

## 酸性电解水对低温条件下单增李斯特菌杀灭效果

梁凡, 杜明, 潘迎捷, 刘海泉, 赵勇

### Inactivation effect of acidic electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* under low temperature conditions

LIANG Fan, DU Ming, PAN Yingjie, LIU Haiquan, ZHAO Yong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503439>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

##### [超高压对单增李斯特菌生物被膜形成的影响](#)

Effects of ultra-high pressure (UHP) processing on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*

上海海洋大学学报. 2017, 26(2): 294 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160401731>

##### [不同培养条件下sigB对单增李斯特菌生物被膜形成的影响](#)

Effects of sigB on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* under various culture conditions

上海海洋大学学报. 2016, 25(4): 634 <https://doi.org/10.12024/jsou.20151201610>

##### [酸性电解水通过抑制总菌及特定腐败菌保鲜南美白对虾的研究](#)

Acidic electrolyzed water improving the quality of *Litopenaeus vannamei* by inhibiting the total bacteria and specific spoilage microorganisms

上海海洋大学学报. 2018, 27(4): 616 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180502319>

##### [高通量基因芯片在压载水中检测致病菌的应用](#)

High-throughput DNA microarray used for pathogens detection in the ballast water

上海海洋大学学报. 2018, 27(3): 431 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180310010>

##### [应用酸性电解水联合超声波杀灭副溶血性弧菌](#)

Combination of acidic electrolyzed water with ultrasonic for killing *Vibrio parahaemolyticus*

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 578 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190402604>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1570-12

DOI:10.12024/jsou.20210503439

## 酸性电解水对低温条件下单增李斯特菌杀灭效果

梁 凡<sup>1</sup>, 杜 明<sup>2</sup>, 潘迎捷<sup>1,3,4</sup>, 刘海泉<sup>1,3,4,5</sup>, 赵 勇<sup>1,3,4</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 大连工业大学 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁 大连 116034; 3. 上海水产品加工贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 4. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 5. 上海海洋大学 食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306)

**摘 要:** 单增李斯特菌是能在低温下生长的一种微生物。冷藏即食食品和冷冻食品加工设备中单增李斯特菌的生长是主要的食品安全问题。酸性电解水(AEW)是一种新型高效、安全且无残留的非热灭菌技术。AEW用于灭活4℃条件下的浮游态、生物膜态及冷藏金针菇样品上单增李斯特菌。通过检测AEW处理前后菌落总数变化、生物被膜、生物被膜结构参数以及毒力基因表达,进一步分析样品实验等。结果表明,当电解质NaCl浓度为0.10%,处理时间为1min、30min时,4℃和37℃下的单增李斯特菌菌落总数、生物被膜清除率存在极显著差异,相同处理时间,AEW较难杀灭4℃条件下的单增李斯特菌及难清除其生物被膜,本研究为评估冷链中食品和冷藏食品及食品加工设备的安全性提供了新的理论基础,对冷藏食品使用抗菌剂提出更高要求。

**关键词:** 冷冻冷藏食品; 低温微生物; 单增李斯特菌; 酸性电解水

**中图分类号:** TS 201.3 **文献标志码:** A

单增李斯特菌是革兰氏阳性食源性病原菌,与人类疾病有关。孕妇、胎儿、老年人和免疫力低下的人最易受感染,这些人在感染后可能会遭受很高的死亡率(10%~40%)<sup>[1]</sup>。重要的是,单增李斯特菌对与食品生产、加工和储存相关的各种压力条件具有抵抗力。例如,它可以在高盐度(10%)、低温(4℃)、低水分活度(<0.9)和广泛的pH范围(4.1~9.6)<sup>[2]</sup>下生长,食品的生产 and 储存环境为单增李斯特菌提供了广泛的栖息地,其也可以在食品的不同阶段进行加工,并在加工现场形成生物被膜。李斯特菌病的发生主要是由于食用了被单增李斯特菌污染的食物,其可能会污染各种食品<sup>[3]</sup>,包括即食产品、蘑菇、水产品、肉和肉类产品以及冷冻食品<sup>[4]</sup>。随着经济的改善和生活节奏的加快,冷冻和冷藏食品因其便利性和明显的高营养价值而受到消费者的青睐<sup>[5]</sup>,不仅可以最大程度地保持食物的质地、风

味和营养价值、成本低廉,而且可以抑制微生物的生长和繁殖<sup>[6]</sup>。尽管它是目前最好的保存方法之一,但它没有有效的杀菌作用,因此对人类健康构成更大的风险<sup>[7-8]</sup>。这些发现强调了冷冻冷藏并不会对食品进行灭菌的事实。例如,2019年的新型冠状病毒COVID-19可以在冷藏和冷冻食品中检测到,当冷藏温度为4℃时,它具有很高的稳定性,并且有望在2℃以下保持传染性<sup>[9]</sup>。因此,冷冻食品并非绝对安全,且不能直接食用<sup>[10]</sup>。

已有研究评估了酸性电解水(AEW)的作用,该抑菌剂具有低pH、高氧化还原电位(ORP)和高有效氯(ACC)<sup>[11]</sup>,是一种新型、高效、安全且无残留的杀菌剂,具有广谱活性。另外,它生产方便,使用简单,可作为一种实用的消毒方法。AEW在食品加工、医学和临床科学以及农业生产领域可能具有非常重要的潜在应用价值<sup>[12]</sup>。然

收稿日期: 2021-05-11 修回日期: 2021-08-10

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602205);上海市科学技术委员会上海市“科技创新行动计划”农业领域项目(19391901600);上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056)

作者简介: 梁 凡(1993—),女,硕士研究生,研究方向为食品微生物。E-mail:1003417684@qq.com

通信作者: 赵 勇,E-mail:yzhao@shou.edu.cn

而该技术在冷藏食品中有害嗜冷微生物方面的应用却鲜有报道。

目前冷冻食品卫生管理的研究主要集中在控制 25 ℃ 以及 37 ℃ 下微生物的生长情况。此外,大多数研究人员在短时间内使用冷模拟来检查微生物的生长<sup>[13]</sup>,却忽略了冷冻食品被长期运输和储存的事实,这为有害细菌的生长提供了足够的时间,增加了食品污染的风险<sup>[14]</sup>,并且在食品工业中引起极大关注。已有研究表明,酸性电解水对 37 ℃ 培养条件下副溶血性弧菌<sup>[15]</sup>、大肠杆菌、单增李斯特菌等<sup>[16]</sup>有较强的杀菌效果,而酸性电解水对 4 ℃ 条件下的单增李斯特菌灭活作用及其机制尚不清楚,对其生物被膜的清除效果少有报道。因此,本研究将系统探究酸性电解水对低温条件下单增李斯特菌、生物被膜及其冷藏金针菇上单增李斯特菌的抗菌效果,从而为酸性电解水杀菌技术在冷藏食品中应用提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 酸性电解水的制备

酸性电解水的制备方法参照文献[11],酸性电解水由不同浓度的电解质电解得到,将 0.05%、0.10% 的 NaCl 盐溶液倒入酸性电解水电解槽中。本实验使用电解水制备仪(FW-200,日本)制备不同理化特性电解水,所需要的 NaCl 溶液浓度参照本实验室实验数据。电解水制备仪具有二槽隔膜式电解槽,电解过程在电解槽中完成,最终在阳极生成具有氧化能力的酸性电解水(acidic electrolyzed water, AEW),及在阴极生成具有还原能力的碱性电解水(basic electrolyzed water, BEW)。本试验中电解条件设置为电解时间 15 min、电流强度 10 A<sup>[11,17]</sup>,制备获得的电解水 pH 和 ORP 值使用 pH/ORP 测量仪表进行测量。电解水中的有效氯浓度(ACC)运用数字化有效氯测定仪(MHY-145446 型手持式有效氯测定仪,北京美华仪科技有限公司)进行测定。

### 1.2 菌株的制备

本实验采用的单增李斯特菌株 4bLM(从生猪肉中分离得到)和标株 ATCC19115。菌株(保存在 25% 甘油,温度为 -80 ℃)在 37 ℃ 的 PALCAM 培养板上传代培养 36~48 h。取形态大小单菌落在试管(18 mm × 18 mm)中以 200 r/

min(4 ℃、37 ℃)的速度进行摇动培养。所有培养好后得到的悬浮液分别收集在 50 mL 试管中,然后离心。将获得细菌细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤并重新悬浮,得到细菌细胞 ~8 log CFU/mL,作为母液进行试验。

### 1.3 悬液定量抑菌试验

应用电解水制备仪将一定的 NaCl 溶液电解制备出所需要的电解水,电解水的电解时间为 15 min,电流强度为 10 A。细菌悬液按照上述方式培养后得到 ~8 log CFU/mL。将制备好的 AEW 和菌液(4 ℃、37 ℃)以体积比 1:1 进行混合处理一定时间后,再加入与电解水同容量终止液(0.8% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液)终止 AEW 的处理。

### 1.4 生物被膜的形成

研究其生物被膜的形成,将 10 μL 单增李斯特菌液(OD<sub>600</sub> = 0.4)接种到 990 μL 新鲜的 BHI 培养基中,然后吸附到 24 聚苯乙烯微量滴定孔板中,孔板中也含有未接种菌液的 BHI 作为空白对照。然后将 24 孔板放在 37 ℃ 下静态孵育 48 h 以形成被膜,并使用保鲜膜将孔板密封以最大程度减少蒸发损失。然后使用 1 × 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)轻轻冲洗孔板 3 次,并在室温(25 ℃)下用 1 000 μL 的 0.1% 结晶紫(生工,上海,中国)染色 30 min,用 PBS 洗涤除去过量的结晶紫,并将其重悬浮于 95% 乙醇中。通过测量相应的 OD<sub>600 nm</sub> 对生物被膜进行定量。

### 1.5 酸性电解水处理对胞外聚合物的影响

被膜培养后,用超声破壁法提取胞外聚合物(EPS)。被膜培养后,吸取孔板中悬浮液 200 μL,其 OD<sub>595 nm</sub> 检测浓度,去除多余悬浮液,用 PBS 清洗 3 次。AEW 处理以后,每孔加入 1 mL 0.01 mol/L 的 KCl 溶液,再进行多次吹打,使孔板底部被膜加速溶解,收集到 1.5 mL 离心管中,然后进行超声破壁处理(超声处理参数:每次超声 5 s,超声处理 6 个循环,每个循环之间间隔 5 s),处理结束后,4 ℃ 条件下离心 20 min,转速 4 000 g,再使用 0.22 μm 的滤膜将离心后的液体进行过滤,转移到新的 1.5 mL 的离心管中。生理盐水处理为对照组。

苯酚-硫酸法测定胞外多糖:上述过滤好的液体取出 100 μL 至 1.5 mL 离心管,加入 200 μL 99.9% 的浓硫酸(AR),在室温下静置 30 min 后加入 25 μL 6% 的苯酚,放于 90 ℃ 金属浴中 5

min, 然后测定其  $OD_{490\text{ nm}}, OD_{490\text{ nm}}/OD_{595\text{ nm}}$  即为所测样品中的胞外多糖含量。Lowry 法测定胞外蛋白: 上述过滤好的液体取出 40  $\mu\text{L}$  至 1.5 mL 离心管, 加入 200  $\mu\text{L}$  Lowry reagent 试剂, 室温静置 10 min, 然后加入 20  $\mu\text{L}$  福林-酚试剂, 室温放置 30 min, 测定  $OD_{750\text{ nm}}$ , 计算出蛋白泄露量。

### 1.6 共聚焦显微镜 (CLSM)

生物被膜的预处理用于显微镜分析参照 FOLSOM 等<sup>[18]</sup>。使用 CLMS 机器 (LSM710, 德国) 捕获并采集所有显微图像。40 $\times$  物镜用于监测在 488 nm 激发并在 500 ~ 550 nm 发射的 SYBR

Green I 荧光。通过 ISA-2 软件从三维 CLSM 图像中提取生物膜结构的定量参数 (生物体积, 均质性, 质地熵, 表面粗糙度)。对于每个样品, 随机获取载玻片上 9 个不同位置的代表性图像。

### 1.7 q-PCR

q-PCR 的循环次数: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 引物延伸, 72  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 秒, 共 35 个循环, 每个循环延伸步骤后检测荧光产物。根据 RT-qPCR 数据, 分析相应基因的表达 (表 1)。

表 1 寡核苷酸引物序列

Tab. 1 Sequences of oligonucleotide primers

基因 Gene	引物名 Primer	序列 Sequences	扩增子 Amplicon/bp
<i>gap</i>	<i>gap</i> -F	GAACCTGGAACACGTTGAGCA	140
	<i>gap</i> -R	TCCAAAAGGTGACTTCCGTC	
<i>inlA</i>	<i>inlA</i> -F	ATAGGCACATTGGCGAGTTT	160
	<i>inlA</i> -R	GTGCGGTAAACCTGCTAGG	
<i>agrA</i>	<i>agrA</i> -F	CGGCTACTTGCCTGTA TGAA	149
	<i>agrA</i> -R	TGAA TAGTTGGCGCTGTCTC	
<i>degU</i>	<i>degU</i> -F	GGCGCGTATATTCA TCCAC	150
	<i>degU</i> -R	TACCTCGCACTCTCTA TGCG	
<i>actA</i>	<i>actA</i> -F	AGAAATCATCCGGGAAACAG	147
	<i>actA</i> -R	CCTCTCCCGTTCAACTCTTC	
<i>sufU</i>	<i>sufU</i> -F	TTCAGAAA TGGTGCAAGGTC	135
	<i>sufU</i> -R	A TCGCTCTCTCCA TTGCTTT	
<i>sigB</i>	<i>sigB</i> -F	TGGTGTACACGGAAGAAGAAG	135
	<i>sigB</i> -R	TCCGTACCACCAACAACATC	
<i>sufS</i>	<i>sufS</i> -F	GAA TTTGGCGGAGAAA TGAT	137
	<i>sufS</i> -R	TCTGCCAAGTAA TCAA TCGC	
<i>itrC</i>	<i>itrC</i> -F	TACGGCGTCGA TGAGA TACT	144
	<i>itrC</i> -R	GAA TGTGTGAACGGCGA TAC	
<i>prfA</i>	<i>prfA</i> -F	CAAAATTTACCATGGGCCAA	287
	<i>prfA</i> -R	AAGGTATGCGGTAGCCTGTT	
<i>flaA</i>	<i>flaA</i> -F	GTAAGCA TCCAAGCGTCTGA	148
	<i>flaA</i> -R	AAGAATCAGCA TCAGCAACG	

### 1.8 酸性电解水杀灭冷藏金针菇上单增李斯特菌研究

将样品随机分成 3 个等份, 并在 4  $^{\circ}\text{C}$  下储存。样品的感官、生物化学和微生物评估在第 0、1、2、3、4、5、6、7 和 9 天进行。每个实验进行 3 次重复。金针菇接种约 6.5 log CFU/mL 单增李斯特菌。使用色差仪对每份样品选取 3 个不同地方进行测量, 取其平均值。

### 1.9 数据处理

实验结果为 3 次重复的平均值, 实验数据表示为平均值  $\pm$  标准差。使用 SPSS 17.0 (SPSS

Inc., Chicago, IL), 使用单向方差分析比较值差异,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

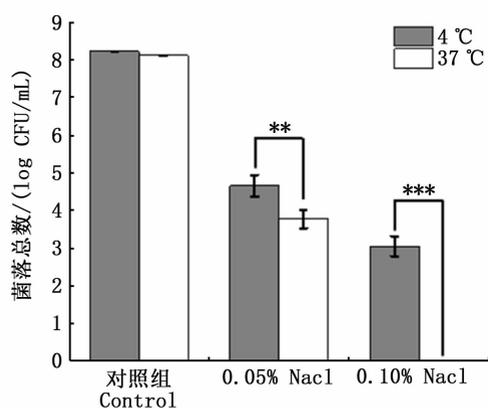
### 2.1 酸性电解水对低温条件下的浮游单增李斯特菌的杀菌效果

单增李斯特菌 2 组温度阴性对照组的菌落总数大约为 8.2 log CFU/mL, 2 种温度培养的单增李斯特菌, 仅处理 1 min 或增加电解质 NaCl 浓度 (0.10%), 菌落总数产生显著变化。电解质 NaCl 浓度为 0.05% 时, 用浓度为 0.10% 的 NaCl

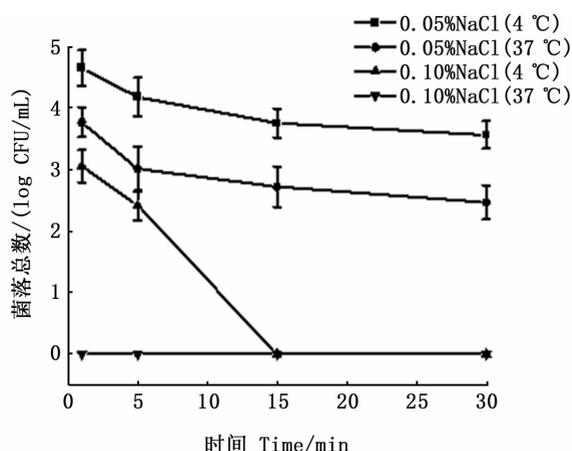
灭活处理 37 °C 条件下的单增李斯特菌 1 min 时,在平板上检测不到任何菌落。然而同样处理条件,4 °C 条件下的单增李斯特菌的菌落总数仅下降至 3.06 log CFU/mL。见图 1a。

与阴性对照组相比,当用 0.05% NaCl 的酸性电解水,杀灭 4 °C 条件下的单增李斯特菌,处理时间从 1 min 增加到 15 min 后,单增李斯特菌的菌落总数分别减少至 4.65 log CFU/mL、4.18 log CFU/mL、3.76 log CFU/mL,当处理时间增加到 30 min,菌落总数减少至 3.36 log CFU/mL。当用 0.10% NaCl 的酸性电解水,处理时间从 1 min 增加至 5 min,单增李斯特菌的菌落总数分别

减少 3.06、2.41 log CFU/mL,当处理时间为 15 min 时,在平板上已经检测不到菌落(图 1b)。低浓度 0.05% NaCl 的酸性电解水在处理 37 °C 条件下的单增李斯特菌,出现类似的趋势,处理时间从 1 min 延长至 30 min,菌落总数分别为 3.77、3.01、2.72、2.47 log CFU/mL。但是当浓度为 0.10% NaCl 时,处理时间仅 1 min,在平板上则无法检测到菌落。因此酸性电解水对 37 °C 条件下的单增李斯特菌灭活表现较好的抑菌效果,但相同处理条件时,对 4 °C 条件下的单增李斯特菌抑菌效果不显著。见图 1b。



(a) 不同浓度 AEW 处理 1 min  
Different concentration of  
AEW treatment for 1 min



(b) 不同处理时间  
Different treatment time

柱状图上方含“\*”代表差异显著。\* . $P < 0.05$ ; \*\* . $P < 0.01$ ; \*\*\* . $P < 0.001$ 。

The “\*” above the histogram shows significant difference. \* . $P < 0.05$ ; \*\* . $P < 0.01$ ; \*\*\* . $P < 0.001$ .

图 1 不同浓度电解质 NaCl 对不同温度的单增李斯特菌的杀菌效果

Fig. 1 Sterilization effect of different concentrations of AEW on *L. monocytogenes* under different temperature

## 2.2 酸性电解水对单增李斯特菌生物被膜清除效果

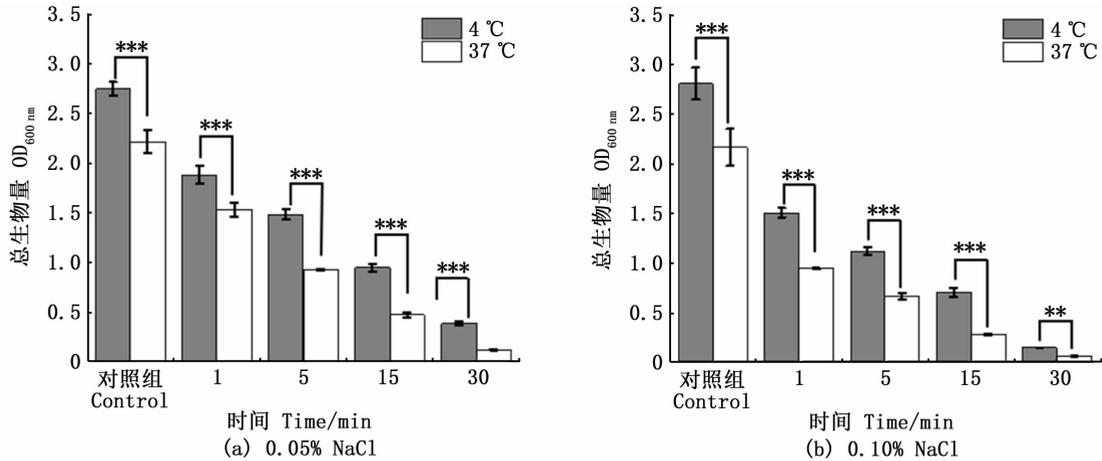
利用结晶紫染色法检测了不同温度条件的单增李斯特菌生物被膜量。当 NaCl 浓度为 0.05% (图 2a) 时,阴性对照组已经出现显著性差异,处理时间为 1 min 时,4 °C、37 °C 条件下单增李斯特菌生物被膜总生物量分别降低 31.44%、30.83%,有显著性差异,时间从 5 min 增加至 30 min,其生物被膜总生物量分别降低 45.84%、65.22%、85.66% (58.00%、78.36%、94.06%)。此外当 NaCl 浓度为 0.10% (图 2b) 时,酸性电解水清除单增李斯特菌生物被膜的试验中也得到了类似的结果,时间为 30 min 时,37 °C 条件下的生物被膜总生物量下降了 97.46%,几乎被清除,而 4 °C 条件下的单增李斯特菌生物

被膜总生物量下降了 85.66%。

在 4 °C 条件下的单增李斯特菌菌株抵抗 ACC 的能力与生物被膜产生的胞外多糖的数量可能比生物被膜所含细胞的数量更紧密相关<sup>[19]</sup>。在低温环境中,低温细菌会合成几种低温保护性化合物,例如细胞外多糖,它们可以改变分子的微观结构,促进表面黏附、细胞聚集和生物膜形成。细菌胞外聚合物在生物被膜结构的稳定性中起着重要作用,并且对生物被膜细菌具有很强的保护作用,导致食品交叉污染和其他危害<sup>[20]</sup>。为了进一步研究 AEW 对生物被膜的破坏,我们探讨了 AEW 对细胞外聚合物中细胞外多糖和细胞外蛋白质含量的影响,采用苯酚-硫酸法测定生物被膜胞外多糖的相对表达量,Lowry 法测定胞外蛋白。图 3 显示了单增李斯特菌的生物被膜

经 AEW 处理后细胞外多糖和细胞外蛋白质含量的变化,与 37 °C 相比,在 4 °C 条件下培养的单增李斯特菌的胞外多糖和细胞外蛋白质明显增多。

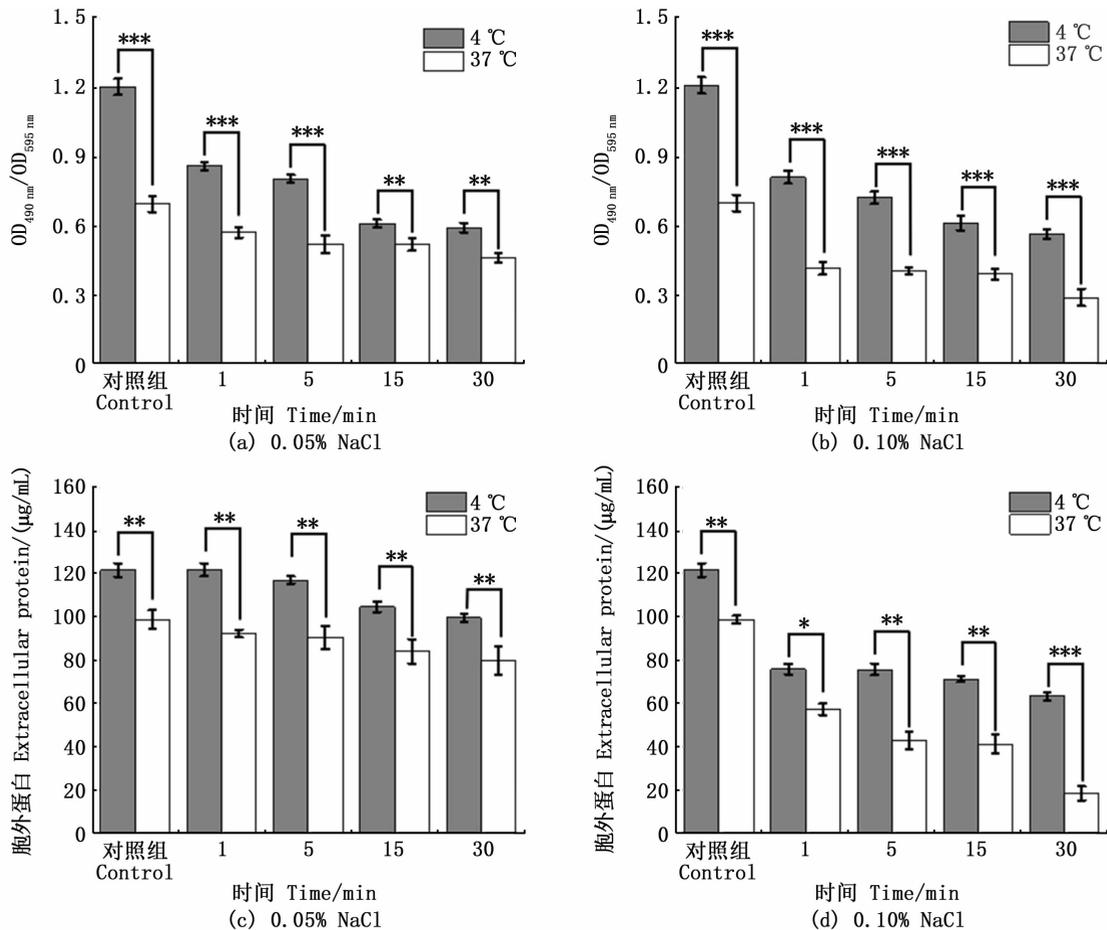
经过不同浓度 AEW 处理后,37 °C 条件的胞外多糖和胞外蛋白质减少量更多。



柱状图上方含“\*”代表差异显著。\* .*P* < 0.05; \*\* .*P* < 0.01; \*\*\* .*P* < 0.001。  
The “\*” above the histogram shows significant difference. \* .*P* < 0.05; \*\* .*P* < 0.01; \*\*\* .*P* < 0.001.

图 2 酸性电解水对单增李斯特菌生物被膜的清除影响

Fig. 2 Effect of AEW on the removal of *L. monocytogenes* biofilms



柱状图上方含“\*”代表差异显著。\* .*P* < 0.05; \*\* .*P* < 0.01; \*\*\* .*P* < 0.001。  
The “\*” above the histogram shows significant difference. \* .*P* < 0.05; \*\* .*P* < 0.01; \*\*\* .*P* < 0.001.

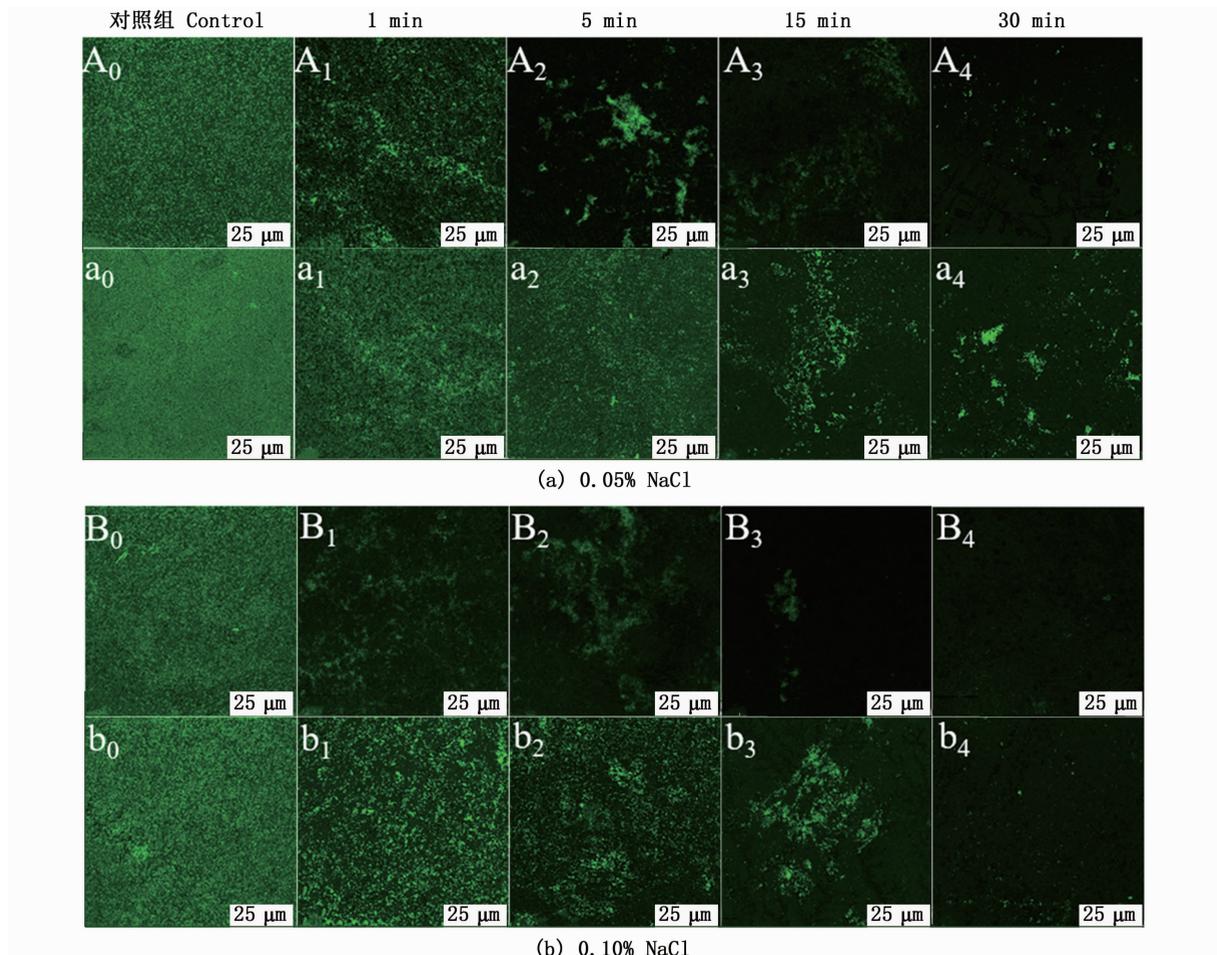
图 3 酸性电解水处理对生物被膜胞外聚合物 EPS 的影响

Fig. 3 Effect of acidic electrolyzed water treatment on EPS of biofilms

在此基础上,进一步通过 CLSM 表征酸性电解水对低温条件下的单增李斯特菌被膜的清除效果,结果如图 4 所示。未处理组 2 组温度条件的单增李斯特菌都呈现出紧凑且密集分布,且 4 °C 条件下单增李斯特菌呈现更密集。当 NaCl 浓度分别为 0.05% 和 0.10%,处理时间为 1 min 时,两组温度条件之间呈现明显差异。随着处理时间从 1 min 增加到 30 min,生物被膜的数量和稀疏度大大降低(图 4)。

表 2 定量分析表明,AEW 处理 1 min、5 min、15 min 及 30 min 后,生物膜体积分别为  $1.6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  和  $5.3 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、 $5.5 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  和  $4.6 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、 $5.0 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  和  $1.0 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ 、 $4.5 \times 10^5 \mu\text{m}^3$  和  $6.6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ 。同质性通常用于衡量细胞簇的相似性。同质性越高,表明簇结构越均匀<sup>[21]</sup>。如表 2 所示,经 AEW 处理的生物被膜的

同质性得到了显著改善。通常,同质性的数量随着细胞簇数量的减少而增加<sup>[22]</sup>。基于此,我们得出结论,AEW 处理可以消除 37 °C 条件下培养的大量单增李斯特菌。4 °C 条件下单增李斯特菌展现较强的活性,在 AEW 处理之后,TE 值分别从 7.35、6.29 显著降低至 5.53、5.39。通常认为,结构熵值越高,生物膜的异质性越强。因此,我们推测表 2 中的 TE 值降低可能是由于生物膜异质性降低。粗糙度是生物膜厚度变化的量度。随着 AEW 处理时间的增加,生物膜的粗糙度显著增加( $P < 0.05$ ),这与生物膜同质性的变化一致<sup>[23]</sup>。但是,观察到两组膜的粗糙度存在显著差异。在 4 °C 形成的生物膜上培养的单增李斯特菌比 37 °C 下培养的单增李斯特菌更光滑。这表明相比于 37 °C 条件,在 4 °C 下生物被膜结构没有受到严重破坏,表 3 定量分析结果亦是如此。



A<sub>0</sub>-A<sub>4</sub>、B<sub>0</sub>-B<sub>4</sub>. 37 °C; a<sub>0</sub>-a<sub>4</sub>、b<sub>0</sub>-b<sub>4</sub>. 4 °C。

图 4 酸性电解水处理不同温度条件下的单增李斯特菌的 CLSM 图像  
Fig. 4 CLSM images of *L. monocytogenes* treated with AEW at concentrations of 0.05% NaCl (a) and 0.10% NaCl (b) at different temperature

表 2 0.05%NaCl 酸性电解水处理单增李斯特菌生物被膜结构参数变化

Tab.2 Changes in structural parameters of *L. monocytogenes* biofilms treated with acidic electrolyzed water of 0.05% NaCl

时间 Time/ min	生物体积 Bio-volume/ $\mu\text{m}^3$		结构熵 Textural Entropy		同质性 Homogeneity		粗糙度 Biofilm Roughness	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
1	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^6$	$(5.3 \pm 0.5) \times 10^5$ <sup>a</sup>	$7.35 \pm 0.18$ <sup>a</sup>	$6.29 \pm 0.36$ <sup>a</sup>	$0.15 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$0.22 \pm 0.02$ <sup>a</sup>	$0.42 \pm 0.04$ <sup>a</sup>	$0.91 \pm 0.10$ <sup>a</sup>
5	$(5.5 \pm 0.6) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$(4.6 \pm 0.2) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$6.28 \pm 0.91$ <sup>b</sup>	$5.74 \pm 0.02$ <sup>b</sup>	$0.22 \pm 0.09$ <sup>b</sup>	$0.23 \pm 0.04$ <sup>a</sup>	$0.94 \pm 0.06$ <sup>b</sup>	$1.15 \pm 0.23$ <sup>b</sup>
15	$(5.0 \pm 0.4) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^5$ <sup>c</sup>	$5.68 \pm 0.13$ <sup>c</sup>	$5.47 \pm 0.19$ <sup>b</sup>	$0.26 \pm 0.02$ <sup>c</sup>	$0.26 \pm 0.03$ <sup>b</sup>	$1.09 \pm 0.06$ <sup>b</sup>	$1.68 \pm 0.42$ <sup>c</sup>
30	$(4.5 \pm 0.4) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$(6.6 \pm 0.3) \times 10^4$	$5.53 \pm 0.29$ <sup>c</sup>	$5.39 \pm 1.26$ <sup>b</sup>	$0.27 \pm 0.01$ <sup>c</sup>	$0.28 \pm 0.04$ <sup>c</sup>	$1.19 \pm 0.16$ <sup>c</sup>	$1.76 \pm 0.43$ <sup>d</sup>

注: 同列不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ )。

表 3 0.10%NaCl 酸性电解水处理单增李斯特菌生物被膜结构参数变化

Tab.3 Changes in structural parameters of *L. monocytogenes* biofilms treated with acidic electrolyzed water of 0.10% NaCl

时间 Time/ min	生物体积 Bio-volume/ $\mu\text{m}^3$		结构熵 Textural Entropy		同质性 Homogeneity		粗糙度 Biofilm Roughness	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
1	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^5$ <sup>a</sup>	$(3.3 \pm 0.4) \times 10^5$ <sup>a</sup>	$6.84 \pm 0.72$ <sup>a</sup>	$6.06 \pm 0.24$ <sup>a</sup>	$0.19 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$0.24 \pm 0.02$ <sup>a</sup>	$1.07 \pm 0.02$ <sup>a</sup>	$1.54 \pm 0.29$ <sup>a</sup>
5	$(1.6 \pm 0.5) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$6.26 \pm 1.19$ <sup>b</sup>	$5.64 \pm 0.69$ <sup>b</sup>	$0.24 \pm 0.03$ <sup>b</sup>	$0.25 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$1.43 \pm 0.03$ <sup>b</sup>	$1.74 \pm 0.25$ <sup>b</sup>
15	$(1.5 \pm 0.4) \times 10^5$ <sup>b</sup>	$(5.6 \pm 0.3) \times 10^4$ <sup>c</sup>	$5.67 \pm 1.03$ <sup>c</sup>	$5.39 \pm 0.47$ <sup>b</sup>	$0.25 \pm 0.01$ <sup>b</sup>	$0.29 \pm 0.02$ <sup>b</sup>	$1.69 \pm 0.03$ <sup>c</sup>	$1.90 \pm 0.28$ <sup>c</sup>
30	$(5.2 \pm 0.4) \times 10^4$ <sup>c</sup>	$(4.8 \pm 0.2) \times 10^4$ <sup>d</sup>	$5.53 \pm 0.49$ <sup>c</sup>	$4.64 \pm 1.13$ <sup>c</sup>	$0.28 \pm 0.01$ <sup>b</sup>	$0.34 \pm 0.03$ <sup>c</sup>	$1.77 \pm 0.16$ <sup>c</sup>	$1.91 \pm 0.61$ <sup>c</sup>

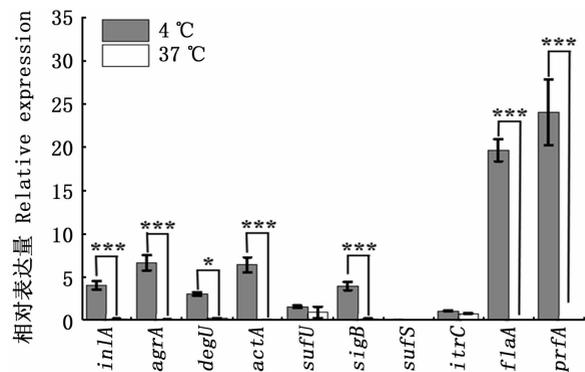
注: 同列不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Notes: Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ )。

进一步从微观层面来证明酸性电解水灭活 4 °C、37 °C 条件下的单增李斯特菌的差异性。单增李斯特菌在很长一段时间的进化中, 获得了 1 组不同的基因和相应的蛋白, 每个基因和相应的蛋白在这种微生物的生存和致病过程中都有自己独特的属性和功能。转录调节因子 *prfA* 是一种重要的转录因子, 控制细菌从细胞外到细胞内的转化, 并上调几个毒力基因的转录。先前的研究表明, 该因子是这种有机体生物膜形成的重要调节因子。除了毒力基因, 还有一些应激反应基因, 在单增李斯特菌的情况下, 由转录因子 *SigB* 控制, 研究已经证明它参与了这种微生物对低温的适应。

单增李斯特菌在 4 °C 下生长, *sigB* 和 *prfA* 基因转录水平均显著提高 ( $P < 0.05$ )。低温对食品加工环境中的单增李斯特菌来说是额外的压力, *prfA* 可以在低温下转录, 转录因子 *prfA* 可以根据生长温度在活性和非活性之间切换, 在目前的研究中, 上调的 *prfA*, 表明低温增加了单核细胞增生李斯特菌的应激反应, 以抵抗外界恶劣的环境。*sigB* 和 *prfA* 的观察结果一致, 这两个基因都参与了胁迫反应和毒力的调节, 支持 *degU* 参与了单增李斯特菌的致病性、抗性和持久性的基本

机制。*degU* 也被鉴定为生物合成的积极激活剂, 在 37 °C 较少甚至没有表达<sup>[24]</sup>。



柱状图上方含“\*”代表差异显著。\* .  $P < 0.05$ ; \* . \* .  $P < 0.01$ ; \* . \* . \* .  $P < 0.001$ 。

The “\*” above the histogram shows significant difference. \* .  $P < 0.05$ ; \* . \* .  $P < 0.01$ ; \* . \* . \* .  $P < 0.001$ 。

图 5 温度对单增李斯特菌相关被膜基因表达的影响  
Fig.5 Effect of temperature on the expression of *Listeria monocytogenes* related virulence genes

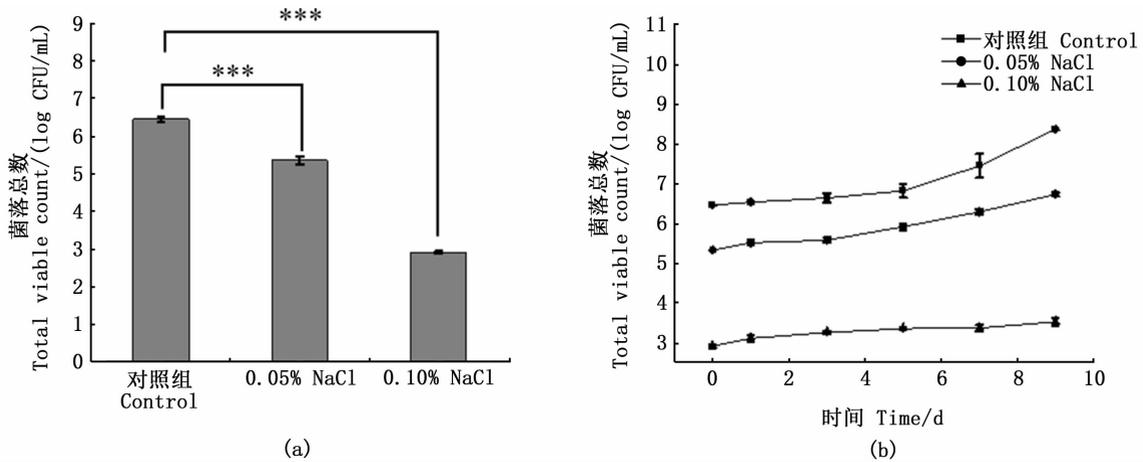
综上, 与在 37 °C 条件下观察到的转录水平相比, 这些数据表明, 大多数基因在 4 °C 时的转录水平都有所增加。结果证明了单增李斯特菌在应激条件下激活几种遗传机制的能力, 以便在暴露于具有挑战性的情况下保持生存能力和致病性。此外, 这些结果强化了控制冷链中存在的

单增李斯特菌的重要性,这些冷链是广泛使用的,例如乳制品、即食食品行业和冷藏食品。同样有趣的是,这两株菌导致了许许多人单增李斯特菌病病例,在 4 °C 和 37 °C 的温度下呈现出不同的分子机制,这表明继续对其他相关基因进行类似实验的重要性<sup>[25]</sup>。

### 2.3 酸性电解水对冷藏金针菇中单增李斯特菌杀菌效果

经过对单增李斯特菌的浮游态、生物被膜态的灭活试验,为了使酸性电解水的理论基础能够与实际应用相结合,进行金针菇样品抑菌试验。

NaCl 浓度选择 0.05%、0.10%,处理时间为 30 min,菌落总数分别减少至 5.35 log CFU/mL 和 2.91 log CFU/mL(图 6a)。随着储藏时间的增加,亚致死单增李斯特菌在金针菇上慢慢恢复且不断增殖。经 NaCl 浓度为 0.05% 的酸性电解水处理后,菌落总数从 5.35 log CFU/mL 增加至 6.73 log CFU/mL。而经 NaCl 浓度为 0.10% 的酸性电解水处理后,菌落总数从 2.91 log CFU/mL 仅增加至 3.51 log CFU/mL(图 6b)。说明后者能够有效抑制单增李斯特菌。



柱状图上方含“\*”代表差异显著。\* . $P < 0.05$ ; \*\* . $P < 0.01$ ; \*\*\* . $P < 0.001$ 。  
The “\*” above the histogram shows significant difference. \* . $P < 0.05$ ; \*\* . $P < 0.01$ ; \*\*\* . $P < 0.001$ .

图 6 经酸性电解水处理后单增李斯特菌在金针菇上的恢复与增殖

Fig. 6 Recovery and proliferation of *L. monocytogenes* on *F. velutipes* after acidic electrolyzed water treatment

感官质量是对采后金针菇的最直接的评价,也是决定货架期的一个重要指标<sup>[26]</sup>。由图 7 所示,金针菇的菌盖在贮藏过程中会随着时间的推移而变质和腐烂,未处理组在第 9 天达到货架期终点,菌毛大部分黏稠、凹陷,菌柄出现大开孔、变黄、开裂等现象。大多数固体表面都附着在模具上,蘑菇已经失去了作为商品的价值。处理组在第 9 天时,一直保持良好的气味和菌毛形态,明显优于同期的对照组。由此可见,酸性电解水能显著抑制金针菇在贮藏过程中的腐烂变质,从而延长货架期。

失重率是评价水果和蔬菜新鲜度的重要指

标<sup>[27]</sup>。金针菇收获后储存期间的重量下降主要是由于细胞呼吸过程中养分的消耗和蒸腾作用中水分的损失<sup>[28]</sup>。新鲜金针菇含水量高,营养丰富。在贮藏过程中,失重会导致子实体的软化、枯萎和收缩,降低新鲜度并影响其商业价值。如表 4 所示,处理组在储存温度 4 °C 下,1 d 的失重率为 2.00%,3 d 的失重率为 3.20%,储藏时间增加到第 9 天,失重率为 13.52%。而未处理组储藏 9 d 后,失重率达到 25.8%,在这一点上,*F. velutipe* 已经失去了大部分的商业价值。由表 4 所示,经过酸性电解水处理后的金针菇在 4 °C 条件下储藏时间相对更久。

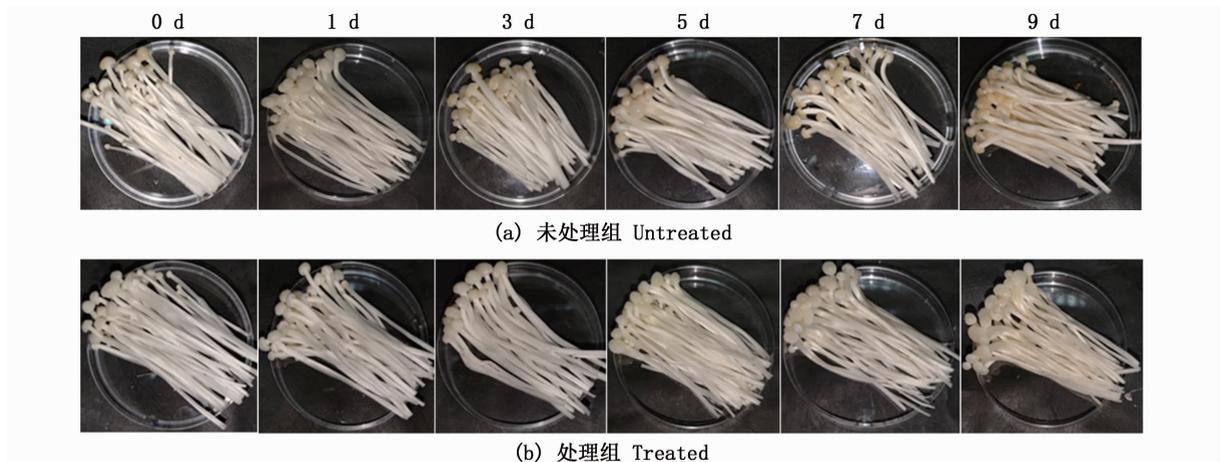


图7 经酸性电解水处理后金针菇在4 °C下子实体感官品质的影响试验

Fig.7 Effect of acid electrolyzed water treatment on the sensory quality of *F. velutipes* at 4 °C

表4 经酸性电解水杀菌后的金针菇贮藏特性分析

Tab.4 Analysis of storage characteristics of *F. velutipes* after sterilization by acidic electrolyzed water

储藏时间 Storage time/d	失重率 Weight loss rates/%		白度值 Whiteness (L*)		可溶性蛋白含量 Soluble protein content/(g/kg)	
	未处理 Untreated	处理 Treated	未处理 Untreated	处理 Treated	未处理 Untreated	处理 Treated
	0	0 ± 0	0 ± 0	92.28 ± 0.60 <sup>a</sup>	91.99 ± 0.52 <sup>a</sup>	5.75 ± 0.11 <sup>a</sup>
1	2.50 ± 0.71 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.32 <sup>a</sup>	82.59 ± 1.51 <sup>b</sup>	88.78 ± 0.69 <sup>a</sup>	5.39 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.50 ± 0.02 <sup>a</sup>
3	3.85 ± 0.68 <sup>b</sup>	3.20 ± 1.41 <sup>a</sup>	76.51 ± 1.28 <sup>c</sup>	83.28 ± 1.12 <sup>b</sup>	5.06 ± 0.08 <sup>c</sup>	5.33 ± 0.04 <sup>a</sup>
5	5.22 ± 0.91 <sup>c</sup>	3.50 ± 1.56 <sup>a</sup>	69.14 ± 1.34 <sup>d</sup>	81.06 ± 1.40 <sup>b</sup>	4.43 ± 0.12 <sup>d</sup>	5.12 ± 0.04 <sup>a</sup>
7	15.40 ± 0.14 <sup>d</sup>	5.59 ± 1.12 <sup>b</sup>	64.34 ± 1.34 <sup>d</sup>	80.01 ± 1.28 <sup>b</sup>	3.44 ± 0.22 <sup>e</sup>	4.81 ± 0.09 <sup>b</sup>
9	25.80 ± 0.84 <sup>e</sup>	13.52 ± 2.00 <sup>c</sup>	53.28 ± 2.06 <sup>e</sup>	77.81 ± 1.76 <sup>b</sup>	3.01 ± 0.05 <sup>f</sup>	4.68 ± 0.06 <sup>b</sup>

白度值是金针菇商业价值的重要指标<sup>[27]</sup>。在贮藏过程中,白度值在4 °C条件下持续缓慢下降,未处理组的金针菇下降最大,白度值在第9天降至53.28。处理组,9 d后白度值仍为77.81,显著优于未处理组( $P < 0.05$ )。结果表明,酸性电解水有效抑制了金针菇子实体的褐变,延缓了贮藏过程中的腐烂<sup>[29]</sup>。见表4。

贮藏期间,蛋白水解酶保持活性,将这些蛋白质水解成更小的分子,从而导致金针菇风味的改变<sup>[30-31]</sup>。如表4所示,可溶性蛋白质在储藏期内含量有所下降。在4 °C储藏下,未处理组可溶性蛋白含量持续下降,最终浓度为3.01 g/kg,处理组可溶性蛋白含量在贮藏过程中缓慢下降,9 d时仍维持在4.68 g/kg,显著高于未处理组的含量( $P < 0.05$ )。酸性电解水对冷藏金针菇中单增李斯特菌有明显的杀菌效果<sup>[32]</sup>。

### 3 讨论

本研究主要分析 AEW 对在冷藏温度 4 °C 下生长的单增李斯特菌的浮游、生物膜的抗菌作用。结果表明,AEW 短时间内对在 4 °C 下培养的单增李斯特菌的影响不显著,相反,AEW 对同期在 37 °C 下培养的单增李斯特菌具有显著的抑菌作用。pH、ORP、ACC 是 AEW 破坏细菌细胞活力的主要因素,而 ACC 是主要原因。ACC 首先作用于细菌细胞壁,引起脂多糖结构的改变和金属离子通道蛋白的变性,从而导致  $K^+$  和  $Ca^{2+}$  从细胞中迅速漏出,破坏肽聚糖层,使细胞松散,并增加细胞壁的通透性。ACC 攻击细菌细胞膜,导致细胞膜通透性增加,这有助于 AEW 进入细胞并最终导致细菌死亡<sup>[33]</sup>。单增李斯特菌对氯的抗性还取决于生长底物、离子浓度和温度。温度是

影响生物存活的限制因素。当温度降低时,膜的流动性降低,从而影响膜的相结构(固相和液相)和膜的正常功能,并且细胞膜的选择性、渗透性基于细胞膜的流动性,即温度可能改变细胞膜流动性,当 ACC 攻击时,细胞膜通透性增加不明显,从而对酸性电解水有效氯有一定的抗性。相比 37 °C 条件下的单增李斯特菌,酸性电解水短时间内不能有效清除其成熟的生物被膜。通过结晶紫法定量生物被膜、生物被膜聚合物的测定,在 4 °C 环境中,低温细菌会合成几种低温保护性化合物,例如细胞外多糖,它们可以改变分子的微观结构,促进表面黏附、细胞聚集和生物被膜形成。细菌胞外聚合物在生物膜结构的稳定性中起着重要作用,并且对生物被膜细菌具有很强的保护作用,这可能是导致相同酸性电解水处理 4 °C、37 °C 条件下的单增李斯特菌浮游态、生物被膜态均出现显著性差异的重要因素。毒力基因相对表达量的测定分析,单增李斯特菌在 4 °C 应激条件下可能激活几种遗传机制的能力,以便在暴露于酸性电解水下保持生存能力和致病性。酸性电解水杀灭 4 °C 条件下的单增李斯特菌,15 min 内并不能灭活,需要延长处理时间,或增加 NaCl 的浓度,造成该现象的主要原因,除去其低温下单增李斯特菌本身就难以杀灭外,还有样品自身条件对酸性电解水的影响。因此,酸性电解水在应用于控制冷冻冷藏环境中的微生物时应提出更高要求,从而大大降低食品的安全风险。

#### 参考文献:

- [1] HOF H. An update on the medical management of listeriosis[J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2004, 5(8): 1727-1735.
- [2] GUENTHER S, HUWYLER D, RICHARD S, et al. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(1): 93-100.
- [3] CHEN M T, CHENG J H, ZHANG J M, et al. Isolation, potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 946.
- [4] PAPAGEORGIOU D K, BORI M, MANTIS A. Survival of *Listeria monocytogenes* in frozen ewe's milk and feta cheese curd[J]. Journal of Food Protection, 1997, 60(9): 1041-1045.
- [5] MCLENNON J, BORZA A, EISEBRAUN M, et al. Improved recovery of stressed *Listeria monocytogenes* from frozen foods [J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(2): 403-414.
- [6] GEIGES O. Microbial processes in frozen food[M]//BRACK A, HORNECK G, FRIEDMANN E I, et al. Life Sciences: Space and Mars Recent Results. 1996: 109-118.
- [7] DATTA A R, LAKSANALAMAI P, SOLOMOTIS M. Recent developments in molecular sub-typing of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013, 30(8): 1437-1445.
- [8] MORTAZAVI N, ALIAKBARLU J. Antibacterial effects of ultrasound, cinnamon essential oil, and their combination against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in milk[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(12): 3700-3706.
- [9] LIU P P, YANG M J, ZHAO X, et al. Cold-chain transportation in the frozen food industry may have caused a recurrence of COVID-19 cases in destination; successful isolation of SARS-CoV-2 virus from the imported frozen cod package surface[J]. Biosafety and Health, 2020, 2(4): 199-201.
- [10] BERGHOLZ T M, TANG S L, WIEDMANN M, et al. Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* is increased by exposure to salt stress and is mediated via LiaR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(18): 5682-5688.
- [11] WANG J J, ZHANG Z H, LI J B, et al. Modeling *Vibrio parahaemolyticus* inactivation by acidic electrolyzed water on cooked shrimp using response surface methodology[J]. Food Control, 2014, 36(1): 273-279.
- [12] LI Y F, ZENG Q H, LIU G, et al. Food-grade emulsions stabilized by marine Antarctic krill (*Euphausia superba*) proteins with long-term physico-chemical stability[J]. LWT, 2020, 128: 109492.
- [13] ALVES Ã, MAGALHÃES R, BRANDÃO T R S, et al. Impact of exposure to cold and cold-osmotic stresses on virulence-associated characteristics of *Listeria monocytogenes* strains[J]. Food Microbiology, 2020, 87: 103351.
- [14] KRAGH M L, MUCHAAMBA F, TASARA T, et al. Cold-shock proteins affect desiccation tolerance, biofilm formation and motility in *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 329: 108662.
- [15] ROY P K, MIZAN F R, HOSSAIN I, et al. Elimination of *Vibrio parahaemolyticus* biofilms on crab and shrimp surfaces using ultraviolet C irradiation coupled with sodium hypochlorite and slightly acidic electrolyzed water[J]. Food Control, 2021, 128: 108179.
- [16] ZHANG J Y, WANG J Y, ZHAO D D, et al. Efficacy of the two-step disinfection with slightly acidic electrolyzed water for reduction of *Listeria monocytogenes* contamination on food raw materials[J]. LWT, 2021, 140: 110699.
- [17] HINTON JR A, NORTHCUIT J K, SMITH D P, et al. Spoilage microflora of broiler carcasses washed with electrolyzed oxidizing or chlorinated water using an inside-outside bird washer[J]. Poultry Science, 2007, 86(1):

- 123-127.
- [18] TAN L, ZHAO F, HAN Q, et al. High correlation between structure development and chemical variation during biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1881.
- [19] FOLSOM J P, FRANK J F. Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance[J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69(6): 1292-1296.
- [20] KOO H, FALSETTA M L, KLEIN M I. The exopolysaccharide matrix; a virulence determinant of cariogenic biofilm [J]. *Journal of Dental Research*, 2013, 92(12): 1065-1073.
- [21] BEYENAL H, DONOVAN C, LEWANDOWSKI Z, et al. Three-dimensional biofilm structure quantification [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 59(3): 395-413.
- [22] BEYENAL H, LEWANDOWSKI Z, HARKIN G. Quantifying biofilm structure: facts and fiction[J]. *Biofouling*, 2004, 20(1): 1-23.
- [23] BRIDIER A, DUBOIS-BRISSENET F, BOUBETRA A, et al. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 82(1): 64-70.
- [24] MURRAY E J, KILEY T B, STANLEY-WALL N R. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour[J]. *Microbiology*, 2009, 155(1): 1-8.
- [25] PIETA L, GARCIA F B, RIBOLDI G P, et al. Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation, stress-response, and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(4): 1707-1714.
- [26] SHI C, WU Y Y, FANG D L, et al. Effect of nanocomposite packaging on postharvest senescence of *Flammulina velutipes* [J]. *Food Chemistry*, 2018, 246: 414-421.
- [27] OZ A T, ULUKANLI Z, BOZOK F, et al. The postharvest quality, sensory and shelf life of *Agaricus Bisporus* in active map[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2015, 39(1): 100-106.
- [28] SHAPERO M, NELSON D A, LABUZA T P. Ethanol inhibition of staphylococcus aureus at limited water activity [J]. *Journal of Food Science*, 1978, 43(5): 1467-1469.
- [29] 刘青, 申雨苗, 张瑶, 等. 臭氧处理对金针菇保鲜效果的影响[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(17): 280-284.
- LIU Q, SHEN Y M, ZHANG Y, et al. Effects of ozone treatment on preservation effect of *Flammulina velutipes*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(17): 280-284.
- [30] ARES G, PARENTELLI C, GÁMBARO A, et al. Sensory shelf life of shiitake mushrooms stored under passive modified atmosphere[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2006, 41(2): 191-197.
- [31] MILES P G, CHANG S T. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact [M]. Baton Rouge: CRC Press, 2004: 480.
- [32] 许愈, 张昭寰, 赵莉, 等. 应用酸性电解水联合超声波杀灭副溶血性弧菌[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 578-584.
- XU Y, ZHANG Z H, ZHAO L, et al. Combination of acidic electrolyzed water with ultrasonic for killing *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 578-584.
- [33] 齐家伟, 董旭日, 柴旭锋, 等. 不同振动模式对副溶血性弧菌生物被膜形成的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(6): 950-960.
- QI J W, DONG X R, CHAI X F, et al. Effects of different vibration modes on *Vibrio parahaemolyticus* biofilm [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(6): 950-960.

## Inactivation effect of acidic electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* under low temperature conditions

LIANG Fan<sup>1</sup>, DU Ming<sup>2</sup>, PAN Yingjie<sup>1,3,4</sup>, LIU Haiquan<sup>1,3,4,5</sup>, ZHAO Yong<sup>1,3,4</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 4. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 5. Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *Listeria monocytogenes* is a psychrophilic bacterium that can grow at low temperatures. The growth of *L. monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat food and frozen food processing equipment is a major food safety issue. Acidic electrolyzed water (AEW) is a new type of high-efficiency, safe and no-residue non-heat sterilization technology. AEW is used to inactivate *L. monocytogenes* in planktonic state, biofilm state, and frozen *Flammulina velutipes* samples under low temperature conditions. By detecting changes in the total number of colonies after AEW treatment, biofilm, biofilm structural parameters, and virulence gene expression, we made further analysis of sample tests, etc.. The results showed that when the electrolyte concentration was 0.10% and the treatment time was 1 min and 30 min, the total number of *Listeria monocytogenes* colonies and the biofilm clearance rate at 4 °C and 37 °C were extremely different. That was, with the same treatment time, AEW was more difficult to inactivate *L. monocytogenes* cultured at 4 °C. Our findings may provide a theoretical basis for evaluating the safety of food and refrigerated food and food processing equipment in the cold chain. The use of antibacterial agents is more demanding.

**Key words:** frozen and refrigerated food; psychrophile; *Listeria monocytogenes*; acidic electrolyzed water