

# 一株荔枝生物保鲜乳酸菌的筛选及鉴定

马镛<sup>1</sup>, 徐匆<sup>1</sup>, 张长勇<sup>2</sup>, 黄应维<sup>2</sup>, 罗华建<sup>1</sup>, 罗诗<sup>1</sup>, 胡文锋<sup>2</sup>

(1. 东莞市农业科学研究中心, 广东东莞 523086) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 本文旨在从荔枝果实发酵液中筛选具抑菌活性的拮抗菌, 并研究其对荔枝霜疫霉菌、炭疽菌、多酚氧化酶和过氧化物酶的抑制作用。采用平板培养法筛选出拮抗菌后, 采用改良的琼脂扩散法和平板对峙法研究其对炭疽菌和荔枝霜疫霉菌的影响; 分别以邻苯二酚、愈创木酚为底物测定其对多酚氧化酶、过氧化物酶的抑制作用。结果显示, 带菌体发酵液对荔枝霜疫病菌抑菌半径可达1.5 cm, 对荔枝炭疽病菌抑菌半径约为0.75 cm; 代谢产物粗品对荔枝果皮多酚氧化酶的抑制率接近60%, 破碎菌体、代谢产物粗品对过氧化物酶的抑制率分别为58.8%和51.4%。根据菌株的形态特征、培养特征、生理生化特征结合16S rDNA基因序列分析、系统发育树构建来鉴定菌株, 最终确定从荔枝果实发酵液中筛选到的乳酸菌是植物乳杆菌, 其在荔枝生物保鲜上具有良好的应用前景。

**关键词:** 乳酸菌; 荔枝; 保鲜; 筛选; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2014)5-111-117

## Screening and Identification of a *Lactic acid bacteria* Strain With Lychee Fresh-keeping Function

MA Ke<sup>1</sup>, XU Cong<sup>1</sup>, ZHANG Chang-yong<sup>2</sup>, HUANG Ying-wei<sup>2</sup>, LUO Hua-jian<sup>1</sup>, LUO Shi<sup>1</sup>, HU Wen-feng<sup>2</sup>

(1. Dongguan Agricultural Science Research Institution, Dongguan 523079, China)

(2. College of Food, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** An antagonistic bacteria from litchi fermentation medium, and the inhibitory effects of antagonism on *Peronophythora litchii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) were studied. A strain was isolated by plating method, and the improved agar diffusion method and plate confrontation method were used to detect the effect of this strain on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Peronophythora litchii*, respectively. The activity of PPO and POD were determined by oxophenic acid and guaiacol as substrate. Results showed that the inhibition zone radius of fermentation broth antagonize *Peronophythora litchii* was 1.5 cm and *Colletotrichum gloeosporioides* was 0.75 cm, and the inhibition rate of crude metabolites on litchi peel PPO was close to 60%. Crude metabolites and cell homogenates on POD was 58.8% and 51.4%, respectively. This isolation was identified as a strain of *Lactobacillus plantarum* according to the results of morphological characteristics, physiological and biochemical characteristic, the 16s rDNA analysis and phylogenetic tree construction, which had a good application prospect in litchi bio preservation.

**Key words:** *Lactic acid bacteria*; litchi; fresh-keeping; screening; identification

荔枝是起源于我国的世界级名果, 果皮鲜艳美观, 肉质细腻多汁, 香甜可口, 营养丰富。由于荔枝形、色、香、味俱佳, 被誉为“果中之王”, 是中国在国际鲜果市场享有明显竞争优势的少数水果种类之一<sup>[1]</sup>。荔枝是一种很难贮藏的水果, 采后荔枝果实有“一日而色变, 二日而香变, 三日而味变, 四五日外, 色香

收稿日期: 2013-12-12

基金项目: 东莞市高等院校科研机构科技计划项目(2011108101008); 广东省现代农业产业技术体系专项资金(粤财教(2009)356号)

作者简介: 马镛(1983-), 男, 硕士, 农艺师, 研究方向: 果树栽培生理、生物保鲜; 徐匆, 并列第一作者

通讯作者: 胡文锋(1964-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 应用微生物; 罗诗(1962), 男, 研究员, 研究方向: 果蔬保鲜

尽去矣”的特点, 荔枝由于在盛夏高温季节采收, 加上其结构特殊, 采收后极易褐变和腐烂变质。研究表明, 多酚氧化酶(polyphenol oxidase, 简称PPO)<sup>[2]</sup>和过氧化物酶(peroxidase, 简称POD)<sup>[3]</sup>在荔枝果皮褐变中起着关键性作用; 霜疫霉病和炭疽病是荔枝果实采后最严重的病害<sup>[1]</sup>。

目前, 荔枝保鲜主要采用化学药剂处理、冷藏保鲜、气调保鲜等方法, 但目前所采用的化学保鲜剂中, 大多数对人体健康有害, 或者造成环境污染; 冷藏和气调保鲜方法, 投资大, 成本高, 较难普及和推广应用<sup>[4]</sup>。微生物保鲜剂由于具有天然、安全和无残留等优点, 在水果的保鲜研究中显得十分的重要<sup>[5]</sup>。乳酸菌在自然界中分布广泛, 是人和动物肠道正常菌群中

的优势菌,具有许多对人和动物健康有益的生理功能。同时,还能产生有机酸(如乳酸、丁酸和醋酸等)、过氧化氢和乳酸菌素等抑菌物质。这些物质可抑制腐败菌和病原菌的生长,从而防止腐败,延长食品的保藏期,且无毒无害,被认为是一种具有广阔应用前景的天然食品防腐剂和饲料添加剂<sup>[6]</sup>。以乳酸菌为生物保鲜剂用于果蔬和肉制品的保鲜已有大量报道<sup>[7-8]</sup>。Martinez-Castellanos等<sup>[9-10]</sup>用植物乳杆菌菌液喷涂荔枝、红毛丹果实,结果表明,植物乳杆菌可显著延缓果皮褐变、保持果实良好品质,延长果实货架期。本研究对健康荔枝果实发酵液中筛选的一株乳酸菌进行鉴定,以荔枝霜疫霉菌和荔枝炭疽病菌作为指示菌,以荔枝多酚氧化酶和过氧化物酶为指示酶,对该植物乳酸菌菌株的保鲜能力进行初步研究,为进一步研究乳酸菌生物保鲜功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 荔枝

怀枝、马贵荔、桂味、糯米糍荔枝来自于东莞市农业科学研究中心荔枝园。

#### 1.1.2 指示菌菌种

荔枝霜疫霉菌和荔枝炭疽病菌由华南农业大学环资学院提供。

#### 1.1.3 培养基

MRS液体和固体培养基<sup>[11]</sup>,乳酸菌筛选时在MRS固体培养基中加入15 g/L的CaCO<sub>3</sub>; PDA培养基。

#### 1.1.4 主要仪器设备

OLYMPUS BX51荧光显微镜; SW-CJ-1F型单人双面净化工作台; LRH-250生化培养箱; YSQ-LS-SII全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅; FE20 pH计; 岛津UV-1800紫外可见分光光度计; SIGMA 3K15冷冻离心机; JY92-2D超声波细胞粉碎机。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 荔枝果实中乳酸菌的分离

取荔枝果实150 g,捣碎于一无菌三角瓶中,37℃自然发酵48 h。将发酵液用无菌水进行梯度稀释后,涂布添加CaCO<sub>3</sub>的MRS固体平板培养基,37℃培养,待长出菌落后,挑选可水解CaCO<sub>3</sub>的菌株纯化,进入初筛。

#### 1.2.2 乳酸菌生长曲线的测定

将活化好的乳酸菌接种于MRS液体培养基中,37℃培养,每隔2 h取样,在600 nm波长下测光密度。

#### 1.2.3 试验样品的制备

1.2.3.1 将 MRS 固体斜面活化好的乳酸菌接种在 MRS 液体培养基中,37℃培养 24 h 后,将发酵液在 9384×g (4℃)离心 15 min,取上清即为代谢产物粗品,不做处理的为带菌发酵液。

1.2.3.2 将 37℃培养 14~16 h 的菌体离心收集后用无菌生理盐水清洗 2 次,再用无菌生理盐水悬起制备所需浓度的菌体悬液(1.83×10<sup>9</sup> cfu/mL)。

1.2.3.3 将上述悬液中菌体细胞经超声波破碎,功率 550 W,5 s 超声,5 s 间歇,冰浴破碎 5 min,使胞内活性物质溶出制备菌体破碎液。

1.2.3.4 采用上述菌体细胞经沸水浴处理 10 min,制备成热灭活菌体细胞悬液。

#### 1.2.4 PPO 及 POD 粗酶液的制备

取 2 g 果皮,加入 5 倍量(m/V) 0.2 mol/L pH 6.8 磷酸缓冲液及 0.4 g PVP,冰浴研磨,4℃ 15000 g 离心 15 min,取上清液即为粗酶液<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.5 具有拮抗作用的乳酸菌筛选

##### 1.2.5.1 抑菌试验

炭疽菌抑制试验采用改良的琼脂扩散法<sup>[6]</sup>。首先在无菌平板上倒一层琼脂含量 1.5%的 PDA 培养基。吸取制备好的孢子悬浮液 1 mL,加入到熔化并冷却到 50℃左右的 6 mL 琼脂含量为 0.9% PDA 培养基中混匀,倾覆在已凝固的 PDA 平板上。待上层培养基冷却凝固后,在平板上打直径约为 6 mm 的孔,分别检测含菌细胞发酵液、无菌上清发酵液以及菌体细胞悬浮液对炭疽菌的抑制作用(对于在 PDA 培养基上分离得到的微生物,可不必打孔,当上层培养基冷却后直接将待筛选微生物划线接种),每处理设 3 个重复,同时分别以未使用过的无菌液体培养基和无菌生理盐水为对照,28℃培养 2~3 d 逐日观察、测量抑菌圈大小。

荔枝霜疫霉菌抑制试验采用 PDA 平板对峙法<sup>[13]</sup>。先在 PDA 平板中央移入一直径约 2 cm 的霜疫霉菌指示菌的琼脂块,待指示菌生长 2~3 d,在距霜疫霉菌菌落边缘约 5 mm 的地方打孔,分别用含菌细胞发酵液、无菌上清发酵液以及菌体细胞悬浮液作为抑制剂进行抑菌试验,每个处理 3 个重复,同时分别以未使用过的无菌液体培养基和无菌生理盐水为对照,28℃培养 3~5 d,逐日观察、测量抑菌圈大小。

##### 1.2.5.2 酶活抑制试验

多酚氧化酶(PPO)抑制试验。反应体系:2550 μL pH 6.8 的磷酸缓冲液,750 μL 0.2 M 邻苯二酚底物溶液,325 μL 菌液(菌体细胞悬液、热灭活菌体细胞悬液、菌体细胞破碎悬液、无细胞上清发酵液作为抑制

剂, 对照用缓冲液代替) 25  $\mu\text{L}$  酶液。在 398 nm 处测量吸光值, 从酶液加入开始计时, 每 10 s 记录一次 OD 值, 以最初直线斜率计算酶活。一个酶活单位定义为: 在测定条件下, 吸光值每分钟增大 0.001 所需的酶量, 酶活平行测定 3 次。

过氧化物酶 (POD) 抑制试验。反应体系: 2175  $\mu\text{L}$  pH 6.8 的磷酸缓冲液, 375  $\mu\text{L}$  0.08%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液, 325  $\mu\text{L}$  菌液 (菌体细胞悬液、热灭活菌体细胞悬液、菌体细胞破碎液、无细胞上清发酵液作为抑制剂, 对照用缓冲液代替), 750  $\mu\text{L}$  0.05 M 愈创木酚底物溶液, 25  $\mu\text{L}$  稀释 10 倍的粗酶液, 在 470 nm 处测量吸光值, 从酶液加入开始计时, 每 10 s 记录一次 OD 值, 以最初直线斜率计算酶活。一个酶活单位定义为: 在测定条件下, 吸光值每分钟增大 0.001 所需的酶量, 酶活平行测定 3 次。

酶活抑制率计算方法:

$$\text{酶活抑制率} = \frac{\text{对照组酶活} - \text{实验组酶活}}{\text{对照组酶活}}$$

## 1.2.6 菌株的鉴定

### 1.2.6.1 菌体形态及生理生化鉴定

菌体形态、培养特征的观察、测定参考文献<sup>[14]</sup>中的检测方法, 检索表要求, 生理生化指标借助 API 50 CHL 试剂盒检测, 检测结果用 APILAB Plus 软件进行分析鉴定。

### 1.2.6.2 16S rDNA 序列分子生物学鉴定

将 MRS 固体培养基培养的 DGNKZX003 菌体挑取于 50  $\mu\text{L}$  TaKaRa 菌体裂解液 (Code No.D304 大连宝生物工程有限公司) 中 80  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 min, 低速离心, 取上清液作为 PCR 反应模板直接用于 16S rDNA 的 PCR 扩增。使用 TaKaRa 16S rDNA 细菌鉴定 PCR 仪 (No.D310, 大连宝生物工程有限公司) 进行目的片段的扩增。PCR 扩增引物为正向引物 (5'-GAGC GGATAACAATTCACACAGG-3') 和反向引物 (5'-CGCCAGGGTTTTCCAG-TCACGAC-3')。50  $\mu\text{L}$  的反应体系中包括 1  $\mu\text{L}$  上述变性反应液、25  $\mu\text{L}$  PCR 预混液、0.5  $\mu\text{L}$  正向引物 (20 pmol/ $\mu\text{L}$ )、0.5  $\mu\text{L}$  反向引物 (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 和 23  $\mu\text{L}$  16 S 无菌去离子水。PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 1 个循环: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 30 个循环: 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 1 个循环。取 5  $\mu\text{L}$  扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用切胶回收试剂盒回收目的片段进行 DNA 测序 (Code No.D823A 大连宝生物工程有限公司)。将获得的序列与 GenBank 数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行同源性比较分析, 以 MEGA 5 软件建立系统进化树。

## 1.2.7 数据统计

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 进行统计处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳酸菌的分离筛选

挑选具有溶钙圈的菌落, 从荔枝果实发酵液中分离并经初步筛选得到乳酸菌。将得到的乳酸菌进行抑菌试验 (初筛) 和酶活抑制试验 (复筛), 最终得到 1 株有明显抑菌和抑酶活性的乳酸菌, 命名为 DGNKZX003。

### 2.2 乳酸菌的生长特性

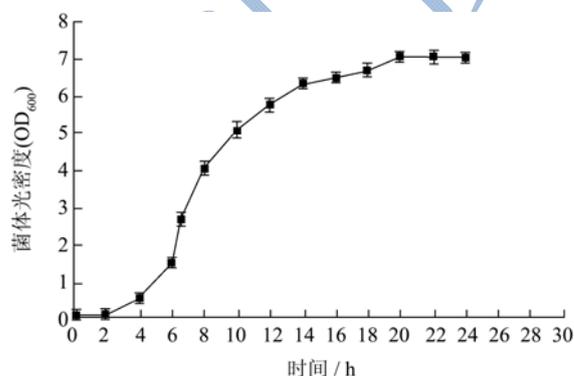


图 1 DGNKZX003 菌株生长曲线

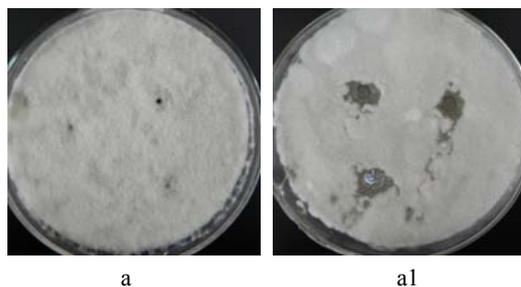
Fig.1 Growth curve of DGNKZX003 strain

由图 1 可见, DGNKZX003 菌株在接种后 4 h, OD<sub>600</sub> 迅速上升, 进入对数生长期, 14 h 后 OD<sub>600</sub> 上升速度放缓, 进入稳定期。

### 2.3 菌株 DGNKZX003 的抑菌及抑酶效果

#### 2.3.1 菌株 DGNKZX003 对荔枝病原真菌的抑制效果

结果如图 2 所示, 以带菌体发酵液作为抑制剂时, DGNKZX003 菌株对荔枝霜疫病菌和荔枝炭疽病菌的抑制效果具有一定差异, 对荔枝霜疫病菌抑菌半径可达 1.5 cm, 对荔枝炭疽病菌抑菌半径约为 0.75 cm, 而对照组半半径几乎为零。此外, 以菌体悬浮液作为抑制剂, 对病原菌也有一定的抑制效果。



a

a1

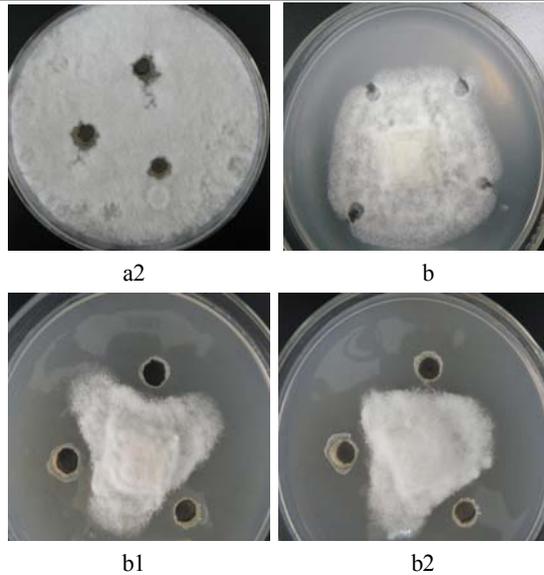


图2 DGNKZX003 菌株对荔枝霜疫霉菌和炭疽菌的抑制效果  
Fig.2 Inhibition effects of strain DGNKZX003 on the growth of *P.litchii* and *C.gloeosporioides*

注: a: 荔枝炭疽病菌抑菌试验对照, a1: DGNKZX003 带菌发酵液对炭疽病菌抑制照片, a2: DGNKZX003 菌体悬液对炭疽病菌抑制照片, b: 荔枝霜疫霉菌抑制实验对照, b1: DGNKZX 003 带菌发酵液对霜疫霉菌抑制照片, b2: DGNKZX 003 菌体悬液对霜疫霉菌抑制照片。

### 2.3.2 菌株DGNKZX003对荔枝PPO、POD抑制效果

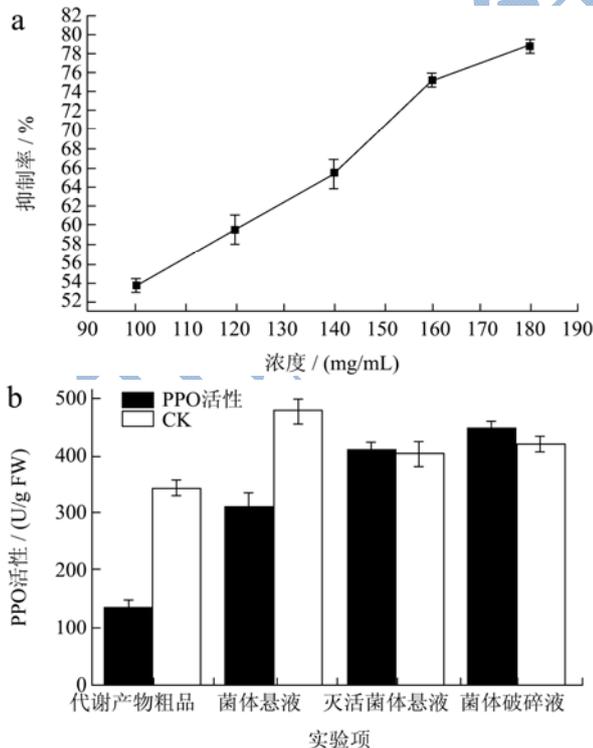


图3 DGNKZX003 菌株对 PPO 抑制效果

Fig.3 Inhibition effects of strain DGNKZX003 on polyphenol oxidase (PPO)

注: a: 柠檬酸抑制剂对 PPO 的抑制效果, b: 代谢产物粗品、菌体悬液、灭活菌体悬液、菌体破碎液对 PPO 活性影响。

如图3所示, DGNKZX003 对 PPO 抑制效果因作用方式而有所差别, 代谢产物粗品对其抑制率接近60%, 与 120 mg/mL 柠檬酸对 PPO 的抑制效果相当; 活菌体抑制率为 35%, 而破碎和热灭活后的菌体对其无抑制作用。

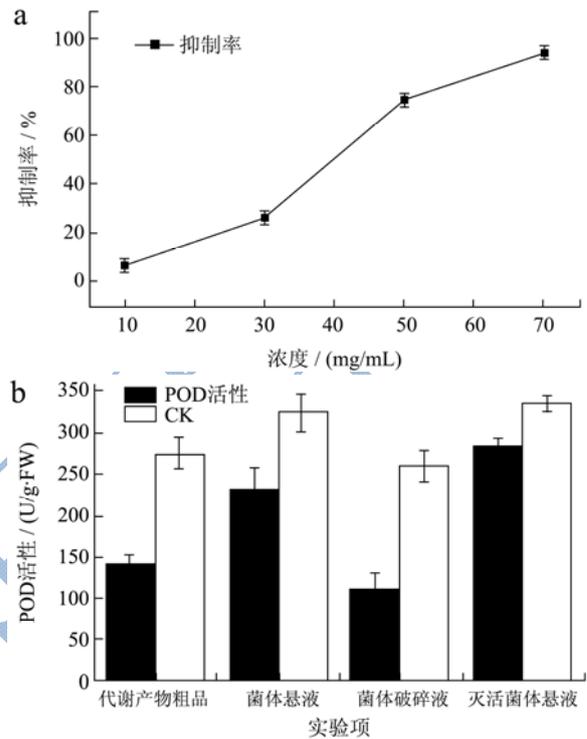


图4 DGNKZX003 菌株对 POD 抑制效果

Fig.4 Inhibition effects of strain DGNKZX003 on peroxidase(POD)

注: a: 柠檬酸抑制剂对 POD 的抑制效果, b: 代谢产物粗品、菌体悬液、灭活菌体悬液、菌体破碎液对 POD 活性影响。

## 2.4 菌株的鉴定

### 2.4.1 菌株的形态学特征

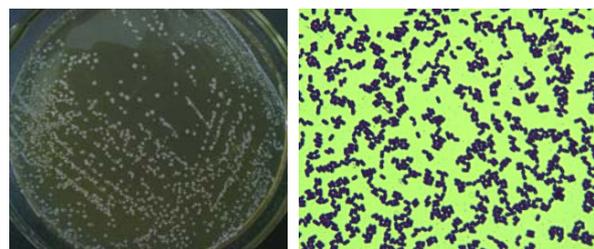


图5 DGNKZX003 菌落及菌体形态

Fig.5 Colonial morphological and thallus characteristics of strain DGNKZX003

注: a DGNKZX003 菌落形态, b DGNKZX003 菌体形态。菌株 DGNKZX003 MRS 在琼脂平板上培养 24 h,

菌落形态为圆形，乳白色小菌落，圆形凸起生长，边缘颜色略浅，湿润不透明，边缘整齐。革兰染色阳性，细胞末端钝圆，短粗杆状，无芽孢。

2.4.2 生理生化特征

表 2 DGNKZX003 菌株 API 50 CHL 鉴定结果

Table 2 API 50 CHL identification of DGNKZX003 strain

试验条生化谱注		API 50 CHL V5.1	
有意义的分类单位	鉴定%	T 值(T 指数)	不一致的试验
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.9	0.64	SOR 78%, MEL 94%, GEN 98%
下一个分类单位	鉴定%	T 值(T 指数)	不一致的试验
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	0.1	0.31	MDM 0%, MLZ 14%, GEN 99%, TUR 14%

表 1 菌株 DGNKZX003 生理生化结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain DGNKZX003

鉴定项目	DGNKZX003	鉴定项目	DGNKZX003	鉴定项目	DGNKZX003
甘露醇	+	蜜二糖	-	阿东醇	-
山梨醇	+	蔗糖	+	淀粉	-
D-阿拉伯糖	-	海藻糖	+	糖原	-
L-阿拉伯糖	+	苦杏仁甙	+	木糖醇	-
核糖	+	七叶灵	+	扰牛儿糖	-
D-木糖	-	松叁糖	+	D-松二糖	+
L-木糖	-	熊果甙	+	D-来芬糖	-
棉子糖	-	N-乙酰-葡糖胺	+	D-塔格糖	-
乳糖	+	柳醇	+	D-岩糖	-
半乳糖	+	卫茅醇	-	L-岩糖	-
葡萄糖	+	肌醇	-	D-阿拉伯糖醇	-
果糖	+	β-甲基-D-木糖甙	-	L-阿拉伯糖醇	-
甘露糖	+	α-甲基-D-甘露糖甙	+	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
葡萄糖酸盐	+	α-甲基-D-葡萄糖甙	-	5-酮基-葡萄糖酸盐	-
鼠李糖	-	赤藓醇	-		
纤维二糖	+	菊糖	-		
麦芽糖	+	甘油	-		

注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应。

根据菌株 DGNKZX003 的菌株的形态学特征和生理生化特征，并参考《伯杰细菌鉴定手册（第八版）》以及 API 50 CHLV5.1 分析鉴定的结果，初步确认该菌株最大可能为植物乳杆菌。

2.4.3 16S rDNA 序列分子生物学鉴定

将测得的菌株 DGNKZX003 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比较，与植物乳杆菌的同源性相似度达 100%，选取相似性较高的几株菌的 16S rRNA 序列，用 MEGA5 软件构建系统发育树，结果如图 8 所示。由系统发育树可知 DGNKZX003 菌株与植物乳杆菌和戊糖乳杆菌的关系最为接近。

综合上述各方法实验结果，最终可鉴定 DGNKZX003 菌株为一株植物乳杆菌。

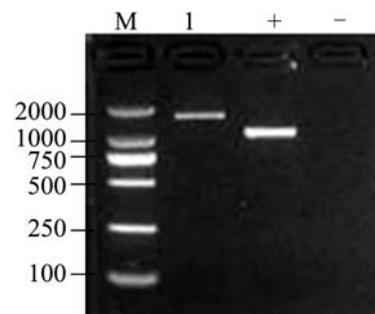


图 7 菌株 DGNKZX003 的 16S rDNA 基因扩增电泳结果

Fig.7 PCR amplification pattern of 16S rDNA from strain DGNKZX003

注：M 为 DL2000 DNA Marker；1 为 DGNKZX003-PCR 产物；+ 为正对照；- 为负对照。

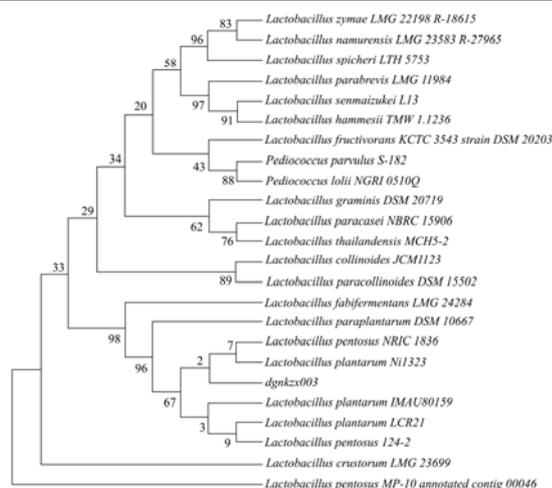


图8 DGNKZX003 菌株 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig.8 The phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of genus strain DGNKZX003

### 3 结论

3.1 研究表明, PPO 和 POD 是引起荔枝果皮褐变的主要酶类<sup>[15]</sup>。在荔枝贮藏过程中, 花色苷可被 PPO 和 POD 降解, 降解产物花色素及其他多酚类物质可被 PPO 和 POD 直接或间接氧化生成褐色物质, 导致果皮褐变<sup>[16]</sup>。荔枝腐烂的直接原因就是病菌侵染, 其中以荔枝霜疫霉病和炭疽病最为严重<sup>[1]</sup>。因此, 荔枝采后保鲜主要从控制果皮褐变、防止病原微生物侵染入手。许多微生物能产生如酸、醇、过氧化氢、双乙酰等低分子量的活性代谢产物, 可有效地抑制酶促褐变<sup>[17]</sup>。Martinez-Castellanos 等<sup>[9]</sup>用  $1 \times 10^9$  cfu/mL 的植物乳杆菌菌液喷涂荔枝, 并在 10 °C、75%湿度条件下贮藏, 延缓了果皮褐变。黄庶识等<sup>[18]</sup>从土壤中分离的 4 株枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 对荔枝霜疫霉菌、炭疽菌菌丝生长均具有明显抑制作用, ON-6 菌株的发酵液对菌丝生长的抑制率最高, 分别为 92.34% 和 70.36%。蔡学清等<sup>[19]</sup>研究表明, 内生枯草芽胞杆菌 BS-2 菌株对荔枝霜疫病具有较好的防治效果。Sivakumar 等<sup>[20]</sup>用枯草芽胞杆菌提取液处理采后荔枝鲜果, 结合改良的聚丙烯包装袋, 在整个 20 d 的市场销售期内 (2 °C 18 d、14 °C 2 d), 果实的腐烂和褐变得到抑制。徐良雄等<sup>[21]</sup>从绿僵菌 SC0924 的发酵物中分离得到 8 个酚酸类化合物, 试验证明该类化合物具有抗荔枝霜疫霉的作用。

3.2 本研究从怀枝果实发酵液中筛选到的 DGNKZX003 菌株是一株生防乳酸菌。在筛选这株菌的过程中, 先后采用了抑菌和抑酶实验, 不同批次的发酵产物对荔枝霜疫霉菌、荔枝炭疽病菌、PPO 以及 POD 的抑制效果有所差别, 但均有明显抑制作用。对

荔枝病原真菌及褐变相关酶的抑制实验表明, 该菌对荔枝霜疫霉菌、炭疽病菌具有较强的拮抗作用, 对荔枝果皮多酚氧化酶和过氧化物酶也有良好的抑制效果, 类似的研究没有同时进行抑菌和抑酶实验。综合本研究的结果, 菌株 DGNKZX003 在荔枝采后保鲜的体外试验均有出色表现, 可尝试作为一株保鲜菌运用到荔枝的护色保鲜中, 相关的后续研究正在进行中。根据对菌株的产酸性、形态学、生理生化试验结果, 初步断定菌株 DGNKZX003 为植物乳杆菌。通过 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列比较, 菌株 DGNKZX003 与植物乳杆菌同源率为 100%, 构建系统发育树, 最终确定其为一株植物乳杆菌。

### 参考文献

- [1] 李建国.荔枝学[M].北京:中国农业出版社,2008  
LI Jian-guo. The litchi [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2008
- [2] SUN J, LI L, YOU X R, et al. Phenolics and polysaccharides in major tropical fruits: chemical compositions, analytical methods and bioactivities [J]. Analytical Methods, 2011, 10(3): 2212-2220
- [3] GONG Q Q, TIAN S P. Partial characterization of soluble peroxidase in pericarp of litchi fruit [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29: 891-896
- [4] 李梦钗.草莓保鲜技术研究进展[J].北方园艺,2010,12: 210-212  
LI Meng-chai. Achievements of studies on fresh-keeping techniques of strawberry [J]. Northern Horticulture, 2010, 12: 210-212
- [5] 王林,胡云,胡秋辉.食品的微生物保鲜技术[J].食品科学, 2005,26(2):242-244  
WANG Lin, HU Yun, HU Qiu-hui. Advance in microbial preservation technology for food [J]. Food Science, 2005, 26(2): 242-244
- [6] Balciunas E M, Martinez F, Todorov S D, et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review [J]. Food Control, 2013, 32(1): 134-142
- [7] Martinez-Castellanos G, Shirai K, Pelayo-Zaldivar C, et al. Effect of lactobacillus plantarum and chitosan in the reduction of browning of pericarp rambutan (*Nephelium lappaceum*) [J]. Food Microbiology, 2009, 26: 444-449
- [8] Ananou S, Maqueda M, Martinez-Bueno M, et al. Control of staphylococcus aureus in sausages by enterocin AS-48 [J]. Meat Science, 2005, 71(3): 549-556
- [9] Martinez-Castellanos G, Pelayo-Zaldivar C, Perez-Flores L J,

- et al. Postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn) quality preservation by *Lactobacillus plantarum* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2011, 59: 172-178
- [10] Martinez-Castellanos G, Shirai K, Pelayo-Zaldivar C, et al. Effect of lactobacillus plantarum and chitosan in the reduction of browning of pericarp rambutan (*Nephelium lappaceum*) [J]. Food Microbiology, 2009, 26(4): 444-449
- [11] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M].北京:中国轻工业出版社,1999  
LING Dai-wen, DONG Xiu-zhu. Identification and characterization and experiment method of lactic acid bacteria [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999
- [12] Jiang Y M. Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 305-310
- [13] 张晓舟,徐剑宏,李顺鹏.植病生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定[J].土壤,2005,37(1):85-88  
ZHANG Xiao-zhou, XU Jian-hong, LI Shun-peng. Isolation, screening and preliminary identification of plant pathogenic fungi biocontrol strains of bacillus SPP [J]. Soils, 2005, 37(1): 85-88
- [14] 布坎南R E,吉本斯N E等编.伯杰细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译.第8版.北京:科学出版社,1984  
Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. Translational group of institute of microbiology, Chinese Academy of Sciences. Beijing: Science Press, 1984
- [15] 吴振先,苏美霞,陈维信,等.贮藏荔枝果皮多酚氧化酶及过氧化物酶与褐变的研究[J].华南农业大学学报,1998,19(1): 12-15  
WU Zhen-xian, SU Mei-xia, CHEN Weixin, et al. Studies on polyphenol oxidase and peroxidase and litchi pericarp browning during storage [J]. Journal of South China Agricultural University. 1998, 19(1): 12-15
- [16] Jiang Y, Duan X, Joyce D, et al. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit [J]. Food Chemistry, 2004, 88(3): 443-446.
- [17] Dowd P F. Relative inhibition of insect phenoloxidase by cyclic fungal metabolites from insect and plant pathogens [J]. Natural toxins, 1999, 7(6): 337-341
- [18] 黄庶识,黄曦,张荣灿,等.枯草芽孢杆菌对离体荔枝果实霜疫霉病、炭疽病的防治效果[J].植物保护学报,2011,38(3): 247-252  
HUANG Shu-shi, HUANG Xi, ZHANG Rong-can, et al. The effects of biological control of *Bacillus subtilis* strains on downy mildew and anthracnose diseases of harvested litchi fruits [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2011, 38(3): 247-252
- [19] 蔡学清,胡方平,陈炜,等.内生枯草芽孢杆菌BS-2防治荔枝霜疫病及其生化机理[J].热带作物学报,2010,31(2):241-247
- [20] Sivakumar D, Zeeman K, Korsten L. Effect of a biocontrol agent (*Bacillus subtilis*) and modified atmosphere packaging on postharvest decay control and quality retention of litchi during storage [J]. Phytoparasitica, 2007, 35(5): 507-518
- [21] 徐良雄,冯娜,薛璨花,等.绿僵菌SC0924酚酸类代谢产物及其抗荔枝霜疫霉活性[J].热带亚热带植物学报,2008,16(2): 140-143  
XU Liang-xiong FENG Na, XUE Can-hua, et al. Phenolic acids from *Metarhizium* sp. SC029924 and their antifungal activities against *Peronophythora lichii* [J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2008, 16(2): 140-143