

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2022.01.005

鲜天麻内生菌分离鉴定及功能活性探究

Isolation and identification of endophytic bacteria from fresh *Gastrodia elata* and preliminary study on its functional activity

孙海燕^{1,2,3,4,5} 刘笑¹ 裴金金¹ 郝丹青¹ 王二楠¹

SUN Hai-yan^{1,2,3,4,5} LIU Xiao¹ PEI Jin-jin¹ HAO Dan-qing¹ WANG Er-nan¹

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000; 3. 国家农产品保鲜工程技术研究中心秦巴地区保鲜工作站, 陕西 汉中 723000; 4. 陕南秦巴山区生物资源综合开发协同创新中心, 陕西 汉中 723000; 5. 陕西理工大学秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室[培育], 陕西 汉中 723000)

(1. *Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000, China*; 2. *Shaanxi University of Technology, Shaanxi Key Laboratory of Resource Biology, Hanzhong, Shaanxi 723000, China*; 3. *National Engineering Research Center for Preservation of Agricultural Products in Qinba Area Preservation Workstation, Hanzhong, Shaanxi 723000, China*; 4. *Qinling-Bashan Mountains Bioresources Comprehensive Development C. I. C., Hanzhong, Shaanxi 723000, China*; 5. *Qinba State Key Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment, Hanzhong, Shaanxi 723000, China*)

摘要:目的:明确天麻内生菌及其代谢产物的活性。方法:采用组织匀浆法和划线法从秦巴地区鲜天麻中分离纯化内生菌,测定其抗菌、抗氧化及抗肿瘤活性,并对高活性菌株进行分子生物学鉴定。结果:从鲜天麻内部分离得到 4 株菌,其中内生菌 B1、B2 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有良好的抗菌活性,内生菌 B2 对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径达 26.33 mm。4 株菌均有一定的抗氧化活性,其中,内生菌 B1 对 DPPH 自由基的清除能力为 69.13%。内生菌 B2、B3、B4 对 HEK293T 细胞有一定的抑制作用,其中内生菌 B2 的最高抑制率可达 40.40%。分子生物学方法鉴定结果表明,内生菌 B1、B2 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),内生菌 B3 为 *Lelliottia* sp.,内生菌 B4 为水生拉恩菌(*Rahnella aquatilis*)。结论:分离纯化的鲜天麻内生菌具有抗菌和抗氧化活性。**关键词:**天麻;内生菌;抗菌活性;抗氧化活性;细胞活性

Abstract: Objective: This study aimed to elucidate the activities of endophytic bacteria and their metabolites of *Gastrodia elata* BI, and to provide theoretical reference for the development of new natural food antibacterial agents and antioxidants. **Methods:** The endophyte of fresh *G. elata* in Qinba area was isolated and purified by tissue homogenization and streaking method. The antibacterial, antioxidant and anti-tumor activities of the extract were determined. Furthermore, molecular biology identification was applied for the highly active strains. **Results:** In this study, four strains were isolated from the inside of fresh *G. elata*, among which, endophytic bacteria B1 and B2 have good antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The inhibition zone diameter of endophytic bacteria B2 against *S. aureus* was 26.33 mm. The four strains all have good antioxidant activities, among which, the percentage of scavenging DPPH scavenges for endophytic bacteria B2 was as high as 69.13%. Endophytic bacteria strain B2, endophytic bacteria B3, and endophytic bacteria B4 have a potential inhibitory effect on HEK293T cells. Among them, endophytic bacteria B2 showed the highest inhibition rate which was 40.40%. The results of molecular biological identification showed that the endophytic bacteria strain B1 and B2 all belonged to *Bacillus velezensis*, while, endophytic bacteria B3 was *Lelliottia* sp., and endophytic bacteria B4 was *Rahnella aquatilis*. **Conclusion:** The endophyte of fresh *G. elata* in Qinba area was isolated and purified had antibacterial activity and antioxidant activity.

基金项目:陕西省教育厅项目(编号:20JS027);陕西省 2011 协同中心项目(编号:QBXT-18-5);陕西省资源生物重点实验室后补助项目(编号:2018SZS-27-04);陕西省资源生物重点实验室开放课题(编号:SLGPT2019KF03-05);陕西理工大学人才启动项目(编号:SLGRCQD2029);国家自然科学基金项目(编号:3180101528)

作者简介:孙海燕(1979—),女,陕西理工大学副教授,博士。
E-mail:diyson2008@163.com

收稿日期:2021-05-11

Keywords: *Gastrodia elata*; endophyte; antibacterial activity; antioxidant activity; antitumor activity

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)为兰科植物的干燥块茎,又名合离草等,是中国名贵的药用植物之一。其含有香草醇、天麻素等化学成分,具有抗惊厥、抗晕眩、降血压、改善记忆和延缓衰老等功效^[1]。2020年1月2日,国家卫健委将天麻、党参等9种物质列入药食同源物质生产经营试点中。莫莉等^[2]研究发现,天麻块茎中分离出的内生菌最多,其次为花茎和茎,种子中最少。熊城^[3]研究发现,荣经天麻中分离出的15株内生真菌均具有良好的抗氧化活性。余丽等^[4]在昭通小草坝天麻中分离出10株内生真菌,但未对该菌株进行鉴定和后续活性研究。

文章拟以秦巴地区红杆鲜天麻为试材,对其内生真菌进行分离纯化和鉴定,同时对其发酵液的抗菌、抗氧化和细胞活性等特性进行系统研究,旨在为天麻内生菌及其代谢产物活性研究奠定基础,为食品天然抑菌剂、抗氧化剂的研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红杆鲜天麻:种植海拔为800~1400 m,土壤pH值5.5~7.1,采于陕西省汉中市略阳县。

1.2 试剂及仪器

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):东京化成工业株式会社;

胰酶(0.25%)、噻唑兰(5 mg/mL, MTT)、二甲基亚砷(DMSO):美国Sigma公司;

改良Eagle培养基(DMEM):含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素,美国Gibco公司;

大肠杆菌、金黄色葡萄球菌:陕西省资源生物重点实验室食品发酵工程实验室;

人胚胎肾HEK293T细胞、人肺腺癌A549细胞:中国科学院典型培养物保藏中心;

恒温培养振荡器:ZWY-211B型,上海智城分析仪器制造有限公司;

超净工作台:SW-CJ-ZD型,苏州净化设备有限公司;

离心机:Avantij-E型,美国贝克曼库尔特有限公司;

生化培养箱:SPX-250B-Z型,上海博迅实业有限公司;

电热恒温鼓风干燥箱:DHG-9140A型,上海精宏试验设备有限公司;

酶标仪:SpectraMax 190型,美国Molecular Devices公司。

1.3 天麻内生菌分离纯化

参照郑旭^[5]的方法略修改:选取200 g左右、形态良

好和无病虫害的一级鲜天麻,用自来水冲洗干净,25 kHz超声波清洗5 min,用滤纸拭干表面水分。无菌环境下,用75%乙醇浸泡1 min,无菌水冲洗2次,4%次氯酸钠溶液浸泡3 min,无菌水冲洗5次。削去天麻组织表皮,切碎,加入少量石英砂和生理盐水研磨至天麻的内生菌与其组织分散。浆液移至LB液体培养基中,(30±1)℃培养3 d,采用梯度稀释法,取50 μL于LB固体培养基中涂布,每次处理重复3次。待菌落在培养基表面生长后,分别挑取各个菌落至固体培养基上反复划线纯化,直至获得菌落形态一致的单一菌落。显微镜下观察菌体形态结构一致后,即初步认定为纯化菌株,编号保藏。

1.4 抗菌活性测定

参照田双娥^[6]的方法略修改:取出纯化菌株,(30±1)℃活化24 h后接种至新的培养液中,(30±1)℃继续培养3 d,4℃下、10 000 r/min离心10 min,取上清液,0.22 μm无菌滤膜器过滤。使用直接观察测量法,将发酵液稀释,用血球计数板计数,调整发酵液浓度约为10⁵个/mL,备用。

选取金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为供试细菌。分别取上述供试细菌菌悬液0.2 mL于灭菌平板中,均匀涂布,另将直径为6 mm的无菌滤纸片浸入内生菌发酵液中浸泡10 min,通风晾干,贴于含供试细菌的平板中,(30±1)℃培养24 h,观察滤纸片周围的抑菌圈大小。

1.5 抗氧化活性测定

取出纯化菌株,(30±1)℃活化24 h后接种至新的培养液中,(30±1)℃继续培养3 d,4℃下、10 000 r/min离心10 min,取上清液,0.22 μm无菌滤膜器过滤^[7]。使用直接观察测量法,将发酵液稀释,用血球计数板计数,调整发酵液浓度约为10⁵个/mL,4℃下保存备用。

1.5.1 DPPH自由基清除率 参照Sharma等^[8]的方法并略有改动。将40 μL待测样品与160 μL DPPH溶液混合液加入酶标板中设定为样品组;40 μL待测样品与160 μL无水乙醇混合液设定为背景组;40 μL超纯水与160 μL DPPH溶液混合液设定为空白组。避光静置30 min,测定517 nm处吸光度值,每个样品重复3次。按式(1)计算DPPH自由基清除率。

$$p = \left(1 - \frac{OD_{\text{样品组}} - OD_{\text{背景组}}}{OD_{\text{空白组}}}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

p ——DPPH自由基清除率, %;

$OD_{\text{样品组}}$ ——样品液与DPPH溶液反应后的吸光度值;

$OD_{\text{背景组}}$ ——样品液与无水乙醇反应后的吸光度值;

$OD_{\text{空白组}}$ ——水与DPPH混合溶液的吸光度值。

1.5.2 OH自由基清除率 采用试剂盒法进行测定^[9],按式(2)计算各发酵液的OH自由基清除率。

$$A = \frac{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{测定组}}}{OD_{\text{空白组}}} \times 100\% , \quad (2)$$

式中:

A——OH 自由基清除率, %;

OD_{测定组}——样品与反应液反应后的吸光度值;

OD_{对照组}——标准品与反应液反应后的吸光度值;

OD_{空白组}——样品空白的吸光度值。

1.5.3 总抗氧化能力 采用试剂盒法进行测定^[9-10],按式(3)计算各发酵液的总抗氧化能力。

$$N = \frac{OD_{\text{测定组}} - OD_{\text{对照组}}}{0.01} \div 30 \times \frac{V}{v} \times n , \quad (3)$$

式中:

N——总抗氧化能力;

OD_{测定组}——样品与反应液反应后的吸光度值;

OD_{对照组}——标准品与反应液反应后的吸光度值;

OD_{空白组}——样品空白的吸光度值;

V——反应液总体积;

v——取样量;

n——稀释倍数, 1 000;

1.6 抑制两种细胞生长活性测定

参照赵满仓等^[11]的方法略有修改:采用 MTT 法测定天麻内生菌发酵液的细胞活性。以人胚肾 HEK293T 细胞和人腺癌肺 A549 细胞为测试细胞株,取对数生长期的供试菌细胞,调整细胞悬液浓度为 5×10^4 个/mL。向 96 孔培养板中每孔加入 100 μ L 供试菌细胞悬液,于 5% CO₂下,30 $^{\circ}$ C 培养 24 h。吸弃孔中上清液,加入 200 μ L 新鲜完全培养基后,将内生菌发酵液分别加入到对应试验孔中,加入体积分别为 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0 μ L。阴性对照组更换为 10% FBS DMEM 培养基。每个处理重复 5 次,于细胞培养箱培养 24, 48 h 后取出,吸净孔中培

养基,每孔加入 90 μ L DMEM 培养基和 10 μ L MTT,于细胞培养箱中孵育 4 h。测定 570 nm 处吸光度值。并按式(4)计算各孔细胞生长抑制率。

$$M = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100\% , \quad (4)$$

式中:

M——细胞生长抑制率;

M₀——标准品与反应液反应后吸光度值的平均值;

M₁——样品与反应液反应后吸光度值的平均值。

1.7 活性菌株的分子生物学鉴定

使用试剂盒法对分离出的细菌进行基因组 DNA 提取^[12-13]。使用细菌通用引物进行 PCR 扩增,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳扩增产物,切割所需 DNA 目的条带。此过程委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。将测序得到的结果用 Gen Bank 进行 BLAST 分析。

1.8 数据处理

采用 Excel 2016、Graphpad 5.0 软件进行数据统计分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 天麻内生菌的分离纯化

从鲜天麻中共分离出了 4 株内生细菌,编号为 B1~B4,其菌落特征如图 1 和表 1 所示。

2.2 天麻内生菌发酵液的抗菌活性

由表 2 可知,4 株内生菌发酵液在供试菌大肠杆菌和金黄色葡萄球菌培养基中均出现了抑菌圈,其对 2 种供试菌均有一定的抑制能力。其中内生菌 B2 对两种指标菌的抑菌能力最好,两种指标菌的抑菌圈直径分别为 14.33, 26.33 mm;内生菌 B1 对大肠杆菌的抑菌能力较好,抑菌圈直径为 13.33 mm。内生菌 B1、B2 与内生菌

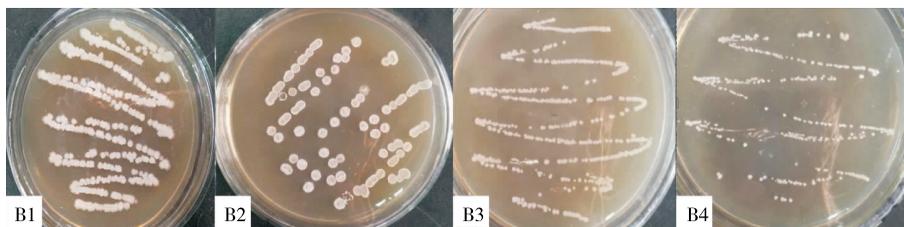


图 1 鲜天麻内生菌菌落形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of endophytic bacteria in fresh *Gastrodia elata*

表 1 鲜天麻内生菌菌落特征

Table 1 Colony characteristics of endophytic bacteria in fresh *Gastrodia elata*

菌株编号	颜色	隆起度	表面	形状	边缘形状	质地	透明度
B1	乳白色	扁平	不光滑	不规则	波状	干燥	不透明
B2	乳白色	扁平	不光滑、有褶皱	不规则	整齐	黏稠	不透明
B3	透明	隆起	光滑	圆形,规则	整齐	湿润	透明
B4	透明	隆起	光滑	圆形,规则	整齐	湿润	透明

B3、B4 对大肠杆菌的抑菌活性之间差异显著 ($P < 0.05$), 4 株内生菌对金黄色葡萄球菌的抑菌活性之间差异显著 ($P < 0.05$)。研究^[14-16]发现, 贵州野生天麻抗菌成分提取物和天麻蛋白对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌能力, 其中对大肠杆菌的抑菌效果最好, 与试验结果一致。此外, 天麻多糖 GeB40 和 GeB80 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有强的抑制能力^[17]。

2.3 天麻内生菌发酵液的抗氧化活性

由图 2 可知, 内生菌 B1 对 DPPH 自由基的清除能力最强为 69.13%, 其次为内生菌 B4 和内生菌 B2。4 株天麻内生菌对 OH 自由基清除率均较低, 其中清除率最高的内生菌 B4 的清除率为 17.88%。内生菌 B2 的总抗氧化能力最强为 19.26 U/mL, 其次为内生菌 B4 和内生菌 B1 的。内生菌 B4 的总抗氧化能力与内生菌 B2、B3 之间差异显著 ($P < 0.05$)。

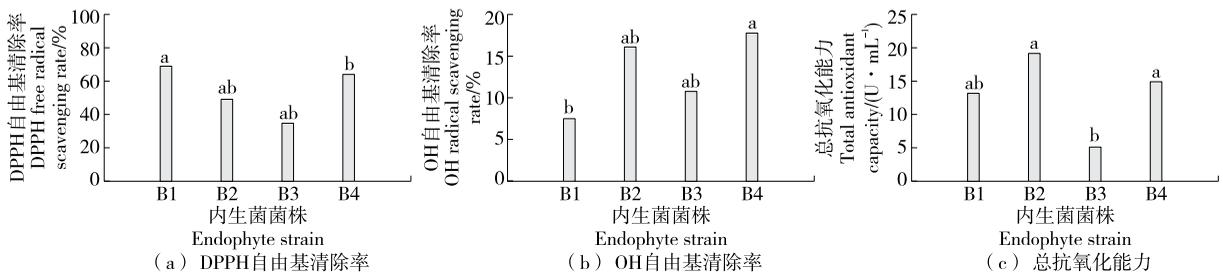
综上, 4 株菌对两株供试菌均有不同程度的抑制能力,

表 2 天麻内生菌发酵液的抗菌活性[†]

Table 2 Antibacterial activity of endophytic *Gastrodia elata* fermentation broth

菌株编号	大肠杆菌/mm	金黄色葡萄球菌/mm
B1	13.33 ± 1.83 ^a	5.33 ± 0.21 ^b
B2	14.33 ± 0.22 ^a	26.33 ± 0.89 ^a
B3	5.33 ± 0.22 ^b	5.00 ± 0.00 ^b
B4	4.67 ± 0.22 ^b	3.67 ± 0.20 ^c

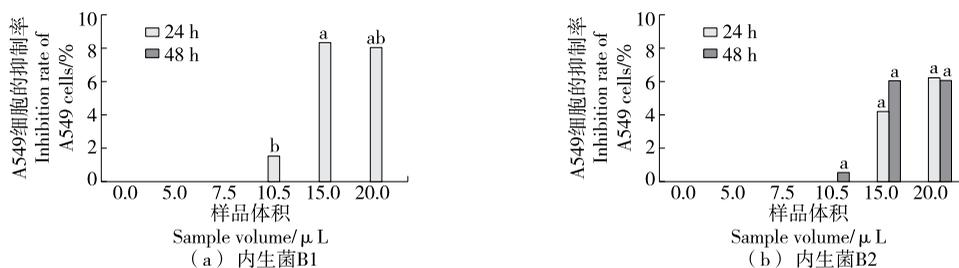
[†] 字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 天麻内生菌发酵液的抗氧化活性

Figure 2 Antioxidant activity of *Gastrodia elata* endophyte fermentation broth



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 天麻内生菌发酵液对 A549 细胞的抑制率

Figure 3 Inhibition rate of *Gastrodia elata* endophyte fermentation broth on A549 cells

与陈琛等^[18-19]的研究结果基本一致。内生菌 B1、B2 和 B4 均具有良好的抗氧化活性, 其代谢产物中的活性物质是否与总黄酮、总酚含量高度呈正相关还需进一步研究。

2.4 天麻内生菌发酵液抑制两种细胞生长活性

2.4.1 对 A549 细胞的生长抑制作用 由图 3 可知, 样品处理 48 h 时, 内生菌 B1 随着样品体积的增加, 抑制能力不断增强, 当样品体积为 15 μ L 时, 内生菌 B1 的能力最强为 8.34%。样品处理 24, 48 h 时, 内生菌 B2 均有一定的抑制能力, 抑制率最高为 6.27%。

2.4.2 对 HEK293T 细胞的生长抑制作用 由图 4 可知, 样品处理 24, 48 h 时, 内生菌 B2、B3 和 B4 对人胚肾 HEK293T 细胞均有抑制能力且随样品体积的增加而增强。样品处理 24 h 时, 其对人胚肾 HEK293T 细胞抑制能力依次为 B3 > B4 > B2; 样品处理 48 h 时, 其对人胚肾 HEK293T 细胞抑制能力依次为 B2 > B4 > B3。其中内生菌 B2 在样品体积为 20 μ L, 处理 24 h 时, 抑制能力最佳为 40.40%。不同样品体积的内生菌 B4 对 HEK293T 细胞的抑制率差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 活性菌株的分子生物学鉴定

采用 16S rDNA 法对 4 株天麻内生菌进行分子生物学鉴定提取, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 内生菌 B1、B3 和 B4 在 700~800 bp 附近出现较强的条带, 内生菌 B2 在 1 000~1 200 bp 附近出现较强的条带, 条带清晰, 可用于测序使用。

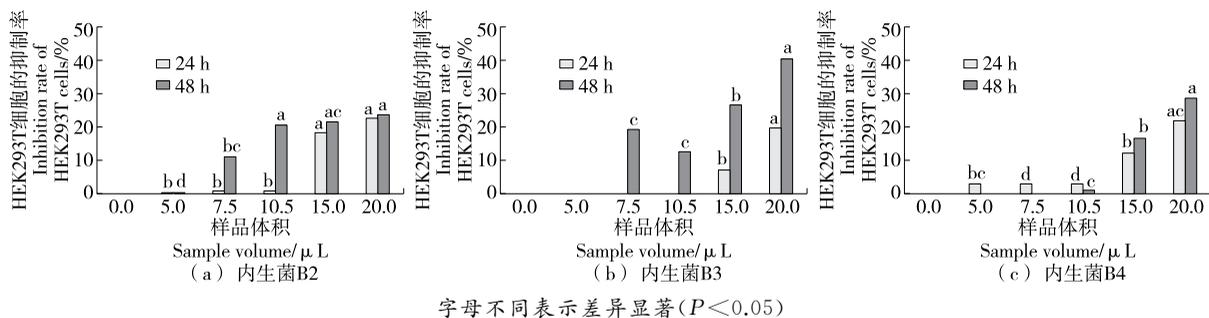


Figure 4 Inhibition rate of *Gastrodia elata* endophyte fermentation broth on HEK293T cells

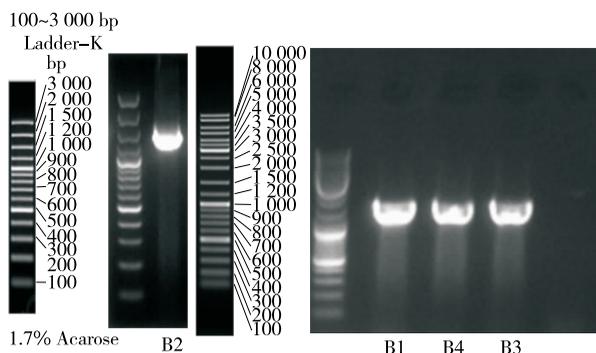


Figure 5 Electrophoresis of 16S rDNA PCR amplified products from 16S rDNA of endophytic *Gastrodia elata*

表 3 天麻内生菌同源性比较

Table 3 Comparison results of homology of *Gastrodia* endophytes

菌株	序列对比	覆盖度/%	相似性/%	登录号
B1	<i>Bacillus velezensis</i>	100	100.00	CP033576.1
B2	<i>Bacillus velezensis</i>	100	99.73	MK641661.1
B3	<i>Lelliottia</i> sp.	100	99.00	CP028520.1
B4	<i>Rahnella aquatilis</i>	100	99.00	CP034483.1

由表 3 可知,内生菌 B1、B2 属贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*),内生菌 B3 属 *Lelliottia* sp.,内生菌 B4 属水生拉恩菌 (*Rahnella aquatilis*)。目前,已有学者^[2-4]从陕西、云南、四川和贵州天麻中分离出内生真菌,其中在百宜、汉中、荣经和昭通小草坝天麻中分别分离出 16, 9, 15, 10 株内生真菌。

3 结论

从秦巴地区天麻中分离得到 4 株内生菌,经形态学观察、16S rDNA 序列同源性分析,内生菌 B1 和 B2 被鉴定为贝莱斯芽孢杆菌,内生菌 B3 被鉴定属 *Lelliottia* sp.,内生菌 B4 被鉴定为水生拉恩菌。抗菌试验表明,4 株菌

对两株供试菌均具有不同程度的抑制能力,其中内生菌 B2 对两种供试菌都有强的抑制能力,内生菌 B1 对大肠杆菌有较强的抑制能力。抗氧化试验表明,4 株菌均具有良好的抗氧化活性。细胞活性试验表明,内生菌 B2、B3、B4 对人胚胎肾 HEK293T 细胞有不同程度的抑制能力,其中内生菌 B2 的抑制率最高。综上,内生菌 B2 在各方面都表现出了良好的活性。后续可探讨分离菌株的活性物质成分及作用机理。

参考文献

[1] 许廷生, 陆龙存, 黄子冬. 天麻有效成分的药理作用分析与临床应用研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(21): 133-135.
 XU Ting-sheng, LU Long-cun, HUANG Zi-dong. Progress in pharmacological action analysis and clinical application of active components of *Gastrodia elata*[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2020, 12(21): 33-135.

[2] 莫莉, 康冀川, 何劲, 等. 天麻内生真菌菌群组成的初步研究[J]. 菌物研究, 2008, 6(4): 211-215.
 MO Li, KANG Ji-chuan, HE Jin, et al. A preliminary study on composition of endophytic fungi from *Gastrodia elata* [J]. Journal of Fungal Research, 2008, 6(4): 211-215.

[3] 熊城. 荣经天麻内生真菌的分离与鉴定[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017: 16.
 XIONG Cheng. Separation and identification of endophytic fungi from Yingjing *Gastrodia elata*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017: 16.

[4] 余丽, 李龙杰. 昭通小草坝天麻内生真菌的分离初探[J]. 保山学院学报, 2019, 38(2): 23-26.
 YU Li, LI Long-jie. Isolation of endophytic fungi from *Gastrodia elata* in Zhaotong Xiaocaoba [J]. Journal of Baoshan University, 2019, 38(2): 23-26.

[5] 郑旭. 马铃薯内生菌的分离鉴定及抑龙葵碱功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019: 11.
 XU Zheng. Isolation and identification of endophytes from potato tubers and inhibition on solanine functions[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019: 11.

- [6] 田双娥. 三种不同抑菌圈试验法在牛至油抑菌评价中的应用研究[J]. 香料香精化妆品, 2019(1): 37-41.
TIAN Shuang-e. Study on three kinds of inhibition zone tests applied in evaluation of antifungal activity of oregano oil [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2019(1): 37-41.
- [7] 卢占慧, 周如军, 袁月, 等. 人参内生拮抗细菌分离、鉴定及其对人参菌核病抑菌作用研究[J]. 中国植保导刊, 2016(3): 6-9.
LU Zhan-hui, ZHOU Ru-jun, YUAN Yue, et al. Isolation and identification of endophytic bacteria from Ginseng and its inhibition activity against *Sclerotinia ginseng* [J]. China Plant Protection, 2016(3): 6-9.
- [8] SHARMA O P, BHAT T K. DPPH antioxidant assay revisited[J]. Food Chemistry, 2009, 113(4): 1 202-1 205.
- [9] 杜晓宁, 代金霞. 宁夏枸杞内生菌抗氧化活性菌株的筛选与鉴定[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 3 941-3 944.
DU Xiao-ning, DAI Jin-xia. Screening and identification of antioxidant endophytes from *Lycium barbarum* of Ningxia [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(20): 3 941-3 944.
- [10] 陈子涵, 刘金娟. 六种食用菌体外抗氧化及抗细胞增殖活性研究[J]. 生物技术通报, 2019, 35(11): 104-108.
CHEN Zi-han, LIU Jin-juan. In vitro antioxidative and anti-proliferative activities of extractions from six common edible mushrooms[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(11): 104-108.
- [11] 赵满仓, 魏文青, 刘晶, 等. MTT法抗肿瘤药敏试验影响因素的探讨[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(4): 306-308.
ZHAO Man, WEI Wen-qing, LIU Jing, et al. Study on the influencing factors of the MTT based tumor chemosensitivity assay in vitro[J]. Chinese Clinical Oncology Apr, 2009, 14(4): 306-308.
- [12] 肖妍, 刘芸宏, 高贵田, 等. PMA-qPCR方法检测陕西猕猴桃溃疡菌优势病原菌活菌的研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(4): 48-53, 59.
XIAO Yan, LIU Yun-hong, GAO Gui-tian, et al. PMA-qPCR for detecting live bacteria of Shaanxi kiwifruit cancer dominant pathogen[J]. Food & Machinery, 2019, 35(4): 48-53, 59.
- [13] SHAH S, SHRESTHA R, MAHARJAN S, et al. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic fungi from the roots of *dendrobium moniliforme*[J]. Plants, 2018, 8(1): 5.
- [14] 安传伟, 石广娅, 安传相, 等. 贵州野生天麻抗菌提取物外抑菌动力学研究[J]. 中医学报, 2013, 28(11): 1 695-1 697.
AN Chuan-wei, SHI Guang-ya, AN Chuan-xiang, et al. Antibacterial kinetic study on antibacterial composition of Guizhou wild *Gastrodia elata blume* in vitro [J]. Journal of Chinese Medicine, 2013, 28(11): 1 695-1 697.
- [15] 陈伊铃. 黄芩及天麻有效成分提取工艺优化和抗菌活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017: 15.
CHEN Yi-ling. Study on extraction process optimization and antibacterial activity of *scutellaria baicalensis* Georgi and *Gastrodia* [D]. Changchun: Jilin University, 2017: 15.
- [16] 王雪, 逯家辉, 王雪, 等. 天麻蛋白提取工艺优化及抑菌活性研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(4): 176-182.
WANG Xue, LU Jia-hui, WANG Xue, et al. Optimization of the extraction of *Gastrodia elata* protein and its antibacterial [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(4): 176-182.
- [17] 张梦娟. 天麻多糖的提取、纯化及活性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2007: 23.
ZHANG Meng-juan. Study on extraction, purification and activity of polysaccharide in *Gastrodia elata blume* [D]. Xianyang Northwest A & F University, 2007: 23.
- [18] 陈琛, 胡红忠, 李鑫鑫, 等. 天麻多糖的分离纯化与抗氧化活性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(18): 2 203-2 206.
CHEN Chen, HU Hong-zhong, LI Xin-xin, et al. Extraction, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Gastrodia elata blume* [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2018, 34(18): 2 203-2 206.
- [19] 张格超. 天麻多糖分离纯化及其抗氧化活性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015: 31.
ZHANG Ge-chao. Study on separation and purification and antioxidant activity of polysaccharides of *Gastrodia elata* [D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2015: 31.
- [22] JOSE DEL Pulgar, MAR Roldan, JORGE Ruiz-Carrascal. Volatile compound sprofile of sous-vide cooked pork cheeks as affected by cooking conditions (vacuum packaging, temperature and time)[J]. Molecules, 2013, 18(10): 125-138.
- [23] 刘光宪, 李雪, 王丽, 等. 江西地方品牌酱鸭游离脂肪酸和风味特性分析[J]. 食品与机械, 2021, 37(1): 53-60.
LIU Guang-xian, LI Xue, WANG Li, et al. Analysis of free fatty acids and flavor characteristics of sauced duck from Jiangxi local brands[J]. Food & Machinery, 2021, 37(1): 53-60.
- [24] LI Ning, ZHENG Fu-ping, CHEN Hai-tao, et al. Identification of volatile components in Chinese Sinkiang fermented camel milk using SAFE, SDE, and HS-SPME-GC/MS [J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 1 242-1 252.
- [25] 孙福犁, 徐慢, 崔和平, 等. 谷胱胺肽美拉德反应中间体的制备及风味形成能力研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 1-7.
SUN Fu-li, XU Man, CUI He-ping, et al. Preparation of Maillard reaction intermediates (MRIs) of gluten peptides-xylose and study on its flavor formation capacity [J]. Food & Machinery, 2019, 35(3): 1-7.
- [26] WOOD J D, RICHARDSON R I, NUTE G R, et al. Effects of fatty acids on meat quality: A review[J]. Meat Science, 2003, 66: 21-32.

(上接第 23 页)