

• 研究论文 •

纳他霉素对冬枣浆胞病菌的毒力及保鲜生理效应研究

王建国, 姜兴印*, 张鹏

(山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 研究了不同浓度纳他霉素对冬枣浆胞病菌 *Alternaria Nees ex Wallr.* 的室内毒力以及对冬枣低温贮藏期间生理生化指标的影响。结果表明, 纳他霉素对冬枣浆胞病菌的 EC₅₀ 和 EC₉₀ 值分别为 39.56 和 208.48 mg/L, 与对照药剂咪鲜胺、异菌脲相比, EC₉₀ 值无显著差异; 经 500~1 000 mg/L 的纳他霉素处理可显著抑制冬枣丙二醛 (MDA) 含量的增加, 并使多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 与苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的活性提高, 对保持果实硬度有很好的效果, 并且抑制了可溶性固形物、抗坏血酸 (Vc) 含量的下降。经 1 000 mg/L 纳他霉素处理的冬枣贮藏到 60 d 其商品率达 87.3%, 高于对照组的商品率 (72.9%); 贮藏到 100 d 其商品率仍可达到 75.0%, 显著高于对照组 (50.2%)。

关键词: 纳他霉素; 浆胞病菌 (*Alternaria Nees ex Wallr.*); 毒力; 生理效应; 冬枣

中图分类号: S482.295

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)04-0313-06

The Toxicity of Natamycin to *Alternaria Nees ex Wallr.* and Physiological Activity of Fresh-keeping Dong Jujube Using Natamycin Treatments

WANG Jian-guo, JIANG Xing-yin*, ZHANG Peng

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract The toxicity of natamycin to *Alternaria Nees ex Wallr.* was tested in laboratory and the effects on physiological activities and biochemical attributes of Dong jujube fruit during low temperature storage were studied, and suitable concentration for storage of Dong jujube fruit were screened. The results showed that the EC₅₀ and EC₉₀ value of natamycin to *Alternaria Nees ex Wallr.* were 39.56 and 208.48 mg/L, respectively. The EC₉₀ value of natamycin showed no significant differences with that of iprodione and myclobutanil. Natamycin at 500~1 000 mg/L could inhibit the fortification of MDA, increase the activity of PG and PAL, and it had the best effects on keeping the firmness and inhibit the decline of soluble solid content and Vc content of Dong jujube. After treated with natamycin and stored for 60 and 100 days, the commodity rate of Dong jujube were 87.3% and 75.0% respectively, which were significantly higher than those of the control.

Key words natamycin, thick liquid disease fruit (*Alternaria Nees ex Wallr.*); toxicity, physiological activity, Dong jujube

收稿日期: 2006-08-10 修回日期: 2006-11-10

作者简介: 王建国 (1982-), 男, 硕士研究生, E-mail: wangjg@sdau.edu.cn; * 通讯作者: 姜兴印 (1967-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为农药毒理及农业有害生物无公害控制。联系电话: 0538-8241897 E-mail: xyjiang@sdau.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

冬枣是深受人们欢迎的鲜食水果^[1],但由于其组织结构特殊,采后生理变化复杂,贮藏期间易褐变、酒化和腐烂,并伴有维生素C大量损失,一般常温下4~5 d便失去商品价值,冷库也只能贮藏50~60 d,且贮后好果率低,商品化程度不高^[2,3],因此保鲜期长短是制约冬枣生产的重要因素,研究冬枣采后的保鲜技术具有十分重要的意义。

纳他霉素(natamycin)是纳他尔链霉菌*Streptomyces natalensis*经发酵得到的一种次级代谢产物,属多烯大环内酯类抗真菌剂^[4]。研究表明,人体口服500 mg纳他霉素后,其在血液中的含量极少^[5];经降解处理后的纳他霉素在急性毒理、短期毒性试验中均未发现其对动物有损害^[6]。纳他霉素对酵母菌和霉菌具有专性抑制作用^[6,7],且有良好的理化稳定性,被广泛用作食品防腐剂和抗菌添加剂^[8,9],但有关其在果蔬保鲜上的应用研究尚未见报道。作者以常用保鲜剂咪鲜胺、异菌脲和腈菌唑为对照药剂,测定了纳他霉素对冬枣贮藏期致病菌的室内毒力;并通过低温保鲜贮藏系统测定了果实硬度、可溶性固型物、可滴定酸含量、Vc含量、丙二醛(MDA)含量以及多聚半乳糖醛酸酶(PG)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性;对冬枣贮藏末期的好果率和商品率进行了调查统计。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 枣果 于2004年10月在山东省东营市河口区选择10年生健壮冬枣树,采集成熟度为果面1/4红的优质枣果*Ziziphus jujube* Mill var Dongzao,单果重18~20 g,无病害,采后18 h在(0±0.5)℃冷库预冷48 h,按试验设计处理完毕后置于冷藏库贮藏。

1.1.2 供试药剂 95%纳他霉素(natamycin)原药(北京东方瑞德生物技术有限公司生产);97%咪鲜胺(prochloraz)原药(山东华阳农药股份有限公司);95%异菌脲(iprodione)原药(浙江禾益农化有限公司);95%腈菌唑(myclobutanil)原药(山东联合农药公司);有效成分质量分数为25%的纳他霉素(myclobutanil)可湿性粉剂及25%咪鲜胺(prochloraz)乳油(实验室按常规方法加工样品)。

1.2 药剂浸果试验处理

将25%纳他霉素可湿性粉剂和25%咪鲜胺乳油分别稀释成有效成分含量为250、500、1 000 mg/L和250、500 mg/L的药液,将预冷48 h的冬枣分别于各浓度药液中浸泡3 min后捞出,自然晾干后分别装入双层PE塑料袋(膜厚0.04 mm,长80 cm,宽50 cm),每袋装果1.0 kg,将处理后的枣果置于(0±0.5)℃冷库中贮藏。以未经处理直接入库贮藏的冬枣为对照。

1.3 冬枣病原菌的分离、纯化和鉴定

取症状典型的病果经酒精消毒后,于无菌条件下用消毒解剖刀在果实病斑中部纵切一刀,用接种针挑取一小块病果果肉组织,接种于PDA平板培养基上,28℃恒温培养72 h。待长出菌落后,再挑取目标菌落边沿部分接种到新的PDA平板培养基上,依此接种多次,直至培养出纯化的目标菌落。依据文献^[10~13]进行鉴定。再将分离的病原菌接种到无病的枣果上,能够正常发病,将病斑按以上相同方法分离、纯化,得到相同的病原菌。初步认定该病原菌为交链孢霉属(*Alternaria* Nees ex Wallr.)。

1.4 测定方法

初始指标的测定于采收后当日进行;贮藏过程中每隔20 d测定一次,每次随机抽取枣果15个,重复3次。

采用改进的生长速率法^[14]进行毒力测定;用GY-1型果实硬度计法^[15]测定果实硬度。可溶性固形物含量采用WYT型手持糖度仪测定^[15];抗坏血酸(Vc)含量用2,6-二氯靛酚钠盐法测定^[16];可滴定酸含量采用酸碱滴定法测定^[16];多聚半乳糖醛酸酶(PG)测定参照韩雅珊的方法^[15];丙二醛(MDA)含量测定用硫代巴比妥酸法测定^[16];苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定参照李合生的方法^[16];商品率(%)=(一级果+好果)/(一级果+好果+二级果)×100,好果—无任何损伤、无凹陷,一级果—轻度损伤、凹陷,果实硬度较好,仍可食用,二级果—较严重损伤,不能食用^[17]。

1.5 数据处理与分析

试验数据采用Excel 2003软件进行方差分析和F检验,多重比较采用Duncan新复极差测验,成对数据比较采用t检验。显著水平取P=0.05(差异显著)或0.01(差异极显著)。文中所有数值均从冬枣预冷48 h后计起,即从处理之日起。

2 结果与分析

2.1 纳他霉素对病原菌的毒力

由表 1 的结果看出, 供试的 4 种药剂对浆胞病病原菌都具有较好的抑制效果, 其中咪鲜胺效果

最好, EC_{50} 值为 9.81 mg/L , 其次为异菌脲, 纳他霉素的 EC_{50} 值为 39.56 mg/L , 腈菌唑的抑菌作用最差。由 EC_{90} 值和置信限看出, 纳他霉素与咪鲜胺和异菌脲相比无显著差异。

Table 1 Toxicity of fungicides to *Alternaria Nees ex Wallr*

Fungicide	Regression equation	EC_{50} (95% CL) / (mg/L)	EC_{90} (95% CL) / (mg/L)
N atamycin	$Y = 2.3320 + 1.6703x$	39.56 (35.74~44.71)	208.5 (201.6~220.2)
Prochloraz	$Y = 3.7011 + 1.3098x$	9.809 (8.146~12.28)	197.4 (193.2~211.5)
Iprodione	$Y = 3.6464 + 1.5012x$	15.64 (14.98~16.21)	198.0 (192.9~219.3)
Myclobutanil	$Y = 1.9638 + 1.7458x$	54.84 (50.35~62.13)	297.3 (290.1~321.5)

2.2 不同处理对冬枣硬度的影响

果实硬度大小可以反映其品质的优劣。由表 2 可以看出, 药剂处理能很好地保持果实硬度。贮藏到 100 d, 各药剂处理组与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。纳他霉素 250 mg/L 处理组效果稍差, 与咪鲜胺处理组差异显著 ($P < 0.05$)。其他各处理间差异不显著。

Table 2 Effect of different fungicides on firmness of Dong jujube fruit^{*}

Fungicides	Treatments	Fruit firmness/(kg/cm ²)
N atamycin	250	10.4 ± 0.4 b
	500	11.2 ± 0.5 ab
	1 000	11.4 ± 0.4 ab
Prochloraz	250	11.5 ± 0.3 a
	500	11.9 ± 0.4 a
CK		8.6 ± 0.2 c

* Data are the means of measuring values of 5 Dong jujube fruits after 120 days of storage. The same letters represent no significant difference at $P < 0.05$. The different letters indicate significant difference at $P < 0.05$. Initial firmness was 13.9 kg/cm^2 . The same as below.

2.3 不同处理对冬枣可溶性固形物及抗坏血酸 (Vc) 含量的影响

枣果中可溶性固形物主要是可溶性糖, 其含量高低是评价果实质量好坏的重要指标。由图 1(A)看出, 药剂处理显著抑制了冬枣果实中可溶性固形物含量的下降。贮藏到 100 d, 咪鲜胺 500、250 mg/L, 纳他霉素 1 000 mg/L 与对照组之间差异极显著 ($P < 0.01$)。纳他霉素 500、250 mg/L 处理效果稍差, 但与对照组相比, 仍显著抑制了冬

枣可溶性固形物的下降。

由图 1(B)看出, 入贮最初 20 d, Vc 含量呈上升趋势, 20 d 以后开始下降, 咪鲜胺和纳他霉素均能很好地抑制 Vc 含量的下降。贮藏到 60 d, 咪鲜胺、纳他霉素处理均很好地抑制 Vc 含量的下降, 各处理组与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。贮藏到 100 d, 各处理组与对照组之间差异极显著 ($P < 0.01$)。纳他霉素 1 000 mg/L 处理与咪鲜胺 250、500 mg/L 处理差异不显著; 纳他霉素 250、500 mg/L 处理比咪鲜胺处理效果稍差。

2.4 不同处理对冬枣可滴定酸及丙二醛 (MDA) 含量的影响

如图 2(A) 所示, 冬枣的可滴定酸含量经历了一个先上升后下降的过程, 不同药剂处理对冬枣可滴定酸含量的影响不大。贮藏到 100 d 测定, 各处理之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

丙二醛 (MDA) 是膜脂过氧化作用的最终产物, 也是评价膜脂过氧化程度的重要指标, 其含量的增多是由活性氧代谢失调和积累造成的, 过多的 MDA 不仅能破坏细胞膜结构的完整性, 而且是果实衰老的标志^[18]。由图 2(B) 可以看出, 贮藏过程中冬枣的丙二醛 (MDA) 含量均呈不断上升趋势, 贮藏到 100 d, 纳他霉素与咪鲜胺处理均显著抑制了丙二醛含量的增加 ($P < 0.01$), 咪鲜胺与纳他霉素处理组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.5 不同处理对冬枣多聚半乳糖醛酸酶 (P) 活性及 PAL 活性的影响

果实的软化及货架寿命与细胞壁水解酶的活性, 尤其与多聚半乳糖醛酸酶的活性密切相关^[16~19]。如图 3(A) 所示, 贮藏过程中冬枣 PG 活性呈不断下降趋势, 相比较而言, 处理组下降得要

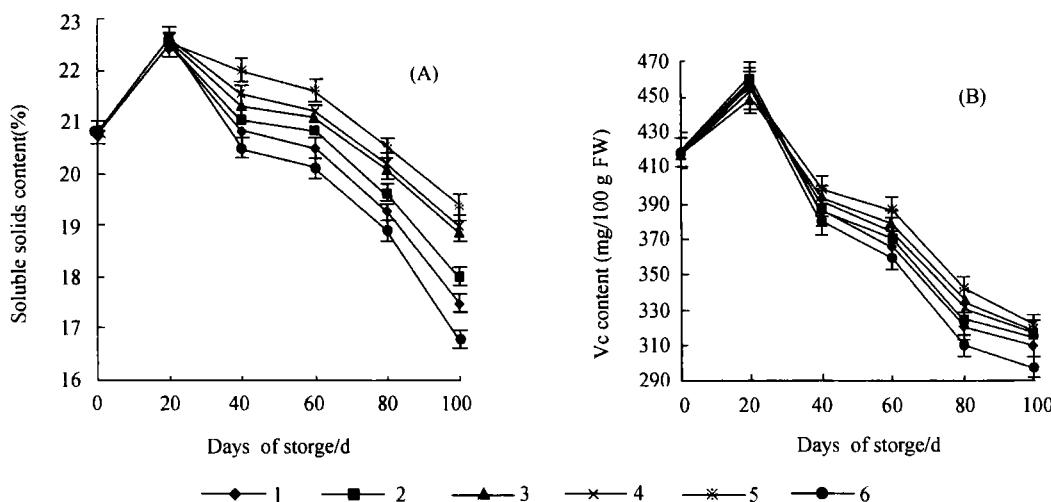


Fig. 1 Effect of different fungicide on soluble solids content (A) and Vc content (B) of Dong jujube fruit

1-Natamycin 250 mg/L, 2-Natamycin 500 mg/L, 3-Natamycin 1000 mg/L, 4-Prochloraz 250 mg/L,

5-Prochloraz 500 mg/L, 6-CK. The same as in the following figures

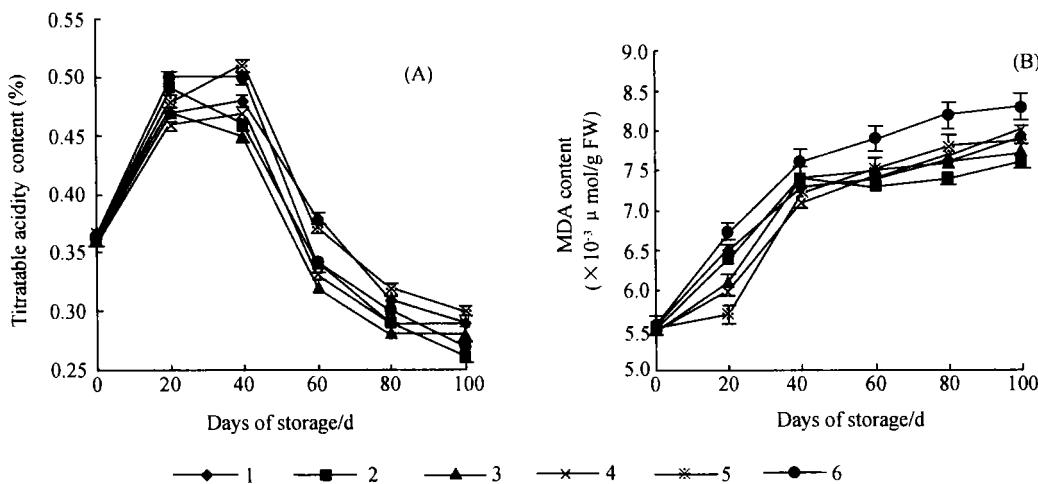


Fig. 2 Effect of different fungicide on titratable acidity content (A)

and MDA content (B) of Dong jujube fruit

缓慢一些。贮藏到 100 d 纳他霉素、咪鲜胺处理和对照之间差异极显著 ($P < 0.01$)，纳他霉素与咪鲜胺处理之间差异不显著。

PAL活性被认为是抗病指标之一，它是苯丙烷类次生代谢的限速酶^[16]。由图3(B)可以看出，在冬枣贮藏到40 d时，药剂处理组PAL活性明显高于对照，差异极显著 ($P < 0.01$)。贮藏到100 d，药剂处理组PAL活性仍显著高于对照组。但各药剂处理组之间差异不显著。

2.6 不同处理对冬枣保鲜效果的影响

由表3可知：采后贮藏30 d后，对照组与药剂

处理组之间好果率无差异；贮藏至60 d，咪鲜胺500 mg/L处理组商品率高达90%，纳他霉素1000和500 mg/L处理分别达到了87.3%和85.1%，各处理与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)；贮藏至100 d，纳他霉素各处理组的商品率依次为69.8%、72.2%、75.0%，咪鲜胺处理组分别为75.7%和83.2%，显著高于对照组的50.2%。说明纳他霉素与咪鲜胺都有很好的保鲜效果。综合考虑，认为纳他霉素500~1000 mg/L是比较适宜的保鲜浓度。

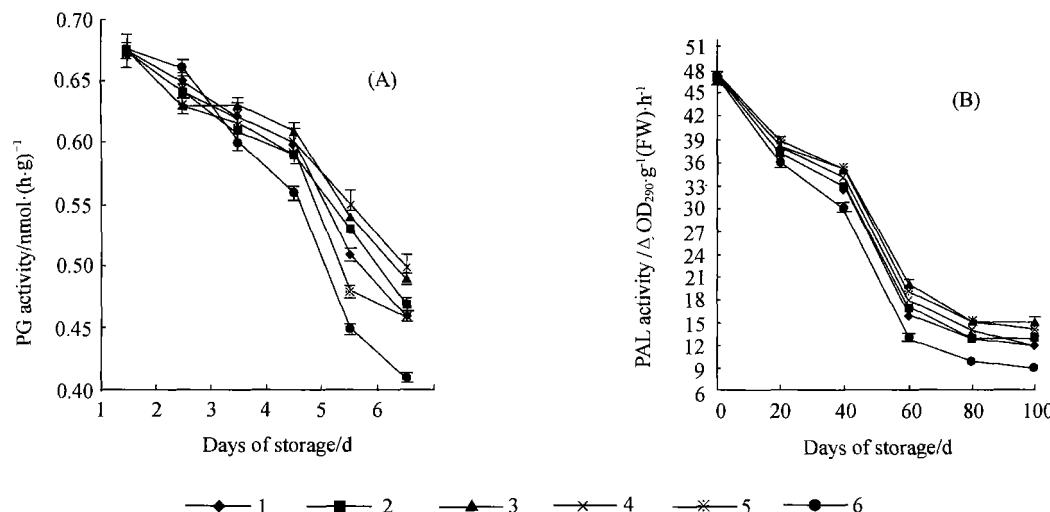


Fig. 3 Effect of different fungicide on PG activity (A) and PAL activity (B) of Dong jujube fruit

Table 3 Effect of different fungicides on fresh keeping of Dong jujube fruit

Fungicides	Conc / (mg/L)	30 d			60 d			100 d			
		Fine fruit (%)	First grade fruit (%)	Fine fruit (%)	First grade fruit (%)	Second grade fruit (%)	Commodity rate (%)	Fine fruit (%)	First grade fruit (%)	Second grade fruit (%)	
Natamycin	250	98.9 a	1.1 ab	66.0 b	17.7 b	16.3 b	83.7 D	48.0 b	21.8 bc	30.2 b	69.8 C
	500	98.7 a	1.3 ab	67.3 b	17.8 b	14.9 b	85.1 C	50.3 b	21.9 bc	27.8 bc	72.2 B
	1 000	99.2 a	0.8 c	68.8 b	18.5 ab	12.7 bc	87.3 B	52.6 ab	22.4 b	25.0 bc	75.0 B
Prochloraz	250	98.6 a	1.4 a	68.5 b	19.3 ab	12.2 bc	87.8 B	52.2 ab	23.5 b	24.3 bc	75.7 B
	500	99.1 a	0.9 c	70.3 a	20.3 a	9.4 c	90.6 A	55.4 a	27.8 a	16.8 d	83.2 A
CK		98.5 a	1.5 a	55.4 c	17.5 c	27.1 a	72.9 E	33.1 c	20.1 c	46.8 a	50.2 D

3 讨论

冬枣浆胞病是冬枣采后发生最为严重的病害。孙蕾等报道^[20], 冬枣浆胞病是主要由交链孢霉属 (*Alternaria* Nees ex Wallr.) 和根菌索菌属 (*Rhizomorpha* Roth ex Fr.) 两种病原菌引起的混合感染, 究竟以哪种病原菌为主还受气候条件的影响。本试验初步分离鉴定出的冬枣浆胞病的主要病原菌为交链孢霉属 (*Alternaria* Nees ex Wallr.), 与孙蕾等的研究结果基本一致。毒力测定结果表明, 纳他霉素对浆胞病病原菌具有很好的抑制作用。通过对冬枣贮藏期间各指标的测定发现, 纳他霉素与咪鲜胺一样, 均可很好地抑制MDA含量的增加, 显著提高冬枣PG与PAL的活性, 抑制可溶性固形物和VC含量的下降, 对保持果实硬度有较好的效果。在冬枣贮藏期间使用纳他霉素处理, 能很好地控制病害的发生, 提高冬枣抗病、抗逆能力, 延长其贮藏期。我国于1996年

批准纳他霉素用作食品防腐剂, 广泛用于乳酪、肉制品表面及广式月饼、糕点表面等, 最大使用量为200~300 mg/L混悬液喷雾或浸泡(残留量小于100 mg/L)^[5~6]。本实验表明, 纳他霉素500~1 000 mg/L处理与咪鲜胺500 mg/L处理对冬枣保鲜的效果相当, 贮藏到一定时期(100 d), 均可以提高冬枣的商品率。研究还发现纳他霉素对冬枣采后病害有很好的控制作用, 但该作用究竟是因为对病原菌的直接控制还是因为其诱导了冬枣自身与抗病、抗逆有关的酶而起到诱导抗性的作用还有待于进一步研究。目前冬枣保鲜大多注重储藏硬件设施的改良, 有关保鲜生理的研究报道较多^[21~25]。本研究的结果表明, 将药剂处理与硬件设施有机结合是解决冬枣低温贮藏保鲜期的有效途径。

4 结论

试验结果表明, 在冬枣入库贮藏前用纳他霉

素 500~1 000 mg/L 处理, 能够很好地保持冬枣果实硬度, 抑制有害物质的积累, 显著提高一些与冬枣抗逆、抗病关系密切的酶的活性, 并且能够显著控制浆胞病等侵染性病害和腐生性病害的发生。贮藏到 60 d 商品率分别达 85.1% 和 87.3%, 贮藏到 100 d, 商品率仍可达到 72.2% 和 75.0%, 果实品质良好。

参考文献:

- [1] LI Shou-yong(李守勇). 冬枣研究进展 [J]. China Fruits(中国果树), 2004(1): 47~51.
- [2] LI Hong-w ei(李红卫), FENG Shuang-qing(冯双庆), ZHAO Yum ei(赵玉梅). 冬枣保鲜技术初探 [J]. J Shanxi Agric Sci(山西农业科学), 1999, 27(2): 65~67.
- [3] LIL i me i(李丽梅), JI Hua(及华), FENG Yun-xiao(冯云宵), et al. 冬枣采后生理变化研究进展 [J]. Storage Process(保鲜与加工), 2006, 33(2): 12~14.
- [4] Brk H. Natamycin [A]. Analytical Profiles of Drug Substances [C]. New York: Academic Press 1994. 514~557.
- [5] John L, Koont Z, Joseph E, et al. Formation of natamycin cyclodextrin inclusion complexes and their characterization [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 7106~7110.
- [6] Aparicio J F, Fouces R, Mendes M V, et al. A complex multienzyme system encoded by five polypeptide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrocyclic antibiotic in *Streptomyces natalensis* [J]. Chem Bio, 2000, 7: 895~905.
- [7] Natamycin. Code of Federal Regulations [M], Part 172.155, Title 21, 2001. Fed Regist 2001, 66(46): 13846~13847.
- [8] Stake J. Permitted preservatives natamycin [A]. Robinson R K, Batt C A, Patel P. Encyclopedia of Food Microbiology [M]. Academic Press San Diego 1999, (3): 1776~1781.
- [9] Mohamed A F, Hesham A E. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis* [J]. Biacis Microbiol, 2000, 40(3): 1576.
- [10] FANG Zhong-da(方中达). The Research Method of Plant Disease (植病研究方法) [M]. Beijing (北京): China Agriculture Press (中国农业出版社), 1996. 122~124.
- [11] WEI Jing-chao(魏景超). The Handbook of Fungus Identification (真菌鉴定手册) [M]. Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1979. 562~571.
- [12] ZHANG Tian-yu(张天宇). Flora Fungorum Sinicorum Vol 16 Altemaria (中国真菌志第十六卷链孢属) [M]. Beijing (北京): Science Press(科学出版社), 2003. 35~36.
- [13] Bam et H, Hunter B. Illustrated Genera of Inperfect Fungi (半知菌属图解) [M]. SHEN Chong-yao(沈崇尧), translated. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1972. 130~131.
- [14] MU Li-yi(慕立义). The Research Method of Plant Chemical Protection(植物化学保护研究方法) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1994.
- [15] HAN Ya-shan(韩雅珊). The Experimental Guidebook of Food Chemistry(食品化学实验指导) [M]. Beijing(北京): Beijing Agricultural University Press(北京农业大学出版社), 1992. 132~134.
- [16] LI He-sheng(李合生), SUN Qun(孙群), ZHAO Shi-jie(赵世杰), et al. The Theory and Technology of Plant Physiology and Biochemistry(植物生理生化实验原理和技术) [M]. Beijing(北京): Higher Education Press(高等教育出版社), 2000.
- [17] ZOU Dong-yun(邹东云). Studies on Post-harvest Physiology and Chemical Screening for Storage of Winter-jujube(冬枣采后生理及其高效贮藏保鲜药剂的筛选研究) [D]. Beijing(北京): China Agricultural University(中国农业大学), 2004.
- [18] SHEN Lin(申琳), LI Guang-chen(李光晨), SHENG Jing-ping(生吉萍). 冬枣果实采后酒软过程中细胞壁与膜代谢的变化 [J]. Sci and Tech Food Ind (食品工业科技), 2003 (Suppl). 168~172.
- [19] LI Hong-w ei(李红卫), FENG Shuang-qing(冯双庆). 冬枣采后果皮成分及氧化酶活性变化与乙醇积累机理的研究 [J]. Transactions of the CSAE (农业工程学报), 2003, 19(3): 165~168.
- [20] SUN Lei(孙蕾), WU Xing-mei(吴兴梅), FANG Yong(房用), et al. 冬枣采后浆胞病定性研 [J]. Storage Process(保鲜与加工), 2004, 4(5): 23~25.
- [21] LI Hong-w ei(李红卫), YIN Xiu-hua(尹秀华), FENG Shuang-qing(冯双庆), et al. 简易气体贮藏对冬枣果实乙醇、有机酸含量及相关酶活性的影响 [J]. Transactions of the CSAE (农业工程学报), 2005, 21(4): 172~175.
- [22] CHEN Gui-tang(陈贵堂), ZHANG Zhi-de(张子德), MA Jun-lian(马俊莲), et al. 冬枣采后生理及贮藏技术研究 [J]. Food and Mechanism (食品与机械), 2003(2): 9~11.
- [23] LIU Xiao-jun(刘晓军), WANG Qun(王群), ZHANG Yun-chuan(张云川). 冬枣湿冷贮藏过程中生理生化变化的研究 [J]. Transactions of the CSAE (农业工程学报), 2004, 20(1): 215~217.
- [24] XUE Meng-lin, ZHANG Ji-shu(张继澍), ZHANG Ping(张平), et al. 减压对冬枣采后生理生化变化的影响 [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2003, 36(2): 196~200.
- [25] LIN L, TIAN S P, WAN Y K, et al. Effects of temperature and atmosphere component on quality of stored jujube fruit [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(8): 928~93.

(Ed. JIN SH)