

壳聚糖复合精油组分在鸭梨保鲜中的应用

王京法, 孙志强, 杨 滨, 马立萍

(昆明学院 旅游学院滇菜研究中心, 云南 昆明 650214)

摘 要:以 6 种精油 (EOs) 组分为试材, 并添加至壳聚糖中, 通过体外试验测定了其对于鸭梨 (*Pyrus bretschneideri*) 采后致病真菌的最小抑菌浓度, 从中选择百里酚、柠檬醛、香叶醇添加到壳聚糖中测定其对鸭梨保鲜质量的影响, 并研究其协同抗菌能力和复合后添加到壳聚糖对于鸭梨接种青霉 (*Penicillium expansum*) 发病情况的影响。结果表明: 所选精油组分对 4 种鸭梨采后致病真菌均具不同程度的抑制能力, 百里酚、香叶醇、柠檬醛具有较强的抑菌能力且它们之间存在协同抑菌作用, 复配剂添加到壳聚糖中可以显著改善鸭梨储藏中的抗病能力, 3 种精油组分添加到壳聚糖中不会降低壳聚糖对鸭梨保鲜硬度、失重和可溶性固形物 (SSC) 的积极作用, 精油组分具有改善壳聚糖作为可食用保鲜膜抗菌性不足的潜在应用价值。

关键词:精油组分; 壳聚糖; 复合膜; 水果; 病菌

中图分类号:TS 255.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0120-05

果蔬采后真菌致腐是导致果蔬采后损失的一个重要因素, 控制病害的发生对减少采后损失具有重要意义。化学合成杀菌剂因其高效和成本优势在果蔬防腐中一直扮演重要角色, 但是近年来化学合成杀菌剂因其毒性残留、致癌、环境污染和易逐渐引起病菌耐受而受到人们广泛关注, 因此化学合成杀菌剂的使用越来越多地受到限制^[1]。壳聚糖作为一种可食用膜在果蔬保鲜的研究中受到广泛关注, 壳聚糖涂膜可以减少果蔬储藏过程中水分的散失、降低果蔬呼吸代谢, 并在一定程度上增加果蔬的抗病能力, 研究证明壳聚糖涂膜可以延长番木瓜^[2]、草莓^[3]、丝瓜^[4]和西红柿^[5]的储存时间。壳聚糖应用在果蔬保鲜中还存在一些缺陷, 其中包括抗菌性能不是非常理想, 研究证明, 当在壳聚糖中加入其它抗菌剂时复合膜保鲜防腐效果会变得更好^[6-7]。很久以前人们便意识到一些植物精油 (EOs) 含有抗菌成分, 利用植物精油可以防止某些食物在存储过程中腐烂变质^[8]。植物精油是一种混合物, 同一种植物精油来源地不同或者来自同一株植物的不同部位其组成存在差异, 而且不同成分之间在抗菌行为上存在复杂关系, 不同成分之间既可能存在拮抗也可能存在协同的抗菌现象, 这给一些精油的抗菌研究带来一定的不确定性。该研究选择精油组分进行体外抗菌性能测定, 并将精油组分加入壳聚

糖对鸭梨 (*Pyrus bretschneideri*) 进行涂膜, 研究复合膜对鸭梨储藏指标的影响和对壳聚糖抗菌能力的改善情况, 旨在为精油组分应用于果蔬储藏保鲜提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试鸭梨 (*Pyrus bretschneideri*) 购自昆明市金马正昌果品市场。精油母液: 百里酚、芳樟醇、肉桂醛、香叶醇、丁香酚、柠檬醛均购自 Sigma 公司, 纯度均大于 97%, 用二甲亚砜 (DMSO) 溶解配制成 100 g/L 的溶液作为母液冷藏备用。5.00 g/L 的壳聚糖溶液: 壳聚糖 (脱乙酰度 ≥ 90 , 分子量为 100 kD), 购自济南海贝海洋工程生物有限公司, 将壳聚糖用 1% (v/v) 乙酸水溶液溶解, 再用 2 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 5.0。孢子悬液: 用含 0.05% 吐温-80 的灭菌蒸馏水, 冲洗培养约 10 d 的病菌平板培养物, 经血小球计数板计数, 配制成 10^9 CFU/L 的孢子悬液。

试验仪器为电子分析天平、显微镜、相机、移液器、手持折光仪、果实硬度计。

1.2 试验方法

首先选择 6 种精油组分通过系列稀释测定其对鸭梨常见致病真菌的最小抑菌浓度, 从中选择体外抑菌能力较好的 3 种精油组分加入壳聚糖中, 研究其对壳聚糖应用于鸭梨涂膜保鲜时, 对鸭梨失重率、硬度、可溶性固形物含量的影响, 其后通过棋盘法研究它们之间的协同抑菌能力, 并选择其中 3 个组合添加到壳聚糖中对鸭梨

第一作者简介:王京法(1975-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为食材开发与保鲜及餐饮战略管理。E-mail: daomisao@sohu.com.

基金项目:昆明学院引进人才科研资助项目 (YJL12006)。

收稿日期:2015-05-19

进行涂膜,研究复合膜对鸭梨损伤接种后的发病率和病斑扩展速度的影响,最后通过浸泡菌丝研究精油组分对菌丝形态的影响。

1.3 项目测定

1.3.1 精油组分最小抑菌浓度(MIC)测定 参照美国临床实验室标准化委员推荐的药敏测定方法^[9]进行微调,用灭菌马铃薯葡萄糖培养基(PDB)稀释各精油组分母液使其各精油组分浓度分别为0.00、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80 g/L。使用96孔灭菌培养板,每孔加入180 μ L的样品稀释液,然后加入20 μ L的孢子悬液,27℃培养约48 h至对照长出菌丝进行观察,把未长出菌丝的最低精油组分浓度作为该样品的最小抑菌浓度,试验重复3次。

1.3.2 精油组分复合壳聚糖涂膜鸭梨对其失重率、硬度、可溶性固形物含量影响 5.00 g/L的壳聚糖溶液加入百里酚、香叶醇或柠檬醛母液,使精油组分最终浓度均为0.50 g/L,搅拌和振荡,将果实浸泡于各个溶液中1 min,取出自然晾干后,置于塑料框中,并用聚乙烯袋包装,于20℃,85%~95% RH贮藏,对照为蒸馏水。每处理用果6个,重复3次,测定其失重率、硬度(将果实中部去皮测定)、可溶性固形物(SSC)含量随时间的改变。

1.3.3 精油组分之间协同抑制青霉菌测定 将不同浓度的百里酚、香叶醇、柠檬醛抗菌药物如图1按棋盘法两两组合加入96孔板,每孔中每种组分溶液加入90 μ L,加入青霉菌(*Penicillium expansum*)孢子悬液20 μ L,A₁、A₂、A₃分别为A物质单独最小抑菌浓度的1/2、1/4、1/8,B₁、B₂、B₃分别为B单独最小抑菌浓度的1/2、1/4、1/8,27℃培养24~48 h,待对照长出菌丝即可进行观察。结果判定根据FRANZOT等^[10]的方法进行,FIC指数=(A联合时MIC/A单独时MIC)+(B联合时MIC/B单独时MIC),FIC指数>2为拮抗、1~2无关、1为相加、≤1协同。

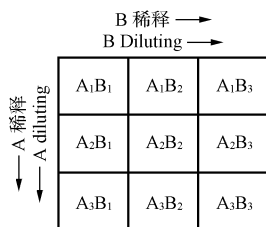


图1 棋盘稀释法示意图

Fig. 1 Sketch map of checkerboard method

1.3.4 精油组分协同抗菌在果体上的测定 选择成熟度适中,大小均一,无病虫害,无机械伤的果实,用75%的酒精溶液擦洗果体,自来水冲洗约5 min,晾干备用。用接种针在果实胴部刺2个3 mm×3 mm的伤口,将伤口表面晾干,用棉花蘸取精油组分和壳聚糖溶液的复合

物对梨果进行涂膜,处理液稍干后(约需2 h),每孔接种青霉菌(*Penicillium expansum*)悬浮液15 μ L。伤口晾干后将果实放在300 mm×200 mm×100 mm的塑料包装盒中,外套塑料袋以保持约95% RH相对湿度,25℃存放。自处理完毕72 h开始每24 h测定果实的发病率和病斑直径。每处理15个果实,重复3次。

1.3.5 精油组分对青霉菌菌丝形态影响的测定 用打孔器在生长3 d的菌丝体培养基上打取6 mm直径的青霉菌(*Penicillium expansum*)菌片,置于对照及含有百里酚、香叶醇或柠檬醛0.50 g/L PDB培养基中(2 mL PDB盛放在10 mL的试管中约20.93 r/s震荡),2 d后观察结果。

1.4 数据分析

水果病斑直径分析利用SPSS 12.0软件单向方差分析(ANOVA),平均值比较使用最小显著性差异法(LSD检验)比较。

2 结果与分析

2.1 精油组分对菌鸭梨致病菌的最小抑菌浓度

据表1可知,所选6种精油组分除芳樟醇、肉桂醛和丁香酚外,其余精油组分对4种致病菌的最小抑菌(MIC)浓度大多为0.20 g/L,均具有比较好的抑菌能力,选择百里酚、柠檬醛、香叶醇进一步研究。

表1 各精油组分最小抑菌浓度

Table 1 MIC of the components of EOs against pathogens g/L				
精油组分	青霉菌	链格孢	褐腐菌	红单端孢菌
Essential oil component	<i>P. expansum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>T. roseum</i>
百里酚 Thymol	0.20±0.00a	0.20±0.00a	0.20±0.00a	0.20±0.00a
柠檬醛 Citral	0.20±0.00a	0.20±0.00a	0.20±0.00a	0.20±0.00a
香叶醇 Geraniol	0.20±0.00a	0.40±0.00b	0.20±0.00a	0.20±0.00a
芳樟醇 Linalool	0.80±0.00b	>0.80±0.00c	>0.80±0.00c	>0.80±0.00c
肉桂醛 Cinnamaldehyde	0.20±0.00a	0.40±0.00b	0.20±0.00a	0.40±0.00b
丁香酚 Eugenol	0.20±0.00a	0.40±0.00b	0.40±0.00b	0.40±0.00b

2.2 精油组分复合壳聚糖涂膜对鸭梨储藏失重率、硬度、可溶性固形物含量影响

由图2可知,壳聚糖处理可以阻止水分的散失,从而能延缓失重率的增加,含0.50 g/L精油组分壳聚糖涂膜的鸭梨失重率在试验结束时略低于纯壳聚糖涂膜的鸭梨,但该试验不同处理间差异不显著,5.00 g/L的壳聚糖可以在梨表面成膜,但是成膜不是特别好,这可能影响了膜对鸭梨储藏失重的降低能力。相关研究证明植物精油可以延缓水果变软和水分丧失^[11],该试验表明,精油组分添加到壳聚糖中虽然未表现出显著改善壳聚糖延缓鸭梨失重的能力,但数据显示精油组分不会降低壳聚糖延缓鸭梨失重的能力;对照组的果实在储藏过程中硬度呈明显下降趋势,壳聚糖涂膜和壳聚糖复合精油组分涂膜均能显著的延缓果实硬度的下降。贮藏至31 d时,壳聚糖涂膜处理、壳聚糖复合百里酚、香叶醇、

柠檬醛处理的果实硬度分别较对照都高;采后鸭梨果实的可溶性固形物在储藏第1周迅速下降,之后变化平稳最终少许上升,这可能是由于储藏过程中淀粉酶活性升高,促进了部分淀粉分解成糖。壳聚糖及壳聚糖复合精油组分各组果实的处理可溶性固形物在储藏1周后也

略有下降,但下降幅度明显小于对照组。随着贮藏时间的延长,处理组果实的可溶性固形物始终保持在较高水平。百里酚、香叶醇、柠檬醛添加到壳聚糖中不会降低壳聚糖在鸭梨保鲜中对失重、硬度和可溶性固形物的积极作用。

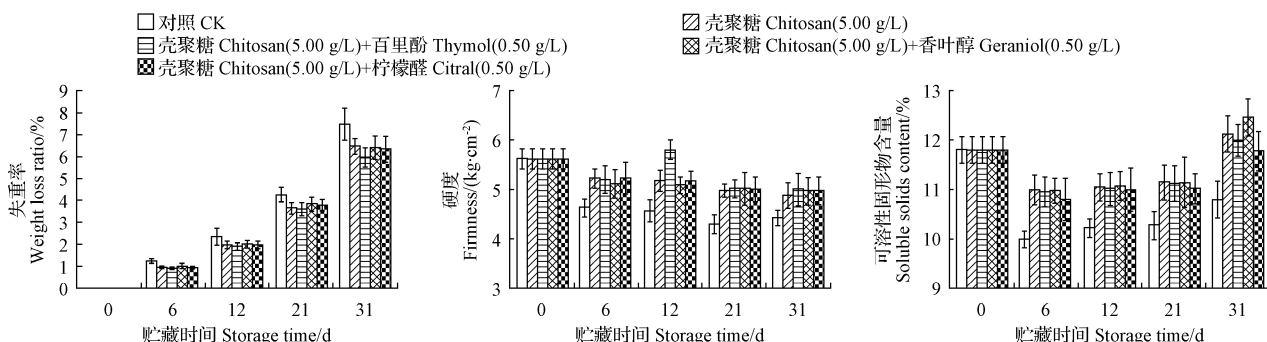


图2 复合膜对鸭梨储藏失重率、硬度、可溶性固形物含量影响 (20℃, 85%~95% RH)

Fig. 2 Effect of the composite coating on weight loss, firmness and soluble solids content in pear fruits (20℃, 85%—95% RH)

2.3 植物精油组分对青霉菌的协同抑制作用

经计算,柠檬醛、百里酚、香叶醇3种精油组分两两组合其FIC均为0.36,表明3种精油组分对于青霉菌(*Penicillium expansum*)的抑制均存在协同抑制现象,经观察在抑菌协同方面柠檬醛和香叶醇组合时二者贡献相当,柠檬醛和百里酚组合时二者贡献也相当,百里酚和香叶醇组合时百里酚贡献大于香叶醇。在百里酚和香叶醇组合抑制青霉菌试验中,百里酚浓度为其单独抑制青霉菌最小抑菌浓度的1/4、香叶醇为其单独抑制青霉菌最小抑菌浓度的1/8时青霉菌在该组合中不能生长,该试验把此时的浓度定义为MICm,此组合中含有的抗菌物质浓度百里酚浓度为(1/4)×百里酚对青霉菌的单独最小抑菌浓度,即0.05 g/L;香叶醇浓度为(1/8)×香叶醇对青霉菌的单独最小抑菌浓度,即0.03 g/L。将此组合添加到5.00 g/L壳聚糖溶液中使得抗菌物质最终浓

度分别为2、4、8倍的MICm用于精油组分协同抗菌在果体上的测定。

2.4 精油组分协同抗菌在鸭梨果体上的测定

如图3所示,精油组分复合壳聚糖能显著降低发病率,96 h内不管是单纯使用壳聚糖还是含有精油组分的壳聚糖涂膜都降低了梨的发病率,但是在120 h的时候单纯用5.00 g/L壳聚糖进行涂膜的鸭梨发病率已经接近对照,而添加了2倍MICm、4倍MICm和8倍MICm精油复合物涂膜的梨发病率明显低于对照和单纯的壳聚糖涂膜的梨,144 h的时候对照、单纯壳聚糖涂膜以及添加了2倍MICm复合膜的梨发病率都已经为100%,已无明显差异,而添加了4倍MICm和8倍MICm精油壳聚糖涂膜的梨发病率显著降低,添加了4倍MICm和8倍MICm精油壳聚糖涂膜的鸭梨发病率大约为60.66%和35.74%。

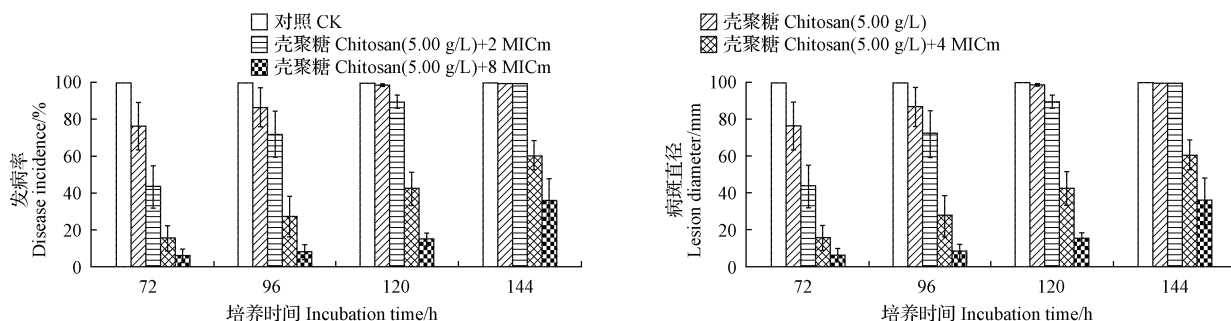


图3 复合膜对鸭梨青霉病害的影响 (25℃, 95%~100% RH)

Fig. 3 Effect of composite coating on the disease development of pear fruits (25℃, 95%—100% RH)

壳聚糖在梨上涂膜也可以减缓病斑的扩展,从96 h开始壳聚糖或复合精油组分壳聚糖涂膜的梨病斑直径一直到试验结束都小于对照,添加了精油组分壳聚糖涂

膜的鸭梨病斑直径要小于纯壳聚糖涂膜的鸭梨。在试验进行至144 h,添加了4倍MICm和8倍MICm精油壳聚糖涂膜的鸭梨病斑直径显著小于纯壳聚糖涂膜的

鸭梨,含8倍MIC_m精油壳聚糖涂膜的鸭梨病斑直径为纯壳聚糖涂膜的鸭梨病斑直径的53.43%、无涂膜鸭梨病斑直径的41.20%。

3 结论与讨论

壳聚糖本身具有提高果蔬抗病能力的作用,一些精油组分在培养基中可以直接抑制孢子的萌发抑制菌丝

的生长^[12],由图4可知,经过精油组分处理菌丝还可以发生菌丝原生质浓缩、甚至细胞壁破裂的现象,当精油组分被添加到壳聚糖中用于鸭梨保鲜,可能直接提高了鸭梨对抗病菌的能力。此外,据报道一些植物的抗性还能被植物精油所诱导^[13],所选精油组分可来自常见的精油,因此也存在鸭梨抗病能力被所选精油组分诱导的可能。

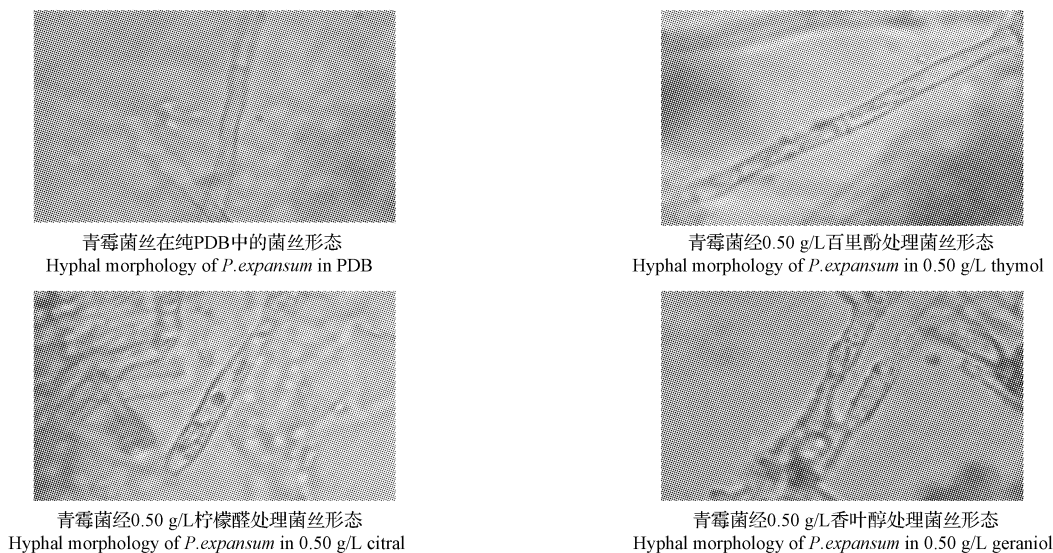


图4 精油组分处理的青霉菌丝形态(27℃,20 h)

Fig.4 Effect of the components of EOs on hyphal morphology of *P. expansum* (27℃,20 h)

百里酚、柠檬醛、香叶醇、芳樟醇、肉桂醛、丁香酚对分离自鸭梨(*Pyrus bretschneideri*)的青霉菌(*P. expansum*)、链格孢(*A. alternata*)、褐腐菌(*M. fructicola*)、红单端孢菌(*T. roseum*)均具有不同程度的抑制,百里酚、柠檬醛、香叶醇添加到壳聚糖中不会降低其在鸭梨保鲜中的积极作用,百里酚、柠檬醛、香叶醇之间存在协同抑制青霉菌的现象,百里酚和香叶醇的组合添加到壳聚糖中可以有效的改善壳聚糖可食用膜应用在鸭梨保鲜中对鸭梨抗青霉病害的能力。精油组分可以改善壳聚糖用于果蔬保鲜的抗菌性能不足。

参考文献

- [1] RIAL-OTERO R, ARIAS-ESTÉVEZ M, LÓPEZ-PERIAGO E, et al. Variation in concentrations of the fungicides tebuconazole and dichlofluanid following successive applications to greenhouse-grown lettuces[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(11): 4471-4475.
- [2] CHIEN P J, LIN H R, SU M S. Effects of edible micronized chitosan coating on quality and shelf life of sliced papaya[J]. Food and Nutrition Sciences, 2013, 4(9B): 9-13.
- [3] ROMANAZZI G, FELIZIANI E, SANTINI M, et al. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry[J]. Postharvest Biology and Technology, 2013, 75(1): 24-27.
- [4] HAN C, ZUO J H, WANG Q, et al. Effects of chitosan coating on post-harvest quality and shelf life of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) during storage[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 166(2): 1-8.
- [5] GARCÍA M, CASARIEGO A, DÍAZ R, et al. Effect of edible chitosan/

- zeolite coating on tomatoes quality during refrigerated storage[J]. Emirates Journal of Food and Agriculture, 2014, 26(3): 238-246.
- [6] SIVAKUMAR D, SULTANBAWA Y, RANASINGH N, et al. Effect of the combined application of chitosan and carbonate salts on the incidence of anthracnose and on the quality of papaya during storage[J]. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2005, 80(4): 447-452.
- [7] ZIVANOVIC S, CHI S, DRAUGHON A F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(1): 45-49.
- [8] BOYLE W. Spices and essential oils as preservatives[J]. The American Perfumer and Essential Oil Review, 1955, 66(1): 25-28.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Tentative standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards[C]. USA: Villanova, Pennsylvania, 1995.
- [10] FRANZOT S P, CASADEVAL A. Pneumocandin L-743872 enhances the activities of amphotericin B and fluconazole against *Cryptococcus neoformans* in vitro[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41(2): 321-336.
- [11] SHIRZADEH E, KAZEMI M. Effect of essential oils treatments on quality characteristics of apple (*Malus domestica* var. Gala) during storage[J]. Trends in Applied Sciences Research, 2012, 7(7): 584-589.
- [12] 王京法, 李健, 曹建康, 等. 丁香油、百里酚复合壳聚糖处理对桃采后褐腐病菌的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 359-424.
- [13] ITAKO A T, JÚNIOR J B T, SCHWAN-ESTRADA K R F. Cymbopogon citratus essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants[J]. Idesia (Chile), 2013, 31(4): 11-17.

DOI:10.11937/bfyy.201517032

鸡枞菌/榆黄蘑的驯化栽培配方试验

谭永忠^{1,2}, 王慧超^{1,2}, 戴玄¹, 冉景盛¹, 陈今朝^{1,2}

(1. 长江师范学院 生命科学与技术学院, 重庆 涪陵 408100; 2. 长江师范学院 武陵山区特色资源与开发利用中心, 重庆 涪陵 408100)

摘要:以棉籽壳、稻草或木屑为原料,驯化栽培鸡枞菌、榆黄蘑,筛选其最适栽培配方及栽培条件。结果表明:鸡枞菌最适栽培配方为棉籽壳 39%、稻草 40%、麸皮 17%、玉米粉 2%、石膏 2%,榆黄蘑最适栽培配方为棉籽壳 22%、木屑 60%、麸皮 16%、石膏 2%;在出菇温度为 15~26℃,空气相对湿度为 90%~95%时,2 种配方的生物学效率分别为 43.5%和 108.9%。鸡枞菌、榆黄蘑子实体蛋白质含量分别为 32.8%、42.9%;糖含量分别为 26.7%、21.2%;粗脂肪含量分别为 4.4%、1.8%。灰分含量分别为 7.0%、6.9%。

关键词:鸡枞菌;榆黄蘑;棉籽壳;稻草;木屑;驯化栽培;生物学效率

中图分类号:S 646 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)17-0124-03

鸡枞菌(*Termitomyces albuminosus*)菌肉鲜甜脆嫩、清香可口^[1]。其富含蛋白质、碳水化合物、维生素、矿物质

第一作者简介:谭永忠(1969-),男,本科,副教授,研究方向为微生物学及生物工程。E-mail:642732481@qq.com.

责任作者:陈今朝(1964-),男,硕士,教授,研究方向为菌物学与生物工程。E-mail:335092248@qq.com.

基金项目:重庆市教委科技计划资助项目(KJ131306);重庆市自然科学基金资助项目(cstc,2012jjA 80026);涪陵区科技计划资助项目(FLKJ,2014ABB2069);长江师范学院重点科技计划资助项目(2013XJZD003);长江师范学院武陵山区特色资源与开发利用中心重点资助项目(WLYF2015 001)。

收稿日期:2015-05-19

元素、多种氨基酸等,具有益胃清神、止血治痔等功效^[2]。但由于鸡枞菌与白蚁巢共生,驯化困难,人工栽培尚处于探索阶段^[3]。榆黄蘑(*Pleurotus citrinipileatus*)具有很高的营养价值和药用价值,栽培始于 20 世纪 70 年代。迄今为止,分离、驯化探索其适宜栽培配方是当前的热点^[4]。

重庆市食用菌栽培品种单一,驯化的新品种少,市场竞争力差,难以支持其食用菌产业的发展^[5]。而当地珍稀野生食用菌如鸡枞菌、榆黄蘑和纤夫头等资源丰富,从中驯化选育适应市场需求的新菌种十分迫切^[6]。为此,该研究以棉籽壳、稻草或木屑为原料,驯化栽培鸡枞菌、榆黄蘑,筛选其最适栽培配方及栽培条件,为鸡枞

Effect of Chitosan Enriched With Essential Oil Components on Yali Pear (*Pyrus bretschneideri*) Fruit During Storage

WANG Jingfa, SUN Zhiqiang, YANG Bin, MA Liping

(Dian Cuisine Research Center, Kunming University, Kunming, Yunnan 650214)

Abstract: Taking 6 essential oil components as material, pathogens isolated from infected Yali pear (*Pyrus bretschneideri*) fruit were treated with them *in vitro* and minimum inhibitory concentrations of the components to the pathogens were determined, 3 components were selected and synergistic effect among them was studied then were added in chitosan and used in Yali pear fruit storage. The results showed that all the pathogens selected could be inhibited by the selected essential oil components, thymol, geraniol and citral had very strong ability of inhibiting pathogens and synergistic effect could be found among them. The results also showed that when the 3 components were added in chitosan and used in Yali pear fruit storage, positive effect of chitosan coating on the weight loss, firmness and total soluble solids (TSS) in Yali pear fruit during storage should not be decreased and inhibiting ability of chitosan coating to *Penicillium expansum* in Yali pear fruit could be improved by enriched with combination of them. Essential oil components had very important value in improving antimicrobial activity of edible coating.

Keywords: essential oil components; chitosan; composite coatings; fruits; pathogens