

# 腐败杨梅中两株细菌的分离与鉴定

蒋会芳,冉火苗,孔望君,辛志宏\*

(南京农业大学食品科技学院,江苏南京 210095)

**摘要:**以腐烂杨梅为研究对象,采用平板划线分离与斜面纯化技术,筛选出两株编号为 YMS-7 和 YMN-5 的细菌,分别提取两株菌的 DNA 后,扩增 16S rDNA 序列并克隆测序,获得的基因序列在 EzBioCloud 数据库中进行同源性比对,构建 16S rDNA 系统发育树,结合生理生化分析,将 YMS-7 和 YMN-5 分别鉴定为类芽孢杆菌 *Paenibacillus agaridevorans* 与嗜气芽孢杆菌 *Bacillus aerophilus*。

**关键词:**杨梅,菌株鉴定,16S rDNA 基因,系统发育分析

## Isolation and identification of two bacteria from rotten *Myrica rubra*

JIANG Hui-fang, RAN Huo-miao, KONG Wang-jun, XIN Zhi-hong\*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In this study, two strains of bacteria coded as YMS-7 and YMN-5 were isolated from rotten *Myrica rubra* using plate streaking and slant culture methods. After extraction of DNA, 16S rDNA from both strains were amplified for sequencing and homology analysis using EzBioCloud database. Two phylogenetic trees were established based on these sequences of 16S rDNA, combined with physiological and biochemical characteristics. Consequently, YMS-7 and YMN-5 were identified as *Paenibacillus agaridevorans* and *Bacillus aerophilus*, respectively.

**Key words:** *Myrica rubra*; identification; 16S rDNA; phylogenetic analysis

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)10-0260-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.10.044

杨梅(*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) 别名树梅、珠红、系杨梅科杨梅属植物<sup>[1]</sup>, 主要产自我国的浙江、福建等省<sup>[2]</sup>。杨梅果实色泽鲜艳, 味道甜美, 富含多种营养成分。又因其性平、无毒且有止咳生津、消食利尿等功能, 深受消费者喜爱<sup>[1]</sup>。然而, 杨梅果实多汁柔嫩, 极易在采摘、运输过程中造成果实腐烂, 严重制约了杨梅的异地销售和鲜果出口<sup>[3-4]</sup>, 据报道, 杨梅采后 4 d, 其病变率达到了 43.7%<sup>[5]</sup>。研究表明导致杨梅不易储存的主要原因有: 杨梅果实外表无结构致密的皮层, 在采收、贮运过程中, 极易受到碰伤、积压等物理性因素的损害, 使果实衰老劣变加速。杨梅采后自身生理生化特性的变化, 进一步促进果实的衰老<sup>[6-7]</sup>。加之杨梅成熟时高温多雨, 适于微生物在果实中快速附着、定殖, 尤其是病原微生物的生长繁殖, 加速了杨梅的腐败<sup>[8]</sup>。因此, 分离鉴定浸染微生物是确定杨梅腐败变质的关键问题。张宏等从杨梅中分离出微紫青霉(*Penicillium janthinellum*)、托姆青霉(*P. thomii*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporium*)、链格孢(*Alternaria alternata*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等六种病原真菌<sup>[9]</sup>; 王根铎等从常温贮藏的杨梅中分离出杨梅轮帚霉

(*Verticicladiella abietina* (Peck) Hughes)、桔青霉(*P. Citrinum* Tom)、绿色木霉(*Trichoderma Viride pers. ex Fr.*)等三种病原真菌<sup>[5]</sup>。曹宜<sup>[10]</sup>等从腐败杨梅中分离出 4 株病原细菌和 2 株病原真菌, 然而, 其并未对病原细菌的种属地位进行鉴定, 只是从形态学的角度进行了初步的分类。因此, 目前有关杨梅腐败菌的研究, 大多集中在病原真菌的分类鉴定方面, 对腐败细菌的分类鉴定研究尚未见报道。

传统的细菌分类鉴定主要通过观察菌种的形态和生理生化等表型特征来确定其种属地位。然而, 细菌种类繁多、形态特征较为相似, 且少数形态特征和生理生化指标随着环境的变化而不稳定, 仅依靠形态、生理生化等表型特征来鉴定细菌, 既需要丰富的细菌鉴定工作经验又需要较长的检验时间, 显然, 这种传统的方法不能高效地分离鉴定出菌株的种属地位, 存在一定的局限性。20 世纪 60 年代末, C R Woese 开始采用寡核苷酸编目法对生物进行分类, 他认为 16S rRNA 及其类似的 rRNA 基因序列作为生物系统发育指标最为合适<sup>[11]</sup>。自此以后, 随着核糖体数据库的日益完善, 分子生物学鉴定技术成为细菌分类和鉴定的有力工具。

收稿日期: 2015-11-11

作者简介: 蒋会芳(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: 2013108086@njau.edu.cn。

\* 通讯作者: 辛志宏(1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: xzhfood@njau.edu.cn。

基金项目: 2015 年农产品质量安全风险评估项目(GJFP2015012)。

本研究以腐烂杨梅为研究对象,采用稀释梯度法和平板划线分离技术得到两株编号 YMS-7 和 YMN-5 的细菌,在形态学观察和生理生化分析的基础上,结合现代分子生物学技术,进行 16S rDNA 基因片段的扩增,构建 16S rDNA 系统发育树,对其进行分类鉴定,确定其种属地位。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

产自江苏省南京市石湫镇种植的杨梅 装入塑料保鲜袋,置于 4 ℃ 冰箱保存 14 d 取出,选取腐烂的杨梅果肉为供试材料,分离细菌<sup>[10]</sup>;微生物培养基所需材料 购自南京寿德试剂器材有限公司;OMEGA 细菌基因组试剂盒 (Bacterial DNA Kit (50)) 及引物 16S(F)/16S(R)、M13-47/M13-RV 购自上海捷瑞生物工程有限公司;PCR 相关试剂 (包括 Lodding Buffer 等) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;基因序列测定 由上海美吉生物有限公司完成。

无菌工作台 SW-CJ-1FD 苏州净化集团设备有限公司;Microfuge 22R 台式微量冷冻离心机 美国 Beckman 公司;TP600 型梯度 PCR 仪 日本 TaKaRa 公司;DYCP-31DN 电泳仪 北京市六一仪器厂;JS-380C 自动数码凝胶成像分析仪 上海培清科技有限公司。

### 1.2 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10、酵母提取物 5、氯化钠 10、琼脂 18、pH7.0。

牛肉膏蛋白胨培养基(NA)(g/L):牛肉膏 5.0、蛋白胨 10.0、氯化钠 5.0、琼脂 18、pH7.2~7.4。

### 1.3 菌株分离与纯化

取数颗体积相同的单个腐烂杨梅,分别置于无菌研钵中研磨出汁液,得到杨梅原液,取 1 mL 原液置于 9 mL 无菌水中,制成  $10^{-1}$  的杨梅稀释液,同理,依次制备  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  杨梅稀释液,取 200  $\mu$ L 稀释液分别涂布于 NA 培养基上,30 ℃ 培养 2~3 d,挑取平板上菌落形态规则的单个菌落接种经划线纯化后,接于 LB 斜面得到单个纯的菌落,置于 4 ℃ 保藏。

### 1.4 菌株生理生化特性测定

参考《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》<sup>[12]</sup>、《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup> 和《微生物学实验》<sup>[14]</sup> 的方法,测定该菌株的生理生化特征。测定指标主要包括耐盐性、接触酶和氧化酶反应、淀粉水解、果胶水解、硝酸盐还原、苯丙氨酸脱氨酶、糖醇类发酵产酸等。

### 1.5 基因组 DNA 的提取

从保藏菌种的斜面培养基中挑取菌体转接到 LB 液体培养基中,30 ℃ 摇床振荡培养 24 h。基因组 DNA 的提取采用细菌基因组试剂盒,按照说明书操作。提取的基因组 DNA 经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳检测(120 V,30 min),溴化乙锭(EB)染色。4 ℃ 保存备用,或于 -20 ℃ 中长期保存。

### 1.6 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增

16S 区域的扩增选择原核生物 16S rDNA 通用引

物 16S(F) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 16S(R) (5'-ACGGTTACCTGTACGACTT-3'),PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 100 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 7 min。

PCR 扩增采用 50  $\mu$ L 的反应体系,包括 ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu$ L,2  $\times$  Taq Master Mix 25  $\mu$ L,引物 16S(F) (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L、16S(R) (10  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L, DNA 2  $\mu$ L。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后 4 ℃ 保存备用。

### 1.7 16S rDNA 基因片段克隆测序

采用 DNA 提取试剂盒 Ver.3.0 回收 PCR 产物,纯化的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,然后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  制备的感受态细胞中,使用氨苄抗性培养基 LB 琼脂平板筛选白色单菌落,挑取白色单菌落于 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡培养 12 h,取 1  $\mu$ L 菌液直接做 PCR,引物为 M13-47 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') 和 M13-RV (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'),电泳检测是否含有目的片段。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 60 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

PCR 采用 25  $\mu$ L 的反应体系,包括 ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L,2  $\times$  Taq Master Mix 12.5  $\mu$ L,引物 M13-47 (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L、M13-RV (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, DNA 1  $\mu$ L。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,EB 染色,并用凝胶成像系统拍照记录。

### 1.8 目的 DNA 序列测序和系统发育学分析

将 16S rDNA 的单克隆 PCR 产物交由上海美吉生物有限公司进行测序。获得基因序列后,利用 DNAMAN 拼接序列,在 EzBioCloud 中进行 EzTaxon 比对,下载与供试菌株序列同源性相近的模式菌株序列,利用 MEGA 6.0 软件 Neighbor-Joining (N-J) 方法构建系统发育树,自展数为 1000。

## 2 结果与分析

### 2.1 生理生化分析

菌株 YMS-7 在 LB 培养基上生长良好,最适生长温度为 30 ℃,形成乳白色菌落,半透明,表面光滑湿润,边缘整齐,菌落无色素产生。生理生化反应测定指标显示(表 1),菌株 YMS-7 在含 2% NaCl 的培养基中能够正常生长,但在含 5% NaCl 的培养基中无法生长;糖发酵产酸实验结果表明,YMS-7 能够利用 D-葡萄糖、海藻糖、D-蔗糖、D-乳糖、D-半乳糖、D-麦芽糖等多种碳源,但是不能利用 D-果糖、D-甘露醇、D-木糖等碳源;接触酶、氧化酶、硝酸还原反应等均为阳性;而 V-P 反应、甲基红反应、柠檬酸钠利用、淀粉水解、果胶水解以及苯丙氨酸脱氨酶等反应均为阴性。上述生理生化指标与文献报道的模式菌株 *Paenibacillus agarivorans* DSM 1355<sup>T</sup> 的生理生化指标高度相似<sup>[15]</sup>。

菌株 YMN-5 在 LB 培养基上生长良好,最适生

表1 菌株 YMS-7、YMN-5 与对照菌株的生理生化分析汇总表<sup>[15-16]</sup>  
Table 1 Physiological and biochemical analysis of strain YMS-7 and YMN-5<sup>[15-16]</sup>

生理生化特征	YMS-7	<i>P.agaridevorans</i>	YMN-5	<i>B.aerophilus</i>
最适生长温度(℃)	30	30	30	30
耐盐性(w/v)				
1%	+	+	+	+
2%	+	+	+	+
5%	-	-	+	+
10%	-	-	+	+
菌落色素	WH	WH	WH	WH
接触酶反应	+	+	+	+
氧化酶反应	+	+	+	+
VP 反应	-	-	+	+
甲基红	-	NR	-	-
柠檬酸盐利用	-	NR	+	+
淀粉水解	-	-	+	+
果胶水解	-	-	-	NR
硝酸盐还原	+	+	+	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-	NR
糖醇类发酵产酸				
D-葡萄糖	+	+	+	+
海藻糖	+	+	+	+
D-果糖	-	-	+	+
D-甘露醇	-	-	+	+
D-蔗糖	+	+	+	+
D-乳糖	+	+	+	+
D-半乳糖	+	+	+	+
D-木糖	-	-	+	+
D-麦芽糖	+	+	+	+

注: +, 表示阳性; -, 表示阴性; WH, 表示白色; NR, 表示未报道。

长温度为 30 ℃, 形成白色菌落, 不透明, 表面不光滑, 边缘不整齐, 菌落无色素产生。生理生化反应测定指标显示(表 1), 菌株 YMN-5 的耐盐性可达 10%, 能够充分利用 D-葡萄糖、海藻糖、D-蔗糖、D-乳糖、D-半乳糖、D-麦芽糖、D-果糖、D-甘露醇、D-木糖等多种碳源发酵产酸, 接触酶、氧化酶、V-P 反应、柠檬酸钠利用、淀粉水解、硝酸还原反应等均为阳性, 甲基红反应为阴性。上述生理生化特征与文献报道的模式菌株 *Bacillus aerophilus* 28K<sup>T</sup> 的生理生化特征基本相符<sup>[16]</sup>。

## 2.2 16S rDNA 的测序结果

菌株 YMS-7 与 YMN-5 的 16S rDNA 基因片段经单克隆后得到的电泳图谱, 如图 1 所示, 菌株 YMS-7 基因片段大小约 1.6 kb, 基因测序之后得到该菌株的 16S rDNA 的基因片段全长为 1614 bp; 菌株 YMN-5 基因片段大小约 1.5 kb, 基因测序之后得到该菌株的 16S rDNA 的基因片段全长为 1448 bp。琼脂糖电泳检测与序列测序得到的基因片段大小一致。

## 2.3 系统发育学分析

系统发育树是基于共同祖先的原则, 是用来描述生物传代谱系的常用表达方式, 它可以直观地表达分类群、物种或基因之间的亲缘关系和进化

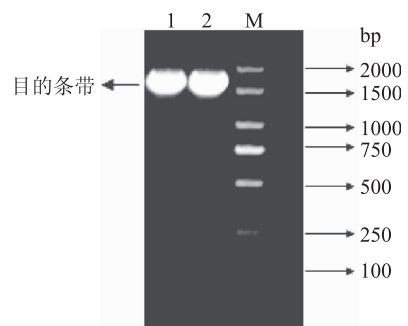


图1 菌株 YMS-7 和 YMN-5 的 16S rDNA 基因的凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR products of 16S rDNA

注: 1, 菌株 YMS-7; 2, 菌株 YMN-5; M, DNA 分子质量标准。

方向<sup>[17]</sup>。

菌株 YMS-7 与 YMN-5 经 PCR 扩增得到 16S rDNA、克隆测序序列, 将序列提交到 EzBioCloud 中进行同源性搜索, 结果如表 2 所示。从表 2 可以看出, 菌株 YMS-7 与 *Paenibacillus agaridevorans* DSM 1355<sup>T</sup> 同源性最高(98.53%)。根据同源性比较结果, 可以推测菌株 YMS-7 为类芽孢杆菌属细菌; 从表 3 可知, 菌株 YMN-5 与 *Bacillus aerophilus* 28K<sup>T</sup> 的 16S

表2 菌株 YMS-7 构建系统发育树所用类芽孢杆菌属 16S rDNA 序列登录号

Table 2 Sequences used in the phylogenetic analysis of strain YMS-7 with accession number

菌种名	菌株名	登录号	同源性(%)
<i>Paenibacillus agaridevorans</i>	DSM 1355(T)	AJ 345023	98.53
<i>Paenibacillus nanensis</i>	MX2_3(T)	AB265206	97.12
<i>Paenibacillus harenae</i>	B519(T)	AY839867	95.81
<i>Paenibacillus montaniterrae</i>	MXC2_2(T)	AB295646	95.70
<i>Paenibacillus granivorans</i>	A30(T)	AF237682	95.60
<i>Paenibacillus relictisesami</i>	KB0549(T)	AB567661	95.37
<i>Paenibacillus camelliae</i>	blls_2(T)	EU400621	95.24
<i>Paenibacillus cookii</i>	LMG 18419(T)	AJ250317	95.04
<i>Paenibacillus uliginis</i>	N3/975(T)	FN556467	95.03
<i>Paenibacillus alkaliterrae</i>	KSL_134(T)	AY960748	94.90
<i>Paenibacillus chibensis</i>	JCM 9905(T)	AB073194	94.86
<i>Paenibacillus septentrionalis</i>	X13_1(T)	AB295647	94.83
<i>Paenibacillus provencensis</i>	4401170(T)	EF212893	94.71
<i>Paenibacillus chibensis</i>	NRRL NRS_1356(T)	D85397	94.41
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	XIL14(T)	AY427832	94.30
<i>Paenibacillus dongdonensis</i>	KUDC0114(T)	KF425513	94.23
<i>Paenibacillus chibensis</i>	NRRL B_142(T)	D85395	94.01
<i>Paenibacillus purispatii</i>	ES_MS17(T)	EU888513	93.85
<i>Paenibacillus sacheonensis</i>	SY01	GU124597	93.81
<i>Paenibacillus siamensis</i>	S5_3(T)	AB295645	93.81
<i>Paenibacillus taihuensis</i>	THMBG22(T)	JQ398861	93.68

表3 菌株 YMN-5 构建系统发育树所用芽孢杆菌属 16S rDNA 序列登录号

Table 3 Sequences used in the phylogenetic analysis of strain YMN-5 with accession number

菌种名	菌株名	登录号	同源性(%)
<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	AJ831844	99.31
<i>Bacillus atrophilus</i>	JCM9070(T)	AB021181	96.75
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FZB42(T)	CP000560	96.47
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DSM 7(T)	FN597644	96.26
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802(T)	AM747812	96.26
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	AE017333	95.63
<i>Bacillus sonorensis</i>	NBRC 101234(T)	AYTN01000016	95.63
<i>Bacillus idriensis</i>	SMC 4352-2(T)	AY904033	95.45
<i>Bacillus aerius</i>	24K(T)	AJ831843	95.42
<i>Bacillus benzoovorans</i>	DSM 5391(T)	D78311	94.22
<i>Bacillus marisflavi</i>	TF-11(T)	AF483624	94.18
<i>Bacillus aquimaris</i>	TF-12(T)	AF483625	94.11
<i>Bacillus zhanjiangensis</i>	JSM 099021(T)	HM460884	93.83
<i>Bacillus cohnii</i>	DSM 6307(T)	X76437	93.76
<i>Bacillus circulans</i>	ATCC 4513(T)	AY724690	93.68
<i>Bacillus indicus</i>	LMG 22858(T)	JGVU01000003	93.56
<i>Bacillus cibi</i>	DSM 16189(T)	JNVC01000024	93.28

rDNA 同源性最高, 达到 99.31%。因此, 推测菌株 YMN-5 为芽孢杆菌属细菌。

YMS-7 菌株构建系统发育树所用的类芽孢杆菌参考菌株 16S rDNA 序列登录号见表 2。选取 *Oxalophagus oxalicus* DSM 5503T(Y14581)<sup>[18]</sup> 作为外组。如图 2 所示, 每一个种都形成一个独立的分支, 且菌株 YMS-7 与 *Paenibacillus agaridevorans* DSM

1355<sup>T</sup> 聚为一支, 其自展支持率为 99%。表明菌株 YMS-7 与 *Paenibacillus agaridevorans* DSM 1355<sup>T</sup> 亲缘关系最近。同源性比对结果与系统发育树分析得到的结果一致。因而进一步表明, 菌株 YMS-7 为类芽孢杆菌 *Paenibacillus agaridevorans*。

YMN-5 菌株构建系统发育树所用的芽孢杆菌参考菌株 16S rDNA 序列登录号见表 3。选取

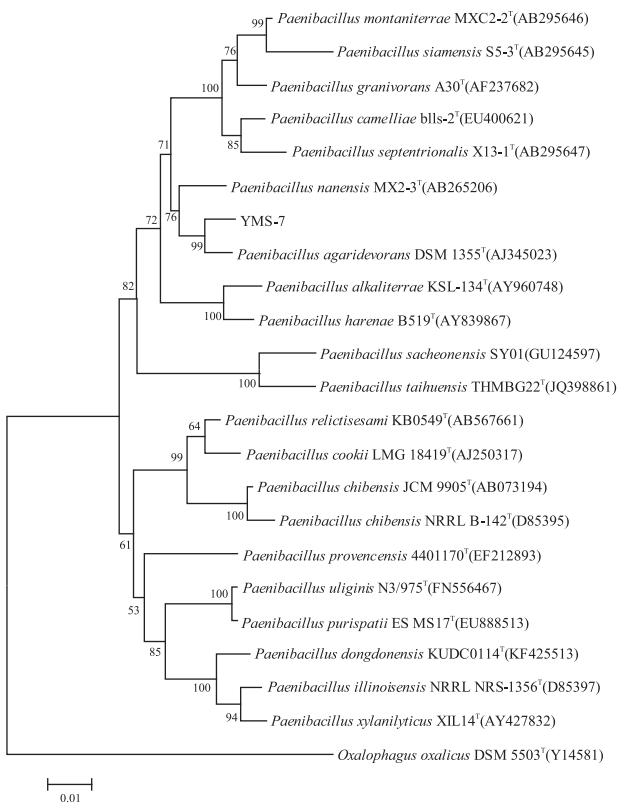


图2 基于菌株 YMS-7 16S rDNA 基因序列构建的系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on the 16S gene sequence of strain YMS-7

*Micrococcus luteus* DSM 20030T (AJ536198)<sup>[16]</sup> 作为外组。如图3所示,菌株 YMN-5 与 *Bacillus aerophilus* 28K<sup>T</sup> 聚为一支,其自展支持率为 100%。表明菌株 YMN-5 与 *Bacillus aerophilus* 28K<sup>T</sup> 亲缘关系最近。与同源性比对结果一致,进一步表明,菌株 YMN-5 为嗜气芽孢杆菌 *Bacillus aerophilus*。

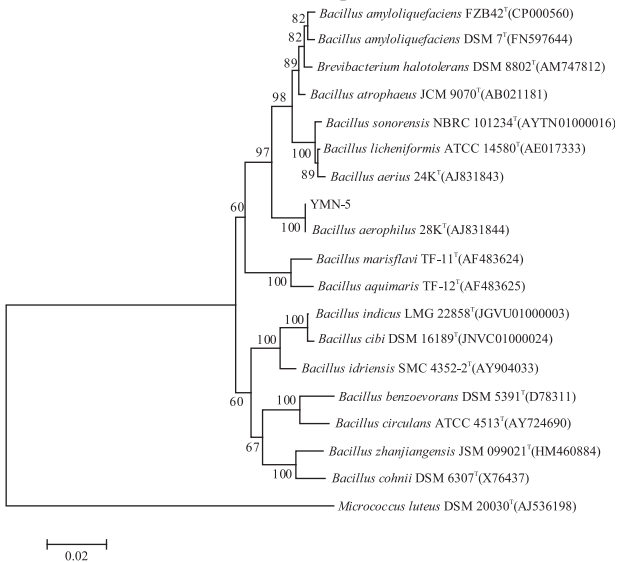


图3 基于菌株 YMN-5 16S rDNA 基因序列构建的系统发育进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the 16S gene sequence of strain YMN-5

结合形态学特征和生理生化结果,以及基于 16S rDNA 的系统发育树分析,将菌株 YMS-7 鉴定为细菌界 *Bacteria*、厚壁菌门 *Firmicutes*、细菌纲 *Bacilli*、芽孢杆菌目 *Bacillales*、类芽孢杆菌科 *Paenibacillaceae*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillaceae*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillaceae*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillaceae*。菌株 YMN-5 鉴定为细菌界 *Bacteria*、厚壁菌门 *Firmicutes*、细菌纲 *Bacilli*、芽孢杆菌目 *Bacillales*、芽孢杆菌科 *Bacillaceae*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、嗜气芽孢杆菌 *Bacillus aerophilus*。

### 3 结论

采用传统的形态学鉴定与现代的分子生物学鉴定相结合的方法,对分离来自腐烂杨梅中的两株细菌 YMS-7 与 YMN-5 进行分离鉴定。提取菌株基因组 DNA 后,扩增 16S rDNA 基因片段,经过 TA 克隆后,进行基因序列测序,所得测序结果提交到 EzBioCloud 数据库,进行有效种的序列相似性搜索,下载与供试菌株 16S rDNA 序列同源性相近的菌株序列,构建 16S rDNA 基因序列进化树,进行系统发育分析,结合形态学特征和生理生化特性,依据细菌鉴定手册标准菌株对照,将菌株 YMS-7 与 YMN-5 分别鉴定为类芽孢杆菌 *P. agaridevorans* 和嗜气芽孢杆菌 *B. aerophilus*。这两株细菌均为首次从腐烂杨梅中分离鉴定得到。今后将对这两株细菌的致腐性进行全面研究,了解它们的来源以及其导致杨梅腐败的机理,为研制开发出抑制杨梅腐烂速率的拮抗菌提供腐败细菌。

### 参考文献

- [1] 普建明. 杨梅[J]. 林业调查规划, 1995(4): 48-51.
- [2] 缪松林, 黄寿波, 梁森苗, 等. 中国杨梅生态区划研究[J]. 浙江农业大学学报, 1995, 21(4): 366-372.
- [3] 何新华, 陈力耕, 陈怡, 等. 中国杨梅资源及利用研究评述[J]. 果树学报, 2004, 21(5): 467-471.
- [4] 倪海枝, 陈方永, 王引, 等. 杨梅采后保鲜技术研究进展[J]. 保鲜与加工, 2012, 12(4): 47-51.
- [5] 王根镠, 刘又高, 王益光, 等. 杨梅贮藏中的病虫害种类及其危害情况[J]. 中国南方果树, 2002, 31(2): 26-27.
- [6] 席筠芳, 郑永华, 应铁进, 等. 杨梅果实采后的衰老生理[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 213-216.
- [7] 胡西琴, 余欲, 陈力耕. 杨梅果实贮藏期间若干生理特性的研究[J]. 浙江大学报, 2001, 27(2): 179-182.
- [8] 席筠芳. 温度对杨梅果实采后营养物质变化和腐烂的影响[J]. 科技通报, 1993, 9(4): 254-256.
- [9] 张宏, 桂明英, 张陶, 等. 云南杨梅贮藏期真菌病害研究[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(4): 503-506.
- [10] 曹宜, 唐建阳, 刘波. 杨梅采后致病病原菌的分离[J]. 福建农业科技, 2009, 38(4): 65-66.
- [11] CARL R Woese. Bacterial Evolution [J]. Microbiological Reviews, 1987, 51(2): 221-271.
- [12] Holt J G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1st Edition) [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 1984-1989.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-380.

(下转第 278 页)

坏,产生了较多的碎片。

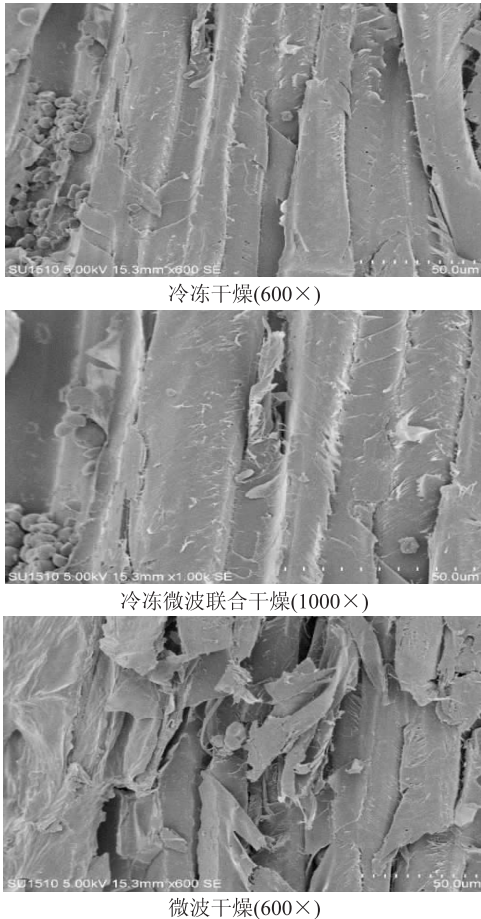


图11 冷冻干燥、微波干燥及冷冻微波联合干燥虎杖产品的微观纤维结构(纵切面)

Fig.11 Electron micrographs(longitudinal section) of *Polygonum cuspidatum*

### 3 结论

不同的冷冻干燥工艺参数对虎杖干燥时间有直接影响。合适的厚度可以保证干燥能力的同时减少干燥时间,合适的加热板温度可以获得良好的外形并减少干燥时间;合适的真空度可减少干燥时间。虎杖冷冻干燥的最优工艺参数为厚度5 mm、加热盘温度40℃、真空度40 Pa。

微波干燥温度越高,干燥速率越快,虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚含量越少,从保护药效成分考虑,合适的微波温度为60℃。

虎杖的微观结构主要形成于冷冻干燥的升华干燥阶段,虎杖干燥至含水率25%时,自由水可完全去除,再进行微波干燥,干燥虎杖产品的色泽、体积保留率、药效成分、复水比相接近冷冻干燥产品,干燥时间可缩短一半,适合实际应用。

### 参考文献

- [1] Xu Zhi, Jie Xiao, Ting Zou. Ameliorative effects of physcion 8-O- $\beta$ -glucopyranoside isolated from *Polygonum cuspidatum* on learning and memory in dementia rats induced by A $\beta$ 1-40 [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53(11): 1-7.
- [2] Jiye Zhang, Li Zhou, Peipei Zhang. Extraction of polydatin and resveratrol from *Polygonum cuspidatum* root: Kinetics and modeling [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 94: 518-524.
- [3] Nawirska, Figiel, Kucharska. Drying kinetics and quality parameters of pumpkin slices dehydrated using different methods [J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 94(4): 14-20.
- [4] Cui Z W, Xu S Y, Sun D W. Effect of microwave-vacuum drying on the carotenoids retention of carrot slices and chlorophyll retention of Chinese chive leaves [J]. *Drying Technology*, 2003, 22(3): 562-575.
- [5] 黄略略. 冻干-真空微波串联联合干燥苹果的保质和节能工艺及模型研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [6] 钱革兰, 张琦, 崔政伟. 真空微波和冷冻干燥组合降低胡萝卜片的干燥能耗[J]. *农业工程学报*, 2011, 26(6): 387-392.
- [7] 于华宁. 黑加仑真空冷冻与微波真空联合干燥工艺研究[J]. *干燥技术与设备*, 2008, 6(5): 235-240.
- [8] 张绪坤, 祝树森, 黄俭花, 等. 用低场核磁分析胡萝卜切片干燥过程的内部水分变化[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(22): 282-287.
- [9] Zielinska, Zapotoczny, Alves-Filho. A multi-stage combined heat pump and microwave vacuum drying of green peas [J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 1(115): 347-356.
- [10] 齐辉, 张勉, 王峥涛. HPLC同时测定虎杖中4种成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(23): 83-85.
- [11] 李静, 宋飞虎, 浦宏杰. 苹果微波干燥的变温控制方法研究[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(9): 218-224.
- [12] GB/T 5009.3-2010. 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [13] 庄远红, 刘静娜, 钟文娟, 等. 真空冷冻干燥香蕉片的工艺研究[J]. *漳州师范学院学报: 自然科学版*, 2011, 24(1): 87-91.

(上接第264页)

- [14] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验(第四版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 9-47.
- [15] A P Uetanabaro, C Wahrenburg, W Hunger, et al. *Paenibacillus agarexodens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(4): 1051-1057.
- [16] S Shivaji, P Chaturvedi, K Suresh, et al. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used

- for collecting air samples from high altitudes [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1465-1473.
- [17] 韩凤侠. 共同祖先原则和系统发育树的解读[J]. *生物学通报*, 2008, 43(9): 14-15.
- [18] Qi Yong Tang, Na Yang, Jian Wang, et al. *Paenibacillus algorifonticola* sp. nov., isolated from a cold spring [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(9): 2167-2172.