

DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20210189

合成绿原酸内生细菌的筛选、鉴定及发酵 培养基的初步优化

邱萌霞¹, 果秀梅¹, 薛冰², 张泽洋¹, 贾士儒¹, 崔建东¹

(1. 食品营养与安全国家重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

2. 山东大树达孚特膳食品有限公司, 菏泽 274000)

摘要: 目前绿原酸的主要来源为天然植物中提取, 但天然植物中绿原酸含量较低且提取工艺复杂, 导致绿原酸生产效率较低, 因此有必要寻找新的、高效的制备绿原酸方法。本研究以金银花叶、红薯叶、薄荷叶、蒲公英叶和杜仲叶为材料, 采用组织块法开展合成绿原酸的内生菌分离筛选, 并利用高效液相色谱(HPLC)对筛选出内生菌的发酵产物进行分析, 最终从植物样本中分离到具有合成绿原酸能力的5株内生菌, 其中菌株XJ-1的绿原酸产量为9.9 μg/mL。形态特征和16S rDNA序列分析表明, 该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。对发酵培养基进行初步优化, 优化后的发酵培养基主要成分为: 果糖 30 g/L、柠檬酸铵 5 g/L、玉米浆 6 g/L, 所得绿原酸的产量达到24.02 μg/mL, 为优化前的2.43倍。本研究为开发微生物发酵法生产绿原酸提供了基础数据支持。

关键词: 绿原酸; 菌株筛选; 菌株鉴定; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: Q814.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2022)02-0001-06

Screening and Identification of Endophytic Bacteria for Chlorogenic Acid Synthesis and Preliminary Optimization of Fermentation Medium

QIU Mengxia¹, GUO Xiumei¹, XUE Bing², ZHANG Zeyang¹, JIA Shiru¹, CUI Jiandong¹

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Biotechnology,

Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Shandong Bigtree Dreyfus Special Food Co., Ltd., Heze 274000, China)

Abstract: Nowadays, the main source of chlorogenic acid is extracted from natural plants. However, the content of chlorogenic acid in plants is low and the extraction process is complicated, thus causing low productivity of chlorogenic acid. Therefore, it is necessary to find a new and efficient method to prepare chlorogenic acid. In this study, the endophytic bacteria with synthesizing chlorogenic acid were isolated from honeysuckle leaves, sweet potato leaves, mint leaves, dandelion leaves and eucommia ulmoides leaves by tissue mass method. The fermentation products of endophytic bacteria were analyzed by HPLC. Finally, five endophytic bacteria with the ability to synthesize chlorogenic acid were isolated from the plant samples. Among the five endophytic bacteria, the yield of chlorogenic acid in strain XJ-1 was 9.9 μg/mL. The endophytic strain was identified as *Bacillus subtilis* strain based on morphological characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The fermentation medium was preliminarily optimized. The optimal fermentation medium was determined to be 30 g/L fructose, 5 g/L ammonium citrate and 6 g/L corn starch. Under the optimized medium, the yield of chlorogenic acid reached 24.02 μg/mL, and was 2.43 times higher than that before optimization. This study has laid a foundation for the development

收稿日期: 2021-09-26; 修回日期: 2021-12-09

基金项目: 天津市科技计划项目(20ZYJJC00080); 广西重点研究发展计划项目(桂科 AB21238005)

作者简介: 邱萌霞(1997—), 女, 河北保定人, 硕士研究生; 通信作者: 崔建东, 教授, jdcui@tust.edu.cn

of microbial fermentation to produce chlorogenic acid.

Key words: chlorogenic acid; strain screening; strain identification; *Bacillus subtilis*

绿原酸(chlorogenic acid, CGA)又称咖啡酰奎宁酸,是金银花、杜仲、咖啡、茵陈等许多中草药的主要活性成分之一,是广泛存在于各种植物中的苯丙素类化合物^[1]. 研究^[2]发现绿原酸具有清除自由基、抗菌、抗病毒、抗肿瘤以及预防糖尿病、高血脂、肝炎等多种生物活性,在食品、医药、日用化工等领域被广泛应用^[3-5],且近年绿原酸已被国家食品药品监督管理局批准为抗癌药物^[6-7].

目前绿原酸的主要生产方法主要是通过超声波法、水提取法等方法从植物的根、叶、花、果实中直接进行提取,如马铃薯皮^[8-9]、微藻、紫甘薯^[10]、草本植物等^[11]. 由于中药植物生长周期长、资源匮乏,绿原酸含量低以及提取工艺复杂、成本高等问题,导致绿原酸生产效率较低.

植物内生菌是生活在健康植物各种组织和器官内部或细胞间隙,对植物无害的一些真菌或细菌^[12]. 目前从藻类、苔藓、蕨类、裸子植物和被子植物中均已分离到内生菌,具有丰富的生物多样性^[13]. 研究^[14]表明,内生菌可以产生与宿主相同或相似的活性成分,是宿主植物活性物质的良好替代生产资源. 刘洋露等^[15]从金银花中分离得到了合成绿原酸的内生细菌 B3. 冷慕婵等^[16]以金银花的不同部位为原材料,采用组织块法从金银花中筛选分离出 80 株具有合成绿原酸能力的内生真菌. 以上结果表明,某些中药植物内生菌具有合成绿原酸的能力.

因此,本研究从金银花叶、红薯叶、薄荷叶、蒲公英叶和杜仲叶中分离筛选出具有合成绿原酸的内生菌,进而通过微生物发酵技术高效生产绿原酸. 这样,不仅可以减少对中药植物的依赖,而且会降低绿原酸的生产成本,并将为开发产绿原酸工程菌株以及微生物发酵生产绿原酸奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

合成绿原酸内生菌的植物来源:金银花叶、红薯叶、薄荷叶、蒲公英叶和杜仲叶,市售.

1.1.2 试剂与仪器

氢氧化钠,分析纯,博欧特(天津)化工贸易有限

公司;无水乙醇和乙酸乙酯,分析纯,天津市津东天正精细化学试剂厂;甲醇,色谱纯,天津市康科德科技有限公司;氯化钠和氯化铝,分析纯,天津市四通化工厂;琼脂粉和牛肉膏,生物试剂,北京奥博星生物技术有限公司;胰蛋白胨,生物试剂,赛默飞世尔科技公司;绿原酸(标准品),北京索莱宝科技有限公司.

LRH-250-SHE 型恒温恒湿培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司;ZHJH-C1115B 型生物洁净工作台,上海智城分析仪器制造有限公司;LDZX-75L-I 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;VOS-90A 型真空干燥箱,上海恰森仪器有限公司;GZX-9070 型电热鼓风干燥箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;DTC-15J 型超声波清洗机,上海比浪仪器制造有限公司;ZQZY-CS8 型振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司.

1.2 方法

1.2.1 绿原酸标准溶液的配制

以 50% 甲醇为溶剂,分别配制质量浓度为 5、25、50、75、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 绿原酸标准溶液.

1.2.2 培养基的配制

牛肉膏蛋白胨筛选培养基:牛肉膏 3 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, 琼脂 20 g/L, AlCl_3 0.75 mmol/L, pH 7.2 ~ 7.4, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌.

初始发酵培养基:牛肉膏 3 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌.

单因素优化基础培养基:磷酸二氢钾 1 g/L,磷酸氢二钾 1 g/L, NaCl 1 g/L, 121 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌.

1.2.3 合成绿原酸内生菌的分离与纯化

参考 Weber 等^[17]的方法,将新鲜的金银花叶、红薯叶、薄荷叶、蒲公英叶和杜仲叶用无菌水清洗 3 次,置于超净工作台后紫外灭菌 30 min,将叶片样品用无菌水清洗后放入 75% 的酒精中浸泡 60 s,取出叶片样品用无菌水清洗 2 次后放入 0.5% 次氯酸钠溶液中浸泡 15 s,再次用无菌水冲洗叶片样品. 将叶片样品置于超净工作台后吹干,用无菌剪切成 1 cm 的小段. 将 5 种叶片样品切口向下分别置于牛肉膏蛋白胨筛选培养基平板上,以最后一次无菌水冲洗液和完整灭菌叶片为对照,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养 48 h. 将长出的红色菌落划线接种在牛肉膏蛋白胨培

培养基上,置于 37 ℃ 的培养箱中培养 48 h, 分离得到单菌落。

1.2.4 菌种液体发酵培养

将分离出的单菌落接种到液体发酵培养基中,置于 37 ℃、200 r/min 的恒温摇床中培养 48 h, 对液体发酵培养基进行初步优化。

碳源优化: 分别选择蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖和乳糖作为唯一碳源, 设置 5 个质量浓度梯度 10、20、30、40、50 g/L. 以不添加碳源为对照组, 对筛选出来的菌株进行液体发酵培养(37 ℃、200 r/min 培养 48 h), 发酵结束后测定各发酵液中绿原酸含量。

氮源的优化: 分别选择蛋白胨、牛肉膏和玉米浆作为唯一有机氮源, 硫酸铵、氯化铵和柠檬酸铵作为唯一无机氮源; 设置 5 个质量浓度梯度 3、4、5、6、7 g/L, 以不添加氮源作为对照组, 对筛选出来的菌株进行液体发酵培养(37 ℃、200 r/min 培养 48 h), 发酵结束后测定各发酵液中绿原酸含量。

正交实验优化: 根据单因素实验结果, 选择对绿原酸合成影响显著的碳源、无机氮源和有机氮源进行 3 因素 3 水平正交实验, 确定发酵培养基主要成分的最佳组合。

1.2.5 绿原酸的定性和定量测定

标准曲线的绘制: 利用高效液相色谱(HPLC)对绿原酸的含量进行定量测定(出峰面积)。以不同质量浓度绿原酸标准品为横坐标、峰面积为纵坐标。标准曲线的回归方程为 $y = 26.795x + 36.897$, $R^2 = 0.9995$ 。

发酵液中绿原酸的初步分离: 3 mL 发酵液于 10 mL 离心管中超声破碎 30 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液并加入等体积的 70% 乙醇溶液, 充分混匀后真空浓缩, 再加入等体积的乙酸乙酯萃取, 取乙酸乙酯层真空浓缩后, 再加入等体积的 50% 甲醇溶液进行溶解, 待用。

HPLC 检测条件: C18 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.5% 乙酸, 流动相 B 为 80% 乙腈水溶液, 流量 1.0 mL/min, 柱温 35 ℃, 326 nm 紫外

检测, 进样量为 10 μL。

1.2.6 菌株的形态鉴定

使用扫描电子显微镜和光学显微镜观察菌体形态。

1.2.7 菌株的分子鉴定

利用菌落 PCR 技术扩增内生菌的 16S rDNA 基因。PCR 体系: 菌液 0.4 μL, ddH₂O 8 μL, Taq 酶 10 μL, 上游引物(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 0.8 μL, 下游引物(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 0.8 μL。反应程序: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 15 s, 52 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 5 min, 循环 30 次。

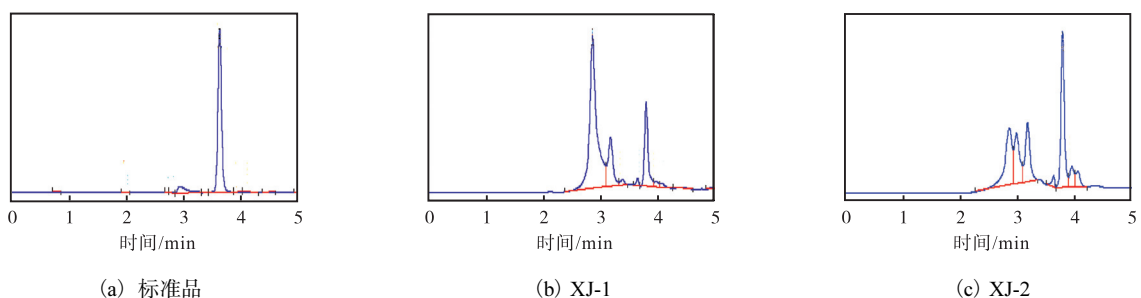
对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(浓度为 1.0%)验证。0.2 g 琼脂糖加入 20 mL 电泳缓冲液(TAE 溶液)中混匀后放入微波炉加热融化, 加入 1 μL 溴化乙锭(5 000 ×)染料充分混匀, 将上述混合液倒入制胶板中凝固, 获得琼脂糖凝胶。将琼脂糖凝胶放入含有电泳液的电泳槽中, 取 5 μL PCR 产物和 2 μL 上样缓冲液混合均匀后加入凝胶孔中, 接通电源开始电泳。

16S rDNA 序列比对和系统发育分析: 将 PCR 扩增产物送金唯智测序公司测序, 并将测序结果在 NCBI 上 GenBank 数据库中利用 BLAST 和 KEGG 搜索与菌株 XJ-1 的 16S rDNA 相关序列, 利用 MEGA7.0 进行系统进化树的构建。

2 结果与分析

2.1 产绿原酸菌株的分离与发酵产物的鉴定

按照 Weber 等^[17]的方法, 在 pH 6.5 ~ 7.5 的范围内, Al³⁺可以与绿原酸上的羟基进行配位, 形成相对稳定的 CGA-Al³⁺络合物, 在培养基中显示为红色。按照此原理, 从金银花叶、薄荷叶、蒲公英叶、杜仲叶和红薯叶中初步分离得到可能具有合成绿原酸能力的 5 株内生菌(分别记为 XJ-1、XJ-2、XJ-3、XJ-4、XJ-5)。为了判断菌株是否真正具有合成绿原酸的能力, 使用 HPLC 的方法进一步测定了发酵液中的绿原酸含量, 结果如图 1 所示。



(a) 标准品

(b) XJ-1

(c) XJ-2

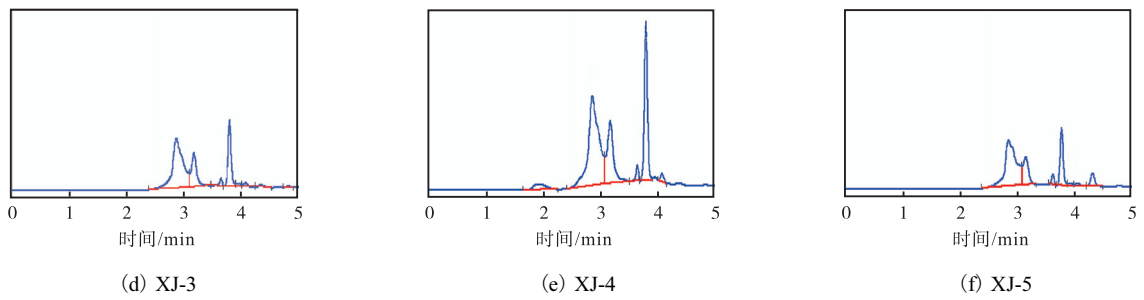


图1 绿原酸的HPLC图

Fig. 1 HPLC chart of chlorogenic acid

由图1可以看出:筛选出的各菌株发酵产物和绿原酸标准品具有相同的保留时间,均在3.613 min左右,表明这5株菌均具有生产绿原酸的能力.同时,HPLC的定量检测表明,内生菌株XJ-1、XJ-2、XJ-3、XJ-4和XJ-5发酵液中的绿原酸含量分别为9.9、3.2、6.6、5.8、4.9 μg/mL.合成绿原酸能力最强的为菌株XJ-1,因此后续选择菌株XJ-1为鉴定和优化培养的

菌株.

2.2 菌株的形态及革兰氏染色分析

菌株XJ-1的形态鉴定如图2所示.菌株形状为圆形,边缘整齐,较黏稠,表面光滑,有隆起,颜色为白色,从菌落形态上初步判断菌株XJ-1为细菌.革兰氏染色表明菌株XJ-1为革兰氏阳性细菌.扫描电子显微镜观察菌株XJ-1为杆状菌.

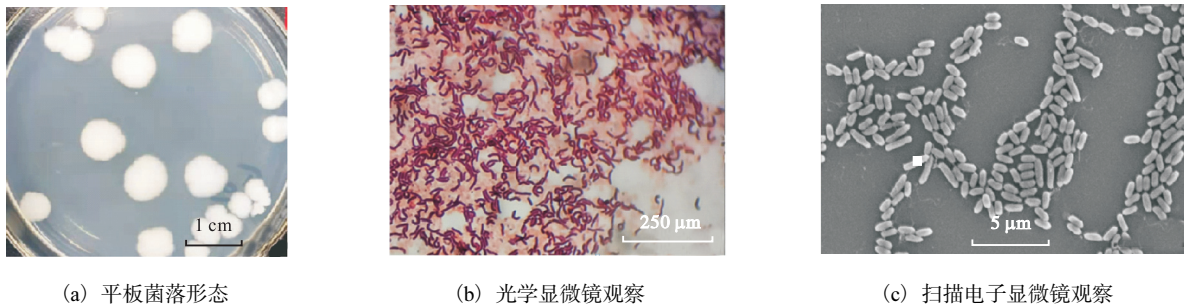


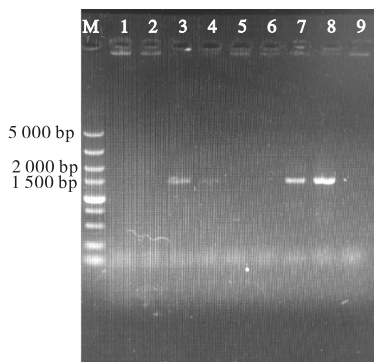
图2 菌株XJ-1的形态鉴定

Fig. 2 Morphological identification of strain XJ-1

2.3 菌株的分子鉴定

采用PCR技术对菌株XJ-1的16S rDNA基因进行体外扩增,并利用琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行验证,结果如图3所示.

图3结果表明成功扩增出16S rDNA基因,该基因序列大小为1500 bp左右,与细菌的16S rDNA基因大小基本一致^[18].对该基因在NCBI数据库上进行序列同源性比对,发现它与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)相似度为97%,因此判断该菌株为枯草芽孢杆菌.



M. marker; 1—9. 温度分别为47.4、48.1、49.0、50.2、51.6、53.0、54.3、55.5、56.4 °C的PCR扩增结果

图3 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis

利用MEGA7.0软件构建了包含有芽孢杆菌等13个基因序列的系统进化树(图4).从系统进化树可以看出,菌株XJ-1与枯草芽孢杆菌位于同一集群组,表明菌株XJ-1属于枯草芽孢杆菌.

2.4 发酵培养基的初步优化

2.4.1 碳源

分别选择葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和果糖为唯一碳源,考察不同碳源对菌株XJ-1合成绿原酸的影响.结果显示当碳源为蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和乳糖时,发酵液中绿原酸的含量较低(小于1 μg/mL),表明该菌株不能很好地利用这4种碳源合成绿原

酸. 当以果糖为碳源时, 发酵液中却有绿原酸产生, 因此以果糖为唯一碳源, 研究不同浓度的果糖对绿原酸产量的影响, 结果如图 5 所示. 随着果糖浓度的增加, CGA 的含量先增加后减少, 在果糖质量浓度为

30 g/L 时, CGA 的含量达到最大值(7.39 μg/mL), 说明高浓度的果糖可能会抑制菌株 XJ-1 合成绿原酸, 因此选择 30 g/L 果糖作为碳源浓度.

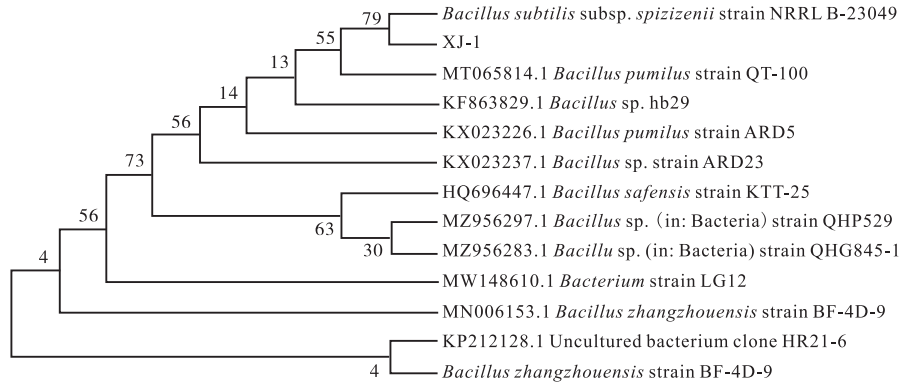


图 4 菌株 XJ-1 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain XJ-1

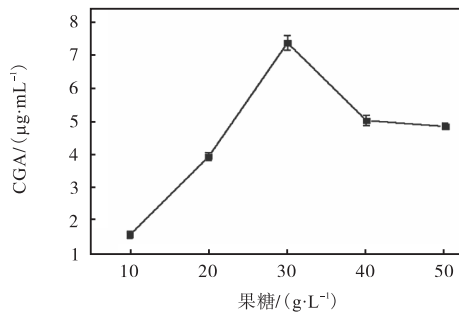


图 5 不同果糖浓度对菌株 XJ-1 合成绿原酸的影响

Fig. 5 Effects of different fructose concentrations on chlorogenic acid synthesis by strain XJ-1

2.4.2 氮源

考察了不同种类和浓度的氮源对菌株 XJ-1 合成绿原酸的影响, 结果如图 6 所示.

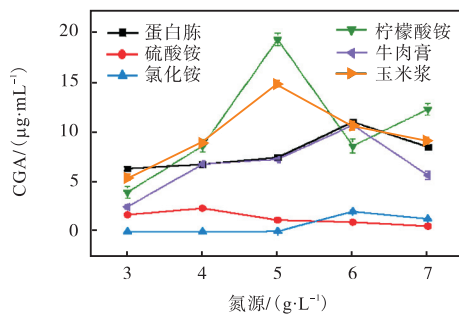


图 6 不同氮源对 XJ-1 合成绿原酸的影响

Fig. 6 Effects of different nitrogen source on chlorogenic acid synthesis by strain XJ-1

不同种类和浓度的氮源对菌株 XJ-1 合成绿原酸的影响有明显差距. 菌株 XJ-1 合成绿原酸的产量随着蛋白胨、牛肉膏、玉米浆、硫酸铵、氯化铵和柠檬酸

铵浓度的增加呈现出先增加后降低的趋势. 在所选择的氮源中, 利用柠檬酸铵为无机氮源时, 菌株 XJ-1 表现出最高的合成绿原酸的能力; 利用玉米浆为有机氮源时, 菌株 XJ-1 合成绿原酸的能力最高.

2.4.3 发酵培养基主要成分的正交优化实验

根据单因素实验结果, 选择果糖、柠檬酸铵、玉米浆进行 3 因素 3 水平的正交实验, 结果见表 1, 方差分析见表 2.

表 1 正交实验设计及其对绿原酸产量的影响

Tab. 1 Orthogonal experimental design and its effect on chlorogenic acid yield

实验	果糖/(g·L ⁻¹)	柠檬酸铵/(g·L ⁻¹)	玉米浆/(g·L ⁻¹)	CGA/(μg·mL ⁻¹)
1	25	4	4	22.93
2	25	5	5	19.04
3	25	6	6	14.36
4	30	4	5	21.96
5	30	5	6	24.02
6	30	6	4	14.60
7	35	4	6	18.19
8	35	5	4	12.65
9	35	6	5	14.37
k ₁	18.78	21.03	16.73	
k ₂	20.19	18.57	18.46	
k ₃	15.07	14.44	18.86	
R	5.12	6.59	2.13	

表 2 方差分析

Tab. 2 Variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 比
果糖	41.99	2	21.00	1.51
柠檬酸铵	66.4	2	33.20	2.38
玉米浆	7.69	2	3.84	0.28
总平方和	143.95	8		

从表 1 可以看出,各因素极差的大小反映了其对菌株 XJ-1 产绿原酸能力影响的主次,极差越大,影响越显著^[19],故主次因素依次为柠檬酸铵>果糖>玉米浆。由表 2 可知:3 个因素对产量的影响都不是特别显著;此外,由表 1 可见以第 5 组的条件培养时绿原酸产量最高,即绿原酸的产量达到了 24.02 $\mu\text{g/mL}$,因此确定最优碳源为果糖 30 g/L,最优无机氮源为柠檬酸铵 5 g/L,最优有机氮源为玉米浆 6 g/L。Magdalena 等^[20]采用响应面(RSM)法优化水提法提取茶叶中的 CGA,获得的最大 CGA 含量仅为 $(6.66 \pm 0.58) \mu\text{g/mL}$ 。相比而言,本研究利用通过初步正交优化内生菌培养基的主要成分所获得绿原酸最大产量为 24.02 $\mu\text{g/mL}$,是 Magdalena 等^[20]产量的 3.6 倍,是菌株 XJ-1 合成绿原酸初始发酵培养产量(9.9 $\mu\text{g/mL}$)的 2.43 倍。表明微生物发酵法在合成绿原酸方面存在较大的优势。

3 结 论

本研究从中药植物样本中分离到具有合成绿原酸能力的 5 株内生菌,5 株菌产绿原酸的能力大小为 XJ-1>XJ-3>XJ-4>XJ-5>XJ-2,菌株 XJ-1 合成绿原酸的产量为 9.9 $\mu\text{g/mL}$ 。形态特征和 16S rDNA 序列分析鉴定结果表明,菌株 XJ-1 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。经过对发酵培养基的初步优化,确定优化后的培养基主要成分为果糖 30 g/L、柠檬酸铵 5 g/L、玉米浆 6 g/L,在此培养基条件下,菌株 XJ-1 合成绿原酸的产量为 24.02 $\mu\text{g/mL}$,是初始发酵培养基的 2.43 倍。本研究结果为开发产绿原酸工程菌株以及微生物发酵生产绿原酸提供了基础数据支持。

参考文献:

[1] FU S, WU C, WU T, et al. Preparation and characterisation of chlorogenic acid-gelatin: a type of biologically active film for coating preservation[J]. Food chemistry, 2017, 221: 657-663.

[2] MILLS C E, ORUNA-CONCHA M J, MOTTRAM D S, et al. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee[J]. Food chemistry, 2013, 141(4): 3335-3340.

[3] FACINO R M, CARINI M, ALDINI G, et al. Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: potential use of *Echinacea* extracts in the prevention of skin photodamage[J]. Planta

medica, 1995, 61(6): 510-514.

[4] HIRASAWA M, SHIMURA K, SHIMIZU A, et al. Quantification and functional analysis of dietary fiber and polyphenols in avocado[J]. Nippon shokuhin kogyo gakkaiishi, 2008, 55(3): 95-101.

[5] WILSKA-JESZKA J, KORZUCHOWSKA A. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation influence on the colour of strawberry and chokeberry juices[J]. Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und forschung, 1996, 203(1): 38-42.

[6] ZHAN Y, LI R, FENG C, et al. Chlorogenic acid inhibits esophageal squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo by downregulating the expression of BMI1 and SOX2[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2020, 121: 109602.

[7] REN T, WANG Y, WANG C, et al. Isolation and identification of human metabolites from a novel anti-tumor candidate 1015 drug 5-chlorogenic acid injection by HPLC-HRMS/MSⁿ and HPLC-SPE-NMR[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2017, 409(30): 7035-7048.

[8] DOURADO C, PINTO C, BARBA F J, et al. Innovative non-thermal technologies affecting potato tuber and fried potato quality[J]. Trends in food science & technology, 2019, 88: 274-289.

[9] ALVES-FILHO E G, SOUSA V M, RIBEIRO P R V, et al. Single-stage ultrasound-assisted process to extract and convert alpha-solanine and alpha-chaconine from potato peels into beta-solanine and beta-chaconine[J]. Biomass conversion and biorefinery, 2018, 8: 689-697.

[10] ZHU Z, GUAN Q, KOUBAA M, et al. HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction[J]. Food chemistry, 2017, 215: 391-400.

[11] SOUSA A D, RIBEIRO P R V, CANUTO K M, et al. Drying kinetics and effect of air-drying temperature on chemical composition of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus niruri*[J]. Drying technology, 2018, 36(5): 1351454.

[12] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004(2): 86-91.

[13] 杨志军, 邓毅, 曼琼, 等. 内生菌在天然药物研究中的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(5): 593-596.

- [2021-06-11]. <https://arxiv.org/pdf/1412.6980.pdf>.
- [24] PASZKE A, GROSS S, CHINTALA S, et al. Automatic differentiation in pytorch[EB/OL]. [2021-06-11]. <https://openreview.net/pdf?id=BJJsrnfCZ>.
- [25] WANG Z, BOVIK A C, SHEIKH H R, et al. Image quality assessment: from error visibility to structural similarity[J]. IEEE Transactions on image processing, 2004, 13(4): 600-612.
- [26] LIM B, SON S, KIM H, et al. Enhanced deep residual networks for single image super-resolution[C]//IEEE. Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops. New York: IEEE, 2017: 136-144.
- [27] ZHAO T, ZHANG C. SAAN: semantic attention adaptation network for face super-resolution[C]//IEEE. 2020 IEEE International Conference on Multimedia and Expo (ICME). New York: IEEE, 2020: 1-6.
- [28] MA C, JIANG Z, RAO Y, et al. Deep face super-resolution with iterative collaboration between attentive recovery and landmark estimation[C]//IEEE. Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. New York: IEEE, 2020: 5569-5578.
- [29] CHEN C, GONG D, WANG H, et al. Learning spatial attention for face super-resolution[J]. IEEE Transactions on image processing, 2020, 30: 1219-1231.
- [30] LI Z, YANG J, LIU Z, et al. Feedback network for image super-resolution[C]//IEEE. Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. New York: IEEE, 2019: 3867-3876.

责任编辑: 郎婧

(上接第6页)

- [14] STROBEL G A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes and infection, 2003, 5(6): 535-544.
- [15] 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): 604-608.
- [16] 冷慕婵, 董诚明, 乔毅琳, 等. 金银花中产绿原酸内生真菌的分离与鉴定[J]. 河南农业科学, 2014, 43(7): 107-111.
- [17] WEBER R W S, STENGER E, MEFFERT A, et al. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest[J]. Mycological research, 2004, 108(6): 662-671.
- [18] NAKAMURA S, YANG C S, SAKON N, et al. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach[J]. PLOS ONE, 2009, 4(1): e4219.
- [19] 康兴娇, 贾招闪, 申红妙, 等. 内生枯草芽孢杆菌 CN181 发酵条件优化[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2016, 47(5): 647-653.
- [20] MAGDALENA J S, AGNIESZKA Z G. Analysis of antioxidant activity, chlorogenic acid, and rutin content of camellia sinensis infusions using response surface methodology optimization[J]. Food analytical methods, 2014, 7(10): 2033-2041.

责任编辑: 郎婧