

正交试验优化新疆芫荽中总黄酮提取工艺

阿依古丽·塔什波拉提, 故丽巴哈·艾合买提, 阿不力孜·艾力

(新疆维吾尔自治区分析测试研究院, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要 [目的]优化新疆芫荽中总黄酮提取工艺。[方法]以新疆芫荽地上部分为原料,采用单因素试验和正交试验设计,以紫外分光光度法测定提取液中总黄酮提取率。[结果]新疆芫荽地上部分总黄酮优化后提取工艺:提取溶剂(乙醇)浓度为40%,提取时间为120 min,固液比为1:15,提取温度为60℃,粒度为40目,提取次数为2。在上述工艺条件下,黄酮提取率达3.28%。[结论]采用正交试验设计优化后的新疆芫荽地上部分总黄酮的提取工艺是合理可行的。

关键词 新疆芫荽;醇提取工艺;总黄酮;紫外可见光谱仪

中图分类号 S573+.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)22-0001-04

Optimization of Technological Parameters for Extraction of Total Flavonoids from *Coriandrum sativum* L. by Orthogonal Experiment
AYGUL Tashpolat, GULIBAHA Aihemaiti, ABLIZ Aili (Xinjiang Uygur Autonomous Region Academy of Instrumental Analysis, Urumqi, Xinjiang 830011)

Abstract [Objective] The aim was to optimize technological parameters for extraction of total flavonoids from *Coriandrum sativum* L. [Method] Aerial parts of *Coriandrum sativum* L. as raw material, using single factor experiment and orthogonal experiment design, the extraction ratio of total flavonoids from the *Coriandrum sativum* L. was determined by UV-Vis spectrophotometry, and the technology parameters of extraction of total flavonoids from the *Coriandrum sativum* L. were studied. [Result] The optimal extraction process conditions were as followed: 40% of solvent concentration, 120 min of extraction time, 1:20 of solid-liquid ratio, 60℃ of extraction temperature, 40 mesh of material size and twice extraction, above the optimal conditions, the extraction ratio of total flavonoids from the *Coriandrum sativum* L. was 3.28%. [Conclusion] The optimized technological parameters for extraction of total flavonoids from *Coriandrum sativum* L. by orthogonal experiment is reasonable and feasible.

Key words *Coriandrum sativum* L.; Ethanol extraction process; Total flavone; Uv-vis spectrophotometry

芫荽(*Coriandrum sativum* L.), 俗称香菜, 又名胡荽, 属伞形科植物, 为一年生草本植物, 高20~60 cm, 全株无毛, 茎直立, 中空, 具细条棱^[1], 是作为药用和调味食品较古老的芳香蔬菜之一, 原产地中海沿岸等地。芫荽的叶、根茎、籽均可入药。中医以全草入药, 性温, 味辛, 功能解表, 透发麻疹, 内有驱风、健胃和刺激的作用, 主要用于治疗麻疹、消化不良、感冒风寒、流行性感冒、发热头痛、痢疾下血和高血压, 外用有镇痛效果, 还对某些食物中毒有解毒作用^[2]。芫荽的上述治病功能与其含有的化学成分密切相关, 芫荽全草富含蛋白质、脂肪、糖类、胡萝卜素、维生素B₁等营养物质^[3], 含有钙、磷、钾、钠、镁、锌等矿物质及铜、锰、硒等稀有金属^[4], 同时含有多种氨基酸^[5], 其中胡萝卜素和铁的含量较高, 是番茄、黄瓜、菜豆的10倍以上, 钙、铁含量也高于其他蔬菜^[6]。

黄酮类化合物具有许多有益的生理效应与药理作用, 越来越引起人们的重视。黄酮类化合物的生理活性作用较广泛, 具有生物抗氧化性、清除自由基作用、抗衰老、治疗心脑血管疾病、降血脂降血压作用、降低血糖作用、抗癌作用、镇痛作用、免疫作用、抗炎作用、抗菌作用、对消化性溃疡的保护作用等药用保健功能^[7-11]。目前, 国内外主要是从银杏叶、大豆、山楂叶、荷叶、芹菜叶、水芹、花生壳、芝麻叶等材料中提取黄酮类化合物, 而对新疆芫荽地上部分的研究鲜见报道。为此, 笔者以新疆芫荽地上部分中总黄酮(以芦丁计)得率为评价指标, 采用单因素和正交试验优化了芫荽中总黄酮

提取工艺, 用紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量, 建立了新疆芫荽地上部分中总黄酮提取较佳工艺条件, 以期为新疆芫荽资源的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。芫荽的地上部分: 6月底一次性采自喀什市, 除掉黄叶和根, 洗净, 在干燥阴凉处(室温)晾干, 置于55℃烘箱中干燥至恒重, 粉碎, 过40目标准筛(粒径0.42 mm), 置于封口塑料袋中, 放入干燥器备用。

1.1.2 试剂。芦丁: 生化试剂(含量≥95%), 上海试剂二厂生产; 甲醇、乙醇、石油醚、丙酮、硝酸铝[Al(NO₃)₃]、氢氧化钠(NaOH)、亚硝酸钠(NaNO₂)均为分析纯。

1.1.3 主要仪器。DYQ-188型流水式粉碎机(上海亚荣生化仪器厂); 电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 721分光光度计(上海第三分析仪器厂); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(上海东玺制冷仪器设备有限公司); GM-0.5B型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司); 正交试验数据统计分析用学韬软件工作室的正交设计助手软件 version 3.1。

1.2 方法

1.2.1 提取工艺流程。芫荽地上部分→去根, 除杂, 洗净, 沥干水→烘干(60℃)→粉碎→过筛→乙醇加热回流提取→减压真空抽滤→滤液减压旋转蒸馏浓缩→石油醚脱色→弃去石油醚层→收集乙醇层→定容, 得总黄酮粗提取液。

1.2.2 芦丁标准溶液的配制。称取芦丁对照品0.0522 g, 用无水乙醇溶解, 定容至100 mL, 得浓度为0.5220 mg/mL的芦丁对照品溶液。吸取芦丁对照品溶液5.00 mL, 用30%乙醇定

基金项目 新疆乌鲁木齐市科技局种子基金项目(k111410002)。
作者简介 阿依古丽·塔什波拉提(1968—), 女, 维吾尔族, 新疆乌鲁木齐人, 副研究员, 从事天然产物基础研究与开发。
收稿日期 2017-05-15

容至 25 mL,得浓度为 0.104 4 mg/mL 的芦丁对照品溶液。

1.2.3 标准曲线的绘制^[8] 吸取“1.2.2”芦丁对照品溶液(0.104 4 mg/mL)0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入 5% NaNO₂ 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min 后加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min 后加入 4% NaOH 溶液 4.0 mL,用 30% 乙醇定容,摇匀,以 30% 乙醇为空白参比,15 min 后用 1 cm 比色皿于 510 nm 波长处测定吸光度(A),以芦丁浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得到芦丁含量 Y(μg/mL)与吸光度 A 之间的回归方程:Y=0.012 5A-0.005 9,相关系数 R²=0.999 5(图 1)。

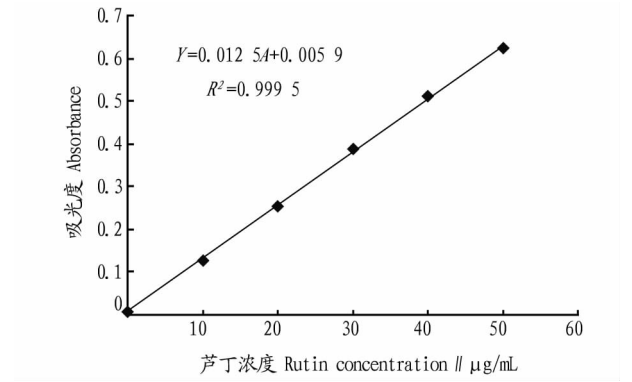


图1 芦丁标准曲线
Fig.1 Rutin standard curve

表1 单因素试验因素与水平

Table 1 Factors and level of single test on extraction of total flavonoids from *Coriandrum sativum* L.

水平 Levels	溶剂类型 Solvent type	乙醇浓度 Ethanol concent- ration//%	提取时间 Extraction time min	固液比 Solid-liquid ratio m: V	提取温度 Extraction temperature ℃	提取次数 Extraction time 次	粒度 Material size 目
1	水	40	40	1: 10	50	1	20
2	甲醇	50	80	1: 15	60	2	40
3	乙醇	60	120	1: 20	70	3	60
4	丙酮	70	160	1: 25	80	4	80
5	—	80	200	1: 30	90	—	100
6	—	90	100	—	100	—	—

水、甲醇、乙醇、丙酮为提取溶剂,回流提取。提取液按照“1.2.4”处理得样品待测溶液,按照“1.2.3”测定其总黄酮含量,计算总黄酮提取率,确定最佳提取溶剂。

1.2.6.2 乙醇浓度的考察。称取 5.00 g 芫荽样品粉末干品(60 目)6 份,分别置于 6 个磨口三角瓶中,在恒定固液比 1:10、提取温度 60 ℃、提取时间 120 min 的条件下,分别用不同浓度(40%、50%、60%、70%、80%、90%)乙醇溶液作提取溶剂,回流提取。每份样品回流提取 2 次,合并 2 次提取液。提取液按照“1.2.4”处理得样品待测溶液,按照“1.2.3”测定其总黄酮含量,计算总黄酮提取率,确定最佳提取溶剂浓度。

1.2.6.3 提取时间的考察。称取 5.00 g 芫荽样品粉末干品(60 目)5 份,分别置于 5 个磨口三角瓶中,在恒定固液比 1:10、浓度为 50% 的乙醇溶液作为提取剂、提取温度 60 ℃的条件下,分别设 40、80、120、160、200 min 5 个时间梯度,回流提取。每份样品回流提取 2 次,合并 2 次提取液。提取液按

1.2.4 芫荽总黄酮粗体液的提取。将芫荽地上部分去根、发黄叶和枯叶,用去离子水洗净,沥干水,60 ℃恒温烘箱烘干,中药粉碎机粉碎,过 60 目筛,得到芫荽干燥粉末。取一定量原料干粉,采用一定体积分数的乙醇按一定的固液比在一定温度下回流提取,重复提取 1 次,合并 2 次提取液,真空减压抽滤,滤液用真空旋转蒸发仪浓缩后,转移到分液漏斗中,加入一定量石油醚振荡进行脱色,弃去石油醚层,收集乙醇层于棕色玻璃瓶中,该提取液为芫荽总黄酮提取液。

1.2.5 芫荽粗提液中总黄酮含量的测定。参照文献^[9],取 1.0 mL 提取液,按照“1.2.3”的方法在 510 nm 波长处测定样品吸光度,从工作曲线中查出吸光度对应的总黄酮浓度,由回归方程可得样品浓度 C 和样品吸光度 A 的关系式:C=80.0A-0.472。通过样品浓度计算总黄酮提取率(X):

$$X = \frac{(80.0A - 0.472) \times \text{稀释倍数} \times \text{提取液体积}}{\text{芫荽重量} \times 10^6} \times 100\%$$

1.2.6 单因素试验。以芫荽地上部分中总黄酮提取率为指标,分别考察原料粒度、提取溶剂种类、乙醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数 7 个因素对芫荽总黄酮提取效果的影响。单因素试验因素及水平见表 1。

1.2.6.1 提取溶剂的考察。称量 5.00 g 芫荽样品粉末干品(60 目)4 份,分别置于 4 个磨口三角瓶中,在恒定固液比 1:10、提取温度 60 ℃、提取时间 120 min 的条件下,分别使用

照“1.2.4”处理得样品待测溶液,按照“1.2.3”测定其总黄酮含量,计算总黄酮提取率,确定最佳提取时间。

1.2.6.4 固液比的考察。称取 5.00 g 芫荽样品粉末干品(60 目)5 份,分别置于 5 个磨口三角瓶中,在浓度为 50% 的乙醇溶液为提取剂、提取温度 60 ℃、提取时间 120 min 的条件下,分别设 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 5 个固液比梯度,回流提取。每份样品回流提取 2 次,合并 2 次提取液。提取液按照“1.2.4”处理得样品待测溶液,按照“1.2.3”测定其总黄酮含量,计算总黄酮提取率,确定最佳固液比。

1.2.6.5 提取温度的考察。称取 5.00 g 芫荽样品粉末干品(40 目)6 份,在固液比 1:20、50% 乙醇的条件下分别于 50、60、70、80、90、100 ℃下提取 120 min。每份样品回流提取 2 次,合并 2 次提取液。提取液按照“1.2.4”处理得样品待测溶液,按照“1.2.3”测定其总黄酮含量,计算总黄酮提取率,确定最佳提取温度。

1.2.6.6 原料粉碎粒度的考察。称取 5.00 g 芫荽样品粉末干品 5 份,分别置于 5 个磨口三角瓶中,在以固液比 1:10 的浓度为 50% 的乙醇为提取溶剂、提取温度 60 ℃、提取时间 120 min 的条件下,分别设 20、40、60、80、100 目 5 个粉碎粒度,回流提取。提取液按照“1.2.4”处理得样品待测溶液,按“1.2.3”测定其总黄酮含量,计算总黄酮提取率,确定最佳原料粉碎粒度。

1.2.6.7 提取次数的考察。称取 5.00 g 芫荽样品粉末干品(60 目)4 份,分别置于 4 个磨口三角瓶中,在以恒定固液比 1:20 的浓度为 50% 的乙醇为提取溶剂、提取温度 60 ℃、提取时间 120 min 的条件下,分别设 1、2、3、4 次 4 个提取次数,回流提取。提取液按照“1.2.4”处理得样品待测溶液,按“1.2.3”测定其总黄酮含量,计算总黄酮提取率,确定最佳提取次数。

1.2.7 正交试验。根据单因素试验结果,选取影响较显著的 4 个因素,设计 4 因素 3 水平 $L_9(3)^4$ 正交试验,进一步优化芫荽总黄酮乙醇提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 提取溶剂对总黄酮提取率的影响。由图 2 可知,在相同条件下,乙醇和甲醇对芫荽总黄酮的提取效果较好,二次水次之,丙酮较差。从食品安全性、环保等因素综合考虑,选用乙醇作溶剂较适宜。

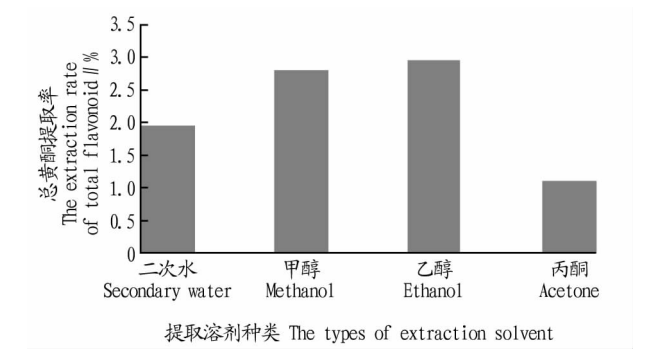


图 2 提取溶剂对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of different extraction solvent on total flavonoids yield from *Coriandrum sativum* L.

2.1.2 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响。由图 3 可见,乙醇浓度在 40% ~ 50% 时,黄酮提取率随着乙醇浓度的增加而增加,乙醇浓度为 50% 时黄酮提取率最高,乙醇浓度超过 50% 时黄酮提取率逐渐下降。从产业化成本的角度考虑,乙醇浓度选用 40%、50%、60% 进行正交试验。

2.1.3 提取时间对总黄酮提取率的影响。由图 4 可见,随着提取时间的增加,芫荽总黄酮提取率呈现出先增加后降低的趋势,提取时间增加到 120 min 时,总黄酮提取较完全,所以提取时间选用 80、120、160 min 进行正交试验。

2.1.4 固液比对总黄酮提取率的影响。由图 5 可知,在其他因素固定的条件下,当固液比为 1:20 时芫荽总黄酮提取率增加幅度较显著,固液比超过 1:20 时总黄酮提取率反而有所下降。从产业化生产成本和能耗控制角度考虑,固液比

选用 1:10、1:20、1:30 进行正交试验。

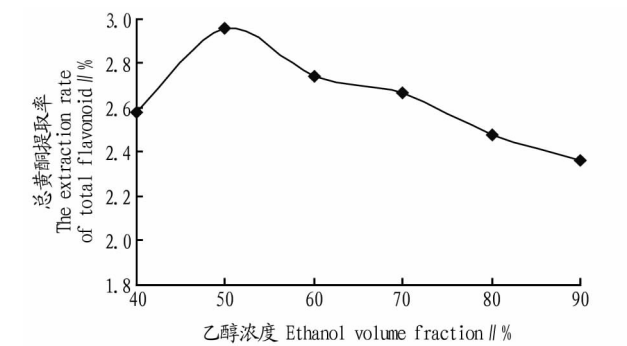


图 3 乙醇浓度对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effects of ethanol concentration on total flavonoids yield from *Coriandrum sativum* L.

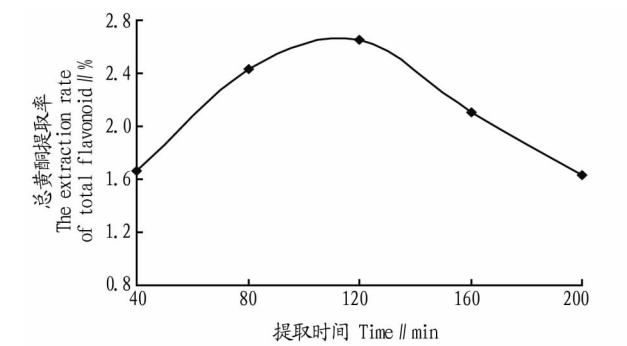


图 4 提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effects of extracting time on total flavonoids yield from *Coriandrum sativum* L.

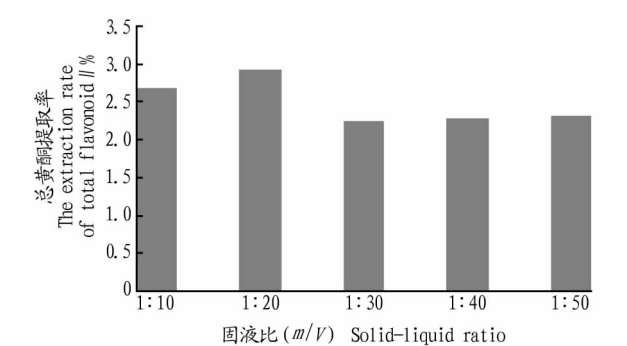


图 5 固液比对芫荽总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effects of solid-liquid ratio on total flavonoids yield from *Coriandrum sativum* L.

2.1.5 提取温度对总黄酮提取率的影响。由图 6 可见,当提取温度在 50 ~ 60 ℃ 时芫荽总黄酮提取率随着提取温度的升高而增加,提取温度为 60 ℃ 时黄酮提取率较高,当提取温度达到并超过 70 ℃ 时,总黄酮提取率逐渐降低。究其原因可能是芫荽所含的黄酮类化合物热稳定性不佳,导致在较高温度范围内总黄酮提取率逐渐降低。从产业化生产成本和能耗控制角度考虑,提取温度选用 50、60、70 ℃ 进行正交试验。

2.1.6 原料粉碎粒度对总黄酮提取率的影响。由图 7 可知,芫荽总黄酮提取率随着原料粉碎粒度的增加而增加,原料粉碎粒度在 20 ~ 60 目时总黄酮提取率增加显著,60 目时总黄酮提取率较高,当原料粉碎粒度超过 60 目时总黄酮提

取率增加不明显,因此,确定 60 目为最佳原料粒度。

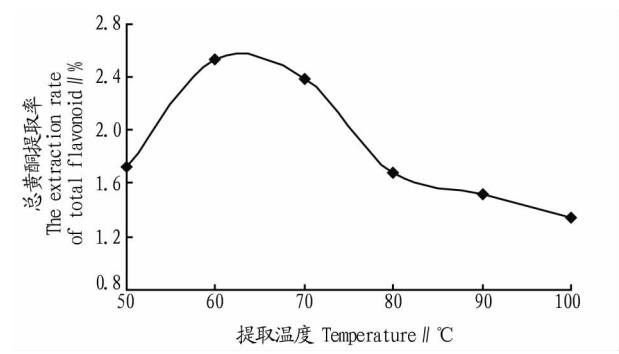


图 6 提取温度对总黄酮提取率的影响

Fig. 6 Effects of extracting temperature on total flavonoids yield from *Coriandrum sativum* L.

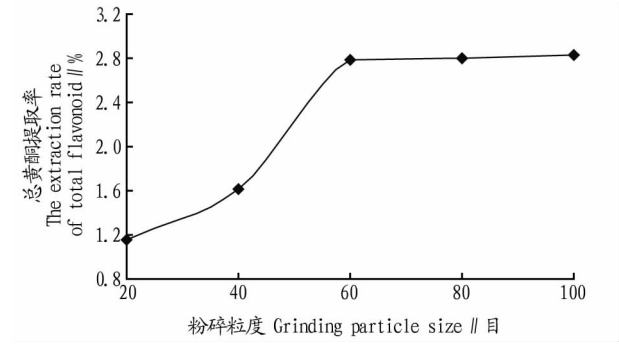


图 7 粉碎粒度对总黄酮提取率的影响

Fig. 7 Effects of grinding particle size on total flavonoids yield from *Coriandrum sativum* L.

2.1.7 提取次数对总黄酮提取率的影响。由图 8 可知,随着提取次数的增加,总黄酮提取率提高,当提取次数超过2 次时,总黄酮提取率增加幅度不明显。因此,确定最佳提取次数为 2 次。

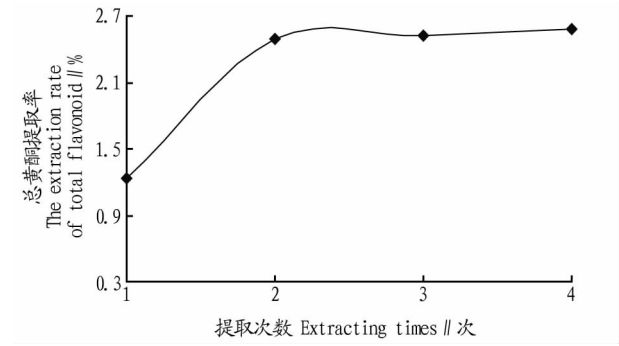


图 8 提取次数对总黄酮提取率的影响

Fig. 8 Effects of extracting times on total flavonoids yield from *Coriandrum sativum* L.

2.2 正交试验结果 根据单因素试验结果,选取乙醇浓度、提取温度、固液比和提取时间 4 个因素,采用 4 因素 3 水平正交试验,对芫荽总黄酮乙醇回流提取工艺进行优化。正交试验各因素及水平见表 2。

由表 3 可知,4 个因素对芫荽地上部分总黄酮提取率的影响从大到小排序为提取温度、乙醇浓度、固液比、提取时间,最佳的工艺条件组合为 A₁B₁C₂D₃,即乙醇浓度为 40%,

提取温度为 60 ℃,固液比为 1: 15,提取时间为 120 min。方差分析表明,选定的 4 个因素对芫荽地上部分总黄酮得率影响均不显著。因此,在工艺条件优化中要综合考虑生产成本、劳动强度和生產速度等因素,制定科学合理的工艺参数,可获得较高的提取效果。

表 2 正交试验因素与水平

Table 2 Factors of orthogonal experiment for extracting total flavonoids from *Coriandrum sativum* L.

水平 Level	乙醇浓度(A) Ethanol concentration // %	提取温度(B) Extraction time // ℃	固液比(C) Solid-liquid ratio // m/V	提取时间(D) Extraction time // min
1	40	50	1: 10	80
2	50	60	1: 15	120
3	60	70	1: 25	160

表 3 正交试验设计方案与结果

Table 3 Results of orthogonal experiment

试验号 Test No.	因素 Factors				得率 Yield // %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2. 73
2	1	2	2	2	2. 81
3	1	3	3	3	2. 34
4	2	1	2	3	2. 61
5	2	2	3	1	2. 22
6	2	3	1	2	1. 60
7	3	1	3	2	2. 38
8	3	2	1	3	2. 45
9	3	3	2	1	2. 22
k ₁	2. 63	2. 57	2. 26	2. 39	
k ₂	2. 14	2. 49	2. 55	2. 26	
k ₃	2. 35	2. 05	2. 31	2. 47	
R	0. 53	0. 52	0. 29	0. 21	
最佳组合 The best combination	A ₁	B ₁	C ₂	D ₃	

2.3 工艺验证试验结果 通过正交试验获得新疆芫荽地上部分中总黄酮最佳提取工艺为 A₁B₁C₂D₃,依据该工艺进行验证试验,重复 4 次,4 次提取率分别为 3. 16%、3. 23%、3. 34% 和 3. 38%,计算得平均提取率为 3. 28%,表明优化后工艺条件是稳定有效的,提取工艺是合理可行的。

3 结论与讨论

通过单因素试验较全面地考察了原料粒度、溶剂类型、乙醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数对芫荽总黄酮提取率的影响,根据单因素试验结果确定正交试验因素及水平。通过 4 因素 3 水平正交试验对新疆芫荽地上部分中总黄酮提取工艺进行了优化,得出最佳的工艺参数为:乙醇浓度 40%,提取温度 60 ℃,固液比 1: 15,提取时间 120 min。提取温度和乙醇浓度对新疆芫荽地上部分总黄酮提取率的影响较明显,固液比、提取时间的影响不明显。

在最佳工艺条件下新疆芫荽地上部分中总黄酮(以芦丁
(下转第 16 页)

OD₆₀₀ 在 0.8 左右。每次试验前,从 4 ℃ 保存的斜面上转接新制菌悬液,每个月重新制备斜面保存菌种。

1.2.2 菌株鉴定。为了确认获赠菌株的种属信息正误,对 HK1 进行形态观察、16S rDNA 序列测序、生理生化实验^[12]等,确定其分类学地位。

1.2.2.1 菌落形态观察。将培养好的 HK1 菌液进行适当稀释,取 10 μL 均匀涂布于 LB 固体培养基中,并将培养皿置于 30 ℃ 培养,待培养皿中长出适当大小的单菌落后观察其菌落形态特征。

1.2.2.2 菌株形态电镜观察。将 HK1 菌株接种于固体培养基上培养至肉眼可见菌落形态后,在菌落上滴加 5 μL 无菌水,用灼烧灭菌的接种针挑散菌落。用干净的盖玻片覆盖水面,使散落在水中的菌体与盖玻片接触。提起盖玻片使其风干,待玻片表面没有流动水滴后将盖玻片放入 3% 戊二醛中,4 ℃ 过夜固定。依次用 30%、50%、60%、70%、80%、90% 及无水乙醇梯度脱水,每梯度浸泡 10 min 2 次。二氧化碳临界干燥法过夜干燥。将干燥好的玻片粘到观察台上,使用离子镀膜仪为玻璃片表面覆盖一层金属铂使其导电,使用扫描电镜观察菌体形态。

1.2.2.3 菌株 16S rDNA 序列测序。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对 HK1 菌株的总 DNA 进行提取。分别以细菌的 16S rDNA 基因通用引物 27F:5′ - AGAGTTTGATCCCTGGCT-CAG - 3′ 和 1492R:5′ - TACCTGTGTACGACTT - 3′ (上海英骏生物技术有限公司合成) 为正、反向引物,对该菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增。产物送上海英骏生物技术有限公司纯化测序。测序结果使用 GenBank 进行 Blast 比对分析、整理后使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树,验证菌株。

1.2.2.4 生理生化特性。参照《伯杰细菌鉴定手册》^[13] 对菌株 HK1 进行生理生化试验,包括糖类发酵试验、淀粉水解试验、明胶水解试验、石蕊牛奶试验、甲基红 (MR)、接触酶试验、NaCl 耐受性试验、纤维素水解、好氧性检测和半固体穿刺试验。

1.2.3 对几种实验室常用抗生素的耐受性检测。

1.2.3.1 含抗生素的培养基制备。灭菌后的 LB 固体培养基冷却至 45 ℃ 左右时,在超净台上按梯度分别向培养基内添加抗生素至终浓度 (mg/L) 为 2.5、5.0、50.0、100.0、200.0、300.0、..., 添加完毕后摇匀培养基倒平板,每种抗生素每个浓度设置 3 个平板重复,冷却后备用。另外使用未添加抗生素的 LB 固体培养基为空白平板对照组。

1.2.3.2 菌株 HK1 对不同抗生素的耐受检测。吸取 5 μL 活化菌株制成的菌悬液涂布于抗生素平板及空白平板上,30 ℃ 倒置培养,最长培养 3 d 以免抗生素失效,观察并记录菌株生长情况。对在某抗生素各浓度平板上生长正常的,逐渐增加该抗生素浓度直至获得最大耐受浓度。

1.2.4 HK1 生长及 PVA 降解率测定。活化好的菌株 HK1 接种于 50 mL PVA 液体培养基中,30 ℃、180 r/min 培养,每隔 6 h 取培养液测定 OD₆₀₀,并另取一定量培养液进行硼酸 - 碘化钾显色反应 (具体步骤见“1.2.6.2”),计算其降解率。

1.2.5 降解条件研究。

1.2.5.1 温度对 PVA 降解的影响。将活化菌株按照 5% 接种于 PVA 液体培养基,置于不同温度 (20、25、30、35、40、45 ℃) 下 180 r/min 振荡培养 60 h,计算菌株对 PVA 的降解率。

1.2.5.2 pH 对 PVA 降解的影响。将活化菌株按照 5% 接种于不同初始 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0) 的 PVA 液体培养基中,在 30 ℃、180 r/min 下培养 60 h,计算菌株对 PVA 的降解率。

1.2.5.3 初始 PVA 浓度对 PVA 降解的影响。将活化菌株按照 5% 接种于含不同初始 PVA 浓度 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 g/L) 的 PVA 液体培养基中,30 ℃ 培养 60 h,计算菌株对 PVA 的降解率。为防止其他碳源影响,此处使用的培养基中不添加酵母粉。

1.2.5.4 酵母粉浓度对 PVA 降解的影响。将活化菌株按照 5% 接种于含不同浓度 (0.5、1.0、2.0、3.0 和 4.0 g/L) 酵母粉的 PVA 液体培养基中,置于 30 ℃ 培养 60 h,计算菌株对 PVA 的降解率。

1.2.6 分析方法。

1.2.6.1 菌体生物量测定。将活化好的菌株 HK1 接种于 PVA 液体培养基中,30 ℃、180 r/min 振荡培养,每隔 6 h 取样于比色皿中,用分光光度计测定 OD₆₀₀。

1.2.6.2 PVA 浓度测定及降解率计算。碘 - 硼酸试剂法^[14]:取 1.2 mL 培养液于 1.5 mL 离心管中,5 000 r/min 室温离心 20 min,取上清 1.0 mL 于 50 mL 容量瓶中,加入 15.0 mL 25 g/L 硼酸溶液、1.5 mL I₂ - KI 溶液,定容。室温避光反应 10 min 生成绿色溶液,于 690 nm 波长处测定吸光度。与标准曲线进行换算,再乘以稀释度得出残留 PVA 浓度。降解率计算^[14]:

$$\text{降解率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

式中, A_0 为空白试样 (即未接菌的空白培养基) 的吸光度; A_1 为降解样的吸光度。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 菌落形态特征。将涂布有菌株 HK1 的 LB 固体培养皿在 30 ℃ 下培养 25 h 后取出,对菌落形态进行观察。HK1 在 LB 固体培养基上的菌落呈不规则形状,浅黄色蜡质,不透明,表面干燥有褶皱,菌落中部隆起,边缘呈锯齿状。

2.1.2 菌株形态电镜观察。扫描电镜图 (图 1 左) 中可以清晰地看到 HK1 的菌体形态为椭圆杆状,长度约为 28 μm,直径约为 6 μm,图 1 右为菌群状态。

2.1.3 菌株生理生化特性。HK1 菌株的生理生化特性见表 1。

2.1.4 菌株 16S rDNA 序列测序。16S rDNA 序列测序结果表明,菌株 HK1 与 *Bacillus amyloliquefaciens* 的序列相似性达 100%,结合生理生化、菌落菌株形态,可以确定 HK1 为解淀粉芽孢杆菌属,验证了捐赠者的 16S rDNA 鉴定结果。菌株 HK1 的系统发育树见图 2。