

# 水溶性壳聚糖/可得然胶可食性复合涂膜对樱桃番茄灰霉的抑制作用及机理

于有伟, 刘坤渝, 张少颖, 景子瑜, 常珈旗, 李佳思

(山西师范大学食品科学学院, 山西 太原 030031)

**摘 要:** 为探究水溶性壳聚糖/可得然胶复合涂膜对樱桃番茄果实采后病原真菌灰葡萄孢霉菌的抑菌作用和抑菌机制, 本研究对灰葡萄孢霉菌菌丝生长情况、最小抑菌浓度、孢子萌发、细胞膜透性等进行测定。结果显示, 复合涂膜对灰葡萄孢霉菌生长有显著的抑制作用, 经复合涂膜处理后, 灰霉的细胞膜破损, 细胞内容物大量泄漏, 菌丝皱缩; 在樱桃番茄果实实验中, 复合涂膜能显著抑制病斑的扩大。复合涂膜可能主要通过影响细胞壁和细胞膜等对灰葡萄孢霉菌产生抑制作用。综上, 水溶性壳聚糖/可得然胶复合涂膜可作为有效的真菌抑制材料应用于樱桃番茄的贮藏保鲜领域中。

**关键词:** 水溶性壳聚糖; 可得然胶; 灰葡萄孢霉菌; 抑菌活性; 抑菌机理

## Inhibitory Effect and Mechanism of Water-Soluble Chitosan/Curdlan Edible Composite Coating on *Botrytis cinerea* in Cherry Tomato

YU Youwei, LIU Kunyu, ZHANG Shaoying, JING Ziyu, CHANG Jiaqi, LI Jiasi

(College of Food Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030031, China)

**Abstract:** In this study, the inhibitory effect of an edible composite composed of coating water-soluble chitosan and curdlan on postharvest infection of cherry tomatoes by *Botrytis cinerea* and the underlying mechanism was investigated. The mycelial growth, minimum inhibitory concentration (MIC), spore germination and membrane permeability of *B. cinerea* were studied. The results showed that the composite coating had a significant inhibitory effect on the growth of *B. cinerea*. After treatment with the composite coating, the cell membrane was damaged, resulting in leakage of intracellular contents and hyphal shrinkage. Meanwhile, it significantly inhibited the expansion of *B. cinerea* lesions. The composite coating might inhibit *B. cinerea* mainly by affecting the cell wall and membrane. These results suggest that the water-soluble chitosan/curdlan edible composite coating can be used as an effective antimicrobial material in the storage and preservation of cherry tomatoes.

**Keywords:** water-soluble chitosan; curdlan; *Botrytis cinerea*; antifungal activity; antifungal mechanism

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240402-020

中图分类号: TS255.36

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 22-0239-08

引文格式:

于有伟, 刘坤渝, 张少颖, 等. 水溶性壳聚糖/可得然胶可食性复合涂膜对樱桃番茄灰霉的抑制作用及机理[J]. 食品科学, 2024, 45(22): 239-246. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240402-020. <http://www.spkx.net.cn>

YU Youwei, LIU Kunyu, ZHANG Shaoying, et al. Inhibitory effect and mechanism of water-soluble chitosan/curdlan edible composite coating on *Botrytis cinerea* in cherry tomato[J]. Food Science, 2024, 45(22): 239-246. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240402-020. <http://www.spkx.net.cn>

灰霉病是樱桃番茄采后的主要病害之一, 其由灰葡萄孢霉菌侵染果实导致发病。灰霉会侵染植物的叶片、果实和茎部, 导致植物生长受阻、产量下降, 严重影响农作物的生长发育和经济产量<sup>[1]</sup>。若果蔬受到病原真菌的侵

染, 可能导致食品变质、霉菌毒素的产生, 从而造成食品安全隐患。开发利用高效、安全的天然抑菌剂成为近年来的研究热点。壳聚糖是天然多功能生物聚合物, 在海洋节肢动物和昆虫甲壳、菌类和藻类细胞膜以及高等

收稿日期: 2024-04-02

基金项目: 山西省自然科学基金项目 (20210302123329; 202203021211254)

第一作者简介: 于有伟 (1977—) (ORCID: 0000-0002-6578-7380), 男, 副教授, 博士, 研究方向为果蔬贮藏与加工。

E-mail: yywsxnu@163.com

植物细胞壁中含量丰富<sup>[2]</sup>。水溶性壳聚糖(water-soluble chitosan, CTS)经化学改性得到,用CTS制备的涂膜拥有优异的抑菌性能、气体阻隔性能和机械性能<sup>[3]</sup>。因此,近年来壳聚糖在食品包装中的应用日益增加。可得然胶(curdlan, CUR)是一种新型的胞外多糖,通过 $\beta$ -1,3-葡萄糖苷键连接而成<sup>[4]</sup>。CUR具有三螺旋分子结构、分子内和分子间的氢键,因其独特的热凝胶特性和流变学性质而广泛应用于食品工业<sup>[5]</sup>,但国内外利用CUR制备抑菌薄膜的报道较少。复合涂膜是一种新型的天然保鲜技术<sup>[6]</sup>,涂膜保鲜技术是近年来果蔬贮藏保鲜领域的主流技术之一,这一技术将具有成膜性的物质通过浸渍、涂刷、喷洒等方法全方面覆盖果蔬果实的表面,自然干燥后形成一层半透膜,有效改善果实采后的呼吸强度和微生物入侵情况,可以起到延长果蔬采后贮藏时间和贮藏品质的作用<sup>[7]</sup>。Chen Kai等<sup>[8]</sup>的研究结果显示,在魔芋葡甘露聚糖成膜溶液中加入CUR显著改善了涂膜的相容性、疏水性和阻水性能,并且保证了樱桃番茄在贮藏期间的品质,具有果实保鲜的潜力。Robledo等<sup>[9]</sup>发现藜麦蛋白/壳聚糖包衣可以抑制樱桃番茄上的灰芽孢杆菌生长,其可作为抗真菌生物活性食用膜,以延长水果的保质期。从目前的国内外研究进展来看,壳聚糖涂膜具有良好的抑菌性能,但壳聚糖涂膜的物理性能不佳,添加CUR可以改善其性能。在本课题组之前进行的实验中,通过制备不同比例的CTS/CUR复合涂膜,并对其进行表征,结果显示,比例为1:1(质量比,下同)的CTS/CUR复合涂层具有优越的防腐效果,可显著延长圣女果保质期,可以应用于水果和蔬菜的保存<sup>[3]</sup>。

本实验以樱桃番茄采后病原真菌灰葡萄孢霉菌为菌种,利用CTS和CUR比例为1:1制备的复合涂膜作为抑菌物质,通过分析菌丝生长状况、孢子的抑制率、最低抑菌浓度、细胞膜通透性、细胞外相对电导率、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化以及观察复合涂膜处理后的樱桃番茄对灰葡萄孢霉菌的抑制情况,探究其对樱桃番茄采后病原菌灰葡萄孢霉菌的抑制机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

樱桃番茄购于山西省晋中市汇隆菜市场,品种为‘粉贝贝’樱桃番茄,选择成熟度适中、硬度适中、大小相近的樱桃番茄进行实验。灰葡萄孢霉菌购于北纳生物公司。

CTS(分子式 $(C_9H_{17}NO_7)_n$ ,食品级,纯度85%)山东奥康生物技术有限公司;CUR(食品级)广州绿色城市生物有限公司;甘油(分析纯)天津市风船化学试剂科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

SHJ-6A磁性搅拌锅 常州良友仪器有限公司;2XZ真空泵 浙江黄岩天龙真空泵有限公司;JSM-7500F扫描电子显微镜 日本JEOL有限公司;DHG-9030A干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;LS-50HD立式压力蒸汽灭菌器 江阴滨江医疗设备有限公司;ZHJH-C1112B智城超净工作台 上海智城分析仪器制造有限公司;PA53生物显微镜 南京市麦克奥迪实业集团有限公司;SpectraMax M2酶标仪 上海普迪生物科技有限公司;CX23LEDRFS1C型倒置生物显微镜 日本奥林巴斯株式会社;DDS-307型电导率仪 上海仪电科学仪器股份有限公司;SHA-B双功能水浴恒温振荡器 天津赛得利斯实验分析仪器制造厂;TGL-16M台式高速冷冻离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 复合涂膜的制备

按照Yu Youwei等<sup>[3]</sup>的方法,在60℃条件下将CTS和CUR的固体粉末按质量比1:1混合,随后加去离子水配制成总固体质量分数1%的溶液。将0.1 mL甘油加入到100 mL的涂膜溶液中作为增塑剂。用磁性搅拌锅以2 000 r/min的速率搅拌40 min,直到混合物中没有颗粒。然后用真空泵将涂膜溶液脱气,以去除溶液中的气泡。溶液静置8 h后供后续实验使用。

#### 1.3.2 菌丝生长抑制测定

采用菌丝生长速率法<sup>[10]</sup>测定药品对灰葡萄孢霉菌的抑菌作用。已经活化的灰葡萄孢霉菌菌种在马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上培养4 d后形成菌落,用打孔器制作直径6 mm的菌碟,随后将菌碟接种于含有药品的培养皿中央,在24℃条件下培养4 d,对照组不加药品。每个处理组设3个重复实验,采用交叉法测定菌落直径,菌落生长直径和菌丝生长抑制率分别按式(1)、(2)计算:

$$\text{菌落生长直径/mm} = L_1 - 6 \quad (1)$$

$$\text{菌丝生长抑制率/\%} = \frac{L_2 - L_3}{L_2} \times 100 \quad (2)$$

式中: $L_1$ 为3次测量的菌落直径平均值/mm; $L_2$ 为对照组菌落生长直径/mm; $L_3$ 为处理组菌落生长直径/mm。

#### 1.3.3 孢子抑制率测定

参照张苗苗等<sup>[11]</sup>的方法,用打孔器将培养10 d后的灰葡萄孢霉菌菌落打成直径为6 mm的菌碟,分别接种于有CTS、CUR和复合涂膜的PDA培养皿中央,随后在24℃培养箱中培养。用打孔器对上述培养了10 d的各处理组和对照组菌落边缘4~5 mm处打取6 mm菌饼,洗下菌饼上的孢子并用血球计数板进行孢子计数,每组重复3次,以平均值作为结果数据。孢子数和孢子抑制率分别按式(3)、(4)计算:

$$\text{孢子数} = \text{孢子平均数} \times 4\,000\,000 \quad (3)$$

$$\text{孢子抑制率}/\% = \frac{\text{对照组孢子数} - \text{处理组孢子数}}{\text{对照组孢子数}} \times 100 \quad (4)$$

1.3.4 真菌最小抑制浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀真菌浓度 (minimum fungicidal concentration, MFC) 测定

MIC和MFC使用微孔稀释法<sup>[12]</sup>进行测定。将已经活化的灰葡萄孢霉菌菌种在PDA培养基上培养4 d后形成菌落, 然后用10 mL无菌水充满平面, 用移液管轻轻刮取, 最后调整孢子悬浮液浓度为 $1 \times 10^6$  孢子/mL。将溶解在无菌水中的药品掺入含有10  $\mu$ L孢子悬浮液的96孔板中, 用等量的无菌水建立对照。将微量滴定板在24  $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育48 h, 用酶标仪检测OD<sub>600 nm</sub>, 以确定MIC。取50  $\mu$ L孔内未见菌生长的样品转移到新鲜的PDA平板上, 然后在28  $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育10 d, 确定MFC。

#### 1.3.5 菌丝形态测定

菌丝样品参照Yu Sainan等<sup>[13]</sup>的方法进行制备。用灭菌的打孔器在PDA培养基培养4 d的灰葡萄孢霉菌菌落上打出菌饼, 然后接种入马铃薯葡萄糖肉汤 (potato dextrose broth, PDB) 培养基中。振荡培养4 d后, 加入药品使其终浓度为1 MIC, 以不加药品的PDB液体培养基作为对照。经过24 h振荡培养后, 离心并分别收集实验组和对照组的菌丝团用于下一步实验。菌丝团采用体积分数2.5%戊二醛磷酸缓冲液进行固定, 进行不同浓度梯度的乙醇脱水, 然后加入乙酸异戊酯, 待乙酸异戊酯挥发后, 喷金, 在扫描电镜下观察。

#### 1.3.6 细胞膜通透性测定

菌丝样品依据Liu Ruiling等<sup>[14]</sup>的方法进行制备。将100  $\mu$ L孢子悬浮液转接到含有100 mL PDB液体培养基的锥形瓶中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min培养3 d后并收集菌丝。用无菌水彻底洗清后将0.2 g菌丝分别加入到装有50 mL不同终浓度CTS、CUR、复合涂膜液 (0 (蒸馏水, 对照)、0.25、0.5、1、2、4 MIC, 下同) 的锥形瓶中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min培养12 h。之后4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min对菌丝离心10 min, 用无菌水冲洗3次, 接着用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 避光染色15 min, 在荧光倒置显微镜下进行观察。

#### 1.3.7 细胞外电导率测定

细胞外电导率依据Li Shengwang等<sup>[15]</sup>的方法进行测定。将灰葡萄孢霉菌孢子悬浮液调节至 $10^6$  孢子/mL, 将100  $\mu$ L孢子悬浮液接种于20 mL PDB液体培养基中, 然后28  $^{\circ}\text{C}$ 培养2 d, 4 000 r/min离心10 min, 并用无菌水洗涤2次, 然后将沉淀重悬于20 mL无菌水中。在加入不同终浓度的药品处理0、2、4、6、8 h后, 通过电导计测量灰葡萄孢霉菌细胞外电导率, 以未处理的样品用作对照。结果以细胞外电导率变化率表示。电导率变化率按式 (5) 计算:

$$\text{细胞外电导率变化率}/\% = \frac{\text{处理后电导率} - \text{初始电导率}}{\text{初始电导率}} \times 100 \quad (5)$$

#### 1.3.8 MDA含量测定

采用硫代巴比妥酸比色法进行测定<sup>[16]</sup>。将灰葡萄孢霉菌的孢子悬浮液接种到PDB培养基中, 然后28  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min孵育3 d, 磷酸盐缓冲液冲洗3次, 用无菌吸水纸收集菌丝体。将每0.5 g菌丝体悬浮在不同终浓度的药品中, 在相同条件下进一步孵育, 然后分别在0、2、4、6、8、10、12 h用磷酸盐缓冲液冲洗菌体, 滤纸吸干表面水分, 放入研钵中研磨, 加入20% (质量分数, 下同) 三氯乙酸溶液10 mL、0.6%硫代巴比妥酸溶液3 mL, 混匀, 95  $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min, 冰水浴冷却10 min。转移至离心管中, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心20 min。收集上清液, 分别在532、450、600 nm波长处测定OD值, 设置3组平行。MDA含量按式 (6) 计算:

$$\text{MDA含量}/(\text{mmol/kg}) = [6.45 (\text{OD}_{532\text{ nm}} - \text{OD}_{600\text{ nm}}) - 0.564 \times \text{OD}_{450\text{ nm}}] \times \frac{V}{m} \quad (6)$$

式中:  $V$ 为上清液体积/mL;  $m$ 为菌丝体鲜质量/g。

#### 1.3.9 细胞溶出物测定

药品对灰葡萄孢霉菌菌丝中细胞溶出物的影响按照Kong Jie等<sup>[17]</sup>的方法进行测定。将100  $\mu$ L灰葡萄孢霉菌的分生孢子悬浮液 (约 $10^6$  孢子/mL) 加入20 mL PDB中, 25  $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育48 h。收集菌丝体, 并在28  $^{\circ}\text{C}$ 条件下与不同终浓度的药品混合0、2、4、6、8、10、12 h。在每个时间点收集样品, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min离心5 min, 取上清液测定OD<sub>260 nm</sub>和OD<sub>280 nm</sub>, 分别表示核酸和蛋白质的含量。

#### 1.3.10 樱桃番茄的抑菌实验

樱桃番茄的抑菌实验参考Guo Jianheng等<sup>[18]</sup>的方法进行。取新鲜樱桃番茄果实用蒸馏水洗净, 捞出后自然晾干。每组50个果实, 分别用不同终浓度 (0 (对照)、0.5、1、2 MIC) CTS、CUR、复合涂膜溶液处理, 对照组为无菌水处理。各组果实均浸渍约30 min后完成涂膜。待果实自然风干后在赤道部位打直径2 mm、深3 mm的孔, 各自接种10  $\mu$ L的灰葡萄孢霉菌孢子悬浮液, 静置使孢子稳定附着。用塑料保鲜盒密封, 在相对湿度95%~98%、温度 (25 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ 条件下贮藏。

#### 1.4 数据统计分析

所有实验均重复3次。使用SPSS 18.0软件进行统计学分析, 组间采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和Duncan多重范围检验,  $P < 0.05$ 为差异显著。使用Origin 2023b软件绘图。

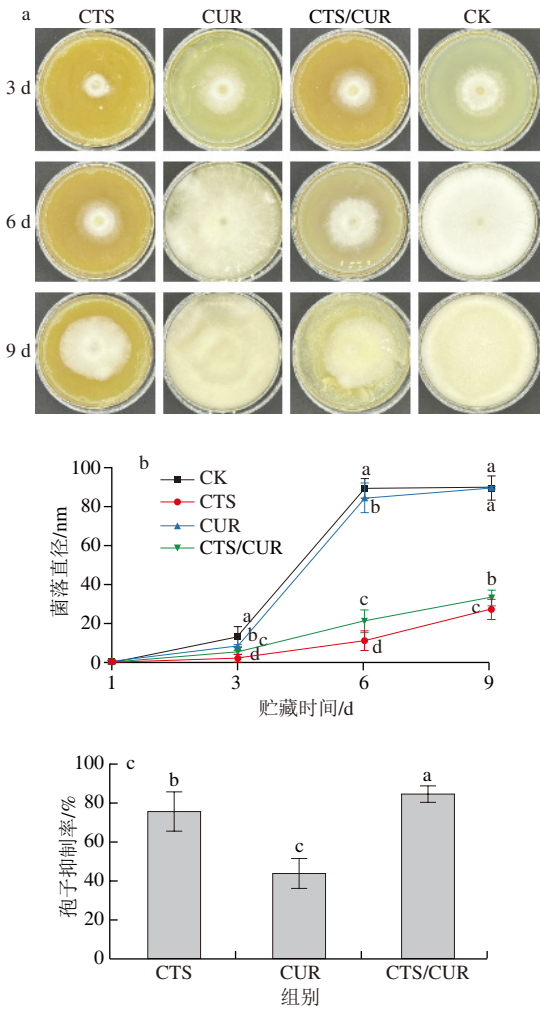
## 2 结果与分析

### 2.1 复合涂膜对菌丝生长直径和孢子萌发抑制的影响

如图1a所示, 灰葡萄孢霉菌的菌落直径随着时间延长而增加, 第3~9天期间, 与对照组的菌丝生长情



况相比,单一CTS溶液和复合涂膜对菌丝有明显的抑制作用。如图1b所示,第6天时,CUR与CK相比,其对菌丝的抑制作用减缓了菌丝生长速度,而单一CTS溶液与复合涂膜则呈现出比CUR和CK更好的菌丝抑制效果。第9天时,CTS、复合涂膜菌落直径分别低于对照组78.75%、73.77%。由图1c可知,单一CTS溶液、单一CUR溶液、复合涂膜溶液对灰葡萄孢霉菌的孢子萌发有一定的抑制作用,对灰葡萄孢霉菌的抑制率分别为77.12%、44.56%、82.17%。



a.菌落外观图; b.菌落直径; c.孢子抑制率。  
不同字母表示各组间差异显著 ( $P<0.05$ )。

图1 CTS/CUR复合涂膜对灰葡萄孢霉菌的影响

Fig. 1 Effect of CTS/CUR composite coating on *Botrytis cinerea*

2.2 复合涂膜对抑制真菌能力的影响

如表1所示,单一CTS溶液对灰葡萄孢霉菌的MIC为5.85  $\mu\text{g/mL}$ , MFC为23.4  $\mu\text{g/mL}$ ; 单一CUR溶液对灰葡萄孢霉菌的MIC为281.25  $\mu\text{g/mL}$ , MFC为600  $\mu\text{g/mL}$ ; 复合涂膜溶液对灰葡萄孢霉菌的MIC为140.625  $\mu\text{g/mL}$ , MFC为333.4  $\mu\text{g/mL}$ 。由上述结果可以看出,单一CTS溶液对

菌丝、孢子的抑制作用都很显著,并且灰葡萄孢霉菌对单一CTS涂膜溶液很敏感,其MIC和MFC都保持在一个很小的范围,这可能是因为壳聚糖是带阳离子的天然聚合物,与微生物细胞膜表面的阴离子通过静电相互作用破坏了细胞膜的完整性,导致胞内物质泄漏,造成细胞代谢紊乱,细胞死亡<sup>[19]</sup>。但是在孢子萌发抑制方面,复合涂膜溶液表现出比单一CTS溶液更好的抑制效果,这可能是因为CTS和CUR溶液表现出了协同作用,灰葡萄孢霉菌和复合涂膜液间的静电作用增强。

表1 灰葡萄孢霉菌的MIC、MFC

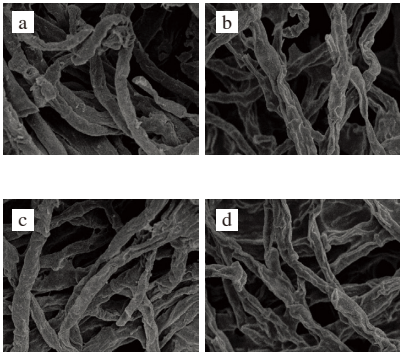
Table 1 MIC and MFC of CTS, CUR and their mixture against *B. cinerea*

指标	CTS	CUR	CTS/CUR
MIC/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$5.850\pm0.004^c$	$281.250\pm0.013^a$	$140.625\pm0.007^b$
MFC/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$23.400\pm0.005^e$	$600.000\pm0.018^a$	$333.400\pm0.002^b$

注:同行字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

2.3 复合涂膜对菌丝形态的影响

图2为3种药品MIC条件下处理后和对照组灰葡萄孢霉菌菌丝的扫描电镜观察图。CTS处理后,菌丝结构有明显的皱缩现象;CUR处理后的菌丝大部分松散饱满,没有受到明显的抑制;复合涂膜处理后的菌丝结构出现皱缩,与CTS处理后表现出来的形态相似。这说明复合涂膜处理导致了灰葡萄孢霉菌菌丝的变形,与上述实验结果保持一致。



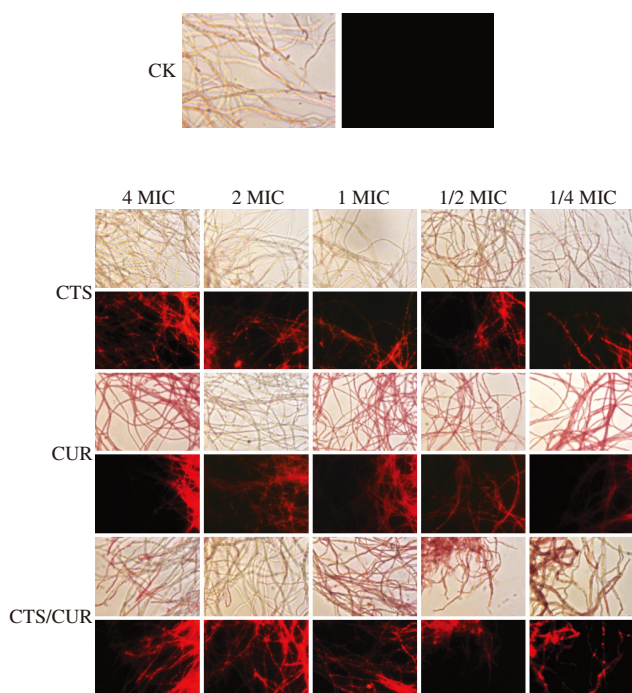
a~d.分别为CK、CTS、CUR、CTS/CUR。

图2 CTS/CUR复合涂膜对灰葡萄孢霉菌菌丝的影响

Fig. 2 Effect of CTS/CUR composite coating on the mycelia of *B. cinerea*

2.4 复合涂膜对细胞膜完整性的影响

细胞膜在维持真菌内环境平衡中起重要作用。PI荧光染料无法进入完整的细胞膜,但可以进入破坏的细胞膜,与核酸结合产生红色荧光<sup>[20]</sup>。红色荧光强度越高,对质膜完整性的破坏越严重。如图3所示,CK组中的菌丝结构完整,没有被破坏,PI染色无法或只有少量进入其细胞中,故观察不到红色的荧光。而经药品处理后的菌丝显示强荧光,且荧光强度与药品浓度呈正相关。同时可以看出,CUR的破坏性明显比另外两者弱,表明CTS、CUR和复合涂膜液可引起细胞膜完整性的丧失。



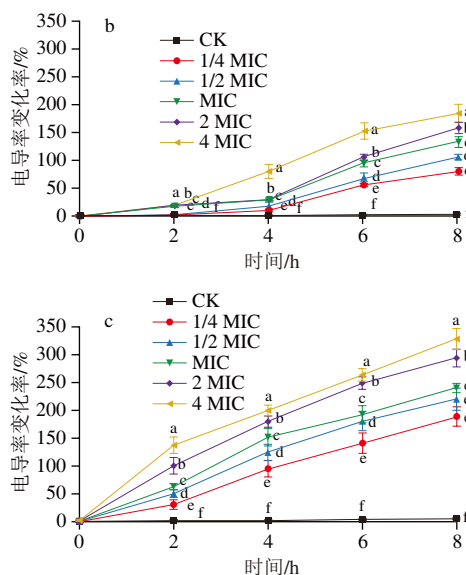
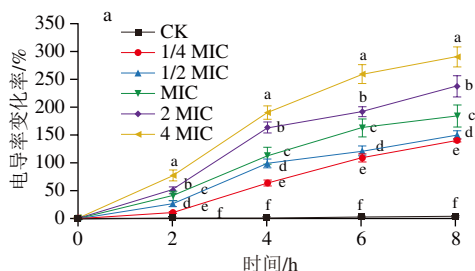
同组内第1行为亮视野图、第2行为暗视野图。

图3 灰葡萄孢霉菌菌丝的荧光倒置显微镜图

Fig. 3 Fluorescent inverted microscope image of the mycelium of *B. cinerea*

## 2.5 复合涂膜对细胞膜渗透性的影响

采用电导率法测定了3种药品对灰葡萄孢霉菌细胞膜渗透性的影响,当抑菌物质作用于灰葡萄孢霉菌时,菌丝被破坏,电解质外漏,导致霉菌培养液的电导率上升,以霉菌培养液的电导率变化体现抑菌物质对菌丝的抑制程度<sup>[21]</sup>。如图4所示,未经处理的灰葡萄孢霉菌菌液电导率在作用时间内几乎没有出现波动,可能是由于灰葡萄孢霉菌细胞在观测时间内的自身衰老死亡速率较慢。经处理后的菌液电导率均有不同程度的变化,其中以复合涂膜组对灰葡萄孢霉菌细胞膜渗透性的影响最为明显,CUR组影响较小。随着药品浓度的增大,电导率也随之增大;作用时间相同时,药品浓度越大,相应菌液电导率也越大。说明经药品处理后的灰葡萄孢霉菌菌丝细胞膜受到损伤,细胞内的离子外漏,导致电导率变化。

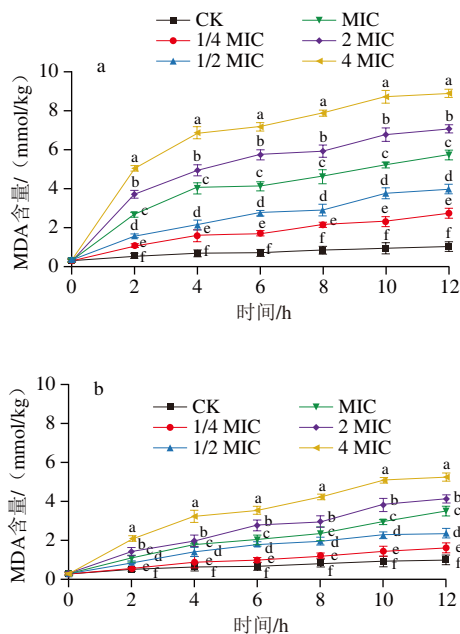


a.单一CTS; b.单一CUR; c. CTS/CUR复合涂膜。字母不同表示同一时间不同浓度差异显著( $P<0.05$ )。图5~7同。

图4 CTS/CUR复合涂膜对灰葡萄孢霉菌细胞膜渗透性的影响  
Fig. 4 Effect of CTS/CUR composite coating on the membrane permeability of *B. cinerea*

## 2.6 复合涂膜对MDA含量的影响

MDA含量是细胞膜损伤的主要指标,反映了膜系统脂质过氧化的情况,同时也反映了细胞对逆境条件的耐受能力,正常的脂质过氧化反应对机体的新陈代谢有重要的作用<sup>[22]</sup>。从图5可以看出,处理组的MDA含量均显著高于对照组,且随着处理时间的延长,MDA含量呈上升趋势。这表明在药品处理后,灰葡萄孢霉菌细胞膜脂质的过氧化情况加剧,进一步说明菌丝细胞膜系统遭到破坏。



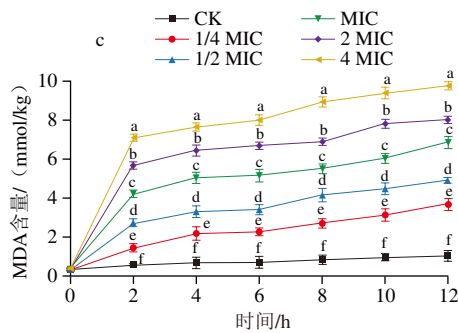


图5 CTS/CUR涂膜对灰葡萄孢霉菌MDA含量的影响

Fig. 5 Effect of CTS/CUR composite coating on the content of MDA in *B. cinerea*

### 2.7 复合涂膜对核酸、蛋白质泄漏量的影响

$OD_{260\text{ nm}}$ 反映了孢外核酸类物质的含量, $OD_{280\text{ nm}}$ 反映了孢外蛋白质的含量<sup>[23]</sup>。在不同时间段内,经不同浓度CTS、CUR、复合涂膜液处理后的灰葡萄孢霉菌细胞内容物的泄漏情况如图6、7所示。对照组在不同时间段内的细胞内容物泄漏量很小,说明未经处理的灰葡萄孢霉菌细胞破损量不多,可能是正常细胞衰亡所致。经处理后孢外 $OD_{260\text{ nm}}$ 和 $OD_{280\text{ nm}}$ 迅速上升,且经过不同浓度的药品处理后,细胞内容物泄漏量随着药品浓度的增大而增大。在处理10 h时,各处理组孢外 $OD_{260\text{ nm}}$ 和 $OD_{280\text{ nm}}$ 上升至最高点,随后降低。结果说明,经3种药品处理后的细胞内容物泄漏量有差异,但这3种药品都可以诱导菌丝体物质代谢异常,从而抑制菌丝体生长。此结果与上述孢外电导率变化的结果相印证。

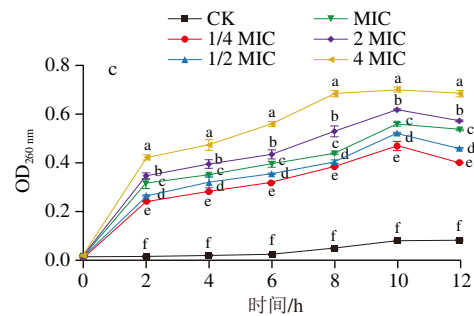
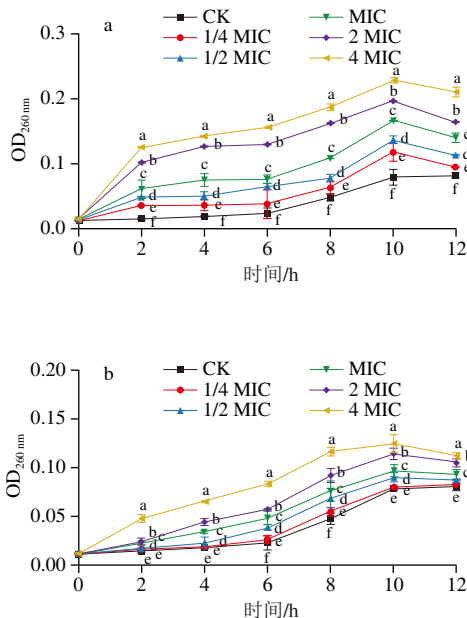


图6 CTS/CUR复合涂膜对灰葡萄孢霉菌胞外核酸含量的影响

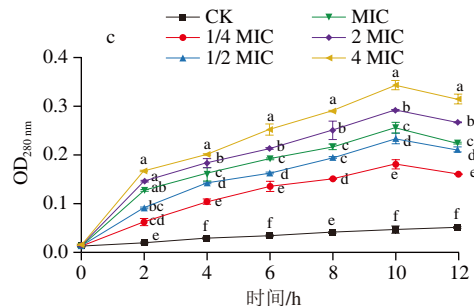
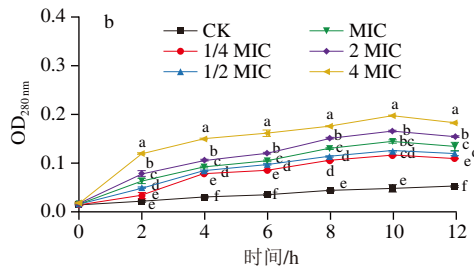
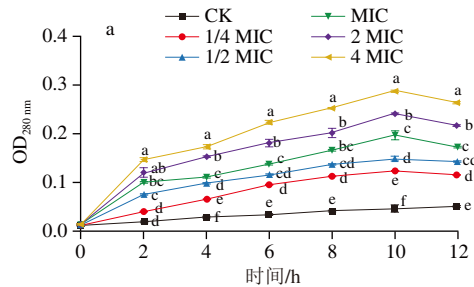
Fig. 6 Effect of CTS/CUR composite coating on extracellular nucleic acid content in *B. cinerea*

图7 CTS/CUR涂膜对灰葡萄孢霉菌胞外蛋白质含量的影响

Fig. 7 Effect of CTS/CUR composite coating on extracellular protein content in *B. cinerea*

### 2.8 樱桃番茄的抑菌实验分析结果

从图8可以看出,未作处理组中灰葡萄孢霉菌迅速感染樱桃番茄,使其表面产生菌丝体。第6天时,对照组有明显的白色菌丝生成,药品处理组均发生部分感染,但程度不严重,随着贮藏时间的延长,对照组和药品处理组的灰霉病病斑进一步增大。第12天时2 MIC复合涂膜液处理组樱桃番茄未发现明显菌丝生长。在病斑直径和病情严重程度方面,药品处理组的感染程度均明显低于对照组,综上所述,复合涂膜液对灰葡萄孢霉菌具有良好的抑制作用,并且对樱桃番茄有保鲜效果。





图8 CTS/CUR涂膜对接种灰葡萄孢霉菌的樱桃番茄的影响

Fig. 8 Effect of CTS/CUR composite coating on the visual appearance of cherry tomatoes inoculated with *B. cinerea*

### 3 讨论与结论

樱桃番茄营养丰富、味道可口,具有保持皮肤健康、解毒抗衰、促进血液循环、降低血压血脂、缓解疲劳和精神压力等多重功效,深受消费者的喜爱<sup>[24]</sup>。但其在贮运期间易受到灰葡萄孢霉菌的感染,造成巨大的经济损失,霉菌毒素还会危害人体健康<sup>[25]</sup>。研究表明,壳聚糖处理显著减少了在樱桃番茄上真菌腐烂现象的发生,并且随着壳聚糖分子质量的降低,抗真菌活性增加<sup>[26]</sup>。Youssef等<sup>[27]</sup>研究表明,使用壳聚糖制造的复合材料降低了接种果实的灰霉病发生率和严重程度,在处理后的灰芽孢杆菌菌丝/孢子中观察到形态和内部结构损伤,细胞空泡化和细胞质紊乱。本研究发现,比例为1:1的CTS/CUR复合涂膜溶液能够有效抑制樱桃番茄采后灰葡萄孢霉菌丝生长和孢子萌发,且抑菌活性随着浓度的升高而加大。这些结果说明CTS/CUR复合涂膜对灰霉有直接的抑制作用,这与Guerra等<sup>[28]</sup>的研究结果相似。Mujtaba等<sup>[29]</sup>研究表明,壳聚糖复合涂膜处理通过最大限度地减少质量损失和真菌变质,保持了樱桃的采后品质。在本研究中,CTS/CUR复合涂膜显著抑制了樱桃番茄灰霉病斑的扩大。相同浓度条件下,单一的CTS溶液对灰葡萄孢霉菌的菌丝生长和孢子萌发抑制作用优于单一的CUR溶液,这说明灰葡萄孢霉菌对CTS更敏感。这可能是因为壳聚糖是自然界中唯一的氨基多糖,是带阳离子的天然聚合物,与微生物细胞膜表面的阴离子通过静电相互作用,破坏了细胞膜的完整性,导致胞内物质泄漏,造成细胞代谢紊乱,致使细胞死亡<sup>[30]</sup>。

微生物细胞膜是细胞非常重要的组成结构之一,当其被破坏时,细胞能量与信息传递会被扰乱,随后微生物死亡。Xing Ke等<sup>[31]</sup>报道壳聚糖可以破坏*Ceratocystis fimbriata*细胞膜的完整性,并在PI染色过程中发出明显的荧光。Li Wang等<sup>[32]</sup>研究表明,对香豆酸乙酯破坏了*Alternaria alternata*细胞膜的完整性和通透性,并导致电解质泄漏,增加了MDA含量。本研究为了进一步揭示CTS/CUR复合涂膜对灰霉细胞膜的影响,分析了菌丝电导率、核酸和蛋白质泄漏量以及菌丝形态的变化。与对照组相比,处理组的菌丝电导变化率、OD<sub>260 nm</sub>和OD<sub>280 nm</sub>均显著升高,且上升趋势与处理浓度呈正相关。这表明CTS/CUR复合涂膜处理破坏了灰霉的细胞膜。PI染色结果也显示,用CTS/CUR复合涂膜处理的菌丝比对照样品具有更强的红色荧光。此外,这些影响均呈剂量依赖性。说明菌丝的膜完整性受到破坏,原因可能是CTS/CUR复合涂膜处理引起的脂质过氧化,最终导致细胞膜的破裂。MDA是细胞膜中脂质过氧化的主要产物之一<sup>[33]</sup>,经CTS/CUR复合涂膜处理后,灰霉菌中存在大量的MDA积累。这证实了CTS/CUR复合涂膜处理可以破坏细胞膜的完整性。扫描电镜结果进一步表明,CTS/CUR复合涂膜溶液处理后的灰葡萄孢霉菌的菌丝发生了明显的皱缩和变形。因此,CTS/CUR复合涂膜溶液对灰葡萄孢霉菌的抑菌作用可能与破坏细胞膜相关,最终使细胞死亡。

本研究探讨了CTS/CUR复合涂膜溶液处理对樱桃番茄采后病原真菌灰葡萄孢霉菌的抑制作用和抑制机理。结果表明,CTS/CUR复合涂膜溶液处理抑制了菌丝的

生长和孢子的萌发, MIC为140.625  $\mu\text{g/mL}$ 。复合涂膜处理还对灰葡萄孢霉菌的菌丝形态造成影响, 细胞破损, 内容物大量泄漏。在樱桃番茄果体上, 复合涂膜抑制了灰葡萄孢霉菌病斑的扩大, 抑制效果与溶液浓度呈正相关。综上所述, CTS/CUR复合涂膜溶液可以有效地控制灰葡萄孢霉菌侵染引起的樱桃番茄腐烂, 为涂膜保鲜技术在樱桃番茄采后病害防治的应用提供一定帮助, 可应用于樱桃番茄的采后贮藏保鲜领域中。

## 参考文献:

- [1] GRECO M, PATRIARCA A, TERMINIELLO L, et al. Toxigenic *Alternaria* species from Argentinean blueberries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 154(3): 187-191. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.004.
- [2] GARCIN M, VACHARD D. Découverte d'Hermelles fossiles dans le Messiniense San Miguel de Salinas (Annélides du Miocène supérieur du Sud-Est de l'Espagne)[J]. Geobios, 1987, 20(3): 407-414. DOI:10.1016/S0016-6995(87)80050-5.
- [3] YU Y W, LIU K Y, ZHANG S Y, et al. Characterizations of water-soluble chitosan/curdlan edible coatings and the inhibitory effect on postharvest pathogenic fungi[J]. Foods, 2024, 13(3): 441. DOI:10.3390/foods13030441.
- [4] LAROCHE C, MICHAUD P. New developments and prospective applications for  $\beta$ -(1,3) glucans[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2007, 1(1): 59-73. DOI:10.2174/187220807779813938.
- [5] 姜放文, 赵若冰, 赵金瑶, 等. 可得然胶与瓜尔豆胶的复配特性及其在酸奶中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(4): 23-32. DOI:10.19804/j.issn1006-2513.2023.04.003.
- [6] 郭瑞, 朱丹, 宋静雅, 等. 可食性复合涂膜对滑子菇采后贮藏品质的影响[J]. 现代食品科技, 2018, 34(2): 149-156. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.024.
- [7] 张蓓, 段小明, 冯叙桥, 等. 果蔬复合涂膜保鲜的研究现状与发展趋势分析[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(4): 125-132.
- [8] CHEN K, TIAN R M, XU G J, et al. Characterizations of konjac glucomannan/curdlan edible coatings and the preservation effect on cherry tomatoes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 232: 123359. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2023.123359.
- [9] ROBLEDO N, VERA P, LÓPEZ L, et al. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes[J]. Food Chemistry, 2018, 246: 211-219. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.11.032.
- [10] 查中萍, 万正煌, 苏醒, 等. 英山黄花草叶枯病的病原鉴定及室内药效研究[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(8): 51-54. DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2018.08.013.
- [11] 张苗苗, 柯媛, 董同琨, 等. 亮寡糖对腐败真菌的抑菌活性及其机理[J]. 中国食品学报, 2023, 23(6): 71-80. DOI:10.16429/j.1009-7848.2023.06.009.
- [12] ZHANG J, WU X, ZHANG S Q. Antifungal mechanism of antibacterial peptide, ABP-CM4, from *Bombyx mori* against *Aspergillus niger*[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(12): 2157-2163. DOI:10.1007/s10529-008-9819-x.
- [13] YU S N, ZHEN C Y, ZHAO P Y, et al. Antifungal mechanisms of  $\gamma$ -aminobutyric acid against the postharvest pathogen *Alternaria alternata*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2023, 173: 114314. DOI:10.1016/j.lwt.2022.114314.
- [14] LIU R L, ZHANG L P, XIAO S Y, et al. Ursolic acid, the main component of blueberry cuticular wax, inhibits *Botrytis cinerea* growth by damaging cell membrane integrity[J]. Food Chemistry, 2023, 415: 135753. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.135753.
- [15] LI S W, YU Y W, XIE P, et al. Antifungal activities of *L*-methionine and *L*-arginine treatment *in vitro* and *in vivo* against *Botrytis cinerea*[J]. Microorganisms, 2024, 12(2): 360. DOI:10.3390/microorganisms12020360.
- [16] 王婧, 翟伟卜, 高环, 等. 链格孢引起的病害严重危害农作物生产并危及农产品安全[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 9-15. DOI:10.3969/j.issn.0529-1542.2017.04.002.
- [17] KONG J, ZHANG Y, JU J, et al. Antifungal effects of thymol and salicylic acid on cell membrane and mitochondria of *Rhizopus stolonifer* and their application in postharvest preservation of tomatoes[J]. Food Chemistry, 2019, 285: 380-388. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.099.
- [18] GUO J H, XU Y, LIANG S Y, et al. Antifungal activity of volatile compounds from *Bacillus tequilensis* XK29 against *Botrytis cinerea* causing gray mold on cherry tomatoes[J]. Postharvest Biology and Technology, 2023, 198: 112239. DOI:10.1016/j.postharvbio.2022.112239.
- [19] 王小佳. 蛋氨酸处理对冬枣采后抗病作用机制的研究[D]. 太原: 山西师范大学, 2022.
- [20] LI W Z, LONG Y H, YIN X H, et al. Antifungal activity and mechanism of tetracycline against *Alternaria alternata*, the soft rot causing fungi in kiwifruit[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2023, 192: 105409. DOI:10.1016/j.pestbp.2023.105409.
- [21] 葛达娥, 魏照辉, 图尔苏阿依·图尔贡, 等. 丁香酚对蓝莓链格孢霉的抑制作用[J]. 食品科学, 2020, 41(19): 68-73. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190909-112.
- [22] RITTER A, GOULITQUER S, SALAÜN J P, et al. Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*[J]. New Phytologist, 2008, 180(4): 809-821. DOI:10.1111/j.1469-8137.2008.02626.x.
- [23] KOHANSKI M A, DWYER D J, COLLINS J J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8(6): 423-435. DOI:10.1038/nrmicro2333.
- [24] VATS S, BANSAL R, RANA N, et al. Unexplored nutritive potential of tomato to combat global malnutrition[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(4): 1003-1034. DOI:10.1080/10408398.2020.1832954.
- [25] YANG X M, WANG Y T, JIANG H Y, et al. Antimicrobial peptide CB-M exhibits direct antifungal activity against *Botrytis cinerea* and induces disease resistance to gray mold in cherry tomato fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2023, 196: 112184. DOI:10.1016/j.postharvbio.2022.112184.
- [26] BADAWY M E I, RABEA E I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 51(1): 110-117. DOI:10.1016/j.postharvbio.2008.05.018.
- [27] YOUSSEF K, ROBERTO S R. Chitosan/silica nanocomposite-based formulation alleviated gray mold through stimulation of the antioxidant system in table grapes[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 168: 242-250. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.047.
- [28] GUERRA I C D, DE OLIVEIRA P D L, SANTOS M M F, et al. The effects of composite coatings containing chitosan and *Mentha (piperita L. or  $\times$  villosa Huds)* essential oil on postharvest mold occurrence and quality of table grape cv. Isabella[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 34: 112-121. DOI:10.1016/j.ifset.2016.01.008.
- [29] MUJTABA M, ALI Q, YILMAZ B A, et al. Understanding the effects of chitosan, chia mucilage, levan based composite coatings on the shelf life of sweet cherry[J]. Food Chemistry, 2023, 416: 135816. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.135816.
- [30] BRODNJAK U V. Experimental investigation of novel curdlan/chitosan coatings on packaging paper[J]. Progress in Organic Coatings, 2017, 112: 86-92. DOI:10.1016/j.porgcoat.2017.06.030.
- [31] XING K, XING Y, LIU Y F, et al. Fungicidal effect of chitosan via inducing membrane disturbance against *Ceratocystis fimbriata*[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 192: 95-103. DOI:10.1016/j.carbpol.2018.03.053.
- [32] LI W S, YUAN S Z, SUN J, et al. Ethyl *p*-coumarate exerts antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against fruit *Alternaria alternata* via membrane-targeted mechanism[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 278: 26-35. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.024.
- [33] LAFLAMME P, BENHAMOU N, BUSSIÈRES G, et al. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries[J]. Canadian Journal of Botany, 2000, 77(10): 1460-1468. DOI:10.1139/b99-111.