

仲丁胺抑菌作用及其机理

叶凤阁

张忠源

(沈阳农业大学植保系·东陵)

(沈阳市土肥工作站)

果蔬防腐剂仲丁胺(2-AB),广泛应用于控制果蔬贮藏期间真菌腐烂。主要应用水果有柑桔、柠檬、梨、苹果、桃以及香蕉、荔枝等。对多种蔬菜的防腐效果也令人满意,由于仲丁胺防腐效果好、抗菌谱广、毒性低、残留少,至今未见有致癌、致畸和致突变效应的报道。使用方便、成本低,因此在实际应用中迅速发展成为果蔬防腐剂的优选品种。早在七十年代中期,联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)便开始推荐使用这一药物,在美、英、澳大利亚、西德、法、西班牙等许多国家都得到大量应用。自八十年代以来,我国对仲丁胺的应用也进行了广泛深入的试验研究。目前,以仲丁胺为有效成份的新制剂,例如克霉灵、桔腐净、保果灵以及多种固体型熏蒸剂等不断得到开发,应用范围不断扩大。有关仲丁胺应用方面的报道颇多,但理论研究方面的报道很少。本文仅就仲丁胺的抑菌作用和机理这个侧面予以综述。

抑菌作用 美国加里福尼亚大学 Eckert J.W.等(1964)用仲丁胺的磷酸盐对31种病原微生物,包括半知菌类、子囊菌和藻状菌纲的真菌以及细菌进行了抑菌试验。液体培养基由葡萄糖、麦芽提取液、酵母提取液、天冬酰胺和磷酸二氢钾配制,调PH6.5,25℃保温培养三天,根据菌丝量确定其抑菌

活性。结果发现有7种病原真菌对仲丁胺磷酸盐最敏感,2-AB浓度为50—100μg/ml时,即可阻止菌丝生长达50%;有5种真菌比较敏感,2-AB浓度250μg/ml时可阻止菌丝生长50%;细菌对2-AB磷酸盐不敏感。同时,还发现2-AB盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐、醋酸盐、丙酸盐和柠檬酸盐效果无明显差异。结合防腐试验确认应用2-AB中性盐溶液可以有效地控制8种病原真菌引起的果蔬收后腐烂。它们是: *Penicillium digitatum* (指状青霉,柑桔绿霉)、*Penicillium expansum* (扩张青霉、苹果青霉)、*Penicillium italicum* (意大利青霉、柑桔青霉),它们属于青霉属真菌,主要危害柑桔、苹果、梨、葡萄等,引起青绿霉病。*Monilinia fructicola* 属于串孢盘菌属真菌,核果褐腐菌,主要危害桃、李等,引起褐腐;*Glomerella cingulata* 属于小丛壳属真菌,炭疽病菌,主要危害柑桔、苹果、梨、山楂、桃、葡萄、柿和番茄等果实,产生褐色腐烂斑;*Gloeosporium musarum* 盘长孢属真菌,主要危害香蕉,引起炭疽病;*Phomopsis citri* 拟茎点属真菌,主要危害柑桔,引起果实褐色蒂腐;*Thielaviopsis paradoxa* 拟黑根霉属真菌,危害香蕉、菠萝,分别引起果柄腐烂和黑腐。

Scooft, K.J. (1967) 报道,0.05—2% 2-AB 浸果几乎能完全控制 *Gloeosporium*

musarum对香蕉的危害。

Eckert, J.W. 等 (1970) 进一步研究指出, 0.1—1.0% 2-AB 溶液直接应用于水果、蔬菜和花卉, 除可控制上述真菌外, 还可控制 *Alternaria* (交链孢霉)、*Aspergillus* (曲霉)、*Sclerotinia* (核盘菌属)、*Botrytis* (葡萄孢属、灰霉菌)、*Stemphylium* (匍柄霉)、*Pleospora* (多孢菌属) 等真菌的危害。

McDonnell, P.F. (1971) 报道, 5000ppm 2-AB 可有效控制 *Nectria* (丛赤壳属真菌) 引起的苹果收后腐烂。

Graham, D.C. 等 (1981) 总结了1966—1980年2-AB应用于马铃薯的试验, 指出用 200mg/kg 薰蒸贮藏马铃薯可有效控制 *Phoma exigua foveata* (茎点霉属真菌) 和 *Oospora Pustulans* (卵形孢霉属真菌) 引起的坏疽和斑皮病。

Boyd, A.E.W (1975) 报道, 用2-AB 薰蒸贮藏马铃薯, 对 *Helminthosporium Solani* (长蠕孢霉属真菌) 引起的银粗皮病 (Silver Scurf) 也有效。

Bompeix, G. 等 (1977) 报道, 100ppm 2-AB 浸果后漂洗, 再用 1ml/kg 蜡乳液蘸果, 除可控制苹果青霉、葡萄灰霉的危害外, 还可控制 *Gloeosporium* SP. (盘长孢属真菌, 炭疽病菌) 和 *Rhizopus nigricans* (黑根霉, 黑霉或软腐病菌) 对苹果的危害。

河北农业大学 (1976) 研究, 按 50—100 mg/kg 使用 2-AB, 对危害甘薯块根的 *Ceratocystis fimbriata* (长喙霉属真菌, 黑斑病菌) 有效。

据中国农业科学院果树研究所 (1986) 室内药效测定, 2-AB 原液 1500 倍液可杀死危害苹果、葡萄等的 *Penicillium expansum*、*penicillium italicum*、*Botrytis cinera* (葡萄灰霉菌) *Sclerotinia* (*Monr-Linia*) *fructigena* (苹果褐腐菌) (以及 *Glomerella Cin gulata*。

生化机理 Eckert, J.W. 等 (1970) 研究了 *Penicillium digitatum* 菌丝对 2-AB 的积累和代谢, 2-AB 阳离子用氚标记, 培养基内胺盐浓度 1Mm/ml。结果发现, 2-AB 阳离子能够在菌丝内积累和集中, 水平接近于 ED_{50} , 且能保持较长时间, 例如, 4 小时后积累达 80—90Mm/g 菌丝。时间又发现, 2-AB 阳离子在抑制作用开始之前很少或不能被代谢, 在上述培养基内 4 小时后被代谢在 4% 以下。2-AB 同系物乙胺、正丙胺、正丁胺等, 不仅积累少, 而且很快被代谢, 甲胺虽积累水平大于 2-AB, 但 4 小时后约有三分之二被代谢分解。这些同系物很少或没有抑菌活性。因此, 可以认为在真菌菌丝内积累和集中以及抗代谢能力是 2-AB 阳离子具有抑菌活性的先决条件。

如将菌丝移入不含 2-AB 的新的培养基或蒸馏水中, 则发生离子交换或溢出, 2-AB 的积累很快丧失, 这说明 2-AB 阳离子与菌丝受体的结合是松弛的。若竞争的无毒阳离子代换了 2-AB 阳离子, 它的抑菌活性将消失。

Bartz, J.A. 等 (1972) 较为系统地研究了 2-AB 阳离子对 *Penicillium digitatum* 抑制作用的生化机理。这项研究指出: 第一, 2-AB 阳离子能够抑制孢子萌发, 2-AB 阳离子的 ED_{50} ($M \times 10^4$) 为 0.989。并且能降低菌丝的呼吸速率, 但不影响 CO_2 和 O_2 的呼吸商。第二, 2-AB 阳离子对菌丝细胞保留小分子 (K^+ 、 ^{14}C —赖氨酸和 ^{32}P 可溶性化合物等) 的能力没有影响, 其原因是它不能改变菌丝细胞膜的透性。虽然菌丝体内 K^+ 水平降低, 但这是由 K^+ 载体拮抗 2-AB 阳离子引起的, 而低 K^+ 并不影响孢子的正常萌发。第三, 2-AB 阳离子能够强烈地抑制真菌对某些氨基酸的摄取及它们掺入蛋白质, 例如谷氨酸、赖氨酸、脯氨酸和亮氨酸等, 特别是其中的碱性氨基酸。主要原因是 2-AB 阳离子与氨基酸有着相互竞争的作用部位, 并且

能干扰甚至破坏氨基酸的运转系统,抑制了氨基酸进入氨基酸库,从而使掺入蛋白质合成部分减少。同时,2-AB阳离子还能抑制与氮代谢有关的酶的活性,例如脱羧酶、转氨酶、脱氨酶等。2-AB阳离子能够与这些酶的辅基(磷酸吡哆醛)结合形成稳定的络合物使其失活。

氨基酸运转系统的破坏使氨基酸代谢失调,特别是营养缺陷型菌丝缺少表达RNA合成速率的氨基酸,氨基酸库中供给合成蛋白质用的氨基酸比例改变,进而抑制了RNA的合成,最终导致蛋白质合成受阻。

一般认为,2-AB阳离子破坏真菌氮代谢是其产生抑菌活性的主要原因,但从目前掌握的实验材料来看,研究的还不够深入,实验证据也不够充分。

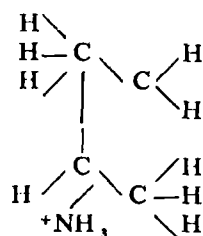
化学机理 仲丁胺的抑菌活性与其性质、结构密切相关,首先,仲丁胺是碱性化合物, PK_a 约10.56。其次,它有一定的蒸气压,在20℃时为18千帕。因此,无论浸渍洗果还是熏蒸,都可造成果蔬污染部位的碱性环境,对浸染真菌的生长不利。其它低级脂肪胺的碱性大体相近,有的也有一定的蒸气压,但却没有或很少抑菌活性。这说明碱性和蒸气压只能是2-AB产生抑菌活性的必要因素,还不是决定因素。

Eckert, J. W. 等(1972)采用50多种低级脂肪胺对 *Penicillium digitatum* 孢子萌发进行试验研究,结果是左旋异构体R-(-)-2-AB阳离子的抑菌活性最大,其 $ED_{50}(M \times 10^4)$ 为0.336,它的对映体即右旋异构体S-(+)-2-AB的 $ED_{50}(M \times 10^4)$ 为23.5,外消旋体的 $ED_{50}(M \times 10^4)$ 为0.989。也就是说左旋体的抑菌活性是右旋体的70倍,是外消旋体的2.9倍。2-AB分子中手性碳原子上的甲基、氢原子被其它基团取代后,抑菌活性明显降低,甚至完全失去活性。他们进行的抑制 *Penicillium digitatum*、*Penicillium citri* 和 *Monilinia fructicola* 菌丝生长试验,以及防

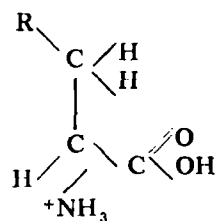
止浸染柑桔的试验,结果同样证实了R-(-)-2-AB阳离子是抑菌防腐的最主要的组分。

根据前已述及的生化机理的实验事实,可以设想,真菌细胞受体含有固定的阴离子组分,例如磷酸根、羧酸根等。2-AB与受体能够形成胺-受体络合物。在这个过程中,2-AB手性中心的构型起着决定性作用。换言之,形成络合物的过程具有立体专一性。

(-)-2-AB的构型与天然氨基酸的构型(L-)相似(这里指用D,L标记的相对构型,如用R,S标记绝对构型,则天然氨基酸为S-型,(-)-2-AB为R-型)。因此,(-)-2-AB能很好地与真菌受体的活性部位相匹配。用构象式表示则更清楚地说明了它能抑制真菌对氨基酸的摄取及被氨基酸阳离子拮抗的实验事实。



R-(-)-2-AB阳离子构象式



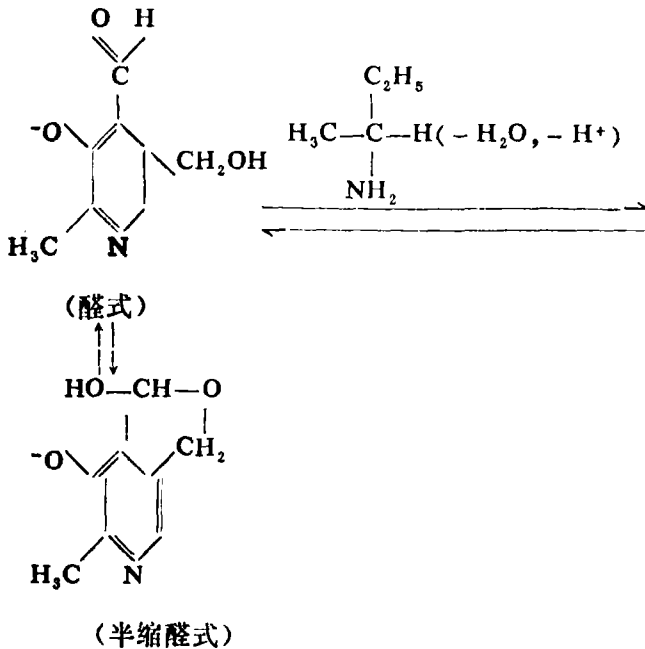
天然氨基酸阳离子构象式

根据现有的实验事实证明,(-)-2-AB阳离子和真菌细胞受体之间存在如下几种结合力。

1. 离子键和氢键 (-)-2-AB的 $+NH_3$ 和受体活性部位的阴离子组分形成离子键,这是造成胺-受体络合物具有一定稳定性的重要因素之一。同时, $+NH_3$ 作为氢

原子的供体，还可与受体阴离子组分形成多个氢键，并且能加固离子键的强度。但是，含 $-^+NH_3$ 的结构可以比较自由地进出受体阴离子部分，表明胺-受体间作用是可逆的。其它阳离子的拮抗作用说明，受体阴离子组分对 $-^+NH_3$ 结构的选择性还不够大。

2. 亚胺键 $(-)-2-AB$ 阳离子能够抑制真菌体内某些与氮代谢有关的酶，这些酶多以磷酸吡哆醛为辅基。Metzler, D.E (1957) 研究了12种氨基酸、低级脂肪酸和磷酸吡哆醛的作用，发现在生理条件下， $(-)-2-AB$ 和磷酸吡哆醛的络合作用要比氨基酸大得多。Matsuo, Y. (1956) 指出，胺阳离子之所以对高丝氨酸脱氨酶有抑制作用，主要是因为胺阳离子与这种酶的辅基（磷酸吡哆醛）形成的亚胺（shiff碱）的稳定常数比氨基酸与辅基形成的亚胺的稳定常数大，使辅基失去活化酶的能力。磷酸吡哆醛和胺、氨基酸的络合是通过羧基亲核加成

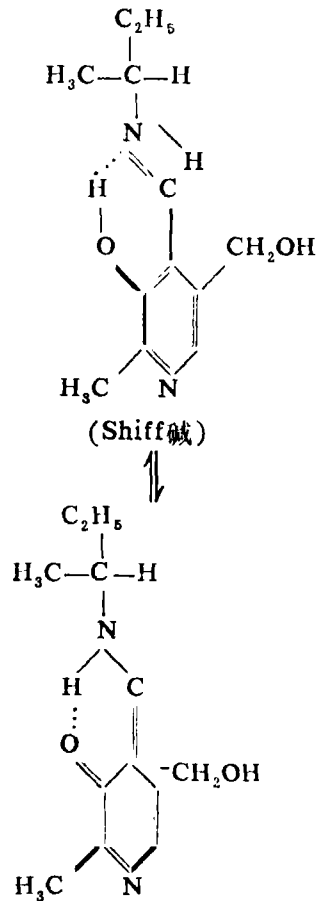


再也容纳不下了。反过来用体积较小的基团取代手性碳的甲基和乙基，虽可自由接近受体，但疏水结合却变弱了，因而抑菌活性就小。由此可见，疏水结合是 $(-)-2-AB$ 抑菌的最主要的结合力。Inagami, T. (1964) 计算了胺阳离子和胰蛋白酶形成的络合物的热

一消去的复合机理进行的，可简单表示如下：

3. 疏水键合 $(-)-2-AB$ 与氨基相连的仲丁基是其产生抑菌活性的特效性因素。因为烃基是非极性的，所以与真菌受体活性部位的疏水组分会结合，这种结合主要通过范德华力来实现， $(-)-2-AB$ 的空间构型在这种结合中起着极其重要的作用，具体地说， $(-)-2-AB$ 中手性碳原子所连基团的大小和空间取向起决定作用。

Eckert, J.W. 等 (1972) 详细研究了各种取代基的影响，甲基或氢原子被取代后，抑菌活性降低数百倍，有的甚至完全失去活性。对乙基的空间要求虽不甚严格，但碳链增长、引入吸电子基团也会降低活性，这说明在靠近 $2-AB$ 手性碳的位置上连一个甲基



力学参数 (ΔF° , ΔH° 和 ΔS°)，结果表明烷基的作用是增加熵变和降低标准自由能，证实了疏水键合对形成胺-酶络合物的重要作用。关于仲丁胺的抑菌和防腐机理还在进一步研究中。(收稿时间1990年5月10日)