几丁质诱导汉逊德巴利酵母拮抗活性的研究

闫岩，王明力，李岑，陆雅丽
（贵州大学化学与化工学院，贵州省发酵工程与生物制药省重点实验室，贵州贵阳 550025）

摘要：为了提高拮抗酵母 *Debaryomyceshansenii* 的生物防治能力，通过体外(*in vitro*)和体内(*in vivo*)试验，用不同浓度的几丁质跟酵母混合，研究对采后柑橘青霉病(*Penicilliumdititatum*)的生防效果，以及几丁质对酵母生长繁殖的影响和对几丁质酶的诱导情况。试验结果表明，酵母与几丁质混合后，对柑橘青霉病的防治有显著提高，其中，酵母(10^7 CFU/mL)与 1.2%几丁质混合使用对柑橘青霉病的效果最佳，6 d 后刺伤试验的发病率和浸泡试验的腐烂指数分别为 15.51%和 14.62%，比单独使用酵母(10^7CFU/mL)降低了 21.13%和 14.76%。在液体培养基中加入几丁质对酵母菌的生长繁殖无显著影响，几丁质对酵母在柑橘伤口的生长繁殖均有一定刺激作用，以 1.2%的几丁质刺激作用最强，1.2%和 1.4%的几丁质与酵母混合都能诱导几丁质酶活性上升。表明 *D.hansenii* 与几丁质与混合后，对柑橘采后青霉病的防治有潜在的应用价值。

关键字：拮抗酵母菌，几丁质，生物防治，生长动态，酶活性
文章篇号：1673-9078(2014)1-91-95

Antagonistic Activity of *Debaryomyceshansenii* Induced by Chitin

YAN Yan, WANG Ming-li, LI Cen, LU Ya-li
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guiyang 550003, China)

Abstract: To improve the biocontrol efficacy of antagonistic yeast *Debaryomyceshansenii (D.hansenii)*, the combination of the yeast with different concentrations of chitin against postharvest diseases caused by *Penicilliumdititatum(P.dititatum*than) in orange fruits were investigated *in vitro* and *in vivo*. Meanwhile, the population dynamics of *D.hansenii* and the activity changes of chitinas were tested. The results showed that combining *D.hansenii* with chitin provided more effective control on *P.dititatum*than than that only using the antagonistic yeast, and *D.hansenii* combined with 1.2% chitin showed the best effect. The disease incidence rate and decay index were 15.51% and 14.62%, respectively after 6 days. Chitin at different concentrations had less inhibit effects on the growth and proliferation of *D.hansenii* in NYDB medium. The chitin (1.2%) in wounded oranges showed the strongest stimulus for the growth of *D.hansenii*. And *D.hansenii* with 1.2% or 1.4% chitin had a positive effect on inducing the increasing activity of chitinas in orange fruits. Therefore, the combination of *D.hansenii* with chitin may have great potential value against green mold of orange fruits.

Key words: antagonistic yeast; chitin; biocontrol; dynamic; enzymatic activities

柑橘鲜美可口，营养健康，是人们生活中喜爱的水果，据 FAO 资料统计，柑橘在全球的种植面积和产量均居水果前列，年产亿吨左右[1]。由于机械伤害，组织衰老，生理失调等原因，柑橘容易受到致病菌的浸染而霉变，造成的损失一般为 10%左右，有的高达 30%以上，不仅损害了经济，也严重影响到果实品质。目前用于柑橘采后真菌病害防治的主要是化学杀菌剂，化学制剂虽然使用便捷、效率高、广谱性强，但是会使致病菌产生耐药性，对环境和人类健康造成危害。生物防治是一种以菌治菌的方法，用环境友好型的方式来防治植物病害，对现代农业的可持续发展有重要的意义。酵母菌有繁殖速度快、在逆境中生长能力强、遗传较稳定、安全性高和抑菌较广谱等优点，成为生物防治研究热点[2],已经在苹果、枇杷等水果上得到了良好的效果[3~4]。通过外源物质诱导拮抗菌的生理代谢是提高防治效果的有效办法，有报道表明，$NaHCO_3$ 可以增强拮抗酵母 *Pichiamembranifaciens* 对梨青霉病的防治能力[5]，*Rhodotorulaglutinis* 与金属离子(Ca^{2+}、Mg^{2+})结合后可以增强对柑橘青霉病的防治[6]，壳聚糖与酵母 *Candida utilis* 配合使用可以增强番茄灰霉的抗性[7]。几丁质是壳聚糖未经过脱乙酰作用的一类多糖，广泛存在于虾蟹、昆虫的外壳和植物的细胞壁中，来源丰富，安全性高，具备多种生物学

收稿日期：2013-09-04
基金项目：国家自然科学基金项目（31060299）
作者简介：闫岩（1987-），男，硕士研究生，研究方向为果蔬储藏与加工
通讯作者：王明力（1961-），女，博士，教授，研究生导师，研究方向为食品贮藏与加工技术

特性，可以提高拮抗菌的拮抗效力[8]，据报道，在液体培养基中加入几丁质后，拮抗细菌能显著提高对芒果炭疽病的防治效果[9]。笔者的前期试验表明汉逊德巴利酵母(*Debaryomyceshansenii*)对柑橘采后青霉病有良好的生物防治效果，本试验目的是通过 *D.hanseni* 和几丁质的混合，提高 *D.hanseni* 的拮抗效力，并对相关机理，包括几丁质促进酵母生长，刺激几丁质酶分泌等进行系统研究，为柑橘采后病害的生物防治提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验柑橘

本试验所用柑橘为砂糖橘(*Citrus reticulata* Blanco)，购于贵州省贵阳市，新鲜无病虫害无机械损伤，浸泡在 2%次氯酸钠中 5 min，无菌水洗净晾干，备用。

1.1.2 拮抗酵母

汉逊德巴利酵母(*Debaryomyceshansenii*, ACCC20010)购于中国普通微生物菌种保藏中心。从试管斜面上挑取一环酵母于 30 mL NYDB(营养肉汤 8 g、酵母浸膏 5 g、葡萄糖 10 g、水 1000 mL)培养液中，27 ℃下摇床培养 24 h，3500 r/min 下离心 10 min 收集菌体，用无菌生理盐水洗涤 2 次，振荡后用血球计数板配制成 10^7 CFU/mL 和 10^8 CFU/mL 的酵母悬浮液。

1.1.3 致病菌

指状青霉（*Penicilliumdititatum*）购于中国普通微生物菌种保藏中心。PDA 培养基 28 ℃下培养 7 d 后，无菌生理盐水冲洗孢子，滤去菌丝震荡后用血球计数板制备 4×10^6 CFU/mL 青霉孢子悬液。

1.2 方法

1.2.1 几丁质在液体培养基中对酵母的影响

几丁质加水后单独灭菌，配成含几丁质浓度为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%和 1.4%的 NYDB 培养基，以不加几丁质的 NYDB 作对照（CK），接种 1 mL 酵母悬浮液（10^8 CFU/mL），27 ℃、150 r/min 下振荡培养，分别在第 1、2、3 和 4 d取样，用无菌生理盐水稀释到适当浓度，在 NYDA 上涂平板，25 ℃下培养 48h 后记数，试验结果用每毫升的酵母总数表示（lgCFU/mL）。

1.2.2 几丁质在柑橘伤口处对酵母生长动态的影响

在柑橘的最大直径处对称刺伤 4 mm×4 mm（除去表皮）的小孔，配成含几丁质浓度为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%和 1.4%的酵母细胞悬浮液（10^8 CFU/mL），以不加几丁质的悬浮液作对照（CK），于 25 ℃保湿贮藏，参考 Janisiewicz 等方法[10]测定酵母的活菌总数，将消过毒的 9 mm 打孔器在刺伤处取橘皮，置于内有 10 mL 的磷酸缓冲液（pH 6.8）的研钵中研磨匀浆，适当稀释后涂平板，25 ℃培养 48 h 记数，试验结果用伤口处总酵母数表示（lgCFU/wound）。

1.2.3 几丁质与酵母混合使用对柑橘的伤口接种试验

在柑橘的最大直径处对称刺伤 4 mm 长×4 mm 宽（除去表皮）的小孔，分组接种(30 μL)。A 组：*D.hanseni*(10^7 CFU/mL)；B 组：0.6%几丁质+*D.hanseni*(10^7 CFU/mL)；C 组：0.8%几丁质+*D.hanseni*(10^7 CFU/mL)；D 组：1.0%几丁质+*D.hanseni*(10^7 CFU/mL)；E 组：1.2%几丁质+*D.hanseni*(10^7 CFU/mL)；F 组：1.4%几丁质+*D.hanseni*(10^7 CFU/mL)；G 组：*D.hanseni*(10^8 CFU/mL)；H组：1.0%几丁质；I组：无菌水。4 h 后在伤口处接种 20 μL 青霉孢子悬液，保鲜袋单果包装后 25 ℃保湿贮藏，6 d 后测定病斑直径和发病率。

$$\text{发病率（\%）}=\frac{\text{发病总孔数}}{\text{接种总孔数}}\times100\%$$

1.2.4 几丁质与酵母混合使用对柑橘的腐烂试验

取大小一致的柑橘，分别浸泡在 A-I 共 9 组处理液中，60 s 后取出快速晾干，再均匀喷湿等量指状青霉孢子悬液，晾干后保鲜袋单果包装 25 ℃保湿培养，6 d 后统计腐烂指数和防治效率。柑橘表面青霉分级标准如下：

0 级：无青霉病；1 级：青霉病占柑橘面积≤5%；3 级：6%≤青霉病占柑橘面积≤10%；5 级：11%≤青霉病占柑橘面积≤25%；7 级：26%≤青霉病占柑橘面积≤50%；9 级：青霉病占柑橘面积≥51%

$$\text{腐烂指数（\%）}=\frac{\sum(\text{腐烂等级}\times\text{该级腐烂个数})}{\text{实验总果数}\times\text{最高腐烂等级数}}\times100\%$$

$$\text{防治效率（\%）}=\frac{\text{对照腐烂指数}-\text{实验腐烂指数}}{\text{对照腐烂指数}}\times100\%$$

1.2.5 液体培养基中几丁质酶的变化

加 1 mL *D.hanseni*（10^8 CFU/mL）到 30 mL 含几丁质浓度为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%和 1.4%的 NYDB 培养基中，以不加几丁质的 NYDB 为对照（CK），27 ℃，150 r/min 下振荡培养，分别在第 1、2、3 和 4 d 后，将培养基 3500 r/min 离心 15 min，取上清液为酶提取液，几丁质酶活性参考曹建康[11]的方法测定，

以每分钟每毫升上清液分解几丁质胶产生 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖为一个几丁质酶活性单位（U）。

1.2.6 柑橘伤口处几丁质酶活性的变化

在柑橘的最大直径处对称刺伤 4 mm 长×4 mm 宽（除去表皮）的小孔，分别接种 30 μL 无菌水、酵母悬浮液（10^8 CFU/mL）、几丁质（1.2%）+*D.hansenii*（10^8 CFU/mL）和几丁质（1.4%）+*D.hansenii*（10^8 CFU/mL），25 ℃保湿贮藏，在第 0、2、4、6 和 8 d 取伤口周围 1 cm 处橘皮，参考曹建康[11]的方法测定几丁质酶的活性，以每分钟每克柑橘分解几丁质胶产生 1 μg N-乙酰氨基葡萄糖为一个几丁质酶活性单位（U）。

1.3 数据处理与分析

试验数据采用 Excel2010 软件进行统计，并用 SPSS(20.0)软件进行 ANOVA 邓肯显著性差异分析(P<0.05)。

2 结果与分析

2.1 几丁质在液体培养基中对酵母生长的影响

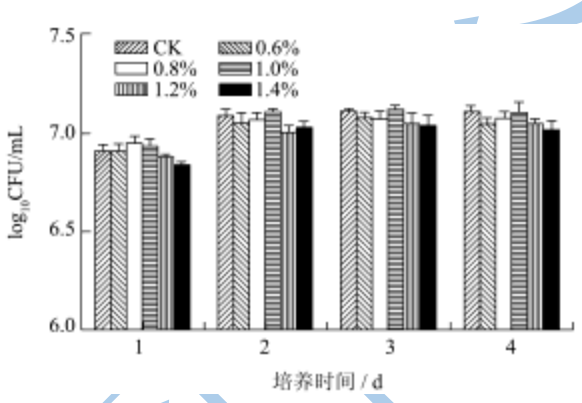


图 1 NYDB 中 *D. hansenii* 的生长情况

Fig.1 Population growth of *D.hansenii* in NYDB

由图 1 可知，第 1 d，酵母对数最大值(6.94)对应的几丁质浓度为 0.8%，最小值(6.84)的几丁质浓度为 1.2%，空白对照酵母数为 6.91，第 2 d 和第 3 d，不同浓度几丁质与培养基混合后，都只有含几丁质 1.0%培养基中的酵母数高于空白对照，分别高出 0.02 和 0.01 个对数单位，不显著(p>0.05)。第 4 d，空白对照和含几丁质 1.0%培养基的酵母数均为 7.11，含几丁质 1.4%培养基酵母数最少(7.02)，总体而言，几丁质在 NYDB 培养基中对酵母的生长繁殖没有显著影响。

2.2 几丁质在柑橘伤口处对酵母生长的影响

由图 2 可知，在柑橘伤口处添加几丁质的酵母数均高于空白对照，几丁质对酵母在柑橘伤口处的增值有显著的刺激作用（p<0.05）。第 0 d 和第 1 d，添加 1.0%几丁质的酵母对数最高，分别比空白对照高出 0.14 和 0.46 个对数单位，后 3 d 几丁质浓度为 1.2%时，酵母对数最大，最大值出现在第 3 d（8.91），比对照组高 0.42 个对数单位。

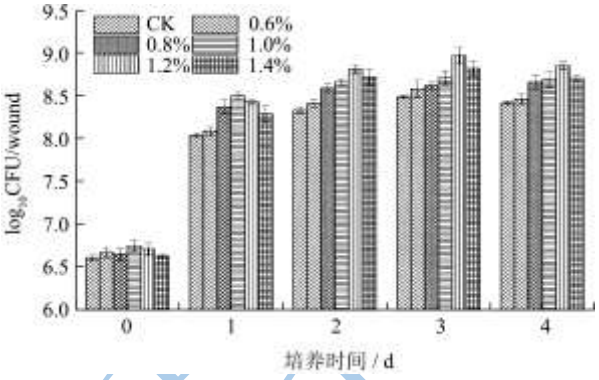


图 2 柑橘伤口处 *D. hansenii* 的生长动态

Fig.2 Population dynamics of *D.hansenii* in orange fruits

2.3 几丁质与酵母混合后在柑橘伤口试验结果

表 1 柑橘刺伤接种的病斑直径和发病率

Table 1 The lesion diameter and disease incidence in orange fruits

处理	病斑直径/mm	发病率/%
10^7CFU/mL	4.50±0.40	36.64±3.95
10^7CFU/mL+0.6%几丁质	4.00±0.50	29.32±3.18
10^7CFU/mL+0.8%几丁质	4.00±0.50	28.43±4.82
10^7CFU/mL+1.0%几丁质	3.50±0.90	27.04±2.47
10^7CFU/mL+1.2%几丁质	2.50±0.40	15.51±2.16
10^7CFU/mL+1.4%几丁质	3.50±0.70	29.33±3.57
10^8CFU/mL	2.00±0.40	8.94±2.11
1.0%几丁质	14.0±0.80	83.15±6.91
无菌水	14.50±1.10	92.17±7.21

由表 1 可知，只要有几丁质混合，均能增强酵母对柑橘青霉病的抑制效果，降低柑橘的病斑直径和发病率，说明几丁质可以辅助酵母对青霉的抑制作用。其中 1.2%几丁质的混合效果最佳，10^7 CFU/mL+1.2%几丁质的病斑直径和发病率为 2.50 mm 和 15.51%，比单独使用酵母(10^7 CFU/mL)分别降低 2.0 mm 和 21.13%，但与更高浓度的酵母(10^8 CFU/mL)相比，病斑直径和发病率还是有显著差异(p<0.05)。

2.4 几丁质与酵母混合后柑橘发病试验结果

由表 2 可知，1.0%几丁质和无菌水处理后柑橘的腐烂指数高达 90.47%和 96.16%，显著高于有酵母存在的情况($p<0.05$)，10^7 CFU/mL 的酵母与不同浓度几丁质混合使用后，防治效率不同程度得到了提高，其中 1.2%几丁质表现出对酵母最佳的辅助效果，浸泡于 10^7 CFU/mL+1.2%几丁质中的柑橘，腐烂指数为 14.62%，防治效率为 84.82%，比单独有 10^7 CFU/mL 酵母时的腐烂率低 14.76%，但却比高浓度酵母(10^8 CFU/mL)的腐烂指数高 6.79%。

表 2 柑橘的腐烂指数和防治效率

Table 2 The decay index and control efficacy in orange fruit

处理	腐烂指数/%	防治效率/%
10^7CFU/mL	29.38±5.21	69.57±4.23
10^7CFU/mL+0.6%几丁质	29.11±4.84	69.77±3.91
10^7CFU/mL+0.8%几丁质	25.39±4.26	73.73±4.41
10^7CFU/mL+1.0%几丁质	22.80±3.29	76.35±4.18
10^7CFU/mL+1.2%几丁质	14.62±2.56	84.82±1.94
10^7CFU/mL+1.4%几丁质	18.07±2.21	81.33±2.50
10^8CFU/mL	7.83±2.85	91.99±2.34
1.0%几丁质	90.47±7.90	2.81±8.82
无菌水	96.16±10.66	-

2.5 液体培养基中几丁质酶的活性

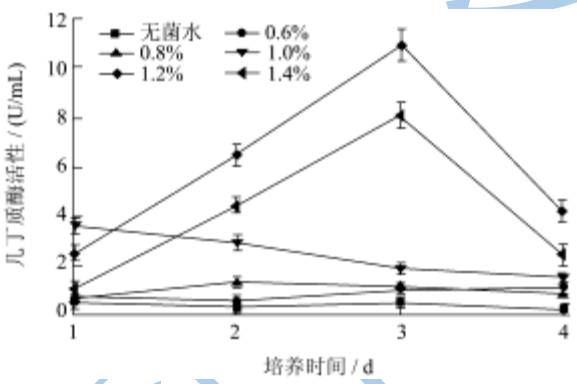


图 3 NYDB 中几丁质酶活性的变化

Fig.3 Changes of chitinase activity in NYDB medium

由图 3 可知，酵母在没有添加几丁质时，培养基上清液中的几丁质酶活极不显著($p>0.05$)，当培养基中添加的几丁质浓度较低时(0.6%和 0.8%)，上清液中几丁质酶活性也没有明显增强，1.0%的几丁质在第 1 d 明显提高了酶活，为 3.62 U，但是后来酶活逐渐降低，到第 4 d 时仅为 0.84 U，添加几丁质 1.2%和 1.4%的培养基，酶活性活性显著提高($p<0.05$)，在前 3 d 大幅度上升，都在第 3 d 达一个明显的最高峰，分别为 10.89 U 和 8.07 U，然后在第 4d 迅速下降，最终酶活为 4.15 U 和 2.41 U。

2.6 柑橘伤口处几丁质酶的活性

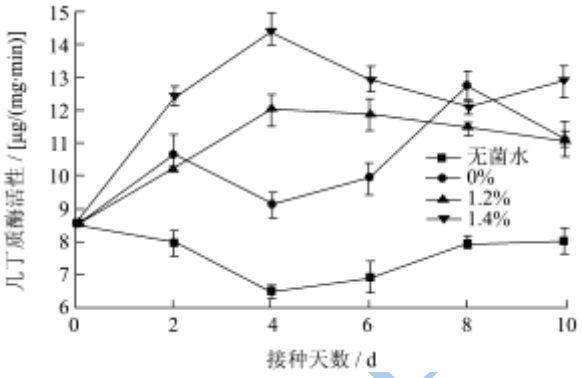


图 4 柑橘伤口处几丁质酶活性的变化

Fig.4 Changes of chitinase activity in wounded orange fruits

由图 4 可知，没有接种酵母的柑橘，几丁质酶的活性一直较低，酵母接种实验明显提高了酶活($p<0.05$)，单独接种酵母时，柑橘分别在第 2 d 和第 8 d 出现了明显的两个峰值，分别为 10.63 U 和 12.76 U，且第二个峰值为接种期间的最高酶活，比第 0d 高出 4.23 U，是对照的 1.61 倍.酵母与几丁质混合后，柑橘都在第 4 d 达到最高酶活，其中含有 1.4%几丁质的酵母有最高酶活(14.44 U)，比第 0 d 高 5.91 U，比单独接种酵母的最高酶活高 2.23 U，且酶活在接种期间一直保持了高活性。

3 结论

3.1 几丁质已被美国 EPA 和 FDA 批准作为生物防腐剂和食品添加剂使用，在国内目前已成功运用在了医药、化工、保健食品等方面，一般认为，几丁质可以诱导一些微生物产生几丁质酶[12]，拮抗菌对果蔬进行生物防治的作用机理比较复杂，酵母快速生长繁殖竞争营养和空间是生防作用的主要机制，同时，酵母分泌的包外水解酶，如几丁质酶，可以分解病原菌的细胞壁和菌丝，也被认为是拮抗菌抑病机理之一。目前为止，国内外筛选出的拮抗菌已经有几十种，都达到了一定的防治效果，但仍然没有化学杀菌剂明显，而将拮抗菌与增效因子混合使用可以显著提高拮抗效力，逐渐成为研究热点。

3.2 从试验结果看，*D.hansenii* 与几丁质混合后，局部的刺伤试验和覆盖全部果实的浸泡试验都表现出了积极的生防作用，以浓度为 1.2%的几丁质与酵母混合后表现出的效果最佳，10^7 CFU/mL+1.2%几丁质处理后的柑橘，在刺伤试验中，病斑直径和发病率仅为 2.50 mm 和 15.51%，在浸泡试验中，腐烂指数 14.62%，防治效率 84.82%，相比单独接种同浓度酵母的效果好，但不如高浓度酵母(10^8 CFU/mL)处理柑橘的防治效果，表明在拮抗效力方面，酵母时主要因素，几丁质只能起到辅助增强的作用。添加几丁质后，可以显著

提高酵母在柑橘伤口处的生长繁殖力，酵母数最多所对应的几丁质浓度为几丁质的最佳混合浓度(1.2%)，表明拮抗菌在果实伤口处的数量与生防效力存在直接的相关性，与 Droby 等研究结果一致[13]，几丁质作为激发因子使液体培养基和柑橘伤口处的几丁质酶得到提高，对酵母的拮抗作用有积极作用，而关于 *D.hansenii* 与几丁质配合的协同抑病机理仍有待于进一步研究。

参考文献

[1] 许萍.拮抗细菌 RY3 对柑橘绿霉病菌拮抗活性及机理研究[D].上海:上海师范大学,2012
Xu P. Research of Activity and Mechanism on *Penicilliumdigitaum* by Antagonistic Bacteria RY3 [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2012

[2] Fleet G H. Yeasts in Foods and Beverages:Impact on Product Quality and Safety [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2007, 18(2): 170-175

[3] Janisiewicz W J, Saftner R A, Conway S C, et al. Control of Blue Mold Decay of Apple during Commercial Controlled Atmosphere Storage with Yeast Antagonists and Sodium Bicarbonate [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 49(3): 374-378

[4] Cao S F, Zheng Y H, Wang K T, et al. Effect of Yeast Antagonist in Combination with Methyl JasmonateTreatment on Postharvest Anthracnose Rot of Loquat Fruit [J]. Biological Control, 2009, 50(1): 73-77

[5] Cao S Y, Yuan Y J, Hu Z C, et al. Combination of *Pichiamembranifaciens* and Ammonium Molybdate for Controlling Blue MouldCaused by *Penicilliumexpansum* in Peach Fruit [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 141(3): 173-176

[6] 孙萍,郑晓冬,张印红,等.粘红酵母与金属离子结合使用对柑橘采后青霉病的抑制效果[J].果树学报,2003,20(2): 169-172
Sun P, Zheng X D, Zhang Y H, et a1. Effects of *Rhodotorulaglutinis* in Combination with Metal Cation on Biocontrol of Postharvest Disease in Citrus [J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(2): 169-172

[7] Sharma N, Verma U, Awasthi P. A combination of the Yeast *Candida utilis* and Chitosan Controls Fruit Rot in TomatoCausedby*Alternariaalternate* [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2006, 81(6): 1052-1056

[8] Kishore G K, Pande S. Chitin-supplemented Foliar Application of *Chitinolytic Bacillus* cereus Reduces Severity of Botrytis Gray Mold Disease inChickpea under Controlled Conditions [J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(1): 98-105

[9] Vivekananthan R, Ravi M, Saravanakumar D, et a1. Microbially Induced Defense Related Proteins AgainstPostharvest Anthracnose Infection in Mango [J]. Crop Protection, 2004, 23(11): 1061-1067

[10] Janisiewicz, Wojciech J. Biological control of postharvest diseases of fruits [J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40(1): 411

[11] 曹健康,姜微波,赵玉梅.果蔬采后生理生化实验指导[M].北京:中国轻工业出版社,2007
Cao J K, Jiang W B, Zhao Y M. Postharvest Physiology and Biochemistry Experiment Guidance [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007

[12] Dahiya N, Tewari R, Hoondal G S. BiotechnologicalAspects of ChiinolyticEnzymes:AReview [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6): 773-782

[13] Droby S, Vinokur V, Weiss B, et a1. Induction of Resistance to *Penicilliumdigitatum* in Grapefruit by the Yeast BiocontrolAgent *Candida oleophila* [J]. Phytopathology. 2002, 92(4): 393-399