



引用格式:黄申,夏璠,魏涛,等.烟叶中西柏三烯-4,6-二醇降解产香菌的分离与鉴定[J].轻工学报,2017,32(6):73-80.

中图分类号:TS41⁺3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.009

文章编号:2096-1553(2017)06-0073-08

烟叶中西柏三烯-4,6-二醇降解产香菌的分离与鉴定

Isolation and identification of a cembratriene-4,6-diol degradation and aroma producing strain from tobacco leaf

黄申¹,夏璠^{1,3},魏涛¹,贾春晓²,钱玉梅¹,毛多斌¹

HUANG Shen¹,XIA Fan^{1,3},WEI Tao¹,JIA Chun-xiao²,QIAN Yu-mei¹,MAO Duo-bin¹

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院,河南 郑州 450001;

3. 湖北中烟有限责任公司 武汉卷烟厂,湖北 武汉 430051

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Material and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

3. Wuhan Cigarette Factory, China Tobacco HuBei Industrial Co., Ltd., Wuhan 430051, China

关键词:

西柏三烯-4,6-二醇;分离鉴定;降解率;金合欢醛;新鞘氨醇杆菌

Key words:

cembratriene-4,6-diol; isolation and identification; degradation rate; farnesol; *Novosphingobium panipatense*

摘要:采取稀释涂布平板法和平板划线法,从调制陈化后的烟叶中分离得到一株高效降解西柏三烯-4,6-二醇的菌株 YII-3。以西柏三烯-4,6-二醇为唯一碳源,该菌株降解产物主要为金合欢醛(8.57%)。根据形态特征和 16S rDNA 系统进化树分析,初步鉴定菌株 YII-3 为新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium panipatense*)。该菌株在含有西柏三烯-4,6-二醇发酵培养基中培养 66 h 后,底物降解率达到 75.58%。

收稿日期:2016-12-31;修回日期:2017-03-29

基金项目:国家自然科学基金项目(21546012);国家烟草专卖局重点实验室专项项目(中烟办[2014]334号);河南省高等学校重点科研项目(15A180064);郑州轻工业学院博士基金项目(2014BSJJ068,2014BSJJ072)

作者简介:黄申(1981—),男,河南省淮阳县人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为烟草生物技术和生物化工。

通信作者:毛多斌(1962—),男,河南省南阳市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草化学和烟草香精香料。

Abstract: A high efficient cembratriene-4,6-diol degradation strain Y11-3 was isolated from tobacco leaf with spread plate and streak plate methods. The cembratriene-4,6-diol was the only carbon source, and the major degradation products were farnesal (8.57%). This strain Y11-3 was identified preliminarily as *Novosphingobium panipatense* through the analysis of classical morphology and 16S rDNA sequence of phylogenetic tree. The strain was cultured in the fermentation medium containing cembratriene-4,6-diol, the degradation rate of substrates reached 74.58% after 66 h.

0 引言

西柏烯类化合物是烟草中的一类大环双萜类物质,主要存在于烟叶表面腺毛分泌物中,也存在于烟草种子和烟草花中^[1],总量占烟叶鲜叶重的2%~10%。其中以西柏三烯-4,6-二醇的含量最为丰富,约占烟叶鲜叶重的0.7%^[2-3]。

西柏烯类化合物也是烟草中一类重要的香味前体物质^[4],在烟草生长过程中,其含量逐渐增加,但在调制、陈化过程中会发生一系列降解反应且陈化前期降解速度较陈化后期更快^[5]。降解反应生成了重要的中性香味成分,例如茄酮、茄尼呋喃,以及茄酮的降解产物如降茄二酮^[6]、茄醇、茄酸和酯类等,它们对卷烟的香味、香气品质起着关键的作用。

西柏三烯-4,6-二醇类化合物的降解方式一般有两种:一种是在氧化剂或光作用下进行;另一种是在生物催化作用下进行。经过一系列的转化,西柏三烯-4,6-二醇类物质可以转化为C8—C18碳原子数不同的香味成分。利用CrO₃在硫酸水溶液和丙酮水溶液中氧化西柏三烯-4,6-二醇,得到包括降茄二酮在内的8种主要产物^[7-9]。光催化降解西柏三烯-4,6-二醇后,11,12号位双键易环氧化。利用雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)的植物细胞催化降解西柏三烯-4,6-二醇后发现,11,12号位双键易环氧化,同时发现10,12和13号位键易羟基化。利用美花烟草(*Nicotiana sylvestris*)的植物细胞、细胞均质体、无细胞提取物和细胞小球分别作为催化剂降解西柏三烯-4,6-二醇后,其降

解产物与雷公藤催化降解的产物相似^[10-13]。

目前,鲜见西柏三烯-4,6-二醇生物降解为香味物质的研究。本文拟利用微生物学方法从烟叶中筛选西柏三烯-4,6-二醇降解菌株,并对其进行鉴定和降解能力研究,以期西柏三烯-4,6-二醇生物降解和降解途径的研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和仪器

样品的采集:用于筛选西柏三烯-4,6-二醇降解菌的样品主要采集于河南、云南、重庆、四川、广西、湖南、贵州等地的调制后烟叶,其产地与品种见表1,烟叶等级均为C3F。

表1 调制烟叶样品产地与品种
Table 1 Samples of modulated tobacco leaf from different origin and variety

分类	产地	烟叶品种
一	吉林	晒红烟(雪茄)
	许昌	K326
	曲靖	Cc27
	重庆	云烟85
	什邡	古巴4号
二	许昌	中烟100
	陕县	秦烟96
	四川	NC297
	贵州	贵烟6号
三	四川	亚布力晒烟
	衡阳	NC89
	襄县	Y056
	洛阳	云烟87
	陕县	云烟97
四	三明	Y077
	广西	NC102
	湖南	LY30605
	许昌	QF232
	永州	Y8123

试剂和仪器:西柏三烯-4,6-二醇标样,纯度 $\geq 98\%$,郑州轻工业学院相关实验室制;Agilent6890a/5975c GC-MS 色谱联用仪,Agilent 公司产;J6-MI 冷冻离心机,美国 Beckman 公司产;2600 UC/VIS 紫外可见分光光度计,美国 UNIC 公司产;NIE802 显微镜,日本尼康公司产。

富集培养基: K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, $NaNO_3$ 3 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, 蔗糖 30 g/L。

发酵培养基: K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g/L, NaCl 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.65 g/L, $MnSO_4$ 0.001 g/L, $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ 0.5 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.005 g/L。在此基础上加 300 mg/L 西柏三烯-4,6-二醇(纯度 $\geq 98\%$,原料来自三门峡市陕县河南中烟烟叶种植基地,品种为豫烟 100,采集部位为成熟上部叶片)^[14]。

固体培养基:在发酵培养基的基础上添加 2% 的琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 菌种的筛选

1.2.1.1 菌源的富集 按表 1 分类分别称取新鲜烟叶、调制后的烟叶各 10 g,在超净工作台,用剪刀剪碎烟叶,分别放入 250 mL 三角瓶中,依次加入 100 mL 无菌水,浸泡过夜;分别用灭菌枪头移取 200 μ L 到 20 mL 的察式培养基和 LB 培养基内,30 $^{\circ}C$ 转速 150 r/min 条件下培养 2 d,得到菌源。

1.2.1.2 初筛 所有接种工作都在超净工作台上进行。移取 1 mL 经富集培养得到的菌源至 100 mL 发酵培养基中,以不加菌源的发酵培养基和 不加西柏三烯-4,6-二醇作为对照,培养 2 d,通过观察摇瓶的变化,并用 GC-MS 检测,与对照的 GC-MS 检测图进行对比,挑选出能降解西柏三烯-4,6-二醇的样品,分别移取

1 mL 样品到灭菌完成的发酵培养基中,然后依次进行梯度稀释,分别选择 10^{-2} 和 10^{-4} 这两个浓度梯度,在固体培养基上用稀释涂布平板法进行平板涂布,每个浓度梯度平行涂布 3 个平板,同时对不含有底物西柏三烯-4,6-二醇的平板进行涂布并将其作为对照组。将涂布好的平板于 30 $^{\circ}C$ 培养箱中培养 2~3 d,挑选出形态较好的单菌落,用平板划线法反复进行划线分离纯化,直到平板上无杂菌落出现,即可确认为纯培养菌。

1.2.1.3 复筛 将筛选到的单菌落经过活化培养后,接种到 100 mL 发酵培养基内,在 30 $^{\circ}C$,转速 150 r/min 条件下摇床培养 2 d。通过观察摇瓶的变化,并用 GC-MS 检测降解产物,进一步筛选能降解西柏三烯-4,6-二醇的菌株^[15]。

1.2.2 溶液制备

1.2.2.1 西柏三烯-4,6-二醇标准储备液的配制 准确称取西柏三烯-4,6-二醇标准品 65.93 mg,用色谱级 CH_2Cl_2 溶解,并定容到 50 mL 容量瓶中,得到一定浓度的标准储备液,置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱中贮存,备用。

1.2.2.2 不同浓度梯度的西柏三烯-4,6-二醇标准溶液的配制 准确量取西柏三烯-4,6-二醇标准储备液 0.1 mL,0.3 mL,0.5 mL,1.0 mL,3.0 mL,5.0 mL,7 mL,10 mL,用色谱级 CH_2Cl_2 定容到 10 mL 容量瓶中,摇匀,即得到含有不同浓度梯度的西柏三烯-4,6-二醇标准溶液。

1.2.3 降解产物的分析检测

1.2.3.1 降解产物的萃取 取 100 mL 发酵液,在 12 000 r/min 条件下离心 30 min,取上清液与等体积的 CH_2Cl_2 在分液漏斗中进行萃取,缓缓摇晃,使两相混合均匀;静置 10 min 后,收集下层有机相;重复以上步骤 5 次,合并有机相,加入无水硫酸钠干燥,静置过夜;过滤,旋转

蒸发除去 CH_2Cl_2 后,加入 1 mL 色谱级 CH_2Cl_2 溶解,过 0.45 μm 有机系滤膜后即可进行 GC-MS 分析检测. 以上操作均在避光环境中进行.

1.2.3.2 分析检测条件的确定 色谱条件: HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 进样口温度 280 $^\circ\text{C}$; 以高纯氮气作载气,流速为 1 mL/min; 升温程序为初始温度 50 $^\circ\text{C}$,以 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 200 $^\circ\text{C}$,以 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 260 $^\circ\text{C}$ 结束;分流比 3:1;进样量为 1 μL ;GC-MS 采用全扫描模式.

质谱条件:传输线温度 280 $^\circ\text{C}$;离子源温度 280 $^\circ\text{C}$,四极杆温度 150 $^\circ\text{C}$;电离方式为电子轰击(EI),电子能量为 70 eV;溶剂延迟时间为 8 min;扫描质量范围(m/z)为 35—550.

1.2.3.3 降解率的测定 以接种的发酵培养基作为实验组,未接种的发酵培养基作为对照组,每次取样 10 mL,12 000 r/min 条件下离心 30 min;取上清液进行萃取、分液,旋转蒸发除去 CH_2Cl_2 后,加入 1 mL 色谱级 CH_2Cl_2 溶解,过 0.45 μm 有机系滤膜后,进行 GC-MS 分析检测,其降解率按下列公式计算:

$$\text{降解率} = \frac{\text{西柏三烯-4,6-二醇的减少量}}{\text{原西柏三烯-4,6-二醇含量}} \times 100\%$$

1.2.4 菌株鉴定

1.2.4.1 形态观察和革兰氏染色 菌株形态在显微镜下观察,菌株的革兰氏染色方法参照文献[15].

1.2.4.2 16S rDNA 序列扩增、测序和系统发育分析 用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒,提取目标菌株基因组 DNA. PCR 反应引物为真菌 16S rDNA 序列通用引物 5'-CAGAGTTT-GATCCTGGCT-3' (上游引物)和 5'-AGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3' (下游引物),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成. PCR 反

应体系:Taq 酶 (5 U/ μL)0.2 μL ,上游引物 1 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)0.5 μL ,下游引物 2 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)0.5 μL ,10 \times Buffer (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)2.5 μL ,DNA 模板(50 ng/ μL)0.5 μL ,dNTP(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),ddH₂O(灭菌蒸馏水)19.8 μL . 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成. 系统发育分析根据其 16S rDNA 基因序列用 Mega 5.1 软件构建系统进化树,使用 Neighbor-Joining 法进行 1000 次步长计算.

1.2.5 菌株生长曲线和降解曲线的测定绘制

微生物的生长周期包括延迟期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段. 在适当条件下,根据菌株在发酵培养时随时间增加表现出的群体生长趋势,可以得到菌株的生长曲线

1)将菌株接入富集培养基内,在 30 $^\circ\text{C}$,转速 150 r/min 条件下发酵 24 h.

2)配制 28 份 20 mL 发酵培养基,置于 28 个 50 mL 锥形瓶中,其中 14 瓶每瓶接种 200 μL 富集菌液,作为实验组 1,用来测定绘制降解曲线;另外 14 瓶每瓶接种 200 μL 富集菌液,作为实验组 2,用于测定绘制生长曲线. 以空白富集培养基作为对照. 以上锥形瓶均在 30 $^\circ\text{C}$,转速 150 r/min 条件下培养.

3)无菌条件下操作,分别在接种后 6 h,12 h,18 h,24 h,30 h,36 h,42 h,48 h,54 h,60 h,66 h,72 h,将实验组 1 样品离心取出上清,用 GC-MS 检测其降解率. 另由实验组 2 取出 5 mL 菌液,测其 OD₆₀₀ 值.

横坐标为培养时间,纵坐标分别为西柏三烯-4,6-二醇的含量和 OD₆₀₀ 值,绘制菌株的生长曲线和降解曲线.

2 结果与讨论

2.1 西柏三烯-4,6-二醇标准曲线

根据西柏三烯-4,6-二醇标准溶液 GC-MS 检测所得数据制作标准曲线,见图 1.

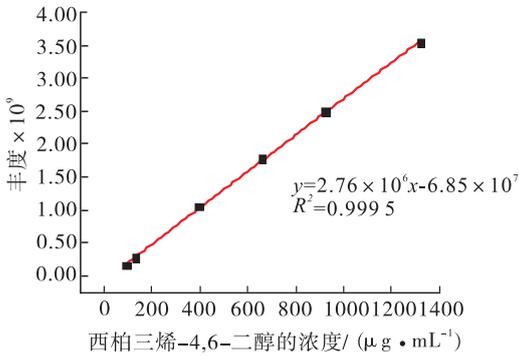


图1 西柏三烯-4,6-二醇的标准曲线

Fig.1 Calibration curve of standard sample of cembratriene-4,6-diol

由标准曲线得到西柏三烯-4,6-二醇线性方程为 $y = 2.76 \times 10^6 x - 6.85 \times 10^7$, 其中, y 为响应值, x 为西柏三烯-4,6-二醇溶液浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$. 所得标准曲线的相对标准偏差为 0.999 5, 说明该标准曲线准确可靠, 可以应用于后续实验.

2.2 西柏三烯-4,6-二醇降解菌的筛选结果

从新鲜烟叶、调制烟叶中共筛选出 11 种降解西柏三烯-4,6-二醇混菌株, 分别接种于含有西柏三烯-4,6-二醇底物的发酵培养基中进行发酵培养, 采用 GC-MS 法测定其降解能力. 这 11 株混菌株降解率的比较如图 2 所示. 由图 2 可知, 混菌株 Y11, Y13, Y16 的西柏三烯-4,6-二醇降解能力较高, 降解率分别为 79.36%, 71.77%, 79.19%.

对这 3 株混菌进行平板涂布, 依次进行梯度稀释, 共得到 5 株单菌落. 经过活化培养, 接种到发酵培养基内, 在 30 °C, 150 r/min 条件下培养 48 h, 采用 GC-MS 法测定其降解能力. 在 Y11 混菌中筛选到 3 株单菌落, 其中 3 号菌降解西柏三烯-4,6-二醇能力较高, 其降解率为 75.58%, 所以将该菌株编号为 Y11-3. 经 GC-MS 分析检测出主要生成物为金合欢醛 (8.57%) (见图 3). 金合欢醛为一种香味物质, 在化妆品和卷烟中有应用.

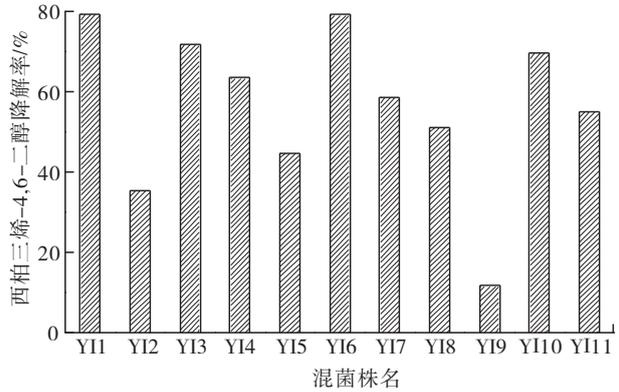


图2 11株西柏三烯-4,6-二醇降解混菌株降解率的比较

Fig.2 Comparison of the degradation rate of 11 cembratriene-4,6-diol degradation strains

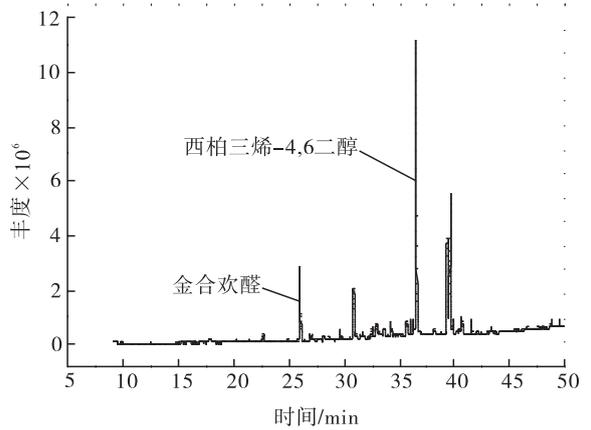


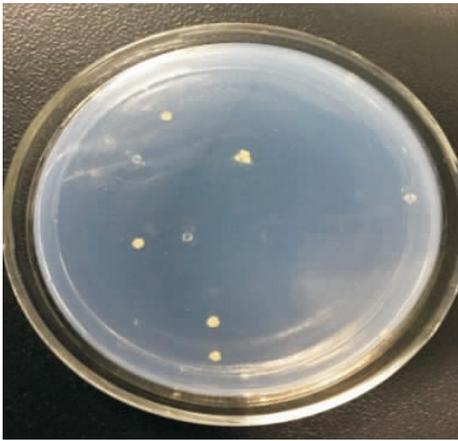
图3 菌株 Y11-3 的 GC-MS 图

Fig.3 GC-MS analysis of the degradation product of Y11-3 strain

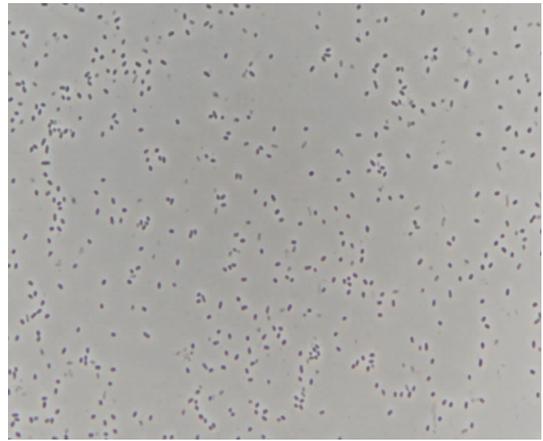
2.3 菌株鉴定

2.3.1 生理特性 将菌株 Y11-3 接种于固体培养基中, 培养 24 h 后长出菌落, 48 h 后观察 (见图 4a): 菌落呈黄色, 表面光亮, 边缘整齐, 不透明, 中央隆起, 容易挑取; 图 4b) 为 100 倍显微镜下观察到的显微形态, 可以看出该菌体大小为 $(1.0 \sim 1.5) \mu\text{m} \times (2.0 \sim 2.5) \mu\text{m}$.

2.3.2 遗传学分析 菌株 Y11-3 的 PCR 扩增电泳图见图 5, 由图 5 可以看到在 1000—1500 bp 有一明显条带. 回收该条带送至生工



a) 菌落形态



b) 细胞形态

图4 菌株 Y11-3 菌落和细胞形态

Fig.4 Colony and cell morphology of Y11-3 strain

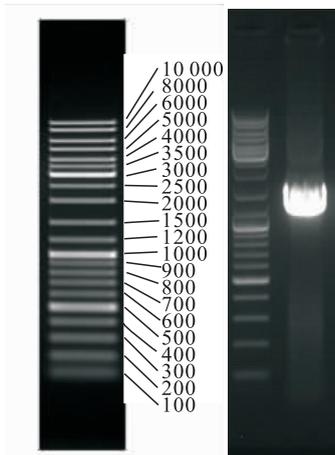


图5 菌株 Y11-3 的 PCR 扩增电泳图

Fig.5 The figure of the amplification electrophoresis of Y11-3 strain

生物工程(上海)股份有限公司武汉分公司进行测序,测序结果表明该条带大小为 1322 bp.

2.3.3 系统进化树分析 将扩增并测序得到的序列提交至 Gene Bank (ID:KY283954). 通过在 NCBI Genbank 数据库中进行 blast 同源性分析发现,菌株 Y11-3 与新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium panipatense*) 的同源性在 90% 以上. 系统进化树分析结果(见图 6)表明,菌株 Y11-3 与新鞘氨醇杆菌聚为一类. 基于形态学特征和系统发育分析,菌株 Y11-3 被初步鉴定为新鞘氨醇杆菌.

2.4 菌株的生长曲线和降解曲线

菌株 Y11-3 的生长曲线和降解曲线如图 7 所示. 从图 7 生长曲线可以看出,菌株 Y11-3 培养 18 h 后快速增长,进入对数期,随着时间的延续,菌株在培养基里吸收营养物质(西柏三烯-4,6-二醇作为碳源被利用)不断繁殖生长后导致菌株数量不断增加,到第 48 h 开始进入稳定期,一直到 66 h,并无明显增加的现象. 从图 7 降解曲线可以看出,在 6 h 前,西柏三烯-4,6-二醇降解变化并不明显,6 h 后西柏三烯-4,6-二醇的降解速度开始加快,到 36 h,西柏三烯-4,6-二醇的降解率达到 65%,36 h 后底物降解趋于平衡,继续培养至 66 h 后,西柏三烯-4,6-二醇降解率达到 75.58%.

3 结论

本文从调制陈化后的烟叶中筛选到一株高效降解西柏三烯-4,6-二醇的菌株 Y11-3,对其进行西柏三烯-4,6-二醇降解能力分析,分析与分离鉴定,得到如下结论.

1)以西柏三烯-4,6-二醇的丰度为响应值,利用 GC-MS 检测计算出标准曲线 $y = 2.76 \times 10^6 x - 6.85 \times 10^7$,标准偏差为 0.999 5,

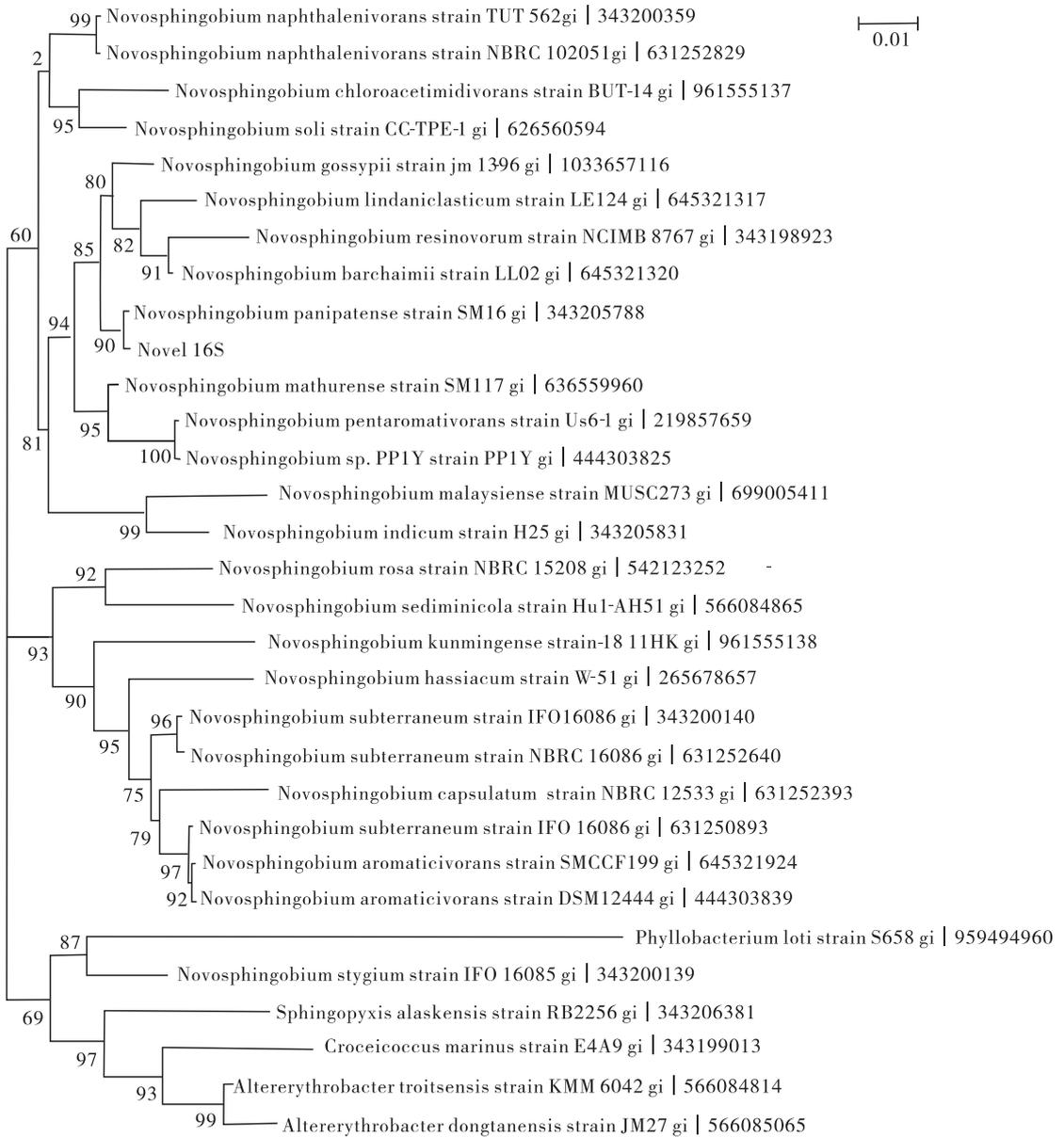


图6 菌株 YII - 3 16S rDNA 区域序列的系统进化树分析结果(图中 Novel 16S 为 YII - 3)

Fig. 6 The analysis result of phylogenetic tree constructed from 16S rDNA sequence of strain YII-3

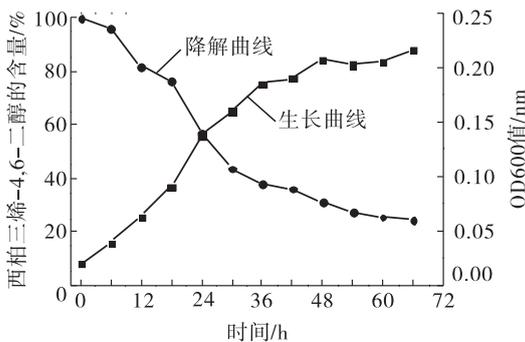


图7 菌株 YII - 3 的生长曲线和降解曲线

Fig. 7 The growth curve and degradation curve of YII-3

标准曲线准确可靠。

2) 以西柏三烯-4,6-二醇为唯一碳源,菌株 YII - 3 能高效降解西柏三烯-4,6-二醇生成金合欢醛(8.57%)。

3) 根据形态特征和 16S rDNA 系统进化树分析,初步鉴定菌株 YII - 3 为新鞘氨醇杆菌 (*Novosphingobium panipatense*)。

4) 新鞘氨醇杆菌培养 18 h 后快速增长,进入对数期,到 48 h 开始进入稳定期;在培养

66 h 后,西柏三烯-4,6-二醇降解率达到 75.58%.

参考文献:

- [1] ENZELL C R, WAHLBERG I, AASEN A J. Isoprenoids and alkaloids of tobacco [M] // Fortschritte der Chemie Organische DNA turstofe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vienna:Springer,1977: 1-79.
- [2] SEVERSON R F, JOHNSON A W, JACKSON D M. Cuticular constituents of tobacco: factors affecting their production and their role in insect and disease resistance and smoke quality [J]. Rev Adv Tob Sci,1985,11:105.
- [3] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2002:1-10.
- [4] ENZELL C R, WAHLBERG I. Tobacco isoprenoids-precursors of important aroma constituents [J]. Pure and Appl Chem,1990,62(7):1353.
- [5] 彭玉富,王根发,刘茂林,等. 不同陈化条件对烤烟烟叶香气成分变化的影响[J]. 河南农业大学学报,2009,43(4):349.
- [6] 毛多斌,张槐岭,贾春晓. 卷烟香味化学[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1994:343-345.
- [7] RALDUGIN V A, FEDOROV V K, PENTEGOVA V A. Oxidative transformations of cembranoid diterpenoids I—Oxidation of cembrene with chromium trioxide [J]. Chem Nat Compd,1976,12(3):278.
- [8] RALDUGIN V A, REZVUKHIN A I, KOROTKIKH L Y, et al. Oxidative transformations of cembrane diterpenoids II—Cembra-2, 7, 11-triene-4,5-diols [J]. Chem Nat Compd,1977,13(1):46.
- [9] RALDUGIN V A, REZVUKHIN A I, KOROTKIKH L Y, et al. Oxidative transformations of cembrane diterpenoids III—Epoxycebranes [J]. Chem Nat Compd,1977,13(4):439.
- [10] RALDUGIN V A, SALENKO V L, YAROSHENKO N I, et al. Oxidative transformations of cembrane diterpenoids IV—Photooxidation of cembrene [J]. Chem Nat Compd,1981,17(1):54.
- [11] ADNARP J, CHU W L A, ENZELL C R, et al. Cheminform abstract: tobacco chemistry. Part 76. Biotransformations of tobacco isoprenoids using plant cell cultures of *Tripterygium wilfordii* [J]. Acta Chem Scand,1993,24(42):683.
- [12] ADNARP J, CHU W L A, ENZELL C R, et al. Cheminform abstract: tobacco chemistry. part 77:biotransformations of a major tobacco cembratrienediol using plant cell cultures of *nicotiana glauca* [J]. Acta Chem Scand,1993,24(42):689.
- [13] ADNARP J, CHU W L A, ENZELL C R, et al. Cheminform abstract: tobacco chemistry. Part 78. biotransformations of tobacco cembranoids using plant cell cultures of *nicotiana glauca* [J]. Acta Chem Scand,1993,47:793.
- [14] 何峰. 烟草中 $\alpha(\beta)$ -2,7,11-西柏三烯-4,6-二醇的分离纯化与分析及热裂解研究 [D]. 郑州:郑州轻工业学院,2015.
- [15] 贾蓓蕾,魏涛,黄申,等. α -胡萝卜素降解产香菌株的分离、鉴定及发酵条件优化 [J]. 食品与发酵工业,2015,41(1):34.