

脉冲微波对大米寄生曲霉致死效应的研究

曾淑薇, 黄晶晶, 赵思明, 车丽, 黄琪琳

(华中农业大学食品科学技术学院, 环境食品学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要: 以大米污染物寄生曲霉为研究对象, 分析了脉冲微波剂量、脉冲宽度、微波总时间、间歇时间对寄生曲霉生长、细胞通透性以及表面形态的影响及规律, 以期为大米储藏过程中寄生霉菌的微波控制提供理论依据。研究结果及结论如下: 随着脉冲微波强度的增加, 霉菌的蛋白质和核酸渗透量、电解质渗透率以及细胞内 Ca^{2+} 的荧光强度呈先增大后减小的趋势, 说明脉冲微波可引起寄生曲霉的细胞膜出现电穿孔, 导致其细胞内物质溶出量突然增大, 而且推测出脉冲微波灭霉的热效应和非热效应的临界条件为微波剂量 5~7.5 W/g、脉宽 200 ms、微波总时间 20 s、间歇时间 150 ms。超越临界条件, 脉冲微波处理可导致寄生曲霉生长量显著降低, 对其生长有明显的抑制作用。脉冲微波处理后寄生曲霉表面形态发生卷曲皱缩, 进一步证实脉冲微波可改变寄生曲霉的细胞膜及其通透性。

关键词: 脉冲微波; 寄生曲霉; 生长曲线; 细胞膜通透性

文章编号: 1673-9078(2015)7-86-91

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.015

Effects of Pulsed Microwaves on *Aspergillus parasiticus* in Rice

ZENG Shu-wei, HUANG Jing-jing, ZHAO Si-ming, CHE Li, HUANG Qi-lin

(College of Food Science and Technology and MOE Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The potential application of pulsed microwave radiation in the control of *Aspergillus parasiticus* growth in rice during storage was evaluated in terms of fungal growth and cell membrane permeability. The parameters evaluated were microwave dose, pulse width, total time, and interval time. The results showed that fungal DNA, protein, and electrolyte leakage, as well as intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity, of *A. parasiticus* increased with an increase in microwave intensity, followed by a slight decrease. This indicated that pulsed microwaves could cause electroporation of the cell membrane, leading to increased cell membrane permeability and accelerated leakage of the cytoplasm. Moreover, threshold values of pulsed microwave irradiation on *A. parasiticus* under thermal and non-thermal conditions included the following: pulsed microwave dose of 5 to 7.5 W/g, pulse width of 200 ms, total processing time of 20 s, and interval time of 150 ms. Beyond these threshold values, fungal growth was significantly inhibited, according to the Gompertz equation. Additionally, the pulsed microwave radiation caused the mycelial surface of *A. parasiticus* to become rough, with a crimped and shrunken appearance, which further confirmed that pulsed microwaves could alter the *A. parasiticus* cell membrane and its permeability.

Key words: pulsed microwave; *Aspergillus parasiticus*; growth curve; cell membrane permeability

霉菌污染是谷物霉变的主要原因, 严重影响谷物的贮藏, 寄生曲霉是影响谷物储藏最常见的霉菌, 在农产品的收获前期、收获期和储藏期都可能污染谷物^[1]。目前常用的谷物储存方式如化学熏蒸、低温、气调包装等都可以一定程度上控制谷物霉变, 但上述技术方法存在诸多弊端, 如食品安全隐患、环境污染、

收稿日期: 2014-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401652); 湖北省科技厅重大专项 (ZDN0006)

作者简介: 曾淑薇 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食加工和副产物综合利用

通讯作者: 黄琪琳 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为粮食加工和副产物综合利用, 淀粉蛋白质等食品大分子的结构和功能特性

高投入低效率等。微波作为一种现代化食品加工技术, 能在较低温度和较短时间内杀灭有害生物, 且能保持食品的营养成分^[2-3]。脉冲微波是一种间歇发射的微波方式, 微波发射的能量短时间内突变后迅速回到初始状态。相对普通连续微波而言, 脉冲微波能在无明显热效应的情况下同样引起较大的生物响应^[4]。除具有高效、环保的优点外, 脉冲微波比普通连续微波能耗更低, 杀菌时间更短, 且设备运行的稳定性更高, 是一种应用前景广阔的冷杀菌技术^[5]。目前在水处理、液态食品、中成药及一些医疗器械的杀菌消毒中已有应用^[6], 但针对稻米的脉冲微波防霉技术的研究较少。

目前, 微波杀菌机理的研究主要集中在热效应和非热效应两方面, 但关于非热效应仍存在争议^[7]。热

效应理论认为, 高强度微波处理能使微生物体系局部温度明显升高, 造成微生物细胞壁的剥落或细胞膜的破坏, 导致微生物体内的大分子变性失活; 微波也可能影响细胞膜电位而破坏微生物的结构与功能, 从而达到杀菌效果^[8~10]。低强度微波还可以发挥非热效应, 在没有明显温度变化的情况下促使微生物形成各种类型的分子转变, 导致细胞产生生理、生化及功能上的变化, 细胞膜发生可逆性通透的改变, 但不会造成细胞结构的损坏^[11~12]。因此, 微波杀菌是热效应和非热效应的共同作用的结果。

本试验选取脉冲微波剂量、脉冲宽度、脉冲间歇时间、总时间四个因素, 研究脉冲微波对大米寄生曲霉生长、细胞膜透性以及表面形态的影响, 确定了曲霉致死的脉冲微波临界条件。不仅揭示了脉冲微波对大米寄生曲霉致死机制, 而且为脉冲微波在大米储藏中的应用提供理论和实践依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂

大米, 新优 188, 湖北黄冈东坡粮油集团提供; 寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*), 保藏在中国工业微生物菌种保藏管理中心, 菌种保藏号 CICC2310。

钙离子荧光探针 Fluo-3/AM, 购于日本同仁化学; 葡萄糖、NaCl, 购于国药集团; 琼脂, 购于成都华西生化; 以上试剂均为分析纯。

1.2 试验仪器

QW-1HO 型脉冲微波炉, 广州科威微波能有限公司; FE30 电导率仪, 瑞士 Mettler-Toledo 仪器有限公司; RF-5301PC 型荧光分光光度计, 日本岛津公司; JSM-6390 PLV 型扫描电镜, 日本 JEOL 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 寄生曲霉的培养

用 9 mL 无菌生理盐水洗净寄生曲霉斜面上的孢子, 在无菌条件下将孢子悬浮液加入 70 mL PDA 液体培养基中, 置于 200 r/min 摇床, 30 °C 培养 48 h 后, 收集菌丝球备用。PDA 液体培养基的制备: 土豆洗净削皮, 称取 200 g, 加入 1000 mL 蒸馏水煮沸, 将土豆煮软过滤后定容到 1000 mL, 加入 20 g 葡萄糖, 于电磁炉上煮至葡萄糖融化, 分装后于 121 °C、101 kPa 灭菌 20 min。

1.3.2 脉冲微波单因素试验

分别以固定间歇时间 100 ms、总时间 40 s、剂量

10 W/g, 脉冲宽度梯度 100、200、300、400、500 ms; 固定脉宽 300 ms、总时间 40 s、剂量 10 W/g, 脉冲间歇时间梯度 50、100、150、200、250 ms; 固定脉宽 300 ms、间歇时间 100 ms、剂量 10 W/g, 脉冲微波总时间梯度 10、20、30、40、50 s; 固定脉宽 300 ms、间歇时间 100 ms、总时间 40 s、脉冲微波剂量梯度 1、2.5、5、7.5、10、12.5、15、20 W/g, 考察上述四个因素对霉菌致死相关指标的影响。

1.3.3 寄生曲霉生长曲线的测定

孢子悬浮液的制备: 取 7 mL 无菌生理盐水洗净斜面培养基上的孢子, 震荡器上震荡以打散孢子, 使之成为孢子悬液, 采用血球计数法调整浓度为 1×10^6 cfu/mL 孢子悬浮液。

采用不同的脉冲微波处理 1×10^6 cfu/mL 孢子悬浮液后, 取 5 mL 孢子悬浮液接种到 50 mL 的 PDA 液体培养基中, 200 r/min, 30 °C 摇床培养, 每 12 h 将曲霉培养液真空抽滤得菌丝球, 将菌丝球于 70~80 °C 烘箱中烘干至恒重得到干燥菌体, 称重 (g)。

1.3.4 寄生曲霉细胞膜电解质渗透率的测定

按 4% 的接种量将菌丝球接入 0.85% 的生理盐水中, 采用不同的脉冲微波处理, 根据文献^[12]的方法, 测量电导率 ($\mu\text{S}/\text{cm}$), 并计算寄生曲霉电解质的渗透率 (%)。

1.3.5 寄生曲霉细胞膜蛋白质和核酸渗透量的测定

按 4% 的接种量将菌丝球接入 0.85% 的生理盐水中, 采用不同的脉冲微波处理后, 过滤, 取滤液分别于 280 nm 及 260 nm 处测量蛋白质及核酸的吸光值。以滤液的吸光值表示蛋白质及核酸的渗透量。

1.3.6 寄生曲霉细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的测定

荧光探针 Fluo-3/AM 负载: 将 Fluo-3/AM 溶于无水 DMSO 中配制成浓度为 1 mmol/L 的 Fluo-3/AM/DMSO 溶液备用。取一定量的 Fluo-3/AM/DMSO 溶液加入到脉冲微波处理后的 1×10^7 cfu/mL 孢子悬浮液中, 使 Fluo-3/AM 的终浓度为 $3 \mu\text{mol}/\text{L}$, 37 °C 避光孵育 30 min, 加生理盐水至 1.5 mL。

Ca^{2+} 荧光强度的测量: 将负载好的样品于荧光分光光度计下测量, 以 490 nm 为激发波长, 于 528 nm 处定量检测钙离子荧光强度^[12]。

1.3.7 寄生曲霉表面形态观察

将寄生曲霉孢子划线培养, 取干净无菌的盖玻片斜插于培养基中, 培养 2 d 后, 取出盖玻片装于无菌封口袋中, 与 100 g 的大米进行混合, 采用脉冲微波处理, 将处理后的盖玻片放在含有称量皿上熏蒸一个小时, 然后取出喷金固定, 用扫描电镜进行观察。

1.3.8 数据处理

本试验中各指标均测定 3 次重复, 3 次平行, 采用 Excel 2010、SAS 数据处理和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 脉冲微波对寄生曲霉生长特性的影响

图 1 显示了不同脉冲微波处理后寄生曲霉的生长曲线。该生长曲线可用 Gompertz 方程进行拟合, 描述寄生曲霉针对微波辐射的生长适应性^[8]。Gompertz 方程如下:

$$N = N_0 + b_0 e^{(-b_1 e^{-b_2 t})}$$

其中, N 为总生长量; N_0 为与残菌数相关的参数, 当 $t=0$ 时, 残菌数 $= N_0 + b_0 e^{-b_1}$; b_0 为稳定期的生长量; b_1 为霉菌的早期生长适应性参数; b_2 为生长速率常数相关的参数。

根据 Gompertz 方程, 由偏最小二乘法拟合的相关参数如表 1 所示。由图 1 可知, 拟合曲线与实测生长量很吻合, 拟合精度高 ($R^2 > 99\%$, 且残差平方和均远小于回归平方和)。

由图 1 可知霉菌的生长量随着脉冲微波强度的增大而减小, 脉宽 400 ms 条件下稳定期生长量最小。表 1 显示, 脉冲微波处理后, 霉菌的生长速率常数皆低于空白组, 尤其是总时间为 40 s、微波剂量为 10 W/g 时生长速率较空白下降约 30%, 说明脉冲微波处理抑

制了霉菌的生长, 霉菌生长缓慢。此外间歇时间为 200 ms 时生长速率最接近空白组, 稳定期的生长量略高于空白, 说明低强度脉冲微波处理有可能会刺激霉菌生长。

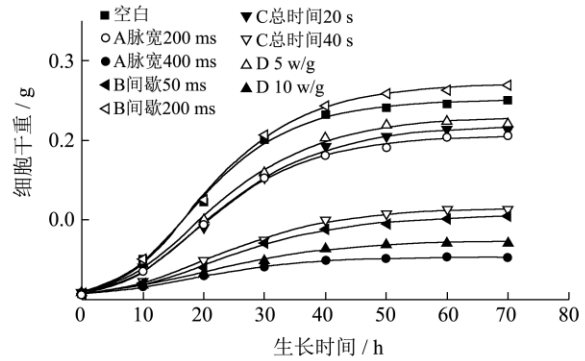


图 1 脉冲微波处理对霉菌生长曲线的影响, 其中点为实测生长量, 实线为拟合曲线

Fig.1 Effects of pulsed microwaves on the growth of *A. parasiticus*. Circles, squares and triangles indicate individual points of measure, while the curve is fitted to the Gompertz equation

注: A: 固定间歇时间 100 ms, 总时间 40 s, 剂量 10 W/g; Fixed intermittent time 100 s, total time 40 s, dose 10 W/g; B: 固定脉宽 300 ms, 总时间 40 s, 剂量 10 W/g; Fixed width 300 ms, total time 40 s, dose 10 W/g; C: 固定脉宽 300 ms, 间歇时间 100 ms, 剂量 10 W/g; Fixed width 300 ms, intermittent time 100 s, dose 10 W/g; D: 固定脉宽 300 ms, 间歇时间 100 ms, 总时间 40 s Fixed width 300 ms, intermittent time 100 s, total time 40s.

表 1 寄生霉菌生长曲线 Gompertz 方程拟合参数

Table 1 *A. parasiticus* growth parameters derived from the Gompertz equation

参数	空白	A		B		C		D	
		200 ms	400 ms	50 ms	200 ms	20 s	40 s	5 W/g	10 W/g
N_0	0.007	0.005	0.006	0.007	0.006	0.007	0.007	0.006	0.006
b_0	0.244	0.201	0.048	0.099	0.266	0.212	0.109	0.224	0.068
b_1	4.955	4.667	4.001	4.621	4.661	4.663	4.539	4.428	3.764
b_2	0.099	0.088	0.075	0.076	0.091	0.084	0.068	0.084	0.072

2.2 脉冲微波对寄生曲霉细胞通透性的影响

2.2.1 脉冲微波对寄生曲霉蛋白质、核酸渗透量的影响

图 2 显示了脉冲微波处理对霉菌蛋白质和核酸渗透量的影响。蛋白质、核酸渗透量随脉冲微波间歇时间的延长呈下降趋势, 且随脉冲宽度, 微波总时间, 微波剂量的增大而先增大后减小, 在脉宽 200 ms、总时间 20 s、微波剂量 5 W/g, 间歇时间 200 ms 时, 吸光值 (即蛋白质、核酸的渗透量) 急剧增大, 可初步

推测为非热效应与热效应的临界条件。而且当脉冲宽度为 300 ms、总时间为 40 s、微波剂量为 10 W/g 时, 渗透量达到最大值。蛋白质和核酸渗透量的变化主要是由于随脉冲微波强度的增大, 细胞膜在电磁场中被极化, 若当膜电位超过细胞膜的击穿电压时, 细胞膜出现电穿孔, 细胞内容物大量溶出, 导致蛋白质及核酸的渗透量增大^[9]。随着微波进一步处理, 体系温度升高, 过高的温度使细胞内大分子物质变性形成沉淀, 阻碍了细胞内物质的进一步渗出^[7], 导致渗透量减小, 但仍然显著高于未处理样品 ($p < 0.05$)。

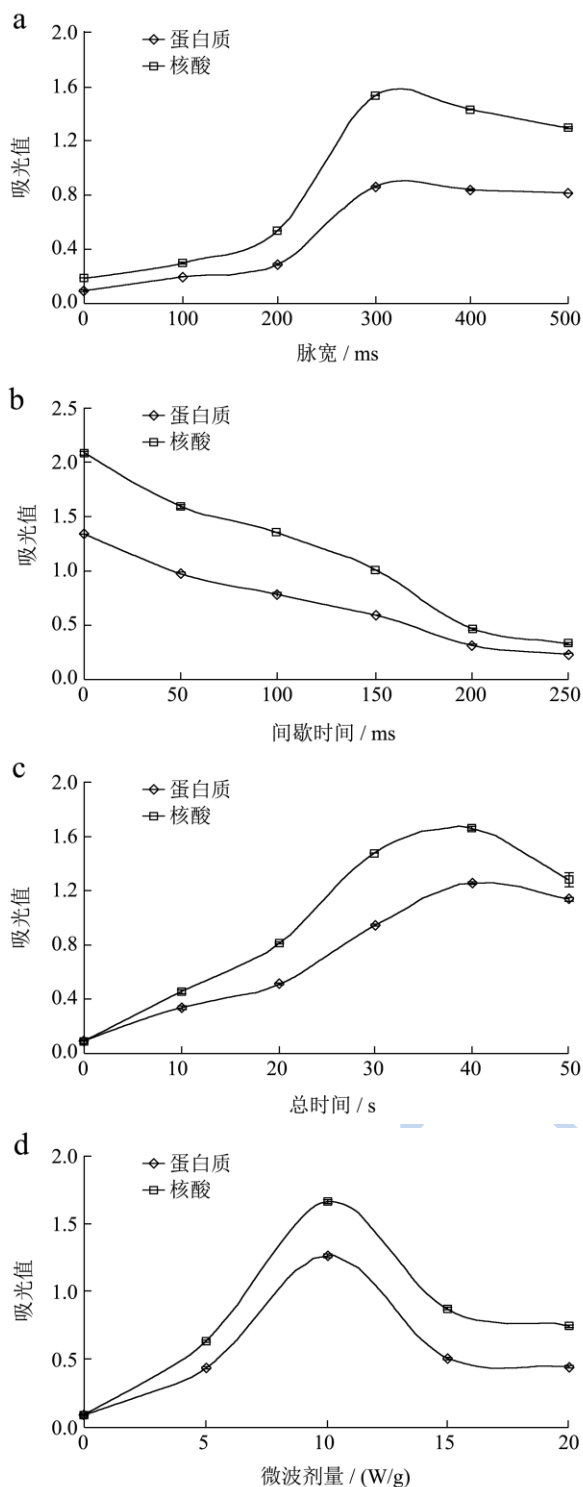


图2 脉冲微波处理对霉菌蛋白质和核酸渗透量的影响

Fig.2 Effects of pulsed microwaves on protein and DNA leakage in

A. parasiticus cell membrane

2.2.2 脉冲微波对寄生曲霉电解质渗透率的影响

由图3可知,随着脉冲宽度、微波时间、微波剂量的增大,间歇时间的缩短,霉菌的电导率呈现先增大后减小的趋势。当脉宽 200 ms、总时间 20 s、微波剂量 7.5 W/g 时,电解质渗透率急剧增大,可推测为

非热效应与热效应的临界条件,其与蛋白质、核酸渗透量急剧变化的临界微波条件基本一致。

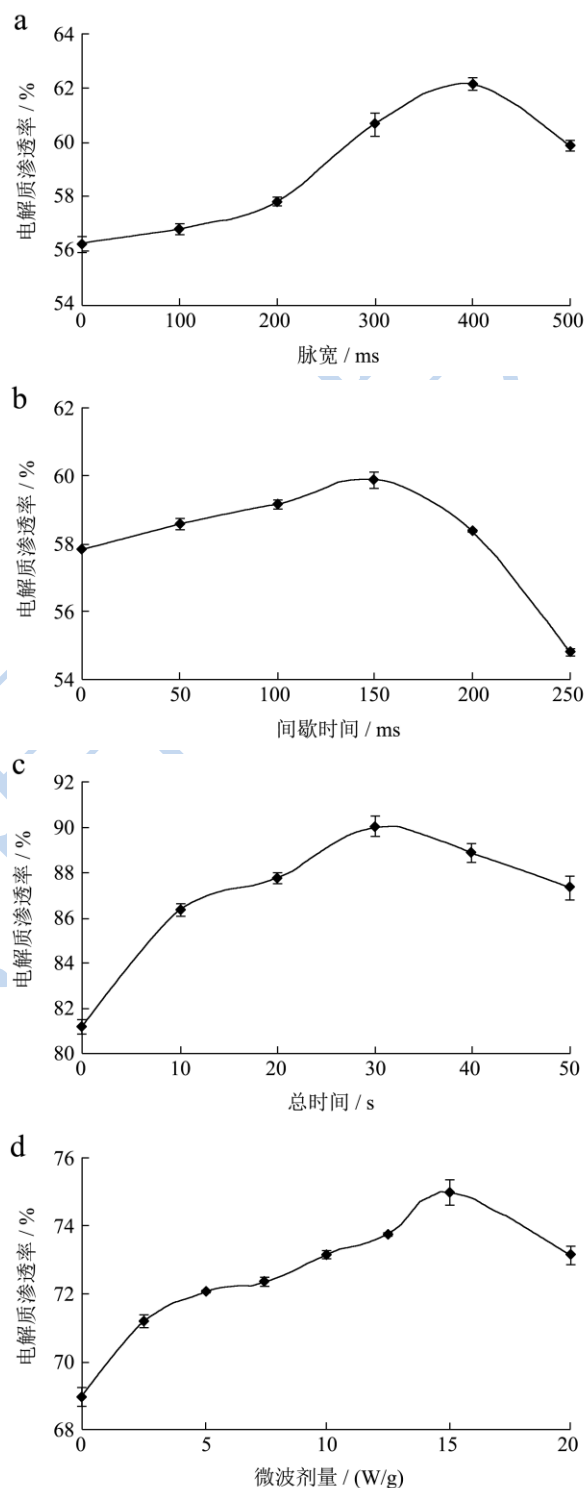


图3 脉冲微波处理对霉菌电解质渗透率的影响

Fig.3 Effects of pulsed microwaves on electrolyte permeability of *A.*

parasiticus

当脉宽 400 ms、总时间 30 s、微波剂量 15 W/g,间歇时间 150 ms 时,电解质渗透率分别达到峰值,随后下降。总的来说,菌悬液电解质渗透率与蛋白质、核酸渗透量变化趋势相似,可推断在高强度脉冲微波

场中霉菌菌体细胞膜会发生不可逆通透性变化。

2.3 脉冲微波对寄生曲霉孢子 Ca^{2+} 荧光强度的影响

的影响

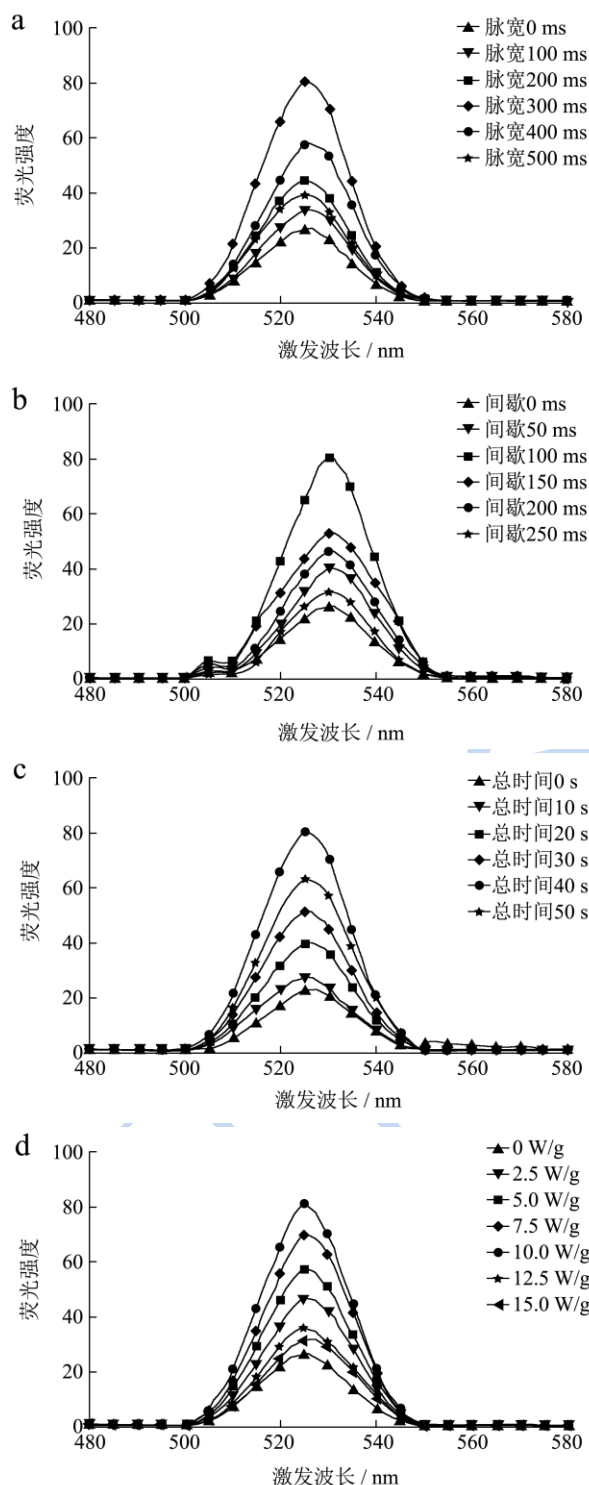


图4 脉冲微波处理对寄生曲霉孢子细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的影响

Fig.4 Effects of pulsed microwaves on the intracellular Ca^{2+} fluorescence intensity of *A. parasiticus*

细胞内的钙离子以结合态和游离态两种形式存

在，游离态具有较高的生物活性，充当细胞内的第二信使，在细胞代谢、细胞分裂及神经传导方面有重要作用。细胞内的游离钙离子 (Ca^{2+}) 浓度极低约为 1×10^{-7} mol/L (胞外 1×10^{-3} mol/L)，当细胞内的钙离子浓度异常时会导致细胞代谢失常，甚至造成细胞的死亡^[11-12]。

Fluo-3/AM 探针被细胞膜上的特异性酯酶水解为 Fluo-3，然后进入细胞，与钙离子结合发荧光。在正常情况下，细胞内 Ca^{2+} 荧光强度与 Ca^{2+} 浓度成正比关系^[13]。图4显示了不同脉冲微波条件下寄生曲霉胞内 Ca^{2+} 荧光强度。随着脉冲宽度、微波时间、微波剂量的增大，间歇时间的缩短，胞内 Ca^{2+} 荧光强度呈现先增大后减小的趋势。 Ca^{2+} 荧光强度的变化率在脉宽 200 ms、总时间 30 s、间歇时间 150 ms 时突然增大，可推测为非热效应与热效应的临界点。当脉宽 300 ms、间歇时间 100 ms、总时间 40 s、微波剂量 10 W/g 时，胞内 Ca^{2+} 荧光强度分别达到峰值。在脉冲微波场中，孢子吸收能量使得细胞膜上的极性分子发生高频的震动，细胞膜的流动性增强，细胞膜上控制细胞钙离子通道的蛋白质发生位移或者脱落，造成 Ca^{2+} 通道打开，细胞外的钙离子大量涌入细胞内，使得细胞内的 Ca^{2+} 荧光强度升高^[14]。随脉冲微波处理强度进一步增大，体系温度升高，孢子死亡率升高，细胞膜上特异性水解 Fluo-3/AM 探针的酯酶失活^[12]，故检测出来的 Ca^{2+} 荧光强度降低。

2.4 脉冲微波对寄生曲霉表面形态的影响

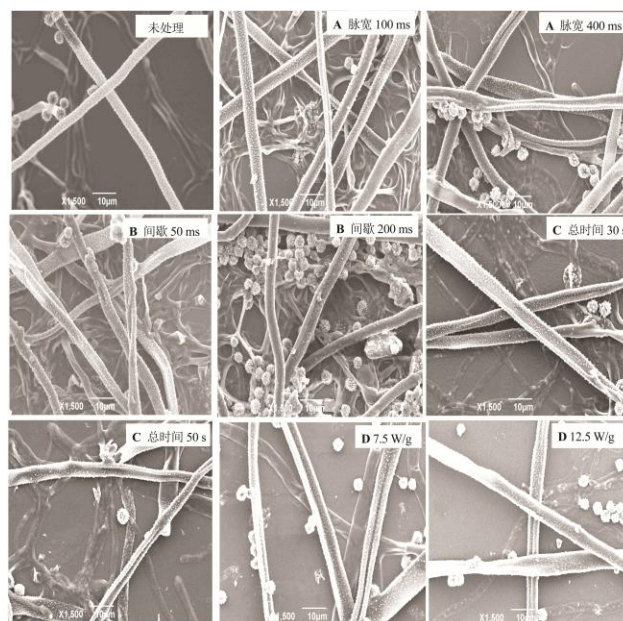


图5显示了扫描电镜观察不同脉冲微波处理后，寄生曲霉的表面形态。未处理的寄生曲霉表面光滑平缓，未出现扭曲折皱现象。当脉宽为 100 ms、间歇时

间为 200 ms 时,少数出现瘪平和曲折现象,仍能发现较圆润的菌丝体。当脉宽为 400 ms、间歇时间为 50ms 时,大部分寄生曲霉呈曲折瘪平状,部分曲霉轮廓变的模糊。随脉冲微波处理总时间的延长,菌丝表面发生褶皱卷曲,尤其时间为 50s 时,所有的霉菌已呈现瘪平扭曲的形状,且有些霉菌茎杆出现破损。当微波剂量为 7.5 W/g 以后,寄生曲霉曲折瘪平的现象进一步加深寄生曲霉表面形成凹槽状的褶皱。

3 结论

采用不同的脉冲宽度、微波剂量、微波时间、间歇时间处理大米寄生曲霉,监测其生长曲线并进行 Gompertz 模型拟合,测定曲霉的蛋白质、核酸渗透量及电解质渗透率等,表征细胞膜的通透性变化,利用扫描电镜观测霉菌菌丝体的表面形态,得出以下结论:

3.1 霉菌的生长量随着脉冲微波强度的增大而减小,结合 Gompertz 方程拟合可知脉冲微波处理抑制了霉菌的生长,微波强度越大抑制作用越显著。

3.2 通过测定曲霉的蛋白质、核酸渗透量,电解质渗透率以及细胞内的 Ca^{2+} 荧光强度,证实脉冲微波处理会导致曲霉细胞膜发生电穿孔,大分子溶出增加。随微波强度进一步增强,大分子聚集堵塞细胞膜从而渗透量减小。

3.3 利用扫描电镜对曲霉菌丝体形态观察的结果显示,脉冲微波处理后寄生曲霉菌丝表面发生褶皱卷曲,与细胞膜渗透各指标测定结果吻合。

3.4 脉冲微波灭霉的热效应和非热效应的临界条件经推测为脉宽 200 ms、总时间 20 s、微波剂量 5~7.5 W/g、间歇时间 150 ms,超过此临界条件杀菌效果会显著增强。

参考文献

- [1] Zhao S M, Xiong S B, Qiu C G, et al. Effect of microwaves on rice quality [J]. Journal of Stored Products Research, 2007, 43(4): 496-502
- [2] 肖南,何建妹,李婷,等.三华李果糕的微波杀菌工艺研究[J].现代食品科技 2013,29(5):1093-1095
XIAO Nan, HE Jian-mei, LI Ting, et al. Microwave sterilization of Sanhuali cake [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1093-1095
- [3] 周仙根,谢正成,周成敏,等.锥栗微波灭菌工艺的研究[J].现代食品科技,2012,28(3):329-331
ZHOU Xian-gen, XIE Cheng-zheng, ZHOU cheng-min, et al. The research of sterilization technology castanea henryi induced by microwave [J]. Modern Food Science and

- Technology, 2012, 28(3): 329-331
- [4] Gunasekaran S, Yang H W. Optimization of pulsed microwave heating [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(4): 1457-1462
- [5] 王萍,肖更生,张友胜,等.五花茶饮料微波杀菌技术研究[J].现代食品科技,2010,26(3):260-266
WANG Ping, XIAO Geng-sheng, ZHANG You-sheng, et al. Disinfection of floral herbal tea using microwave [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(3): 260-266
- [6] Salazar-González C, San Martín-González M F, López-Malo A, et al. Recent studies related to microwave processing of fluid foods [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 31-46
- [7] Belyaev I. Non-thermal biological effects of microwaves: current knowledge, further perspective, and urgent needs [J]. Electromagnetic Biology and Medicine, 2005, 24(3): 375-403
- [8] Fang Y P, Hu J, Xiong S B, et al. Effect of low-dose microwave radiation on *Aspergillus parasiticus* [J]. Food Control, 2011, 22(7): 1078-1084
- [9] Zhang M, Zhu R R, Zhang M F, et al. High energy pulse-electron-beam-induced molecular and cellular damage in *Saccharomyces cerevisia* [J]. Research in Microbiology, 2013, 164(2): 100-109
- [10] 卢智远,石频频,朱满座,等.微波及高强电磁脉冲灭菌的机理分析[J].生物医学工程学杂志,2008,25(4):811-813
LU Zhi-yuan, SHI pin-pin, ZHU Man-zuo, et al. The analysis of the mechanism of microwave and high intensity electromagnetic pulse sterilization [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2008, 25(4): 811-813
- [11] Zeng S W, Huang Q L, Zhao S M. Effects of microwave irradiation dose and time on Yeast ZSM-001 growth and cell membrane permeability [J]. Food Control, 2014, 46(12): 360-367
- [12] Ramundo-Orlando A. Effects of millimeter waves radiation on cell membrane - a brief review [J]. Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves, 2010, 31(12): 1400-1411
- [13] Zhang W H, Rengel Z, Kuo J. Determination of intracellular Ca^{2+} in cells of intact wheat roots: loading of acetoxymethyl ester of Fluo-3 under low temperature [J]. The Plant Journal, 1998, 15(1):147-151
Geletyuk V I, Kazachenko V N, Chemeris N K, et al. Dual effects of microwaves on single Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured kidney cells Vero [J]. FEBS Letters, 1995, 359(1): 85-88

现代食品科技