

海水酵母菌的分离鉴定及其在果实贮藏保鲜中的应用

张书轩^{1,2}, 原永兵¹, 张新富¹, 王玉玲¹, 杨绍兰¹

(1. 青岛农业大学园艺学院, 山东青岛 266109) (2. 贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025)

摘要: 本文研究了海水酵母菌对果实腐烂病的防治效果以及其在梨和苹果果实采后贮藏保鲜中的作用。通过显微观察结合分子生物学方法对分离的菌株进行鉴定, 结果表明该菌与酵母菌(*Galactomyces geotrichum*)同源性相近, 属于酵母菌类。通过平板抑菌试验及活体试验研究该菌对腐烂病菌的拮抗作用, 发现该菌对腐烂病菌具有明显的拮抗作用, 活体试验结果表明, 5×10^7 CFU/mL 该菌对接种了 5×10^4 spores/mL 病原菌的梨和苹果果实腐烂病具有良好的防治效果。经该菌悬浮液浸泡处理的采收后的梨果实, 贮藏 20 d 时的腐烂率比对照少 20%, 贮藏 60 d 苹果的腐烂率比对照减少了 30%。另外, 该菌处理能够延缓梨和苹果果实的软化速率, 保持果实较高的营养品质。研究表明, 从海水中分离的酵母菌在果实腐烂病的生物防治和果实保鲜方面具有极大的应用潜力。

关键词: 生防菌; 果实; 腐烂病菌; 贮藏

文章编号: 1673-9078(2017)12-115-119

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.019

Separation of Bio-antagonists from Sea and the Application in Fruit Postharvest Fresh-keeping

ZHANG Shu-xuan^{1,2}, YUAN Yong-bing¹, ZHANG Xin-fu¹, WANG Yu-ling¹, YANG Shao-lan¹

(1. College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The effects of bio-antagonists on the prevention of *Valsa ceratosperma* and the application in fruit postharvest fresh-keeping of apple and pear were analyzed in this paper. The fungus was classified into *Galactomyces geotrichum* by microexamination combined with molecular biology. The antagonistic effect of fungus on the fruit *Valsa ceratosperma* was studied based on the plate bacteriostasis and *in vivo* experiments, which indicated that the fungus could inhibit *Valsa ceratosperma* and 5×10^7 CFU/mL of the fungus had good effect on the prevention of pear and apple rot inoculated with 5×10^4 spores/ml pathogenic bacteria. Compared with the control fruit, the rot rate of pear treated by the fungi solution decreased 20% after storage 20 d and the apple decreased 30% after storage 60 d. Furthermore, the softening of fruit could be delayed and the fruit maintained good nutritional quality after treated by the fungus. The experiments showed that the fungus separated from sea had high potential in biological control of fruit disease and could be applied in the fruit preservative and fresh-keeping.

Key words: bio-antagonists; fruit; *Valsa ceratosperma*; storage

果蔬是我们日常生活的必需品,但由于地域限制,果蔬产品的生产地大多远离城市,运输不便。因此,合理调节果蔬贮藏与运输周期非常重要。在果品的贮运过程中,由于微生物侵染引起的腐烂已造成惊人的损失,发达国家约有 10~30% 的新鲜果品腐烂是由于

收稿日期: 2017-06-12

基金项目: 国家重点研发计划重点专项课题 (2016YFD0400102-04); 国家自然科学基金项目 (31201608); 山东省现代蔬菜产业技术体系 (SDAIT-05-21)

作者简介: 张书轩 (1990-), 女, 研究生, 研究方向: 果蔬采后生理与分子生物学

通讯作者: 杨绍兰 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 果蔬采后生理与分子生物学

采后病害引起的,而发展中国家果蔬腐烂损失率更高^[1]。据报道,我国每年有近 8000 万吨水果因采后病害无法销售,损失近 800 亿元,严重影响我国水果产业的发展^[2]。长期以来,具有高效、迅速、局部经济效益高的化学防治广泛用于防治果实病害^[3]。然而,随着人们对食品安全的重视,农药的大量使用已经引起人们的担忧。化学杀菌剂的持续使用不仅会导致病原菌产生耐药性,而降低杀菌剂的杀菌效果,也会导致众多食品安全问题和环境污染问题^[4]。

近年来利用生物拮抗菌防治水果采后病害已被证明是安全有效的新方法之一^[4]。水果采后生物防治即选择对水果有益或无危害的拮抗微生物来抑制病原菌

的生长^[5]。而拮抗酵母是研究最多的拮抗菌，它主要是通过与病原菌进行营养与空间竞争来防治病害，且多数酵母是由果蔬表面分离得到的，具有较高的安全性^[6]，是理想的水果采后保鲜剂。但拮抗酵母资源有限，且应用条件受限，因此探究菌株分离与筛选的新方法，获得新型、高效的生防菌株对果蔬的生产和保鲜有重要意义。

海洋酵母多处于低温高盐环境中^[7]，具有耐低温与耐高渗透压胁迫等优良特性，在果蔬采后病害的生物防治方面具有其他微生物所不能比拟的优点^[8]。本试验从海水中筛选出具有生防效果的菌株，初步开展其生防效应的研究，以期获得具有高效生防效果的海洋酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用海水取自青岛仰口海域（东经120°40.158′，北纬36°14.322′），于水面以下1.5 m的水层采集水样。成熟茌梨和红富士苹果果实分别于2013年10月12日和10月10日采自青岛农业大学莱阳试验基地，采收当天运抵实验室，挑选大小均匀、无病虫害且成熟度相对一致的果实供试验用。果实预冷后置于0℃、相对湿度90~95%的条件下贮藏，0℃贮藏5个月后移至20℃环境中进行接种试验。

1.2 试验方法

1.2.1 海水酵母菌的分离纯化

将采集的水样置于无菌采样瓶中，用精密滤纸对海水进行抽滤。随后剪取1 cm²抽滤后的滤纸置于PDA培养基（马铃薯200 g/L，葡萄糖20 g/L，琼脂15 g/L）中，28℃条件下培养2 d。用接种环挑取生长良好的白色菌落进行纯培养，连续纯培养3次。

1.2.2 分离菌株的形态观察

观察纯培养后菌落的形状、大小和增殖方式等宏观性状。将配好的菌悬液稀释至1×10⁶ CFU/mL，制成玻片标本，采用光学显微镜（Nikon ECLIPSE 80i）观察，并用ACT-2U软件进行图像的采集、处理、测量和分析。

1.2.3 26S rDNA 序列分析与分子生物学鉴定

采用Ezup柱式基因组DNA抽提试剂盒（真菌，上海生工）提取基因组DNA。菌株26S rDNA D1/D2区域序列的PCR扩增引物为：Yea-26S rDNA up: 5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3'，Yea-26S rDNA down: 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'。PCR

反应条件如下：94℃预变性4 min，94℃变性60 s，60℃退火60 s，72℃延伸60 s，共35个循环，72℃延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，采用凝胶回收试剂盒（上海生工）割胶回收纯化。随后进行pMD-18T载体的连接，转化感受态细胞，并进行菌液PCR鉴定，送至上海生工进行测序。将测得的26S rDNA D1/D2区域序列通过NCBI数据库中的Blast程序与GenBank数据库中已登录的序列进行同源性分析（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>）。

1.2.4 分离菌株对果实腐烂病菌的抑制作用

通过平板对峙法观察菌株对果实腐烂病菌的抑菌效果，在PDA培养基两侧分别接种腐烂病病原菌与酵母菌，以只接种病原菌的培养基为对照，于28℃培养2 d，观察酵母菌株的抑菌情况，重复3次。抑制效果通过抑菌圈的存在与否来表示。

1.2.5 活体试验

菌悬液的配制方法如下：YPD培养基（1%酵母膏，2%蛋白胨，2%葡萄糖）于121℃下灭菌15 min，将分离出的酵母菌接种至YPD培养基中，于振荡培养箱中28℃，200 r摇菌36~40 h。将摇好的菌分装配平后于12000 r/min离心10 min，收集菌体，并用10 mL无菌水洗涤酵母菌，将洗下的菌液倒入已灭菌的三角瓶中制成菌悬液，取出1 mL，稀释50倍后参照郭军英^[9]的方法用血球计数板计数，并计算出菌悬液的浓度。本试验所用血球计数板为25×16型，计数完毕后，依下列公式计算：

$$\text{细胞个数/mL} = 80 \times \text{小方格细胞总数} / 80 \times 400 \times 10000 \times \text{稀释倍数}$$

用2%的NaClO浸泡挑选好的梨果实，2 min后取出用蒸馏水冲洗干净，晾干备用。用无菌打孔器在梨果实赤道部扎3 mm（深）×5 mm（直径）的伤口，伤口晾干后先接种20 μL不同的处理液，分别为无菌水、5×10⁷ CFU/mL菌1菌悬液、5×10⁶ CFU/mL菌1菌悬液。40 min晾干后分别接种同体积的5×10⁴ spores/mL的腐烂病菌的悬浮液，果实晾干后贮藏于10℃，并保持90%左右的相对湿度，每个处理选取10个果实，重复3次。

1.2.6 酵母菌液在果实贮藏保鲜中的处理方法

茌梨和红富士苹果果实于2014年3月10日于0℃贮藏环境移至20℃条件下。采用10⁷ CFU/mL和10⁶ CFU/mL的菌悬液（蒸馏水处理为对照）浸泡茌梨果实2 min，随后取出晾干，置于20℃贮藏，相对湿度为90%。贮藏期间对茌梨果实品质相关指标进行测定。

1.2.7 数据统计分析

采用 DPS 和 Excel 进行数据分析和作表。采用 DPS 中完全随机二因素有重复试验统计分析进行显著性差异分析。

2 结果与讨论

2.1 海水酵母菌的分离及形态观察



图1 海水中分离纯化的菌株

Fig.1 The colony morphology of the strain separated from sea water

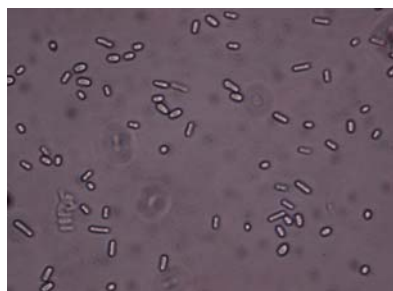


图2 海水菌株的显微结构

Fig.2 The microstructure of strain separated from sea water

海水样品经抽滤后培养纯化,在 28℃ 培养箱培养 2 d 后进行纯化培养,获得类似酵母的菌类,菌落质地均匀,正反面和边缘、中央部位的颜色都很均一,为乳白色。如图 1 所示。该菌细胞为球形,是出芽生殖(图 2)。

2.2 提取菌株的序列分析

对分离菌株菌 26S rDNA D1/D2 区域序列进行 PCR 扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后结果如图 3 所示。

表 1 海水分离菌与 GenBank 中其它已知菌 26s rDNA 序列相似性比较

Table 1 The sequences homology comparison of 26S rDNA between the separated fungus from sea and the other known fungus

菌株	登录号	相似性/%
<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-70	JQ668740.1	99
<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-20	JF262181.1	99
<i>Galactomyces geotrichum</i> strain LMA-21	JQ668739.1	99
<i>Pichia anomala</i> strain TJY9d	EU327111.1	73.42
<i>Pichia anomala</i> strain VTT C-04565	DQ377650.1	71.96
<i>Pichia anomala</i> strain LGMG 8.B	EF694618.1	69.47

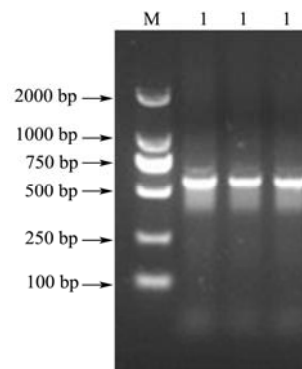


图 3 分离菌株的 26S rDNA PCR 扩增产物

Fig.3 The PCR amplification products of 26S rDNA

注: M 表示 DL2000 DNA marker; 1 表示分离菌株 26S rDNA。

测序后得到该菌株 26S rDNA 的序列大小为 588 bp。将所测得序列与 GenBank 数据库中的已有序列进行 Blast 分析,与 *Galactomyces geotrichum* 的序列相似性高达 99% 以上,因此我们初步判定该菌可能为 *Galactomyces geotrichum*。

2.3 分离菌株对腐烂病菌的抑菌效果

利用平板对峙法观察海水分离菌株对腐烂病菌的抑菌效果,结果如图 4 所示。对照组在培养 2 d 后,其菌丝生长几乎蔓延至整个平板,而海水分离菌株和腐烂病菌对峙培养 2 d 后,在两菌株之间有明显拮抗带,表明该菌株抑制了腐烂病菌的蔓延生长,结果为拮抗阳性。



图 4 海水分离菌株对腐烂病菌的拮抗作用

Fig.4 The antagonism effects of the strain separated from sea water on the *Valsa ceratosperma*

2.4 海水酵母菌对果实腐烂病的生防效果

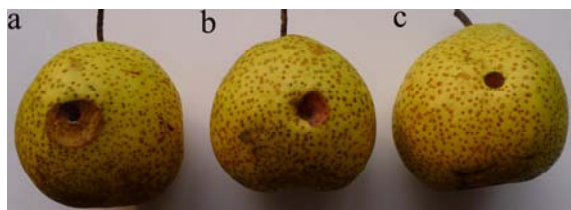


图5 海水分离菌对梨果实腐烂病的生防效果

Fig.5 The bio-control effects of fungus on pear fruit *Valsa ceratosperma*

注: a, 对照 b, 接种 5×10^6 CFU/mL 分离菌株 c, 接种 5×10^7 CFU/mL 分离菌株



图6 海水分离酵母菌对苹果果实腐烂病的生防效果

Fig.6 The bio-control effects of fungus on apple fruit *Valsa ceratosperma*

注: a, 对照 b, 接种 5×10^7 CFU/mL 分离菌株 c, 接种 5×10^6 CFU/mL 分离菌株

活体实验结果如图5所示, 梨果实在采用腐烂病菌接种处理10 d后, 对照组在梨果实致病伤口处有明显腐烂, 而接种 5×10^7 CFU/mL、 5×10^6 CFU/mL 菌悬

液的分离菌株的梨果实腐烂程度则较轻, 并且随着分离菌株含菌量的升高腐烂程度变小, 说明该分离菌株对梨果实腐烂病菌有很明显的抑制作用。

由图6可以看出对照组果实腐烂严重, 而接种菌悬液后病斑直径小于对照, 并且随着浓度的增加, 接种了 5×10^7 CFU/mL 的菌悬液效果优于接种 5×10^6 CFU/mL 的菌悬液。

2.5 菌悬液处理对果实贮藏效果的影响

采用 10^7 CFU/mL 的菌悬液对在梨果实进行采后浸泡处理, 贮藏20 d后的果实贮藏品质如表2所示。其中, 经菌悬液处理的在梨果实的腐烂率比对照少20%, 表明菌处理能够明显抑制果实在贮藏期间的腐烂; 处理的在梨果实硬度亦明显高于对照果实, 说明菌处理延缓了在梨果实的软化衰老过程; 另外, 处理果实的失重率、可溶性固形物含量及可滴定酸含量均低于对照果实, 从而表明菌处理能够抑制果实的失水和糖酸的降解, 维持果实较好外观品质和营养品质。

菌悬液处理后贮藏60 d苹果的腐烂率比对照减少了30%; 果实硬度比对照增加了5.09%; 可溶性固形物的含量要比对照组增加9.65%, 可滴定酸的含量增加了28.21%; 失重率比对照组减少了28.19%, 说明菌悬液处理后的果实可保持良好的外观品质, 可明显延长货架期。

表2 10^7 CFU/mL 菌悬液对在梨果实贮藏特性的影响

Table 2 The effects of 10^7 CFU/mL fungus suspension on the Chili pear storage characters

贮藏时间/d	处理组	腐烂率/%	硬度/(kg·cm ⁻²)	失重率/%	可溶性固形物/%	可滴定酸/%
0	对照	0	9.47±0.86 ^a	0	16.00±1.25 ^a	0.16±0.01 ^a
20	对照	40	4.24±0.32 ^b	6.41±0.42 ^a	11.78±0.58 ^b	0.06±0.02 ^c
20	菌悬液处理	10	4.92±0.44 ^b	5.51±0.58 ^b	12.83±0.81 ^b	0.10±0.01 ^b

注: 同列不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$), 下同。

表3 10^7 CFU/mL 菌悬液对苹果果实贮藏特性的影响

Table 3 The effects of 10^7 CFU/mL fungus suspension on the apple storage characters

贮藏时间/d	处理组	腐烂率/%	硬度/(kg·cm ⁻²)	失重率/%	可溶性固形物/%	可滴定酸/%
0	对照	0	7.91±1.21 ^a	0	11.72±1.22 ^a	0.10±0.01 ^a
60	对照	40	4.69±1.33 ^b	14.65±2.11 ^a	10.26±0.58 ^a	0.08±0.00 ^b
60	菌悬液处理	10	7.27±0.65 ^a	10.52±1.23 ^b	11.25±1.46 ^a	0.10±0.01 ^a

3 结论

3.1 近年来, 酵母菌用于果蔬采后生物防治越来越受到人们的重视。然而, 拮抗酵母菌的分离方法单一, 多数从果蔬表面自然生长的微生物中分离得到。一方面拮抗酵母菌对果蔬表面的微生态环境比较适应; 另一方面它一般对人、畜无毒^[10], 但这也限制了拮抗酵

母菌的发展。而海洋酵母已经广泛应用到海水养殖、食品加工、制药、化工业和环境保护等各大领域^[11]。与陆生酵母相比, 海洋酵母耐性更强, 较易适应贫瘠的环境。因此本试验从海水中筛选出具有生防效果的酵母菌株, 对果蔬采后生物病害的防治是有一定效果的。目前, 众多具有生防效果的酵母菌种被发现。如季也蒙假丝酵母(*Candida guilliermondii*), 卡利比克毕

赤酵母(*Pichia caribbica*), 掷孢酵母(*Sporobolomyces roseus*)等^[12]。在现有报道中,*Galactomyces geotrichum* Y25 常用作脂肪酶的产生菌^[13]。

3.2 本研究鉴定的海水酵母菌对于果蔬的抑菌效果和保鲜皆具有明显作用。平板对峙法的结果显示,其对于果实腐烂病菌具有明显的拮抗作用,进一步通过苹果和梨的接种试验发现,不同浓度的菌悬液处理对腐烂病菌的抑菌效果不同。且随着分离菌株含菌量的升高果实的腐烂程度变小。酵母菌在果蔬表面能够定殖,耐受不良环境,拮抗效果好^[14]。果实采后贮藏试验中发现,该分离菌株菌悬液浸泡后,苹果和梨果实的贮藏期延长,其硬度下降减缓,且失重率和腐烂率明显降低,从而维持了果实的较好品质。这可能是由于酵母菌在果实表面形成一个生物屏障^[15],从而降低了果实的蒸腾作用,延缓了果实的水分和营养物质的损失。

3.3 本研究鉴定出了对果蔬采后病害具有拮抗作用的菌株,并对果实采后贮藏具有一定的保鲜作用。但目前关于酵母菌抑制病原菌生长的机制并不清楚,可能通过营养竞争,空间竞争,或是分泌物起到了抗菌作用,这都需要我们后续进一步深入研究。

参考文献

- [1] El-Ghaouth A, Wilson C L. Biologically based technologies for the control of postharvest diseases [J]. *Postharvest News and Information*, 1995, 6: 5-11
- [2] 侯玉婷,施威,孔令云,等.采后水果保鲜技术巧究进展[J].*食品工业*,2014,36:226-231
HOU Yu-ting, SHI Wei, KONG Ling-yun, et al. Research advances in preservation technology of postharvest fruits [J]. *Food Industry*, 2014, 36: 226-231
- [3] McKay A H, Forster H, Adaskaveg J E. Toxicity and resistance potential of selected fungicides to *Galactomyces* and *Penicillium spp.* Causing postharvest fruit decays of citrus and other crops [J]. *Plant Dis.*, 2012, 96(96): 87-96
- [4] Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, et al. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? [J]. *Postharvest Biol. Technol.*, 2009, 52(2): 137-145
- [5] Nunes C A. Biological control of postharvest diseases of fruit. *Eur [J]. J. Plant pathol.*, 2011, 133: 181-196
- [6] Liu J, Sui Y, Wisniewski M, et al. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit [J]. *Int. J Food Microbiol.*, 2013, 167(2): 153-160
- [7] Turk M, Abramovic Z, Plemenitas A. Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi [J]. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7(4): 550-557
- [8] 王一非,郑晓冬.食品添加剂对海洋拮抗酵母 *Rhodospiridium paludigenum* 抑制冬枣采后腐烂效果的影响[J].*浙江大学学报*,2009,35(2):158-164
WANG Yi-fei, ZHENG Xiao-dong. Control of postharvest disease of jujube fruit by combing antagonistic yeast *Rhodospiridium paludigenum* with food additives [J]. *Journal of Zhejiang University*, 2009, 35(2): 158-164
- [9] Mather J P, Roberts P E. Introduction to cell and tissue culture: theory and technique [M]. New York and London: Plenum Press, 1998, 89(4): 554
- [10] 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
GUO Dong-qi, ZHAO Ping, HOU Xu-jie. Screening of antagonistic yeasts for biological control of postharvest diseases of winter jujubes [J]. *Storage and Process*, 2011, 11(6): 6-9
- [11] Chi Z M, Liu Z Q, Gao L M, et al. Marine yeasts and their applications in mariculture [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2006, 5(3): 251-256
- [12] 周小虹,闫冬,陆兆新,等.酵母菌 A82-2 的分类鉴定及对桃软腐病菌的抑菌效果研究[J].*浙江大学学报(农业与生命科学版)*,2013,39(1):75-83
ZHOU Xiao-hong, YAN Dong, LU Zhao-xin, et al. Classification and identification of yeast strain A82-2 and its inhibitory effect on *Rhizopus stolonifer* [J]. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2013, 1: 75-83
- [13] 阎金勇,杨江科,闫云君.*Galactomyces geotrichum* Y25 产脂肪酶条件的优化[J].*生物加工过程*,2007,5(2):46-51
YAN Jin-yong, YANG Jiang-ke, YAN Yun-jun. Optimization of lipase production conditions by *Galactomyces geotrichum* Y25 [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2007, 5(2): 46-51
- [14] 徐慎东.酵母菌防治果蔬采后病害研究进展[J].*现代农业科学*,2008,15(11):12-13
XU Shen-dong. Research progress on fruit and vegetable diseases after controlling with yeast [J]. *Modern Agricultural Sciences*, 2008, 15(11): 12-13
- [15] 陈爱平,史辉,王楠楠,等.酵母菌对草莓果实防腐保鲜的效果研究[J].*北方园艺*,2011,17:166-168
CHEN Ai-ping, SHI Hui, WANG Nan-nan, et al. Research on preservation effect of yeast on strawberry fruit [J]. *Northern Horticulture*, 2011, 17: 166-168