

王 丰,郭道友,范余娟. 毒蝇鹅膏菌有效成分的提取工艺及抗菌特性[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):177-179.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.056

毒蝇鹅膏菌有效成分的提取工艺及抗菌特性

王 丰^{1,2},郭道友³,范余娟¹

(1. 吉林农业科技学院,吉林吉林 132101; 2. 吉林省长白山动植物资源利用与开发实验室,吉林吉林 132101;

3. 吉林省舒兰市第二高级中学,吉林吉林 132600)

摘要:以长白山有毒真菌毒蝇鹅膏菌为原料,研究其活性成分的超声波提取工艺和抑菌性,确定了其最佳提取工艺条件:丙酮质量浓度 85%,料液比 1 g:25 mL,浸提温度 20℃,浸提时间 40 min。其中,丙酮质量浓度是影响提取率的主要因素。毒蝇鹅膏菌提取液对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄葡萄球菌均有明显的抑菌效果,最低抑菌浓度是 0.062 5%;对酵母、青霉、米根霉、黑曲霉抑菌效果不明显。

关键词:长白山有毒真菌;有效成分;提取;抑菌

中图分类号:S482.2⁺92 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0177-03

有毒真菌是含有对人或动物有毒成分的真菌的总称,一般是指大型真菌的子实体被人或动物食用后产生中毒反应的物种。据不完全统计,世界上已知具较明显毒性的大型真菌有 400 多种,如包括有轻微毒性的,则有 1 000 多种,中国目前包括怀疑有毒在内的大型有毒真菌有 421 种。近年来,传统化学农药面临严峻的挑战,大量高毒、高残留农药被禁止使用,开发对有害生物高效、易分解、且分解产物对环境无损害的生物农药是目前广泛研究和应用的领域。利用天然植物中具有良好抑菌杀菌活性的物质来防治农林病虫害成为农药学研究的热点^[1]。据相关资料反映,大多数研究的是有毒真菌的杀虫效果,国内外比较少有关于抑菌效果的研究。笔者对长白山有毒真菌有效成分的提取工艺及抗菌特性进行了研

究,旨在为有毒真菌提取物在农林业生产实践即植物源抑菌剂中的开发利用提供理论依据,也为有毒真菌的开发开辟一条新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

供试菌种:枯草杆菌、大肠杆菌、金黄葡萄球菌、青霉、黄曲霉、黑曲霉,来自吉林农业科技学院实验室。

有毒真菌:毒蝇鹅膏菌,采集于吉林省白山市八道江镇长白山原始林区。

试验仪器:722 型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;电子恒温水浴锅;高温高压蒸汽灭菌锅等。

主要试剂:乙醇、三氯甲烷、丙酮、石油醚、牛肉膏、蛋白胨等,均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 杀虫活性物质提取工艺 在单因素试验的基础上,选定料液比、提取温度、提取时间 3 个参数为主要影响因素,每个因素取 3 个水平,采用 3 因素 3 水平 $L_9(3^3)$ 正交试验设计,找到超声辅助丙酮提取最佳工艺^[2-3],因素及水平设计见表 1。

1.2.2 真菌提取液的抑菌性测定 将 7 种供试菌种分别制

体培养条件[J]. 林业科技开发,2013,27(4):111-114.

[5]陈琳,孟美娇,杨绍斌,等. 豹斑毒鹅膏菌液体培养及产物毒性的初步研究[J]. 贵州农业科学,2011,39(10):93-96.

[6]汪梦筱,王伟,汪维云. 羊肚菌液体深层发酵工艺优化研究[J]. 包装与食品机械,2014(1):15-18.

[7]毛宁,丁珊珊,余宗钟. 裸盖菇 L-001 菌株液体培养及其产毒素初探[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,2009,25(6):77-81.

[8]王霞,范腕腕,邓天福. 四种植物精油对花斑皮蠹的熏蒸作用[J]. 河南科技学院学报:自然科学版,2013,33(3):75-78.

[9]邓天福,姜雪晓. 大蒜生姜提取物对花斑皮蠹幼虫的驱避作用[J]. 河南科技学院学报:自然科学版,2011,39(1):47-50.

收稿日期:2014-11-07

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科学技术研究(编号:吉教科合字[2013]第 331 号);吉林农业科技学院储备基金(编号:吉农院合字[2012]第 417 号);吉林省长白山动植物资源利用与开发实验室资助项目(编号:吉农院合字[2012]第 724 号);2013 年吉林省高等学校大学生创新创业训练计划。

作者简介,王 丰(1973—),女,吉林永吉人,硕士,副教授,主要从事分析化学和天然产物提取方面的科研与教学工作。E-mail:jlhkjxgc@126.com。

今后还应该深入研究不同使用方法和不同发育阶段的生物活性等方面,为大型真菌复合植物源诱杀剂的进一步开发和利用提供理论依据。

参考文献:

[1]邓天福,王霞. 两种防蛀剂对花斑皮蠹的熏蒸活性研究[J]. 河南科技学院学报:自然科学版,2013,6(6):18-20.

[2]卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000:1-17.

[3]图力古尔,包海鹰,李玉. 中国毒蘑菇名录[J]. 菌物学报,2014(3):517-548.

[4]张 扬,赵 阳,范克胜,等. 红绒盖牛肝菌发酵培养基筛选及液

表 1 杀虫活性物质提取工艺正交试验因素水平

水平	因素		
	A:料液比(g:mL)	B:温度(℃)	C:时间(min)
1	1:25	20	20
2	1:20	30	30
3	1:15	40	40

成菌悬液。采用滤纸片法测定抑菌性:牛肉膏蛋白胨培养基平板上分别涂布 0.2 mL 的金黄葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌菌悬液,PDH 培养基平板上分别涂布 0.2 mL 米根霉、青霉、酵母、黑曲霉悬液,然后将灭菌滤纸片浸在提取液中,放入培养皿中,做 3~4 个平行,细菌置培养箱中 30℃ 培养 24 h,霉菌置培养箱中 35℃ 培养 24 h 后,测量滤纸片抑菌圈直径大小。抑菌圈越大,抑菌效果越好。

2 结果与分析

2.1 料液比对提取率的影响

称取真菌粉末 1.00 g,加入 85% 丙酮,料液比分别为 1 g:10 mL、1 g:15 mL、1 g:20 mL、1 g:25 mL、1 g:30 mL,40℃ 水浴中超声波辅助提取,频率为 24 kHz,提取时间为 30 min,在 35℃ 旋转蒸发仪中减压蒸馏,过滤,定容 50 mL。分别取提取液 1 mL 置于分光光度计 352 nm 波长下测吸光度,研究料液比对提取效果的影响,结果见图 1。从图 1 可知,随着料液比的增大,吸光度不断提高,而料液比 1 g:25 mL 时与 1 g:30 mL 时的提取率没有显著差异。从节约成本方面考虑,本试验选择了 1 g:25 mL 的料液比。

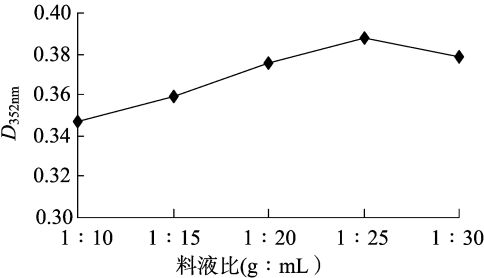


图1 料液比对提取率的影响

2.2 提取时间对提取率的影响

称取真菌粉末 1.00 g,加入 85% 丙酮,料液比为 1 g:20 mL,提取时间分别为 10、20、30、40、50、60、70 min,在 20℃ 水浴中超声波辅助提取,频率为 24 kHz。分别取提取液 1 mL 置于分光光度计 352 nm 波长下测其吸光度,研究提取时间对提取效果的影响,结果见图 2。由图 2 可以看出,提取时间为 40 min 时,提取效果最好。提取时间低于 40 min 时,随着提取时间的延长,吸光度逐渐增大;提取时间高于 40 min 时,提取液的吸光度基本没有变化。提取时间为 70 min 时,吸光度下降到 0.374。因此确定超声辅助提取时间为 40 min。

2.3 提取温度对提取率的影响

称取真菌粉末 1.00 g,加入 85% 丙酮,料液比为 1 g:20 mL,分别于 10、15、20、25、30℃ 水浴中超声波辅助提取,频率为 24 kHz,提取时间为 40 min,分别取提取液 1 mL 置于分光光度计 352 nm 波长下测其吸光度,研究提取温度对提取效果的影响,结果见图 3。由图 3 可以看出,20℃ 时其吸光度达最高,当温度超过 20℃ 后,提取液的吸光度开始平缓下

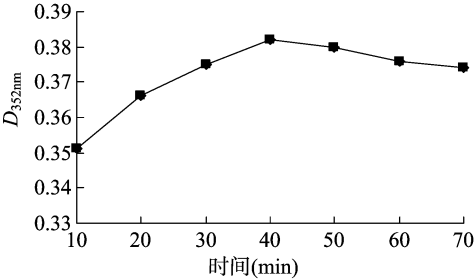


图2 提取时间对提取率的影响

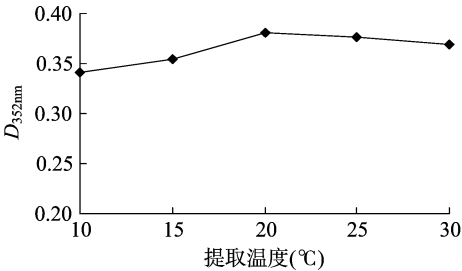


图3 提取温度对提取率的影响

降。在超声条件下,提取液在较低的提取温度条件下即可溶出,因此,提取温度以 20℃ 效果最好。

2.4 正交试验结果

由于料液比、提取温度、提取时间因素对试验结果影响显著,故选择料液比(A)、温度(B)、时间(C)进行正交试验,结果见表 2。根据极差分析可以得出,3 种因素对提取效果影响大小依次为 A>C>B,即料液比对提取效果影响最大,其次为提取时间,提取温度影响最小。由此可确定最佳提取工艺条件为 A₁B₁C₃,即料液比为 1 g:25 mL、提取温度为 20℃、提取时间为 40 min。

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	$D_{352\text{ nm}}$
1	1	1	1	0.387
2	1	2	2	0.381
3	1	3	3	0.384
4	2	1	3	0.382
5	2	2	1	0.376
6	2	3	2	0.383
7	3	1	2	0.378
8	3	2	3	0.382
9	3	3	1	0.377
k_1	0.384	0.382	0.380	
k_2	0.381	0.380	0.381	
k_3	0.379	0.381	0.383	
R	0.005	0.002	0.003	

2.5 抑菌作用

提取液对金黄葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有明显的抑菌效果,对酵母、青霉、米根霉、黑曲霉抑菌效果很弱。然后用浓缩液对 4 种霉菌做抑菌性试验,抑菌效果仍然不明显。可以断定,毒蝇鹅膏菌提取液的抑菌性:金黄葡萄球菌>枯草芽孢杆菌>大肠杆菌,对 4 种霉菌抑菌性不明显(表 3)。

2.6 最低抑菌浓度(MIC)的确定

牛肉膏蛋白胨培养基灭菌后,在其还未凝固时,在无菌操

表 3 真菌提取液对 7 种指示菌的抑菌效果

供试菌种	抑菌圈直径 (mm)				
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	均值
金黄色葡萄球菌	24	25	24	23	24
大肠杆菌	18	21	20	18	19.25
枯草芽孢杆菌	21.5	23	21.5	22	22
米根霉	6	6	7	6.5	6.375
青霉	6	5	6	4	5.25
酵母	6	0	0	0	1.5
黑曲霉	6	6	7	7	6.5

作台中用灭菌的量筒配制含 0.031 25%、0.062 5%、0.125%、0.25%、0.5%、0.1%、5% 的毒蝇鹅膏菌提取液,抑菌试验操作方法同上,用枯草芽孢杆菌涂布,30℃ 培养 24 h 之后观察菌落生长情况,其他 2 种细菌以同样的方法测定。由表 4、5、6 可见,和对照组相比,0.062 5% 浓度时菌落明显减少;0.25% 浓度时,没有菌落出现;0.031 25% 以下菌落数目和对照组相比没有明显减少。因而得出结论:毒蝇鹅膏菌提取液对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度是 0.062 5%。

表 4 对枯草芽孢杆菌的 MIC 试验结果

浓度 (%)	菌落生长情况		
	1 号	2 号	3 号
0	++++	++++	++++
0.031 25	++++	++++	++++
0.062 5	++	++	++
0.125	-	+	-
0.25	-	-	-
0.5	-	-	-
1	-	-	-
5	-	-	-

表 5 对大肠杆菌的 MIC 试验结果

浓度 (%)	菌落生长情况		
	1 号	2 号	3 号
0	++++	++++	++++
0.031 25	++++	++++	++++
0.062 5	++	+++	++
0.125	-	+	-
0.25	+	-	-
0.5	-	-	-
1	-	-	-
5	-	-	-

表 6 对金黄色葡萄球菌的 MIC 试验结果

浓度 (%)	菌落生长情况		
	1 号	2 号	3 号
0	++++	++++	++++
0.031 25	++++	+++	++++
0.062 5	++	+	++
0.125	-	-	-
0.25	-	-	-
0.5	-	-	-
1	-	-	-
5	-	-	-

注:“+”为阳性,有菌生长;“-”为阴性,无菌生长。

2.7 提取物的耐热性

将真菌提取液沸水浴 5、10、20、30、40、50、60 min,每个时

间点用金黄色葡萄球菌做指示菌,用滤纸片法做抑菌性试验,3 个平行。如图 4、图 5、图 6 所示,真菌提取液沸水浴 1 h 之后,其抑菌圈大小和对照组相比变化不大,说明提取物中的抑菌物质耐热性很强,即温度对提取物抑菌效果没有明显的影响。

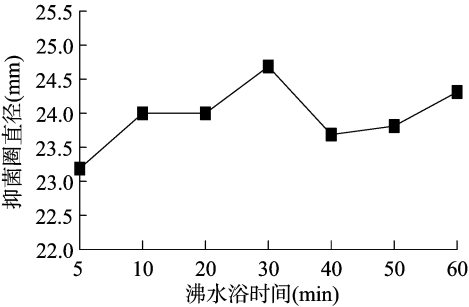


图 4 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果

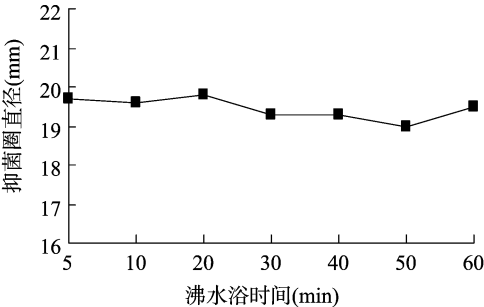


图 5 对大肠杆菌的抑菌效果

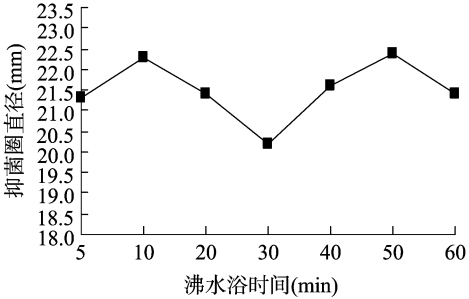


图 6 对枯草芽孢杆菌的抑菌效果

3 结论与讨论

本研究结果表明,超声波辅助丙酮提取毒蝇鹅膏菌有效成分最佳提取工艺为:提取时间为 40 min,提取温度为 20℃,料液比为 1 g : 25 mL。本试验采用超声波辅助法提取真菌提取液,影响提取效果的因素还有很多,如其他提取方法、提取剂、粉碎度、提取次数等,该试验的进行可以为进一步研究及实现产业化提供技术支持。毒蝇鹅膏菌提取液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌均有明显的抑菌效果,对酵母、青霉、米根霉、黑曲霉抑菌效果不明显。

参考文献:

[1]李首昌,刘凤沂,马建华. 生物农药的开发与应用[J]. 现代化农业,2002,276(7):10-11.
[2]王 丰,赵 权. 串红花色素的提取与稳定性研究[J]. 江苏农业科学,2010(6):473-475.
[3]王 丰,赵 敏,薛晓丽. 杭白菊多糖超声提取工艺的研究[J]. 北方园艺,2012(2):28-31.