

# 产 L-酪氨酸花椒内生菌的分离鉴定

陈冲, 李霄洁, 赵志峰, 何强, 钟凯, 吕远平, 高鸿

(四川大学轻纺与食品学院, 四川成都 610065)

**摘要:** 采用研磨法从汉源产红花椒果实中分离筛选出了 6 株内生菌, 包括 4 株内生细菌和 2 株内生真菌。本文以其中一株内生细菌 Z2 为研究对象, 对其进行了形态特征、生理生化特征及分子生物学特征鉴定。实验结果发现, Z2 菌体短杆状, 大小约为 0.6~0.7  $\mu\text{m}$  × 1.5~2.5  $\mu\text{m}$ , 革兰氏阳性菌, 无芽孢, 无鞭毛。生理生化特征、16S rDNA 基因序列及进化树的结果均表明, Z2 为耐寒短杆菌 (*Brevibacterium frigoritolerans*)。经过摇瓶液体发酵后, 利用高效液相色谱法对其发酵液及未发酵培养基进行了对比分析, 发现其中有新物质产生。通过 Sephadex LH-20 层析柱初步分离发酵液后, 利用半制备型高效液相色谱仪对该物质所在组分进行进一步分离纯化, 采用电喷雾电离质谱和核磁共振等方法对该物质进行结构解析, 结果表明该物质为 L-酪氨酸, 得率为 12.90 mg/L 发酵液。

**关键词:** 花椒; 内生菌; 鉴定; 耐寒短杆菌; L-酪氨酸

文章编号: 1673-9078(2016)2-66-72

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.011

## Isolation and Identification of an L-tyrosine-producing Endophyte from *Zanthoxylum bungeanum*

CHEN Chong, LI Xiao-je, ZHAO Zhi-feng, HE Qiang, ZHONG Kai, LV Yuan-ping, GAO Hong

(College of Light Industry, Textile and Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** Six endophytic strains were isolated from the fruits of *Zanthoxylum Bungeanum* by grinding, and these included four strains of bacteria and two strains of fungi. The endophytic bacteria, Z2, was used as the research object in the present study, and its morphological, physiological, biochemical, and molecular biological characteristics were investigated. It was found that the strain Z2 was Gram-positive without spores and flagella, and was observed as a short rod of about 1.5~2.5  $\mu\text{m}$  in length and 0.6~0.7  $\mu\text{m}$  in width. According to the results on the physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA gene sequence, and the phylogenetic tree, Z2 was identified as *Brevibacterium frigoritolerans*. During comparative analysis of the broth fermented with Z2 and the broth without fermentation using high-performance liquid chromatography (HPLC), a new substance was found in the fermentation broth. This new substance was further purified by Sephadex LH-20 column chromatography and by semipreparative HPLC. Based on the data from electrospray ionisation tandem mass spectrometry and nuclear magnetic resonance imaging, this substance was identified as L-tyrosine and its content was 12.90 mg/L in the fermented broth.

**Key words:** *Zanthoxylum bungeanum*; endophyte; identification; *Brevibacterium frigoritolerans*; L-tyrosine

花椒是指芸香科植物花椒 (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.) 和青椒 (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc.) 的干燥成熟果皮<sup>[1]</sup>。花椒在我国的使用有着悠久的历史, 作为一味传统中药材, 具有温中散寒、除湿和杀虫止痛等作用; 作为一种食用香辛料, 被誉为“八大味”之一, 也是川菜的主要调味品之一。《本草纲目》记载: “椒, 纯阳之物, 其味辛而麻, 其

收稿日期: 2015-03-26

基金项目: 四川省科技支撑项目 (2012NZ0023); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-10-0591)

作者简介: 陈冲 (1991-), 女, 硕士, 发酵工程

通讯作者: 钟凯 (1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物化学、食品微生物; 吕远平 (1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与工程

气温以热。入肺散寒, 治咳嗽; 入脾除湿, 治风寒湿痹, 水肿泻痢; 入肾补火, 治阳衰瘦数, 足弱久痢诸症”<sup>[2]</sup>。现代研究发现花椒最重要的用途是香辛料, 用于食品的烹调加工调味, 有赋香、着色、防腐、掩盖异味及增加食欲等作用<sup>[3]</sup>。目前, 国内外对花椒的研究主要着眼于其生药性状与组织鉴别、化学成分分析<sup>[4,5]</sup>、药理研究<sup>[6]</sup>、相关产品加工应用<sup>[7]</sup>等方面, 但对于花椒内生菌的研究较少, 更未见从花椒内生菌代谢产物中分离出花椒相关成分的报道。

有研究发现<sup>[8]</sup>, 内生菌长期生活在植物体内特殊环境中并与其协同进化, 在演化过程中形成了互惠关系, 一方面, 植物为内生菌提供其光合作用产物和矿物质以满足其生长必须的能量和营养需要; 另一方面, 内生菌通过自身代谢产物或借助于信号传导作用对宿

主产生影响。甚至发现<sup>[8]</sup>内生菌不仅能参与植物次生代谢产物的合成、促进其生成、积累及对其的转化,还能独立产生与宿主相同或相类似的生物活性物质,是天然产物的重要来源。1993年美国蒙大拿州立大学 Stierle<sup>[9]</sup>等首次报道从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的韧皮部分离到一株能产生抗癌物质紫杉醇的内生真菌 (*Taxomyces andreanae*), 掀起了在植物内生菌中寻找新物质的热潮, 关于内生菌产生活性物质的研究报道也日益增多。

研究发现花椒属植物的化学成分主要有生物碱、木质素、酰胺、香豆素、挥发油和脂肪酸等, 其它成分还包括三萜、甾醇、黄酮类、烃类、蛋白质、微量元素及维生素等<sup>[11]</sup>。而本实验通过对汉源花椒内生菌的研究发现, 内生细菌 Z2 能发酵产生 L-酪氨酸, 并对其种属进行了鉴定, 为深入花椒内生菌的研究及探寻其与宿主之间的相互作用提供前期基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料

红花椒果实, 2011年8月采摘自四川省雅安市汉源县花椒种植基地(海拔2000m), 经75%乙醇表面擦洗消毒阴干后, 装入无菌样品瓶中, 4℃放置备用。

#### 1.1.2 试剂与培养基

盐酸、氢氧化钠、氯化钠、乙醇、次氯酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠, 均为分析纯, 购于成都市科龙化工试剂厂; 生理生化鉴定管, 生化级, 购于杭州微生物试剂有限公司; 甲醇、甲酸, 色谱纯, 购于美国 Sigma 试剂有限公司; 葡萄糖、可溶性淀粉、牛肉膏、蛋白胨、琼脂, 均为生化级, 购于青岛海博生物技术有限公司; Tris/HCl、EDTA、苯酚、氯仿、异戊醇、醋酸钠、十二烷基磺酸钠、氨苄西林购于成都孟德尔科技有限公司; 模板 DNA、dNTP、Buffers、Primer、氯化镁、聚合酶、溶菌酶、琼脂糖凝胶、pMD18-T 载体、PCR 产物纯化试剂盒购于 Takana 公司; 新鲜马铃薯, 市购。

营养琼脂培养基 (g/L, NA): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂粉 15, pH 调至 7.2~7.4; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (g/L, PDA): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, 自然 pH; 发酵培养基 (g/L, NB): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, pH 调至 7.2~7.4。

### 1.2 仪器与设备

BSA224S 分析天平: 德国 Sartorius; SW-CJ-1BV

无菌操作台: 苏净集团安泰公司; LDZX-50FB 立式压力蒸汽灭菌器: 上海申安医疗器械厂; DH-420A 恒温培养箱: 北京中兴伟业; SHA-B 水浴恒温振荡器: 金城国胜试验仪器厂; ECLIPSE E200 显微数码成像系统: 日本尼康; Agilent 1200 高效液相色谱仪: 安捷伦科技有限公司; TGL-16C 离心机: 金坛市医疗仪器厂; LGJ-50F 冷冻干燥机: 北京松源华兴科技发展有限公司; 依利特 P270 高效液相色谱仪: 大连依利特分析仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 内生菌的分离和筛选

称取适量花椒果实用流动自来水冲洗干净后, 75%乙醇浸泡 30s, 无菌水冲洗 4 次, 再用 5% NaClO 浸泡 3 min, 无菌水冲洗 3 次, 并保留最后一次洗涤用水<sup>[10]</sup>; 使用无菌滤纸吸干样品表面水分后, 置于装有 10 mL 磷酸缓冲盐的灭菌研钵中研碎, 静置 15 min 后, 吸取 200  $\mu$ L 上清液涂布在两种分离培养基平板上 (NA 用于分离细菌, PDA 用于分离真菌), 并设置两个重复, 于 28℃ 恒温培养箱中培养 72 h。培养期间逐日观察, 将长出的菌落或菌丝及时挑取至与分离培养基成分相同的新鲜固体培养基上进行纯化, 使用斜线法进行划线, 划线时每次三根, 平均分布在平板上。待纯化后的菌株长出后, 将 3 个无菌的牛津杯垂直放置在菌群中, 呈三角形分布在平板上, 分别吸取 200  $\mu$ L 花椒精油注入牛津杯中, 于 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后观察抑菌圈的生长情况, 选择没有抑菌圈的菌种通过划线接种到相应的斜面培养基上, 在 28℃ 下培养 72 h 后, 蜡封试管 4℃ 保存。

为了确保表面消毒彻底, 将最后一次洗涤用水取相同的体积涂布于两种培养基上, 在相同条件下培养作为对照。若对照组无菌生长则证明表面消毒彻底, 即能保证分离得到的菌是植物内生菌而不是空气中或该植物表面附着的菌。

#### 1.3.2 内生菌 Z2 的鉴定

结合内生菌 Z2 菌体的形态特征及生理生化特征对其进行系统鉴定。即观察固体培养基上菌落的形态、大小、表面光滑程度、边缘、凹凸度及透明度; 利用革兰氏染色、芽孢染色及扫描电镜观察菌株形态等, 具体方法参照伯杰细菌鉴定手册<sup>[11]</sup>。在此基础上对内生菌 Z2 进行分子生物学分类鉴定, 即采用 16S rDNA 鉴定来确定其种属。

细菌总 DNA 的提取<sup>[12]</sup>: 将菌株培养至对数期后,  $5.0 \times 10^3$  r/min 离心 15 min 收集菌体, 向菌体内依次加入 700  $\mu$ L 缓冲液和 50  $\mu$ L 质量浓度为 20 mg/mL 的溶

菌酶,充分混匀,室温放置 30 min;加入 10  $\mu\text{L}$  浓度为 1%的十二烷基磺酸钠,60  $^{\circ}\text{C}$  水浴处理 1 h 后,1.0 $\times 10^4$  r/min 离心 3 min 得上清液,加入与上清液等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)的混合溶液进行抽提,振荡充分后在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1.0 $\times 10^4$  r/min 离心 2 min,重复两次直到没有白色沉淀为止;离心后吸取上清液,加入 1/10 上清液体积的 3 M 醋酸钠和 2 倍上清液体积的无水乙醇,充分混匀后,置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  下处理 1 h 后,1.0 $\times 10^4$  r/min 离心 5 min 弃上清液,在沉淀内加入适量的 70% 乙醇后混匀,4  $^{\circ}\text{C}$ 、1.0 $\times 10^4$  r/min 离心 2 min,重复一次;离心后弃上清液,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  下干燥 30 min,加入 50  $\mu\text{L}$  双蒸水溶解,取 5  $\mu\text{L}$  溶液,用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

PCR 扩增<sup>[13]</sup>: 16S rDNA 扩增用 PCR 引物由上海英俊(invitrogen)公司合成。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ )为 2.5  $\mu\text{L}$  模板 DNA,4  $\mu\text{L}$  dNTP,上下游引物各 1.25  $\mu\text{L}$ ,5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  Buffers,5  $\mu\text{L}$  25 mol/L  $\text{MgCl}_2$ ,0.5  $\mu\text{L}$  高保真 LA 聚合酶,30.5  $\mu\text{L}$  Mili-Q 去离子水。其中引物 A 为 8-27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';引物 B 为 1523-1504r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGC CGCA-3'。扩增反应程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2.5 min,25 个循环,再 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。将 PCR 扩增产物上样至 1% 琼脂糖凝胶,80 V 电压,电泳 40 min 检测后,用溴化乙锭浸泡 10 min,用凝胶成像仪成像观察分析并进行片段回收,然后使用回收试剂盒将回收片段进行纯化,并链接到 pMD18-T 载体上,最后将 PCR 产物送至华大基因进行测序。

用分子生物学软件 Clustal X (8.1) 对已获得的 16S rDNA 序列格式进行调整,再利用调整好的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行序列比对,选择与目的片段序列同源性较高的序列,用 Mega 4.1 软件和 Felsenstein 报道的计算方法对目的片段序列进行系统进化树的构建<sup>[14]</sup>。

### 1.3.3 内生菌 Z2 的发酵产物分析

将分离纯化后得到的内生细菌 Z2 菌种接种到相应的固体平板培养基上,在 28  $^{\circ}\text{C}$  下活化培养 24 h 后,用无菌生理盐水制备成菌悬液,控制其含菌体约为 1.0 $\times 10^7$  CFU/mL,在 28  $^{\circ}\text{C}$  下,160 r/min 的水浴恒温振荡器上振荡培养 30 min 后,将该菌悬液按 2% 的接种量接种于盛有液体发酵培养基的 250 mL 三角瓶中(装液量 30%),在 28  $^{\circ}\text{C}$  下,160 r/min 的水浴恒温振荡器上发酵 48 h。发酵结束后,4.0 $\times 10^3$  r/min 离心 15 min 后除去菌体,收集上清液,真空冷冻干燥后配置成浓度为 300 mg/mL 的样品,过 0.22  $\mu\text{m}$  聚醚砜滤膜

后,用高效液相色谱法(HPLC 法)进行分析。将未发酵的空白培养基与发酵液做相同处理作为对照。

液相条件如下:使用 ODS-3 色谱柱(4.6 $\times 250$  mm),采用二元梯度洗脱,梯度洗脱时间程序为:0%~20% 甲醇-水(0.1% 甲酸),10 min;20%~25% 甲醇-水(0.1% 甲酸),10 min;25%~100% 甲醇-水(0.1% 甲酸),10 min;100% 甲醇溶液,10 min。进样流速为 1 mL/min,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 254 nm,进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.3.4 目标物质的分离纯化

将上述处理后的发酵上清液过 Sephadex LH-20 层析柱,按样品与 Sephadex LH-20 质量比 1:25 的比例上样,上样量为柱体积的 20%;用 100 mL 纯水进行等梯度洗脱,洗脱流速为 3 mL/min;按每份收集量 20 mL 等份收集洗脱液,编号 F<sub>1</sub>-F<sub>5</sub>。将各组分用高效液相色谱法(HPLC 法)进行分析,确认目标物质所在组分,其液相条件与发酵液分析条件一致。

将目标物质所在组分用半制备型液相色谱仪(semipre-HPLC)进行分离纯化,条件如下:GL-science 色谱柱(20 $\times 250$  mm,5 mm);流速 18.9 mL/min;柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ;紫外检测波长 280 nm;进样量 2 mL;20% 甲醇溶液洗脱 30 min。收集目标物质相应色谱峰后真空冷冻干燥保存。

### 1.3.5 目标物质的结构解析

采用电喷雾电离质谱(ESI-MS)及核磁共振(NMR)技术对分离纯化得到的物质进行结构测试。ESI-MS 质谱条件如下:离子加速电压 3 kV,电离能 70 eV,离子源温度 200  $^{\circ}\text{C}$ ,收集电流 200  $\mu\text{A}$ ,光电倍增电压 650 V。NMR 分析操作时,用适量甲醇溶解被测样品并转移至 5 mm 的核磁共振试管中,用氮气吹干后加入 0.5 mL 体积比 1:4 的氘代二甲亚砜重水溶液溶解,操作温度 298 K,使用 Z 梯度三共振探头,Varian Vnmr C Software。<sup>1</sup>H NMR 谱宽 1~14 ppm(9615 Hz),弛豫时间 20 s,采样时间 8.82 min,采样次数 24 次,采样数据点为 64 K(65536 个数据点)。

### 1.3.6 数据分析

试验所得数据均为 3 次平行试验结果的平均值,采用 Excel 2007 对数据进行分析处理。采用 Clustal X (8.1) 软件对已获得的 16S rDNA 序列格式进行调整,再利用调整好的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中进行序列比对,选择与目的片段序列同源性较高的序列,使用 Mega 4.1 软件对目的片段序列进行系统进化树的构建比较分析。

## 2 结果与分析

## 2.1 内生菌的分离

本实验前期采用组织块法进行预实验,未能从花椒果实中分离出内生菌,而后采用研磨法进行,共从花椒果实中分离出了4株内生细菌和2株内生真菌。由此可见,分离方法显著影响花椒内生菌的分离效果。由于内生菌广泛分布于植物各个器官组织的细胞或细胞间隙中,采用组织块法不能使其充分有效地暴露于培养基上,尤其是对于不做任何破坏处理的花椒果实,不利于内生菌的分离;采用研磨法则可以使植物组织细胞中的内生菌完全暴露于研磨液中,更利于花椒果实中内生菌的分离。此外,分离所得2株内生真菌在后期进一步划线纯化时,发现其均不能进行体外培养。这可能是由于它们与宿主植物之间形成了共生关系,所以只能在植物体内的特殊环境中才能生存,一旦离开它们赖以生存的母体则无法自行生长<sup>[8]</sup>。在前期实验中,我们将分离所得的内生细菌进行发酵,通过HPLC分析它们的发酵液,结果发现其中一株菌的发酵液中有新物质产生。因此,命名该菌株为Z2,并对Z2进行了进一步的研究。

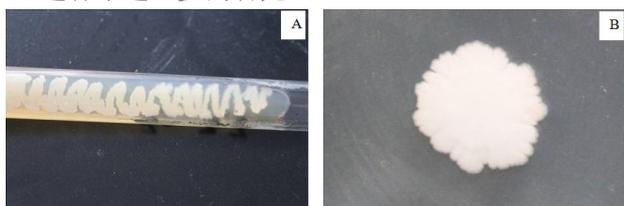


图1 内生菌 Z2 培养特征实验结果

Fig.1 Cultural characteristics of Z2

注: A. Z2 在 NA 斜面上培养 48 h; B. Z2 在 NA 平板上培养 48 h。

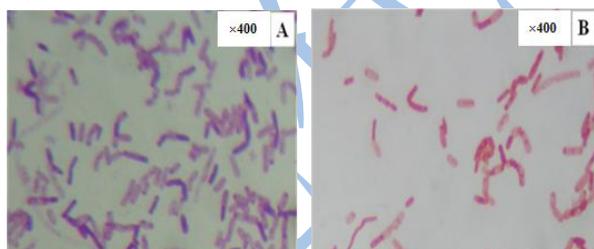


图2 内生菌 Z2 染色结果

Fig.2 Staining results of Z2

注: A. 革兰氏染色; B. 芽孢染色。

## 2.2 内生菌 Z2 的鉴定

### 2.2.1 内生菌 Z2 的形态特征与生理生化特征鉴定

菌株 Z2 在 30 °C 下培养 48 h 后,在 NA 斜面上表面光滑,为白色略带淡淡的黄色,在 NA 平板上其菌落较大,扁平,表面光滑,边缘不规则,不透明(图

1)。通过对其进行革兰氏染色和芽孢染色后,显微镜下放大 400 倍进行观察和拍照。由染色和形态观察结果可知,菌株 Z2 的革兰氏染色为阳性,无芽孢,短杆状(图 2)。

菌株 Z2 扫描电镜图如图 3 所示。可观察到菌体大小为 0.6~0.7 μm×1.5~2.5 μm,菌株 Z2 整个菌体饱满,单个短杆状,表面光滑,无芽孢,无鞭毛。生理生化特征测试结果表明:该菌为好氧菌,接触酶阳性,致死温度为 60 °C,能利用葡萄糖(不产酸,不产气)、乳糖、蔗糖、松三糖,不能利用棉子糖,能利用肌醇、甘露醇、尿素和硝酸。

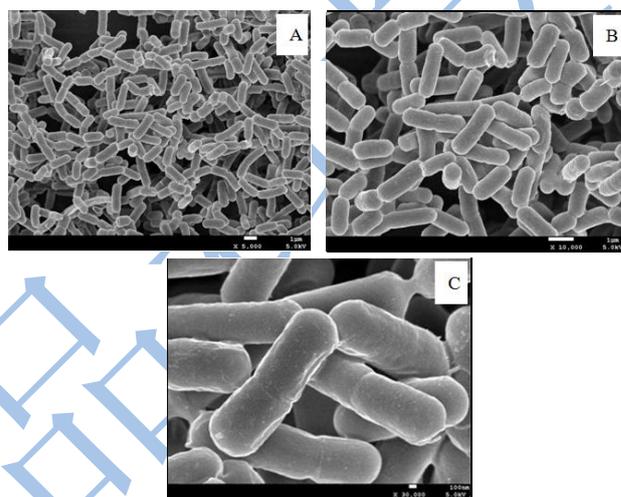


图3 内生菌 Z2 扫描电镜图

Fig.3 Scanning electron micrographs of Z2

注: A. 5000×; B. 10000×; C. 30000×。

### 2.2.2 内生菌 Z2 的分子生物学分类鉴定

通过对内生菌 Z2 进行 16SrDNA PCR 扩增,将 PCR 产物进行测序后,将其序列进行 GenBank 比对搜索,与已经报道的细菌 16S rDNA 序列用 ClustalX 软件进行比对,用 Mega 4.1 软件和 Felsenstein 报道的计算方法对目的片段序列和同源性较高的序列进行系统进化树的构建,结果如图 4 所示。内生菌 Z2 与 *Brevibacterium frigoritolerans* (HQ242765) 亲缘关系最近,确定其为耐寒短杆菌(*Brevibacterium frigoritolerans*)。此菌株 Z2 现已保藏于中国典型培养物保藏中心,分类学命名为 *Brevibacterium frigoritolerans* GH-HJZ2,保藏编号为 CCTCC M20130422。通过查阅相关文献<sup>[11]</sup>发现,目前对于耐寒短杆菌的报道相当少,最新版的伯杰细菌鉴定手册里并没有关于耐寒短杆菌的描述。

## 2.3 目标物质的分离纯化

用高效液相色谱对内生菌 Z2 的发酵液进行分析,发现经 Z2 发酵后,有新的代谢产物产生,如图 5 中

标注峰 1 所示, 对应物质编号 A<sub>1</sub>。因此, 本文对发酵液中的目标物质 A<sub>1</sub> 进行了进一步分离纯化。

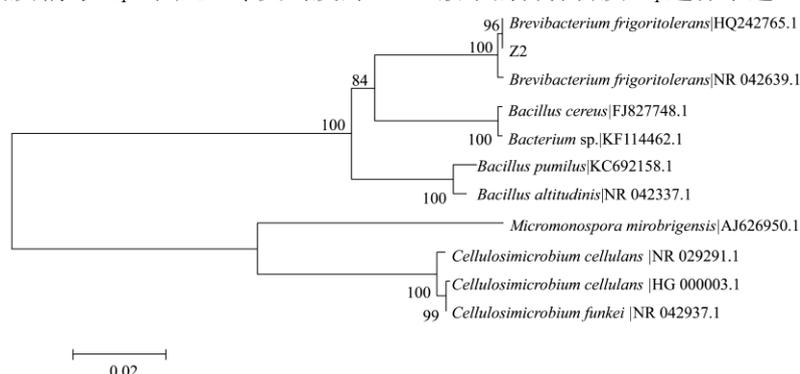


图 4 花椒内生菌系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree

注: “|”后面是 GenBank 登录号。

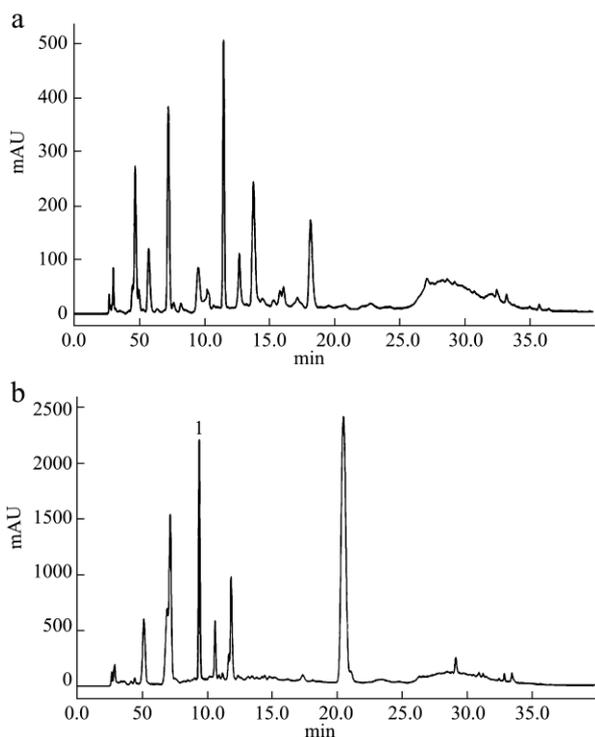


图 5 空白对照与内生菌 Z2 的发酵液 HPLC 图谱

Fig.5 HPLC of the control and experimental broth

注: a. 空白对照; b. 发酵液。

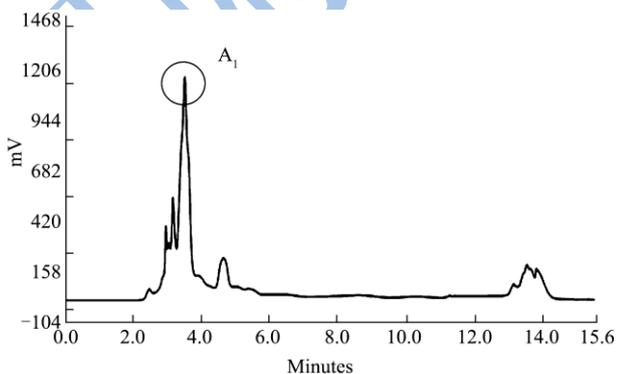


图 6 组分 F<sub>3</sub> 的 semipre-HPLC 图谱

Fig.6 Semipreparative HPLC of fraction F<sub>3</sub>

将内生菌 Z2 的发酵液离心后取上清液真空冷冻干燥, 得固体物质 3.13 g; 通过 Sephadex LH-20 层析柱分离得到 5 个不同的组分 F<sub>1</sub>~F<sub>5</sub>, 利用高效液相色谱分析, 将各组分对应的色谱图与发酵液色谱图进行对比, 发现物质 A<sub>1</sub> 存在于组分 F<sub>3</sub> 中; 用制备型液相色谱仪将组分 F<sub>3</sub> 纯化, 进样后收集物质 A<sub>1</sub> 所在峰, 即如图 6 所示保留时间为 3.80 min 的色谱峰, 冷冻干燥后得 1.94 mg 物质 A<sub>1</sub> (纯度为 98.42%)。

## 2.4 物质 A<sub>1</sub> 的结构解析

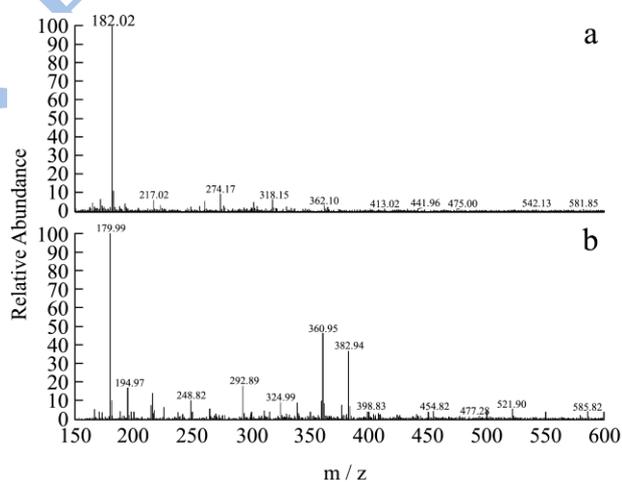


图 7 目标物质的 ESI-MS 图谱

Fig.7 ESI-MS spectra of the target substance

注: a. 正离子; b. 负离子。

通过对分离纯化所得物质 A<sub>1</sub> 进行电喷雾电离质谱及核磁共振分析, 得到其 ESI-MS 谱图及 <sup>1</sup>H-NMR 谱图。ESI-MS 的结果如图 7 所示, 其结果分析如下: 正离子电荷质谱 m/z 182[M+H]<sup>+</sup>, 负离子质谱 m/z 180[M-H]<sup>-</sup>, 由此可以推断物质 A<sub>1</sub> 的分子量为 m/z 181; <sup>1</sup>H-NMR 的结果如图 8 所示, 其结果分析如下: <sup>1</sup>H-NMR d (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O=1:4): 2.96 (1H,



- [5] MIN Bo-kyung, HYUN Dong-geol, JEONG Su-yang, et al. A new cytotoxic coumarin, 7-[(E)-3', 7'-Dimethyl-6'-oxo-2', 7'-octadienyloxy] Coumarin from the Leaves of *Zanthoxylum schinifolium* [J]. Archives of Pharmacal Research, 2011, 34(5): 723-726
- [6] LI Wei, SUN Ya-nan, YAN Xi-tao, et al. Coumarins and lignans from *zanthoxylum schinifolium* and their anticancer activities [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(45): 10730-10740
- [7] 刘勋,宋正富,胡敏,等.多孔淀粉制备微胶囊化粉末花椒精油的研究[J].现代食品科技,2009,25(4):408-410  
LIU Xun, SONG Zheng-fu, HU Min, et al. Preparation of microcapsulated zanthoxylum oil powder with porous starch [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(4): 408-410
- [8] 李海燕,刘丽.产生物活性物质植物内生菌的研究进展[J].天然产物研究与开发,2004,16(5):482-485  
LI Hai-yan, LIU Li. Recent advances on bioactive compounds producing endophytes [J]. Natural Product Research and Development, 2004, 16(5): 482-485
- [9] Stierle Andrea, Strobel Gary, Stierle donald. taxol and taxane production by *taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216
- [10] Chen Liang, Luo Sheng-lian, Xiao Xiao, et al. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) Isolated from *Solanum nigrum* L. for Phytoextraction of Cd-polluted Soils [J]. Applied Soil Ecology, 2010, 46(3): 383-389
- [11] R E 布坎南, N E 吉本斯, 等.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984  
R E Buchanan, N E Gibbons, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1984
- [12] 邹家兴,李国基,耿予欢.腐乳发酵过程中细菌种群变化的鉴定与分析[J].现代食品科技,2008,24(5):424-438  
ZOU Jia-xing, LI Guo-ji, GENG Yu-huan. et al. Analysis and identification of bacteria population in sufu fermentation [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(5): 424-438
- [13] Julie D Thompson, Toby J Gibson, Frederic Plewniak, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [14] Kumar Sudhir, Tamura Koichiro, Nei Masatoshi. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163