

孙静, 刘玉娟, 罗晓娇, 等. 杆菌霉素 D 和壳聚糖复合抑菌作用及其对砂糖橘保鲜效果 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 372–379.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100014

SUN Jing, LIU Yujuan, LUO Xiaojiao, et al. Combination of Bacillomycin D and Chitosan for Microbial Inhibition and Freshness Preservation of Sugar Orange[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 372–379. (in Chinese with English abstract).
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100014

· 贮运保鲜 ·

杆菌霉素 D 和壳聚糖复合抑菌作用及其 对砂糖橘保鲜效果

孙 静, 刘玉娟, 罗晓娇, 张莫然, 黄俊凯, 戴永进, 陆颖健*

(南京财经大学食品科学与工程学院/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏南京 210023)

摘 要:目的: 基于杆菌霉素 D (BD) 和壳聚糖 (CTS) 对柑橘绿霉的抑菌作用, 探究 BD 和 CTS 复配对砂糖橘采后病害的防治作用及保鲜效果。方法: 以砂糖橘为研究对象, 在发霉的砂糖橘中筛选出霉菌菌种进行鉴定, 并通过棋盘微稀释法确定 BD 和 CTS 对柑橘绿霉的最小抑菌浓度和 FIC 指数, 最后采用 BD 和 CTS 处理过的砂糖橘在 28 ℃、相对湿度 90% 条件下贮藏保鲜, 测定发病率、失重率、硬度、可溶性固形物、酶活等指标的变化。结果: 对霉腐砂糖橘上分离纯化的菌种进行鉴定, 为柑橘绿霉菌, 并命名为 *Penicillium digitatum* strain L6。BD 和 CTS 对柑橘绿霉的最小抑菌浓度分别为 42.19 和 62.5 mg/L, FIC 指数为 0.75, 表明 BD 和 CTS 对柑橘绿霉的抑制为累加作用。贮藏保鲜结果表明, 贮藏 15 d 后, BD、CTS 和 BD+CTS 处理的砂糖橘失重率分别为 0.99%、1.62% 和 1.09%, 与对照组相比, 分别降低了 66.44%、45.08% 和 63.05%。另外, 可滴定酸度、可溶性固形物、抗坏血酸以及植物相关酶活性的变化等结果也表明 BD、CTS 和 BD+CTS 复合处理的砂糖橘保鲜效果良好, 其中 BD+CTS 复合处理组的整体效果最好。结论: BD 和 CTS 均对柑橘绿霉菌具有显著的抑制效果, 可用于砂糖橘的贮藏保鲜, 延长货架期。两者复合使用不仅可以增强保鲜效果, 而且 CTS 的价格低, 可以减少 BD 的使用, 降低成本。

关键词: 杆菌霉素 D, 壳聚糖, 砂糖橘, 抑菌, 保鲜

中图分类号: TS255.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)17-0372-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100014

本文网刊:



Combination of Bacillomycin D and Chitosan for Microbial Inhibition and Freshness Preservation of Sugar Orange

SUN Jing, LIU Yujuan, LUO Xiaojiao, ZHANG Moran, HUANG Junkai, DAI Yongjin, LU Yingjian*

(College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics/The Jiangsu Province Center of Cooperative Innovation for Modern Grain Circulation and Security, Nanjing 210023, China)

Abstract: Objective: Based on the inhibitory effect of bacillomycin D (BD) and chitosan (CTS) on *Penicillium digitatum*, the effect of BD and CTS combination on post-harvest disease control and freshness preservation of sugar oranges was investigated. Method: Sugar oranges as the research object, mold strains were screened in the moldy sugar oranges for identification, and the minimum inhibitory concentration and FIC index of BD and CTS against *P. digitatum* were determined by the checkerboard microdilution method. Finally, treated sugar oranges with BD and CTS were stored and preserved under the conditions of 28 ℃ and 90% relative humidity, and the changes of morbidity, weight loss, hardness, soluble solids, enzyme activity and other indicators were determined. Result: The isolated and purified fungus from the sugar orange was identified as *P. digitatum* and named *P. digitatum* strain L6. The minimum inhibitory concentrations of BD and CTS for *P. digitatum* were 42.19 and 62.5 mg/L, respectively, and the FIC index was 0.75, indicating that the inhibition of BD and CTS on *P. digitatum* was cumulative. The storage and preservation results showed that after 15 days of

收稿日期: 2023-10-09

基金项目: 国家自然科学基金 (32302038)。

作者简介: 孙静 (1988-), 女, 博士, 研究方向: 食品微生物与食品生物技术, E-mail: jingsun@nufe.edu.cn。

* 通信作者: 陆颖健 (1985-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: yingjianlu@nufe.edu.cn。

storage, the weight loss rates of BD, CTS, and BD+CTS treated sugar oranges were 0.99%, 1.62%, and 1.09%, respectively, which were 66.44%, 45.08%, and 63.05% lower compared to the control groups. In addition, the results of changes in titratable acidity, soluble solids, ascorbic acid, and plant-related enzyme activities also indicated that BD, CTS, and BD+CTS combination treatments had good preservation effects on sugar oranges, with the BD+CTS combination treatment group having the best results. Conclusion: Both BD and CTS had significant inhibition effect on *P. digitatum*, which could be used for storage and preservation of sugar orange to extend the shelf life. The combination of the two could not only enhance the preservation effect, but also the low price of CTS could reduce the use of BD and save the cost.

Key words: bacillomycin D; chitosan; sugar orange; antifungal; retain freshness

柑橘是全球最重要的园艺作物之一, 具有极高的经济和营养价值。砂糖橘作为一种柑橘类水果, 采后易受柑橘绿霉(*Penicillium digitatum*)和意大利青霉(*P. italicum*)的侵染而腐败变质^[1]。柑橘绿霉(*P. digitatum*)是子囊菌属真菌中的一种, 对环境和食品工业具有重要的意义, 它是全世界柑橘类果实采后腐烂的主要来源^[2]。而化学合成杀菌剂的大量使用带来了病原菌抗性的增强和安全性问题^[3-4]。近年来, 随着对食品安全问题的重视, 采用更安全绿色的贮藏保鲜方法替代传统的化学方法成为研究热点。

杆菌霉素 D(Bacillomycin D, BD)是由解淀粉芽孢杆菌等次级代谢产生的天然抗菌脂肽类物质, 它对灰霉、青霉及黄曲霉等都具有强烈的抑制作用^[5], 因此, BD 在农产品加工、保藏和食品的防腐保鲜等方面具有广阔的应用前景。壳聚糖(Chitosan, CTS)作为一种天然多糖对多种细菌及部分真菌具有一定的抗性, 且生产成本较低。Lin 等^[6]研究发现 BD 对霉菌的孢子萌发和菌丝生长有直接抑制作用。它既能直接抑制霉菌的生长, 又能诱导樱桃番茄抗性。此外, BD 处理显著提高了植物防御相关酶的活性, 包括几丁质酶(CHI)、 β -1,3-葡聚糖酶(GLU)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)和过氧化物酶(POD)。王安杏等^[7]研究发现 CTS 与多糖、蛋白质复合膜降低了蓝莓、草莓和芒果等果蔬水果的腐烂率, 具有良好的保鲜效果。CTS 在水果涂抹保鲜处理上也具有良好的效果, 通过壳聚糖复合涂膜处理鲜切的库尔勒梨, 可以在不同程度上延缓果实的衰老, 保持库尔勒梨的生理生化品质, 延长贮藏期^[8]。最新研究发现采用 CTS 涂层可以有效的抑制 *P. digitatum* 的生长^[9], 另有 CTS 作为凝胶和纳米颗粒悬浮液对青霉菌具有体外和体内抑菌活性^[10]。

本研究采用绿色、天然抗菌脂肽 BD 代替对人体和环境有害的化学杀菌剂, 达到对砂糖橘采后防腐保鲜的效果, 另外联合 CTS 共同使用, 不仅可以扩大抗菌图谱, 更好地达到保鲜效果, 还可以降低使用成本。研究 BD 和 CTS 对导致砂糖橘霉变真菌的抑制效果, 探究经过 BD 和 CTS 处理后贮藏保鲜过程中相关指标的变化, 确定保鲜效果, 为延长砂糖橘货架期提供新的思路及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

砂糖橘(处于成熟期, 成熟度 80%) 周边采摘

园现采直接提供; 绿霉(*Penicillium digitatum* strain L6) 发霉的砂糖橘中分离; Bacillomycin D 本实验室从解淀粉芽孢杆菌 fmbJ(CGMCC 0943)的发酵产物中分离纯化获得; 马铃薯葡萄糖培养基 青岛日水生物技术有限公司; 壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 95\%$) 美国 Sigma-Aldrich 公司; 冰乙酸 阿拉丁试剂有限公司; 抗坏血酸(ASA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)检测试剂盒 南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 其他所用的化学试剂 均为国产分析纯。

MJT-P80C 霉菌培养箱 合肥达斯卡特生物科技有限公司; ZEISS Scope A1 正置显微镜 德国 Zesis 公司; TA TX plus 食品物性测定仪 英国 Stable Micro Systems 公司; RX-7000i 自动折光仪 爱宕(ATAGO)科学仪器有限公司; Spectra Max 190 全波长酶标测定仪 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 霉菌的筛选与鉴定 挑取霉腐砂糖橘上的霉菌孢子于 PDB 培养基 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 48 h, 再转接于 PDA 固体培养基。随后, 将霉菌送于南京擎科生物科技有限公司进行鉴定。

1.2.2 霉菌孢子计数 采用 0.8% 生理盐水洗涤平板上的霉菌孢子, 制成孢子悬浮液。使用血细胞计数板确定孢子数, 计数重复三次。计数完毕后, 依据公式计算孢子数:

$$\text{孢子数}(\text{cfu/mL}) = \frac{80 \text{ 个小方格孢子总数}}{80 \times 400 \times 10000 \times \text{稀释倍数}}$$

1.2.3 BD 和 CTS 对霉菌的最小抑菌浓度(MIC)测定 采用 96 孔板梯度稀释来确定 BD 和 CTS 对霉菌的最小抑菌浓度。在 96 孔板中分别加入 50 μL 含有抗菌物质的 PDB 培养液和 50 μL 10^5 cfu/mL 的孢子悬浮液, 每孔中 BD 的终浓度分别为 1350、675、337.5、168.75、84.38、42.19、21.09、10.5 和 5.25 mg/L, CTS 的终浓度分别为 8000、4000、2000、1000、500、250、125、62.5 和 31.75 mg/L, PDB 培养液作为对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h, 观察霉菌生长状况, 确定最小抑菌浓度, 以孔板中无霉菌生长的最低抑菌物质浓度定义为 MIC。

1.2.4 FIC 指数的确定 使用棋盘微稀释法确定 BD

和 CTS 对霉菌的相互作用^[11],在确定 MIC 的基础上,选择六个浓度的 BD 和 CTS 的混合液(2 MIC、MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、1/8 MIC、1/16 MIC),分别在棋盘 X 轴和 Y 轴加入 100 μL BD 和 CTS 的混合液,PDB 培养液作为对照,在每个孔板中加入 10 μL 的 10^5 cfu/mL 孢子悬浮液,28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h,观察霉菌生长情况,将无霉菌生长的最低浓度确定 FIC 指数(FICI)。

$$\text{FICI} = \frac{\text{组合MIC bacillomycinD}}{\text{单独MIC bacillomycinD}} + \frac{\text{组合MIC Chitosan}}{\text{单独MIC Chitosan}}$$

通过 FICI 值评估 BD 和 CTS 组合对霉菌作用的影响。FICI ≤ 0.5 定义为协同效应,0.5<FICI ≤ 1.0 定义为叠加效应,1.0<FICI ≤ 4.0 定义为无差异效应,FICI>4.0 定义为拮抗作用。

1.2.5 BD 和 CTS 对霉菌的直接抑制效果 为了探究 BD 及 CTS 对绿霉的直接抑制作用,在砂糖橘赤道区域使用 5 mm 无菌打孔器打一个伤口,在每个伤口加入 10 μL 的 10^5 cfu/mL 的孢子悬浮液,室温下放置 2 h 后,分别在无菌水(pH5.6)、BD(42.19 mg/L)、CTS(62.5 mg/L)、BD+CTS(10.55 mg/L+31.75 mg/L)中浸泡 1 min 后取出晾干,每个处理 10 个平行。随后在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 90% 的条件下放置 72 h,观察砂糖橘的霉变程度。

1.2.6 BD 和 CTS 对砂糖橘诱导抗性的测定 在砂糖橘赤道区域使用 5 mm 无菌打孔器打一个伤口后,分别加入 50 μL BD(42.19 mg/L)、CTS(62.5 mg/L)和 BD+CTS(10.55 mg/L+31.75 mg/L),无菌水(pH5.6)作为对照,每组处理 3 个平行,每个平行 10 个砂糖橘。常温下处理 36 h 后,在伤口 2 mm 处重新打一个伤口,加入 10 μL 10^5 cfu/mL 的孢子悬浮液,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 90% 的条件下放置 72 h,计算砂糖橘的发病率。

1.2.7 BD 和 CTS 对砂糖橘保鲜效果的测定 砂糖橘用无菌水清洗后室温晾干,分别在无菌水(pH5.6)、BD(42.19 mg/L)、CTS(62.5 mg/L)以及 BD+CTS(10.55 mg/L+31.75 mg/L)中浸泡 1 min 后取出晾干,采用加速贮藏的方式,将砂糖橘置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 90% 贮藏 15 d,每三天取一次样,测量以下指标。

1.2.7.1 失重率 在开始贮藏前测定每个砂糖橘的重量,然后分别在贮藏的 3、6、9、12、15 d 时取样称重,失重率计算公式如下:

$$\text{果实失重率(\%)} = \frac{\text{贮藏前果实质量} - \text{不同贮藏期的果实质量}}{\text{贮藏前果实质量}} \times 100$$

1.2.7.2 腐烂率 每 3 天观察一次果实,当砂糖橘表面出现水渍状病斑且伴有白色菌丝体标记为腐烂果实,记录腐烂果实的数量,果实腐烂率计算为:

$$\text{果实腐烂率(\%)} = \frac{\text{该组果实累计腐烂个数}}{\text{该组果实总个数}} \times 100$$

1.2.7.3 硬度 采用食品物性测定仪分别于 0、3、6、9、12、15 d 时取样测定砂糖橘赤道部位,测定条件为:探头直径 6 mm,深度 8 mm,穿刺速度为 1 mm/s,以穿刺强度 g 为单位测定砂糖橘果实硬度。

1.2.7.4 可溶性固形物含量 分别于 0、3、6、9、12、15 d 取样,果肉榨汁过滤后使用自动折光仪进行测定,每组 10 个平行,以蒸馏水为对照,测定砂糖橘果实内的可溶性固形物的含量。

1.2.7.5 可滴定酸 使用碱式滴定法,参考 Akbudak 等^[12]的方法测定砂糖橘中可滴定酸的含量,柑橘类中的酸主要为柠檬酸,结果以柠檬酸百分数表示。

1.2.7.6 抗坏血酸含量 使用抗坏血酸试剂盒对 0、3、6、9、12、15 d 的砂糖橘过滤液中的维生素 C 含量进行测定,重复测定 3 次。

1.2.7.7 超氧化物歧化酶(SOD) 通过 SOD 测定试剂盒测定不同贮藏时间砂糖橘果实内超氧化物歧化酶的活性,分别将 0、3、6、9、12、15 d 的砂糖橘进行榨汁过滤,测定过滤后果汁内 SOD 活性,重复测定 3 次。

1.2.7.8 过氧化物酶(POD) 使用 POD 测定试剂盒对 0、3、6、9、12 和 15 d 的砂糖橘过滤液中的过氧化物酶的活性进行测定,重复测定 3 次。

1.2.7.9 多酚氧化酶(PPO) 使用 PPO 测定试剂盒测定 0、3、6、9、12 和 15 d 砂糖橘果汁滤液中多酚氧化酶的活性,重复测定 3 次。

1.3 数据处理

以上数据指标使用 Excel 表进行数据整理后,通过 SPSS 16.0 进行数据分析,采用 Duncan 检验显著性($P<0.05$),最后采用 Origin 8.0 进行制图。

2 结果与分析

2.1 霉菌的分离与鉴定

将分离自砂糖橘的霉菌送 18S rDNA 测序,获得结果序列共 593 个碱基,将该序列导入 National Center for Biotechnology Information(NCBI)网站进行 BLAST 比对,采用 MEGA 11 构建系统发育树,进一步确定该霉菌与其他菌属的亲缘关系,将自筛的霉菌命名为 L6,如图 1 所示,系统发育树中 L6 与柑橘绿霉 AK4(*P. digitatum* strain AK4)在同一支,确定 L6 为柑橘绿霉属,并命名为 *P. digitatum* strain L6。

2.2 最小抑菌浓度(MIC)及 FIC 指数(FICI)的确定

采用两倍稀释法分别测定 BD 和 CTS 对柑橘绿霉 L6 的抑制效果,确定 MIC,结果表明 BD 和 CTS 对 L6 的 MIC 分别为 42.19 mg/L 和 62.50 mg/L。随后,通过棋盘微稀释法确定 BD 和 CTS 对霉菌的相互作用,如表 1 所示,两者复配使用时,BD 的添加浓度仅为 10.54 mg/mL,CS 的添加浓度从 62.50 mg/L

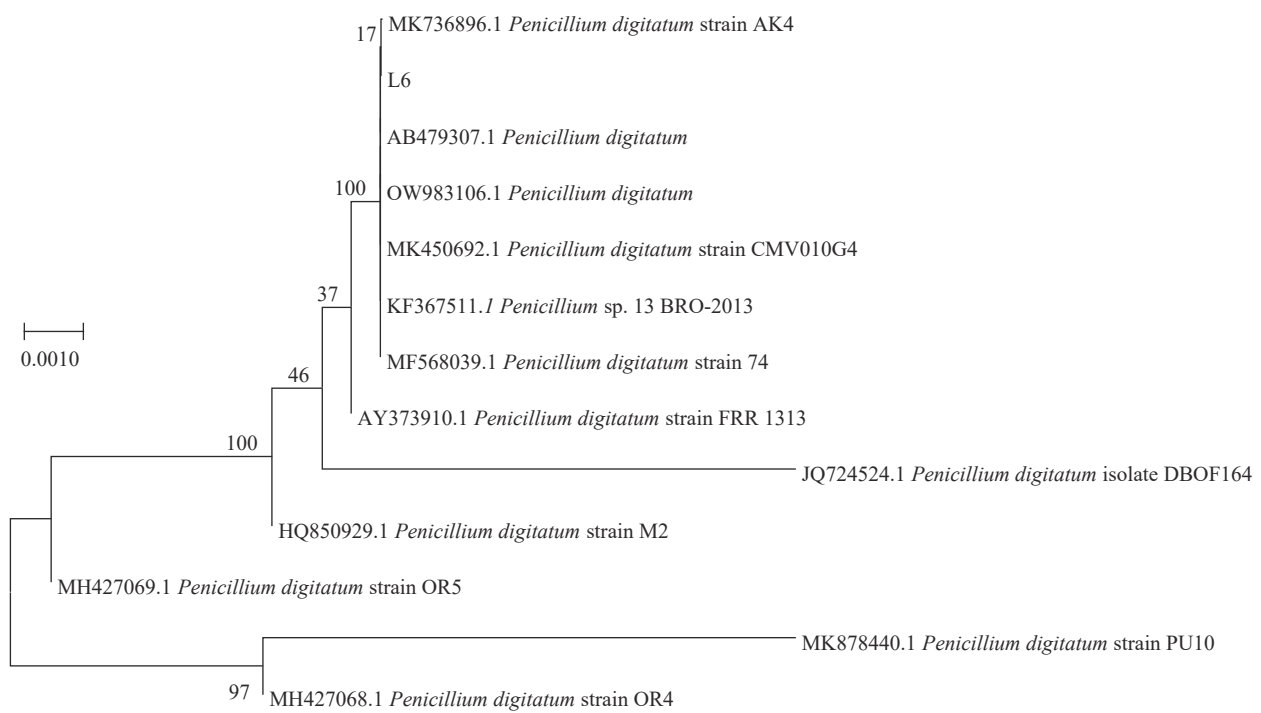


图 1 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree

降低到 31.25 mg/L, 根据 FICI 值计算结果表明 BD 和 CTS 对 L6 抑制作用是一种叠加效应, 即两者联合使用对 L6 的抑菌效果更好, 且各自的抑菌浓度都降低, 减少了 BD 的使用量, 降低了成本。

表 1 BD 和 CTS 对柑橘绿霉 L6 的 MIC 及 FICI
Table 1 Effects of BD and CTS on MIC and FICI of *P. digitatum* strain L6

菌株	MIC(mg/L)			FICI	相互作用
	BD	CTS	BD+CTS		
L6	42.19	62.50	10.54+31.25	0.75	累加作用

2.3 BD 和 CTS 对霉菌直接的抑制效果

外接霉菌孢子培养 72 h 后, 观察砂糖橘的发病程度, 如图 2 所示, 对照组的砂糖橘发病率最高, 几乎全部砂糖橘发生霉变且霉变程度较为严重。而经过 BD、CTS 以及 BD 和 CTS 复合处理的砂糖橘都在一定程度上达到了抑菌效果, 其中 BD 和 CTS 复合处理的砂糖橘霉变率最低。



图 2 BD 和 CTS 对砂糖橘发病率的抑制效果

Fig.2 Inhibitory effect of BD and CTS on incidence of sugar orange

注: A: 对照组(无菌水); B: BD; C: CTS; D: BD+CTS。

2.4 BD 和 CTS 对砂糖橘抗性诱导的效果

常温处理后外接霉菌孢子继续培养 72 h 后, 观察砂糖橘的发病率, 如图 3 所示, 结果表明未经处理的砂糖橘在外接霉菌后的发病率高达 83.3%, 而经过抑菌剂处理的砂糖橘分别在不同程度上抑制了霉菌的生长, 降低了发病率, 其中 BD 和 CTS 复配的效果最好, 发病率降低至 50.4%。另外, BD 和 CTS 单独使用均可诱导砂糖橘抵抗霉菌侵染, 降低砂糖橘的霉腐率。这说明 BD 和 CTS 对砂糖橘具有一定的抗性诱导作用。

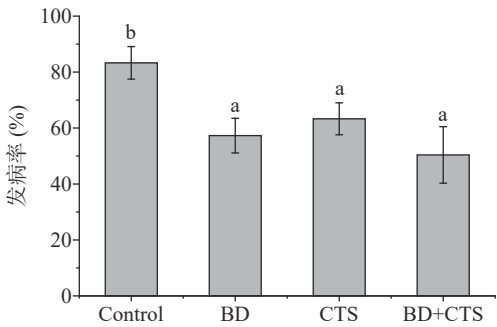


图 3 BD 和 CTS 对砂糖橘抗性诱导的作用

Fig.3 Effects of BD and CTS on the induction of resistance in sugar orange

注: 不同小写字母代表数据之间差异显著($P<0.05$)。

2.5 BD 和 CTS 对砂糖橘果实失重率及腐烂率的影响

随着贮藏时间的变化, 水果的水分含量在不断蒸发, 通过使用不同抗菌剂研究对砂糖橘水分的保留度。如图 4A 所示, 贮藏时间越久, 砂糖橘的水分含量越低, 失重率越高。使用抗菌剂处理的砂糖橘失重率要比对照组的低, 贮藏 15 d 后, BD、CTS 和 BD+

CTS 的失重率分别为 0.99%、1.62% 和 1.09%，与对照组相比，分别降低了 66.44%、45.08% 和 63.05%。其中 BD 和 BD+CTS 复配的效果较好，保鲜效果明显。

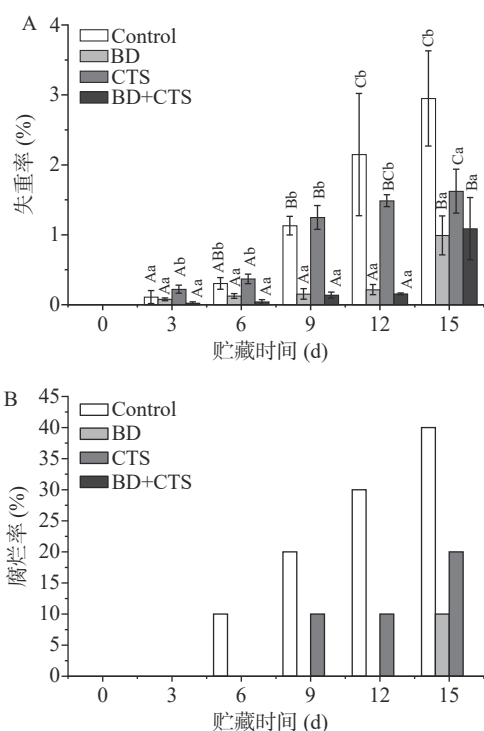


图 4 不同处理组砂糖橘贮藏期间失重率(A)和腐烂率(B)的变化

Fig.4 Changes in weight loss rate (A) and decay incidence (B) of sugar orange during storage in different treatment groups
注:大写字母代表相同处理组不同贮藏时间的显著性差异,小写字母代表不同处理组相同贮藏时间的显著性差异, $P<0.05$; 图 5~图 9 同。

砂糖橘在贮藏过程中极易受到病原微生物感染而腐烂,是造成其经济损失的重要原因。如图 4B 所示,对照组从第 6 d 开始腐烂,且腐烂率迅速提高,到 15 d 时已高达 40%。然而,各处理组的腐烂率受到了较大程度的抑制,其中 CTS 处理组的砂糖橘从第 9 d 开始腐烂,到 15 d 时腐烂率为 20%;BD 处理组贮藏到 15 d 时才开始腐烂;而 BD+CTS 复配处理组在 15 d 的贮藏期间没有出现腐烂。这也进一步证明了 BD+CTS 复配的保鲜效果更佳。

2.6 BD 和 CTS 对砂糖橘果实硬度的影响

贮藏期间果实硬度整体呈现下降趋势,其中对照组最为明显,而使用不同抗菌剂在不同程度上延缓了果实硬度的变化(图 5)。CTS 处理的果实在 3~6 d 硬度变化最大,从 427.30 ± 24.45 g 下降到 350.44 ± 14.76 g,而 BD 和 BD+CTS 复配处理的果实在 6~9 d 时硬度显著下降($P<0.05$)。当贮藏时间到达 15 d 后,BD 和 BD+CTS 复配处理的效果良好,与对照组相比,硬度分别延缓降低了 33.92% 和 34.69%。BD 和 BD+CTS 复配处理效果接近,但复合使用中 BD 的量显著减少,仍可达到效果,降低了使用成本。

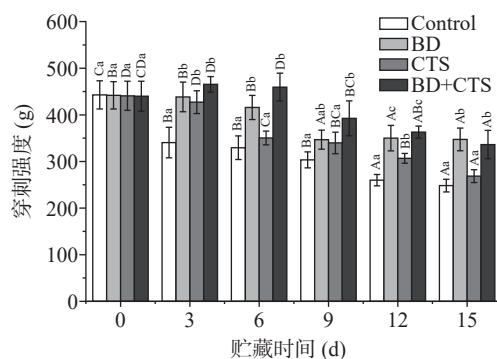


图 5 不同处理组砂糖橘贮藏期间硬度变化

Fig.5 Changes in firmness of sugar oranges during storage in different treatment groups

2.7 BD 和 CTS 对砂糖橘果实可溶性固形物的影响

贮藏过程中,砂糖橘果实的呼吸代谢会逐渐消耗可溶性糖等有机物,造成可溶性固形物含量的减少。如图 6 所示,随着贮藏时间的延长,砂糖橘内可溶性固形物的含量逐渐下降,且前 3 d 下降最为显著。各处理砂糖橘内可溶性固形物含量均高于对照组,尤其是 BD+CTS 处理组可溶性固形物的含量在贮藏 15 d 后能够维持在 11.93%,显著高于对照组 ($P<0.05$)。

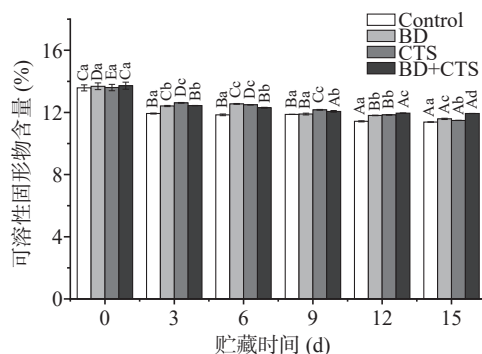


图 6 不同处理组砂糖橘贮藏期间可溶性固形物的变化
Fig.6 Changes in soluble solids of sugar orange during storage in different treatment groups

2.8 BD 和 CTS 对砂糖橘果实可滴定酸的影响

由于贮藏时间的延长,砂糖橘品质会下降,果实内可滴定酸含量下降。如图 7 所示,随着贮藏时间的增加,砂糖橘中可滴定酸含量总体呈现下降趋势,但所有处理组砂糖橘中可滴定酸含量均高于对照组。其中,BD+CTS 复配处理组可滴定酸含量下降缓慢,由初始的 1.48% 降低到 1.09%,显著高于对照组 ($P<0.05$)。结果表明,BD 和 CTS 的处理可以保持砂糖橘果实的新鲜度,延缓果实的腐败,两者复配的效果最好。

2.9 BD 和 CTS 对砂糖橘果实抗坏血酸含量的影响

抗坏血酸即维生素 C 是一种抗氧化物质,蔬菜水果中皆有,且柑橘类水果中维生素 C 含量较高。因此,在砂糖橘贮藏保鲜中,维生素 C 含量的测定是必不可少的。如图 8 所示,随着贮藏时间延长,砂糖

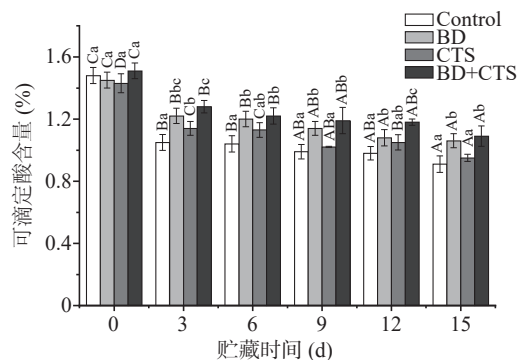


图 7 不同处理组砂糖橘贮藏期间可滴定酸含量的变化

Fig.7 Changes in the titratable acid content of sugar orange during storage in different treatment groups

橘中抗坏血酸含量逐渐下降。处理组砂糖橘内抗坏血酸含量相较对照组下降趋势缓慢,其中 BD+CTS 处理的砂糖橘中抗坏血酸含量相较其他组维持在较高水平,贮藏 15 d 后,抗坏血酸含量仍可维持 $28.42 \pm 3.85 \mu\text{g/mL}$,与对照组相比,提高了 25.36%。

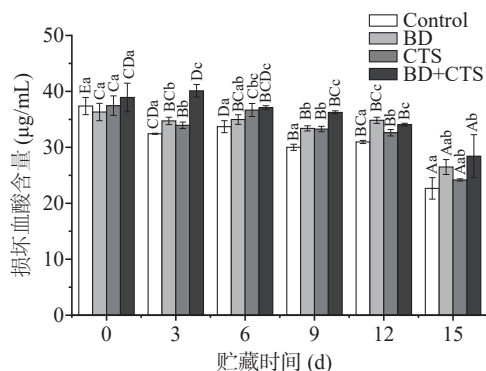


图 8 不同处理组砂糖橘贮藏期间抗坏血酸含量的变化

Fig.8 Changes in ascorbic acid content of sugar orange during storage in different treatment groups

2.10 BD 和 CTS 对砂糖橘果实防御相关酶活性的影响

为分析砂糖橘在 BD 和 CTS 处理后果实中防御相关酶活性的变化,选取了 SOD、POD 和 PPO 三个与抗病相关的酶进行研究。如图 9A 所示,SOD 的活性在贮藏期间的变化呈现先上升后下降的趋势,在第 9 d 时,SOD 活性达到最高,其中 BD+CTS 处理组的 SOD 活性高达 129.33 U/mL 。经过 BD、CTS 以及 BD+CTS 处理的砂糖橘中 SOD 的活性显著高于对照组 ($P < 0.05$)。随着贮藏时间延长,图 9B 显示砂糖橘果实中 POD 的活性也呈现先上升后下降的趋势,在第 9 d 活性最高,随后迅速下降。经 BD 及 CTS 处理的砂糖橘果实内 POD 活性高于对照组,其中,第 9 d 的结果最为显著,BD、CTS 以及 BD+CTS 复配的效果较为接近。由图 9C 可知,在贮藏 0~6 d 时 PPO 的活性呈现上升趋势,6~9 d 活性下降,在 9~15 d PPO 的活性比较平稳。其中,BD 和 BD+CTS 复配的果实中 PPO 的活性显著高于对照组和 CTS 处理组 ($P < 0.05$)。由以上的结果可推断出,三种处理方式的保鲜效果为 $\text{BD+CTS} > \text{BD} > \text{CTS}$,即表

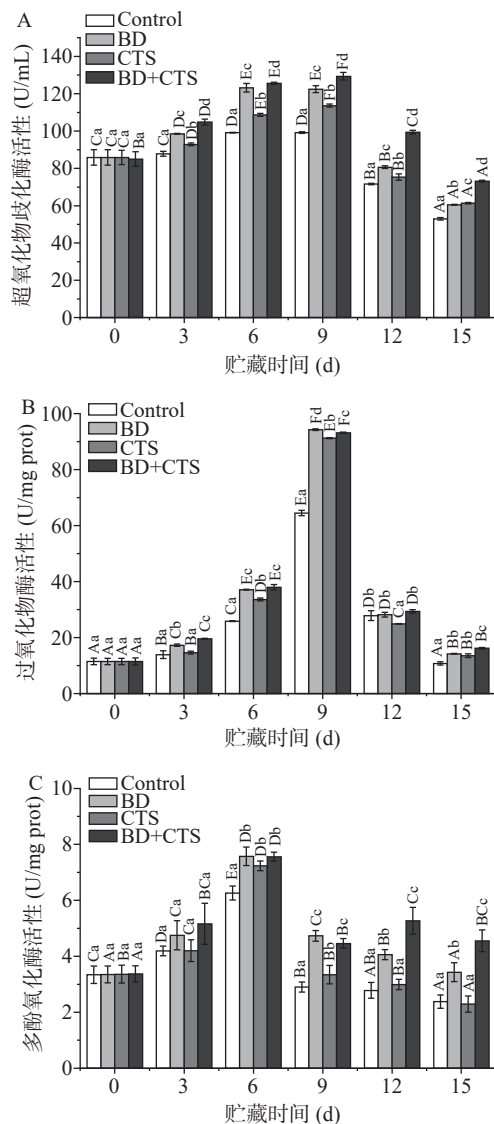


图 9 不同处理组砂糖橘贮藏期间防御相关酶活性的变化

Fig.9 Changes in defense-related enzyme activity of sugar orange during storage in different treatment groups

明了 BD 和 CTS 均可提高砂糖橘防御酶的活性,延长保质期。

3 讨论与结论

砂糖橘营养丰富、味道可口,具有理气化痰、润肺清肠等功效,深受消费者的喜爱。但其在贮运期间易受柑橘绿霉和青霉的感染,造成巨大的经济损失。近年来,芽孢杆菌产生的天然抗菌脂肽具有强烈的抗真菌、抗病毒等生物活性,同时具有绿色安全及不易产生耐药性等特点,可应用于农业、食品、医药及化妆品等行业。Waewthongrak 等^[13-14]研究枯草芽孢杆菌 ABS-S14 产生的抗菌脂肽 iturin A 和 fengycin 与 CTS 结合对柑橘类水果中指状青霉的抑制作用,研究表明它们可以显著抑制霉菌的生长。本研究发现抗菌脂肽 BD 和 CTS 均可以直接抑制 *P. digitatum* 的生长,当 BD 的浓度达到 42.19 mg/L ,CTS 的浓度达到 62.50 mg/L 或更高时,砂糖橘的霉变率均可得到有效控制。

BD 的使用可以造成霉菌菌丝损伤及孢子细胞

壁和细胞膜的破裂,使胞内物质外渗形成空洞,导致菌体破裂死亡^[15]。CTS是一种无毒的天然抗菌聚合物,已获得GRAS(Generally Recognized as Safe)认证^[16],它对禾谷镰刀菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌等表现出强烈的抗菌活性^[17-19]。本研究结果表明BD和CTS均可以有效抑制*P. digitatum*的生长,当BD和CTS复合使用时不仅增强了两种抑菌物质的效果,还降低了各自的使用量,可更有效控制砂糖橘的霉变率。

硬度是衡量水果新鲜度的重要指标,果实的硬度随贮藏时间的延长不断下降,果实的软化是由于细胞壁中间果胶物质的损失导致完整性的丧失,从而导致果实的萎缩和软化^[20]。处理组的砂糖橘在贮藏一段时间后仍保持较大的硬度,可能是由于呼吸过程的阻滞^[21]。同时,BD和CTS处理的果实在贮藏过程中可溶性固形物含量和可滴定酸度也较对照组高。可滴定酸的含量与果实中有机酸的含量直接相关,果实新陈代谢或呼吸过程中会利用有机酸,可滴定酸的含量会降低^[11],另外,水果中的微生物可以通过代谢过程产生酸和气体。这些代谢产物可以导致食品的可滴定酸含量增加,并且可能改变食品的味道和质地。BD和CTS的使用不仅起到抑菌作用,同时,经过浸泡,在果实外层形成保护屏障,具有氧阻隔性能,有效降低了呼吸^[22-23]。砂糖橘是抗坏血酸(维生素C)含量很高的水果,抗坏血酸易受氧化影响,特别是在与空气接触时。氧气可以导致抗坏血酸分子中的双键氧化,从而降低其含量,抗坏血酸的加速降解可能是由呼吸增强导致酶活性增强,L-抗坏血酸被氧化为脱氢抗坏血酸^[24],在贮藏实验中,经过BD和CTS处理的砂糖橘果实在贮藏期间保持较高水平的抗坏血酸含量,这与Kaya等^[25]研究CTS对猕猴桃果实的保鲜结果一致。

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)是一种含金属的酶,催化过氧阴离子发生歧化反应生成氧和过氧化氢,在对抗有害物质的防御中起主要作用^[26]。在逆境环境下,氧自由基的生成会进一步加剧,因此,SOD被认为对植物的逆境耐受性很重要。过氧化物酶(Peroxidase, POD)是植物酶促防御系统中一个关键的氧化还原酶,是活性氧清除酶系统的重要保护酶与植物诱导抗病性有关,它们能有效阻止高浓度氧的积累,防止膜脂的过氧化作用,延缓植物的衰老,维持正常的生命活动^[27],普遍存在于植物中,可与SOD协调配合提高植物的抗病性^[28]。多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase, PPO)是一种以Cu为辅基的酶,它与果蔬组织的酶促褐变有关。果蔬的褐变会降低其品质及营养价值^[29]。BD和CTS均可有效控制番茄采后的病害,它们既可抑制致病霉菌的生长,又显著增加了番茄果实中PPO、POD、CHI和GLU等相关防御酶的活性^[6,30]。因此,在砂糖橘的防腐保鲜过程中,控制微生物生长、相关酶活性和氧化反应以

及正确的储藏条件是非常重要的。同时,加工过程中的适当措施,如调整pH、改变包装方式、使用防腐剂等,也可以帮助延长食品的保鲜期和维持食品的质量。

本研究进一步证实BD和CTS复配效果最好,显著增加了果实中防御相关酶的活性,并能延长砂糖橘的贮藏期。BD和CTS均可有效抑制柑橘绿霉*P. digitatum* strain L6的生长,BD能发挥抗真菌作用主要归因于它可以破坏真菌细胞膜的结构^[15]。两者的MIC分别为42.19 mg/L和62.50 mg/L。当两者复合使用时,可达到叠加的抑制效果。BD和CTS复合使用显著降低了砂糖橘在贮藏过程中的发病率,同时还可诱导砂糖橘自身的抗性来抵抗霉菌的侵染,有效提高了砂糖橘果实的品质,这样复配使用不仅可以增加保鲜效果,而且壳聚糖的价格低,可以减少BD的使用,既延长货架期又降低了成本,具有可观的应用前景。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] REYMICK O O, LIU D, CHENG Y, et al. Cuminaldehyde-induced oxidative stress inhibits growth of *Penicillium digitatum* in citrus[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 192: 111991.
- [2] YANG Q, QIAN X, ROUTLEDGE M N, et al. Metabonomics analysis of postharvest citrus response to *Penicillium digitatum* infection[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2021, 152: 112371.
- [3] LIN S H, LUO P, YUAN E, et al. Physiological and proteomic analysis of *Penicillium digitatum* in response to X33 antifungal extract treatment[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 584331.
- [4] PAPOUTSIS K, MATHIOUDAKIS M M, HASPERUÉ J H, et al. Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold)[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 86: 479-491.
- [5] 马芳芬,殷海成. 枯草芽孢杆菌及其杆菌素D对黄曲霉毒素作用机制的研究进展[J]. *粮食与饲料工业*, 2016, 12(4): 48-50.
- [6] MA F F, YING H C. Research progress on the inhibition mechanism of *Bacillus subtilis* and bacillomycin D against aflatoxin[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2016, 12(4): 48-50.
- [7] LIN F, XUE Y, HUANG Z, et al. Bacillomycin D inhibits growth of *Rhizopus stolonifer* and induces defense-related mechanism in cherry tomato[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2019, 103(18): 7663-7674.
- [8] 王安杏,曹川,张庆,等. 壳聚糖复合膜在果蔬保鲜中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(5): 164-172.
- [9] WANG A X, CAO C, ZHANG Q, et al. Application of chitosan composite film in fruits and vegetables preservation[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2023, 14(5): 164-172.
- [10] 胡诗瑶,王艳颖,李嘉骏,等. 壳聚糖复合涂膜处理对鲜切库尔勒梨生理生化品质的影响[J]. *现代园艺*, 2023, 46(3): 6-8,11.
- [11] HU S Y, WANG Y Y, LI J J, et al. Effects of chitosan composite coating on physiological and biochemical qualities of fresh cut Korla Pear[J]. *Contemporary Horticulture*, 2023, 46(3): 6-8,11.

- [9] MEDRANO-CASTELLÓN L M, BLANCAS-BENITEZ F J, SANTOYO-GONZÁLEZ M A, et al. Application of bioactive chitosan-based coatings with marine antagonists to control postharvest Persian lime decay caused by *Penicillium italicum*[J]. *Biocontrol Science Technology*, 2023, 33(3): 283–295.
- [10] COUTINHO T C, FERREIRA M C, ROSA L H, et al. *Penicillium citrinum* and *Penicillium mallochii*: New phytopathogens of orange fruit and their control using chitosan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 234: 115918.
- [11] 林福兴. 抗菌脂肽 Bacillomycin D 对樱桃番茄果实采后病害的防治及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020. [LIN F X. Biocontrol of cherry tomato postharvest diseases by antimicrobial lipopeptide bacillomycin D and its mechanism [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.]
- [12] AKBUDAK B, AKBUDAK N, SENIZ V, et al. Sequential treatments of hot water and modified atmosphere packaging in cherry tomatoes[J]. *Journal of Food Quality*, 2007, 30(6): 896–910.
- [13] WAEWTHONGRAK W, PISUCHPEN S, LEELASUPHAKUL W. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2015, 99: 44–49.
- [14] WAEWTHONGRAK W, LEELASUPHAKUL W, MCCOLLUM G. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* ABS-S14 elicit defense-related gene expression in citrus fruit[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109386.
- [15] GONG Q, ZHANG C, LU F, et al. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*[J]. *Food Control*, 2014, 36(1): 8–14.
- [16] YAN C. Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections[J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7136.
- [17] LORON A, WANG Y, ATANASOVA V, et al. Chitosan for eco-friendly control of mycotoxinogenic *Fusarium graminearum*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 134: 108067.
- [18] ARDILA N, DAIGLE F, HEUZEY M C, et al. Effect of chitosan physical form on its antibacterial activity against pathogenic bacteria[J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(3): 679–686.
- [19] JOVANOVI G D, KLAUS A S, NIKI M P. Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish[J]. *Revista Argentina De Microbiologia*, 2016, 48(2): 128–136.
- [20] YAO S, CAO Q, XIE J, et al. Alteration of sugar and organic acid metabolism in postharvest granulation of Ponkan fruit revealed by transcriptome profiling[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2018, 139: 2–11.
- [21] TESFAY S Z, MAGWAZA L S. Evaluating the efficacy of moringa leaf extract, chitosan and carboxymethyl cellulose as edible coatings for enhancing quality and extending postharvest life of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit[J]. *Food Packaging & Shelf Life*, 2017, 11: 40–48.
- [22] DAN X, QIN H, DAN R. Prolonged preservation of tangerine fruits using chitosan/montmorillonite composite coating[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2018, 143: 50–57.
- [23] CHIEN P J, SHEU F, LIN H R. Coating citrus (*Murcott tangerine*) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life[J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(3): 1160–1164.
- [24] NAYAK S L, SETHI S, SINGH B, et al. Influence of γ -radiation and chitosan coating on postharvest quality of ‘Dancy’ Tangerine fruit[J]. *Journal of Packaging Technology and Research*, 2022, 7(1): 23–33.
- [25] KAYA, ČESONIENE, DAUBARAS, et al. Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 85: 355–360.
- [26] BOWLER C, VAN CAMP W, VAN MONTAGU M, et al. Superoxide dismutase in plants[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1994, 13(3): 199–218.
- [27] 吴彩娥, 李婷婷, 范龚健, 等. 保鲜剂处理对银杏果采后生理及贮藏品质的影响[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(18): 3832–3840.
- [28] WU C E, LI T T, FAN G J, et al. Effect of different preservatives on post-harvest physiological and storage quality in *Ginkgo biloba* seeds[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(18): 3832–3840.
- [29] 程晨. 柑橘采后杀菌剂的筛选及防腐保鲜研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. [CHENG C. Screening of citrus postharvest fungicide and study on antiseptic preservation [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.]
- [30] 牛锐. 臭氧处理对柑橘保鲜效果的研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2015. [NIU R. Research of ozone treatment effect on citrus preservation [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2015.]
- [31] LIU J, TIAN S P, MENG X H. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 44(3): 300–306.