

文章编号:1001-6880(2015)6-1070-06

油樟油对油樟内生真菌中活性化合物影响

谭韵雅¹, 卢红¹, 李群^{1*}, 魏琴^{2*}¹ 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101; ² 宜宾学院发酵资源与应用四川省高校重点实验室, 宜宾 644000

摘要: YY26、YG42 和 YG71 是从油樟中分离得到的三株内生真菌。本研究采用 GC-FID、GC-MS 技术, 以油樟油作为诱导物, 研究 YY26、YG42、YG71 菌株在不同培养基条件下对菌株中活性化合物 1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇、*r*-松油烯产量的影响。结果表明: 在 PDB 培养基中, 一方面, 油樟油可促进 YY26、YG42 菌株积累 1,8-桉叶油素等物质, 其中对 1,8-桉叶油素的促进最强, 分别提高 1.41 倍和 1.30 倍; 另一方面, 油樟油抑制 YG71 菌株中以上 4 种物质的积累。在察氏培养基中, 油樟油对 YY26、YG42 及 YG71 菌株中 4 种物质的积累没有明显的促进作用。该研究为植物有用代谢产物的规模化生产提供了理论依据, 有较强的实践意义。

关键词: 油樟油; 内生真菌; GC-FID; GC-MS; 1,8-桉叶油素

中图分类号: Q939.97

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.06.024

Effects of *Cinnamomum longepaniculatum* Oil on the Active Components of Endophytic Fungi

TAN Yun-ya¹, LU Hong¹, LI Qun^{1*}, WEI Qin^{2*}¹ College of Life Science, Chengdu 610101, China; ² Yibin College Fermentation Resources Universities of Sichuan Key Laboratory, Yibin 644000, China

Abstract: YY26, YG42 and YG71 were three endophytic fungi strains isolated from *Cinnamomum longepaniculatum*. With *C. longepaniculatum* oil as inductor, GC-FID and GC-MS were used to analyze the accumulation of 1,8-cineole, terpinen-4-ol, *a*-terpineol and *r*-Terpinene in YY26, YG42, and YG71 strains under different media conditions. The experimental results indicated that in PDB medium *C. longepaniculatum* oil can promote accumulation of 1,8-cineole in YY26, YG42 strains and the content of 1,8-cineole increased by 1.41 and 1.30 times respectively, while 1,8-cineole were repressed in strains YG71 in PDB medium. *C. longepaniculatum* oil had no obvious promotion effect on the 4 compounds in czapek's medium. This study provided scientific basis for the large-scale production of natural metabolites.

Key words: *Cinnamomum longepaniculatum* oil; endophytic fungi; GC-FID; GC-MS; 1,8-cineole

植物内生菌是与其宿主在长期的协同进化过程中形成了互利互惠、无害或微害的寄生关系的菌群。目前研究植物内生菌的生物学作用已逐渐成为热点, 对于内生菌发酵生产代谢产物的报道较多^[1,2]。但直接从植物中分离得到的内生菌发酵产物普遍含量较低, 不利于直接用于工业生产, 需要对其进行优化^[3,4]。优化内生菌的方式非常多, 其中添加前体物质等诱导物来促进其产物的生产是一种常用且有效的方法^[5,6]。

1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇、*r*-松油烯

均是重要的天然产物, 存在于多种植物精油之中, 在医药、香料和日用化学品等方面均有重要的用途, 有较高的经济价值^[7,8]。目前多是直接从植物中提取来获得这些物质, 但存在产量少, 受季节限制等局限性。因此本研究试图在产生这些天然产物的内生菌中添加诱导物, 探索不同培养条件下这些天然产物的产量, 旨在提高天然产物的产量。

本研究使用的内生菌是游玲等^[9,10] 2009 年从油樟中分离得到的, 且经过分析发现这些内生菌能生产 1,8-桉叶油素等物质。但其产量低, 相对含量在 8.5% 至 16.7% 之间, 需优化提高其产量。本研究使用的油樟油是一种天然的芳香油, 用它作原料, 可以得到许多重要的香料、香料复合剂或其它的化工产品^[11]。本研究参照陶翠等^[12] 2011 年对油樟叶挥发油对几种真菌的抗菌效果的报道, 再加上前期

收稿日期:2014-03-07 接受日期:2014-09-30

基金项目: 四川省高校重点实验室项目(2012KFZ001); 宜宾市科技局项目(2011ZSF008); 四川省科技计划(2010JY0093); 四川师范大学大精设备使用基金(DJ2013-07)

* 通讯作者 Tel: 86-018011457355; E-mail: liqun01234@163.com

的预实验,以4%油樟油水浊液作为诱导剂添加在可产1,8-桉叶油素等物质的几种内生菌中,探索油樟油对内生菌产物的影响,旨在能提高1,8-桉叶油素等天然产物的产量,为这些产物能否工业化生产提供依据。目前这方面的研究未见相关报道。

1 材料与仪器

1.1 材料

油樟内生真菌YY26、YG42和YG71由宜宾学院发酵资源与应用四川省高校重点实验室从宜宾市采集的油樟中分离获得。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):去皮马铃薯200 g煮沸30 min过滤,葡萄糖20 g,琼脂20 g,加水定容至1000 mL,pH自然。马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):去皮马铃薯200 g煮沸30 min过滤,葡萄糖20 g,加水定容至1000 mL,pH自然。察氏培养基:蔗糖30 g,硝酸钠3 g,硫酸镁0.5 g,氯化钾0.5 g,硫酸亚铁0.01 g,磷酸氢二钾1 g,琼脂12 g,水1000 mL,pH自然。

1.3 主要试剂

1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇和*r*-松油烯四种标品均由宜宾市旧州志林商贸有限责任公司江南香料化工厂提供。乙醇为色谱纯级别。

1.4 仪器

气相色谱仪[Agilent7890A、火焰离子化检测器(FID)],气-质联用仪(Agilent 7890A/5975C),超净工作台(SW-CJ-ZF),恒温培养摇床(THZ-300),恒温培养箱(BPH-9082)。

2 实验方法

2.1 油樟内生真菌的培养

从保藏的试管斜面挑取适量YY26、YG42和YG71菌种,分别接种于PDA平板上活化,在长出的菌落边缘取直径6 mm的菌丝块3块,转入装有50 mL培养液的摇瓶中,28 °C,180 rpm摇床培养8 d。

2.2 油樟油水浊液的制备

2.2.1 油樟叶挥发油的制备
新鲜油樟叶洗净后剪碎至适当粒度放入1 L的圆底烧瓶中,用水蒸气蒸馏法提取4 h,然后乙醚萃取、旋转浓缩后用无水硫酸钠干燥,得油樟叶挥发油。

2.2.2 混合乳化剂的制备

吐温-80和斯盘-80按照7:3的比例混合,混合后于60 °C水浴,然后充分搅拌后。此混合乳化剂的HLB(亲水亲油平衡值)值为12.0(水包油乳化剂)。

2.2.3 油樟油水浊液的制备

先将油樟叶挥发油和乳化剂(HLB值为12.0)按照1:5的比例混合,加入研钵中,顺着一个方向充分研磨1 min左右,再加入溶剂水继续研磨,过滤灭菌后放入4 °C冰箱保存备用。

2.3 实验方案

在PDB培养基和察氏培养基中加入4%油樟油水浊液,再分别接入真菌YY26、YG42、YG71,同时设置相对照。每组实验设三个重复,如表1。在28 °C,180 rpm摇床中培养8 d后,将培样瓶中的物质均匀混合后取10 mL放入顶空进样瓶中,进行GC-FID检测。采用外标法定量。取其中产物较多的一组样品进一步做GC-MS检测,以此来确认产物。

2.4 标品的配制

分别称取0.5 g 1,8-桉叶油素、*a*-松油醇、松油烯-4-醇、*r*-松油烯标品于50 mL容量瓶中用乙醇定容,制成10 g/L的标准溶液。

取配好的10 g/L的1,8-桉叶油素标准溶液,稀释成浓度分别为50、20、5、1、0.5、0.1 mg/L的标准溶液,用以建立1,8-桉叶油素的标准曲线。

取配好的10 g/L的*r*-松油烯标准溶液,稀释成浓度分别为1、0.5、0.2、0.1、0.05、0.01 mg/L的标准溶液,用以建立*r*-松油烯的标准曲线。

分别取配好的10 g/L的*a*-松油醇和松油烯-4-醇标准溶液,分别稀释成浓度为10、5、1、0.5、0.05、0.01 mg/L的标准溶液,用以建立*a*-松油醇和松油烯-4-醇的标准曲线。

2.5 GC-FID检测

色谱条件:HP-5(30 m × 250 μm × 0.25 μm)毛细管柱,平衡温度90 °C,平衡时间10 min。载气为氮气,氢气流速40 mL/min,空气流速400 mL/min,氮气尾吹气25 mL/min,顶空不分流进样。柱箱程序:90 °C保持4 min,然后5 °C/min到130 °C保持5 min,然后5 °C/min到190 °C保持3 min。

2.6 GC-MS检测

2.6.1 色谱条件

HP-5(30 m × 250 μm × 0.25 μm)毛细管柱;进样口温度230 °C;载气为He流量1 mL/min;分流

比 3:1, 分流流量 3 mL/min。色谱柱程序升温条件: 初始温度 90 ℃ 保持 4 min 然后 5 ℃/min 到 130 ℃ 保持 5 min 然后 5 ℃/min 到 190 ℃ 保持 3 min。

2.6.2 质谱条件

离子源为 EI 源, 电子能量 70 eV; 离子源温度 230 ℃; 四极杆温度 150 ℃; 质谱接口温度 280 ℃; 质量扫描范围为 m/z 35 ~ 400。

2.7 精密度和稳定性试验

取 2.4 中配制好的 10 g/L 标准溶液, 用乙醇为溶剂配制成 10 mg/L 的混标, 取 10 mL 于顶空进样瓶中, 按 2.5 方法重复进样 5 次, 计算 1,8-桉叶油素、*a*-松油醇、松油烯-4-醇、*r*-松油烯标准溶液的峰面积 RSD(%) ; 取同一供试品在同一天内重复进样 5 次, 并连续进样 3 天, 计算 1,8-桉叶油素、*a*-松油醇、松油烯-4-醇、*r*-松油烯的峰面积日内与日间 RSD(%) 。

2.8 回收率试验

取 2.4 中配制好的 10 g/L 标准溶液, 用乙醇为溶剂配制成 10, 5, 1 mg/L 的混标, 分别取 5 mL 于顶空进样瓶中, 再分别加入 5 mL 已测样品, 依 2.5 中方法测定, 计算出回收率及 RSD(%) 。

2.9 统计分析

本实验所有数据均使用 SPSS17.0 软件进行方

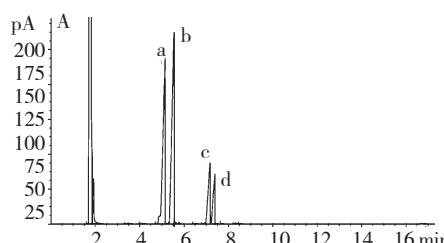


图 1 标品(A)和样品(B)的 GC-FID 分析色谱图

Fig. 1 GC-FID TICs of standard (A) and sample (B)

注:a;1,8-桉叶油素;b;*r*-松油烯;c;松油烯-4-醇;d;*a*-松油醇

Note:a;1,8-cineole;b;r-terpinene;c;terpinen-4-ol;d;a-terpineol

样品的 GC-MS 检测结果显示, 样品中 1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇的质谱图与标准质谱图相对比, 匹配度分别达到 98%、89%、90%, 证明样品中相应峰所对应物质确实与标品为同一物质。

3.2 精密度和稳定性试验结果

精密度试验中 1,8-桉叶油素、*a*-松油醇、松油烯-4-醇、*r*-松油烯标准溶液的峰面积 RSD(%) 分别为 2.69、1.23、1.42、1.96, 表明进样过程中进样量基本一致; 稳定性试验中 1,8-桉叶油素、*a*-松油醇、

差分析。

3 结果与讨论

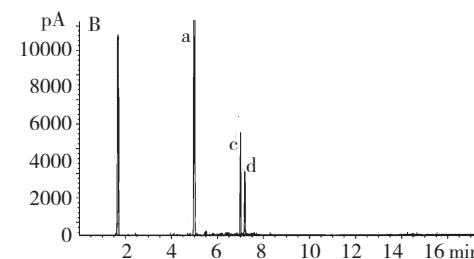
3.1 标准曲线的建立及样品中物质的确认

3.1.1 标准曲线的建立

在 2.5 色谱条件下, 各个标品以 2.4 中所配制的浓度梯度进样, 以进样浓度和峰面积进行回归分析, 求得 1,8-桉叶油素的回归方程为 $Y = 0.016X + 0.0301, R^2 = 0.9995$; *r*-松油烯的回归方程为 $Y = 0.0127X + 0.0016, R^2 = 0.9992$; 松油烯-4-醇的回归方程为 $Y = 0.0346X + 0.0286, R^2 = 0.9996$; *a*-松油醇的回归方程为 $Y = 0.0552X - 0.0221, R^2 = 0.9999$ 。

3.1.2 样品中物质的确认

几种标品的 GC-FID 检测结果如图 1A 所示。由图 1A 可知, 标品 1,8-桉叶油素的出峰时间为 5.134 min; *r*-松油烯的出峰时间为 5.543 min; 松油烯-4-醇的出峰时间为 7.162 min; *a*-松油醇的出峰时间为 7.383 min。图 1B 为样品 GC-FID 检测的其中一个结果图。比较图 1A 与图 1B 发现样品在相近的时间出现与标品相应的峰, 初步判断样品中有 1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇和 *a*-松油醇。而 *r*-松油烯未见出峰, 可能没有这个产物或该产物产量过低未被检测出来。



松油烯-4-醇、*r*-松油烯的峰面积日内 RSD(%) 分别为 1.99、2.12、2.11、1.59, 日间 RSD(%) 分别为 3.44、2.89、4.12、3.16, 表明供试品溶液在所测时间内基本稳定。

3.3 回收率试验结果

2.8 试验中 1,8-桉叶油素、*a*-松油醇、松油烯-4-醇、*r*-松油烯的平均回收率 ($n = 3$) 分别为 101.22%、100.34%、98.97%、103.01%; RSD(%) 分别为 2.89、1.71、1.99、2.62。

3.4 GC-FID 检测结果

通过 GC-FID 检测,明确了各标本吸收峰的出峰时间。通过标品与样品 GC-MS 质谱检测,确定样品中相同出峰时间的物质与相应的标品为同一物质。在此基础上对所有实验处理进行了 GC-FID 检测,结果如表 1 所示。

3.4.1 未加油樟油时内生菌中天然产物含量情况

从表 1 可知,在未加油樟油的处理中(即 3、4、5、9、10、11 处理),三种菌均能生成 1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇,不能生成 *r*-松油烯。其中不同菌株在不同培养基中均表现为 1,8-桉叶油素的产量最高,最高产量可达 0.18 mg/L(9、10 处理);其次为松油烯-4-醇,其最高产量为 0.08 mg/L(4 处理);*a*-松油醇的产量最低,其最高产量仅为 0.05 mg/L(4 处理)。

未加油樟油的处理组之间的对比发现(即 3、4、5 之间相互比较;9、10、11 之间相互比较):在 PDB 培养基中,1,8-桉叶油素产量最高的是 YG71 菌株,产量可达 0.16 mg/L,其次是 YY26 菌株,YG42 菌株的产量最低;对松油烯-4-醇和 *a*-松油醇的产量来说,最高的均是 YG42 菌株,产量分别可达 0.08 mg/L 和 0.05 mg/L;YY26 菌株的产量次之,YG71 菌株的产量最低。在察氏培养基中,YG42 和 YY26 菌株的 1,8-桉叶油素产量较高,产量均为 0.18 mg/L,YG71 菌株的产量较低;YG42 和 YG71 菌株中松油烯-4-醇和 *a*-松油醇产量均相同且较高,分别为 0.07 mg/L 和 0.02 mg/L,YY26 菌株的产量较低。

由此可见,对未加油樟油的 PDB 培养基和察氏培养基中内生菌产物进行对比分析得出:除 YG42 菌株中松油烯-4-醇和 *a*-松油醇产量 PDB 培养基比察氏培养基中的产量高外,其余均是察氏培养基中的产量更高,即察氏培养基的产物总量高于 PDB 培养基中的产物总量。

3.4.2 加油樟油后内生菌中天然产物含量情况

由表 1 可知,在 PDB 培养基中,加入油樟油后,YY26 和 YG42 菌株中 1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇的产量均增加,表明油樟油对 YY26 和 YG42 菌株中的三种目标产物均有促进的作用。其中对 1,8-桉叶油素的促进作用最强,在 YY26 菌株中产量提高了 1.41 倍,YG42 菌种中产量提高了 1.30 倍,与仅加油樟油的处理相比(1 处理)有极显著的差异;其次对松油烯-4-醇和 *a*-松油醇也有促进作用,只是提高倍数较小,最高仅有 0.38 倍。与仅加油樟油的处理相比,仍达到了显著水平以上(见表 2);而在 YG71 菌株中,加入油樟油后,1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇的产量均被抑制,与仅加油樟油的处理相比,分别减少 0.27、0.31、0.34 倍,均达到显著水平以上(见表 2)。

察氏培养基中,加入油樟油后,YY26 菌株中 1,8-桉叶油素的产量减少,减少了 0.19 倍,与仅加油樟油的处理相比有显著性差异;松油烯-4-醇和 *a*-松油醇的产量均增加,但与仅加油樟油的处理相比没有显著性差异;YG42 菌株中 1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇的产量均增加,*a*-松油醇的产量减少,与仅加油樟油的处理相比均无显著性差异;YG71 菌株中 1,8-桉叶油素、松油烯-4-醇、*a*-松油醇的产量均减少,与仅加油樟油的处理相比 1,8-桉叶油素的产量有及显著性差异,松油烯-4-醇的产量有显著性差异,*a*-松油醇的产量则无显著性差异,分别减少 0.45 倍、0.18 倍 0.03 倍。

由此可见,对加了油樟油的 PDB 培养基和察氏培养基中内生菌产物进行对比分析得出:除 YG71 菌株中松油烯-4-醇和 *a*-松油醇的产量察氏培养基比 PDB 培养基高外,其余均是 PDB 培养基中的产量更高,即 PDB 培养基中的产物总量比察氏培养基的产物总量高。这与未加油樟油的处理组结果完全不同。

表 1 内生真菌代谢产物 GC 检测结果

Table 1 GC detection result for the endophytic fungi metabolites

组别 Group	培养基 Medium	菌株 Strains	诱导物 Inducer	1,8-桉叶油素 1,8-Cineole (mg/L)	<i>r</i> -松油烯 <i>r</i> -Terpinene (mg/L)	松油烯-4-醇 Terpinen-4-ol (mg/L)	<i>a</i> -松油醇 <i>a</i> -Terpineol (mg/L)
1	-	-	+	14.11 ± 0.273	0.03 ± 0.003	4.92 ± 0.163	5.48 ± 0.310
2	PDB	-	-	0	0	0	0
3	PDB	YY26	-	0.14 ± 0	0	0.05 ± 0	0
4	PDB	YG42	-	0.13 ± 0	0	0.08 ± 0	0.05 ± 0.01
5	PDB	YG71	-	0.16 ± 0	0	0.05 ± 0	-0.01 ± 0.01

6	PDB	YY26	+	34.04 ± 1.46 ^{aa}	0	6.59 ± 0.42 ^{aa}	6.67 ± 0.36 ^{aa}
7	PDB	YG42	+	32.44 ± 1.70 ^{aa}	0	6.84 ± 0.35 ^{aa}	6.55 ± 0.41 ^a
8	PDB	YG71	+	10.36 ± 0.54 ^a	0	3.41 ± 0.13 ^{aa}	3.61 ± 0.03 ^{aa}
9	察氏	YY26	-	0.18 ± 0.01	0	0.05 ± 0	0
10	察氏	YG42	-	0.18 ± 0.01	0	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0
11	察氏	YG71	-	0.16 ± 0.01	0	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0
12	察氏	YY26	+	11.45 ± 0.31 ^a	0	5.47 ± 0.23	5.76 ± 0.18
13	察氏	YG42	+	15.75 ± 0.31	0	5.27 ± 0.22	5.29 ± 0.27
14	察氏	YG71	+	7.78 ± 0.63 ^{aa}	0	4.10 ± 0.26 ^a	5.29 ± 0.13

注：“-”表示不添加；“+”表示添加；与1处理相比,^a0.001 < P < 0.05;^{aa}P < 0.001。

Note：“-” means not added; “+” means added; compared with 1 treatment,^a0.001 < P < 0.05; ^{aa}P < 0.001.

表2 油樟油对内生真菌中1,8-桉叶油素等产物的提升倍数

Table 2 The multiple of the 4 investigated compounds promoted by *C. longepaniculatum* oil in endophytic fungi

培养基(菌株) Medium (strains)	1,8-桉叶油素 1,8-Cineole	松油烯-4-醇 Terpinen-4-ol	<i>a</i> -松油醇 <i>a</i> -Terpineol
PDB (YY26)	1.41	0.34	0.22
PDB (YG42)	1.30	0.38	0.20
PDB (YG71)	-0.27	-0.31	-0.34
察氏(YY26)	-0.19	0.11	0.05
察氏(YG42)	0.12	0.06	-0.03
察氏(YG71)	-0.45	-0.18	-0.03

注：“-”表示减少的倍数。

Note：“-” means reducing multiples.

4 讨论

在本研究中,采用了GC-MS和GC-FID两种检测方式,是因为本实验所用GC-MS的最低检测线较高。而本实验中部分样品的物质含量较低,用GC-MS无法检测,因此采用GC-FID检测。同时再选择几组含量较高的样品来做GC-MS检测,以此定性。得到的实验结果如正文所描述。

众所周知,培养基与诱导物均是影响微生物代谢产物的重要因素。近几年有大量关于优化培养基来提高微生物代谢产物的报道^[13,14],也有许多通过添加诱导物来促进代谢产物产量提高的报道^[15,16]。本实验中未加油樟油的PDB培养基与察氏培养基相比,察氏培养基的1,8-桉叶油素等物质积累更多;而加了油樟油的PDB培养基与察氏培养基相比,PDB培养基的1,8-桉叶油素等物质积累更多。可以推断培养基和诱导物对内生菌产物产量均有影响,且它们之间存在交互影响。

在PDB培养基中,加入油樟油和不加油樟油的实验结果表明,油樟油可促进YY26、YG42菌株中

积累1,8-桉叶油素,并且积累量分别提高1.41倍和1.30倍。有人做过类似的研究,得到类似的结果,如吴欣证明滑桃树种子提取物能提高其内生菌*Streptomyces* sp. WXC菌株中富伦菌素B的产量^[6],同时证实是因为滑桃树种子提取物作为诱导物诱导了活性化合物富伦菌素B生物合成基因的表达。本实验中油樟油作为诱导物,在YY26和YG42菌株中促进1,8-桉叶油素产量的提高,是否也是诱导了1,8-桉叶油素生物合成基因的表达,还有待进一步探讨。另外,对YG71菌株来说,在PDB培养基和察氏培养基中1,8-桉叶油素均被抑制,推测可能是YG71利用油樟油中的1,8-桉叶油素将其转化为了其它物质或者其它原因。Rodríguez P^[17]等曾做过关于微生物对1,8-桉叶油素的生物转化,结果证实1,8-桉叶油素被转化为2-氧-1,8-桉叶油素等物质。

本实验初步证明通过添加诱导物或培养基的优化等手段可增加油樟内生菌中1,8-桉叶油素等物质的积累,之后的工作就可从这方面继续做进一步的研究。该研究为这些天然产物的工业化生产奠定了基础。

参考文献

- 1 Wei YM, Liu L, Zhou XW, et al. Engineering taxol biosynthetic pathway for improving taxol yield in taxol-producing endophytic fungus EFY-21 (*Ozonium* sp.). *African J Biotechnol*, 2012, 11:9094-9101.
- 2 Yang YX(杨勇勋), Dong XP(董小萍), Yan YM(晏永明), et al. Studies on secondary metabolites produced by endophytic *Aspergillus fumigatus* from *Trifolium repens*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25(001):64-67.
- 3 Ruiz-Sanchez J, Flores-Bustamante ZR, Dendooven L, et al. A comparative study of Taxol production in liquid and solid-state fermentation with *Nigrospora* sp. a fungus isolated from *Taxus globosa*. *J Appl Microbial*, 2010, 109:2144-2150.
- 4 Song Q, Huang Y, Yang H. Optimization of fermentation conditions for antibiotic production by *Actinomycetes* YJ1 strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Agric Sci*, 2012, 4(7):95-102.
- 5 Chen JH, Liu JJ, Zang GG, et al. Screening of taxol-producing endophytic fungi and regulation of fermentation conditions. *J Central South Univ*, 2004, 35:65-69.
- 6 Wu X(吴欣). Influence of *Trewia nudiflora* seed extract on the antifungal compound of endophyte. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2013, 10:93-97.
- 7 Wang YW(王文元), Gu LL(顾丽莉), Wu ZM(吴志民). Research on 1,8-Cineole. *Food Drug*(食品与药品), 2007, 9(02A):56-59.
- 8 Ma JJ(马剑剑), Han MZ(韩孟竹), Wu JY(吴景雨), et al. One step synthesis of α -terpineol from turpentine oil. *J Shanghai Inst Technol, Nat Sci*(上海应用技术学院学报, 自科版), 2013, 13:97-100.
- 9 Wang T(王涛), You L(游玲), Huang NY(黄乃耀), et al. Antifungal activities against phytopathogens and diversity of endophytic fungi isolated from *Cinnamomum longepaniculatum*. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2009, 1:98-101.
- 10 You L(游玲), Wang T(王涛), Li L(李兰), et al. Analyses on volatile organic compound of 78 endophytic fungi isolated from *Cinnamomum longepaniculatum*. *J Northwest A&F Univ, Nat Sci*(西北农林科技大学学报, 自科版), 2009, 37:193-198.
- 11 Lou ZJ(罗中杰), Li WY(李维一), Wei Q(魏琴), et al. The status quo and future of *Cinnamomum longepaniculatum* in Yibin. *J Sichuan Normal Univ, Nat Sci*(四川师范大学学报, 自科版), 2001, 24:317-319.
- 12 Tao C(陶翠), Wei Q(魏琴), Yin ZQ(殷中琼), et al. Antifungal activity of the essential oil from *Cinnamomum longepaniculatum* leaves against three species of fungi. *Chin Veter Sci*(中国兽医科学), 2011, 41:89-93.
- 13 Zhao L, Fan F, Wang P, et al. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. *Appl Microbial Biotechnol*, 2013: 1-10.
- 14 Li S, Xu H, Yu J, et al. Enhancing isomaltulose production by recombinant *Escherichia coli* producing sucrose isomerase: culture medium optimization containing agricultural wastes and cell immobilization. *Bioproc Biosystems Eng*, 2013:1-11.
- 15 Bhatia SK, Mehta PK, Bhatia RK, et al. Optimization of arylacetonitrilase production from *Alcaligenes* sp. MTCC 10675 and its application in mandelic acid synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1):83-94.
- 16 Saini V, Bhattacharya A, Gupta A. Effectiveness of sal de-oiled seed cake as an inducer for protease production from *Aeromonas* sp. S1 for its application in kitchen wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 170:1896-1908.
- 17 Rodríguez P, Sierra W, Rodríguez S, et al. Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of Eucalyptus oils. *Electronic J Biotechnol*, 2006, 9:233-236.