

等离子体活化水对青椒尖孢镰刀菌的抑制作用

钼晓艳¹, 李海蓝¹, 吴迪², 刘舒彦¹, 李湃¹, 高梦婷³, 张金木¹

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064)

(2. 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310058) (3. 蚌埠医学院公共基础学院, 安徽蚌埠 233030)

摘要: 本文旨在研究等离子体活化水 (Plasma activated water, PAW) 对青椒腐败菌-尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) AF93247 的抑制作用。着重研究了制备功率 (0~1.18 kW) 和制备时间 (0~420 min) 对 PAW 物理性质的影响; PAW 制备时间 (0~60 min) 对 AF93247 菌丝生长和分生孢子萌发的影响, PAW 处理时间 (0~60 min) 对染菌青椒腐败率和品质的影响。实验结果表明, 制备功率越高, PAW 的氧化还原电位、电导率和温度越高, pH 值越低。同一制备功率 (0.90 kW) 时, 随制备时间延长, PAW 对 AF93247 的抑制作用增强。制备 60 min 的 PAW (即 PAW60) 处理 AF93247 样品后, 其菌丝生长抑制率和孢子萌发抑制率分别为 (15.00±1.14)% 和 (54.44±5.03)%, 显著高于其他各组 ($p<0.05$); PAW60 处理后的孢子受损程度也高于其他各组。贮藏实验中, PAW60 处理 30 min 组的染菌青椒色差 ΔE 降低率和硬度 H 降低率与对照组无显著性差异 ($p>0.05$), 青椒腐败率、叶绿素 a 和总叶绿素损失率显著低于其他各组 ($p<0.05$)。综上, PAW60 对尖孢镰刀菌 AF93247 的有良好抑制作用, 用其处理青椒 30 min 可在 14 d 内有效抑制青椒腐败的同时最大程度保持其品质。

关键词: 等离子体活化水; 青椒; 尖孢镰刀菌; 抑制作用

文章编号: 1673-9078(2020)10-33-40

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0348

The Inhibitory Effect of Plasma Activated Water on *Fusarium oxysporum* of Green Pepper

ZU Xiao-yan¹, LI Hai-lan¹, WU Di², LIU Shu-yan¹, LI Pai¹, GAO Meng-ting³, ZHANG Jin-mu¹

(1. Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China) (2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China) (3. Bengbu Medical College, Public Basic College, Bengbu 233030, China)

Abstract: To evaluate the inhibitory effect of plasma activated water (PAW) on *Fusarium oxysporum* AF93247, the effects of preparation power (0~1.18 kW) and preparation time (0~420 min) on the physical properties of PAW, effects of PAW preparation time (0~60 min) on mycelial growth and spore germination of AF93247, and effects of PAW treatment time (0~60 min) on the rotten rate and quality of green pepper were investigated in the work. The results showed that the higher the oxidation reduction potential (ORP), conductivity and temperature, and the lower the pH value of PAW were obtained by using the higher the power. At the same preparation power (0.90 kW), the inhibition effect on AF93247 increased with the prolongation of PAW preparation time. After the treatment of PAW with 60 min preparation (namely PAW60), the inhibition rates of AF93247 mycelial growth and spore germination were (15.00±1.14)% and (54.44±5.03)%, respectively, which were significantly higher than those of other groups ($p<0.05$). In the storage experiment, there was no significant difference in the decrease rate of color difference (ΔE) and hardness (H) between the PAW60-30 group and the control group ($p>0.05$). The rotten rate, loss rate of chlorophyll a and total chlorophyll of the green peppers in PAW60-30 group were significantly lower than those of the other groups ($p<0.05$). Therefore,

引文格式:

钼晓艳, 李海蓝, 吴迪, 等. 等离子体活化水对青椒尖孢镰刀菌的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 33-40

ZU Xiao-yan, LI Hai-lan, WU Di, et al. The inhibitory effect of plasma activated water on *Fusarium oxysporum* of green pepper [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 33-40

收稿日期: 2020-04-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0700105); 湖北省农业科技创新中心项目(2020-620-000-001-036)

作者简介: 钼晓艳(1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 水产品加工与保鲜

通讯作者: 张金木(1965-), 男, 副研究员, 研究方向: 农产品加工与贮藏

PAW60 had the strong inhibitory effect on *Fusarium oxysporum* AF93247, and PAW60 treatment for 30 minutes could effectively inhibit the rot of green pepper and maintain its quality within 14 days.

Key words: plasma activated water; green pepper; *Fusarium oxysporum*; inhibition

等离子体活化水 (Plasma-activated water, PAW) 是指通过在水中或水表面进行等离子体放电而得到的液体^[1,2]。PAW 杀菌目前主要集中于表面杀菌, 较传统的热杀菌技术, 其对食品的色泽、风味、质构和营养的损失破坏较小。作为一种新型环境友好型食品处理技术, PAW 具有活性组分含量高、均匀性和流动性良好、pH 值低和氧化还原电位较高等特点^[3], 在农产品和食品的保鲜杀菌、内源酶灭活、微生物被膜抑制等方面的应用备受瞩目^[4-6]。

在过去的 20 年里, 等离子体相关科学研究急剧增加^[7], 应用广泛, 但国内外研究主要集中于低温等离子气体对肉制品 (鸡肉、培根)^[8,9], 水果 (甜瓜、草莓)^[10,11], 蔬菜 (茼蒿、马铃薯) 的李斯特菌、大肠杆菌、酿酒酵母、沙门氏菌等致病和腐败细菌的抑制效果上。关于等 PAW 对植物源腐败真菌 (如: 尖孢镰刀菌) 的抑制效果研究较少, 尤其在蔬菜 (如: 青椒) 的清洗减菌方面, 由于原料形状不规则, 气体接触均匀性不理想、需单个处理、难以规模化应用等问题, 使得 PAW 的研究与应用迫在眉睫。

尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 属半知菌类 (Imperfecti fungi)、从梗孢目 (Moniliales)、瘤座孢科 (Tuberculariaceae)、镰刀菌属 (*Fusarium*), 是一种世界性分布的土传病原真菌, 寄生范围广泛, 可引起瓜类、茄科、香蕉、棉、豆科及花卉等 100 多种植物枯萎病的发生^[12-14], 也是引起青椒腐败变质的主要真菌。青椒 (*Capsicum annuum* L.), 茄科辣椒属, 别名大椒、甜椒、菜椒, 是一种冷敏性蔬菜, 也是国内最主要的经济作物之一^[15]。据农业部市场与经济信息司统计, 2017 年我国辣椒种植面积达 2390 万亩, 产量达到 3356 万 t, 产业规模居蔬菜首位。由于青椒原产于热带地区, 其对低温敏感、易失水萎蔫、腐败变质, 如何对青椒采取必要的保鲜措施, 延长贮藏期是人们关注焦点。

因此, 本文以青椒为原料, 研究 PAW 对尖孢镰刀菌的抑制作用及青椒品质的影响, 重点研究不同制备功率和时间下 PAW 的氧化还原电位 (Oxidation reduction potential, ORP)、电导率、温度、pH 值的变化规律, PAW 对尖孢镰刀菌菌丝生长和分生孢子萌发的影响, 对尖孢镰刀菌孢子质膜完整性的影响, 及对染菌后青椒腐败率和品质的影响等。评价 PAW 抑菌效果, 优化 PAW 制备时间和处理时间, 为青椒的减菌保

鲜和延长货架期提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

青椒, 武汉市洪山区武商量贩 (农科城店) 提供; 尖孢镰刀菌, 中国典型培养物保藏中心 (China center for type culture collection, CCTCC) 提供, 保藏号 CCTCC AF93247; 纯净水, 娃哈哈饮用水有限公司提供; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar, PDA)、马铃薯葡萄糖肉汤培养基 (Potato dextrose broth, PDB), 青岛海博生物技术有限公司提供; 氯化钠、丙酮、盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、维生素 C 等分析纯试剂, 国药集团化学试剂有限公司提供。

1.2 主要设备

PG-3000 型低温等离子双介质阻挡液体处理发生器, 南京苏曼等离子科技有限公司; as-528 系列 A 型钳形表, 武汉中测宏图测量仪器有限公司; ORP986 型电位笔, 上海艾测电子科技有限公司; CT-3030 电导率仪, 深圳市科迪达电子有限公司; PB-10 pH 计, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; IX7 荧光倒置显微成像系统, 日本奥林巴斯株式会社; FSH-2A 可调高速均质机, 常州越新仪器制造有限公司; UH5300 紫外分光光度计, 日立 (中国) 有限公司; TA-XTPlus 食品物性测试仪, 英国 Stable Micro System 公司; CR-400 色差仪, 柯尼卡美能达株式会社。

1.3 试验方法

1.3.1 PAW 的制备

利用低温等离子双介质阻挡液体处理发生器处理获得 PAW, 发生器的档位分为 0、1、2、3、4 和 5 档, 用钳形表实测电流分别为 0.0、3.0、4.0、4.8、5.6 和 6.3 A, 根据功率计算公式: $P=U \times I \times \cos\Phi$ (其中 U 为电压 220 V, I 为实测电流, $\cos\Phi$ 为功率因数按 0.85 计), 得到档位相对应的功率分别为 0、0.56、0.75、0.90、1.05 和 1.18 kW。准备去离子纯净水 30 L, 分别进行 0、0.56、1.90、1.18 kW 的外加电压循环处理, 获得的 PAW 用于 ORP 值、电导率、水温和 pH 值的测定和尖孢镰刀菌 AF93247 抑制效果实验。

1.3.2 AF93247 菌丝和分生孢子的培养

用无菌水溶解尖孢镰刀菌 AF93247 冻干粉, 涂布接种到 PDA 培养基上, 28 °C 下培养 7 d, 然后用灭菌手术刀挑取培养物, 接种到无菌 PDA 上, 继续 28 °C 培养 7 d, 获得 AF93247 菌丝体。挑取培养好的尖孢镰刀菌接种于 30 mL PDB 中, 于 25~28 °C 生化培养箱中静置培养 7 d, 获得分生孢子液^[16]。

1.3.3 PAW 对 AF93247 菌丝生长的抑制实验

选择功率 0.90 kW, 制备时间 0、15、30、45、60 min, 获得的 PAW 分别记为 PAW0 (对照)、PAW15、PAW30、PAW45、PAW60。用移液枪分别吸取 50 μ L 各 PAW 滴在待接菌的 PDA 上并均匀涂布。将已培养好的尖孢镰刀菌 AF93247 用灭菌操作刀切成直径为 0.5 cm 圆块接种在涂布好各 PAW 的 PDA 上, 28 °C 培养 6 d^[17]。每 2 d 用十字交叉法垂直测量菌落直径, 每样三个平行。菌丝生长抑制率按照如下式公式计算:

$$\text{菌丝生长抑制率} / \% = \frac{D_0 - D_i}{D_0} \times 100\%$$

式中: D_0 : 对照组菌落直径; D_i : 各 PAW 处理组菌落直径。

1.3.4 PAW 对 AF93247 分生孢子萌发的抑制实验

切取 4 个直径 0.5 cm 的菌块接种到 30 mL PDB 中, 25 °C 培养 7 d。根据参考文献^[18], 用灭菌纱布过滤孢子悬浮液, 8000 r/min 离心 10 min, 无菌水清洗孢子并定容至 1 mL。分别取孢子悬浮液 0.1 mL 和不同制备时间的 PAW 0.4 mL, 混匀, 静置 1 h。用移液枪吸取 5 μ L 混合液体滴在凹玻片上, 25 °C 条件下培养 3 h, 光学显微镜观察孢子萌发情况, 每样 3 个平行。孢子萌发率、孢子萌发抑制率等按照如下式公式^[19]计算:

$$\text{孢子萌发率} R / \% = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%$$

$$\text{校正孢子萌发率} R_e / \% = \frac{R_2}{R_1} \times 100\%$$

$$\text{孢子萌发抑制率} / \% = \frac{(R_1 - R_e)}{R_1} \times 100\%$$

式中: N_1 : 孢子萌发数; N_2 : 孢子总数; R_1 : 对照组孢子萌发率; R_2 : PAW 处理组孢子萌发率; R_e : 校正孢子萌发率。

1.3.5 孢子质膜完整性分析和显微镜观察

用不同制备时间的 PAW 处理 AF93247 孢子, 孢子培养液与 PDB 和 PAW 的体积比为 0.5:1:1, 28 °C 培养 2 h, 8000 r/min 离心收集孢子, 室温下用 1 mL 10 μ g/mL 碘化丙啶 (PI) 染色 30 min^[12]。8000 r/min 离心去除 PI 染液, 25 mM 磷酸盐缓冲液洗涤两次, 用荧光倒置显微成像系统观察孢子质膜完整性。显微镜

放大倍数 $\times 20$, 分别进行明场观察和荧光观察, 荧光观察采用绿色激发红色, 激发波长 510~550 nm, 发射波长 590 nm, 观察后拍照, 分辨率 1600 $\times$ 1200。

1.3.6 PAW 对染菌青椒腐败率和品质的影响实验

挑选规格相近的青椒 120 个 20.0 ± 2.0 g, 随机分成 4 组, 每组 30 个。青椒用酒精喷雾消毒, 2 min 后用无菌水喷雾洗涤两次, 置于超净工作台中晾干。在青椒表面用无菌钉打出一个创口, 接种 AF93247 孢子悬浮液 10 μ L (浓度 1×10^5 个/mL), 待孢子液被创口吸收, 用 PAW60 分别处理青椒创口 0、30、60、90 min, 然后移至生化培养箱 25 °C 贮藏 14 d, 观察记录青椒腐败个数, 计算腐败率 (公式如下), 并检测青椒色度、硬度、Vc 和叶绿素含量变化。

$$\text{腐败率} / \% = \frac{\text{腐败个数}}{\text{青椒个数}} \times 100\%$$

1.4 指标测定

1.4.1 ORP 值、电导率、水温和 pH 值测定

用电位笔、电导率仪、温度计、pH 计对获得的 PAW 进行 (ORP) 值、电导率、水温和 pH 值的测定。测定持续 7 h, 其中放电反应 1 h, 每 5 min 测定 1 次, 放电结束后静置 6 h, 每 60 min 测定 1 次, 每次平行测定 3 回, 结果取平均值。

1.4.2 色度和硬度测定

贮藏 0 d 和 14 d 的青椒样品, 用色差仪分别测定 L (亮度)、 a (红度) 和 b (黄度), 每样 3 个平行, 并计算 ΔE ^[20] 和 ΔE 降低率。贮藏 0 d 和 14 d 的青椒, 切块制成 2 cm $\times$ 2 cm 样品, 使用质构仪对切块样品进行硬度分析。探头: P/2, 压缩比 50%, 测前速率 5.00 mm/s, 测中速率 2.00 mm/s, 返回速率 1 mm/s, 距离: 10 mm。每样 3 个平行, 获得的数据结果进行硬度 (H) 降低率计算。

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

$$\Delta E_{\text{降低率}} / \% = \frac{\Delta E_{14} - \Delta E_0}{\Delta E_0} \times 100\%$$

$$H_{\text{降低率}} / \% = \frac{H_{14} - H_0}{H_0} \times 100\%$$

式中: $\Delta L = L_{\text{样品}} - L_{\text{标准}}$ (明度差异); $\Delta a = a_{\text{样品}} - a_{\text{标准}}$ (红/绿差异); $\Delta b = b_{\text{样品}} - b_{\text{标准}}$ (黄/蓝差异); ΔE_{14} : 指贮藏 14 d 青椒的 ΔE 值; ΔE_0 : 指贮藏 0 d 青椒的 ΔE 值; H_{14} : 指贮藏 14 d 青椒的硬度值; H_0 : 指贮藏 0 d 青椒的硬度值。

1.4.3 Vc 含量测定

根据参考文献^[21]进行 Vc 标准曲线的绘制, 得标曲一元二次方程 $y=0.0448x-0.0142$ ($R^2=0.9918$), 并测定青椒 Vc 含量。称取青椒 10 g, 加入 1% HCL 匀浆, 定容至 50 mL, 离心得青椒上清液。取上清液 1 mL, 加入 2 mL 10% HCL, 容至 50 mL, 摇匀。以蒸馏水为参比, 在 243 nm 处测定其吸光度。取上清液 1 mL, 加入 4 mL 1 mol/L NaOH 和 10 mL 蒸馏水, 混匀后静置 20 min, 加入 4 mL 10% HCl, 定容至 50 mL, 在 243 nm 处测定碱处理上清液吸光度。上清液与碱处理上清液吸光度之差为青椒样品吸光度。根据标曲方程, 得青椒样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。根据如下公式计算青椒中 Vc 含量 ($\text{mg}/100\text{g}$)。

$$\text{Vc 含量}/(\text{mg}/100\text{g}) = \frac{c \times V_{\text{总}} \times V_{\text{上清}} \times 100}{V_1 \times W_{\text{总}} \times 1000}$$

$$\text{Vc 损失率}/\% = \frac{V_{\text{C}_0} - V_{\text{C}_{14}}}{V_{\text{C}_0}} \times 100\%$$

式中: c : 标准曲线方程计算的青椒样品浓度, $\mu\text{g/mL}$;
 V_1 : 样品溶液体积, mL; $V_{\text{总}}$: 样品定容总体积, mL; $V_{\text{上清}}$: 青椒上清液体积, mL; $W_{\text{总}}$: 青椒质量, g。 V_{C_0} : 青椒贮藏 0 d 时 Vc 含量, $\text{mg}/100\text{g}$; $V_{\text{C}_{14}}$: 青椒贮藏 14 d 时 Vc 含量, $\text{mg}/100\text{g}$ 。

1.4.4 叶绿素含量测定

准确称取 1 g 青椒样品研磨捣烂, 置于三角瓶中, 加入 10 mL 提取剂 (无水乙醇和丙酮 1:1 混合液), 封口膜密封, 室温下避光静置提取 5 h, 用双圈定性滤纸过滤得待测滤液^[22]; 以提取剂为空白溶液调零点, 分别在 645 nm 和 663 nm 处测定滤液的吸光度值 (A_1 和 A_2)。样品中叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量和叶绿素总含量, 均以质量分数 W (mg/g) 表示, 分别按下公式^[23]计算:

$$W_1/(\text{mg/g}) = \frac{(12.72 \times A_1 - 2.59 \times A_2) \times V}{1000 \times m}$$

$$W_2/(\text{mg/g}) = \frac{(22.88 \times A_2 - 4.67 \times A_1) \times V}{1000 \times m}$$

$$W_{\text{总}}/(\text{mg/g}) = \frac{(8.05 \times A_1 + 20.29 \times A_2) \times V}{1000 \times m}$$

$$\text{叶绿素 损失率}/\% = \frac{W_{i-0} - W_{i-14}}{W_{i-0}} \times 100\%$$

式中: W_1 : 叶绿素 a 含量, mg/g ; A_1 : 试液在 663 nm 处的吸光度值; A_2 : 试液在 645 nm 处的吸光度值; V : 试液体积, mL; m : 试样质量, g; W_2 : 叶绿素 b 含量, mg/g ; $W_{\text{总}}$: 叶绿素总含量, mg/g 。 W_{i-0} 为 0 d 叶绿素 (a/b/总) 含量, mg/g , W_{i-14} 为 14 d 叶绿素 (a/b/总) 含量, mg/g 。

1.5 数据统计

应用 Microsoft Excel 2010 和 SAS System 8.0 软件

对实验数据进行整理、制图及统计, 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。运用单因素 Anova 法 Duncan's 程序进行多组间显著性分析, 不同小写字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 制备功率和时间对 PAW 物性指标的影响

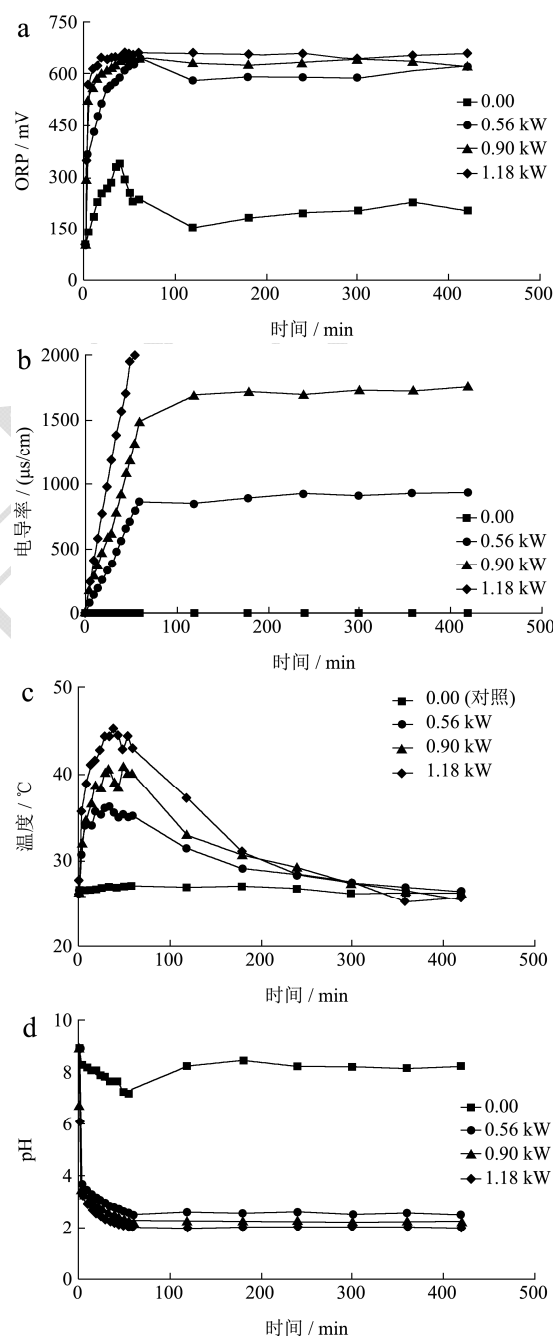


图1 不同制备功率下 PAW 的 ORP (a)、电导率 (b)、温度 (c) 和 pH 值 (d)

Fig.1 The ORP (a), conductivity (b), temperature (c) and pH value (d) of PAW at different preparation power

ORP 值和电导率与水中 O_3 、 O_2 、 ONOO^- 、 NO_2^- 、

NO_3^- 等活性物质有关,是表征 PAW 氧化还原能力和水溶性化学物质的重要指标^[24]。根据图 1 结果,制备功率越高,放电时间越长,PAW 的 ORP 值、电导率和水温越高,pH 值越低;放电结束后 PAW 的水温下降,其它指标数值波动较小。图 1a 和 1b 结果显示,PAW 组 ORP 值和电导率整体高于对照组,且随着制备功率增加,ORP 值和电导率上升速率增加。实验过程中,对照组 ORP 值和电导率稳定在 100~200 mV 和 $3.16 \pm 0.5 \mu\text{S}/\text{cm}$; PAW 组 ORP 值和电导率,随着制备时间延长而急剧上升,55~60 min 时均上升到最高点,放电结束后趋于平稳,其中 1.18 kW 组电导率达到仪器检测上限。以上结果与非热等离子活化水在草莓中应用时,ORP 值和电导率随制备时间上升而上升的结果相符^[24]。图 1c 结果显示,实验过程中对照组水温保持在 $26.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$,PAW 组在放电反应时水温急剧

上升,放电结束后水温缓慢降至室温;制备 60 min 时,各 PAW 组均达到最高温度,其中 0.90 kW 组和 1.18 kW 组温度分别接近和超过仪器使用上限 (40°C)。图 1d 结果显示,实验过程中对照组 pH 值稳定在 7.94 ± 0.45 ,PAW 组 pH 值在等离子体放电 5 min 时即急剧下降至 3.41 ± 0.21 ,60 min 时降至最低点 2.31 ± 0.27 ,且各 PAW 组之间差异不显著 ($p > 0.05$)。PAW 的 pH 值降低,主要与等离子体放电产生的 NO_2^- 、 NO_3^- 等酸根离子有关^[25,26]。考虑到仪器使用温度上限,选择功率 0.90 kW 时间 0~60 min 制备各 PAW,后进行尖孢镰刀菌 AF93247 菌丝和孢子的抑制实验。

2.2 不同制备时间 PAW 对 AF93247 菌丝生长的影响

表 1 不同制备时间 PAW 处理下的 AF93247 菌丝长度及生长抑制率

Table 1 Mycelial length and growth inhibition rate of AF93247 under the treatment of different preparation time of PAW

指标	培养时间/d	PAW0	PAW15	PAW30	PAW45	PAW60
菌丝长度/cm	0	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.00
	2	2.87 ± 0.04^a	2.53 ± 0.04^{ab}	2.43 ± 0.04^{bc}	2.40 ± 0.00^{bc}	2.23 ± 0.04^c
	4	5.23 ± 0.04^a	4.47 ± 0.04^b	4.27 ± 0.04^c	4.13 ± 0.04^d	3.93 ± 0.04^e
	6	7.17 ± 0.04^a	6.87 ± 0.06^b	6.50 ± 0.08^c	6.53 ± 0.04^c	6.17 ± 0.04^d
6 d 菌丝生长抑制率/%		0.00	5.00 ± 0.69^c	10.01 ± 0.74^b	10.03 ± 1.76^b	15.00 ± 1.14^a

注:运用单因素 ANOVA 法 Duncan's 程序进行不同制备时间处理组间显著性分析,不同小写字母表示组间差异显著 ($p < 0.05$)。

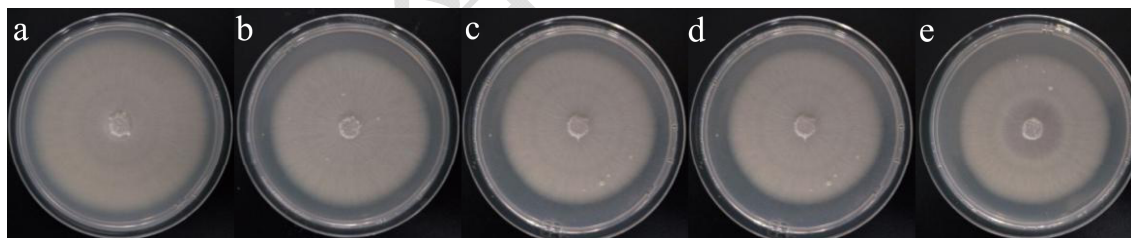


图 2 不同制备时间 PAW 处理下的 AF93247 菌丝生长情况

Fig.2 Mycelial growth of AF93247 under the treatment of different preparation time of PAW

注: a: PAW0; b: PAW15; c: PAW30; d: PAW45; e: PAW60。

AF93247 经过 PAW0、PAW15、PAW30、PAW45 和 PAW60 分别处理后培养 6 d, 菌丝生长情况和菌丝生长抑制率如表 1 和图 2 所示。随着制备时间延长, PAW 对 AF93247 的抑制作用增强。跟对照组 (PAW0) 相比, PAW60 组菌丝长度显著降低 ($p < 0.05$)。PAW 处理组之间相比, PAW60 组菌丝生长抑制率可达 15.00%, 显著高于 PAW15、PAW30 和 PAW45 组 ($p < 0.05$)。在外加电压较高时, 液体被击穿产生包括电子、正负离子、自由基、各种激发态的分子和原子等混合物, 使水处于活化状态^[20], 因此 PAW 制备时间越长, 水中激活态的各种电子和离子越多, pH 值越低, 对 AF93247 菌丝体和孢子等的抑制效果越好。

2.3 不同制备时间 PAW 对 AF93247 孢子的影响

尖孢镰刀菌 AF93247 分生孢子经过 PAW0、PAW15、PAW30、PAW45 和 PAW60 分别处理, 培养 2~3 h, 然后进行孢子计数和 PI 染色观察。根据表 2 结果, 随制备时间延长, PAW 对 AF93247 孢子萌发的抑制作用增强, 跟其他 PAW 处理组相比, PAW60 组孢子萌发率显著下降 ($p < 0.05$), 抑制率显著上升 ($p < 0.05$)。如图 3 所示, 失去膜完整性的孢子在 PI 染色后在荧光显微镜下呈现红色^[12], 随制备时间增加, 孢子质膜受损

程度增加,PAW60处理后的孢子受损程度高于其他各组。可能因为跟其他各组相比,PAW60中含有最多的激活态电子和离子,破坏孢子质膜蛋白质、核糖核酸及膜渗透性^[6,27]程度高,从而导致孢子质膜受损最多。根据以上AF93247菌丝和孢子的抑制结果,选择PAW60进行染菌青椒的腐败抑制实验。

表 2 不同制备时间 PAW 处理下的 AF93247 孢子萌发情况

Table 2 Spore germination of AF93247 under the treatment of different preparation time of PAW					
指标	PAW0	PAW15	PAW30	PAW45	PAW60
R ₁ /%	68.94±2.61	-	-	-	-
R ₂ /%	-	42.51±1.36 ^b	40.32±2.37 ^b	33.00±1.84 ^c	21.60±1.93 ^d
R _e /%	-	61.76±3.93 ^a	58.57±4.95 ^a	47.88±2.52 ^b	36.31±2.92 ^c
孢子萌发抑制率/%	-	10.19±8.82 ^c	14.81±9.86 ^c	30.31±4.91 ^b	54.44±5.03 ^a

注: R₁ 对照组孢子萌发率; R₂ 指 PAW 处理组孢子萌发率; R_e 指处理校正孢子萌发率; 孢子萌发抑制率=[(R₁-R_e)/R₁]×100。运用单因素 ANOVA 法 Duncan's 程序进行 PAW 处理组间显著性分析,不同小写字母表示差异显著 (p<0.05)。

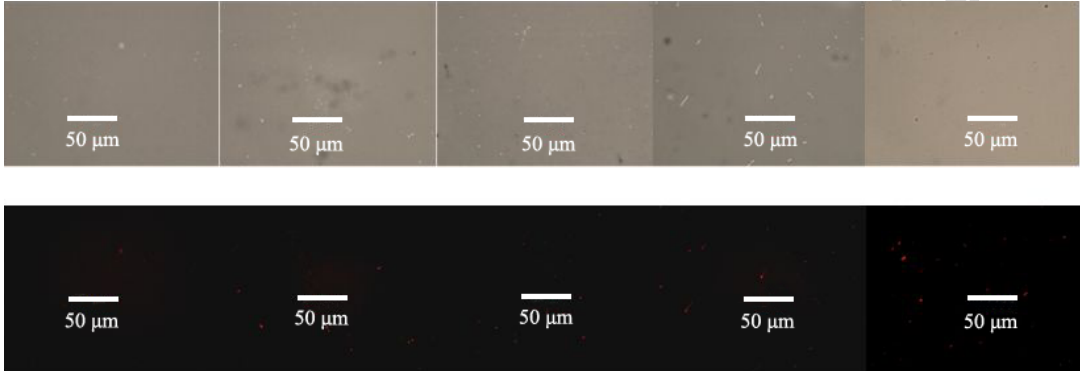


图 3 AF93247 孢子的质膜完整性观察 (×20)

Fig.3 Observation on the integrity of plasma membrane of AF93247 (×20)

2.4 PAW60 对染菌青椒腐败率及品质的影响

表 3 贮藏期间 PAW60 不同处理时间组青椒腐败程度及品质变化

Table 3 Changes of rotten rate, Vc and chlorophyll loss rate of *Capsicum annuum* L. in different treatment time groups of PAW60 during storage

指标	PAW60 处理时间/min			
	0 (对照)	30	60	90
腐败率/%	60.00±3.33 ^{ab}	53.33±4.44 ^a	56.67±4.41 ^a	70.00±3.33 ^b
ΔE 降低率/%	41.24±0.23 ^a	40.89±0.45 ^a	42.01±3.69 ^a	46.80±8.02 ^a
H 降低率/%	83.91±12.71 ^a	78.89±7.06 ^a	79.99±8.18 ^a	87.77±0.66 ^a
Vc 损失率/%	2.49±0.00 ^d	6.57±1.10 ^c	12.43±1.46 ^b	32.42±0.90 ^a
叶绿素 a 损失率/%	58.41±0.28 ^a	9.38±0.29 ^c	21.71±0.38 ^b	15.51±0.68 ^d
叶绿素 b 损失率/%	55.66±1.78 ^a	27.46±0.51 ^b	19.40±1.18 ^c	14.33±2.78 ^d
总叶绿素 损失率/%	57.59±0.33 ^a	15.06±0.00 ^c	20.87±0.49 ^b	15.70±0.63 ^d

注: 运用单因素 ANOVA 法 Duncan's 程序进行不同处理时间组间显著性分析,不同小写字母表示组间差异显著 (p<0.05)。

青椒接种尖孢镰刀菌 AF93247,经 PAW60 处理后储藏 14 d,其品质指标及外观变化如表 3 和图 4 所示。根据表 3 结果,PAW60 处理 30~60 min 可以降低青椒腐败率,处理时间超过 60 min,青椒腐败率反而上升。这与等离子气体作用时间越长对染菌甜椒腐败抑制效果越好的实验结果^[12,28]不同,可能因为 PAW 中含有大量超氧根离子和酸根离子对青椒细胞有一定的

氧化刺激作用,处理时间过长会加剧腐败。在贮藏期间,随着处理时间的延长,PAW60 各组青椒的色差 ΔE 降低率和硬度 H 降低率与对照组相比无显著性差异 (p>0.05),而 Vc 损失率显著上升 (p<0.05),叶绿素 a/b/总损失率均显著下降 (p<0.05)。其中,30 min 处理组,Vc 损失率、叶绿素 a 损失率和总叶绿素损失率显著低于 60 min 和 90 min 处理组 (p<0.05)。根据图 4 结果,贮藏 7 d

时, PAW60 各处理组与对照组的外观、色泽无差异;贮藏 14 d 时, 0 min 组和 90 min 组青椒色泽下降且皱缩严重, 60 min 组青椒接种点腐败严重, 30 min 组色泽较优、腐败点较小。



图 4 贮藏期间 PAW60 不同处理时间组青椒的外观品质

Fig.4 Appearance and quality of *Capsicum annuum* L. in different treatment time groups of PAW60 during storage

注: a~d: 贮藏 0 d; e~h: 贮藏 7 d; i~l: 贮藏 14 d; a、e、i: PAW60 处理 0 min; b、f、j: PAW60 处理 30 min; c、g、k: PAW60 处理 60 min; d、h、l: PAW60 处理 90 min。

3 结论

制备功率越高, PAW 的 ORP、电导率和温度越高, pH 值越低。同一制备功率 (0.90 kW) 时, 制备时间延长, PAW 对尖孢镰刀菌 AF93247 的抑制作用增强; 其中 PAW60 可显著降低尖孢镰刀菌 AF93247 的菌丝生长长度和孢子萌发率, 并导致孢子质膜受损。PAW60 处理染菌青椒 30 min 后贮藏 14 d, 其外观和色泽优于对照组, 其腐败率、Vc 损失率、叶绿素 a 损失率和总叶绿素损失率较低。综上, PAW60 对尖孢镰刀菌 AF93247 抑制作用良好, PAW60 处理青椒 30 min 可在 14 d 内有效抑制青椒腐败并保持其品质。

参考文献

[1] ZHANG Qian, LIANG Yong-dong, FENG Hong-qing, et al. A study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage [J]. Applied

Physics Letters, 2013, 102(20): 203701

- [2] 康超娣, 相启森, 刘骁, 等. 等离子体活化水在食品工业中应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(7): 348-352
- KANG Chao-di, XIANG Qi-sen, LIU Xiao, et al. A review of application of plasma-activated water in food industry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(7): 348-352
- [3] Jung S, Kim H J, Park S, et al. The use of atmospheric pressure plasma-treated water as a source of nitrite for emulsion-type sausage [J]. Meat Science, 2015, 108: 132-137
- [4] LIAO Xin-yu, LIU Dong-hong, XIANG Qi-sen, et al. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: a review [J]. Food Control, 2017, 75: 83-91
- [5] Misra N N, Pankaj S K, Segat A, et al. Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems [J]. Innovative Trends in Food Science & Technology, 2016, 55: 39-47
- [6] Flemming H C, Wingender J, Szewzyk U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life [J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 563-575
- [7] Surowsky B, Schlüter O, Knorr D. Interactions of non-thermal atmospheric pressure plasma with solid and liquid food systems: a review [J]. Food Engineering Reviews, 2015, 7: 82-108
- [8] Kim B N, Yun H J, Jung S M, et al. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions [J]. Food Microbiology, 2011, 28: 9-13
- [9] Noriega E, Shama G, Laca A, et al. Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua* [J]. Food Microbiology, 2011, 28: 1293-1300
- [10] Perni S, Shama G, Kong M G. Cold atmospheric plasma disinfection of cut fruit surfaces contaminated with migrating microorganisms [J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(8): 1619-1625
- [11] Fernández A, Noriega E, Theompson A. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology [J]. Food Microbiology, 2013, 33: 24-29
- [12] 郝晓娟, 刘波, 谢关林. 植物枯萎病生物防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 319-322, 337
- HAO Xiao-juan, LIU Bo, XIE Guan-lin. Research progress in biological control of *Fusarium* wilt disease [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(7): 319-322, 337

- [13] 高晓敏,王璐钢,马立国,等.尖孢镰刀菌致病机理和化感作用研究进展[J].微生物学通报,2014,41(10):2143-2148
GAO Xiao-min, WANG Ju-gang, MA Li-guo, et al. Research advances on the mechanism of pathogenesis and allelopathy of *Fusarium oxysporum* [J]. Microbiology, 2014, 41(10): 2143-2148
- [14] 王芳,李静,张欢.青霉菌、放线菌株和石灰水对尖孢镰刀菌抑制作用的研究[J].中国农学通报,2013,29(12):185-189
WANG Fang, LI Jing, ZHANG Huan. The study on inhibition of *Penicillium*, *Actinomycete* and limewater to *Fusarium oxysporum* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(12): 185-189
- [15] Go S M, Park M R, Kim H S, et al. Antifungal effect of non-thermal atmospheric plasma and its application for control of postharvest *Fusarium oxysporum* decay of paprika [J]. Food Control, 2019, 98: 245-252
- [16] 余方伟.禾谷镰孢菌 TOR 信号途径中关键基因的功能研究[D].杭州:浙江大学,2014,86-92
YU Fang-wei. Functional characterization of key gene involved in the TOR signaling pathway in *Fusarium graminearum* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014, 86-92
- [17] 郭俭.低温等离子体杀菌机理与活性水杀菌作用研究[D].杭州:浙江大学,2016
GUO Jian. The inactivation mechanism of non-thermal plasma agents and bactericidal effect of plasma activated water [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016
- [18] ZHU Qi-li, ZHOU Ben-guo, GAO Zheng-liang, et al. Effects of phospholipase C on *Fusarium graminearum* growth and development [J]. Current Microbiology, 2015, 71: 632-637
- [19] NY/T 1156.2-2006 农药室内生物测定试验准则 杀菌剂第1部分:抑制病原真菌孢子萌发试验凹玻片法[S]
NY/T 1156.2-2006 Guidelines for laboratory bioassay of pesticides-fungicides part 1: inhibition of spore germination of pathogenic fungi by concave slide method [S]
- [20] Min S C, Roh S H, Niemira B A, et al. In-package inhibition of *E. coli* O157: H7 on bulk *Romaine lettuce* using cold plasma [J]. Food Microbiology, 2017, 65: 1-6
- [21] 马宏飞,卢生有,韩秋菊,等.紫外分光光度法测定五种果蔬中维生素C的含量[J].化学与生物工程,2012,29(8):92-94
MA Hong-fei, LU Sheng-you, HAN Qiu-ju, et al. Determination of vitamin C content in five kinds of fruits and vegetables by UV spectrophotometry [J]. Chemistry & Bioengineering, 2012, 29(8): 92-94
- [22] 胡秉芬,黄华梨,季元祖,等.分光光度法测定叶绿素含量的提取液的适宜浓度[J].草业科学,2018,35(8):1965-1974
HU Bing-fen, HUANG Hua-li, JI Yuan-zu, et al. Evaluation of the optimum concentration of chlorophyll extract for determination of chlorophyll content by spectrophotometry [J]. Pratacultural Science, 2018, 35(8): 1965-1974
- [23] 张宪政.植物叶绿素含量测定-丙酮乙醇混合液法[J].辽宁农业科学,1986,3:26-28
ZHANG Xian-zheng. Determination of chlorophyll contents in plants using acetone ethanol mixture method [J]. Liaoning Agricultural Sciences, 1986, 3: 26-28
- [24] MA Ruo-nan, WANG Guo-min, TIAN Ying, et al. Non-thermal plasma-activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 300: 643-651
- [25] ZHANG Qian, MA Ruo-nan, TIAN Ying, et al. Sterilization efficiency of a novel electrochemical disinfectant against *Staphylococcus aureus* [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(6): 3184-3192
- [26] Park G, Ryu Y H, Hong Y J, et al. Cellular and molecular responses of *Neurospora crassa* to non-thermal plasma at atmospheric pressure [J]. Applied Physics Letters, 2012, 100(6): 063703
- [27] Handorf O, Weihe T, Bekeschus S, et al. Non-thermal plasma jet treatment negatively affects viability and structure of *Candida albicans* SC5314 biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(21): e01163-18
- [28] Vleeugels M, Shama G, Deng X T, et al. Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control [J]. IEEE Transactions on Plasma Science, 2005, 33(2): 824-828