DOI:10.12441/spyswjs.20220629001 [文章编号] 1673-1689(2024)08-0020-11

汉逊德巴利酵母冻干菌剂制备条件的优化及其对草莓采后软腐病的控制

赵利娜 周娅丽 兰 晨 张晓云 张红印*

(江苏大学食品与生物工程学院,江苏 镇江 212013)

摘要:为了更好地利用拮抗酵母菌控制果蔬采后病害,实现酵母制剂的商业化,作者以拮抗酵母菌汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*,*D. hansenii*)为研究对象,使用冷冻干燥技术制备酵母制剂,并研究该制剂对草莓采后软腐病的影响。首先通过单因素试验研究冻干过程中不同保护剂在不同质量分数下对*D. hansenii*存活率的影响,随后利用响应面法优化保护剂复配方案,最后验证在最优复配方案的保护剂下*D. hansenii*冻干菌制剂在贮藏期间的存活率及其对草莓采后软腐病的控制效果。结果表明*D. hansenii*冻干菌制剂的最优保护剂方案为质量分数2.22%的海藻糖、质量分数17.83%的脱脂乳粉、质量分数0.06%的*L*-抗坏血酸和质量分数4.06%的*L*-谷氨酸钠。*D. hansenii*在最优复配方案得到的冻干菌制剂长达90 d的贮藏期内能够保持70%~80%的存活率,且该制剂对由匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*,*R. stolonifer*)引起的草莓采后软腐病具有良好的控制效果。

关键词:汉逊德巴利酵母;保护剂;冷冻干燥;草莓;软腐病

Optimization of Preparation Conditions of Lyophilized *Debaryomyces hansenii* Yeast Formulation and Its Control on Postharvest Soft Rot of Strawberry

*ZHAO Li'na ZHOU Yali LAN Chen ZHANG Xiaoyun ZHANG Hongyin**

(School of Food Science and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: The successful use of antagonistic yeasts to control postharvest diseases of fruits and vegetables relies on commercializing yeast preparations. Antagonistic yeast, namely *Debaryomyces hansenii* (*D. hansenii*) was used as the research object to analyze the effect of its freeze-dried formulation on the postharvest soft rot of strawberry. Firstly, the impact of different protective agents at different concentrations on the survival rate of *D. hansenii* in freeze-drying process was examined by a single-factor test. Then, the response surface methodology was used to optimize the protectant regimen. Finally, the survival rate of freeze-dried *D. hansenii* preparation during storage and its control effect on postharvest soft rot of strawberry was verified under the optimal protectant regimen. The study exposed that the optimal protectant regimen for freeze-drying of *D. hansenii* preparation was 2.22% alginate, 17.83% skimmed milk powder, 0.06% *L*-ascorbic acid and 4.06% sodium *L*-glutamine. *D. hansenii* in he freeze-dried formulation obtained by the optimal protectant regimen maintained a high survival rate of 70%~80% during prolonged storage of 90 d, and this formulation effectively controlled the postharvest soft rot of strawberry caused by *Rhizopus stolonifer* (*R. stolonifer*).

Keywords: *Debaryomyces hansenii*; protectant;freeze drying; strawberry; soft rot

基金项目:国家自然科学基金项目(32372401,32072276);山东省博士后创新项目(SDCX-ZG-2023-03053)。

通信作者:张红印(1972—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品微生物研究。E-mail:zhanghongyin126@126.com

收稿日期:2022-06-29 **修回日期:**2022-10-07

草莓是多年生草本植物，其果实鲜美多汁，色泽红润诱人，具有令人愉悦的特殊水果芳香。草莓是各类植物化学物质（鞣花酸、花青素、槲皮素、儿茶素等）、维生素（抗坏血酸、叶酸等）和矿物质（铁、锌、钾等）的食物来源[1-2]，同时草莓在多酚和抗氧化能力来源的食物中排名也很高[3]，受到了消费者的广泛喜爱[4]。近年来，随着草莓种植管理技术的不断发展，草莓也成为促进农民增收和中国农业发展的重要种植水果之一。目前，亚洲已成为草莓生产的世界中心[5]，2018年中国草莓产量为296.43万t，比2009年增长了63.47%[6]。但草莓组织娇嫩、果肉软、果皮薄，采摘后在贮藏、运输和销售过程中极易受到机械损伤和不良环境的影响，导致草莓表皮结构受破坏，为病原真菌侵染创造了机会，最终造成草莓的采后真菌性病害。在此类病害引起的草莓腐烂变质中，由匍枝根霉引起的软腐病害尤为严重[7]。草莓采后软腐病的发生降低了草莓的果实品质和经济价值，并对人体健康构成了严重威胁[8]，因此有必要对草莓采后软腐病进行防控。

控制草莓采后病害的传统方法包括化学方法和物理方法。化学杀菌剂虽然抑菌效果好、成本低、经济效益高，但是会引起耐药性、增加农药残留，严重威胁人类健康并破坏生态平衡[9]。物理方法因较高的设备要求和成本大大限制了其在实际生产中的应用[10]。随着绿色农业和“大健康”的理念日渐深入人心，在果蔬采后病害防治领域开发高效、安全及对环境友好的新技术日渐成为当前国际上的研究热点[11]。其中生物防治法是目前最安全、有效的方法，该方法是指利用微生物之间的拮抗作用选用对寄主无害且能明显抑制病原菌生长的拮抗微生物来防治病害的发生[12]。迄今为止，国内外已经筛选出了多种对果蔬采后病原真菌具有明显抑制效果的细菌、霉菌和酵母菌，其中拮抗酵母菌由于拮抗效果好[13]、不产生真菌毒素和抗生素[14]、遗传稳定[15]、环境适应性强及对环境友好[16]等优势成为果蔬采后病害防治的新手段。酵母菌在我国并没有商业化应用，因此当前的首要任务就是研制出拮抗酵母制剂，这样才能更广泛地利用拮抗酵母，加快酵母制剂的商业化进程。

冷冻干燥又称升华干燥，是将物料冷冻至水的冰点以下，同时将其置于高真空的容器中，通过供热使物料中的水分直接从固态升华为气态的一种干燥方法[17]。与其他微生物的干燥方法相比，真空冷冻干燥具有如下优势：使用对象广，包括酵母菌、细菌、大多数丝状真菌以及病毒；微生物存活率高，保藏期长；可避免微生物在保藏期间被杂菌污染；冻干产物便于运输，易实现微生物的商业化生产[18]。但微生物在被冻干时细胞暴露在额外应激压力下，胞内冰晶和再结晶等的形成也会引起细胞膜损伤，造成部分微生物死亡[19-20]。研究发现，在微生物冻干过程中添加保护剂能改变其冻干环境，减少微生物在该过程中的损伤，尽可能保持其原有生物活性[21]。常见的冻干保护剂包括糖类、蛋白质类、抗氧化剂类、氨基酸类等。现阶段拮抗菌在果蔬采后病害生物防治领域的商业化应用研究主要集中于拮抗细菌，而关于拮抗酵母菌的报道相对较少。

以前期筛选到的对草莓采后软腐病具有良好控制效果的汉逊德巴利酵母菌为研究对象，在单因素试验的基础上，通过响应面法优化*D. hansenii*冻干菌制剂的保护剂复配方案，并验证在最优保护剂复配方案下*D. hansenii*在贮藏期间的存活率及其对由*R. stolonifer*引起的草莓采后软腐病的控制效果，为拮抗酵母控制果蔬采后病害的商业化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

草莓：江苏省镇江市的本土品种‘红颜’。清晨从镇江农副产品批发市场挑选无病虫害和机械损伤，并且商业成熟度和大小基本一致的草莓果实，迅速将其转移至实验室备用。草莓不进行任何清洗和消毒处理，直接用于后续试验。

海藻糖：南京草本源生物科技有限公司；脱脂乳粉：内蒙古伊利实业集团股份有限公司；*L*-抗坏血酸和*L*-谷氨酸钠：国药集团化学试剂有限公司。

D. hansenii：作者所在实验室筛选的一株对草莓采后软腐病具有良好控制效果的酵母菌[22]，菌株保存在中国典型培养物保藏中心，保藏编号为CCTCCM2021610 Y3；*R. stolonifer*：作者所在实验室筛选并鉴定的能够引起草莓软腐病的病原菌。

NYDB培养基：酵母浸膏5 g，牛肉浸膏8 g，葡萄糖10 g，蒸馏水定容至1 L。PDA培养基：200 g去皮后的土豆煮沸20 min，纱布过滤后留滤液，葡

葡萄糖 20 g，琼脂 20 g，蒸馏水定容至 1 L。培养基灭菌条件为 115 ℃灭菌 20 min。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机：TGL-20M 型，美国 Beckman Coulter 公司；冷冻干燥机：xianou-12N 型，南京先欧仪器制造有限公司；全自动高压灭菌锅：GR85DR 型，厦门致微仪器有限公司；超净工作台：SW-CJ-2FD 型，苏州净化设备有限公司；生化培养箱：LRH-250 型，宁波科晟实验仪器有限公司；光学显微镜：WYS-CX23 型，上海缔伦光学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 不同保护剂对 *D. hansenii* 存活率的影响

选择不同质量分数的海藻糖（1.00%、1.50%、2.00%、2.50%、3.00%）、脱脂乳粉（10.00%、12.50%、15.00%、17.50%、20.00%）、*L*-抗坏血酸（0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.10%）和 *L*-谷氨酸钠（3.00%、3.50%、4.00%、4.50%、5.00%）溶液作为酵母冻干过程中的保护剂。将不同质量分数的保护剂与 *D. hansenii* 菌悬液按体积比 1∶1 混合均匀。将混合后的溶液倒入 50 mL 无菌离心管中，用封口膜密封后冻干。冻干过程如下：与保护剂混匀的 *D. hansenii* 在 −80 ℃条件下预冻 2 h，同时预冷冻干机，冷阱的温度达到 −40 ℃以下时放入样品，打开真空泵，使干燥过程中的真空度值小于 20 Pa，冻干 24 h 后测定不同质量分数的保护剂对 *D. hansenii* 存活率的影响。*D. hansenii* 冻干存活率按公式（1）计算。

$$R = Y_1/Y_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中：

R——*D. hansenii* 存活率，%；

Y_1——冻干后的 *D. hansenii* 活菌数，CFU/g；

Y_2——冻干前的 *D. hansenii* 活菌数，CFU/g。

1.3.2 响应面交互分析 *D. hansenii* 冻干菌制剂的最优保护剂复配方案

根据单因素试验结果，以海藻糖质量分数（*A*）、脱脂乳粉质量分数（*B*）、*L*-抗坏血酸质量分数（*C*）、*L*-谷氨酸钠质量分数（*D*）为影响因素，以 *D. hansenii* 存活率为响应值，使用统计分析软件 Design-Expert 8.0.6、利用响应面中的 Box-Behnken Design 方法设计保护剂复配方案，得到 *D. hansenii* 冻干菌制剂的最优复配方案。

1.3.3 *D. hansenii* 在冻干菌制剂贮藏期间的存活率

根据响应面交互分析得到的最优保护剂复配方案制备 *D. hansenii* 冻干菌制剂，分别在该制剂贮藏期的第 0、15、30、45、60、75、90 天测定该制剂的 *D. hansenii* 存活率。

1.3.4 *D. hansenii* 冻干菌制剂在贮藏期间对草莓采后软腐病的控制效果

将 *D. hansenii* 冻干菌制剂在 NYDB 培养基中于 28 ℃、180 r/min 条件下活化两次，活化完成后将菌株发酵液于 4 ℃、7 000 *g* 下离心 5 min 后弃去培养基，并用无菌生理盐水在相同离心条件下清洗 2 次，随后用无菌生理盐水调整为 1×10^8 CFU/mL 的酵母菌悬液备用。将挑选好的草莓置于干净塑料筐中备用，用无菌打孔器在草莓赤道部位打 1 个直径 3 mm、深 3 mm 的伤口，加入 30 μL 酵母菌悬液至伤口处，加入等体积的无菌生理盐水作为空白对照。处理后的草莓待自然晾干后接种 30 μL、1×10^4 个/mL 的 *R. stolonifer* 孢子菌悬液（PDA 培养基培养 3 d 后加入无菌水收集的孢子菌悬液），自然晾干后密封。试验包括 18 个草莓、3 组平行，每个试验重复 2 次。将试验草莓置于 20 ℃恒温恒湿培养箱中培养 3 d，记录草莓采后软腐病发病率，以评价酵母制剂对草莓采后软腐病的控制效果。分别在该制剂贮藏期的第 0、30、60、90 天测定其对草莓采后软腐病的控制效果。草莓采后软腐病发病率按公式（2）计算。

$$M = M_1/M_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中：

M——发病率，%；

M_1——发病的草莓果实数，个；

M_2——草莓果实总数，个。

1.4 数据统计与分析

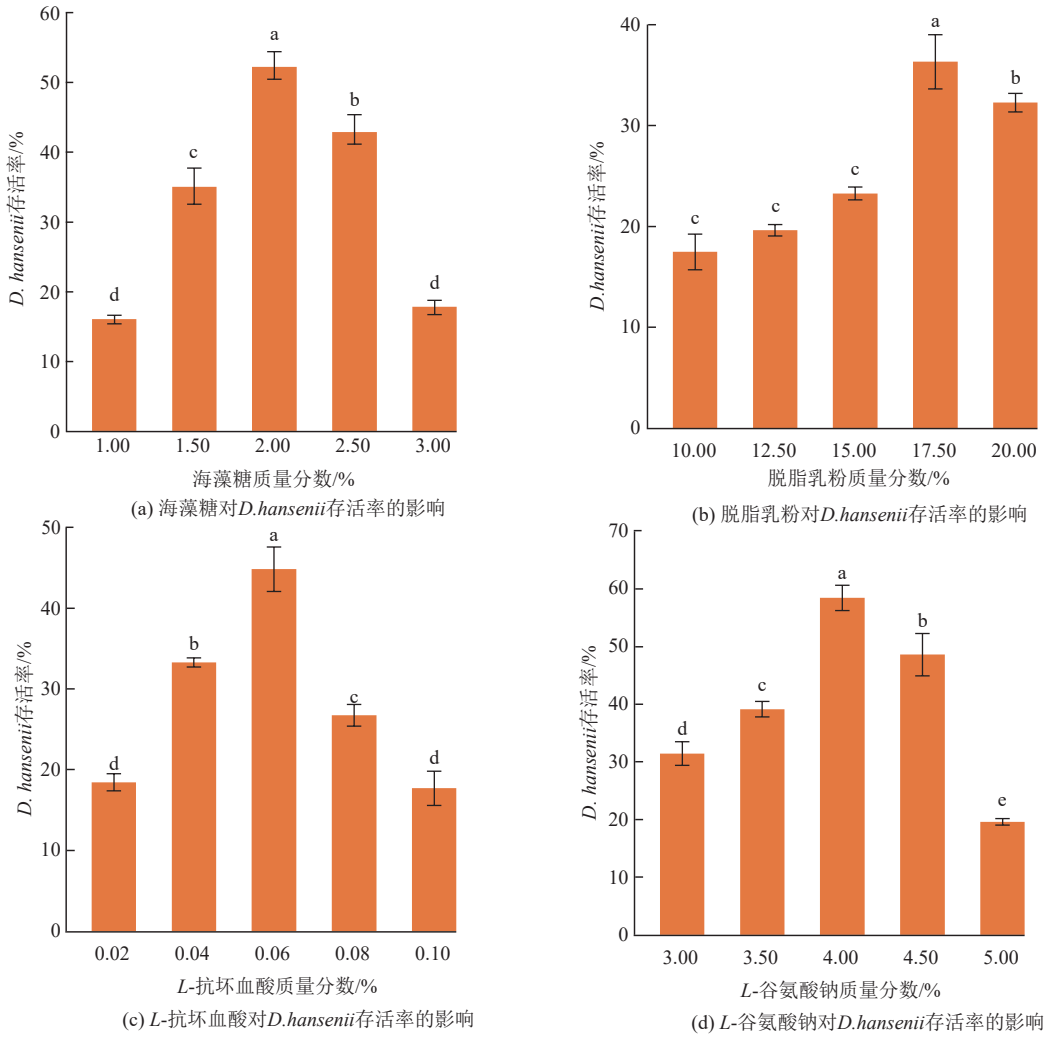
采用 GraphPad Prism 8.0.2 和 IBM SPASS Statistics 26 处理数据，数据通过独立 *t* 检验及 Duncan 多重比较进行方差分析，$P<0.05$ 表明数据间存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 不同保护剂对 *D. hansenii* 存活率的影响

图 1 为不同保护剂对 *D. hansenii* 存活率的影响。当海藻糖质量分数为 2.00% 时，*D. hansenii*

存活率最高；显示当脱脂乳粉质量分数为17.50%时，*D. hansenii*存活率最高；当*L*-抗坏血酸质量分数为0.06%时，*D. hansenii*存活率最高；当*L*-谷氨酸钠质量分数为4.00%，*D. hansenii*存活率最高。



(a) 海藻糖对*D.hansenii*存活率的影响　(b) 脱脂乳粉对*D.hansenii*存活率的影响

(c) *L*-抗坏血酸对*D.hansenii*存活率的影响　(d) *L*-谷氨酸钠对*D.hansenii*存活率的影响

不同小写字母代表不同处理组间差异显著（$P<0.05$）。

图1　不同保护剂对*D.hansenii*存活率的影响

Fig. 1　Effect of different alginate on the survival rate of freeze-dried *D.hansenii*

海藻糖作为冻干保护剂时，微生物细胞的冰晶形成速度要远低于其他糖类，并且能在不利条件下通过自身作用形成一种特殊的细胞表面保护膜，同时还具有良好的玻璃化转变温度，因此能减少细胞在冻干过程中的损伤[23-25]。王宪斌等[26]通过试验发现质量分数5%的海藻糖与其他保护剂复配可作为异常威克汉姆酵母（*Wickerhamomyces anomalus*）冻干的最佳复配保护剂。脱脂乳粉是一种常见的大分子胞外保护剂，其含有的蛋白质、糖类等物质可以保护细胞，减少细胞与介质的接触面积，通过防止由细胞壁损伤引起的胞内物质渗漏来发挥其保护作用[27]。王磊[28]通过研究发现以质量分数10%脱脂乳为主的冻干保护剂可以使嗜酸乳杆菌的存活率达到98%。*L*-抗坏血酸可以预防对菌种有害的氨基和羰基反应或氧化作用，保持冻干细胞活性，从而提高菌体细胞冻干存活率。周莉等[29]发现抗坏血酸是影响嗜热链球菌菌体存活率的因素之一，通过正交试验发现质量分数0.6%的抗坏血酸是复合冻干保护剂最佳配方成分之一。*L*-谷氨酸钠中的氨基和羧基能对微生物起保护作用，在干燥过程中能与水密切作用，使冻干菌粉保留适量的水分以满足微生物维持生命的最低需求。此外，*L*-谷氨酸钠

具有抗氧化作用，可以抑制三酰甘油的氧化和自由基的形成，以防止冻干对细胞膜造成不可逆转的破坏。杨玲等[30]发现质量分数0.6%的谷氨酸钠可以作为保护剂来优化两歧双歧杆菌TMC3115冻干菌粉的生产工艺。但单一保护剂的保护作用和效果比较有限[31]，因此研究复配保护剂对微生物冻干存活率的影响很有必要。

2.2 响应面交互分析优化 *D. hansenii* 冻干菌制剂的复配方案

根据响应面设计方案，利用软件Design-Expert 8.0.6设计出的保护剂复配方案及最终试验得到*D. hansenii*的存活率，结果见表1。

运用软件Design-Expert 8.0.6，以海藻糖溶液质量分数（*A*），脱脂乳溶液质量分数（*B*），*L*-抗坏血酸溶液质量分数（*C*），*L*-谷氨酸钠溶液质量分数（*D*）为因素，以*D. hansenii*存活率（*Y*）为响应指标进行回归拟合，得到二次多项回归方程：

$$Y=91.92+3.84A+1.27B+0.84C+0.22D-0.45AB+1.05AC+1.63AD+0.05BC-0.2BD+0.025CD-4.77A^2-3.98B^2-2.75C^2-4.03D^2。$$

由表2中回归模型的各项方差分析可知：回归模型的F值为8.26，P值为0.000 2，$P<0.05$，表示该回归模型达到显著水平，同时失拟项P值为0.195 3，$P>0.05$，代表失拟不显著，表明误差对试验

表1 响应面设计方案及试验结果

Table 1 Response surface design scheme and test results

单位：%

试验序号	海藻糖质量分数	脱脂乳粉质量分数	*L*-抗坏血酸质量分数	*L*-谷氨酸钠质量分数	*D. hansenii*存活率
1	2.00	17.50	0.06	4.00	91.24
2	2.00	17.50	0.04	3.50	82.51
3	2.00	15.00	0.06	3.50	83.33
4	2.50	17.50	0.04	4.00	87.81
5	1.50	17.50	0.08	4.00	80.08
6	2.00	17.50	0.08	4.50	86.62
7	2.00	17.50	0.08	3.50	84.67
8	2.00	20.00	0.06	4.50	85.32
9	2.50	20.00	0.06	4.00	86.44
10	2.00	20.00	0.06	3.50	85.62
11	2.00	20.00	0.04	4.00	85.13
12	2.00	17.50	0.06	4.00	93.12
13	1.50	15.00	0.06	4.00	77.78
14	2.00	15.00	0.04	4.00	80.41
15	1.50	17.50	0.06	4.50	76.26
16	1.50	20.00	0.06	4.00	79.62
17	2.50	15.00	0.06	4.00	86.41
18	2.50	17.50	0.06	3.50	86.71
19	2.00	17.50	0.06	4.00	91.63
20	2.00	17.50	0.04	4.50	84.26
21	2.00	17.50	0.06	4.00	90.12
22	2.00	15.00	0.08	4.00	85.23
23	2.50	17.50	0.06	4.50	89.31
24	1.50	17.50	0.04	4.00	84.33
25	2.00	20.00	0.08	4.00	90.12
26	1.50	17.50	0.06	3.50	80.17
27	2.00	15.00	0.06	4.50	83.77
28	2.50	17.50	0.08	4.00	87.82
29	2.00	17.50	0.06	4.00	93.61

影响不显著。此外该模型的决定系数R^2=0.892，表明该模型能够说明89.2%的响应面值变化，代表该回归模型与试验数据拟合程度高，可用于*D. hansenii*冻干菌制剂的保护剂复配方案的预测和分析。显著性检验表明，海藻糖对*D. hansenii*存活率的影响为极显著（P<0.000 1），而脱脂乳粉、*L*-抗坏血酸、*L*-谷氨酸钠对*D. hansenii*存活率的影响不显著。同时海藻糖、脱脂乳粉、*L*-抗坏血酸和*L*-谷氨酸钠每两种因素间的交互作用对*D. hansenii*存活率的影响均不显著。

表2　响应面回归模型的方差分析

Table 2　ANOVA for response surface regression models

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	488.10	14	34.86	8.26	0.000 2	显著
A	177.10	1	77.10	41.94	<0.000 1	
B	9.25	1	19.25	4.56	0.050 9	
C	8.50	1	8.50	2.01	0.177 8	
D	0.56	1	0.56	0.13	0.720 4	
AB	0.81	1	0.81	0.19	0.668 1	
AC	4.41	1	4.41	1.04	0.324 2	
AD	10.56	1	10.56	2.50	0.136 1	
BC	0.01	1	0.01	2.37×10^{-3}	0.961 9	
BD	0.16	1	0.16	0.038	0.848 5	
CD	2.50×10^{-3}	1	2.50×10^{-3}	5.92×10^{-4}	0.980 9	
A^2	147.74	1	147.74	34.98	<0.000 1	
B^2	103.01	1	103.01	24.39	0.000 2	
C^2	48.96	1	48.96	11.59	0.004 3	
D^2	105.61	1	105.61	25.01	0.000 2	
残差	59.12	14	4.22			
失拟项	50.97	10	5.10	2.50	0.195 3	不显著
纯误差	8.15	4	2.04			
总和	547.23	8				

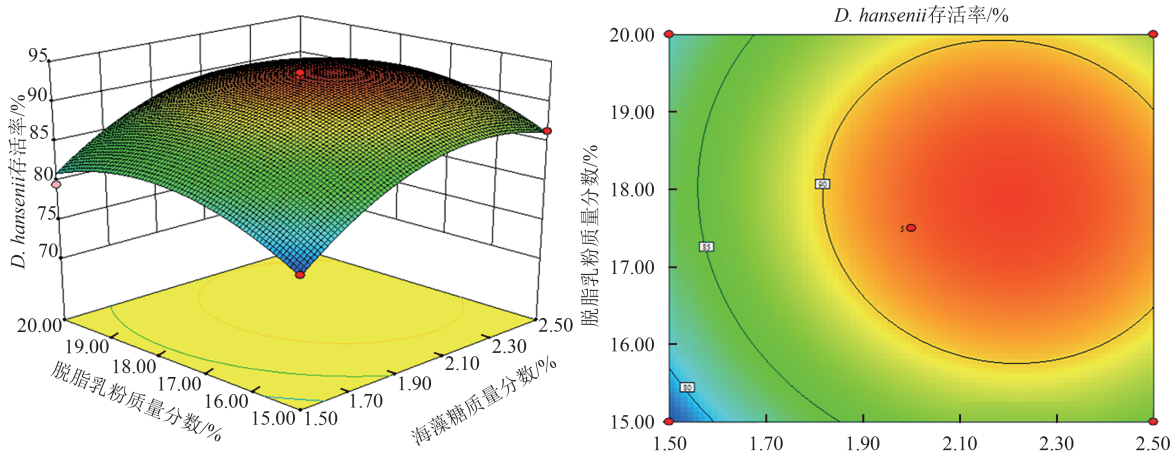
通过响应面分析得到*D. hansenii*冻干最优保护剂复配方案为质量分数2.22%的海藻糖、质量分数17.83%的脱脂乳粉、质量分数0.06%的*L*-抗坏血酸和质量分数4.06%的*L*-谷氨酸钠，在该方案下预测得到的*D. hansenii*存活率为92.97%。验证试验中，最优复配方案下的酵母存活率为94.05%，与预测值之间的偏差较小，表明通过该响应面模型下分析得出的预测值是可靠的。

2.3　响应面交互分析不同保护剂对*D. hansenii*存活率的影响

等高线的形状能反映不同因素间交互效应的强弱，图中圆形的离心率越大代表两个因素交互作用越显著[32-33]。图2~7分别为海藻糖和脱脂乳粉、海藻糖和*L*-抗坏血酸、海藻糖和*L*-谷氨酸钠、脱脂乳粉和*L*-抗坏血酸、脱脂乳粉和*L*-谷氨酸钠及*L*-抗坏血酸和*L*-谷氨酸钠的交互作用对*D. hansenii*存活率的影响。结果显示，凡是与海藻糖交互的因素得到的等高线图离心率都较大，且大于与脱脂乳粉交互分析得到的等高线离心率。此外，*L*-抗坏血酸和*L*-谷氨酸钠交互作用得到的等高线图离心率也较大。以上分析结果表明，海藻糖在*D. hansenii*冻干过程中能起到的作用要优于其他保护剂，可在*D. hansenii*的商业化应用中作为优先选择的保护剂种类。

2.4　*D. hansenii*在冻干菌制剂贮藏期间的存活率

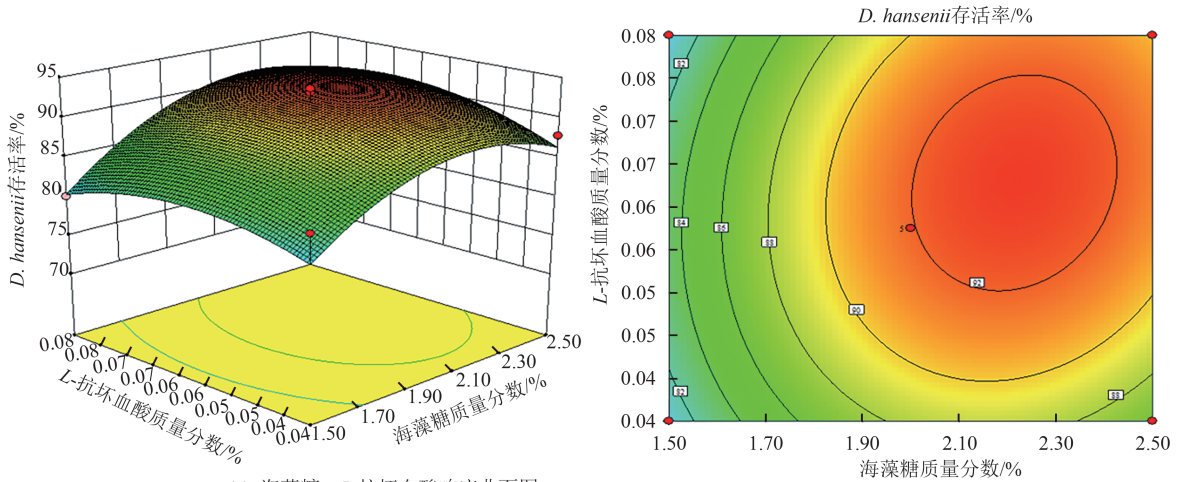
按照响应面分析得到的最优保护剂复配方案制备*D. hansenii*冻干菌制剂样品，图8为*D. hansenii*在冻干菌制剂贮藏期间的存活率。由图8可知第0天的酵母存活率为94.05%，与预测值非常接近，说明响应面法分析所得的最优保护剂复配方案可靠，可为*D. hansenii*的商业化应用提供数据参考。此外，虽然*D. hansenii*的存活率



(a) 海藻糖、脱脂乳粉响应曲面图　(b) 海藻糖、脱脂乳粉等高线

图 2　海藻糖和脱脂乳粉交互作用的响应面和等高线

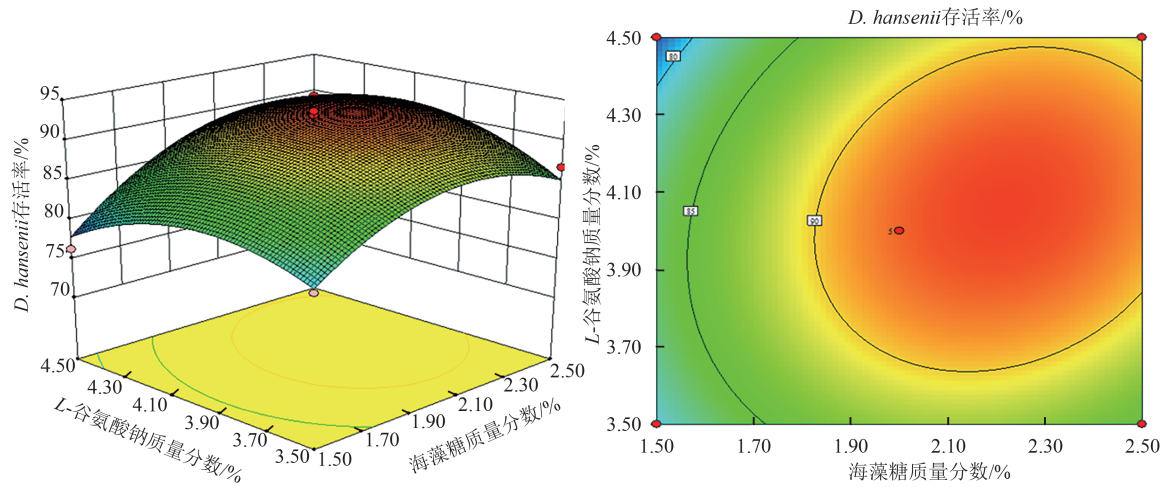
Fig. 2　Response surfaces and contours of the interaction between trehalose and skim milk powder



(a) 海藻糖、*L*-抗坏血酸响应曲面图　(b) 海藻糖、*L*-抗坏血酸等高线

图 3　海藻糖和*L*-抗坏血酸交互作用的响应面和等高线

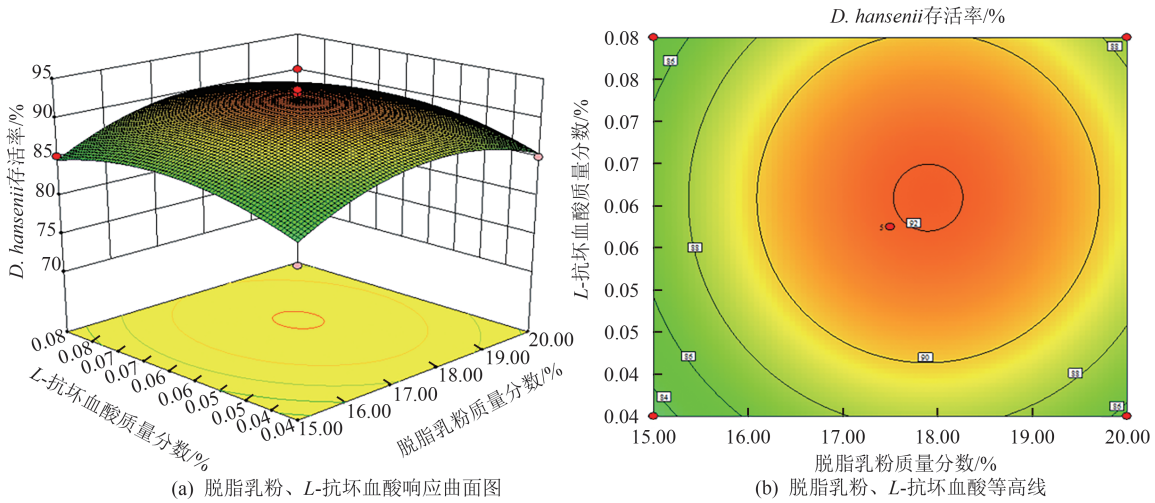
Fig. 3　Response surfaces and contours of the interaction between trehalose and *L*-ascorbic acid



(a) 海藻糖、*L*-谷氨酸钠响应曲面图　(b) 海藻糖、*L*-谷氨酸钠等高线

图 4　海藻糖和*L*-谷氨酸钠交互作用的响应面和等高线

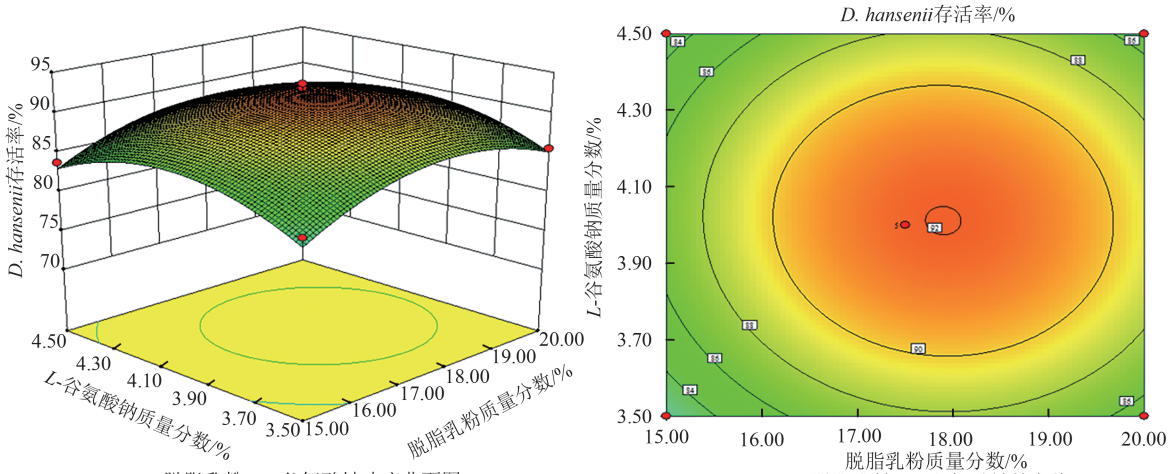
Fig. 4　Response surface and contour lines of the interaction between trehalose and sodium *L*-glutamate



(a) 脱脂乳粉、*L*-抗坏血酸响应曲面图　(b) 脱脂乳粉、*L*-抗坏血酸等高线

图 5　脱脂乳粉和*L*-抗坏血酸交互作用的响应面和等高线

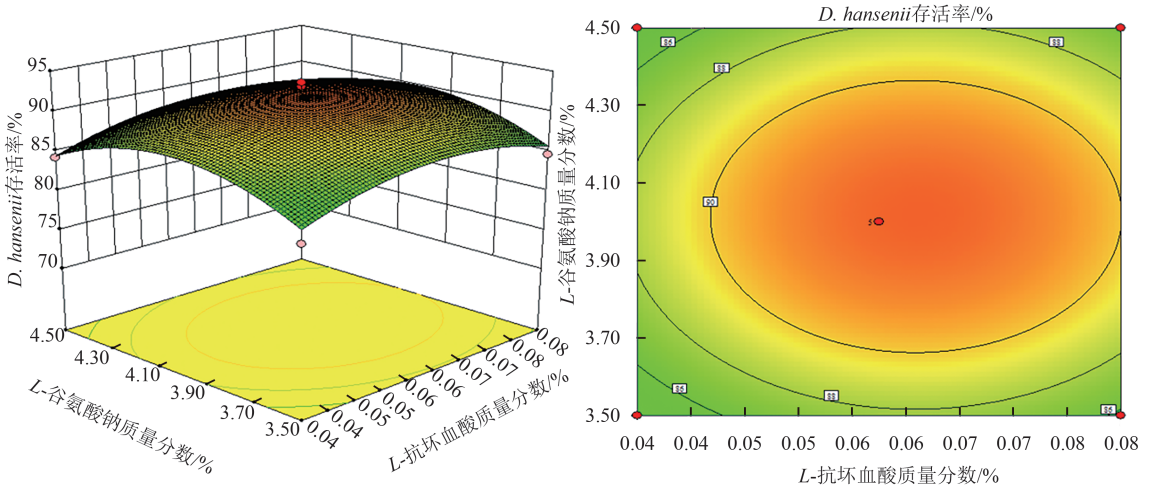
Fig. 5　Response surfaces and contours of the interaction between skim milk powder and *L*-ascorbic acid



(a) 脱脂乳粉、*L*-谷氨酸钠响应曲面图　(b) 脱脂乳粉、*L*-谷氨酸钠等高线

图 6　脱脂乳粉和*L*-谷氨酸钠交互作用的响应面和等高线

Fig. 6　Response surfaces and contours of the interaction between skim milk powder and sodium *L*-glutamate

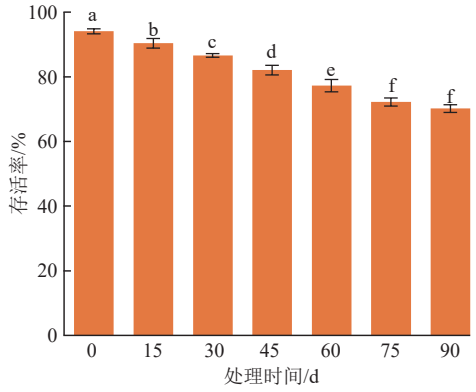


(a) *L*-抗坏血酸、*L*-谷氨酸钠响应曲面图　(b) *L*-抗坏血酸、*L*-谷氨酸钠等高线

图 7　*L*-抗坏血酸和*L*-谷氨酸钠交互作用的响应面和等高线

Fig. 7　Response surfaces and contours of the interaction between *L*-ascorbic acid and sodium *L*-glutamate

呈现显著下降的趋势，但到第90天时仍然可以保持在70%~80%。



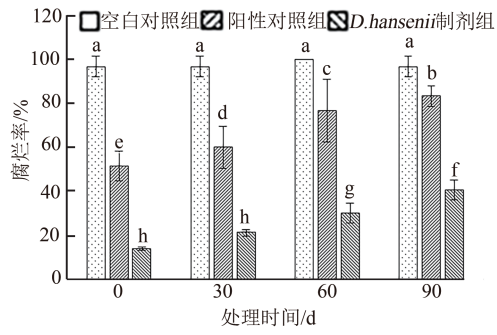
不同小写字母代表差异显著。

图8 *D. hansenii*在冻干菌制剂贮藏期间的存活率

Fig. 8 Survival rate of *D. hansenii* in freeze-dried formulation during storage

2.5 *D. hansenii*冻干菌制剂在贮藏期间对草莓采后软腐病的控制效果

为了验证*D. hansenii*冻干菌制剂对草莓采后软腐病的生防效力，每隔30 d测定其对草莓采后软腐病发病率的影响。结果如图9所示，随着贮藏期的延长，保护剂冻干粉的阳性对照组和*D. hansenii*制剂组的草莓果实腐烂率均呈显著上升趋势。值得注意的是，*D. hansenii*制剂组的腐烂率显著低于阳性对照组和空白对照组。上述结果表明，按照保护剂最优复配方案得到的*D. hansenii*冻干菌制剂对由*R. stolonifer*引起的草莓采后软腐病有很好的控制效果，虽然随着贮藏期的延长其生防效力有所下降，但腐烂率依旧显著低于空白对照组，说明*D. hansenii*冻干菌制剂的保护剂复配方案可靠。



不同小写字母代表差异显著。

图9 *D. hansenii*制剂在贮藏期间对草莓采后软腐病的控制效果

Fig. 9 Control effect of *D. hansenii* formulation on postharvest soft rot of strawberry during storage

3 结论

用响应面法分析了*D. hansenii*冻干菌制剂的保护剂最优复配方案，质量分数2.22%的海藻糖、质量分数17.83%的脱脂乳粉、质量分数0.06%的*L*-抗坏血酸和质量分数4.06%的*L*-谷氨酸钠。最优复配方案得到的*D. hansenii*冻干菌制剂在较长贮藏期内能够保持较高的存活率，并对草莓采后软腐病具有良好的控制效果。该研究为拮抗酵母控制果蔬采后病害的商业化应用提供理论依据，具有一定的研究价值及实际应用意义。

参考文献

[1] 李亚辉，马艳弘，张宏志，等. 草莓发酵酒澄清稳定处理技术[J]. 食品与生物技术学报，2016，35(8)：864-870.
LI Y H，MA Y H，ZHANG H Z，et al. Study on the technology for clarification and stabilization of strawberry wine[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2016，35(8)：864-870.(in Chinese)

[2] GIAMPIERI F，ALVAREZ-SUAREZ J M，BATTINO M. Strawberry and human health：effects beyond antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2014，62(18)：3867-3876.

[3] BASU A，NGUYEN A，BETTS N M，et al. Strawberry as a functional food：an evidence-based review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2014，54(6)：790-806.

[4] 邓明琴，雷家军. 中国果树志·草莓卷[M]. 北京：中国林业出版社，2005.

[5] 张运涛，雷家军，赵密珍，等. 新中国果树科学研究70年：草莓[J]. 果树学报，2019，36(10)：1441-1452.
ZHANG Y T，LEI J J，ZHAO M Z，et al. Fruit scientific research in NEW China in the past 70 years：strawberry[J]. Journal of Fruit Science，2019，36(10)：1441-1452.(in Chinese)

[6] 王鸣谦，薛莉，赵珺，等. 世界草莓生产及贸易现状[J]. 中国果树，2021，(2)：104-108.(in Chinese)
WANG M Q，XUE L，ZHAO J，et al. Present situation of strawberry production and trade in the world[J]. China Fruits，2021，(2)：104-108.(in Chinese)

[7] 杨书珍，柳丽梅，彭丽桃，等. 草莓采后真菌病害控制研究进展[J]. 华中农业大学学报，2012，31(1)：127-132.
YANG S Z，LIU L M，PENG L T，et al. Advances in controlling of pathogenic fungi infections in post-harvest strawberry [J]. Journal of Huazhong Agricultural University，2012，31(1)，127-132.(in Chinese)

[8] 赵亮. 草莓病虫害综合防治技术初探[J]. 现代农村科

技，2018，(9)：31-32.
ZHAO L. Preliminary study on integrated control technology of strawberry diseases and insect pests[J]. Modern Rural Science and Technology，2018，(9)：31-32 (in Chinese).
[9] 冯国明. 草莓常见病害的防治措施[J]. 山西果树，2010，(2)：52-53.
FENG G M. The control measures of common diseases of strawberry[J]. Shanxi Fruit Tree，2010，(2)：52-53.(in Chinese)
[10] TIAN S P，QIN G Z，LI B Q，et al. Effects of salicylic acid on disease resistance and postharvest decay control of fruits[J]. Stewart Postharvest Review，2007，3(6)：1-7.
[11] Millan F A，LARRAYA L，FARRAN I，et al. Successful biocontrol of major postharvest and soil-borne plant pathogenic fungi by antagonistic yeasts[J]. Biological Control，2021，160：104683.
[12] ALEAHMAD P，EBRAHIMI L. Biological control method of postharvest fungal diseases of apple[J]. Plant Pathology Science，2020，9(2)：95-107.
[13] AL-RAHBI B A A，AL-SADI A M，AL-MAHMOOLI I H，et al. *Meyerozyma guilliermondii* SQUCC-33Y suppresses postharvest fruit rot of strawberry caused by *Alternaria alternata*[J]. Australasian Plant Pathology，2021，50(3)：349-352.
[14] BU S W，MUNIR S，HE P F，et al. *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*[J]. Biological Control，2021，157：104568.
[15] CUNHA T，FERRAZ L P，SILVEIRA SOUSA G，et al. The action of yeast strains as biocontrol agents against *Penicillium digitatum* in Lima sweet oranges[J]. Citrus Research & Technology，2020，41：e1054.
[16] YU L L，QIAO N Z，ZHAO J X，et al. Postharvest control of *Penicillium expansum* in fruits：A review[J]. Food Bioscience，2020，36：100633.
[17] 孔凡真. 真空冷冻干燥食品的技术与设备[J]. 山西食品工业，2005，(3)：26-28，37.
KONG F Z. The technology and equipment of vacuum freeze-drying food[J]. Shanxi Food Industry，2005，(3)：26-28，37.(in Chinese)
[18] 李华，骆艳娥，刘延琳. 真空冷冻干燥微生物的研究进展[J]. 微生物学通报，2002，29(3)：78-82.
LI H，LUO Y E，LIU Y L. Research progress of vacuum freeze-drying microorganisms[J]. Bulletin of Microbiology，2002，29(3)：78-82.(in Chinese)
[19] 刘建丽，郭丽娜，张充，等. 嗜酸乳杆菌NX2-6冻干发酵剂的研究[J]. 食品工业科技，2014，35(23)：154-157.
LIU J L，GUO L N，ZHANG C，et al. Study on freeze-drying protective agents formula of *Lactobacillus acidophilus* NX2-6[J]. Science and Technology of Food Industry，2014，35(23)：154-157.(in Chinese)
[20] 李宝磊. 真空冷冻干燥对乳酸菌损伤机制及关键保护技术研究[D]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学，2011.
[21] 田文静，王俊国，宋娇娇，等. 适宜冷冻干燥保护剂提高植物乳杆菌LIP-1微胶囊性能[J]. 农业工程学报，2015，31(21)：285-294.
TIAN W J，WANG J G，SONG J J，et al. Proper cryoprotectants improving properties of *L. plantarum* LIP-1 microcapsules[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering，2015，31(21)：285-294.(in Chinese)
[22] 赵利娜，兰晨，张红印，等. 汉逊德巴利酵母Y3进行草莓果实采后软腐病的生物防治及草莓果实贮藏保鲜的方法：202110717456.X[P]. 2021-6-28.
[23] MCGANN L E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents[J]. Cryobiology，1978，15(4)：382-390.
[24] PETRENKO Y A，ROGULSKA O Y，MUTSENKO V V，et al. A sugar pretreatment as a new approach to the Me_2SO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells[J]. Cryo Letters，2014，35(3)：239-246.
[25] 赵志华，岳田利，王燕妮，等. 海藻糖的生物学机制在酿酒活性干酵母(AADY)中的应用[J]. 食品研究与开发，2006，27(11)：180-184.
ZHAO Z H，YUE T L，WANG Y N，et al. The biochemical mechanism of trehalose and its application in alcohol active dry yeast(AADY)[J]. Food Research and Development，2006，27(11)：180-184.(in Chinese)
[26] 王宪斌，冯霞，张蓓蓓，等. 一株生香酵母冻干菌剂的制备研究[J]. 食品与发酵科技，2019，55(6)：9-12.
WANG X B，FENG X，ZHANG B B，et al. Study on the freeze-drying microbial agent preparation of an aroma-producing yeast[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology，2019，55(6)：9-12.(in Chinese)
[27] 郑勇. 豆酸奶适制性菌株生物学特性及其高密度培养与冻干保护剂研究[D]. 广州：华南农业大学，2019.
[28] 王磊. 嗜酸乳杆菌高密度培养及冻干保护剂的研究[D]. 西安：陕西科技大学，2011.
[29] 周莉，张亚勋，章建军，等. 冻干益生菌微胶囊保护剂及抗性研究[J]. 中国饲料，2021，(17)：34-38.
ZHOU L，ZHANG Y X，ZHANG J J，et al. Effect of microencapsulation on freeze-dried probiotics on stress resistance[J]. Chian Feed，2021，(17)：34-38.(in Chinese)
[30] 杨玲，张栋，齐世华，等. 两歧双歧杆菌TMC3115冻干菌

粉生产工艺优化[J]. 乳业科学与技术，2021，44(5)：12-17.
YANG L，ZHANG D，QI S H，et al. Process optimization for production of freeze-dried cells of *Bifidobacterim bifidum* TMC3115[J]. Journal of Dairy Science and Technology，2021，44(5)：12-17.(in Chinese)
[31] 陈贺佳，牟光庆. 混合乳酸菌复合冻干保护剂的研究[J]. 食品研究与开发，2013，34(18)：133-136.
CHEN H J，MU G Q. Research of the cryoprotectant for composited *Lactobacillus*[J]. Food Research and Development，2013，34(18)：133-136.(in Chinese)
[32] 李颖畅，王亚丽，齐凤元，等. 响应面法优化蓝莓叶多糖提取工艺[J]. 食品工业科技，2015，36(3)：227-231.
LI Y C，WANG Y L，QI F Y，et al. Optimization of extraction process of polysaccharides from blueberry leaves by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry，2015，36(3)：227-231.(in Chinese)
[33] 张环宇，郭玉泽，陈明月，等. Box-Behnken响应面法优化暴马丁香花多糖提取工艺[J]. 赤峰学院学报(自然科学版)，2020，36(11)：32-35.
ZHANG H Y，GUO Y Z，CHEN M Y，et al. Box-Behnken response surface methodology to optimize the extraction process of polysaccharides from *Syringa reticulata*[J]. Journal of Chifeng University (Natural Science Edition)，2020，36(11)：32-35 (in Chinese).

（责任编辑：闫林红）

(上接第 19 页)

[57] LOU G H，LIU Y N，WU S S，et al. The p53/miR-34a/SIRT1 positive feedback loop in quercetin-induced apoptosis[J]. Cellular Physiology and Biochemistry 2015，35(6)：2192-2202.
[58] TAO S F，HE H F，CHEN Q. Quercetin inhibits proliferation and invasion acts by up-regulating miR-146a in human breast cancer cells[J]. Molecular and Cellular Biochemistry，2015，402(1-2)：93-100.
[59] DHAR S，HICKS C，LEVENSON A S. Resveratrol and prostate cancer：promising role for microRNAs[J]. Molecular Nutrition & Food Research，2011，55(8)：1219-1229.
[60] HAN Z Y，YANG Q Y，LIU B B，et al. MicroRNA-622 functions as a tumor suppressor by targeting K-Ras and enhancing the anticarcinogenic effect of resveratrol[J]. Carcinogenesis，2012，33(1)：131-139.
[61] WANG D，JIANG Y，SUN-WATERHOUSE D X，et al. MicroRNA-based regulatory mechanisms underlying the synergistic antioxidant action of quercetin and catechin in H_2O_2-stimulated HepG2 cells：Roles of BACH1 in Nrf2-dependent pathways[J]. Free Radical Biology & Medicine，2020，153：122-131.
[62] LIU H，GUAN H，TAN X T，et al. Enhanced alleviation of insulin resistance via the IRS-1/Akt/FOXO1 pathway by combining quercetin and EGCG and involving miR-27a-3p and miR-96-5p[J]. Free Radical Biology & Medicine，2022，181：105-117.
[63] FOLLO-MARTINEZ A D，BANERJEE N，LI X R，et al. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a[J]. Nutrition and Cancer，2013，65(3)：494-504.
[64] GUO J L，LI W P，SHI H L，et al. Synergistic effects of curcumin with emodin against the proliferation and invasion of breast cancer cells through upregulation of miR-34a[J]. Molecular and Cellular Biochemistry，2013，382(1)：103-111.
[65] DERRY M M，RAINA K，BALAIYA V，et al. Grape seed extract efficacy against azoxymethane-induced colon tumorigenesis in A/J mice：interlinking miRNA with cytokine signaling and inflammation[J]. Cancer Prevention Research，2013，6(7)：625-633.
[66] BANERJEE N，TALCOTT S，SAFE S，et al. Cytotoxicity of pomegranate polyphenolics in breast cancer cells *in vitro* and *vivo*：potential role of miRNA-27a and miRNA-155 in cell survival and inflammation[J]. Breast Cancer Research and Treatment，2012，136(1)：21-34.

（责任编辑：刘冬梅）