

刘姬荣, 闵伟恩, 林丽萍. 热水与赣南脐橙皮对意大利青霉孢子的致死作用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 367–369.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.107

热水与赣南脐橙皮对意大利青霉孢子的致死作用

刘姬荣, 闵伟恩, 林丽萍

(江西农业大学/南昌市农产品加工与质量控制重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要:为验证热水处理赣南脐橙预防赣南脐橙青霉病害的有效性, 对热水与脐橙皮共同处理对意大利青霉孢子致死作用进行了研究, 以不加赣南脐橙皮的同样热水处理的意大利青霉孢子为对照, 采用平板菌落计数法检测霉菌孢子死亡率; 用蜗牛酶去除霉菌孢子壁制备原生质体, 经 Hoechst 33342/PI 双荧光染色法染色, 检测霉菌孢子细胞膜损伤程度。结果显示, 55 ℃ 8 min 处理组的霉菌孢子死亡率为 $(88 \pm 2.12)\%$, 对照组霉菌孢子死亡率为 $(60 \pm 2.78)\%$; 荧光染色结果显示热处理组有更多的原生质体细胞膜受到了破坏。试验结果说明, 热水与赣南脐橙皮成分对意大利青霉孢子有协同抑杀作用。

关键词:赣南脐橙皮; 热水处理; 意大利青霉孢子; 致死作用

中图分类号:TS205 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)10-0367-02

柑橘采后极易遭受意大利青霉与指状青霉污染, 引起柑橘青、绿霉病害^[1], 这 2 种霉菌繁殖速度非常快, 正常自然条件下, 它们主要靠产生大量的无性孢子进行繁殖。热处理 (35~55 ℃) 这种物理保鲜方法, 可延长采后果蔬的货架期^[2], 还可以适当调整果肉品质, 增加一定糖分^[3], 因其无污染、无残留、安全环保等特点而受到越来越广泛的关注^[4-5]。热处理包括热水处理、热空气处理和蒸汽加热法^[6]。热水沉浸处理相较于热空气保鲜处理, 操作更简便, 方法更易获得, 所以试验选热水处理为研究方法。

前期试验结果证明热水与赣南脐橙皮共同处理柑橘青霉孢子可降低其生活力^[7]。所以, 热与橙皮共同作用可能会对霉菌孢子结构造成损伤。细胞死亡或者坏死是正常的细胞受到各种损伤或者细菌病毒的感染导致的不正常死亡, 是病理性的, 会有细胞壁破裂、内含物外泄的现象, 是由外界条件引起的。荧光 Hoechst 33342/PI 双染色试剂染色法, 结合了细胞膜通透低毒的 Hoechst 33342 染料与无法进入正常细胞膜的 PI 核荧光染料, 可以准确判断热水处理是否破坏霉菌细胞膜的完整性。为去除细胞壁障碍, 试验选用具有代表性的酶用量为研究霉菌孢子去壁的条件, 优选出适合的酶用量。

本试验以对环境耐受力更好的意大利青霉孢子为研究对象, 采用热水与赣南脐橙皮共同处理意大利青霉孢子, 平板菌落计数法检测其死亡率及 Hoechst 33342/PI 双染色法检测细胞膜的结构完整性, 探究热水与赣南脐橙皮共同处理对意大利青霉的致死作用, 为揭示热处理抑杀柑橘青霉病原菌的机制提供依据。

收稿日期: 2015-11-29

基金项目: 江西省教育厅青年基金 (编号: GJJ14315); 江西农业大学大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201410410043)。

作者简介: 刘姬荣 (1992—), 女, 江西吉安人, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: 349401861@qq.com。

通信作者: 林丽萍, 硕士, 讲师, 主要从事食品微生物方向的教学与研究。E-mail: jialin1543@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病原菌 意大利青霉 (*Penicillium italicum*) 为江西农业大学食品微生物实验室保存菌种。

1.1.2 赣南脐橙 纽荷尔脐橙。果实大小、成熟度均匀一致, 表皮完好, 无伤口。

1.1.3 主要培养基及试剂 PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 000 mL, 琼脂 20 g, pH 值自然, 121 ℃ 灭菌 20 min。作病原菌的活化、培养及计数用。

蜗牛消化酶 (90 U/g, 上海研域生物科技有限公司); Hoechst33342/PI 双染色试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.1.4 主要仪器 自动立式压力蒸汽灭菌器 (LDZX-40B 型, 上海申安医疗器械厂); 生化培养箱 (SHP-160 型, 上海三发科学仪器有限公司); 水浴恒温振荡器 (SHY-2 型, 金坛市精达仪器制造厂); 数显恒温循环水浴锅 (HH-6 型, 国华电器有限公司); 漩涡混合器 (Vortex-Genie2 型, 上海琪特分析仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (HC-2518R 型, 安徽中科中佳学仪器有限公司); 荧光显微镜 (ZEISS Ver. A1 型, 德国卡尔蔡司光学仪器公司); 数码生物显微镜 (BK5000 型, 重庆奥特光学仪器有限责任公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 意大利青霉孢子悬液制备 刮取经过活化复壮^[8-9]的意大利青霉菌, 转入加有玻璃珠和 50 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中, 充分振荡, 菌悬液经 2~3 层的无菌擦镜纸过滤于另一个无菌三角瓶中, 得到霉菌孢子悬液, 用血球计数板直接计数, 对孢子悬液进行适当的梯度稀释, 保证悬液孢子浓度为 $n \times 10^8$ 个/mL ($n < 10$)。

1.2.2 意大利青霉孢子热水处理方法 用凉开水清洗新鲜橙子, 用次氯酸对其表面消毒并清洗。橙子沥干水后, 用 3 mm 无菌打孔器获得大小均匀的橙皮。处理组: 将 20 片脐橙皮加入到新制备的 10 mL 霉菌孢子悬液中, 将加橙皮的菌悬液放入不同温度水浴锅, 同时做温度指示, 待温度指示达到

处理温度,开始计时,然后移出至冰浴,使温度降至 10 ℃ 以下。不加脐橙皮的同样热水处理的意大利青霉孢子为对照组,检测霉菌孢子死亡率并进行荧光染色。

1.2.3 意大利青霉孢子去壁条件研究 取未加脐橙皮热水处理后的霉菌孢子悬液 5 mL, 8 000 r/min 离心 8 min, 去除上清液, 加入渗透压稳定剂 (0.1 mol/L pH 值 5.5~6.0 磷酸缓冲液 配制 0.7 mol/L NaCl) 5 mL, 分别加蜗牛酶液 (10 mg/mL, 以渗透压稳定剂配制) 15、35、55、75 μ L, 置恒温振荡器 50~60 r/min、33 ℃ 振荡酶解 3 h^[10]。观察酶解后孢子形态的变化, 并记录。以未进行热处理的霉菌孢子悬液为对照组。

1.2.4 热水与脐橙皮处理的意大利青霉孢子死亡率 将热水处理后的霉菌孢子悬液做梯度稀释, 用移液枪分别取菌悬液 200 μ L 于 PDA 平板上, 涂匀, 放入 30 ℃ 的恒温箱中培养 72 h 左右, 待霉菌长至清晰可见时, 观察并记录霉菌孢子菌落数, 计算其死亡率。

死亡率 = (未热处理平板菌落数 - 热处理平板菌落数) / 未热处理平板菌落数 \times 100% (相同稀释倍数下)

1.2.5 热水与脐橙皮处理的意大利青霉孢子原生质体荧光染色 取热水处理的霉菌孢子悬液, 加入一定量的蜗牛酶液, 放置于恒温振荡器 50~60 r/min、33 ℃ 振荡酶解 3 h。按 Hoechst 33342/PI 双荧光染色试剂盒步骤对原生质体染色, 取 1 滴染色后的原生质体悬液于载玻片, 荧光显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 霉菌孢子去壁条件的研究

由图 1 可见, 当蜗牛酶液用量为 35 μ L 时, 开始产生一定量的原生质体, 蜗牛酶液用量达到 55 μ L 时, 产生大量原生质体, 蜗牛酶液用量为 75 μ L 时, 出现了酶解过度现象, 产生了很多变形增大的原生质体。热处理与未热处理对照组, 蜗牛酶去壁效果没有显著性差异, 说明热处理对于蜗牛酶解条件没有影响, 所以后续试验霉菌孢子去壁蜗牛酶用量选择 55 μ L。

2.2 热水与脐橙皮对意大利青霉孢子死亡率的影响

由图 2 可见, 加了脐橙皮热水处理组的意大利青霉孢子死亡率明显高于对照组孢子死亡率。55 ℃、8 min 处理霉菌孢子死亡率最高, 处理组孢子死亡率为 (88 \pm 2.12)%, 对照组孢子死亡率为 (60 \pm 2.78)%。

2.3 热水与脐橙皮处理对意大利青霉孢子细胞膜的影响

试验以热致死效率最高的 55 ℃、8 min 热处理条件, 进一步研究热水与脐橙皮对意大利青霉孢子细胞膜的影响。对热处理后的意大利青霉孢子原生质体荧光双染色后, 从结果可以看出, 对照组的原生质体荧光染色中有大量蓝色荧光 (图 3-A), 说明霉菌孢子原生质体还保持一定活性或逐渐走向凋亡; 处理组的原生质体出现大量红色荧光 (图 3-B), 说明经过热处理霉菌孢子多数已经走向死亡, 成坏死细胞。综合霉菌孢子死亡率结果, 说明热水与赣南脐橙皮对意大利孢子有协同抑杀作用。

3 结论与讨论

现有文献对于霉菌去壁研究大多是针对霉菌营养体的,

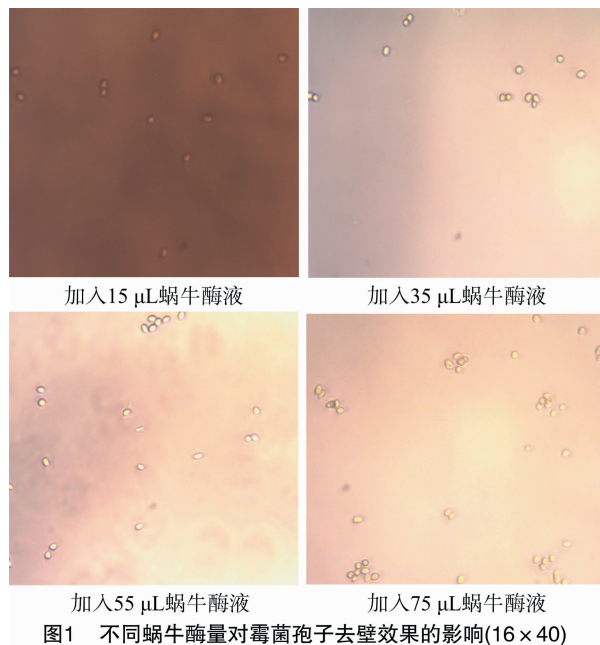


图1 不同蜗牛酶量对霉菌孢子去壁效果的影响(16×40)

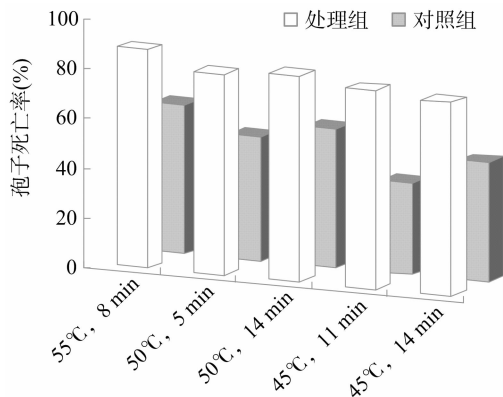


图2 不同热处理霉菌孢子死亡率

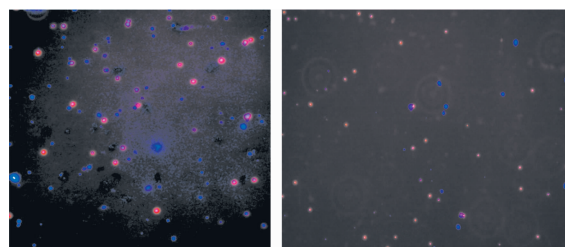


图3 霉菌孢子荧光染色结果(16×40)

而本试验所用孢子材料与营养体不同。蜗牛酶的用量是去壁条件的决定性因素, 所以优选这个条件作为去壁依据。而优化霉菌孢子去壁条件, 除了本试验考虑蜗牛酶液量, 还可以从霉菌的菌龄、酶解时间、酶解温度、酶解菌量等因素考虑, 结合这些因素得到更完整的去壁最优条件, 值得后期继续探索。

荧光染料 Hoechst 33342 能少许进入正常细胞膜, 使其染上浅蓝色, 而凋亡细胞膜通透性增加, 因此进入凋亡细胞的 Hoechst 33342 比正常细胞多, 荧光强度要比正常细胞高。而 PI 染料不能进入细胞膜完整的正常细胞和凋亡细胞中, 即活细胞对 PI 拒染, 而坏死细胞由于膜完整性在早期即已被破坏, 可被 PI 染料染色。根据这些特点, 用 Hoechst 33342 结合

郭小山,文廷刚,谢忠谊,等. 淮安蒲菜中营养元素和重金属元素的检测与分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):369-370.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.108

淮安蒲菜中营养元素和重金属元素的检测与分析

郭小山,文廷刚,谢忠谊,赵建峰,吴传万,汪国莲

(江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所,江苏淮安 223001)

摘要:为确定淮安蒲菜的营养元素和重金属含量,采用 ICP-MS 法和生理试验法测定蒲菜矿质元素、重金属元素、维生素 C 等指标的含量。结果显示,淮安蒲菜含有 K、Ca、Mn、Zn、Se、Mg、Sr、Cu、Fe 等元素,其中以 Fe、Mn、Sr、K 含量较高,重金属 Pb、Cd、Cr 含量极低,不含 Hg、As。此外,蒲菜中维生素 C 含量较高,纤维素、蛋白质、脂肪含量较低。可见,蒲菜是一种清洁安全、富含矿质元素和维生素,兼具营养、保健、药用于一身的蔬菜。

关键词:蒲菜;营养元素;重金属;ICP-MS 法

中图分类号: TS255.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0369-02

蒲菜(*Typha latifolia* L.) 别称蒲儿菜、香蒲、蒲草、蒲儿根、草芽、象牙菜,归属于香蒲科香蒲属(*Typha*),是江苏省淮安市特有的传统名菜^[1]。蒲菜主要生长在沼泽及淡水湖泊中,以其叶鞘抱合的假茎内层或地下匍匐的幼嫩茎枝作为蔬菜食用,不仅营养丰富,且具有一定的药用价值^[2]。近年来,随着环境污染的逐年加剧,蒲菜生长的水环境受到生活污水、重金属等的极大威胁,同时威胁着人们的身体健康。为探究淮安蒲菜的营养元素和重金属含量情况,研究了淮安蒲菜主产区所采集蒲菜的生长状况、营养状况、重金属含量等指标,以期为淮安蒲菜的生产加工和综合利用提供依据。

1 材料与方法

收稿日期:2016-03-18

基金项目:江苏省淮安市科技计划(编号:HC201316)。

作者简介:郭小山(1982—),男,陕西柞水人,助理研究员,主要从事园艺与植物保护研究。E-mail: xiaoshanguo@126.com。

通信作者:汪国莲,副研究员,主要从事园艺与蔬菜研究。E-mail: hynkskyc@163.com。

PI 染料对凋亡细胞双染色,可以进一步借助于流式细胞仪的散点图将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞进行定量。

本试验在没有流式细胞仪的情况下,采用了简便易行的定量方法——平板菌落计数法,测定热处理后霉菌孢子的死亡率,结合荧光染色结果,充分证明了热水与脐橙皮共同处理破坏了霉菌孢子的细胞膜结构,彻底造成了大部分霉菌孢子死亡。后续将进一步研究该热处理条件对赣南脐橙品质的影响,深入研究热处理抑制意大利青霉的具体机制,期望能够更全面地了解赣南脐橙热处理保鲜机制。

参考文献:

- [1] Brown G E, Dezman D J. Uptake of imazalil by citrus fruit after post-harvest application and the effect of residue distribution on sporulation of *Penicillium digitatum* [J]. Plant Disease, 1990, 74: 927-930.
- [2] 孔祥佳, 郑峻峰, 林河通, 等. 热处理对果蔬贮藏品质和采后生理的影响及应用 [J]. 包装与食品机械, 2011, 29(3): 34-39.

1.1 材料

供试蒲菜采自江苏省淮安市天妃宫蒲菜种植基地。选取新鲜的蒲菜,剥去外层老化部分,选择未受损伤的可食用部分,用聚乙烯自封袋分装用于各指标的测定。每个指标以 5 个样为 1 次重复,共 3 次重复。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 无机元素和重金属元素含量的测定 参照罗玉明等的方法^[3]进行无机元素和重金属元素含量的测定。新鲜蒲菜于 105℃ 下烘至恒质量后,准确称量 1 g 于 50 mL 烧杯中,加入 15 mL 混合酸(硝酸:高氯酸=4:1)。在电热板上低温加热约 2 h,待黄烟冒尽后,升高温度加热至溶液近干,加入少量蒸馏水继续加热至白烟冒尽(此时溶液为澄清透明),加入适量蒸馏水溶解,转移至 25 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。平行做 1 份空白试验,采用 ICP-MS 仪器测定无机元素含量。

1.2.2 营养元素含量的测定 维生素 C 含量采用 2,6-二氯酚靛酚滴定法^[4]测定,纤维素含量采用蒽酮法^[5]测定,蛋白质含量采用凯氏定氮法^[6]测定,脂肪含量采用近红外法^[6]。

- [3] 王贵元, 夏仁学, 曾祥国, 等. 不同温度储藏红肉脐橙果肉主要色素和糖含量的变化及其相关性 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(3): 180-183.
- [4] Yehoshua S B. Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality [M]. Florida, US: CRC Press, 2005: 11-34.
- [5] 吕纪增. 水果热处理保鲜正被关注 [J]. 北京农业, 2005(11): 28-29.
- [6] 王青云, 龚吉军, 钟海雁. 柑橘果实采后热处理研究进展 [J]. 食品科学, 2010, 31(11): 316-319.
- [7] 林丽萍, 陈于陇, 朱丽琴, 等. 热处理对柑橘霉菌生活力和致病力的影响 [J]. 现代食品科技, 2015, 31(4): 42-45.
- [8] 刘慧. 现代食品微生物学实验技术 [M]. 中国轻工业出版社, 2013: 30-36.
- [9] 王公坤. 不同条件对产黄青霉菌原生质体制备率与再生率的影响 [J]. 科技资讯, 2013(10): 123.
- [10] 张延新, 刘开启, 夏振远, 等. 淡紫拟青霉菌 IPC 菌株原生质体形成和再生条件 [J]. 植物学报, 2005, 31(5): 42-45.