

# 壳聚糖复合保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌活性

倪荣<sup>1</sup>, 郭雪松<sup>1</sup>, 韩艳霞<sup>1</sup>, 张妍<sup>1</sup>, 李丹丹<sup>2\*</sup>, 张振<sup>1\*</sup>

(1. 锦州医科大学食品与健康学院, 辽宁锦州 121000) (2. 锦州医科大学生物信息工程学院, 辽宁锦州 121000)

**摘要:** 该实验以质量分数 1.5% 壳聚糖、0.14%  $\epsilon$ -聚赖氨酸、0.15% D-异抗坏血酸钠组成复合保鲜剂, 以荧光假单胞菌为实验菌株, 探究壳聚糖复合保鲜剂对水产品中的优势菌的抑菌性能和机理。实验方法: 通过测定最小抑菌浓度 (MIC)、抑菌圈、细菌生长曲线考察保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌活性, 测定 OD<sub>260</sub> 值、ATP 酶和 AKP 酶活性的变化, 细胞超微结构 (SEM) 和 SDS 凝胶电泳法研究保鲜剂的抑菌机制。结果表明: 壳聚糖复合保鲜剂对荧光假单胞菌的最低抑菌浓度 (MIC) 为 2.24 mg/mL。壳聚糖复合保鲜剂有着显著的抑菌活性, 壳聚糖复合保鲜剂导致菌体的细胞壁膜通透性增大、完整性被破坏, 菌体内 ATP 和 AKP 酶活性被抑制, 显著低于 ( $P < 0.05$ ) 对照组; SDS 凝胶电泳表明壳聚糖复合保鲜剂使菌蛋白条带颜色变浅且造成部分蛋白条带消失; 细菌超微结构 (SEM) 显示壳聚糖复合保鲜剂使菌体发生变形破裂, 内容物大量流出, 导致菌体死亡。结论: 该研究证明了壳聚糖复合保鲜剂良好的抑菌性能, 研究了保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌机理, 为水产品可食性涂膜保鲜的研发提供理论支持。

**关键词:** 壳聚糖复合保鲜剂;  $\epsilon$ -聚赖氨酸; D-异抗坏血酸钠; 荧光假单胞菌; 抑菌机理

文章编号: 1673-9078(2023)12-178-183

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1172

## Antibacterial Activity of Chitosan Composite Preservative against *Pseudomonas fluorescens*

NI Rong<sup>1</sup>, GUO Xuesong<sup>1</sup>, HAN Yanxia<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, LI Dandan<sup>2\*</sup>, ZHANG Zhen<sup>1\*</sup>

(1. College of Food and Health Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

(2. College of Bioinformation Engineering, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**Abstract:** In this experiment, 1.5% chitosan, 0.14%  $\epsilon$ -polylysine and 0.15% D-sodium isoascorbate were used to form a composite preservative, and *Pseudomonas fluorescens* was used as the experimental strain for investigating the inhibitory property and inhibition mechanism of the chitosan composite preservative against the dominant bacteria in aquatic products. Experimental methods: The inhibitory activity of the preservative against *Pseudomonas fluorescens* was investigated by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC), inhibition zone and bacterial growth curve. The changes in OD<sub>260</sub> value, ATPase and AKP enzymatic activities were determined, and SEM (for examining cellular ultrastructure) and SDS gel electrophoresis were used to study the antibacterial mechanism of the preservative. The results showed that the MIC of the chitosan composite preservative against *Pseudomonas fluorescens* was 2.24 mg/mL. The chitosan composite preservative exhibited significant antibacterial activity, and increased the permeability of cell wall membranes, destroyed the integrity of cell wall membranes, and inhibited the activities of ATP and AKP enzymes in the bacteria, compared with the control group ( $P < 0.05$ ). SDS gel electrophoresis showed that the chitosan composite preservative made the color of bacterial protein bands lighter and caused some protein bands to disappear; Bacterial ultrastructure analysis (by SEM) revealed that the chitosan composite preservative made the bacterial body deformed and ruptured, caused the contents to flow out in large quantities, resulting in the death of the bacteria strain. Conclusion: This study proved that the

引文格式:

倪荣, 郭雪松, 韩艳霞, 等. 壳聚糖复合保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 178-183

NI Rong, GUO Xuesong, HAN Yanxia, et al. Antibacterial activity of chitosan composite preservative against *Pseudomonas fluorescens* [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 178-183

收稿日期: 2022-09-16

基金项目: 辽宁省教育厅基本科研项目 (重点项目) (LJKZ0802); 锦州医科大学横向课题 (2021 年 031 号)

作者简介: 倪荣 (1997-), 女, 硕士在读, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: Nirong2813@163.com

通讯作者: 李丹丹 (1983-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 食品安全与质量控制, E-mail: lulang1111@163.com; 共同通讯作者: 张振 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工与安全控制, E-mail: zhangzhen8849@163.com

chitosan composite preservative has good antibacterial properties, and examined its antibacterial mechanism against *Pseudomonas fluorescens*, which provides theoretical support for the research and development of edible coatings for preservation of aquatic products.

**Key words:** chitosan complex preservative;  $\epsilon$ -polylysine; sodium D-isoascorbate; *Pseudomonas fluorescens*; bacterial inhibition mechanism

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*, *P. fluorescens*), 属于  $\gamma$ -变形杆菌纲, 是冷藏水产品中常见的一类革兰氏阴性菌, 可导致水产品的脂肪氧化酸败, 蛋白质表达改变<sup>[1]</sup>。陶飞燕<sup>[2]</sup>通过对微冻贮藏南美白对虾的高通量测序表明, 在贮藏 4 周后, 假单胞菌属、希瓦氏菌属成为各组样品的优势菌属, 导致对虾腐败变质。

壳聚糖 (Chitosan, CS), 是甲壳素的脱乙酰产物, 其不易溶解于水, 多使用酸性溶液溶解, 在酸性溶液中有更强的抑菌性, CS 对微生物通过阻隔蛋白质的形成, 破坏微生物的细胞结构, 达到对食品的抑菌保鲜目的<sup>[3]</sup>。虽然单一壳聚糖抑菌活性好, 但存在抗氧化能力弱、抑菌谱较窄等不足, 通过围栏理论, 加入不同类型保鲜剂, 形成复合型保鲜剂起到协同抑菌效果。 $\epsilon$ -聚赖氨酸 ( $\epsilon$ -Polylysine,  $\epsilon$ -PL) 对各种细菌、真菌及部分病原体等有广谱抑菌性, 通过改变细胞膜的完整性和通透性来显示其抗菌活性<sup>[4]</sup>。D-异抗坏血酸钠 (Sodium D-isoascorbate, D-SE) 是食品良好的护色剂和保鲜剂, 能够有效抑制食品发生氧化, 李月番等<sup>[5]</sup>表明 D-异抗坏血酸钠对冷却牛肉在储藏期内有效抑制微生物及脂质的氧化, 延长货架期。有研究证明聚赖氨酸-壳聚糖结合物组合能形成更强的抗菌活性, 增加细胞膜通透性<sup>[6]</sup>。本文以前期从 4 °C 中国对虾中分离得到的优势腐败菌 *P. fluorescens* 为实验菌<sup>[7]</sup>, 研究壳聚糖复合保鲜剂对 *P. fluorescens* 抑菌机理, 先测定最小抑菌浓度, 生长曲线和抑菌圈, 壳聚糖复合保鲜剂的抑菌能力, 然后测定保鲜剂作用于 *P. fluorescens* 的 AKP、ATP 酶活力、SEM、蛋白质含量实验, 深入探讨壳聚糖复合保鲜剂对 *P. fluorescens* 细胞膜破坏性, 分析壳聚糖复合保鲜剂对 *P. fluorescens* 的抑菌机理, 为水产品保鲜的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、材料与试剂

荧光假单胞菌由实验前期分离纯化得到; 壳聚糖 (脱乙酰度  $\geq 95\%$ ), 上海阿拉丁科技有限公司; D-异抗坏血酸钠, 江西省德兴市百勤异抗坏血酸钠有限公司;  $\epsilon$ -聚赖氨酸 (食品级, 含量  $\geq 99.8\%$ ), 陕西晨明生物科技有限公司; 超微量  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATP 酶测试盒、碱性磷酸酶 (AKP) 测试盒, 南京建成生物工程研究

所; 考马斯亮蓝 R-250, 天津市科密欧化学试剂有限公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、PBS 缓冲液、戊二醛溶液, 购于北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 主要仪器

SHA-B 水浴恒温振荡器, 金坛市科系仪器有限公司; VarioskanFlashT 多功能酶标仪, 山东普朗 (DNM-9602G); GL-25MS 高速冷冻离心机, 上海卢湘仪器有限公司; DCodeTM System 蛋白电泳仪, 美国 BIO-Rad 公司; ZQPW-70 全温振荡培养箱, 天津莱玻特瑞; UV1810 紫外可见分光光度计, 鑫贝西科学仪器有限公司; 蔡司 SIGMA HD 场发射扫描电子显微镜, 德国卡尔蔡司公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 复合保鲜剂制备

壳聚糖复合保鲜剂: 壳聚糖溶于 1.0% (体积分数) 的冰乙酸与  $\epsilon$ -聚赖氨酸、D-异抗坏血酸钠按一定比例复配, 配比质量浓度为 CS 15 g/L、 $\epsilon$ -PL 1.4 g/L、D-SE 1.5 g/L。

#### 1.3.2 最小抑菌浓度测定 (MIC)

根据刘海晴等<sup>[8]</sup>方法对浓度较高的初始保鲜剂以二倍稀释法分为 5 个梯度, 各取 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔酶标板中再取 100  $\mu\text{L}$  实验菌株的菌悬液加入不同梯度保鲜液的酶标孔里, 30 °C 培养箱中培养 24 h, 阳性对照组有菌生长, 阴性对照组无菌生长, 三次平行实验。

#### 1.3.3 抑菌圈测定

参考 Zhang 等<sup>[9]</sup>的方法, 采用滤纸片法测定保鲜剂对 *P. fluorescens* 的抑制效果。

#### 1.3.4 细菌生长曲线测定

参考宁亚维等<sup>[10]</sup>的方法适当修改, 调整菌液浓度为  $10^5$  CFU/mL, 加入保鲜剂以 30 °C, 160 r/min 振荡培养, 12 h 内每间隔 2 h 测定 600 nm 处吸光值, 绘制生长曲线, 另以不添加保鲜剂为对照组。

#### 1.3.5 细胞膜完整性测定

参考于晓慧等<sup>[11]</sup>的方法略作改动, 调整菌液浓度为  $10^5$  CFU/mL, 处理后菌悬液中加入等量保鲜剂, 置于 30 °C, 160 r/min 摇床中震荡培养, 12 h 内每间隔 2 h 培养液离心, 取上清液, 用紫外分光光度计于 260 nm 处测定吸光值, 以无菌生理盐水代替保鲜剂作为对照组。

### 1.3.6 菌体 AKP、ATP 酶活性测定

按照 AKP、ATP 测定试剂盒说明分别测量细菌胞内碱性磷酸酶含量 (AKP)、三磷酸腺苷 (ATP) 含量。

### 1.3.7 复合保鲜剂对细菌微观形态的影响

参考 Wei 等<sup>[12]</sup>的方法, 进行适当修改: 调整菌液浓度为  $10^5$  CFU/mL, 处理组加入保鲜剂, 对照组加入灭菌的生理盐水, 在 30 °C, 170 r/min 培养 12 h 后, 各组菌液 6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, PBS 冲洗菌体沉淀三次, 随后用 2.5% (V/V) 戊二醛于 4 °C 固定 12 h, 用无菌水洗滌和离心两次后, 梯度乙醇脱水, 离心, 37 °C 下干燥 72 h。喷洒金后, 通过 SEM 对细菌的微观形态进行表征, 未经处理的细菌作为对照组。

### 1.3.8 SDS-PAGE

参考 Li 等<sup>[13]</sup>的方法, 处理各组菌液与保鲜剂进行

表 1 壳聚糖复合保鲜剂的最小抑菌浓度

保鲜剂/(mg/mL)	17.9	8.95	4.48	2.24	1.12	阳性对照组	阴性对照组
OD <sub>600</sub>	-	-	-	-	+	+	-

注: “-”号代表未出现浑浊, “+”号代表出现浑浊。

从表 1 可以看出, 当壳聚糖复合保鲜剂质量浓度为 1.12 mg/mL 时测得的吸光值与阳性对照管相同, 说明在此质量浓度下有菌生长, 从而得出复合保鲜剂对荧光假单胞菌的最小抑菌质量浓度为 2.24 mg/mL。

## 2.2 抑菌圈的测定

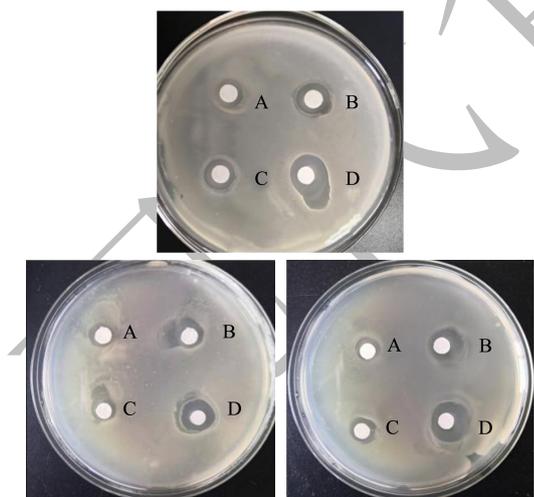


图 1 壳聚糖复保鲜剂对荧光假单胞菌的抑菌圈

Fig.1 The inhibitory zone of chitosan composite preservative against *P. fluorescens*

注: A 为 0.56 mg/mL 组; B 为 2.24 mg/mL 组; C 为 1.12 mg/mL 组; D 为 4.48 mg/mL 组。三幅图为 3 次平行实验。壳聚糖复合保鲜剂对 *P. fluorescens* 的抗菌性能如图 1 所示。四组实验组对菌都有抑制作用, 0.56 mg/mL

培养后, 按照 SDS-PAGE 凝胶试剂盒说明制胶、脱色, 拍照记录。

## 1.4 数据分析

应用 SPSS 统计软件对实验数据进行统计学分析, Graphpad Prism 8 和 Excel 2010 对试验数据分析及绘图, 不同试验均进行 3 次, 取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 最低抑菌浓度 (MIC) 的测定

以从冷藏中国对虾中分离出来的荧光假单胞菌为测试菌, 对一定浓度的复合保鲜剂, 进行二倍稀释后测定 OD<sub>600</sub> 吸光值, 得到复合保鲜剂的最小抑菌浓度, 结果如表 1 所示。

组作用于菌的抑菌圈直径为 7.8 mm, 而 1.12 mg/mL 组与 2.24 mg/mL 组都有较好的抑菌能力抑菌圈直径分别为 8.83、10.83 mm, 4.48 mg/mL 组的抑菌能力非常明显, 抑菌圈直径 13.2 mm, 抑菌圈直径显著 ( $P < 0.05$ ) 高于其它处理组, 说明壳聚糖复合保鲜剂对 *P. fluorescens* 有很好的抑菌性。

### 2.3 壳聚糖复合保鲜剂对细菌生长曲线的影响

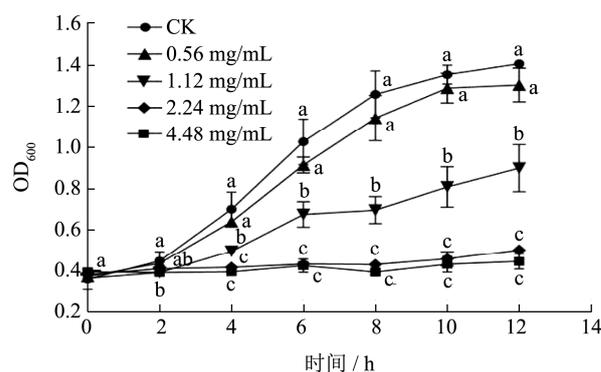


图 2 壳聚糖复合保鲜剂对荧光假单胞菌的生长曲线影响

Fig.2 Effect of chitosan compound preservative on growth curve of *P. fluorescens*

注: 图 2 中所标的小写字母表示同一贮藏时间不同处理组的比较, 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。图 3、4 同。

细菌生长曲线在一定条件下, 表现出微生物的生长规律, 通过测定生长曲线的变化, 表征复合保鲜剂对细菌生长曲线的影响, 如图 2, 通过 OD<sub>600 nm</sub> 下紫

外吸收值的测定发现,随着复合保鲜剂浓度的增加,对菌体生长曲线的影响越明显,对照组的菌体(CK)生长状况良好,随着复合保鲜剂浓度的增加,OD<sub>600</sub>的吸收值受到抑制,2.24 mg/mL 质量浓度下,吸收值变化与 0 h 时变化不明显,表明此浓度使细菌生长得到抑制,与前期实验结果是相一致的,低于 2.24 mg/mL 质量浓度的实验组,OD<sub>600</sub>值有所增加,但低于对照组。结果表明 2.24 mg/mL 是最适抑菌浓度,为后续展开抑菌机理研究提供实验依据。

### 2.4 壳聚糖复合保鲜剂对菌液紫外吸收的影响

细胞膜保护细胞,控制细胞内外物质的进出,核酸等大分子物质无法通过细菌细胞壁膜的微孔道进出,但在细胞膜破坏后,细胞内容物极易外渗,其中大分子物质中的 DNA、RNA 在 260 nm 处具有强吸收值,因此,通过测定细菌在 260 nm 的吸收物质量,确定保鲜剂对细菌细胞膜完整性的破坏强度<sup>[14]</sup>。由图 3 可知,对照组 OD<sub>260</sub>随着时间增加与 0 h 吸收值相对变化不显著 ( $P>0.05$ );实验组中 OD<sub>260</sub>值随着各组作用时间的增加而增大,4 h 前各质量浓度组初期 OD<sub>260</sub>值并没有明显区别,但随着时间的延长,在 4 h 之后,各质量浓度之间有明显差异,该结果与张楠楠<sup>[15]</sup>研究  $\epsilon$ -赖氨酸对腐败希瓦氏菌的紫外吸收结果相似。0.56 mg/mL 组菌悬液的 OD<sub>260</sub>值与 CK 组 OD<sub>260</sub>值整体无显著差异 ( $P>0.05$ ),说明 0.56 mg/mL 质量浓度对于菌体细胞膜的破坏作用较小,OD<sub>260</sub>值变化不明显。加入 2.24 mg/mL 和 4.48 mg/mL 质量浓度的菌液 OD<sub>260</sub>值随着时间的增加迅速上升,显著高于其它组 ( $P<0.05$ )。结果初步表明壳聚糖复合保鲜剂能够破坏荧光假单胞菌体细胞膜的完整性,使菌体内核酸等内容物外渗。

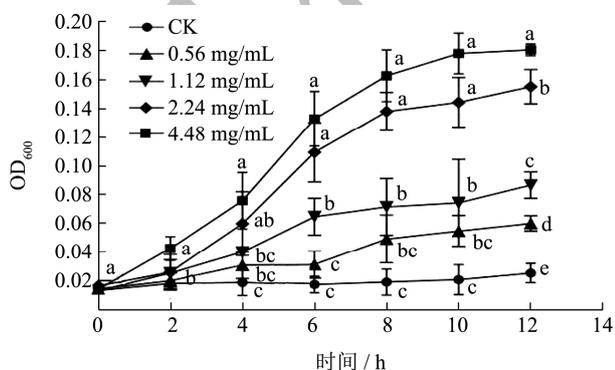


图 3 壳聚糖复合保鲜剂对荧光假单胞菌的紫外吸收的影响

Fig.3 Effects of chitosan compound preservatives on UV absorption of *P. fluorescens*

### 2.5 壳聚糖复合保鲜剂对假单胞菌 AKP 和 ATP 酶活性的影响

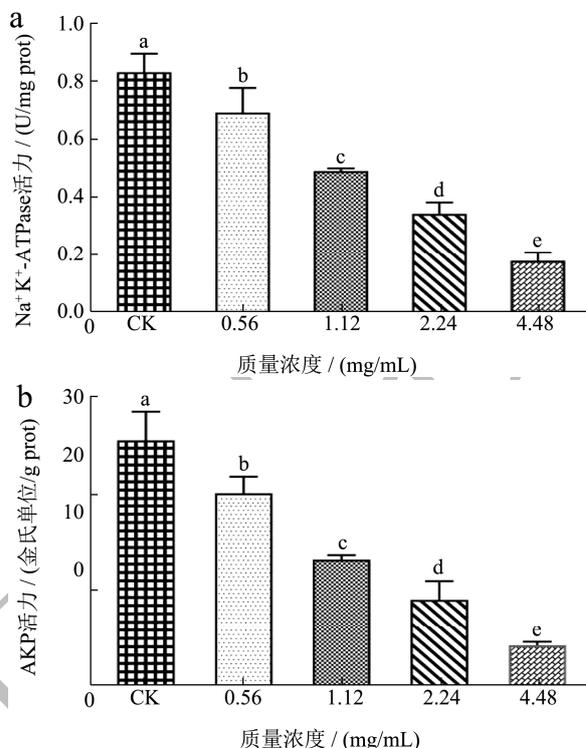


图 4 壳聚糖复合保鲜剂对假单胞菌 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶 (a) 和 AKP 酶活性的变化 (b)

Fig.4 Changes of chitosan complexes on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (a) and AKP enzyme activities (b) of *P. fluorescens*

由图 4a 可见,各处理组处理后的 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶活力显著低于 CK 组 ( $P<0.05$ ),说明壳聚糖复合保鲜剂能够对细菌的细胞膜进行破坏,并显著抑制 ATP 酶活力。处理组之间 ATP 酶的活力也存在显著性差异 ( $P<0.05$ ),而经 4.48 mg/mL 组处理后的 ATP 酶的活力远低于各组的 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶活力值,抑制能力突出。说明壳聚糖复合保鲜剂处理后,抑制了酶活力,造成 ATP 能量不能正常供给,从而导致细菌的生长代谢被阻碍,进而菌体死亡。此项研究表明壳聚糖复合保鲜剂能够破坏菌体细胞膜的完整性,造成 ATP 酶活力降低,有效抑制假单胞菌的生长繁殖。徐宇辰<sup>[16]</sup>研究表明阿魏酸甲酯作用于腐败希瓦氏菌会降低 ATP 酶活力,破坏细胞膜完整性。由图 4b 可见,经各处理组处理后的细菌 AKP 酶活力显著低于 CK 组 ( $P<0.05$ ),各处理组之间 AKP 酶活力值也存在显著性差异 ( $P<0.05$ ),说明壳聚糖复合保鲜剂抑制菌体 AKP 酶活力的能力显著有效,这与王明等<sup>[17]</sup>研究结果

相似。分析认为,壳聚糖与 $\epsilon$ -聚赖氨酸在进入菌体的细胞壁膜后,抑制生物膜形成,破坏细菌生长代谢<sup>[18,19]</sup>。因此ATP与AKP酶的活力降低,可能是保鲜剂进入菌体内部,通过破坏了细菌生长代谢环境,抑制酶的活性,破坏了菌体细胞膜的完整性。壳聚糖复合保鲜剂通过三种保鲜剂复配使用具有协同效果,抑菌性更强。

## 2.6 壳聚糖复合保鲜剂对菌体微观形貌的影响

各处理组对 *P. fluorescens* 的微观形貌见图 5 可知,未经处理对照组(CK)每一个单菌落形态完整,均匀分布。但随着抑菌浓度增加,能看到菌体出现明

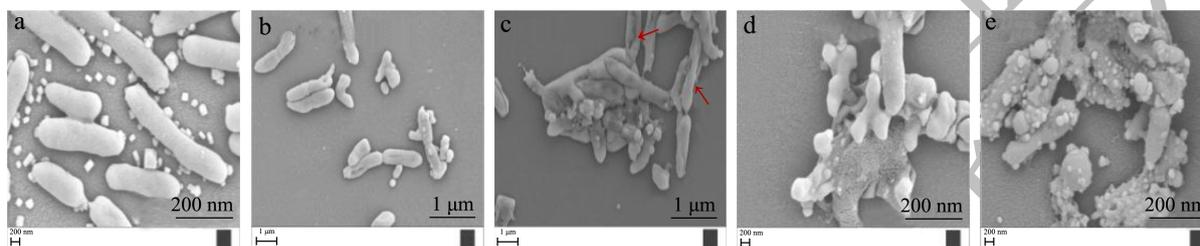


图 5 壳聚糖复合保鲜剂处理后荧光假单胞菌的 SEM 图

Fig.5 SEM image of *Pseudomonas fluorescens* treated with chitosan composite preservative

注: a 为 CK 组, b-e 的壳聚糖复合保鲜剂质量浓度分别为 0.56、1.12、2.24、4.48 mg/mL。

## 2.7 SDS 电泳蛋白

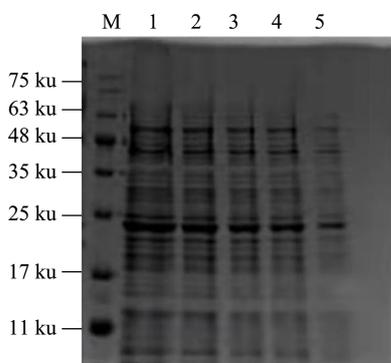


图 6 壳聚糖复合保鲜剂处理后荧光假单胞菌的电泳图

Fig.6 Electrophoresis of *Pseudomonas fluorescens* treated with chitosan composite preservative

注:泳道 1 为 CK 组;泳道 2 为 0.56 mg/mL 组;泳道 3 为 1.12 mg/mL 组;泳道 4 为 2.24 mg/mL 组;泳道 5 为 4.48 mg/mL 组。

蛋白质是生命体完整活动的重要承担者,参与生命体的代谢及生长,通过测定细菌的蛋白质可以得知细菌的生长状况,侧面反映保鲜剂的抑菌效果。结果如图 6 所示,CK 组的蛋白条带完整清晰且颜色较深,而经 0.56、1.12、2.24 mg/mL 组处理的蛋白条带与对照组相比数量无明显变化但颜色变浅且条带变窄。4.48 mg/mL 组的蛋白条带与其它组相比有明显差异,蛋白条带颜色非常浅,分子质量在 11~25 ku 之间的蛋白条带消失,说明复合保鲜剂对细菌合成蛋白的抑制

显的凹陷、内容物外渗、菌体之间粘连聚团等现象。分析认为,壳聚糖复合保鲜剂的抑菌机理是因为 $\epsilon$ -聚赖氨酸与 D-异抗坏血酸钠的加入,改善了单一壳聚糖的性能,使膜的有序性增强,壳聚糖分子中的-NH<sub>2</sub>质子化-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>与细菌细胞壁膜上的脂多糖带负电的阴离子结合增强静电作用能力<sup>[20,21]</sup>,改变了细菌的通透性,保鲜剂作用菌体后,可能使内容物中的多糖类物质外渗,造成菌体成团状聚集出现,通过微观结构验证了壳聚糖复合保鲜剂对荧光假单胞菌细胞壁,细胞膜完整性有一定破坏性。

能力强,结合扫描电镜结果,初步判断复合保鲜剂通过影响菌体细胞的完整性和通透性,导致内容物外泄,大分子合成机制受阻,蛋白质成分及含量减少,最终实现抑制菌体生长。

## 3 结论

本实验以配比质量浓度壳聚糖 15 g/L、 $\epsilon$ -赖氨酸 1.4 g/L、D-异抗坏血酸钠 1.5 g/L 为壳聚糖复合保鲜剂, MIC 质量浓度为 2.24 mg/mL,作用于 *P. fluorescens*, 研究保鲜剂的抑菌活性及作用机理。研究表明,壳聚糖复合保鲜剂可以有效抑制细菌的生长繁殖,破坏细胞膜的完整性以及阻碍蛋白质合成,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶和 AKP 酶活力被显著抑制,保鲜剂通过影响细菌代谢及表达进一步使细菌死亡达到抑菌目的。经壳聚糖复合保鲜剂处理后的菌体表面发生凹陷、内容物流出、菌体聚集成团的现象。通过实验证明了壳聚糖复合保鲜剂对荧光假单胞菌有着良好的抑菌性能,为该可食性涂膜保鲜剂的应用提供了实验数据。

## 参考文献

- [1] 查代明,张炳火,李汉全,等.假单胞菌属脂肪酶的分子生物学研究进展[J].中国生物工程杂志,2015,35(9):114-121.
- [2] 陶飞燕.微冻贮藏南美白对虾品质变化及其响应机理研究[D].上海:上海海洋大学,2021.
- [3] 刘瑶,钟志梅.壳聚糖及其衍生物的抑菌活性研究概述[J].

- 科技资讯,2021,19(11):112-115,130.
- [4] ZHANG Xiaowei, SHI Ce, LIU Zuoqia, et al. Antibacterial activity and mode of action of  $\epsilon$ -polylysine against *Escherichia coli* O157:H7 [J]. Journal of Medical Microbiology, 2018, 67(6): 838-845.
- [5] 李月番,高莉,王敬臣,等.D-异抗坏血酸钠对冷却牛肉的保鲜效果研究[J].中国高新科技,2018,20:26-28.
- [6] LIANG Chunxuan, YUAN Fang, LIU Fuguo, et al. Structure and antimicrobial mechanism of  $\epsilon$ -polylysine-chitosan conjugates through Maillard reaction [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 70: 427-434.
- [7] 倪荣,齐懿涵,马晓璐,等.冷藏中国对虾优势腐败菌的分离鉴定及致病能力分析[J].食品工业,2022,43(7):162-167.
- [8] 刘海晴,李万鹏,王奕飞,等.酿酒黄水对希瓦氏菌和假单胞菌抑菌机理的研究[J].食品与发酵工业,2022,48(5):68-74.
- [9] ZHANG Jiatao, LI Yinchang, 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.
- [10] 宁亚维,侯琳琳,李明蕊,等.苯乳酸对荧光假单胞菌基于细胞膜损伤和 DNA 破坏的双靶位抑菌机制[J].食品科学, 2021,42(7):60-67.
- [11] 于晓慧.即食小龙虾保鲜剂的复配及其抑菌机理的初步研究[D].合肥:合肥工业大学,2017.
- [12] WEI Xuqing, LI Qiuying, WU Chaoling, 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.
- [13] Li Y Q, Han Q, Feng J L, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of  $\epsilon$ -poly-lysine against *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* [J]. Food Control, 2014, 43: 22-27.
- [14] 张璇.茶多酚缓释体系的建立及其保鲜性能和抗菌机理研究[D].锦州:渤海大学,2019.
- [15] 张楠楠.复合生物保鲜剂结合真空包装对冰鲜大黄鱼品质及腐败菌作用机制的影响[D].上海:上海海洋大学,2019.
- [16] 徐宇辰.阿魏酸甲酯对腐败希瓦氏菌的抑菌机制及其同轴静电纺丝膜的制备与保鲜应用[D].锦州:渤海大学,2021.
- [17] 王明,张家涛,周斌,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.
- [18] GUO Aijie, WANG Feihu, LIN Wentao, et al. Evaluation of antibacterial activity of N-phosphonium chitosan as a novel polymeric antibacterial agent [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67: 163-171.
- [19] 吴旻. $\epsilon$ -聚赖氨酸抗菌活性的影响因素及其抗菌膜的研究[D].武汉:武汉轻工大学,2020.
- [20] Krishnaveni R, Thambidurai S. Industrial method of cotton fabric finishing with chitosan-ZnO composite for anti-bacterial and thermal stability [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 47: 160-167.
- [21] Vallapa N, Wiarachai O, Thongchul N, et al. Enhancing antibacterial activity of chitosan surface by heterogeneous quaternization [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 868-875.