

## 原位预处理甘蔗糖蜜对耐高温酿酒酵母突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 生产乙醇的影响\*

### Promoting Ethanol Production of Cane Molasses by a Mutant Thermophilic Strain *Saccharomyces cerevisiae* AQ Using an *in situ* Pretreatment Method

何 珣<sup>1</sup>, 蒋学剑<sup>2\*\*</sup>, 花加伟<sup>1</sup>, 陈可泉<sup>1\*\*\*</sup>, 柏建新<sup>1</sup>

HE Xun<sup>1</sup>, JIANG Xuejian<sup>2</sup>, HUA Jiawei<sup>1</sup>, CHEN Kequan<sup>1</sup>, BO Jianxin<sup>1</sup>

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏南京 211816; 2. 江苏汤沟两相和酒业有限公司, 江苏连云港 222535)

(1. State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical, Nanjing Tech University, Nanjing, Jiangsu, 211816, China; 2. Tanggou Liangxianghe Wine Pty Ltd., Lianyungang, Jiangsu, 222535, China)

**摘要:**【目的】探讨和分析原位预处理糖蜜促进酿酒酵母生长和乙醇生产的原因, 开发一条绿色、低成本糖蜜乙醇生产途径。【方法】先在不同温度和初始糖浓度条件下, 考察酿酒酵母原始菌株 *Saccharomyces cerevisiae* A 及其突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 的生长和乙醇生产性能差异, 再以原位预处理前后糖蜜为发酵底物, 测定突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在不同培养基中的生长量、出芽率、乙醇产量、胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶、细胞质内 ATP 酶和线粒体内 ATP 酶活力, 研究原位预处理糖蜜对其生理特性的影响。【结果】在高温发酵糖蜜过程中, 突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 较原始菌株 *Saccharomyces cerevisiae* A 表现出更好的生长和乙醇发酵稳定性。当以原位预处理糖蜜作为 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 唯一碳源时, 其胞内 SOD 酶、过氧化物酶、细胞质内 ATP 酶和线粒体内 ATP 酶活力较以糖蜜原料为唯一碳源时分别提高 2.51 倍, 0.92 倍, 1.80 倍和 1.45 倍, 乙醇收率为 31.07%, 较以糖蜜原料为唯一碳源时提高 36.26%。【结论】突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 较原始菌株 *Saccharomyces cerevisiae* A 更适用于糖蜜发酵生产乙醇体系, 且新型的原位预处理方法能通过增强 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在糖蜜培养基中的呼吸作用, 提高菌株活力, 从而进一步提高乙醇收率。

**关键词:** 原位预处理 糖蜜 酿酒酵母 乙醇

中图分类号: TQ922.9 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)01-0001-06

收稿日期: 2016-02-16

作者简介: 何 珣(1983-), 女, 实验师, 主要从事废弃生物质资源化和能源化研究。

\* 国家“863”项目(2015AA021005)和广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 1598004-4)资助。

\*\* 共同第一作者: 蒋学剑(1984-), 男, 工程师, 主要从事白酒生产工艺研究。

\*\*\* 通讯作者: 陈可泉(1982-), 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事生物技术及酶催化研究, E-mail: kqchen@njtech.edu.cn。

**Abstract:**【Objective】The positive effects of the *in situ* pretreated molasses on *Saccharomyces cerevisiae* cell growth and ethanol production were explored and analyzed in order to develop a green and low cost pathway of ethanol production from molasses. 【Methods】First, the differences of growth and ethanol production performance were compared between the original strain *Saccharomyces cerevisiae* A and the mutant strains *Saccharomyces cerevisiae* AQ; then both un-treat-

ted and *in situ* pretreated molasses were used as fermentation substrate, in which different parameters of the mutant strain *Saccharomyces cerevisiae* AQ were measured, including the cell growth, budding rate, ethanol production, and the activity of intracellular superoxide dismutase (SOD), peroxidase, ATP enzyme in the cytoplasm and the mitochondria, to investigate the effects of the *in situ* pretreatment molasses on the physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* AQ. **【Results】** During the fermentation process of molasses under high temperature condition, the mutant strain *Saccharomyces cerevisiae* AQ presented better stability in cell growth and ethanol yield than its original strain *Saccharomyces cerevisiae* A. When the *in situ* pretreated molasses was used as the single carbon source of *Saccharomyces cerevisiae* AQ, the activities of intracellular SOD enzyme, peroxidase, ATP enzyme in the cytoplasm and ATP enzyme in the mitochondria increased by 2.51, 0.92, 1.80, and 1.45 times, respectively, than that obtained in raw molasses material medium. The obtained ethanol yield from pretreated molasses was 31.07%, which was 36.26% higher than the ethanol yield obtained from molasses raw material. **【Conclusion】** The mutant strain *Saccharomyces cerevisiae* AQ was more suitable for molasses ethanol fermentation system than its original strain *Saccharomyces cerevisiae* A, and the new *in situ* pretreatment method could further increase ethanol yield through enhancing *Saccharomyces cerevisiae* AQ respiration and cell vitality in molasses mediums.

**Key words:** *in situ* pretreatment, molasses, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.2016.01.001

## 0 引言

**【研究意义】**在当今世界能源紧缺的情况下,不仅筛选耐高温、产乙醇性能好的酿酒酵母菌株是必要的,还需要开发能加快乙醇发酵速率、缩短生产周期、提高乙醇收率等特点的绿色工艺。**【前人研究进展】**糖蜜是蔗糖生产的副产物,在我国广西、云南和广东等主要蔗糖产区已经成为生物乙醇的主要生产原料<sup>[1]</sup>。酿酒酵母是糖蜜乙醇生产的主要出发菌株,最佳培养温度多在 25~35℃,这使得在目前的酿酒酵母乙醇发酵生产中往往需要加入冷却工序<sup>[2-3]</sup>。若既能保证乙醇产量,又能将发酵温度提高至 38~40℃,将可以极大地节省能源,并在我国夏季高温季节仍能进行正常的乙醇发酵<sup>[4]</sup>。另一方面,糖蜜成分复杂且黏度高,培养基中的高浓度糖蜜会减弱发酵过程的传质和传热作用,从而抑制微生物菌株正常的生理代谢,降低细胞活力,导致乙醇产量偏低<sup>[5-7]</sup>。对糖蜜进行脱毒预处理,可以去除或降低其中对微生物生长产生抑制作用的有害物质,从而增加目标产品的生产效率<sup>[8-10]</sup>。**【本研究切入点】**现有预处理工艺需要对糖蜜原料进行稀释、加热、强酸/碱处理,工艺过程复杂且易产生环境污染。微生物细胞在预处理前后糖蜜中的生理特性差异也鲜有报道。因此,有必要探讨和分析原位预处理糖蜜促进酿酒酵母生长和乙醇生产的原因,开发一条绿色、低成本糖蜜乙醇生产途径。

**【拟解决的关键问题】**以从窖泥中筛选的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* A 及其突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 为出发菌株,考察在不同温度和初糖浓度条件下,两株菌的生长和乙醇生产性能差异,再以原位预处理前后糖蜜为发酵底物,测定突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在不同培养基中的生长量、出芽率、乙醇产量,并通过细胞内与呼吸作用相关酶的活力,即胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶、细胞质内 ATP 酶和线粒体内 ATP 酶活力的变化,从机理上分析原位预处理对菌株生长和发酵过程的促进作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 甘蔗糖蜜

甘蔗糖蜜购于广西南宁,含水分 23.52%、总糖 43.50% (其中葡萄糖 3.69%、果糖 8.91%、蔗糖 30.90%)、灰分 7.21%、总氮 1.34%、胶体 15.92%、其他 8.51%。

甘蔗糖蜜原料在常温下的黏度为 10.3 Pa·s。经复合表面活性剂/氨水二元复合体系<sup>[11]</sup>预处理后,在常温下的黏度降低至 2.3 Pa·s。

#### 1.1.2 菌株

*Saccharomyces cerevisiae* A 为野生型酿酒酵母,从江苏汤沟两相和酒业有限公司窖泥中筛选获

得,保藏于中国典型培养物保藏中心,编号 CCTCC AY 2015007。将 *Saccharomyces cerevisiae* A 进行紫外诱变,筛选得到最优突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ,保藏于中国典型培养物保藏中心,编号 CCTCC AY 2015008。

### 1.1.3 培养基

酵母菌种子培养基(YPD 培养基, W/V):1% 酵母膏,2% 蛋白胨,2% 葡萄糖,自然 pH 值;在 115℃ 条件下灭菌 15 min;固体培养基添加 2.5% 琼脂。

发酵培养基(W/V):总糖 20%(以糖蜜或葡萄糖为唯一碳源),蛋白胨 2%,磷酸氢二铵 0.05%,尿素 0.05%,磷酸氢二钾 0.02%,硫酸镁 0.02%,pH 值为 6.0。发酵培养基在 121℃ 条件下灭菌 20 min。

## 1.2 方法

### 1.2.1 种子培养

挑取保存在斜面培养基的菌种到 YPD 液体培养基中,装液量为 50 mL/500 mL 三角瓶,37℃、200 r/min 培养至对数生长中后期,作为种子液备用。

### 1.2.2 发酵培养

种子液以 10%(V/V)的接种量添加至发酵培养基中,发酵培养基初始 pH 值为 6.0,培养基装液量为 150 mL/500 mL 三角瓶,30~37℃,200 r/min 发酵 36 h,再静置发酵至终点。

#### 1.2.2.1 温度对乙醇发酵的影响

以糖蜜原料为发酵培养基中的唯一碳源,初始总糖浓度为 100 g/L,发酵温度分别为 30℃、37℃ 和 42℃,测定发酵 34 h 后 *Saccharomyces cerevisiae* A 和 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 的菌体生长量( $OD_{600}$ )和出芽率,以及发酵液中的乙醇浓度,考察温度对两株酿酒酵母的生长及乙醇发酵的影响。

#### 1.2.2.2 初始糖浓度对乙醇发酵的影响

以糖蜜原料为发酵培养基中的唯一碳源,发酵温度为 37℃,初始糖浓度分别为 100 g/L、150 g/L、200 g/L、250 g/L 和 300 g/L,测定发酵 34 h 后 *Saccharomyces cerevisiae* A 和 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 的菌体生长量( $OD_{600}$ )和出芽率,以及发酵液中的乙醇浓度,考察初始糖浓度对两株酿酒酵母的生长及乙醇发酵的影响。

#### 1.2.2.3 预处理糖蜜对乙醇发酵及胞内呼吸作用相关酶活力的影响

根据上述实验结果选取最优的发酵菌株,分别以葡萄糖、糖蜜原料、预处理糖蜜为发酵培养基的唯一碳源,初始总糖浓度为 200 g/L,发酵温度为 37℃,每隔 4~8 h 取样测定发酵液中的乙醇浓度,以及酿酒酵母菌体生长量( $OD_{600}$ )、胞内 SOD 活力、胞内过氧

化物酶、细胞质内 ATP 酶和线粒体 ATP 酶活力,考察预处理对发酵菌株乙醇生产、菌体生长及胞内呼吸作用相关酶活力的影响。

### 1.2.3 分析

用生物传感仪(SBA-40C 型,山东微生物研究所)测定发酵液中乙醇浓度。

用紫外分光光度计(752s 型,上海棱光技术有限公司)测定发酵液中酿酒酵母  $OD_{600}$ 。用血球计数板测定发酵过程中的酿酒酵母菌体数目并计算细胞出芽率。

酿酒酵母蛋白含量测定使用 BCA(Bicinchoninic Acid)蛋白定量试剂盒,购自 Sigma-Aldrich;胞内 SOD 活力的测定使用 SOD 活力分析试剂盒,购自 BioVision。试剂盒的使用均按说明书进行。胞内过氧化物酶和 ATP 酶活力分别按照惠永华等<sup>[12]</sup>和 Korshunov 等<sup>[13]</sup>报道的方法进行,其中线粒体的提取方法按张凤莲<sup>[14]</sup>报道的方法操作。

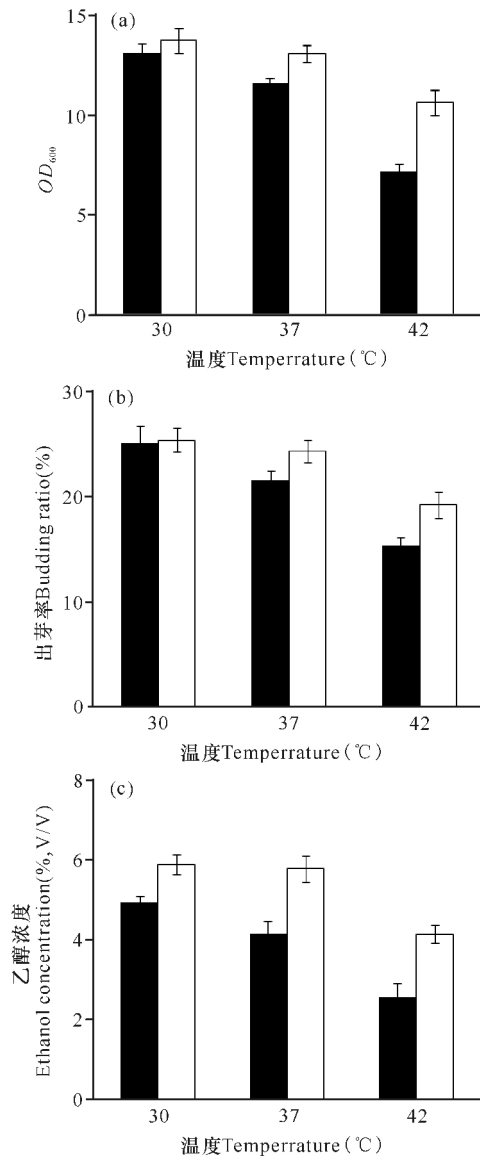
## 2 结果与分析

### 2.1 温度对乙醇发酵的影响

在温度分别为 30℃、37℃ 和 42℃ 时发酵 34 h 后,原始菌株 *Saccharomyces cerevisiae* A 的  $OD_{600}$  分别为 13.15,11.64 和 7.16,菌株生长量随着发酵温度的升高而降低;而突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 的  $OD_{600}$  分别为 13.75,13.12 和 10.66,当发酵温度在 30~37℃ 时,菌体生长量无显著变化,当温度升高至 42℃ 时,生长量降低 22.47%(图 1a)。两株酿酒酵母在出芽率和乙醇生产上也出现类似的情况:*Saccharomyces cerevisiae* A 的发酵温度从 30℃ 提高至 37℃ 时,出芽率为 20.92%,降低了 13.99%(图 1b),乙醇生产量为 4.07%,降低了 15.99%(图 1c),当温度提高至 42℃ 时,出芽率和发酵液中乙醇浓度仅分别为 15.33%和 2.55%;而突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 的发酵温度从 30℃ 提高至 37℃ 时,出芽率和乙醇生产量无显著变化,将温度进一步提高至 42℃ 时,出芽率和发酵液中乙醇浓度才分别降低至 19.22%和 4.13%(图 1b、图 1c)。说明相对于原始菌株 *Saccharomyces cerevisiae* A,突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在 30~37℃ 的发酵温度下具备更好的生长量和乙醇生产稳定性。

### 2.2 初始糖浓度对乙醇发酵的影响

从图 2 可以看出,当初始糖浓度为 100 g/L 时,两株酿酒酵母的  $OD_{600}$ 、出芽率和发酵液乙醇浓度都无明显差别,而当初始糖浓度进一步增加时,原始菌



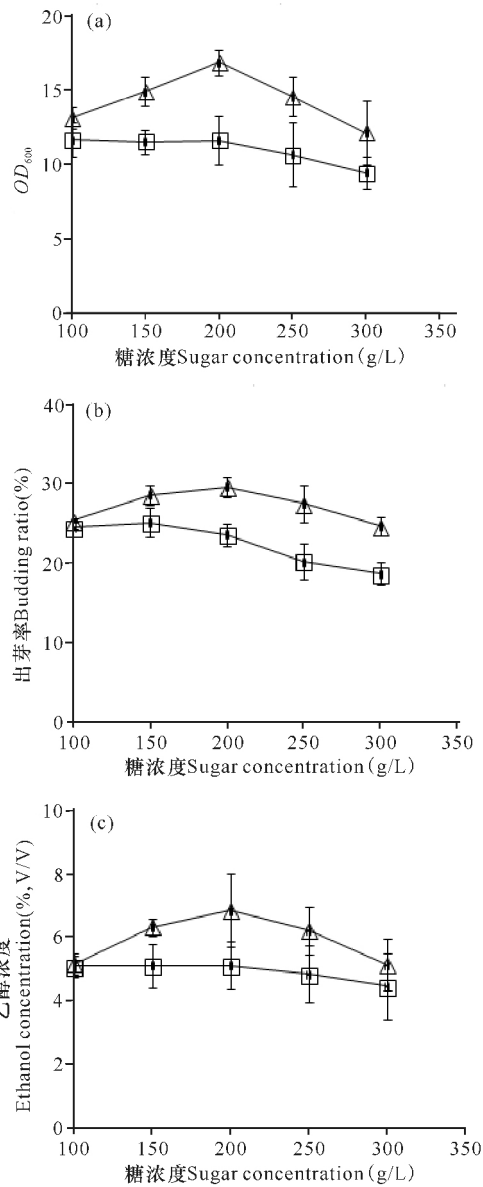
■: *Saccharomyces cerevisiae* A; □: *Saccharomyces cerevisiae* AQ

图1 温度对菌株生长和乙醇生产的影响

Fig. 1 The effect of temperature on cell growth and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*

株 *Saccharomyces cerevisiae* A 的生长和乙醇生产受到明显抑制。突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在初始糖浓度为 200 g/L 时获得最高的  $OD_{600}$ 、出芽率和乙醇浓度,分别为 16.88,9.62%和 6.84%。此条件下得到的乙醇收率为 22.80%,而葡萄糖生产乙醇的理论收率为 51.1%,故该条件下糖蜜原料生产乙醇的收率仅为理论收率的 44.62%。

结合 2.1 节的分析可知,突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 较原始菌株 *Saccharomyces cerevisiae* A 更适用于糖蜜发酵乙醇体系,因此选取突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 进行后续研究。



—□—: *Saccharomyces cerevisiae* A;  
—△—: *Saccharomyces cerevisiae* AQ

图2 初始糖浓度对菌株生长和乙醇生产的影响

Fig. 2 The effect of initial sugar concentration on cell growth and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.3 预处理对乙醇发酵的影响

由图 3 可知, *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在葡萄糖培养基中的生长速度最快,发酵 34 h 后  $OD_{600}$  达到 26.66,发酵液中的乙醇浓度为 12.14%,表明葡萄糖仍是 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 生长和乙醇生产的最佳碳源。*Saccharomyces cerevisiae* AQ 在糖蜜原料培养基中发酵 48 h 的  $OD_{600}$  仅有 16.80,发酵液中的乙醇浓度仅为 6.84%。而将预处理糖蜜作为唯一碳源时,发酵 43 h 的  $OD_{600}$  为 20.98,比糖蜜原料获得的  $OD_{600}$  值高 24.88%;发酵液中乙醇浓度为 9.32%,乙醇收率为 31.07%,该收率为理论收率的 60.80%,较糖蜜原料培养时提高 36.26%。

## 2.4 预处理对胞内呼吸作用相关酶活力的影响

如图4所示, *Saccharomyces cerevisiae* AQ 分别在以葡萄糖、糖蜜原料和预处理糖蜜为唯一碳源的培养基中发酵 34 h 后, 其细胞内 SOD 酶活力分别为 10.45 U/mg 蛋白、2.18 U/mg 蛋白和 7.66 U/mg 蛋白; 胞内过氧化物酶活力分别为 0.36 U/mg 蛋白、0.12 U/mg 蛋白和 0.23 U/mg 蛋白; 细胞质内 ATP 酶活力分别为 0.26 U/mg 蛋白、0.05 U/mg 蛋白和 0.14 U/mg 蛋白, 线粒体内 ATP 酶活力分别为 0.42 U/mg 蛋白、0.11 U/mg 蛋白和 0.27 U/mg 蛋白。

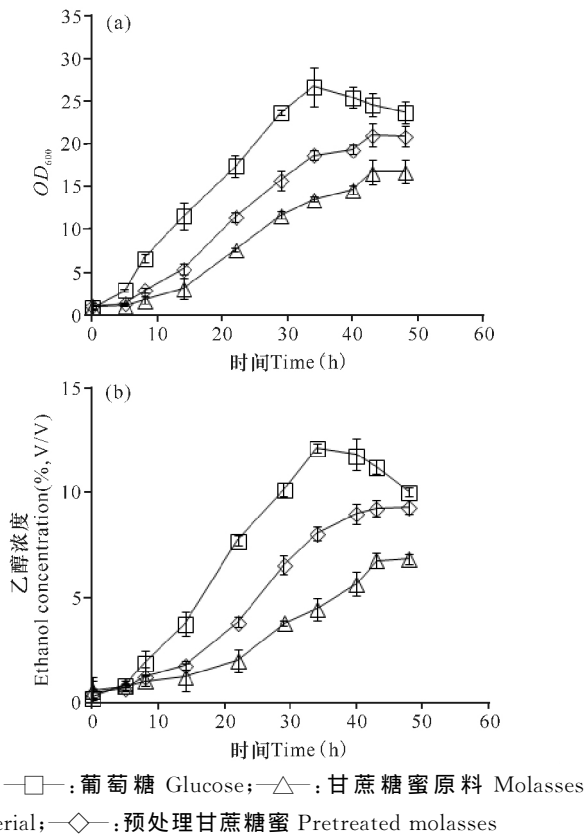


图3 预处理对生长和乙醇生产的影响

Fig. 3 The effect of pretreatment on cell growth and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*

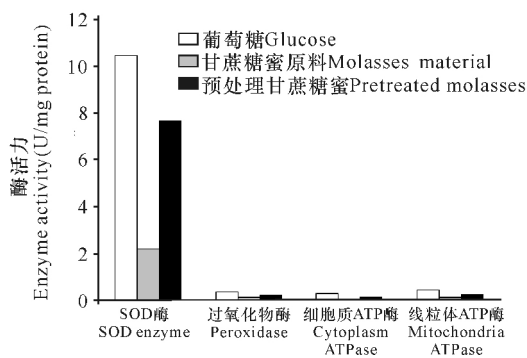


图4 预处理对菌株胞内酶活力的影响

Fig. 4 The effect of pretreatment on intracellular enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae*

以预处理糖蜜作为唯一碳源, *Saccharomyces cerevisiae* AQ 的胞内 SOD 酶活力、胞内过氧化物酶活力、细胞质和线粒体内获得的 ATP 酶活力较以糖蜜原料为唯一碳源时分别增加 2.51 倍、1.92 倍、1.80 倍和 1.45 倍。

## 3 讨论

筛选糖蜜乙醇生产性能良好的菌株, 以及绿色简便的糖蜜预处理方法是提高糖蜜乙醇生产的关键技术。本研究以广西产甘蔗糖蜜为原料, 探讨原位预处理方法对酿酒酵母高温发酵糖蜜乙醇的促进作用, 以及在以原位预处理前后的甘蔗糖蜜为唯一碳源的培养基中, 酿酒酵母突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 的生理特性变化。研究表明, 突变株 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在 37°C 条件下仍能保持良好的糖蜜乙醇发酵能力。原位预处理方法将糖蜜黏度降低了 77.67%, 以该预处理糖蜜作为 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 发酵过程的唯一碳源, 乙醇收率为 31.07%, 较糖蜜原料提高 36.26%。相对于其他糖蜜预处理方法而言, 原位预处理同样可以极大地促进菌体生长和乙醇生产, 还具有工艺简便、成本低、对环境友好等优点。

在前人的研究中发现, 细胞内 SOD、过氧化物酶, 以及 ATP 酶活力与酿酒酵母在受到高盐、高浓度乙醇、高糖等胁迫时的菌体活力呈正相关<sup>[15]</sup>。本研究中当以原位预处理糖蜜作为 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 唯一碳源时, 胞内 SOD 酶、过氧化物酶、细胞质内 ATP 酶和线粒体内 ATP 酶活力也较以糖蜜原料为唯一碳源时分别增加 2.51 倍、0.92 倍、1.80 倍和 1.45 倍, 说明经原位预处理获得甘蔗糖蜜可通过增强 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 在糖蜜培养基中的呼吸作用, 提高菌株活力, 从而进一步提高乙醇收率。但原位预处理前后, 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* AQ 糖蜜乙醇生产过程中胞内产物、胞内酶活力的变化机理还需深入考察。

## 参考文献:

- [1] 张穗生, 陆琦, 陈东, 等. 甘蔗糖蜜酒精高产酵母的发酵特性研究[J]. 广西科学, 2010, 17(4): 363-367. ZHANG S S, LU Q, CHEN D, et al. Studies on alcohol fermentation features of a high-yield *Saccharomyces cerevisiae* using sugarcane molasses as feedstock [J]. Guangxi Sciences, 2010, 17(4): 363-367.
- [2] SARRIS D, PAPANIKOLAOU S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies[J]. Engineering in Life Sciences, 2016. DOI: 10.

- 1002/elsc.201400199.
- [3] ABDEL-BANAT B M, HOSHIDA H, ANO A, et al. High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(4):861-867. DOI:10.1007/s00253-009-2248-5.
- [4] 曾云中, 吴雪昌, 金珊, 等. 耐高温酿酒酵母的选育——II: 菌株的选育及产酒发酵特性初探[J]. *杭州大学学报: 自然科学版*, 1992(3):327-335.  
ZENG Y Z, WU X C, JIN S, et al. Screening thermotolerant yeast producing ethanol—II: The primary study of screening of strains characteristic of ethanol fermentation[J]. *Journal of Hangzhou University: Natural Science*, 1992(3):327-335.
- [5] SIQUEIRA P F, KARP S G, CARVALHO J C, et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17):8156-8163.
- [6] KUNDU S, PANDA T, MAJUMDAR S K, et al. Pretreatment of indian cane molasses for increased production of citric acid [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26:1114-1121.
- [7] INAMDAR S. Effect of pretreatment of molasses and posttreatment of fermented broth in industrial production of ethanol[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1994(1):181-187.
- [8] HE X, CHEN K, LI Y, et al. Enhanced L-lysine production from pretreated beet molasses by engineered *Escherichia coli* in fed-batch fermentation[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(8):1615-1622.
- [9] ROUKAS T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production[J]. *Process Biochemistry*, 1998, 33(8):805-810.
- [10] KÜCÜKASIK F, KAZAK H, GÜNEY D, et al. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(6):1729-1740.
- [11] 陈可泉, 何珣, 张弘, 等. 一种复合降黏剂及其在糖蜜降黏中的应用: 201510773321. X [P]. 2015-11-16.  
CHEN K Q, HE X, ZHANG H, et al. A Novel Composite Viscosity Reducer and Its Application in the Reducing the Molasses Viscosity: 201510773321. X [P]. 2015-11-16.
- [12] 惠永华, 王路, 牛金涛. 一种检测乳过氧化物酶方法的建立[J]. *南方农业学报*, 2011, 42(1):105-108.  
HUI Y H, WANG L, NIU J T. Development of a method to detect lactoperoxidase (LP) activity in milk [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(1):105-108.
- [13] KORSHUNOV S S, SKULACHEV V P, STARKOV A A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria [J]. *FEBS Letters*, 1997, 416(1):15-18.
- [14] 张凤莲. 酿酒酵母 PP2C 类蛋白磷酸酯酶对线粒体 ATP 酶活性的调控[D]. 天津: 天津大学, 2008.  
ZHANG F L. Regulation of Mitochondrial ATPase Activity by Type 2C Protein Phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2008.
- [15] 熊雅兰, 晏伟, 张穗生, 等. 酿酒酵母呼吸突变株的高糖胁迫反应研究[J]. *广西科学*, 2014, 21(1):34-41.  
XIONG Y L, YAN W, ZHANG S S, et al. The response of a *Saccharomyces cerevisiae* respiratory mutant to high sugar stress[J]. *Guangxi Sciences*, 2014, 21(1):34-41.

(责任编辑: 陆雁)