



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113273604 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(21) 申请号 202110505327.4

(22) 申请日 2021.05.10

(71) 申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路  
301号

(72) 发明人 张红印 傅昱 杨其亚 蓝黄博恩

(51) Int. Cl.

A23B 7/155 (2006.01)

G12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

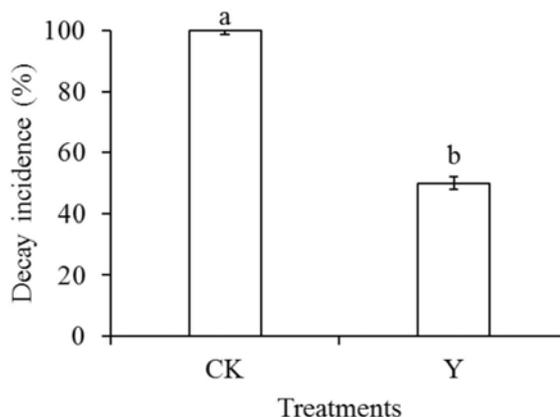
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途

(57) 摘要

本发明属于生物防治技术领域,涉及异常威克汉姆酵母应用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途;步骤为:将异常威克汉姆酵母进行活化培养后,离心得到菌体,再用无菌水稀释成浓度为 $1 \times 10^8$  cells/mL的酵母菌悬液,在番茄表面打孔后注入酵母菌悬液,2h后注入等体积 $1 \times 10^5$  spores/mL灰葡萄孢霉孢子悬浮液,实现对灰霉病的有效控制;或者直接将酵母菌悬液均匀喷洒在番茄表面,自然风干;即可实现番茄采后灰霉病防治和贮藏保鲜的用途;本发明可以有效控制番茄采后灰霉病和自然腐烂,从而降低番茄采后病害所造成的损失;同时操作方便且安全环保,具有显著的经济效益和社会效益。



1. 异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途, 其特征在于, 其特征在于, 具体步骤如下:

首先将异常威克汉姆酵母活化, 然后用NYDB培养基培养异常威克汉姆酵母至对数中期, 再取对数中期的培养液接种至新鲜的NYDB培养基中继续培养, 达到稳定期后, 离心得到菌体, 接着用无菌水洗涤、离心; 重复洗涤、离心步骤数次后, 得到的菌体再用无菌水稀释成浓度为 $1 \times 10^8$  cells/mL的酵母菌悬液; 在番茄表面用灭菌的打孔器进行打孔, 然后在每孔分别注入适量体积的酵母菌悬液, 一段时间后在每孔分别接种与酵母菌悬液等体积的灰葡萄孢霉孢子悬浮液, 其浓度为 $1 \times 10^5$  spores/mL, 实现对灰葡萄孢霉孢子引起灰霉病的有效防治;

或者不对番茄进行处理, 保持番茄的自然状况放入塑料筐中, 将浓度为 $1 \times 10^8$  cells/mL的酵母菌悬液均匀喷洒于番茄表面, 待番茄自然风干后放入保鲜袋中, 再置于塑料筐中, 用保鲜膜密封后, 于室温下存放, 即可实现对番茄采后灰霉病的防治及贮藏保鲜的用途。

2. 根据权利要求1所述的异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途, 其特征在于, 所述用NYDB培养基培养条件为: 温度 $28^\circ\text{C}$ , 转速 $180 \sim 200$  rpm, 培养 $10 \sim 13$  h至对数中期; 所述取对数中期的培养液接种至新鲜的NYDB培养基中的接种体积比为 $1\% \sim 2\%$ ; 所述继续培养的时间为 $18 \sim 20$  h。

3. 根据权利要求1所述异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途, 其特征在于, 所述离心的条件为:  $7500$  转/分钟, 时间 $10 \sim 15$  min。

4. 根据权利要求1所述异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途, 其特征在于, 所述打孔的孔径为 $5$  mm, 深度 $3$  mm; 所述一段时间为 $2$  h。

5. 根据权利要求1所述异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途, 其特征在于, 所述在孔中注入异常威克汉姆酵母酵母菌悬液和灰葡萄孢霉孢子悬浮液的体积均为 $20$   $\mu\text{L}$ 。

6. 根据权利要求1所述异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途, 其特征在于, 所述的NYDB培养基为: 酵母膏 $5$  g, 葡萄糖 $10$  g, 牛肉浸膏 $8$  g, 蒸馏水定容至 $1000$  mL, pH自然,  $115^\circ\text{C}$  灭菌 $20$  min。

## 异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于果蔬采后病害生物防治领域,具体涉及一株异常威克汉姆酵母用于番茄采后病害防治及贮藏保鲜的用途。

### 背景技术

[0002] 番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)又叫西红柿,是茄科番茄属植物,现作为食用蔬果全世界范围内广泛栽培。番茄果皮光滑,果肉细腻多汁,肉质呈橘黄色或鲜红色,风味酸甜适口并具浓郁香味。番茄还有养阴凉血的功效,能补充胡萝卜素、维生素C和维生素E等多种营养元素。煮熟后食用,所含的番茄红素和其他抗氧化剂含量会显著上升,起到降低心脏病的风险、抗癌、抗衰老并起到提高人体免疫力的作用,适宜各类人群食用。但另一方面,因番茄果实水份含量大、表皮十分脆弱,极易受到碰撞、挫伤等机械损伤,所以采后运输、储藏和货架期极易受到病原菌的侵染,病原菌侵染后,果肉易软化腐烂,造成严重的经济损失。其中由灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)引起的番茄采后灰霉病是番茄采后的主要病害,灰葡萄孢霉属于腐生营养型病原菌,可通过果实表面气孔及伤口侵入组织内部,形成病斑,并进一步造成果实腐烂变质。

[0003] 番茄采后灰霉病引起的损失已成为全球性问题,长期以来,控制番茄采后病害的方法主要有物理控制方法和化学控制方法。物理方法是利用一些物理因素,如温度、湿度、气体成分等一些对人体不产生危害的因素来抑制病原菌生长或者诱导果蔬抗病性来控制番茄采后病害的一种方法。物理控制方法主要有气调贮藏,低温贮藏,人工挑选,高压清洗,热处理,微波处理和辐照处理等。气调贮藏和低温贮藏通过调控番茄的贮藏条件,防止病原菌的侵害,但是所需要的设备大,成本也较高。人工挑除病果,果实用高压水枪进行清洗,需要耗费大量的人力,对设备也有一定要求,且后续储藏过程中也不能避免病原菌的侵染,效果一般。热处理能有效杀死病原菌,减少果实的腐败变质,但是大大降低了果实口感及营养。微波处理和辐照处理等方法对机械设备要求高且不能完全防止病原菌对果实侵染。化学方法是指利用天然化合物以及化学杀菌剂等化学物质处理,直接杀死病菌细胞或抑制病原微生物的繁殖衍生控制番茄采后病害的一种方法。化学杀菌剂因其作用机理清楚、效价高,低价,使用方便等特点而被广泛运用,但是化学杀菌剂的广泛使用已经对环境造成了极大的污染,并且化学杀菌剂残留问题也对人与动物的健康构成了严重的威胁。近些年,人们越来越注意环境以及食品安全问题,限制了化学杀菌剂的运用。

[0004] 国内外研究表明,许多对人体无害的拮抗微生物包括拮抗细菌、拮抗酵母和拮抗霉菌可以用以防治病原菌引起的采后病害。生物防治方法既安全高效,且能保护环境,被认为是最有安全、高效、经济的方法。相关文献报道,候晓丹等人筛选出了一株枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* BS1.25,接种菌液能显著降低番茄灰霉病的发病率和病斑直径。王笑笑等人筛选到一株膜醭毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*),对灰葡萄孢菌有良好的抑制效果。但是生物防治方法仍处在一个发展阶段,国内外相关研究也处于探索、起步时期,相关研究的不全面、不深入,利用酵母控制番茄采后病害鲜有报道,而且防控效果有待进一步

提高。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种分离自生态果园的土壤,能够高效控制番茄采后病害的酵母菌株异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*),利用该菌显著降低番茄采后灰霉病的发生,降低番茄的腐烂率,从而达到贮藏保鲜的目的,减少采后病害造成的损失,具有潜在的应用价值。本发明使用的异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*),已经ICR小鼠急性毒性试验,确定其具有高度安全性,对人体无害。

[0006] 本发明采用的技术方案:

[0007] 本发明所提供的控制番茄采后灰霉病的异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*),系从镇江市世业洲农业生态果园的土壤中筛选分离到的,在NYDA固体培养基平板上28℃培养,进行形态学观察;对该菌株的5.8S rDNA-ITS区序列分析,进行分子生物学鉴定。

[0008] 本发明所提供的降解展青霉素的菌株,现保藏于位于武汉市武昌区八一路珞珈山的中国武汉武汉大学的中国典型培养物保藏中心(CCTCC),具体信息如下,保藏日期为2018年1月24日,保藏编号为:CCTCC NO:M 2018053,建议的分类命名为异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)。

[0009] 首先将异常威克汉姆酵母活化,然后用NYDB培养基培养异常威克汉姆酵母至对数中期,再取对数中期的培养液接种至新鲜的NYDB培养基中继续培养,达到稳定期后,离心得到菌体,接着用无菌水洗涤、离心;重复洗涤、离心步骤数次后,得到的菌体再用无菌水稀释成浓度为 $1 \times 10^8$  cells/mL的酵母菌悬液;在番茄表面用灭菌的打孔器进行打孔,然后在每孔分别注入适量体积的酵母菌悬液,一段时间后在每孔分别接种与酵母菌悬液等体积的灰葡萄孢霉孢子悬浮液,其浓度为 $1 \times 10^5$  spores/mL,实现对灰葡萄孢霉孢子引起灰霉病的有效防治;

[0010] 或者不对番茄进行处理,保持番茄的自然状况放入塑料筐中,将浓度为 $1 \times 10^8$  cells/mL的酵母菌悬液均匀喷洒于番茄表面,待番茄自然风干后放入保鲜袋中,再置于塑料筐中,用保鲜膜密封后,于室温下存放,即可实现对番茄采后灰霉病的防治及贮藏保鲜的用途。

[0011] 优选的,所述用NYDB培养基培养条件为:温度28℃,转速180~200rpm,培养10~13h至对数中期;所述取对数中期的培养液接种至新鲜的NYDB培养基中的接种体积比为1%-2%;所述继续培养的时间为18-20h。

[0012] 优选的,所述离心的条件为:7500转/分钟,时间10~15min。

[0013] 优选的,所述打孔的孔径为5mm,深度3mm;所述一段时间为2h。

[0014] 优选的,所述在孔中注入异常威克汉姆酵母YD酵母菌悬液和灰葡萄孢霉孢子悬浮液的体积均为20μL。

[0015] 优选的,所述的NYDB培养基(以1L计)为:酵母膏5g,葡萄糖10g,牛肉浸膏8g,蒸馏水定容至1000mL,pH自然,115℃灭菌20min。

[0016] 本发明的优点:

[0017] (1) 本发明所使用的异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)具有广谱抑

菌性,经急性经口毒性试验验证对人体无害,且目前尚未有在番茄上应用的报道,拮抗效果好可以显著抑制番茄采后灰霉病的发生,降低番茄采后自然腐烂率。

[0018] (2) 本发明所使用的异常威克汉姆酵母可以显著抑制番茄采后灰霉病的发生,降低番茄采后自然腐烂率,从而降低番茄采后病害所造成的损失,具备突出的效果。

[0019] (3) 本发明使用异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*), 可以代替化学杀菌剂防治果蔬采后病害,避免化学杀菌剂的使用对人体造成的危害,安全环保。

### 附图说明

[0020] 图1为异常威克汉姆酵母对番茄灰霉病的抑制效果。注:CK:无菌蒸馏水,即对照组;Y: $1 \times 10^8$  cells/mL的异常威克汉姆酵母菌悬液。不同字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。

[0021] 图2为异常威克汉姆酵母对番茄灰霉病腐烂直径的控制效果。注:CK:无菌蒸馏水,即对照组;Y: $1 \times 10^8$  cells/mL的异常威克汉姆酵母菌悬液。不同字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。

[0022] 图3为异常威克汉姆酵母在PDA上对灰葡萄孢霉的抑制效果。注:CK:无菌蒸馏水,即对照组;Y: $1 \times 10^8$  cells/mL的异常威克汉姆酵母菌悬液。不同字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ )。

### 具体实施方式

[0023] 通过借助以下实施实例将更加详细的说明本发明。以下实施例仅是说明性的,本发明并不受这些实施实例的限制。本发明使用的异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*) 为自行筛选,且也申请专利并获得授权,申请号为:CN201810419559.6。

[0024] 实施例1:

[0025] 异常威克汉姆酵母对番茄灰霉病的抑制效果。

[0026] (1) 酵母菌悬液的制备

[0027] 把斜面保存的酵母菌接种到装有已灭菌的50mLNYDB培养基的250mL三角瓶中,恒温28℃下180转/分钟培养13小时后,再取1mL发酵液于一个新的已灭菌的50mLNYDB培养基的250mL三角瓶中,将发酵液于7500转/分钟下离心10分钟后收集菌体,并用无菌水冲洗菌体两次;用血球计数板计数并将酵母悬浮液浓度调整至 $1 \times 10^8$  cells/mL,待用。

[0028] (2) 灰葡萄孢霉孢子悬浮液的制备

[0029] 从已在28℃下,经PDA培养基培养7天的灰葡萄孢霉平板上刮取孢子并悬浮于无菌水中,用血球计数板计数并调整浓度至 $1 \times 10^5$  spores/mL,待用。

[0030] 供试的番茄果实经过精细挑选,选择果实大小均匀一致,成熟度好,表面无擦伤等机械损伤和病虫害的果实。用无菌打孔器在番茄果实赤道处打3个大小均一的孔,番茄的表面伤口为5mm(直径)×3mm(深度)。每个伤口处等量加入20μL以下处理液:(1)  $1 \times 10^8$  cells/mL的异常威克汉姆酵母菌悬液;(2) 等量无菌蒸馏水。2h自然晾干后,再向番茄伤口处接种20μL的浓度为 $1 \times 10^5$  spores/mL的灰葡萄孢霉孢子悬浮液。自然晾干后,将果实放入塑料筐内,并用保鲜膜密封,恒温培养箱(温度,20℃;湿度,95%)中培养。每处理重复3次,每次重复12个果实。整个试验重复2次。经过4天的培养,记录果实发病率,以此评价异常威克汉姆对番茄灰霉病的抑制效果。

[0031] 发病率的计算公式如下：

[0032] 发病率(%) = 发病的果实/果实总数 × 100%。

[0033] 按照上述步骤试验,异常威克汉姆酵母对番茄灰霉病的抑制效果如图1所示。

[0034] 从图1可以看出,对照组,即未接种异常威克汉姆酵母的番茄过时的发病率在第4天为100%,而经异常威克汉姆酵母处理的番茄过时发病率为49%。即番茄人为接种灰葡萄孢霉菌孢子悬浮液前用异常威克汉姆酵母处理,与对照相比,经异常威克汉姆酵母处理的番茄发病率显著低于对照组 ( $p < 0.05$ )。结果表明,20℃条件下,针对高浓度的( $1 \times 10^5$  spores/mL)的灰葡萄孢霉菌孢子悬浮液,异常威克汉姆酵母能够有效控制由灰葡萄孢霉菌造成的番茄采后灰霉病,效果显著。

[0035] 实施例2:

[0036] 异常威克汉姆酵母对番茄灰霉病腐烂直径的控制效果。

[0037] 酵母菌悬液及灰葡萄孢霉菌孢子悬浮液的制备同实施例1。

[0038] 番茄预处理同上,经过4天的培养,记录果实腐烂直径,以此评价异常威克汉姆对番茄灰霉病腐烂直径的控制效果。

[0039] 按照上述步骤试验,异常威克汉姆酵母对番茄灰霉病腐烂直径的控制效果如图2所示。

[0040] 从图2可以看出,接种异常威克汉姆酵母的番茄果实的腐烂直径要显著小于未接种酵母的番茄果实的腐烂直径。对照组灰霉病引起的番茄腐烂,腐烂直径达到43mm时,接种异常威克汉姆酵母的番茄的腐烂直径仅为20mm,显著低于对照组 ( $p < 0.05$ )。结果表明,20℃条件下,异常威克汉姆酵母对番茄灰霉病腐烂直径有很好的控制效果。

[0041] 实施例3:

[0042] 异常威克汉姆酵母在PDA上对灰葡萄孢霉菌的抑制效果。

[0043] 酵母菌悬液及灰葡萄孢霉菌孢子悬浮液的制备同实施例1。

[0044] 在无菌培养皿内倒入40mL灭菌PDA培养基,凝固后,用无菌打孔器在培养皿中心打一个10mm的孔,每个孔中注入100μL浓度为 $1 \times 10^8$  cells/mL的异常威克汉姆酵母菌悬液。2h后,再将100μL的灰葡萄孢霉菌孢子悬浮液( $1 \times 10^5$  spores/mL)注入到每个孔中。等待2h后用保鲜袋将平板包裹,置于恒温恒湿培养箱(20℃,RH 95%)中培养,5d后观察霉菌的生长情况,测量病斑直径。每种处理包含3个平行,整个试验重复两次。

[0045] 按照上述步骤试验,异常威克汉姆酵母在PDA上对灰葡萄孢霉菌的抑制效果如图3所示。

[0046] 从图3可以看出,接种异常威克汉姆酵母的PDA上灰葡萄孢霉菌的菌落直径要显著小于未接种酵母的灰葡萄孢霉菌的菌落直径。对照组PDA平板上灰葡萄孢霉菌的菌落直径达到86mm时,接种异常威克汉姆酵母的PDA平板上灰葡萄孢霉菌的菌落直径仅为11mm。与对照相比,经异常威克汉姆酵母处理的PDA上灰葡萄孢霉菌的菌落直径显著低于对照组 ( $p < 0.05$ )。结果表明,20℃条件下,异常威克汉姆酵母对PDA上对灰葡萄孢霉菌菌落直径有很好的控制效果,能够很好的抑制灰葡萄孢霉菌在PDA上的生长。

[0047] 实施例4:

[0048] 异常威克汉姆酵母的保存。

[0049] 本发明所提供的异常威克汉姆酵母的培养方法,其特征是固体培养基采用NYDA固

体培养基,培养温度28℃,培养时间48h,所述培养基组成为牛肉浸膏8.0g,酵母浸膏5.0g,葡萄糖10.0g,琼脂20.0g,加蒸馏水至1000mL;液体发酵培养采用发酵培养基NYDB液体培养基,所述NYDB液体培养基组成除不含琼脂外,其他成分同培养基NYDA固体培养基;也可以使用马铃薯琼脂培养基:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂15~20g,蒸馏水1000mL,pH7.0~9.0。

[0050] 说明:以上实施例仅用以说明本发明而并非限制本发明所描述的技术方案;因此,尽管本说明书参照上述的实施例对本发明已进行了详细的说明,但是本领域的普通技术人员应当理解,仍然可以对本发明进行修改或等同替换;而一切不脱离本发明的精神和范围的技术方案及其改进,均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

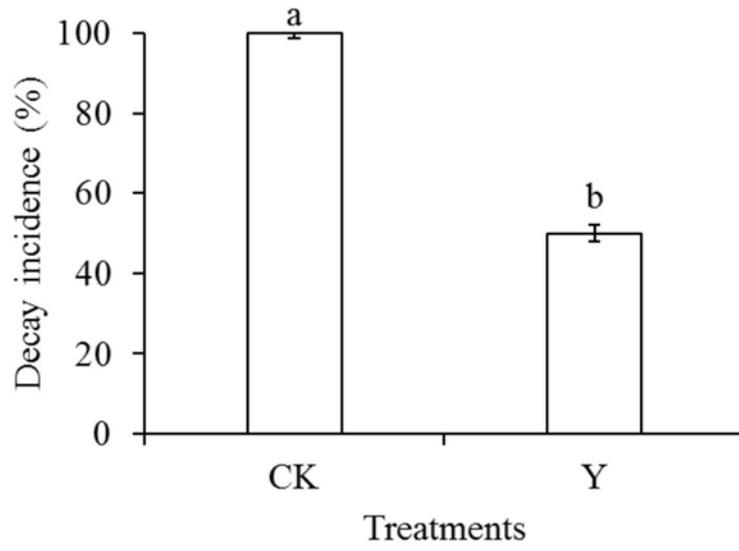


图1

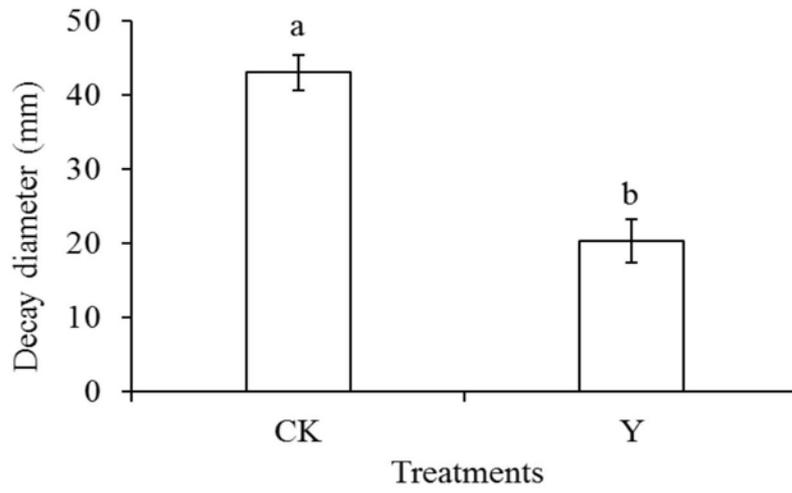


图2

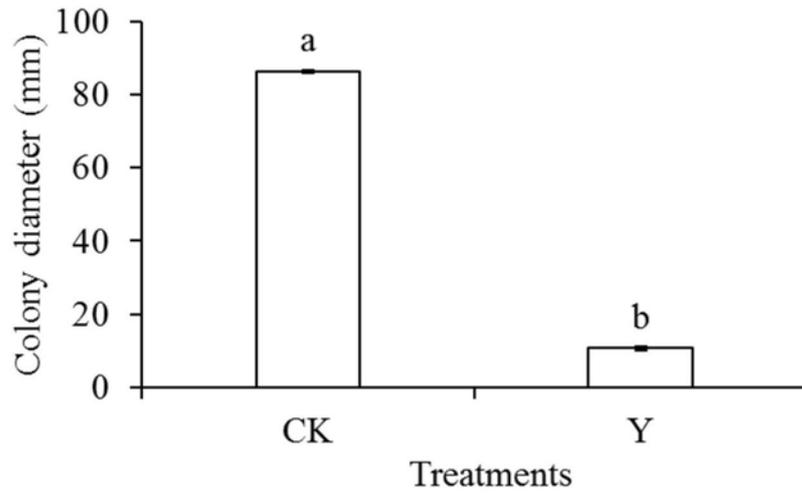


图3