

7种虫草真菌菌丝游离氨基酸的聚类分析和主成分分析

于士军^{1*}, 刘肖肖², 张胜利³, 张 余¹, 柴新义¹, 胡丰林^{2*}

(1. 滁州学院生物与食品工程学院, 滁州 239012; 2. 安徽农业大学安徽省微生物防治重点实验室, 合肥 230036;
3. 亳州师范高等专科学校生物工程研究所, 亳州 236800)

摘 要: **目的** 研究虫草真菌菌丝中游离氨基酸的组成、主成分和依据氨基酸的聚类。**方法** 以7种虫草真菌菌丝为原料, 以菌丝中游离氨基酸含量为对象, 应用聚类分析和主成分分析方法探讨不同虫草真菌菌丝中游离氨基酸的含量和组成规律。**结果** 结果表明, 聚类分析将7个样品分为3类; 其中蛹拟青霉、蝉棒束孢菌丝聚为一类, 古尼拟青霉、粉被玛利亚霉、中国被毛孢、细脚拟青霉菌丝聚为一类, 戴氏绿僵菌菌丝单独一类。主成分分析提取的前3个主成分可以代表7个样品中游离氨基酸含量93.901%的信息, 第一主成分以缬氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、组氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸和半胱氨酸的影响为主; 第二主成分以丝氨酸、苯丙氨酸和精氨酸的影响为主; 第三主成分以脯氨酸、赖氨酸和谷氨酸的影响为主。**结论** 聚类分析将7个样品分为3类, 主成分分析提取得到3个主成分。

关键词: 菌丝; 游离氨基酸; 主成分分析; 聚类分析

Principal component analysis and cluster analysis of free amino acid of mycelia of 7 *Cordyceps* fungi

YU Shi-Jun^{1*}, LIU Xiao-Xiao², ZHANG Sheng-Li³, ZHANG Cuan¹, CHAI Xin-Yi¹, HU Feng-Lin^{2*}

(1. School of Biology & Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239012, China;
2. Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;
3. Institute of Biological Engineering, Bozhou Teachers College, Bozhou 236800, China)

ABSTRACT: Objective To study the compositions and principal components of free amino acids of mycelia of 7 *Cordyceps* fungi and cluster analysis on the basis of free amino acids. **Methods** The free amino acids of mycelia of 7 *Cordyceps* fungi were determined and analyzed by cluster analysis (CA) and principal component analysis (PCA). **Results** The result of CA showed that 7 samples were classified into 3 clusters, *Paecilomyces militaris* and *Isaria cicadae* as a cluster; *Paecilomyces gunnii*, *Mariannaea puinosa*, *Hirsutella sinensis* and *Isaria tenuipes* as a cluster; and *Metarhizium taii* as a cluster. The result of PCA indicated that the first 3 principal components accounted for 93.901% of the total variation. The first principal component was mainly affected by the levels of Val, Thr, Ile, Leu, His, Tyr, Met,

基金项目: 滁州学院科研启动基金资助项目(2014qd049)、国家自然科学基金项目(30871676)

Fund: Supported by the Research Initial Funding of Chuzhou University (2014qd049), the National Natural Science Foundation of China (30871676)

*通讯作者: 于士军, 工程师, 主要研究方向为发酵食品和功能食品的研究与开发。E-mail: yushijun@outlook.com

胡丰林, 教授, 主要研究方向为昆虫和菌物资源利用和微生物制药。E-mail: hufenglin@hotmail.com

*Corresponding author: YU Shi-Jun, Ph.D, School of Biology and Food Engineering, Chuzhou University, No. 1528, Fengle Road, Chuzhou 239012, China. E-mail: yushijun@outlook.com

HU Feng-Lin, Professor, Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China. E-mail: hufenglin@hotmail.com

Asp and Cys of mycelia. The second principal component was mainly affected by the levels of Ser, Phe and Arg and the third principal component was mainly affected by the levels of Pro, Lys and Glu. **Conclusion** The 7 samples were classified into 3 groups through the CA and 3 principal components were extracted through PCA.

KEY WORDS: mycelia; free amino acid; principle component analysis; cluster analysis

1 引言

虫草是一类珍贵的食药两用真菌资源,其药理和保健作用得到广泛认可^[1-3]。其中,冬虫夏草最为出名,与鹿茸和人参并称为三大滋补品。而作为珍贵中药材的冬虫夏草仅分布于中国青海、西藏、四川和云南等海拔 3000~5000 m 的高寒地区。由于天然条件的限制,产量有限,因此价格昂贵,成为稀世珍品。因此,冬虫夏草的无性型和其他易得虫草受到了越来越多研究者的注意。人们期望能够找到与冬虫夏草具有相同药理和保健作用,且廉价、容易培养的冬虫夏草的替代产品。很多学者对冬虫夏草及其无性型的化学成分进行研究, Hsu 等^[4]对冬虫夏草子实体、冬虫夏草虫体及冬虫夏草发酵菌丝体和发酵液的氨基酸和其他营养(物质)进行了研究;李春如等^[5]研究了冬虫夏草无性型中国被毛孢摇瓶培养和深层发酵菌丝的氨基酸及其成分;陈安徽等^[6]对古尼拟青霉小孢变种即地顶孢霉和冬虫夏草生药的氨基酸进行了研究;葛飞等^[7]对蝉棒束孢和天然蝉花的化学成分进行了分析比较。而对虫草及其无性型中的游离氨基酸组成的系统研究却少见报道。刘肖肖等^[8]对用液相色谱-电喷雾飞行时间质谱法测定虫生真菌菌丝中游离氨基酸的方法进行了研究,该检测方法具有无需进行衍生化处理、实验过程简单、准确性高的特点。游离氨基酸是食物中可以被人或动物体直接吸收利用的重要营养物质,同时也是食品的主要风味物质之一。因此,测定虫草真菌菌丝中游离氨基酸的含量与组成,可作为该类食药两用真菌营养价值评价的重要指标。本文对 7 种虫草真菌菌丝中游离氨基酸的组成进行主成分和聚类分析,以期通过其中游离氨基酸的分析,为虫草真菌菌丝的开发应用提供理论一定的依据。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 材料与试剂

中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)菌株号为

RCEF5042; 蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris*)菌株号为 RCEF0720; 古尼拟青霉(*Paecilomyces gunnii*)菌株号为 RCEF0199; 蝉棒束孢(*Isaria cicadae*)菌株号为 RCEF4777; 细脚棒束孢(*Isaria tenuipes*)菌株号为 RCEF4256; 戴氏绿僵菌(*Metarhizium taii*)菌株号为 RCEF4127; 粉被玛利亚霉(*Mariannaea puinosa*)菌株号为 RCEF4695, 由安徽农业大学安徽省微生物防治重点实验室提供。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯),均购于美国 Tedia 公司; 16 种氨基酸(分析纯): 脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、赖氨酸(Lys)、甲硫氨酸(Met)、组氨酸(His)、苯丙氨酸(Phe)、精氨酸(Arg)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)购于中国药品生物制品鉴定所。

2.1.2 仪器设备

高分辨液质联用分析仪(Agilent 6210 LC/MS), 包括 Agilent1100 高效液相色谱(HPLC), 二极管阵列检测器(DAD)、飞行时间质谱仪(TOF)和电喷雾离子源(ESI), 美国 Agilent 公司; 供试分析型高效液相色谱柱有 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 5 μm), 美国 Agilent 公司; Waters Xterra MS C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm), 美国 Waters 公司; Phenomenex Synergi Hydro-RP (4.6 mm×250 mm, 4 μm), 美国 Phenomenex 公司; FreeZone12 冷冻干燥系统, 美国 Labonconco 公司; 2K-15 超速离心机, 德国 Sigma 公司; Simplicity RUV 超纯水系统, 美国 Millipore 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液的配制

精确称取 16 种氨基酸标准品, 溶解于 30%(V/V) 甲醇水溶液, 分别得到混合标准溶液 I: 含脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和精氨酸, 它们的浓度均为 500 μmol/L; 混合标准溶液 II: 含丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸和色氨酸, 它们的浓度均

为 125 $\mu\text{mol/L}$ 。这些标样在测定前用 30% 的甲醇水溶液(含 0.1% 甲酸)稀释成系列浓度的标准溶液, 以进行标准曲线绘制。

2.2.2 样品前处理

精确称取各虫生真菌固体培养菌丝体的冻干粉 200 mg, 溶于 4 mL 30% 的甲醇水溶液(含 0.1% 甲酸), 25 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 30 min, 12000 r/min 离心 10 min 取上清液, 即得 50 mg/mL 的待测样品溶液。制备好的氨基酸标准溶液及样品溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 暂存备用, 保存时间不得超过 24 h^[9,10]。

2.2.3 色谱条件

进样体积: 5 μL ; 流速: 0.60 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 供试流动相体系为含 0.1% 甲酸的甲醇水体系和乙腈水体系, 采用梯度洗脱, 洗脱梯度为: 0~8 min 由 100% 的流动相 A(水相)洗脱; 8~15 min 流动相 B(有机相)比例由 0% 增加到 15%; 15~23 min 流动相 B 由 15% 增加到 20%; 23~30 min 流动相 B 由 20% 增加到 50%。

2.2.4 质谱条件

电喷雾(ESI)离子源的雾化气压: 0.24 MPa(35 psi); 氮气流速: 12.0 L/min; 毛细管温度: 325 $^{\circ}\text{C}$; 离子扫描范围(m/z): 50~1000; 阴离子模式下离子化电压: 3500 V; 碎片电压: 175 V; 阳离子模式下离子化电压: 4000 V; 碎片电压: 250 V。

2.2.5 数据处理

本研究采用 NCSS 2007 软件对 7 中虫草菌丝体中的游离氨基酸进行聚类分析; 用 SPSS 19.0 软件对虫草菌丝体中的游离氨基酸进行主成分分析, 通过载荷图反映各游离氨基酸对虫草菌丝体品质特征的影响程度; 通过主成分分析方法中的得分图, 对不同的虫草菌丝体样品进行区分辨识。

2.2.6 rRNA ITS 序列的系统发育树构建

应用 PAUP* 4.0b10^[11]对整合的数据矩阵采用最大简约法进行分析, 采用随机序列添加采用启发式搜索, 重复 100 次。分支交换算法用树平分重接法(TBR)和 MulTrees on。分支的可靠性检验采用 Bootstrap 法, 完全启发式搜索计算 1000 次^[12]。大于 70% 的自举值被认为结果被数据可靠的支持, 并列在分支的上方。

利用 MrBayes 3.1 软件^[13]进行贝叶斯推理法(BI)分析, 替换模型采用 GTR, 位点间差异比率采用 γ 分布比率差异, 其中部分为不变位点, 其余参数为默认值; 采用 mcmc 法运算 1000 000 代, 每 1000 代取样 1

次, 从得到的样本中舍弃 250 个老化样本后总结得到共有树^[14]。大于 95% 的后检验概率值被列举在分支的下方。

3 结果与分析

3.1 聚类分析

采用 NCSS 2007 以组间平均距离作为测量方法, 以“欧式距离”作为 7 个虫草真菌菌丝样品的评价指标, 对 7 种虫草菌丝体游离氨基酸组成数据进行二维聚类分析, 结果如图 1 所示。由图可以看出, 7 个样品可以聚为 3 类。蛹拟青霉(*P. militaris*)和蝉棒束孢(*I. cicadae*)聚为一类, 古尼拟青霉(*P. gunnii*)、粉被玛利亚霉(*M. puinosa*)、中国被毛孢(*H. sinensis*)、细脚拟青霉(*I. tenuipes*)聚为一类, 戴氏绿僵菌(*M. taii*)单独一类。从图 1 还可以直观的看出, 在 7 个样品中半胱氨酸含量均很低, 含量较多的氨基酸为苯丙氨酸、异亮氨酸、脯氨酸和赖氨酸。

根据检测数据计算得到, 中国被毛孢菌丝中游离氨基酸含量最高为 7.537 mg/g, 戴氏绿僵菌和古尼拟青霉菌丝中游离氨基酸含量依次次之。蝉棒束孢菌丝中游离氨基酸含量最低为 3.196 mg/g。在游离氨基酸中, 戴氏绿僵菌的游离必需氨基酸含量最高为 5.485 mg/g, 中国被毛孢菌丝次之; 蝉棒束孢菌丝中游离必需氨基酸含量最低仅 2.090 mg/g。戴氏绿僵菌菌丝游离必需氨基酸占游离氨基酸的百分含量最高为 74.28%, 细脚拟青霉菌丝次之; 蝉棒束孢菌丝游离必需氨基酸占游离氨基酸的百分含量最低为 65.39%。在所研究的 7 个虫草真菌菌丝游离氨基酸中, 游离必需氨基酸所占比例均在 65% 以上。

3.2 主成分分析

利用 SPSS 19.0 对 7 种样品中的 16 种的游离氨基酸组成进行主成分分析, 得到相关矩阵的特征值和方差贡献率(如表 1)。提取 3 个主成分, 第一主成分方差贡献率占总变异信息的 52.035%, 主要反映缬氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、组氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸和天冬氨酸的变异信息; 第二主成分方差贡献率占总变异信息的 24.408%, 主要反映丝氨酸、苯丙氨酸和精氨酸的变异信息; 第三主成分方差贡献率占总变异信息的 17.458%, 主要反映脯氨酸、赖氨酸和谷氨酸的变异信息。提取得到的 3 个主成分累计方差贡献率达 93.901%(>90%),

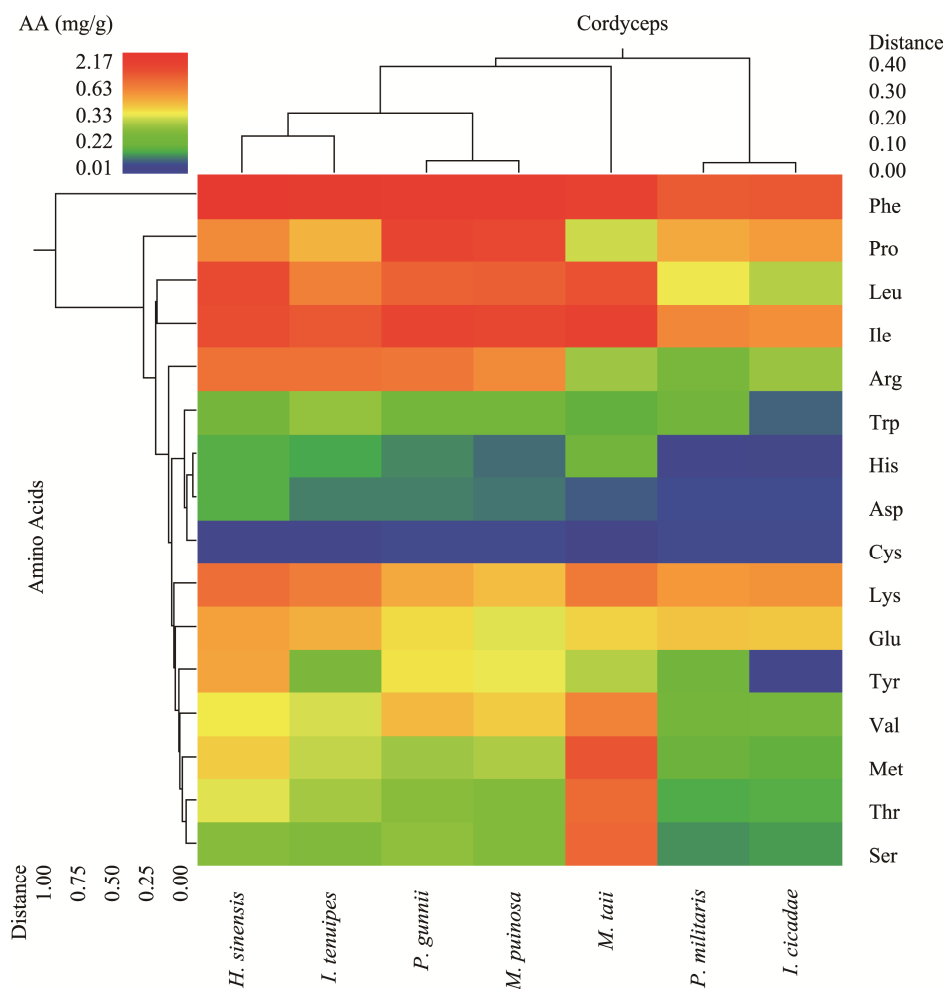


图 1 二维聚类分析图

Fig. 1 Cluster analysis of double dendrograms

表 1 主成分方差解释

Table 1 Analysis of the variance contribution

主成分	特征值	贡献率%	累积贡献率%
1	8.326	52.035	52.035
2	3.905	24.408	76.443
3	2.793	17.458	93.901
4	0.830	5.186	99.087
5	0.111	0.695	99.782
6	0.035	0.218	100

故该 3 个主成分能代表 7 个样品中游离氨基酸含量 93.901%的信息。

表 2 显示了游离氨基酸的主成分矩阵中主要氨基酸在各个主成分矩阵中的权重系数。从中可以看出，

第一主成分在变量缬氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、天冬氨酸和酪氨酸上有较高的载荷系数，说明这些氨基酸与第一主成分有高度的相关性；第二主成分在丝氨酸、苯丙氨酸和精氨酸上有较高的载荷系数，说明丝氨酸、苯丙氨酸和精氨酸与第二主成分有较高的相关性；第三主成分在变量脯氨酸、赖氨酸和谷氨酸上有较高的载荷系数，说明脯氨酸、赖氨酸和谷氨酸与第三主成分有较高的相关性。

为便于理解各变量之间的关系可以通过载荷图直观的反应出来，如图 2 所示。变量点与原点之间的距离越远，表示其与主成分的间的相关性越高。如在第一主成分正方向，缬氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、组氨酸和酪

氨酸均距离原点较远, 与上述表 1 的结果一致; 在第二主成分的正方向, 苯丙氨酸和精氨酸距离原点较远, 他们与第二主成分有较高的正相关性, 在第二主成分的负方向, 丝氨酸距离原点较远, 他们与第二主成分有较高的负相关性; 在第三主成分正方向, 谷氨酸和赖氨酸距离原点距离较远, 表明他们与第三主成分有较高的正相关性, 在第三主成分负方向, 脯氨酸距离原点距离较远, 表明他们与第三主成分有较高的负相关性。

通过对 7 个样品中的 16 种氨基酸进行主成分分析, 计算各成分得分, 对各个样品进行评价, 所得结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, 根据第一、二主成分分析中国被毛孢、细脚棒束孢、古尼拟青霉、粉被玛利亚霉聚集在第一象限内, 主要受精氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸和色氨酸含量影响。可以看出中国被毛孢、细脚棒束孢、古尼拟青霉、粉被玛利亚霉菌丝中精氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸和色氨酸的含量均比其他 3 个样品高。蝉棒束孢和蛹拟青霉聚集在第三象限内, 主要受谷氨酸、脯氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸和半胱氨酸相对含量的影响。戴氏绿僵菌在第四象限内, 主要受缬氨酸、异亮氨酸、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸含量的影响, 同时也可以看出戴氏绿僵菌菌丝中缬氨酸、异亮氨酸、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸的含量均比其他样品高。

表 2 游离氨基酸主成分矩阵

Table 2 The component matrix of free amino acids			
氨基酸	主成分 1	主成分 2	主成分 3
Ser	0.689	-0.698	-0.172
Pro	0.046	0.570	-0.815
Val	0.923	-0.229	-0.289
Thr	0.818	-0.571	0.032
Cys	0.760	-0.520	0.370
Ile	0.874	0.103	-0.468
Leu	0.924	0.097	-0.213
Asp	0.720	0.638	0.234
Lys	0.645	-0.173	0.720
Glu	0.147	0.258	0.918
Met	0.797	-0.595	-0.088
His	0.989	0.032	0.001
Phe	0.675	0.723	0.042
Arg	0.587	0.772	0.131
Tyr	0.802	0.329	-0.246
Trp	0.345	0.583	0.333

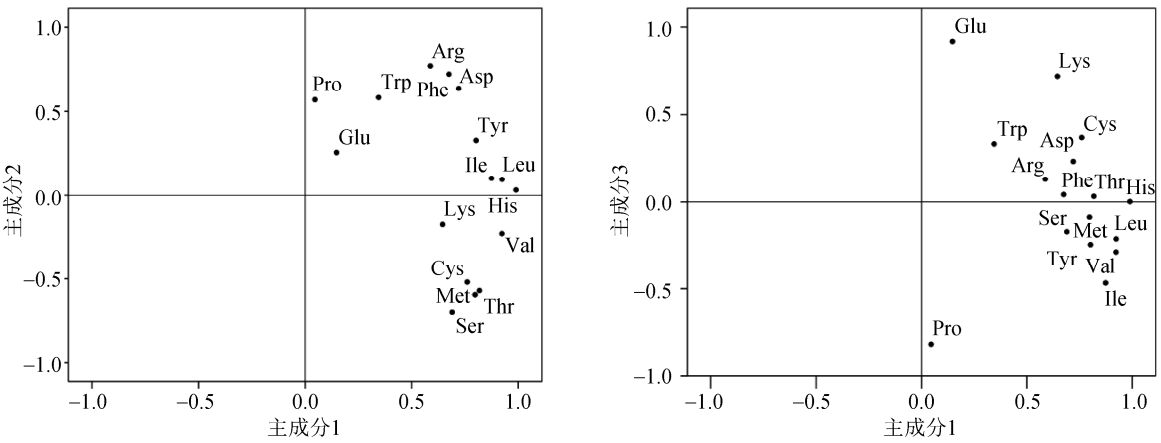


图 2 主成分载荷图

Fig. 2 Loading plot of principal components

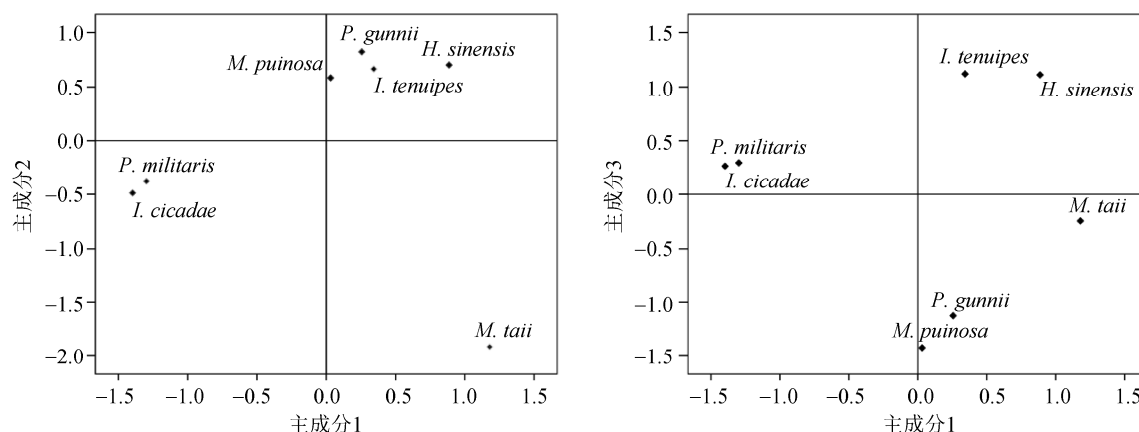


图3 因子得分散点图

Fig. 3 Scatterplot of principal component scores

根据第一和第三主成分分析可知, 7 个样品分为 4 组, 即位于第一象限的中国被毛孢和细脚棒束孢, 位于第二象限的蛹拟青霉和蝉棒束孢, 位于第四象限(近第三主成分)古尼拟青霉和粉被玛利亚霉, 位于第四象限(近第一主成分)戴氏绿僵菌。

与图 1 中的聚类分析结果一致, 二者可以互相印证。聚类分析树状图可以更加直观的反映出虫草真菌在游离氨基酸含量上的区别。

3.3 rRNA ITS 序列的系统发育树

从 NCBI GenBank 下载上述 7 种虫草真菌的 rRNA ITS 序列, 使用应用 PAUP* 4.0b10 和 MrBayes 3.1 软件基于最大简约法和贝叶斯分析法构建的系统树, 结果如图 4 所示。从中可以看出, 7 种虫草真菌样品分为 3 大类: 蝉棒束孢、细脚棒束孢、蛹拟青霉、古尼拟青霉聚为一类, 粉被玛利亚霉和戴氏绿僵菌聚为一类, 中国被毛孢独自一类。综合图 3 和图 4, 可以看出, 7 种虫草真菌样品根据游离氨基酸含量聚类 and 根据 rRNA ITS 序列聚类之间并没有相关性。表明 7 种虫草真菌样品中游离氨基酸含量与他们的系统进化亲缘关系之间没有直接的相关性。

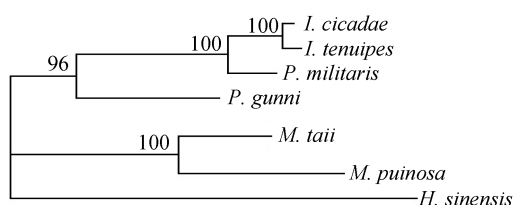


图4 样品 rRNA ITS 基于最大简约法和贝叶斯分析法构建的系统树

Fig. 4 Phylogenetic tree of samples based on maximum parsimony and Bayesian analysis of the rRNA ITS

4 结论

本研究通过液相色谱法检测虫草发酵菌丝的 16 种游离氨基酸组成, 通过对 7 种虫草真菌菌丝样品游离氨基酸分析发现, 游离氨基酸中必需氨基酸所占比例均在 65% 以上。由于样品前处理和检测方法局限, 未能对样品中的其他氨基酸组成进行检测分析。故该研究在一定程度上有一定的局限性, 但随着检测技术的改进和深入, 有待进一步的完善。

马磊等^[15]通过主成分分析和聚类分析研究了贵人香葡萄酒中的氨基酸, 结果表明不同产区的贵人香葡萄原酒在游离氨基酸和总氨基酸含量上都有明显的产地特征。邹瑶等^[16]通过主成分分析和聚类分析研究了四川黑茶渥堆中茶叶的主要品质成分变化, 发现渥堆一翻后四川黑茶品质成分的转化已基本完成, 为四川黑茶渥堆工艺革新提供了理论依据。本研究通过主成分分析, 提取出的前 3 个主成分可以代表 7 个样品中游离氨基酸 93.901% 的信息, 第一主成分以缬氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、组氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸和半胱氨酸的影响为主; 第二主成分以丝氨酸、苯丙氨酸和精氨酸的影响为主; 第三主成分以脯氨酸、赖氨酸和谷氨酸的影响为主。系统聚类分析将 7 个样品分为 3 类; 其中蛹拟青霉、蝉棒束孢聚为一类, 古尼拟青霉、粉被玛利亚霉、中国被毛孢、细脚拟青霉聚为一类, 戴氏绿僵菌单独一类。

此外, 通过 rRNA ITS 序列进行系统发育树聚类分析, 结果表明 7 种虫草真菌菌丝中游离氨基酸含

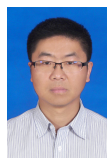
量与他们的系统进化亲缘关系之间没有相应的联系关系。

参考文献

- [1] Holliday J, Cleaver M. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) link (Ascomycetes). A Review [J]. Int J Med Mushrooms, 2008, 10(3): 219–234.
- [2] Buenz EJ, Bauera BA, Osmundson TW, *et al.* The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects onapoptotic homeostasis [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96(1–2): 19–29.
- [3] Russel R, Paterson M. *Cordyceps*-A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? [J]. Phytochemistry, 2008, 69(7): 1469–1495.
- [4] Hsu TH, Shiao LH, Hsieh CY, *et al.* A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom Dongchongxiacao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. Food Chem, 2002, 78(4): 463–469.
- [5] Li CR, Li ZZ, Fan MZ, *et al.* The composition of *Hirsutella sinensis*, anamorph of *Cordyceps sinensis* [J]. J Food Compos Anal, 2006, 19(8): 800–805.
- [6] 陈安徽, 李春如, 葛飞, 等. 古尼拟青霉小孢变种的主要有效成分分析[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(12): 124–126.
- Chen AH, Li CR, Ge F, *et al.* Analysis on effective components in the fermentation mycelia and broth of *Paecilomyces gunnii* var. minor [J]. Food Ferment Ind, 2006, 32(12): 124–126.
- [7] 葛飞, 夏成润, 李春如, 等. 蝉拟青霉菌丝体与天然蝉花中化学成分的比较分析[J]. 菌物学报, 2007, 26(1): 68–75.
- Ge F, Xia CR, Li CR, *et al.* Analysis of the chemical compositions of *Paecilomyces cicadae* fermented mycelia and *Cordyceps cicadae* fruit body [J]. Mycosystema, 2007, 26(1): 68–75.
- [8] 刘肖肖, 李淑林, 陆瑞利, 等. 液相色谱-电喷雾飞行时间质谱法同时测定虫生真菌菌丝中 16 种游离氨基酸[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(1): 181–186.
- Liu XX, Li SL, Lu RL, *et al.* Simultaneous analysis of 16 free amino acids in mycelia of entomogeneous fungi by LC-ESI-TOF-MS [J]. Food Ferment Ind, 2013, 39(1): 181–186.
- [9] 黄翼飞, 胡静. 液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱同时分析烟草中的 20 种游离氨基酸[J]. 色谱, 2010, 28(6): 615–622.
- Huang JF, Hu J. Simultaneous analysis of twenty free amino acids in tobacco using liquid chromatography-electrospray ionization/iontrap tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(6): 615–622.
- [10] 刘阳, 倪君君, 相婷, 等. 直接注入式串联质谱法测定氨基酸含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3): 198–205.
- Liu Y, Ni JJ, Xiang T, *et al.* Content determination of amino acids by direct-infusiantandem mass spectrometry [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2011, 28(3): 198–205.
- [11] Yang ZH. Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods [J]. J Mol Evol, 1996, 42(2): 294–304.
- [12] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783–791.
- [13] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [14] 王勇, 陈克平, 姚勤. 系统发生分析程序 Mr Bayes 3.1 使用方法介绍[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (33): 16665–16669.
- Wang Y, Chen KP, Yao Q. An introduction to the operation of phylogenetic analysis program Mr Bayes 3.1 [J]. J Anhui Agric Sci, 2009, 37 (33): 16665–16669.
- [15] 马磊, 唐柯, 韩业慧, 等. 贵人香葡萄酒氨基酸含量对产地特征性贡献的分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(19): 128–134.
- Ma L, Tang K, Han YH, *et al.* Analysis of primary amino acids profiles of Italian Riesling white wines and their contribution to regional characteristics [J]. Sci Technol Food Ind, 2012, 33(19): 128–134.
- [16] 邹瑶, 齐桂年, 刘婷婷, 等. 四川黑茶渥堆中品质成分的主成分及聚类分析[J]. 食品工业科技, 2014, 35(14): 304–307.
- Zou Y, Qi GN, Liu TT, *et al.* Principal component and cluster analysis of the quality ingredients of Sichuan dark tea during post-fermentation [J]. Scie Technol Food Ind, 2014, 35(14): 304–307.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



于士军, 博士, 工程师, 主要研究方向为发酵食品和功能食品的研究和开发。
E-mail: yushijun@outlook.com



胡丰林, 博士, 教授, 主要研究方向为经济昆虫、菌物资源利用和微生物制药。
E-mail: hufenglin@hotmail.com