



## 一个产香大型真菌鉴定及其挥发性成分分析

刘安琪<sup>1#</sup>, 张伟<sup>2#</sup>, 王明锋<sup>2</sup>, 廖头根<sup>2</sup>, 贺茂强<sup>1,3</sup>, 任晋玮<sup>1\*</sup>, 赵瑞琳<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

<sup>2</sup>云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南 昆明 650202

<sup>3</sup>清迈大学农业学院昆虫学与植物病理学系, 泰国 清迈 50200

**摘要:**【目的】开发优质的产香大型真菌资源, 丰富挥发性香味成分的获取途径。【方法】本文通过传统形态分类学和分子生物学相结合的方法对采自泰国北部的野生产香大型真菌及其菌株进行鉴定。利用液体发酵、HP20 大孔树脂固相萃取和气相色谱-质谱联用(GC-MS)等方法分析发酵液中的挥发性物质。同时筛选了对该真菌液体培养的最佳碳源、氮源及无机盐离子条件。【结果】该真菌经鉴定为茉莉小皮伞 *Marasmius jasminodorus*, 分析发现其主要香味组分及对应的峰面积百分比分别为芳樟醇(33.11%)、5-羟甲基糠醛(4.64%)、4-甲基-5-(β-羟乙基)噻唑(4.55%)、甲基麦芽酚(4.49%)、糠醇(4.46%)、桃醛(2.20%)、羟基丙酮(2.18%)等。同时该菌的最优培养液配方中最佳碳源、氮源及无机盐离子为麦芽糖、酵母粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。【结论】本研究表明该大型真菌能够产生多种在现有工业生产中广泛应用的挥发性香味成分, 如芳樟醇等, 所以其在天然香精香料生产中具有较好的潜在应用前景。

**关键词:** 产香真菌, 小皮伞属, 鉴定, GC-MS

香味能够愉悦身心、舒缓压力、改善情绪, 对这类物质的应用已经渗入生活的各个方面, 例如食品<sup>[1]</sup>、酿酒业<sup>[2]</sup>、化妆品<sup>[3]</sup>、医药等<sup>[4-5]</sup>。目前, 香味成分的来源主要有以下几个方面: 一是从芳香植物或动物麝中直接提取的天然挥发性香味成分<sup>[6]</sup>; 二是利用化学合成的方法得到高纯度的香味

物质; 三是从具有产香功能的微生物<sup>[7-9]</sup>中直接获取香味成分; 四是以生物转化<sup>[10]</sup>的方法间接获得。几种方法相较, 芳香植物和动物麝香来源的香料品质高, 但原料有限, 成本高产量低, 不能满足巨大的市场需求; 化学合成路径的产品合成周期短, 但操作复杂, 副产物多<sup>[11]</sup>; 产香微生物利用

基金项目: 云南中烟工业有限责任公司科技重大专项项目(2017CP01)

#共同第一作者

\*通信作者。E-mail: 赵瑞琳, zhaorl@im.ac.cn; 任晋玮, renjw@im.ac.cn

收稿日期: 2019-09-02; 修回日期: 2019-10-09; 网络出版日期: 2019-11-04

天然原料合成大量天然香味物质属于绿色化学, 具有周期短、品质高、安全环保等众多优点<sup>[12]</sup>, 现已成为香精香料开发的研究热点。

近年来研究发现, 产香微生物以真菌为主, 例如周森等<sup>[13]</sup>筛选了优质的产香白地霉菌, 在发酵中产生的多种醇、醛、酯、芳香族化合物对白酒中风味物质形成具有重要作用。玉云等<sup>[14]</sup>从菠萝中分离得到产花草香的有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum*。陈利军等<sup>[15]</sup>分析蒙塔涅梨孢假壳的挥发性物质, 其中苯乙醇含量高达 98%, 具有生物生产苯乙醇的开发潜力。Bosse 等<sup>[16]</sup>使用 30 种担子菌通过苹果渣的生物转化在提取液中检测到 14 种风味化合物, 其中 3-苯基丙醛、3-苯基-1-丙醇和苯甲醇是最主要的产物。

本课题组近期从泰国北部采集到一株野生大型真菌, 其子实体具有浓郁茉莉香味, 并分离获得菌株 LE2016056。本研究对这份标本进行了形态学检测和分子系统发育分析, 并对其挥发性产物进行了 GC-MS 分析, 结果表明该菌株在香精香料生产中具有较好的潜在应用前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

从本课题组近几年在野外收集所得的 300 份菌株中, 通过平板培养, 人工筛选出多个具有特殊香味的菌株, 经扩大培养重新筛选菌株, 得到一株具有浓郁香味的标本(采集号: LE2016056)现保藏于中国科学院菌物标本馆(馆藏号: HMAS279932)。

### 1.2 菌株分离

野外采集得到子实体标本后, 在实验室采用单孢分离法获得菌株。在酒精灯火焰附近取菌盖

部分置于无菌的培养皿中, 菌褶朝下菌盖朝上。静置过夜后取出菌盖, 培养皿中获得担孢子。使用少量无菌水冲洗培养皿上的担孢子, 得到孢子悬液。通过配制不同的孢子悬液浓度梯度, 获得浓度适宜的被稀释后的孢子悬液, 并涂布到 PDA 培养基中, 25 °C 避光培养, 定时复检, 挑取孢子萌发后的菌丝至其他培养皿中, 纯化后即获得相关菌株。菌株现保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(菌株保藏编号为 CGMCC17072)。

### 1.3 标本及菌株鉴定

**1.3.1 形态学检测:** 子实体形态学检测采用 Largent<sup>[17-18]</sup>真菌分类学实验方法, 对子实体的菌盖、菌褶、菌肉、菌柄和菌环等特征进行观察记录, 颜色名称对照 Kornerup & Wanscher<sup>[19]</sup>的手册进行描述。微观形态特征使用 Olympus CX31 进行观察。

**1.3.2 分子系统发育分析:** 本实验中将野外采集标本(HMAS279932, 采集号为 LE2016056)及菌株(菌株保藏号 CGMCC17072)用志昂生物科技公司生产的快速植物 DNA 磁珠法提取试剂盒提取 DNA, 利用通用 ITS 引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3')进行 PCR 扩增。

PCR 反应体系 25  $\mu$ L: 1  $\mu$ L DNA 模板、1  $\mu$ L primer ITS1、1  $\mu$ L primer ITS4、12  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR MasterMix (200 mol/L dNTPs、4.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2.5 U Taq DNA 聚合酶)、10  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。扩增程序为 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 50 °C 50 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 8 min, PCR 扩增产物由北京博迈德测序公司进行测序。将得到的 ITS 序列与 GenBank 中的核酸序列先进行序列比对, 排除测

序的污染问题。然后从 GenBank 下载相关序列,并与这两个自测序列一起进行分子系统发育分析,序列使用 Muscle 比对分析后在 BioEdit v. 7.0.4 中手动调节少数歧义碱基位置<sup>[20-21]</sup>,用最大似然法 (ML) 构建系统进化树, RaxmLGUI 选用 GTRGAMMA 模型,运算 1000 次,在 FigTree v1.4.0 中打开系统进化树调节显示 BS (Bootstrap) 值大于 70 的支持率。

#### 1.4 菌株挥发性成分分析

**1.4.1 菌株扩大培养:** 准备 250 mL 锥形瓶配制 PDB 加富培养基(20 g 葡萄糖, 200 g 马铃薯浸汁, 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.01 g  $\text{V}_{\text{B1}}$ , 1000 mL 蒸馏水, pH 自然), 培养液约为 125 mL。在超净台中,用灭过菌的直径 0.5 mm 打孔器在原始平板中打孔,将长满菌丝的菌块接入新的培养液中,(每个培养瓶接 10 块菌块)。放入摇床,调节温度 25 °C, 转速 150 r/min 培养 10-12 d。

**1.4.2 挥发性成分提取方法:** 收集液体发酵后的菌液,以反相硅胶(ODS)为吸附材料进行固相萃取,对香味成分进行提取与富集;用无水乙醇对反相硅胶进行洗脱,得到含有香味成分的乙醇洗脱液。对菌株提取物的挥发性成分进行气质联用(GC-MS)分析,得到总离子流图(TIC);对主要的色谱峰提取质谱图,并通过岛津 GC-MS 自带的 NIST 11 数据库进行相似度检索,推测其化学成分。

**1.4.3 挥发性物质 GC-MS 分析条件:** 采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析,仪器为岛津公司 GCMS-QP 2010Ultra。GC 条件:色谱柱为 Rtx-Wax 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),起始柱温 35 °C,程序升温以 5 °C/min 至 230 °C,保持 15 min,柱流量为 1 mL/min,进样不分流。MS 条件:EI 离子源,离子源温度 230 °C,接口温度

230 °C,扫描范围 29-500 amu,溶剂延迟 4.5 min,采用面积归一化法进行定量分析。

#### 1.5 菌株产香最佳碳、氮源及无机离子筛选

**1.5.1 菌株产香最佳碳源筛选:** 以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉 4 种碳源为研究对象,每种以 20 g/L 的浓度加入 500 mL 无碳培养基(3 g 酵母粉, 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.01 g  $\text{V}_{\text{B1}}$ , 1000 mL 蒸馏水, pH 自然),使用 250 mL 摇瓶培养液 80 mL,接种量 5 mL,接种后在转速 140 r/min, 25 °C 条件下培养 7 d,过滤菌液,ODS 固相萃取提取挥发性成分用于 GC-MS 分析,统计峰面积百分比大于 0.01 的保留时间及化合物检索相似度得分大于 80 的成分,对比分析得出最优碳源。

**1.5.2 菌株产香最佳氮源筛选:** 以酵母粉、蛋白胨、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、蛋白胨+酵母粉这 4 种氮源组合为研究对象,每种以 3 g/L 的浓度加入 500 mL 无氮培养基(20 g 葡萄糖, 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.01 g  $\text{V}_{\text{B1}}$ , 1000 mL 蒸馏水, pH 自然),使用 250 mL 摇瓶培养液 80 mL,接种量 5 mL,在 25 °C 条件下培养 7 d,转速 140 r/min,过滤菌液提取挥发性成分进行 GC-MS 分析,统计峰面积百分比大于 0.01 的保留时间及化合物检索相似度得分大于 80 的成分,对比分析得出最优氮源。

**1.5.3 菌株产香最佳无机离子筛选:** 以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + $\text{MgSO}_4$  这 3 种无机离子组合为研究对象,每种以 3 g/L 的浓度加入 500 mL 无盐培养基(20 g 葡萄糖, 3 g 酵母粉, 0.01 g  $\text{V}_{\text{B1}}$ , 1000 mL 蒸馏水, pH 自然),使用 250 mL 摇瓶培养液 80 mL,接种量 5 mL,在 25 °C 条件下,转速 140 r/min 培养 7 d 后提取挥发性成分进行 GC-MS 分析,统计峰面积百分比大于 0.01 的保留时间及化合物检索相似度得分大于 80 的成分,对比分析

得出最优无机离子。

## 2 结果和分析

### 2.1 标本及菌株鉴定结果

**2.1.1 形态学检测结果:** 标本菌盖直径 10–40 mm, 钟形至扁平, 中部稍凸, 橙红色或红褐色, 中央颜色深且边缘色浅, 膜质, 表面光滑, 边缘有微皱条纹。菌肉极薄, 菌褶近白色至污白色, 离生, 稀疏, 长短不一。菌柄长 20–60 mm, 粗 1–2 mm, 中生, 细柱形, 暗褐色, 上部色浅基部棕色, 平滑坚韧, 中空。子实体具有强烈气味, 香甜芬芳, 如茉莉花香。担孢子(9–12)  $\mu\text{m} \times (3–4) \mu\text{m}$ , 椭圆形, 光滑无色。担子(23–25)  $\mu\text{m} \times (5–6) \mu\text{m}$ , 具有 4 个担子小梗。褶缘囊体形态多样, 基部圆柱形状, 端部着生多个不规则的短棒状附属物, 整体形似扫帚, (9–19)  $\mu\text{m} \times (6–10) \mu\text{m}$ , 无色至淡黄色。于腐叶层上单生或散生。

标本形态(图 1)与 Wannathes 等<sup>[22]</sup>描述的茉莉小皮伞 *Marasmius jasminodorus* Wannathes, Desjardin & Lumyong 形态相同。该种原产地泰国, 估计广泛分布于热带亚洲。目前标本保存于中国

科学院微生物研究所菌物标本馆, 采集号 LE2016056, 馆藏号 HMAS279932。

**2.1.2 标本及菌株的分子系统发育分析结果:** 将干标本及菌株的 ITS 序列经 BLAST 比对分析后, 结果表明为小皮伞属。根据文献查阅, 下载相关序列, 包括茉莉小皮伞 *Marasmius jasminodorus* 模式标本序列(GenBank: EU935512)共 45 条, 构建了小皮伞属的分析数据库。用最大似然法构建系统进化树(图 2), 子实体干标本(HMAS279932)及其菌株的 ITS 序列 GenBank (提交 GenBank 序列号分别为 MK656316, MK656317)与 *Marasmius jasminodorus* 模式标本序列聚在一起, 且具有 99% 的自展支持率。

### 2.2 挥发性物质 GC-MS 分析结果

对菌株 CGMCC17072 的乙醇溶液进行 GC-MS 分析(图 3), 从其挥发性成分中鉴定了 28 种已知化合物(表 1), 其中有 7 种主要产物, 均是合成香精香料产品的原料, 包括芳樟醇(33.11%)、5-羟甲基糠醛(4.64%)、4-甲基-5-( $\beta$  羟乙基)噻唑(4.55%)、甲基麦芽酚(4.49%)、糠醇(4.46%)、桃醛(2.20%)、羟基丙酮(2.18%)。

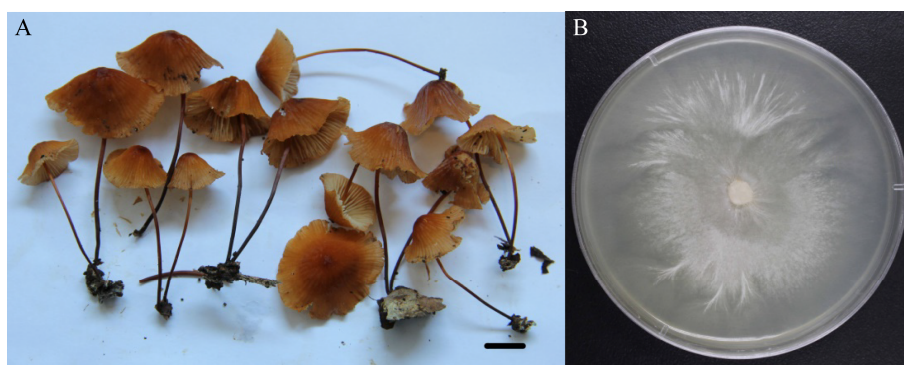


图 1. 茉莉小皮伞 *Marasmius jasminodorus* 形态特征

Figure 1. Morphology characteristics of *Marasmius jasminodorus*. A: Fruiting bodies, bar=1 cm; B: A colony on the enriched PDA plate for 12 days.

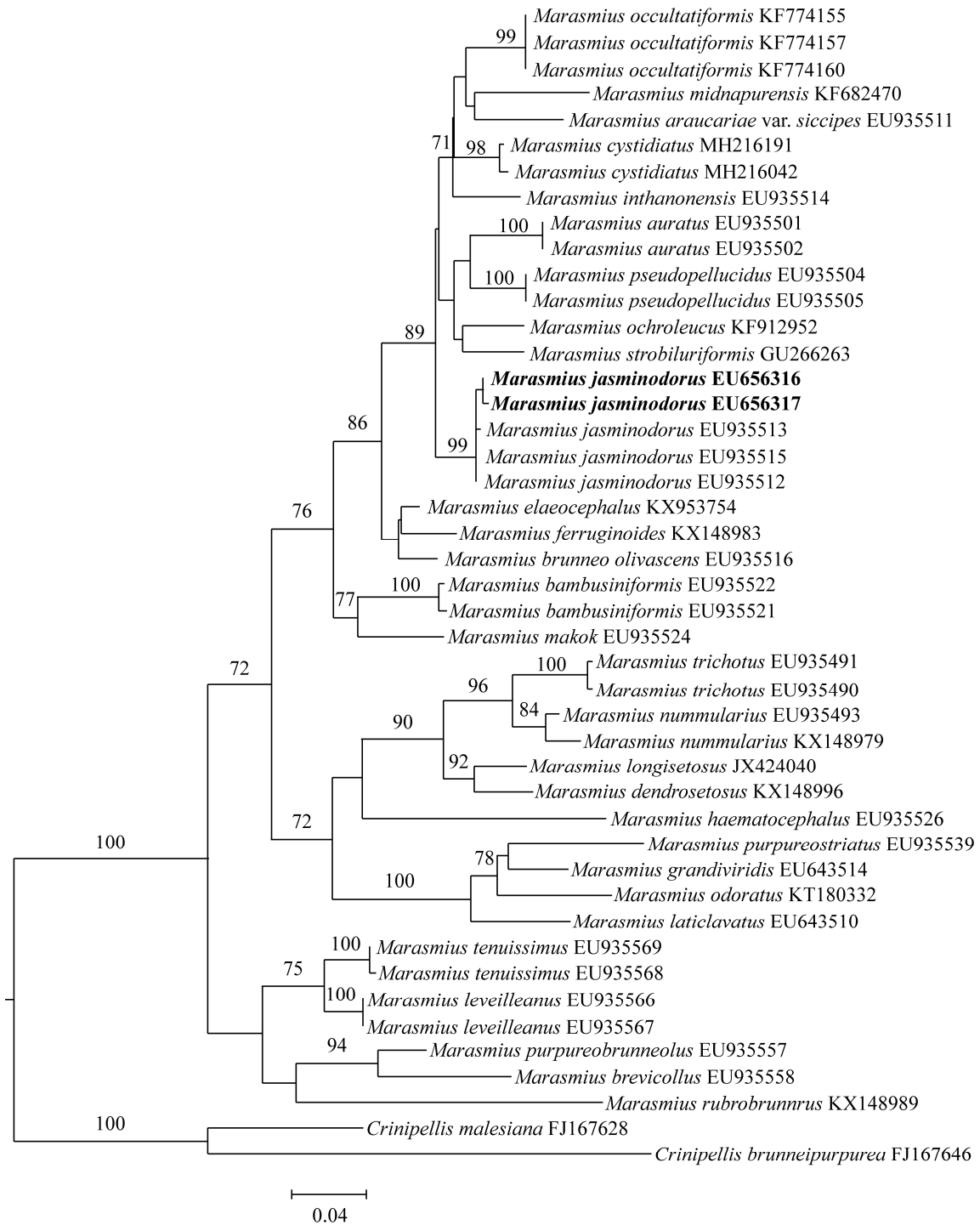


图 2. 基于 ITS 序列采用最大似然法构建的 MK656316 和 MK656317 以及相关小皮伞属系统发育树

Figure 2. Phylogenetic analysis constructed by the Maximum Likelihood method based on comparison of the internal transcribed spacer region sequence between MK656316, MK656317 and related phylogenetic tree of genus *Marasmius*. *Crinipellis malesiana* and *Crinipellis brunneipurpurea* were used as outgroup. Bars represent phylogenetic distance of 0.04. The branch figure shows that BS value is more than 70%.

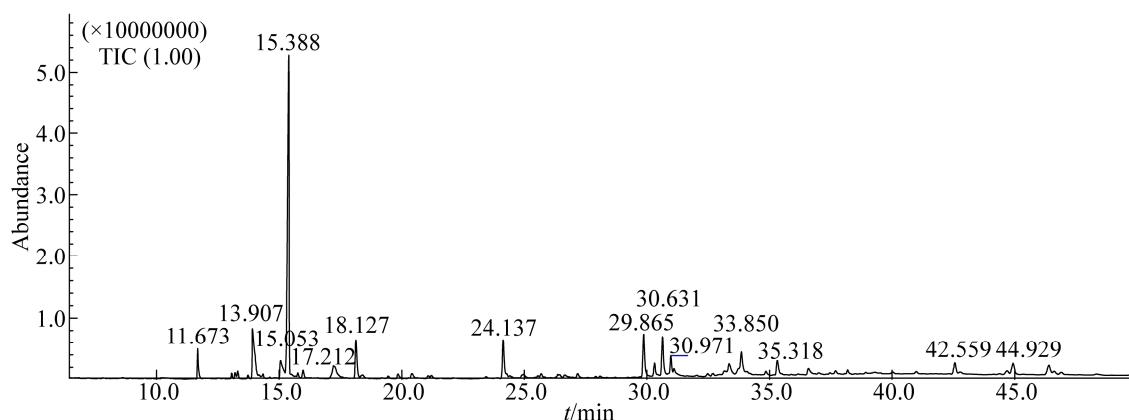


图 3. 菌株 LE2016056 发酵液挥发性成分 GC-MS 总离子流图

Figure 3. Total ion chromatogram of volatile aroma compounds from fermentation liquor of LE2016056 strain.

表 1. 菌株 LE2016056 发酵液部分挥发性成分

Table 1. Volatile flavor compositions of fermentation liquor of LE2016056 strain

Number	Retention time/min	Compounds	Peak area percentage/%
1	6.260	1-Propanol	0.36
2	11.505	Acetoin	0.03
3	11.620	Hydroxyacetone	2.18
4	13.140	2-Propenoic acid, oxiranylmethyl ester	0.51
5	13.260	Furfural	0.62
6	13.835	Acetic acid	8.80
7	14.570	Thiazole, 5-ethenyl-4-methyl	0.06
8	14.985	Formic acid	3.22
9	15.240	Linalool	33.11
10	15.705	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl	0.29
11	15.890	4-Cyclopentene-1,3-dione	0.77
12	18.035	2-Furanmethanol	4.46
13	18.275	Butanoic acid, 3-methyl	0.65
14	19.755	2(5H)-Furanone	0.56
15	24.035	Maltol	4.49
16	25.480	Pantolactone	0.17
17	25.620	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone	0.38
18	26.295	Nerolidol	0.25
19	26.395	Cyclopropyl carbinol	0.33
20	29.760	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	5.13
21	30.535	5-Thiazoleethanol, 4-methyl	4.55
22	31.050	Butanoic acid, 2-methyl-3-oxo-, ethyl ester	0.81
23	33.260	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro	2.20
24	33.570	5-Hydroxymethylfurfural	4.64
25	34.195	1,5-Heptadien-4-one, 3,3,6-trimethyl	0.12
26	34.735	(S)-5-Hydroxymethyl-2[5H]-furanone	0.47
27	35.215	(R)-3-Hydroxy-gamma-butyrolactone	2.14
28	35.805	Hydrocinnamic acid	0.06

### 2.3 菌株产香最佳碳、氮源及无机离子筛选结果

实验探究不同碳源、氮源、无机离子组合对挥发性成分影响的结果表明(表 2、3、4), 该菌在麦芽糖为碳源、酵母粉为氮源、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为无机盐

离子条件下代谢产生的挥发性成分种类多, 同时 7 种主要挥发性成分的相对含量多。因此, 麦芽糖、酵母粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  分别为最优碳源、氮源和无机盐离子组合。

表 2. 不同碳源条件对菌株 LE2016056 产香的影响

Table 2. Effects of different carbon sources on aromatic production of strain LE2016056

Carbon source	Quantity	Relative content of 7 main volatile components/%						
		Hydroxyacetone	Linalool	Furfuryl alcohol	Maltol	5-Thiazoleethanol, 4-methyl	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro	5-Hydroxymethylfurfural
Glucose	43	2.01	24.28	0.82	—	6.16	—	5.61
Maltose	55	1.94	31.73	4.17	5.16	5.21	2.31	3.04
Sucrose	50	2.78	32.05	1.66	0.47	4.22	—	15.12
Soluble starch	16	—	76.39	—	—	3.41	—	—

Relative content refers to the percentage of the peak area of one component in the total area of all components under the same carbon source condition.

表 3. 不同氮源条件对菌株 LE2016056 产香的影响

Table 3. Effects of different nitrogen sources on aromatic production of strain LE2016056

Nitrogen sources	Quantity	Relative content of 7 main volatile components/%						
		Hydroxyacetone	Linalool	Furfuryl alcohol	Maltol	5-Thiazoleethanol, 4-methyl	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro	5-Hydroxymethylfurfural
Yeast extract	43	2.01	24.28	0.82	—	6.16	—	5.61
$\text{NH}_4\text{Cl}$	34	4.50	16.39	1.06	—	9.86	2.13	6.24
Peptone	22	2.12	32.52	—	—	7.20	—	9.26
Peptone+ Yeast extract	25	0.84	59.94	—	—	2.39	—	1.40

Relative content refers to the percentage of the peak area of one component in the total area of all components under the same nitrogen source condition.

表 4. 不同无机离子条件对菌株 LE2016056 产香的影响

Table 4. Effects of different inorganic ion on aromatic production of strain LE2016056

Inorganic ion	Quantity	Relative content of 7 main volatile components/%						
		Hydroxyacetone	Linalool	Furfuryl alcohol	Maltol	5-Thiazoleethanol, 4-methyl	2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro	5-Hydroxymethylfurfural
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	43	2.01	24.28	0.82	—	6.16	—	5.61
$\text{MgSO}_4$	44	2.62	15.80	0.83	—	7.06	—	—
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ + $\text{MgSO}_4$	40	2.20	17.83	0.73	—	6.05	—	8.12

Relative content refers to the percentage of the peak area of one component in the total area of all components under the same inorganic ion condition.

### 3 讨论

本研究对一个采自泰国的大型真菌及其菌株经形态学和分子系统发育相结合的方法鉴定为茉莉小皮伞 *Marasmius jasminodorus*, 属于蘑菇纲 (*Agaricomycetes*)、蘑菇目 (*Agaricales*)、小皮伞科 (*Marasmiaceae*)。该物种是 Wannathes 等<sup>[22]</sup>经形态学与分子系统发育分析结果而描述的新种。

世界菌物总数约 220 万–380 万种, 目前已知 15 万种, 已知的大型真菌估计有 4 万种, 因此大型真菌资源丰富<sup>[23]</sup>。然而目前对产香真菌的研究主要以酵母菌为主, 且应用广泛<sup>[8–9]</sup>, 但对具有产香能力的大型真菌研究还很少。现有的报道发现产香蕈菌 JXJ01 的挥发性成分为反-桂酸甲酯、桂酸乙酯和芳樟醇等多种化合物<sup>[24]</sup>。本研究从茉莉小皮伞中鉴定出了以芳樟醇为主的(占总挥发成分的 33%)的 7 种主要挥发性成分, 而芳樟醇具有铃兰花香, 可用于各种香水的调配, 是香料配方中使用频率最高的成分<sup>[25]</sup>。因此, 该菌株具有作为生产天然芳樟醇的开发潜力。

此外本研究探索了该菌株产香的最佳碳源、氮源及无机盐营养因素, 其中麦芽糖、酵母粉和  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  分别为最优碳源、氮源和无机盐离子来源, 并且不同的营养条件对该菌的产香能力影响显著。本研究为具有产香功能的大型真菌的资源开发、挥发性成分分析鉴定及培养配方的优化提供了借鉴, 并为茉莉小皮伞的香味物质开发奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Mall V, Schieberle P. Evaluation of key aroma compounds in processed prawns (whiteleg shrimp) by quantitation and aroma recombination experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(13): 2776–2783.
- [2] Siebert TE, Barter SR, de Barros Lopes MA, Herderich MJ, Francis IL. Investigation of 'stone fruit' aroma in chardonnay, viognier and botrytis semillon wines. *Food Chemistry*, 2018, 256: 286–296.
- [3] Wang D, Xie XL, Hu X, Pang YX, Yu FL, Zhang YB, Chen ZX, Guan LL, Hu XF. Application of natural fragrance in cosmetics. *Progress in Modern Biomedicine*, 2013, 13(31): 6189–6193. (in Chinese)  
王丹, 谢小丽, 胡璇, 庞玉新, 于福来, 张影波, 陈振夏, 官玲亮, 胡雄飞. 天然香料在化妆品中的应用现状. *现代生物医学进展*, 2013, 13(31): 6189–6193.
- [4] Zhou MR. "Four Great Fragrance" in animal medicinal materials. *China Medical News*, 2016–06–23(004). (in Chinese)  
周满茹. 动物药材中的“四大香”. *中国医药报*, 2016–06–23(004).
- [5] Liu JZ, Han YE. The mechanism and research progress of plant aromatic odor on human psychology. *World Latest Medicine Information*, 2018, 18(88): 93–94. (in Chinese)  
刘隽喆, 韩玉娥. 植物芳香气味对人体心理调节机制与研究进展. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(88): 93–94.
- [6] He FP, Lei CY, Fan JX, Gong DY, Kang ZM, Liu R, Han SQ, Luo LN, Wu XB, Peng Y, Ming FG. Research progress of extraction methods, components and functional characteristics in essential oil. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(3): 307–312, 320. (in Chinese)  
何凤平, 雷朝云, 范建新, 龚德勇, 康专苗, 刘荣, 韩树全, 罗立娜, 吴小波, 彭杨, 明方刚. 植物精油提取方法、组成成分及功能特性研究进展. *食品工业科技*, 2019, 40(3): 307–312, 320.
- [7] Wang W, Yu ZM, Hou YM, Du GC, Li XZ. Isolation and properties of aroma-producing *Pichia myanmarensis* and the effects of the formation of aromatic substances in craft-brewed beer. *Journal of Microbiology*, 2018, 38(4): 34–40. (in Chinese)  
王伟, 俞志敏, 侯英敏, 堵国成, 李宪臻. 产香酵母 *Pichia myanmarensis* LX15 的分离纯化及对精酿啤酒风味物质形成的影响. *微生物学杂志*, 2018, 38(4): 34–40.
- [8] Wang N, Li D, Cheng SF, Pang DH, Dai K, Xiong GX. Preparation of special tobacco extract from tobacco leaves' fragments by aroma producing yeast. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2010(2): 4–9, 16. (in Chinese)  
王娜, 李丹, 程书峰, 庞登红, 戴魁, 熊国玺. 产香酵母菌处理烟叶碎片制备特色烟草浸膏的工艺研究. *香料香精化妆品*, 2010(2): 4–9, 16.
- [9] Dzialo MC, Park R, Steensels J, Lievens B, Verstrepen KJ.



- Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(S1): S95–S128.
- [10] Mäkelä MR, Marinović M, Nousiainen P, Liwanag AJM, Benoit I, Sipilä J, Hatakka A, de Vries RP, Hildén KS. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. *Advances in Applied Microbiology*, 2015, 91: 63–137.
- [11] Su L. The use of microbial ecology technique for the production of natural flavors and fragrances. *China Food Additives*, 2009(6): 197–201. (in Chinese)  
苏林. 微生物生态学技术制备天然香精香料. 中国食品添加剂, 2009(6): 197–201.
- [12] Yang JY, Yang YX, Wang XQ, Li HQ, Zhang BH. Preliminary identification of an aroma-producing fungus strain and analysis of volatile compounds. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(20): 197–200, 205. (in Chinese)  
杨建远, 杨云仙, 汪香琴, 李汉全, 张炳火. 一株产香真菌的初步鉴定及其挥发性成分分析. 食品工业科技, 2015, 36(20): 197–200, 205.
- [13] Zhou S, Wang Y, Li YM, Hu JH, Hu JY, Wang XL. Screening and identification of an aroma-producing *Geotrichum candidum* strain and analysis of its metabolites. *Liquor-Making Science & Technology*, 2013(7): 52–54. (in Chinese)  
周森, 王勇, 李艳敏, 胡建华, 胡佳音, 王旭亮. 产香白地霉菌株筛选鉴定及其代谢产物分析. 酿酒科技, 2013(7): 52–54.
- [14] Yu Y, Yin TZ, Pang DH, Ma YM, Zhu W, Huang YY. Screening and identifying the aroma-producing strains from pineapple. *Hubei Agricultural Sciences*, 2018, 57(12): 36–39. (in Chinese)  
玉云, 尹团章, 庞登红, 马煜明, 朱雯, 黄友谊. 菠萝产香菌的筛选与鉴定. 湖北农业科学, 2018, 57(12): 36–39.
- [15] Chen LJ, Wang GJ, Tian XL, Shi HZ. Identification of an aroma-producing fungus ZY-2 and its analysis on antifungal activity and chemical component of volatile compounds. *Journal of Southern Agriculture*, 2013, 44(11): 1818–1822. (in Chinese)  
陈利军, 王国君, 田雪亮, 史洪中. 产香真菌 ZY-2 菌株鉴定及其挥发性物质抑菌活性测定与组分分析. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1818–1822.
- [16] Bosse AK, Fraatz MA, Zorn H. Formation of complex natural flavours by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. *Food Chemistry*, 2013, 141(3): 2952–2959.
- [17] Largent DL. How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features. 3rd ed. Eureka, California: Mad River Press, 1986: 166.
- [18] Largent DL, Johnson D, Watling R. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. Eureka, California: Mad River Press, 1977: 148.
- [19] Kornerup A, Wanscher JH. Methuen handbook of colour. London: Methuen and Co Ltd, 1963.
- [20] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792–1797.
- [21] Hall T. BioEdit v7. Carlsbad: Ibis Biosciences. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>.
- [22] Wannathes N, Desjardin DE, Hyde KD, Perry BA, Lumyong S. A monograph of *Marasmius* (*Basidiomycota*) from Northern Thailand based on morphological and molecular (ITS sequences) data. *Fungal Diversity*, 2009, 37: 209–306.
- [23] Hawksworth DL, Lücking R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, 2017, 5(4), doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- [24] Zhang BH, Li HQ, Yang JY, Zha DM, Shi HQ, Sun FZ. Identification and volatile component analysis of aromatic fungi strain JXJ 01. *Natural Product Research and Development*, 2016, 28(4): 536–541. (in Chinese)  
张炳火, 李汉全, 杨建远, 查代明, 石红璆, 孙凤珍. 产香真菌 JXJ 01 的初步鉴定及挥发性香气成分分析. 天然产物研究与开发, 2016, 28(4): 536–541.
- [25] Jiang Y. Study on the change law of the main components in essential oil of linalool-type *Cinnamomum camphora* (L.) presl leaves. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2018(6): 1–3. (in Chinese)  
江燕. 芳樟醇型樟叶精油中主要成分变化规律的研究. 香料香精化妆品, 2018(6): 1–3.

# Identification and volatile components analysis of an aromatic macrofungi

Anqi Liu<sup>1#</sup>, Wei Zhang<sup>2#</sup>, Mingfeng Wang<sup>2</sup>, Tougen Liao<sup>2</sup>, Maoqiang He<sup>1,3</sup>,  
Jinwei Ren<sup>1\*</sup>, Ruilin Zhao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co., LTD., Kunming 650202, Yunnan Province, China

<sup>3</sup> Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**Abstract:** **[Objective]** The aim of this study was to explore aromatic macrofungi resources, and obtain volatile aroma components. **[Methods]** An aromatic mushroom collected from northern Thailand was identified by combining the traditional morphological taxonomy and molecular phylogenetic analysis. HP20 macroporous resin and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to analyze the volatile components in fermentation broth. Then, carbon source, nitrogen source and inorganic salts were optimized. **[Results]** The fungus was identified as *Marasmius jasminodorus*. The analysis result suggests that the main aromatic compounds and their peak area percentage include linalool (33.11%), 5-Hydroxymethylfurfural (4.64%), 5-Thiazoleethanol, 4-methyl (4.55%), Maltol (4.49%), 2-Furanmethanol (4.46%), 2(3*H*)-Furanone, 5-heptyldihydro (2.20%), 2-Propanone and 1-hydroxy (2.18%). In addition, the optimal fermentation conditions of carbon source, nitrogen source and inorganic salts were maltose, yeast powder and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. **[Conclusion]** The study shows that this macrofungi can produce a variety of volatile aroma components that are widely used in existing industrial production, such as linalool, and it has potential application in the production of natural flavor.

**Keywords:** aromatic fungi, genus *Marasmius*, identification, GC-MS

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Major Special Projects of China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd. (2017CP01)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding authors. E-mail: Ruilin Zhao, zhaorl@im.ac.cn; Jinwei Ren, renjw@im.ac.cn

Received: 2 September 2019; Revised: 9 October 2019; Published online: 4 November 2019