

剑麻渣果胶提取工艺的研究

陈芳艳¹, 王林川², 杨艳¹, 陈希¹, 刘伟强¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:以剑麻渣为原料提取果胶,采用正交试验优化提取条件,并对剑麻果胶的分离及脱色进行研究,得出制备剑麻果胶的最佳工艺条件为:以 $2.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草酸-草酸铵缓冲溶液为提取剂,料液比为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,时间 90 min,温度 80°C ,在 pH4.0 条件下用乙醇沉淀果胶,果胶产率为 14.87%;用 w 为 1.8%~2.4% 的过氧化氢脱色,获得浅黄色果胶.理化性质研究表明,剑麻果胶为酯化度 23% 的低酯果胶, w (半乳糖醛酸)为 66%,pH、灰分等指标均符合国家轻工行业标准.

关键词:剑麻渣;果胶;提取;沉淀;脱色

中图分类号:Q539.8

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2012)01-0077-05

Extraction of Pectin from Sisal Residue

CHEN Fang-yan¹, WANG Lin-chuan², YANG Yan¹, CHEN Xi¹, LIU Wei-qiang¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The method of pectin extraction from sisal residue was optimized by orthogonal experiments, and pectin separation and decoloration were also studied. The optimized extraction conditions were as follows: $2.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oxalic acid-ammonium oxalate buffer as extracting agent, the solid to liquid ratio $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, time 90 min, temperature 80°C . Pectin was precipitated by alcohol at pH 4.0; the yield of sisal pectin was 14.87%. The primrose yellow pectin was decolorated by 1.8%~2.4% H_2O_2 . The results of physicochemical property were that the degree of esterification of sisal pectin was 23%, galacturonic acid 66%, pH and ash all complying with Chinese light industry standards.

Key words: sisal residue; pectin; extraction; precipitation; decoloration

果胶具有良好的凝胶和乳化稳定作用,是在食品、医药和其他工业中应用的重要多糖之一.在食品中可用做胶凝剂、增稠剂、组织成型剂、乳化剂和稳定剂等,用来制造果酱、果冻、果脯、冰制品、酸奶制品、饮料和烤肉调味酱等^[1],在医药上具有抗菌、止血、消肿、解毒、止泻、降血脂、抗辐射等作用,还是一种优良的药物制剂基质,可与其他制剂合用配制软膏、膜、栓剂、胶囊等药物.果胶对维持血液中正常的胆固醇含量具有非常好的效果,还能够防止阳离子中毒,能有效地除去肠胃和呼吸道中的铅和汞^[2].剑麻 *Agave sisalana* 是一种龙舌兰科龙舌兰属的叶纤维

作物,它含有多种皂苷元、蛋白质、多糖类化学成分,具有降胆固醇、抗炎、抗肿瘤等药理作用.性味甘、辛、凉;功能为凉血止血、消肿解毒;主治肺癆咯血、衄血、便血、痢疾、痈疮肿毒、痔疮等,在广西长期作为地方植物药应用^[3].剑麻根茎中的汁液可用于酿酒,如墨西哥的剑麻酒世界闻名,被称为墨西哥国酒.墨西哥亦开发利用剑麻作为动物饲料^[4].我国华南地区有丰富的剑麻资源,为麻工业提供了大量的原料,但同时也产生了大量的剑麻渣,不仅占用场地,而且污染环境.国内通常直接用来作为有机肥料或废渣处理,利用程度低,亟待对剑麻渣进行综合利

收稿日期:2011-04-19

作者简介:陈芳艳(1971—),女,讲师,博士;通信作者:刘伟强(1972—),男,高级实验师, E-mail:liuweiqiang@scau.edu.cn

基金项目:广东省产学研项目(4300-E11089)

用. 剑麻渣中含有大量的果胶、皂甙、纤维素等物质, 对其开发利用, 不仅提高剑麻的经济效益, 而且有利于保护环境. 生产食品工业上需求量极大的果胶, 是提高剑麻渣经济价值的有效方法.

本试验从提取了皂甙之后的剑麻渣中提取果胶, 研究剑麻果胶的提取工艺及其理化性质, 为果胶制备提供新的材料来源.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

剑麻渣: 湛江剑麻厂提供; 咔唑: 分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司; 半乳糖醛酸 ($D-(+)$ Galacturonic acid): 纯度 $>93\%$, Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 剑麻果胶制备工艺流程

剑麻渣 $\rightarrow$ 漂洗灭酶 $\rightarrow$ 抽提 $\rightarrow$ 过滤浓缩 $\rightarrow$ 滤液脱色 $\rightarrow$ 醇析 (过滤) $\rightarrow$ 干燥 $\rightarrow$ 剑麻果胶.

1.3 剑麻果胶提取液的制备

1.3.1 剑麻果胶提取的正交试验 将萃取完皂甙后的剑麻渣按料液比 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的比例加入蒸馏水, 在水浴中加热保温 0.5 h , 使其吸水充分软化, 并适当加以搅拌, 然后用纱布过滤, 挤干, 反复三四次, 以达到漂洗及灭酶的目的.

准确称取 9 份各 10 g 经上述处理后的剑麻渣, 加入草酸-草酸铵缓冲溶液, 在一定温度下提取果胶. 以料液比、温度、时间、草酸-草酸铵缓冲溶液浓度 4 个因素确定最佳的果胶提取条件, 每个因素各取 3 个水平, 以果胶产率为指标, 进行 4 因素 3 水平的正交试验 $L_9(3^4)$ (表 1), 反应结束后用乙醇沉淀, 过滤, 70°C 烘至恒质量后, 称质量, 计算果胶得率.

果胶得率 = 果胶质量 / 剑麻渣质量 $\times 100\%$.

表 1 剑麻果胶提取的正交试验设计

Tab. 1 Orthogonal test table of extracting pectin from sisal

水平	料液比/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\theta/^\circ\text{C}$	t/min	$c(\text{缓冲液})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
	(A)	(B)	(C)	(D)
1	1:10	60	30	0.2
2	1:15	80	60	0.5
3	1:20	100	90	0.8

1.3.2 草酸-草酸铵浓度对果胶得率的影响 分别称取 5 g 经处理的剑麻渣 9 份, 在料液比为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、温度 80°C 、浸提 90 min 的条件下, 加入浓度分别为 0.1 、 0.4 、 0.7 、 1.0 、 1.3 、 1.6 、 1.9 、 2.2 、 2.5 mol/L 的草酸-草酸铵缓冲溶液 ($\text{pH}=3$) 进行抽提, 比较果胶得率.

1.4 剑麻果胶脱色

取 10 mL 果胶提取液 6 份, 分别置于具塞试管中, 加入质量分数为 30% 的 H_2O_2 , 使果胶提取液中过氧化氢的质量分数分别为 0 、 0.6% 、 1.2% 、 1.8% 、 2.4% 、 3.0% , 混匀后放置 12 h , 观察颜色变化, 然后加乙醇, 沉淀, 过滤, 烘干得到脱色果胶.

1.5 剑麻果胶的分离

1.5.1 沉淀剂对果胶分离效果的影响 取 100 mL 果胶提取液 3 份, 分别加入 5 g CaCl_2 、 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 100 mL φ 为 95% 的乙醇, 搅拌均匀后放置 12 h , 过滤得到果胶, 70°C 烘干至恒质量, 比较果胶得率.

1.5.2 醇析 pH 对果胶分离效果的影响 分别在 6 份 50 mL 果胶提取液中加入等体积的 φ 为 95% 的乙醇后, 用 HCl 调节 pH 分别为 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 , 放置 12 h 后, 过滤得到果胶, 70°C 烘干至恒质量, 比较果胶得率.

1.6 剑麻果胶中半乳糖醛酸含量的测定

采用咔唑硫酸比色法, 在波长 530 nm 处测定果胶溶液的光密度^[5].

1.7 果胶酯化度 (DE) 的测定

取 3 份干样品分别测果胶酯化度. 参考 Pinheiro 等^[6]的方法, 称取 0.2 g 果胶移入 250 mL 锥形瓶中, 用乙醇润湿, 加入 20 mL 40°C 不含 CO_2 的蒸馏水, 用瓶塞塞紧并振摇, 使样品全部溶解. 加入 5 滴酚酞, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液进行标定, 记录所消耗 NaOH 的体积 (V_1) 即为初滴定量. 继续加入 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液 10 mL , 加塞后强烈振摇 2 h , 加入 0.1 mol/L 的 HCl 10 mL , 振摇至粉红色消失为止. 然后加入 3 滴酚酞指示剂, 用 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定至呈微红色. 记录所消耗 NaOH 的体积 (V_2), 即为皂化滴定量.

$$\text{果胶酯化度} = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100\%.$$

1.8 剑麻果胶 pH、总灰分的测定

剑麻果胶 pH、总灰分按照国标 QB2484—2000^[7] 中规定的方法进行测定.

2 结果与分析

2.1 剑麻果胶提取条件的确定

2.1.1 正交试验结果

从表 2 可看出, 各因素的最优组合为 $A_1B_2C_3D_3$, 即提取剑麻果胶的最佳工艺条件: 料液比为 $1 \text{ g} : 10 \text{ mL}$ 、草酸-草酸铵溶液浓度为 0.8 mol/L 、温度为 80°C 、反应时间 90 min . 由 R 可知, 各因素对果胶提取

率影响的主要次序为 $D > C > B > A$, D 的极差最大, A 的极差最小. 极差越大, 反映该因素水平变动时, 总指标变化越大, 即草酸-草酸铵缓冲液的浓度对果胶提取率的影响最大.

表2 剑麻果胶提取正交试验结果

Tab. 2 Orthogonal test results of extracting pectin from sisal

水平	料液比/ ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\theta/^\circ\text{C}$	t/min	$c(\text{缓冲液})/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	果胶 产率/%
(A)	(B)	(C)	(D)		
1	1:10	60	30	0.2	3.23
2	1:10	80	60	0.5	3.98
3	1:10	100	90	0.8	10.59
4	1:15	60	60	0.8	4.49
5	1:15	80	90	0.2	5.21
6	1:15	100	30	0.5	4.08
7	1:20	60	90	0.5	3.62
8	1:20	80	30	0.8	8.31
9	1:20	100	60	0.2	2.72
K_1	5.93	3.78	5.21	3.72	
K_2	4.59	5.83	3.73	3.89	
K_3	4.88	5.80	6.47	7.80	
R	1.34	2.05	2.74	4.08	

2.1.2 草酸-草酸铵缓冲液浓度对果胶得率的影响 由于浓度对果胶提取率的影响最大, 因此在其他条件相同的情况下, 进一步确定草酸-草酸铵缓冲溶液的浓度, 结果如图1所示:

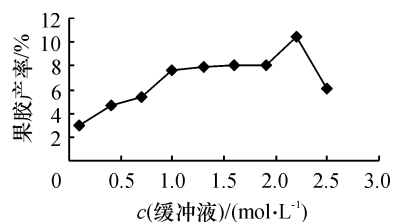


图1 缓冲液浓度对剑麻果胶产率的影响

Fig. 1 Effect of buffer solution concentration on pectin yield from sisal

由图1可知, 随着草酸-草酸铵缓冲液浓度的升高, 果胶的提取率逐渐增大, 当浓度为 2.2 mol/L 时, 果胶的产率达到最大, 继续升高缓冲液浓度, 果胶产率不再增大反而下降. 因此, 确定草酸-草酸铵缓冲溶液的最佳提取浓度应为 2.2 mol/L .

2.2 H_2O_2 质量分数对剑麻果胶颜色及产率的影响

在果胶溶液中加入不同质量分数的 H_2O_2 脱色, 比较脱色效果和果胶得率, 结果如表3. 随着 H_2O_2 质量分数的增大, 果胶的脱色效果越来越好. 但是由于 H_2O_2 有强氧化性会破坏果胶分子, 影响果胶的得率, 所以从脱色效果和得率两方面考虑, 果胶溶液中

过氧化氢质量分数为 1.8% 时为最佳.

表3 H_2O_2 质量分数对剑麻果胶脱色效果的影响

Tab. 3 Effect of hydrogen peroxide concentration on decoloration of pectin from sisal

$w(\text{H}_2\text{O}_2)/\%$	颜色	果胶产率/%
0	褐色	12.24
0.6	浅褐色	8.77
1.2	浅褐色	8.59
1.8	浅黄色	8.40
2.4	浅黄色	5.36
3.0	浅黄色	5.17

2.3 剑麻果胶的分离

2.3.1 沉淀剂对果胶产率的影响 选择 CaCl_2 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、乙醇作为果胶的沉淀剂, 研究不同的沉淀剂对果胶产率的影响, 结果表明, 3种沉淀剂均能使果胶析出, 采用 CaCl_2 作为沉淀剂时, 果胶产率为 8.64% , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀果胶产率为 4.77% 、乙醇沉淀果胶产率最高, 为 10.60% , 因此选用乙醇来沉淀果胶.

2.3.2 醇析 pH 对果胶产率的影响 控制乙醇沉淀时的 pH, 研究不同 pH 对沉淀效果的影响, 结果如图2. 当溶液 $\text{pH} < 4$ 时, 果胶的沉淀率随 pH 的增大而升高, 而当 $\text{pH} > 4$ 时, 果胶沉淀率随 pH 增大而减小, 在溶液 $\text{pH} = 4$ 时, 果胶得率最高, 达 14.87% . 这是因为果胶是弱酸性物质, 在酸性条件下稳定, pH 偏离4时, 果胶会带上电荷而呈溶解状态, 不利于醇析. 且 pH 越低, 果胶的糖苷键和酯键的水解程度也会加大, 更不利于醇析沉淀. 因此调节醇析时的 $\text{pH} = 4$, 使果胶易于沉淀析出.

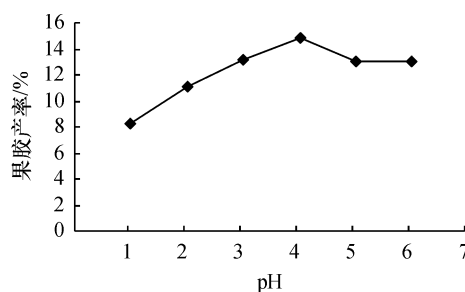


图2 pH 对果胶沉淀效果的影响

Fig. 2 Effect of pH on the result of pectin precipitation

2.4 果胶理化性质

2.4.1 剑麻果胶鉴别 剑麻果胶浅黄绿色, 无异味. 溶于40倍水中呈粘稠状液体, 说明其溶于水; 加入乙醇, 即出现悬浮絮状沉淀, 说明剑麻果胶不溶于乙醇; 剑麻果胶与蔗糖和柠檬酸按一定比例混合, 在一定条件下加热, 冷却后呈现柔软而有弹性的胶冻, 说明果胶具有胶凝性.

2.4.2 剑麻果胶质量分析 果胶是一种食品添加剂,国家对其有一定的质量标准.本文分别检测了剑麻果胶的半乳糖醛酸含量、酯化度、pH 和灰分,并与国家轻工业标准^[7]进行对比,结果如表4.由表4可知,剑麻果胶几项指标均符合国标,可用作食品添加剂.剑麻果胶的酯化度为23%,低于50%,属于低酯果胶.

表4 剑麻果胶质量指标
Tab.4 Quality index of sisal pectin

指标	测定值	国家轻工业 标准 ^[7]
$w_{\text{总}}$ (半乳糖醛酸)/%	66.0	≥ 65.0
酯化度(DE)/%	23.0	高酯果胶:DE ≥ 50 低酯果胶:DE < 50
pH(25℃)	6.67	高酯果胶:2.6~3.0 低酯果胶:4.5~7.0
w (灰分)/%	3.00	≤ 5

3 讨论与结论

果胶的提取方法主要有酸法^[8]、离子交换法^[9]、微波法^[10-12]、超滤法^[13-14]、酶法^[15]和草酸铵法^[16]等.剑麻果胶含量丰富,每100 g新鲜剑麻柄中含糖量约6.6%、蛋白质2.2%、纤维60%、果胶5.29%、淀粉11.5%^[17].本试验以去除了纤维后的风干剑麻渣为材料提取果胶,采用pH 3的2.2mol/L草酸-草酸铵缓冲溶液在温度为80℃、反应时间90 min的条件下提取,然后用乙醇在pH4.0的条件下沉淀,剑麻果胶得率可达到14.87%,而过去单独用草酸铵溶液从其他材料中提取果胶的得率由3.82%到11.59%不等^[16-20].可见,用草酸-草酸铵缓冲溶液从剑麻渣中提取果胶的得率较高.

剑麻果胶黄褐色,很难满足市场的需求,因此需对果胶进行脱色处理.目前较为成熟的果胶脱色方法有:活性炭脱色、醇氨溶液脱色、过氧化氢脱色、树脂脱色等^[21].本试验选用了活性炭和H₂O₂2种方法进行脱色,虽然采用活性炭脱色效果明显,但活性炭颗粒会混入果胶中,无论是过滤还是在12 000 r/min的条件下超速离心,都无法将活性炭从果胶溶液中彻底去除.H₂O₂的脱色效果好,脱色后处理简单,但由于H₂O₂有强氧化性会使果胶分子受到破坏,影响产率.通过对H₂O₂用量与脱色效果及产率的比较,可以看出果胶提取液中H₂O₂质量分数控制在1.8%~2.4%,果胶的脱色效果好,产率高.本研究也曾利用还原剂亚硫酸钠进行脱色,但脱色效果不理想.

果胶沉淀方法有盐析法^[22]和醇沉淀法^[23].本研究对CaCl₂、(NH₄)₂SO₄和乙醇3种沉淀剂的沉淀效

果进行了比较.用乙醇沉淀的果胶产率最高,CaCl₂次之,(NH₄)₂SO₄最低.虽然采用乙醇和CaCl₂沉淀,二者间的产率相差不是很大,但采用CaCl₂沉淀问题较多,CaCl₂用量多会造成果胶的过滤、洗涤较困难,烘干后的果胶成品有细小的白色颗粒,用量少则沉淀不彻底.因此,选用乙醇作为剑麻果胶的沉淀剂,工艺简单,得到的果胶色泽好、灰分少,但也存在乙醇的用量大,不易回收,能耗大,生产成本高等问题.据报道,在痕量电解质存在的条件下,沉淀会更完全,这可能由于离子在果胶分子间形成了桥梁,使果胶分子连接、聚合,从而加速了果胶沉淀,一般选用HCl作为电解质加入到乙醇中^[23].在乙醇沉淀时利用HCl控制提取液pH4.0,沉淀效果更加理想,使果胶产率提高到14.87%.

该法制备的剑麻果胶各项指标均符合国家标准.剑麻果胶为低酯果胶,天然低酯果胶很少,它在Ca²⁺或其他二价阳离子存在下,有糖或无糖均能形成性质优良的凝胶.与高酯果胶只能在可溶性固形物高于55%才能胶凝而主要用于高糖类食品的生产相比,低酯果胶更符合人们低糖、低热量食品的消费观念,因此有着广阔的市场前景^[24].

参考文献:

- [1] 李文德,章克昌.果胶的应用研究进展[J].粮油食品,1999,7(4):4-6.
- [2] 马彦彪,陈桂卿,冯辉,等.果胶的研究概况[J].内蒙古中医药,2000(19):111-112.
- [3] 江苏新医学院.中药大辞典:下册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:1699.
- [4] 蔡东宏.中国剑麻业现状和发展对策[J].广西热作科技,2000,77(4):20-22.
- [5] 张小铃.果胶的咪唑硫酸分光光度测定法研究[J].甘肃农业大学学报,1999,34(1):75-78.
- [6] PINHEIRO E R, SILVA I M D A, GONZAGA L V, et al. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology[J]. Biore-source Technology, 2008, 99: 5561-5566.
- [7] 国家轻工业局. QB 2484—2000 中华人民共和国轻工业标准:食品添加剂:果胶[S].北京:中国轻工业出版社,2000.
- [8] KALAPATHY U, PROCTOR A. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin[J]. Food Chemistry, 2001, 73(4): 393-396.
- [9] VOVK I, SIMONOVSKA B. Isolation of tomato pectin methyltransferase and polygalacturonase on monolithic columns[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1144:90-96.
- [10] LIU Zhong-dong, WEI Guo-hua, GUO Yun-chang, et al.

- Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2006, 64: 548-552.
- [11] WANG Si-jin, CHEN Fang, WU Ji-hong, et al. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78: 693-700.
- [12] YEOH S, SHI J, LANGRISH T A G. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels [J]. *Desalination*, 2008, 218: 229-237.
- [13] QIU Nong-xue, TIAN Yu-xia, QIAO Shu-tao, et al. Apple pectin behavior separated by ultrafiltration[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(10): 1193-1202.
- [14] CHO Chang-won, LEE Do-youn, KIM Chan-wha. Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 54: 21-26.
- [15] 李文德, 张礼星, 徐柔, 等. 纤维素酶提取甜菜果胶的工艺条件[J]. *无锡轻工大学学报*, 1999, 18(4): 42-45.
- [16] 黄永春, 杨 锋, 何 仁, 等. 草酸铵逆流萃取法提取西番莲果皮中果胶的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(9): 226-229.
- [17] 杨世军, 卢璐. 剑麻柄保健酒的工艺研究[J]. *酿酒科技*, 2005, 133(7): 94-96.
- [18] 刘燕, 刘钟栋. 微波条件下烟梗果胶多糖提取工艺研究[J]. *中国食品添加剂*, 2006(5): 58-61.
- [19] 周艳红, 金征宇. 大豆皮果胶多糖的提取工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2004, 25(3): 76-77.
- [20] 熊重铎, 李海燕, 曾庆福. 微波辅助萃取测定苧麻果胶含量的测定方法[J]. *麻业科学*, 2008, 30(2): 79-83.
- [21] 左莹, 张萍. 果胶脱色技术研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2010, 16(20): 44-46, 106.
- [22] 王淑敏, 侯志敏, 张学倩. 十二烷基伯胺乙酸盐盐析法在桔皮果胶提取中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(10): 3960-4015.
- [23] 田辉, 马力. 果胶的提取与分离[J]. *中国食品添加剂*, 2007(1): 126-129.
- [24] 焦云鹏, 徐伟, 朱秀灵, 等. 低酯果胶的制备、应用和研究进展[J]. *四川工业学院学报*, 2004(4): 57-62.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 68 页)

- [10] ROJAS A, HOLGUIN G, GLICK B R, et al. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, 35: 181-187.
- [11] 万璐, 康丽华, 廖宝文, 等. 红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J]. *林业科学研究*, 2004, 17(1): 89-94.
- [12] 李玫, 廖宝文, 康丽华, 等. PGPB 对红树植物木榄幼苗的接种效应[J]. *林业科学研究*, 2006, 19(1): 109-113.
- [13] SENGUPTA A, CHAUDHURI S. Ecology of heterotrophic dinitrogen fixation in the rhizosphere of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India [J]. *Oecologia*, 1991, 87: 560-564.
- [14] ALONGI D M, CHRISTOFFERSON P, TIRENDI F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments[J]. *J Exp Mar Bio Ecol*, 1993, 171: 201-223.
- [15] HOLGUIN G, ANTONIA G M, BASHAN Y. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1992, 101: 207-216.
- [16] HOLGUIN G, BASHAN Y, MENDOZA-SALGADO R A, et al. La Microbiologia de los manglares, bosques en la frontera entre el mar y la tierra[J]. *Ciencia y Desarrollo*, 1999, 25(144): 26-35.
- [17] HOLGUIN G, VAZQUEZ P, BASHAN Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of the mangrove ecosystems: An overview [J]. *Bio Fertil Soils*, 2001(33): 265-278.
- [18] BASHAN Y, MORENO M, TMYO E. Growth promotion of the seawater irrigated oil seed halophyte *Salicornia bigelovii* inoculated with mangrove rhizosphere bacteria and halotolerant *Azospirillum* spp. [J]. *Bio Fertil Soils*, 2000, 32: 265-272.
- [19] BASHAN Y, HOGUIN G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990—1996) [J]. *Can J Microbiol*, 1997, 43: 103-121.
- [20] 张瑜斌, 曹卉, 庄铁诚, 等. 红树林固氮微生物研究进展[J]. *海洋通报*, 2003, 22(6): 79-82.
- [21] BASHAN Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture[J]. *Biotechnology Advance*, 1998, 16(4): 730-758.
- [22] SINGH C S, SUBBA RAO N S. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* on nodulation and yield of soybean (*Glycine max*) [J]. *Plant and Soil*, 1979(53): 387-392.
- [23] SUBBA RAO N S, TILAK K V B R, SINGH C S. Synergistic effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Azospirillum brasilense* on the growth of barley in pots[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1985(17): 119-121.
- [24] 王富民, 张彦, 吴皓琼, 等. 解磷固氮菌剂的研制及其对小麦的增产效应[J]. *生物技术*, 1994(4): 30-36.

【责任编辑 李晓卉】