

一株高产 2-苯乙醇酵母菌的筛选及鉴定

黄筱萍, 刘 兰, 熊大维, 黄国昌

(江西省科学院 微生物研究所, 江西 南昌 330029)

摘要: 从 24 株不同来源的酵母菌中分离筛选出一株对 2-苯乙醇耐受性强、生物转化合成 2-苯乙醇能力高的优良菌株 SH003, 该菌株能在含有 4 g/L 的 2-苯乙醇培养基中生长, 在优化的转化条件下, 转化合成 2-苯乙醇质量浓度达 4.31 g/L, 生成速率为 0.18 g/(L·h), L-苯丙氨酸摩尔转化率为 72.4%, 经菌落特征、菌体形态分析、生理生化试验, 结合 18S rDNA 序列分析, 由系统发育树表明它与酿酒酵母亲缘关系最近, 确定该菌株为 *Saccharomyces cerevisiae*。

关键词: 2-苯乙醇; 酿酒酵母; 菌株筛选和鉴定; 18S rDNA

中图分类号: TQ 92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)05—0531—06

Screening and Identification of High-Yield Strain for 2-Phenylethanol

HUANG Xiaoping, LIU Lan, XIONG Dawei, HUANG Guochang

(Institution of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China)

Abstract: A strain designated as SH003 with high 2-phenylethanol tolerance and bioconversion properties was selected from 24 yeast strains with different sources. It could grow in the medium containing 4 g/L 2-phenylethanol. Under the optimized conditions, the production and productivity of 2-phenylethanol respectively reached to 4.31 g/L and 0.18 g/(L·h). The molar conversion rate of L-phenylalanine to 2-phenylethanol was 72.4%. Identified by the morphological and physiological characteristics and its 18S rDNA sequence, strain SH003 was closely related with *Saccharomyces cerevisiae* on phylogenesis.

Keywords: 2-phenylethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, screening and identification, 18S rDNA

2-苯乙醇(2-phenylethanol, 2-PE)是一种具有玫瑰花香的芳香醇, 其作为主香和底香广泛应用于食品香精、化妆品洗涤产品等日化产品中。此外, 它还是重要的医药中间体, 是合成苯乙醇苷、羟基苯乙醇的前体, 作为精细化工中间体用于合成苯乙烯^[1]。目前, 全球 2-苯乙醇年产量近万吨, 基本采用化学合成法生产。其产品大都含有难闻的有毒副产

物, 如联二苯、二氯代乙苯、氯二醇等。随着人们对天然香料的需求增多, 从植物中主要是玫瑰精油中萃取获得的天然 2-苯乙醇已远不能满足市场的需求。2-苯乙醇是微生物代谢产物, 它是一些发酵食品如面包、葡萄酒、干酪的自然产物, 采用微生物生产 2-苯乙醇生产周期短、原料便宜, 具有大规模生产的潜在能力, 通过微生物发酵法生产 2-苯乙醇已

收稿日期: 2014-11-14

基金项目: 江西省重点科技支撑计划项目(20133BBE50018); 江西省科研院所基础设施配套项目(20151BBA13031)。

* 通信作者: 黄筱萍(1965—), 女, 江西南昌人, 理学硕士, 研究员, 主要从事生物发酵、活性物质提取精制方面的研究。

Email: plahxp@163.com

获得广泛关注。

酵母细胞合成 2-苯乙醇途径主要有两条:一是通过合成芳香族氨基酸的莽草酸途径合成,二是通过艾氏途径(Ehrlich pathway),即 L-苯丙氨酸通过转氨作用生成苯丙酮酸,再脱羧形成苯乙醛后,经氧化脱氢作用生成 2-苯乙醇,通过添加前体物质 L-苯丙氨酸使 2-苯乙醇的产量大幅提高^[2]。大多数酵母具有从头合成或转化 L-苯丙氨酸为 2-苯乙醇的能力,如马克斯克鲁维酵母^[3]、发酵毕赤酵母^[4]、乳酸克鲁维酵母、酿酒酵母及异常汉逊酵母等^[5],但通常产率较低,主要是严重的产物抑制成为酵母合成转化 2-苯乙醇的瓶颈。因此筛选对 2-苯乙醇耐受性好、转化率高的菌株成为国内外持续研究开发的关键。Etschmann M^[6]等以工业废糖蜜为碳源,L-苯丙氨酸为前体,从 14 株酵母菌中筛选出 2 株高产菌,采用原位分离技术,2-苯乙醇产量达到 3 g/L。Eshkol 等^[7]通过对 Ye9 系类菌种的筛选,得到 2 株对于 2-苯乙醇耐受性高的菌株,在补料分批发酵 72 h 后,2-苯乙醇质量浓度达 4.5 g/L。唐育岐等^[8]从 9 株酵母菌中筛选出一株 2-苯乙醇产量达 1.688 g/L 的酿酒酵母,通过培养基优化,2-苯乙醇产量达 4.402 5 g/L。崔志峰等^[9]采用紫外诱变等方法筛选出一株对 2-苯乙醇耐受性和产量较高的酿酒酵母突变株,2-苯乙醇的耐受性和产率分别提高了 50%和 9.1%。王航等^[10]从 8 株酵母菌株中 2-苯乙醇产量达 1.48 g/L 的酿酒酵母,通过紫外诱变和原生质融合,获得一株 2-苯乙醇产量达 2.51 g/L 的突变株。荣绍峰^[11]筛选出一株酿酒酵母菌种,在优化的条件下 2-苯乙醇产量达 3.2 g/L,梅建风等^[12]通过紫外诱变选育出一株酿酒酵母突变株,转化合成 2-苯乙醇产量达 5.4 g/L。通过从自然界中分离筛选酵母菌,以及从不同来源的酵母菌株中进行 2-苯乙醇的耐受性的筛选和对 L-苯丙氨酸转化合成 2-苯乙醇能力的研究,筛选到一株对 2-苯乙醇耐受性高、产率高的酵母菌株,并对它进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集和菌种来源 市售不同产地葡萄,酒厂泥窖,土壤,市售酵母干粉,外购菌种。

1.1.2 培养基

1)斜面及保藏培养基(g/L):麦芽汁琼脂培养

基。

2)筛选培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母粉 1, KH_2PO_4 5, MgSO_4 0.2, 2-苯乙醇 2, 琼脂粉 18; pH 6.5~6.7。2-苯乙醇于培养基灭菌后加入。

3)种子培养基(g/L):葡萄糖 30,蛋白胨 5,酵母粉 3,麦芽汁 3; pH 自然。

4)初筛转化培养基(g/L):葡萄糖 60,酵母粉 3, L-苯丙氨酸 6, KH_2PO_4 5, MgSO_4 0.2; L-苯丙氨酸于培养基灭菌后加入。

5)转化培养基(g/L):葡萄糖 100,酵母粉 5, L-苯丙氨酸 8;复合无机盐营养液 2 mL。L-苯丙氨酸于培养基灭菌后加入。

1.1.3 主要试剂 L-苯丙氨酸:河北冀海生物科技有限公司,纯度 99.5%;2-苯乙醇标准品:Sigma 公司,纯度 99.0%;甲醇:色谱纯;超纯水自制,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪,SPD-20A 紫外检测器,Agilent HC-C18 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),Olympus BX53 显微镜,成像系统 DP80, Sartorius prachfum 224-1CN 分析天平。

1.3 实验方法

1.3.1 酵母菌的筛选和分离纯化 取不同来源的样品,分别接入含有 2-苯乙醇的筛选培养基中,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇瓶培养 24 h,取 0.1 mL 富集后的菌液进行梯度稀释度,涂布于筛选培养基平板中,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h,挑选不同的单菌落划线纯化并镜检,将纯化的酵母菌接种麦芽汁斜面中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.2 种子液培养和生物转化 从斜面菌种中挑取少量菌苔接种于 30 mL 种子培养液中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 24 h,再按 10%的接种体积分数接种于含有 L-苯丙氨酸转化培养液中,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h,转化液于 10 000 r/min 离心 10 min,上清液采用高效液相色谱法检测 L-苯丙氨酸和 2-苯乙醇质量浓度。

1.3.3 酵母菌对 2-苯乙醇耐受性试验 斜面培养基灭菌后,加入 2-苯乙醇使其在培养基中的质量浓度分别为 0、1、2、3、3.5、4、5 g/L,用无菌量杯准确量取 20 mL 培养基,倒入直径 10 cm 的平皿中,制成厚度均一的筛选培养基平板。从待测菌株的斜面上取一环菌苔至含有玻璃珠的 50 mL 无菌水中,振荡

均匀,制成菌悬液,稀释涂平板,于28℃培养3d后进行菌落计数。

1.3.4 反相高效液相色谱法测定L-苯丙氨酸和2-苯乙醇含量 发酵液经10 000 r/min离心10 min,取上清液1 mL,加纯水稀释1倍,用0.22 μm滤膜过滤。样品于HPLC分析,流动相为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=50\%:50\%$,流速为1.0 mL/min,检测波长260 nm,柱温30℃,进样量10 μL。

1.3.5 酵母菌形态特征及生理生化鉴定 利用显微镜及观察固体平板上的菌落形态,并根据《酵母菌的特征与鉴定手册》^[13]所列的酵母菌鉴定方法进行生理生化鉴定。生理生化鉴定主要为碳源同化、氮源同化和其它特定的生理生化试验等。

1.3.6 18S rDNA的扩增、测序和系统树的构建 提取SH003菌株的基因组DNA,以引物NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')和NS8(5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3')扩增18S rDNA。PCR反应条件:94℃5 min预变性;94℃30 s变性,54℃30 s退火,72℃2 min延伸,35个循环;72℃10 min延伸,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,在北京诺禾致源生物信息科技公司完成测序。

将测序获得18S rDNA序列在NCBI核酸数据库中进行搜索,从数据库中获得高相似性的18S rDNA序列,下载相关菌种的18S rDNA序列,与供试菌株的序列一同用Clustal1.83软件进行多序列完全比对,结果采用MEGA5.2中的邻接法(Neighbor-Joining tree)进行系统树的构建,并用Bootstrap对进化树进行1 000次可信度分析。

2 结果与讨论

2.1 生物转化合成2-PE菌株的初筛

从筛选平板中挑选出24株菌株,经菌落形态和菌体形态观察,初步确定这些菌株均为酵母菌,分离纯化后,将这些酵母菌分别接种于初筛转化培养液中,于28℃、200 r/min培养24 h,以筛选合成转化2-苯乙醇能力较高的菌株,转化结束后,检测转化液中的2-苯乙醇质量浓度,结果见表1。

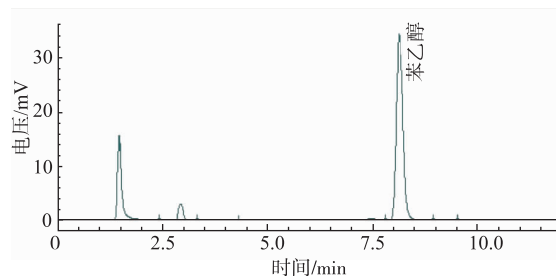
初筛结果表明,所分离的酵母菌合成转化2-PE的能力差异较大,有3株2-苯乙醇产量达2.5~3.2 g/L,13株2-苯乙醇产量为1.0~2.8 g/L,8株2-苯乙醇产量低于1 g/L。其中菌株SH003显示出最高的2-苯乙醇合成能力,其产量达3.15 g/L,转化率

为70.74%。图1为菌株SH003的发酵上清液的HPLC图谱。

表1 不同酵母菌株转化合成2-苯乙醇质量浓度和摩尔转化率

Table 1 2-PE concentration and molar yield in screening process by different yeast

菌株及编号	2-PE 质量浓度/(g/L)	摩尔转化率/%	来源
SH001	1.94	43.57	SH001-SH006 从不同葡萄园土壤和酒厂窖泥中分离
SH002	0.62	13.92	
SH003	3.15	70.74	
SH004	2.33	52.32	
SH005	0.75	16.84	
SH006	0.13	2.92	
GH001	0.46	10.33	GH001-GH007 从市售的不同产地葡萄中分离
GH002	2.88	64.67	
GH003	1.36	30.54	
GH004	1.88	42.22	
GH005	0.21	4.72	
GH006	0.84	18.86	
GH007	0.19	4.27	
安琪活性干酵母 AQ-1	2.66	59.73	湖北安琪酵母股份有限公司
安琪酿酒高活性干酵母 AQ-2	2.81	63.10	
安琪葡萄酒、果酒专用酵母 AQ-3	2.06	46.26	
丹宝利酿酒活性干酵母 DBL	2.47	55.47	广东丹宝利酵母有限公司
发酵毕赤酵母 PF	1.57	35.26	源于日本
酿酒酵母 JS-1	2.49	55.92	
酿酒酵母 JS-2	1.67	37.50	
乳酸克鲁维酵母 LS	0.57	12.80	购自广东微生物研究所
酿酒酵母 GIM2.45	1.51	33.91	
酿酒酵母 GIM2.15	1.34	30.09	
马克斯克鲁维酵母 GIM2.119	1.18	26.50	



(a) 2-苯乙醇标品

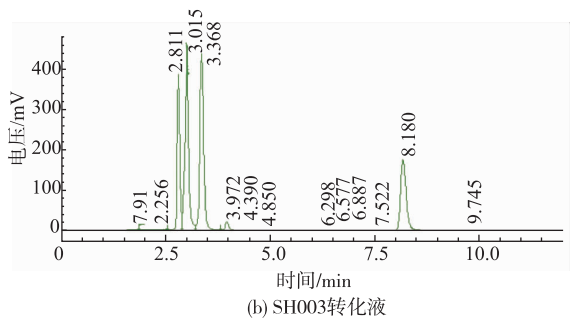


图 1 菌株 SH003 转化液 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of 2-phenylethanol from the transformed reaction solution of strain SH003

2.2 菌株对 2-苯乙醇耐受性试验

对产 2-苯乙醇高于 1 g/L 的 19 株菌进行 2-苯乙醇耐受性平板试验,在筛选培养基中加入 1~5 g/L 的 2-苯乙醇,分别用菌悬液涂布接种后,于 30 ℃ 培养 3 d。19 株菌均能在含 2 g/L 的平板中生长,在高于 2 g/L 的平板中其生长明显受到抑制,菌落变小,培养 72 h 有 3 株能在含 3 g/L 的 2-苯乙醇平板上生长,当质量浓度达到 4 g/L 以上时,基本上无菌落形成。菌株 SH003 在 3.5 g/L 的平板中生长良好,在 4.0 g/L 的平板上亦有少量菌生长,对 2-苯乙醇的耐受性明显高于其它 2 株酵母菌。表 2 为对 2-苯乙醇耐受性最强的 3 株菌株的结果。

表 2 不同 2-苯乙醇质量浓度平板中酵母菌落数

Table 2 Colony forming units of yeast in dishes containing different concentration of 2-PE

菌株	不同 2-PE 质量浓度平板中菌落数/(cfu/mL)						
	0 g/L	1 g/L	2 g/L	3 g/L	3.5 g/L	4 g/L	5 g/L
SH003	68	73	63	75	39	18	0
GH002	126	117	101	88	0	0	0
AQ-2	77	84	85	43	12	0	0

2.3 酵母菌株转化合成 2-苯乙醇能力试验

将初筛中对 2-苯乙醇耐受性较高,转化能力较高的 3 株酵母菌株,接种于转化培养基,于 28 ℃、200 r/min 培养 24 h,2-苯乙醇产率见表 3。

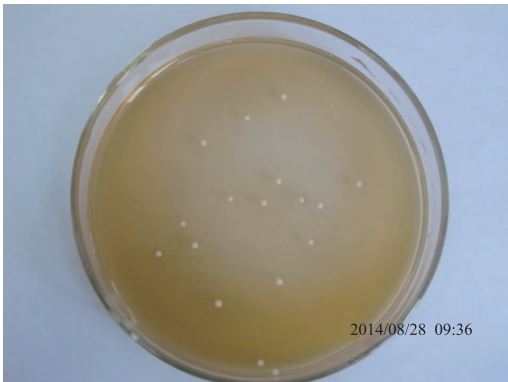
表 3 不同酵母菌株转化合成 2-苯乙醇质量浓度和摩尔产率
Table 3 2-phenylenthanol concentration and molar yield by different yeast

菌株	2-苯乙醇质量浓度/(g/L)	摩尔转化率/%
SH003	4.31	72.4
GH002	3.68	61.8
AQ-2	3.83	64.5

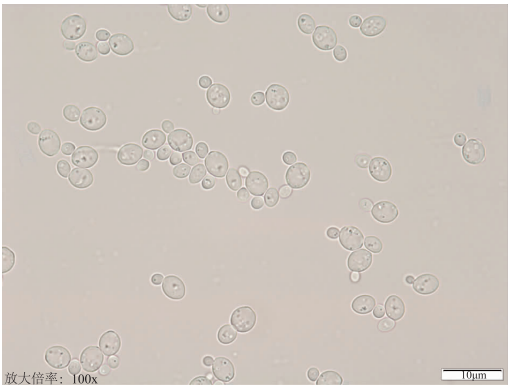
在提高转化培养基中 L-苯丙氨酸底物质量浓度和葡萄糖质量浓度后,各菌株转化合成 2-苯乙醇质量浓度均有很大提高,其中对 2-苯乙醇耐受性最高的菌株 SH003 产率最高,产 2-苯乙醇质量浓度达 4.3 g/L,摩尔转化率达 72.4%。这表明菌株对产物的耐受性越高,其生物转化合成 2-苯乙醇的能力越强。

2.4 菌株形态特征观察

菌株 SH003 在麦芽汁琼脂平板中于 28 ℃ 培养 48 h,其菌落形态和菌体形态特征见图 2 及表 4。



(a) SH003 菌落形态



(b) SH003 菌体形态 (100 ×)

图 2 酵母 SH003 形态特征

Fig. 2 Morphologic characteristic of yeast SH003

表 4 酵母 SH003 的形态特征

Table 4 Morphology characteristics of yeast SH003

项目	特征
菌落特征	乳白色、表面光滑,粘稠,边缘整齐
液体特征	浑浊、有沉淀、不形成菌膜
菌体形状	卵圆形
繁殖方式	一端出芽

2.5 生理生化鉴定

根据《酵母菌的特征与鉴定手册》和《食品微生物实验技术》等相关方法,生理生化鉴定主要进行了碳源同化、氮源同化和其它生理生化实验,采用广东省微生物研究所购买的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* GIM2.45 (ATCC AS2.119) 作为模式种,每个菌株分别作3个重复,结果见表5。

表5 *S.cerevisiae* GIM2.45 与菌株 SH003 部分生理生化特征
Table 5 Some physiological and biochemical characteristics of *S. cerevisiae* GIM2.45 and strain SH003

碳同化实验	结果		氮同化实验	结果	
	GIM2.45	SH003		GIM2.45	SH003
葡萄糖	+	+	(NH ₄) ₂ SO ₄	+	+
麦芽糖	+	+	KNO ₃	+	+
蔗糖	+	+	NaNO ₂	+	+
乳糖	-	-	天门冬素	-	-
半乳糖	+	+	L-赖氨酸	+	+
木糖	-	-	蛋白胨	+	+
甘露糖	+	+	乙胺	+	+
菊糖	-	-	肌酸	+	+
L-阿拉伯糖	-	-	其它		
纤维二糖	-	-	水解尿素	-	-
棉子糖	-	+	明胶液化	-	-
海藻糖	-	-	硝酸盐还原	-	-
柠檬酸	+	+	类淀粉生成	-	-
肌醇	-	-	0.1%、0.01%放线菌酮培养基	-	-
山梨醇	-	-	在无维生素培养基中生长	+	+

注:“+”为可以利用或生长或阳性反应,“-”为不能利用或不能生长或阴性反应

菌株 SH003 碳源同化实验中棉子糖同化为阳性,而菌株 *Saccharomyces cerevisiae* GIM2.45 棉子糖同化为阴性,其它生理生化特性均相同,从鉴定手册中亦列举了部分酿酒酵母可利用棉子糖。

2.6 18S rDNA 序列分析

测序结果表明,该菌株 18S rDNA 序列共 1 039 bp。在 NCBI 中进行 BLAST,结果表明,它与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 18S rDNA 序列同源性最高,达 99.0%。菌株 SH003 的 18S rDNA 序列与

S.cerevisiae MA09AN 菌株的序列只有 3 个碱基的差别。用 ClustalX+MEGA5.2 建立 SH003 的系统发育树,结果见图 3。可以看出,菌株 SH003 与 *S.cerevisiae* KMS0510 和 *S.cerevisiae* MA09-AN 同源性最高,可以确定酵母菌 SH003 归属于 *S.cerevisiae*。

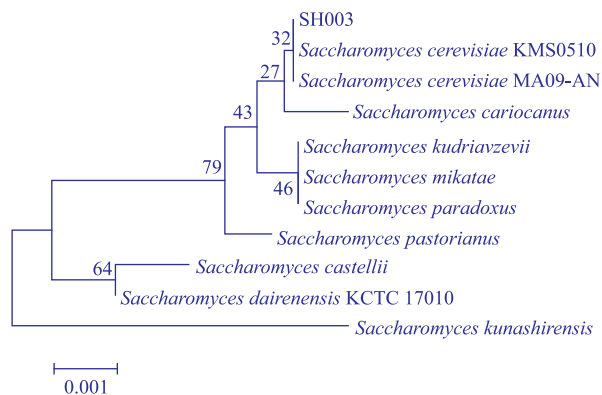


图3 基于菌株 SH003 18S rDNA 基因构建的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain SH003 on its 18S rDNA

3 结 语

酵母菌在自然界分布广泛,很多酵母菌都有转化生成 2-苯乙醇的能力,但不同酵母菌株中转化合成 2-苯乙醇的能力差别很大。从不同产地的市售葡萄酒、酒厂窖泥、市售干酵母中分离出的 17 株酵母菌和不同来源的 7 株酵母菌中筛选到 3 株转化合成 2-苯乙醇能力较高的菌株,通过对 2-苯乙醇耐受性和对 2-苯乙醇合成能力测试,发现酵母菌对 2-苯乙醇的耐受性越强,其转化合成 2-苯乙醇的能力越高,为从自然界中快速分离获得 2-苯乙醇高产菌株提供一种高效便捷的方法。从葡萄果皮中分离的菌株 SH003 对 2-苯乙醇的耐受性最强,在含有 4 g/L 的 2-苯乙醇培养基中亦能生长,在 L-苯丙氨酸底物质量浓度为 8 g/L 时,转化合成 2-苯乙醇质量浓度为 4.31 g/L,生成速率为 0.18 g/(L·h),摩尔转化率为 72.4%,该菌株的成功选育为后续生物转化合成 2-苯乙醇的研究和生产提供了很好的菌种来源。

通过形态学、生理生化鉴定,菌株 SH003 的形态学特征和生理生化特性均与酿酒酵母相符,通过 18S rDNA 序列分析,菌株 SH003 与酿酒酵母同源性最高,可确定其为酿酒酵母。

参考文献:

- [1] 卢健, 卢少明, 马集锋. β -苯乙醇的现状与发展前景[J]. 广东化工, 2012, 39(11): 123-124.
LU Jian, LU Shaoming, MA Jifeng. Situation and development prospects of the β -phenylethanol [J]. **Guangdong Chemical Industry**, 2012, 39(11): 123-124. (in Chinese)
- [2] 荣绍丰, 付艳丽. 微生物转化法生产 β -苯乙醇的研究进展[J]. 上海应用技术学院学报, 2009, 9(4): 266-269.
RONG Shaofeng, FU Yanli. Progress in β -phenylethanol production by biotransformation method [J]. **Journal of Shanghai Institute of Technology: Natural Science**, 2009, 9(4): 266-269. (in Chinese)
- [3] Fabre C E, Duviau V J, Blane P J, et al. Identification of volatile flavor compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus* [J]. **Biotechnol Lett**, 1995, 17: 1207-1212.
- [4] Huang C J, Lee S L, Chou C C. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions [J]. **Food Res Int**, 2001, 34: 277-282.
- [5] Etschmann M, Sell D, Schrader J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium [J]. **Biotechnol Lett**, 2003, 25: 531-536.
- [6] Etschmann M, Bluemke W, Sell D, et al. Biotechnological production of 2-phenylethanol [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 59: 1-8.
- [7] Eshiol N, Sendovski M, Bahalul M, et al. Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain [J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2009, 106(2): 534-542.
- [8] 唐育岐, 刘天明, 赵修报, 等. 高产 2-苯乙醇酵母菌株的筛选及培养基优化[J]. 中国食品添加剂, 2012, 3: 137-142.
TANG Yuqi, LIU Tianming, ZHAO Xiubao, et al. Screening of high-yield yeast strains for 2-phenylethanol medium optimization [J]. **China Food Additives**, 2012, 3: 137-142. (in Chinese)
- [9] 崔志峰, 车智博, 杨霄, 等. 2-苯乙醇耐受性高产酵母菌株的选育[J]. 浙江工业大学学报, 2008, 36(4): 427-430.
CHUI Zhifeng, CHE Zhibo, YANG Xiao, et al. Screening of the *Saccharomyces cerevisiae* strain for resistance and higher production of 2-phenylethanol [J]. **Journal of Zhejiang University of Technology**, 2008, 36(4): 427-430. (in Chinese)
- [10] 王航, 董清凤, 孟春, 等. 高产 2-苯乙醇酿酒酵母的选育[J]. 福州大学学报, 2010, 38(1): 153-156.
WANG Hang, DONG Qingfeng, MENG Chun, et al. Breeding for high-yield 2-phenylethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **Journal of Fuzhou University: Nature Science Edition**, 2010, 38(1): 153-156. (in Chinese)
- [11] 荣绍丰, 付艳丽, 王涛, 等. 酿酒酵母 AS2.1182 发酵生产 β -苯乙醇的研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(8): 69-77.
RONG Shaofeng, FU Yanli, WANG Tao, et al. The study on β -phenylethanol fermented by *Saccharomyces cerevisiae* AS2.1182 [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2009, 35(8): 69-77. (in Chinese)
- [12] 梅建风, 闵航. 生物转化合成 2-苯乙醇菌种的诱变选育[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 22-24.
MEI Jiangfeng, MIN Hang. Breeding of yeast strain for production of 2-phenylethanol by biotransformation [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2007, 33(5): 22-24. (in Chinese)
- [13] 巴尼特 J A, 佩恩 R W, 亚罗 D 著. 胡瑞卿译. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
- [14] 李成, 戚南昌, 彭果, 等. S-苯乙醇高产菌株的筛选及鉴定[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(2): 43-47.
LI Cheng, QI Nanchang, PENG Guo, et al. Screening and identification of S-phenylethanol-producing strain [J]. **Journal of Microbiology**, 2013, 33(2): 43-47. (in Chinese)
- [15] 苏艳秋, 朱卫, 吴鹏, 等. 耐高温、耐酸产酒精酵母的筛选与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(2): 243-247.
SU Yanqiu, ZHU Weihua, WU Peng, et al. Screening and identification of heat-resistant and acid-proof alcohol-producing yeast [J]. **Journal of Microbiology**, 2009, 29(2): 243-247. (in Chinese)