

# 拮抗酵母菌在鲜枣表面定殖能力的研究

郭东起<sup>1,2</sup>, 詹绪芳<sup>1</sup>

(1. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 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“圆脆”鲜枣为试材,对拮抗酵母菌(美极梅奇酵母菌)在其表面的定殖情况进行了研究。结果表明:高的接种浓度( $10^8$  cfu/mL)、贮藏环境中高的相对湿度(RH 95%~100%)更利于美极梅奇酵母菌在“圆脆”表面的定殖,其在 25℃ 时定殖能力强于在 5℃ 时;接种病原菌对美极梅奇酵母菌定殖能力有一定影响,特别是在接种病菌 24 h 后再接种美极梅奇酵母菌,其定殖能力显著下降;增效因子能提高美极梅奇酵母菌的定殖能力,尤其是 0.2%(w/v)的丙酸钙能显著增强美极梅奇酵母菌在“圆脆”表面定殖能力。

**关键词:**鲜枣;拮抗酵母菌;定殖

**中图分类号:**S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)15-0136-04

长期以来,防治果蔬采后病害主要是使用化学杀菌剂防腐保鲜,这造成了农药残留,严重污染了环境,损害了人体健康,导致病原菌产生了抗药性<sup>[1]</sup>。因此,寻求一种能代替化学农药的安全、无毒、经济、有效的保鲜新技术的新方法已成为当务之急。利用微生物进行生物防治是目前果蔬采后病害控制研究的热点之一。近几年来,拮抗酵母菌对果蔬采后病害生物防治越来越受到人们的重视。生防微生物在果蔬表面的定殖能力与防病效果关系密切,只有定殖能力强的拮抗酵母菌才能充分发挥其空间、营养竞争和代谢抗菌物质抑制病菌的作用<sup>[2-4]</sup>。

近几年来,新疆特色农产品深加工兵团重点实验室筛选了 1 株对鲜枣采后贮藏主要病害具有拮抗作用的生防酵母菌-美极梅奇酵母菌<sup>[5]</sup>,该生防酵母菌能否适应鲜枣贮藏期的生态环境,能否在鲜枣表面定殖尚不明确。故对该酵母菌在鲜枣“圆脆”表面的定殖能力及其影响因素进行了研究,旨在为该酵母菌用于新疆鲜枣采后贮藏保鲜提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为新疆鲜枣“圆脆”,采于农一师 10 团,选择成熟度一致(7~8 成熟)、大小均一、无病虫害及机械损伤的果实,当天运回实验室,并贮藏于恒温( $0\pm 2$ )℃、相对湿度 85%~90%的冷库预冷,待用。试验用的鲜枣

“圆脆”用清水洗净后放入 2%次氯酸中浸泡 1 min,捞出后再用清水冲洗干净,自然晾干备用。

橘青霉(*Penicillium citrinum*)是引起冬枣采后贮藏过程中青腐病的主要病原菌。无菌操作条件下,将病原真菌转接到 PDA 固体培养基上,28℃ 培养 7 d,然后在洁净工作台用接种环在平板上刮取适量孢子,转移到 10 mL 含 0.05% Tween-80 的无菌水中,并用无菌纱布过滤,以滤去其菌丝体。血球计数板法计数,调整病原菌孢子数为  $1\times 10^4$  spores/mL,保存待用。

美极梅奇酵母菌(*Metschnikowia pulcherrima*)为该实验室从新疆冬枣的表面筛选出的拮抗酵母菌,由生工生物工程(上海)有限公司鉴定。在无菌操作条件下,从美极梅奇酵母菌 YDP 斜面上用接种环挑取 2 环菌种,接种到装 300 mL NYDB 液体培养基的 500 mL 三角瓶内,28℃ 下振荡(140 r/min)培养 36 h 后,离心(12 000 r/min,10 min)收集菌体,并用无菌的生理盐水(0.85% NaCl)洗涤酵母菌体 2 次,最后用无菌的生理盐水洗下酵母菌,制成酵母菌悬液,用血球计数板计数,用无菌的生理盐水调整至所需浓度,冰箱保存待用。

**PDA 培养基:**称取 200 g 马铃薯,洗净去皮切成小块,加水煮沸 0.5 h,纱布过滤,再加 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂条,溶化后补足水至 1 000 mL,121℃ 灭菌 15 min。

**YPD 培养基:**溶解 10 g 酵母膏,20 g 蛋白胨于 1 000 mL 水中,121℃ 灭菌 15 min,再加入 100 mL 20 g 葡萄糖(葡萄糖溶液灭菌后加入)。

**PDAY 培养基:**称取 200 g 马铃薯,洗净去皮切成小块,加水 1 000 mL 煮沸 0.5 h,纱布过滤,再加 20 g 葡萄糖、1 g 酵母浸膏和 20 g 琼脂,补充水至 1 000 mL,121℃ 温度条件下灭菌 15 min。

**NYDB 培养基:**牛肉膏 8 g,酵母浸膏 5 g,葡萄糖 10 g,水 1 000 mL,121℃ 灭菌 15 min。

**第一作者简介:**郭东起(1975-),男,河南人,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:**2014-04-17

## 1.2 试验方法

1.2.1 生防酵母菌处理浓度对其定殖的影响 将处理过的鲜枣“圆脆”用浓度为  $10^8$ 、 $10^6$ 、 $10^4$  cfu/mL 美极梅奇酵母菌悬液浸泡 2 min, 取出自然晾干, 分组装入不同的水果保鲜袋。每个处理 300 个果实, 将处理后的各组鲜枣置于  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , RH  $(90 \pm 5)\%$  的环境下贮藏, 每个处理在第 1、3、6、10、15 天各取 10 个鲜枣, 无菌操作条件下, 分别放入加了 100 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶内置于微型振荡器上振荡 15 min, 然后按 GB 4789.15-2010《食品微生物学检验 霉菌和酵母菌计数》进行操作计数。重复 3 次, 求平均值<sup>[6]</sup>。

1.2.2 温度对生防酵母菌定殖的影响 根据鲜枣“圆脆”储藏期的温度特点, 将用浓度为  $10^8$  cfu/mL 的美极梅奇酵母菌悬液处理 2 min 的鲜枣, 分别置于  $5^\circ\text{C}$  (RH=95%)、 $25^\circ\text{C}$  (RH=95%) 条件下, 于第 1、3、6、10、15 天检测酵母菌数量, 方法同上。重复 3 次, 求平均值。

1.2.3 湿度对生防酵母菌定殖的影响 将用浓度为  $10^8$  cfu/mL 的美极梅奇酵母菌悬液浸泡 2 min 的鲜枣, 取出自然晾干, 分组装入不同的水果保鲜袋。处理分为 3 组分别置于相同温度 ( $25^\circ\text{C}$ ) 不同湿度 (RH 35%~40%、RH 65%~70% 与 RH 95%~100%) 的条件下贮藏, 然后于第 1、3、6、10、15 天检测酵母菌数量, 方法同上。重复 3 次, 求平均值。

1.2.4 接种病菌对生防酵母菌定殖的影响 病原菌(橘青霉)及拮抗酵母菌均采用喷雾法接种, 试验设 4 组处理, 处理 1: 仅接种美极梅奇酵母菌 ( $10^8$  cfu/mL); 处理 2: 接种病原菌孢子 ( $1 \times 10^4$  spores/mL) 24 h 后接种美极梅奇酵母菌; 处理 3: 美极梅奇酵母菌接种 24 h 后接种病原菌; 处理 4: 病原菌与美极梅奇酵母菌同时接种。所有经处理的鲜枣“圆脆”晾干后分组装入保鲜袋, 置于温度  $25^\circ\text{C}$ 、RH 95% 的环境下贮藏, 贮藏一定时间检测酵母菌数量, 方法同上。重复 3 次, 求平均值<sup>[7]</sup>。

1.2.5 增效因子对生防酵母菌定殖的影响 丙酸钠、丙酸钾、丙酸钙分别溶解于生防酵母菌液 (浓度为  $10^8$  cfu/mL) 中, 添加量均为 0.2% (w/v)。处理 1: 仅接种生防酵母菌液; 处理 2: 接种含有丙酸钠的生防酵母菌液; 处理 3: 接种含有丙酸钾的生防酵母菌液; 处理 4: 接种含有丙酸钙的生防酵母菌液。处理的鲜枣“圆脆”晾干后分组装入保鲜袋, 置于温度  $25^\circ\text{C}$ 、RH 95% 的环境下贮藏, 贮藏一定时间 (1、3、6、10、15 d) 后检测酵母菌数量, 方法同上。重复 3 次, 求平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 生防酵母菌处理浓度对其定殖的影响

美极梅奇酵母菌在鲜枣“圆脆”的表面定殖能力与其初始浓度密切相关, 生防酵母菌悬液浓度越高, 其定殖效果越好。由图 1 可知, 随着贮藏时间的延长拮抗酵母菌在“圆脆”表面的定殖数量逐渐减少, 接种高浓度

( $10^8$  cfu/mL) 酵母菌的处理下降趋势缓慢, 第 15 天检测的菌量达  $\lg 6.16$  cfu/mL ( $1.45 \times 10^6$  cfu/mL), 低浓度 ( $10^4$  cfu/mL) 的处理在“圆脆”表面的定殖数量下降较快。

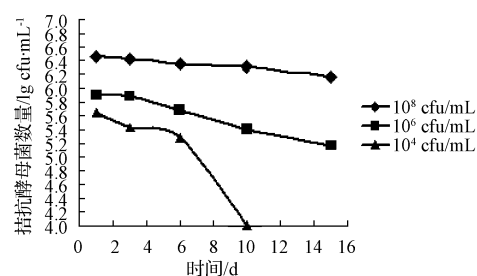


图 1 不同浓度生防酵母菌对其定殖的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations on colonization of bio-control yeast

### 2.2 温度对生防酵母菌定殖的影响

由图 2 可以看出, 随着贮藏天数增加酵母菌数量逐渐减少, 与贮藏温度为  $5^\circ\text{C}$  相比,  $25^\circ\text{C}$  处理有利于酵母菌在鲜枣表面的定殖, 在第 15 天时, 鲜枣表面的菌量为  $\lg 6.40$  cfu/mL。

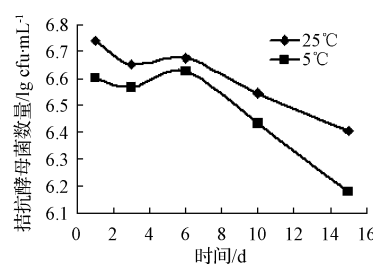


图 2 温度对生防酵母菌定殖的影响

Fig. 2 Effect of temperature on colonization of bio-control yeast

### 2.3 湿度对生防酵母菌定殖的影响

由图 3 可以看出, 不同湿度处理对酵母菌的定殖能力影响不同, 与低湿度 (RH 35%~40%) 贮藏相比, 高湿度 (RH 95%~100%) 贮藏条件下有利于生防酵母菌在鲜枣表面的定殖, 第 15 天检测时, 酵母菌数量为  $\lg 6.30$  cfu/mL, 因此, 生防酵母菌用于鲜枣贮藏时, 应尽量保持高湿度的条件, 这样利于其定殖, 更好的发挥其生防效果。

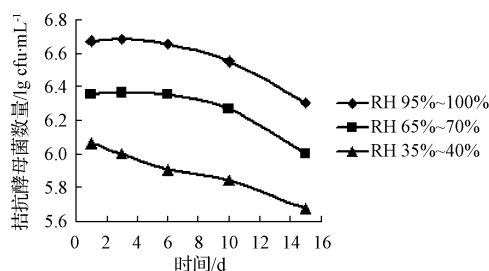


图 3 湿度对生防酵母菌定殖的影响

Fig. 3 Effect of humidity on colonization of bio-control yeast

## 2.4 接种病原菌对生防酵母菌定殖的影响

由图4可以看出,接种病原菌对美极梅奇酵母菌在鲜枣“圆脆”表面的定殖影响随病原菌接种先后顺序而不同。接种美极梅奇酵母菌24 h后,再接种橘青霉对美极梅奇酵母菌定殖影响较小,到第15天时酵母菌数量仍为lg 5.90 cfu/mL;而接种橘青霉24 h后再接种美极梅奇酵母菌,生防酵母菌定殖能力较差,酵母菌数量直接从第3天的lg 5.95 cfu/mL降到第10天的lg 4.60 cfu/mL,而到第15天时“圆脆”的表面因长橘青霉菌而无法检测出酵母菌,这可能与生防菌与病原菌直接的营养竞争有关系。

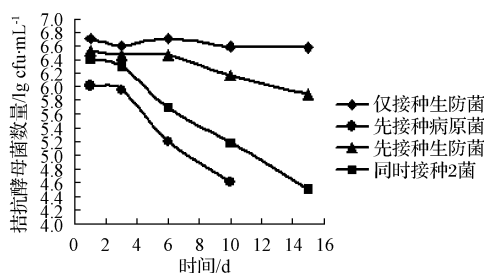


图4 接种病菌对生防酵母菌定殖的影响

Fig. 4 Effect of pathogen on colonization of bio-control yeast

## 2.5 增效因子对生防酵母菌定殖的影响

添加增效因子有利于生防酵母菌在鲜枣表面的定殖,由图5可知,生防酵母菌菌悬液中分别添加0.2%(w/v)丙酸钠、0.2%(w/v)丙酸钾及0.2%(w/v)丙酸钙,其在鲜枣“圆脆”表面的定殖效果比仅接种生防酵母菌的定殖效果好,尤其是添加0.2%(w/v)丙酸钙的生防酵母菌悬液在“圆脆”表面定殖能力增强更加明显,到第15天生防酵母菌数量仍为lg 6.79 cfu/mL,下降趋势弱。

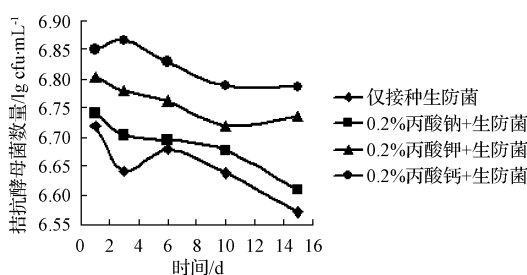


图5 增效因子对生防酵母菌定殖的影响

Fig. 5 Effect of synergistic factors on colonization of bio-control yeast

## 3 讨论与结论

Kloepper等<sup>[8]</sup>认为,生防酵母菌在靶植物位点上能否有效定殖是其能否稳定、持久发挥防效的一个重要因素。殷幼平等<sup>[9]</sup>研究表明,许多生防酵母菌在植物体内无法有效定殖而失去应用价值。同样,生防酵母菌的防病效果与其在果蔬表面定殖的数量有一定相关性,因此,要更好的发挥美极梅奇酵母菌防治鲜枣“圆脆”贮藏

期病害的效果,就需要研究该菌的定殖情况。

试验表明,拮抗酵母菌(美极梅奇酵母菌)能在鲜枣“圆脆”果面定殖,说明这种生防酵母菌对“圆脆”表面的微生态环境具有较好的适应性。又因为其对水果贮藏期重要病害橘青霉病有一定的防治作用<sup>[5]</sup>,因此,该生防酵母菌具有防治水果贮藏期病害的潜力。生防细菌在植物体表的定殖容易受细菌引进的浓度和温度、湿度等环境因子的影响<sup>[6,10]</sup>,美极梅奇酵母菌在鲜枣“圆脆”果面的定殖同样也受到上述因子的影响,需要注意的是,有利于生防酵母菌定殖的环境条件往往也利于病原菌生长,相对较高的温度和湿度对美极梅奇酵母菌的定殖有利,但高温高湿也能够促进病原菌生长,同时较高的温度会增强水果的代谢活动,使其品质下降。因此,必须进一步明确环境条件对促进生防酵母菌定殖、抑制病原菌生长和减缓水果代谢作用的机理,以及对三者影响的综合效应,在此基础上优化环境条件,使其既有利于生防酵母菌的定殖,又有利于水果的贮藏,这样才能稳定和提生防酵母菌的防病效果<sup>[7]</sup>。

除了环境条件影响拮抗酵母菌的定殖能力外,“圆脆”表面的病原菌对美极梅奇酵母菌的定殖也有一定的影响,特别是接种病原菌24 h后,再接种美极梅奇酵母菌,其定殖能力较差。这可能是病原菌与美极梅奇酵母菌在鲜枣“圆脆”表面产生营养与空间竞争的结果,同时,也表明,美极梅奇酵母菌用于鲜枣贮藏保鲜过程中,应该先对鲜枣进行清洗消毒,除去果实表面的病原菌,这样有利于更好的发挥其生防效果。

从现有的一些商品化的化合物中寻找对美极梅奇酵母菌在果实表面上的定殖具有增效功能的因子是目前较为直接和简易的方法,从中找到一些具有明显增效作用的因子对美极梅奇酵母菌定殖有及其重要的作用,这些增效因子包括丙酸钠、丙酸钾、丙酸钙等。添加增效因子后美极梅奇酵母菌在“圆脆”表面的定殖能力明显增强,将来有助于开发商业用生防制剂。

随着生防酵母菌接种浓度的增高,其在“圆脆”表面的定殖能力逐渐增强,25℃贮藏条件下生防酵母菌的定殖能力强于5℃时的定殖能力,高湿度(RH 95%~100%)更有利于生防酵母菌的定殖,接种病原菌降低了生防酵母菌在“圆脆”表面的定殖能力,添加丙酸钠、丙酸钾、丙酸钙都能提高生防酵母菌的定殖能力。

## 参考文献

- [1] 苏月梅. 应用拮抗微生物防治枣采后病害的研究进展[J]. 落叶果树, 2013, 45(5): 29-30.
- [2] Yuen G Y, Godoy G, Steadman J R, et al. Epiphytic colonization of dry edible bean by bacteria antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and potential for biological control of white mold disease[J]. Biological Control, 1991, 1(4): 293-301.
- [3] 朱丽娅, 邵海燕, 陈杭君, 等. 拮抗菌防治果疏采后病害的概况[J]. 浙江农业科学, 2013(7): 853-857.



# 微波提取山药黄酮的方法研究

徐 东 生

(湖北工程学院 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室,湖北 孝感 432000)

**摘 要:**以山药为试材,用微波消解仪提取黄酮,分光光度法测定黄酮含量,采用单因子试验及正交实验方法研究山药黄酮的最佳提取条件。结果表明:微波提取山药黄酮最适条件是乙醇浓度 60%,提取温度 95℃,料液比 1:20 g/mL,提取时间 20 min,黄酮提取率达 0.428%,各因子对提取效果影响的大小顺序是微波温度>料液比>乙醇浓度,提取时间对黄酮提取率影响不大。

**关键词:**山药;微波;黄酮

**中图分类号:**S 632.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)15-0139-03

山药属薯蓣科植物薯蓣(*Dioscorea opposita* Thunb)的根茎,药食两用,药用和滋补价值均很高<sup>[1-2]</sup>,市场需求量不断增加。山药的药用价值与其多糖、黄酮等多种营养物质有关,黄酮在医学和保健等方面有重要价值,是

目前研究的热点。研究山药黄酮的提取方法对于充分发挥山药的药用价值,筛选优质山药资源等研究有积极作用。黄酮的提取方法很多,常用的方法有回流和索氏提取,这些方法耗时长,通常要 6~8 h。周厚良等<sup>[3]</sup>、吕鹏等<sup>[4]</sup>分别用热浸提和超声波的方法对山药黄酮的含量进行了研究,随着微波炉的普及,人们发现利用微波提取植物黄酮省时、高效、节能,该方面的研究在枸杞等植物上报道较多<sup>[5]</sup>,但鲜见用于山药黄酮的研究,该研究以山药为原料利用微波提取山药黄酮,以期为其工艺条件优化提供理论依据。

**作者简介:**徐东生(1955-),男,湖北武汉人,高级实验师,现主要从事植物方面的研究工作。E-mail:1377994531@qq.com.

**基金项目:**特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放基金资助项目(2013k16)。

**收稿日期:**2014-04-10

[4] 刘普,方静凡,程运江,等.生防酵母菌防治果品采后病害机理的研究进展[J].华中农业大学学报,2013,32(2):134-140.

[5] 郭东起,赵萍,侯旭杰.冬枣采后病害生物防治用拮抗酵母菌的筛选[J].保鲜与加工,2011,11(6):6-9,13.

[6] 童蕴慧,纪兆林,徐敬友,等.灰葡萄孢拮抗细菌在番茄植物体表的定殖[J].中国生物防治,2003,19(2):78-81.

[7] 凌箴,纪兆林,张纪兵,等.地衣芽孢杆菌 W10 在苹果和柑橘果实表面的定殖[J].果树学报,2009,26(6):851-854.

[8] Kloepper J W, Kuc J A. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions[J]. Phytopathology, 1981,71(6):642-644.

[9] 殷幼平,袁训娥,李强,等.生防菌枯草芽孢杆菌 CQBS03 的绿色荧光蛋白基因标记及其在柑橘叶片上的定殖[J].中国农业科学,2010,43(17):3555-3563.

[10] 陈志谊,苗东华.拮抗细菌的定殖、浓度和喷施期与水稻纹枯病的关系[J].江苏农业学报,1998,14(1):31-35.

## Study on Colonization Ability of Antagonistic Yeasts on the Surface of Fresh Jujubes

GUO Dong-qi<sup>1,2</sup>, ZHAN Xu-fang<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. Production and Construction Group Key Laboratory of Agricultural Products Processing in South Xinjiang, Alar, Xinjiang 843300)

**Abstract:** Taking 'Yuancui' jujubes as test material, the colonization ability of antagonistic yeasts (*Metschnikowia pulcherrima*) on the surface of fresh jujubes was studied. The results showed that higher concentrations of *M. pulcherrima* ( $10^8$  cfu/mL) applied, and relative humidity (RH 95%~100%) in preservation period of fruit, the more favorably colonized *M. pulcherrima* on fresh jujubes surface, the colonization ability of it was at 25℃ much more than at 5℃, pre-inoculation of pathogen had a negative effect of *M. pulcherrima*. Especially, the colonization ability of *M. pulcherrima* was decreased significantly then the inoculation the fungus 24 h after inoculation *M. pulcherrima* on fresh jujube surface. The synergistic factors could improve its colonizing ability, especially calcium propionate(0.2%w/v) could improve its colonizing ability stronger.

**Key words:** fresh jujube; antagonistic yeasts; colonization