

文章编号: 1000-0615(2018)07-1140-14

DOI: 10.11964/jfc.20170310732

## 植物精油对冷藏大黄鱼优势腐败菌的抑制作用及其机制

孟玉霞<sup>1</sup>, 崔惠敬<sup>1</sup>, 赵前程<sup>1</sup>, 李萌<sup>1</sup>,  
边楚涵<sup>1</sup>, 白如健<sup>2</sup>, 马永生<sup>1\*</sup>

(1. 大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁大连 116023;  
2. 新兴际华伊犁农牧科技发展有限公司, 新疆维吾尔自治区伊宁 835000)

**摘要:** 为探讨天然植物精油对冷藏大黄鱼贮藏过程中优势腐败菌的抑制作用及其机制, 实验首先对冷藏大黄鱼的优势腐败菌进行分离纯化, 并通过16S *rDNA*序列分析及生理生化实验进行菌株鉴定; 采用纸片扩散法和微量肉汤稀释法检测14种植物精油或其组分对腐败菌株的抑菌活性; 在阐明植物精油抗菌活性的基础上, 再对植物精油处理后的大黄鱼气味进行感官可接受度检验, 以筛选出具有高效抗菌活性和良好感官接受性的精油保鲜剂; 实验通过细菌形态扫描电镜观察、胞内乳酸脱氢酶及核酸释放研究山苍子精油对不同腐败菌株的膜损伤作用, 以初步阐明其抗菌机制; 最后, 通过检测微生物数量、产硫菌数量、挥发性盐基氮(TVB-N)及组胺含量变化来考察山苍子精油对冷藏大黄鱼潜在的保鲜效果; 从冷藏大黄鱼中分离得到6株优势腐败菌, 分别为腐败希瓦氏菌4株, 热杀索丝菌1株, 温和气单胞菌1株; 14种植物精油对腐败菌株具有不同抑制活性, 其中肉桂醛抑菌活性最强, 最低抑菌浓度为0.125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 其次为丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草及山苍子精油, 最低抑菌浓度均 $\leq 0.5 \mu\text{L}/\text{mL}$ ; 丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草及山苍子精油使用后未导致大黄鱼气味的感官劣化, 且可矫正大黄鱼肉的腥味; 山苍子精油可破坏腐败菌株的细胞膜, 并导致胞内蛋白酶和核酸外泄。经4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 山苍子精油处理后, 冷藏过程中大黄鱼片的菌落总数、产硫菌数、TVB-N及组胺含量显著降低。研究表明, 肉桂醛、丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草及山苍子精油对大黄鱼特定腐败菌具有显著抑制作用, 芳香酚和富含柠檬醛的精油使用后不影响大黄鱼的感官接受性, 有望作为天然保鲜剂用于冷藏海产品的保鲜。

**关键词:** 大黄鱼; 优势腐败菌; 抑菌活性; 植物精油; 保鲜剂

**中图分类号:** S 983

**文献标志码:** A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属石首鱼科(Sciaenidae), 黄鱼属(*Larimichthys*), 我国主要海水经济养殖鱼类之一, 2015年全国大黄鱼养殖产量约14.9万t, 主要集中在福建、广东和浙江有少量养殖<sup>[1]</sup>。目前大黄鱼产品流通形式以冰鲜和冻品为主, 少量腌干制品(黄鱼鲞)。但冷冻贮藏会因蛋白变性问题而引起大黄鱼品质下降, 冷藏大黄鱼极易因腐败微生物、内源酶及脂质氧化

等作用而引起腐败变质, 大黄鱼在0~4 °C低温下的货架期一般仅为8~14 d<sup>[2]</sup>, 这极大制约了大黄鱼的流通加工和产业发展。为此, 国内一些学者尝试在低温保藏过程中辅助使用一些天然保鲜剂, 如茶多酚<sup>[3]</sup>、原花青素<sup>[4]</sup>、海藻酸钠<sup>[5]</sup>和壳聚糖<sup>[6]</sup>等, 但这些保鲜剂抑菌效果较弱, 或受食品基质影响较大, 如壳聚糖仅在酸性环境中(pH<6.5)能发挥有效抗菌作用<sup>[7]</sup>, 这也限制了其

收稿日期: 2017-03-03 修回日期: 2017-06-08

资助项目: 国家科技支撑计划(2015BAD16B00)子项目(2015BAD16B08); 辽宁省教育厅项目(L201607); 辽宁省博士启动基金(20131010)

通信作者: 马永生, E-mail: mayo@dlou.edu.cn

应用。可见,在人们对化学防腐剂接受性逐渐降低的趋势下,研发一些安全有效的天然保鲜剂已成为大黄鱼产业发展的迫切之需。

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(FDA)认定为公认安全类产品(generally regarded as safe, GRAS)。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<sup>[8-9]</sup>,目前已被尝试用于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[10]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[11]</sup>、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[12]</sup>和即食鱿鱼(*Loligo vulgaris*)圈<sup>[13]</sup>等水产品的保鲜,且取得了较显著效果。因此,将植物精油用于低温冷藏大黄鱼的辅助保鲜不失为一种可行选择。

微生物是导致鱼类腐败的主要因素,新鲜水产品中栖息的微生物复杂多样,但只有其中少数微生物能适应后续贮藏环境,并快速生长繁殖而逐渐成为优势菌群并造成产品腐败,这些少数微生物即特定腐败菌(specific spoilage organisms)<sup>[14]</sup>。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<sup>[15]</sup>,而精油作为水产品保鲜剂的前提是必须能有效抑制这些特定腐败菌。但以往研究中水产品中的特定腐败菌大多未确定,精油选用类型单一、缺乏针对性,且研究主要集中在精油保鲜效果评价方面,精油对特定腐败菌的抑菌活性缺乏定量数据,具体机制也鲜见探讨。

此外,植物精油绝大多数是挥发性小分子化合物,其中某些具有明显刺激性气味,即便使用的浓度很低也会影响食品的风味及感官接受性,因此,从水产品保鲜角度考虑,极有必要考察精油使用后水产品的感官接受性。

基于上述分析,本实验首先对北方市场上流通的冷藏大黄鱼优势腐败菌进行分离鉴定,然后采用纸片扩散法和微量肉汤稀释法对14种植物精油或其组分的体外抑菌活性进行检测,并通过喜好检验对精油处理后大黄鱼的感官接受性进行评价;通过细菌形态扫描电镜观察、胞内乳酸脱氢酶及核酸释放研究山苍子精油(*Lusea cubeba* oil, LCO)对腐败菌株的膜损伤作用,最后从微生物、挥发性盐基氮和组胺指标来考察山苍子精油对冷藏大黄鱼的保鲜效果,期望为植物精油应用于大黄鱼的冷藏保鲜提供一定的参考依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

冷藏大黄鱼购自辽宁省大连市某超市;实验用柠檬草精油由实验室提取获得,肉桂醛购于上海生工生物工程有限公司;百里香酚、丁香酚及柠檬醛购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;陈皮、薄荷、柠檬、山苍子、八角、孜然、香茅、大蒜及甜橙精油购于江西吉安中香天然植物精油有限公司;PCR相关试剂购于上海生工生物工程有限公司;乳酸脱氢酶试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;平板计数琼脂和铁琼脂购于北京陆桥生物技术有限责任公司;组胺标准品购于国药集团化学试剂有限公司;扫描电镜Zeiss supra55为德国卡尔·蔡司股份公司生产;VITEK2 Compact全自动微生物分析系统为法国生物梅里埃公司生产;酶标仪Synergy H1/H1M为美国伯腾仪器有限公司生产;PCR仪为大连宝生物工程有限公司生产;全自动凯氏定氮仪UDK159为意大利VELP公司生产;紫外-可见分光光度计Lambda 35为PerkinElmer股份有限公司生产;高效液相色谱Agilent 1260为安捷伦科技有限公司生产。

### 1.2 方法

**腐败细菌的分离** 冷藏大黄鱼购于大连某超市,原产于福建,将大黄鱼置4℃冰箱冷藏,待腐败后置超净台内,用无菌棉签擦拭鱼体表、体腔、鱼鳃及肠容物取样,并均匀涂布于胰大豆琼脂培养基(TSA)上,28℃恒温培养48h后,挑取典型单菌落,溶于200 μL灭菌生理盐水,接种纯化3次,菌悬液加20%甘油于-80℃冰箱中冻藏,备用。

**细菌鉴定** ①16S *rDNA*序列分析扩增、测序及系统发育进化树构建:用灭菌牙签挑一个单菌落置入100 μL灭菌水中,轻微振荡,100℃水浴锅中水浴10 min,10 000 r/min离心3 min,取上清液作为DNA模板;PCR扩增采用16S *rDNA*通用引物,正向引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物1492 R:5'-TACGGC-TACCTTGTACGACTT-3',预期扩增片段大小约为1 500 bp。PCR反应体系50 μL:DNA模板2 μL,正、反引物各1 μL,EX *Taq* 25 μL,无菌水21 μL。PCR循环参数:94℃预变性5 min;94℃

变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1.5 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min; 最后降温至4 °C。琼脂糖凝胶电泳检测PCR结果, 并将PCR产物送至上海生工生物工程有限公司测序。

将测得的16S *rDNA*序列通过BLAST检索和Clustal X1.8软件进行序列比对分析; 根据邻接法(Neighbor-Joining, NJ)采用Mega 6.0构建系统发育树, 自举分析(Bootstrap)检测置信度, 自举数集为1 000次。

②VITEK2 Compact系统鉴定: 部分分离菌株通过16S *rDNA*序列分析难以准确鉴定到“种”的水平, 本实验又通过VITEK2 Compact全自动微生物分析系统进行生化辅助鉴定, 具体操作参照法国生物梅里埃公司提供的鉴定卡说明书进行。

植物精油或其组分抑菌圈测定 参考Stefanakis等<sup>[16]</sup>方法, 采用纸片扩散法检测14种植物精油或其组分对腐败菌株的抑制效果。取过夜振荡培养的细菌悬液, 用胰大豆肉汤培养基(TSB)稀释至 $1 \times 10^8$  CFU/mL, 用无菌棉签蘸取菌液, 均匀涂布于TSA培养基表面。待平板上的菌液被琼脂完全吸收, 取直径为6 mm的无菌滤纸片, 滴加2  $\mu$ L精油后, 将纸片贴在培养基表面。在恒温培养箱中28 °C培养48 h后, 测量抑菌圈直径, 实验重复3次, 计算平均值。

植物精油或其组分对腐败菌株最低抑菌浓度测定 采用微量肉汤稀释法测定植物精油或其组分的最低抑菌浓度, 具体操作参照Othman等<sup>[17]</sup>方法。简述如下, 将溶解于无水乙醇的精油用TSB培养基梯度稀释至16、8、4、2、1、0.5、0.25和0.125  $\mu$ L/mL, 再依次加入96孔细胞培养板中, 每孔100  $\mu$ L, 每个浓度梯度设置3个平行, 另设8  $\mu$ L/mL乙醇为溶剂对照组, 并设不含精油的培养基为空白对照组。再取经过夜振荡培养的待测菌液, 用TSB培养基稀释至 $2 \times 10^6$  CFU/mL, 转入前述含精油培养基的96孔板中, 每孔加100  $\mu$ L; 将96孔板置入酶标仪, 在28 °C条件下振荡培养, 每隔30 min自动检测一次600 nm处吸光值(OD<sub>600</sub>), 连续测定20 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精油浓度。

精油处理后大黄鱼肉质可接受度检验 根据抑菌实验结果, 选择具有较强抗菌活性的精油或其组分进行感官接受度检验, 分别为肉桂

醛、丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草和山苍子精油, 其中肉桂醛对3种受试腐败菌的最小抑菌浓度(MIC)为0.125  $\mu$ L/mL, 另外5种精油的MIC  $\leq$  0.5  $\mu$ L/mL。简述如下, 将大黄鱼肉片浸入浓度为0、0.5×MIC、1×MIC、2×MIC及4×MIC的待测精油悬浊液中(肉桂醛的MIC值为0.125  $\mu$ L/mL, 其他精油MIC值选择0.5  $\mu$ L/mL), 浸泡15 min后取出, 将每个浓度处理的鱼肉样品平均分成2份, 一份作为生鱼肉直接进行感官检验, 另一份鱼肉在沸水中煮3 min, 冷却至室温后品评。参照Lawless等<sup>[18]</sup>方法进行可接受度检验, 将生熟2份鱼肉分别盛入一次性杯子, 用3位随机码编码后呈送给46名经筛选的感官评价员。感官评价员根据9点喜好标度进行检验, 具体分数描述: 9=极端喜欢, 8=非常喜欢, 7=一般喜欢, 6=稍微喜欢, 5=既不喜欢也不厌恶, 4=稍微厌恶, 3=一般厌恶, 2=非常厌恶, 1=极端厌恶。

细菌形态扫描电镜观察 参照Barman等<sup>[19]</sup>方法, 将山苍子精油加入待测菌株过夜培养物中, 终浓度均为1×MIC, 并设不加山苍子精油的菌液对照组, 28 °C、180 r/min振荡孵育1 h。取对照组和山苍子精油处理组菌液各1 mL, PBS清洗2次; 4 °C 2.5%戊二醛固定24 h, PBS清洗2次后, 将菌液滴于干净载玻片上静置2 h; 分别用50%、70%、80%、90%、100%乙醇梯度脱水, 再用叔丁醇置换乙醇3次; 通风橱中晾干后真空喷金, 扫描电镜观察。

#### 胞外乳酸脱氢酶和紫外吸收物质的测定

将山苍子精油加入分离腐败菌株过夜培养物中至终浓度为1×MIC, 28 °C 180 r/min振荡孵育, 分别于不同时间点取1 mL菌液, 4 °C 10 000 r/min离心10 min, 取上清液, 再分别测定上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活力和260 nm处吸光值, 实验以未经精油处理的菌体细胞作为对照。LDH酶活测定按试剂盒提供方法进行, 为获得细菌胞内乳酸脱氢酶的全部释放量, 将菌液在功率50 W、工作时间5 s、间隔时间5 s、连续90次超声。乳酸脱氢酶相对释放量计算公式如下:

LDH释放率(%) =

$$\frac{\text{精油处理后菌体细胞LDH释放时吸光度} - \text{对照菌体吸光度}}{\text{菌体细胞中LDH完全释放时吸光度} - \text{对照菌体吸光度}} \times 100$$

植物精油对大黄鱼贮藏过程中腐败微生物的抑制作用 将冷藏大黄鱼去皮、内脏后, 洗净

并于无菌条件下剖片,分为3组,分别用已灭菌的蒸馏水、1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 山苍子精油溶液和4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 山苍子精油溶液浸泡15 min,沥干水分、分装后置于4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮存,并于0、3、6、9、12 d取样,检测微生物、挥发性盐基氮及组胺指标。

#### 鱼肉中菌落总数和产硫化氢菌数量测定

采用平板计数法,培养基分别选用平板计数琼脂和铁琼脂,具体操作分别参考GB 4789.2-2016和Koutsoumanis等<sup>[20]</sup>法进行;挥发性盐基氮测定参考GB 5009.228-2016方法进行,结果用mg/100 g表示;鱼肉中组胺含量采用高效液相色谱法测定,具体操作参照GB 5009.208-2016,其中流动相A为超纯水,B为纯乙腈,梯度洗脱条件为0 min, 55%B; 15 min, 65%B; 20 min, 80%B; 30 min, 90%B; 35 min, 55%B; 流速为1 mL/min,进样量10  $\mu\text{L}$ ,柱温30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长为254 nm。

### 1.3 数据处理和统计分析

采用SPSS 22软件进行数据统计分析,实验数据以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,Student-Neuman-Keuls (SNK)法均值多重比较;二组之间的比较采用Student's-t-test进行分析, $P<0.05$ 表示统计学显著差异。

## 2 结果

### 2.1 腐败菌的分离鉴定结果

以细菌基因组DNA为模板,PCR扩增大黄鱼腐败分离菌株的16S *rDNA*序列,电泳检测结果显示在约1 500 bp处有目的条带。将16S *rDNA*序列通过BLAST检索系统进行序列同源性比对,结果表明菌株LC-Q2、LC-Q3、LC-Q6和LC-B3菌株与波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica* AJ000214)及腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens* X81623)聚为一支,但难以归属具体种别,需结合生理生化指标进一步确定。通过VITEK2 Compact系统对这4株希瓦氏菌进行鉴定,结果表明这4株腐败菌均能产生 $\text{H}_2\text{S}$ ,可在4  $^{\circ}\text{C}$ 和37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下生长,不能利用龙胆二糖、纤维二糖、D-葡萄糖、柠檬酸盐,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》及Ziemke等<sup>[21]</sup>研究结果,鉴定本实验所分的4株希瓦氏菌为腐败希瓦氏菌。

菌株LC-R1、LC-S2分别与热杀索丝菌(*Bro-*

*chothrix thermosphacta* AODI01000055,也被译作热死环丝菌)和温和气单胞菌(*Aeromonas sobria* X74683)序列同源性为99%,并分别选择模式菌株16S *rDNA*序列构建系统发育树。可见菌株LC-R1和LC-S2分别与热杀索丝菌(AODI01000055)和温和气单胞菌(X74683)聚为同一分支。

### 2.2 体外抑菌圈测定结果

选择腐败希瓦氏菌LC-Q6、热杀索丝菌LC-R1和温和气单胞菌LC-S2 3株腐败菌为研究对象,通过纸片扩散法初步检测14种植物精油或其组分的抗菌活性。14种植物精油对3株腐败菌的抑制效果不同,其中肉桂醛的抑菌效果最强,抑菌圈直径为18.0~31.3 cm;丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草及山苍子精油次之,抑菌圈直径为9.0~22.8 cm;孜然、薄荷及八角茴香精油的抑菌效果一般,抑菌圈直径为2.6~12.3 cm;陈皮、大蒜、甜橙等精油抑菌效果较弱或无(表1)。

### 2.3 植物精油或其组分对腐败菌株的MIC测定

在纸片扩散法定性检测精油抗菌活性的基础上,采用微量肉汤稀释法进一步对14种精油或其组分的MIC进行检测。在本实验中,MIC定义为在细菌培养20 h时,可以完全抑制其生长的最低精油浓度。14种植物精油或其组分对3株腐败菌具有不同程度的抑制作用,其中肉桂醛抗菌活性最高,对受试3株菌的MIC均为0.125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ;其次为丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草和山苍子精油,  $\text{MIC}\leq 0.5 \mu\text{L}/\text{mL}$ ;薄荷、孜然、柠檬香茅及大蒜精油对3株腐败菌抑菌效果相对较弱;陈皮、甜橙、八角茴香和柠檬精油抑菌效果较差(表2)。此外,溶剂乙醇在最大浓度8  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时对腐败菌株生长无抑制作用。

### 2.4 精油处理后对鱼肉气味可接受度的影响

基于前述抗菌实验结果,实验选择肉桂醛、丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草和山苍子6种抗菌活性较强的精油或其组分处理大黄鱼肉,并对精油处理后鱼肉气味的感官接受性进行评价。未经精油处理的大黄鱼由于腥味重,气味接受性较低,经精油浸泡处理后,除肉桂醛外,鱼肉气味感官接受度均显著增加( $P<0.05$ ),可见精油处理对大黄鱼腥味有矫正作用(图2)。

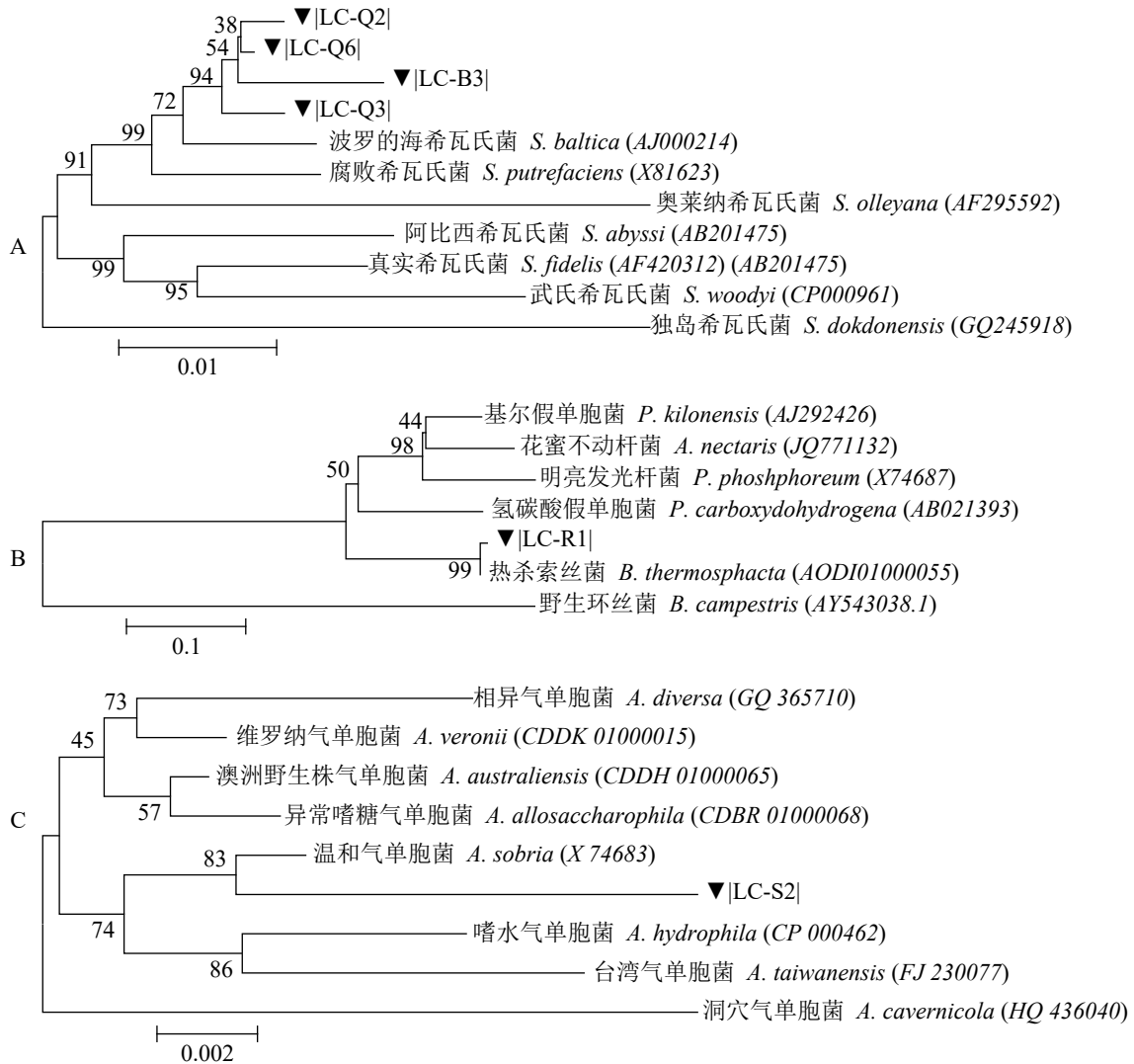


图 1 基于大黄鱼腐败菌分离株 16S *rDNA* 序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S *rDNA* gene sequence analysis of the spoilage bacteria isolates

精油浓度对处理后鱼肉感官接受性影响明显, 具体影响结果可分为3类: ①随着精油处理浓度增加, 鱼肉感官接受性提高, 如山苍子精油和百里香酚, 其中山苍子精油剂量效应显著 ( $P < 0.05$ ), 且在最大处理浓度时也未带来鱼肉感官劣化; ②随着精油处理浓度增加, 鱼肉感官接受性先提高后降低, 如丁香酚, 不过统计分析差异不显著 ( $P > 0.05$ ); ③随着精油处理浓度增加, 鱼肉感官接受性显著下降 ( $P < 0.05$ ), 如肉桂醛。值得提出的是, 大黄鱼在食用前一般需要加热处理, 如蒸、煮等, 热处理过程中精油挥发消散, 可一定程度消除精油带来的鱼肉感官劣化问题, 如本实验中经肉桂醛处理后的鱼肉煮熟后, 感官接受性显著提高 ( $P < 0.05$ )。

本实验中的山苍子精油提取自樟科、木姜子属植物山苍子的果实, 为我国特有且生产规模最大的天然香料<sup>[22]</sup>。山苍子精油对腐败菌株显示了高效抗菌活性, 且其主要组分为柠檬醛, 赋予了精油特有的柠檬香气, 不会带来产品感官劣化问题, 因此被选用于后续鱼肉基质中精油抗菌效果研究, 以期开发出一种理想的天然保鲜剂。

## 2.5 山苍子精油的抑菌机理研究

在明确山苍子精油抗菌活性的基础上, 实验又通过扫描电镜观察、胞内乳酸脱氢酶和核酸释放测定来研究其对腐败菌株的膜损伤作用, 期望初步阐明其抗菌机制。扫描电镜观察

表 1 植物精油或其组分对腐败菌株的抑菌活性

Tab. 1 Antimicrobial activity of essential oils or their components against the spoilage bacteria isolates

植物精油或其组分 essential oils or their components	抑菌圈直径/mm inhibitory zone		
	热杀索丝菌 <i>B. thermosphacta</i> LC-R1	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i> LC-S2	腐败希瓦氏菌 <i>S. putrefaciens</i> LC-Q6
	肉桂醛 cinnamaldehyde	19.6±6.1	18.0±2.3
丁香酚 eugenol	10.6±2.5	12.4±1.9	12.8±4.1
百里香酚 thymol	14.3±5.5	22.8±2.9	10.7±7.2
柠檬醛 citral	14.2±7.9	12.6±2.8	18.8±1.2
山苍子 <i>Litsea cubeba</i>	9.0±0.4	17.5±0.9	17.5±2.5
柠檬草 <i>Cymbopogon citratus</i>	11.6±1.6	14.0±0.1	19.2±4.5
孜然 <i>Cuminum cyminum</i>	5.0±2.1	12.3±4.0	2.7±2.2
陈皮 <i>Citri pericarpium reticulatae</i>	0.0±0.0	0.2±0.3	0.0±0.0
薄荷 <i>Mentha haplocalyx</i>	3.9±0.7	6.1±0.9	2.7±1.3
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	0.0±0.0	0.4±0.6	5.4±0.7
柠檬香茅 <i>Cymbopogon nardus</i>	0.7±0.6	1.1±1.1	7.6±4.9
大蒜 <i>Allium sativum</i>	3.9±0.2	0.0±0.0	2.3±2.3
八角茴香 <i>Illicium verum</i>	6.5±1.5	2.6±0.9	4.5±2.4
柠檬 <i>Citrus limon</i>	0.0±0.0	0.3±0.5	2.0±0.4

注: 表中抑菌圈数据减去了纸片直径

Notes: The diameter of the paper disc was subtracted from the inhibition zone

表 2 精油或其组分对腐败菌株的最低抑菌浓度

Tab. 2 Minimal inhibitory concentration of selected essential oils or their components against the spoilage bacteria isolates

植物精油或其组分 essential oils or their components	最低抑菌浓度/( $\mu$ L/mL) minimal inhibitory concentration (MIC)		
	热杀索丝菌 <i>B. thermosphacta</i> LC-R1	温和气单胞菌 <i>A. sobria</i> LC-S2	腐败希瓦氏菌 <i>S. putrefaciens</i> LC-Q6
	肉桂醛 cinnamaldehyde	0.125	0.125
丁香酚 eugenol	0.5	0.25	0.5
百里香酚 thymol	0.25	0.125	0.5
柠檬醛 citral	0.25	0.5	0.5
山苍子 <i>Litsea cubeba</i>	0.5	0.5	0.5
柠檬草 <i>Cymbopogon citratus</i>	0.25	0.5	0.25
孜然 <i>Cuminum cyminum</i>	2.0	0.5	1
陈皮 <i>Citri pericarpium reticulatae</i>	>4	>4	>4
薄荷 <i>Mentha haplocalyx</i>	2.0	2.0	2.0
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	>4	2.0	>4
柠檬香茅 <i>Cymbopogon nardus</i>	>4	2.0	0.5
大蒜 <i>Allium sativum</i>	2.0	>4	0.5
八角茴香 <i>Illicium verum</i>	>4	>4	4.0
柠檬 <i>Citrus limon</i>	>4	>4	>4

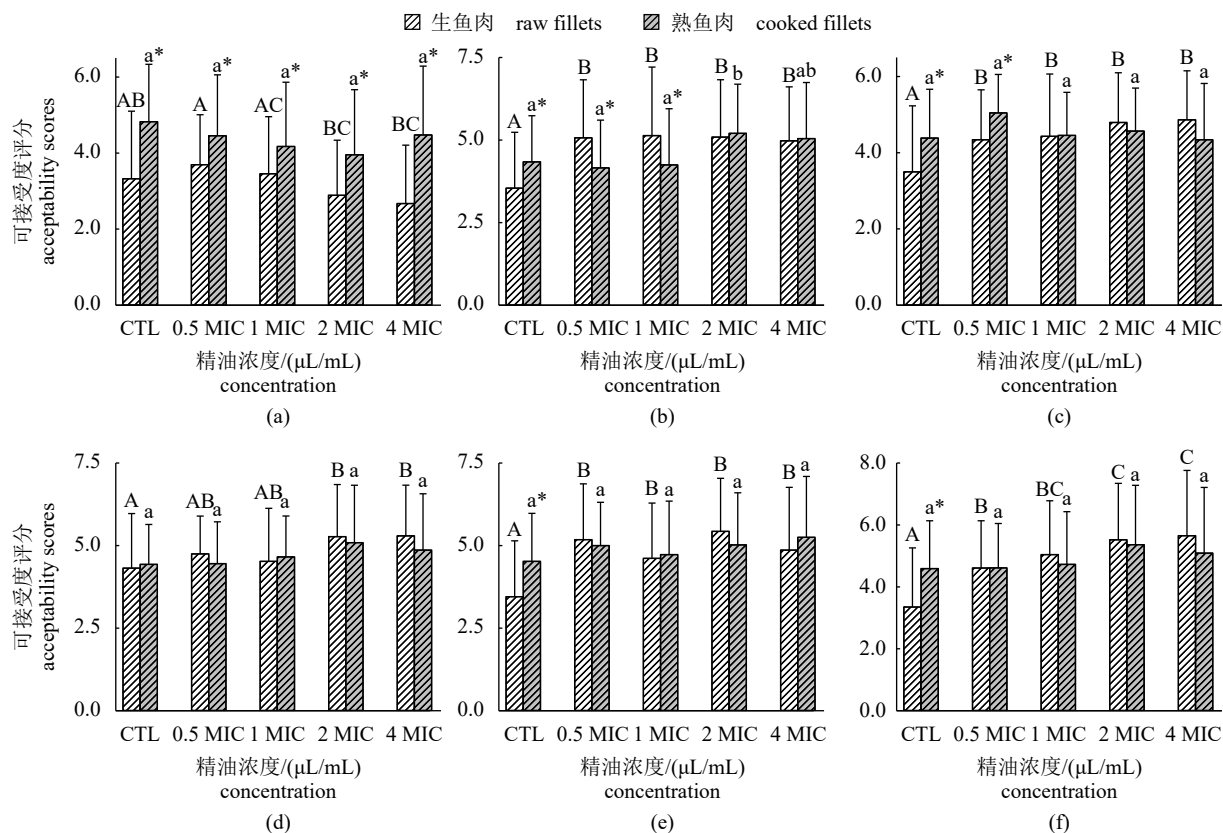


图2 大黄鱼片经不同精油处理后的感官接受度

(a)肉桂醛；(b)丁香酚；(c)百里香酚；(d)柠檬醛；(e)柠檬草；(f)山苍子。\*代表同一组生、熟鱼肉之间的可接受度存在显著差异 ( $P < 0.05$ )；不同大写字母表示生鱼肉多重比较检验结果，不同小写字母表示熟鱼肉多重比较检验结果，不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Fig. 2 Sensory acceptability of large yellow croaker fillets treated by essential oils

(a)cinnamylaldehyde; (b)eugenol; (c)thymol; (d)citral; (e)*Cymbopogon citratus* oil; (f)*Litsea cubeba* oil. \*Represents significant differences between raw fillets and cooked fillets at the same group ( $P < 0.05$ ). Columns with different capital letter superscripts mean significant differences of raw fillets ( $P < 0.05$ ), and with different lower-case letter superscripts mean significant differences of cooked fillets ( $P < 0.05$ )

显示，精油处理前，3株腐败菌均呈短杆状，细菌表面结构完整，经浓度为 $1 \times \text{MIC}$ 的山苍子精油处理后，细胞壁破裂，菌体明显凹陷且出现内容物溢出现象(图3)

乳酸脱氢酶存在于细胞质中，参与糖酵解途径，在膜损伤时会外泄至胞外，腐败希瓦氏菌经 $1 \times \text{MIC}$ 浓度的山苍子精油处理后，胞外乳酸脱氢酶和紫外吸收物质含量呈上升趋势，处理时间1 h时其胞内LDH释放量达60.55%，且随着处理时间延长，释放量持续增加；而热杀索丝菌和温和气单胞菌经过山苍子精油处理后胞外LDH含量并未见明显释放(图4)。

经山苍子精油处理后，腐败希瓦氏菌和温和气单胞菌胞内紫外吸收物质迅速释放，热杀索丝菌缓慢释放，30 min后趋于平稳。胞内乳酸脱氢酶和核酸释放均说明了山苍子精油对分离

腐败菌的膜损伤作用。

## 2.6 山苍子精油对大黄鱼贮藏过程中腐败微生物的抑制作用

鉴于植物精油在液体培养基和食品基质中的抗菌效果可能存在较大差异，因此有必要考察山苍子精油在鱼肉基质中抗菌活性，以大黄鱼片为实验对象，检测精油处理后鱼片贮藏过程中微生物数量变化，以探究其潜在的保鲜效果。贮藏期间对照组大黄鱼片中细菌总数和产硫菌数迅速增加，6 d后趋于平缓。经 $4 \mu\text{L}/\text{mL}$ 山苍子精油浸泡处理后，贮藏过程中微生物的生长被有效抑制(图5)。 $4^\circ\text{C}$ 贮藏3~12 d，每个时间点的菌落总数均显著低于对照组，减菌量为2.2~2.8 lg(CFU/g)；产硫菌的减菌量为1.3~3.9 lg(CFU/g)，均显著低于对照 ( $P < 0.05$ )。

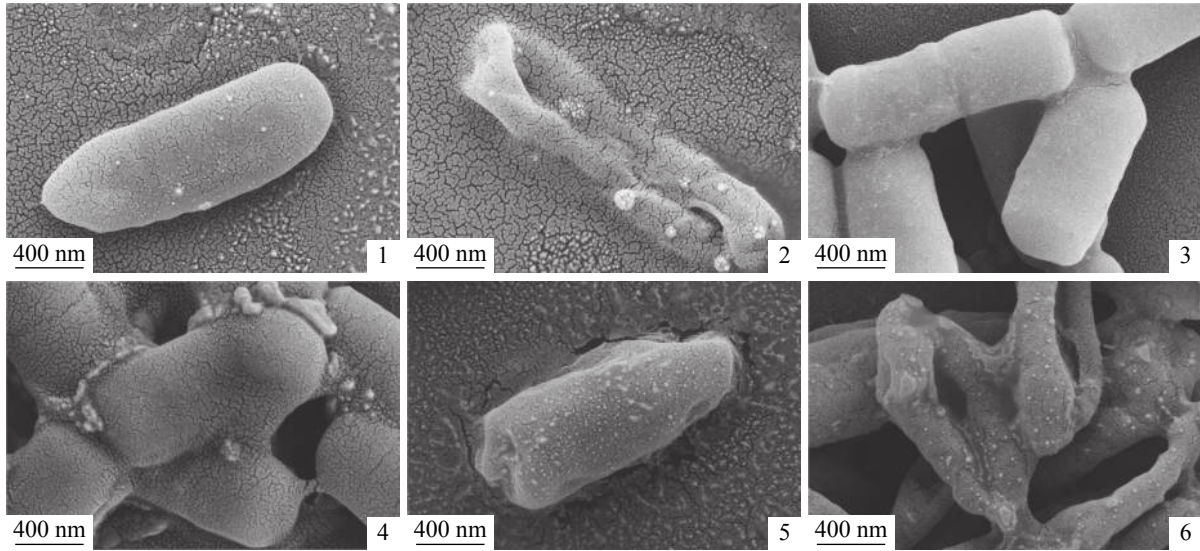


图3 植物精油处理前后分离腐败菌株电镜图片

1. 腐败希瓦氏菌LC-Q6: 未处理组; 2. 腐败希瓦氏菌LC-Q6: 山苍子精油处理组; 3. 热杀索丝菌LC-R1: 未处理组; 4. 热杀索丝菌LC-R1: 山苍子精油处理组; 5. 温和气单胞菌LC-S2: 未处理组; 6. 温和气单胞菌LC-S2: 山苍子精油处理组

Fig. 3 Scanning electron micrograph of spoilage bacteria untreated cells and after treatment with *L. cubeba* oil (LCO)

1. *S. putrefaciens* LC-Q6: control; 2. *S. putrefaciens* LC-Q6:treated by *L. cubeba* oil; 3. *B. thermosphacta* LC-R1: control; 4. *B. thermosphacta* LC-R1:treated by *L. cubeba* oil; 5. *A. sobria* LC-S2: control; 6. *A. sobria* LC-S2: treated by *L. cubeba* oil

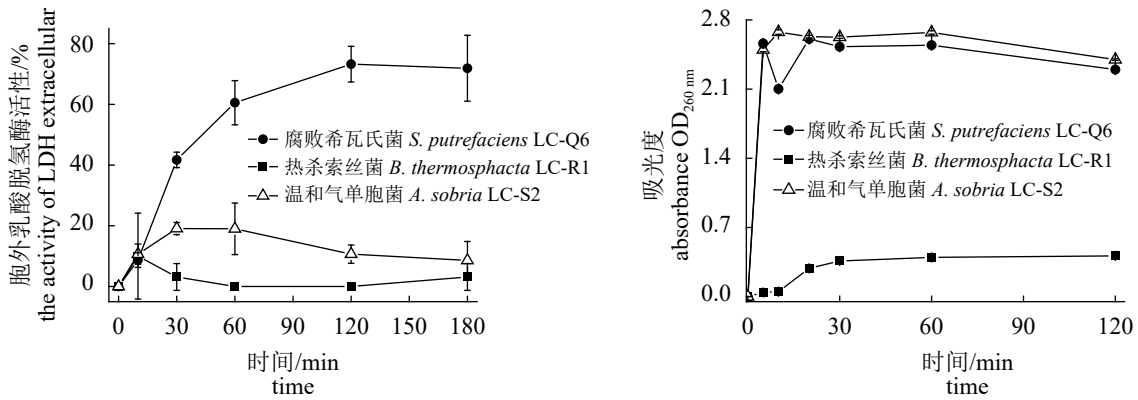


图4 山苍子精油处理后分离腐败菌胞外乳酸脱氢酶和紫外吸收物质含量变化

Fig. 4 The LDH and UV-absorbing materials efflux from the *L. cubeba* oil treated bacteria cells

实验发现山苍子精油在浓度为1 μL/mL时, 处理组菌落总数无显著变化(P>0.05); 虽然精油使用浓度已达到希瓦氏菌的2×MIC, 但产疏菌仅在第3天和12天时, 减少了1.3~1.4 lg(CFU/g), 其他时间点也无显著差异, 可见鱼肉基质影响了精油的抗菌活性。

鱼肉中蛋白质或游离氨基酸在微生物和酶的作用下, 分解或转化产生氨及胺类等碱性含氮物质, 2个常见的表征指标为挥发性盐基氮 (total volatile basic nitrogen, TVB-N)和生物胺含

量, 进一步通过检测这两种微生物生长的伴生指标来考察精油在鱼肉基质中的抗菌活性。鱼肉TVB-N值随贮藏时间延长而升高, 3 d后迅速增加, 在贮藏12 d时, 对照组TVB-N值达到264 mg/100 g(图6), 而4 μL/mL山苍子精油处理组TVB-N值仅为88 mg/100 g, 表明山苍子精油可显著抑制鱼肉中TVB-N的产生(P<0.05); 不过1 μL/mL山苍子精油对TVB-N产生仅在第3天时具有显著性(P<0.05), 其他时间点均无显著抑制效果(P>0.05), 这与前述微生物指标结果吻合。



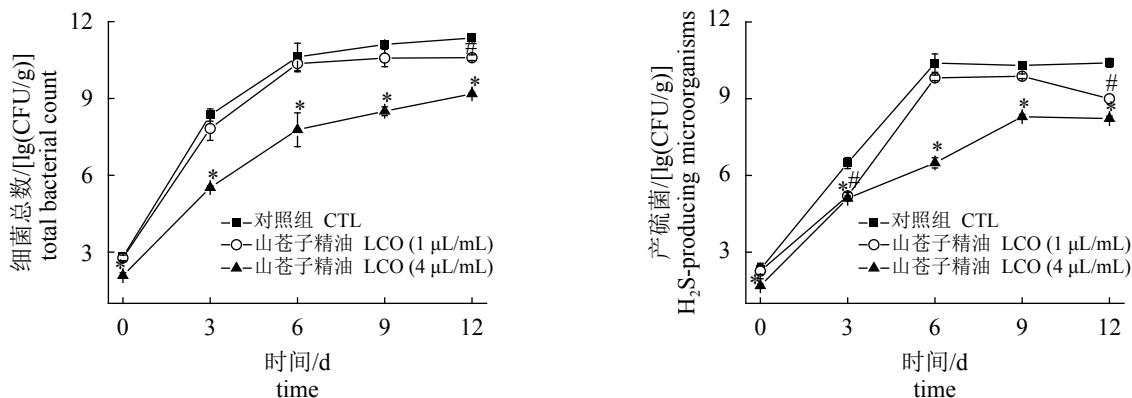


图5 大黄鱼片在4℃冷藏条件下菌落总数及产硫化氢数量变化

#, \*表示山苍子精油处理组与对照组相比差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 5 Changes in the total bacterial counts and H<sub>2</sub>S-producing bacteria of large yellow croaker fillets during chilled storage at 4 °C

# and \*represents significant differences compared to control at the same time point ( $P<0.05$ )

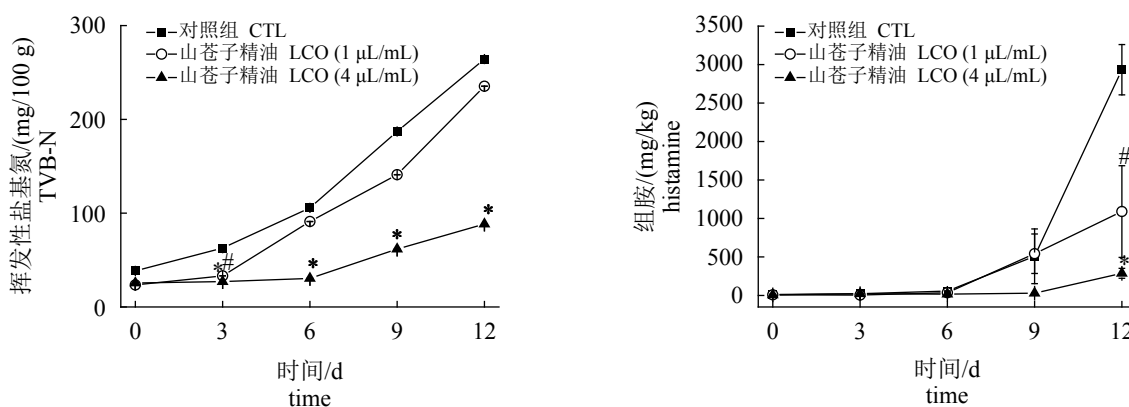


图6 大黄鱼片在4℃冷藏条件下挥发性盐基氮和组胺含量变化

#, \*表示山苍子精油处理组与对照组相比差异显著( $P<0.05$ )

Fig. 6 Changes in the TVB-N value and histamine content of large yellow croaker fillets during chilled storage at 4 °C

# and \*represents significant differences compared to control at the same time point ( $P<0.05$ )

组胺是海产品中的一种代表性生物胺,为评价海产品鲜度和质量安全的重要指标。对照组大黄鱼冷藏6 d后,组胺含量开始显著上升,12 d时达到2 933 mg/kg;经1或4 μL/mL 山苍子精油处理后,实验终点时组胺含量分别为1 090 mg/kg和 287 mg/kg(图6),表明山苍子精油能显著抑制组胺的产生( $P<0.05$ ),并呈现剂量依赖效应。需要指出的是,由于本实验在大连市场上购买的大黄鱼均原产自福建,已经历长途物流运输和较长时间贮藏,故起始鲜度不佳,表现为TVB-N和组胺起始值较高,故未来保鲜实验中有必要以鲜活大黄鱼为原料进行。

### 3 讨论

希瓦氏菌是冷藏海水鱼类常见腐败菌之一<sup>[14]</sup>,第9版《伯杰氏细菌鉴定手册》中收录的希瓦氏菌有22种,其中腐败希瓦氏菌和波罗的海希瓦氏菌为常见水产品腐败菌。Owen等<sup>[23]</sup>早期通过DNA杂交同源性分析将腐败希瓦氏菌分为4种不同的基因型,后来德国学者Ziemke等<sup>[21]</sup>将其中的基因II型腐败希瓦氏菌单列为一新种,即波罗的海希瓦氏菌。二者16S *rDNA*相似度高达99%,理化指标上也很接近,只腐败希瓦氏菌能在37 °C条件下生长,不能利用龙胆二糖、纤维二糖、蔗糖、D-葡萄糖及柠檬酸盐,而波罗的海希瓦

氏菌的上述理化指标刚好与之相反<sup>[21]</sup>。本实验通过VITEK2 Compact全自动微生物分析系统发现分离得到的4株希瓦氏菌理化指标与腐败希瓦氏菌相符,结合16S *rDNA*序列分析结果,可以确定这4株分离腐败菌为腐败希瓦氏菌。郭全友等<sup>[24]</sup>研究证实养殖大黄鱼0℃冷藏货架期终点优势腐败菌为腐败希瓦氏菌,这与本实验结果基本一致。张雯等<sup>[25]</sup>发现0~4℃冰鲜大黄鱼优势腐败菌为波罗的海希瓦氏菌,但其仅依照16S *rDNA* V3区序列判定细菌种别,鉴定准确性有待商榷。

此外,本实验从腐败大黄鱼肠容物和鱼鳃中分别分离得到的1株热杀索丝菌和1株温和气单胞菌,可能部分参与了大黄鱼的腐败进程。热杀索丝菌为革兰氏阳性嗜冷菌,兼性厌氧且耐盐,为冷藏环境下无须鳕(*Merluccius merluccius*)<sup>[26]</sup>、大西洋鲑(*Salmo salar*)<sup>[27]</sup>、去壳北极甜虾(*Pandalus borealis*)<sup>[28]</sup>等水产品中常见腐败菌,尤其在气调包装中。国内张雯等<sup>[29]</sup>也从贮藏后期的冰鲜大黄鱼肠道中分离出少量索丝菌。气单胞菌属气单胞菌科,兼性厌氧,为常见的水生微生物,广泛存在于尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[30]</sup>、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[31]</sup>等水产品中,部分菌种具有显著致腐特性。郭全友等<sup>[24]</sup>曾确定气单胞菌是养殖大黄鱼冷藏初期的优势菌,但该研究未鉴定气单胞菌的具体种别。最近葛阳杨等<sup>[32]</sup>证实杀鲑气单胞菌(*A. salraon-icida*)为冷藏大黄鱼的强致腐菌;与此类似,Wang等<sup>[33]</sup>研究也认为嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)为冷藏草鱼片的优势腐败菌。

植物精油的抗菌活性已被大量研究证实,但大多针对大肠杆菌、沙门氏菌及金黄色葡萄球菌等常见食源性致病菌<sup>[9, 34]</sup>,而精油对水产品腐败菌抗菌活性的影响尚鲜见报道。Mahmoud等<sup>[11]</sup>研究发现导致鲤(*Cyprinus carpio*)腐败的优势微生物为黄杆菌(*Flavobacterium* sp.)和弧菌科(*Vibrionaceae* sp.)微生物,抑菌实验发现肉桂醛、百里香酚和香芹酚的抑菌活性最强。不过这项研究针对的均是淡水鱼类腐败菌,且选用的精油类型较为有限。Gómez-Estaca等<sup>[35]</sup>研究发现丁香精油能完全抑制腐败希瓦氏菌的生长,不过该研究未提供精油对受试菌株的MIC数据。

本实验天然植物精油或其组分对腐败希瓦氏菌、热杀索丝菌和温和气单胞菌的抗菌活性,发现肉桂醛、丁香酚、百里香酚、柠檬

醛、柠檬草及山苍子精油对3株腐败菌均具有很强抑菌活性, MIC ≤ 0.5 μL/mL。这与已报道的一些研究结果类似,如百里香精油对热杀索丝菌的MIC为0.5 μL/mL<sup>[36]</sup>;丁香酚对大肠杆菌和伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)的MIC分别为1.6和0.125 μL/mL<sup>[34]</sup>。

本实验中山苍子和柠檬草精油主要组分均为柠檬醛,它是一种开链单萜醛,含顺反2种异构体,分别为橙花醛(顺式)和香叶醛(反式),自然状态下常共存于同一挥发油中,具有较强的广谱抗菌活性。Kim等<sup>[37]</sup>研究发现柠檬醛对单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌及大肠杆菌的MIC也为0.5 μL/mL; Li等<sup>[38]</sup>研究证实山苍子精油对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性仅次于肉桂精油, MIC为0.125%(体积百分比, V/V),与本实验结论基本一致。

但上述表征精油抗菌活性的MIC值均是使用液体培养基实验而获得的数据,若将精油用于食品基质中,抗菌效果一般会降低。如本实验发现山苍子精油在体外对水产腐败菌具有显著抑制作用, MIC为0.5 μL/mL, 但将1 μL/mL的山苍子精油用于大黄鱼片中,抑菌效果并不显著,这可能因为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,难以进入水相作用于目标微生物。当精油浓度提高至4 μL/mL(8×MIC)时,可以显著抑制鱼肉基质中微生物生长。与本实验类似,0.018%芫荽叶油在体外抑菌实验中抑菌效果很显著,但应用于火腿中时浓度提升至6%仍然没有抗菌效果<sup>[39]</sup>;薄荷油在高脂肪的鱼卵沙拉中对李斯特菌和沙门氏菌的抑制效果较差,但在黄瓜和低脂酸奶中的抑菌效果很显著<sup>[40]</sup>。因此,若将精油应用于脂质含量较高的食品,有必要提高精油浓度,或增加其在水相中的分散性,如将其制备成纳米乳剂<sup>[41]</sup>。

植物精油绝大多数是挥发性小分子化合物,其中某些具有明显辛辣刺激气味,使用后可能会影响食品的风味,因此有必要对精油处理后鱼肉气味的感官接受性进行评价。本实验选择了6种抗菌效果较强的精油或其组分,通过喜好检验考察了精油处理后大黄鱼片的气味接受性,结果发现丁香酚、百里香酚、柠檬醛、柠檬草和山苍子等5种精油均提高了大黄鱼片感官接受性,表明精油可矫正大黄鱼肉的腥味。本

实验中,肉桂醛精油虽然抗菌活性很强,但却会导致大黄鱼片感官的劣化。Nowak等<sup>[36]</sup>研究发现百里香和迷迭香精油按2×MIC剂量添加至气调包装的牛肉中,造成了产品气味的明显劣化,不过该研究没有考察精油不同处理浓度对感官接受性的影响。为降低精油对食品风味的影响,也有研究尝试将精油做成可食性抗菌薄膜代替将精油直接加入食品,如含牛至精油的明胶-壳聚糖膜可使草鱼冷藏货架期延长4~5 d<sup>[42]</sup>,研发含精油的抗菌活性包装是目前正在进行的工作。

植物精油成分复杂,作用靶标多样,具体作用机制尚未完全阐明。目前植物精油的抑菌机制研究主要以大肠杆菌、沙门氏菌等为模型,水产品腐败菌很少涉及。一般认为植物精油及其成分具有疏水性,易对细胞膜造成非特异性损伤,使膜通透性增加,胞内无机离子、蛋白酶和核酸外泄<sup>[43]</sup>,细胞死亡。本实验通过细胞形态扫描电镜观察、胞内LDH和核酸物质释放测定,证实山苍子精油可对腐败希瓦氏菌、温和气单胞菌和热杀索丝菌细胞膜造成损伤。Li等<sup>[38]</sup>通过透射电镜观察认为山苍子精油可穿透大肠杆菌细胞外膜层,并破坏其细胞膜。但本实验中温和气单胞菌和热杀索丝菌胞内LDH释放并不明显,这可能是因为LDH分子量较大(3 000 u),而精油在这2种细菌细胞膜上产生的孔洞相对较小,故LDH释放较少。不过由于原核生物的呼吸链位于细胞膜上,膜损伤必然导致电子传递链的破坏和质子动力势的消除,致使ATP合成受阻,这也可能是山苍子精油通过膜损伤作用而产生抑菌效应的机制之一。

冷藏大黄鱼的优势腐败菌包括腐败希瓦氏菌、热杀索丝菌和温和气单胞菌,丁香酚、百里香酚及富含柠檬醛的植物精油对这3种优势腐败菌均具有显著抑制作用,其中山苍子精油对水产腐败菌的抑制作用可能通过膜损伤作用而实现,且其使用后不影响大黄鱼的感官接受性。可见,植物精油有望作为一种天然保鲜剂用于海产品保鲜。

#### 参考文献:

[1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016: 32.  
Fishery Bureau of Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture

Press, 2016: 32 (in Chinese).

- [2] 李学英, 许钟, 郭全友, 等. 大黄鱼冷藏过程中的鲜度变化[J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 442-450.  
Li X Y, Xu Z, Guo Q Y, et al. Changes of freshness in cultured *Pseudosciaena crocea* during chilled storage[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(3): 442-450(in Chinese).
- [3] 吕卫金, 赵进, 汪金林, 等. 茶多酚延缓冷藏大黄鱼肌原纤维蛋白变性降解机理研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 60-67.  
Lv W J, Zhao J, Wang J L, et al. Effects of tea polyphenols on preservation mechanism of myofibrillar protein from large yellow croaker[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(1): 60-67(in Chinese).
- [4] 汪金林, 赵进, 吕卫金, 等. 原花青素对冷藏养殖大黄鱼鱼片保鲜效果研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 130-136.  
Wang J L, Zhao J, Lv W J, et al. Study on fillet quality of *Pseudosciaena crocea* dip by oligomeric proanthocyanidins during cold storage[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(2): 130-136(in Chinese).
- [5] 陈丽娇, 郑明锋. 大黄鱼海藻酸钠涂膜保鲜效果研究[J]. 农业工程学报, 2003, 19(4): 209-211.  
Chen L J, Zheng M F. Freshness-keeping effect of large yellow croaker by coating with sodium alginate solution[J]. Transactions of the CSEE, 2003, 19(4): 209-211(in Chinese).
- [6] 李婷婷, 励建荣, 胡文忠. 可食性壳聚糖涂膜保鲜大黄鱼品质控制研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 147-152.  
Li T T, Li J R, Hu W Z. Effects of edible coatings chitosan on the shelf life of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(6): 147-152(in Chinese).
- [7] Rabea E I, Badawy M E T, Stevens C V, et al. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(6): 1457-1465.
- [8] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al. Biological effects of essential oils-a review[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(2): 446-475.
- [9] Hyldgaard M, Mygind T, Meyer R L. Essential oils in

- food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 3(12): 12.
- [10] Yildiz P O. Effect of essential oils and packaging on hot smoked rainbow trout during storage[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2015, 39(6): 806-815.
- [11] Mahmoud B S M, Yamazaki K, Miyashita K, *et al.* Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds[J]. *Food Microbiology*, 2004, 21(6): 657-666.
- [12] Kostaki M, Giatrakou V, Savvaidis I N, *et al.* Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets[J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(5): 475-482.
- [13] Sanjuás-Rey M, Pourashouri P, Barros-Velázquez J, *et al.* Effect of oregano and thyme essential oils on the microbiological and chemical quality of refrigerated (4 °C) ready-to-eat squid rings[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2012, 47(7): 1439-1447.
- [14] Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria-problems and solutions[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(3): 262-266.
- [15] Bekaert K, Devriese L, Maes S, *et al.* Characterization of the dominant bacterial communities during storage of Norway lobster and Norway lobster tails (*Nephrops norvegicus*) based on 16S *rDNA* analysis by PCR-DGGE[J]. *Food Microbiology*, 2015, 46: 132-138.
- [16] Stefanakis M K, Touloupakis E, Anastasopoulos E, *et al.* Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*[J]. *Food Control*, 2013, 34(2): 539-546.
- [17] Othman M, Loh H S, Wiart C, *et al.* Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(2): 161-166.
- [18] Lawless H T, Heymann H. 食品感官评价原理与技术 [M]. 王栋, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 430-475.
- Lawless H T, Heymann H. Sensory evaluation of food principles and practices[M]. Wang D, trans. Beijing: China Light Industry Press, 2001: 430-475 (in Chinese).
- [19] Barman S, Ghosh R, Mandal N C. Use of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LABW4 to prevent *Listeria monocytogenes* induced spoilage of meat[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5(22): 2115-2123.
- [20] Koutsoumanis K, Lampropoulou K, Nychas G J. Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15 °C[J]. *Journal of Food Protection*, 1999, 62(4): 398-402.
- [21] Ziemke F, Höfle M G, Lalucat J, *et al.* Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(1): 179-186.
- [22] 和承尧. 富含柠檬醛精油植物资源综合利用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2008: 7.
- He C Y. Comprehensive utilization of plant resources of essential oils riched in citral[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2008: 7 (in Chinese).
- [23] Owen R J, Legros R M, Lapage S P. Base composition, size and sequence similarities of genome deoxyribonucleic acids from clinical isolates of *Pseudomonas putrefaciens*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1978, 104(1): 127-138.
- [24] 郭全友, 杨宪时, 许钟, 等. 冷藏养殖大黄鱼细菌相组成和优势腐败菌鉴定[J]. *水产学报*, 2006, 30(6): 824-830.
- Guo Q Y, Yang X S, Xu Z, *et al.* Bacterial flora and identification of dominated spoilage organisms on cultured *Pseudosciaena crocea* at chilled storage[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(6): 824-830(in Chinese).
- [25] 张雯, 倪莉, 吕旭聪, 等. 大黄鱼鲜度评价及鲜度与细菌菌群的关系[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(7): 181-188.
- Zhang W, Ni L, Lv X C, *et al.* Freshness evaluation of iced fresh large yellow croaker and the relationship between freshness and bacterial flora[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(7): 181-188(in Chinese).
- [26] Ordóñez J A, Lopezgalvez D E, Fernandez M, *et al.* Microbial and physicochemical modifications of hake (*Merluccius merluccius*) steaks stored under carbon dioxide enriched atmospheres[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(13): 1831-1840.
- [27] Mamlouk K, Macé S, Guilbaud M, *et al.* Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR[J]. *Food Microbiology*,

- 2012, 30(1): 173-179.
- [28] Mejlholm O, Bøknæs N, Dalgaard P. Shelf life and safety aspects of chilled cooked and peeled shrimps (*Pandalus borealis*) in modified atmosphere packaging[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(1): 66-76.
- [29] 张雯, 倪莉, 黄志清, 等. 冰鲜大黄鱼肠腔细菌类群鉴定及菌群结构分析[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(12): 188-196.
- Zhang W, Ni L, Huang Z Q, *et al.* Species identification and analyses on intestine bacterial flora of iced fresh large yellow croaker[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(12): 188-196(in Chinese).
- [30] Castro-Escarpulli G, Figueras M J, Aguilera-Arreola G, *et al.* Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 84(1): 41-49.
- [31] Qian Y F, Xie J, Yang S P, *et al.* *In vivo* study of spoilage bacteria on polyphenoloxidase activity and melanosis of modified atmosphere packaged Pacific white shrimp[J]. *Food Chemistry*, 2014, 155(11): 126-131.
- [32] 葛阳杨, 朱军莉, 刘丽, 等. 大黄鱼源气单胞菌的分离鉴定及致病表型[J]. *水产学报*, 2017, 41(6): 861-869.
- Ge Y Y, Zhu J L, Liu L, *et al.* Spoilage phenotypic characterization and identification of *Aeromonas* isolated from spoiled *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(6): 861-869(in Chinese).
- [33] Wang H, Liu X C, Zhang Y M, *et al.* Spoilage potential of three different bacteria isolated from spoiled grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during storage at 4 °C[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 81: 10-17.
- [34] Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94(3): 223-253.
- [35] Gómez-Estaca J, de Lacey A L, López-Caballero M E, *et al.* Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation[J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(7): 889-896.
- [36] Nowak A, Kalembe D, Krala L, *et al.* The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere[J]. *Food Microbiology*, 2012, 32(1): 212-216.
- [37] Kim Y G, Rho B J, Lee K K, *et al.* Antimicrobial activity of *Artemisia princeps* var. *orientalis* essential oil against fish pathogenic bacteria[J]. *Journal of Fish Pathology*, 1994, 7(2): 113-117.
- [38] Li W R, Shi Q S, Liang Q, *et al.* Antibacterial activity and kinetics of *Litsea cubeba* oil on *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e110983.
- [39] Gill A O, Delaquis P, Russo P, *et al.* Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 73(1): 83-92.
- [40] Tassou C C, Drosinos E H, Nychas G J E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10 °C[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 78(6): 593-600.
- [41] Donsì F, Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 233: 106-120.
- [42] Wu J L, Ge S Y, Liu H, *et al.* Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation[J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2014, 2(1): 7-16.
- [43] Paul S, Dubey R C, Maheswari D K, *et al.* *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens[J]. *Food Control*, 2011, 22(5): 725-731.

## Antimicrobial effects and mechanism of action of essential oils against dominant spoilage bacteria isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) during chilled storage

MENG Yuxia<sup>1</sup>, CUI Huijing<sup>1</sup>, ZHAO Qiancheng<sup>1</sup>, LI Meng<sup>1</sup>,  
BIAN Chuhan<sup>1</sup>, BAI Rujian<sup>2</sup>, MA Yongsheng<sup>1\*</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Xinxing Cathay International Group Yili Agriculture and Animal Husbandry Science and  
Technology Development Co., Ltd., Yining 835000, China)

**Abstract:** To evaluate the feasibility of essential oils as natural preservatives in extending the shelf life of chilled large yellow croaker, the antimicrobial efficacy of 14 essential oils against the dominant spoilage bacteria from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) during chilled storage at 4 °C was investigated. The dominant spoilage bacteria were isolated from skin, body cavity, gill and intestine of large yellow croaker, and identified by the sequence similarity analysis of the 16S *rDNA* genes and physiological and biochemical test. The paper disc diffusion method and microbroth dilution technique were employed for the determination of antimicrobial activity of 14 essential oils. Sensory acceptability of fish treated with different quantities of essential oils were evaluated using a nine-point hedonic scale ranging from 1 (most disliked) to 9 (most liked). The mode of action of *Litsea cubeba* oil against spoilage bacteria was studied by scanning electron micrograph, measurement of release of intracellular lactate dehydrogenase (LDH), and 260 nm absorbing material. After dipping in a solution containing 4 μL/mL *L. cubeba* oil, the total microbial load, H<sub>2</sub>S- producing bacteria, total volatile bases nitrogen(TVB-N), and histamine content of refrigerated large yellow croaker fillets as a function storage time were determined. The results showed that a total of 6 strains of bacteria were identified as four strains of *Shewanella* spp., one strain of *Brochothrix thermosphacta* and one strain of *Aeromonas sobria*. The 14 essential oils showed different antimicrobial activity against spoilage bacteria isolates, and cinnamaldehyde had the highest activity with a minimum inhibitory concentration(MIC) of 0.125 μL/mL, followed by eugenol, thymol, citral, *Cymbopogon citratus* and *L. cubeba* oil, with MIC ≤ 0.5 μL/mL. The flavours of large yellow croaker fillets treated with eugenol, thymol, citral, *C. citratus* and *L. cubeba* oil were found to be acceptable. *L. cubeba* oil can disrupt the cytomembrane of spoilage bacteria isolates and cause the leakage of protease and nucleic acid. Dipping fish fillets in a solution of 4 μL/mL *L. cubeba* oil significantly reduced the total microbial load, H<sub>2</sub>S-producing bacteria, TVB-N, and histamine content. Eugenol, thymol, citral, *C. citratus*, and *L. cubeba* oil showed high antimicrobial activity against the dominant spoilage bacteria isolates from chilled large yellow croaker, and had no adverse effects on the organoleptic properties of the fish fillets. Therefore, it can be concluded that essential oils had the potential to be used as natural preservatives to enhance the shelf-life of seafood during chilled storage.

**Key words:** *Larimichthys crocea*; dominant spoilage bacteria; antimicrobial activities; essential oils; preservatives

**Corresponding author:** MA Yongsheng. E-mail: mayo@dlou.edu.cn

**Funding projects:** National Key Technology Support Program (2015BAD16B00) Sub-Program (2015BAD16B08); Liaoning Province Department of Education Fund Program (L201607); Doctoral Research Fund of Liaoning Province (20131010)