

# 酿酒酵母温度敏感性突变株的选育

## Breeding of temperature-sensitive mutant from *Saccharomyces cerevisiae*

岳希洁<sup>1</sup> 蒋雪薇<sup>1</sup> 罗晓明<sup>1</sup> 周慧<sup>1</sup>  
YUE Xi-jie<sup>1</sup> JIANG Xue-wei<sup>1</sup> LUO Xiao-ming<sup>1</sup> ZHOU Hui<sup>1</sup>  
刘永乐<sup>1</sup> 陈代文<sup>2</sup> 周志明<sup>2</sup>  
LIU Yong-le<sup>1</sup> CHEN Dai-wen<sup>2</sup> ZHOU Zhi-ming<sup>2</sup>

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410004;  
2. 连南瑶族自治县奇乡生物科技有限公司, 广东 清远 513300)

(1. College of Chemistry & Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Liannan Yao autonomous County Qixiang BIO-SCI CO., Ltd, Qingyuan, Guangdong 513300, China)

**摘要:**为获得酵母胞内产物的高效分泌,以酿酒酵母二倍体(2n)及单倍体(n)为出发菌,经紫外诱变处理,筛选获得 5 株可能具有温度敏感性的突变株。为进一步鉴定,以野生菌 Y<sub>1</sub> 为对照菌,测定其胞外核酸、蛋白质及果糖-1,6-二磷酸(FDP)的含量,发现突变菌株 Ts<sub>4</sub>(2n)自溶程度最高,其核酸、蛋白质渗透率达 1.709,1.483,胞外 FDP 浓度为 38 μg/mL,较 Y<sub>1</sub>(2n)提高了 24.1%。此外突变株 Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>(n)、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup>(n)也会发生一定程度的自溶。因此,该试验共获得温度敏感性突变株 3 株,即 Ts<sub>4</sub>(2n)、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>(n)和 Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup>(n)。

**关键词:**酿酒酵母;紫外诱变;温度敏感性突变株;自溶

**Abstract:** In order to obtain the efficient secretion of intracellular product in yeast, as the original strain, *Saccharomyces cerevisiae* (2n), (n) were mutagenized with UV treatment, five mutants strain may have temperature-sensitive were selected. To further identify, Y<sub>1</sub> was used as the control bacterium, and its content of extracellular nucleic acids, proteins and FDP were determined, find that the highest degree of autolysis was Ts<sub>4</sub>(2n), it's content of nucleic acid and protein in extracellular environment were 1.709, 1.483, the concentration of FDP in extracellular environment was 38 μg/mL, higher than Y<sub>1</sub> 24.1%. Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>(n) and Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup>(n) also have a certain extent of temperature-sensitive. Therefore, 3 temperature-sensitive mutants were obtained in this study, which are Ts<sub>4</sub>(2n), Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>(n) and Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup>(n).

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*; UV mutagenesis; temperature-

sensitive mutant; autolysis

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为一种模式生物,具有安全可靠、遗传背景清晰等优点,被认为是外源基因最理想的真核生物表达系统<sup>[1-2]</sup>。由于其不能有效释放外源基因所表达的蛋白<sup>[3-4]</sup>,故在工业中的应用存在着明显的局限性。近年来国内外开展了一些利用酵母细胞膜通透性提高外源蛋白分泌的研究,多集中在两个方面:① 采用物理方法处理<sup>[5-7]</sup>,通过超声波、高压脉冲及光照等方法对细胞膜结构产生破坏,提高胞内物质及外源蛋白的分泌能力;② 利用基因工程的手段<sup>[8-10]</sup>,重组或改造外源基因中的信号肽,增强外源蛋白的分泌能力。这两类方法中,机械处理对仪器设备要求较高、工业化生产难度大<sup>[11-12]</sup>;基因工程手段则处理过程较为繁琐,技术难度较大<sup>[13]</sup>。相比之下,传统的遗传育种相对简便得多,但其研究少见报道,主要集中在条件致死突变株的研究上,特别是高渗胁迫突变株的研究<sup>[14]</sup>。条件致死突变株除高渗胁迫突变株外,还有温度敏感性突变株。温度敏感性突变株(Temperature-sensitive mutant, Ts)是一种比较常用的条件致死突变株<sup>[15]</sup>,其温度敏感性突变位点经常发生在细胞膜上,诱变筛选突变位点在细胞膜上的温度敏感性突变株亚致死类型,可以通过改变温度促使酵母适度自溶,产生细胞膜通透,促进胞内物质释放到胞外<sup>[16]</sup>。本试验拟以酿酒酵母二倍体(2n)及单倍体(n)为出发菌株,采用紫外诱变的方法,以胞内蛋白质、核酸渗透率及胞外 1,6-二磷酸果糖(Fructose-1, 6-diphosphate, FDP)浓度为考察指标,筛选出温度敏感性突变株亚致死类型,利用其适度自溶特性,简便高效地构建能有效释放胞内产物的宿主系统,为酵母工程菌工业化的应用提供一条新的思路。

**基金项目:**清远市科技计划项目(编号:2013A024,2014A023);湖南省科技计划项目(编号:2013FJ4036)

**作者简介:**岳希洁,女,长沙理工大学在读硕士研究生。

**通讯作者:**蒋雪薇(1972—),女,长沙理工大学副教授,博士。

E-mail:jxw\_72@sina.com

**收稿日期:**2016-06-15

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 菌种

酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) Y<sub>1</sub>:长沙理工大学食品与发酵研究所分离并保藏。

#### 1.1.2 培养基

酵母菌活化培养基:麦芽汁琼脂培养基,参考文献[17]<sup>[242-244]</sup>制备;

酵母菌生孢子培养基:McClary培养基,参考文献[18]制备;

酵母菌完全培养基:YEPD培养基,参考文献[17]<sup>[242-244]</sup>制备;

种子液培养基:葡萄糖 10 g,蛋白胨 20 g,酵母膏 10 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值为 6,于 121 ℃,湿热灭菌 20 min;

发酵培养基:葡萄糖 30 g,磷酸二氢钾 27.2 g,磷酸氢二钾 45.6 g,氯化镁 2 g,于 121 ℃,湿热灭菌 20 min。

#### 1.1.3 仪器

显微成像系统:Eclipse E200 型,尼康仪器(上海)有限公司;

紫外分光光度计,UV1800 型,日本岛津公司;

高速离心机:TGL-16G 台式,常州诺基仪器有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备 菌株 Y<sub>1</sub> 28 ℃、160 r/min 培养 12 h,无菌生理盐水离心洗涤 3 次,制成 10<sup>8</sup> CFU/mL 的菌悬液备用。

1.2.2 紫外(UV)诱变致死率曲线的测定 取 10 mL 菌悬液于无菌皿中,搅拌状态下,进行不同剂量的紫外照射,紫外照射条件:紫外灯 30 W、垂直照射距离 30 cm,分别照射 10, 20, 30, 40, 50, 60 s;计算致死率并确定最佳的诱变剂量。

1.2.3 温度敏感性突变株筛选及鉴定方法 将诱变后的酵母悬液进行梯度稀释,涂平板,影印接种于两组平板上(2n 采用麦芽汁平板,n 采用麦氏平板),分别于 28, 37 ℃ 培养 48 h,挑选 28 ℃ 平板上生长良好,37 ℃ 平板上微生长或不生长的菌株进入复筛;对应点接初筛挑选的菌株于两组平板上,先点接的平板于 37 ℃ 培养,后点接的 28 ℃ 培养,再次筛选 37 ℃ 微生长或不长的菌株为目标菌<sup>[19]</sup>。

1.2.4 酵母核酸、蛋白质渗透率测定方法 将培养 12 h 的菌悬液接种于发酵培养基中,接种量 10 mL/100 mL,37 ℃ 培养,2 h 后取两份 10 mL 发酵液,一份紫外分光光度法测其在 600 nm 处的吸光值,另一份进行 80 ℃ 水浴 5 min,然后 1×10<sup>4</sup> r/min 离心 20 min,取其上清液,分别测定其在 260, 280 nm 处吸光值,OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub> 与 OD<sub>600</sub> 比值分别计为胞外核酸、蛋白质的渗透率。

1.2.5 FDP 含量及提高率的测定 FDP 含量测定方法参考文献[20]。FDP 提高率按式(1)计算:

$$R = \frac{C_2 - C_1}{C_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

R——FDP 提高率,%;

C<sub>1</sub>——出发菌株胞外 FDP 含量,μg/mL;

C<sub>2</sub>——诱变筛选菌株胞外 FDP 含量,μg/mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 酿酒酵母单倍体(n)的制备

将酿酒酵母二倍体(2n)接种于麦氏培养基上培养 1 周,筛选获得其单倍体(n),并通过显微镜下观察,检验酵母菌二倍体生孢子情况,其单倍体(n)子囊孢子见图 1。由图 1 可知,在麦氏培养基上培养时,酵母菌二倍体(2n)营养细胞易转变成子囊,这时细胞核进行减数分裂,形成 4 个子囊孢子。

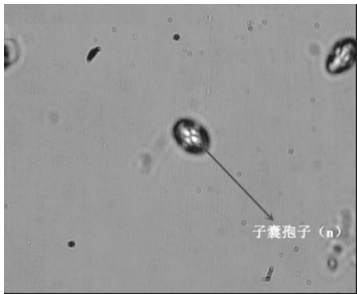


图 1 酿酒酵母子囊孢子

Figure 1 The ascospores of *Saccharomyces cerevisiae* (100×)

### 2.2 紫外诱变条件确定

紫外是一种应用广泛、效果明显的物理诱变剂,具有诱变频率高、不易回复突变等优点,是工业微生物育种中最常用和有效的诱变剂之一<sup>[21]</sup>。酿酒酵母的营养体多以二倍体(2n)的形式存在,但其单倍体(n)的突变率相对较高,且单倍体(n)突变株经重新结合形成二倍体(2n)后,诱变所获得的性状能较稳定的遗传下去,因此,考虑以酵母二倍体(2n)、单倍体(n)同时作为诱变出发菌株,对其进行紫外诱变,结果见图 2、3。由图 2 可知,随着紫外诱变时间的延长,酵母二倍体(2n)致死率逐渐升高,通常情况下取致死率 70%~80%为最佳,因此可以确定酵母二倍体(2n)的紫外照射时间为 30 s。酵母单倍体(n)由于孢子壁的保护作用,其耐紫外线能力要远远强于酵母细胞,同样,根据其诱变致死率曲线(图 3),确定紫外照射时间为 4.5 min。

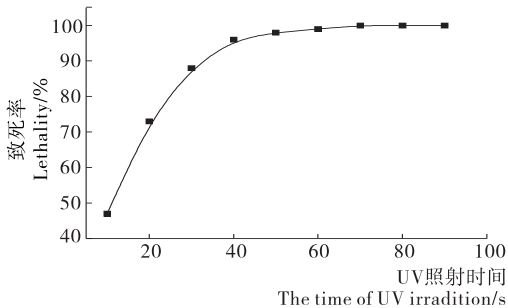


图 2 酿酒酵母二倍体(2n)致死率曲线

Figure 2 The lethalitycurve of *Saccharomyces cerevisiae* (2n)

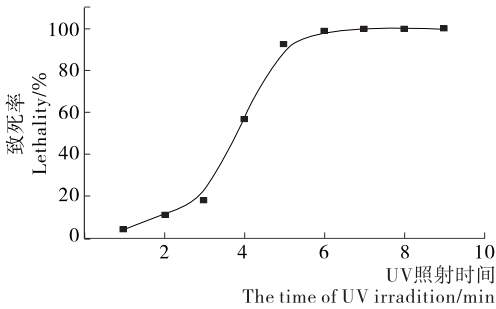


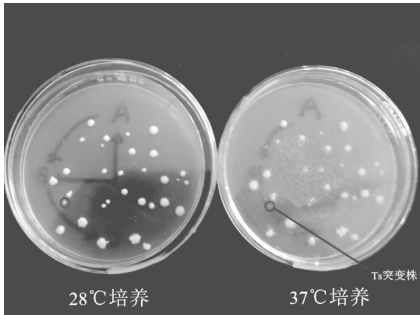
图 3 酿酒酵母单倍体(n)致死率曲线

Figure 3 The lethalitycurve of *Saccharomyces cerevisiae* (n)

2.3 温度敏感性突变株的筛选及生长特征鉴定

2.3.1 酿酒酵母温度敏感性突变株影印培养法初筛 以温度为筛选条件,通过影印培养法对诱变菌株中的温度敏感性突变株进行初筛,结果见图 4。图 4 中左右两个平板上菌落一一对应,圆圈标出为突变株,不同温度培养时,其生长状况出现较大差异,即 28℃生长正常,37℃无法生长或生长微弱,根据 37℃平板对照培养情况,可以筛选出无法生长或生长微弱的菌株为温度敏感性突变株,经初筛,二倍体(2n)及单倍体(n)共筛选出 20 株。

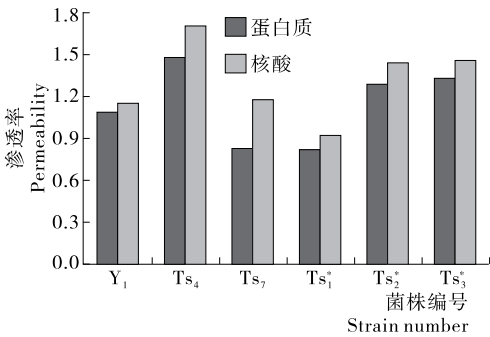
2.3.2 酿酒酵母温度敏感性突变株逐个检出法复筛 初筛后的突变株逐个培养法进一步复筛,筛选结果见图 5,二倍体



Ts 突变株:温度敏感性突变株

图 4 影印培养筛选温度敏感性突变株

Figure 4 Screening temperature-sensitive mutants by replica plating



Ts 突变株:温度敏感性突变株

图 5 逐个检出法筛选温度敏感性突变株

Figure 5 Screening temperature-sensitive mutants by colony detection one by one

(2n)及单倍体(n)生长谱分别见表 1、2。结果发现,初筛中的菌株经复筛进一步验证,只有 Ts<sub>4</sub>、Ts<sub>7</sub>、Ts<sub>1</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 5 株菌株在 28℃时正常生长,37℃时不能正常生长,判断其为温度敏感性突变株。

2.4 温度敏感性突变株自溶程度考察

2.4.1 温度敏感性突变株蛋白质、核酸胞外渗透率测定 蛋白质、核酸为细胞内的大分子物质,正常的细胞很难分泌到胞外。温度敏感性突变株的突变位点如果在细胞膜上,升高温度时,就会导致细胞膜适度自溶,细胞膜结构不完整,出现较大的通透性,胞内的蛋白质及核酸等大分子物质分泌到胞外。因此,可以通过测定酵母胞外的蛋白质、核酸等大分子物质的渗透情况来判断细胞自溶的程度及大分子物质外泌能力。测定突变株 Ts<sub>4</sub>、Ts<sub>7</sub>、Ts<sub>1</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 的蛋白质、核酸渗透率,与出发菌株 Y<sub>1</sub>对比,结果见图 6。由图 6 可知,突变株 Ts<sub>4</sub>、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 蛋白质、核酸渗透率明显大于出发菌株,说明突其变位点在细胞膜上,出现适度自溶。其中 Ts<sub>4</sub> 自溶程度最大,其胞外蛋白质、核酸渗透率分别达到了 1.483,1.709,约为出发菌株的 1.36 倍及 1.47 倍。突变株 Ts<sub>7</sub> 菌株与出发菌株相差不大,说明突变位点不在细胞膜上。突变株 Ts<sub>4</sub>、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 蛋白质、核酸渗透率均超过了出发菌株,其突变位点发生在细胞膜上,37℃培养时细胞膜发生适度自溶,属于具有大分子外泌能力的温度敏感性突变株。对比发现同一

表 1 酿酒酵母二倍体(2n)突变菌株生长谱<sup>†</sup>

Table 1 Auxanogram of*Saccharomyces cerevisiae* (2n) mutants

| 菌株编号 | Y <sub>1</sub> | Ts <sub>1</sub> | Ts <sub>2</sub> | Ts <sub>3</sub> | Ts <sub>4</sub> | Ts <sub>5</sub> | Ts <sub>6</sub> | Ts <sub>7</sub> | Ts <sub>8</sub> | Ts <sub>9</sub> | Ts <sub>10</sub> |
|------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 28℃  | +              | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +               | +                |
| 37℃  | +              | +               | +               | +               | —               | +               | +               | +/-             | +               | +               | +                |

<sup>†</sup> Y<sub>1</sub>为出发菌株;Ts<sub>n</sub>为二倍体菌株;—不生长;+/-生长微弱;+生长良好。

表 2 酿酒酵母单倍体(n)突变菌株生长谱<sup>†</sup>

Table 2 Auxanogram of*Saccharomyces cerevisiae* (n) mutants

| 菌株编号 | Y <sub>1</sub> | Ts <sub>1</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>2</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>3</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>4</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>5</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>6</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>7</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>8</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>9</sub> <sup>*</sup> | Ts <sub>10</sub> <sup>*</sup> |
|------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 28℃  | +              | +/-                          | +                            | +                            | +                            | +                            | +                            | +                            | +                            | +                            | +                             |
| 37℃  | +              | —                            | +/-                          | —                            | +                            | +                            | +                            | +                            | +                            | +                            | +                             |

<sup>†</sup> Y<sub>1</sub>为出发菌株;Ts<sub>n</sub><sup>\*</sup>为单倍体菌株;—不生长;+/-生长微弱;+生长良好。

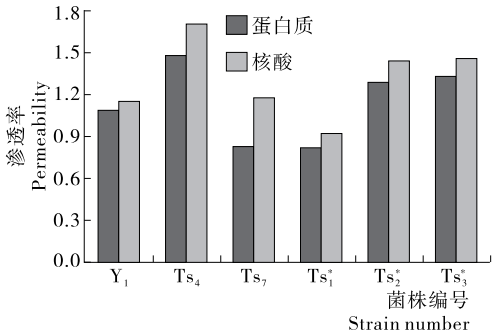


图6 突变株蛋白质、核酸渗透率

Figure 6 Penetration of protein and nucleic acid in extracellular environment

菌株的核酸渗透率始终大于蛋白质渗透率,这主要是因为

在细胞内外环境中,核酸的存在较蛋白质更为稳定,其水解酶类少于蛋白质水解酶类,故胞外含量更大。

2.4.2 温度敏感性突变株胞外 FDP 测定 FDP 也是可以衡量酵母细胞自溶程度的重要指标,在胞内产生,是糖酵解途径的中间产物,其存在时间非常短,正常情况下胞外很难积累<sup>[22]</sup>。由图 7 可知,酿酒酵母在发酵时间为 2 h 时胞外 FDP 浓度达到最大值,随着发酵时间延长,胞外 FDP 浓度开始降低;突变株 Ts<sub>4</sub>、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 的 FDP 值均明显高于出发菌株,其中 Ts<sub>4</sub> 自溶程度最高,其胞外 FDP 含量高达 38 μg/mL;突变株 Ts<sub>7</sub> 的 FDP 值与出发菌株相近。计算 5 个突变株 2 h 培养后的胞外 FDP 较出发菌株的提高率,突变株 Ts<sub>4</sub> 增幅最大,达到 24.1%,Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 增幅也较为明显(图 8)。因此可以确定,当培养温度提高到 37℃,温度敏感性突变株 Ts<sub>4</sub>、

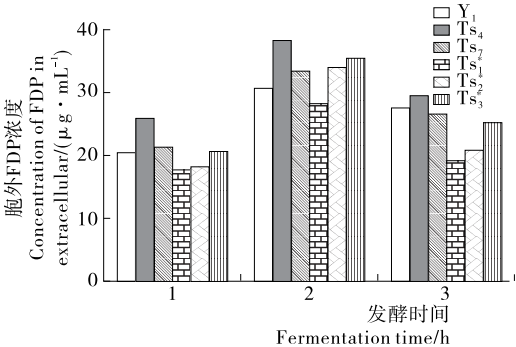


图7 突变株胞外 FDP 浓度

Figure 7 Concentration of FDP in extracellular environment

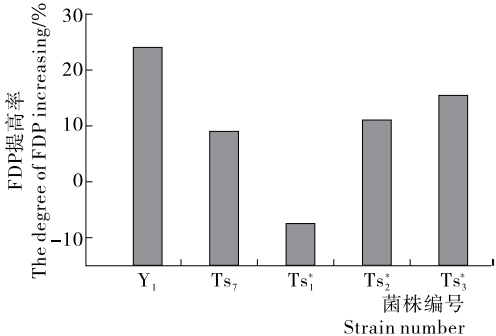


图8 突变株胞外 FDP 提高率

Figure 8 The increasing of extracellular FDP

Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 细胞均出现条件性适度自溶,表现出较好的外泌特性。

多次传代并分别测定突变株 Ts<sub>4</sub>、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 胞外 FDP 浓度及提高率,结果显示均具有较好的遗传稳定性,因此确定 Ts<sub>4</sub>、Ts<sub>2</sub><sup>\*</sup>、Ts<sub>3</sub><sup>\*</sup> 为具有大分子物质外泌能力的温度敏感性突变株,且遗传性状稳定。

3 结论

高通透性细胞膜是增强酿酒酵母对胞内物质分泌能力的重要因素。通过简单的诱变处理,筛选出对温度较为敏感的条件自溶性菌株——温度敏感性突变株,可以较大程度提高酿酒酵母对外源蛋白的分泌能力。由于温度控制简便的特点,所筛选的目标菌株将具有良好的工业应用潜力。温度敏感性突变株条件性自溶对于改变细胞膜壁的通透性有着重要的意义,可有效促进胞内产物的胞外渗透,较好地简化了胞内产物的提取工艺。

参考文献

[1] 何秀萍. 国内酿酒酵母分子遗传与育种研究 40 年[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 450-458.

[2] BUSER C. Toward sub-second correlative light and electron microscopy of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Methods in Cell Biology*, 2010, 96: 217-234.

[3] 刘文, 胡巍, 王洪海. 酵母表达基因工程产物特性分析[J]. 生物工程进展, 2001, 21(2): 74-76.

[4] 姚春阳, 沈旭, 庄金秋. 巴斯德毕赤酵母表达系统的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(2): 26-28.

[5] FONSECA R A S, SILVA RAFAEL R, KALIL S J, et al. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(7): 1 165-1 171.

[6] 谢阁, 杨瑞金, 卢蓉蓉, 等. 利用高压脉冲电场诱导啤酒酵母细胞释放蛋白质与核酸[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(3): 44-47.

[7] 李冰, 王颖, 徐炳政, 等. 超声波辅助提取酵母源类金属硫蛋白工艺的优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 194-197.

[8] 李毅, 李子杰, 高晓冬. 木糖异构酶酿酒酵母孢子“微胶囊”的构建及酶学性质分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(4): 6-11.

[9] 暴立娟, 宋庆凤, 李杰. 重组木聚糖酶的安全高效表达与应用研究[J]. 食品工业科技, 2011(1): 156-158.

[10] SUDA Y, RODRIGUEZ R K, COLUCCIO A E, et al. A screen for spore wall permeability mutants identifies a secreted protease required for proper spore wall assembly[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7184.

[11] 史敬灼, 沈晓茜, 司彦娜. 基于 Lyapunov 稳定性的超声波电机模型参考自适应转速控制[J]. 微电机, 2014, 47(2): 37-39.

[12] 刘建, 胡孟春, 唐登攀, 等. 基于 LabVIEW 的脉冲辐射探测器灵敏度标定系统[J]. 仪表技术与传感器, 2014(4): 25-27.

[13] KAISA K, BÄRBEL H H, MARIE-F G G. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering[J]. *Yeast*, 2005, 22(5): 359-368.

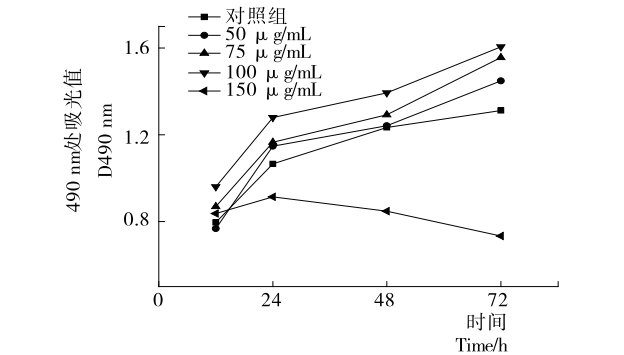


图 2 蓝莓花色苷对鸡胚成纤维细胞单层生长的影响  
Figure 2 Effect of blueberry anthocyanins for primary chicken embryonic fibroblast growth by MTT assay

浓度高于 100  $\mu\text{g/mL}$  时对鸡胚成纤维细胞生长产生抑制作用。本试验结果可为蓝莓花色苷抗以鸡胚成纤维细胞为模型的病毒研究提供了理论依据,但有关蓝莓花色苷促进及破坏鸡胚成纤维细胞生长的机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 侯格妮, 李俊, 李然洪, 等. 蓝莓白兰地特征香气成分的 GC—MS 分析[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 21-26.

(上接第 8 页)

[2] 梅亚敏, 郭敏. 基于碰撞声信号的农产品品质检测技术综述[J]. 西北农林科技大学学报, 2013, 41(4): 213-219.

[3] PEARSON T C. Detection of pistachio nuts with closed shells using impact acoustics[J]. Applied Engineering in Agriculture, 2001, 17(2): 249-253.

[4] CETIN A E, PEARSON T C, TEWFIK A H. Classification of closed and open-shell pistachio nuts using voice-recognition technology[J]. Transaction of ASAE, 2004, 47(2): 659-664.

[5] MAHMOUD Omid, ASGHAR Mahmoudi, MOHAMMAD H Omid. An intelligent system for sorting pistachio nut varieties[J]. Expert Systems with Applications, 2009, 36: 11 528-11 535.

[6] MAHMOUD Omid. Design of an expert system for sorting pistachio nuts through decision tree and fuzzy logic classifier[J]. Expert Systems with Applications, 2011, 38: 4 339-4 347.

[7] ONARAN I, PEARSON T C, YARDIMCI Y, et al. Detection of underdeveloped hazelnuts from fully developed nuts by impact acoustics [J]. Information & Electrical Technologies Division of ASABE, 2006, 49(6): 1 971-1 976.

(上接第 12 页)

[14] 彭娜, 曾新安. 高糖胁迫对生长期酿酒酵母生理代谢的影响 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(4): 397-399.

[15] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2009: 22.

[16] 郭科, 周兵. 酵母 Ndi1p 突变表达文库的建立和温度敏感株的筛选[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(10): 966-970.

[17] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.

[2] CHEN Jian, ZHAO Ying, TAO Xiao-yun. Protective effect of blueberry anthocyanins in a CCl<sub>4</sub>-induced liver cell model[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 60(2): 1 105-1 112.

[3] PETROFICIANI J. Cell substrates; where do we stand after 50 years of discussion[J]. Developmental Biology, 2006, 123: 11-21, discussion 55-73.

[4] 徐渊金, 杜琪珍. 花色苷生物活性的研究进展[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 154-157.

[5] 王秀臻, 张培培, 程合刚, 等. 鸡胚成纤维细胞替代鸡胚成纤维细胞上清快速检测外源性禽白血病毒病的探究[J]. 中国家禽, 2013, 35(10): 18-21.

[6] 盖丽丽, 张莉, 姜世金, 等. 3 种花色苷对 DF-1 细胞的影响[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(4): 242-245.

[7] 王亚丽, 李颖畅, 马春颖, 等. 蓝莓叶多酚提取物对 3 种细菌的抑菌活性[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(3): 163-167.

[8] 李颖畅, 孟宪军, 孙靖靖, 等. 蓝莓花色苷的降血脂和抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(10): 44-48.

[9] 李颖畅, 马春颖, 孟宪军, 等. 蓝莓花色苷提取物抗油脂氧化能力研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(2): 92-95.

[10] 凌美庭. 可供开发食品添加剂(IX): 兰莓提取物及其抗氧化作用[J]. 粮食与油脂, 2003(6): 45-48.

[11] 康雪燕. 猪传染性胃肠炎病毒 S 蛋白在毕赤酵母中的分泌表达及免疫原性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010: 37.

[8] KHALIFA S, KOMARIZADEH M H, TOUSI B. An intelligent system for grading walnuts based on acoustic emission and neural [J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2011, 9(1): 132-135.

[9] KHALES S, MAHMOUDI A, HOSAINPOUR A, et al. Detection of walnut varieties using impact acoustics and artificial neural networks (ANNs) [J]. Modern Applied Science, 2012, 6 (1): 43-49.

[10] 杨红卫. 小麦品质分析的信号处理方法研究[D]. 郑州: 解放军信息工程大学, 2005: 44-46.

[11] 杨丽. 基于信号处理的小麦品质声学检测方法研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2007: 21-27.

[12] 张丽娜. 基于 BP 神经网络的小麦碰撞声信号分类[J]. 电子设计工程, 2013, 21(7): 163-168.

[13] 臧富瑶, 冯涛, 王晶, 等. 基于撞击声的开心果分拣模型研究 [J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 157-160.

[14] 刘华平. 语音信号端点检测方法综述及展望[J]. 计算机应用研究, 2008, 25(8): 2 278-2 283.

[15] 宋知用. MATLAB 在语音信号分析与合成中的应用[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2013: 117-122, 159.

[18] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工出版社, 2006: 355.

[19] 张莉, 王婧, 杨婷, 等. 产  $\beta$ -葡萄糖苷酶酿酒酵母菌株紫外诱变选育及酶学性质分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 220-224.

[20] 李文莉, 缪冶炼, 陈介余, 等. 木质素降解物对酿酒酵母的毒性 [J]. 生物加工过程, 2015, 13(1): 82-88.

[21] 苗兰兰, 张东杰, 王颖. 复合诱变高产金属硫蛋白酵母菌株的筛选[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 261-264.

[22] 姚咏婧. 插入式超声对酵母细胞膜通透性影响的研究[J]. 广东化工, 2006, 33(1): 42-44.