

2-苯乙醇及其生物复配保鲜剂 对柑橘致腐菌的抑菌作用

黄筱萍¹, 刘 兰¹, 李 鹏¹, 倪 赛², 张 波²

(1.江西省科学院微生物研究所, 江西南昌 330096;

2.江西省科学院生物技术有限责任公司, 江西南昌 330029)

摘 要:为研究 2-苯乙醇(2-phenylethanol, 2-PE)、纳他霉素、壳聚糖与壳寡糖对意大利青霉(*Penicillium italicum*)、指状青霉(*Penicillium digitatum*)、柑橘链格孢霉(*Alternaria citri*)和芽枝状枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*)4 种主要柑橘致腐菌的抑菌活性,分别通过单一及复合生物保鲜剂的抑菌率与最低抑菌浓度测定,判断其抑菌效果。结果表明,2-PE与纳他霉素在较低的质量浓度下对 4 种致病真菌的抑菌效果明显,在质量浓度分别为 2.4、0.3 g/L 时可完全抑制致腐菌的生长,而壳聚糖和壳寡糖的抑菌效果较弱,在质量浓度分别为 7.5 和 12.0 g/L 时亦不能完全抑制致腐菌的生长。由主效应与交互效应的方差分析得出,影响意大利青霉与芽枝状枝孢霉抑菌率的主要因子为 2-苯乙醇和纳他霉素,且二者交互作用显著($0.005 < P < 0.05$),2-苯乙醇与壳聚糖的交互作用不显著($P > 0.05$)。2-苯乙醇和纳他霉素复合使用抑菌显著($P < 0.05$)增效,与同一浓度的 2-苯乙醇相比,复配后的抑菌效能提升 60% 以上。

关键词:2-苯乙醇,生物复配保鲜剂,致腐菌,抑菌作用

Antimicrobial Effects of 2-Phenylethanol and Its Compound Biological Preservatives on the Citrus Pathogen

HUANG Xiao-ping¹, LIU Lan¹, LI Peng¹, NI Sai², ZHANG Bo²

(1.Institution of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China;

2.Jiangxi Keyuan Bio-technology Co., Ltd., Nanchang 330029, China)

Abstract:To study the activities of bio-preservatives 2-phenylethanol(2-PE), natamycin, chitosan and oligochitosan against the four mainly citrus pathogens *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria citri* and *Cladosporium cladosporioides*, the antibacterial rate and minimum inhibition concentrations of single and composite biopreservatives were assayed in this research. The results showed that both of 2-PE and natamycin strongly inhibited the four pathogens in the relative low mass concentration, and could inhibit mycelium growth of citrus pathogens in the concentration of 2.4 g/L (2-PE) and 0.3 g/L (natamycin). The antibacterial effects of chitosan and oligochitosan were not significant, and mycelium growth could not be inhibited completely in relative high concentration of 7.5 g/L (chitosan) and 12.0 g/L (oligochitosan). The analysis of variance of main effect and interaction effect showed that the main factors affecting the inhibition rate of *Penicillium italicum* and *Cladosporium cladosporioides* were 2-PE and natamycin, and the interaction between 2-PE and natamycin was significant ($0.005 < P < 0.05$). The interaction between 2-PE and chitosan was not significant ($P > 0.05$). Combined usage of 2-PE and natamycin could enhance their inhibition activities significantly ($P < 0.05$). Compared with the same concentration of 2-PE, the antibacterial effect would increased by more than 60% when 2-PE and natamycin were combined.

Key words:2-phenylethanol; bio-preservative; citrus pathogen; antimicrobial activity

中图分类号:TS254.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2019)22-0125-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.22.023

引文格式:黄筱萍,刘兰,李鹏,等.2-苯乙醇及其生物复配保鲜剂对柑橘致腐菌的抑菌作用[J].食品工业科技,2019,40(22):125-131.

柑橘作为我国大宗水果之一,其种植面积和产量均居世界前列^[1]。由于果实成熟、采摘期集中,在贮运过程中易感染霉菌,出现褐变腐烂现象,经济损失严重,阻碍了柑橘产业的发展^[2]。引起腐烂病害有 20 多种,其中真菌是柑橘最主要的致腐病原菌。常

见的真菌病害主要有:意大利青霉引起的青霉病、指状青霉引起的绿霉病、橘色二孢(*Diplodia natalensis*)引起的黑色蒂腐病、柑橘链格孢霉引起的黑腐病、白地霉(*Geotrichum citri-auranti* E.E)引起的酸腐病,芽枝状枝孢霉会引起多种水果水斑病及植物叶片病

收稿日期:2019-03-05

作者简介:黄筱萍(1965-),女,硕士,研究员,研究方向:生物工程及生物活性产物的制备和应用,E-mail:plahxp@163.com。

基金项目:江西省重点研发项目(S2018ZPYFE1016);江西省科学院重大研究专项(2018-YZD1-03)。

害^[3-4]。国内外对柑橘采后腐烂现象开展了相关方面的防腐保鲜研究,其中应用较多的是化学杀菌剂,包括咪唑胺、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、抑霉唑、百菌清等,这些化学药品会导致一定的化学残留和环境污染,果实的食用安全性倍受争议^[5-6]。

2-苯乙醇(2-phenylethanol, 2-PE)是一种具有玫瑰气味的芳香醇,作为传统的香精香料广泛应用于日化产品和食品工业中^[7-9]。近年来,研究者发现其对多种细菌和真菌具有抑菌作用,苗潇潇^[10]发现玫瑰花露对金黄色酿脓葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌具有明显的抑菌作用,其主要抑菌成分是2-PE。Mo等^[11]筛选到一株能够有效控制草莓采后灰霉菌病原体的生防酵母异常毕赤酵母(*Pichia anomala* SKM-T),其主要的代谢产物为2-PE。刘普^[12]研究发现,柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata* 34-9)中的抗菌物质是2-苯乙醇,能够有效地抑制柑橘青绿霉菌的生长。方静凡^[13]的研究进一步发现2-PE具有较宽的抑菌谱,对引起柑橘、苹果、芒果、番茄等多种致腐菌具有较好的抑菌作用,对意大利青霉的最小抑菌浓度MIC为0.2%(v/v)。以上研究只发现和初步探索了2-PE对细菌和真菌具有抑菌作用,还未能进一步确定2-PE对不同菌,尤其是对果蔬致腐真菌的抑菌效果,及与其它生物抑菌剂的协同抑菌作用。纳他霉素作为一种高效、广谱的真菌抗菌剂用于乳制品、肉类的保鲜,对水果果实的保鲜亦有较好的效果^[14-17],还可作为抗菌剂应用于食品抗菌包装材料中^[18-19]。壳聚糖作为保鲜剂单独使用或与其他抗菌剂制备成抑菌涂膜广泛地应用在食品保鲜中^[20-21]。生物转化法生产的2-PE被认定为GRAS产品^[22],安全无毒、适用性广,对酸、热稳定,易溶于水,能在各种食品中均匀扩散。

本研究通过2-PE及其它生物保鲜剂对柑橘常见致腐菌进行抑菌效果评价,以及与纳他霉素和壳聚糖等生物保鲜剂的协同抑菌作用,减少单种抑菌剂的用量,降低成本,并且弥补单种抑菌剂的不足,扩大抑菌谱,以期获得以2-PE为主的新型、低成本的生物复合保鲜剂,为今后开发2-PE复合保鲜剂及复合抑菌膜在果蔬防腐保鲜中的应用提供依据,对柑橘等果蔬的保鲜具有较大的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

意大利青霉(*Penicillium italicum*)、指状青霉(*Penicillium digitatum*)、柑橘链格孢霉(*Alternaria citri*)、芽枝状枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*) 从自然腐烂的赣南脐橙和南丰蜜桔中分离,保存于本研究室中;2-PE粗提液 由本实验室生物转化液经乙醇抽提浓缩而成的质量分数80%~90%粗制品^[23];壳聚糖、壳寡糖 山东西王化学股份有限公司;纳他霉素 浙江银象生物工程有限公司;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基 北京奥博星生物技术有限责任公司。

BX53型显微镜 日本 Olympus 公司;Prachfum 224-1CN分析天平 德国 Sartorius 公司;MJX-250B-Z

霉菌培养箱 上海博迅医疗生物仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生物保鲜剂溶液配制 纳他霉素用10 g/L的乙酸溶液配制成2 g/L的母液,壳聚糖用20 g/L乙酸溶液配制成25 g/L母液,壳寡糖用10 g/L乙酸溶液配制成50 g/L母液。

1.2.2 2-PE对病原菌孢子萌发率的影响 将4种病原菌株分别于PDA斜面培养基28℃培养6 d,分别加入10 mL无菌水,用玻璃棒洗下孢子,菌液再分别倒入20 mL注射器中,经4层无菌纱布过滤,收集孢子液备用。用血球计数器计数,稀释孢子液为 10^{-4} 和 10^{-5} 涂布于含2-PE分别为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0和1.2 g/L的培养基中,每个梯度涂布3皿,于28℃培养3~6 d,计算孢子的萌发率。

$$\text{孢子萌发率}(\%) = \frac{\text{处理平皿中菌落数}}{\text{对照平皿中菌落数}} \times 100$$

1.2.3 孢子萌发最小抑菌浓度(Minimum Inhibition Concentration, MIC)测定 先配制含较大质量浓度范围保鲜剂的PDA培养基,按1.2.2方法制备孢子液涂布于培养基上,初步确定其MIC范围,在此范围内设定密集的质量浓度梯度并测定孢子萌发率,配制的保鲜剂浓度分别为纳他霉素浓度为0.0050~0.025 g/L,壳聚糖浓度为0.5~3.0 g/L,壳寡糖1.0~3.0 g/L的培养基,选择孢子萌发率为0的保鲜剂质量浓度,即为其抑制孢子萌发最小抑菌质量浓度^[25]。

1.2.4 生物保鲜剂对菌丝生长的抑制浓度观测 将4种病原菌孢子液分别涂布于PDA平皿中,于28℃培养6~7 d,用 $\phi 5$ mm的打孔器在培养基上打孔,制备生长一致的菌苔,备用。分别配制2-PE浓度为1.0、2.0、3.0、4.0 g/L,纳他霉素浓度为0.10、0.20、0.30 g/L,壳聚糖浓度为2.5、5.0、7.5 g/L,壳寡糖浓度4.0、8.0、12.0 g/L的培养基,分别倒入 $\phi 15$ cm平皿中,每皿放入预先制备好的4种病原菌菌苔各一块,将菌苔倒贴在培养基上,于28℃培养4 d,以不加药剂的培养基作为对照,观察菌丝生长情况。

1.2.5 菌丝生长抑制率的测定(菌丝生长速率测定法) 配制含2-PE浓度为0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2、2.4 g/L,纳他霉素浓度为0.0050、0.0075、0.0100、0.0125、0.0150、0.0200、0.0400、0.0600、0.0800、0.1000、0.2000、0.3000 g/L,壳聚糖浓度为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L,壳寡糖浓度2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 g/L的培养基,用量杯量取等量体积倒入平皿中,用打孔器切取生长一致的病原菌菌块,移植于含药剂的平皿中,每块平皿植入3块菌苔作为平行试验,另设加无菌水的PDA培养基平板作为对照。置于28℃生化培养箱中培养,72 h后开始用游标卡尺测量菌落直径,以后每隔24 h测量一次,取120 h的菌落平均值计算菌丝生长抑制率,比较不同保鲜剂对4种病原菌的毒力大小^[24]。

$$\text{抑菌率}(\%) = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}) \times 100$$

1.2.6 正交试验 试验以2-PE浓度(A)、纳他霉素浓度(B)、壳聚糖浓度(C)为考察因素,抑菌率为考察指标,采用SPSS 20.0统计软件进行3因子2水平

表1 正交试验因素与水平设计表

Table 1 Table of factors and levels in orthogonal design

菌株	水平	2-PE 浓度(A)	纳他霉素浓度(B)	壳聚糖浓度(C)
意大利青霉	1	1.0	0.005	1.0
	2	1.6	0.010	2.0
芽枝状枝孢霉	1	0.2	0.030	1.0
	2	0.6	0.060	2.0

表2 2-PE 对 4 种病原菌的孢子萌发率的影响(%)

Table 2 Effect of 2-PE in spore germination rate of four citrus pathogens(%)

2-PE(g·L ⁻¹)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
意大利青霉	100 ± 1.67 ^a	100 ± 2.62 ^a	92.1 ± 3.17 ^a	67.8 ± 1.08 ^b	21.4 ± 2.93 ^c	0
指状青霉	100 ± 1.54 ^a	54.7 ± 1.1 ^b	28.4 ± 2.41 ^c	0	0	0
柑橘链格孢	100 ± 1.74 ^a	85.6 ± 1.63 ^b	0	0	0	0
芽枝状枝孢霉	100 ± 1.89 ^a	43.5 ± 0.75 ^b	0	0	0	0

注:同行数据后的不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

的 $L_8(2^7)$ 交互作用表进行正交试验设计(表1),通过软件中一般线性模型进行主效应和与交互效应的方差分析,确定各因子间的交互作用^[26-27]。

1.2.7 2-PE 与纳他霉素的复合抑菌实验 取 2-PE 浓度为 1.0、1.2、1.4 g/L,在这三个浓度中分别添加纳他霉素浓度为 0、0.0050、0.0075、0.0100 g/L,按 1.2.5 方法测定复合抑菌剂对意大利青霉的抑菌率,以不添加纳他霉素的 2-PE 抑菌率为对照,计算抑菌率增幅。同样取纳他霉素浓度为 0.02、0.04、0.06 g/L,在这三个浓度中分别添加 2-PE 浓度为 0、0.2、0.4、0.6 g/L,测定复合抑菌剂对芽枝状枝孢霉的抑菌率,以不添加 2-PE 的纳他霉素抑菌率为对照,计算抑菌率增幅。

抑菌率增幅(%) = (复合抑菌剂抑菌率 - 对照抑菌率) / 对照抑菌率 × 100

1.3 数据处理

采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析和相关分析, Duncan's 法进行多重比较, Microsoft Excel 2010 表格作图。

2 结果与分析

2.1 保鲜剂对 4 种病原菌孢子抑菌浓度的影响

2-PE 对细胞具有一定的毒性,其抑菌作用主要是通过增加细胞膜的通透性而扰乱跨膜质子电势,以及作为大分子合成的抑制剂抑制细胞内蛋白质和 RNA 的合成。不同的微生物对 2-PE 的耐受性不同,通常质量浓度为 0~2 g/L 的 2-PE 可抑制大部分微生物的生长,当质量浓度达到 4 g/L 可完全抑制酵母菌的生长^[22]。由表 2 可知,2-PE 对 4 种病原菌孢子萌发均有显著($P < 0.05$)的抑制效果(意大利青霉中 2-PE 浓度 ≥ 0.8 g/L),在浓度为 0.6 g/L 时可全部抑制柑橘链格孢和芽枝状枝孢霉的孢子萌发,对指状青霉和意大利青霉的最低孢子萌发抑制浓度分别为 0.8 和 1.2 g/L,2-PE 对意大利青霉的孢子萌发率抑制效果较弱。2-PE 在可较低的质量浓度下完全抑制真菌孢子萌发,可能是孢子在萌发过程中蛋白质和 RNA 的合成更易受到 2-PE 的抑制。

参照 2-PE 对 4 种病原菌孢子萌发率的影响,亦

进行了纳他霉素、壳聚糖和壳寡糖对 4 种病原菌孢子萌发率的影响。表 3 为 3 种生物保鲜剂完全抑制 4 种病原菌孢子萌发的最小抑菌浓度,病原菌对纳他霉素最为敏感,在极低的浓度下即可完全抑制孢子的萌发,在浓度为 0.02 g/L 时可完全抑制 4 种孢子的萌发,孙启华等^[28]发现纳他霉素对青霉菌的最小抑菌浓度为 5 mg/L,在浓度为 0.6~25 mg/L 时可抑制绝大部分真菌的生长^[29]。本试验结果表明 0.008 g/L 的纳他霉素可完全抑制意大利青霉的孢子萌发,当浓度达到 0.02 g/L 时完全抑制了 4 种病原真菌的孢子萌发,对孢子萌发的抑菌浓度范围相近。壳聚糖和壳寡糖对病原菌株的孢子萌发都具有抑制作用,但对不同的病原菌的抑菌活性有较大的差异,且病原菌对壳聚糖和壳寡糖的敏感性相同,即壳聚糖和壳寡糖对 4 种病原菌的抑菌活性为芽枝状枝孢霉 > 指状青霉 > 意大利青霉 > 柑橘链格孢。

表3 生物保鲜剂抑制 4 种病原菌

孢子萌发的最小抑菌浓度(g·L⁻¹)

Table 3 Minimum inhibition concentration of bio-preservatives in inhibiting spore germination of four citrus pathogens(g·L⁻¹)

菌株名称	纳他霉素	壳聚糖	壳寡糖
意大利青霉	0.008	1.5	2.5
指状青霉	0.02	1.0	2.0
柑橘链格孢	0.01	1.5	3.0
芽枝状枝孢霉	0.02	0.8	1.5

2.2 不同质量浓度的保鲜剂对 4 种病原菌菌丝生长的抑制作用

不同质量浓度的保鲜剂对 4 种病原菌菌丝生长的抑制效果见表 4。

4 种保鲜剂对供试病原菌菌丝生长均有抑制作用。当 2-PE 浓度为 2.0 g/L 时可抑制指状青霉和枝状枝孢霉的菌丝生长,当浓度达 3.0 g/L 时,意大利青霉和柑橘链格孢的菌丝生长亦完全被抑制。这与报道的 2-PE 在浓度达到 1.5 g/L 时即可很好地抑制柑橘青霉(意大利青霉)、绿霉(指状青霉)生长^[12]的抑菌浓度有一定的差异,这可能是从不同地区和不

表4 生物保鲜剂对病原菌菌丝生长的抑菌效果(g·L⁻¹)

Table 4 Effect of bio-preservatives in inhibiting mycelium growth of citrus pathogens(g·L⁻¹)

菌种名称	2-PE				纳他霉素			壳聚糖			壳寡糖		
	1.0	2.0	3.0	4.0	0.10	0.20	0.30	2.5	5.0	7.5	4.0	8.0	12.0
意大利青霉	++++	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	++++	++	+
指状青霉	++++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++++	++	+
柑橘链格孢	+++	+	-	-	++++	++	-	++++	+++	+	++++	+++	++
枝状枝孢霉	+++	-	-	-	+++	-	-	++++	++++	++	++++	+++	++

注：“+”、“++”、“+++”、“++++”分别表示菌丝生长、生长较好、生长良好和生长极好；“-”表示不生长。

同柑橘品种中分离的青、绿霉对 2-PE 的敏感性存在着差异。纳他霉素对意大利青霉和指状青霉菌丝生长具有很强的抑菌作用,在浓度低于 0.10 g/L 时即可完全抑制意大利青霉、指状青霉菌丝生长,对其它两种病原真菌的抑菌作用稍弱。孙远功等^[30]在柑桔保鲜研究中发现纳他霉素对桔青霉的抑菌浓度为 300 mg/L。壳聚糖和壳寡糖需在较高的浓度下才有较好的抑菌作用,且对柑橘链格孢和芽枝状枝孢霉抑菌效果较弱。

2.3 不同质量浓度的生物保鲜剂对不同病原菌的抑菌效果

从图 1~图 4 可知,4 种生物保鲜剂对柑橘致腐菌均有不同程度的抑菌作用。图 1 为 2-PE 对 4 种病原真菌的抑菌效果,在一定质量浓度下,2-PE 对 4 种病原真菌的抑菌效果差异显著($P < 0.05$),抑菌强弱为芽枝状枝孢霉 > 指状青霉 > 柑橘链格孢霉 > 意大利青霉,抑菌率为 90% 时,对应的 2-PE 浓度分别为 1.0、1.2、1.2、2.2 g/L,当抑菌率达 100% 时,即最小抑菌浓度(MIC)分别为 1.4、1.8、2.2、2.4 g/L。即 2-PE 浓度达到 2.4 g/L 时,可完全抑制 4 种病原菌菌丝的生长。方静凡^[13]采用 2-PE 对多种果实病原真菌的抑菌谱进行检测,2-PE 浓度在 0.2~0.4% (v/v) 时可完全抑制柑橘绿霉菌、黑腐菌、炭疽菌,苹果青霉菌和灰霉菌等多种致腐真菌的生长,对意大利青霉菌 B3 的最小抑菌浓度 MIC 为 0.25% (v/v)。

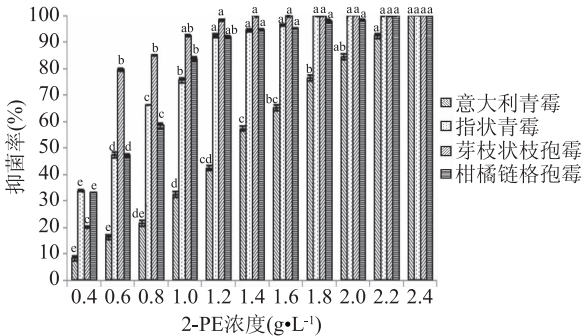


图1 2-PE 质量浓度对 4 种病原菌的抑菌效果

Fig.1 Antibacterial effect of 2-PE concentration on four pathogenic bacteria

注:不同小写字母表示相同致病菌不同保鲜剂浓度的抑菌率差异显著, $P < 0.05$;图 2~图 4 同。

纳他霉素对几乎所有的霉菌和酵母菌具有抗性,绝大多数霉菌在质量浓度为 0.5~25 mg/L 可抑制绝大多数霉菌的生长,对指状青霉和娄地干酪青霉的

最小抑菌浓度分别为 2.5 和 10 mg/L^[29]。250 mg/L 纳他霉素可有效抑制银杏果致霉菌(扩展青霉)的生长^[31]。同样纳他霉素对 4 种病原真菌均有很强的抑菌效果(图 2),纳他霉素在相同的质量浓度下对不同病原菌的抑菌效果差异不同,在低浓度下指状青霉对纳他霉素比意大利青霉更为敏感,当纳他霉素浓度为 0.0125 g/L 时,指状青霉和意大利青霉抑菌率分别为 91.1% 和 87.7%,随着纳他霉素浓度的提高,指状青霉抑菌率提高较为平缓,而意大利青霉的抑菌率则大幅上升。完全抑制意大利青霉和指状青霉生长的纳他霉素浓度分别为 0.0150、0.0200 g/L。芽枝状枝孢霉和柑橘链格孢霉在相对较高的浓度下才能完全抑制菌丝的生长,其浓度分别为 0.2000、0.3000 g/L,据此得出纳他霉素对病原菌的完全抑菌强弱为意大利青霉 > 指状青霉 > 芽枝状枝孢霉 > 柑橘链格孢霉。

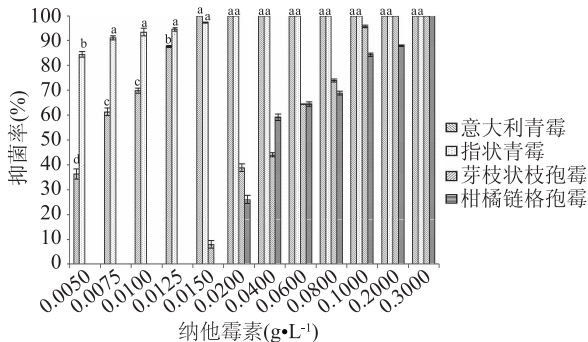


图2 不同质量浓度的纳他霉素对 4 种病原菌的抑菌效果

Fig.2 Antibacterial effect of natamycin concentration on four pathogenic bacteria

壳聚糖对指状青霉有较好的抑菌效果(图 3),当浓度为 3.0 g/L 时,可完全抑制菌丝的生长。提高壳聚糖为 5.0 g/L 时,对意大利青霉、柑橘链格孢霉和芽枝状枝孢霉的抑菌率分别达到 100%、94.2% 和 88.7%。壳寡糖在较低浓度的条件下对 4 种病原菌抑菌效果较弱(图 4),当质量浓度为 4.0 g/L 时,抑菌率均低于 50%,提高浓度,抑菌率提高亦不明显,提高质量浓度为 12.0 g/L 时,对 4 种病原菌的抑菌率仅为 65%~82%。

2.4 2-PE 与其他生物保鲜剂的主效应和交互作用

由于不同病原菌对不同生物保鲜剂的敏感性不同,本试验旨在研究 2-PE 与其它保鲜剂复配后对病原菌的抑菌作用的差异。在 4 种病原菌中,意大利青霉对 2-PE 的耐受性最高,而芽枝状枝孢霉对 2-

表 5 意大利青霉抑制 SPSS 试验方案及结果
Table 5 Experimental scheme and results of inhibition for *P.italicum* by SPSS

实验号	A(2-PE)	B(纳他霉素)	C(壳聚糖)	抑菌率(%)
1	1.0	0.005	1.0	56.56 ± 1.01 ^d
2	1.0	0.005	2.0	63.04 ± 0.79 ^d
3	1.0	0.010	1.0	80.20 ± 0.98 ^c
4	1.0	0.010	2.0	89.79 ± 1.23 ^b
5	1.6	0.005	1.0	90.13 ± 0.98 ^b
6	1.6	0.005	2.0	92.42 ± 1.34 ^{ab}
7	1.6	0.010	1.0	97.34 ± 0.97 ^{ab}
8	1.6	0.010	2.0	100.00 ± 0.10 ^a

注:同列数据后的不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$;表 7 同。

抑菌率影响显著,A 和 C 的交互作用对意大利青霉菌抑菌率无显著性影响($P > 0.05$)。

2.4.2 复合保鲜剂对芽枝状枝孢霉抑菌效果的正交试验结果 在单因子试验中,2-PE 对芽枝状枝孢霉的抑菌效果最强,而纳他霉素对其的抑菌效果较弱,通过正交试验考察影响其抑菌率的主要因子和各因子间的交互作用。试验设计和结果见表 7~表 8。

表 7 芽枝状枝孢霉抑制 SPSS 试验方案及结果
Table 7 Experimental scheme and results of inhibition for *C.cladosporioides* by SPSS

实验号	A(2-PE)	B(纳他霉素)	C(壳聚糖)	抑菌率(%)
1	0.2	0.03	1.0	70.43 ± 0.12 ^c
2	0.2	0.03	2.0	72.55 ± 0.23 ^c
3	0.2	0.06	1.0	82.38 ± 0.05 ^b
4	0.2	0.06	2.0	86.14 ± 0.24 ^b
5	0.6	0.03	1.0	87.53 ± 0.58 ^b
6	0.6	0.03	2.0	90.84 ± 0.43 ^b
7	0.6	0.06	1.0	94.19 ± 0.56 ^{ab}
8	0.6	0.06	2.0	100.00 ± 0.01 ^a

主体间效应和方差分析表明,校正模型显著性检验 $P = 0.005 < 0.01$,影响极显著,偏 Eta 方为

表 6 意大利青霉抑制效果主体间效应的检验
Table 6 Test of intersubjective effect of inhibition for *P.italicum*

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F	P 值	偏 Eta 方 ^a
校正模型	1779.422	5	355.884	290.251	0.003	0.999
截距	56025.434	1	56025.434	45693.085	0.000	1.000
A	1019.2611	1	019.261	831.287	0.001	0.998
B	531.056	1	531.054	433.166	0.002	0.995
AB	158.420	1	158.420	129.204	0.008	0.985
C	55.230	1	55.230	45.044	0.021	0.957
AC	15.457	1	15.457	12.606	0.071	0.863
误差	2.452	2	1.226			
总计	57807.308					
校正总计	1780.874	7				

注:a.偏 Eta 方 = 0.999(调整偏 Eta 方 = 0.995);表 8 同。

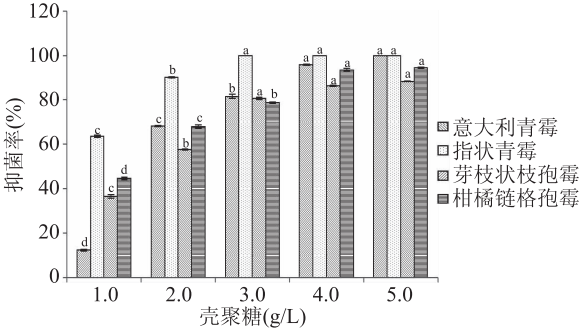


图 3 壳聚糖质量浓度对 4 种病原菌的抑菌效果
Fig.3 Antibacterial effect of chitosan concentration on four pathogenic bacteria

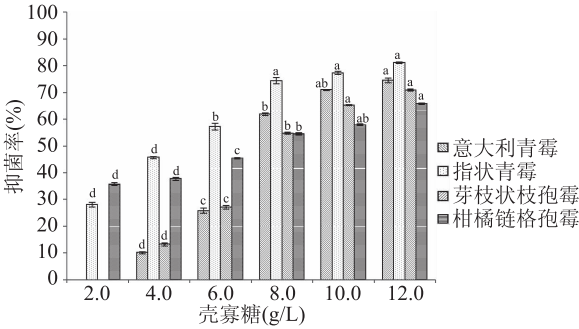


图 4 壳寡糖质量浓度对 4 种病原菌的抑菌效果
Fig.4 Antibacterial effect of oligochitosan concentration on four pathogenic bacteria

PE 最为敏感,因而采用这两株病原菌株分别进行不同保鲜剂的交互抑菌试验。在相同的抑菌剂浓度下,采用复合保鲜剂可能会取得更好的抑菌效果。在单因素实验结果的基础上,通过 SPSS20.0 统计软件中的一般线性模型对 3 因子的主效应用和交互效应进行方差分析。

2.4.1 复合保鲜剂对意大利青霉菌抑菌效果的正交试验结果 2-PE 与其他生物保鲜剂复合使用对意大利青霉的抑菌效果见表 5~表 6。

主体间效应和方差分析表明,校正模型显著性检验 P 值为 0.003,影响极为显著,偏 Eta 方为 0.999,表明回归模型误差小,拟合度极好。A、B 和 AB 的 P 值均 < 0.01 ,对抑菌率影响极显著,C 的 $P < 0.05$,对

表 8 芽枝状枝孢抑制效果主体间效应的检验

Table 8 Test of intersubjective effect of inhibition for *C.cladosporioides*

源	Ⅲ型平方和	df	均方	<i>F</i>	<i>P</i> 值	偏 Eta 方 ^a
校正模型	1330.671 ^a	5	266.134	188.955	0.005	0.998
截距	55514.452	1	55514.452	39415.281	0	1.000
A	774.211	1	774.211	549.69	0.002	0.996
B	435.125	1	435.125	308.939	0.003	0.994
AB	93.571	1	93.571	66.436	0.015	0.971
C	25.920	1	25.92	18.403	0.05	0.902
AC	1.843	1	1.843	1.309	0.371	0.396
误差	2.817	2	1.408	.		
总计	56847.940	8				
校正的总计	1333.488	7				

表 9 2-PE 和纳他霉素复配液对意大利青霉和芽枝状枝孢霉的抑菌率和抑菌率增幅

Table 9 Antimicrobial rate with mixture of 2-PE and natamycin on *Penicillium italicum* and *Cladosporium cladosporioides*

供试菌	抑菌剂(g·L ⁻¹)		抑菌率 (%)	抑菌率 增幅(%)	供试菌	抑菌剂(g·L ⁻¹)		抑菌率 (%)	抑菌率 增幅(%)
	2-PE	纳他霉素				纳他霉素	2-PE		
意大利青霉	1.0	0.0000	32.54 ± 0.65 ^f	—	芽枝状枝孢霉	0.02	0.0	38.84 ± 1.78 ^f	—
	1.0	0.0050	53.55 ± 1.02 ^d	64.57		0.02	0.2	53.55 ± 1.45 ^e	37.87
	1.0	0.0075	66.32 ± 1.11 ^{cd}	103.81		0.02	0.4	70.43 ± 1.23 ^{cd}	81.33
	1.0	0.0100	72.89 ± 0.45 ^c	124.00		0.02	0.6	90.26 ± 0.78 ^b	132.39
	1.2	0.0000	42.39 ± 0.23 ^c	—		0.04	0.0	44.02 ± 0.79 ^f	—
	1.2	0.0050	76.46 ± 1.04 ^{bc}	80.37		0.04	0.2	66.46 ± 0.67 ^d	50.98
	1.2	0.0075	81.27 ± 0.87 ^{bc}	91.72		0.04	0.4	88.31 ± 1.23 ^b	100.61
	1.2	0.0100	83.37 ± 0.98 ^b	96.67		0.04	0.6	97.37 ± 1.45 ^{ab}	121.19
	1.4	0.0000	57.28 ± 0.67 ^d	—		0.06	0.0	60.51 ± 2.07 ^{de}	—
	1.4	0.0050	89.54 ± 0.87 ^{ab}	56.32		0.06	0.2	79.54 ± 1.47 ^c	31.45
	1.4	0.0075	92.56 ± 1.45 ^{ab}	61.59		0.06	0.4	91.43 ± 0.45 ^{ab}	51.10
	1.4	0.0100	96.38 ± 1.56 ^a	68.26		0.06	0.6	100.00 ± 0.23 ^a	65.26

注：“—”为对照；同列不同小写字母表示差异显著，*P* < 0.05。

0.998,表明回归模型误差小,拟合度好。A 和 B 的 *P* < 0.01,对抑菌率影响极显著,C 的 *P* < 0.05,对结果影响显著,A 与 B 的交互作用对芽枝状枝孢霉抑菌率的影响显著(*P* < 0.05),A 和 C 的交互作用对芽枝状枝孢霉抑菌率的影响不显著(*P* > 0.05)。

2.5 2-PE 与纳他霉素的复合抑菌效应

正交试验表明 2-PE 与纳他霉素对意大利青霉和芽枝状枝孢霉的抑菌率均存在显著的交互作用(*P* < 0.05)。由于 2-PE 对意大利青霉抑菌作用较弱,通过添加少量的纳他霉素提高其抑菌活性。纳他霉素对芽枝状枝孢霉的抑菌作用较弱,通过添加少量 2-PE 的提高其抑菌活性。表 9 为不同浓度的 2-PE 和纳他霉素复配液对意大利青霉和芽枝状枝孢霉的抑菌率和抑菌率增幅。

在 2-PE 中添加纳他霉素,可明显提高对意大利青霉的抑菌率。当 2-PE 浓度为 1.0 g/L 时,无纳他霉素添加抑菌率仅为 32.54%,添加 0.005、0.0075、0.0100 g/L 的纳他霉素,抑菌率随着纳他霉素的浓度增加而明显提高,相较于对照抑菌率最高增幅达 124.00%。提高 2-PE 浓度,添加纳他霉素的抑菌增效效果有所下降,当 2-PE 为 1.4 g/L、纳他霉素为 0.0100 g/L 时,抑菌率达到了 96.38%,基本上抑制了

意大利青霉的生长,但相较于对照抑菌率增幅为 68.26%。由于单一保鲜剂 2-PE 和纳他霉素完全抑制对意大利青霉生长的浓度分别为 2.4 和 0.0150 g/L,二者的复合使用对意大利青霉抑菌有明显增效效用,即达到同一抑菌率时使用复配制剂比单独使用的用量大幅度降低。

在纳他霉素中添加 2-PE 亦可明显提高对芽枝状枝孢菌的抑菌率。当纳他霉素为 0.02 g/L 时,添加 2-PE 抑菌率增幅非常显著,最高达 132.39%,随着纳他霉素浓度的增加,其对芽枝状枝孢霉的抑菌率也升高,当纳他霉素为 0.06 g/L、2-PE 为 0.6 g/L 时,对芽枝状枝孢霉的抑菌率达到了 100.00%。而纳他霉素和 2-PE 在单独使用时,浓度分别为 0.2 和 1.4 g/L 才能完全抑制该菌的生长,因此,二者的复合具有明显的抑菌增效作用。

3 结论

2-苯乙醇、纳他霉素、壳聚糖与壳寡糖均能有效抑制柑橘致腐菌意大利青霉、指状青霉、柑橘链格孢霉和芽枝状枝孢霉的孢子萌发和菌丝生长,在相同的质量浓度下,这 4 种保鲜剂对菌丝生长的抑制效果强弱顺序为:纳他霉素 > 2-苯乙醇 > 壳聚糖 > 壳寡糖。2-PE 和纳他霉素对供试菌株均有明显抑菌

效果,对不同供试菌的抑菌效果有显著差异,而壳聚糖与壳寡糖对供试菌株的抑菌效果差异不显著。应用 SPSS 软件中的一般线性模型分析,进行保鲜剂的多因素二水平的交互作用试验,并进行主效应用和交互效应的方差分析,结果表明,影响意大利青霉和芽枝状枝孢霉抑菌率的主要因子为 2-PE 与纳他霉素,且二者均有显著交互作用。在此基础上进行 2-PE 和纳他霉素复合抑菌试验表明,二者的复合使用有显著抑菌增效作用,在相同质量浓度下抑菌效率增幅提高 60% 以上。因此,2-PE 与纳他霉素复配使用,不仅可拓宽抑菌谱,还可有效提高抑菌活性,降低抑菌剂的使用量。本研究基于对生物转化的 2-PE 及与其它生物保鲜剂的抑菌效果评价,开发其在柑桔等果蔬中的防腐保鲜功能,为果蔬保鲜提供新型、低成本生物保鲜剂,对提升果蔬的品质和食用安全性有着重要的应用价值,为开发低成本 2-PE 生物保鲜剂提供一种新的思路和方法。

参考文献

- [1] Landaniya M S. 2 - Commercial fresh citrus cultivar and producing countries; Citrus fruit [M]. San Diego: Academic Press, 2008: 13-65.
- [2] 邓雨艳, 曾凯芳. 柑橘果实采后侵染性病害防治技术研究进展[J]. 食品科技, 2008, 33(4): 211-214.
- [3] 熊亚波, 闫晓俊, 颜静, 等. 新型柑橘贮藏保鲜剂的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 284-288.
- [4] 杨永利, 张贺, 刘晓妹, 等. 芒果新病害水斑病菌对杀菌剂敏感性测定[J]. 果树学报, 2015, 32(1): 123-127.
- [5] Talibi I, Boubaker H, Boudyach E H, et al. Alternative methods for the control of postharvest citrus disease [J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(1): 1-17.
- [6] 张兰, 李节法, 陈东奎, 等. 柑桔采后病害新型生物防控保鲜剂研究进展[J]. 广西农业科技, 2016, 31(5): 59-63.
- [7] Yin S, Zhou H, Xiao X, et al. Improving 2-phenylethanol production via Ehrlich pathway using genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains [J]. Current Microbiology, 2015, 70(50): 762-767.
- [8] Kim T Y, Lee S W, Oh M K. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 61: 44-47.
- [9] 丁东栋, 崔志峰, 徐翔, 等. 生物转化法合成 2-苯乙醇的研究进展[J]. 工业微生物, 2017, 47(2): 53-60.
- [10] 苗潇潇. 玫瑰花香成分分析及其抑菌作用的初探[D]. 太原: 山西大学, 2017: 42-46.
- [11] Mo E K, Sung C K. Effect of *Pichia anomala* SKM-7 and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 dipping on storage property and sensory quality of strawberry [J]. Food Science and Biotechnology. 2005, 14: 487-492.
- [12] 刘普. 柑橘采后生防菌柠檬形克勒克酵母(34-9)产生的活性物质及其他抑菌机制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 43-52.
- [13] 方静凡. 苯乙醇对柑橘青霉及生防菌 34-9 的作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 21-25.
- [14] 宋雪健, 张东杰, 王洪江, 等. 天然生物抗菌剂纳他霉素在食品中的应用及研究进展[J]. 保鲜与加工, 2013, 17(5): 129-135.
- [15] Kallinter L D, Kostoula O K, Savvaidis I N. Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese [J]. Food Microbiology, 2013, 36(2): 176-181.
- [16] 任杰, 邱春强, 朱伟, 等. 几种主要防腐剂抑菌性和肉品保鲜的作用研究[J]. 肉类工业, 2016(7): 52-56.
- [17] 周福慧, 姜爱丽, 姬亚茹, 等. 纳他霉素对采后蓝莓果实灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 防治[J]. 食品工业科技, 2018, 39(8): 257-260.
- [18] Romero Y, Borneo R, Passalacqua N, et al. Biodegradable films obtained from triticale ($\times$ *Triticosecale* Witmack) flour activated with natamycin for cheese packaging [J]. Food Packaging & Shelf Life, 2016, 10: 54-59.
- [19] Shin J, Liu X J, Chikthimmah N, et al. Polymer surface modification using UV treatment for attachment of natamycin and the potential applications for conventional food cling wrap (LDPE) [J]. Applied Surface Science, 2016, 386: 276-284.
- [20] 李慧芸, 李蒙蒙, 余琼, 等. 纳他霉素结合壳聚糖保鲜对鲜食核桃霉变及采后生理的影响[J]. 农产品加工, 2019, 471(1): 23-26.
- [21] 叶青青, 李亚娜, 侯温甫, 等. 壳聚糖/聚赖氨酸对柑橘的保鲜性研究[J]. 包装工程, 2017, 38(17): 52-56.
- [22] 梅建凤. 利用微生物细胞生物转化合成天然 2-苯乙醇的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009: 15-39.
- [23] 黄筱萍, 刘兰, 熊大维, 等. 酵母静息细胞耦合原位分离技术连续转化 2-苯乙醇 [J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 20-24.
- [24] 刘浩强, 李鸿筠, 向可海, 等. 保鲜剂对柑橘贮藏病菌的敏感性及其贮藏保鲜效果[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 210-214.
- [25] 杨晓娟, 李春, 周晓宏. 7 种食品防腐剂对肉制品污染微生物的抑菌效果比较研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 12-16.
- [26] 龚学臣. SPSS 软件在交互效应方差分析中的应用[J]. 河北北方学院学报, 2015, 31(1): 19-22.
- [27] 叶红卫. SPSS 实现有交互作用的正交实验设计[J]. 西安文理学院学报, 2009, 12(4): 118-121.
- [28] 孙启华, 崔树玉, 李爱萍, 等. 纳他霉素防腐抑菌效果的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2005, 22(4): 435-436.
- [29] 李东, 杜连祥, 路福平. 纳他霉素的抑菌谱及最小抑菌浓度[J]. 食品工业科技, 2004(7): 143-145.
- [30] 孙远功, 呼玉侠, 冯昕. 纳他霉素在柑桔防腐保鲜中的应用[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(7): 190-192.
- [31] 李昱, 吴彩霞, 范堃建, 等. 纳他霉素对银杏果的抑菌作用及保鲜效果[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 220-225.

本刊已被知网、万方、维普、超星全文收录。