

水溶性壳聚糖对美极梅奇酵母菌拮抗效力的影响

郭东起, 沈永娟

(塔里木大学 生命科学院, 新疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:以冬枣为试材, 采用体外及体内试验方法, 研究了水溶性壳聚糖对美极梅奇酵母菌抑制冬枣采后贮藏保鲜中青霉病的效果的影响。结果表明: 水溶性壳聚糖对橘青霉孢子的萌发有显著的抑制作用, 壳聚糖浓度 $>0.3\%$ (w/v), 橘青霉孢子萌发状态完全受到抑制; 在 NYDB 培养基(液体)中, 壳聚糖的浓度 $\geq 0.04\%$ (w/v)时, 对酵母菌的生长有较强的抑制效果, 在 NYDA 固体培养基中, 壳聚糖浓度在 $0.1\% \sim 0.9\%$ (w/v)范围内对其均有显著抑制作用; 在冬枣伤口处, 壳聚糖浓度 $\leq 0.1\%$ 时, 对酵母菌的生长无显著影响; 美极梅奇酵母菌与浓度为 0.1% (w/v)壳聚糖结合处理对冬枣青霉病的抑制效果最佳。

关键词:美极梅奇酵母菌(*Metschnikowia pulcherrima*); 水溶性壳聚糖; 冬枣

中图分类号:S 609+.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0127-04

果蔬采后贮藏中真菌病害的生物防治技术是利用微生物之间的拮抗效力, 控制病原菌的生长, 以此降低腐败发生率^[1], 近几年被证实是最高效、最具有发展空间的一种保藏手段。它是一种控制果蔬采后贮藏中真菌病害的新途径, 已成为目前研究热点^[2]。拮抗酵母菌由于具备遗传稳定性、不产生抗生素、抑菌广泛性、同时对各种胁迫、逆境具有很强的忍耐力等优点而成为研究的热点^[3-4]。但是, 在实际应用中, 其防效不如化学杀菌剂, 其效力易受到病原菌浓度、果实成熟衰老生理状态等因素的影响, 以上缺陷给拮抗酵母菌的大规模使用带来了许多不便, 所以有必要通过有效的途径增强拮抗酵母菌的生防效果^[5-6]。研究发现, 一些外源物质, 如化学盐类, 化学杀菌剂, 生物保鲜剂等其它物质和拮抗酵母菌联合应用, 可以增强酵母菌的生物防治活性^[7-8], 在这些外源物质中, 水溶性壳聚糖是能够进行分解的天然产物, 壳聚糖不但资源广泛多样、无毒性、价格低廉, 并与果蔬接触不产生有毒的物质, 同时, 还有很多特殊的作用, 在果蔬采后贮藏保鲜等领域都有着广泛的研究和应用^[9-10]。目前, 在水溶性壳聚糖和拮抗酵母菌联合使用处理方面, EL 等^[11]研究显示, 采后假丝酵母(*Candida*

saitoana)与壳聚糖衍生物结合使用可以对苹果青霉病和灰霉病及柑橘绿霉病产生协同增效的抑制作用。SHARMA 等^[12]研究表明, 产朊假丝酵母(*Candida utilis*)与壳聚糖配合使用对番茄果实病原菌链格孢(*Alternaria alternata*)和白地霉(*Geotrichum candidum*)的抑菌效果显著提高。该试验的目的是研究利用水溶性壳聚糖增强美极梅奇酵母菌(*Metschnikowia pulcherrima*)对冬枣采后贮藏过程中真菌病害抑制效力的可行性, 通过体内外试验为探明相关机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

冬枣采于新疆阿拉尔第 1 师 14 团, 选取八九成熟度、相似大小、无病虫害及损坏的枣果, 当日立即运回, 并保藏在冷库($T(0 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{RH } 85\% \sim 90\%$)中备用。水溶性壳聚糖(羧化壳聚糖)食用级, 羧化度 $\geq 60\%$, 购于浙江澳兴生物科技有限公司。

橘青霉(*Penicillium citrinum*)是引发冬枣贮藏过程中青腐病的主要病原真菌。在无菌条件下, 将病原真菌接种到 PDA 固体培养基中, 28°C , 培养 7 d, 在培养好的病原菌平板上用接种环刮取适量孢子, 转移到 5 mL 含 0.05% Tween-80 的无菌水中, 并用灭菌后的 4 层纱布过滤, 滤掉其菌丝体, 使用血球计数板法计数, 调整病原菌孢子数目为试验所需浓度, 保存待用。

美极梅奇酵母菌(*Metschnikowia pulcherrima*)是从新疆冬枣表面筛选的拮抗酵母菌, 由生工生物工程(上

第一作者简介:郭东起(1975-), 男, 河南南阳人, 硕士, 副教授, 现主要从事食品安全及果蔬保鲜与加工技术等研究工作。E-mail: guodongqi10@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160342)。

收稿日期:2015-07-31

海)有限公司鉴定(26S rDNA 序列分析法),在无菌条件下,从美极梅奇酵母菌 PDA 斜面上刮取 2 环酵母,接种到 NYDB 液体培养基内,28℃下,振荡培养 28 h,离心(12 000 r/min,10 min)收集菌体,血球计数板计数,调至试验所需浓度,待用。

1.2 试验方法

1.2.1 水溶性壳聚糖对 *P. citrinum* 孢子培养基中生长的影响 将灭菌后的水溶性壳聚糖加到 PDB 培养基(马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL)中,并使其浓度分别达到 0.00%、0.05%、0.10%、0.20%、0.30%、0.40%、0.50%、1.00%(w/v),然后接入终浓度为 1×10^6 孢子/mL *P. citrinum*,28℃,震荡培养(140 r/min)10 h,取样在光学显微镜下对 *P. citrinum* 孢子萌发情况进行观察和统计。每个处理至少观察 160 个以上孢子(目镜范围内),结果以平均病原真菌孢子萌发率(%)为单位表示,试验重复 3 次。

1.2.2 水溶性壳聚糖对 *M. pulcherrima* 在培养基中生长的影响 在 NYDB 液体培养基(酵母粉 5 g、牛肉膏 8 g、葡萄糖 10 g、蒸馏水 1 000 mL)中的影响:将水溶性壳聚糖灭菌后加到 NYDB 培养基中,并使其浓度分别达到 0.00%、0.01%、0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%(w/v),接入最终浓度为 1×10^4 细胞/mL *M. pulcherrima*,28℃,震荡器培养(140 r/min)10~24 h 后,取样观察,并用血球计数板计数,结果以 1 mL 中酵母菌数量为单位,log 细胞/mL(log cells per mL)表示。试验重复 3 次。在 NYDA 固体培养基上的影响:将定量的 *M. pulcherrima* 细胞加到经灭菌后的水溶性壳聚糖溶液(使浓度分别达到 0.0%、0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9% w/v)中,60 s 后,取 100 μ L 涂布在 NYDA 固体培养基,28℃,培养 28 h,对酵母菌的菌落数进行计数,结果以原始数据与对照相比的百分比(%)为单位表示,试验重复 3 次。

1.2.3 壳聚糖对 *M. pulcherrima* 在果实伤口生长动态的影响 将 *M. pulcherrima* 细胞悬浮在水溶性壳聚糖溶液(浓度分别为 0.0%、0.1%、0.3%、0.5%、1.0% w/v)中。用打孔器(灭过菌的)在冬枣表面人工制造相同大小及深度的伤口,在伤口中移入 30 μ L 的 *M. pulcherrima* 细胞菌悬液(伤口中起始酵母菌细胞数量大约 1×10^5 细胞/伤口),然后常温(大约 24℃)贮藏,定期取样对 *M. pulcherrima* 数量进行计数。测定方法:用灭过菌的打孔器将冬枣伤口处组织取出,放入定量无菌水中,用捻钵捣碎,在生物显微镜下,用血球计数板计数,结果以每个伤口处总酵母菌数量为单位,log 细胞/伤口(log cell per wound)表示,试验重复 3 次。

1.2.4 生防试验 冬枣用自来水洗净,放入 2%次氯酸钠溶液中浸泡 2 min,然后洗净,晾干待用。用消毒过的

打孔器在冬枣表面人工制造相同大小和深度的伤口,每伤口部位移入定量(30 μ L)的以下溶液:A 为不同浓度的壳聚糖溶液;B 为 *M. pulcherrima* 悬液;C 为不同浓度壳聚糖配制的 *M. pulcherrima* 悬液(浓度为 1×10^4 孢子/mL);D 为无菌水(作为对照)。自然通风放置 2 h 后,每伤口处移入等量(30 μ L)的 *P. citrinum* 孢子菌悬液,处理完后室温下贮藏,并用保鲜袋密封处理。每天对冬枣伤口处病害情况进行观察及统计,结果以平均病害发生率(%)为单位表示,试验重复 3 次。

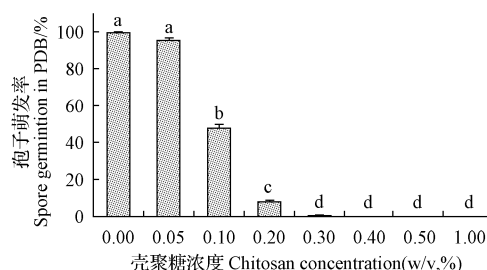
1.3 数据分析

试验数据用 SPSS 18.0 软件分析,并使用 Sigmaplot 12.5 绘图。当组内比较个数为 3 个及 3 个以上时,采用 Duncan's 多重比较进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 水溶性壳聚糖对 *P. citrinum* 孢子萌发的影响

在 PDB 培养基中,水溶性壳聚糖对 *P. citrinum* 孢子的萌发有显著的抑制效力($P < 0.05$),且这种抑制效果与壳聚糖的浓度高低有关(图 1),当其浓度 $> 0.30\%$ (w/v)时,*P. citrinum* 孢子萌发状态完全受到抑制;在含有 0.10%(w/v)和 0.20%(w/v)浓度壳聚糖的 PDB 液体培养基中,与对照相比,孢子萌发率分别降低了 51.6%及 91.3%。壳聚糖浓度 $\leq 0.05\%$ (w/v)时,对 *P. citrinum* 的孢子萌发的抑制作用无显著差异($P > 0.05$)。



注:不同小写字母表示在 0.05 水平存在显著性差异。下同。

Note: The different lowercase letters show significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 壳聚糖对橘青霉孢子萌发的影响

Fig. 1 Effect of chitosan at different concentration on spore germination of *P. citrinum* in PDB

2.2 水溶性壳聚糖对 *M. pulcherrima* 在体外生长的影响

由图 2 可知,在 NYDB 液体培养基中,水溶性壳聚糖的浓度 $\geq 0.04\%$ (w/v)时,对 *M. pulcherrima* 的生长有显著的抑制作用,0.01%~0.02%(w/v)浓度的壳聚糖对 *M. pulcherrima* 的生长也有较强的抑制($P < 0.05$),0.02%(w/v)的浓度壳聚糖处理与对照组相比,*M. pulcherrima* 数量下降了 1.3 个数量级;在 NYDA 固体培养基上(图 3),壳聚糖浓度在 0.1%~0.9%(w/v)范

围内均对其有显著抑制效果($P<0.05$),其中,水溶性壳聚糖浓度为 0.1%(w/v)时与对照组相比 *M. pulcherrima* 的存活率下降了 63.2%。

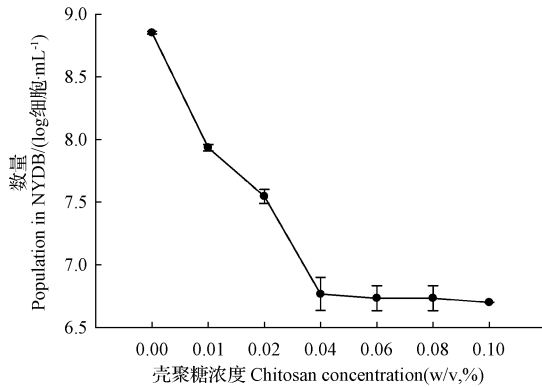


图2 壳聚糖对美极梅奇酵母菌在 NYDB 液体培养基中生长的影响

Fig. 2 Effect of chitosans at different concentration with various viscosities on the population of *M. pulcherrima* on NYDB

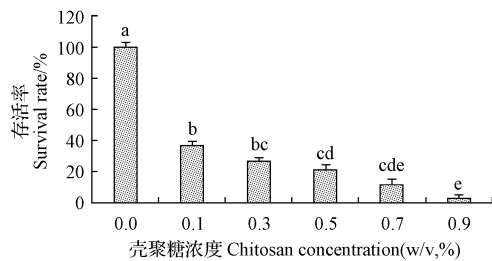


图3 壳聚糖对美极梅奇酵母菌在 NYDA 固体培养基中生长的影响

Fig. 3 Effect of chitosans at different concentration with various viscosities on the population of *M. pulcherrima* on NYDA

2.3 水溶性壳聚糖对 *M. pulcherrima* 在果实伤口生长动态的影响

由图 4 可知,在冬枣果实伤口部位,壳聚糖浓度 $\geq 0.3\%$ (w/v),*M. pulcherrima* 生长被抑制达显著差异,尤

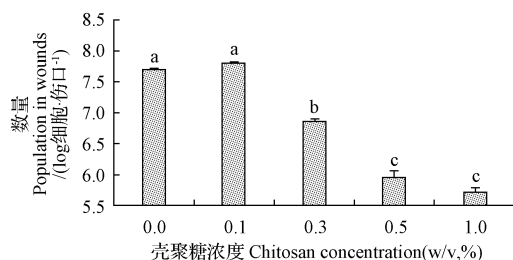


图4 壳聚糖对美极梅奇酵母菌在冬枣伤口处生长的影响

Fig. 4 Effect of chitosan at different concentration on population of *M. pulcherrima* in jujuba fruit wounds

其是壳聚糖浓度为 0.5%(w/v),*M. pulcherrima* 数量比对照组下降了 1.75 个数量级,而壳聚糖浓度 $\leq 0.1\%$ 时,对 *M. pulcherrima* 的生长影响无显著差异($P>0.05$)。

2.4 水溶性壳聚糖与 *M. pulcherrima* 联合处理对冬枣青腐病的抑制效果

壳聚糖与 *M. pulcherrima* 联合处理对 *P. citrinum* 在冬枣的侵染能够产生协同增效的抑制作用,其效果与壳聚糖的浓度相关,浓度为 0.10%(w/v)壳聚糖与 *M. pulcherrima* 联合处理是最有效的组合,在此浓度下,壳聚糖与 *M. pulcherrima* 联合处理对冬枣青腐病的抑制效果最好,该处理第 6 天的病害发生率仅为壳聚糖 [0.10%(w/v)]和 *M. pulcherrima* 单独处理的 26.9%和 52.2%。浓度为 1.00%(w/v)的壳聚糖与 *M. pulcherrima* 联合处理的抑制作用也比 *M. pulcherrima* 单独处理好,浓度为 0.01%(w/v)的壳聚糖与 *M. pulcherrima* 联合处理,与酵母菌单独处理相比,抑制效果差异不显著。

表1 壳聚糖和美极梅奇酵母菌对冬枣青腐病的控制

Table 1 Effect of chitosan at different concentration with various viscosities alone or in combination with *M. pulcherrima* on reduction of blue mould rot of jujuba fruit

处理 Treatment	病害发生率 Disease incidence/ %
Control	100.00±0.0a
1.00% Chitosan	48.96±2.1d
0.10% Chitosan	92.71±2.1b
<i>M. pulcherrima</i>	47.92±2.4c
<i>M. pulcherrima</i> +1.00% Chitosan	37.50±3.4f
<i>M. pulcherrima</i> +0.10% Chitosan	25.00±3.4g
<i>M. pulcherrima</i> +0.01% Chitosan	46.87±2.1e

注:数据平均值±标准差(4次重复)。

Note: Data are means±standard deviations of four replicates.

3 讨论

在体外(PDB 培养基)试验中,水溶性壳聚糖对 *P. citrinum* 孢子的萌发有显著的抑制,且这种抑制效果与壳聚糖的浓度关系密切,壳聚糖浓度越高,其抑制效果越显著,壳聚糖的直接抑菌机制被认为与壳聚糖具有的还原态氨基酸基团有关,但壳聚糖的抑菌机理很复杂,脱乙酰度、相对分子质量和黏度等因素是影响壳聚糖生物学功能的重要参数指标^[13-14]。保证拮抗酵母菌在果实体内的生长不受外源物质的影响,是使用外源物质增强拮抗酵母菌效力的一个重要前提,因为,其拮抗机制是营养和空间竞争,其依赖于足够的酵母菌的群体数量^[15]。该试验结果表明,壳聚糖与 *M. pulcherrima* 结合使用对冬枣青霉病的控制效力与不同浓度壳聚糖对其在果实上生长的影响也密切相关。

在冬枣上,浓度小于 0.1%(w/v)的壳聚糖对 *M. pulcherrima* 在冬枣伤口部位的生长无显著影响,说明 *M. pulcherrima* 和壳聚糖均能发挥各自的生物学功能,

并很可能对病原菌产生协同、相互促进的效应,但这种增效作用的机制需要进一步探讨。壳聚糖浓度 $>0.3\%$ (w/v)时,*M. pulcherrima* 在冬枣果实上的生长显著被抑制,尤其是壳聚糖的浓度为 0.5% (w/v)时,与对照组相比,对*M. pulcherrima* 的抑制效力下降了大约1.75个数量级,水溶性壳聚糖可能起了主要的作用,而*M. pulcherrima* 仅起次要的作用。壳聚糖浓度小于 $<0.01\%$ (w/v)时,*M. pulcherrima* 与壳聚糖联合处理的效果与*M. pulcherrima* 单独处理相比没有显著抑制作用,说明,此时可能主要以*M. pulcherrima* 的生物活性为主,壳聚糖对病害抑制的贡献量相对较小。

壳聚糖在体内和体外试验条件下对拮抗酵母菌效应是不同的,这与文献中对水杨酸及钼酸铵研究结果有相类同之处^[16-17],由于体外试验常常忽略了在体内试验中的许多关键性因素,如环境条件、寄主等对试验结果的影响等,所以,获得的结果并不能完全反应实际的情况。

综上所述,*M. pulcherrima* 与适当浓度的水溶性壳聚糖能够有效的结合,能增强对冬枣采后真菌病害(青霉病)的控制效果,可为新疆有机果蔬的生物防治提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] 李红叶. 果蔬采后病害生物防治研究进展[J]. 生物防治通报, 1993, 9(4): 176-180.
- [2] 于帅, 刘天明, 魏泓. 拮抗酵母菌对果蔬采后病害生物防治的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(9): 402-405.
- [3] 耿鹏, 杨柳, 郝卫宁, 等. 拮抗酵母菌控制果蔬采后病害的研究进展[J]. 北方园艺, 2010(20): 220-225.
- [4] 周雅涵, 罗杨, 曾凯芳. 拮抗酵母菌对果蔬采后病害生物防治途径及机理研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 362-365.
- [5] JANISIEWICZ W J, KORSTEN L. Biological control of Postharvest diseases of fruits [J]. Annual Review of PhytoPathology, 2002, 40: 411-441.
- [6] 林晓敏, 谭晓荣. 拮抗酵母菌防治果蔬采后病害的研究[J]. 北方园艺, 2015(1): 182-186.
- [7] 卢黄娉. 几丁质对海洋酵母 *Rhodospiridium paludigenum* 果实采后病害防治效力的影响及相关机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [8] 戴莹, 王纪华, 韩平, 等. 拮抗酵母菌复合保鲜技术在果蔬保鲜中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(3): 742-746.
- [9] 余挺. 提高罗伦隐球酵母拮抗效力的途径及其机理的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [10] 黄国宏. 壳聚糖及其衍生物在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(8): 131-134.
- [11] EL G A, SMILANICK J L, WILSON C L. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2000(19): 103-110.
- [12] SHARMA N, VERMA U, AWASTHI P. A combination of the yeast *Candida utilis* and chitosan controls fruit rot in tomato caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and *Geotrichum candidum* Link ex Pers [J]. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2006, 81: 1052-1056.
- [13] 吴刚, 夏文水. 壳聚糖结构对抗菌性能的影响[J]. 食品工业科技, 2005, 26(5): 53-55.
- [14] RABEA EI, BADAWEY M E T, STEYENS C V, et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action [J]. Biomacromolecules, 2003(4): 1457-1465.
- [15] ZHAN H Y, ZHENG X D, FU C X, et al. Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2005(35): 79-86.
- [16] KHANAM N N, UENO M, KIHARA J, et al. Suppression of red light-induced resistance in broad beans to *botrytis cinerea* by salicylic acid [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2005, 66: 20-29.
- [17] WAN Y, TIAN S P. Integrated control of postharvest diseases of pear fruits using antagonistic yeasts in combination with ammonium molybdate [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85: 2605-2610.

Effect of Water-soluble Chitosan on Antagonist *Metschnikowia pulcherrima*

GUO Dongqi, SHEN Yongjuan

(College of Life Science, Tarim University/Xinjiang Production & Construction Group Key Laboratory of Agricultural Products Processing in Xinjiang, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Taking winter jujubes as test material, the inhibiting effect of *Metschnikowia pulcherrima* on control, blue mould of winter jujube by using water-soluble chitosan was studied by adopting the method of *in vitro* and *in vivo* tests. The results showed that the water-soluble chitosan could significantly inhibit germination of *Penicillium citrinum* spore, when the concentration of water-soluble chitosan was more than 0.3% (w/v), the germination of *P. citrinum* spore was inhibited completely. In NYDB medium, the concentration of water-soluble chitosan was 0.04% (w/v) or more, the growth of *M. pulcherrima* was strongly inhibited, while in NYDA (solid medium), the growth of *M. pulcherrima* was significantly inhibited in the range of $0.1\% - 0.9\%$ (w/v) water-soluble chitosan concentration. In the wound of winter jujube, the water-soluble chitosan concentration of 0.1% or less had no significant effect on the growth of *M. pulcherrima*, the combination of water-soluble chitosan concentration of 0.1% with *M. pulcherrima* had the best inhibiting effect on blue mould of winter jujube.

Keywords: *Metschnikowia pulcherrima*; water-soluble chitosan; winter jujube