

食品流通与包装

原位合成纳米 SiO_x /LZM/TP-CS 涂膜对腐败希瓦氏菌的抑菌机理

张家涛¹, 武娇¹, 杨华¹, 王红雨², 徐赵萌¹, 孙彤¹

(1.渤海大学 a.食品科学与工程学院 b.生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心, 辽宁 锦州 121013; 2.锦州市检验检测认证中心, 辽宁 锦州 121000)

摘要: **目的** 为拓展壳聚糖 (CS) 保鲜涂膜在水产品中的应用, 并为水产品保鲜机制的研究提供理论支持。**方法** 以原位合成纳米 SiO_x 改性的 CS 为成膜基质, 以溶菌酶 (LZM) 和茶多酚 (TP) 为添加剂, 采用流延法制备复合保鲜涂膜。以水产品中优势腐败菌——腐败希瓦氏菌为抑菌对象, 研究涂膜的抑菌性能, 用扫描电子显微镜 (SEM) 观测复合保鲜涂膜处理前后菌体的微观形貌变化, 测定复合保鲜涂膜处理一定时间后菌悬液的电导率、 OD_{260} 值、 Na^+/K^+ -ATP 酶和 AKP 酶活性的变化。**结果** 各涂膜均表现出了抑菌性能, 涂膜处理后菌体变形, 且其菌悬液的电导率、 OD_{260} 值、 Na^+/K^+ -ATP 酶和 AKP 酶活性明显高于同期未处理样品。CS 经纳米 SiO_x 改性后, 涂膜的抑菌性能略有提高, 菌体多处塌陷, 菌悬液电导率、 OD_{260} 值、 Na^+/K^+ -ATP 酶和 AKP 酶活性显著增加; 继续加入 LZM 或 TP 后, 涂膜的抑菌性能继续提高, 且原位合成纳米 SiO_x /TP-CS 涂膜抑菌性能更优。LZM 和 TP 同时加入经纳米 SiO_x 改性的 CS 涂膜中后, 复合涂膜处理的菌体细胞壁溶解, 损伤严重, 同期处理的菌悬液电导率、 OD_{260} 值最高, 并对 Na^+/K^+ -ATP 酶、AKP 酶活性有抑制作用。**结论** 结合前期的研究结果, SiO_x /LZM/TP-CS 复合保鲜涂膜具有良好的保鲜、抑菌性能, 可为可食性保鲜涂膜的应用提供理论指导和技术支持。

关键词: 复合保鲜涂膜; 腐败希瓦氏菌; 抑菌机理

中图分类号: TS206.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-3563(2021)23-0076-08

DOI: 10.19554/j.cnki.1001-3563.2021.23.011

Antibacterial Mechanism of the *In-Situ* Synthesis of Nano- SiO_x /LZM/TP-CS Composite Coatings against *Shewanella Putrefaciens*

ZHANG Jia-tao¹, WU Jiao¹, YANG Hua¹, WANG Hong-yu², XU Zhao-meng¹, SUN Tong¹

(1a.College of Food Science and Technology b.National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Bohai University, Jinzhou 121013, China; 2.Jinzhou Inspection, Examination & Certification Centre, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT: The work aims to expand the use of chitosan (CS) in preservative coatings and provide theoretical support for research of aquatic product preservation mechanism. With chitosan (CS) modified by *in-situ* synthesis of nano- SiO_x as the film-forming matrix, and lysozyme (LZM) and tea polyphenols (TP) as additives, the *in-situ* synthesis of nano- SiO_x /LZM/TP-CS composite coatings was prepared by the tape-casting method. *Shewanella putrefaciens*, one domi-

收稿日期: 2021-04-14

基金项目: 辽宁省一流学科专项资金 (LSPBD20304, LSPBD20310)

作者简介: 张家涛 (1994—), 男, 渤海大学硕士生, 主攻水产品贮藏保鲜。

通信作者: 孙彤 (1966—), 女, 博士, 渤海大学教授, 主要研究方向为水产品贮藏保鲜。

nant spoilage bacteria of aquatic products, was used as the antibacterial object to study the antibacterial properties of the coatings. Scanning electron microscope (SEM) was used to observe the changes of the micro morphology of the bacteria before and after being treated by the composite preservative coatings. The changes of conductivities, OD_{260} , Na^+/K^+ -ATPase and AKP enzyme activities of the bacterial suspension treated by the composite preservative coatings for a certain time were determined. The results showed that all the coatings exhibited antibacterial properties. The bacteria deformed after being treated by the coatings, and the conductivity, OD_{260} , Na^+/K^+ -ATPase and AKP enzyme activities of the bacterial suspension were significantly higher than those of the untreated samples during the same period. After CS was modified by nano- SiO_x , the antibacterial property of the coatings was slightly improved, the bacteria collapsed in many places, and the conductivity, OD_{260} , Na^+/K^+ -ATPase and AKP enzyme activities of bacterial suspension were significantly increased. After adding LZM or TP, the antibacterial properties of the coatings continued to improve, and the antibacterial properties of the *in-situ* synthesis of nano- SiO_x /TP-CS composite coatings were better. When LZM and TP were added to CS coating modified by nano- SiO_x at the same time, the cell wall was dissolved and seriously damaged. The conductivity and OD_{260} of the bacterial suspension treated at the same time were the highest, and even the Na^+/K^+ -ATPase and AKP enzyme activities were inhibited. Combined with previous research results, SiO_x /LZM/TP-CS composite preservative coatings have good preservative and antibacterial properties, which can provide theoretical guidance and technical support for the application of edible preservative coatings.

KEY WORDS: composite preservative coatings; *Shewanella putrefaciens*; antibacterial mechanism

涂膜保鲜技术是应对水产品死后腐败变质的有效策略^[1-3]。涂膜材料无毒、无害且具有成膜性能。壳聚糖 (Chitosan, CS) 是常用的成膜材料之一, CS 涂膜具有良好的阻隔性和广谱抑菌性, 可减缓水产品的腐败速度^[4-6]。单一的壳聚糖涂膜具有力学性能和保湿性能较差、抑菌谱较窄、抗氧化能力较弱的弊端^[7]。笔者团队采用原位合成纳米 SiO_x 对 CS 涂膜进行改性, 研究发现, 原位合成纳米 SiO_x 可显著改善单一 CS 涂膜的理化性能, 并提高 CS 涂膜的保鲜性能和抗菌性能^[8-10]。涂膜的保鲜性能仍有待进一步提高。

溶菌酶 (Lysozyme, LZM) 是一种无毒无害的天然亲水性蛋白质, 具有一定的溶菌作用, 可抑制细菌的生长, 从而延长食品的保质期^[11-12]。茶多酚 (Tea polyphenols, TP) 是茶叶中多酚类物质的总称, 可用作食品保鲜剂和抗氧化剂^[13-14]。通过栅栏理论应用, 表明 TP 和 LZM 复配可产生协同增效作用^[15-16]。TP-LZM 复合保鲜剂已被添加到水产品保鲜涂膜中, 以提高涂膜的抑菌活性^[1,17]。为改善原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜的抗菌性能, 在前期工作中已采用 TP 和 LZM 改性原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜, 使涂膜的拉伸强度和断裂伸长率增加, 同时提高了复合涂膜对冷藏海鲈鱼鱼片的保鲜性能, 使其货架期延长 9~10 d^[18]。

腐败希瓦氏菌 (*Shewanella putrefaciens*) 是弧菌科 (*Vibrionaceae*) 希瓦氏菌属的革兰氏阴性杆菌, 为运动杆菌, 致腐潜力大, 对蛋白质具有较强的分解能力, 并代谢产生硫化氢和胺类物质^[19]。研究表明, 腐败希瓦氏菌是水产品的优势腐败菌之一^[20]。原位合

成纳米 SiO_x /LZM/TP-CS 复合涂膜具有优异的保鲜性能的原因之一是涂膜可抑制海鲈鱼鱼片冷藏期间菌落总数的增长^[18]。涂膜对腐败希瓦氏菌的抑菌机制并不清楚。

文中利用前期的研究成果^[18], 进一步揭示原位合成纳米 SiO_x /LZM/TP-CS 复合保鲜涂膜对鲈鱼优势腐败菌——腐败希瓦氏菌的抗菌性能和机理。此研究可拓展 CS 保鲜涂膜在水产品中的应用, 并为水产品保鲜机制的研究提供支持。

1 实验

1.1 材料和试剂

主要材料和试剂: 腐败希瓦氏菌 (ATCC 8071), 渤海大学食品安全实验室保存; CS, 食品级, 脱乙酰率 $\geq 95\%$, 上海晶纯试剂有限公司; TP, 食品级, 纯度 $> 98\%$, 安徽红星药业有限公司; LZM, Sigma aldrich 公司; 超微量 Na^+/K^+ -ATP 酶测定试剂盒、碱性磷酸酶 (AKPase) 测定试剂盒、考马斯亮蓝试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为分析纯; 去离子水, 电导率 $< 15 \mu\text{S}/\text{cm}$, 实验室自制。

1.2 仪器和设备

主要仪器和设备: MS-105DU 电子分析天平, 瑞士梅特勒托利多仪器有限公司; DF-II 集热式磁力加热搅拌器, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; LRH-150 生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; MLS-3030CH 立式高压灭菌锅, 三洋电机(广州)有限公司; Victor X3 酶标仪, 上海珀金埃尔默仪器有限

公司; X1R 高速冷冻离心机、Legend Micro21R 台式微量离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; THZ-D 台式恒温振荡箱, 太仓市实验设备厂; S-4800 型场发射扫描电镜, 日本日立; Jem-2100F 场发射透射电子显微镜, 日本电子株式会社; FE38-Meter 电导率仪, METTLER TOLEDO 公司; SCIENTIA-IID 超声波细胞粉碎器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; UV-2000 紫外-可见分光光度计, 尤尼柯仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 复合保鲜涂膜制备

参考先前的方法制备原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{LZM}/\text{TP-CS}$ 复合涂膜^[18]。称取 1.5 g/L 的 CS 溶于 1.0% (体积分数) 的冰乙酸和 0.1% (体积分数) 甘油的混合溶液中, 在 50 °C 下磁力搅拌至 CS 完全溶解, 制得 CS 涂膜液。在搅拌条件下, 向 2 mol/L 盐酸溶液中滴加 1 mol/L 硅酸钠溶液至 pH=4~5, 得淡蓝色酸性硅溶胶。滴加 0.015 g 硅溶胶和 0.03 mL 质量分数为 1% 的十二烷基苯磺酸钠溶液至 100.0 mL 上述 CS 涂膜液中, 并添加 0.15 g 的 LZM 和 0.25 g 的 TP。溶液超声脱气 10 min 后, 取 40.0 mL 涂膜溶液在 20 cm×20 cm 亚克力板上流延成膜, 于生化培养箱中 30 °C 恒温干燥 24 h, 揭膜, 制得原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{LZM}/\text{TP-CS}$ 复合涂膜。采用该方法, 不加 TP, 加入 0.3 g 的 LZM, 制备原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{LZM-CS}$ 复合涂膜; 不加 LZM, 加入 0.5 g 的 TP, 制备原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{TP-CS}$ 复合涂膜; 不加 TP 和 LZM, 制备原位合成纳米 $\text{SiO}_x\text{-CS}$ 复合涂膜; 不加酸性硅溶胶、TP 和 LZM, 制备 CS 涂膜。

1.3.2 抗菌性能测定

参考 Zhang 等^[17]的处理方法, 采用滤纸片法测定复合涂膜的抑菌性能。

1.3.3 抗菌机理

1) 菌体微观形貌观察。参照 Zhang 等^[17]的方法, 测定涂膜处理前后菌体的扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 图像。

2) 细胞膜通透性测定。参考 Zhang 等^[17]的方法并略有改动, 测定腐败希瓦氏菌细胞膜通透性。每隔 10 min 测定 1 次各涂膜处理前后菌悬液的电导率, 至达到平衡。

3) 细胞膜完整性测定。为了评估腐败希瓦氏菌细胞膜的完整性, 参考 Wei 等^[21]的方法测定 CS 或其复合涂膜处理后细菌悬浮液的 OD_{260} 值。

4) 菌体 AKP、ATP 酶活性测定。为了评估复合涂膜对腐败希瓦氏菌 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATP}$ 酶和 ATPase 活性的影响, 参考 Yang 等^[22]的方法对细菌悬浮液进行预处理, 然后采用超微量 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATP}$ 酶测定试剂盒和

AKPase 测定试剂盒测定 AKP 和 ATPase 活性。

1.3.4 数据处理

结果用 3 次测定结果的平均值±标准偏差表示, 使用 Origin 8.5 (Origin Lab 公司) 软件绘图, 使用 SPSS19.0 (IBM 公司) 软件进行单因素方差分析, Duncan 多重比较法进行差异显著性分析。

2 结果和讨论

2.1 复合涂膜的抗菌性能

由表 1 可见, 各复合涂膜对腐败希瓦氏菌的抑菌性能存在显著差异 ($P<0.05$)。CS 复合涂膜的抑菌圈直径均大于单一 CS 涂膜。CS 涂膜经原位合成纳米 SiO_x 改性后, 其抗菌性能略有提高。继续加入 LZM 后, 涂膜的抗菌性能继续提高。加入 TP 后, 涂膜的抗菌性能显著高于原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{LZM-CS}$ 复合涂膜。同时复合 LZM 和 TP 后, 复合涂膜的抗菌性能与原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{TP-CS}$ 复合涂膜无显著性差异。

表 1 复合涂膜的抑菌圈直径
Tab.1 Inhibitory zone diameter of the composite coatings

涂膜种类	抑菌圈直径/mm
CS 涂膜	7.09±0.39 ^c
原位合成纳米 $\text{SiO}_x\text{-CS}$ 涂膜	8.79±0.89 ^{bc}
原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{LZM-CS}$ 涂膜	10.62±0.65 ^b
原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{TP-CS}$ 涂膜	17.80±1.64 ^a
原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{LZM}/\text{TP-CS}$ 涂膜	18.76±1.34 ^a

注: 不同字母表示不同处理组之间差异显著 ($P<0.05$)

2.2 复合涂膜抗菌机理分析

2.2.1 复合涂膜对菌体微观形貌的影响

不同涂膜处理前后腐败希瓦氏菌的微观形貌见图 1。由图 1a 可知, 未经涂膜处理的菌体完整, 表面光滑且饱满度良好。由图 1b 可知, 经 CS 涂膜处理后, 菌体出现明显变形, 且有部分凹陷。分析认为, CS 分子中的 $-\text{NH}_2$ 质子化形成 $-\text{NH}_3^+$ 后, 与菌体细胞膜表面带负电的阴离子结合, 从而破坏了细胞膜的完整性, 造成菌体凹陷, 抑制了细菌的生长和繁殖。由图 1c 可知, 经原位合成纳米 $\text{SiO}_x\text{-CS}$ 涂膜处理后, 腐败希瓦氏菌菌体多处塌陷, 表面粗糙, 出现褶皱, 说明此时细胞完整性遭到破坏, 导致细菌的死亡。当原位合成纳米 SiO_x 与 CS 中的活性基团发生键合后, 改善了涂膜的理化性能, 使涂膜形成后的有序性增强, CS 分子中质子化形成的 $-\text{NH}_3^+$ 与菌体表面带负电荷的阴离子结合能力增强, 表现出更强的抗菌性能, 这与 Sun 等^[8]的研究结果一致。由图 1d 可知,

当向原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜中加入 LZM 后, 菌体塌陷严重, 饱满性较差。分析认为, LZM 具有胞壁质酶和阳离子抗菌肽活性, 能水解 β -1,4 糖苷键, 当其作用于菌体后, 会干扰细菌的生长和繁殖, 严重时会导致菌体的内容物泄漏^[23]。TP 是一种多酚基及多环结构的物质, 对蛋白质和核酸具有较好的亲和力, 当其作用于菌体时, 其主要成分儿茶素等通过破坏磷脂层结构, 使细菌内部物质外泄, 降低细胞的完整性, 从而影响细菌的新陈代谢^[24]。经原位合成纳米 SiO_x /TP-CS 涂膜处理后的菌体表面粗糙, 凹陷明显, 细胞壁膜溶解导致内部物质泄露。经原位合成纳米 SiO_x /LZM/TP-CS 涂膜处理后的菌体形貌见图 1f, 此时菌体细胞壁溶解, 损伤严重。分析认为, 当 LZM 和 TP 复配后, 两者具有协同抗菌作用, 对菌体破坏程度较大。此前 Zhang 等^[17]也报道了 TP/LZM-聚乙烯醇涂膜处理的腐败希瓦氏菌比 TP-聚乙烯醇涂膜处理的样品损伤更严重。

当细菌处于危害自身的环境中时, 细菌的结构和微观形态会发生变化甚至被破坏, 从而影响细胞功能。未处理的细菌结构完整, 致密饱满, 无损伤 (图 2a)。经 CS 涂膜处理后, 细菌内部结构改变, 细胞质流失, 内容物分布不均匀, 出现低密度空白 (图 2b)。当原位合成纳米 SiO_x 加入到 CS 涂膜中后, 菌体细胞内细胞质流失较多且结构松散 (图 2c)。由图 2d—e 可知, 原位合成纳米 SiO_x 涂膜中加入 LZM 或 TP 后, 细菌的中间凹陷更严重, 细胞质向细胞膜一侧聚集, 胞内出现高密度空白, 存在质壁分离现象。原位合成纳米 SiO_x /LZM/TP-CS 涂膜处理的菌体仍出现质壁分离, 胞内出现高密度空白, 细胞壁部分被分解且边缘

模糊 (图 2f)。这说明 LZM 与 TP 具有协同抗菌的功效, 对菌体结构损伤能力加强, 与 SEM 结果一致。

2.2.2 复合涂膜对腐败希瓦氏菌细胞膜通透性和完整性的影响

当细菌细胞膜遭受抗菌剂破坏时, 内部电解质首先泄露, 可根据细菌培养液的电导率判断菌体细胞膜通透性的变化情况。由图 3a 可知, 在涂膜处理前期, 菌悬液的电导率迅速增加, 随着作用时间的延长, 电导率的增加趋势减缓, 至达到平衡。经涂膜处理后, 菌悬液的电导率显著高于同期未经涂膜处理的菌悬液, 说明涂膜可破坏菌体的细胞膜结构, 使之产生微孔, 导致菌体内部电解质渗透到细胞外, 从而使细胞膜流动性降低, 菌悬液电导率升高。在整个处理过程中, 经原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜处理的菌悬液电导率高于经 CS 涂膜处理的样品, 经原位合成纳米 SiO_x /LZM-CS 涂膜处理后, 菌悬液的电导率进一步提高, 经原位合成纳米 SiO_x /TP-CS 涂膜处理后, 菌悬液的电导率又升高。当 LZM 和 TP 同时加入原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜中时, 经其处理后, 菌悬液的电导率最高。此前, 杨丽丽^[4]也发现了与 TP 脂质体-CS 涂膜相比, TP 脂质体/LZM-CS 复合涂膜处理后的腐败希瓦氏菌悬液电导率更高。

DNA 和 RNA 在 260 nm 处具有强吸收值, 可通过测定 260 nm 处吸光物质的量确定细菌细胞膜的完整性^[25]。复合涂膜处理前后腐败希瓦氏菌悬液在 260 nm 处的吸光值变化情况见图 3b。在涂膜处理前期, 菌悬液的 OD_{260} 值迅速升高, 随着处理时间的延长, 菌悬液的 OD_{260} 值增加缓慢, 3 h 后基本达到平衡。

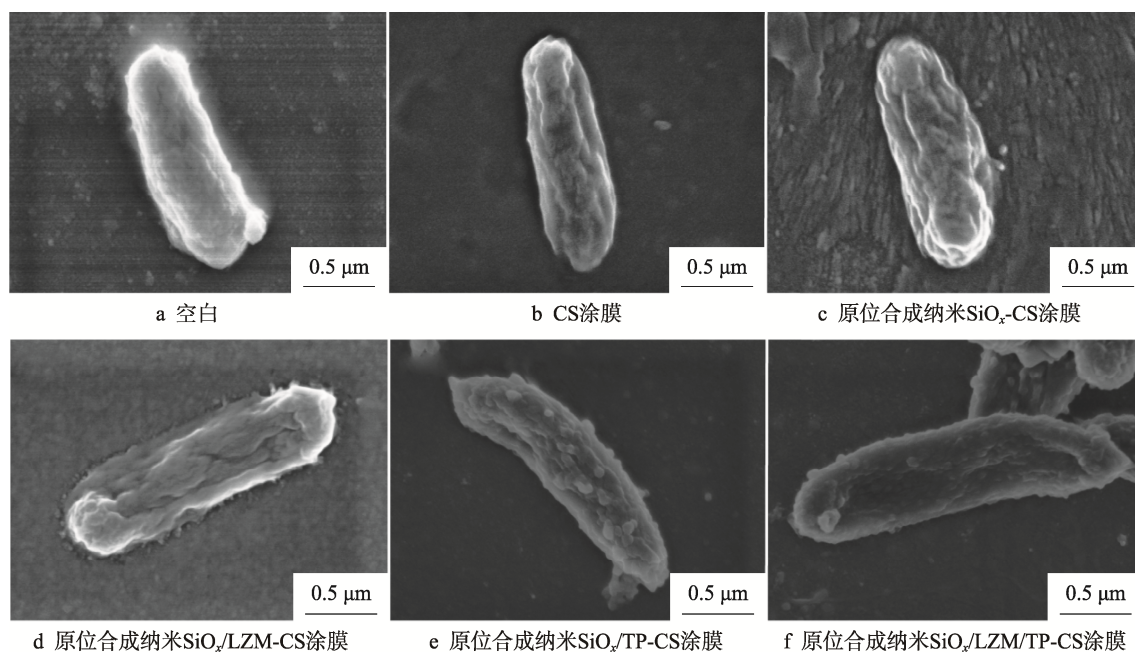


图 1 不同涂膜处理前后腐败希瓦氏菌的 SEM

Fig.1 SEM images of *S. putrefaciens* before and after being treated by different coatings

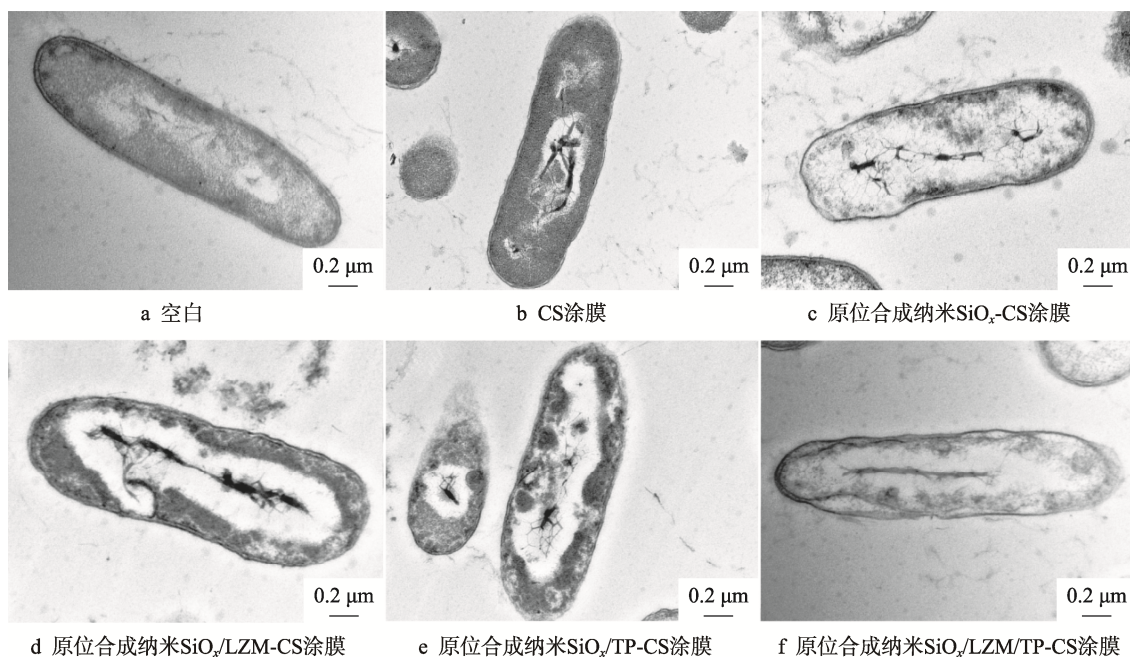


图2 不同涂膜处理前后腐败希瓦氏菌的TEM

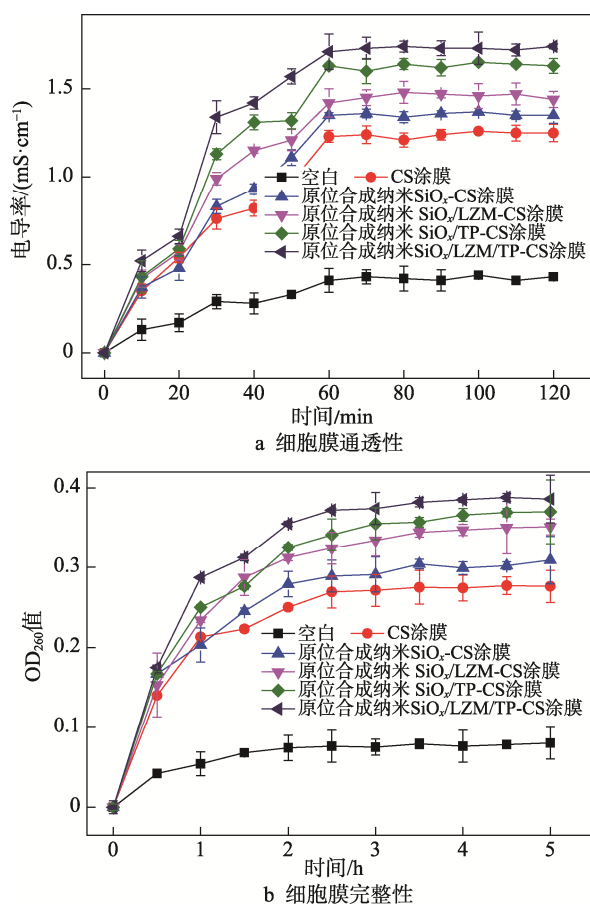
Fig.2 TEM images of *S. putrefaciens* before and after being treated by different coatings

图3 复合涂膜处理前后腐败希瓦氏菌的变化

Fig.3 Changes of *S. putrefaciens* before and after being treated by the composite coatings

其中未经涂膜处理的菌悬液 OD_{260} 值始终处于较低水平。经涂膜处理后, 菌悬液的 OD_{260} 值显著高于

同期未经涂膜处理的样品, 说明菌体经复合涂膜处理后其细胞膜完整性被破坏, 体内大分子物质泄露到细胞外。3 h 后, 经 CS 涂膜、原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜、原位合成纳米 SiO_x /LZM-CS 涂膜、原位合成纳米 SiO_x /TP-CS 涂膜和原位合成纳米 SiO_x /LZM/TP-CS 涂膜处理的菌悬液 OD_{260} 值依次增加。

分析认为, CS 与纳米 SiO_x 的活性基团发生键合作用, 通过改善涂膜的理化性能增强涂膜形成后的有序性, 使 CS 的质子化 NH_3^+ 更有效地作用于细菌表面, 从而表现出更强的抗菌性能, 对细胞膜破坏程度增加, 有利于细胞内电解质和大分子物质泄露, 导致菌悬液的电导率和 OD_{260} 值升高。涂膜中加入 LZM 后, 对细菌细胞内外膜的破坏性增强, 这可能是由于 LZM 的胞壁质酶水解细胞壁肽聚层 β -1,4 糖苷键, 在 CS 破坏菌体细胞壁和细胞膜的基础上进一步破坏了细胞壁的完整性, 使菌体内的 DNA 和 RNA 等物质大分子泄露, 流失增加。涂膜中加入 TP 后, 因 TP 具有抗氧化性, 其含有大量的酚羟基可与细胞膜上的羟基结合, 直接吸附于细胞, 打破了菌体的保护屏障, 使细胞膜破损, 完整性遭到破坏, 故其电导率和 OD_{260} 值有所升高。当 LZM 与 TP 复配时, LZM 首先通过水解 β -1,4 糖苷键来破坏细菌细胞壁内层的肽聚糖, 使细胞壁松弛, 失去保护细胞的功效, 导致菌体破坏, 然后 TP 作用于细菌细胞膜的脂质层, 导致电解质泄露, 菌体进一步被破坏, 两者共同作用, 协同抗菌, 加速了菌体细胞内电解质和大分子物质泄漏, 此时菌悬液的电导率和 OD_{260} 值最高。这与 SEM 表征结果一致。

2.2.3 复合涂膜对腐败希瓦氏菌 AKP 和 ATP 酶活性的影响

处于胞内的 AKP 和 ATP 酶会因菌体细胞膜被破坏释放到菌悬液中, 检测 2 种酶的活力可间接反映细胞壁和细胞膜通透性的变化。复合涂膜对腐败希瓦氏菌 AKP 酶活性的影响见图 4a。与未经处理的腐败希瓦氏菌 AKP 酶活性相比, 经复合涂膜处理后的 AKP 酶活性均显著提高。与经 CS 涂膜处理的菌悬液相比, 经原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜处理后, 其 AKP 酶活性升高, 说明后者对菌体的破坏能力更强。

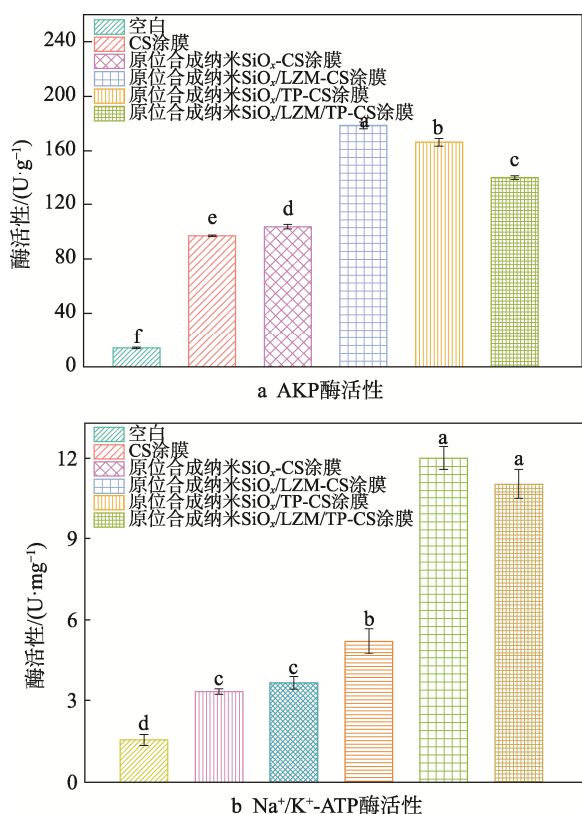


图 4 复合涂膜处理前后腐败希瓦氏菌变化
Fig.4 Changes of *S. putrefaciens* before and after being treated by the composite coatings

当涂膜中继续加入 LZM 或 TP 后, AKP 酶活性显著升高。二者相比, 经原位合成纳米 SiO_x/LZM -CS 涂膜处理后, AKP 酶活性高于原位合成纳米 SiO_x/TP -CS 涂膜。分析认为, LZM 的加入对细菌的破坏极为严重, 使细胞内 AKP 酶的流失较多, 影响菌体正常的生长繁殖。由前期的菌体微观形貌观察、细胞膜电导率和通透性的研究结果可知, TP 具有广谱抗菌性, 可使涂膜的抗菌性能进一步增强, 该项实验结果表示 TP 的加入导致 AKP 酶活性降低。由此可认为, 当涂膜中加入 TP 后, TP 除了可使细菌细胞膜遭到破坏, 导致酶释放到菌悬液之外, 同时对 AKP 酶活性还具有抑制作用, 这与仪淑敏^[26]的研究结构一致。当 LZM 和 TP 同时加入涂膜中后, 菌悬液内 AKP

酶的活性与原位合成纳米 SiO_x/LZM -CS 涂膜和原位合成纳米 SiO_x/TP -CS 涂膜处理样品相比略有降低, 说明在抑制 AKP 酶活性方面, TP 和 LZM 具有协同增效作用。

复合涂膜作用前后腐败希瓦氏菌 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的变化情况见图 4b。 Na^+/K^+ -ATP 酶是一种蛋白酶, 其在生物膜的物质运输、能量转换等方面具有重要作用。与未处理的腐败希瓦氏菌相比, 涂膜处理后菌悬液的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性均显著提高, 说明涂膜破坏了菌体细胞膜, 导致 Na^+/K^+ -ATP 酶释放进入菌悬液。经原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜处理后, ATP 酶活性略高于经 CS 涂膜处理样品, 无显著性差异。涂膜内加入 LZM 后, 菌悬液中 Na^+/K^+ -ATP 酶活性继续增加, 这是由于 LZM 破坏了细胞膜, 使 ATP 酶溢出。涂膜中加入 TP 后, 菌悬液中的 Na^+/K^+ -ATP 酶活性最高, 分析认为, 与 LZM 相比, TP 加入原位合成纳米 SiO_x -CS 涂膜后, 涂膜可显著增加菌体细胞膜的通透性, 破坏细胞膜的完整性, 使 ATP 酶大量溢出。与原位合成纳米 SiO_x/TP -CS 涂膜处理样品相比, 采用原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{TP}/\text{LZM}$ -CS 涂膜处理后的菌悬液 Na^+/K^+ -ATP 酶活性并未增加。此前, 王明等^[12]报道了丁香酚与乳酸或生物级别的溶菌酶复配后, 可显著抑制腐败希瓦氏菌 ATP 酶活性。ATP 酶无显著性差异的原因可能是由于 CS、原位合成纳米 SiO_x 、LZM、TP 这 4 种成分相互作用, 破坏了菌体的完整性, 同时抑制了 Na^+/K^+ -ATP 酶的活性。

3 结语

CS 涂膜对腐败希瓦氏菌有抑菌性能, 在 CS 涂膜中加入原位合成纳米 SiO_x 后使涂膜的有序性增强, 进一步增加了涂膜的抑菌活性。继续添加 LZM 或 TP 可提高涂膜的抑菌活性, 此时菌体细胞膜通透性增强, 完整性降低, AKP 酶和 Na^+/K^+ -ATP 酶大量释放, 其中原位合成纳米 SiO_x/TP -CS 的抑菌性能更优, 对细胞膜的破坏程度更大, 甚至对菌体 AKP 酶活性产生抑制作用。当 LZM 与 TP 复合时, 表现出协同效应, 使涂膜对菌体细胞膜完整性的破坏程度最大, 显著增加了细胞膜的通透性, 进一步抑制了菌体的 AKP 酶活性, 甚至对 Na^+/K^+ -ATP 酶活性产生了抑制作用。结合前期工作成果认为, 原位合成纳米 $\text{SiO}_x/\text{LZM}/\text{TP}$ -CS 复合保鲜涂膜具有良好的保鲜、抑菌性能, 可为可食性保鲜涂膜的应用提供理论指导和技术支持。

参考文献:

- [1] 张冉, 杨丽丽, 李秋莹, 等. TP-Lips/LZM-CS 复合缓释涂膜对美国红鱼鱼片贮藏品质的影响[J]. 包装工

- 程, 2020, 41(1): 44—50.
- ZHANG Ran, YANG Li-li, LI Qiu-ying, et al. Effect of TP-Lips/LZM-CS Composite Sustained-Release Coatings on the Storage Quality of *Sciaenops Ocellatus* Fillets[J]. Packaging Engineering, 2020, 41(1): 44—50.
- [2] 周强, 丁立云, 刘蒙佳. 牛至精油-壳聚糖复合涂膜协同茶多酚对海鲈鱼品质影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 121—126.
- ZHOU Qiang, DING Li-yun, LIU Meng-jia, et al. Effects of Oregano Essential Oil-Chitosan Composite Coatings Combined with Tea Polyphenols on the Quality of Sea Bass[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 121—126.
- [3] 李娜. 微冻、复合可食性涂膜及气调包装对半滑舌鳎鱼片保鲜效果的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 1—73.
- LI Na. Effects of Superchilling, Composite Edible Coating and Modified Atmosphere Packaging on Fresh-Keeping of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus Semilaevis*) Fillets[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 1—73.
- [4] 杨丽丽. 茶多酚复合保鲜剂缓释体系的建立及性能研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2019: 1—89.
- YANG Li-li. Establishment and Properties of Sustained Release System of Tea Polyphenol Compound Preservative[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019: 1—89.
- [5] XIN Song-lin, XIAO Lan, DONE Xiu-ping, et al. Preparation of Chitosan/Curcumin Nanoparticles Based Zein and Potato Starch Composite Films for *Schizothorax Prenati* Fillet Preservation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 211—221.
- [6] SULLIVAN D J, CRUZ-ROMERO M C, HERNANDEZ A B, et al. A Novel Method to Deliver Natural Antimicrobial Coating Materials to Extend the Shelf-Life of European Hake (*Merluccius Merluccius*) Fillets[J]. Food Packaging and Shelf Life, 2020, 25: 100522.
- [7] 董泽义, 谭丽菊, 王江涛. 壳聚糖保鲜膜研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(6): 147—151.
- DONG Ze-yi, TANG Li-ju, WANG Jiang-tao. Research Progress of Chitosan Preservative Coating[J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(6): 147—151.
- [8] SUN Tong, WU Chao-ling, HAO Han, et al. Preparation and Preservation Properties of the Chitosan Coatings Modified with the *in Situ* Synthesized Nano SiO_x[J]. Food Hydrocolloids, 2016(54): 130—138.
- [9] WEI Xu-qin, LI Xue-peng, WU Chao-ling, et al. The Modification of *in Situ* SiO_x Chitosan Coatings by ZnO/TiO₂ NPs and Its Preservation Properties to Silver Carp Fish Balls[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(12): 2992—3001.
- [10] WEI Xu-qin, LI Qiu-yin, HAO Han, et al. Preparation, Physicochemical and Preservation Properties of Ti/ZnO/*in Situ* SiO_x Chitosan Composite Coatings[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019(100): 570—577.
- [11] MORRISON H. Lysozyme[J]. Enzyme Active Sites and their Reaction Mechanisms, 2021(2): 121—127.
- [12] 王明, 张家涛, 孙彤, 等. 丁香酚复合保鲜剂对腐败希瓦氏菌的抗菌作用机制[J]. 食品科学, 2021, 42(13): 10—16.
- WANG Min, ZHANG Jia-tao, SUN Tong, et al. Antibacterial Mechanism of Eugenol Compound Preservatives against *Shewanella Putrefaciens*[J]. Food Science, 2021, 42(13): 10—16.
- [13] LYU Yao-zhong, ZHANG Li-ming, LI Meng-nan, et al. Physicochemical Properties and Digestibility of Potato Starch Treated by Ball Milling with Tea Polyphenols[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 129: 207—213.
- [14] WU He-jun, LEI Yan-lin, ZHU Rui, et al. Preparation and Characterization of Bioactive Edible Packaging Films Based on Pomelo Peel Flours Incorporating Tea Polyphenol[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90: 41—49.
- [15] PELEG M. The Hurdle Technology Metaphor Revisited[J]. Food Engineering Reviews, 2020(60): 1—12.
- [16] 王当丰, 李婷婷, 国竞文, 等. 茶多酚-溶菌酶复合保鲜剂对白鲢鱼丸保鲜效果[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 224—229.
- WANG Dang-feng, LI Ting-ting, WANG Jing-wen, et al. Effect of Composite Preservatives Consisting of Tea Polyphenols and Lysozyme on the Quality of Silver Carp Meatballs during Storage[J]. Food Science, 2017, 38(7): 224—229.
- [17] ZHANG Jia-tao, LI Yin-chang, ZHANG Xuan, et al. Physicochemical Properties and Antibacterial Mechanism of TP Microcapsules/LZM-PVA Gradual Sustained-Release Composite Coatings[J]. Progress in Organic Coatings, 2020, 314(146): 16—27.
- [18] 武娇, 杨华, 张家涛, 等. 原位合成纳米 SiO_x/溶菌酶/茶多酚/壳聚糖复合保鲜涂膜对海鲈鱼片保鲜性能的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 181—189.
- WU Jiao, YANG Hua, ZHANG Jia-tao, et al. Preservation Effect of *in-Situ* Synthetic Nano-SiO_x/Lysozyme/Tea Polyphenols/Chitosan Composite Coatings on Sea Bass Fillets [J]. Food Science, 2020, 41(23): 181—189.
- [19] YANG Sheng-ping, XIE Jin, CHENG Ying, et al. Response of *Shewanella Putrefaciens* to Low Temperature Regulated by Membrane Fluidity and Fatty Acid Metabolism[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 117(6): 108—128.

- [20] 赵宏强, 蓝蔚青, 孙晓红, 等. 冷藏鲈鱼片优势腐败菌的分离鉴定及致腐能力分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(8): 208—215.
- ZHAO Hong-qiang, LAN Wei-qing, SUN Xiao-hong, et al. Isolation and Identification of Dominant Spoilage Bacteria from Refrigerated Sea Bass Fillets and Analysis of their Spoilage Ability[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(8): 208—215.
- [21] WEI Xu-qin, LI Qiu-yin, WU Chao-lin, et al. Preparation, Characterization and Antibacterial Mechanism of the Chitosan Coatings Modified by Ag/ZnO Microspheres[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(15): 5527—5538.
- [22] YANG Hua, LI Qiu-yin, YANG Li-li, et al. The Competitive Release Kinetics and Synergistic Antibacterial Characteristics of Tea Polyphenols/ ϵ -Poly-L-Lysine Hydrochloride Core-Shell Microcapsules against *Shewanella Putrefaciens*[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2020, 182(5): 104—119.
- [23] THAMMASIRIRAK S, PUKCOTHANUNG Y, PREECHARRAM S, et al. Antimicrobial Peptides Derived from Goose Egg White Lysozyme[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2010, 151(1): 84—91.
- [24] LI Yuan, JIANG Xiao-ge, HAO Jian-qi, et al. Tea Polyphenols: the Application in Oral Microorganism Infectious Diseases Control[J]. Archives of Oral Biology, 2019, 102: 74—82.
- [25] CHEN C Z, COOPER S L. Interactions between Dendrimer Biocides and Bacterial Membranes[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3359—3368.
- [26] 仪淑敏. 茶多酚对鱼糜制品的冷藏保鲜作用及抑菌机理[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2011: 55—99.
- Yi Shu-min. Effect of Tea Polyphenols on Quality of Chilling Fish Suimi Products and Antibacterial Mechanisms[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2011: 55—99.