

一株桃褐腐病生防酵母菌活性冻干粉的制备及保鲜应用

周秋阳,杨慧慧,王玲,毋宁宁,高兴彪,孙卫红*

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212000)

摘要:为研究出一种能有效防治水蜜桃采后褐腐病的生防制剂,以一株间型假丝酵母菌 Y-17 为研究对象,通过单因素实验和响应面中心组合设计对间型假丝酵母菌 Y-17 冷冻干燥保护剂的配方进行筛选和优化,考察了所制备的活性冻干粉的生防效力和存放效力,并研究了其对水蜜桃的蜜桃采后贮藏的保鲜效果。结果表明,山梨醇 5.43 g/100 mL、海藻糖 12.45 g/100 mL、谷氨酸钠 13.56 g/100 mL 时,组合保护效果最好,酵母菌存活率可达 $84.21\% \pm 0.87\%$,且冻干后的菌粉仍具有较高的生防效力,-20 °C 贮藏 180 d 酵母存活率为 34.66%。保鲜应用实验表明,酵母菌 Y-17 活性冻干粉能够有效抑制水蜜桃腐烂,25 °C 贮藏至第 9 d 时,腐烂指数仅为 6.28%。酵母冻干粉还能减少桃果实贮藏期间水分流失,减缓果实软化速度,25 °C 贮藏 7 d 后,桃果实可溶性固形物含量、维生素 C 含量、可滴定酸含量分别为 10.67%、2.15 mg/100 g、0.17%,均高于对照组,且能有效维持果皮细胞膜完整性,对水蜜桃采后的贮藏保鲜具有积极作用。

关键词:水蜜桃,褐腐病,间型假丝酵母,冻干粉,保鲜应用

Preparation and Preservation Application of a Yeast Active Freeze-dried Powder for Biocontrol of Peach Brown Rot

ZHOU Qiu-yang, YANG Hui-hui, WANG Ling, WU Ning-ning, GAO Xing-biao, SUN Wei-hong*

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

Abstract: In order to study a biocontrol agent which can effectively control honey peach brown rot after harvest, a strain of *Candida intermedia* Y-17 was used as the object. The cryoprotectant formulation was selected and optimized by single factor test and response surface center composite design. The biocontrol effect and storage effect of the active lyophilized powder were investigated, and its fresh-keeping effects on honey peach after harvest were also studied. It was found that the combination of 5.43 g/100 mL sorbitol, 12.45 g/100 mL trehalose and 13.56 g/100 mL sodium glutamate had the best protective effect, and the survival rate of yeast could reach $84.21\% \pm 0.87\%$. The freeze-dried powder still had high biocontrol effect, and the yeast survival rate was 34.66% after 180 days of storage at -20 °C. Fresh-keeping experiment showed that, yeast Y-17 active lyophilized powder could effectively inhibit the rot incidence of peach during storage, and the decay index was only 6.28% when stored at 25 °C until the 9th day. In addition, the yeast freeze-dried powder could also reduce the loss of water and slow down the softening rate of peach during storage. After 7 days storage at 25 °C, the content of soluble solids, vitamin C and titratable acid in peach were 10.67%, 2.15 mg/100 g and 0.17%, respectively, which were higher than those in the control group. Freeze-dried powder could also effectively maintain the integrity of peel cell membrane and played a positive role in maintaining the quality of peach after harvest.

Key words: honey peach; brown rot; *Candida intermedia*; freeze-dried powder; preservation application

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)21-0096-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.21.016

引文格式: 周秋阳, 杨慧慧, 王玲, 等. 一株桃褐腐病生防酵母菌活性冻干粉的制备及保鲜应用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 96-103.

桃褐腐病是一种世界范围内的真菌性病害, 主要由美澳型核果链核盘菌 (*Monilinia fructicola*) 引起,

桃果实感染此病后极易腐烂, 给水蜜桃采后的贮藏、运输和销售带来了极大的困难^[1]。目前, 水蜜桃的采

收稿日期: 2019-01-31

作者简介: 周秋阳 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬采后保鲜, E-mail: xiaoqiuyanglaiye@163.com。

* 通讯作者: 孙卫红 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬采后保鲜, E-mail: weihongsun2009@163.com。

基金项目: 镇江市 2017 科技创新基金 (GY2017006); 企业与院校研发合作项目 (2014126)。

后保鲜仍旧采用传统方法,如冷藏、气调、紫外照射等物理方法以及使用各类广谱杀菌剂^[2]。但这些方法往往伴随着资金高投入、能源高消耗、农药高残留等诸多问题,因此安全高效的生物防治成为国内外果蔬采后贮藏保鲜的研究热点。

现代生物防治主要是利用微生物间的拮抗作用,通过生防菌、病原微生物和宿主之间的相互作用,进而达到防治果蔬采后病害的目的。当前主要使用的拮抗微生物有拮抗细菌、拮抗霉菌和拮抗酵母菌,而拮抗酵母菌更因其抑菌谱性广、安全性高、抗逆性强等特点而被广泛关注^[3]。拮抗酵母菌的主要抑菌机制有:营养和空间竞争、重寄生作用、水解酶的分泌、诱导宿主抗性提高^[4]。龙超安^[5]将拮抗菌株 34-9 接种到柑橘伤口处,48 h 后酵母菌数量即可增长到 20 倍以上,能有效防治柑橘青霉病;刘程惠等^[6]用电子显微镜观察发现,拮抗假丝酵母菌能够很好地吸附在病原菌菌丝表面,并使附着点处病原菌细胞壁出现溶解;罗琳等^[7]发现酵母菌株 G5 能够诱导宿主体内多酚氧化酶(PPO)和过氧化物酶(POD)等抗性酶活性的增加。

冷冻干燥是目前制备微生物固体制剂最常用的方法,但是低温干燥过程中往往会造成细胞的损伤、死亡以及某些生物功能的改变^[8]。因此,通常在菌体冷冻之前加入不同类型的保护剂以改变细胞所处的物理、化学环境,从而减轻冻干过程对细胞的损害^[9]。唐飞等^[10]单独使用海藻糖作为冻干保护剂,冻干后酵母菌存活率为 42%,而对照组仅为 3%;王华等^[11]发现用 14.15 g/100 mL 蔗糖、7.07 g/100 mL 谷氨酸钠、1.1 g/100 mL 聚乙二醇作为冻干保护剂时,热带假丝酵母冻干存活率高达 81.46%。

本研究以一株从桃树枝叶上分离得到的,能够显著抑制桃褐腐病的间型假丝酵母菌 Y-17 为研究对象,通过单因素实验和响应面中心组合设计筛选得到该酵母菌株的复合冻干保护剂配方,对所制备的活性冻干粉进行生防效力和存放效力的评价,并将其在水蜜桃采后贮藏保鲜方面进行初步应用,以明确其在水蜜桃贮藏期间的抑菌效果和保鲜效果,为间型假丝酵母菌 Y-17 在桃褐腐病生物防治方面的应用提供理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试病原菌 美澳型核果链核盘菌,从中国林业微生物菌种保藏中心(CFCC)购得,其 CFCC 编号为 80648;供试拮抗酵母 由本实验室从桃树枝叶上分离得到,能够显著抑制桃褐腐病的间型假丝酵母菌 Y-17 菌株,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏号为 NO:M 2018054,该酵母菌株经小鼠急性经口实验证明为实际无毒型酵母;供试水果“白凤”水蜜桃,从镇江市一有机桃园采摘无机械损伤、无病害、大小均一、7~8 分成熟的水蜜桃,并于当天运回实验室;海藻糖、甘露醇、山梨醇、脯氨酸、谷氨酸钠、 β -环糊精、麦芽糊精、邻苯二酚、愈创木酚、酚酞、抗坏血酸 均为国产分析纯。

HVE-50 全自动高压蒸汽灭菌锅 日本 Hirayama;H1850R 台式高速冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器有限公司;ULT1386-3-V40 超低温冰箱 美国赛默飞世尔公司;FD-8 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;WYA-2WAJ 阿贝折光仪 杭州三永德仪器仪表有限公司;DDS-11A 电导率仪 杭州齐威仪器有限公司;ST-Z16 食品物性测试仪 山东盛泰仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的配制及菌种活化 NYDA 培养基:葡萄糖 10 g,酵母浸膏 5 g,牛肉浸膏 8 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1000 mL,自然 pH;NYDB 培养基:NYDA 培养基中不加琼脂;PDA(Potato Dextrose Agar)培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1000 mL,自然 pH;上述培养基均 121 °C 灭菌 20 min,待用。

将病原菌菌株于 PDA 培养基上 25 °C 活化 2~3 次,待用;Y-17 酵母菌株于 NYDA 培养基上 28 °C 活化 2~3 次,待用。

1.2.2 菌体的培养与收集 将活化好的酵母菌接种于 NYDB 液体培养基中(50 mL/250 mL),180 r/min,28 °C 恒温振荡培养 24 h;培养好的种子液按 3%(V/V)的接种量接入 NYDB 培养基中,180 r/min,28 °C 恒温振荡培养 48 h 后,4 °C、6000 r/min 离心 15 min,收集菌体沉淀^[12]。

1.2.3 酵母冻干粉的制备 将 1.2.2 离心得到的菌体沉淀用保护剂溶液振荡溶解,平衡 30 min 后分装至直径 9 cm 的培养皿中,控制液体厚度为 5 mm 左右;将样品放入-80 °C 超低温冰箱中预冻 3 h,预冻结束后迅速转入预冷好的真空冷冻干燥机中,-40 °C、10 Pa 干燥 36 h,最后将冻干物碾碎即得到酵母冻干粉^[13]。

1.2.4 单一保护剂的筛选 选取海藻糖、山梨醇、甘露醇、脯氨酸、谷氨酸钠、 β -环糊精、麦芽糊精作为保护剂。将山梨醇、甘露醇和脯氨酸配成 6 个浓度梯度,分别为 1、3、5、7、9、11 g/100 mL,其余保护剂溶液浓度梯度为 2、5、8、11、14、17 g/100 mL,121 °C 灭菌 20 min。无菌水为对照,以冻干后的酵母存活率为指标,筛选出保护效果较好的 3 种保护剂。

1.2.5 复合保护剂的优化 根据单因素实验的筛选结果,采用响应面中心组合设计对山梨醇、海藻糖和谷氨酸钠的配比进行优化,以冻干后的酵母存活率为响应值,确定间型假丝酵母 Y-17 冷冻干燥保护剂的最佳配方,试验因素水平设置见表 1。

1.2.6 酵母存活率的计算 酵母冻干粉用无菌水复水至冻干前体积,于 28 °C 水浴锅中活化 30 min,通过稀释涂布进行活菌计数^[14],酵母存活率的计算公式为:酵母存活率(%)=(冻干后活菌数/冻干前活菌数)×100。

1.2.7 酵母冻干粉生防效力的评价 本实验对比了酵母菌冻干粉和新鲜酵母菌对水蜜桃褐腐病的生防效力,以验证所制备的冻干粉生防效力并未因干燥处理而减弱。取上述洗净消毒(用 0.1% NaClO 消毒并清水冲洗)的水蜜桃,用无菌打孔器在每个水蜜桃

表1 响应面中心组合设计试验因素及水平
Table 1 Factors and levels of response
surface central composite design

水平	因素		
	A 山梨醇 (g/100 mL)	B 海藻糖 (g/100 mL)	C 谷氨酸钠 (g/100 mL)
1.682	8.36	16.05	19.05
1	7	14	17
0	5	11	14
-1	3	8	11
-1.682	1.64	5.95	8.95

的阳面赤道处打一个直径为 5 mm, 深 3 mm 左右的孔。

实验组 1: 1.2.5 中最优条件下制备的冻干粉用无菌水溶解混匀, 并调节菌体浓度至 1×10^8 CFU/mL, 吸取 10 μ L 酵母悬液接种到水蜜桃伤口处。

实验组 2: 1.2.2 中振荡培养 24 h 的新鲜酵母发酵液, 6000 r/min 离心 15 min, 用无菌水调节菌体浓度至 1×10^8 CFU/mL, 吸取 10 μ L 酵母菌液种到水蜜桃伤口处。

对照组: 吸取 10 μ L 无菌水接种到伤口处。

接种后的水蜜桃于室温放置 2 h, 吸取 10 μ L 浓度为 5×10^4 CFU/mL 的美澳型核果链核盘菌孢子悬液接入伤口处。将处理后的水蜜桃放入塑料框中, 并用保鲜膜包裹好, 置于 28 $^{\circ}$ C、相对湿度 95% 的恒温培养箱中进行贮藏。5 d 后观察并记录各组水蜜桃的腐烂情况, 按照如下公式计算桃果实的发病率, 病斑直径取垂直两个方向病斑长度的平均值。每个处理选用 10 个桃果实, 平行 3 次, 实验重复 2 次。发病率计算公式为: 发病率 (%) = 处理组果实发病数/处理组果实个数 \times 100。

1.2.8 酵母冻干粉贮藏期间活性的评价 将 1.2.5 中最优条件下制备的酵母冻干粉立刻转移至密封袋中, 分别置于 25、4、-20 $^{\circ}$ C 三个温度条件下进行贮藏。分别于 0、30、60、90、120、150、180 d, 准确称取 0.1 g 冻干粉, 溶解于 1 mL 无菌水中, 28 $^{\circ}$ C 水浴活化 30 min, 稀释涂布, 计算各贮藏温度下酵母菌的存活率。

1.2.9 酵母冻干粉对水蜜桃保鲜效果的评价 将 1.2.5 中最优条件下制备的酵母冻干粉用去离子水溶解, 调整菌体浓度至 1×10^8 CFU/mL, 然后对水蜜桃做以下处理: 冻干粉处理组: 将水蜜桃在上述菌液中浸泡 10 min, 取出后自然晾干; 去离子水处理组: 将水蜜桃在去离子水中浸泡 10 min, 取出后自然晾干; 空白对照组: 不做任何处理。将各个处理的水蜜桃放入塑料框中并用保鲜膜密封, 于 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 75% 条件下贮藏。贮藏期间, 每天定时测定相关生理指标。

1.2.9.1 桃果实腐烂指数的测定 依据水蜜桃腐烂情况划分为 5 个等级, 无腐烂的为 0 级; 腐烂面积小于果实表面积大于 25% 的为 1 级; 腐烂面积占果实表面积 25%~50% 的为 2 级; 腐烂面积占果实表面积 50%~75% 的为 3 级; 腐烂面积大于果实表面积 75%

的为 4 级。腐烂指数 (%) = Σ (级别 \times 该级别果数)/(总果数 \times 最高级别) \times 100。

1.2.9.2 桃果实失重率的测定 分别测量每个果实的初始重量 W_0 及取样时重量 W_1 , 果实失重率 (%) = $(W_0 - W_1)/W_0 \times 100$ 。

1.2.9.3 果实硬度的测定 参照赵鲁宁等^[15]的方法, 用食品物性仪进行测量。

1.2.9.4 可溶性固形物(TSS)含量的测定 参照贺惠文^[16]的方法, 用阿贝折光仪进行测量。

1.2.9.5 维生素 C 含量的测定 参照高海荣等^[17]的方法, 采用紫外法进行测量。

1.2.9.6 可滴定酸含量的测定 参照李合生^[18]的方法, 采用酸碱滴定法进行测量。

1.2.9.7 果皮细胞膜透性测定 称取 1 g 果皮用去离子水反复冲洗 3 遍后, 于 20 mL 去离子水中浸泡 20 min, 测量其电导率 L_0 , 煮沸 10 min 迅速冷却, 再次测量其电导率 L_1 , 相对电导率 (%) = $L_0/L_1 \times 100$ 。

以上每种指标的测量均做 3 个平行, 且实验重复 2 次。

1.3 统计分析

采用 Excel 2016 作图; 实验数据结果取三次平行的均值, 并采用 SPSS 16.0 进行显著性分析, 用邓肯氏新复极差法比较不同处理组之间的显著性差异, 设置显著性差异水平为 $P < 0.05$; 采用 Design-Expert V8.0.6 对数据进行回归分析, 筛选出酵母冻干粉的最佳保护剂配方。

2 结果与分析

2.1 单一保护剂对间型假丝酵母 Y-17 冻干存活率的影响

为了提高酵母菌冻干粉中的活菌数, 通常在菌体冷冻前加入各类保护剂以维持酵母细胞的活性和稳定性。由图 1 可知, 当不加任何保护剂时, 菌体冻干后存活率仅有 5.15%; 当加入不同保护剂后, 菌体的冻干存活率随着保护剂质量浓度的增加而呈先上升后降低的趋势。当谷氨酸钠、脯氨酸、 β -环糊精、海藻糖、山梨醇、麦芽糊精、甘露醇的质量浓度分别为 14、3、8、11、5、11、1 g/100 mL 时, 酵母冻干存活率最高, 分别为 48.74%、14.32%、19.64%、43.51%、25.06%、17.21%、18.92%; 当保护剂浓度超过其最适浓度时, 菌体的冻干后存活率随着保护剂质量浓度的增加而下降, 这是因为较高浓度的保护剂会造成细胞内的蛋白加速聚合, 形成较强的玻璃化结构^[19]。当海藻糖、山梨醇、谷氨酸钠浓度分别为 11、5、14 g/100 mL 时, 对酵母菌的冻干保护效果较好。海藻糖和山梨醇均具有较多的羟基, 可代替膜蛋白周围的水分子与蛋白之间形成水合键, 稳定蛋白质的高级结构, 防止蛋白质因干燥失水而变性^[20]。此外, 海藻糖在溶液中能够与水分子结合形成二水化合物, 使得其具有较高的玻璃化转变温度, 从而降低冷冻过程中冰晶对细胞的伤害^[21]。而山梨醇除了能够作为一种亲水保护剂稳定蛋白结构外, 还能作为填充剂, 当菌悬液在冷冻结晶时, 山梨醇能为活性组分提供很好的结构支撑, 有利于保护细胞活性^[22]。谷

氨酸钠由于氨基(-NH₂)和羧基(-COOH)的存在,使其具有酸碱两性,能够很好地调节 pH,稳定酵母活性^[22]。此外,在冷冻过程中,谷氨酸钠还能够穿过细胞壁,在细胞壁与细胞膜之间形成缓冲层,抑制冰晶的生成,保持细胞膜的完整性^[19]。

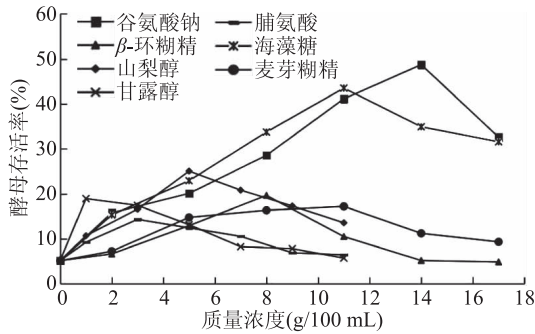


图1 各种保护剂对间型假丝酵母 Y-17 冻干后存活率的影响

Fig.1 Effect of different cryoprotectants on the survival rate of *Candida intermedia* Y-17 after freeze-drying

单因素试验结果表明,仅仅使用单一的保护剂对菌体的冻干保护效果较差,即便使用保护效果最好的谷氨酸钠,其菌体冻干存活率最高也仅有 48.47%,难以满足工业上生产活性冻干粉的要求,而通过多种保护剂的互配则能有效提高其冻干保护效果^[24]。因此,选用山梨醇、海藻糖、谷氨酸钠 3 种保护剂进行中心组合设计,以确定其复合保护剂的最佳配方。

2.2 中心组合设计试验结果分析

根据单因素实验结果,选取山梨醇、海藻糖和谷氨酸钠为考察因素,采用响应面中心组合设计对酵母冻干保护剂配方进行优化,具体设计及结果见表 2。利用 Design-Expert 软件对表中响应值进行回归分析,得到优化后的二次回归方程: $R = -364.91988 + 9.28697A + 13.91497B + 49.98053C + 0.69042AB + 0.3275AC + 0.0475BC - 2.05774A^2 - 0.73502B^2 - 1.93023C^2$ 。方程中 R 为冻干酵母存活率, A、B、C 分别代表山梨醇、海藻糖和谷氨酸钠,对上述所建模型进行方差分析,结果如表 3 所示。

根据方差分析表可知,所建响应面模型 $F = 118.08, P < 0.01$,说明回归方程模型极显著,实验设计可靠。失拟项用来反应所建模型与实验的拟合程度, $P = 0.1288 > 0.05$,不显著,说明试验点均能用模型描述,且上述拟合的二次回归方程能够很好地预测酵母冻干后的存活率。方程校正系数 $R_{Adj}^2 = 0.9823$,说明 98.23% 的响应值可以用该模型解释,进一步说明实验回归方程拟合效果较好。方差分析结果表明: A、AC 对酵母冻干存活率影响显著 ($P < 0.05$), B、C、AB、A²、B²、C² 对酵母冻干存活率影响极显著 ($P < 0.01$)。

响应面分析法不但能够分析各反应因素对目标值的影响,还能对最佳反应条件进行预测优化^[25]。由图 2 可知, A 与 B 之间、A 与 C 之间的等高线图均为椭圆形,说明 A 和 B 以及 A 和 C 之间均存在显著

表 2 中心组合实验设计及结果

Table 2 Design and results of central combination experiments

试验号	A	B	C	酵母存活率 (%)
1	0	0	0	81.71
2	0	0	1.682	26.86
3	-1	1	-1	60.00
4	-1	1	1	45.71
5	0	0	0	86.71
6	0	1.682	0	72.00
7	1.682	0	0	64.29
8	-1.682	0	0	56.14
9	-1	-1	1	38.14
10	1	1	1	58.57
11	1	1	-1	69.00
12	0	0	0	82.57
13	1	-1	1	38.43
14	0	0	-1.682	41.86
15	0	0	0	84.14
16	-1	-1	-1	58.14
17	0	0	0	83.43
18	0	-1.682	0	57.57
19	1	-1	-1	46.57
20	0	0	0	84.43

交互关系,与方差分析结果一致。当其中一种物质的浓度一定时,酵母冻干存活率随着其他两种物质浓度的增加呈现先上升后降低的趋势,说明响应曲面中存在极大值点,即存在保护剂最佳浓度。通过 Design-Expert 软件对数据优化处理得到,当山梨醇 5.43 g/100 mL,海藻糖 12.45 g/100 mL,谷氨酸钠 13.56 g/100 mL 时,酵母的冻干存活率最高,预测值为 85.77%。在此条件下进行 3 次验证试验,最终得到间型假丝酵母 Y-17 的冻干存活率为 84.21% ± 0.87%,与预测值较为接近,说明建立的模型合理有效。

2.3 酵母冻干粉生防效力的评价

拮抗酵母菌冷冻干燥后仍需具有较高的生防效力,这是其能应用于果蔬采后病害防治的前提。由图 3 可知,贮藏 5 d 后,实验组 1 用间型假丝酵母 Y-17 冻干粉处理水蜜桃发病率为 20.63%,实验组 2 用新鲜酵母菌液处理的桃果实发病率为 15.87%,两组间无显著差异 ($P > 0.05$),但均显著 ($P < 0.05$) 低于对照组用无菌水处理的 100% 发病率。此外,实验组 1 的水蜜桃病斑直径为 1.83 cm,与实验组 2 的病斑直径无显著 ($P > 0.05$) 差异,却显著 ($P < 0.05$) 小于对照组病斑直径 3.44 cm。综上,活性冻干粉对桃褐腐病的生防效力与新鲜酵母之间并无显著 ($P > 0.05$) 差异,说明冻干粉中酵母菌细胞活力并未因干燥处理而明显减弱,可以用于水蜜桃采后病害的防治。

2.4 酵母冻干粉贮藏期间活性的评价

酵母冻干粉在贮藏期间,其细胞活性会随着贮

表3 响应面模型方差分析

Table 3 Variance analysis of the response surface model

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值(prob > F)	显著性
模型	6322.14	9	702.46	118.08	<0.0001	**
A	43.19	1	43.19	7.26	0.0225	*
B	425.93	1	425.93	71.6	<0.0001	**
C	446.48	1	446.48	75.05	<0.0001	**
AB	137.28	1	137.28	23.08	0.0007	**
AC	30.89	1	30.89	5.19	0.0459	*
BC	1.46	1	1.46	0.25	0.6308	
A ²	976.34	1	976.34	164.12	<0.0001	**
B ²	630.65	1	630.65	106.01	<0.0001	**
C ²	4349.17	1	4349.17	731.07	<0.0001	**
残差	59.49	10	5.95			
失拟项	44.5	5	8.9	2.97	0.1288	不显著
纯误差	14.99	5	3			
总离差	6381.63	19				
系数	$R^2 = 0.9907$	$R_{Adj}^2 = 0.9823$				

注: ** 极显著($P < 0.01$), * 显著($P < 0.05$)。

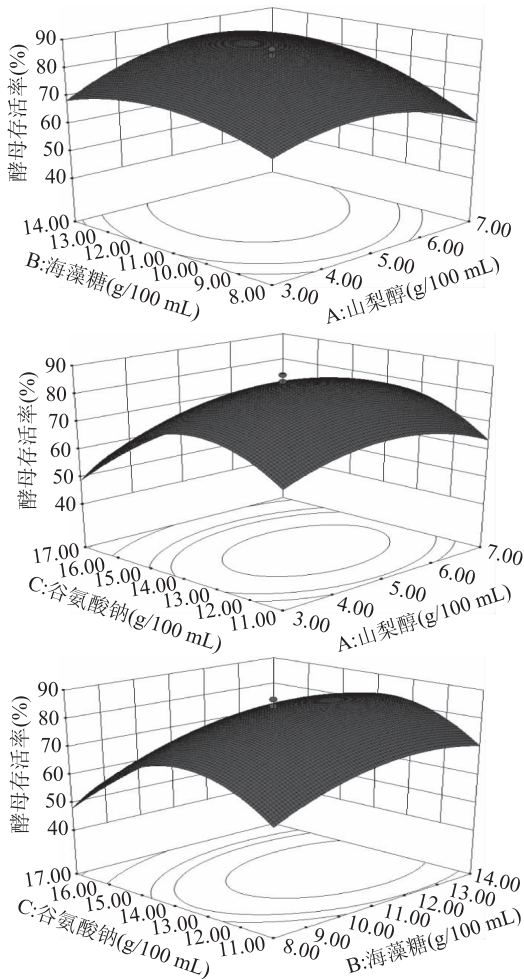


图2 不同因素交互作用的响应面和等高线图

Fig.2 Response surface and contour plots of interaction of different factors

藏时间的延长而逐渐降低,而适宜的贮藏温度则能有效延缓其下降速度。从图4可知,至30 d时,于25、4、-20℃三个温度条件下贮藏的冻干粉复水后酵

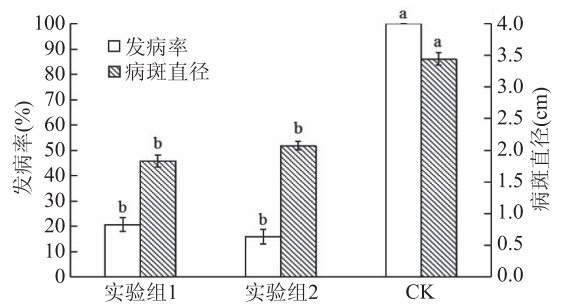


图3 不同处理对水蜜桃发病率及病斑直径的影响

Fig.3 Effects of different treatments on the incidence and the diameter of disease spots of honey peach

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$),图4同。

母菌存活率无显著差异($P > 0.05$),分别为81.66%、82.56%、83.29%,至60 d时,三组的存活率均在65%以上;60 d之后酵母菌存活率下降速度加快,于25℃贮藏的冻干粉酵母菌存活率下降最为迅速,至180 d时,酵母菌存活率仅为15.72%;于4℃贮藏的冻干粉酵母菌存活率下降速度相对较慢,至120和180 d时酵母菌存活率分别为40.85%和28%;于-20℃贮藏的冻干粉酵母菌存活率下降速度最慢,在90~180 d期间其存活率显著($P < 0.05$)高于其他两组,贮藏至120和180 d时酵母菌存活率分别为50.6%和34.66%。综上,酵母Y-17活性冻干粉更适合在-20℃进行贮藏。

2.5 酵母冻干粉对水蜜桃的贮藏保鲜效果

2.5.1 不同处理下水蜜桃果实腐烂指数的变化

水蜜桃采后极易发生腐烂,选择合适的防腐方法在其采后贮藏保鲜方面至关重要。从图5可以看出,各处理下水蜜桃果实的腐烂指数均随着贮藏时间的增加而增加,从第3 d开始,经冻干粉处理的水蜜桃腐烂指数显著($P < 0.05$)低于其他两个处理;4 d之后,去离子水处理组和对照组的水蜜桃腐烂指数迅速上升,贮藏至第9 d时,两处理组的腐烂指数分别为

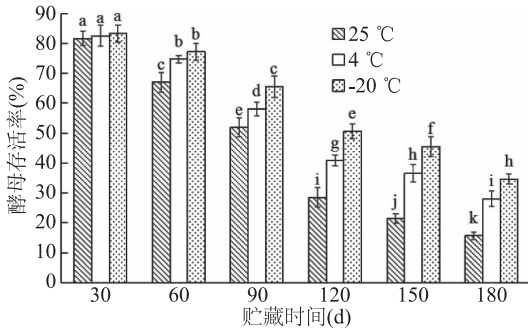


图4 活性冻干粉在不同贮藏温度下的酵母存活率
Fig.4 The yeast survival rate of active freeze-dried powder at different storage temperatures

28.27%和31.11%，远远高于用冻干粉处理的腐烂指数6.28%。表明该生防菌剂在水蜜桃的贮藏过程中能有效抑制由病原菌生长繁殖引起的桃果实腐烂，具有很好的防腐保鲜效果。

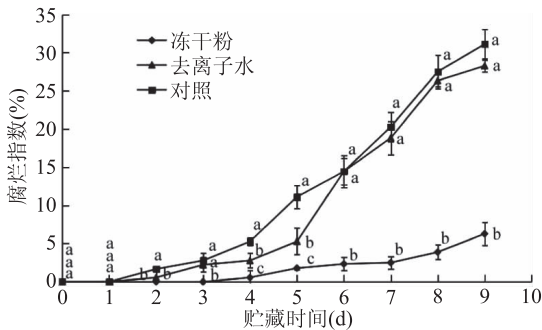


图5 不同处理下水蜜桃果实腐烂指数的变化
Fig.5 Changes in the decay index of honey peach under different treatments

注:不同字母表示各处理组间

差异性显著 ($P < 0.05$), 图6~图11同。

2.5.2 不同处理下水蜜桃果实失重率的变化 水蜜桃含水量较高,在贮藏过程中极易失水皱缩,进而影响其品质。从图6可以看出,随着贮藏时间的延长,桃果实的失重率也随之增加。贮藏前5 d,用冻干粉处理的水蜜桃失重率相较于对照差别不大;而随着后熟进程的加快,桃果实体内贮备的有机物被大量消耗,果实快速失重^[26],5 d之后,对照组水蜜桃失重率迅速升高,显著高于 ($P < 0.05$) 冻干粉处理组;贮藏至第8 d时,去离子处理组和对照组的失重率分别为5.45%和6.11%,均高于冻干粉处理组水蜜桃的失重率4.84%。表明该生防菌剂能够在水蜜桃储存过程中,通过抑菌抗病而保持果皮的完整性及延展性,从而减少桃果实的水分流失,利于水蜜桃果实的贮藏保鲜。

2.5.3 不同处理下水蜜桃果实硬度的变化 硬度不仅能够反应桃果实软化程度,更是评价其商品价值的重要指标。随着采后桃果实成熟度的增加,果肉细胞中的果胶大量水解,导致果实组织崩溃,硬度降低^[27]。从图7可以看出,桃果实的硬度随着贮藏时间的增加而降低。贮藏至第4 d时,冻干粉处理的桃果实硬度由16.53 kg/cm²降至9.54 kg/cm²,在此期间其果实硬度明显大于对照组;5 d之后,桃果实成

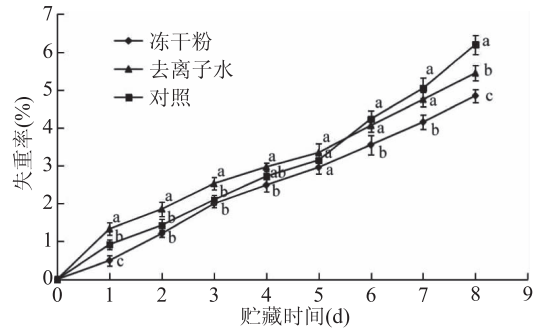


图6 不同处理下水蜜桃果实失重率的变化
Fig.6 Changes in the weight loss of honey peach under different treatments

熟加快,三个处理组之间果实硬度无显著差异 ($P > 0.05$)。表明该生防菌剂能通过抑制病原菌孢子的萌发及生长,从而避免病原菌对桃果实果胶的降解,有效抑制桃果实硬度的降低。

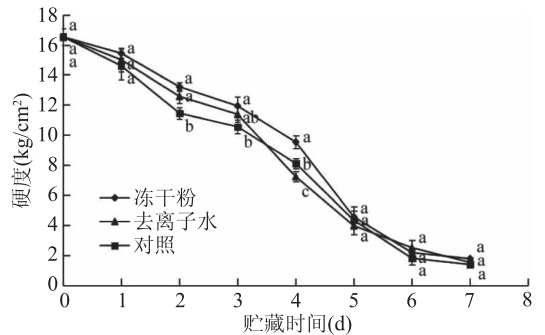


图7 不同处理下水蜜桃果实硬度的变化
Fig.7 Changes in the hardness of honey peach under different treatments

2.5.4 不同处理下水蜜桃果实 TSS 含量的变化 可溶性固形物是水果中糖、酸、维生素、矿物质等可溶性化合物的总称,而在水蜜桃中,可溶性固形物主要是指可溶性糖^[28]。从图8可以看出,水蜜桃采后 TSS 含量的变化并不呈现单一的上升或下降趋势。在贮藏前期,桃果实中的大量多糖类物质发生水解,使得 TSS 含量有所上升,后期因呼吸作用消耗部分糖类物质, TSS 含量逐渐下降^[29]。贮藏至第2 d时,各处理组桃果实 TSS 含量升至峰值,其中冻干粉处理组 TSS 含量最高,为15%,之后随着贮藏时间的延长 TSS 含量呈下降趋势;从第5 d起,各处理组桃果实 TSS 含量:冻干粉处理组 > 去离子水处理组 > 对照组,至第7 d时,冻干粉处理组 TSS 含量为10.67%,显著高于 ($P < 0.05$) 其他两组。表明该生防菌剂在水蜜桃的贮藏过程中,能通过抑制病原菌的生长繁殖,减少病原菌对桃果实糖类物质的消耗,以及延迟桃果后熟引起的呼吸消耗,进而抑制桃果实中 TSS 含量的降低。

2.5.5 不同处理下水蜜桃果实 V_c 含量的变化 水蜜桃中 V_c 含量较高,但是其极易受到外界条件的影响而降解,因此 V_c 含量是衡量水果采后品质的一项重要指标^[26]。从图9可以看出,各处理组水蜜桃在贮藏期间 V_c 含量均呈下降趋势,其中冻干粉处理组的 V_c 含量始终高于其他两组。贮藏前3 d,各组 V_c 含量迅速下降;贮藏至第7 d时,冻干粉处理组桃果

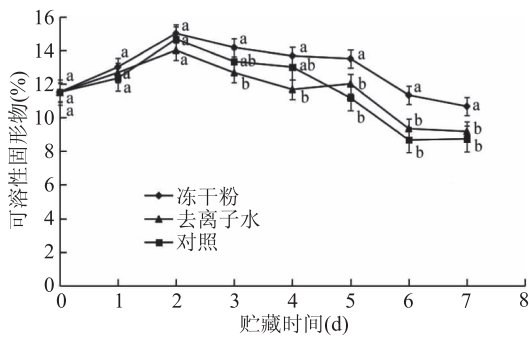
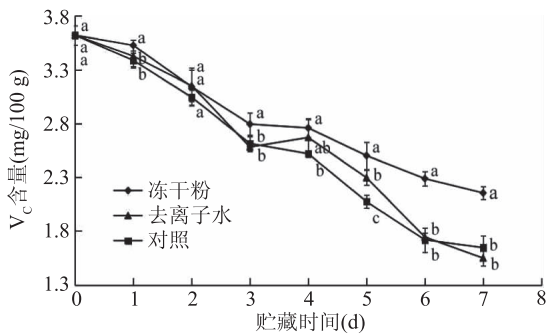


图8 不同处理下水蜜桃果实 TSS 含量的变化

Fig.8 Changes in the content of TTS of honey peach under different treatments

实 V_c 含量为 2.15 mg/100 g, 与其他两处理组存在显著差异 ($P < 0.05$), 是去离子水处理组的 1.4 倍, 对照组的 1.3 倍。说明该生防菌剂能通过提高宿主抗病性, 避免病原菌生长繁殖对桃果的营养消耗, 延缓果实 V_c 分解速率, 有利于维持桃果实品质。

图9 不同处理下水蜜桃果实 V_c 含量的变化Fig.9 Changes in the content of V_c of honey peach under different treatments

2.5.6 不同处理下水蜜桃果实可滴定酸含量的变化 果实中的可滴定酸在贮藏过程中可以作为呼吸底物而被消耗, 从而影响果实风味^[30]。从图 10 可以看出, 在整个贮藏期间, 各处理组可滴定酸含量呈现下降趋势, 其中冻干粉处理组可滴定酸含量始终高于其他两组。在贮藏前 4 d, 冻干粉处理组可滴定酸含量与对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 第 5 d 起, 对照组可滴定酸含量迅速下降, 贮藏至第 7 d, 冻干粉处理组可滴定酸含量为 0.17%, 是对照组的 1.3 倍。表

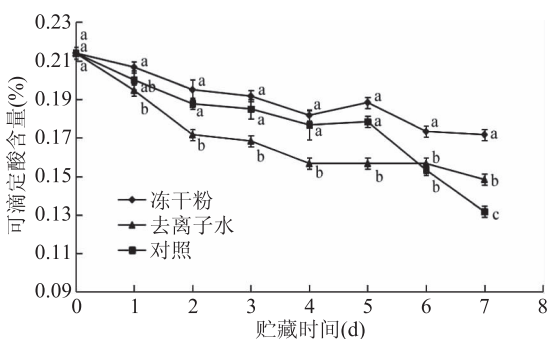


图10 不同处理下水蜜桃可滴定酸含量的变化

Fig.10 Changes in the content of titratable acid of honey peach under different treatments

明该生防菌剂能通过抑制病原菌对果实的侵染和营养消耗, 减少机体的氧化损伤, 进而延迟后熟作用引起的呼吸底物消耗, 减缓可滴定酸含量的降低。

2.5.7 不同处理下水蜜桃果皮相对电导率的变化 相对电导率是评价细胞膜完整性的重要指标, 能够反映菌粉制剂对水蜜桃果皮细胞膜的保护能力。从图 11 可以看出, 各处理组水蜜桃果皮的相对电导率均随着贮藏时间的延长而增加。贮藏至第 4 d 时, 对照组水蜜桃果皮的相对电导率就上升至 54.39%, 显著高于 ($P < 0.05$) 冻干粉处理组的相对电导率 47.53%。在整个贮藏期间, 冻干粉处理组相对电导率一直低于其他处理组。说明该生防菌剂能诱导宿主抗氧化性能的提高, 对水蜜桃果皮细胞膜系统具有很好的保护效果, 能够减缓采后果实衰老和腐烂速度。

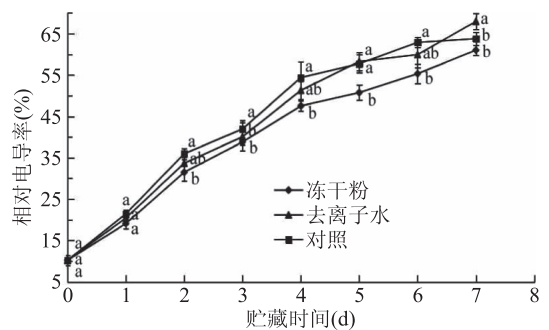


图11 不同处理下水蜜桃果皮相对电导率的变化

Fig.11 Changes in the relative conductivity of honey peach under different treatments

3 结论

通过对间型假丝酵母菌 Y-17 活性冻干粉保护剂进行筛选和优化, 得到其最佳配方为: 山梨醇 5.43 g/100 mL、海藻糖 12.45 g/100 mL、谷氨酸钠 13.56 g/100 mL, 酵母存活率可达 84.21% ± 0.87%, 且所制备的冻干粉仍具有较高的生防效力, 其最佳贮藏温度为 -20 °C。之后, 通过对不同处理条件下水蜜桃生理指标的分析, 结果表明, 上述制备的活性冻干粉能显著降低水蜜桃贮藏期间的发病率 ($P < 0.05$), 减少水分的流失, 对果实的硬度、 V_c 含量、TSS 含量、可滴定酸含量、果皮细胞膜的完整性均有一定的维持作用。综上, 本实验利用间型假丝酵母 Y-17 制备的活性冻干粉对水蜜桃采后的贮藏具有良好的保鲜效果, 为今后间型假丝酵母 Y-17 在桃褐腐病生物防治方面的应用提供理论和实践基础。

参考文献

- [1] 肖烟云, 张婷婷, 林丽莎, 等. 中国桃果实采后生理和病害研究进展[J]. 包装与食品机械, 2014, 32(3): 45-51.
- [2] 王玉良, 郜海燕, 陈文煊, 等. 水蜜桃采后保鲜研究进展[J]. 浙江农业科学, 2011, 1(1): 84-88.
- [3] Sharma R R, Singh D, Singh R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review [J]. Biological Control, 2009, 50(3): 205-221.
- [4] Liu J, Sui Y, Wisniewski M, et al. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit

- [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 167(2): 153-160.
- [5] 龙超安. 酵母菌的分离、筛选以及对柑橘保鲜的机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [6] 刘程惠, 吴伟男, 胡文忠, 等. 苹果腐败霉菌的拮抗酵母菌筛选鉴定及拮抗机理初探[J]. 食品工业科技, 2018, 39(12): 132-136.
- [7] 罗琳, 周冷璇, 刘娅. 毕赤酵母 G5 拮抗葡萄灰霉病机理初探[J]. 生物技术通报, 2017, 33(9): 210-215.
- [8] 田焯, 吴明媛. 生物制品冻干保护方法研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2018, 13(1): 73-76.
- [9] 张帆, 张捍民, 葛程程, 等. 厌氧氨氧化菌的真空冷冻干燥保藏及复壮性能[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(9): 33-40.
- [10] 唐飞, 王一非, 齐学明, 等. 冷冻保护剂和储藏条件对海洋酵母冻干粉活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 33-38.
- [11] 王华, 贺金梅. 中心组合设计优化热带假丝酵母菌冷冻干燥保护剂[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 244-247.
- [12] 胡曼. 优质奶啤乳源酵母菌的筛选及其活性干粉制备的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [13] Bjelosevic M, Seljak K B, Trstenjak U, et al. Aggressive conditions during primary drying as a contemporary approach to optimise freeze-drying cycles of biopharmaceuticals[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 122: 292-302.
- [14] 周德庆, 徐德强. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013.
- [15] 赵鲁宁, 周秋阳, 杨慧慧, 等. Y35-1 季也蒙毕赤酵母菌株对枇杷采后炭疽病的抑菌效果及保鲜作用[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 170-177.
- [16] 贺惠文. 地衣芽孢杆菌 W10 对桃褐腐病菌的抑制及储藏期桃果的防腐保鲜作用[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [17] 高海荣, 赵爱娟, 王睿颖, 等. 紫外法快速测定中原地区 12 种蔬菜 V_c 含量[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(6): 1131-1133.
- [18] 李合生. 食品分析实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [19] 朱敦兰, 杨洁. 生物制品冻干保护剂及其保护机理的研究进展[J]. 喀什师范学院学报, 2007(6): 46-50.
- [20] 张光磊, 张新创, 翟雷. 活菌剂冻干保护剂的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(4): 80-85.
- [21] Streeter J G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(3): 484-491.
- [22] 徐克银, 随顺安, 刘洁, 等. 辅料在小分子化合物冻干产品中的作用和研究进展[J]. 食品与药品, 2016, 18(6): 448-452.
- [23] 牛晓影, 邓丽莉, 曾凯芳. 保护剂在微生物真空冷冻干燥中的应用[J]. 食品工业科技, 2015, 36(1): 390-394.
- [24] Chen H, Chen S, Li C, et al. Response surface optimization of lyoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus* during vacuum freeze-drying[J]. Preparative Biochemistry, 2015, 45(5): 463-475.
- [25] Li D, Zheng D, Cao Z, et al. Response surface methods for slope reliability analysis: Review and comparison[J]. Engineering Geology, 2016, 203: 3-14.
- [26] 郭艳萍, 马慧玲, 王贵禧, 等. 乙烯对桃果实 MA 贮藏期和货架期品质及有关生理机制的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(3): 119-126.
- [27] 马之胜, 王越辉, 贾云云, 等. 桃果实果胶、可溶性糖、可滴定酸含量和果实大小与果实硬度关系的研究[J]. 江西农业学报, 2008, 20(10): 45-46.
- [28] Crisosto C H, Crisosto G M. Relationship between ripe soluble solids concentration (RSSC) and consumer acceptance of high and low acid melting flesh peach and nectarine (*Prunus persica* (L.) Batsch) cultivars [J]. Postharvest Biology & Technology, 2005, 38(3): 239-246.
- [29] 周慧娟. 水蜜桃采后生理及贮藏保鲜技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [30] 李阳. 几种生物保鲜处理对凤凰白花水蜜桃保鲜效果的研究[D]. 南京: 南京大学, 2014.
- (上接第 95 页)
- [J]. 中国乳品工业, 2016, 44(1): 31-37.
- [11] 张灿, 吴彩娥, 范龚健, 等. 植物蛋白微胶囊对益生菌包埋的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(5): 385-389.
- [12] Ozyurt V H, Atles S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food[J]. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 2014, 13(4): 413-424.
- [13] 洪青, 王钦博, 杭锋. 乳酸菌微胶囊制备研究进展[J]. 食品工业, 2017(6): 238-242.
- [14] Goranov B, Blazheva D, Kostov G, et al. Lactic acid fermentation with encapsulated *Lactobacillus casei* SSP. rhamnosus ATCC 11979 (NBIMCC 1013) in alginate/chitosan matrices[J]. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2013, 19(2): 101-104.
- [15] 刘文彬, 赵丽红, 等. 微囊包被处理屎肠球菌制剂耐受性的评价[J]. 中国农业科学, 2012, 45(6): 1169-1175.
- [16] 李漫, 袁杰利, 刘党生. 工业生产益生菌微囊化技术的研究进展[J]. 中国微生物生态学杂志, 2014, 26(3): 354-357.
- [17] Zhang L, Li J., Yun T.T., et al. Effects of pre-encapsulated and pro-encapsulated *Enterococcus faecalis* on growth performance, blood characteristics, and cecal microflora in broiler chickens[J]. Poultry Science, 2015, 94(11): 2821-2830.
- [18] 王婷婷, 李爱科, 陶浩瀚, 等. 微囊化屎肠球菌活菌剂的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(12): 51-56, 62.
- [19] 闫娟娟, 卢俭, 周剑忠, 等. 基于响应曲面法的微囊化保加利亚乳杆菌高密度培养条件优化[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 153-159.
- [20] 张琳, 贞婷婷, 蔡文涛, 等. 发酵前及发酵后包被粪肠球菌微胶囊抗胁迫作用的研究[J]. 粮油食品科技, 2016, 24(2): 80-84.
- [21] 杨罡, 郭建军, 曾静, 等. 粪肠球菌 xwAP 增菌培养基的优化[J]. 江西科学, 2017, 35(3): 347-351.
- [22] Çabuk B, Harsa Ş T. Improved viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 during freeze-drying in whey protein-pullulan microcapsules[J]. Journal of Microencapsulation, 2015, 32(3): 300-307.