

不同蒜素制剂对果实病原菌抑菌能力的研究

马惠玲 弓 弼 漆录平 李焕忠

(西北林学院园林系, 陕西杨凌 712100)

摘 要 通过抑菌圈测定得出, 不同工艺制取大蒜提取液的抑菌能力不同, 并与蒜素含量呈现一定的相关关系。以苹果青霉菌等 5 种果实病原菌为试材, 测出蒜素提取液、天然蒜精油和人工蒜素的最低抑菌浓度(MBC)为 $1.25 \sim 2.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑菌能力强于多菌灵和苯甲酸 2 倍以上。

关键词 天然抑菌剂, 蒜素制剂, 抑菌能力

中图分类号 S633.4, S436.611.12, S436.661.19

由病原菌侵染引起腐烂是果实采后损失的主要原因, 现行有效控制这些病害的方法是用以苯并咪唑等一类药剂为代表的化学杀菌剂处理, 而这些制剂的残留毒性使人们拒绝把它们直接用于采后鲜食的果实。于是高效、无毒的天然杀(抑)菌剂成为采后保鲜工作者们寻求的目标。蒜素是大蒜瓣和蒜精油中含硫化合物的总称, 具有不同程度的杀(抑)菌作用, 被誉为天然杀(抑)菌剂。蒜瓣被破碎、挤压时, 由蒜氨酸与蒜苷酶接触在磷酸吡哆醛催化下转化形成一类杀(抑)菌力最强的烯丙基二硫和三硫化物(亦称为大蒜新素)。它已被人工合成, 并正在被医学上用作广谱的抗菌, 消炎药物^[1-3]。继发现了大蒜浸出液对果实病原菌有较强的抑菌能力后^[4], 作者又系统研究了这种人工蒜素和天然蒜素抑菌能力的差别, 以期选择最经济有效的蒜素制剂作为果实防腐剂。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大蒜 杨凌市售紫皮大蒜, 贮存 3 个月。

供试菌种及来源 苹果炭疽病菌(*Gloeosporium fructigenum*)由西北农业大学果树病理组提供。苹果青霉病菌(*Penicillium expansum*)、苹果褐腐病菌(*Monilinia fructigena*)、柑桔青霉病菌(*Penicillium italicum*)、柑桔绿霉(*Penicillium digitatum*)为自备^[4]。

PDS 培养基 适于植物病原菌的分离和培养。

1.2 蒜素制剂类型与来源

提取液制备 精蒜瓣, 加 2 倍 $0.4 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇, 按不同试验条件打浆, 4000 r/min 离心取上清液, 得各种提取液。

天然蒜精油 精蒜瓣 打浆(破碎)至 $2 \sim 3 \text{ mm}$ 大小颗粒 加 2 倍水 水蒸汽常压蒸馏 2 h 分取油层, 无水硫酸钠脱水 称重。

收稿日期 1997-08-18

课题来源 林业部“天然系列果蔬保鲜剂研究”项目

作者简介 马惠玲, 女, 1963 年生, 讲师, 硕士

其他制剂和药品 人工合成蒜素,上海三维医药公司生产;25%可湿性多菌灵粉剂,湖北沙隆达股份有限公司蕲春农药厂出品;苯甲酸钠,西安化学试剂厂出品,化学纯。

1.3 分析与测定方法

蒜素含量测定 硝酸汞沉淀滴定法^[5]。

最低抑菌浓度(MBC)^[6]测定 分三步操作:①制备含不同浓度杀菌剂的平板培养基,无菌条件下,于稍凉又尚未凝固的PDS培养基内加入一定量的抑菌剂(天然和人工蒜油需先乳化,再加入),混匀,制成 $0.5 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度梯度培养基;②菌悬液的配制:于菌苔生长旺盛处挑取2环针,用无菌水调配成含孢子 4×10^9 个/L菌悬液;③接种培养:吸取菌悬液0.2 mL,加入含不同浓度杀(抑)菌剂培养皿中,刮平,28℃恒温箱中培养5 d,找出一直未长菌的培养皿中含杀(抑)菌剂浓度最低者,其对应浓度即为最低抑菌浓度。

抑菌圈测定 $\Phi 10 \text{ mm}$ 滤纸,浸沾各号提取液后,贴于接有苹果青霉菌悬液的培养皿中,每皿3片,重复3次,28℃培养48~60 h,量取抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 不同浸提工艺对大蒜浸提液蒜素含量及抑菌作用的影响

用于杀(抑)菌的大蒜素提取时,提取条件应考虑:①是否有利于大蒜素的形成;②浸提溶剂是否得当,在前人选定的 $0.4 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇^[7,8]下,作者对其他工艺参数作了限定。

破碎时间(A):本研究所用打浆机,需约30 s以上方能将蒜瓣打成2~3 mm均匀颗粒,便于提取,因此,设10 s(1)、30 s(2)和50 s(3)三种时间进行筛选。

浸提液pH值(B):据报道,蒜酶作用的有效pH值为5~8^[9],设定pH5.5(1)、6.5(2)和7.5(3),以选择最佳pH值。

破碎温度(C):室温25(1)、35(2)、45(3)。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验

编 号	因素组合	蒜素含量(Y_1) ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑菌圈 Φ (Y_2) (mm)
1	$A_1B_1C_1(A \times C)_1$	1.625	13.5
2	$A_1B_2C_2(A \times C)_2$	2.030	14.5
3	$A_1B_3C_3(A \times C)_3$	2.755	16.0
4	$A_2B_1C_2(A \times C)_3$	2.165	11.5
5	$A_2B_2C_3(A \times C)_1$	2.875	16.3
6	$A_2B_3C_1(A \times C)_2$	2.300	16.0
7	$A_3B_1C_3(A \times C)_2$	2.435	18.5
8	$A_3B_2C_1(A \times C)_3$	2.840	17.0
9	$A_3B_3C_2(A \times C)_1$	2.300	14.7
10*	$A_3B_2C_3(A \times C)_3$	2.890	21.5

* 为正交组合之外的补充试验。

以上3因素,加上A与C交互项,构成4因子3水平,按 $L_9(3^4)$ 正交试验得到9种提取液。它们的蒜素含量与抑菌圈大小不尽相同(见表1)。以蒜素含量为指标正交分析(表2)得出, $A_3B_2C_3(A \times C)_3$ 为最优组合,而正交试验表中没有出现这一组合,故进行了补充

试验 10 的测定, 结果验证了这一组合的最优性。10 种提取液的抑菌圈值与蒜素含量呈正相关, 相关系数 $r = 0.6687 (r_{(0.05, 7)} = 0.6644)$, 达 0.05% 显著水平。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验的结果分析

因素	Y_{11}	Y_{12}	Y_{13}	R	优水平	次要因素
A	6.410	7.350	7.575	1.165	A_3	$C > (A \times C) > A > B$
B	6.225	7.745	7.355	1.130	B_2	$C > (A \times C) > A > B$
C	6.770	6.495	8.065	1.570	C_3	
$(A \times C)$	6.225	6.765	7.760	1.535	$(A \times C)_3$	

由于上述正交试验选出 A、C 两因素的优水平均为设定中最高的水平 3, 不足以说明这是各自的最佳水平, 因此, 再设定 $A_4(70\text{ s})$ 、 $A_5(90\text{ s})$; $C_4(55^\circ)$ 、 $C_5(65^\circ)$ 进一步试验(表 3), 得到 4 种提取液的蒜素含量反映出, 在破碎时间大于 50 s, 破碎温度高于 45 后, 蒜素得率不再提高, 呈高水平下平稳的趋势。抑菌圈则随 45 以上温度升高和破碎时间的延长而减小。11~14 号提取液的蒜素含量抑菌能力间未表现任何相关关系。

表 3 蒜瓣破碎时间和温度更高水平的组合试验

试验号	因素组合	蒜素含量(Y_1) ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	抑菌圈 Φ (Y_2) (mm)
11	$A_4B_2C_4$	2.870	16.8
12	$A_4B_2C_5$	2.840	12.0
13	$A_5B_2C_4$	3.040	14.5
14	$A_5B_2C_5$	2.670	11.0

2.2 不同处理对蒜精油产率的影响

采用添加辅助剂打浆和对浆液冷热处理均比对照提高了蒜精油产率(表 4)。虽然加催化剂磷酸吡哆醛获得了最高产值, 但该试剂价格昂贵, 相对于增产率仅比其他处理高 0.1~0.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 来说不经济, 而卵磷脂价格适中, 且比其他处理增产 0.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上, 可酌情使用。

表 4 不同预处理对蒜精油产率的影响

打浆时处理		打浆后处理		无预处理
加 1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的卵磷脂	加 1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 磷酸吡哆醛	50 下保温 3 h	-24 冷冻 12 h	
3.5	3.6	3.1	3.1	2.4

2.3 蒜素液最低抑菌浓度的测定与比较

为了找出不同方式制取的蒜素抑菌有效性的差别, 特对蒜素提取液、天然蒜精油、人工蒜素的最低抑菌浓度(MBC)进行了测定, 并与果树上常用的化学杀菌剂多菌灵, 以及食品上常用的防腐剂苯甲酸钠的 MBC 对照比较。在 5 种供试菌种上一致得出, 3 种来源蒜素的 MBC 值均在 1.25~2.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 5), 而多菌灵的 MBC 为 4.25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 苯甲酸钠为 4.50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。

表 5 各种杀(抑)菌剂(液)对 5 种果实病原菌的 MBC 测定

g · L⁻¹

种 类	浓 度	柑桔青霉	柑桔绿霉	苹果青霉	苹果炭疽病菌	苹果褐腐病菌
蒜素提取液	1.00	++	+++	+++	+++	++
	1.25	-	-	++	+	+
	1.50	-	-	-	-	-
	1.75	-	-	-	-	-
	MBC	1.25	1.25	1.50	1.50	1.50
天然蒜精油	1.25	++	+++	+++	+++	++
	1.50	-	++	++	+	+
	1.75	-	-	-	-	-
	2.00	-	-	-	-	-
	MBC	1.50	1.75	1.75	1.75	1.75
人工蒜素	1.25	+	++	++	++	++
	1.50	-	+	++	+	+
	1.75	-	+	-	+	+
	2.00	-	-	-	-	-
	MBC	1.50	2.00	1.75	2.00	2.00
多菌灵	4.00	+	+	+	+	+
	4.25	-	-	+	+	-
	4.50	-	-	-	-	-
	> 4.75	-	-	-	-	-
	MBC	4.25	4.25	4.50	4.50	4.50
苯甲酸钠	4.25	+	+	+	+	+
	4.50	-	+	+	-	+
	4.75	-	-	-	-	+
	5.00	-	-	-	-	-
	MBC	4.50	4.50	4.75	4.50	5.00

注: + 表示有菌生长; ++ 表示菌生长更多; 依次类推; - 表示无菌生长。

3 讨 论

3.1 提取液的蒜素含量与其抑菌圈大小的关系

孙君社等^[9]研究得出 55 可钝化蒜苷酶。本文第 1~10 号液在 45 以下破碎得到, 在蒜苷酶正常作用下各号液中可能含有相似的蒜素成分。它们抑菌能力的大小取决于这些成分提出量的多少, 表现出各号提取液的抑菌能力与蒜素的含量呈正相关。第 11~14 号提取液均在 55 以上破碎得到, 可能因蒜苷酶失活, 使破碎时转化形成的、杀(抑)菌力强的大蒜新素生成量减少, 导致它们蒜素总量虽与 10 号液接近, 抑制效果却大大减弱。这种蒜素含量与抑菌能力的关系还有待于把总蒜素与大蒜新素含量作分别测定后进一步确定。

3.2 蒜素用于果实杀菌剂的可行性

从 3 种来源蒜素都获得了比多菌灵和苯甲酸钠强的抑菌效果, 可以肯定, 蒜素作为一种天然的杀(抑)菌剂用于果实防腐具有广泛的潜力。浸提法制取蒜素液后, 余渣尚可制做蒜蓉、蒜粉等, 便于大蒜综合利用^[7,9], 适于大蒜原料产地使用。天然蒜精油产率较低, 以本研究最佳处理 0.36% 计算, 原料投入产出比为 280 1。且提油后残渣一般废弃^[10], 使蒜油生产成本更为昂贵, 不宜作大规模提取应用。相比之下, 200~300 元/kg 的人工蒜素

(油) 较为经济适用。

4 结 论

1) 浸提法提取蒜素的最佳条件为: 45 ℃, pH6.5, 破碎 50 s。

2) 蒸馏提取蒜精油的最可行的预处理方式为: 打浆时加 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 卵磷脂, 可把精油产率由 $2.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (不处理) 提高到 $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

3) 蒜素溶液的最低抑菌浓度 (MBC) 受病原菌种类和蒜素制取途径的影响程度不同。同种途径所得蒜素的 MBC 在不同供试菌种上趋于一致, 不同来源蒜素的 MBC 以浸提液最小, 人工蒜素最大, 天然蒜精油居中, 但增幅仅为 0.075%, 实际中可根据方便程度互相替代使用。

4) 蒜素的最低抑菌浓度 (MBC) 为多菌灵和苯甲酸的 2 倍以上, 是一种高效的病原菌抑制剂。

参 考 文 献

- 1 于新蕊, 从月珠. 大蒜的化学成分及其药理作用研究进展. 中草药, 1994(3): 158~160
- 2 郎彝江, 张不远. 大蒜有效成分的研究. 中草药, 1981(1): 4~7
- 3 王 杰. 大蒜和洋葱的风味化学. 食品科学, 1987(2): 41~43
- 4 马惠玲, 李晓明, 孙 强等. 大蒜浸出液对几种果实病原菌杀(抑)菌效力的研究. 西北林学院学报, 1997, 12(4): 76~79
- 5 张维勤. 大蒜及制剂中大蒜素的含量测定. 中草药, 1985(10): 17~19
- 6 毛跟年. 大蒜抗霉菌作用的研究. 畜牧兽医杂志, 1994(4): 19~20
- 7 岳田利. 大蒜素液生产工艺试验. 西北农业大学学报, 1990(4): 111~114
- 8 岳田利. 大蒜脱臭工艺参数研究. 西北农业大学学报, 1993(3): 94~97
- 9 孙君社, 郑 晖, 周 洋等. 大蒜脱臭和无臭蒜汁的研究. 食品科学, 1995(2): 21~24
- 10 黄祥贤, 王辛强, 茅 勤等. 提高大蒜出油率研究. 中草药, 1989(1): 17~19

Bactericidal Effects of Different Allicin Agents on Fruit Fungi

Ma Huiling Gong Bi Qi Luping Li Huanzhong

(Department of Architecture, Northwestern Forestry College, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract It was derived from bactericidal circle method that the bactericidal capacities of the garlic extracting produced by different technical conditions were differently correlated to allicin content at certain degrees. The minimum bactericidal contents (MBC) to five fruit fungi of the extract, garlic essential oil, and synthetic garlic oil were $1.25\text{--}2.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ which were less than half of the Bavistin and Sodium benzoic acid.

Key words natural bactericidal agent, Allicin preparation, bactericidal capacity