

黑曲霉抗菌活性组分分离研究

李祝^{1*}, 丛铭¹, 刘松¹, 肖洋², 郭博恺¹, 施渺筱³, 王明力¹, 谢爱林¹

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省产品质量监督检验院, 贵阳 550004;
3. 贵州省安顺学院 农学院, 安顺 561000)

摘要: 黑曲霉(*Aspergillus niger*)是曲霉属黑曲霉群霉菌, 为低等真核生物。黑曲霉是集安全和具有许多活性强大酶系等诸多优点于一身的优良工业发酵用菌种。前期研究分离得到一株黑曲霉 *Aspergillus niger* xj, 其液体培养代谢物对根癌农杆菌、青枯雷尔氏菌、腐霉等常见农业病原菌有抑制作用。本文对黑曲霉的抗菌活性组分分离研究进行简要综述, 对于进一步开发和利用黑曲霉这一真菌资源, 研究开发新型的环境友好微生物杀菌剂具有较大的理论和实践意义。

关键词: 黑曲霉; 抗菌活性; 活性组分分离

Progress on active compounds in extracts of strain *Aspergillus niger*

LI Zhu^{1*}, CONG Ming¹, LIU Song¹, XIAO Yang², GUO Bo-Kai¹, SHI Miao-Xiao³, WANG Ming-Li¹, XIE Ai-Lin¹

(1. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Province Product Quality Supervision and Inspection Institute, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: *Aspergillus niger* is a fungus of lower eukaryotes. *Aspergillus niger* is a safe and excellent industrial fermentative strain, which can produce high levels of active enzymes. The former research had isolated an *Aspergillus niger* xj, of which the metabolites of liquid culture had an inhibitory effect on *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Pythium Pringsheim*, and other common agricultural pathogen. This paper briefly reviewed the separation of *Aspergillus niger* antimicrobial active ingredients. The present study showed a theoretical and practical significance for the further development and utilizing of this fungus and development of new environmentally friendly fungus bactericides.

KEY WORDS: *Aspergillus niger*; antibacterial activity; active component separation

1 引言

黑曲霉(*Aspergillus niger*)是曲霉属黑曲霉群霉菌, 为低等真核生物。菌丝体由具有横隔的分支菌丝构成, 菌丛黑褐色, 顶囊球形, 小梗双层, 分生孢子球形, 平滑或粗糙。曲霉在发酵、食品、粮食储藏、医药及饲料工业等方面都有着十分重要的地位。其中的黑曲霉是集安全和具有

许多活性强大酶系等诸多优点于一身的优良工业发酵用菌种。黑曲霉含有多种活性非常强大的酶系, 因此是重要的工业发酵菌种, 可以用于生产多种酶, 有胞外酶也有胞内酶。如糖化酶、淀粉酶、酸性蛋白酶、果胶酶、葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶、核糖核酸酶、脂肪酶、纤维素酶、橙皮苷酶、柚苷酶等。该菌种广泛应用于生产酶制剂(蛋白酶、果胶酶、淀粉酶)。在发酵工业中地位不凡, 用途非常广泛

基金项目: 国家自然科学基金(31460486); 贵州省科学技术厅、安顺市人民政府、安顺学院联合科技基金资助(黔科合 J 字 LKA[2012]06 号); 黔科合 NY[2014]3033 号; 黔科合 NY 字[2011]3053 号; 毕节市烟草公司课题(201109)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460486); LKA[2012]06; NY[2014]3033; NY[2011]3053; 201109

*通讯作者: 李祝, 教授, 主要研究方向为微生物。E-mail: zhuliluck@163.com

*Corresponding author: LI Zhu, Professor, College of Life Science, Guizhou University, Huaxi District, Guiyang 550025, China. E-mail: zhuliluck@163.com

[1]。黑曲霉是公认的安全(GRAS)微生物, 利用黑曲霉生产的酶制剂不仅安全、可靠, 而且生长比较快、发酵周期也较短, 具有非常明显的优越性。我国酶制剂工业生产用菌种中, 黑曲霉占了 17 种中的 3 种, 即黑曲霉 UV11 变异株、CP85211 和 3350, 分别用于糖化酶、果胶酶和酸性蛋白酶的生产[2]。

黑曲霉酶类在工业上的作用已愈来愈受到人们的重视, 但将黑曲霉运用在抑菌作用方面的研究报道较少。

2 黑曲霉对病原菌抑制作用

在国外, Farooqahamed 等[3]发现黑曲霉中的抗菌物质壳聚糖对蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌有抑制作用。Yoko 等[4]从 *Aspergillus niger* FKI-2342 发酵液中提取分离得到 6 种化合物 Tensuic Acids A, B, C, D, E, F, 以 *Bacillus subtilis* PCI 219, *Micrococcus luteus* PCI 1001, *Escherichia coli* NIHJ, *Xanthomonas oryzae* KB 88, *Mucor racemosus* IFO 4581 和 *Candida albicans* ATCC 64548 作为指示菌, 对这 6 种化合物抗菌活性进行测定, 研究发现只有 Tensuic acid C 对 6 个指示菌中的 *Bacillus subtilis* 显示了一定的抗菌活性, 而其他 5 种化合物未检测到抗菌活性。

在国内, Song 等[5]从狗牙根 *Cyndon dactylon* 叶子分离得到一株内生真菌 *Aspergillus niger* IFB-E003, 其能产生 4 个 γ -萘-吡喃酮类化合物 rubrofusarin B, fonsecinone A, asperpyrone B 和 aurasperone A。这 4 个化合物对细菌枯草芽孢杆菌 (*B. Subtilis*), 大肠杆菌 (*E. coli*) 和荧光假单胞杆菌 (*P. fluorescence*) 以及真菌 (红色发癣菌 *T. rubrum* 和白色念珠菌 *C. albicans*) 的 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 1.9~31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其中化合物 aurasperone A 的抗菌效果最好, 对 *B. Subtilis*, *E. coli* 和 *P. fluorescence* 的 MIC 分别为 1.9, 7.8, 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而阳性对照抗菌素 KKB8 的 MIC 为 0.45, 3.9, 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$; aurasperone A 对真菌 *T. rubrum* 和 *C. albicans* 的 MIC 为 3.9 和 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而阳性对照酮康唑的 MIC 均为 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 另外, 李祝[6,7]等从土壤中分离得到一株 *Aspergillus niger* xj, 其对根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)、5 种常见病原真菌腐霉 (*Pythium Pringsheim*)、茄病镰刀菌 (*Fusarium solan*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、西瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*)、桔青霉 (*Penicillium citrinum*) 均具有抑制作用, 并对 *Aspergillus niger* xj 抗根癌农杆菌发酵条件进行了优化。

果树细菌性根癌病菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 引起根癌病分布于世界各地, 是一种危害极大的世界性病害, 直接影响了果树产品的生产[8]。据报道美国由原核植物病原菌所造成的作物损失中, 果树和葡萄的根癌病排列第一; 我国的葡萄根癌病在北方地区 13 个省均有不同程度发生,

严重的果园植株发病率为 90% 以上[9-13]。此病的防治受到世界各国的关注, 国际上主要应用细菌在其代谢过程中产生的细菌素来对根癌农杆菌的生长起到预防和抑制的作用, 虽然细菌素作为生防制剂能维持生态平衡, 适应病害生态系, 而且耐突变, 但生防细菌不耐旱, 寿命短, 必须贮藏和随制随用[14]。而 *Aspergillus niger* xj 能有效抑制根癌农杆菌。

3 黑曲霉活性段的分离及纯化

Aspergillus niger xj 能产生哪些抑制根癌农杆菌的活性成分? 这些成分是什么, 如何分离、提取, 作用方式及作用机制是什么? 我们根据前期的工作基础, 结合生产实际, 选择根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* T-37、青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 及腐霉 (*Pythium Pringsheim*) 等常见病原菌作为指示菌。利用有机溶剂多步萃取法, 提取黑曲霉的活性成分。

3.1 溶剂提取法

溶剂提取法是根据发酵产物中各化学组分在溶剂中的溶解度各不相同, 选用对活性组分溶解度较大, 对其余组分溶解度较小或不溶的溶剂, 将有效组分从发酵产物内溶解出来的方法。溶剂可分为水、亲水性有机溶剂及亲脂性有机溶剂, 被溶解物质也有亲水性及亲脂性的不同[15]。因此, 我们就可以通过对发酵产物成分结构分析, 去选择合适的溶剂。总的说来, 只要天然产物成分的极性与溶剂的极性性质相当, 就会在其中有较大的溶解度, 即所谓“相似相溶”规律, 这是选择适当溶剂从天然产物中提取目标组分的重要依据。

3.2 微波辅助萃取

微波萃取又称微波辅助提取, 是指使用适合的溶剂在微波反应器中从天然药用植物、矿物、动物组织中提取各种化学成分的技术和方法[16,17]。1980 年, Ganzler[18-20] 首先报道了利用微波萃取技术从土壤、种子、食品、饲料中分离各种类型化合物的样品制备新方法, 并与传统的水蒸气蒸馏、索氏抽提等技术比较, 微波萃取技术可以缩短实验和生产时间、降低能耗、减少溶剂用量以及废物的产生, 同时可以提高收率和提取物的纯度降低实验操作费用和生产成本。

微波萃取技术在国内外受到了广泛关注。郝和生等[21] 对从黑曲霉提取壳聚糖进行了系列研究, 确定的最优提取条件为: 菌丝体:碱液体=1:10(v:v), 微波火力为 480 W, 消解时间为 20 min, 碱浓度为 20%, 醇水比为 1:1(v:v)。壳聚糖的脱乙酰度为 88%, 特性粘数为 1.132 dL/g。

3.3 超声提取法

超声提取法超声波是一种高频机械波。频率范围在 15~60 kHz 的超声常被用于过程强化和引发化学反应[22]。

利用超声波增大物质分子运动频率和速度, 增加溶剂穿透力, 提高药物溶出速度和溶出次数, 缩短提取时间的浸取方法^[23]。超声波在有机物降解和天然药物的有效成分提取等方面已有了一定的应用。超声波提取速度快、收率高, 已被许多中药分析过程选为供试样处理的手段^[24,25]。

宋丹丹等^[26]对黑曲霉多糖超声波提取工艺进行了优化研究, 黑曲霉在 75 °C, 固液比 1:25, 超声功率 400 w 时具有最大的多糖得率, 可达到 5.69%。张尊听^[27]等研究了野葛根中黄酮类化合物的提取。结果表明, 采用超声萃取法从野葛根中提取异黄酮活性成分具有省时、节约能源、总黄酮提取率和产品纯度高的优点。

3.4 高速逆流色谱分离技术

高速逆流色谱分离技术是一种不用任何载体或支撑体的液—液分配色谱技术, 该技术分离效率高产品纯度高, 不存在载体对样品的吸附和污染, 具有制备量大和溶剂消耗少等优点^[28,29]。可广泛应用于生物工程、医学、医药、化工、食品等领域^[30]。上世纪年代后期各国学者迅速认识到该技术的应用和开发价值, 并广泛应用于天然药物成分的分离制备和分析中有报道用该技术研究生物碱、黄酮、葱醌、香豆素等成分的分离都取得了较好的效果^[31]。

3.5 大孔树脂吸附法

大孔树脂吸附分离技术是近代发展起来的一类有机高聚物吸附剂, 在 21 世纪初逐渐应用于天然产物有效成分的提取和分离, 是使用吸附剂从发酵产物选择性吸附, 一种新的消除无效成分的提取精制工艺^[32]。此外, 大孔吸附树脂还可应用于中药有效成分样品组成含量测定前的预分离, 该方法具有设备简单、操作方便生产周期短、能源省、成本低、产品纯度高、不吸潮及不加辅料等优点, 因此大孔树脂吸附法在研究和生产中的应用日益广泛, 将这种方法应用于中药有效成分的分离取得了相当显著的成果^[33-35]。

3.6 离子交换色谱

离子交换色谱分离主要是通过带电荷溶质与固体或液体离子交换剂中可交换的离子进行反复多次交换而达到分离, 它在离子色谱中应用最广泛^[36]。其主要填料类型为有机离子交换树脂, 以苯乙烯二乙烯苯共聚体为骨架, 在苯环上引入磺酸基形成强酸性阳离子交换树脂, 引入叔胺基而成季胺型强碱性阴离子交换树脂, 此交换树脂具有大孔或薄壳型或多孔表面层型的物理结构, 以便于快速达到交换平衡^[37,38]。离子交换树脂耐酸碱, 可在任何 pH 范围内使用, 易再生处理, 使用寿命长, 缺点是机械强度差、易溶胀、易受有机物污染^[39]。

3.7 硅胶色谱

硅胶的表达式为 $\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$ 。层析用硅胶是一种多孔

性物质, 它的硅氧环交链结构表面上密布极性硅羟基 ($-\text{Si}-\text{OH}$), 这种极性的硅醇基能和许多化合物形成氢键而产生吸附。

3.7.1 薄层层析

薄层层析是一种微量、快速的层析方法^[40]。它不仅可用于纯物质的鉴定, 也可用于混合物的分离、提纯及含量的测定。还可以通过薄层层析来摸索和确定柱层析时的洗脱条件^[41]。根据分离的原理不同, 薄层层析可以分为两类用吸附剂铺成的薄层所进行的层析为吸附薄层层析用纤维素粉、硅胶、硅藻土为支持剂铺成的薄层, 属于分配薄层层析。薄层层析中以吸附薄层为多用, 吸附薄层中常用的吸附剂为氧化铝和硅胶^[42]。

在吸附薄层中, 化合物在吸附薄层上移动的速度与展开剂的极性有关。展开剂的极性越大, 化合物移动的速度越快; 展开剂的极性越小, 化合物的移动速度慢, 故选择适当的展开剂是首要任务^[43]。一般常用溶剂按照极性从小到大的顺序排列大概为石油醚<己烷<苯<乙醚<THF<乙酸乙酯<丙酮<乙醇<甲醇。使用单一溶剂, 往往不能达到很好的分离效果, 往往使用混合溶剂通常使用一个高极性和低极性溶剂组成的混合溶剂, 高极性的溶剂还有增加区度的作用^[44]。

3.7.2 硅胶柱层析

与薄层层析的原理相似, 利用吸附剂对样品中各成分吸附能力不同, 及展开剂对它们的解吸附能力的不同, 使各成分达到分离^[45]。柱层析关键在于柱子是否装好和淋洗剂是否选择恰当。而淋洗剂的选择则是通过 TLC 确定。TLC 的作用除了跟踪反应进程, 检测试剂和原料纯度外, 一个重要的用途就是为柱层析选择适当的淋洗剂^[46,47]。

最后利用硅胶柱层析、制备薄层等方法对萃取物进行分离得到抗菌单体化合物。利用红外光谱、质谱、核磁共振氢谱 $^1\text{H-NMR}$ 和碳谱 $^{13}\text{C-NMR}$ 等波谱数据对单体化合物的结构进行解析和鉴定。

4 黑曲霉抑菌活性的检测

活性测定主要通过研究提取物的抑菌圈大小、最小抑菌浓度和最小杀菌浓度。抑菌活性的常用测定方法主要包括纸片法、牛津杯法、K-B 法, 通过测定抑菌圈的大小测定抑菌活性的大小^[48]。也有通过平板计数、最小抑菌浓度和杀菌浓度来判定抑菌活性的大小^[49]。而抑菌机制研究主要在细胞和分子水平探讨提取物对细胞亚结构的破坏和抑制情况和细胞代谢关键环节的干扰情况。

4.1 影响细胞壁或细胞膜正常功能

提取物有效成分进攻微生物的细胞壁或细胞膜, 导致了细胞膜功能受到影响, 细胞内容物外泄, 最终导致细菌死亡。目前主要通过电导率测定、扫描电镜和透射电镜观察细胞膜的结构来研究 *Aspergillus niger* 产抑菌活性成

分对细胞膜的破坏情况^[50]。

4.2 影响能量代谢及还原酶系

目前主要通过测定细胞的生长曲线的抑制情况, 细胞周期的改变来初步研究细胞的能量代谢、物质代谢。再根据细胞周期情况模拟代谢模型和对关键酶的破坏情况, 比如测定丁二酸脱氢酶(SDH)及还原型辅酶(NADH)的活性探讨对细胞呼吸和细胞膜功能的影响, 同时也可测定呼吸过程的电子传递和氧化磷酸化过程的影响^[51]。

4.3 细胞蛋白质的破坏情况

通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳研究抑菌液对菌蛋白破坏情况, 得到抑菌液抑菌效果与蛋白质的破坏情况^[52]。

4.4 其他抑菌机制降解细胞壁

破坏细胞质膜; 破坏膜蛋白; 胞内成分渗出; 胞质凝结; 分子主动运输力损耗^[53]; 抑制酶的作用, 作为抗代谢物, 抑制核酸的合成等^[54]。

5 小 结

本课题组前期分离到的 *Aspergillus niger* xj 对果树细菌性根癌病菌进行有效抑制, 预防及防止果树发病, 间接提高了果实的产量和品质。本文一方面在理论上阐述了黑曲霉液体培养产生的活性成分的种类、作用方式及作用机制, 另一方面, 在实践上拓宽了黑曲霉的研究应用范围, 为果树等生物防治提供了新途径。

参考文献

- [1] 李卫华, 武新民, 王卫峰, 等. 黑曲霉产酶条件的研究[J]. 检验检疫科学, 2000, 10(3): 42.
Li WH, Wu XM, Wang WF, *et al.* *Aspergillus niger* enzyme production conditions [J]. *Inspect Quar Sci*, 2000, 10(3): 42.
- [2] 陶玉华. 植物根癌病防治研究进展[J]. 广西植保, 2004, 17(2): 25-27.
Tao YH, *Advances in cancer prevention research roots* [J]. *Guangxi Plant Prot*, 2004, 17 (2): 25-27.
- [3] Farooqahamed S, Kittura Acharya B, Vishu K, *et al.* Chitooligosaccharides—preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity [J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340(6): 1239-1245.
- [4] Yoko H, Takashi F, Keiichi H. Tensuic acids, new antibiotics produced by *Aspergillus niger* FKI-2342 [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(9): 1338-1341.
- [5] Song YC, Li H, Ye YH, *et al.* Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 241: 67-72.
- [6] 李祝, 宋宝安, 郁建平, 等. 根癌农杆菌拮抗真菌的筛选、鉴定及发酵条件研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 166-169.
Li Z, Song BA, Yu JP, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* antagonistic fungi screening, identification and fermentation conditions [J]. *Food Sci*, 2007, 28(2): 166-169.
- [7] 李祝. 根癌农杆菌拮抗真菌的筛选、发酵及有机锡新化合物抗 TMV、抗癌机制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
Li Z. *Agrobacterium tumefaciens* antagonistic fungi screening, fermentation and organic tin compounds new anti-TMV, the anticancer mechanism of [D]. Guiyang: Guizhou University, 2008.
- [8] Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10: 813-829.
- [9] 李祝, 葛永怡, 陈青, 等. 黑曲霉发酵液抗真菌活性及稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(7): 141-143.
Li Z, Ge YY, Chen Q, *et al.* *Aspergillus niger* fermentation broth antifungal activity and stability [J]. *Food Res Dev*, 2011, 32 (7): 141-143.
- [10] 马德钦, 王慧敏. 果树根癌病及其生物防治[J]. 中国果树, 1995, (2): 42-44.
Ma DX, Wang HM. *Root fruit trees and biocontrol cancer* [J] *Chin Fruit Trees*, 1995, (2): 42-44.
- [11] 游积峰, 谢雪梅, 陈培民, 等. 我国北方葡萄根癌病的发生规律及药物防治[J]. 植物保护学报, 1986, 13(3): 145-150.
You JF, Xie XM, Chen PM, *et al.* *Grape root of cancer in northern China Occurrence and drug prevention and treatment* [J]. *J Plant Prot*, 1986, 13 (3): 145-150.
- [12] 施文晓, 王洪凯, 郭庆元. 葡萄根癌病研究进展[J]. 浙江农业科学, 2013, (11): 1418-1421.
Shi WX, Wang HK, Guo QY. *Grape root cancer research* [J]. *Zhejiang Agric Sci*, 2013, (11): 1418-1421.
- [13] 张洁, 师校欣, 焦延静, 等. 葡萄根癌病原菌类型鉴定及几种杀菌剂和抗菌素对其抑菌效果[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(3): 77-81.
Zhang J, Shi XX, Jiao YJ, *et al.* *Classification of bacteria collected from crown gall and efficacy of some bactericides and antibiotics to their control in grapes* [J]. *Hebei Agric Univ*, 2013, 36(3): 77-81.
- [14] 吴健胜, 王金生. 植物病原细菌的细菌素[J]. 微生物学报, 1996, 23(2): 4-9.
Wu JS, Wang JS, *Plant pathogenic bacteria bacteriocins* [J]. *Acta microbiol Sin*, 1996, 23(2): 4-9.
- [15] 姚领. 海洋微藻抗菌活性藻株筛选及其活性物质分离纯化研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2007.
Yao L, *Antibacterial activity of marine microalgae algae strains isolated Screening and purification of active substances* [D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2007.
- [16] 龚磊, 黄小容, 龚其海, 等. 微波辅助提取瑞香狼毒总黄酮的研究[C]. 中国药学会、江苏省人民政府. 2012 年中国药学会大会暨第十二届中国药师周论文集, 2012.
Gong L, Huang XR, Gong QH, *et al.* *Research Stelleria chamaejasme microwave-assisted extraction of total flavonoids* [C]. Chinese Pharmaceutical Association, Jiangsu Province People's Government of China Pharmaceutical Conference and .2012 Twelfth China Pharmacist Week Proceedings, 2012.
- [17] 谢淑玲. 微波辅助提取法提取复方中草药有效成分的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 23: 11551-11552+11593.
Xie SL, *Microwave-assisted extraction method to extract the active ingredients of Chinese herbal compound* [J]. *Anhui Agric Sci*, 2012, 23: 11551-11552+11593.
- [18] 仇凡, 顾明冬. 微波辅助提取留兰香中挥发油的工艺优化[C]. 中国医药教育协会(China Medicine Education Association). 中国医药教育论坛-

- 中国医药教育协会第三届三次理事大会暨学术年会论文集专辑, 2013: 3.
- Qiu F, Gu MD. Microwave-assisted extraction of volatile oil of spearmint process optimization [C]. China Medicine Education Association. Chinese Medicine Education Forum - China Association of Pharmaceutical Education Third Annual Conference and three directors Papers album, 2013: 3.
- [19] 张轶群. 动态微波辅助萃取在食品和中药分析中的应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- Zhang YQ. Dynamic microwave-assisted extraction applied research [D] in the food and medicine analysis[D]. Changchun: Jilin University, 2014.
- [20] 郁颖佳. 微波辅助相关萃取技术在红花等药物分析中的应用研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- Yu YJ. Application of microwave-assisted extraction technique in drug-related analysis of safflower, etc. [D]. Shanghai: Fudan University, 2010.
- [21] 酃和生, 王吉龙, 张春原, 等. 利用微波技术从黑曲霉提取壳聚糖的研究[J]. 石化技术, 2001, 4: 222-224.
- Li HS, Wang JL, Zhang CY, *et al.* Research on the use of microwave technology to extract chitosan from *Aspergillus niger* [J]. *Pe Technol*, 2001, 4: 222-224.
- [22] 李莉. 金银花提取工艺的研究[D]. 天津: 天津大学, 2007.
- Li L. Research Honeysuckle Extraction [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007.
- [23] 胡殿丽. 木蝴蝶总黄酮提取工艺和脂肪酸成分研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- Hu DL. Constituents of the process of total flavonoids and fatty acids extracted *Oroxylum indicum*[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2010.
- [24] 于云虎. 超声强化提取中草药的优化研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- Yu YH. Optimization of ultrasonic extraction of herbs to strengthen [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2011.
- [25] 王雪梅. 提高小儿咽喉颗粒提取过程中绿原酸浸提率的研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2012.
- Wang XM. Improvement of Pediatric pharynx flat particle extraction process of chlorogenic acid leaching rates [D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2012.
- [26] 宋丹丹. 曲霉多糖的提取及其抑菌活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- Song DD. *Aspergillus polysaccharides* extracted and antibacterial activity of [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.
- [27] 张尊听, 杨伯伦, 刘谦光, 等. 野葛根异黄酮成分的超声萃取及抗氧化作用[J]. 食品科学, 2002, 5: 31-33.
- Zhang ZT, Yang BL, Liu QG, *et al.* Ultrasonic extraction and antioxidant ingredients *Pueraria Isoflavones* [J] *Food Sci*, 2002, 5: 31-33.
- [28] 高蕾. 高速逆流色谱分离甘草和淡豆豉中主要黄酮成分的研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- Gao L. Research on high-speed countercurrent chromatography licorice and SSP's main flavonoids [D]. Chengdu: Sichuan University, 2007.
- [29] 李佳莲. 高速逆流色谱分离纯化麻黄、苍白秤钩风、钩吻和蟾酥中活性成分的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
- Li JL. High-speed countercurrent chromatography separation and purification of ephedra, pale scales hook wind, and Toad study *Oncorhynchus active ingredient* [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2013.
- [30] 林仙江. 小球藻活性成分的逆流色谱分离方法研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.
- Lin XJ. Research countercurrent chromatography method *Chlorella active ingredients* [D]. Hangzhou: Zhejiang Industry and Commerce University, 2013.
- [31] 张敏. 高速逆流色谱分离纯化人参、龙胆中的有效成分[D]. 长春: 长春师范学院, 2011.
- Zhang M. High-speed countercurrent chromatography purified ginseng, gentian active ingredient in [D]. Changchun: Changchun Normal University, 2011.
- [32] 白夺龙, 杨开华. 大孔吸附树脂分离纯化化技术及应用[J]. 海峡药学, 2007, 9: 96-99.
- Bai DL, Yang KH. Macroporous resin separation and purification technology and application [J] *Strait Pharm*, 2007, 9: 96-99.
- [33] 刘江波. 大孔吸附树脂分离纯化黄酮类化合物的规律性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- Liu JB. Regularity of macroporous resin separation and purification of flavonoids [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [34] 麻宁. 氢键吸附树脂体系的建立及其应用[D]. 天津: 南开大学, 2013.
- Ma N. Establish hydrogen adsorption resin system and its application [D]. Tianjin: Nankai University, 2013.
- [35] 董占波. 吸附分离法制备茶叶儿茶素类和茶氨酸的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- Dong ZB. Adsorption and separation of Preparation of tea catechins and theanine [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [36] 陆泉, 施波, 李瑞胜, 等. 离子交换色谱在细菌素分离纯化中的应用[J]. 中国微生物学杂志, 2010, 6: 570-572.
- Lu Q, Shi B, Li RS, *et al.* Ion exchange chromatography separation and purification of bacteriocins application [J]. *Chin J Microecology*, 2010, 6: 570-572.
- [37] 盛露莹. 选择性分离材料及其在修饰蛋白质组学中的应用[D]. 上海: 华东理工大学, 2014.
- Sheng QY. Selective separation of materials and their applications in proteomics modified [D]. Shanghai: East China University of Technology, 2014.
- [38] 石林娟. 西兰花籽中萝卜硫苷提取分离工艺研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
- Shi LJ. Radish glucosinolates in broccoli seeds Extraction Separation Process[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2013.
- [39] 张敬彩. 中药千层塔中生物碱成分的色谱分离方法研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2013.
- Zhang JC. Chromatographic separation methods of traditional Chinese medicine research alkaloids *Melaleuca tower* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013.
- [40] 李英波. 从灵芝菌丝体中高效分离制备抗肿瘤灵芝酸单体的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
- Li YB. Preparation of anti-tumor *Ganoderma acid monomer* efficiently isolated from mycelia [D]. Shanghai: East China University of Technology, 2013.
- [41] 李晓娜, 曹清明, 钟海雁, 等. 薄层层析技术在植物活性成分研究中的应用进展[J]. 食品与机械, 2010, 6: 144-147.

- Li XN, Cao QM, Zhong HY, *et al.* Progress of TLC technology in the study of plant active ingredient [J]. Food Mach, 2010, 6: 144–147.
- [42] 王莉, 卢良坤, 丁喆, 等. 样品中未知物质分离鉴定方法的研究[J]. 中国酿造, 2011, 12: 91–95.
Wang L, Lu LK, Ding Z, *et al.* Identification of research material separating the unknown samples [J]. Chin Brewing, 2011, 12: 91–95.
- [43] 张丽. 印楝内生放线菌抑菌活性物质及作用机制初步研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
Zhang L. Preliminary Study of active substances and mechanism of action of neem endogenous antimicrobial actinomycetes [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2014.
- [44] 陈琛. 松口蘑多糖的提取[D]. 大连: 大连工业大学, 2009.
Chen C. Polysaccharides extracted matsutake[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2009.
- [45] 吴来东. 埃博霉素提取工艺优化[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2012.
Wu LD. Epothilone extraction process optimization [D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2012.
- [46] 田翠. 三七皂苷转化菌株的筛选及其转化产物的分离纯化与鉴定[D]. 上海: 上海师范大学, 2008.
Tian C. Screening notoginsenoside transformed strain and its transformation products Purification and identification of [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2008.
- [47] 王琢. 抑黄曲霉毒素的 Hitwh-B05 菌株有效成分的分离纯化与鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
Wang Z. Suppression of aflatoxin Hitwh-B05 strain active ingredient Purification and identification of [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013.
- [48] 王关林, 姜丹, 李霞. 病原菌抑菌机理的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 23–24.
Wang GL, Jiang D, Li X. Studies on antibacterial mechanism [J]. Acta Microbiol Sin, 2004, 44(1): 23–24.
- [49] Kawaguchi A, Inoue K. Grapevine crown gall caused by *Rhizobium radiobacter* (Ti) in Japan [J]. J Gen Plant Pathol, 2009, 75: 205–212.
- [50] Martin B, Mark R, Albrecht NG, *et al.* Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces* [J]. J Gen Plant Pathol, 1988, 23(6): 534–538.
- [51] Kim KJ, Kim YB, Shin DH. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent [J]. J Microbiol Biotechn, 2002, 36 (7): 235–241.
- [52] 刘梦茵, 刘芳, 周涛, 等. 乌梅提取物对蜡状芽孢杆菌的抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 103–105.
Liu MY, Liu F, Zhou T, *et al.* Research ebony extracts of antibacterial mechanism of *Bacillus cereus* [J] Food Sci, 2012, 33(1): 103–105.
- [53] 张赞彬, 郭媛. 香辛料精油抑菌机理研究进展及其在食品保藏中的应用[J]. 中国调味品, 2011, 33(1): 4–10.
Zhang YB, Guo Y. Progress bacteriostatic mechanism spice oils and its application in food storage [J] Chin Condiment, 2011, 33(1): 4–10.
- [54] 韩淑琴, 杨洋, 黄涛, 等. 仙人掌提取物的抑菌机理[J]. 食品科技, 2007, 32(3): 130–134.
Han SQ, Yang Y, Huang T, *et al.* Inhibitory mechanism cactus extract [J]. Food Sci Technol, 2007, 32(3): 130–134.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



李 祝, 教授, 主要研究方向为微生物。
E-mail: zhuliluck@163.com