

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2024.05.020

雷雨晴, 张海洋, 祁智慧, 等. 紫外联合冷等离子体对玉米真菌灭活及毒素降解效果初探[J]. 粮油食品科技, 2024, 32(5): 160-168.

LEI Y Q, ZHANG H Y, QI Z H, et al. Preliminary study on effects of maize fungal inactivation and degradation of mycotoxins by ultraviolet combined with cold plasma[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2024, 32(5): 160-168.

# 紫外联合冷等离子体对玉米真菌 灭活及毒素降解效果初探

雷雨晴<sup>1,2</sup>, 张海洋<sup>1,2</sup>, 祁智慧<sup>1,2</sup>, 谢迪麟<sup>3</sup>, 田琳<sup>1,2</sup>, 李金东<sup>1,4</sup>, 唐芳<sup>1,2</sup>✉

1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮食储运研究所, 北京 100037;
2. 粮食储运国家工程研究中心, 北京 100037;
3. 北京中和锦程科技有限公司, 北京 100083;
4. 河南工业大学 粮食物资和储备学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 用紫外联合冷等离子体处理对黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、谢氏曲霉 (*Aspergillus chevalieri*) 孢子灭活效果、机制以及对黄曲霉毒素 (AFs)、呕吐毒素 (DON) 降解效果进行探究, 结果表明, 紫外联合冷等离子体处理 80 s 时使两种真菌孢子完全灭活, 并对细胞膜及细胞核造成损伤, 处理 600 s 时可灭活 70% 以上玉米粒携带的两种真菌。降解真菌毒素方面, 处理标准品 600 s 时 DON 和黄曲霉毒素 B 族降解率分别超过 60% 和 50%, 黄曲霉毒素 G 族降解率小于 50%; 玉米粒携带的两种毒素需要较长时间降解, 处理 20 min 时 DON 降解率为 36.41%, 但 AFs 降解率不超过 30%。紫外联合冷等离子体处理在真菌孢子灭活及真菌毒素降解上有一定应用前景。

**关键词:** UVC 紫外; 冷等离子体; 真菌孢子灭活; 灭活机制; 真菌毒素降解

中图分类号: TS210.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2024)05-0160-09

网络首发时间: 2024-08-29 09:49:53

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20240828.1459.009>

## Preliminary Study on Effects of Maize Fungal Inactivation and Degradation of Mycotoxins by Ultraviolet Combined with Cold Plasma

LEI Yu-qing<sup>1,2</sup>, ZHANG Hai-yang<sup>1,2</sup>, QI Zhi-hui<sup>1,2</sup>, XIE Di-lin<sup>3</sup>,  
TIAN Lin<sup>1,2</sup>, LI Jin-dong<sup>1,4</sup>, TANG Fang<sup>1,2</sup>✉

1. Institute of Grain Storage and Logistics, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China; 2. National Engineering Research Center of Grain Storage and Logistics, Beijing 100037, China; 3. Beijing Zhonghejincheng Technology Co., Ltd., Beijing 100083, China; 4. School of Food and Strategic Reserves, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China)

**Abstract:** A preliminary study was conducted on the inactivation effects and mechanisms of spore inactivation

收稿日期: 2024-02-04

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JY2402)

Supported by: Fundamental Research Funds of the Central Research Institutes (No. JY2402)

作者简介: 雷雨晴, 女, 1996 年出生, 硕士, 研究实习员, 研究方向为真菌毒素降解, E-mail: lyq@ags.ac.cn

通信作者: 唐芳, 女, 1978 年出生, 硕士, 副研究员, 研究方向粮食微生物, E-mail: tf@ags.ac.cn

of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus chevalieri* spores, as well as the degradation of aflatoxins (AFs) and deoxynivalenol (DON) by ultraviolet combined with cold plasma. The results showed that ultraviolet combined with cold plasma could completely inactivate the two kinds of fungal spores and cause damage to cell membrane and nucleus when treated for 80 s. More than 70% of the two fungi carried by maize kernels were inactivated at 600 s. In terms of degradation of mycotoxins, the degradation rate of standard DON and aflatoxin B group exceeded 60% and 50% respectively at 600 s, and aflatoxin G group was less than 50%. However, toxins carried by maize kernels took longer time to degrade. The degradation rate of DON after 20 minutes of treatment was 36.41%, but the degradation rate of AFS did not exceed 30%. The use of ultraviolet combined with cold plasma treatment shows potential for the inactivation of fungal spores and the degradation of fungal toxins.

**Key words:** UVC light; cold plasma; fungal spores inactivation; inactivation mechanism; mycotoxin degradation

粮食安全一直是我国重点关注的领域，粮食霉变和毒素污染是影响粮食安全的主要因素。玉米是我国三大主粮之一，是重要的储备粮和饲料加工主要来源之一，在干燥前因含有较高水分而易滋生霉菌，进而易导致真菌毒素污染，存在食品安全隐患。曲霉属在储藏玉米真菌中有很高分离频率<sup>[1]</sup>，其中黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 产生的黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFs) 有强烈的致癌性，能导致儿童生长发育迟缓、影响免疫系统<sup>[2]</sup>。除 AFs 外，玉米被呕吐毒素 (Deoxynivalenol, DON) 污染的情况也很普遍，DON 具有肝毒性、肾毒性、神经毒性、免疫毒性，DON 引发的呕吐反应可能影响人体电解质平衡<sup>[3]</sup>，这些真菌毒素严重威胁着人体健康。抑制产毒真菌的生长是阻断真菌毒素产生的主要手段，对已出现的真菌毒素进行降解也是必要措施，因此找到一种能同时灭活真菌、降解真菌毒素的技术应用于玉米采收后、储藏前能够大大提高储藏玉米的安全性。

紫外辐照是一项常规杀菌技术，尤其短波段 (UVC, 200~280 nm) 紫外光对生物体有极强伤害性<sup>[4]</sup>，UVC 也被证实对真菌毒素有降解效果<sup>[5]</sup>。等离子体是含有平衡电荷的电离气体，温度低于 60 °C 的等离子体被称为冷等离子体，在微生物灭活、真菌毒素降解方面均有研究应用<sup>[6]</sup>。冷等离子体的放电方式多样，其中电晕放电因使用针脚型电极而具有聚焦效应，能产生能量强、密度大的冷等离子体<sup>[7]</sup>。这两项技术均有环保、对食品品质影响小的特点。目前针对单项技术对真菌消杀和毒素降解的研究较多，而将两项技术耦合处

理的研究较少。

本研究使用的紫外联合冷等离子体设备是基于短波紫外辐照和电晕放电冷等离子体两种技术联合研制而成。选取玉米上两种常见曲霉黄曲霉、谢瓦曲霉 (*Aspergillus chevalieri*)，和两种常见真菌毒素 AFs、DON 作为主要研究对象，旨在探究该紫外联合冷等离子体设备对真菌孢子灭活和真菌毒素降解效果，并对该设备灭活真菌孢子机理进行初探，为设备的参数优化及产业化应用提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黄曲霉菌株、谢瓦曲霉菌株：国家粮食和物资储备局科学研究院微生物实验室分离鉴定和保藏；玉米籽粒：地方粮库提供；马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar, PDA)、高盐察氏琼脂培养基 (Salt czapek dox agar, SCA)：北京陆桥技术股份有限公司；磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffered saline, PBS)、碘化丙啶 (Propidium iodine, PI)：北京索莱宝科技有限公司；无水乙醇 (分析纯)：国药集团化学试剂有限公司；4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI)：江苏凯基生物技术股份有限公司；甲醇、乙腈 (色谱纯)：北京伊诺凯科技有限公司；去离子水；呕吐毒素标准品、黄曲霉毒素混合标准溶液 (其中 AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 含量为 10 μg/mL, AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 含量为 3 μg/mL)、呕吐毒素免疫亲和柱、黄曲霉毒素 BG 族总量免疫

亲和柱：购于北京中检维康生物技术有限公司。

## 1.2 仪器与设备

紫外联合冷等离子体设备：北京中和锦程科技有限公司；MLS-3781L-PC 高压蒸汽灭菌器：日本三洋电机公司；HERAsafe KS12 生物安全柜、Evolution 220 紫外可见分光光度计：美国赛默飞世尔科技公司；BMJ-250C 霉菌培养箱：上海博迅医疗生物仪器股份有限公司；Axio scope A1 科研级生物显微镜：德国蔡司公司；LC-10AT VP Plus 液相色谱仪：日本岛津公司；cytoflex 双激光流式细胞仪：美国贝克曼库尔特有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 紫外联合冷等离子体设备

紫外联合冷等离子体设备由高压电源、尖端电极、孔板电极、紫外灯、样品槽组成，工作电压 20 kV，工作电流 500  $\mu$ A，紫外灯波长 253.7 nm，辐照强度 1.2 W/m<sup>2</sup>，样品槽距紫外灯管 12.5 cm。设备基本构造如图 1 所示，通电后紫外灯亮起，电极尖端放电，电离空气产生冷等离子体。本设备可以实现紫外辐照、冷等离子体的单独作用，及两种技术的联合作用。开始实验前设备预热 30 min。

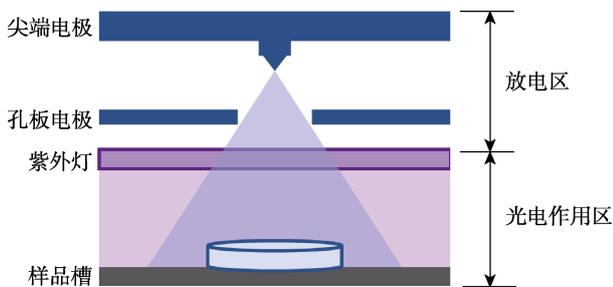


图 1 紫外联合冷等离子体设备示意图

Fig.1 Schematic diagram of the ultraviolet combined with cold plasma equipment

### 1.3.2 真菌孢子灭活

无菌接种环挑取纯种黄曲霉、谢瓦曲霉孢子加入无菌 PBS 溶液，适当稀释后参照 LS/T 6132—2018《储粮真菌的检测 孢子计数法》检测孢子数，控制孢子悬浮液浓度约  $2.5 \times 10^5$  CFU/mL，取 10  $\mu$ L 涂于无菌培养皿底部，置于超净工作台自然风干后，分别进行单独紫外、单独冷等离子体及紫外联合冷等离子体处理，处理 20、40、60、80 s 后用 2 mL 无菌 PBS 溶液将孢子洗脱至培养

皿内，黄曲霉孢子、谢瓦曲霉孢子分别加入 15~30 mL 提前灭菌的 50  $^{\circ}$ C PDA、SCA 培养基，凝固后在 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 5~7 d，计数。灭活率按式 (1) 计算：

$$\text{灭活率} = \frac{N_0 - N}{N_0} \times 100\% \quad \text{式 (1)}$$

式中： $N_0$  为未处理真菌菌落数， $N$  为处理后真菌菌落数，单位均为 CFU。

### 1.3.3 细胞膜通透性检测

调整黄曲霉、谢瓦曲霉孢子悬浮液浓度至  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL，取 1 mL 于无菌培养皿中，分别使用单独紫外、单独冷等离子体及紫外联合冷等离子体处理 80 s 后，离心 (6 000 r/min, 10 min, 4  $^{\circ}$ C) 取上清液，分光光度计检测 OD<sub>260nm</sub>。

### 1.3.4 细胞膜完整性检测

取  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL 黄曲霉、谢瓦曲霉孢子悬浮液各 1 mL 于无菌培养皿中，分别使用单独紫外、单独冷等离子体及紫外联合冷等离子体处理 80 s 后，收集于离心管内，加入 5  $\mu$ L 质量浓度为 1 mg/mL 的 PI 染料，避光染色 30 min 后，流式细胞仪 PE 通道检测荧光强度。

### 1.3.5 细胞核损伤检测

参考王静等<sup>[8]</sup>的方法进行细胞核损伤检测，并稍作修改。将  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL 的黄曲霉、谢瓦曲霉孢子悬浮液分别使用单独紫外、单独冷等离子体及紫外联合冷等离子体处理 80 s 后，离心 (6 000 r/min, 10 min, 4  $^{\circ}$ C) 并重悬于 70% 乙醇，4  $^{\circ}$ C 固定 30 min，离心去除乙醇后加入终浓度为 10  $\mu$ g/mL 的 DAPI 染料，室温避光染色 30 min，PBS 冲洗 3 次后，制片，荧光显微镜观察。

### 1.3.6 基于原粮的真菌孢子灭活

取 20 g 自然状态下被真菌污染的玉米粒样品 (天然带菌量  $10^4$  CFU/g，主要优势菌为黄曲霉和谢瓦曲霉)，平铺于无菌培养皿底部，确保籽粒之间无重叠。紫外联合冷等离子体技术处理 40、120、600 s，处理到一半时间时翻面，确保均匀辐照。处理后样品参照 GB 4789.15—2016《食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》培养计算菌落数。灭活率按式 (2) 计算：

$$\text{灭活率} = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \times 100\% \quad \text{式 (2)}$$

式中： $N_1$  为未处理玉米真菌菌落数， $N_2$  为处理后玉米真菌菌落数，单位均为 CFU/g。

### 1.3.7 毒素标准品降解

分别配制黄曲霉毒素混合标准品溶液（含 AFB<sub>1</sub> 和 AFG<sub>1</sub>：200 ng/mL，含 AFB<sub>2</sub> 和 AFG<sub>2</sub>：60 ng/mL）和 10 000 ng/mL 呕吐毒素标准品溶液，取 100  $\mu$ L 于培养皿底部，置于通风橱中自然风干。紫外联合冷等离子体处理 40、60、80、180、300、600 s 后，用 3 mL 流动相复溶，收集至进样瓶中。黄曲霉毒素的检测参照 GB 5009.22—2016《食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》，呕吐毒素的检测参照 GB 5009.111—2016《食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》。降解率按式（3）计算：

$$\text{降解率} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad \text{式 (3)}$$

式中： $A_0$  为未处理毒素含量， $A$  为处理后毒素含量，单位均为 ng/mL。

### 1.3.8 基于原粮的毒素降解

分别将黄曲霉毒素混合标准品溶液（控制含量 AFB<sub>1</sub> 和 AFG<sub>1</sub>：20  $\mu$ g/kg 样品，AFB<sub>2</sub> 和 AFG<sub>2</sub>：6  $\mu$ g/kg 样品）和呕吐毒素标准品溶液（控制含量 1 000  $\mu$ g/kg 样品）喷洒至不含毒素的玉米粒上，通风橱中自然风干后取 20 g 玉米粒平铺于无菌培养皿底部，确保籽粒之间无重叠。紫外联合冷等离子体处理 2、10、20 min，处理到一半时间时翻面，确保均匀辐照。玉米粒磨粉后，参照 GB 5009.22—2016 和 GB 5009.111—2016，分别提取、

检测并计算黄曲霉毒素、呕吐毒素含量。降解率按式（4）计算：

$$\text{降解率} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad \text{式 (4)}$$

式中： $A_1$  为未处理玉米毒素含量， $A_2$  为处理后玉米毒素含量，单位均为  $\mu$ g/kg。

## 1.4 数据处理

每组实验做 3 次重复，Excel 2016 软件计算平均值和标准差，GraphPad Prism 9.0 软件进行 ANOVA 方差分析（ $P < 0.05$ ）并作图，数据均用平均值 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外联合冷等离子体对真菌孢子灭活效果及灭活机制

#### 2.1.1 不同处理技术对真菌孢子灭活效果

经不同技术处理后，黄曲霉和谢瓦曲霉孢子的灭活效果如表 1 所示，处理时间的延长能显著提高设备对两种真菌孢子的灭活率。本实验中，单独紫外比单独冷等离子体对两种真菌孢子的灭活作用更好，两种技术的联合处理可提高设备灭活效率，联合技术使得黄曲霉、谢瓦曲霉孢子分别在 20 s、80 s 达到完全灭活。紫外光能对微生物造成基因损伤，254 nm 左右为 DNA 的最大吸收波长，吸收后形成的胸腺嘧啶二聚体可以中断 DNA 的复制与转录，使得微生物失活<sup>[9]</sup>，实验结果显示经单独 253.7 nm 紫外光辐照 20 s 即可使两种真菌孢子灭活率达 70% 以上；冷等离子体可以

表 1 不同处理技术对真菌孢子的灭活率

Table 1 Inactivation rate of fungal spores by different processing techniques

菌种	处理技术	灭活率			
		处理 20 s	处理 40 s	处理 60 s	处理 80 s
黄曲霉	UV	74.00 $\pm$ 5.29 <sup>b</sup>	97.33 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	99.33 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	CP	32.41 $\pm$ 6.56 <sup>a</sup>	30.18 $\pm$ 9.45 <sup>a</sup>	19.51 $\pm$ 6.47 <sup>a</sup>	25.12 $\pm$ 3.58 <sup>a</sup>
	UV+CP	93.39 $\pm$ 3.58 <sup>b</sup>	98.62 $\pm$ 1.60 <sup>ab</sup>	98.77 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
谢瓦曲霉	UV	88.89 $\pm$ 5.99 <sup>b</sup>	98.69 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	99.35 $\pm$ 1.13 <sup>a</sup>	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
	CP	46.78 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	44.93 $\pm$ 3.54 <sup>a</sup>	40.38 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	41.00 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>
	UV+CP	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>			

注：UV 表示单独紫外处理，CP 表示单独冷等离子体处理，UV+CP 表示紫外联合冷等离子体处理，不同小写字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ），下同。

Note: UV means ultraviolet treatment, CP means cold plasma treatment, UV+CP means ultraviolet combined with cold plasma treatment. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ), the same below.

通过与脂质和多糖反应而破坏微生物的细胞壁和细胞膜,使得细胞内容物泄漏、细胞功能丧失,再进一步损伤蛋白质、DNA、RNA 等胞内大分子,从而达到灭活微生物的效果<sup>[10]</sup>,本研究中单独冷等离子体手段的孢子灭活率在不同时间处理时没有显著变化,可能是由于设备产生的冷等离子体处于开放空间而非密闭空间中,冷等离子体发生逸散使得效率降低,也可能是样品距离放电区较远使得冷等离子体作用不明显。紫外与冷等离子体两项技术灭活微生物时作用位点不同,或许是联合处理后因协同增效使得灭活效果优于单处理技术的原因。

### 2.1.2 不同处理技术对细胞膜的影响

2.1.2.1 细胞膜通透性变化 核酸在 OD<sub>260nm</sub> 处有强烈的紫外吸收,当微生物细胞膜被破坏后,胞内核酸会泄漏至胞外,此时通过检测细胞外液 OD<sub>260nm</sub> 可反映细胞膜通透性变化<sup>[11]</sup>。表 2 展示了 80 s 时不同处理技术对黄曲霉、谢瓦曲霉孢子 OD<sub>260nm</sub> 的影响,与对照组相比,单独紫外、紫外联合冷等离子体手段的吸光度增加,证明有核酸泄漏,两种真菌孢子细胞膜通透性增强。单独冷等离子体处理的 OD<sub>260nm</sub> 与对照组相比没有显著

差异,但与紫外协同处理时能增加单处理技术的核酸泄漏量,说明联合处理能在一定程度上增强对细胞膜的损伤。

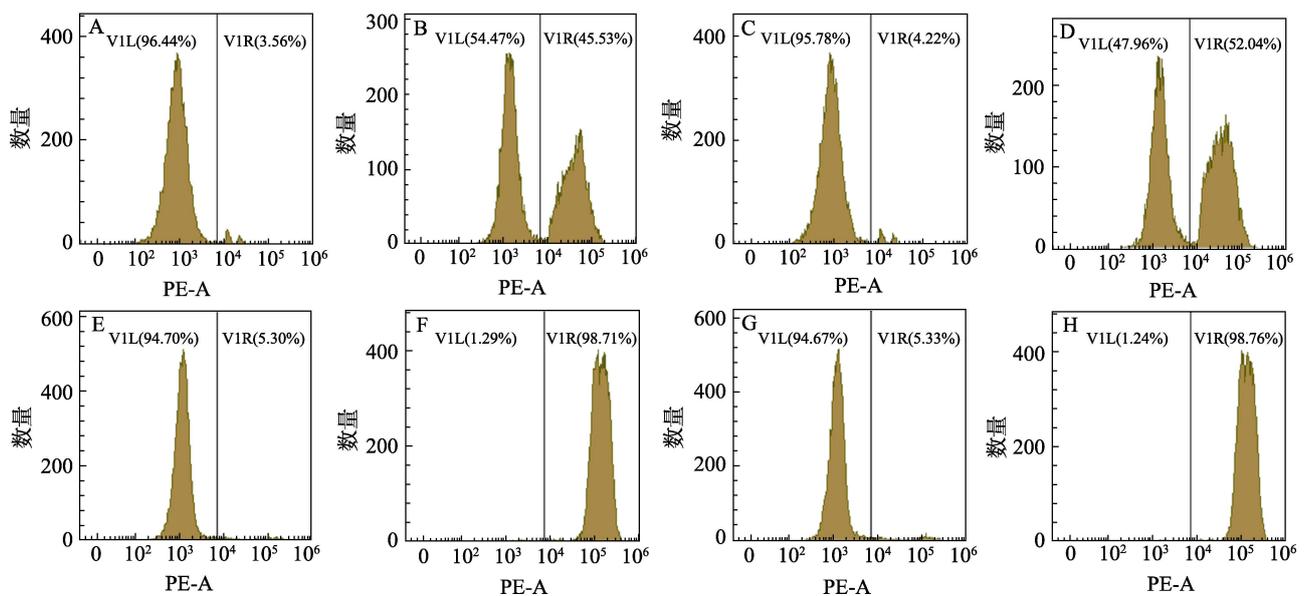
表 2 不同处理技术对真菌孢子的紫外 260 nm 吸光度的影响  
Table 2 Effects of different processing techniques on OD<sub>260nm</sub> of fungal spores

菌种	OD <sub>260nm</sub>			
	CK	UV	CP	UV+CP
黄曲霉	0.029±0.005 <sup>b</sup>	0.039±0.007 <sup>ab</sup>	0.027±0.007 <sup>b</sup>	0.046±0.005 <sup>a</sup>
谢瓦曲霉	0.005±0.001 <sup>ab</sup>	0.014±0.003 <sup>a</sup>	0.002±0.005 <sup>b</sup>	0.024±0.004 <sup>a</sup>

注: CK 表示对照组,下同。

Note: CK means control check, the same below.

2.1.2.2 细胞膜完整性变化 细胞膜完整时因具有选择透过性使得 PI 染料无法穿过细胞膜,但当膜受损时 PI 染料可以进入细胞与 DNA 结合发出红色荧光<sup>[12]</sup>,此时检测荧光强度可以反映细胞膜损伤情况。图 2 展示了不同处理技术处理 80 s 后两种真菌孢子的 PI 染色情况,未经处理时几乎没有细胞被染色,对于黄曲霉孢子,单独紫外、紫外联合冷等离子体处理后分别有 45.53%、52.04%的细胞被染色;对于谢瓦曲霉孢子,单独紫外及紫外联合冷等离子体处理均可使 98%以上的细胞呈红色荧光;两种孢子在单独冷等



注: A: 黄曲霉 CK; B: 黄曲霉 UV 处理; C: 黄曲霉 CP 处理; D: 黄曲霉 UV+CP 处理; E: 谢瓦曲霉 CK; F: 谢瓦曲霉 UV 处理; G: 谢瓦曲霉 CP 处理; H: 谢瓦曲霉 UV+CP 处理。

Note: A: *Aspergillus flavus* CK, B: *Aspergillus flavus* with UV treatment, C: *Aspergillus flavus* with CP treatment, D: *Aspergillus flavus* with UV+CP treatment, E: *Aspergillus chevalieri* CK, F: *Aspergillus chevalieri* with UV treatment, G: *Aspergillus chevalieri* with CP treatment, H: *Aspergillus chevalieri* with UV+CP treatment.

图 2 不同处理技术处理后真菌孢子的 PI 染色情况

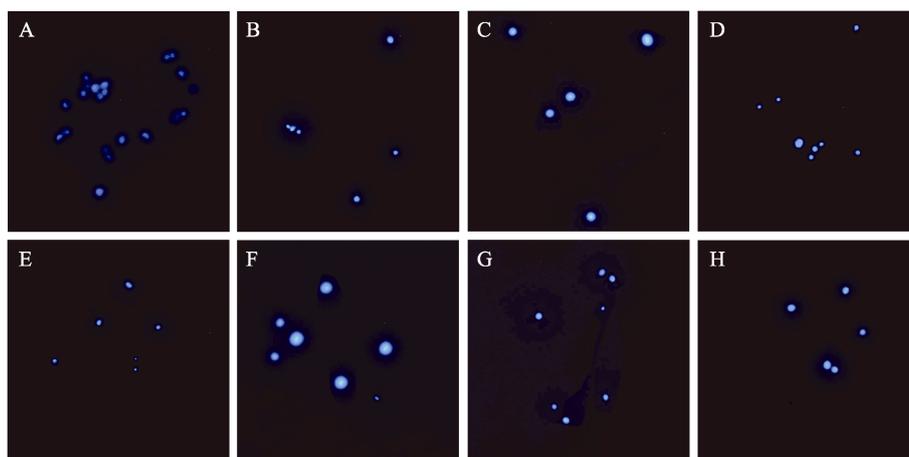
Fig.2 PI staining of fungal spores after treatment with different processing techniques

离子体处理后均未被 PI 染色, 证明没有出现膜的损伤, 可能是本实验所用设备冷等离子体放电区距离样品较远, 且处理时间较短, 导致冷等离子体处理尚未达到破坏细胞膜的程度。结果显示, 单独紫外和紫外联合冷等离子体手段均能导致细胞膜损伤, 且联合处理能提升单处理技术的效果, 这些情况与前文结果一致。

### 2.1.3 不同处理技术对细胞核的影响

DAPI 自身荧光较弱, 但能通过 DNA 结合

发出强烈荧光, 是检测细胞核的常用染料<sup>[13]</sup>。细胞凋亡时, DNA 会出现集聚、损伤等现象, 通过观察 DAPI 染色后荧光信号强弱及分布, 可以反映细胞凋亡发生与否<sup>[14]</sup>。如图 3 所示, 对照组的黄曲霉及谢瓦曲霉孢子蓝色荧光较弱, 而经过不同处理技术处理后的孢子均出现了明显荧光反应, 说明细胞核受到影响, 可能是 DNA 受损, 由此推测单独紫外、单独冷等离子体、紫外联合冷等离子体手段均能损伤细胞核, 导致细胞凋亡。



注: A: 黄曲霉 CK; B: 黄曲霉 UV 处理; C: 黄曲霉 CP 处理; D: 黄曲霉 UV+CP 处理; E: 谢瓦曲霉 CK; F: 谢瓦曲霉 UV 处理; G: 谢瓦曲霉 CP 处理; H: 谢瓦曲霉 UV+CP 处理。

Note: A: *Aspergillus flavus* CK, B: *Aspergillus flavus* with UV treatment, C: *Aspergillus flavus* with CP treatment, D: *Aspergillus flavus* with UV+CP treatment, E: *Aspergillus chevalieri* CK, F: *Aspergillus chevalieri* with UV treatment, G: *Aspergillus chevalieri* with CP treatment, H: *Aspergillus chevalieri* with UV+CP treatment.

图 3 不同处理技术处理后真菌孢子的 DAPI 染色情况

Fig.3 DAPI staining of fungal spores after treatment with different processing techniques

## 2.2 紫外联合冷等离子体对玉米上真菌孢灭活效果

玉米在生长、收获、运输、储藏等环节都有可能被真菌侵染, 其表面或内部都能成为真菌的寄生位点。表 3 展示了紫外联合冷等离子体处理对玉米粒上天然寄生的黄曲霉、谢瓦曲霉孢子的灭活情况, 随处理时间的延长, 两种孢子的灭活率显著增加, 处理至 600 s 时灭活率可达 70%。与 2.1.1 结果相比, 玉米上天然寄生的真菌孢子比纯种真菌孢子灭活所需时间更长, 可能是 UVC 紫外 (穿透深度约 1  $\mu\text{m}$ ) 和冷等离子体 (穿透深度可达 10  $\mu\text{m}$ ) 两种技术穿透力有限<sup>[15]</sup>, 因此对微生物的灭活多作用于粮食表面, 而玉米粒有立体结构, 其表面的凹陷及胚等部分都有可能潜藏真菌孢子, 使灭活难度加大。紫外辐照通常需要

较长时间才能完成对微生物的灭活, Udovicki 等<sup>[16]</sup>使用带振动流化床的 UVC 紫外消毒设备处理玉米样品, 在最长处理时间和最大辐照强度的条件下 (45 min, 31  $\text{W}/\text{m}^2$ ), 黄曲霉菌才能实现超过 2 log (CFU/g) 的减少; Scholtz 等<sup>[17]</sup>总结前人研究结果后提出了一个适用于等离子体的一般结论, 即等离子体对丝状真菌的完全灭活通常需要 20~30 min, 灭活效率取决于真菌的种类、等离子体源及具体处理条件。由此可见, 本实验中紫外联

表 3 紫外联合冷等离子体对玉米粒上真菌孢子的灭活率

Table 3 Inactivation rate of fungal spores on maize kernels by ultraviolet combined with cold plasma %

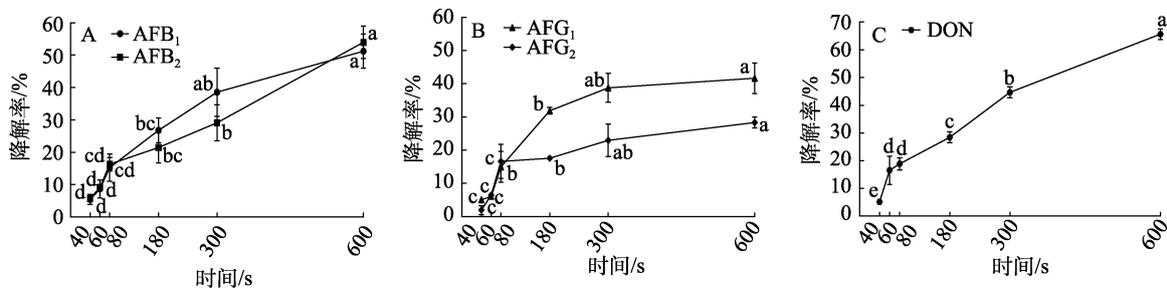
菌种	灭活率		
	处理 40 s	处理 120 s	处理 600 s
黄曲霉	21.74 $\pm$ 5.75 <sup>c</sup>	46.20 $\pm$ 9.62 <sup>b</sup>	71.74 $\pm$ 7.78 <sup>a</sup>
谢瓦曲霉	34.70 $\pm$ 7.94 <sup>b</sup>	44.03 $\pm$ 1.58 <sup>b</sup>	70.34 $\pm$ 7.40 <sup>a</sup>

合冷等离子体处理对玉米上真菌孢子的灭活效率较高。

### 2.3 紫外联合冷等离子体对真菌毒素降解效果

紫外联合冷等离子体处理对 AFs、DON 标准品有一定降解效果, 结果如图 4 所示, 处理 80 s 内, 所有毒素的降解率均不超过 20%; 处理时间的延长能够显著增加降解效果, 600 s 时 DON 和黄曲霉毒素 B 族降解率分别超过 60% 和 50%, 但黄曲霉毒素 G 族降解率低于 50%, 其中 AFG<sub>2</sub> 的降解率低于 30%。紫外对毒素有光降解作用, 可以作用于毒素分子中低能量可断裂键 (C—O 和 N—H) [18], Patras 等 [19] 认为紫外光诱发的 ·OH 自由基是导致 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub> 和 AFG<sub>1</sub> 光解的原因。

而活性物质被认为是冷等离子体能够降解真菌毒素的主要作用因子, 能与质子溶剂相互作用, 导致独特的物理化学修饰 [20], 对于 AFB<sub>1</sub>, 冷等离子体处理能够使得 C8=C9 双键断裂, 发生加成或氧化反应, 进而呋喃环裂解开环, 将毒素降解为毒性更小的分子 [21-22]; 对于 DON, 冷等离子体处理可能导致 C-12,13 环氧环裂解、C9=C10 位双键发生加成反应, 从而降解毒素 [23]。另外, AFB<sub>1</sub> 和 AFG<sub>1</sub> 因在 C8-C9 位置存在双键, 因此分别比 AFB<sub>2</sub> 和 AFG<sub>2</sub> 更易被降解, 黄曲霉毒素分子的降解从易到难排序为 AFB<sub>1</sub>>AFG<sub>1</sub>>AFB<sub>2</sub>>AFG<sub>2</sub> [24-26], 与本实验结果基本相同。由此可见, 本实验中紫外联合冷等离子体技术具有降解真菌毒素的能力。



注: A: 黄曲霉毒素 B 族; B: 黄曲霉毒素 G 族; C: 呕吐毒素。不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

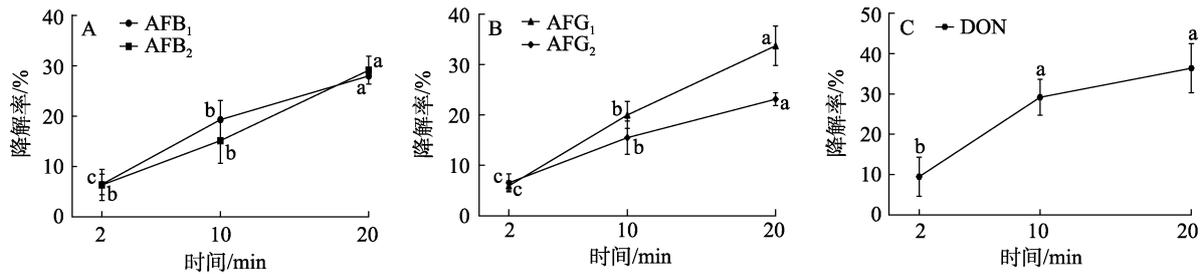
Note: A: aflatoxin B group, B: aflatoxin G group, C: deoxynivalenol. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ), the same below.

图 4 紫外联合冷等离子体对真菌毒素的降解率  
Fig.4 Degradation rate of mycotoxins by ultraviolet combined cold plasma

### 2.4 紫外联合冷等离子体对玉米上真菌毒素降解效果

玉米在自然生长和储藏过程中, 可能由于真菌的生长导致毒素污染, 本实验测试了紫外联合冷等离子体对玉米上人工喷洒 AFs、DON 的降解效果, 结果如图 5 所示。处理 2 min 内毒素降解率均不超过 10%, 但降解率随时间的延长显著增加, 20 min 后 AFB<sub>1</sub>、DON 降解率分别为 27.97%、36.41%。与 2.3 毒素标准品结果相比, 玉米上毒素降解率下降, 可能是玉米粒具有立体结构, 毒素因侵入玉米内部或是分布在不平整的表面使得降解难度加大。在单纯紫外光辐照下, 降解真菌毒素需要较长时间, Shen 和 Singh [27] 使用 2.3 mW/cm<sup>2</sup> UVC 处理 4 h 测得花生上 AFB<sub>1</sub> 降解率为 31.8%, 他们发现将花生不停旋转能够使得紫外光辐照更加均匀, 且增加 AFB<sub>1</sub> 降解率; 严雷雷等 [28] 使用紫外线灯处理被

DON 污染的小麦, 在辐照强度 20 W、处理 60 min、距离 5 cm 时, DON 降解率为 38.501%。对于单独冷等离子体处理, Puligundla 等 [29] 将 AFB<sub>1</sub> 分别添加到大米和小麦上, 经电晕放电等离子体射流处理 30 min 后降解率在 45%~56% 之间; 再程 [30] 使用辉光放电等离子体在最优条件 (时间 15 min, 功率 500 W, 真空度 40 Pa) 下处理玉米上 DON 降解率为 68.5%, 这些研究中降解效率与本实验不同, 可能是由于冷等离子体的发生有多种因素控制 (放电方式、载气成分、功率等), 使得等离子体活性成分、数量等有差异, 另外样品基质的不同也会影响降解率。总体来说, 本实验中紫外联合冷等离子体设备能够降解玉米上人工喷洒的真菌毒素, 但效率不高, 可以通过优化工艺参数、缩短处理距离、封闭处理空间、使用振动槽以提高粮食样品接触面积等方式对设备进行改造, 提高降解率。



注: A: 黄曲霉毒素 B 族; B: 黄曲霉毒素 G 族; C: 呕吐毒素。

Note: A: aflatoxin B group, B: aflatoxin G group, C: deoxynivalenol.

图 5 紫外联合冷等离子体对玉米粒上真菌毒素的降解率

Fig.5 Degradation rate of mycotoxins on maize kernels by ultraviolet combined cold plasma

### 3 结论

本文所用紫外联合冷等离子体设备对粮食主要危害真菌孢子灭活及真菌毒素降解均有一定作用。研究发现单独紫外、单独冷等离子体、紫外联合冷等离子体处理对黄曲霉、谢瓦曲霉孢子均有灭活作用,且联合处理能增强单处理技术的效果,灭活真菌孢子时能对细胞膜及细胞核造成损伤。将紫外联合冷等离子体技术作用于玉米粒样品时,相比于纯种孢子及毒素标准品,联合手段对玉米上的孢子灭活及毒素降解效率降低,600 s 时对玉米上黄曲霉、谢瓦曲霉孢子灭活率大于 70%,20 min 时对 AFs、DON 降解率均不超过 40%。后续可以通过优化工艺参数、缩短处理距离、封闭处理空间、变固定样品槽为振动槽等方式对设备进行改造,提高真菌孢子灭活及毒素降解效率。

### 参考文献:

- [1] 祁智慧,张海洋,田琳,等. 粮食真菌群落组成及多样性研究进展[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(5): 24-31.
- [2] BRADFORD K J, DAHAL P, ASBROUCK J V, et al. The dry chain: Reducing postharvest losses and improving food safety in humid climates[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 71: 84-93.
- [3] YAN P P, LIU Z Z, LIU S Q, et al. Natural occurrence of deoxynivalenol and its acetylated derivatives in Chinese maize and wheat collected in 2017[J]. Toxins, 2020, 12(3): 200.
- [4] LEE E S, PARK S Y, HA S D. Effect of UV-C light on the microbial and sensory quality of seasoned dried seafood[J]. Food Science and Technology International, 2016, 22(3): 213-220.
- [5] SHANAKHAT H, SORRENTINO A, RAIOLA A, et al. Technological properties of durum wheat semolina treated by heating and UV irradiation for reduction of mycotoxin content[J]. Journal of Food Process Engineering, 2019, 42(3): e13006.
- [6] 周煜,蔡瑞,岳田利,等. 低温等离子体在食品中杀灭微生物与降解真菌毒素研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(14): 209-218.
- [7] ZHOU Y, CAI R, YUE T L, et al. Research progress of cold plasma in killing microorganisms and degrading mycotoxins in food[J]. Food Research and Development, 2020, 41(14): 209-218.
- [8] SCALLY L, BEHAN S, CARVALHO A, et al. Diagnostics of a large volume pin-to-plate atmospheric plasma source for the study of plasma species interactions with cancer cell cultures[J]. Plasma Processes and Polymers, 2021, 18(6): e2000250.
- [9] 王静,张威,樊磊,等. 一株土壤来源的贝莱斯芽孢杆菌抑制黄曲霉生长机理研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2023, 44(1): 68-74.
- [10] WANG J, ZHANG W, FAN L, et al. Inhibition mechanism of a soil-derived *Bacillus velezensis* strain on *Aspergillus flavus* growth[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2023, 44(1): 68-74.
- [11] DENG L Z, MUJUMDAR A S, PAN Z L, et al. Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: a comprehensive review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(15): 2481-2508.
- [12] DENG L Z, TAO Y, MUJUMDAR A S, et al. Recent advances in non-thermal decontamination technologies for microorganisms and mycotoxins in low-moisture foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 106: 104-112.
- [13] 王向阳,卢进彬,潘炎,等. 水溶性壳聚糖对 3 种微生物的抑制作用差异[J]. 中国食品学报, 2021, 21(11): 53-61.
- [14] WANG X Y, LU J B, PAN Y, et al. Difference of inhibition effects of water soluble chitosan on three kinds of microorganisms[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(11): 53-61.
- [15] TANMAYEE S, KAVITA, BIBHUTI B M, et al. Detection of

- gamma radiation processed onion during storage using propidium iodide based fluorescence microscopy[J]. Food Chemistry, 2023, 398: 133928.
- [13] LIU K X, LIN S F, ZHU S Q, et al. Hyperspectral microscopy combined with DAPI staining for the identification of hepatic carcinoma cells[J]. Biomedical Optics Express, 2021, 12(1): 173-180.
- [14] 高梦月, 华子春. 细胞凋亡检测技术: 进展及应用[J]. 药学学报, 2023, 58(8): 2059-2069.  
GAO M Y, HUA Z C. Methods of apoptosis detection: advances and applications[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2023, 58(8): 2059-2069.
- [15] ZHOU D, WANG Z, TU S, et al. Effects of cold plasma, UV-C or aqueous ozone treatment on *Botrytis cinerea* and their potential application in preserving blueberry[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(1): 175-185.
- [16] UDOVICKI B, STANKOVIC S, TOMIC N, et al. Evaluation of ultraviolet irradiation effects on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B<sub>1</sub> in maize and peanut using innovative vibrating decontamination equipment[J]. Food Control, 2022, 134: 108691.
- [17] SCHOLTZ V, PAZLAROVA J, SOUSKOVA H, et al. Nonthermal plasma-A tool for decontamination and disinfection[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1108-1119.
- [18] POPOVIĆ V, FAIRBANKS N, PIERSCIANOWSKI J, et al. Feasibility of 3D UV-C treatment to reduce fungal growth and mycotoxin loads on maize and wheat kernels[J]. Mycotoxin Research, 2018, 34(3): 211-221.
- [19] PATRAS A, JULAKANTI S, YANNAM S, et al. Effect of UV irradiation on aflatoxin reduction: a cytotoxicity evaluation study using human hepatoma cell line[J]. Mycotoxin Research, 2017, 33: 343-350.
- [20] HOJNIK N, MODIC M, WALSH J L, et al. Unravelling the pathways of air plasma induced aflatoxin B<sub>1</sub> degradation and detoxification[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 403: 123593.
- [21] SHI H, COOPER B, STROSHINE R L, et al. Structures of degradation products and degradation pathways of aflatoxin B<sub>1</sub> by high-voltage atmospheric cold plasma (HVACP) treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(30): 6222-6230.
- [22] WIELOGORSKA E, AHMED Y, MENEELY J, et al. A holistic study to understand the detoxification of mycotoxins in maize and impact on its molecular integrity using cold atmospheric plasma treatment[J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125281.
- [23] CHEN X L, QIU Y, ZHANG J Y, et al. Degradation efficiency and products of deoxynivalenol treated by cold plasma and its application in wheat[J]. Food Control, 2022, 136: 108874.
- [24] NGUYEN T, FLINT S, PALMER J. Control of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by novel methods: A review[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125984.
- [25] SICILIANO I, SPADARO D, PRELLE A, et al. Use of cold atmospheric plasma to detoxify hazelnuts from aflatoxins[J]. Toxins, 2016, 8(5): 125.
- [26] MCKENZIE K S, SARR A B, MAYURA K, et al. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone[J]. Food and Chemical Toxicology, 1997, 35: 807-820.
- [27] SHEN M H, SINGH R K. Effect of rotating peanuts on aflatoxin detoxification by ultraviolet C light and irradiation uniformity evaluated by AgCl-based dosimeter[J]. Food Control, 2021, 120: 107533.
- [28] 严雷雷, 万忠民, 马倩婷, 等. 紫外线处理对小麦中呕吐毒素降解的研究[J]. 粮食储藏, 2020, 49(3): 35-39.  
YAN L L, WAN Z M, MA Q T, et al. Study on degradation of DON in wheat by ultraviolet treatment[J]. Grain Storage, 2020, 49(3): 35-39.
- [29] PULIGUNDLA P, LEE T, MOK C. Effect of corona discharge plasma jet treatment on the degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> on glass slides and in spiked food commodities[J]. LWT-Food Science & Technology, 2020, 124: 108333.
- [30] 冉程. 农户储粮仓玉米霉变试验分析及等离子体对真菌毒素的降解研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022: 64.  
RAN C. Experimental analysis of mycotoxins in maize from farmers' grain storage silos and study of mycotoxin degradation by plasma[D]. Changchun: Jilin University, 2022: 64. 完
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。