

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240117003

低温等离子体处理模式对冷藏南美白对虾中假单胞菌的抑菌效果及机制研究

胡袞源[#], 谢 凯[#], 胡家杰, 邓尚贵, 袁鹏翔^{*}

(浙江海洋大学食品与药学学院, 舟山 316022)

摘要: **目的** 探究低温等离子体(cold plasma, CP)处理模式对冷藏南美白对虾中常见荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的抑菌效果及其作用机制。**方法** 通过 CP 直接处理和循环处理 *P. fluorescens*, 研究了两种处理模式下臭氧含量动态变化对 *P. fluorescens* 的生长曲线、细胞活力、生物膜形成、细胞壁、细胞膜完整性和南美白对虾菌落总数及假单胞菌数等指标的影响。**结果** 两种处理模式在 CP 处理 3 min 或 3 cycles 后, 包装内臭氧含量达到最高值, 分别为(850±10) mg/m³和(874±20) mg/m³。CP 循环处理模式使得臭氧含量随处理循环数递增, 因此获得更长的臭氧存在时间从而具有更大的抑菌能力。*P. fluorescens* 生长曲线表明 CP 处理使得菌体延迟期变长且对数生长期推迟。此外, CP 处理后的 *P. fluorescens* 细胞活力显著下降($P<0.05$), CP-1 min、CP-3 min 和 CP-3 cycles 组的细胞活力分别为 33.03%、5.90%和 4.82%。同时相比 CP-3 min 组, CP-3 cycles 组的 *P. fluorescens* 生物膜 OD 值下降 27.61%。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性和核酸蛋白泄漏量结果表明, 细胞壁和细胞膜完整性受损可能是 *P. fluorescens* 失活的直接原因。对虾保鲜测试结果证实, 贮藏第 6 d, CP-3 cycles 组虾体中的菌落总数和假单胞菌数相比 CP-3 min 组分别降低了 58.02%和 79.54%。**结论** CP 循环处理模式通过延长臭氧与对虾的暴露时间, 提高了对 *P. fluorescens* 的灭活效果, 同时还具有更优越的保鲜能力。本研究为开发基于 CP 技术的新型保鲜技术应用提供了理论参考。

关键词: 低温等离子体; 荧光假单胞菌; 抑菌机制; 保鲜

Study on the antibacterial effect and mechanism of cold plasma treatment modes on *Pseudomonas fluorescens* in refrigerated *Penaeus vannamei*

HU Xi-Yuan[#], XIE Kai[#], HU Jia-Jie, DENG Shang-Gui, YUAN Peng-Xiang^{*}

(College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT: Objective To explore the antibacterial effect and mechanism of cold plasma (CP) treatment modes on *Pseudomonas fluorescens*, which is common in refrigerated *Penaeus vannamei*. **Methods** In this experiment, *Pseudomonas fluorescens* was treated by CP direct treatment and cyclic treatment. The effects of dynamic changes of

基金项目: GK 省人才项目-浙江省“万人计划”科技创新杰出人才培养项目(21137006922)

Fund: Supported by the GK Provincial Talent Project-Zhejiang Province “Ten thousand People Plan” Scientific and Technological Innovation Outstanding Talent Training Project (21137006922)

#胡袞源、谢凯为共同第一作者

#HU Xi-Yuan and XIE Kai are Co-first Authors

*通信作者: 袁鹏翔, 博士, 副教授, 主要研究方向为水产品加工。E-mail: xiangzi661822@163.com

*Corresponding author: YUAN Peng-Xiang, Ph.D, Associate Professor, Zhejiang Ocean University, No.1, Haida South Road, Lincheng Street, Dinghai District, Zhoushan 316022, China. E-mail: xiangzi661822@163.com

ozone content in 2 treatment modes on the growth curve, cell viability, biofilm formation, cell wall, cell membrane integrity of *Pseudomonas fluorescens*, the total viable count and *Pseudomonas* count of *Penaeus vannamei* were studied.

Results The results showed that the ozone content in the packaging reached the highest value of (850 ± 10) mg/m^3 and (874 ± 20) mg/m^3 after 3 min or 3 cycles of CP treatment, respectively. The CP cyclic treatment mode allowed the ozone content to increase with the number of treatment cycles, thus obtaining a longer ozone lifetime and thus having a greater antibacterial ability. The growth curve of *Pseudomonas fluorescens* showed that CP treatment prolonged the lag phase and delayed the logarithmic growth phase. In addition, the cell viability of *Pseudomonas fluorescens* after CP treatment was significantly ($P<0.05$) decreased, and the cell viability of CP-1 min, CP-3 min and CP-3 cycles groups was 33.03%, 5.90% and 4.82%, respectively. Meanwhile, compared with CP-3 min group, the OD value of *Pseudomonas fluorescens* biofilm in CP-3 cycles group decreased by 27.61%. The results of alkaline phosphatase (AKP) activity, nucleic acid and protein leakage showed that the damage of cell wall and membrane integrity might be the direct cause of *Pseudomonas fluorescens* inactivation. The results of shrimp preservation test confirmed that on the 6 th day of storage, the CP-3 cycles group reduced the total viable count in the shrimp by 58.02% and the *Pseudomonas* count by 79.54% compared with the CP-3 min group. **Conclusion** The CP cyclic treatment mode, by prolonging the exposure time to ozone and shrimp, enhanced the inactivation effect on *Pseudomonas fluorescens* while exhibiting superior freshness preservation capabilities. This study provides a theoretical reference for the development of new preservation technology based on CP technology.

KEY WORDS: cold plasma; *Pseudomonas fluorescens*; antibacterial mechanism; preservation

0 引言

南美白对虾(*Penaeus vannamei*)是我国淡水/海水养殖的重要虾种,因其丰富的蛋白质含量和不饱和脂肪酸而深受消费者喜爱^[1]。根据联合国粮食及农业组织的统计,2022 年全球南美白对虾的产量约为 581 万 t, 占据甲壳类动物总产量的 51.7%^[2]。然而, 虾等水产品因其特殊的化学组成即高水分含量(70%~90%)和丰富营养成分使其易成为细菌生长的底物, 从而在贮藏期间极易腐败变质^[3]。低温贮藏常作为食品保存的有效手段而被广泛应用, 然而微生物仍会在低温条件下发生生化反应, 从而导致虾体持水力下降和感官劣化, 异味甚至腐败^[4-5]。

假单胞菌(*Pseudomonas*)作为常见的水产品优势腐败菌, 其快速繁殖被认为是引起水产品蛋白质降解和脂质氧化的主要原因^[6]。例如, 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, *P. fluorescens*)是一种需氧性的革兰氏阴性菌, 在冷藏条件下会产生蛋白酶和脂酶等而生成异味, 同时具有较强的生物被膜形成能力^[7]。WANG 等^[6]发现接种 *Aeromonas hydrophila* 和 *Pseudomonas jessenii* 会导致草鱼中挥发性盐基氮和生物胺含量迅速增加; XIANG 等^[8]的研究发现通过等离子体活化水处理可以有效抑制腐败鸡肉中 *Pseudomonas deceptionensis* CM2 的生长。因此选择一种高效无残留的杀菌技术用以延长水产品保鲜期极为必要。

低温等离子体(cold plasma, CP)技术因其出色的杀菌能力和非热加工特性而受到广泛关注^[9]。据报道, CP 致使

微生物失活的主要原因是等离子体在产生过程中形成的自由基、离子、紫外线光子等化学反应的活性物质, 如 H_2O_2 、 O_3 、 NO^{2-} 、 NO^{3-} 和 ONOO^- 等, 这些活性粒子(active particles, AP)可以促使细胞膜的脂质氧化以及微生物细胞中蛋白质和 DNA 的氧化, 最终导致微生物完全失活^[10]。此外, 也有研究表明, 高剂量活性氧应激是细胞膜损伤、脂质氧化、内源性酶失活和 DNA 损伤的主要原因, 而活性氮也会增加对细胞的特异性毒性^[11-12]。因此探究 CP 对水产品中的腐败微生物的抑制作用和杀菌机制极为重要。

本研究首先对 CP 直接处理和循环处理模式诱导产生的臭氧的含量进行动态追踪, 初步评估两种处理模式对活性粒子的保留效率。同时, 结合细胞水平的检测指标(生长曲线、生物膜形成、细胞活力、细胞壁和细胞膜完整性)进一步地探究 CP 两种处理模式对 *P. fluorescens* 的菌悬液杀菌效率并揭示其杀菌机制。最后, 综合评估两种模式对接种 *P. fluorescens* 南美白对虾中微生物变化的影响, 以期开发基于 CP 技术的新型保鲜技术提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南美白对虾(*Litopenaeus Vannamei*), 每只质量 (15 ± 5) g, 购买于浙江舟山水产城, 加冰于 2 h 内运至实验室。

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) (BNCC336632, 北京北纳创联生物技术研究院); 氯化钠、甲醇、乙醇、冰醋酸、正己烷、硼酸、甲基红、溴甲酚绿、氧化镁(分析纯,

国药集团化学试剂有限公司); 盐酸(0.01 mol/L, 深圳市博林达科技有限公司); 胰蛋白胍大豆琼脂(tryptose soya agar, TSA)、胰蛋白胍大豆肉汤(trypticase soy broth, TSB)、平板计数琼脂(plate count agar, PCA)、假单胞菌 CFC 选择性培养基(青岛海博生物科技有限公司); 磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS) (0.01 mol/L, pH=7.2~7.4, 北京索莱宝科技有限公司); CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP) 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪器与设备

BK 130/36 介质阻挡等离子体发生装置(美国 Phenix 科技公司); iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); U-2800 紫外可见分光光度计、F-7000 荧光分光光度计(株式会社日立制作所); Multifuge X1R 高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); GZX-03 臭氧测定仪(上海高致精密仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌悬液的制备

将-80℃下冻藏有 *P. fluorescens* 的冻藏管在 40℃水浴中解冻 2 min, 表面杀菌后在超净台中将 *P. fluorescens* 接种在 TSB 中, 并在 25℃下孵育 18 h。将过夜培养的 TSB 通过 6000 r/min 离心 10 min, 以获得菌体沉淀。用无菌 PBS 冲洗菌体, 重复离心与冲洗两次, 最后菌体重悬于 PBS 中。最后测量其 OD_{600 nm} 值, 调整浓度后制成 8 log CFU/mL 的菌悬液。

1.3.2 低温等离子体处理

本研究所的等离子体处理方式是采用 HU 等^[13]的方法。首先, 将无菌培养皿中制备的悬浮液(10 mL)放置在尺寸为 200 mm×300 mm 的聚丙烯食品包装袋的中心。然后, 将样品放置在两个铝电极之间并用两种不同模式进行处理, 包括直接处理和循环处理(即分 3 次循环处理样品, 每次 CP 处理 1 min, 间隔 4 min)。在两种处理模式下, 样品暴露于 35 kV 的电压下 CP 处理 1 min 或 3 min, 处理完成后在室温下保持 1 h。样品以未处理组为对照组, 直接处理下的样品按 CP 处理 1 min 和 3 min 被分别命名为 CP-1 min 和 CP-3 min, 循环处理下的样品命名为 CP-3 cycle, 所得样品立即进行实验测定各指标。

1.3.3 臭氧含量测定

聚丙烯食品包装袋中的臭氧浓度由臭氧气体检测仪完成。直接处理组在 CP 处理 3 min 后, 每 10 min 测定一次臭氧浓度。循环处理组在完成第一个 CP 处理循环(即 CP 处理 1 min)后, 每 10 min 测定一次臭氧浓度。结果以时间为横坐标, 臭氧浓度为纵坐标绘制时间-臭氧变化曲线。

1.3.4 生长曲线绘制

参考周倩倩等^[14]的方法并作适当修改。将 CP 处理后的

P. fluorescens 菌悬液, 用 PBS 稀释至浓度约为 6 log CFU/mL。将 3 组样品中的 10 μL 菌悬液分别注入含有 90 μL 新鲜 TSB 的 96 孔板中, 并在 25℃的温度下培养至 36 h。每 2 h 通过酶标仪处测 OD_{630 nm} 值, 结果以时间为横坐标, OD 值为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.5 细胞活力测定

参考徐慧倩^[15]的方法使用 CCK-8 试剂盒测量 CP 处理对 *P. fluorescens* 的细胞活力的影响。即将未经 CP 处理和经不同模式 CP 处理的 100 μL *P. fluorescens* 菌悬液添加到 96 位孔板中, 后向装有 100 μL *P. fluorescens* 菌悬液的 96 位孔板中各加入 10 μL CCK-8 试剂, 并在 37℃下培养 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测量吸光度。结果经过归一化处理, 并将存活的细胞百分比与未处理细胞的百分比进行比较。

1.3.6 生物膜测定

通过微板法评估 *P. fluorescens* 的生物膜形成活性^[16]。将 90 μL 新鲜培养溶液加入到 96 孔板中。然后, 在孔板中分别接种 10 μL 的 CP 处理或未处理的菌悬液(已稀释至 7 log CFU/mL), 并在相应温度下培养 36 h。最后, 使用酶标仪测定 OD_{630 nm} 值。

1.3.7 AKP 活性测定

通过测定菌悬液中细胞泄漏的 AKP 活性来评估细胞壁的完整性^[17]。在不同模式的 CP 处理后, 将菌悬液在 4℃下以 6500 r/min 离心 10 min, 然后弃去上清液, 用 PBS 重悬, 在冰水浴中超声破碎细胞, 取上清液为待测样品, 最后根据 AKP 试剂盒说明书进行测定。

1.3.8 核酸蛋白泄露量测定

根据 HU 等^[13]的方法, 将 CP 处理前后的菌悬液以 8000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并通过无菌微孔膜(0.22 μm PTFE)过滤。使用分光光度计记录 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值来测定核酸和蛋白质含量。

1.3.9 虾体保鲜测试

(1) 样品制备

参考 HU 等^[13]的方法并作适当修改。将南美白对虾表面喷洒 75%乙醇, 并在紫外灯下照射 30 min 以杀灭表面微生物。将预处理后的对虾浸入菌悬液(8 log CFU/mL)中, 并在超净台上干燥 1 h, 以促进细菌附着。随后, 对虾在 35 kV 电压条件下进行不同模式的 CP 处理。最后对虾在 4℃下贮藏, 并在 0、1、2、4 和 6 d 进行微生物测定。

(2) 微生物测定

将 10 g 虾肉放入含有 90 mL 无菌生理盐水(0.85%)的无菌烧杯中, 并在 7000~9000 r/min 下匀浆 30 s, 然后进行 10 倍梯度稀释。将各梯度稀释液混合或涂布在相应的培养基上。使用平板计数琼脂测定总菌数, 并在 30℃下培养 48~72 h。通过假单胞菌 CFC 选择性培养基(添加 CFC 补充

剂)测定对虾中假单胞菌数,并在 25°C下培养 48 h。

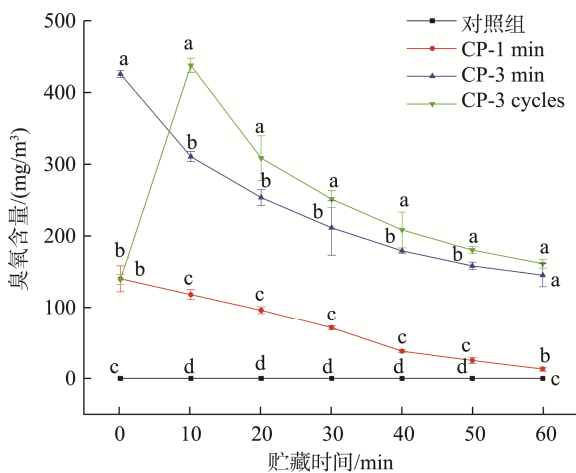
1.4 数据处理

所有实验重复 3 次,以平均值±标准偏差表示结果。方差分析使用 IBM SPSS 26 软件进行。使用 Duncan 检验来评估变量之间的差异, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 臭氧含量变化分析

臭氧作为 CP 中半衰期较长的活性氧(reactive oxygen species, ROS),被认为是杀菌保鲜的关键物质^[18]。一般认为臭氧潜在杀菌机制有两种,一种为微生物胞内的肽和蛋白质的氧化以及多不饱和脂肪酸的氧化导致细胞死亡,另一种为微生物膜的受损,导致细胞内容物外渗,最终细胞死亡^[17]。如图 1 所示,臭氧含量随着 CP 处理时间的增加而显著增加($P<0.05$)。CP-3 min 组和 CP-3 cycles 组中臭氧含量的最高值差距较小,两者的臭氧浓度的下降趋势相似。然而,循环处理使得样品在处理阶段(0~10 min)就暴露在高浓度的臭氧中,因此该模式可能具有更有效的杀菌潜力。此外,已经有研究证实,CP 对 *Shewanella Putrefaciens* 的杀菌机制涉及臭氧对其细胞结构(细胞壁和细胞膜)和胞内的双链 DNA 的损伤,最终导致 *Shewanella Putrefaciens* 的死亡,因此 CP 对 *P. fluorescens* 的杀菌机制可能与上述研究相似^[13]。



注:不同小写字母表示同一贮藏期间内组间存在显著性差异($P<0.05$),图 2、7 同。

图 1 不同模式下 CP 处理对包装中臭氧含量的影响

Fig.1 Effects of CP treatment on the ozone concentration in packaging under different modes

2.2 低温等离子体对 *P. fluorescens* 生长曲线的影响

采用 96 孔板法测定了不同 CP 模式下 *P. fluorescens* 的细胞生长曲线。如图 2 所示,随孵育时间的延长,对照组的细菌数量显著增加($P<0.05$),18 h 后进入稳定期,总体

呈典型的 s 型增长。在不同 CP 模式下,1 min 的 CP 处理对 *P. fluorescens* 的生长速率抑制作用不显著($P>0.05$),而 3 min 的 CP 处理与 3 min 循环处理对 *P. fluorescens* 的生长速率抑制最为显著($P<0.05$),延迟期均延长至 6 h。其中,与 CP 直接处理相比,CP 循环处理对 *P. fluorescens* 的抑制作用要强。这可能是因为 CP 循环处理可以有效地延长臭氧等 ROS 的保留时间,从而延长了 ROS 与细胞的接触时间,最终导致细胞的活性受到抑制。因此选用 CP 循环处理模式来延长臭氧与样品的暴露时间,可以有效增强杀菌性能和提升食品保鲜潜力。综上所述,CP 处理对 *P. fluorescens* 生长曲线的影响主要表现在延迟期变长和对数生长期推迟,呈现该趋势可能是因为 CP 诱导产生 ROS 破坏了细菌表面结构和 DNA 受到严重损伤,最终导致细菌的生长受到抑制^[18]。

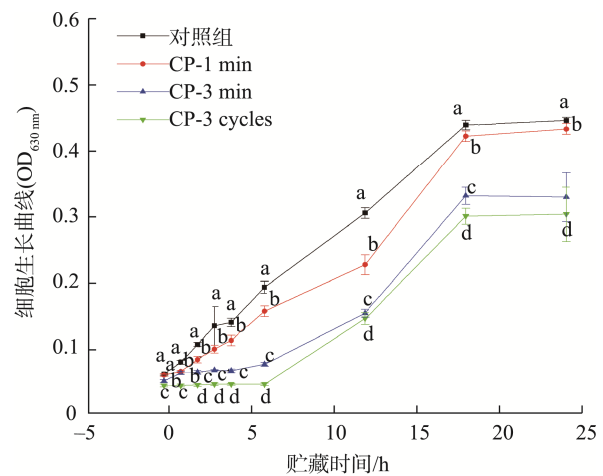
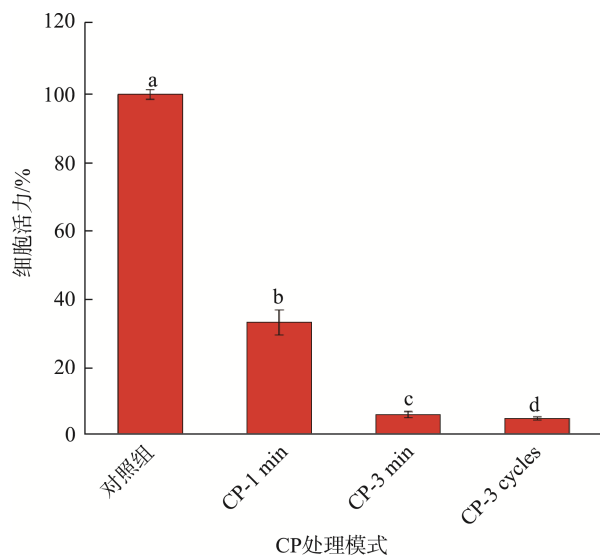


图 2 不同模式下 CP 处理对荧光假单胞菌生长曲线的影响

Fig.2 Effects of CP treatment on the growth curve of *P. fluorescens* under different modes

2.3 低温等离子体对 *P. fluorescens* 细胞活力的影响

CCK-8 试剂盒中 WST-8 是一种类似于 MTT 的化合物,在电子耦合试剂存在时可以被一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞^[19]。因此存活的 *P. fluorescens* 细胞越多,则颜色越深,反之则颜色越浅。如图 3 所示,随 CP 处理时间的延长, *P. fluorescens* 的细胞活力显著下降($P<0.05$),同时循环处理模式下的细胞活力也显著低于直接处理模式($P<0.05$)。其中 CP-1 min、CP-3 min 和 CP-3 cycles 组的细胞活力分别为 33.03%、5.90%和 4.82%。结果表明,CP 循环处理模式具有更加优异的杀菌性能。然而 CP 处理的 *P. fluorescens* 仍具有一定的细胞活力,这可能是由于等离子体诱导的生化反应不足导致细菌完全死亡,但足以使细菌处于一种不能增殖的亚致死状态^[20]。因此不同模式处理下的 *P. fluorescens* 的生长曲线在贮藏后期均进入了稳定期。



注: 不同小写字母表示组间具有显著性差异($P<0.05$), 图 4、5 同。

图 3 不同模式下 CP 处理对荧光假单胞菌细胞活力的影响

Fig.3 Effects of CP treatment on the cell viability of *P. fluorescens* under different modes

2.4 低温等离子体对 *P. fluorescens* 生物膜的影响

生物膜是细菌自我保护的生长模式。在生物膜形成过程中, 细菌将自身包裹在由多糖、蛋白质和核酸组成的细胞外基质中, 并逐渐形成三维结构^[21]。生物膜极大地增强了细菌对杀菌剂和抗生素的耐药性, 从而导致细菌的持续污染^[22]。在食品杀菌处理过程中, 形成生物膜的微生物比悬浮的微生物具有更强的抗逆性, 因而严重威胁食品安全^[23-24]。本研究选用结晶紫染色法探究不同 CP 处理模式对 *P. fluorescens* 生物膜形成的影响, 需要注意的是, 该方法选用的吸光值与细菌生长曲线相似, 这是由于结晶紫的特征峰值也在 600 nm 左右。结果表明(图 4), CP 处理可以显著抑制 *P. fluorescens* 生物膜形成($P<0.05$)。在 CP 直接处理 1 min、3 min 和循环处理 3 min 后, *P. fluorescens* 的生物膜 OD 值分别下降了 24.23%、38.69%和 55.64%。这些结果表明, *P. fluorescens* 的生物膜形成对 CP 处理诱导的活性粒子敏感, 并且 CP 对抑制细菌生物膜的形成具有较大影响。此外也有研究认为 CP 可以作为群体感应抑制剂, 影响 AHLs 和 AI-2 等信号分子的体内积累从而抑制腐败菌的生物膜形成^[24]。因此 CP 处理可以延缓 *P. fluorescens* 等腐败菌在水产品体系中的黏附和渗透。

2.5 低温等离子体对 *P. fluorescens* AKP 活力的影响

AKP 是一种广泛分布于细菌细胞壁和细胞膜之间的酶。当菌体细胞壁受损时, AKP 会泄露到环境中, 因而胞外 AKP 活性可作为细胞壁完整性的重要指标。然而研究表明, CP 处理产生的羟基自由基、超氧阴离子自由基等可能会改变酶的结构(如氨基酸侧链被氧化)而导致酶失去活性^[24-25]。因此, 本

研究通过超声破碎细胞, 重悬收集并测定存活细胞中的 AKP 活性来判断存活 *P. fluorescens* 的细胞壁完整。即 AKP 活性越小, ACP 对细胞壁的破坏就越严重。如图 5 所示, CP 处理后 *P. fluorescens* 的 AKP 活性急剧下降, 这表明细胞壁结构严重受损。相比 CP-3 min 组中的 AKP 活性 $[(1.658\pm 0.047)$ Kings/100 mL], 循环处理下的 CP-3 cycles 组中 AKP 活性降低至 (1.405 ± 0.067) Kings/100 mL, 降幅约 15.26%。结果表明, 细胞壁是 CP 诱导活性粒子的攻击靶点, 细胞壁损伤可能是 *P. fluorescens* 失活的直接原因。此外, CP 循环处理模式的作用效果优于直接处理模式。

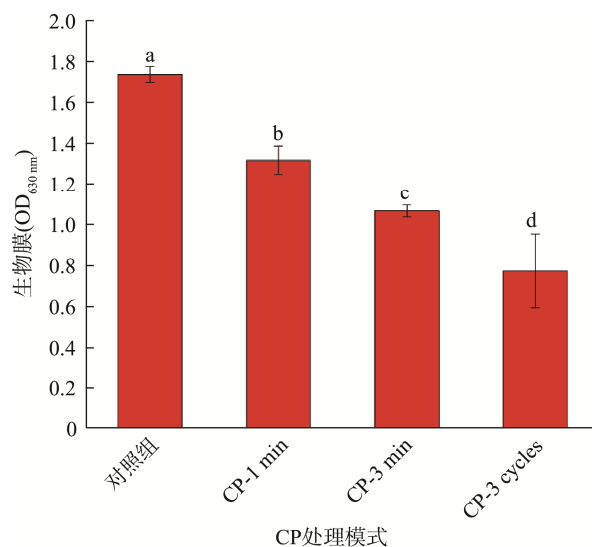


图 4 不同模式下 CP 处理对荧光假单胞菌生物膜的影响

Fig.4 Effects of CP treatment on the biofilm of *P. fluorescens* under different modes

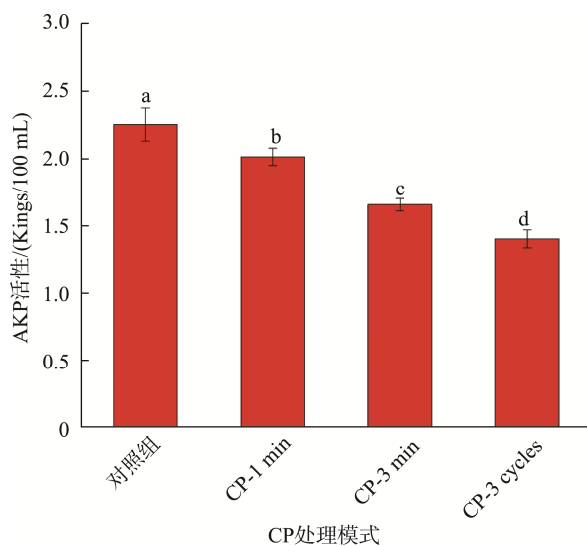


图 5 不同模式下 CP 处理对荧光假单胞菌 AKP 活力的影响

Fig.5 Effects of CP treatment on the AKP activities of *P. fluorescens* under different modes

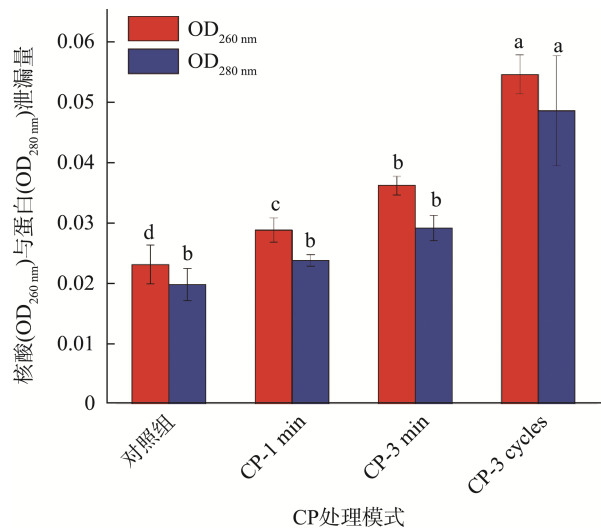
2.6 低温等离子体对 *P. fluorescens* 核酸和蛋白质泄露量的影响

CP 处理诱导产生了多种 ROS 和 RNS, 其对细菌抗菌产生不同的作用机制^[26]。然而, 最常被报道的失活机制涉及到细胞膜通透性增加和细胞膜损伤^[27-28]。核酸和蛋白质作为细胞遗传和代谢等生命活性重要的载体, 细胞膜损伤导致了这些细胞质的泄露, 导致细胞死亡。通过测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光度, 定量评估 CP 处理后核酸和蛋白质的泄露情况, 结果如图 6 所示。随着 CP 处理时间延长, *P. fluorescens* 的核酸泄露量显著增加($P<0.05$), 而蛋白泄露量仅在循环模式中显著高于其他组别($P<0.05$)。细胞膜作为细胞的保护屏障, CP 处理后菌体细胞膜受到严重损伤, 导致细胞壁和细胞膜失去完整性, 胞内成分大量泄露造成了细菌死亡。ALKAWAREEK 等^[20]的研究认为 ROS 会氧化损伤细胞膜中的脂质层, 从而导致膜损伤及相应泄露物的特征 OD 值的上升。然而也有研究发现过长时间氧化处理和贮藏时间可能使得蛋白质泄露达到峰值而不再上升, 甚至导致 OD 值的下降^[29]。整体而言, 细胞膜是臭氧和过氧化氢等 ROS 的重要攻击靶点, 而循环处理模式可以有效提升该攻击效率。

2.7 低温等离子体对南美白对虾中微生物的影响

如图 7 所示, 分析了冷藏期间不同 CP 处理模式对接种 *P. fluorescens* 的南美白对虾的菌落总数和假单胞菌数的影响。由图 7 可知, 在贮藏 0 d 时, 相比于对照组, CP 处理可以显著地抑制虾体中菌落总数和假单胞菌的增加($P<0.05$)。随着贮藏时间的延长, 各组的菌落总数和假单胞菌数整体上呈现增长趋势。在贮藏 6 d 时, 对照组虾的菌落总数为 (7.101 ± 0.045) log CFU/g meat, 超过国际食品微生物标准委员会建议的菌落总数的上限值 $(7 \log \text{CFU/g})$ ^[30]。相反, CP-1 min、CP-3 min 和 CP-3 cycles 组的菌落总数分别为 (6.904 ± 0.054) 、 (6.718 ± 0.07) 和 (6.341 ± 0.102) log CFU/g meat,

均没有超过建议的上限值, 这与徐迪莎等^[31]的研究结果相似, 即 CP 处理可以通过抑制蓝圆鲟中微生物的生长来延长其货架期。这些结果表明, CP 处理能有效抑制并杀灭腐败菌, 具有较好的保鲜潜力。值得注意的是, *P. fluorescens* 作为假单胞菌属中的重要一员, 在南美白对虾等水产品的初期贮藏中并非属于优势腐败菌^[32], 可能虾体内环境 pH、共生微生物结构、信号分子含量和外部低温等条件限制了 *P. fluorescens* 的生长。随着贮藏时间增加, *P. fluorescens* 数占菌落总数的比值也逐渐增加。在第 8 d 时, 相比 CP-3 min 组, CP-3 cycles 组中 *P. fluorescens* 数下降了 0.22 log CFU/g meat。因此 CP 循环处理模式通过延长臭氧与对虾的暴露时间, 增强了微生物灭活效果而具有更佳的保鲜能力。



注: 不同小写字母表示同一吸光度下组间存在显著性差异($P<0.05$)。

图 6 不同模式下 CP 处理对荧光假单胞菌核酸和蛋白质泄露量的影响

Fig.6 Effects of CP treatment on the nucleic acid and protein leakage of *P. fluorescens* under different modes

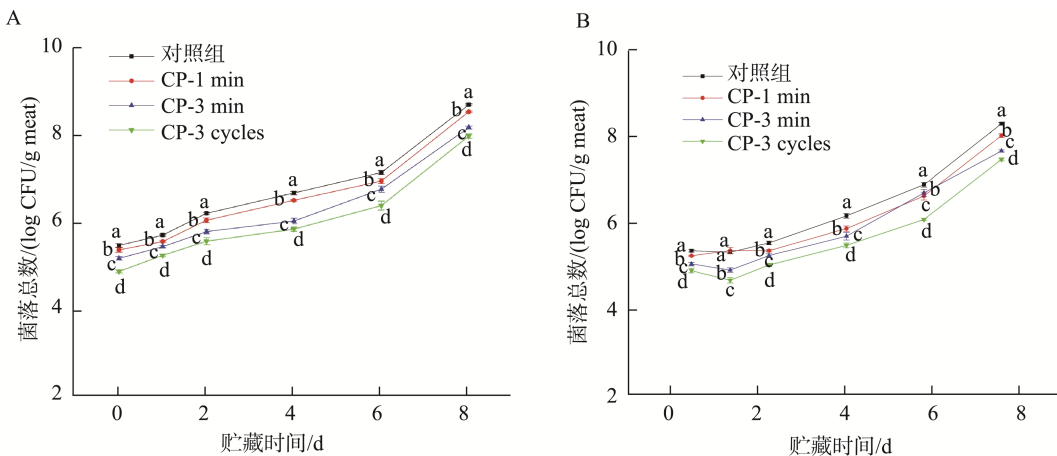


图 7 不同模式下 CP 处理对南美白对虾菌落总数和假单胞菌数的影响

Fig.7 Effects of CP treatment on the total viable count and *Pseudomonas* count of *Penaeus vannamei* under different modes

3 结 论

本研究以 *P. fluorescens* 为实验对象,以臭氧含量的动态变化为指标,评估了 CP 直接处理和 CP 循环处理模式的杀菌保鲜效果。结果表明两种处理模式的臭氧含量最高值无显著差异,然而 CP 循环处理模式延长了臭氧与 *P. fluorescens* 的暴露时间从而具有更佳的杀菌性能。相比 CP 直接处理,CP 循环处理显著抑制了 *P. fluorescens* 的生长,降低了细胞活力和生物膜形成。CP 处理后,AKP 活性的降低和核酸、蛋白泄漏量的增加表明 *P. fluorescens* 细胞表面结构严重受损。细胞壁和细胞膜是 CP 诱导的活性氧的直接攻击靶点,其损伤是造成 *P. fluorescens* 失活的直接原因。同时研究证实了 CP 处理可以有效抑制南美白对虾菌落总数和假单胞菌数的增加。此外,CP 循环处理模式通过延长活性粒子与目标食品的暴露时间,有效提高了其抗菌保鲜性能。综上所述,本研究可为基于 CP 技术的新型保鲜技术开发提供理论参考。

参考文献

- [1] ELLIOT M, CHEN J, CHEN DZ, *et al.* Effects of a cold plasma-assisted shrimp processing chain on biochemical and sensory quality alterations in Pacific white shrimps (*Penaeus vannamei*) [J]. Food Sci Technol Int, 2021, 28(8): 1–11.
- [2] WEI Q, SUN Q, DONG X, *et al.* Effect of static magnetic field-assisted freezing at different temperatures on muscle quality of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Food Chem, 2024, 438: 138041.
- [3] ZHUANG S, HONG H, ZHANG L, *et al.* Spoilage-related microbiota in fish and crustaceans during storage: Research progress and future trends [J]. Compr Rev Food Sci, 2021, 20(1): 252–288.
- [4] ZHUANG S, TAN Y, HONG H, *et al.* Exploration of the roles of spoilage bacteria in degrading grass carp proteins during chilled storage: A combined metagenomic and metabolomic approach [J]. Food Res Int, 2022, 152: 110926.
- [5] KODDY JK, MIAO W, HATAB S, *et al.* Understanding the role of atmospheric cold plasma (ACP) in maintaining the quality of hairtail (*Trichiurus lepturus*) [J]. Food Chem, 2021, 343: 128418.
- [6] WANG H, LIU X, ZHANG Y, *et al.* Spoilage potential of three different bacteria isolated from spoiled grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during storage at 4°C [J]. LWT Food Sci Technol, 2017, 81: 10–17.
- [7] 冯豪杰, 蓝蔚青, 臧一字, 等. 优势腐败菌对暗纹东方鲀冷藏期间品质变化影响及致腐能力分析[J]. 食品科学, 2022, 43(1): 191–197.
FENG HJ, LAN WQ, ZANG YY, *et al.* Effects of dominant spoilage bacteria on quality change in obscure pufferfish (*Takifugu obscurus*) during cold storage and analysis of their spoilage ability [J]. Food Sci, 2022, 43(1): 191–197.
- [8] XIANG Q, KANG C, NIU L, *et al.* Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of plasma-activated water against *Pseudomonas deceptionensis* CM2 [J]. LWT Food Sci Technol, 2018, 96: 395–401.
- [9] MISRA NN, YEPEZ X, XU L, *et al.* In-package cold plasma technologies [J]. J Food Eng, 2019, 244: 21–31.
- [10] ZHI A, SHI S, LI Q, *et al.* Aflatoxins degradation and quality evaluation in naturally contaminated rice by dielectric barrier discharge cold plasma [J]. Innov Food Sci Emerg, 2023, 88: 103426.
- [11] PAN Y, CHENG JH, LV X, *et al.* Assessing the inactivation efficiency of Ar/O₂ plasma treatment against *Listeria monocytogenes* cells: Sublethal injury and inactivation kinetics [J]. LWT Food Sci Technol, 2019, 111: 318–327.
- [12] KLETSCHKUS K, HARALAMBIEV L, NITSCH A, *et al.* The application of a low-temperature physical plasma device operating under atmospheric pressure leads to the production of toxic NO₂ [J]. Anticancer Res, 2020, 40(5): 2591–2599.
- [13] HU J, HUANG W, WANG Y, *et al.* Atmospheric cold plasma: A potential technology to control *Shewanella putrefaciens* in stored shrimp [J]. Int J Food Microbiol, 2023, 390: 110127.
- [14] 周倩倩, 方士元, 梅俊, 等. 丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理[J]. 食品科学, 2020, 41: 1–6.
ZHOU QQ, FANG SY, MEI J, *et al.* Inhibitory mechanism of eugenol on *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens* [J]. Food Sci, 2020, 41: 1–6.
- [15] 徐慧倩. 低温等离子体协同气调包装对带鱼的保鲜效果及其抑菌机理研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022.
XU HQ. Study on the preservation effect and antibacterial mechanism of low temperature plasma combined with modified atmosphere packaging on hairtail [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2022.
- [16] HU J, ZHU H, FENG Y, *et al.* Emulsions containing composite (clove, oregano, and cinnamon) essential oils: Phase inversion preparation, physicochemical properties and antibacterial mechanism [J]. Food Chem, 2023, 421: 136201.
- [17] YANG Y, LIN M, FENG S, *et al.* Chemical composition, antibacterial activity, and mechanism of action of essential oil from *Litsea cubeba* against foodborne bacteria [J]. J Food Proc Pres, 2020, 44(9): e14724.
- [18] JOSHI SG, COOPER M, YOST A, *et al.* Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(3): 1053–1062.
- [19] 冯华龙, 何升华, 黄飞强, 等. CCK-8法定量检测亚甲蓝对人髓核细胞的毒性[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22: 2532–2536.
FENG HL, HE SH, HUANG FQ, *et al.* Quantitative study on cytotoxicity of methylene blue to human nucleus pulposus cells by cell counting-kit 8 assay [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res 2018, 22: 2532–2536.
- [20] ALKAWAREEK MY, GORMAN SP, GRAHAM WG, *et al.* Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma [J]. Int J Antimicrob Ag, 2014, 43(2): 154–160.
- [21] VENKATESAN N, PERUMAL G, DOBLE M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria [J]. Future Microbiol, 2015, 10(11): 1743–1750.
- [22] KANG J, JIN W, WANG J, *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activities

- of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus* [J]. LWT Food Sci Technol, 2019, 101: 639–645.
- [23] GAJDÁCS M, BARÁTH Z, KÁRPÁTI K, *et al.* No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Results from a laboratory-based *in vitro* study [J]. Antibiotics, 2021, 10(9): 1134.
- [24] GIAOURIS E, HEIR E, HEBRAUD M, *et al.* Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods [J]. Meat Sci, 2014, 97(3): 298–309.
- [25] SEGAT A, MISRA NN, CULLEN PJ, *et al.* Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase [J]. Food Bioprod Process, 2016, 98: 181–188.
- [26] HAN L, PATIL S, BOEHM D, *et al.* Mechanisms of inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Appl Environ Microb, 2016, 82(2): 450–458.
- [27] HELGADÓTTIR S, PANDIT S, MOKKAPATI VRSS, *et al.* Vitamin C pretreatment enhances the antibacterial effect of cold atmospheric plasma [J]. Front Cell Infect, 2017, 7: 43.
- [28] ZIUZINA D, PATIL S, CULLEN PJ, *et al.* Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside a sealed package [J]. J Appl Microbiol, 2013, 114(3): 778–787.
- [29] GIRGIN EZ, BARISCI S, DINC O. Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone [J]. LWT Food Sci Technol, 2019, 100: 306–313.
- [30] SHAHIDI F, HOSSAIN A. Preservation of aquatic food using edible films and coatings containing essential oils: A review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(1): 66–105.
- [31] 徐迪莎, 丁怡萱, 廖月琴, 等. 低温等离子体对蓝圆鲈在冷藏过程中的

品质影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(13): 266–273.

XU DS, DING YX, LIAO YQ, *et al.* The effect of low temperature plasma on the quality of *Decapterus maruadsi* during cold storage [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14 (13): 266–273.

- [32] CEN S, FANG Q, TONG L, *et al.* Effects of chitosan-sodium alginate-nisin preservatives on the quality and spoilage microbiota of *Penaeus vannamei* shrimp during cold storage [J]. Int J Food Microbiol, 2021, 349: 109227.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



胡襄堉, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工。

E-mail: 1278694495@qq.com



谢 凯, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品加工。

E-mail: 1932303433@qq.com



袁鹏翔, 博士, 副教授, 主要研究方向为水产品加工。

E-mail: xiangzi661822@163.com