

一株莴苣内生生产香酵母菌的分离、鉴定及挥发性香气成分分析

高 健, 许爱清, 唐新科
(湖南科技大学生命科学学院, 湖南 湘潭 411201)

摘 要: 通过平板划线分离法, 从茎用莴苣中分离出一株酵母样真菌, 命名为 G0901。形态学特征、生理实验以及 26S rDNA D1/D2 区序列分析表明, 该菌株属于 *Wickerhamomyces* 属的 *Wickerhamomyces anomalus*。采用 GC-MS 方法, 对该菌株麦芽汁发酵产生的挥发性香气成分进行检测, 结果表明: 该酵母菌发酵产生的香气组分主要为烯类和醇类, 包括柠檬烯、月桂烯、香桉烯、 α -蒎烯、罗勒烯、3-甲基-1-丁醇、苯乙醇和 2-辛醇等, 其中, 柠檬烯的相对含量高达 20%, 这在发酵产香的微生物当中较少存在。因此, G0901 菌株的分离为利用微生物高效生产柠檬烯提供了较好的研究材料。

关键词: 茎用莴苣; 异常威克汉姆酵母; D1/D2 区; GC-MS 分析

Isolation, Identification and Volatile Compound Analysis of an Aroma-producing Endophytic Yeast from Romaine Lettuce

GAO Jian, XU Ai-qing, TANG Xin-ke
(School of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract: A strain of yeast named as strain G0901 was isolated from romaine lettuce stem by streak plate method. Morphological characteristics, physiological and biochemical tests and 26S rDNA D1/D2 region sequence analysis revealed that it belonged to the species *Wickerhamomyces anomalus*. The major volatile compounds produced by the strain were identified by gas chromatography-mass spectrometry to be alkenes and alcohols, including limonene, myrcene, sabinene, α -pinene, ocimene, 3-methyl-1-butanol, phenylethyl alcohol and 2-octanol. The relative content of limonene was 20%, which has been found present in other aroma-producing microorganisms at lower levels. Thus, strain G0901 holds promise for efficient limonene production by microbial fermentation.

Key words: romaine lettuce; *Wickerhamomyces anomalus*; D1/D2 region; GC-MS analysis

中图分类号: Q939.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0162-05

内生真菌(endophytic fungi)一般是指其整个生活史或生活史的某个阶段生活在健康植物的组织中, 形成不明显病症的一类真菌^[1-2]。这类真菌生长在植物体的特殊生境中, 不但在促进宿主植物的生长发育、增强抗逆性等方面起着重要的作用, 而且许多内生真菌还能产生与其寄主植物相同或类似的生物活性物质^[3-4]。1993 年, 美国科学家 Stierle 首次从太平洋短叶红豆杉中分离到一株产新型活性物质的菌株 *Taxomyces andreanae*^[5], 这暗示着植物内生真菌可能是寻找天然活性物质的重要来源, 因此, 植物内生真菌活性物质的研究引起了人们

的广泛关注。以前的研究大多是从药用植物中分离获得产生多种药理活性物质的内生真菌^[6-10], 而从水稻、芹菜、莴苣和菊苣等农作物植物中寻找产活性物质的内生真菌的报道相对少得多^[11-13], 尤其是莴苣。

莴苣(*Lactuca sativa*)为菊科莴苣属的草本植物, 可分为叶用和茎用两类。作为一种蔬菜, 莴苣主要食叶片或叶球, 近年来在各大城市尤其是南方沿海各省的大城市有所发展, 成为当前增加花式品种的主要蔬菜之一。莴苣茎叶中含有莴苣素, 能增强胃液, 刺激消化, 增进食欲, 并具有镇痛和催眠的作用^[14]。此外, 莴苣

收稿日期: 2011-01-22

基金项目: 湖南省自然科学基金市州联合基金资助项目(10JJ9004)

作者简介: 高健(1972—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为资源微生物。E-mail: xtgojian@yahoo.com.cn

还含有丰富的VC,能预防和治疗坏血病,因此,莴苣不但是良好的蔬菜,而且还有食疗的功效^[15]。基于莴苣具有的独特而丰富的保健功效,推测从其组织中分离出来的内生菌的种类及其产物化学类型的多样性也较丰富,而且很有可能从中发现一些新的菌种及新的代谢产物。因此,近来本研究组对莴苣(包括叶用和茎用莴苣)内生真菌的多样性进行了初步调查。在调查的过程中,本实验室从许多健康的莴苣茎内空腔中的浅乳白色膏状物中分离到一株能产香的酵母样真菌G0901。因此,本研究的主要目的为:一是从形态、生理生化和分子水平了解这株酵母菌的分类地位,二是利用GC-MS技术了解这株酵母菌产生的香味的主要化学成分,为该菌株的进一步应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

酵母样真菌G0901分离于湖南科技大学周边菜地中的健康茎用莴苣。

1.2 试剂与仪器

酵母基因组DNA提取试剂盒(N0.D1900-50) 北京索莱宝科技有限公司;微量生化管 杭州天和微生物试剂有限公司;麦芽汁 湖南湘乡燕京啤酒厂;琼脂糖、*Taq*酶、dNTPs、引物 上海生工生物工程技术有限公司;MagExtractor®-PCR & GelCleanUp 凝胶回收试剂盒 日本Toyobo公司。

GC/MS-QP2100 气质联用仪 日本岛津公司;Olympus U-CMAD3 照相机、Olympus BX41TF 显微镜 日本奥林巴斯公司。

1.3 培养基

分离培养基与纯化培养基均为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);发酵培养基为麦芽汁液体培养基^[16];用于形态学观察的为YM培养基;用于观察子囊孢子的为McClary培养基;用于观察是否产假菌丝的为玉米粉琼脂培养基(CMA)。

1.4 内生酵母的分离

将莴苣的茎用无菌水洗净后,用75%乙醇浸泡5~10min,做表面消毒,再用无菌水冲洗多次。然后用已灭菌的手术刀将茎切开,用无菌接种环挑取莴苣茎内空腔中的少许浅乳白色膏状物接种在PDA平板上,置于28℃恒温培养箱中培养,当平板上长出菌落时,用接种环挑取菌落,连续划线传代培养几次,即得到纯化的菌株。

1.5 形态学观察与生理测试

将纯化的菌种分别接种于已灭菌的YM和CMA培养基上,25℃培养5~7d,观察菌落的形态,细胞形状、大小和无性繁殖方式,假菌丝的形成及其形态,并记

录气味特征。子囊孢子的观察及其生理生化特征按照《酵母菌的特征和鉴定手册》^[17]介绍的方法进行。

1.6 基因组DNA的提取和PCR扩增

1.6.1 DNA的提取

离心收集大约5mL的酵母细胞,用pH8.0的TE缓冲液洗涤3次,弃上清,沉淀备用。基因组DNA的提取采用酵母基因组DNA提取试剂盒完成。

1.6.2 26S rDNA的D1/D2区的PCR扩增

26S rDNA的D1/D2区的PCR扩增采用引物对^[18]:NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAA GACGG-3')。PCR反应体系(50μL):10×PCR缓冲液5.0μL;Mg²⁺(5mmol/L)3.0μL;dNTP(各5mmol/L)2.0μL;引物(20μmol/L)各1.0μL;*Taq* DNA聚合酶(1U/μL)1.0μL;模板2.0μL约20ng;去离子水35μL。扩增程序:94℃预变性3min;94℃30s,52℃30s,72℃40s,30个循环;72℃8min。取5μL产物于1%琼脂糖凝胶电泳。在紫外灯下观察结果。

1.7 PCR扩增产物的纯化、测序与系统发育分析

扩增的PCR产物用DNA凝胶回收试剂盒纯化。纯化产物由上海生工生物工程技术有限公司采用双向测序完成测序工作。

根据供试菌株的D1/D2区序列,运用Blast程序在GenBank数据库中分别进行同源序列搜索。根据同源序列搜索结果,下载相关菌种的D1/D2区域序列,与供试菌株的序列放在一起,用Mega4.1软件进行匹配排列,然后采用邻接法(Neighbor-Joining)进行系统树的构建^[19],并用Bootstrap软件对进化树进行1000次可信度分析^[20]。

1.8 挥发性香气成分分析

1.8.1 发酵条件和样品制备

活化好的酵母菌株G0901按体积分数5%接入上述麦芽汁发酵培养基中,于28℃、150r/min培养3d后,5000r/min离心收集发酵上清液,上清液加入适量体积的乙醚萃取6h,得上层透明有机相,待测。

1.8.2 气质联用分析条件

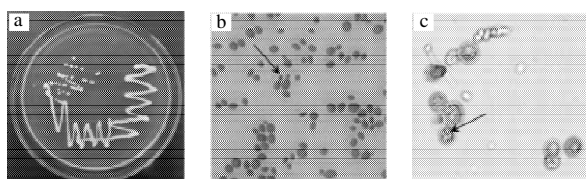
采用DB-5型色谱柱(30m×0.25mm,0.25μm);进样口温度250℃,起始温度40℃,保留1min,以5℃/min速率升至260℃,保留3min;MS条件为离子源温度200℃,接口温度220℃,扫描范围29~350 *m/z*,扫描方式Scan。各组分经面积归一法计算相对百分含量,经NIST08s.LIB谱库检索进行组分分析后,再进行人工谱图解析,确认各种组分。

2 结果与分析

2.1 G0901菌株的培养和形态特征

将G0901菌株接种于YM培养基上,于28℃培养2d

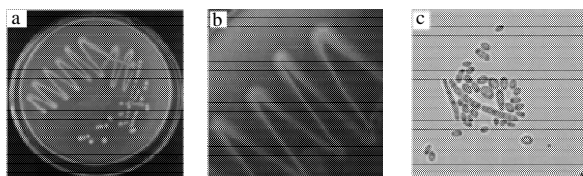
后,菌落为圆形,乳白色,质地均匀,边缘整齐,表面光滑、湿润、黏稠,易挑取,并散发清淡的香味。光学显微镜下,细胞呈球形、卵形至椭圆形,细胞大小为 $(3.0\sim 6.0)\mu\text{m}\times(4.4\sim 7.6)\mu\text{m}$,行出芽生殖,且为一端出芽(图1a、b)。取在 28°C 条件下培养1周的麦氏培养基上的细胞进行涂片染色,显微镜下观察,发现部分细胞产子囊孢子,且每一子囊内含有1~4枚子囊孢子,子囊孢子呈光滑的圆形或礼帽形(图1c)。



a.菌落; b.箭头表示行出芽生殖($\times 40$); c.箭头表示子囊孢子($\times 100$)。

图1 YM培养基上菌落形态及麦氏培养基上子囊孢子的形成
Fig.1 Colonies of strain G0901 in YM medium and the formation of ascospores in McClary medium

将G0901菌株划线接种于玉米琼脂培养基(CMA)上,于 28°C 培养5d后,菌落呈乳白色,四周呈放射状(图2a、b),挑取菌落镜检观察到假菌丝的形成(图2c)。



a.原始照片($\times 40$); b.部分放大后的照片($\times 100$); c.细胞形成假菌丝($\times 40$)。

图2 CMA培养基上的菌落形态及假菌丝的光学显微照片
Fig.2 Colonies of strain G0901 in CMA medium and optical micrograph of its pseudohyphae

上述形态学特征表明,G0901菌株应该属于单细胞但可形成假菌丝、无性生殖行出芽生殖、有性生殖产子囊孢子的酵母类真核生物。

2.2 生理生化实验结果

从表1可以看出,对照《酵母菌的特征与鉴定手册》检索表^[17]和最新的酵母分类系统^[21],G0901菌株与Wickerhamomyces属的Wickerhamomyces anomalus(以前叫作Pichia anomala)的特征极为相似。

表1 G0901菌株的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain G0901

实验名称	实验结果	实验名称	实验结果
同化实验		菊糖	—
纤维二糖	+	D-木糖	V
甘油	+	D-阿拉伯糖	—
半乳糖醇	—	L-阿拉伯糖	V
D-山梨糖醇	+	D-核糖	V
琥珀酸	+	D-葡萄糖胺	—
硝酸盐	+	N-乙酰-D-葡萄糖胺	—
肌醇	—	甲醇	—
2-酮-D-葡萄糖酸	—	α -甲基-D-葡萄糖苷	+
纤维二糖	+	发酵实验	
甘油	+	葡萄糖	+
5-酮-D-葡萄糖酸	—	麦芽糖	V
水杨苷	+	海藻糖	—
D-葡萄糖-1,5-内酯	V	松三糖	W
D-甘露糖醇	+	半乳糖	V
葡萄糖	+	乳糖	—
L-山梨糖	—	纤维二糖	—
淀粉	+	蜜二糖	—
L-鼠李糖	—	蔗糖	+
赤藓糖醇	+	棉子糖	W
核糖醇	V	菊糖	—
柠檬酸	+	好氧条件下D-葡萄糖为唯一碳源的生长实验	
D-半乳糖	V	明胶液化实验	—
D-蜜二糖	—	淀粉形成实验	—
蔗糖	+	MEA生长情况	+
麦芽糖	+	无维生素培养基	+
乙醇	+	37℃生长情况	+
DL-乳酸	+	45℃生长实验	+
海藻糖	+	尿素水解实验	—
乳糖	—	50g/100mL葡萄糖	+
棉子糖	+		
松三糖	+		

注: +.强阳性; W.弱阳性; V.可变; —.阴性。

2.3 基于26S rDNA序列的系统发育分析

传统上,酵母分类主要强调形态学和培养特征,但随着现代生物学技术的发展,这些经典的酵母鉴定方法逐渐被一些新的方法,如染色体核型分析、核糖体内转录间隔区分析(ITS序列)、核糖体26S大亚基序列(D1/D2区)分析和肌动蛋白基因分析等所取代^[18, 22-25]。尤其是基于D1/D2区序列的系统发育分析在酵母的分类鉴定中显示出强大的分辨能力。在当前研究中,采用非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA),基于供试菌株和其他相关菌株的D1/D2区序列的系统发育树被构建(图3)。从图3可以看出,G0901菌株(D1/D2序列登陆号HQ891142)与Wickerhamomyces anomalus的模式菌株NRRL Y-366T类聚在相同的一组,而且Bootstrap检验的支持百分率高达93%。这充分表明该菌株与W.anomalus具有高度的亲缘关系。事实上,采用邻接法(Neighbor-Joining)和最大似然法(maximum likelihood)构建的系统发育树所得到的

结果与 UPGMA 法得到的结果也是一致的。

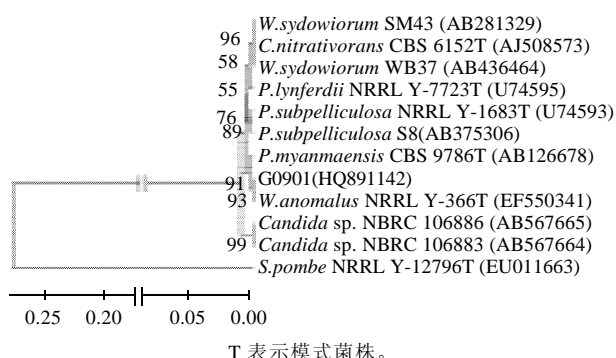


图3 基于 26S rDNA D1/D2 序列和 UPGMA 法构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree established from UPGMA analysis based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequence

2.4 挥发性香气成分分析

考虑到工业应用,本研究采用麦芽汁作为菌株 G0901 的发酵底物,发酵过程中产生的挥发性成分经质谱检测,其结果见表 2。本研究以麦芽汁液体培养基作空白对照。

表2 菌株 G0901 发酵液挥发性香气成分及相对含量

Table 2 Aromatic volatile composition and their relative contents in the fermentation supernatant of strain G0901

保留时间/min	化合物	分子式	相对分子质量	相对含量/%	峰面积
3.970	3-甲基-1-丁醇	C ₅ H ₁₂ O	88	9.44	1536744
6.408	2-辛醇	C ₈ H ₁₈ O	130	1.65	720645
6.575	2-呋喃醇	C ₅ H ₆ O ₂	98	0.73	279399
6.916	2-乙氧基-3-氯丁烷	C ₆ H ₁₃ ClO	136	0.47	125638
7.150	醋酸戊酯	C ₇ H ₁₄ O ₂	130	0.13	52720
8.579	水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.18	60625
8.809	α-蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.86	246099
10.048	香桉烯	C ₁₀ H ₁₆	136	2.19	833903
10.562	月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	136	3.18	1491154
11.714	异丙基对甲苯	C ₁₀ H ₁₄	134	0.16	88804
11.884	柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	136	9.28	3509419
12.584	香茅醇	C ₁₀ H ₂₀ O	156	0.01	8606
12.793	γ-萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.16	93788
14.605	苯乙醇	C ₈ H ₁₀ O	122	5.21	2695411
15.015	罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	136	0.44	273717
20.617	4-乙基-2-甲氧基苯酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	150	0.12	72390

由表 2 可知,菌株 G0901 产生的挥发性成分大多为烯烃类和醇类两大类,其中前者主要包括柠檬烯、月桂烯、香桉烯、α-蒎烯和罗勒烯等,后者主要包括 3-甲基-1-丁醇、苯乙醇和 2-辛醇等。除此之外,还有少量的酯类如醋酸戊酯等其他物质。上述这些烯烃类和醇类所产生的香气相互综合,赋予发酵后麦芽汁浓郁的清香。

在研究发酵产香的微生物中,酵母发酵产香的报道较为常见^[26-28]。而且,酵母发酵产香目前较多的是应用于酱油酿造行业,其他行业应用较少。因此,生香酵母资源的开发仍是一个具有巨大潜力的市场。本研究从莴苣中分离到的 *W.anomalous* G0901 菌株发酵麦芽汁产生的香气中,烯烃的相对含量相当高,约占 17%,如果排除溶剂乙醚的相对含量(约 53%),实际约占 37% 以上,尤其是柠檬烯的相对含量高达 9.3%(排除乙醚的相对含量后,约占 20%),这在发酵产香的微生物中是非常罕见的。柠檬烯是多种水果(主要为柑橘类)、蔬菜及香料中存在的天然成分。许多证据支持柠檬烯在癌症预防和胆固醇结石治疗中有作用^[29-31]。尽管在柑橘类水果(特别是其果皮)、香料和草药的精油中含量较高,尤其是橙皮精油中柠檬烯含量高达 90%~95% 以上。但植物生长周期长,占用土地面积较多,成本较高。而微生物生长繁殖速度快,现代发酵工业发展迅速,成本较低。因此, *W.anomalous* G0901 菌株的分离为利用微生物高效生产柠檬烯提供了极好的研究材料。

3 结 论

从来自湖南科技大学周边菜地中的茎用莴苣中分离到一株酵母样真菌,命名为 G0901。结合形态学、生理生化特征以及核糖体 26S 大亚基 D1/D2 区序列分析,该菌株被鉴定为 *Wickerhamomyces anomalous*。

鉴于菌株 G0901 培养时所发出的淡淡的清香味及其工业应用,本研究采用 GC-MS 手段,检测了菌株 G0901 发酵麦芽汁产生的各种挥发性成分。结果表明:菌株 G0901 产生的挥发性成分大多为烯类和醇类两大类,主要包括柠檬烯、月桂烯、香桉烯、α-蒎烯、罗勒烯、3-甲基-1-丁醇、苯乙醇和 2-辛醇等,尤其是柠檬烯,其相对含量高达 20%,这在发酵产香的微生物中较少存在。因此, G0901 菌株的分离为利用微生物高效生产柠檬烯提供了较好的研究材料。

参考文献:

- [1] CARROLL G C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. Ecology, 1988, 69: 2-9.
- [2] WILSON D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition[J]. Oikos, 1995, 73: 274-276.
- [3] BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, et al. Biological effects of essential oils: a review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46 (2): 446-475.
- [4] SCHULZ B, BOYLE C, DRAEGER S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites[J]. Mycological Research, 2002, 106(9): 996-1004.
- [5] STIERLE A, STROBEL G A, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*[J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [6] HUANG Wuyang, CAI Yizhong, XING Jie, et al. A potential antioxi-

- dant resource: endophytic fungi from medicinal plants[J]. Economic Botany, 2007, 61(1): 14-30.
- [7] HUANG W Y, CAI Y Z, HYDE K D, et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants[J]. Fungal Diversity, 2008, 33: 61-79.
- [8] 胡凤, 程玉鹏, 王振月, 等. 药用植物内生真菌研究现状及其应用前景[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 781-783.
- [9] KUSARI S, ZÜHLKE S, SPITELLER M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues[J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(1): 2-7.
- [10] LIU Kaihui, DING Xiaowei, DENG Baiwan, et al. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(9): 1171-1177.
- [11] D'AMICO M, FRISULLO S, CIRULLI M. Endophytic fungi occurring in fennel, lettuce, chicory, and celery-commercial crops in southern Italy [J]. Mycological Research, 2008, 112(Pt 1): 100-107.
- [12] 霍红雁, 卢萍, 牛艳芳, 等. 小花棘豆(*Oxytropis glabra* DC.)11株内生真菌的分离培养及鉴定[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2010, 41(2): 206-211.
- [13] LARRAN S, ROLLAN C, BRUNO ANGELES H, et al. Nota Corta: endophytic fungi in healthy soybean leaves[J]. Investigación Agraria Producción y Protección Vegetales, 2002, 17(1): 173-178.
- [14] REN Yulin, ZHOU Yawei, YE Yunhua. Chemical components of *Lactuca* and their bioactivities[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2004, 39(11): 954-960.
- [15] 戴国辉, 孙志栋, 吴海军, 等. 莴笋的营养保健价值及其加工开发[J]. 农产品加工: 学刊, 2008, 154(11): 43-46.
- [16] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 78-79.
- [17] 巴尼特 J A, 佩恩 R W, 亚罗 D. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [18] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义[J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32.
- [19] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [20] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [21] KURTZMAN C P, ROBNETT C J, BASEHOAR-POWERS E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 8(6): 939-954.
- [22] 吴作为, 白逢彦. 大亚基 rRNA 基因 D1/D2 区序列相同或相似的子囊菌酵母 ITS 序列比较和核型分析[J]. 菌物学报, 2005, 24(2): 193-198.
- [23] WANG Shian, BAI Fengyan. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(Pt 2): 510-514.
- [24] ESPOSTO M C, COGLIATI M, TORTORANO A M, et al. Electrophoretic karyotyping of *Cryptococcus neoformans* AD-hybrid strains[J]. Mycoses, 2009, 52(1): 16-23.
- [25] DANIEL H M, SORRELL T C, MEYER W. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(4): 1593-1606.
- [26] 李锐, 冯奎, 吴婧, 等. 不同来源酿酒酵母对柑橘果酒香气成分的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 206-213.
- [27] 付俊淑, 庄世文, 徐丹丹, 等. 酵母分离株分子鉴定及其挥发性香气成分检测分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 44-48.
- [28] 廖永红, 沈晗, 石文娟, 等. 产香酵母碳源利用及发酵产香特性初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(2): 1-6.
- [29] KARLSON J, BORG-KARLSON A K, UNELIUS R, et al. Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes *in vitro*: evidence of a Ras-independent mechanism of action[J]. Anticancer Drugs, 1996, 7(4): 422-429.
- [30] LOBELL R B, KOHL N E. Pre-clinical development of farnesyltransferase inhibitors[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 1998, 17(2): 203-210.
- [31] VIGUSHIN D M, POON G K, BODDY A, et al. Phase I and pharmacokinetic study of *D*-limonene in patients with advanced cancer. Cancer research campaign phase I / II clinical trials committee[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1998, 42(2): 111-117.