

研究报告

## 一株红景天内生细菌的筛选及初步研究

杨欣<sup>1</sup> 曾宪军<sup>1</sup> 丁仁芳<sup>1</sup> 谢晨文<sup>1</sup> 张兴利<sup>1</sup> 赵建<sup>1</sup> 赵文吉<sup>2</sup> 张杰<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川 成都 610065)

(2. 四川省草原科学研究院 四川 成都 611731)

**摘要:**【目的】从红景天根部筛选并鉴定一株产酪醇的细菌, 初步研究其产酪醇特性, 为寻找红景天替代资源提供新途径。【方法】用 NA 培养基从大花红景天根部分离内生细菌, 通过薄层层析(TLC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱-质谱联用(GC-MS)筛选出酪醇产量最大的菌株, 经菌落形态分析、革兰氏染色分析及 16S rRNA 基因序列分析其分类学地位。单因素实验确定初始 pH、培养温度、发酵时间及接种量对菌株产酪醇活力的影响。【结果】从大花红景天根部分离出 14 株内生细菌, 其中 8 株能产酪醇, 筛选出酪醇产量最大的菌株 B3, 经菌落形态分析、革兰氏染色分析及 16S rRNA 基因序列分析初步鉴定为水生拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*)。研究其发酵条件, 其最适 pH 为 6.0, 最适温度为 32 °C, 最佳发酵时间为 42 h, 最佳接种量为 15%。在最适发酵条件下, 用改良 NA 培养基发酵, B3 菌株酪醇的产量为 15.68 mg/L。【结论】B3 菌株是一株具有产酪醇能力的细菌, 在最适发酵条件下酪醇产量达到 15.68 mg/L, 具有潜在的开发价值。

**关键词:** 大花红景天, 内生细菌, 酪醇, 水生拉恩氏菌

## Screening and preliminary study on one endophytic bacterium of *Rhodiola crenulata*

YANG Xin<sup>1</sup> ZENG Xian-Jun<sup>1</sup> DING Ren-Fang<sup>1</sup> XIE Chen-Wen<sup>1</sup> ZHANG Xing-Li<sup>1</sup>  
ZHAO Jian<sup>1</sup> ZHAO Wen-Ji<sup>2</sup> ZHANG Jie<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Biological Resource and Ecological Environment of the Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

(2. Sichuan Academy of Grassland Science, Chengdu, Sichuan 611731, China)

**Abstract:** [Objective] To research the alternative resources of *Rhodiola crenulata*, a tyrosol-producing strain was isolated and identified from the root of *Rhodiola crenulata*. The production features of the strain were preliminary studied. [Methods] Endophytic bacteria were isolated from *Rhodiola crenulata* with NA medium. The best potential strain to produce tyrosol was selected through thin-layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), followed by identification by colony morphology, gram staining analysis and 16S rRNA gene sequence profiles. Single factor experiments based on initial pH, culture temperature,

基金项目: 若尔盖湿地保护关键技术与示范项目(No. 2012SZ0045); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(No. NCET-13-0397); 四川省科技支撑计划(No. 2013ZX0161)

\*通讯作者: Tel: 86-28-85460487; 信箱: zhangjfy@163.com

收稿日期: 2014-12-09; 接受日期: 2015-03-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-27

incubation time and inoculum size were performed to optimize the conditions for tyrosol-production.

**[Results]** In this study, a total of 14 strains of endophytic bacteria were isolated from the root of *Rhodiola crenulata*. The best potential strain B3 was selected from 8 strains which can produce tyrosol. B3 strain was preliminary identification to *Rahnella aquatilis* by colony morphology, gram staining analysis and 16S rRNA gene sequence analysis. Researching its fermentation conditions, we found out that the optimum pH was 6.0, optimum temperature was 32 °C, the best fermentation time was 42 h, the best inoculation amount was 15%, and at the best fermentation conditions, the yield of tyrosol can reach 15.68 mg/L with improved NA culture medium. **[Conclusion]** B3 strain is able to produce tyrosol, and the yield can reach to 15.68 mg/L at the optimal fermentation condition. The tyrosol-producing strain is expected to be explored its marketing values.

**Keywords:** *Rhodiola crenulata*, Endophytic bacteria, Tyrosol, *Rahnella aquatilis*

红景天是一种传统的多年生草本野生药用植物,因其具有抗缺氧、抗疲劳、抗氧化、延缓衰老、抗病毒、抗肿瘤等功效,近年来愈发受到广泛重视<sup>[1]</sup>。红景天的模式种为:红景天 *Rhodiola* L., 全球总共有 96 种,分布于喜马拉雅地区、亚洲西部至北部,经我国、朝鲜、日本至北美洲,并以我国为分布中心。我国共有 73 种,主要分布在西南、西北、华中、华北及东北,尤其云南、四川及西藏高寒地区种类最多,其中四川省有 22 种<sup>[2]</sup>。研究表明,红景天的主要成分为红景天苷、酪醇等,具有延缓机体衰老、防止心血管疾病、抗肿瘤以及多种老年性疾病的作用<sup>[3]</sup>。植物中红景天苷生物合成最后一步反应机制已经明确,是尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(UDP-glucosyltransferase, UDPGT, UGTs)以尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和酪醇为底物催化合成红景天苷<sup>[4-5]</sup>。野生红景天资源由于过度开采而逐年减少,市场需求量不断增加,而红景天的人工养殖周期相对较长。

1993 年, Stierle 等<sup>[6]</sup>首次报道短叶红豆杉中分离出了可以产紫杉醇的内生真菌(*Taxomyces andreanae*),为生产紫杉醇提供了潜在新途径。自此,内生菌的研究成为了热点。You 等<sup>[7]</sup>从掌叶大黄根部分离出了能产大黄素、大黄酸的内生真菌。刘洋露等<sup>[8]</sup>从金银花中分离出了能产绿原酸的内生细菌。王学军等<sup>[9]</sup>从喜树组织中分离出能产 10-羟基喜树碱的内生真菌。张玲琪等<sup>[10]</sup>从长春花(*Catharanthus roseus* (L) G. Don)茎的韧皮部分离出

能产长春新碱的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。Piccoli 等<sup>[11]</sup>从盐地植物 *Prosopis strombulifera* (牧豆树)中分离出一株内生细菌能够产 ABA、IAA、赤霉素 A1 和 A3 及茉莉酸。与其他资源相比,微生物资源有明显的优势,如生长周期短、产物容易提取、对环境无污染等。本文从生长于中国四川省阿坝藏族羌族自治州红原县的大花红景天根部分离到一株细菌,经鉴定为水生拉恩氏菌,经研究初步判断此株细菌能通过发酵产酪醇。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物材料:**新鲜的大花红景天完整植株采集于四川省阿坝藏族羌族自治州红原县。

**1.1.2 主要试剂及仪器:**酪醇标准品,成都鹏世达实验用品有限公司。酪醇(图 1)又叫对羟基苯乙醇,易溶于水、乙醇、乙醚、丙酮和乙酸,分子式为 C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>, 相对分子质量为 138.165 8, 熔点为 88-92 °C, 闪点为 310 °C, CAS 登录号为 501-94-0。细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司; 2×PCR Master Mix (0.05 U/μL *Taq* DNA 聚合酶, 2×PCR 反应缓冲液, 4 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mmol/L dNTP 混合物以及稳定剂, 优化剂等), 日本 TaKaRa 公司。

1525-2487 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; QP2010 气相色谱-质谱联用仪,日本岛津公司; S1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler, 美国 Bio-Rad 公司。

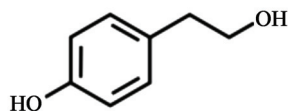


图1 酪醇的分子式

Figure 1 The molecular formula of standard of tyrosol

**1.1.3 培养基:** NA 固体培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 牛肉膏 3.0, 葡萄糖 2.5。加热溶解后, 添加 20 g 琼脂, pH 调至 7.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。改良 NA 培养基(Modified NA medium, MNA): 培养基原配方中的蛋白胨替换为大豆蛋白胨。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 内生细菌的分离:** 完整大花红景天去叶留根, 水洗净晾干, 依次用 75%乙醇表面消毒 2 min, 无菌蒸馏水冲洗, 2.5%的次氯酸钠溶液消毒 4 min, 无菌蒸馏水冲洗后, 用无菌手术刀切掉表层 2 mm, 然后切成 2 mm 的小块, 分别置于 NA 平板上, 以第 2 次冲洗下来的洗涤水 0.1 mL 涂布 NA 平板为对照, 37 °C 培养。观察 NA 平板, 及时挑选、纯化并 4 °C 保存菌株。

**1.2.2 大花红景天根部的提取物:** 干燥的红景天根部用中药粉碎机制成粉, 用 20%的乙醇浸泡 30 min 后, 80 W 微波 2 min, 70 °C 水浴 10 min。浸出液抽滤蒸干后用 1 mL 甲醇溶解, 甲醇溶解液过滤除菌后备用。

**1.2.3 内生细菌发酵液的提取:** 内生细菌以 10%的接种量接种到 60 mL NA 液体培养基中, 32 °C、120 r/min 摇床培养 42 h。细菌发酵液用 1.2.2 方法提取。

**1.2.4 内生菌发酵液样品检测:** 采用薄层层析(TLC)、高效液相色谱和气相色谱-质谱联用(GC-MS)逐次筛选, 以红景天药材提取物和酪醇标准品为对照。3 种检测方法的检测条件如下: TLC 展开剂为甲醇:氯仿:水=24:14:4 (体积比)。

HPLC 色谱柱: Waters C<sub>18</sub> (75 mm×4.6 mm×3.5 μm); 流动相:甲醇:水=15:85 (体积比); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 275 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

GC-MS 色谱柱: OC-101 非极性柱(45 m×0.25 mm×0.25 μm)。加热程序如下: 2 °C/min 从

70 °C 升至 135 °C, 保持 10 min, 4 °C/min 升温至 220 °C, 保持 10 min, 4 °C/min 升温至 270 °C, 保持 20 min; 检测温度: 290 °C; 载气: He (氦气); 柱子压强: 10 kPa; 载气流速: 2.0 mL/min; Transfer line (传输线即 GC 到 MS 的接口)温度: 300 °C。

**1.2.5 菌株的鉴定:** 通过菌落形态、显微观察结果、革兰氏染色和 16S rRNA 基因序列鉴定菌株。

DNA 的提取采用天根生化科技(北京)有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒按标准操作流程提取。16S rRNA 基因 PCR 扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。扩增体系 (25 μL): 模板(浓度为 600 mg/L) 1 μL, 上下游引物 (10 μmol/L)各 1 μL, 2×PCR Master Mix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增样品送上海英潍捷基(Invitrogen)公司测序。测序结果在 NCBI 上 GenBank 数据库比对, 并用 MEGA 4 构建系统发育树。

**1.2.6 内生菌的生长曲线和酪醇产量测定:** 将内生菌 B3 接种于 60 mL 液体培养基内, 32 °C、200 r/min 摇床培养, 从 12 h 开始直到 46 h 每隔 2 h 取等量的发酵液测 OD 值、菌体干重与酪醇产量, 分别重复测定 3 次, 取平均值绘制生长曲线和酪醇产量曲线。

**1.2.7 发酵条件的优化:** 分别在 12、17、23、27、30、32、37 °C 条件下发酵培养, 考察不同温度对 B3 菌株酪醇产量的影响。

最适温度下, 研究发酵培养基初始 pH, 分别在 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 条件下发酵培养, 考察不同初始 pH 对 B3 菌株酪醇产量的影响。

最适温度、最适 pH 下, 研究不同接种量: 1%、5%、10%、15%、20%及不同培养基成分对 B3 菌株酪醇产量的影响。

最适发酵条件下, 研究不同提取方法对 B3 产物中酪醇的不同提取率。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌的分离筛选、产物分析及菌株鉴定

**2.1.1 内生菌的分离筛选及其产物分析:** 从大花红景天根部中分离出了 14 株细菌, 发酵液提取物经

TLC 检测,初步判断其中 8 株能够通过发酵产酪醇。酪醇标准品、红景天根部提取物、发酵液提取物依次在硅胶板上点样,用碘熏蒸后出现黄色斑点,  $R_f$  值基本一致,约为 0.67。HPLC 结果显示,酪醇标准品,红景天根部提取物与 8 株细菌的发酵产物在酪醇的特征吸收波长 222.00 nm 和 276.00 nm 处均有吸收峰(图 2A),且有相近的保留时间,分别为 11.22 (图 2B)、11.03 (图 2C)、11.13 min (图 2D),且 B3 产量最大。进一步通过 GC-MS 分析表明,在相同的检测条件下,B3 菌株发酵液提取物的保留时间为 16.428 min (图 3A),在此保留时间的总离子色谱图(Total ion chromatograms, TIC)中也检测到相同的酪醇特征  $m/z$  值(图 3B),与酪醇标准品(图 3C)一致。以上结果表明,内生菌 B3 能产生和宿主植物大花红景天相同的活性物质酪醇。

**2.1.2 菌株 B3 的鉴定:** 菌落形态与显微镜观察: B3 菌株的菌落呈乳白色、半透明,菌落周围湿润,较老的菌落(10 d 以后)中心呈浅红色。革兰氏染色后菌体呈红色,为阴性菌,长杆状,长径约为 4  $\mu\text{m}$ ,短径约为 1  $\mu\text{m}$ ,两端呈圆形(图 4)。

分子鉴定: PCR 扩增 B3 菌株的 16S rRNA 基因序列并测序,测序结果通过 NCBI 上 GenBank 数据库比对,结果显示 B3 的 16S rRNA 基因序列与水生拉恩氏菌[*Rahnella aquatilis* (AY253921.1)]的相似性达到 99%,用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树(图 5)。结合革兰氏染色与显微镜观察结果及菌落形态鉴定 B3 菌株为水生拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*)。

## 2.2 内生菌发酵条件的探索

**2.2.1 B3 菌株生长曲线及酪醇生产曲线:** 内生细菌 B3 的生长曲线: B3 菌株干重曲线(图 6A)及 OD 值曲线(图 6B)显示,菌株的生长周期约为 46 h,菌体从对数期开始快速增长,到稳定期后基本不变,在衰退期缓慢下降。其延滞期、对数期、稳定期、衰退期分别为 0–12、12–36、36–42、42–46 h。

内生细菌 B3 产酪醇的能力曲线: HPLC 的定量结果显示,0–22 h 基本没有酪醇的产生,从 22 h 开始酪醇快速增加,42 h 后达到最大值 6.99 mg/L (依照酪醇标准曲线:  $y=2E-07x+0.022$ ,  $R^2=0.996$ ),42 h 后酪醇积累量逐渐下降(图 7)。综合图 6 与图 7

的结果,B3 菌株的酪醇积累时期为:对数期中期开始,稳定期末期结束。

**2.2.2 温度对酪醇产量的影响:** 培养温度为 32  $^{\circ}\text{C}$  时菌体生长良好,其酪醇产量达到峰值为 3.87 mg/L。当温度低于 32  $^{\circ}\text{C}$  时,随温度的升高酪醇产量增加,32  $^{\circ}\text{C}$  时产量达最大;温度高于 32  $^{\circ}\text{C}$  时细菌生长受到抑制,酪醇产量快速下降(图 8)。

**2.2.3 初始 pH 对酪醇产量的影响:** 发酵温度为 32  $^{\circ}\text{C}$ ,初始 pH 为 6.0 时,菌体生长良好,酪醇产量达到峰值为 4.52 mg/L。当 pH 小于 6.0 时,酪醇产量随 pH 的上升而增加,pH 为 6.0 时产量最大;pH 大于 6.0, B3 菌株的生长受到抑制,酪醇产量快速下降(图 9)。

**2.2.4 接种量及培养基成分对酪醇产量的影响:** 发酵温度为 32  $^{\circ}\text{C}$ ,培养基初始 pH 为 6.0,改良 NA 培养基及接种量为 15%的条件下, B3 菌株酪醇产量达到峰值为 14.239 mg/L (图 10)。

**2.2.5 不同提取方法的提取效率:** 在最适条件,用改良 NA 培养基培养,离心去除菌体且不用微波辅助的方法提取效率最高,酪醇产量达到 15.68 mg/L (图 11)。

## 3 结论与讨论

通过微生物发酵得到红景天苷的前体物质酪醇,在酶的催化作用下转化为红景天苷,以此替代野生红景天植物资源。本课题研究的初始目的是分离出能产红景天苷的内生菌,经过多次实验,没有发现能产红景天苷的内生菌,而在研究过程中筛选到能产酪醇的内生细菌,为水生拉恩氏菌,目前国内对水生拉恩氏菌的研究主要集中在对展青霉,葡萄孢菌的生物控制,应用在黄瓜植株上细菌的控制,葡萄藤冠瘿病及葡萄根癌病的防治<sup>[12-14]</sup>方面。

酪醇作为红景天苷的前体物质,经过葡萄糖基转移酶(UDPGT)以尿苷二磷酸葡萄糖(UDPGT)和酪醇为底物催化合成,而植物体内酪醇的合成机制尚不明确。酪醇是芳香族氨基酸衍生物,属于典型的简单酚类化合物,根据植物次生代谢途径,目前可以明确其前体来源于莽草酸途径。根据已有文献报道,酪醇生物合成来源主要可能途径存在两种观点:一是苯丙烷代谢途径<sup>[15-16]</sup>;二是生物碱代谢途

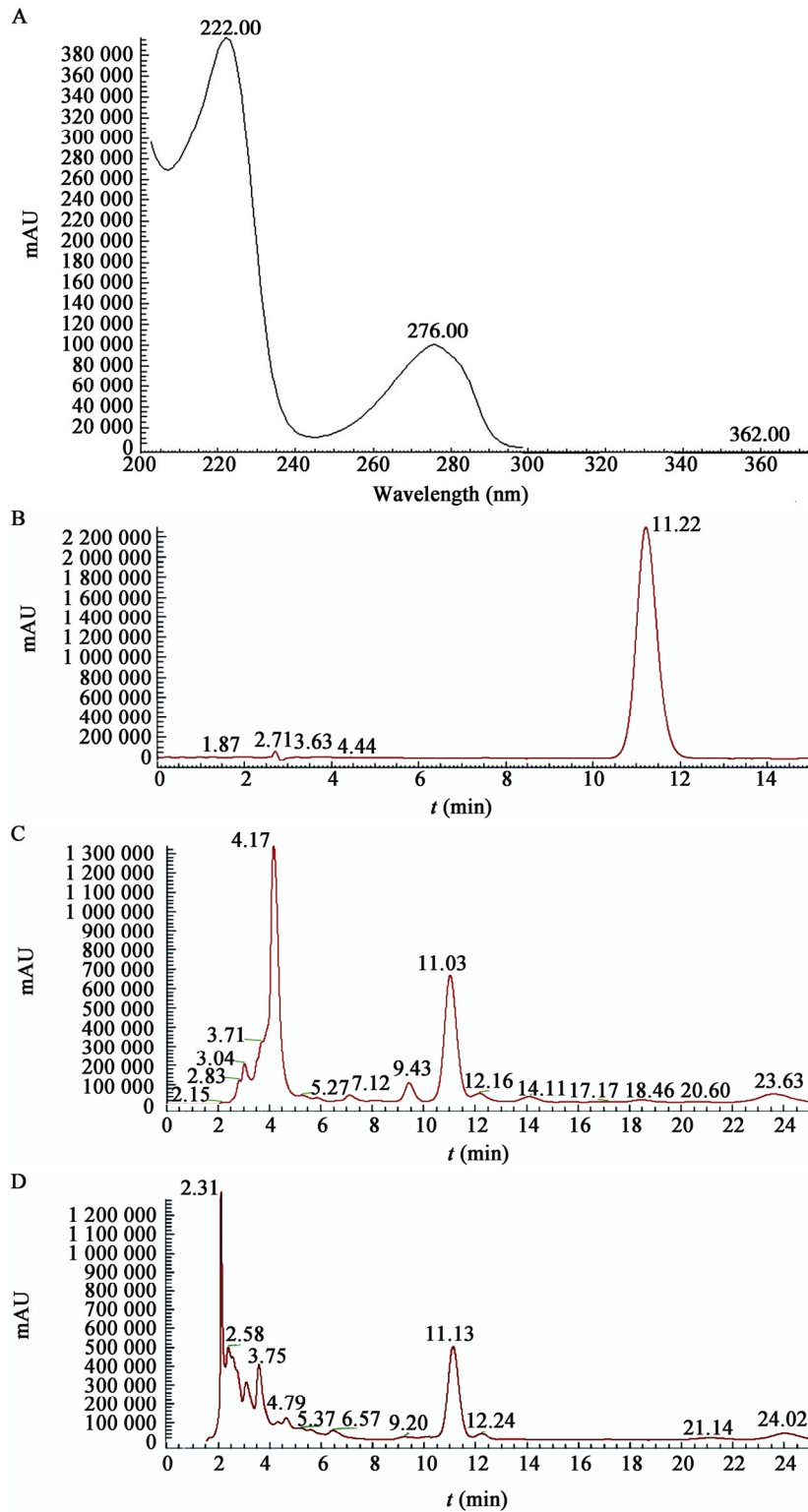


图2 HPLC 结果分析图

Figure 2 The analysis of HPLC

注：A：特征吸收峰；B：酪醇标准品；C：红景天根部提取物；D：B3 提取物。

Note: A: Characteristic absorption peak; B: Standard tyrosol; C: The extracts of *Rhodiola crenulata* root; D: The extracts of B3.

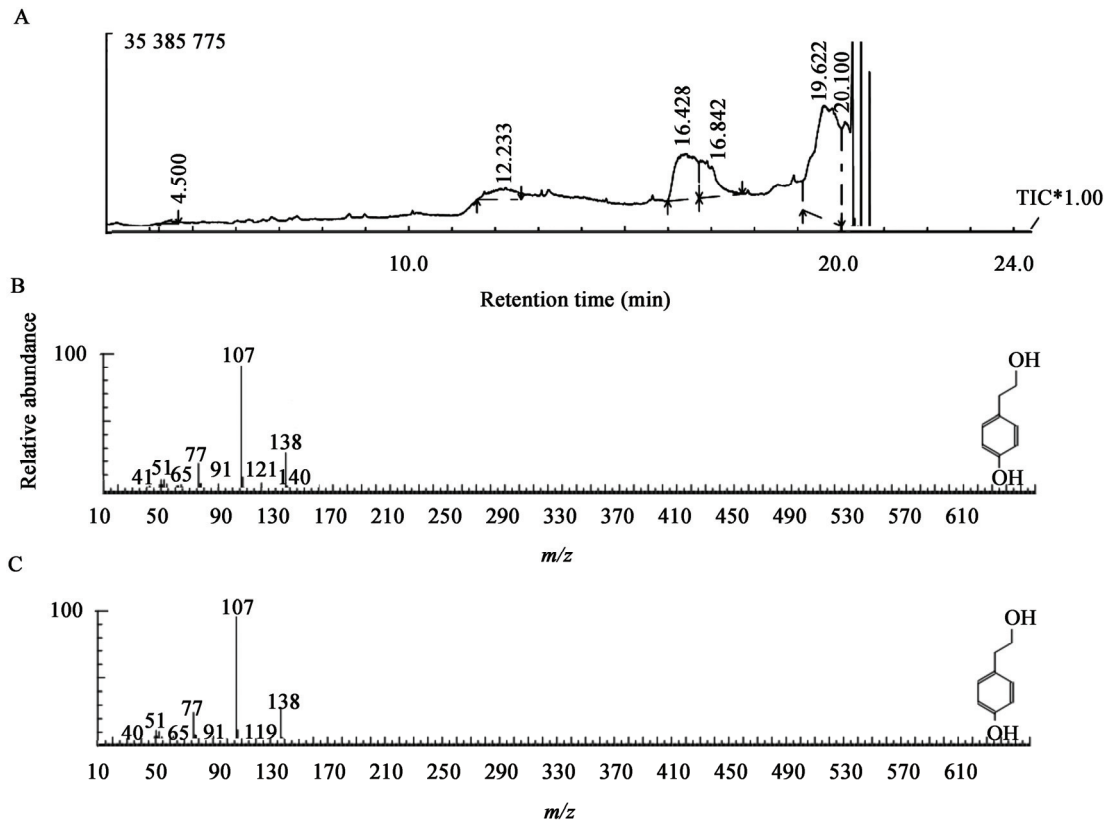


图 3 GC-MS 分析结果

Figure 3 The analysis of GC-MS

注: A: B3 产物 GC-MS 总图; B: B3 产物质谱图; C: 酪醇标准品质谱图。

Note: A: The GC-MS of B3; B: The material spectra of B3 products; C: The material spectra of tyrosol.

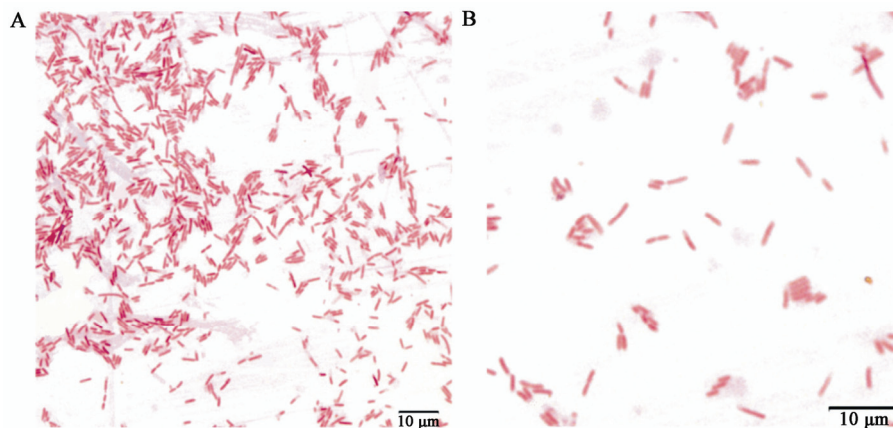


图 4 菌株 B3 的革兰氏染色

Figure 4 Gram staining of strain B3

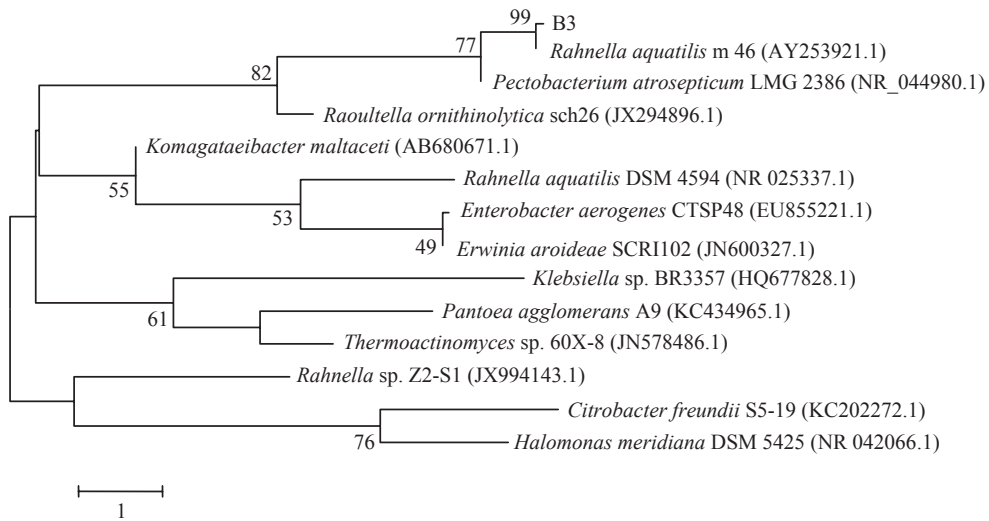


图 5 内生细菌 B3 的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of the endophytic bacterium B3

注：标尺 1 表示序列差异的分支长度；发育树节点的数值表示 Bootstrap 值；括号内数值为 GenBank 数据库的登录号。

Note: Bar=1 nucleotide divergence. Number at notes present bootstrap percentages. Those in parentheses are GenBank accession number.

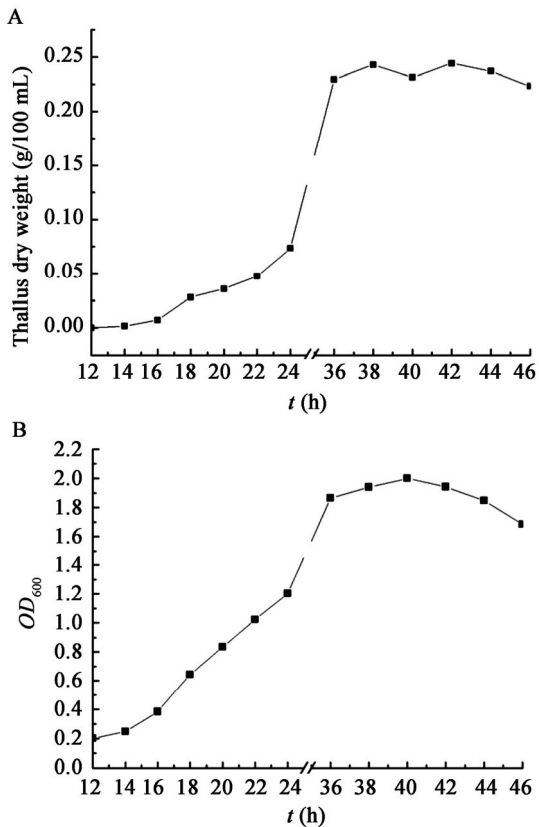


图 6 内生细菌 B3 的生长曲线

Figure 6 Growth curve of strain B3

注：A：干重曲线；B：OD 值曲线。

Note: A: The thallus dry weight of B3; B: The OD value of B3.

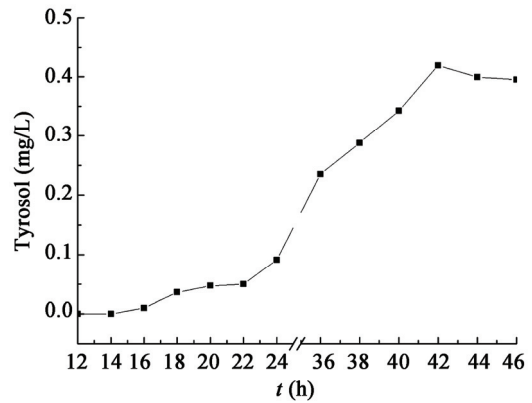


图 7 内生细菌 B3 产酪醇的能力折线图

Figure 7 Production curve of producing tyrosol of strain B3

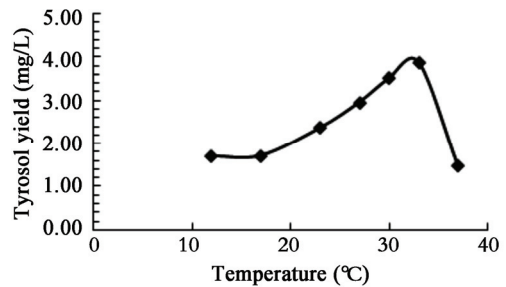


图 8 不同温度对内生细菌 B3 酪醇产量的影响

Figure 8 Effects of different temperature on tyrosol yield of B3

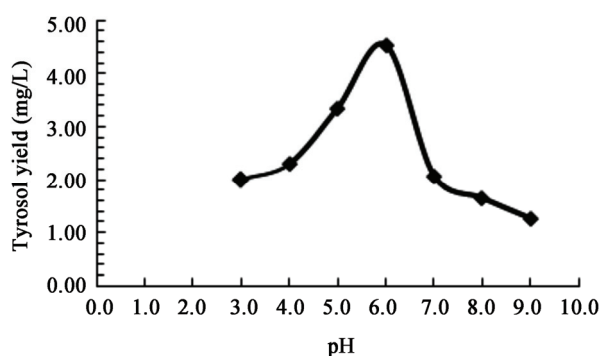


图9 不同 pH 对内生细菌 B3 酪醇产量的影响  
Figure 9 Effects of different pH on tyrosol yield of B3

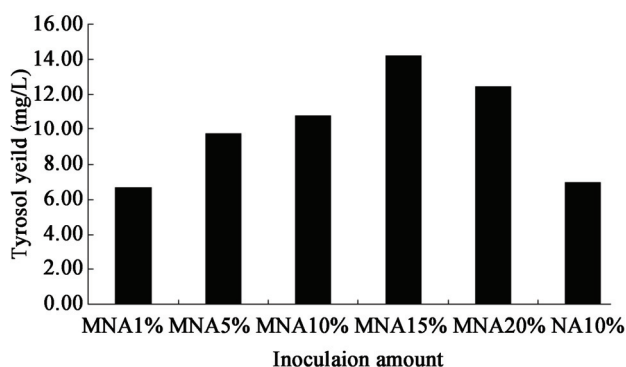


图10 接种量及培养基成分对酪醇产量的影响  
Figure 10 The influence of inoculation amount and culture medium on tyrosol yield

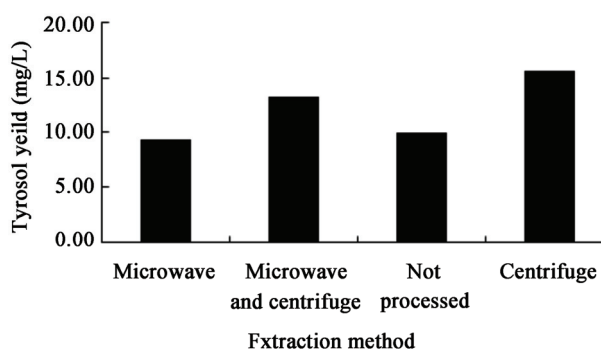


图11 不同提取方法的提取效率  
Figure 11 The extraction efficiency of different extraction method

径, 该途径起源于酪氨酸, 包括酪氨酸脱羧或酪氨酸转氨两种方式<sup>[17-18]</sup>。

酪醇最初来源于橄榄油, 是天然的抗氧化剂。

此外, 化学合成法也是获得酪醇的主要途径之一。1992年, 王亚楼等<sup>[19]</sup>提出对硝基苯乙酸为起始原料, 经过3步反应得到酪醇, 总收率为41.4%。张三奇等<sup>[20]</sup>以对溴苯酚为原料, 经过氯乙酰化、醚化、Clemmensen还原(克莱门森还原反应)、水解得到酪醇。White<sup>[21]</sup>通过芳胺合成法, 先酰化后得到酪醇。除此之外, 还有以对硝基甲苯、对羟基苯乙烯、对羟基苯甲酮等为原料合成酪醇<sup>[22-24]</sup>。化学合成法有原料贵、合成步骤复杂、产率低、涉及有毒物质、对环境有害等缺点。生物发酵法则可以避免这些问题, 而催化酪醇转换为红景天苷的酶广泛存在于生物界中, 以微生物中最常见。

利用红景天中酪醇进行微生物转化提高红景天苷的含量的研究报道表明该类方法是可行的: 高雪华等<sup>[25]</sup>用硫酸铵沉淀法从黑曲霉 H35 和 H42 的发酵液中提取转换酪醇为红景天苷的酶, 通过酶促反应提高红景天药材浸出液中红景天苷的量; 宋伟舟等<sup>[26]</sup>从已经分离的具有酪醇转化能力的霉菌中, 筛选出能协同发酵提高药材浸出液中红景天苷总量的双菌株组合; 王梦亮等<sup>[27]</sup>从红景天根系土壤中筛选出一株米曲霉, 以 D-葡萄糖和酪醇为底物, 将酪醇转化成红景天苷。

国内外对产酪醇的真菌偶见报道, 已从土壤中分离出一株植物致病菌多脂长喙壳真菌产酪醇, 产量为 65.3  $\mu\text{g/L}$ <sup>[28]</sup>。国内外对产酪醇的细菌鲜见报道, 本文中从大黄红景天根部分离到的细菌 B3 能通过发酵产酪醇, 经过鉴定为水生拉恩氏菌。酪醇具有抗缺氧、抗疲劳、抗氧化、延缓衰老、抗肿瘤、抗病毒等功效, 本身具有很高的应用价值, 还有转换成红景天苷的潜在价值。B3 菌株发酵所产的酪醇可以通过进一步的微生物转化得到红景天苷, 对后续寻找红景天的替代资源有一定的参考价值。

## 参考文献

- [1] Fan MH, Xu SY. Microwave-assisted extraction of *Salidroside* from *Rhodiola Sachalinensis* A. Bor[J]. Natural Product Research and Development, 2008, 20(2): 353-356 (in Chinese) 范明辉, 许时婴. 高山红景天中有效成分的微波辅助提取[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 353-356
- [2] Jia GF. General study and its prospect on *Rhodiola* root[J]. Journal of Sichuan Grassland, 1997(3): 38-40 (in Chinese) 贾国夫. 红景天的研究概况及展望[J]. 四川草原, 1997(3): 38-40
- [3] Wang ZF, Wu YX, Zeng FK. The developing utilization and its future of *Rhodiola* resource[J]. Quarterly of Forest By-product



- and Speciality in China, 1997(3): 48-49 (in Chinese)  
王中风, 吴永娟, 曾凡坤. 红景天资源的开发利用与前景[J]. 中国林副特产, 1997(3): 48-49
- [4] Xu JF, Su ZG, Feng PS. Activity of tyrosol glucosyltransferase and improved salidroside production through biotransformation of tyrosol in *Rhodiola sachalinensis* cell cultures[J]. Journal of Biotechnology, 1998, 61(1): 69-73
- [5] Ma LQ, Liu BY, Gao DY, et al. Molecular cloning and overexpression of a novel UDP-glucosyltransferase elevating salidroside levels in *Rhodiola sachalinensis*[J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(7): 989-999
- [6] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216
- [7] You X, Feng S, Luo SL, et al. Studies on a rhein-producing endophytic fungus isolated from *Rheum palmatum* L.[J]. Fitoterapia, 2013, 85(1): 161-168
- [8] Liu YL, Zhang J, Yang ZR, et al. Isolation and identification of a chlorogenic acid-producing endophytic bacterium from *Flosloniceræ japonicæ*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2014, 51(3): 603-608 (in Chinese)  
刘洋露, 张杰, 杨志荣, 等. 金银花中产绿原酸的内生细菌的分离与鉴定[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2014, 51(3): 603-608
- [9] Wang XJ, Min CL, Liu WB, et al. Isolation and identification of the 10-hydroxycamptothecin-producing endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* Decne[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(6): 407-411 (in Chinese)  
王学军, 闵长莉, 刘文博, 等. 一株产10-羟基喜树碱喜树内生真菌的分离和鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(6): 407-411
- [10] Zhang LQ, Guo B, Li HY, et al. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000, 31(11): 805-807 (in Chinese)  
张玲琪, 郭波, 李海燕, 等. 长春花内生真菌的分离及其发酵产药用成分的初步研究[J]. 中草药, 2000, 31(11): 805-807
- [11] Piccoli P, Travaglia C, Cohen A, et al. An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> and jasmonic acid in chemically-defined culture medium[J]. Plant Growth Regulation, 2011, 64(2): 207-210
- [12] El-Hendewy HH, Osman ME, Sorour NM. Characterization of two antagonistic strains of *Rahnella aquatilis* isolated from soil in Egypt[J]. Folia Microbiologica, 2003, 48(6): 799-804
- [13] Chen F, Li JY, Guo YB, et al. Biological control of grapevine crown gall: purification and partial characterisation of an antibacterial substance produced by *Rahnella aquatilis* strain HX2[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 124(3): 427-437
- [14] Calvo J, Calvente V, Orellano ME, et al. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple fruit by mixtures of bacteria and yeast[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 3(5): 644-650
- [15] Li W, Du GS, Huang QN. Salidroside contents and related enzymatic activities in *Rhodiola kirilowii* Callus[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(8): 1645-1648 (in Chinese)  
李伟, 杜桂森, 黄勤妮. 狭叶红景天愈伤组织中红景天苷含量及相关代谢酶活力的研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1645-1648
- [16] Xu JF, Su ZG, Feng PS. Regulation of metabolism for improved salidroside production in cell suspension culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Borl: the effect of precursor[J]. Natural Product Research and Development, 1998, 10(2): 8-14 (in Chinese)  
许剑锋, 苏志国, 冯朴荪. 高山红景天细胞悬浮培养中红景天苷生物合成代谢的调控 I: 前体的影响[J]. 天然产物研究与开发, 1998, 10(2): 8-14
- [17] Landtag J, Baumert A, Degenkolb T, et al. Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase[J]. Phytochemistry, 2002, 60(7): 683-689
- [18] Ellis BE. Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*[J]. Phytochemistry, 1983, 22(9): 1941-1943
- [19] Wang YL. New synthetic method of  $\beta$ -(p-hydroxyphenyl)-ethyl alcohol[J]. Jiangsu Chemical Industry, 1992(3): 16,55 (in Chinese)  
王亚楼. 合成  $\beta$ -对羟基苯乙醇的新路线[J]. 江苏化工, 1992(3): 16,55
- [20] Zhang SQ, Shang GW, Li ZJ, et al. A new approach to synthesis of salidroside[J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 1997, 7(4): 256-257 (in Chinese)  
张三奇, 尚刚伟, 李中军, 等. 合成红景天苷的新途径[J]. 中国药物化学杂志, 1997, 7(4): 256-257
- [21] White EH. A new method for the deamination of aliphatic amines[J]. Journal of the American Chemical Society, 1954(17): 4497-4498
- [22] Zhu JT, Chen YQ, Dai LY, et al. Preparation of 4-(2'-methyl phenyl ethyl) phenol[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2001, 15(3): 299-301 (in Chinese)  
朱锦桃, 陈英奇, 戴立言, 等. 4-(2'-甲基苯乙基)苯酚的制备[J]. 高校化学工程学报, 2001, 15(3): 299-301
- [23] Strutz H, Frankfurt AM. Production of 4-Hydroxyphenethyl alcohol: US, 5003115[P]. 1991-10-02. <http://www.freepatentsonline.com/EP0449603.pdf>
- [24] Durrwachter JR. Production of Ethanol: US, 5254753[P]. 1993-10-19. <http://www.freepatentsonline.com/5254753.pdf>
- [25] Gao XH, Lei L, Deng XC. Improving the yield of salidroside and tyrosol by microbial enzyme method[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(9): 2137-2140 (in Chinese)  
高雪华, 雷蕾, 邓小晨. 微生物酶的方法提高红景天苷和酪醇的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2137-2140
- [26] Song WZ, Sun JF, Liu YY, et al. Raising the yield of salidroside and tyrosol by double strains synergistic fermentation[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(1): 156-159 (in Chinese)  
宋伟舟, 孙剑锋, 刘玉应, 等. 双菌株协同发酵提高红景天中苷和酪醇含量的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 156-159
- [27] Wang ML, Zhang F, Liu DS. Preliminary study on synthesis of salidroside through glucosylation of D-glucose and tyrosol catalyzed by microorganism[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2006, 27(3): 233-236 (in Chinese)  
王梦亮, 张芳, 刘滇生. 微生物催化 D-葡萄糖与酪醇葡萄糖基转移合成红景天苷的初步研究[J]. 催化学报, 2006, 27(3): 233-236
- [28] Guzmán-López O, Trigos A, Fernández FJ, et al. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(10): 1473-1477