

反式-2-己烯醛对猕猴桃贮藏过程扩展青霉生长的抑制作用

段腾飞^{1,2}, 李 昭¹, 岳田利^{1*}, 夏秋霞¹, 孟江洪¹

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 宿州学院生物与食品工程学院, 宿州 234000)

摘要: 为研究反式-2-己烯醛对扩展青霉生长及展青霉素产生的抑制作用。选取反式-2-己烯醛和研究报道的8种具有抑菌效果的物质对5株扩展青霉进行体外抑菌试验, 研究反式-2-己烯醛的抑菌效果并测定其最小抑菌浓度, 然后进行猕猴桃活体试验, 通过测定硬度、可溶性固形物、可滴定酸、维生素C、pH值等指标研究反式-2-己烯醛对猕猴桃品质的影响, 并采用高效液相检测抑菌试验前后猕猴桃活体中展青霉素含量, 最终通过扫描电子显微镜观察反式-2-己烯醛对5株扩展青霉形态的影响。结果反式-2-己烯醛与8种抑菌物质相比, 反式-2-己烯醛抑菌效果最好, 能够完全抑制5株扩展青霉生长且得到对5株试验菌的最小抑菌浓度(MIC, minimum inhibitory concentration); 反式-2-己烯醛能够极显著降低扩展青霉对猕猴桃果实硬度、可滴定酸、维生素C的影响($P<0.01$), 并且对猕猴桃硬度、可溶性固形物、pH值和还原糖及维生素C含量等没有极显著影响($P>0.01$), 极显著降低了染菌猕猴桃果实的腐烂率($P<0.01$), 较好的保持了猕猴桃品质, 经反式-2-己烯醛处理的染菌猕猴桃均没有展青霉素检出; 扫描电子显微镜显示5株试验菌出现菌丝皱缩、折叠、干瘪, 孢子生成减少现象。研究反式-2-己烯醛对扩展青霉生长及展青霉素产生均具有很好的抑制作用, 可为开发具有抑菌作用可替代农药的天然产物提供理论基础。

关键词: 果实; 菌; 贮藏; 反式-2-己烯醛; 扩展青霉; 抑菌效果; 猕猴桃; 展青霉素

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.02.037

中图分类号: TS255.44

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2019)-02-0293-09

段腾飞, 李 昭, 岳田利, 夏秋霞, 孟江洪. 反式-2-己烯醛对猕猴桃贮藏过程扩展青霉生长的抑制作用[J]. 农业工程学报, 2019, 35(2): 293-301. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.02.037 http://www.tcsae.org

Duan Tengfei, Li Zhao, Yue Tianli, Xia Qiuxia, Meng Jianghong. Study on inhibitory effect of trans-2-hexenal on growth of *P. expansum* at kiwi fruit storage[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2019, 35(2): 293-301. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2019.02.037 http://www.tcsae.org

0 引言

扩展青霉是一种引起猕猴桃、苹果、梨等水果腐败变质的常见霉菌, 并且许多扩展青霉在侵染水果及其制品的过程中会产生展青霉素(patulin)。展青霉素又称棒曲霉素, 是一种主要由青霉属(*Penicillium*)和曲霉属(*Aspergillus*)产生的次级代谢产物^[1-2], 具有致癌、致畸、致突变和广泛的生理及细胞毒性^[3], 当人体摄入过量展青霉素时, 会出现恶心、抽搐、呼吸困难、甚至晕厥等一系列的急性和慢性病症^[4-5]。

猕猴桃(*Actinidia chinensis Planch*)又称“奇异果”, 含有丰富的氨基酸、维生素、膳食纤维及多酚类化合物, 具有显著的生物活性和抗氧化能力, 由于其果肉鲜美, 口感酸甜, 营养丰富, 深受大众的喜爱^[6-7]。中国是猕猴桃发源地, 并且是世界上猕猴桃最大生产国, 其中陕西地区分布最多^[8], 猕猴桃在成熟后期果实逐渐变软、果皮较薄, 因此在采摘、加工、运输等过程中容易感染扩展

青霉, 产生展青霉素且展青霉素会在果实内迁移, 加速猕猴桃的腐败变质, 不仅造成人力和财力浪费, 还对人体健康造成危害^[9]。因此研究一种安全、有效的方法控制猕猴桃及其制品霉变和展青霉素积累变得十分必要, 也是保证猕猴桃及果汁产业快速、健康发展的核心问题之一。

近年来, 国内外学者对食品中展青霉素的控制主要通过物理、化学和生物方法直接去除食品中的展青霉素或者杀灭展青霉素产生菌, 从源头上控制展青霉素的产生, 目前研究较多的物理方法主要采用吸附^[10]、紫外线辐照^[11-12]、超声波^[13]、分子印迹技术^[14-15]、低温等离子体^[16]等, 该方法操作简单, 但对于水果及其制品品质影响和广泛应用仍需进一步探索。化学方法主要采用杀菌剂^[17]、臭氧^[18]、果汁护色剂^[19]等抑制扩展青霉的生长, 操作方便, 但是长期使用会增强病原菌抗药性, 同时会造成环境污染, 威胁人类健康。生物方法主要采用微生物(酵母菌^[20-21]、乳酸菌^[22]、芽孢杆菌^[23]等)抑菌和天然产物(生物碱类、黄酮类、精油类等)抑菌^[24-27]。天然产物多是存在于植物中的生物活性物质, 来源广泛, 成本低, 抑菌效果显著, 同时能够很好的保持食品中营养物质, 具有很大发展潜力。

本试验比较了反式-2-己烯醛和文献研究报道的8种具有抑菌作用的柠檬酸、柠檬烯、苹果酸、 γ -氨基丁酸、槲皮素、儿茶素、双乙酸钠、草酸^[28-32]对5株扩展青霉

收稿日期: 2018-04-11 修订日期: 2018-12-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371814); 宿州区域发展协同创新中心开放课题(2016szxt04)

作者简介: 段腾飞, 助教, 主要研究方向为农产品加工与综合利用。

Email: duantf@alu.hit.edu.cn

*通信作者: 岳田利, 教授, 博士生导师; 主要研究方向为生物技术及食品安全控制技术。Email: yuetl@nwsuaf.edu.cn

的体外抑菌效果,并测定反式-2-己烯醛最小抑菌浓度(MIC)及其对猕猴桃理化指标(硬度、可溶性固形物、还原糖、可滴定酸、pH值、维生素C)的影响,最终通过测定染菌猕猴桃中展青霉素含量和扫描电子显微镜观察,研究反式-2-己烯醛对扩展青霉生长及展青霉素生成的抑制作用,以期得到一种天然、安全、有效的抑菌产物抑制扩展青霉生长及毒素积累。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌株: CICC40658、CGMCC3.3703 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,为扩展青霉标准菌株; LPH6、LPH5 为实验室分离菌株,分离于苹果; WY 为实验室分离菌株,分离于猕猴桃。

猕猴桃品种为秦美(*Actinidia deliciosa*, Qinmei)购自杨凌阳光超市;展青霉素标品纯度为99%以上,购于美国 Sigma-Aldrich 公司。柠檬酸、柠檬烯、苹果酸、 γ -氨基丁酸、槲皮素、儿茶素、双乙酸钠、草酸、反式-2-己烯醛纯度均为98%以上,购于阿拉丁有限公司。

购自陕西杨凌阳光超市。氢氧化钠、邻苯二甲酸氢钾、酚酞、次氯酸钠硫酸铜、次甲基蓝、酒石酸钾钠、亚铁氰化钾、乙酸乙酯、乙酸、盐酸等试剂均为国产分析纯。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g,蒸馏水1 000 mL,煮沸20 min至马铃薯切块变软,过滤并定容至1 000 mL,再加入葡萄糖20 g、琼脂20 g。

马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB): PDA培养基不加琼脂。

1.2 材料与设备

LC-2010ATH 高效液相色谱,日本岛津有限公司; S-4800 场发射扫描电子显微镜,日本日立公司; RE-5205 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂; DK-98-II 恒温水浴锅,天津市亚泰斯仪器有限公司; UV-2550 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司; 雷磁 PHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司; WYT-4 型阿贝折射仪,泉州中友光学仪器有限公司; GY-4 型数显硬度计,浙江托普仪器有限公司; 镀铬游标卡尺,宝鸡市量具有限公司; SC-3610 低温离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 9种抑菌物质对扩展青霉抑制作用

1) 孢子悬液制备

取4℃保存的5株扩展青霉 CICC40658、CGMCC3.3703、LPH6、LPH5、WY,分别接种到100 mL PDB 培养基中活化,28℃培养5 d,划线法转接至PDA斜面培养基,28℃培养7 d后,用无菌水冲洗PDA斜面培养基制成孢子浓度为 1.0×10^6 cfu/mL 孢子悬液。

2) 菌饼制备

取100 μ L(浓度为 1.0×10^6 cfu/mL)5株扩展青霉孢子悬液,接种至PDA培养皿,28℃培养48 h。用200 μ L

移液枪枪头尾部在菌株培养基上打孔,并用注射器针头挑取制成菌饼,试验均在无菌条件下进行。

3) 9种抑菌物质体外抑菌试验

制备10组PDA培养基,每组300 mL,灭菌待冷却至50℃时每组分别加入一定量的柠檬酸、柠檬烯、苹果酸、 γ -氨基丁酸、槲皮素、儿茶素、双乙酸钠、草酸、反式-2-己烯醛,使抑菌物质浓度为5 mg/mL,同时加入15 mg 吐温80助溶混合均匀,迅速倒于培养皿中冷却。将制得的 CICC40658、CGMCC3.3703、LPH6、LPH5、WY 菌饼分别接种于含有抑菌物质的PDA培养基平皿中。设置空白对照,每组平行3次。

4) 菌落直径的测定

将接种有菌饼的含有抑菌物质的PDA培养皿置于28℃恒温箱避光培养5 d,每天同一时刻采用十字交叉法测量菌落直径,每组平行3次。

5) 稀释后草酸和反式-2-己烯醛对扩展青霉生长的影响

为进一步研究草酸和反式-2-己烯醛对扩展青霉的抑制效果,将一定量的草酸和反式-2-己烯醛分别加入PDB培养基进行等浓度梯度稀释,使其浓度分别为5、2.5、1.25、0.625、0.3125 mg/mL,28℃培养5 d,观察是否有菌丝生成,并用划线法转接至PDA培养皿中,28℃培养48 h,观察是否有菌落形成。

1.3.2 反式-2-己烯醛最小抑菌浓度测定

制备5组PDA培养基,每组300 mL,灭菌待冷却至50℃时加入一定量反式-2-己烯醛(MIC, minimum inhibitory concentration),使其浓度依次为40、60、80、100 μ L/L,将制得的 CICC40658、CGMCC3.3703、LPH6、LPH5、WY 菌饼分别接种于含有抑菌物质的PDA培养皿中,28℃培养12 d,从第2天开始,每天同一时间采用十字交叉法测量菌落直径。设置空白对照,每组平行3次。

1.3.3 反式-2-己烯醛对猕猴桃品质的影响

1) 猕猴桃活体试验

挑选大小、硬度相近、无病害的新鲜猕猴桃果实,用1% NaClO 溶液浸泡2 min,无菌水冲洗干净,置于无菌操作台中晾干待用。然后用直径3 mm的无菌铁钉在猕猴桃赤道部位打孔,孔深5 mm,用移液枪分别取10 μ L、 1.0×10^6 cfu/mL 5株试验菌的孢子悬液注入孔中侵染猕猴桃,经添加反式-2-己烯醛100 μ L/L的为处理组(S),未添加反式-2-己烯醛的染菌猕猴桃为未处理组(T),未染菌和反式-2-己烯醛处理的猕猴桃为空白组,每组10个猕猴桃计算猕猴桃腐烂率,将试验猕猴桃置于保鲜袋中28℃培养7 d。

2) 样品制备

在试验猕猴桃打孔附近0.5~2 cm取15 g均匀试样(精确到0.01 g)置于100 mL离心管中,漩涡震荡5 min,10 000 r/min,离心15 min,转移上清液于50 mL离心管中,4℃备用。

3) 指标测定

硬度的测定:GY-4型数显硬度计直接测定;可溶性

固形物含量 (soluble solids content, SSC) 的测定：采用阿贝折射仪测定；pH 值的测定：采用 pH 计直接测定；还原糖含量测定：采用 3,5-二硝基水杨酸法测定，结果以葡萄糖含量计；可滴定酸测定：采用酸碱滴定法测定。维生素 C 含量测定：采用 2,6-二氯酚法，参照 GB/T 15038—2006《葡萄酒、果酒通用实验方法》。每个理化指标测定 3 次。

1.3.4 反式-2-己烯醛对展青霉素产生的影响

1) 展青霉素提取与测定

在试验猕猴桃打孔附近 0.5~2 cm 取 10 g 均匀试样 (精确到 0.01 g) 于 100 mL 离心管中，加入 20 mL 无菌水，匀浆 1 min，然后加入 150 μ L 果胶酶溶液混合均匀，置于 40 $^{\circ}$ C 水浴锅中水浴 2 h，用 20 mL 乙酸乙酯重复提取两次，萃取上清液。水浴中减压浓缩至干，用 1.5 mL pH 值为 4 水溶液 (乙酸调节) 溶解残渣，经 0.22 μ m 滤膜过滤，供高效液相色谱测定。

2) 色谱条件

采用 Eclipse Plus C18 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)，流动相为乙腈-水体积比 (10:90)，梯度洗脱。流速：1.0 mL/min，柱温：30 $^{\circ}$ C，进样量：20 μ L，检测波长：276 nm。

1.3.5 反式-2-己烯醛对扩展青霉菌体及孢子生成的影响

通过扫描电子显微镜观察反式-2-己烯醛对扩展青霉菌丝形态和孢子生成数量的影响。将制得的 CICC40658、CGMCC3.3703、LPH6、LPH5、WY 菌饼分别接种于反式-2-己烯醛浓度为 40 μ L/L 的 PDA 培养皿中，28 $^{\circ}$ C 恒温培养 5 d。设置空白对照，每组平行 3 次。取试验组和空白组样品在 4 000 r/min 下离心 6 min，弃掉上清液，加入 1 mL 4%戊二醛固定液 4 $^{\circ}$ C 下固定 2 h。然后用 0.1 mol/L pH 值为 6.8 的磷酸盐缓冲液进行漂洗，5、10、15、20、25、30 min 时各漂洗一次。再用 1%锇酸常温固定 2 h，重复上述磷酸盐缓冲液漂洗之后分别用 30%、50%、70%、80%、90%乙醇进行梯度脱水。最后经真空冷冻干燥，喷金后进行场发射扫描电镜观察，并拍照。

1.4 数据统计分析

采用 Origin9.0 软件做图，SPSS 22.0 软件对试验数据进行方差分析和多重比较，分析显著性。

2 结果与分析

2.1 9 种抑菌物质对展青霉体外抑菌效果

试验选取反式-2-己烯醛和文献研究报道的 8 种具有抑菌作用的物质 (质量浓度均为 5 mg/mL) 对 5 株扩展青霉菌株进行体外抑菌试验，结果如表 1。

表 1 9 种抑菌物质对扩展青霉菌生长的影响

Table 1 Effects of nine kinds of antibacterial substances on growth of <i>P.expansum</i> strains												cm
菌株 Strains	时间 Time/h	抑菌物质 Antibacterial substances										
		空白 Control	柠檬酸 Citric acid	柠檬烯 Limonene	苹果酸 Malic acid	γ -氨基丁酸 γ -amino butyric acid	槲皮素 Quercetin	儿茶素 Catechins	双乙酸钠 Sodium diacetate	草酸 Oxalic acid	反-2-己烯醛 Trans-2-hexenal	
CICC 40658	48	1.28 \pm 0.07a	0.98 \pm 0.04c	0.96 \pm 0.03c	1.08 \pm 0.11bc	0.96 \pm 0.01c	1.20 \pm 0.05ab	1.30 \pm 0.08a	0.58 \pm 0.02e	0.60 \pm 0.01e	0.60 \pm 0.00e	
	72	1.74 \pm 0.07a	1.43 \pm 0.01c	1.44 \pm 0.07c	1.59 \pm 0.07b	1.52 \pm 0.03bc	1.49 \pm 0.01bc	1.49 \pm 0.05bc	0.58 \pm 0.02d	0.60 \pm 0.01d	0.60 \pm 0.00d	
	96	2.06 \pm 0.05a	1.74 \pm 0.03d	1.85 \pm 0.01bcd	1.99 \pm 0.05bc	1.83 \pm 0.04cd	2.03 \pm 0.03a	1.97 \pm 0.08ab	0.58 \pm 0.02e	0.60 \pm 0.01e	0.60 \pm 0.00e	
	120	2.65 \pm 0.00a	2.11 \pm 0.08c	2.32 \pm 0.01b	2.30 \pm 0.03b	2.27 \pm 0.01b	2.31 \pm 0.06b	2.07 \pm 0.01c	0.69 \pm 0.07d	0.60 \pm 0.01d	0.60 \pm 0.00d	
CGMCC 3.3703	48	1.88 \pm 0.02c	2.27 \pm 0.04a	1.88 \pm 0.03c	1.61 \pm 0.06d	2.05 \pm 0.07b	1.67 \pm 0.00d	1.67 \pm 0.05d	0.73 \pm 0.07e	0.60 \pm 0.01e	0.60 \pm 0.00e	
	72	2.52 \pm 0.26ab	2.65 \pm 0.02a	2.32 \pm 0.04bc	2.12 \pm 0.09d	2.63 \pm 0.04a	2.12 \pm 0.01d	2.27 \pm 0.03cd	0.77 \pm 0.11e	0.60 \pm 0.01e	0.60 \pm 0.00e	
	96	3.16 \pm 0.04a	3.14 \pm 0.05a	3.15 \pm 0.05a	2.76 \pm 0.05c	2.84 \pm 0.04bc	3.01 \pm 0.08ab	2.43 \pm 0.07d	1.18 \pm 0.07e	0.60 \pm 0.01f	0.60 \pm 0.00f	
	120	3.39 \pm 0.01b	3.05 \pm 0.04c	3.56 \pm 0.04a	3.00 \pm 0.05c	3.02 \pm 0.03c	3.04 \pm 0.01c	2.76 \pm 0.04d	1.70 \pm 0.01e	0.60 \pm 0.01f	0.60 \pm 0.00f	
LPH5	48	1.47 \pm 0.03c	1.28 \pm 0.01d	1.47 \pm 0.04c	1.32 \pm 0.04d	1.82 \pm 0.08a	1.34 \pm 0.04d	1.61 \pm 0.07b	0.68 \pm 0.03e	0.59 \pm 0.01e	0.56 \pm 0.00e	
	72	1.94 \pm 0.04cd	1.87 \pm 0.06d	2.01 \pm 0.03c	1.93 \pm 0.04cd	2.39 \pm 0.08a	2.15 \pm 0.07b	2.16 \pm 0.08b	0.68 \pm 0.03e	0.59 \pm 0.01e	0.56 \pm 0.00e	
	96	2.11 \pm 0.01c	2.09 \pm 0.04c	2.45 \pm 0.04b	2.43 \pm 0.07b	2.78 \pm 0.05a	2.74 \pm 0.06a	2.78 \pm 0.04a	0.97 \pm 0.07d	0.59 \pm 0.01e	0.56 \pm 0.00e	
	120	2.84 \pm 0.02b	2.53 \pm 0.02c	2.85 \pm 0.08b	2.80 \pm 0.03b	3.10 \pm 0.04a	2.79 \pm 0.02b	3.11 \pm 0.02a	1.44 \pm 0.05d	0.59 \pm 0.01e	0.56 \pm 0.00e	
LPH6	48	1.94 \pm 0.01a	1.35 \pm 0.03d	1.65 \pm 0.06bc	1.55 \pm 0.06c	1.82 \pm 0.07ab	1.51 \pm 0.08cd	1.48 \pm 0.05cd	1.82 \pm 0.03ab	0.58 \pm 0.01e	0.61 \pm 0.05e	
	72	2.85 \pm 0.06a	2.02 \pm 0.09d	2.26 \pm 0.07c	2.13 \pm 0.01cd	2.57 \pm 0.05b	1.97 \pm 0.03d	1.98 \pm 0.06d	2.60 \pm 0.07b	0.58 \pm 0.01e	0.61 \pm 0.05e	
	96	3.47 \pm 0.06a	2.72 \pm 0.07c	2.56 \pm 0.07cd	3.05 \pm 0.06b	3.41 \pm 0.06a	2.61 \pm 0.07c	2.41 \pm 0.03d	3.39 \pm 0.01a	0.58 \pm 0.01e	0.61 \pm 0.05e	
	120	4.04 \pm 0.06b	3.36 \pm 0.04c	2.92 \pm 0.07d	3.39 \pm 0.03c	4.52 \pm 0.04a	3.44 \pm 0.07c	2.87 \pm 0.02d	4.45 \pm 0.04a	0.58 \pm 0.01e	0.61 \pm 0.05e	
WY	48	1.54 \pm 0.01ab	1.42 \pm 0.05b	1.52 \pm 0.07ab	1.38 \pm 0.07b	1.62 \pm 0.08a	1.64 \pm 0.05a	1.50 \pm 0.03ab	0.57 \pm 0.02c	0.58 \pm 0.03c	0.61 \pm 0.01c	
	72	2.02 \pm 0.01b	1.78 \pm 0.33c	2.05 \pm 0.08b	1.85 \pm 0.05c	2.21 \pm 0.06a	2.14 \pm 0.03ab	2.05 \pm 0.05b	0.57 \pm 0.02d	0.58 \pm 0.03d	0.61 \pm 0.01d	
	96	2.42 \pm 0.01b	1.89 \pm 0.07d	2.77 \pm 0.03a	2.09 \pm 0.05c	2.68 \pm 0.08a	2.66 \pm 0.06a	2.64 \pm 0.04a	0.57 \pm 0.02e	0.58 \pm 0.03e	0.61 \pm 0.01e	
	120	2.83 \pm 0.02b	2.21 \pm 0.06c	3.15 \pm 0.05a	2.23 \pm 0.05c	3.20 \pm 0.05a	3.16 \pm 0.04a	3.06 \pm 0.05a	0.82 \pm 0.02d	0.58 \pm 0.03e	0.61 \pm 0.01e	

注：同一行相同字母代表不同天然抑菌物质对相应菌株的抑菌效果在 $P<0.01$ 水平上没有极显著差异，CICC40658 和 CGMCC3.3703 为扩展青霉标准菌株；LPH6、LPH5 和 WY 为实验室分离菌株，下同。
Note: Same letter on the same line means that the antibacterial effect of different natural antibacterial substances on the corresponding strains was not significantly different at $P<0.01$ level. CICC40658 and CGMCC3.3703 are standard strains for *Penicillium expansum*; LPH6, LPH5 and WY are laboratory isolates, the same below.

与空白组相比, 48 和 96 h 时, 槲皮素和儿茶素对标准菌 CICC40658 没有显著抑制作用 ($P>0.01$), 120 h 时, 9 种天然抑菌物质对标准菌 CICC40658 均具有极显著抑制作用 ($P<0.01$), 且抑菌效果从大到小依次为: 反-2-己烯醛>草酸>双乙酸钠>儿茶素>柠檬烯> γ -氨基丁酸>苹果酸>槲皮素>柠檬酸; 48 h 时, 柠檬酸和 γ -氨基丁酸对标准菌 CGMCC3.37038 具有极显著促进作用 ($P<0.01$), 120 h 时, 8 种天然抑菌物质对标准菌 CGMCC3.3703 具有极显著抑制作用 ($P<0.01$), 且抑菌效果从大到小依次为: 反-2-己烯醛>草酸>双乙酸钠>儿茶素>苹果酸> γ -氨基丁酸>槲皮素>柠檬酸, 其中柠檬烯对标准菌 CGMCC3.3703 生长出现显著促进作用 ($P<0.01$), 菌落直径从 3.39 增长到 3.56 cm; 在 48、72、96 和 120 h 时, 儿茶素和 γ -氨基丁酸对分离菌 LPH5 生长均出现显著促进作用 ($P<0.01$), 120 h 时, 4 种天然物质对分离菌 LPH5 具有极显著抑制作用 ($P<0.01$), 且抑菌效果从大到小依次为: 反-2-己烯醛>草酸>双乙酸钠>柠檬酸, 其中苹果酸和柠檬烯对分离菌 LPH5 没有显著抑制作用 ($P>0.01$); 在 48、96 和 120 h 时, 双乙酸钠和 γ -氨基丁酸对分离菌 LPH6 生长具有显著促进作用 ($P<0.01$), 120 h 时, 7 种天然物质对分离菌 LPH6 具有

显著抑制作用 ($P<0.01$), 且抑菌效果从大到小依次为: 草酸>反-2-己烯醛>儿茶素>柠檬烯>柠檬酸>苹果酸>槲皮素; 在 48、72、96 和 120 h 时, 5 种天然物质对分离菌 WY 具有显著抑制作用 ($P<0.01$), 120 h 时抑菌效果从大到小依次为: 草酸>反-2-己烯醛>双乙酸钠>柠檬酸>苹果酸, 其中 4 种天然物质对分离菌 WY 具有显著促进作用 ($P<0.01$), 促进效果从大到小依次为: γ -氨基丁酸>槲皮素>柠檬烯>儿茶素。综上所述, 9 种天然物质中反-2-己烯醛和草酸在 48、72、96 和 120 h 均对 5 株扩展青霉菌株具有显著抑制作用, 且抑菌效果较好。

稀释后草酸和反式-2-己烯醛的抑菌效果如表 2 所示: 草酸在稀释不同倍数后, 浓度低于 1.25 mg/mL 时, 抑菌效果降低, 28 ℃ 培养 5 d, PDB 培养基变浑浊, 5 株试验菌均有菌丝产生, PDA 培养皿均有菌落检出, 这可能是由于草酸稀释后氢离子浓度降低抑菌效果受 pH 影响引起的^[31]; 而反式-2-己烯醛在稀释浓度为 0.312 5 mg/mL 时, 仍对 5 株试验菌具有很好的抑制作用, 28 ℃ 培养 5 d, PAB 培养基保持澄清, 5 株菌均未出现菌丝, PAD 培养皿均未有菌落检出。因此后续试验选择反式-2-己烯醛为最佳抑菌物质进行研究。

表 2 不同质量浓度天然抑菌物质对扩展青霉菌生长的影响
Table 2 Effect of different mass concentrations of natural antibacterial substances on growth of *P. expansum* strains

菌株 Strains	培养基	草酸 Oxalic acid/(mg·mL ⁻¹)					反式-2-己烯醛 Trans-2-hexenal/(mg·mL ⁻¹)				
		5	2.5	1.25	0.625	0.312 5	5	2.5	1.25	0.625	0.312 5
CICC40658	PDB	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	PDA	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
CGMCC3.3703	PDB	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	PDA	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
LPH5	PDB	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	PDA	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
LPH6	PDB	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	PDA	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
WY	PDB	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	PDA	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-

注: “+”代表 PDB、PDA 培养基有菌丝产生、培养基有菌落生长; “-”代表 PDB、PDA 培养基没有菌落生长。
Note: “+” represents hyphae production in PDB and PDA medium; “-” represents no hyphae production in PDB and PDA medium.

2.2 最小抑菌浓度 (MIC) 测定结果

由表 3 可知: 反式-2-己烯醛对标准菌 CICC40658 和 CGMCC3.3703、分离菌 LPH5、LPH6 和 WY 的最小抑菌浓度 (MIC) 依次为 100、80、80、80、80 μ L/L, 当反式-2-己烯醛浓度为 100 μ L/L 时均未检测到菌生长。当反式-2-己烯醛浓度为 40 μ L/L、培养 12 d 时, 抑菌率依次为 0.18%、6.81%、3.30%、40.38%、2.96%, 5 株试验菌对反式-2-己烯醛敏感程度从大到小依次为 LPH6>CGMCC3.3703>LPH5>WY>CICC40658; 当反式-2-己烯醛浓度为 60 μ L·L⁻¹、培养 12 天时, 抑菌率依次为 3.87%、9.44%、24.18%、58.68%、6.25%, 5 株试验菌对反式-2-己烯醛敏感程度从大到小依次为 LPH6>LPH5>CGMCC3.3703>WY>CICC40658。当反式-2-己烯醛体

积浓度分别为 40 和 60 μ L/L, 随着培养时间增加, 抑菌效果有所降低, 当反式-2-己烯醛浓度为 40 μ L/L, 与空白组相比, 培养时间在第 11 和第 12 天时, 反式-2-己烯醛对标准菌 CICC40658 没有极显著抑制作用 ($P>0.01$), 培养时间在第 9 和第 10 天时, 反式-2-己烯醛对分离菌 LPH5 没有极显著抑制作用 ($P>0.01$)。随着反式-2-己烯醛浓度增加, 抑菌效果增强, 与空白组相比, 相同培养时间下, 不同浓度的反式-2-己烯醛对标准菌 CGMCC3.3703、分离菌 LPH6 和 WY 均具有极显著抑制作用 ($P<0.01$); 当反式-2-己烯醛浓度为 60 μ L/L 时, 反式-2-己烯醛对标准菌 CICC40658 和分离菌 LPH5 均具有极显著抑制作用 ($P<0.01$), 因此, 在一定浓度下, 反式-2-己烯醛对 5 株扩展青霉具有显著抑制作用 ($P<0.01$)。

表 3 反式-2-己烯醛对 5 株试验菌最小抑菌浓度测定

Table 3 Minimum inhibitory concentration of trans-2-hexenal for five test strains

菌株 Strains	体积浓度 Volume concentration/($\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$)	培养天数 Cultivated days/d											cm
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CICC 40658	0	0.84±0.05a	1.29±0.02a	1.79±0.03a	2.28±0.04a	2.73±0.04a	3.16±0.02a	3.68±0.02a	4.10±0.03a	4.53±0.03a	4.90±0.02a	5.42±0.02a	
	40	-	0.87±0.04b	1.40±0.02b	1.85±0.04b	2.44±0.02b	2.94±0.03b	3.26±0.04b	3.98±0.02b	4.37±0.03b	4.89±0.04a	5.41±0.02a	
	60	-	0.74±0.03c	0.87±0.03c	1.24±0.02c	1.68±0.04c	2.24±0.04c	2.96±0.02c	3.56±0.04c	4.03±0.03c	4.66±0.04b	5.21±0.03b	
	80	-	-	-	0.85±0.04d	1.18±0.03d	1.74±0.03d	2.34±0.04d	2.86±0.03d	3.40±0.02d	3.94±0.04c	4.43±0.04c	
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CGMCC 3.3703	0	1.01±0.01a	1.68±0.02a	2.26±0.02a	2.88±0.02a	3.43±0.03a	3.91±0.02a	4.36±0.03a	4.84±0.02a	5.33±0.04a	5.88±0.05a	6.46±0.03a	
	40	0.72±0.03b	1.19±0.01b	1.93±0.03b	2.51±0.01b	3.05±0.02b	3.67±0.02b	4.23±0.04b	4.77±0.03b	5.13±0.04b	5.50±0.02b	6.02±0.04b	
	60	-	0.85±0.02c	1.09±0.01c	1.55±0.03c	2.16±0.04c	2.70±0.02c	3.43±0.03c	4.09±0.03c	4.73±0.04c	5.30±0.04c	5.85±0.03c	
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LPH5	0	0.90±0.04a	1.43±0.03a	2.12±0.04a	2.87±0.05a	3.45±0.04a	3.98±0.02a	4.53±0.02a	4.98±0.04a	5.47±0.04a	5.88±0.02a	6.37±0.04a	
	40	0.66±0.01b	0.88±0.03b	1.68±0.04b	2.43±0.04b	3.09±0.01b	3.64±0.04b	4.38±0.12b	4.89±0.08a	5.39±0.09a	5.79±0.04b	6.16±0.04b	
	60	-	0.69±0.07c	0.98±0.04c	1.40±0.03c	1.92±0.03c	2.17±0.08c	2.61±0.03c	3.24±0.04b	3.85±0.05b	4.27±0.06c	4.83±0.08c	
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LPH6	0	0.91±0.04a	1.59±0.05a	2.36±0.07a	3.01±0.09a	3.83±0.03a	4.50±0.03a	5.13±0.05a	5.76±0.11a	6.33±0.06a	6.81±0.03a	7.43±0.08a	
	40	-	-	0.66±0.03b	0.87±0.03b	1.10±0.06b	1.21±0.03b	1.44±0.05b	2.07±0.07b	2.84±0.06b	3.61±0.03b	4.43±0.10b	
	60	-	-	-	0.69±0.03c	0.75±0.03c	0.86±0.04c	1.05±0.08c	1.29±0.03c	1.93±0.05c	2.41±0.04c	3.07±0.05c	
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
WY	0	0.90±0.04a	1.54±0.03a	2.11±0.02a	2.70±0.02a	3.26±0.04a	3.76±0.04a	4.27±0.04a	4.74±0.04a	5.21±0.03a	5.60±0.04a	6.08±0.04a	
	40	0.75±0.02b	1.13±0.03b	1.73±0.03b	2.29±0.03b	2.92±0.02b	3.46±0.03b	3.94±0.04b	4.50±0.02b	5.00±0.01b	5.41±0.04b	5.90±0.03b	
	60	-	0.84±0.02c	1.34±0.02c	1.81±0.04c	2.20±0.04c	2.75±0.03c	3.32±0.03c	3.92±0.04c	4.49±0.03c	5.06±0.04c	5.70±0.04c	
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注：“-”代表菌落未生长，同一列相同字母代表不同浓度的反式-2-己烯醛对相应菌株的抑菌效果在 $P<0.01$ 水平上差异极不显著。
Note:“-” represents the colony does not grow, the same column of the same letter represents the different concentrations of trans-2-hexenal antibacterial effect on the corresponding strains at the $P<0.01$ level of the difference is extremely insignificant.

2.3 反式-2-己烯醛对猕猴桃品质的影响

反式-2-己烯醛对猕猴桃果实硬度的影响如表 4 所示：第 1 天，处理组、对照组猕猴桃果实硬度均没有极显著差异 ($P>0.01$)，第 7 天时，猕猴桃果实硬度均是空白组 > 处理组 > 未处理组，其中侵染扩展青霉 LPH6 的猕猴桃果实硬度降低至最初的 23.80%，3 组果实硬度值分别为 4.12（空白组）>4.01（处理组）>1.88（未处理组），可能是由于扩展青霉在猕猴桃上生长，造成果实软化变质^[9]；反式-2-己烯醛处理组猕猴桃果实硬度均大于未处理组，差异极显著 ($P<0.01$) 说明反式-2-己烯醛可以在一定程度上抑制扩展青霉在猕猴桃上快速生长，降低扩展青霉对猕猴桃果实硬度的影响；与空白组相比，处理组猕猴桃果实硬度稍低，但并没有极显著差异 ($P>0.01$)，说明反式-2-己烯醛对猕猴桃果实硬度没有显著影响

反式-2-己烯醛对猕猴桃可溶性固形物 (soluble solids content, SSC) 含量的影响：第 1 天，空白组、未处理组和处理组，其中处理组与空白组的试验猕猴桃可溶性固形物含量 (SSC) 没有极显著差异 ($P>0.01$)；第 7 天，试验猕猴桃 SSC 均为空白组 > 处理组 > 未处理组，其中处理组与空白组猕猴桃 SSC 没有极显著差异 ($P>0.01$)，

说明反式-2-己烯醛对猕猴桃 SSC 没有极显著影响 ($P>0.01$)，而未处理组侵染猕猴桃 SSC 含量极显著低于处理组 ($P<0.01$)，说明反式-2-己烯醛处理可以在一定程度上降低侵染猕猴桃可溶性固形物含量上升，抑制扩展青霉对猕猴桃品质的影响。与空白组相比未处理组猕猴桃果实 SSC 极显著降低，其中侵染分离菌 LPH6 猕猴桃 SSC 降低 6.38%，可能由于随着培养时间增加，扩展青霉适应酸性环境，在猕猴桃上快速生长繁殖，消耗各种可溶性营养物质；

反式-2-己烯醛对猕猴桃可滴定酸含量和 pH 值的影响：第 1 天，空白组、未处理组和处理组试验猕猴桃可滴定酸含量和 pH 值均没有极显著差异 ($P>0.01$)，第 7 天，试验猕猴桃可滴定酸含量为未处理组 > 处理组 > 空白组，试验猕猴桃 pH 值为空白组 > 处理组 > 未处理组，随着贮藏时间，空白猕猴桃可滴定酸含量持续下降和 pH 值上升，但变化比较缓慢分别为：26.19%和 12.79%，其中未处理组猕猴桃可滴定酸含量高于空白组，且差异极显著 ($P<0.01$)，可能是由于扩展青霉在猕猴桃上快速生长，产生酸类物质；第 7 天，与空白组相比，处理组猕猴桃可滴定酸含量和 pH 值均没有显著差异 ($P>0.01$)，说明反式-2-己烯醛

处理对猕猴桃 pH 值没有极显著影响 ($P>0.01$), 并且在一定程度上可以抑制染菌猕猴桃 pH 值的升高;

反式-2-己烯醛对猕猴桃还原糖含量的影响: 第 1 天, 试验猕猴桃还原糖含量均没有极显著差异 ($P>0.01$), 第 7 天, 试验猕猴桃还原糖含量均空白组>处理组>未处理组, 未处理组染菌猕猴桃还原糖含量极显著低于空白组 ($P<0.01$), 其中未处理组侵染分离菌 LPH6 猕猴桃还原糖质量分数降低 5.53%, 处理组降低 1.91%, 说明反式-2-己烯醛处理可以在一定程度上抑制染菌猕猴桃还原糖含量降低, 降低扩展青霉产生菌对猕猴桃品质的影响, 试验猕猴桃还原糖含量处理组与空白组没有极显著差异 ($P>0.01$), 说明反式-2-己烯醛处理对猕猴桃还原糖含量没有显著影响。

反式-2-己烯醛对猕猴桃维生素 C 含量的影响: 第 1 天, 试验猕猴桃维生素含量均没有极显著差异 ($P>0.01$), 第 7 天, 试验猕猴桃维生素含量为空白组>处理组>未

处理组, 随着贮藏时间, 空白猕猴桃维生素质量分数下降 14.02%, 未处理组染菌猕猴桃维生素含量极显著低于空白组 ($P<0.01$), 其中未处理组侵染分离菌 LPH6 猕猴桃还原糖质量分数降低 33.73%, 处理组降低 16.62%, 说明反式-2-己烯醛处理可以在一定程度上抑制染菌猕猴桃维生素含量降低, 降低扩展青霉产生菌对猕猴桃品质的影响, 试验猕猴桃维生素含量处理组与空白组没有极显著差异 ($P>0.01$), 说明反式-2-己烯醛处理对猕猴桃维生素含量没有显著影响。

反式-2-己烯醛对猕猴桃果实腐烂率的影响: 第 1 天, 猕猴桃果实并未发病, 果实完好, 第 7 天, 未经反式-2-己烯醛处理的染菌猕猴桃大量腐烂, 而处理组染菌猕猴桃腐烂率显著降低未处理组, 其中接种扩展青霉 LPH6 猕猴桃腐烂率为 98.87%, 处理组腐烂率为 28.31%, 说明反式-2-己烯醛对扩展青霉有显著抑制作用 ($P<0.01$), 能够降低染菌猕猴桃的腐败变质。

表 4 反式-2-己烯醛对猕猴桃品质的影响
Table 4 Effects of trans-2-hexenal on kiwifruit quality

指标 Indicators	时间 Time/d	CICC40658		CGMCC3.3703		LPH5		LPH6		WY		空白 Control
		S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	
硬度 Fruit firmness/ (kg·cm ⁻²)	1	7.92± 0.04a	7.99± 0.07a	7.89± 0.06a	7.99± 0.09a	7.89± 0.04a	7.97± 0.06a	7.90± 0.03a	8.00± 0.01a	7.88± 0.06a	7.98± 0.06a	8.00± 0.09a
	7	2.39± 0.07c	3.90± 0.06a	2.77± 0.04b	4.05± 0.09a	2.03± 0.11d	3.94± 0.04a	1.88± 0.04d	4.02± 0.03a	2.43± 0.06c	3.96± 0.05a	4.12± 0.07a
可溶性固形物 SSC/%	1	10.98± 0.06a	11.00± 0.00a	10.96± 0.06a	10.99± 0.10a	11.00± 0.10a	11.02± 0.06a	11.00± 0.06a	11.01± 0.06a	10.98± 0.06a	10.97± 0.06a	11.04± 0.00a
	7	12.30± 0.10c	12.80± 0.06ab	12.40± 0.10c	12.81± 0.10ab	12.20± 0.00c	12.93± 0.06ab	12.17± 0.06c	12.80± 0.10ab	12.30± 0.05c	12.83± 0.03ab	13.00± 0.00a
可滴定酸 Titratable acid/%	1	0.84± 0.01a	0.84± 0.00a	0.85± 0.02a	0.83± 0.01a	0.85± 0.03a	0.84± 0.01a	0.86± 0.01a	0.83± 0.01a	0.86± 0.01a	0.85± 0.01a	0.84± 0.02a
	7	0.68± 0.02a	0.62± 0.01b	0.69± 0.03a	0.59± 0.02b	0.70± 0.02a	0.61± 0.02b	0.69± 0.01a	0.60± 0.02b	0.70± 0.02a	0.64± 0.02b	0.62± 0.01b
pH 值 pH value	1	3.40± 0.03a	3.41± 0.01a	3.40± 0.02a	3.44± 0.03a	3.41± 0.04a	3.42± 0.02a	3.42± 0.02a	3.41± 0.01a	3.42± 0.02a	3.42± 0.02a	3.43± 0.03a
	7	3.69± 0.03b	3.85± 0.03a	3.67± 0.03b	3.86± 0.03a	3.67± 0.02b	3.87± 0.02a	3.60± 0.03c	3.84± 0.02a	3.62± 0.02c	3.82± 0.03a	3.88± 0.04a
还原糖 Reducing sugar/%	1	8.44± 0.02a	8.49± 0.06a	8.46± 0.01a	8.50± 0.03a	8.45± 0.03a	8.49± 0.03a	8.47± 0.03a	8.50± 0.03a	8.41± 0.03a	8.48± 0.08a	8.48± 0.04a
	7	8.94± 0.02c	9.25± 0.12ab	8.93± 0.03c	9.17± 0.04b	8.90± 0.05c	9.21± 0.06ab	8.88± 0.05c	9.22± 0.05ab	9.09± 0.10bc	9.21± 0.06ab	9.40± 0.06a
维生素 C Vitamin C/(mg·100 g ⁻¹)	1	61.62± 0.21a	62.56± 0.64a	60.56± 0.62a	62.96± 1.79a	62.66± 0.51a	62.85± 0.28a	62.13± 0.36a	62.80± 0.32a	60.79± 0.55a	62.47± 0.31a	62.53± 0.22a
	7	45.98± 0.78b	52.46± 0.68a	45.70± 0.49b	53.32± 0.76a	41.90± 1.70c	52.69± 0.54a	41.17± 0.36c	52.36± 1.06a	44.99± 0.67b	53.74± 0.62a	53.76± 0.41a
果实腐烂率 Fruit decay rate/%	7	94.23± 3.16a	18.14± 1.78c	93.02± 3.46a	12.76± 1.24d	98.82± 3.04a	26.46± 2.18b	98.87± 2.76a	28.31± 1.34b	92.74± 2.64a	20.32± 2.01c	-

注: “S”表示未加入反式-2-己烯醛处理, “T”表示加入一定浓度的反式-2-己烯醛处理。
Note: “S”means that trans-2-hexenal is not added and “T” means that a certain concentration of trans-2-hexenal is added.

2.4 反式-2-己烯醛对展青霉素生成的影响

从表 5 中可以看出, 未用反式-2-己烯醛处理的染菌猕猴桃, 除标准菌 CGMCC3.3703 未检测到展青霉素外, 其余四株扩展青霉都产生展青霉素, 且含量均高于水果原汁、原浆等半制品中展青霉素质量分数 18~953 μg/kg), 可能原因是猕猴桃果实 pH 值较低, 适宜于扩展青霉产生毒素以及毒素累积^[9]。而用反式-2-己烯醛处理的染菌猕猴桃均未检出展青霉素, 说明反式-2-己烯醛不仅对扩展青霉生长具有很好抑制作用还能够有效抑制扩展青霉在猕猴桃上产生毒素与毒素累积。

表 5 反式-2-己烯醛对生成展青霉素质量分数的影响
Table 5 Effects of trans-2-hexenal on content of patulin

试验菌株 Test strains	未处理 Treated without trans-2-hexenal/(mg·kg ⁻¹)	抑菌处理 Treated with trans-2-hexenal/(mg·kg ⁻¹)
CICC 40658	0.55	-
CGMCC3.3703	-	-
LPH5	0.93	-
LPH6	1.21	-
WY	3.23	-

2.5 扫描电镜结果

反式-2-己烯醛处理前后 5 株扩展青霉的扫描电镜结果由图 1 所示：正常的分离菌 LPH6 菌丝生长茁壮，相互间交织形成繁茂的菌丝体，菌丝体顶端产生多细胞的分生孢子梗，梗末端分裂成串的分生孢子，呈扫帚状，孢子为规则椭球形，形态饱满（图 1a），经反式-2-己烯醛处理的分离菌 LPH6 菌丝生长稀疏，菌丝体明显减少，形态杂乱，且未观察到孢子产生（图 1b）；正常的分离菌 LPH5 菌丝光滑饱满，形态呈规则管状，有少量椭圆形孢子产生，形态饱满（图 1c），经反式-2-己烯醛处理的

分离菌 LPH5 菌丝出现明显皱缩、干瘪现象，形态呈条带状且未观察到孢子产生（图 1d）；正常的标准菌 CICC 40658、CGMCC 3.3703 和分离菌 WY 菌丝生长茁壮、形态呈规则管状，表面光滑饱满（图 1e、图 1g、图 1i），经反式-2-己烯醛处理后 3 株扩展青霉菌丝均出现生长稀疏，菌丝形态呈条带状，出现明显皱缩、干瘪、螺旋现象（图 1f、图 1h、图 1j）；由上述可知，一定浓度的反式-2-己烯醛不仅影响扩展青霉菌丝正常生长，还会抑制孢子产生，从而影响扩展青霉正常繁殖达到抑菌效果。

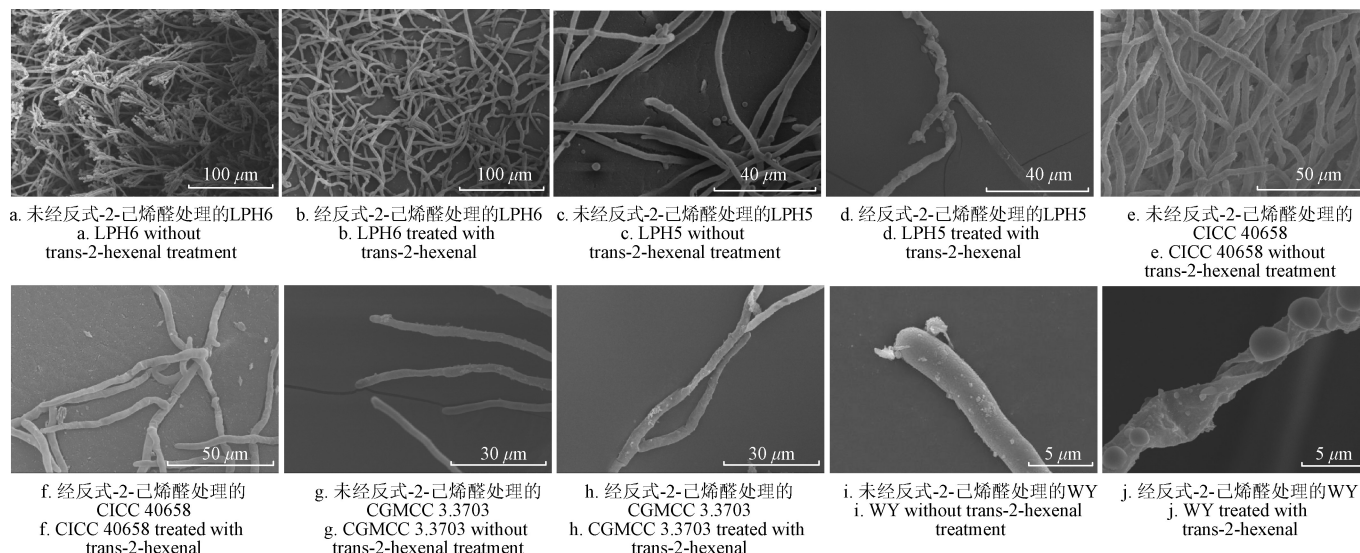


图 1 反式-2-己烯醛处理前后 5 株扩展青霉的扫描电子显微镜图

Fig.1 Scanning electron micrographs of five strains of *P.expansum* before and after treatment with trans-2-hexenal

3 讨论

本文选择天然存在于猕猴桃中的反式-2-己烯醛对 5 株扩展青霉进行体外抑菌试验和猕猴桃活体试验，首先以文献报道的 8 种具有抑菌作用的物质做对比，分别将 5 株扩展青霉菌饼接种于含有反式-2-己烯醛和 8 种抑菌物质浓度为 5 mg/mL 的 PDA 培养基中，进行体外抑菌试验，结果表明与 8 种抑菌物质相比，反式-2-己烯醛的抑菌效果最好，但是由于离体抑菌效果与实际应用中猕猴桃果实保鲜效果存在一定差异，因此后续试验可以对高温自发气调情况下，9 种抑菌剂对猕猴桃果实保鲜效果进行研究，确定反式-2-己烯醛对猕猴桃果实保鲜效果。试验采用直径 3 mm 的无菌铁钉在猕猴桃赤道部位打孔，接种 $10 \mu\text{L}$ 、 $1.0 \times 10^6 \text{ cfu/mL}$ 5 株试验菌的孢子悬液的方法模拟猕猴桃感染扩展青霉菌，通过添加浓度 $100 \mu\text{L/L}$ 的反式-2-己烯醛进行猕猴桃活体抑菌试验，研究反式-2-己烯醛对猕猴桃品质的影响，试验结果表明反式-2-己烯醛能够较好保持猕猴桃的品质，但是由于反式-2-己烯醛的抑菌效果在试验模拟条件下和猕猴桃自然条件下感染青霉菌可能存在差异，因此需要对自然条件下感染青霉菌的猕猴桃进行活体试验，以进一步验证反式-2-己烯醛在实际应用中对猕猴桃上扩展青霉抑制效果及品质的影响。试验通过扫描电镜初步探索了反式-2-己烯醛的抑菌机理，

结果发现反式-2-己烯醛不仅能够使 5 株扩展青霉菌丝出现明显皱缩、干瘪、螺旋等现象，还能够抑制孢子的繁殖和展青霉素的产生及积累。但是对于反式-2-己烯醛引起扩展青霉细胞死亡的原因还未完全揭示，后续试验可以通过测定扩展青霉细胞膜通透性、电势变化及作用靶点等进一步研究反式-2-己烯醛的抑菌机理。

4 结论

本文选取反式-2-己烯醛和 8 种文献报道具有抑菌效果的物质对 5 株扩展青霉进行体外抑菌试验，研究反式-2-己烯醛的抑菌效果并测定最小抑菌浓度，通过猕猴桃活体试验进一步研究了反式-2-己烯醛对猕猴桃品质影响，并初步探索了抑菌机理，得到以下结论：

1) 与 8 种文献报道具有抑菌效果物质相比，反式-2-己烯醛能够极显著抑制 5 株扩展青霉生长 ($P < 0.01$)，具有最佳抑菌效果，反式-2-己烯醛对标准菌 CICC40658 和 CGMCC3.3703、分离菌 LPH5、LPH6 和 WY 的最小抑菌浓度 (MIC) 依次为 100、80、80、80、80 $\mu\text{L/L}$ 。

2) 试验采用 $100 \mu\text{L/L}$ 反式-2-己烯醛对感染 5 株扩展青霉的猕猴桃进行处理，结果发现，反式-2-己烯醛能够极显著抑制染菌猕猴桃果实硬度、可滴定酸、维生素 C 含量的快速下降 ($P < 0.01$)，并且对猕猴桃果实硬度、SSC、pH 值和还原糖含量均没有极显著影响 ($P > 0.01$)，

较好的保持了猕猴桃的品质。

3) 高效液相法测定猕猴桃中展青霉素含量和扫面电镜观察反式-2-己烯醛处理前后 5 株扩展青霉形态变化, 发现反式-2-己烯醛不仅能够使 5 株扩展青霉菌丝出现明显皱缩、干瘪、螺旋等现象, 还能够抑制孢子的繁殖和展青霉素的产生及积累。

研究结果为猕猴桃的保鲜贮藏及扩展青霉污染控制和毒素积累奠定基础, 并为天然抑菌物质在农产品中实际应用提供一定依据, 但是反式-2-己烯醛对扩展青霉抑菌机理仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Moake M M, Padillazakour O I, Worobo R W. Comprehensive review of patulin control methods in foods[J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2010, 4(1): 8—21.
- [2] 张承, 王秋萍, 冉飞, 等. 猕猴桃适宜采摘期确定及其贮藏性能[J]. 农业工程学报, 2018, 34(17): 266—275.
Zhang Cheng, Wang Qiuping, Ran Fei, et al. Determination of suitable harvest period of kiwifruit and its storage performance[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2018, 34(17): 266—275.
- [3] 薛华丽, 毕阳, 宗元元, 等. 果蔬及其制品中真菌毒素的污染与检测研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 285—290.
Xue Huali, Bi Yang, Zong Yuanyuan, et al. Progress in mycotoxins contamination and detection in fruits and vegetables and their processed products[J]. Food Science, 2016, 37(23): 285—290. (in Chinese with English abstract)
- [4] Zong Yuanyuan, Li Boqiang, Qin Guozheng, et al. Toxicity of patulin on fruit quality and its research progress[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, 15(4): 36—41.
- [5] 张欣怡, 王威浩, 邓丽莉, 等. 水果及其制品中展青霉素的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(11): 379—384.
Zhang Xinyi, Wang Weihao, Deng Lili, et al. Research progress in patulin of fruits and its products[J]. Food Industry Technology, 2017, 38(11): 379—384. (in Chinese with English abstract)
- [6] Cassano A, Donato L, Conidi C, et al. Recovery of bioactive compounds in kiwifruit juice by ultrafiltration[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9(4): 556—562.
- [7] 张业芳, 唐诗, 周艳, 等. 猕猴桃乳酸菌饮料的研制[J]. 中国酿造, 2017(12): 186—190.
Zhang Yefang, Tang Shi, Zhou Yan, et al. Preparation of kiwifruit lactic acid bacteria beverage[J]. China Brewing, 2017(12): 186—190. (in Chinese with English abstract)
- [8] Zhang J B, Gao Z P, Liu X H, et al. The Effect of RF treatment combined with Nisin against alicyclobacillus, spores in kiwi fruit juice[J]. Food & Bioprocess Technology, 2016, 10(2): 1—9.
- [9] 李可, 李华佳, 袁怀瑜, 等. “金艳”猕猴桃贮藏期腐烂病原菌的分离鉴定[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(1): 160—164.
Li Ke, Li Huajia, Yuan Huaiyu, et al. Isolation and identification of rot disease pathogens during storage of “Jinyan” kiwifruit[J]. Anhui Agric. Sci, 2018, 46(1): 160—164. (in Chinese with English abstract)
- [10] Appell M, Jackson M A, Dombink-Kurtzman M A. Removal of patulin from aqueous solutions by propylthiol functionalized SBA-15[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 187(1/2/3): 150—156.
- [11] Dong Q F, Manns D C, Feng G P, et al. Reduction of patulin in apple cider by UV radiation[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(1): 69—74.
- [12] Zhu Y, Koutchma T, Warriner K, et al. Kinetics of patulin degradation in model solution, apple cider and apple juice by ultraviolet radiation[J]. Food science and technology international, 2013, 19(4): 291—303.
- [13] 高振鹏, 刘瑞, 张德举, 等. 超声波降解苹果汁中展青霉素动力学研究[J]. 农业机械学报, 2015, 46(11): 230—235.
Gao Zhenpeng, Liu Rui, Zhang Deju, et al. Kinetics study of ultrasonic degradation of patulin in apple juice[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(11): 230—235. (in Chinese with English abstract)
- [14] Khorrami A R, Taherkhani M. Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for pre-concentration of patulin from apple juice[J]. Chromatographia, 2011, 73(1): 151—156.
- [15] Zhang W, Yong H, Chen X, et al. Surface molecularly imprinted polymer capped Mn-doped ZnS quantum dots as a phosphorescent nanosensor for detecting patulin in apple juice[J]. Food Chemistry, 2017, 232: 145—154.
- [16] 潘春青, 岳田利, 王铁成, 等. 气体沿面放电低温等离子体对扩展青霉孢子杀灭效果[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 1—7.
Pang Chunqing, Yue Tianli, Wang Tiecheng, et al. Killing effect of low-temperature plasma generated by gas phase surface discharge on *Penicillium expansum* spores[J]. Food Science, 2017, 38(21): 1—7. (in Chinese with English abstract)
- [17] Calvo J, Calvente V, de Orellano M E, et al. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 113(3): 251—257.
- [18] 姜楠, 王蒙, 韦迪哲, 等. 果蔬中真菌毒素污染及臭氧防治研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(11): 4415—4420.
Jiang Nan, Wang Meng, Wei Dizhe, et al. Progress on mycotoxins contamination and ozone degradation in fruits and vegetables[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(11): 4415—4420. (in Chinese with English abstract)
- [19] 师俊玲, 张小平, 李元瑞, 等. 果汁护色剂 JPX 对苹果汁中棒曲霉素的降解作用及护色效果[J]. 农业工程学报, 2006, 22(10): 237—239.
Shi Junling, Zhang Xiaoping, Li Yuanrui, et al. Effects of color protection agent JPX on patulin degradation and color protection of apple juice[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of CSAE), 2006, 22(10): 237—239. (in Chinese with English abstract)
- [20] Cao J, Zhang H, Yang Q, et al. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162(2): 167—173.
- [21] Yang Q, Zhang H, Zhang X, et al. Phytic acid enhances biocontrol activity of *Rhodotorula mucilaginosa* against *penicillium expansum* contamination and patulin production in apples[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(8): 1—9.
- [22] Fuchs S, Sontag G, Stidl R, et al. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria[J]. Food & Chemical Toxicology, 2008, 46(4): 1398—1407.
- [23] 付瑞敏. 解淀粉芽孢杆菌生物防治扩展青霉的机制及苹果采摘后防腐保鲜技术研究[D]. 西安: 西北大学, 2016.
Fu Ruimin. Biocontrol Mechanism of *Bacillus Amyloliquefaciens* against *Penicillium Expansum* and Preservative and Fresh-keeping study on Postharvest Apples[D]. Xi'an: Northwest University, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [24] 王媛, 袁亚宏, 杨丽霞, 等. 多酚及植物精油对扩展青霉生长及展青霉素生成的抑制作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2702—2707.
Wang Yuan, Yuan Yahong, Yang Lixia, et al. Study on the effect of polyphenol and essential oil on the growth and patulin production of *Penicillium expansum*[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(7): 2702—2707. (in Chinese with English abstract)
- [25] Xing F, Hua H, Selvaraj J N, et al. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by

- cinnamon oil and cinnamaldehyde[J]. Food Control, 2014, 46: 343–350.
- [26] 燕璐. 体外条件下柠檬酸处理对 *T.roseum* 的抑制及部分机理[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
Yan Lu. Citric Acid Inhibits against *Trichothecium Roseum* in Vitro and its Partial Mechanism[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015. (in Chinese with English abstract)
- [27] 张怀予, 毕阳, 李云华, 等. 采后苹果酸处理对苹果梨青霉病的抑制[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(1): 138–142.
Zhang Huaiyu, Bi Yang, Li Yunhua, et al. Inhibiting effect of postharvest malic acid treatment on blue mould of pear[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2009, 44(1): 138–142. (in Chinese with English abstract)
- [28] Zhou C Y L Z. γ -aminobutyric acid induces resistance against *Penicillium expansum* by priming of defence responses in pear fruit[J]. Food Chemistry, 2014, 159: 29–37.
- [29] 孙昊. 茶多酚中儿茶素的抑菌效果探究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2013, 36(6): 62–65.
- Sun Hao. Research on the bacteriostatic activity of catechin from tea polyphenols[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2013, 36(6): 62–65. (in Chinese with English abstract)
- [30] 王晓英, 王宇光, 谷新春, 等. 双乙酸钠在食品防腐保鲜中的应用及展望[J]. 农业机械, 2013(14): 66–68.
- [31] 朱玉燕, 郭波龙, 姜天甲, 等. 外源草酸对猕猴桃采后果实扩展青霉生长及展青霉素积累的影响[J]. 果树学报, 2015, 32(2): 298–303.
Zhu Yuyan, Wu Bolong, Jiang Tianjia, et al. Effects of exogenous oxalic acid on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in harvest kiwifruit[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(2): 298–303. (in Chinese with English abstract)
- [32] Taguchi T, Kozutsumi D, Nakamura R, et al. Effects of aliphatic aldehydes on the growth and patulin production of *Penicillium expansum* in apple juice[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2013, 77(1): 138–144.

Study on inhibitory effect of trans-2-hexenal on growth of *P. expansum* at kiwi fruit storage

Duan Tengfei^{1,2}, Li Zhao¹, Yue Tianli^{1*}, Xia Qiuxia¹, Meng Jianghong¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. School of Biological and Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China)

Abstract: Patulin is a neurotoxic secondary metabolite that causes a series of acute and chronic conditions such as enteritis, dyspnea and cancer when the body consumes excessive amounts. China is the birthplace of kiwifruit and the largest producer of kiwifruit in the world. A large number of studies had shown that kiwifruit is susceptible to infection with *penicillium expansum* (*P.expansum*) and patulin accumulation during harvesting, storage and processing which not only causes waste, but also harms human health. Therefore, it is necessary to study a safe and effective method to control *P.expansum* and patulin accumulation of kiwifruit and its products. Trans-2-hexenal is a characteristic aroma component naturally present in kiwi, apple and other fruits. Studies had shown that trans-2-hexenal has a certain inhibitory effect on microorganisms. This article studied the inhibitory effect of hexenal on the growth of *P.expansum* and the production of patulin. Firstly, the five strains of *P.expansum* (CICC40658, CGMCC3.3703, LPH6, LPH5, WY) were inoculated into PDA medium plates containing bacteriostatic substance concentration of 5 mg/mL which kept at 28 °C and the diameter of the colony was measured by the cross method every day. Study the antibacterial effect of trans-2-hexenal and eight antibacterial substances reported in the literature (citric acid, limonene, malic acid, γ -aminobutyric acid, quercetin, catechin, sodium diacetate, oxalic acid) on 5 strains of *P.expansum*. Determined the minimum inhibitory concentration of trans-2-hexenal by antibacterial test of 5 strains of *P.expansum* when trans-2-hexenal at a concentration of 40, 60, 80, 100 μ L/L. Then 3 mm of sterile iron nails were used to perforate the equator of kiwifruit and 10 μ L 1.0×10^6 cfu/mL spore suspension of 5 test strains were inoculated which simulating injury of kiwifruit secondary infection *P.expansum*. The kiwifruit in vivo test was carried out by adding trans-hexenal aldehyde at a concentration of 100 μ L/L and determined the kiwifruit hardness, soluble solids, titratable acid, reducing sugar, vitamin C, pH value and fruit decay rate to study the effect of trans-2-hexenal on the quality of kiwifruit and the patulin content in kiwifruit was measured by HPLC. Lastly, the effect of trans-2-hexenal on the morphology of 5 strains of *P.expansum* was observed by scanning electron microscope. The results shown: Compared with the eight antibacterial substances, trans-2-hexenal had the best antibacterial effect and it could completely inhibit the growth of 5 strains of *Penicillium expansum*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the five strains was 100, 80, 80, 80 and 80 μ L/L, respectively; trans-2-hexenal significantly reduced the effect of *P. expansum* on kiwi fruit firmness, titratable acid and vitamin C ($P < 0.01$) and had no significant effect ($P > 0.01$) on the fruit firm, soluble solids, pH value and reducing sugar content of kiwifruit. The rot rate of kiwi fruit with *P. expansum* was reduced and the quality of kiwifruit was better maintained by Trans-2-hexenal. All the aldehyde-treated kiwifruits were not detected by patulin; the scanning electron microscope showed that the five strains showed hyphal shrinkage, folding, drying, and sporulation reduction. Trans-2-hexenal has a good inhibitory effect on the growth of *P.expansum* and the production of patulin and provides a theoretical basis for the development of natural products with antibacterial effects.

Keywords: fruit; bacteria; storage; trans-2-hexenal; *P.expansum*; antibacterial effect; kiwi; patulin