

## 柑橘酸腐病拮抗菌的筛选及其对柑橘品质的影响

李登勇<sup>1,2</sup>, 王建国<sup>1,2</sup>, 支胡钰<sup>1,2</sup>, 王勇<sup>1,2</sup>, 吴日章<sup>1,2\*</sup>

(1. 珠海真绿色技术有限公司, 广东珠海 519060; 2. 国家农产品保鲜工程技术研究中心, 广东珠海 519060)

**摘要** [目的] 筛选一株柑橘酸腐病拮抗菌, 用于柑橘采后酸腐病的防治。[方法] 筛选一株对柑橘酸腐病具有高效拮抗作用的生防菌, 并研究其对柑橘可溶性固形物、可滴定酸、抗坏血酸及挥发性物质含量的影响。[结果] 筛选出的拮抗菌株在平板上对白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) 的抑菌率为 82.58%。当柑橘酸腐病发病率为 96.67% 时, 接种  $10^8$  CFU/mL 生防菌能有效降低柑橘酸腐病发病率至 13.89%。经鉴定发现拮抗菌为解淀粉芽孢杆菌植物亚种 (*Bacillus amyloliquifaciens* subsp. *plantarum*), 其能延缓柑橘贮藏过程中抗坏血酸含量的下降, 保持柑橘果实中可溶性固形物和可滴定酸的含量, 延缓果实衰老, 提高多种香味物质, 特别是柠檬烯、月桂烯、沉香醇及奎醛等的含量, 同时延缓正己醛和反式-2-己烯醛等挥发性物质的降解, 从而有效延长柑橘的贮藏期, 保证柑橘贮藏期内良好的果实风味、食品品质和营养价值。[结论] 该研究可推动柑橘采后生物保鲜产业的发展。

**关键词** 酸腐病; 拮抗菌; 解淀粉芽孢杆菌植物亚种; 挥发性物质

**中图分类号** TS 205 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2019)08-0186-04

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.08.049



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Screening of Antagonistic Bacillus of Citrus Sour Rot and Its Effects on the Quality of Citrus

LI Deng-yong<sup>1,2</sup>, WANG Jian-guo<sup>1,2</sup>, ZHI Hu-yu<sup>1,2</sup> et al (1. Zhuhai GenGreen Technology Limited Company, Zhuhai, Guangdong 519060; 2. National Engineering and Technology Research Center, Zhuhai, Guangdong 519060)

**Abstract** [Objective] To screen out a strain of antagonistic bacillus of citrus sour rot for the prevention and control of citrus sour rot after harvest. [Method] A strain of biocontrol bacteria with highly antagonistic effect on citrus sour rot was screened out, and its effects on the contents of soluble solid, titratable acid, ascorbic acid and volatiles in citrus were studied. [Result] The inhibition rate of screened antagonistic bacillus on *Geotrichum candidum* Link was 82.58%. The morbidity of sour rot decreased from 96.67% to about 13.98% when the biocontrol bacillus's inoculation amount was  $10^8$  CFU/mL. The antagonistic bacillus was identified as *Bacillus amyloliquifaciens* subsp. *plantarum*, which could prolong the decrease of ascorbic acid content, maintain the content of soluble solid and titratable acid in the storage period, delaying the fruits' aging, increase the content of multiple flavor compounds, especially limonene, yrcene, linalool and kratos aldehyde, and reduce the degradation of some volatiles that could inhibit the propagation of pathogenic bacteria, such as hexanal, trans-2-hexenal, and so on. Furthermore, it could effectively prolong the storage period of citrus, and ensure good fruit flavor, food quality and nutritional value during the storage period of citrus. [Conclusion] The research could promote the development of citrus postharvest biological preservation industry.

**Key words** Sour rot; Antagonistic bacteria; *Bacillus amyloliquifaciens* subsp. *plantarum*; Volatile substance

柑橘采后病害严重, 青霉病、绿霉病、酸腐病和蒂腐病是其最主要病害, 每年因采后病害对柑橘产业造成的损失难以估计<sup>[1]</sup>。抑菌唑、噬霉胺、咪鲜胺和咯菌腈等化学杀菌剂是抑制柑橘采后病害的主要手段, 近年来因其对人类健康、生态环境的不利影响, 许多国家和地区已严格限制使用<sup>[2]</sup>。

生物防治是利用生物自然拮抗性抑制或杀死病原菌的一种方法, 具有目标特异性和环境友好型等优点<sup>[3]</sup>, 是近年来相关行业研究的热点。有文献报道植物次级代谢产物或者提取物能够抑制柑橘病原菌的繁殖, 比如 Hao 等<sup>[1-2]</sup>发现茶皂素仅仅与少量的咪鲜胺或抑菌唑混合就能显著提高杀菌效果, 并延长茶皂素在柑橘表面的保存时间, 同时也发现茶皂素与 *Bacillus amyloliquifaciens* 联合使用能够显著抑制 *P. digitatum*, *P. italicum* 和 *G. candidum* 的繁殖。Talibi 等<sup>[4]</sup>研究发现 *C. villosus*, *C. siliqua* 和 *H. umbellatum* 3 种植物的提取物能不同程度抑制 *G. candidum* 的繁殖。Faten 等<sup>[5]</sup>建立了柠檬醛与壳聚糖的联合抑制酸腐病菌的方法。Liu 等<sup>[6]</sup>研究了 2 种酵母菌对酸腐病病原菌的抑制情况, 发现 *C. laurentii* 能够竞争性抑制酸腐病病原菌的繁殖。

化学杀菌剂抑菌唑、咪鲜胺等不能很好抑制酸腐病病菌的繁殖, 只有邻苯酚钠能减缓其生长繁殖<sup>[7]</sup>。Talibi 等<sup>[4]</sup>发现 *C. villosus* 等植物提取物能够不同程度抑制酸腐病病原菌的繁殖。然而, 植物代谢物提取过程工艺相对复杂、繁琐。笔者以白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) 为靶, 筛选高效拮抗菌, 研究其对柑橘中可溶性固形物、可滴定酸、抗坏血酸及挥发性物质含量的影响, 以期推动柑橘采后生物保鲜产业的发展。

### 1 材料与与方法

**1.1 材料** 拮抗菌分离样采集于福建省三明市大田县老树林土壤, 担子菌纲伞菌红菇科食用真菌根部; 柑橘和马铃薯购买于当地农贸市场。

枯草芽孢杆菌菌株 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>4</sub> 和 B<sub>5</sub> 分别购买于武汉某公司、江西某公司、浙江某公司、北京某公司和山东某公司; 枯草芽孢杆菌 R31、白地霉 (*Geotrichum candidum* Link) 为实验室保存菌种。

马铃薯琼脂培养基 (PDA): 葡萄糖 20 g, 去皮马铃薯 200 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

**1.2 试剂** 2,6-二氯酚酞、蛋白胨、牛肉膏、氯化钠、葡萄糖等试剂均购自天津市百世化工有限公司; C<sub>5</sub>~C<sub>20</sub> 正构烷烃及环己酮标准品 (色谱级) 购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

**基金项目** 珠海市香洲区科技计划项目 (201409)。

**作者简介** 李登勇 (1992—), 男, 重庆人, 硕士, 从事现代发酵技术研究。  
\* 通信作者, 工程师, 硕士, 从事农产品加工及贮藏工程研究。

**收稿日期** 2018-11-25

**1.3 仪器** 7890/5973 气相色谱-单四极杆质谱仪,为美国 Agilent 公司产品;Combi PAL 气相色谱多功能自动进样器,为瑞士 CTC 公司产品;DB-5MS 石英毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);DVB/CAR/PDMS 50/30 μm(二乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲甲基硅氧烷)萃取头购自美国 Supelco 公司。

#### 1.4 方法

**1.4.1 拮抗菌株的筛选及处理浓度。**将食用真菌根部及土壤样品各研磨成粉,混合均匀。从混合均匀的 2 个样品中各称取 5.00 g 食用真菌根部及土壤混合粉样置于玻璃瓶中,使用振荡器振荡均匀,采用梯度稀释法适当稀释后涂布于 PDA 培养基,每天观察并挑选长势良好、对周边菌具明显拮抗作用的菌落于 PDA 培养基培养,并进行纯化。

**1.4.1.1 拮抗菌株的筛选。**无菌条件下从培养 7 d 的白地霉 PDA 培养基中打取菌饼(直径 5 mm),菌丝面向下接种于已经凝固的 PDA 培养基中心点,以中心点为轴,绘制 X、Y 轴。然后,将培养于 PDA 培养基上 12 h 的待筛选菌株、标准菌株,以同样方式取出菌饼(直径 5 mm),并将菌饼沿 X、Y 轴等距离接种于已接种白地霉的 PDA 培养基中并封口,于 28 ℃ 培养 7 d 后利用十字交叉法测定白地霉菌落直径。菌株抑菌率按照以下公式计算:

$$\text{抑菌率} = \left[ \frac{\text{对照平板中菌落直径} - \text{处理平板中菌落直径}}{\text{对照平板菌落直径}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

**1.4.1.2 效果验证及浓度筛选。**将已筛选出的高效拮抗菌于三角瓶中活化培养 12 h,用血球板测量菌体浓度,将菌体浓度稀释成  $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  和  $10^9$  CFU/mL,待用。将培养基中培养了 7 d 的白地霉用无菌水配制成菌悬液,控制浓度为  $1 \times 10^7$  孢子数/mL。

将柑橘果实洗净,然后用 200 mg/L 次氯酸钠浸泡 1 min,去除表面各种杂菌,并于通风处晾干。用灭菌金属针沿赤道部位刺孔 1 个(直径 5 mm、深 2 mm),然后分别用移液枪移入不同浓度的拮抗菌各 15 μL,自然晾干。然后,将晾干后的果实每孔再移入白地霉菌悬液 15 μL,自然晾干。

最后,用聚乙烯袋(0.03 mm)进行单果包装,每个处理设 3 次重复,每个重复 60 个果。置于室温(25±2)℃下,在相对湿度 85%~95%条件下贮藏,定期观察损伤接种果实酸腐病的发病情况,5 d 后统计发病率。发病率根据以下公式计算:

$$\text{发病率} = \left( \frac{\text{发病果数}}{\text{检查总果数}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

**1.4.2 拮抗菌传代稳定性试验。**对已筛选出的高效拮抗菌株的第 2、4、6、8 及 10 代菌分别进行对白地霉(*Geotrichum candidum* Link)的抑菌实验,试验方法与“1.4.1.1”相同。

**1.4.3 菌株分子生物学及生理生化鉴定。**菌种分子生物学和生理生化鉴定均委托中国工业微生物菌种保藏中心完成。

**1.4.4 拮抗菌株对柑橘品质的影响。**三角瓶中活化培养筛选出的拮抗菌 12 h,用血球板测量菌体浓度,将菌体浓度稀释成  $10^8$  CFU/mL,待用。将柑橘果实洗净,用 200 mg/L 次氯酸钠浸泡 1 min,去除表面各种杂菌,通风处晾干。然后将晾干后的果实分别于无菌水、 $10^8$  CFU/mL 菌液中浸泡 1 min,

自然晾干。再用聚乙烯袋(0.03 mm)进行单果包装,每个处理 120 个果。置于室温(25±2)℃,相对湿度 85%~95%条件下贮藏,定期取样测定。

**1.4.4.1 可溶性固形物及可滴定酸的测定。**可溶性固形物的测定参考国标 GB/T 12295—1990<sup>[8]</sup>,具体如下:准确称取 250 g 柑橘果肉于水果捣碎机混合均匀,用 2 层纱布过滤得到滤液。在 20 ℃ 恒温水浴下,以蒸馏水为空白,使用折射仪测定可溶性固形物浓度,每个样品重复 3 次。

可滴定酸的测定方法:准确称取果肉 10.0 g,研磨匀浆后,用约 60 mL 蒸馏水洗净 100 mL 容量瓶中,放在沸水浴中浸提 30 min。冷却定容至刻度,充分摇匀后过滤至 100 mL 锥形瓶中。量取 20 mL 滤液置于三角瓶中,加入 2 滴 1% 酚酞指示剂,用已标定的氢氧化钠溶液进行滴定。滴定至溶液初显粉色并在 30 s 内不褪色时为终点,记录氢氧化钠滴定液的用量,重复 3 次。以蒸馏水作为空白对照。

**1.4.4.2 抗坏血酸含量的测定。**抗坏血酸含量的测定参考 Dewhirst 等<sup>[9]</sup>的方法,略做修改。称取 10.0 g 果肉样品,加少量 2% 草酸溶液在冰浴条件下研磨成浆状,转入到 100 mL 棕色容量瓶中,再用 2% 草酸溶液定容至刻度摇匀,并于黑暗处静置 30 min 提取,过滤,收集滤液于棕色瓶。准确吸取 10 mL 滤液,用已标定的 2,6-二氯酚靛酚溶液滴定至出现微红色,且 15 s 不褪色为止,记下用量,重复 3 次。同时,以 10 mL 2% 草酸溶液做空白滴定。按以下公式计算抗坏血酸含量:

$$W = \frac{V \times (V_1 - V_0) \times \rho}{V_s \times m} \times 1000 \quad (3)$$

式中,W 表示抗坏血酸含量(mg/kg); $V_0$  为空白滴定消耗的染料的体积(mL); $V_1$  为样品液滴定消耗的染料的体积(mL); $\rho$  为 1 mL 染料溶液相当于抗坏血酸的质量(mg/mL); $V_s$  为测定时所用样品溶液体积(mL); $V$  为样品提取液总体积(mL); $m$  为样品质量(g)。

**1.4.4.3 柑橘果肉中挥发性物质的测定。**分别取新鲜、正常贮存的、拮抗菌液处理后储藏的柑橘果肉样品 5.00 g 置于 20 mL 螺口样品瓶中,加入 3.00 g NaCl,准确加入 2 μL 环己酮(0.947 89 μg/mL),作为内标物,旋紧瓶盖。顶空固相萃取条件:40 ℃ 平衡 20 min;顶空吸附 35 min;解吸 5 min。

色谱和质谱条件:载气为氦气,1 mL/min;进样口温度 250 ℃,不分流进样;以 35 ℃ 为程序性升温起示温度,在此温度下维持 5 min,然后以 3 ℃/min 升至 180 ℃ 保持 2 min,最后以 5 ℃/min 的升温速度升至 240 ℃,保持 2 min。传输线温度 280 ℃;离子源温度 230 ℃;四极杆温度 150 ℃;离子化方式电子电离源(electron ionization, EI),电子能量 70 eV,质量范围  $m/z$  35~400。

在相同的色谱及质谱条件下,以  $C_5 \sim C_{20}$  的正构烷烃作为标准,以其保留时间的不同计算样品测试中的化合物的保留指数(retention indices, RI),结合图谱库(NIST2008 和 Havour2.0)检索结果,同时与文献中已有相应保留值相比来完成挥发性物质的定性。以环己酮为内标,对挥发性物质进

行半定量分析,并将影响因子视为1。所有样品重复3次,结果均以平均值±标准差表示。

$$C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s \times V_s \quad (4)$$

式中, $C_x$ 表示未知挥发性组分的浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); $A_x$ 表示未知挥发性组分的色谱峰面积; $A_s$ 表示内标的色谱峰面积; $C_s$ 表示内标浓度( $\text{mg}/\text{mL}$ ); $V_s$ 表示内标溶液的体积( $\mu\text{L}$ )。

**1.4.5 数据处理。**使用方差分析(ANOVA)对不同样品进行显著性分析( $P < 0.05$ ),所有统计分析及数据可视化均使用SPSS 17.0和Origin 8.50软件进行。

## 2 结果与分析

**2.1 拮抗菌的筛选** 通过初筛及与标准菌株的对比,共筛选出4株对白地霉具有高抑制率的菌株,分别命名为HF-1、HF-2、HF-3和HF-4。由表1可知,HF-3菌株对白地霉的抑菌作用最强,抑菌率为82.58%,高于从其他公司购买的标准菌株及实验室自存的菌株。

表1 不同菌株对白地霉的抑菌效果

Table 1 Bactericidal effect of different strains on *Geotrichum candidum* Link

菌株 Strain	抑菌率 Bactericidal rate // %	菌株 Strain	抑菌率 Bactericidal rate // %
HF-1	25.86±4.14	B <sub>1</sub>	77.29±0.97
HF-2	42.16±0.55	B <sub>2</sub>	70.86±2.82
HF-3	82.58±0.17	B <sub>3</sub>	62.15±1.28
HF-4	67.88±1.30	B <sub>4</sub>	52.87±2.37
R31	73.11±1.69	B <sub>5</sub>	39.87±1.11

从图1可知,随着HF-3浓度的增加,HF-3对果实酸腐病的抑制作用逐渐增强。当HF-3浓度达到 $10^8$  CFU/mL时酸腐病发病率降低到13.89%,空白发病率为96.67%。当HF-3浓度升至 $10^9$  CFU/mL时,对酸腐病的抑制效果没有显著增加,可能与拮抗菌过度消耗果实表面营养从而降低了果实本身的抗性有关。酸腐病是柑橘采后最难防控的病害,当空白组5 d损伤接种发病率为96.67%,拮抗菌HF-3能有效作用于酸腐病菌,降低病害的发生率,表明拮抗菌HF-3对酸腐病有较好的拮抗作用, $10^8$  CFU/mL是最适作用浓度。

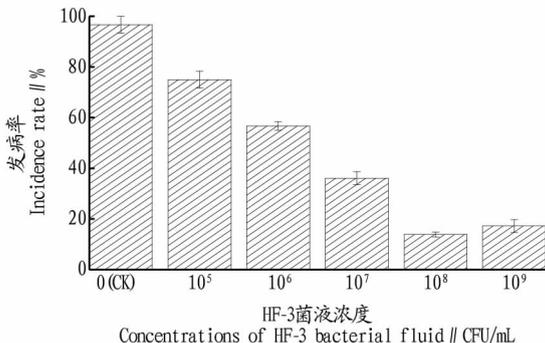


图1 不同浓度HF-3菌液对柑橘接种酸腐病发病率的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of HF-3 bacterial fluid on the incidence rate of citrus sour rot

**2.2 拮抗菌的性能稳定性** 拮抗菌产业化过程中最大的问题是稳定性问题。由图2可知,HF-3菌株的第2、4、6、8及10传代菌对白地霉的抑菌率都超过80%,表明HF-3菌株对白地霉的抑菌性能是稳定的,并未因传代次数的增多而降低对白地霉的抑菌效果。

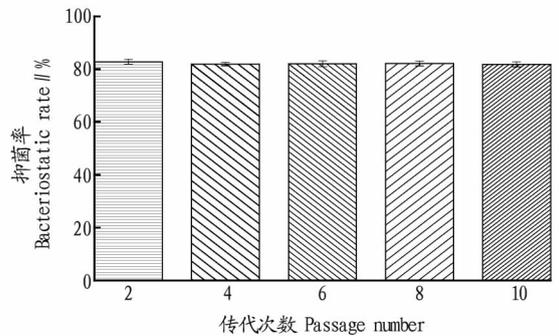


图2 传代次数对HF-3抑菌率稳定性的影响

Fig.2 Effects of passage number on the bacteriostatic rate stability of HF-3

**2.3 拮抗菌的鉴定** 经鉴定,HF-3为革兰氏阳性菌,菌体成杆状,中生或端生椭圆形芽孢,孢囊不肿大,菌落乳白色,表面光滑,不透明,边缘整齐,直径约1 mm(图3)。HF-3的生理生化分析结果如表2所示,对照伯杰氏细菌鉴定手册,初步判断HF-3为解淀粉芽孢杆菌植物亚种。

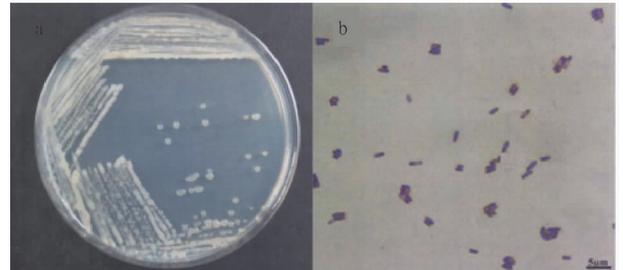


图3 HF-3菌株的菌落形态和菌体形态

Fig.3 Colonial and mycelial morphology of HF-3 strain

分别扩增HF-3的16S rDNA及gyr基因,纯化测序后并采用邻接法(MEGA 5.0)进行1 000次的相似度重复计算,构建系统发育树。16S rDNA基因进化树显示,HF-3属于枯草芽孢杆菌群,而gyr基因进化树显示HF-3基因序列与甲基型营养芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)和解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*Bacillus amyloliquifaciens* subsp. *plantarum*)相似度最高,达98%以上。因此确定HF-3菌株为解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*Bacillus amyloliquifaciens* subsp. *plantarum*),最终菌株命名为ZFH-3。

**2.4 HF-3菌液处理对柑橘可溶性固形物及可滴定酸的影响** 可溶性固形物和可滴定酸是评价柑橘品质的重要指标,同时可溶性固形物与可滴定酸的比值常作为柑橘成熟度的评价指标。从图4可看出,在柑橘采摘5 d内,由于营养物质被切断等原因,可溶性固形物含量急剧下降,同时可滴定酸含量略微上升;后期随着内源乙烯的积累合成(乙烯合成系统II),使柑橘中纤维素、淀粉等大分子物质足渐分解为可溶性小分子。与HF-3L(菌液处理后储藏)和CKL(正常储

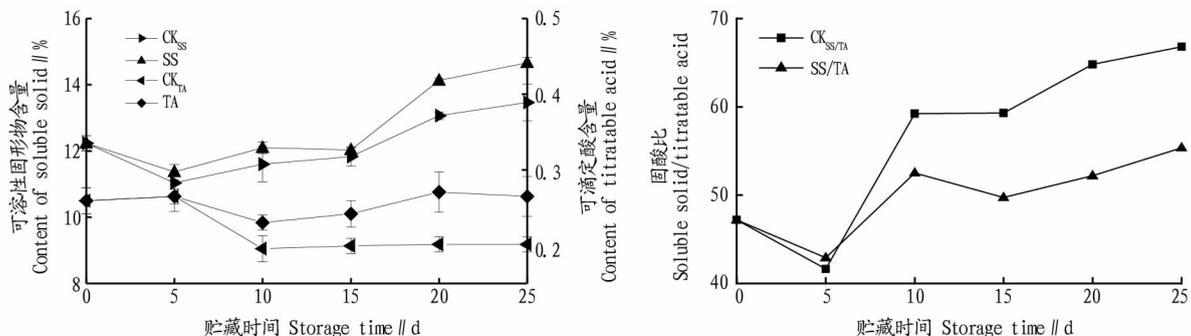
表 2 HF-3 菌株的生理生化试验结果

Table 2 Results of physiological and biochemical test results of HF-3 strain

序号 No.	检测项目 Detection items	结果 Results									
1	甘油	-	15	D-半乳糖	-	29	L-鼠李糖	-	43	熊果苷	+
2	D-核糖	+	16	L-三梨糖	-	30	山梨醇	+	44	D-麦芽糖	+
3	D-蜜二糖	-	17	甘露醇	+	31	苦杏仁苷	+	45	D-海藻糖	+
4	D-甘露醇	+	18	N-乙酰葡萄糖胺	-	32	D-纤维二糖	+	46	淀粉	+
5	肌醇	+	19	水杨苷	+	33	D-蔗糖	+	47	葡萄糖酸钾	-
6	$\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷	+	20	$\beta$ -甲基-D-木糖醇	-	34	2-酮基-葡萄糖酸盐	-	48	5-酮基-葡萄糖酸盐	-
7	七叶灵	+	21	D-松三糖	-	35	D-龙胆二糖	-	49	D-木糖	+
8	D-乳糖	+	22	木糖醇	-	36	D-岩藻糖	-	50	D-棉籽糖	+
9	菊糖	-	23	D-塔格糖	-	37	$\alpha$ -甲基 D-甘露糖	-	51	卫矛醇	-
10	糖原	+	24	L-阿拉伯醇	-	38	L-阿拉伯糖	+	52	赤藻糖醇	-
11	D-来苏糖	+	25	D-阿拉伯糖	-	39	D-葡萄糖	+	53	D-果糖	+
12	D-阿拉伯糖	-	26	L-木糖	-	40	阿东糖醇	-	54	柠檬酸利用	-
13	L-岩藻糖	-	27	V-P 试验	+	41	丙氨酸利用	-	55	明胶水解	+
14	果胶酶	-	28	吡啶试验	-	42	色氨酸脱氢酶	-	56	鸟氨酸脱氢酶	-

藏)相比, HF-3 菌液能够促成柑橘贮存过程中可溶性糖分的积累, 贮存 20 d 后 HF-3L 可溶性糖约比 CKL 高 8%。CKL 果中可滴定酸在 10 d 后没有发生显著变化, 而 HF-3L 中可滴定酸在 10 d 后会逐渐上升, 20 d 达到最高。同时, HF-3L 与 CKL 相比能有效延缓果实的衰老, 这种作用在后期更加明显。这可能是由于 HF-3 菌株能够在柑橘表面形成一层

由多糖-蛋白质化合物-细菌组成, 并带有负电荷的生物膜<sup>[2]</sup>, 另外 HF-3 的呼吸作用能够增加 CO<sub>2</sub> 的浓度, 一定程度上抑制柑橘自身的呼吸作用, 减少可溶性糖的损失; 抑制乙烯的产生和降低果胶酶的活性, 从而延缓柑橘的成熟和果实软化<sup>[10]</sup>。



注: CK<sub>SS</sub>. 正常贮藏柑橘中可溶性固形物含量; SS. HF-3 菌液处理的柑橘可溶性固形物含量; CK<sub>TA</sub>. 正常贮藏柑橘中可滴定酸的含量; TA. HF-3 菌液处理柑橘的可滴定酸含量; CK<sub>SS/TA</sub>. 正常贮藏柑橘的固酸比; SS/TA. HF-3 菌液处理柑橘的固酸比

Note: CK<sub>SS</sub>. Content of soluble solid in the citrus during the storage; SS. The soluble solid content in the citrus treated by HF-3 bacterial fluid; CK<sub>TA</sub>. The titratable acid in the citrus during the storage; TA. Changes of titratable acid content in the citrus treated by HF-3 bacterial fluid; CK<sub>SS/TA</sub>. Soluble solid/titratable acid of citrus during the storage; SS/TA. Soluble solid/titratable acid of citrus treated by HF-3 bacterial fluid

图 4 HF-3 菌液处理对柑橘可溶性固形物及可滴定酸含量的影响

Fig. 4 Variety of soluble solid and titratable acid during storage in citrus

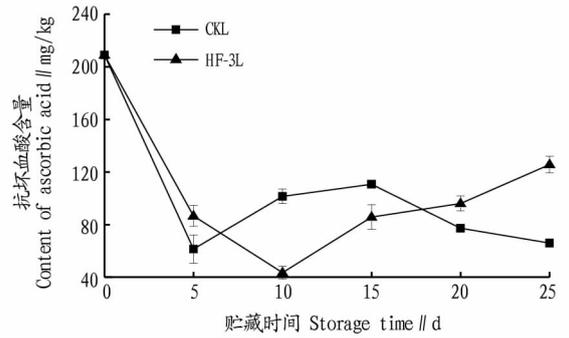
**2.5 HF-3 菌液处理对柑橘抗坏血酸含量的影响** 由图 5 可知, 在自然贮存中柑橘的抗坏血酸含量呈现先急剧下降后略微上升再降低的过程, 与西柚贮存中抗坏血酸含量的变化趋势相同<sup>[11]</sup>。与正常贮藏柑橘 (CKL) 相比, 贮藏前期 HF-3 菌液能延缓抗坏血酸含量的下降, 贮藏中后期能较好地保持抗坏血酸在果实中的含量, 第 20、25 天抗坏血酸含量分别为 CKL 样品中的 2.5 倍和 1.9 倍。

**2.6 HF-3 菌液处理对柑橘挥发性物质含量的影响** 应用 HS-SPME-GC/MS 联用技术分析了新鲜柑橘 (XXL)、HF-3 菌液处理柑橘 (HF-3L) 及对照柑橘 (CKL) 果肉的挥发性物质。通过图谱库检索与 RI 值比对, 结合相关文献, 得出香气成分及其定量值。结果表明, 在 3 种柑橘果肉中共检出 53 种香气成分, 其中 23 种为共有成分, 31 种为非共有成分, 并

且各有 5~8 种相对含量较低的独特成分。HF-3L 柑橘样品中香气含量最多, 共检出 39 种挥发性物质, 总含量为 223.90  $\mu\text{g/g}$ , 其次为 CKL 样品果肉, 检出 38 种, 挥发性物质总含量为 184.39  $\mu\text{g/g}$ ; XXL 果肉中共为检出 35 种挥发性物质, 总含量为 117.72  $\mu\text{g/g}$ 。检出的挥发性物质主要包括萜烯、醛类、酯类、醇类、酚类等; CKL 中萜烯类、酯类、酮类含量较 XXL 增加, 醛类、醇类、其他等含量则减少。与 XXL 相比, HF-3L 柑橘中酮类减少, 其他类型成分显著上升。柑橘果肉中主要挥发性物质及其风味描述见表 3。

进一步对 3 种样品中的挥发性物质进行了主成分分析 (图 6)。从图 6 可看出, PCA1 和 PCA2 分别能解释 3 种样品中挥发性物质差异的 56.88% 和 43.12%, 结合 PCA1 和 PCA2 能完全解释 3 种样品中挥发性物质的差异。结果显示, 3 种

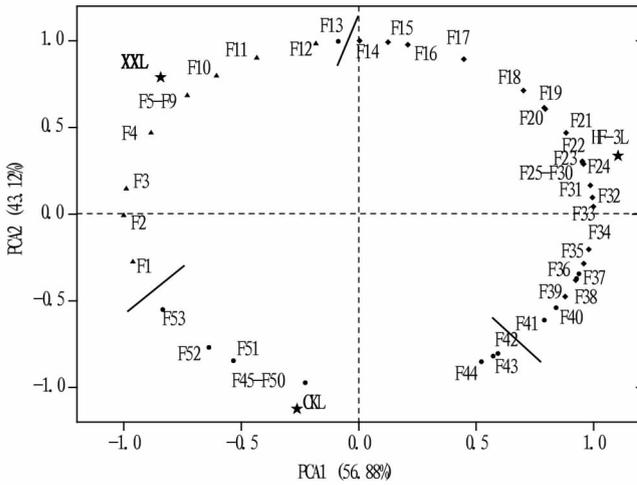
柑橘样品中挥发性物质的含量存在显著差异,α-蒎品烯、邻苯二甲酸二乙酯、4-蒎烯醇、乙烯胺、反式二烯酸等挥发性物质(F1~F13)主要存在于XXL样品中,柠檬烯、奎酸、壬醛、正辛醛、苯甲醛等多种挥发性物质(F14~F41)主要存在于HF-3L样品中,α-蒎烯、沉香醇等挥发性物质(F42~F53)主要存在于CKL中。通过HF-3菌液处理,显著提高了正辛醇、紫苏醇、沉香醇、月桂烯、柠檬烯、γ-蒎品烯、苯乙酮、壬醛、ρ-伞花烃和奎醛等香味物质含量,同时减缓了正己醛、反式二烯醛,1-辛醇等香味物质损耗。通过与OAV值相比较,表明沉香醇、月桂烯、柠檬烯、奎醛是柑橘香气成分中最主要的贡献者,使柑橘产生令人愉快的气味。其中沉香醇仅仅在HF-3L样品中检测到,其相对含量为OAV值的540倍,能够产生令人愉悦的花香<sup>[12]</sup>。柠檬烯、正己醛和反式二烯醛等挥发性物质不仅是柑橘独特香味的贡献者,而且抑制病原菌的生长<sup>[13]</sup>。HF-3菌液处理后,柑橘中香茅醇、α-蒎烯和α-蒎品烯等香味物质的含量略微降低,但其本身香味贡献度较低。



注:CKL:正常贮藏柑橘;HF-3L:HF-3菌液处理柑橘  
Note:CKL.Citrus in normal storage;HF-3L.The citrus treated by HF-3 bacterial fluid

图5 HF-3菌液处理对柑橘抗坏血酸含量的影响

Fig.5 Effects of HF-3 bacterial fluid treatment on the content of ascorbic acid in citrus



- F1: α-蒎品烯
- F2: 邻苯二甲酸二乙酯
- F3: 异松油烯
- F4: 4-蒎烯醇
- F5: 香桉烯
- F6: α-甲基苯乙烷
- F7: 甲酸辛酯
- F8: 甲基丙烯酸乙二酯
- F9: 丙烯酸异辛酯
- F10: 乙醛
- F11: 反式-2-己烯醛
- F12: 9-亚甲基-9H-芴
- F13: 香茅醇
- F14: α-蒎品醇
- F15: 3-萜烯
- F16: 1-辛醇
- F17: 4-乙酰基-1-甲基-1-环己烯
- F18: 2,4-二叔丁基苯酚
- F19: 苯甲醛
- F20: 正辛醛
- F21: 2-甲基-5-(1-异丙烯基)-环己酮
- F22: 2-乙基己基乙酸酯
- F23: 顺香芹醇
- F24: 4-(1-甲基乙基)-1-环己烯-1-甲醛
- F25: 3,7-二甲基-6-辛烯醇丁酸酯
- F26: 2,7-二甲基茶
- F27: 戊酸2-乙基己基酯
- F28: γ-榄香烯
- F29: 香叶基丙酮
- F30: 花侧柏烯
- F31: 香芹酮
- F32: ρ-伞花烃
- F33: 蒎品烯
- F34: 3,1-乙醛,4-甲基环己烯
- F35: 壬醛
- F36: 癸醛
- F37: 柠檬烯
- F38: 月桂烯
- F39: 2-乙基己酸乙酯
- F40: 6-甲基庚丙烯酸乙酯
- F41: 苯乙酮
- F42: 异辛酸乙酯
- F43: 沉香醇
- F44: 1-甲基茶
- F45: 1,3,8-对-薄荷三烯
- F46: 甲基丁香酚
- F47: 3-(甲氧基甲烯基)-2-GH-苯并咪唑酮
- F48: 2,5-二叔丁基酚
- F49: 二十五酸甲酯
- F50: 菲
- F51: 1-甲基-环己酮
- F52: 1-环己基-2-环己酮
- F53: α-蒎烯

图6 不同柑橘果肉样品间的主成分分析

Fig.6 Principal component analysis of different flesh samples of citrus

表3 柑橘果肉中主要挥发性物质及其风味描述

Table 3 Volatile substances in citrus flesh and their flavor description

序号 No.	挥发性物质 Volatile substances	挥发性物质含量 Content of volatile substances//μg/g			OAV值 OAV value μg/g	风味描述 Flavor description	挥发性物质含量/OAV值 Volatile substances' content/OAV value		
		XXL	CKL	HF-3L			XXL	CKL	HF-3L
1	正己醛	2.44±0.13	1.18±0.02	1.41±0.05	0.017	青草味	143.53	69.41	82.94
2	反式-2-己烯醛	4.55±0.20	2.58±0.05	3.30±0.08		清香 <sup>[11]</sup>			
3	苯甲醛	1.05±0.09	0.95±0.00	1.23±0.00	3.000	苦杏仁味	0.70	0.63	0.82
4	正辛醛	1.03±0.10	0.89±0.03	1.29±0.19	0.700	甜味,油脂味	1.47	1.27	1.84
5	紫苏醛	0.41±0.00	0.40±0.03	0.53±0.01	0.062	紫苏香 <sup>[11]</sup>	6.61	6.45	8.55
6	3-萜烯	0.69±0.01	0.37±0.02	0.62±0.01		柠檬,松香 <sup>[14]</sup>			
7	1-辛醇	1.03±0.03	0.49±0.01	0.97±0.02	0.040 <sup>[12]</sup>	芳香 <sup>[12]</sup>	25.75	12.25	24.25
8	α-蒎品醇	0.47±0.03	0.23±0.02	0.46±0.04	0.330	紫丁香味	1.42	0.70	1.39
9	香茅醇	0.66±0.03	0.23±0.02	ND	0.040	柚香味 <sup>[15]</sup>	16.50	5.75	0
10	沉香醇	ND	ND	0.81±0.02	0.002	植物花香 <sup>[12]</sup>	0	0	540.00

接下表

续表 3

序号 No.	挥发性 物质 Volatile substances	挥发性物质含量 Content of volatile substances // $\mu\text{g/g}$			OAV 值 OAV value $\mu\text{g/g}$	风味描述 Flavor description	挥发性物质含量/OAV 值 Volatile substances' content/OAV value		
		XXL	CKL	HF-3L			XXL	CKL	HF-3L
11	$\alpha$ -蒎烯	0.12±0.00	0.18±0.00	ND	0.005 <sup>[12]</sup>	菠萝柑橘 <sup>[12]</sup>	24	36	0
12	$\alpha$ -蒎品烯	0.41±0.01	0.40±0.06	ND	0.260	柑橘柠檬 <sup>[15]</sup>	1.58	1.54	0
13	月桂烯	2.16±0.03	3.95±0.07	4.99±0.07	0.013	天竺葵味	166.15	303.85	383.85
14	柠檬烯	90.99±10.71	152.85±4.72	192.75±12.67	0.010	柑橘, 水果香	9 099	15 285	19 275
15	$\gamma$ -蒎品烯	0.25±0.01	0.37±0.06	0.72±0.01		柑橘味			
16	苯乙酮	ND	0.08±0.00	0.09±0.00	0.065	杏仁, 水果	0	1.23	1.38
17	壬醛	ND	1.02±0.01	1.85±0.01	0.001	脂肪, 果香 <sup>[16]</sup>	0	1 020	1 850
18	$\rho$ -伞花烃	0.33±0.03	0.38±0.01	0.57±0.04	0.013 <sup>[13]</sup>	果香 <sup>[12]</sup>	25.38	29.23	43.85
19	癸醛	0.48±0.03	1.20±0.07	1.60±0.02	0.002	花香, 柑橘 <sup>[15]</sup>	240	600	800

注: ND 表示未检出

Note: ND stands for not detected

### 3 结论

本研究以白地霉为靶标, 从土壤及食用菌根际组织中进行拮抗菌的筛选, 筛选出一株对白地霉具高拮抗作用的解淀粉芽孢杆菌植物亚种 (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*)。结果表明, 当拮抗菌浓度达到  $10^8$  CFU/mL, 能有效的降低柑橘果实酸腐病发病率, 控制酸腐病发病率为 13.89%; 延缓柑橘贮藏过程中抗坏血酸含量的下降, 显著提高正辛醇、紫苏醇、沉香醇、月桂烯、柠檬烯、 $\gamma$ -蒎品烯、苯乙酮、壬醛、 $\rho$ -伞花烃和奎醛等香味物质含量, 同时减缓正己醛、反式二烯醛、1-辛醇等香味物质损耗; 保持柑橘果实中可溶性固形物、可滴定酸的含量, 从而有效延长柑橘的贮藏期, 保证柑橘贮藏期内良好的果实风味、食品品质和营养价值。

### 参考文献

- [1] HAO W N, ZHONG G H, HU M Y, et al. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz[J]. *Postharvest biology & technology*, 2010, 56(1): 39-43.
- [2] HAO W N, LI H, HU M Y, et al. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin[J]. *Postharvest biology & technology*, 2011, 59(3): 316-323.
- [3] NARAYANASAMY P. Biological management of diseases of crops [M]. Netherlands: Springer, 2013.
- [4] TALIBI I, ASKARNE L, BOUBAKER H, et al. Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum* [J]. *Letters in applied microbiology*, 2012, 55(2): 155-161.
- [5] FATEN A, ABD-EL-LATIF F M. Combination between citral and chitosan

for controlling sour rot disease of lime fruits[J]. *Research journal of agriculture & biological sciences*, 2010, 5(6): 1039-1045.

- [6] LIU X, FANG W, LIU L, et al. Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts[J]. *Letters in applied microbiology*, 2010, 51(1): 30-35.
- [7] SCHENA L, STRANO M C, SANZANI S M, et al. Postharvest diseases of citrus fruits[J]. *Protezione delle colture*, 2011(4): 30-41.
- [8] 国家技术监督局. 水果、蔬菜制品 可溶性固形物含量的测定 折射仪法: GB/T 12295-1990 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1990.
- [9] DEWHIRST R A, CLARKSON G J J, ROTHWELL S D, et al. Novel insights into ascorbate retention and degradation during the washing and post-harvest storage of spinach and other salad leaves[J]. *Food chemistry*, 2017, 233: 237-246.
- [10] 钱敏, 白卫东, 于新, 等. CO<sub>2</sub> 对果蔬采后生理的作用[J]. *食品工业科技*, 2009(10): 350-355.
- [11] 石金瑞, 刘潇然, 刘翠华, 等. '瑞阳' 及其亲本 '秦冠' 和 '富士' 苹果香气物质的比较[J]. *西北农业学报*, 2018, 27(7): 977-987.
- [12] MAYUONI-KIRSHINBAUM L, DAUS A, PORAT R. Changes in sensory quality and aroma volatile composition during prolonged storage of 'Wonderful' pomegranate fruit[J]. *International journal of food science & technology*, 2013, 48(8): 1569-1578.
- [13] 张智毅. 正己醛结合反-2-己烯醛熏蒸鲜切菠萝蜜保鲜技术研究[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- [14] YI L Z, DONG N P, LIU S, et al. Chemical features of *Pericarpium Citri reticulatae* and *Pericarpium Citri Reticulatae Viride* revealed by GC-MS metabolomics analysis[J]. *Food chemistry*, 2015, 186: 192-199.
- [15] 陈婷婷, 周志钦. 5 个宽皮柑桔品种果肉特征香气物质的确定[J]. *中国南方果树*, 2018, 47(3): 23-29.
- [16] 周慧敏, 张顺亮, 赵冰, 等. 吹扫/捕集-热脱附-气质联用比较分析长白山黑猪和瘦肉型猪肉的挥发性风味物质[J]. *肉类研究*, 2017, 31(3): 45-50.