

产香真菌 JXJ 01 的初步鉴定及挥发性香气成分分析

张炳火*, 李汉全, 杨建远, 查代明, 石红璆, 孙凤珍

九江学院 药学与生命科学学院, 九江 332000

摘要:产香微生物在天然香料生产中具有重要意义。本文根据形态学、生理学、ITS 基因序列等特征,对产香真菌 JXJ 01 进行了初步鉴定;利用同时蒸馏萃取技术提取挥发性成分,利用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析其组成。结果表明,菌株 JXJ 01 分泌纤维素酶和木质素酶,在 PDA 培养基上菌丝发达,乳白色,有隔,培养 30 d 后未见孢子产生,在农业废弃物固体培养基上能够产生成簇片状肉质子实体,该菌在 ITS 基因序列系统进化树上与赤褐鹅膏菌(*Amanita fulva*)聚在单独一支;其代谢产物显著促进小鼠生长;其挥发性成分中含有大量香气物质,主要成分为反-桂酸甲酯(15.24%)、桂酸乙酯(10.14%)、芳樟醇(6.33%)、3-甲基丁醇(3.67%)、苯甲醛(3.42%)、3-辛醇(2.16%)、2-甲基丙醇(1.76%)、2-甲基丁醇(1.42%)和苯甲酸乙酯(1.21%)。产香真菌 JXJ 01 在天然香料生产中具有重要的潜在应用价值。

关键词:产香真菌;天然香料;气相色谱-质谱联用

中图分类号:Q939.97

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.4.012

Identification and Volatile Component Analysis of Aromatic Fungi Strain JXJ 01

ZHANG Bing-huo*, LI Han-quan, YANG Jian-yuan, ZHA Dai-ming, SHI Hong-qiu, SUN Feng-zhen

College of Pharmacy and Life Science, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China

Abstract: Aromatic microorganisms are important in the productions of natural flavors and fragrances. In this study, aromatic fungi strain JXJ 01 was identified on basis of the characteristics of morphology, physiology and ITS gene sequence. The toxicity of the strain was measured using mouse feeding tests. The volatile components were extracted using simultaneous distillation and extraction equipment, and analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Strain JXJ 01 was observed to secrete cellulase and ligninase, and develop well branched substrate and aerial mycelia on PDA medium, and the mycelia were septate and milk-white with no spores after culturing for 30 days. Strain JXJ 01 developed clusters of sheet fleshy fruiting body on solid media, which consisted of agricultural wastes. It formed a distinct clade with *Amanita fulva* on phylogenetic tree based on the ITS gene sequence. The metabolites of strain JXJ 01 significantly promoted the growth of mouse. Its volatiles consisted of many kinds of flavors, and the main components included methyl trans-cinnamate (15.24%), ethyl cinnamate (10.14%), linalool (6.33%), 3-methyl-1-butanol (3.67%), benzaldehyde (3.42%), 3-octanol (2.16%), 2-methyl propionic acid (1.76%), 2-methyl-1-butanol (1.42%) and ethyl benzoate (1.21%). Aromatic fungi strain JXJ 01 showed important potential application in the production of natural flavors.

Key words: aromatic fungi; natural flavors; gas chromatography-mass spectrometry

香精香料在食品、饲料、化妆品、化工和制药等工业上具有重要地位,其来源主要包括天然与化学合成两种方式^[1,2],其中,化学合成的香精香料约占整个产品的 85%^[3],但它具有诸多缺点,如反应选择性差、副产物多、产率低、高成本、污染环境、人们对化学合成香精香料用于食品和化妆品日益反感^[1,3,4],因此,天然香精香料在食品工业中越来越

重要^[1]。目前单一和混合的商业化天然香料超过 100 种,它们通常来自植物^[4],但植物受气候、产地资源等各种因素限制,其产量不能满足市场需求^[1,3]。微生物独特的特性使其可成为产香植物的替代者^[1],因此,利用微生物发酵技术生产食品和日化香精香料受到广泛关注^[4]。

目前产香微生物的报道以真菌居多,如酵母菌^[5-10]、丝状真菌^[11-14]、蕈菌^[15]等,这些产香真菌可利用普通培养基产生醇、醛、酮、酸和酯等各类挥发性混合香气物质。微生物在高级单体香料的生产中也具有重要应用价值。王明君^[16]利用黑曲霉将天

然底物阿魏酸转化为香草酸,再利用朱红密孔菌将香草酸转化为在烟草、化妆品和香水等方面具有重要应用价值的香草醛,在 25 升的发酵罐中,其浓度可达 1.446 g/L,香草酸转化率达到 79.9%。华宝香化科技发展有限公司用微生物发酵烟梗和烟末生产天然苯乙醇,并获得发明专利授权^[3]。Wang 等^[10]利用酵母菌在一个连续反应器中将 L-苯丙氨酸转化为苯乙醇,达到 0.9 g/(L·h)的产量。本文对产香真菌 JXJ 01 进行了初步鉴定,并利用 GC-MS 联用技术分析其挥发性物质组成。

1 材料与方法

1.1 研究菌株和实验小鼠

产香真菌 JXJ 01 为本实验室分离自土壤并保藏。实验小鼠为普通级昆明小鼠,起始体重约 16.5~17.0 g,购自南昌大学实验动物科学部(医动字第:02196-02)。

1.2 产香真菌的初步鉴定

1.2.1 形态特征

将菌株 JXJ 01 接种到 PDA 固体平板上,并在平板上插入洁净盖玻片,30 °C 下培养,连续观察 30 d,镜检菌丝形态、是否有横隔、是否产生孢子等。

将斜面菌种接种于 PDA 液体培养基,30 °C、180 rpm 摇床培养 4 d,再将液体菌种接种于无菌农业废弃物固体培养基上(组成:棉籽壳 250 g、木屑 150 g、麦麸 100 g、水 550 mL,pH 值自然,装于食用菌栽培袋),接种量为 50 mL/袋,接种后 30 °C 条件下培养,菌丝长满栽培袋后给予昼夜 5~10 °C 的温差刺激。

1.2.2 菌株生长温度和 pH

用无菌打孔器,将 PDA 平板上生长的菌制备琼脂菌块,再进行下列试验:(1)把菌块置于 PDA 平板上,不同温度下培养 3~10 d;(2)将菌块置于 pH 1-14 的 PDA 平板上,在 30 °C 下恒温培养 7 d。每天观察和记录菌的生长情况,根据菌株有无生长、菌落直径大小,判断菌株生长温度和 pH 范围。

1.2.3 纤维素酶和木质素酶

将菌株接种于纤维素酶产生菌筛选培养基(羧甲基纤维素钠,20 g;(NH₄)₂SO₄,2.0 g;MgSO₄·7H₂O,0.5 g;KH₂PO₄,1 g;NaCl,0.5 g;琼脂,15~20 g;刚果红,1 g;水,1000 mL),30 °C 培养 3~6 d,根据颜色变化判断菌株是否产生纤维素酶。参考武善军等^[18]的方法,将菌株接种到 PDA 固体培养基平板上(含 0.01% 的愈创木酚),30 °C 恒温培养 3~7 d,观察培

养基颜色变化,判断菌株是否产生木质素酶。

1.2.4 ITS 序列分析

采用石英砂研磨法提取染色体 DNA^[19]。取少许菌丝体,置于研钵中,加入适量石英砂和 2 mL 的 DNA 提取液(配方:Tris-HCl 100 mmol,NaCl 100 mmol,EDTA 40 mmol,SDS 20 g,蒸馏水 1000 mL,pH 9.0),研磨 5 min,研磨液于 10000 rpm 离心 5 min,取上清液,用苯酚抽提 2 次,除去杂蛋白,再用氯仿洗涤一次,然后加入等体积的异丙醇,于室温静置 5 min 后,12000 rpm 离心 15 min,弃上清液,沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次,沉淀最后用 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris + 1 mmol/L EDTA)溶解备用。ITS 区域 PCR 扩增(25 μL)参考 Innis 等^[20]的方法进行:10 倍 Buffer 2.5 μL,25 mM MgCl₂ 2 μL,2.5 mM dNTPs 1 μL,10 μM 引物各 1 μL,模板 DNA 1 μL,Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,蒸馏水 16.25 μL。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,30 个循环,72 °C 延伸 10 min。从 GenBank 数据库中调出相似性高的相关菌株的序列,并利用软件 CLUSTAL_X1.83^[21]进行多重序列比对,采用 MEGA5^[22],以邻接法^[23]构建 ITS 基因序列系统进化树。

1.3 小鼠饲喂实验

将产香真菌接入 PDA 液体培养基,28 °C、180 rpm 摇床培养 3 d,再将种子液接入无菌固体培养基(小麦/稻谷/黄豆,m/m/m=1:1:1)中,并使菌种和培养基充分混合均匀,于 28 °C 下静置培养,待培养基表面长满菌丝,即取出干燥备用。按照 0%、20%、40% 和 60% 的剂量,将真菌固体发酵物与未发酵的固体培养基混合,配制饲料饲喂小鼠,每组试验 10 只小鼠,重复 3 次,每 7 d 称重一次,饲喂 49 d。数据用平均值(mean value)±标准偏差(standard deviation,SD)表示,试验组和对照组数据采用单因素方差进行分析, $P < 0.05$ 表示差异显著(*), $P < 0.01$ 表示差异极显著(**)。

1.4 香气成分提取及 GC-MS 分析

1.4.1 香气成分提取

将产香真菌接入 PDA 液体培养基中,28 °C、180 rpm 培养 7 d,再以二氯甲烷为萃取溶剂,用同时蒸馏萃取装置提取挥发性物质,培养液蒸馏温度为 100 °C,萃取溶剂二氯甲烷蒸馏温度为 70 °C,萃取液加入适量无水硫酸钠脱水,于 4 °C 冰箱中过夜后过滤,滤液用于 GC-MS 香气成分分析。

1.4.2 香气成分 GC-MS 分析

香气成分采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析,仪器为美国 Agilent Technologies 公司 HP6890GC/5973MS 气相色谱-质谱联用仪。GC 条件:HP-5MS 石英毛细管柱(30 mm × 0.25 mm × 0.25 μm),起始柱温为 40 °C,保持 5 min,程序升温 3 °C/min 至 80 °C,再程序升温 5 °C/min 至 260 °C,柱流量为 1.0 mL/min,进样口温度 250 °C,柱前压 100 kPa,进样量 1 μL,分流比为 10:1,载气为高纯氦气。MS 条件:电离方式为 EI,电子能量 70,传输线温度 250 °C,离子源温度 230 °C,四极杆温度 150 °C,质量范围 35 ~ 500,采用 Wiley7n.1 标准谱库检索定性。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态特征

产香真菌 JXJ 01 在 PDA 培养基上生长良好,菌丝乳白色,有隔(图 1A),但培养 30 d 后依然为乳白色,未产生孢子。在农业废弃物固体培养基上生长迅速,30 °C 条件下 30 d 内菌丝长满菌袋,并散发出酱香味,在昼夜 5 ~ 10 °C 温差下培养形成瘤状物,进而长出一簇簇的片状肉质子实体(图 1B),子实体高 2.0 cm 左右,部分片状子实体上会生长出成簇的小梗,其上生长着酷似鸟类绒毛状的菌丝(图 1 箭头所指)。

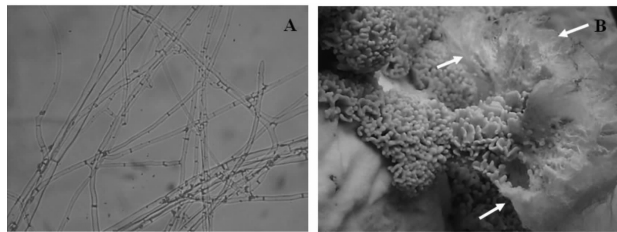


图 1 产香真菌 JXJ 01 的菌丝(A)和子实体(B)形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of mycelia (A) and fruiting body (B) of aromatic fungi JXJ 01

注:箭头指向羽毛状菌丝

Note: Arrows point to plumose mycelia

2.1.2 生长温度和 pH

在 PDA 培养基上,该菌 4 ~ 44 °C 范围内均能生长,其中 34 ~ 36 °C 时生长最快;在 pH 值为 3 ~ 13 范围内均能生长,生长最适 pH 值为 5 ~ 6 左右。

2.1.3 纤维素酶和木质素酶

图 2 显示,产香真菌生长处及菌丝前沿红色褪

去,而其它地方依然为红色,这说明产香真菌 JXJ 01 在生长过程中产生了纤维素降解酶,将羧甲基纤维素钠降解,导致红色褪去。图 3 显示,随着产香真菌 JXJ 01 的生长,菌丝延伸之处培养基逐渐变为红褐色,这说明该菌在 PDA 培养基上能够产生木质素酶,导致愈创木酚氧化而出现红褐色。

2.1.4 ITS 序列基因系统发育分析

根据 ITS 基因序列(652 bp),从 GenBank 中调出相似性最高(均为 99%)的 100 株可培养菌的相关序列,其中 84 株菌为 *Irpex* 属,其它 16 株菌分属于另外 6 个属和未知真菌,除未鉴定真菌外,其余均

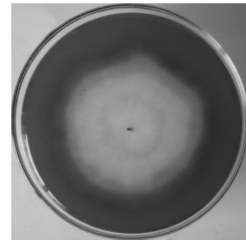


图 2 刚果红在羧甲基纤维素钠平板上的染色结果
Fig. 2 The dyeing result of congo red on CMC-Na plate

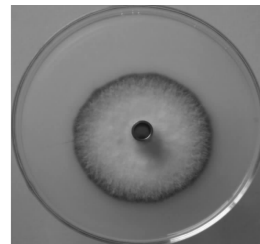


图 3 愈创木酚平板氧化结果
Fig. 3 Oxidation of guaiacol on plate

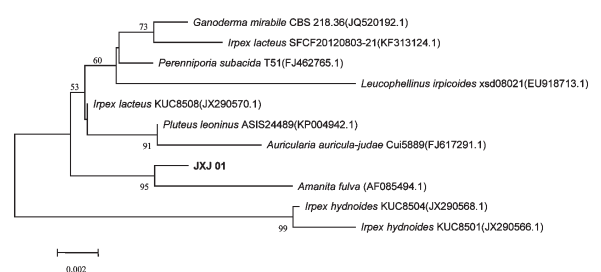


图 4 以邻接法构建的产香真菌 JXJ 01 和相关菌种的 ITS 基因序列系统进化树

Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on ITS gene sequences of aromatic fungi strain JXJ 01 and its closest relative species. Bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) > 50% were shown at the nodes. Bar, 0.002 sequence divergence.

表 1 产香真菌 JXJ 01 产生的部分挥发性成分

Table 1 The volatile components produced by aromatic fungi strain JXJ 01

化合物 Compounds	保留时间 Retention time	峰面积百分比 Peak area percentage (%)
2-甲基丙醇 2-Methyl-1-propanol	2.486	1.76
3-甲基丁醛 3-Methyl butyraldehyde	2.782	0.25
丁醇 Butanol	2.892	0.59
3-戊烯-2-醇 3-Penten-2-ol	3.221	0.10
3-羟基-2-丁酮 Acetoin	3.624	0.08
丙酸乙酯 Ethyl propionate	3.693	0.10
3-甲基丁醇 3-Methylbutan-1-ol	4.217	3.67
2-甲基丁醇 2-Methylbutan-1-ol	4.307	1.42
2-甲基丙酸乙酯 2-Methylpropanoate	4.943	0.10
2-甲基丙酸 2-Methylpropanoic acid	5.216	0.10
2-呋喃甲醛 2-Furaldehyde	7.743	0.05
戊酸 Pentanoic acid	8.715	0.10
2-呋喃甲醇 2-Furylmethanol	8.854	0.11
2,5-二甲基吡嗪 2,5-Dimethyl pyrazine	11.397	0.10
苯甲醛 Benzaldehyde	13.875	3.42
3-辛醇 3-Octanol	15.953	2.16
1,8-桉叶素 1,8-Cineole	17.586	0.10
苯甲醇 Benzyl alcohol	17.939	0.20
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	18.309	0.05
3,7-二甲基癸烷 3,7-Dimethyl decane	19.111	1.82
辛醇 Octanol	19.821	0.05
苯甲酸甲酯 Methyl benzoate	20.740	0.83
芳樟醇 Linalool	21.071	6.33
苯甲酸乙酯 Ethyl benzoate	23.796	1.22
萘 Naphthaline	24.122	0.60
十三烷异构体 Tridecane isomer	27.445	4.40
2,6,11-三甲基十二烷 2,6,11-Trimethyl dodecane	28.807	2.78
反-桂酸甲酯 Trans-methyl cinnamate	30.495	15.24
桂酸乙酯 Ethyl cinnamate	32.659	10.14

属于担子菌。84 株 *Irpex* 属中有 74 株菌是 *Irpex lacteus*, 2 株菌是 *I. hydroides*, 其余 8 株菌未鉴定到种。然而,在 ITS 基因序列系统进化树上,产香真菌 JXJ 01 和与 *Amanita fulva* (AF085494. 1) 聚在单独一支(图 4)。

2.2 小鼠饲喂实验

饲喂实验死亡统计结果表明,对照组第 4 周有 2 个小组各死亡 1 只,第 5 周添加 40% 产香真菌发

酵饲料有 1 个小组死亡 1 只,其余均正常。小鼠体重统计结果(图 5)显示,产香真菌发酵饲料占混合饲料 20% 时,与对照组相比,第 1 周小鼠体重没有明显变化,但从第 2 周开始显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而产香真菌发酵饲料占混合饲料 40% ~ 60% 时,从第 1 周开始,小鼠体重即显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),第 7 周时,添加 20%、40% 和 60% 的发酵饲料实验组比对照组体重分别增加

46.6 ± 13.0%、76.6 ± 8.9% 和 84.4 ± 4.8% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上结果说明,产香真菌代谢产物对小鼠不但没有毒性,而且能够显著促进小鼠的生长。

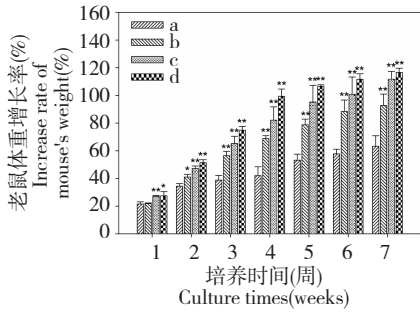


图5 产香真菌发酵饲料对小鼠生长的影响

Fig. 5 Influence of cultured feeds by aroma fungi on the growth of mouse

注: a: 对照组; b: 20% 培养物; c: 40% 培养物; d: 60% 培养物

Note: a: control; b: 20% of culture; c: 40% of culture; d: 60% of culture

2.3 香气成分

试验结果显示,真菌 JXJ 01 接种 PDA 液体培养基培养 1 d 后,培养液即散发出怡人的香味。利用 GC-MS 技术,从该菌挥发性成分中鉴定出 29 个已知化合物(表 1),峰面积百分比占总挥发性成分的 67.89%,这些化合物中许多是日化和食用香料物质,其中含量较高的香料物质有反-桂酸甲酯(15.24%)、桂酸乙酯(10.14%)、芳樟醇(6.33%)、2-甲基丁醇(3.67%)、苯甲醛(3.24%)、3-辛醇(2.16%)、2-甲基丙醇(1.76%)、2-甲基丁醇(1.42%)和苯甲酸乙酯(1.21%)。

3 讨论

产香真菌 JXJ 01 在 PDA 平板上长时间培养,菌丝颜色不变,也未产生孢子,这说明该菌不是普通霉菌。ITS 基因序列分析说明该菌是能够产生大型肉质子实体的担子菌。在农业废弃物固体培养基上能够形成瘤状物,最终长出大型肉质子实体,进一步说明产香真菌菌 JXJ 01 是蕈菌。然而,该菌 ITS 基因序列虽然与系统进化树上其它担子菌相似性最高,但其子实体形态和这些担子菌却完全不同,尤其是 *Amanita fulva* (AF085494.1),虽然和 JXJ 01 在系统进化树上聚在单独一支,但其子实体是典型的伞形。以上结果说明,产香真菌 JXJ 01 可能是一个潜在新蕈菌,其确切分类地位有待于研究。

许多担子菌能够产生香气物质, Bosse 等^[15] 用 30 株担子菌发酵食品工业副产物,结果发现 7 株菌产生令人感兴趣的香气物质,其中 *Tyromyces chioneus* (薄皮干酪菌)利用苹果渣发酵产生苯丙醛、3-苯基-1-丙醇、苯甲醇、苯丙酸甲酯、苯乙酸甲酯、肉桂醛和肉桂酸甲酯等物质。蕈菌 JXJ 01 利用 PDA 培养基产生 20 余种已知日化和食用香精香料物质,其中反-桂酸甲酯、桂酸乙酯和芳樟醇含量很高,占总挥发性成分的 31.71%,这 3 种物质是该菌的主要呈香物质。另外尚有 30% 以上的未知挥发性成分,其中部分成分含量超过总挥发性成分的 9% (表 1),这些未知挥发性成分中是否有新的香气物质,有待于进一步研究。蕈菌 JXJ 01 还能利用农业废弃物固体培养基产生香气风格完全不同的酱香型香气物质(其成分有待于进一步研究),这说明该菌能够利用不同培养基产生不同香气物质,产香能力强。老鼠饲喂试验说明该菌代谢产物无毒。因此,产香真菌 JXJ 01 在微生物发酵生产安全无毒的天然混合香料方面具有较大的潜在应用价值,值得进一步系统研究。

参考文献

- 1 Sanchez L, Seila RL, Christen P, et al. Effect of leucine on aroma volatiles production from *Ceratocystis fimbriata* grown in liquid culture. *World J Microb Biot*, 2002, 18: 231-237.
- 2 Berger RG. Flavours and Fragrances-Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- 3 Su L (苏林). The use of microbial ecology technique for the production of natural flavors and fragrances. *China Food Addit* (中国食品添加剂), 2009, 6: 197-201.
- 4 Akacha NB, Gargouri M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food Bioprod Proc*, 2014, 94: 675-706.
- 5 Gao J (高健), Xu AQ (许爱清), Tang XK (唐新科). Isolation, identification and volatile compound analysis of an aroma-producing endophytic yeast from *Romaine lettuce*. *Food Sci* (食品科学), 2011, 23: 162-166.
- 6 Xiao Y (肖阳), Sun BG (孙宝国), Liao YH (廖永红), et al. Identification and aroma components analysis of *Pichia* sp. yeast separated from grape wine mud. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 31: 164-169.
- 7 Liao YH (廖永红), Shen H (沈晗), Shi WJ (石文娟), et al. Study on carbon sources utilization and fermentation fea-

- tures of aroma-producing yeasts. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2010, 36(2):1-7.
- 8 Liang H (梁慧), Ma HX (马海霞), Li LH (李来好). Screening of aroma-producing yeast strains from dry-cured fish and initial study on their aroma-production and fermentation characteristics. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2011, 32:213-217.
 - 9 Cano-García L, Rivera-Jiménez S, Belloch C, *et al.* Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains. *Food Chem*, 2014, 151:364-373.
 - 10 Wang H, Dong Q, Meng C, *et al.* A continuous and adsorptive bioprocess for efficient production of the natural aroma chemical 2-phenylethanol with yeast. *Enzyme Microb Tech*, 2011, 48:404-407.
 - 11 Zhou S (周森), Wang Y (王勇), Li YM (李艳敏), *et al.* Screening and identification of an aroma-producing *Geotrichum candidum* strain and analysis of its metabolites. *Liquor-making Sci Technol* (酿酒科技), 2013, 7:52-54.
 - 12 Zhu J (朱静), Shi JL (师俊玲), Liu LP (刘拉平). Study on production of volatile aroma by solid-state fermentation of *Geotrichum candidum* in apple pomace. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2010, 31:176-181.
 - 13 Zhu J (朱静), Shi JL (师俊玲), Liu LP (刘拉平). GC/MS analysis of the aroma compounds produced in pear pomace by *Geotrichum* fungi. *J Northwest Agric Forest Univ, Nat Sci* (西北农林科技大学学报, 自科版), 2010, 38:171-178.
 - 14 Abrahão MRE, Molina G, Pastore GM. Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. *Food Res Int*, 2013, 52:367-372.
 - 15 Bosse AK, Fraatz MA, Zorn H. Formation of complex natural flavors by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. *Food Chem*, 2013, 141:2952-2959.
 - 16 Wang MJ (王明君). Pilot study on the production of vanillin by microbial method. Wuxi: Jiangnan University, MSc, 2004.
 - 17 Shen P (沈萍), Chen XD (陈向东). *Microbiology Experiment (the fourth edition)*. Beijing: Higher Education Press, 2007.
 - 18 Wu SJ (武善军), Jia R (茱荣), Gan L (甘露). Isolation and identification a fungus enable to secret lignin-degrading enzymes. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2009, 12:172-176.
 - 19 Yuan HS (袁洪水), Li SN (李术娜), Zhang AL (张爱莲), *et al.* Quartzite sand grind mycelia for rapid preparation of chromosome DNA of *Cephalosporium acremonium*. *J Agric Univ Hebei* (河北农业大学学报), 2007, 30:8-10.
 - 20 Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, *et al.* *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990. 315-322.
 - 21 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25:4876-4882.
 - 22 Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28:2731-2739.
 - 23 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4:406-425.
-
- (上接第 555 页)
- 11 Fu H (付慧), Yang P (杨萍), Wang QK (汪秋宽). Preparation and antimicrobial activities of tea polyphenols. *J Food Sci* (食品科技), 2012, 37:273-276.
 - 12 Panhwar QK, Memon S. Synthesis, characterization and antioxidant activity of rutin complexes. *Pak J Anal Environ Chem*, 2014, 15(2):60-70.
 - 13 de Souza RFV, De Giovanni WF. Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochim Acta Part A: Mole Biomol Spectrosc*, 2005, 61:1985-1990.
 - 14 Yang XF (杨小飞), He QZ (何其庄), He XH (贺香红), *et al.* Study on low temperature synthesis, characterization and antibacterial activity of ternary rare earth complexes. *Chemistry* (化学通报), 2004, 9:689-694.
 - 15 Lin JY (林建原), Luo LF (骆林峰), Chen L (陈亮), *et al.* Synthesis, characterization and antibacterial activity of rare earth lanthanum-rutin complex. *J Text Res* (纺织学报), 2012, 33(5):81-85.