

葡萄采后病害生防制剂用拮抗酵母的筛选

秦 丹¹, 石雪晖², 林亲录¹, 胡亚平¹, 郭佳婧¹

(1.湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 本研究通过对比 5 种拮抗酵母在抑制葡萄采后病害中的效果, 以及在正常葡萄表面的生长适应性, 从中筛选出适合开发成生防制剂的种类。结果表明: 罗伦隐球酵母和季也蒙假丝酵母的抑菌效果较好, 从生长适应性方面比较, 季也蒙假丝酵母最适合开发成生防制剂。

关键词: 葡萄; 采后病害; 拮抗酵母; 筛选

Screening of Antagonism Yeasts as Biocontrol Preparation for Postharvest Diseases of Grapes

QIN Dan¹, SHI Xue-hui², LIN Qin-lu¹, HU Ya-ping¹, GUO Jia-jing¹

(1.College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In this study, the biocontrol efficacies for postharvest diseases of grapes and growth adaptabilities on the grapes surface were contrasted among 5 strains of antagonism yeasts. Results showed that *Candida guilliermondii* and *Cryptococcus laurentii* can effectively inhibit postharvest diseases of grapes. *Candida guilliermondii* is the optimum antagonism yeast to produce biocontrol preparation.

Key words: grapes; postharvest diseases; antagonism yeast; screening

中图分类号: TQ926.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0303-03

葡萄是我国的六大水果之一, 2002 年我国的鲜食葡萄产量已经突破 200 万吨, 成为世界第一鲜食葡萄生产大国^[1]。葡萄极易在贮藏运销中受到病原菌感染而引起腐烂, 目前, 葡萄贮藏中主要的防腐技术是熏硫处理, 但硫熏蒸后, 对人有毒害的亚硫酸盐残留量往往超标, 高剂量的 SO₂ 还会破坏葡萄自身的抗氧化酶系的活性使膜损伤。过剩的 SO₂ 气体挥发到环境中还会带来酸雨、土壤酸化等一系列环境问题。因此, 葡萄防腐需要寻求更安全 and 环保的技术。果实采后病害生物防治技术的主要原理是利用微生物之间的拮抗作用, 通过拮抗菌的繁殖, 达到抑制病原微生物生长, 减少腐败的目的^[2]。该技术安全环保性能优越, 将是今后果品防腐保鲜技术的发展方向。目前, 葡萄专用的采后病害生防制剂的研究与开发在国内外尚属空白, 及时开展相关研究具有非常重要的实用意义。

本研究对比几种国内外报道的几类葡萄采后病害拮抗酵母的抑菌效果和正常葡萄表面的生长适应性, 从中筛选出最适合开发成生防制剂的拮抗菌, 以期最终研制出能够商业应用的生防制剂, 提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄购自本地葡萄园, 品种为夏黑无核。

拮抗菌: 黑酵母(*Aureobasidium pullulans*)、季也蒙假丝酵母(*Candida guilliermondii*)、罗伦隐球酵母(*Cryptococcus laurentii*)、柠檬形克勒克氏酵母(*Kloeckera apiculata*)、毕赤氏酵母(*Pichia guilliermondii*) 中国科学院微生物研究所国家菌种保藏中心; 病原菌: 灰霉葡萄孢(从病果上分离获得)。

1.2 方法

1.2.1 NYDB(酵母营养葡萄糖培养液)的制备

牛肉膏 8 g、酵母浸膏: 5 g、葡萄糖 10 g、水 1000ml, 于 115℃灭菌 20min。

1.2.2 拮抗菌悬液的制备^[3]

在 250ml 的三角瓶中装入 50ml 的 NYDB 培养基, 置于高压灭菌锅中, 在 115℃灭菌 20min, 冷却后用接种环接入两环拮抗酵母菌, 在 28℃下 200r/min 振荡培养 20h, 取出三角瓶, 将酵母菌培养液置于离心杯中, 在 3000r/min 下离心 10min 收集菌体, 并用无菌的生理盐水(0.85%)洗涤酵母菌体两次, 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, 计算

收稿日期: 2007-08-27

作者简介: 秦丹(1972-), 男, 副教授, 研究方向为果蔬保鲜与加工。E-mail: qd730101@126.com

出酵母菌悬液的浓度。并用无菌的生理盐水调整至所需浓度，待用。

1.2.3 病原菌悬液的制备

用接种环在培养好的霉菌试管斜面上刮取适量孢子，转移到无菌生理盐水中，用血球计数板计数，并用无菌的生理盐水调整至所需浓度，待用。

1.3 实验设计

1.3.1 不同酵母抑菌效果对比(活体筛选法)^[4]

选择新鲜饱满的葡萄果粒作为实验材料(每组用果 50 粒)，用消毒接种针在葡萄果粒上扎孔(3mm 深)，每个果粒扎 5 个孔，将各酵母的纯菌株分别制成菌悬液(1×10^8 CFU/ml)，将扎孔后的果粒在酵母菌悬液中浸泡 30s，捞出风干 2h，再将果粒在病原菌菌悬液(1×10^8 CFU/ml)中浸泡 30s，捞出风干，置于常温下，每天观察一次，并记录腐烂率(果实表皮开始出现水渍状斑块时即认定为腐烂)，直到对照组的腐烂率超过 90% 为止，统计腐烂率。重复以上步骤，将处理后的果粒改为在 2~4℃ 的冰箱中贮藏观察，统计腐烂率。

1.3.2 不同酵母葡萄正常果实表面生长情况对比^[5]

选择新鲜饱满的葡萄果粒作为实验材料(每组用果 100 粒)，将 1.3.1 中筛选出的抑菌效果较好的酵母纯菌株分别制成菌悬液(2×10^5 CFU/ml)，把果粒全部浸入菌悬液中 1min 后取出，室温下放置 1h，然后随机从中选取 5 粒放入 200ml 无菌水中，用超声波清洗器清洗 10min，用血球计数板计数，作为该酵母的起始值。再将剩下的果粒置于 2~4℃ 的冰箱中贮藏，每隔 24h 按同样的方法测定酵母数量，同时观察葡萄外观形态的变化情况，连续测定 15d 后，对剩下的葡萄进行感官评价。

1.4 感官评价方法

采用 100 分制(评分项目为 4 项，每项占 25 分)：通过请 5 位有经验的食品专业的师生和 5 位非专业人员共 10 人担任感官评价员，按感官评分标准对葡萄进行评分，取平均分作为最终评分。感官评分标准见表 1。

表 1 葡萄感官评分标准评价
Table 1 Standard of sensory evaluation on grapes

项目	色泽	脆度	酸感	风味
20~25 分	鲜艳有光泽	正常	适当，正常	正常
10~19 分	略为发暗，仍有光泽	略软	加重，无异酸味	略有酒味
5~9 分	发暗，无光泽	绵软	有异酸味	有酒味
0~4 分	发白，无光泽	软烂	有强烈的异酸味	酒味浓郁，伴有异味

2 结果与分析

2.1 不同酵母抑菌效果对比

拮抗菌的筛选方法目前主要有两种：离体筛选(*in*

vitro)和活体筛选(*in vivo*)。离体筛选是将病菌和可能的拮抗菌共同培养于培养基内，测定其抑菌圈情况来判断微生物的拮抗能力的筛选方法，一般适应于可以产生抗菌素的拮抗细菌和霉菌的筛选。而拮抗酵母一般不产生抗菌素，采用离体筛选的方法可能存在较大误差，而活体筛选与实际应用环境接近，所得拮抗菌的拮抗效果更为可靠，从实验阶段转向应用阶段更容易，因此，本研究中直接采用活体筛选比较酵母的抑菌能力。常温下存放至空白腐烂率达 90% 以上后的结果见图 1，2~4℃ 的冰箱中贮藏的结果图 2。

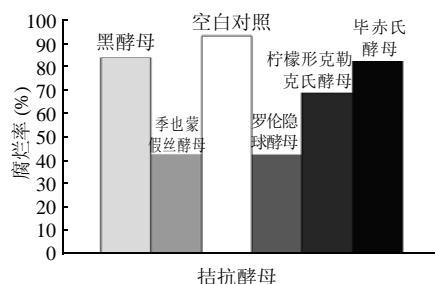


图 1 常温下拮抗菌抑菌效果对比

Fig.1 Decay rates of grapes inoculated with various yeasts at room temperature

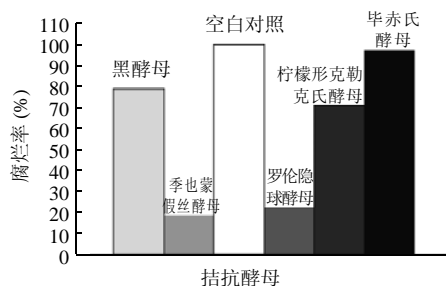


图 2 0~2℃下拮抗菌抑菌效果对比

Fig.2 Decay rates of grapes inoculated with various yeasts at 0~2℃

由图 1、2 可知，接种拮抗酵母后，葡萄的腐烂率均比对照低，说明拮抗酵母具有减轻腐烂，抑制灰霉繁殖的作用，这与相关的报道相吻合。在所有酵母中，无论在常温下还是低温环境下，黑酵母、毕赤氏酵母和柠檬形克勒克氏酵母的抑菌效果均明显不如其它两种酵母。而罗伦隐球酵母和季也蒙假丝酵母的抑菌效果十分显著，尤其在低温贮藏条件下，经罗伦隐球酵母和季也蒙假丝酵母处理的样品腐烂率只有空白对照的 20% 左右，而鲜食葡萄目前均采用低温贮藏，灰霉病正是低温贮藏中葡萄最主要的病害，因此应该选择这两种酵母进行生防制剂的研制。

2.2 不同酵母葡萄正常果实表面生长情况对比

果蔬采后生防制剂必须在正常果蔬表面具有较好的生长适应性，才有可能发挥抑菌作用。在进行拮抗酵

表2 葡萄鲜果感官评分结果($\bar{x} \pm SD$)
Table 2 Results of sensory evaluation ($\bar{x} \pm SD$)

评分项目	色泽	脆度	酸感	风味	总分
季也蒙毕赤氏酵母处理得分	19 \pm 1.21 ^a	22 \pm 0.12 ^a	23 \pm 0.33 ^a	25 \pm 0.41 ^a	89 \pm 0.33 ^a
罗伦隐球酵母处理得分	18 \pm 2.32 ^a	21 \pm 0.46 ^a	24 \pm 0.17 ^a	24 \pm 0.03 ^a	87 \pm 0.81 ^b
未处理对照得分	21 \pm 0.59 ^a	22 \pm 0.20 ^a	25 \pm 0.55 ^a	24 \pm 0.18 ^a	92 \pm 0.19 ^a

注: 上标不同小写字母表示 $p=0.05$ 水平差异。

母筛选时, 除考察活体抑菌效果外, 还必须考察拮抗微生物在商业贮藏条件中, 在正常果实表面的生长情况, 所筛选出的拮抗菌才能够真正开发成生防制剂。本研究选取了在活体抑菌试验中表现良好的罗伦隐球酵母和季也蒙假丝酵母作为实验对象, 考察它们在正常葡萄表面的生长情况, 实验环境模拟商业贮藏条件, 结果见图3。

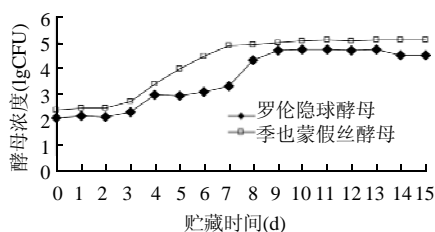


图3 拮抗酵母在葡萄表面生长情况
Fig.3 Population dynamics of different antagonists on surface of grapes

由图3可知, 两种酵母菌在较低贮藏温度的情况下, 均能在葡萄表面自然生长, 罗伦隐球酵母从第3d开始进入对数生长期, 至第9d开始进入稳定期。而季也蒙假丝酵母在第2d就开始进入对数期, 至第7d已进入稳定期, 因此, 季也蒙假丝酵母在葡萄表面的繁殖速度比罗伦隐球酵母略快。从微生物数量上看, 至稳定期时, 季也蒙假丝酵母增加了345倍, 罗伦隐球酵母增加了263倍。以上实验结果表明, 两种酵母在葡萄表面的生长适应性均较好, 具有开发成生防制剂的潜力。二者间比较, 由于酵母菌主要是通过营养竞争抑制病菌生长, 因此繁殖速度越快拮抗作用越明显, 因此, 从营养竞争的方面考虑, 季也蒙假丝酵母开发成为制剂的潜力最大。贮藏15d后, 对葡萄进行感官评价, 结果见表2。

由表2可知, 拮抗酵母处理过的果实风味和颜色与未经处理的对照间不存在明显差异, 说明这两种酵母在葡萄表面的繁殖及代谢产物在一定时间内并不会影响果实的感官品质, 因此选取季也蒙假丝酵母开发成生防制剂是

可行的。

3 结论

3.1 活体筛选表明, 在所选的拮抗酵母中, 罗伦隐球酵母和季也蒙假丝酵母的抑菌效果最明显。

3.2 罗伦隐球酵母和季也蒙假丝酵母在葡萄表面的生长适应性均较好, 具有开发成生防制剂的潜力, 二者间比较, 季也蒙假丝酵母开发成为制剂的潜力比罗伦隐球酵母更大。

4 讨论

4.1 由于酵母菌拮抗酵母一般不产生抗菌素, 比产生抗菌素的拮抗细菌和霉菌具有更好的安全性, 因此本研究中只选取酵母菌进行筛选, 未比较拮抗酵母与其他类型拮抗菌的抑菌效果。

4.2 本研究中所选的酵母均是近年来, 国内外报道最多的, 对葡萄采后病害具有抑制作用的种类, 现有研究基础上最可能发展成为生防制剂。受条件限制不可能比较所有拮抗酵母的抑菌效果, 同时今后研究中也有可能发现抑菌效果更好的拮抗酵母。

4.3 本研究仅从抑菌效果一方面筛选出能够发展成为生防制剂的酵母种类, 未考察酵母增值培养条件, 实际工业化大生产还需考虑酵母的培养成本等因素, 最终确定商业生产的最佳菌种。

参考文献:

- [1] 修德仁. 我国鲜食葡萄保鲜产业现状及发展建议[J]. 保鲜与加工, 2002(5): 1-4.
- [2] 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.
- [3] ROBERTS R G. Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii* [J]. Phytopathol, 1990, 80: 526-530.
- [4] 范青, 田世平, 姜爱丽, 等. 采摘后果实病害生物防治拮抗菌的筛选和分离[J]. 中国环境科学, 2001, 21(4): 313-316.
- [5] MACLAUGHLIN. Biological control of postharvest diseases of grape, peach and with yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermond* [J]. Plant Dis, 1992, 76: 470-473.