

一株铁皮石斛内生真菌的色素稳定性研究

雒晓芳¹,许淑娟²,潘和平^{1*}

¹西北民族大学实验教学部;²西北民族大学生命科学与工程学院,兰州 730030

摘要:本研究以铁皮石斛体内分离筛选得到一株产橙红色素的内生真菌 X1 为研究对象,为明确该菌株的种属及其所产天然色素的稳定性,采用分子生物学的方法,鉴定该菌株归属于 *Neurospora* sp. 一种。该菌株所产橙色素在 400 nm 波长处有最大吸收峰;从温度、pH、光照、氧化剂与还原剂四个单因子,对该株菌进行色素稳定性研究。结果表明该色素在紫外光下放置 6 h 橙色素光吸收值增大,说明有增色效应;在 pH 2~8,20~100 ℃ 下不受太大影响; H_2O_2 和 Na_2SO_3 对该色素有较强的破坏力; Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 对该色素具有保色或增色作用;10% NaCl 和 15% 葡萄糖溶液对色素均有增色效应。该研究对内生真菌分离及真菌色素提取工艺具有一定的理论指导意义。

关键词:铁皮石斛;内生真菌;鉴定;色素;稳定性

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0832-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.015

Study on the stability of pigments produced by endophytic fungi from *Dendrobium candidum*

LUO Xiao-fang¹, XU Shu-juan², PAN He-ping^{1*}

¹Experimental teaching department, Northwest Minzu University;

²College of Life Scenice and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China

Abstract: In this study, an endophytic fungi X1 that produces orange pigment was isolated and screened out from *Dendrobium candidum*. In order to clarify the species of this strain and the stability of its natural pigments, and the strain was identified as *Neurospora* sp. based on molecular biology. The orange pigment which produced at this strain has the highest absorption peak at 400nm. It is show that when the pigment is placed in ultraviolet light for 6 h, the absorption value increased, indicating a color enhancement effect. It is not affected much at pH 2-8 and 20-100 ℃. Furthermore, H_2O_2 and Na_2SO_3 have strong destructive power to the pigment though several common additives have no effect on the pigment. In the metalions, Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} have color protection or burnish effect on the pigment. Meanwhile, 10% NaCl and 15% glucose solution also have a significant hyperchromic effect on it. This study has theoretical and practical importance for the separation of endophytic fungi and extraction process of fungal pigments.

Key words: *Dendrobium candidum*; endophytic fungi; identification; pigment; stability

铁皮石斛是兰科石斛属的多年生草本植物。不仅是传统的珍贵中药材,也是高档的观赏花卉,拥有很高的观赏价值。铁皮石斛含有多种内生真菌,但只有一些内生真菌能有效地促进石斛的生长发育,组织、宿主、环境等因素的影响在组织和宿主中表现出一定的差异^[1]。

微生物与植物体相互作用关系由来已久,大多

数植物体的根、茎、叶中都分布着数量众多和种类繁多的微生物^[2]。内生菌作为植物微生态系统中的天然组成部分,对植物具有多方面的积极作用。在生物防治上,植物内生菌系统地分布于植物体内,有充分的碳源和氮源的供应,比暴露于外界的恶劣环境中更有利地发挥作用^[3]。所以具有重要经济价值和药用价值的铁皮石斛内生真菌成为筛选新活性物质的重要资源^[4-8]。

随着人们对天然色素的关注度不断提高,现在人们发现某些细菌、真菌等微生物产生的色素也可以作为天然染料用于纺织品的染色中,成为天然染

收稿日期:2018-06-14 接受日期:2019-03-01

基金项目:甘肃省现代化草食畜产业技术体系项目(GARS-08);西

北民族大学中央高校重大培育项目(31920190052)

*通信作者 Tel:86-931-4512970;E-mail:panheping62@163.com

料的新的一大来源^[9-11]。天然色素的色泽不稳定,在使用过程中易受多种因素(如光、温度、氧化、pH值、介电极性等)的影响,并影响褪色和变色,影响其着色效果^[12-18]。因此研究色素的稳定性具有非常重要的意义。

本实验从铁皮石斛中分离出1株产色素的内生真菌,其色素为水溶性胞外色素。以这株产橙红色素铁皮石斛内生菌为材料,对产生橙红色素的稳定性进行初步探究,为该色素进一步开发利用奠定基础。

1 材料

1.1 实验材料

在云南省普洱市宁洱县五里坡选取生长优良,表面无病虫害的仿野生生长三年以上整个植株。观察形态特征,绿杆“硬脚”,植株茎较圆,与节部有黑褐色环状间隙,萼片和花瓣黄绿色,经由西北民族大学生命科学与工程学院郭鹏辉老师和实验教学部微生物学分室的雒晓芳老师鉴定为铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)。

1.2 培养基

麦芽汁琼脂培养基:氯霉素0.1 g, pH为6.0±0.2,麦芽膏粉30 g,琼脂15 g蒸馏水1 L,121℃高压灭菌30 min。

马铃薯琼脂糖培养基(PDA),pH为6.0:把土豆冲洗干净,去皮。将200 g切成小块,加入纯水1 L,煮沸半小时,补纯水至1 L。在滤液中加入10 g琼脂,煮沸后加入20 g糖,溶解(用糖培养霉菌,用葡萄糖作酵母培养物)补水,121分钟灭菌30 min。

高盐察氏培养基:氯化钾0.5 g,硫酸亚铁0.01 g,氯化钠60 g,蔗糖30 g,琼脂20 g,蒸馏水1 L,121℃高压灭菌30 min。

营养琼脂培养基:牛肉膏1 g,酵母膏2 g,蛋白胨5 g,NaCl 5 g,琼脂15 g,加水定容至1 L。调pH为7.4,加热溶解,121℃高压灭菌30 min。

LB固体培养基:胰化蛋白胨10 g,酵母提取物5 g,NaCl 5 g,琼脂粉15 g,摇动容器直至溶质溶解。用5 mol/L NaOH调pH至7.4,去离子水定容至1 L。加热溶解,121℃高压灭菌30 min.

营养肉汤培养基:牛肉膏1 g,酵母膏2 g,蛋白胨5 g,NaCl 5 g,琼脂15 g,加水定容至1 L。调pH为7.4,加热溶解,121℃高压灭菌30 min。

LB液体培养基:胰化蛋白胨10 g,酵母提取物5 g,NaCl 5 g,摇动容器直至溶质溶解。用5 mol/L

NaOH调pH至7.4,去离子水定容至1 L。加热溶解,121℃高压灭菌30 min。

1.3 试剂

盐酸、蔗糖、氢氧化钠、无水乙醇、异丙醇、10% SDS、双氧水、1X TAE(pH 8.0)、1% 氯化汞、亚硫酸钠、硫酸双氢链霉素、青霉素G钾、10 mg/mL RNase(Sigma)、PCR试剂盒、乳酸石炭酸棉蓝染色液、5% 石炭酸水溶液。

2 方法

2.1 菌种筛选

选取新鲜健康的铁皮石斛植株的根段、茎段和叶片用流水冲洗干净,按照插片法将切片等距离均匀分别放置于含链霉素(50~100 mg/L)和青霉素(100~300 mg/L)的5种固体培养基上(3~4片/皿),分别为麦芽汁琼脂培养基、高盐察氏培养基、营养琼脂培养基、LB固体培养基、PDA培养基。于26℃黑暗条件下培养5~10天待切片周围长成肉眼可见的菌落时,以平板划线法分离真菌培养。将初筛后获得的一株优势菌种连续富集培养三次。富集培养均无出现杂菌,继续以平板划线法分离纯化菌株,重复三次。通过肉眼对培养特征的观察选择生长优良的菌株。将所得的单菌株接于斜面上26℃培养3~5天后,4℃保存备用。

2.2 真菌鉴定

真菌菌体用液氮研磨后提取总DNA,然后用ITS扩增引物ITS1和ITS4进行PCR扩增并测序。将测序结果与NCBI数据库(NR)进行比对,并将序列进行BLAST比对,构建进化树。

2.3 色素测定

2.3.1 色素的提取

用接种环取活化后的菌丝体于麦芽汁琼脂固体培养基中,在26℃恒温黑暗培养3~5天。至产生的色素达到饱和时除去菌丝体,保留仅存色素的培养基,然后按体积比1:2(w/v)加入蒸馏水在60℃水浴条件下进行浸提1 h,经过8层纱布过滤掉培养基等大块的固体杂质,用滤纸过滤后37℃烘箱干燥得到橙红色素粗提物。用蒸馏水配制浓度为1%的色素溶液作为母液。

2.3.2 色素吸收光谱曲线的测定

取1%的色素溶液,用G10S UV-VIS双光束紫外可见分光光度计在300~700 nm范围内扫描,以10 nm为扫描间隔,记录数据,利用Excel软件分析找到最大吸收波长。测出的最强吸收峰波长值将作

为后续实验中的参考值。

2.3.3 色素色价测定

色价测定参照 GB 1886.34-2015 “食品安全国家标准食品添加剂辣椒红”的方法做了适当调整：准确称取 0.25 g 色素粗品，精确至 0.000 2 g，用蒸馏水溶解于 25 mL 的容量瓶中，配制成浓度为 1% 的色素溶液，适当稀释使吸光值控制在 0.3 ~ 0.7 范围内，用蒸馏水为对照，测定其在最大吸收波长处的吸光值。色价 E 和色价保存率计算公式如下：

$$E_{1cm}^{1\%} 400nm = \frac{Af}{m} \times \frac{1}{100}$$

$$\text{色价保存率} (\%) = \frac{E_1}{E_0} \times 100\%$$

$E_{1cm}^{1\%} 400nm$ 为单位质量橙红色素在浓度为 1%，用 1 cm 比色皿，在 400 nm 处的吸光度，即为橙红色素色价；A 为实测吸光度；f 为稀释倍数；m 为样品质量，单位为 g； E_0 为橙红色素溶液初始色价； E_1 为橙红色素溶液处理后色价。

2.4 色素的稳定性研究

2.4.1 温度对色素稳定性的影响

取适当稀释后的色素溶液，分别置于 4、20、40、60、80、100 °C 恒温水浴锅中避光保温 1 h，迅速冷却至常温观察颜色变化，以蒸馏水为对照分别测定其在最大吸收波长处的吸光值，计算色素色价保存率。

2.4.2 pH 对色素的影响

取适当稀释后的色素溶液，分别用 1 mol/mL NaOH 和 1 mol/mL HCl 调节 pH 为 2、4、6、8、10、12，室温避光静置 1 h，观察颜色变化，分别测定其在最大吸收波长处的吸光值，计算色素色价保存率。

2.4.3 光照对色素稳定性的影响

取 5 mL 适当稀释的色素溶液于玻璃皿中，用保鲜膜封口，分别置于自然光照、紫外光照和避光条件下持续处理 24 h，分别测定其在 3、6、9、12 h 时的最大吸收波长处的吸光值，计算色素色价保存率。

2.4.4 氧化剂与还原剂对色素稳定性的影响

取 9 mL 适当稀释的色素溶液，分别加入 1 mL 浓度为 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9% 的氧化剂 H₂O₂ 和浓度为 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、0.9% 的还原剂 Na₂SO₃。室温避光静置 1 h，分别测定其在最大吸收波长处的吸光值，计算色素色价保存率。

2.4.5 金属离子对色素稳定性的影响

取 9 mL 适当稀释的色素溶液，分别加入 1 mL

浓度为 1% 的 5 种金属离子溶液 FeCl₃、ZnSO₄、CuSO₄、CaCl₂ 和 MnCl₂，室温避光静置 1 h，分别测定其在最大吸收波长处的吸光值，计算色素色价保存率。

2.4.6 常见添加剂对色素稳定性的影响

取 9 mL 适当稀释的色素溶液，分别加入 1 mL 浓度为 5%、10%、15%、20%、25% 的 NaCl、蔗糖、葡萄糖溶液。室温避光静置 1 h，分别测定其在最大吸收波长处的吸光值，计算色素色价保存率。

3 结果与分析

3.1 菌株的形态特征

用 5 种不同的固体及对应的液体培养基经过初筛、富集培养以及分离纯化，得到一株铁皮石斛优势内生真菌，将其命名为 X1。菌株 X1 落在麦芽汁琼脂培养基上培养 26 °C 培养 3 天，即形成较典型的菌落，菌落呈白色、蛛网状，无隔。分生孢子梗发生于基质，壁平滑，帚状枝为双轮生或三轮生，梗基每轮 2~3 个，瓶梗每轮 4~8 个，分生孢子为椭圆形，壁平滑，分生孢子链圆柱状。

3.2 分子生物学鉴定

3.2.1 16S rDNA 扩增

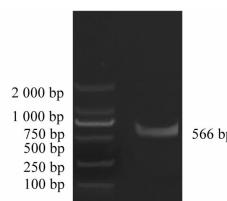


图 1 X1 的 PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoretic diagram of X1

Marker 条带组成：100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1 000 bp, 2 000 bp, 3 000 bp, 5 000 bp。750 bp 条带浓度为 60 ng/3 μL，显示为加亮带，其余条带浓度均为 30 ng/3 μL。电泳方向从下向上。

3.2.2 进化树构建

将 X1 菌株铁皮石斛内生真菌优势菌的 16S rDNA 的核酸序列经序列用比对用软件 MEGA5.1 进行多重比对并绘制了系统进化树。结果如图 2 所示。结果表明：X1 菌株与链孢霉菌属中的 *Neurospora africana* 的 16S rDNA 序列有 99% 的同源性，可见 X1 与链孢霉菌具有较近的遗传距离。结合形态学及分子生物学染色实验结果综合分析，将 X1 与链孢霉菌属中的 *Neurospora africana* 具有较近的遗传距离。

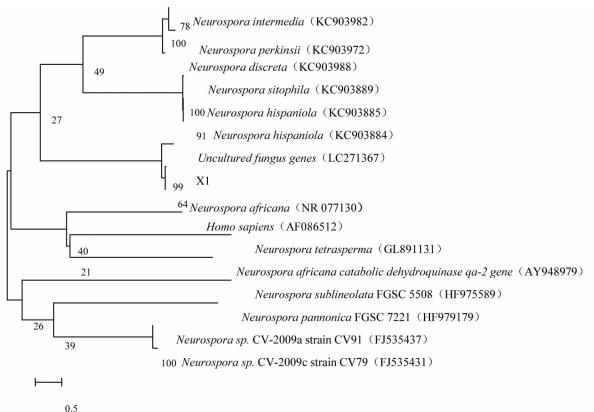


图 2 X1 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of X1

3.3 色素稳定性

3.3.1 不同波长条件下色素紫外吸收光曲线

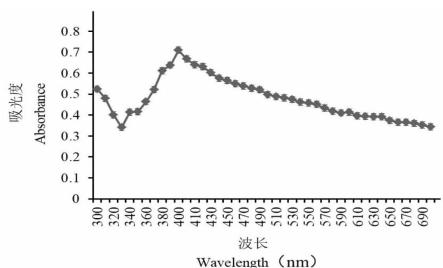


图 3 不同波长下橙红色素的 OD 曲线

Fig. 3 The OD curve of orange red pigment at different wavelengths

由图 3 可知,300~210 nm 范围内为下降趋势,320~400 nm 范围内为持续上升,至 400~700 nm 为缓慢下降的趋势,故可得最大吸收峰为波长 λ 为 400 nm。故本实验选择 400 nm 作为最大吸收波长。

3.3.2 不同温度条件对色素色价的影响

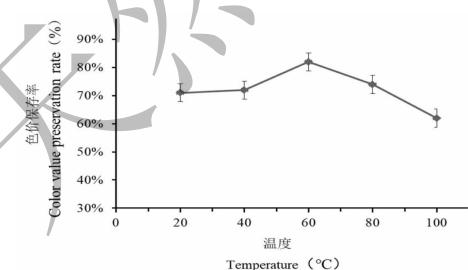


图 4 不同温度对色素色价的影响

Fig. 4 The effect of different temperatures on the color value of the pigment

由图 4 可知,20~60 °C 时色素的保存率处于上升阶段,60~100 °C 是色素的保存率则处于连续下

降阶段,温度为 60 °C 时其色价保存率最好为 82% 即对色素的影响较小,对色素有护色反应。所以选择 60 °C 作为该色素的提取温度。

3.3.3 不同 pH 值对色素色价的影响

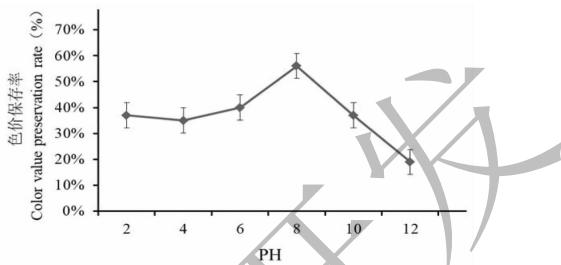


图 5 不同 pH 值对色素色价的影响

Fig. 5 The effect of different pH on the color value of pigment

用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节经稀释的色素溶液的 pH 分别为 2、4、6、8、10、12, 室温放置 1 h, 取不同 pH 的 1 mL 色素溶液测定吸光度值。由图 5 可知, pH 为 2~8 时的色价保存率持续上升, pH 在 8~12 的时候连续下降, 所以色价保存率最好为 pH = 8 时, 色价保存率为 56%。说明 pH 的变化对色素的色价影响较大。色素宜储存于中性或弱碱性环境, 强碱性环境比酸性环境对色素的色价稳定性影响更大。

3.3.4 不同光照条件对色素稳定性的影响

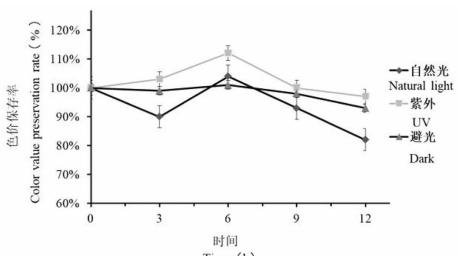


图 6 不同光照条件对色素色价的影响

Fig. 6 The effect of different light on the color price of pigment

将 10 mL 色素溶液放置于自然光、紫外、避光三个条件下室温持续处理 12 h。每 3 h 取 1 mL 的色素溶液测定吸光度值。由图 6 可知, 紫外条件下, 0~6 h 范围内色素溶液的色价持续上升, 6~12 h 色素溶液色价持续下降。自然光条件下, 0~3 h 色价先下降, 3~6 h 色价上升, 6 h 后色素溶液色价持续下降。避光条件下, 对该色素色价的影响可忽略不计。在自然光和紫外条件下, 6 h 时均会发生增色反应, 间接证明紫外对该色素具有增色反应。避光条件下, 对该色素的色价影响可忽略不计, 可将色素

溶液避光保存。

3.3.5 不同浓度 H_2O_2 和 Na_2SO_3 溶液对橙红色素稳定性的影响

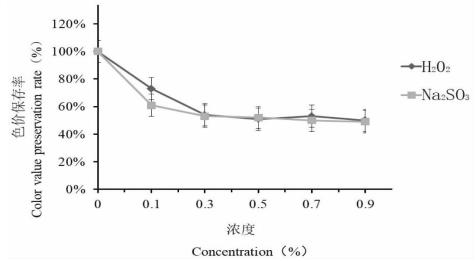


图 7 H_2O_2 和 Na_2SO_3 对色素色价的影响

Fig. 7 The effect of H_2O_2 and Na_2SO_3 on color value of pigment at different concentrations

由图 7 可知, 经氧化剂 H_2O_2 和还原剂 Na_2SO_3 处理后, 色素对 H_2O_2 和 Na_2SO_3 溶液较敏感。随着浓度的上升, 整体呈下降趋势, 对色素一直保持减色反应。

3.3.6 不同金属离子对色素稳定性的影响

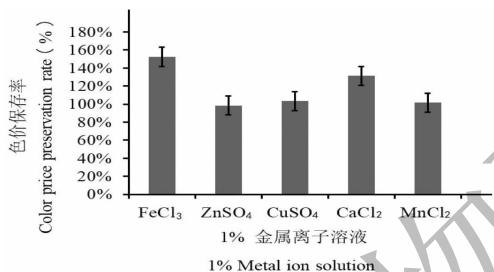


图 8 不同金属离子溶液对色素色价的影响

Fig. 8 The effect of different metal ion in the solution of the dye color value

由图 8 可知, 浓度为 1% 的 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 5 种金属离子溶液对色素溶液均有不同程度影响。其中, Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 对色素溶液具增色反应, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 对色素溶液有保色效果。

3.3.7 不同常见添加剂对色素稳定性的影响

由图 9 可知, 经不同浓度 $NaCl$ 溶液处理后, 5%

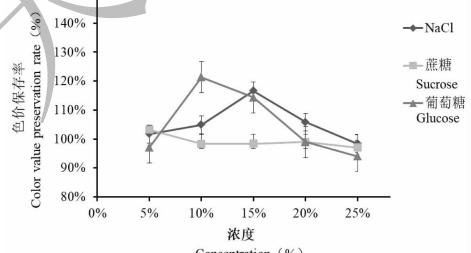


图 9 不同常见添加剂对色素色价的影响

Fig. 9 The effect of different common additives on color Price of pigments

~10% 范围内色素色价呈上升趋势, 于 10% 时色素色价达到峰值, 10% 之后色素溶液色价持续下降。经不同浓度葡萄糖溶液处理后, 5% ~ 15% 范围内色素色价呈上升趋势, 15% 时色素色价达到峰值, 15% ~ 25% 色素溶液色价持续下降。不同浓度的蔗糖对该色素的色价几乎没有影响。

4 讨论

内生真菌(endophytic fungi)指长期生活在植物的根、茎、叶等器官的组织内部, 但一般不引发植物体病害的真菌。链格孢是经济上重要的真菌属之一。大多数种类兼性寄生于植物上, 引起多种经济植物病害, 造成田间和产后损失。有几个链格孢小孢子种可侵染人和动物, 引起皮癣、甲癣、颤骨髓炎等疾病。链格孢产生的某些真菌毒素是重要的致癌因素。另一方面, 链格孢也是有应用潜力的生物资源, 如一些链格孢次生代谢物具有杀虫、杀菌和杀原生生物活性。长柄链格孢中某些菌株分生孢子壁中含有激发子组份, 可被用来制成防治烟草赤星病的生制剂等^[19]。X1 菌株与脉孢菌中的 *Neurospora africana* 亲源关系最近, 为 99%。脉孢菌属在遗传研究及生化途径研究上广泛应用, 且其菌体内含丰富蛋白质、维生素 B12 等, 可用于工业发酵和制作饲料。

发现并选择能够大量生产色素的真菌, 作为一种新型的天然染料应用与纺织品的染色中, 利用真菌培养的优势对于色素进行工业化生产, 将有望解决天然植物染料不能满足人们的需求的难题, 使得天然染料更好的为人们使用^[20]。因此, 本实验选择 X1 内生真菌所产生的橙红色素对其稳定性进行初期研究。经研究分析, 发现该水溶性橙红色色素色价保存率易受到批次影响, 不同批次的 1% 色素溶液色价均有差异。并且也发现该色素溶液不能低温保存, 低温保存对其色价有很大影响。每次提取配制的色素溶液, 只可以于常温避光放置一周。后续实验将会通过多个单因子实验和正交实验对橙红色素的提取工艺进行优化, 为色素进行工业化生产提供理论依据。

参考文献

- 1 Hu KX, Hou XQ, Guo SX. Distribution of endophytic fungi in *Dendrobium officinale* [J]. *Microbiol Chin*(微生物学通报), 2010, 37(1):37-42.
- 2 Feng YJ, Song M. Endophytic bacteria [J]. *Chin J Nat*(自然杂志), 2001, 5:249-252.
- 3 Andrews JH. Biological control in the phyllosphere [J]. *Annu*

- Rev Phytopathol, 1992, 30: 603-635.
- 4 Gong Y, He WB, Wang SZ, et al. Research progress on endophyte from *Dendrobium officinale* [J]. J Zhejiang Agric Sci (浙江农业科学), 2017, 58: 1372-1375.
 - 5 Wang WY, Li HM, Zhou H, et al. Research advances in the functions to promote endophytic fungi of *Dendrobium officinale* [J]. Chin Hortic Abstr (中国园艺文摘), 2016, 32 (11): 52-53.
 - 6 Yang HT. Screening and functional characterization of endophytic mycorrhizal fungus in *Dendrobium officinale* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京农业大学), 2015.
 - 7 Ma Z, Tan CC, Zhang C, et al. The relationship between endophytes and host plants: implications for research on geo-herbalism [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med (上海中医药大学学报), 2015, 29(6): 4-11.
 - 8 Li Y, Luo PF, Zhou DL, et al. Isolation and identification of endophytic fungi in the root, stem and leaves of *Dendrobium nobile lindl* [J]. J Anhui Agric Sci (安徽农业科学), 2012, 40: 11598-11600.
 - 9 Pei XX, Li YF, Cai DY, et al. Study on the stability of yellow pigments produced by endophytic fungus RML6 from *Lycium ruthenicum Murr* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30(1): 10-14.
 - 10 Hu SY, Liu S, Wang SJ, et al. Isolation and identification of a melanin-producing marine fungi and characterization of the pigment [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2017, 33: 138-143.
 - 11 Chen Q, Wang SJ, Wang HM, et al. Preliminary identification of red pigments producing fungus and extraction condition [J]. J Zaozhuang Univ (枣庄学院学报), 2017, 34(5): 91-98.
 - 12 Liu W, Ruan LY, Guan CL, et al. Study on stability of red pigments produced by an endophytic fungus H1B1 from *Dendrobium officinale* [J]. Chin Food Additives (中国食品添加剂), 2016, 7: 71-75.
 - 13 Zhang LQ, Liang HB, Ai TS, et al. Characterization of a red pigment produced by a fungus and study on the stability of the red pigment [J]. Hubei Agric Sci (湖北农业科学), 2015, 54: 2863-2865.
 - 14 Jiang QF, Chen ML, Yuan ZH. Study on extraction and stability of monascus pigment from Red Kojic Rice [J]. Chin Condiment (中国调味品), 2014, 39(9): 1-3.
 - 15 Zhang D. Study on the fermentation of monascus pigment by monascus and stability of monascus pigment [D]. Anhui: Anhui Polytechnic University (安徽工程大学), 2014.
 - 16 Wang LJ, Zhang F, He PX. Isolation, identification and red pigment properties of fungi in rhizosphere soil [J]. Food Sci and Technol (食品科技), 2014, 39(4): 15-19.
 - 17 Wang B, Xu LG, Yu ZD, et al. Study of producing condition and the stability of a red pigment from *Lecanicillium psalliotae* Zare & W. Gams [J]. J Northwest Forestry Univ (西北林学院学报), 2013, 28: 112-116.
 - 18 Xie LM, Li JR. Study on the extraction of monascus pigment and its stabilization [J]. Sci and Tech Food Ind (食品工业科技), 2004, 3: 118-121.
 - 19 Wang HK, Zhang TY, Zhang M. Advances on taxonomic studies of the genus alternaria [J]. J Shandong Agric Univ (山东农业大学学报), 2001, 32: 406-410.
 - 20 Li HY. The preparation of fungal pigments and their dyeing research on protein fiber fabric [D]. Zhejiang: Zhejiang Sci-Tech University (浙江理工大学), 2015.

(上接第 746 页)

- 16 Plutowska B, Chmiel T, Dymerski T, et al. A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography [J]. Food Chem, 2011, 126: 1288-1298.
- 17 Kaskonienė V, Venskutonis PR, Čeksteryte V. Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and bee-bread collected in Lithuania [J]. Food Chem, 2008, 11: 988-997.
- 18 Su YZ, Xie LQ, Wang Q, et al. SPME-GC-MS analysis of volatile compounds from four Xinjiang monofloral honey [J]. Food Sci (食品科学), 2010, 31: 293-299.
- 19 Liang XW, Li QQ, Wang K, et al. A review of characteristic markers for honey traceability [J]. Food Sci (食品科学), 2018, 39: 343-348.
- 20 Seisonen S, Kivima E, Vene K. Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry [J]. Food Chem, 2015, 169: 34-40.
- 21 Siegmund B, Urdl K, Jurek A, et al. "More than honey": Investigation on volatiles from monovarietal honeys using new analytical and sensory approaches [J]. J Agric Food Chem, 2017, 66: 2432-2442.
- 22 Pei GP, Shi BL, Zhao L, et al. The analysis research of three nectar source honey aroma ingredients differentiation information [J]. Food Sci Technol (食品科技), 2014, 2: 68-73.
- 23 Ren JM, Zhao YZ, Tian WL, et al. Analysis of volatile components in honeys from different nectar sources [J]. J Chin Inst Food Sci Technol (中国食品学报), 2016, 16: 225-236.