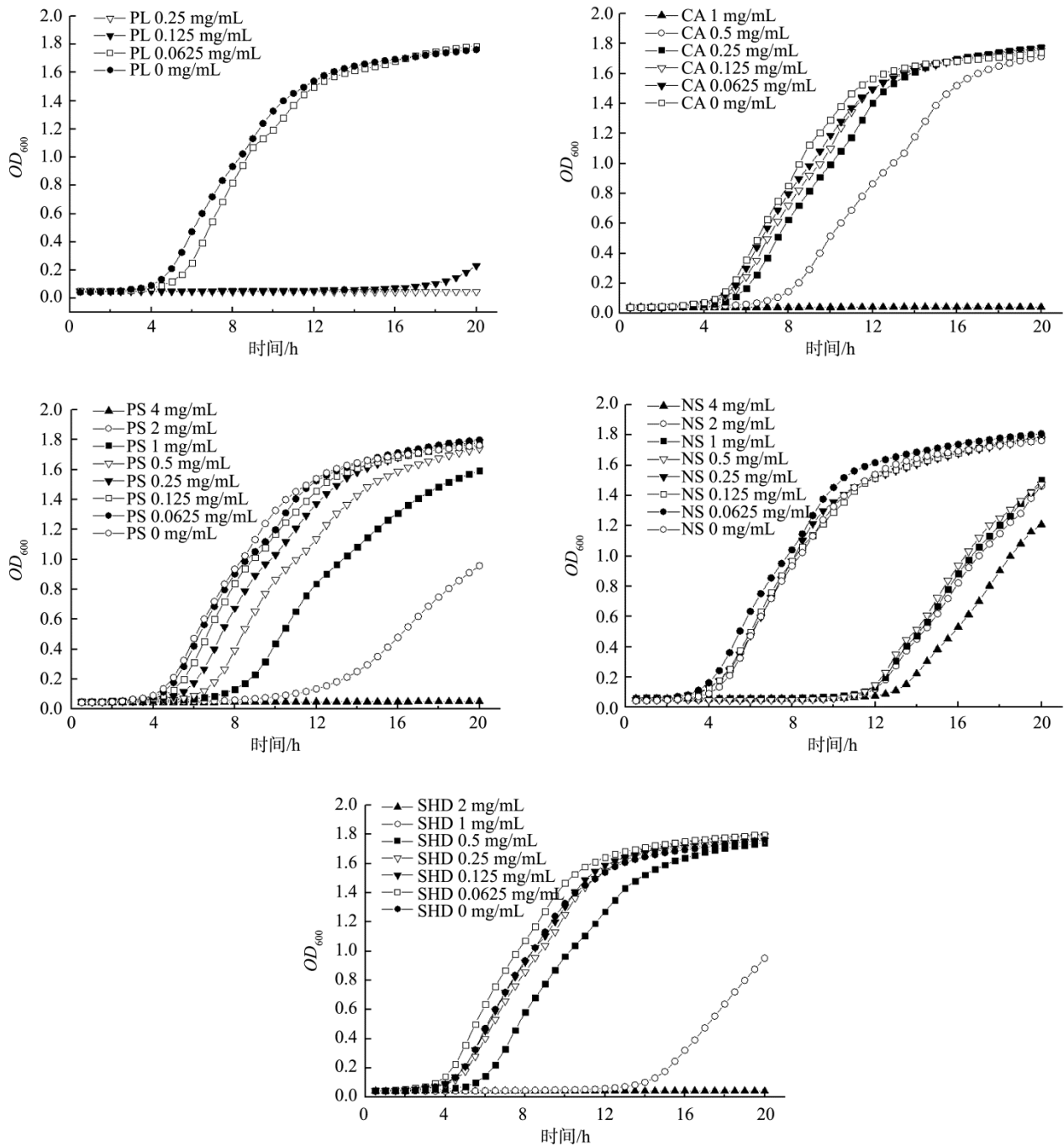


图 1 山苍子精油的总离子色谱图

Fig.1 Total ion chromatogram of *Litsea cubeba* essential oil

本研究中山梨酸钾及乳酸链球菌素的抑菌效果较差, MIC ≥ 4 mg/mL, 这可能是由于二者需要在酸性环境下才能发挥抑菌作用, 在中性介质中抑菌作用有限^[27]。此外, 乳酸链球菌素对金黄色葡萄球菌、芽孢杆菌、李斯特菌等

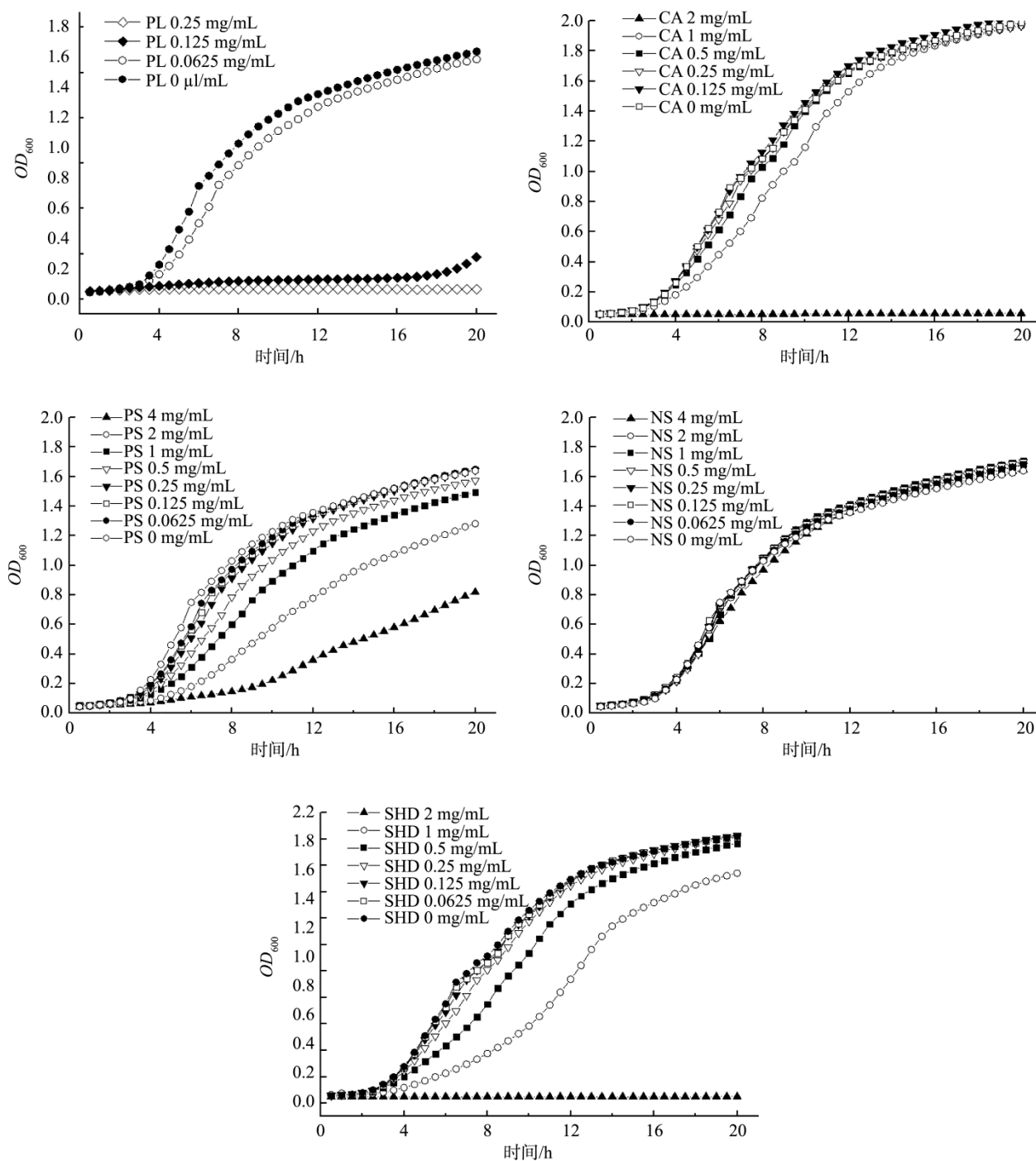
革兰氏阳性菌的抑制效果更显著, 而本研究中的 3 株受试菌均为革兰氏阴性菌, 这可能也是限制其抑菌效果的原因之一^[28]。综合考虑添加剂的抑菌效果、来源及风味, 后续拟选择聚赖氨酸和柠檬酸与山苍子精油进行联合抑菌实验。



注: PL, 聚赖氨酸; CA, 柠檬酸; PS, 山梨酸钾; NS, 乳酸链球菌素; SHD, 双乙酸钠。

图 2 5 种食品添加剂对腐败希瓦氏菌 SM-R2 的抑菌曲线

Fig.2 Antimicrobial kinetic curves of five food additives against *S. putrefaciens* SM-R2



注: PL, 聚赖氨酸; CA, 柠檬酸; PS, 山梨酸钾; NS, 乳酸链球菌素; SHD, 双乙酸钠。

图 3 5 种食品添加剂对莓实假单胞菌 SM-R1 的抑菌曲线

Fig.3 Antimicrobial kinetic curves of five food additives against *P. fragi* SM-R1

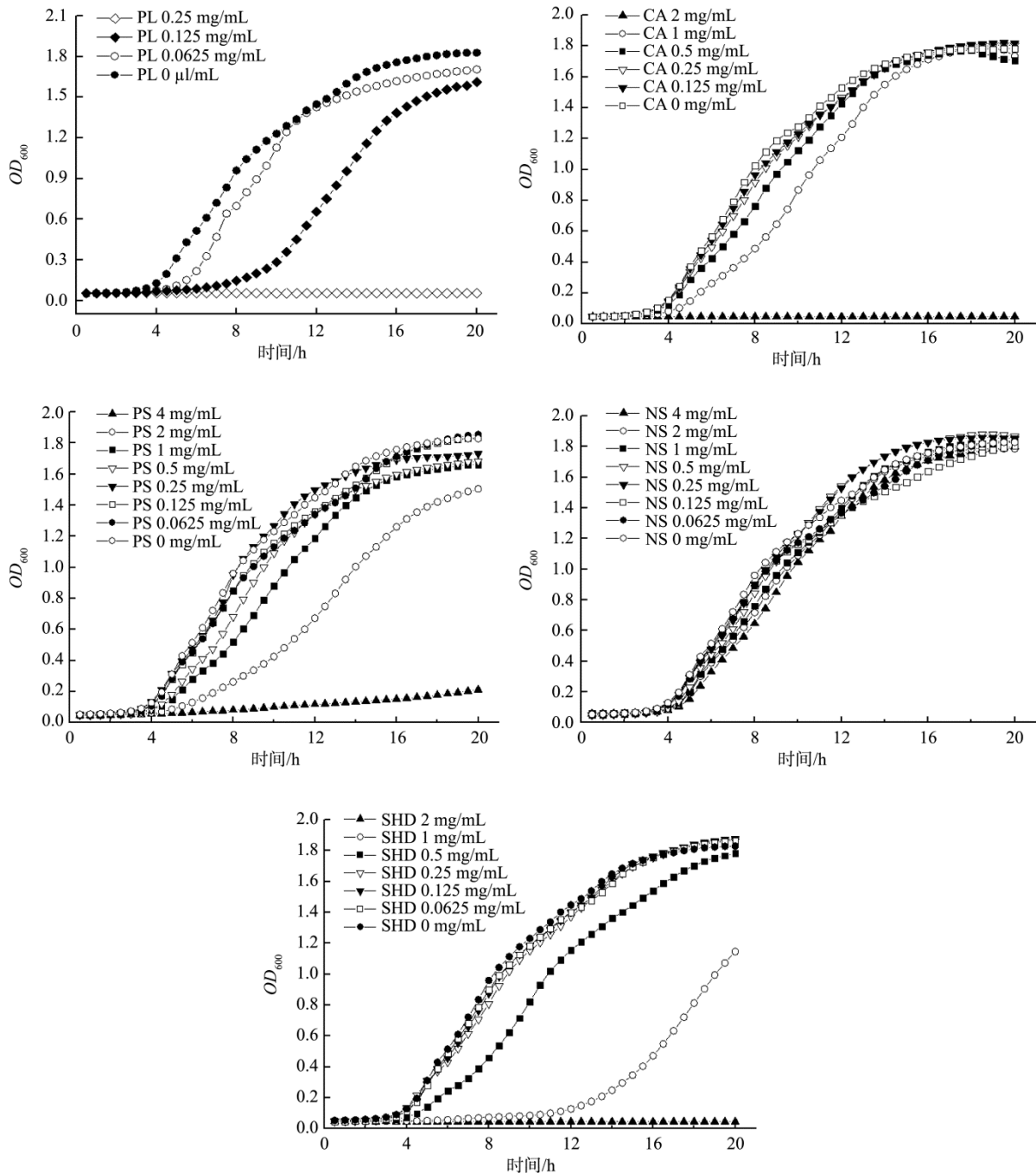
3.3 山苍子精油和聚赖氨酸及柠檬酸的联合抑菌作用

引起水产品腐败的微生物复杂多样, 单用某一种植物精油可能难以达到理想抑菌效果, 因此常见策略是将不同精油组合, 或精油与其他食品添加剂联合应用, 由此可产生协同、相加、无关和拮抗效应四种结果, 但多数呈现

相加或无关作用, 协同或拮抗均较少见^[17]。如表 2 和表 3 所示, 山苍子精油和聚赖氨酸联合使用时对腐败希瓦氏菌 SM-R2 和摩拉维亚假单胞菌 SM-T1 的分级抑菌浓度指数为 $0.5 < FIC_i \leq 1$, 显示为相加作用; 对莓实假单胞菌 SM-R1 的 $1 < FIC_i < 2$, 呈现无关作用; 山苍子精油和柠檬酸联合使用时对 3 株受试菌株的 $1 < FIC_i \leq 2$, 均显示为无关作用。

本研究中山苍子精油和聚赖氨酸、柠檬酸复配使用对 3 株受试细菌为相加或无关作用, 未显示出协同或拮抗效应, 这与前人相关研究结论类似。Mélanie 等^[29]将乳酸菌素分别与肉桂(*Cinnamomum cassia*)、亚香茅(*Cymbopogon nardus*)、百里香(*Thymus vulgaris*)等 6 种植物精油组合, 其对恶臭假单胞菌、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)也显示为相加或无关效应。与此类

似, Hyldgaard 等^[22]将聚赖氨酸与异丁香酚组合后使用对大肠杆菌、恶臭假单胞菌、肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)等 7 种细菌的分级抑菌浓度指数为 $0.5 < FIC_i \leq 2$, 均显示为相加或无关作用。张皓然等^[30]研究认为百里香酚肉桂醛混合精油与柠檬酸复配后提高了精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果, 即柠檬酸与精油分子间具有协同效应, 但该研究仅通过抑菌圈大小定性判定抑菌活性, 并没有检测分级抑菌浓度指数, 故研究结论有待商榷。



注: PL, 聚赖氨酸; CA, 柠檬酸; PS, 山梨酸钾; NS, 乳酸链球菌素; SHD, 双乙酸钠。

图 4 5 种食品添加剂对摩拉维亚假单胞菌 SM-T1 的抑菌曲线

Fig.4 Antimicrobial kinetic curves of 5 food additives against *P. moraviensis* SM-T1

山苍子精油具有良好的抗菌和抗氧化功效, 在冷藏大菱鲆和大黄鱼保鲜中已显示良好效果^[15]。将山苍子精油与聚赖氨酸组合使用, 有望扩展其抑菌谱, 并解决单用精油难以控制水产品中致腐性假单胞菌的难题。此外, 联用后还能减少山苍子精油的使用剂量, 避免精油挥发性气味对产品感官接受性带来的影响。值得提出的是, 聚赖氨酸与壳聚糖、海藻酸钠等形成聚合物后具有良好的成膜性能^[31,32], 将精油和聚赖氨酸组合对水产品进行涂膜保鲜不失为一种可行保鲜方法。

4 结 论

本研究通过气质联用法从山苍子精油中检测出 16 种单体化合物, 主要成分为柠檬醛, 相对含量为 62.7%。天然防腐剂聚赖氨酸和柠檬酸对冷藏水产品优势腐败菌希瓦氏菌和假单胞菌具有显著抑制作用, 最小抑菌浓度分别为 0.5、2 mg/mL。将山苍子精油与聚赖氨酸联合使用具有相加效应, 能有效扩大精油抑菌范围并减少其使用剂量, 解决了单用精油难以控制水产品中致腐性假单胞菌的问题, 并避免了精油挥发性气味所带来的感官接受性降低问题, 为冷藏水产品绿色贮藏保鲜提供了新思路。

表 2 山苍子精油与聚赖氨酸的联合抑菌效果
Table 2 Combined antimicrobial effect of *Litsea cubeba* essential oil and polylysine

受试菌株	最小抑菌浓度($\mu\text{L}/\text{mL}$ 或 mg/mL)				分级抑菌浓度指数 (FIC_i)
	山苍子精油		聚赖氨酸		
	单用(MIC_E)	联用(MIC_{E+P})	单用(MIC_P)	联用(MIC_{P+E})	
腐败希瓦氏菌 SM-R2	2	1	0.25	0.125	1
莓实假单胞菌 SM-R1	>4	4	0.25	0.25	$1 < FIC_i < 2$
摩拉维亚假单胞菌 SM-T1	>4	2	0.25	0.125	$0.5 < FIC_i \leq 1$

表 3 山苍子精油与柠檬酸的联合抑菌效果
Table 3 Combined antimicrobial effect of *Litsea cubeba* essential oil and citric acid

受试菌株	最小抑菌浓度($\mu\text{L}/\text{mL}$ 或 mg/mL)				分级抑菌浓度指数 (FIC_i)
	山苍子精油		柠檬酸		
	单用(MIC_E)	联用(MIC_{E+P})	单用(MIC_P)	联用(MIC_{P+E})	
腐败希瓦氏菌 SM-R2	2	2	2	2	2
莓实假单胞菌 SM-R1	>4	4	2	2	$1 < FIC_i < 2$
摩拉维亚假单胞菌 SM-T1	>4	4	2	2	$1 < FIC_i < 2$

参考文献

- [1] Lone, Gram, Paw, *et al.* Fish spoilage bacteria--problems and solutions [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 262-266.
- [2] Liu X, Zhang Y, Li D, *et al.* Characterization of the microbiota in lightly salted bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 °C [J]. *Food Microbiol*, 2017, 62: 106-111.
- [3] 郭全友, 修艳辉, 王鲁民, 等. 鱼源莓实假单胞菌生长动力学与碳源利用分析[J]. *农业机械学报*, 2017, (6): 324-332.
Guo QY, Xiu YH, Wang LM, *et al.* Growth kinetics and carbon utilization analysis of *Pseudomonas fragi* from fish [J]. *Transact Chin Soc Agric Mach*, 2017, (6): 324-332.
- [4] Parlapani FF, Verdos GI, Haroutounian SA, *et al.* The dynamics of *Pseudomonas* and volatiliome during the spoilage of gutted sea bream stored at 2°C [J]. *Food Control*, 2015, 55: 257-265.
- [5] Wang XY, Xie J. Assessment of metabolic changes in *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* co-culture from bigeye tuna (*Thunnus obesus*) spoilage by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 123: 109073.
- [6] Xie J, Zhang Z, Yang SP, *et al.* Study on the spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* on salmon stored at different temperatures [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55: 217-225.
- [7] Li T, Yang B, Li X, *et al.* Quorum sensing system and influence on food spoilage in *Pseudomonas fluorescens* from turbot [J]. *J Food Sci Technol*, 2018, 55: 3016-3025.
- [8] Ozogul Y, Yuvka, Ucar Y, *et al.* Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage [J]. *LWT*, 2017, 75: 677-684.
- [9] Zhang Y, Li D, Lv J, *et al.* Effect of cinnamon essential oil on bacterial diversity and shelf-life in vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated storage [J]. *Int J Food Microbiol*, 2017, 249: 1-8.

- [10] 孟玉霞, 崔惠敬, 赵前程, 等. 植物精油对冷藏大黄鱼优势腐败菌的抑制作用及其机制[J]. 水产学报, 2018, 42: 1140–1153.
Meng YX, Cui HJ, Zhao QC, *et al.* Antimicrobial effects and mechanism of action of essential oils against dominant spoilage bacteria isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) during chilled storage [J]. J Fisher China, 2018, 42: 1140–1153.
- [11] Tariq S, Wani S, Rasool W, *et al.* A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens [J]. Microb Pathogen, 2019, 134: 103580.
- [12] Maswal M, Dar AA. Formulation challenges in encapsulation and delivery of citral for improved food quality [J]. Food Hydrocoll, 2014, 37: 182–195.
- [13] Wan J, Wilcock A, Coventry MJ. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* [J]. J Appl Microbiol, 1998, 84: 152–158.
- [14] Kačániová M, Terentjeva M, Vukovic N, *et al.* The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas spp.* isolated from fish [J]. Saudi Pharm J, 2017, 25: 1108–1116.
- [15] 孟玉霞. 天然植物精油对冷藏海水养殖鱼类特定腐败菌的抑制作用及保鲜效果研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2018.
Meng YX. Study on the inhibitive effect of natural plant essential oil on the specific spoilage bacteria and the fresh-keeping effect of refrigerated mariculture fish [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018.
- [16] Othman M, Loh HS, Wiart C, *et al.* Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts [J]. J Microbiol Methods, 2011, 84(2): 161–166.
- [17] Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients [J]. Int J Food Microbiol, 2008, 124(1): 91–97.
- [18] 周欣, 莫彬彬. 黔产山苍子油化学成分的气相色谱/质谱分析[J]. 贵州大学学报(自然科学版), 2001, (1): 45–47.
Zhou X, Mo BB. Analysis of the chemical constituents of *Litsea cubeba* oil from Guizhou province by gas chromatography/mass spectrometry [J]. J Guizhou Univ(Nat Sci Ed), 2001, (1): 45–47.
- [19] 付红军. 微波对山苍子油化学成分的影响及其抑菌活性研究[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 65–69.
Fu HJ. Study on the effect of microwave on the chemical composition and antibacterial activity of *Litsea cubeba* oil [J]. Food Sci, 2016, 37(17): 65–69.
- [20] GB 2760-2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S].
GB 2760-2014 National food safety standard- Standard for uses of food additives [S].
- [21] Yoshida T, Nagasawa T. ϵ -Poly-L-lysine: Microbial production, biodegradation and application potential [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(1): 21–26.
- [22] Hyltdgaard, Morten, Sigmundsson, *et al.* Binary combination of epsilon-poly-L-lysine and isoeugenol affect progression of spoilage microbiota in fresh turkey meat, and delay onset of spoilage in *Pseudomonas putida* challenged meat [J]. Int J Food Microbiol, 2015, 215(1): 131–142.
- [23] 王军华, 王易芬, 裴纪莹, 等. ϵ -聚赖氨酸对牡蛎的防腐抗菌效果[J]. 食品工业科技, 2019, 40(24): 270–275.
Wang JH, Wang YF, Qiu JY, *et al.* The antiseptic and antibacterial effect of ϵ -polylysine on oyster [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(24): 270–275.
- [24] 张海燕, 吴燕燕, 杨少玲, 等. 聚赖氨酸与魔芋葡甘聚糖复配对海鲈鱼片的保鲜效果[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(24): 202–208.
Zhang HY, Wu YY, Yang SL, *et al.* Fresh keeping effect of polylysine and konjac glucomannan on sea bass fillet [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(24): 202–208.
- [25] 郑玉秀, 周斌, 王明, 等. 复合保鲜剂对美国红鱼调理鱼片贮藏品质的影响[J]. 现代食品科技, 2019, 35(6): 191–199.
Zheng YX, Zhou B, Wang M, *et al.* Effect of compound preservatives on the storage quality of American red fish fillet [J]. Mod Food Sci Technol, 2019, 35(6): 191–199.
- [26] 侯佳启, 林敏, 周亚彬, 等. 柠檬酸和氯化钠抑制地衣芽孢杆菌生物膜的研究[J]. 中国酿造, 2017, (7): 110–130.
Hou JQ, Lin M, Zhou YB, *et al.* Inhibition of *Bacillus licheniformis* biofilm by citric acid and sodium chloride [J]. China Brew, 2017, (7): 110–130.
- [27] 李南薇, 刘佳, 刘锐, 等. 32 种食品添加剂对蜡样芽孢杆菌的协同抑菌作用[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 138–142.
Li NW, Liu J, Liu R, *et al.* Synergism of 32 food additives on *Bacillus cereus* [J]. J Chin Instit Food Sci Technol, 2015, 15(2): 138–142.
- [28] 陈晓, 柳艳霞, 魏法山, 等. 防腐剂对地衣芽孢杆菌的抑制效果[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 89–91.
Chen X, Liu YX, Wei FS, *et al.* Inhibitory effect of preservatives on *Bacillus licheniformis* [J]. Food Sci, 2012, 33(3): 89–91.
- [29] Mélanie T, Vu KD, Dupont C, *et al.* Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria [J]. Food Res Int, 2012, 48(2): 696–702.
- [30] 张皓然, 刘金松, 张玲玲, 等. 植物精油与有机酸的抑菌效果及协同作用研究[J]. 饲料工业, 2018, (18): 48–52.
Zhang HR, Liu JS, Zhang LL, *et al.* Study on bacteriostatic effect and synergism of essential oil and organic acid [J]. Feed Ind, 2018, (18): 48–52.
- [31] Li YN, Ye QQ, Hou WF, *et al.* Development of antibacterial ϵ -polylysine/chitosan hybrid films and the effect on citrus [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 118(2): 2051–2056.
- [32] Cai LY, Cao AL, Bai FL, *et al.* Effect of ϵ -polylysine in combination with alginate coating treatment on physicochemical and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) during refrigerated storage [J]. LWT-Food Sci Technol, 2015, 62(2): 1053–1059.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

马子祯, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。
E-mail: 861531259@qq.com

马永生, 博士, 主要研究方向为水产品加工与贮藏。
E-mail: mayo@dlou.edu.cn