

酿酒酵母低渗敏感性突变株的选育

Breeding of low-permeability sensitive mutant from *Saccharomyces cerevisiae*

叶菁¹ 岳希洁² 蒋雪薇^{1,3} 罗晓明¹

YE Jing¹ YUE Xi-jie² JIANG Xue-wei^{1,3} LUO Xiao-ming¹

陈代文³ 吴健¹ 李赤翎¹

CHEN Dai-wen³ WU Jian¹ LI Chi-ling¹

(1. 长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410004; 2. 益阳职业技术学院生物与信息工程系, 湖南益阳 410600; 3. 广东益鲜美生物科技有限公司, 广东清远 513300)

(1. School of Chemical & Biological Engineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. College of Biological & Information Engineering, Yiyang Vocational & Technical College, Yiyang, Hunan 410600, China; 3. Guangdong Yixianmei BIO-SCI Co., Ltd, Qingyuan, Guangdong 513300, China)

摘要:为促进酿酒酵母胞内产物的有效释放,以其野生型二倍体(2n)菌株 Y₁ 为出发菌株,经紫外诱变处理,通过测定其胞外 FDP 浓度及核酸、蛋白质渗透率,对比各突变株在低渗条件下的自溶程度。结果表明:突变株 Hs₅ * (n) 低渗培养时,条件性自溶程度最高,其胞外 FDP 浓度达 25.82 μg/mL,低渗培养 6 h 时,其核酸、蛋白质渗透率高达 1.86, 2.07。此外突变株 Hs₂ * (n)、Hs₁ (2n) 也具有较好的条件性自溶能力。试验共筛选获得 3 株低渗敏感性突变株,与野生型菌株相比,条件性自溶的低渗敏感性突变株能有效促进胞内大分子物质的外泌。

关键词:酿酒酵母;紫外诱变;低渗敏感性突变株;条件性自溶

Abstract: In order to improve the efficient secretion of intracellular product in *Saccharomyces cerevisiae*, wild diploid Y₁ (2n) were mutagenized with UV treatment as original strain. To further identify, the degree of autolysis of each mutant strain was contrasted in low permeability condition by the test of its content of FDP, extracellular nucleic acids and proteins. The results showed: Hs₅ * (n) showed the highest degree of conditional autolysis in low permeability

condition, the concentration of FDP in extracellular environment was 25.81 μg/mL. At the sixth hour in low permeability, its penetration rate of nucleic acid and protein in extracellular environment were 1.86 and 2.07, respectively. In addition, mutant strain Hs₅ * (n), Hs₁ (2n) also had a great extent of conditional autolysis capacity. These three low-permeability mutant strains obtained in this study possessed greater efficiency of intracellular product secretion contrast with wild strain.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; UV mutagenesis; low-permeability mutant; conditional autolysis

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是生物技术领域最常用的真核外源基因表达系统^[1],但其坚硬的细胞壁及细胞膜是阻碍胞内产物释放的主要屏障^[2],因此如何促进胞内物质及外源蛋白的高效分泌成为研究热点。目前提高胞内物质释放的方法主要有物理法、化学法和生物法,其中物理法和化学法是目前最常采用的手段,这 2 种方法虽然效果明显但也存在着不足^[3-5]。物理法以脉冲电场、超声波等方法为主,对仪器设备要求较高;化学法主要采用溶剂破碎,易导致蛋白质等大分子物质发生改变。此外,采用基因工程手段改造外源基因中的信号肽,增强外源蛋白的分泌能力也是研究的主流方向^[6-7],但此法技术难度高、处理步骤复杂。

相比之下,采用传统的遗传育种方式筛选条件致死突变株显得更为安全、简便。条件致死突变株的突变位点经常发生在细胞壁(膜)的相关基因上,导致其在相应的条件下细胞通透性增大,从而促进细胞发生自溶,使胞内物质释放到胞外^[8]。目前,常见的条件致死酵母菌株主要有三类:温度敏感突变株^[8]、高渗胁迫突变株^[9]以及低渗敏感突变株^[10]。

基金项目:长沙市科技计划重点项目(编号:K1403029-11);清远市科技计划项目(编号:2013A024,2014A023);湖南省水生资源食品加工工程技术研究中心开放基金项目(编号:2015GCZX07)

作者简介:叶菁,女,长沙理工大学在读硕士研究生。

通信作者:蒋雪薇(1972—),女,长沙理工大学副教授,硕士生导师,博士。E-mail:jxw_72@sina.com

李赤翎(1966—),女,长沙理工大学教授,硕士生导师,博士。E-mail:baiweili2005@163.com

收稿日期:2017-05-24

课题组^[11]前期研究过程中以酿酒酵母 Y_1 为出发菌株, 诱变选育出一株温度敏感突变酵母菌 Ts_1 , 37 °C 培养时其胞内大分子物质分泌能力明显提升, 证明了条件致死突变株能有效释放胞内产物。基于此, 本研究拟继续对酿酒酵母 Y_1 进行诱变处理, 采用等渗、低渗培养基对比培养进行初筛, 再以胞外 1,6-二磷酸果糖 (Fructose-1, 6-diphosphate, FDP) 浓度及胞内蛋白质、核酸渗透率为复筛指标, 筛选出具有高蛋白外泌水平的低渗敏感性突变株 (Hypotonic-sensitive mutant, Hs), 旨在丰富酿酒酵母条件致死菌株类型, 并为快速构建有效释放胞内产物的宿主系统提供更为简单有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y_1 : 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

活化斜面培养基: 麦芽汁培养基^{[12]242};

生孢子培养基: Meclary 培养基^{[12]244};

种子培养基: YEPD 培养基^[13];

YEPDK 培养基: YEPD 培养基中添加 4.5% KCl;

YEPDS+K 培养基: YEPD 培养基中添加 4.5% KCl 和 0.004% 十二烷基磺酸钠 (SDS);

YEPS 培养基: 用蔗糖代替 YEPD 培养基中的葡萄糖;

YEPDS 培养基: YEPD 培养基中添加 0.004% 十二烷基磺酸钠 (SDS);

发酵培养基: 在 YEPDS 培养液中添加 0.2% $MgCl_2$ 。

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;

恒温振荡培养箱: ZWY-2102C 型, 上海智城分析仪器制造有限公司;

高速离心机: 台式 TGL-16G 型, 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_1 在 28 °C、160 r/min 下培养 12 h, 无菌生理盐水离心洗涤 3 次, 制成 10^8 CFU/mL 的菌悬液备用。

1.2.2 紫外诱变及突变株的筛选 根据文献^[11], 对 Y_1 菌的二倍体 (2n) 及单倍体 (n) 菌悬液进行紫外诱变, 将诱变后的酵母菌悬液梯度稀释, 影印接种于 YEPDK、YEPDS 平板上, 28 °C、培养 48 h。挑选在 YEPDK 上正常生长, 而在 YEPDS 上微生长或不生长的突变株进入复筛; 取初筛挑选的菌株依次接种于 YEPD、YEPDK、YEPDS、YEPS、YEPDS+K 平板上, 再次筛选低渗透压时微生长或不长的菌株^[2]。

1.2.3 FDP 含量的测定 参考文献^[14], 并采用血球计数板计算发酵液菌体浓度, 以每毫升发酵液中 10^7 个细胞计算 FDP 含量。

1.2.4 酵母核酸、蛋白质渗透率的测定 取筛选获得的突变株依次进行活化、种子培养基培养、发酵培养基培养 (培养 3 h 时添加 SDS 0.04 g/L)。取两份发酵液, 其中一份采用紫外分光光度法直接测定菌体密度 (OD_{600}), 另一份先 80 °C 水浴 5 min, 再 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 分别测定 OD_{260} 、 OD_{280} , 按式 (1)、(2) 计算胞外核酸渗透率 (LD_{260})、蛋白质渗透率 (LD_{280})。

$$LD_{260} = \frac{OD_{260}}{OD_{600}}, \quad (1)$$

$$LD_{280} = \frac{OD_{280}}{OD_{600}}. \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 酵母子囊孢子的制备

通常条件下酵母细胞以二倍体的形式存在, 进行出芽生殖, 但在特殊条件诱导下 (以醋酸钠为唯一碳源, 缺乏氮源), 可以进行有性繁殖, 产生 2~4 个单倍体有性孢子^[15], 即子囊孢子, 酿酒酵母产生的子囊孢子是人工选育优良杂交酵母菌株的重要基因纯核系来源^[16]。将酿酒酵母 Y_1 二倍体 (2n) 接种于麦氏培养基上培养一周, 筛选获得其单倍体 (n), 并通过显微镜下观察, 检验其二倍体生孢子情况, 孔雀绿一番红染色后见图 1。可以看出, 在麦氏培养基上培养时, Y_1 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, 形成子囊孢子。

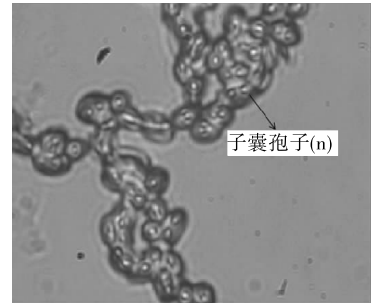


图 1 酿酒酵母 Y_1 子囊孢子染色图 (100×)

Figure 1 The ascospores staining of *Saccharomyces cerevisiae* Y_1 (100×)

2.2 低渗敏感性突变株的筛选及生长特征鉴定

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, 诱变所获得的性状才能较稳定地遗传下去^[17]。因此, 同时以酵母二倍体 (2n)、单倍体 (n) 为出发菌株, 采用紫外线对菌株 Y_1 的二倍体 (2n) 及单倍体 (n) 菌株分别照射 30 s, 4.5 min, 利用影印培养法对等渗及低渗条件下菌株的生长状况进行对比初筛, 获得低渗敏感性突变株, 结果见图 2 及表 1、2。由图 2 可知, 圆圈标出的突变株在等渗培养条件下 (YEPDK 培养) 生长正常, 但在低渗培养条件下 (YEPDS 培养) 生长微弱甚至无法生长; 表 1、2 显示, 根据等渗平板与低渗平板菌落生长对照情况, 筛选出 8 株二倍体 (2n)、7 株单倍体 (n) 低渗敏感性突变株。

表 1 酿酒酵母二倍体(2n)突变菌株生长谱[†]Table 1 Auxanogram of *Saccharomyces cerevisiae* (2n) mutants

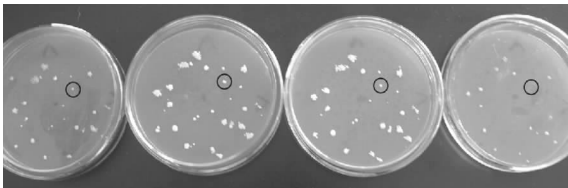
菌株	Y ₁ (2n)	Hs ₁	Hs ₂	Hs ₃	Hs ₄	Hs ₅	Hs ₆	Hs ₇	Hs ₈
YEPD	++	+	+	+	+	+/-	+/-	++	++
YEPDK	++	++	+	+	+	+	+	+	++
YEPDS+K	+	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-
YEPS	++	+/-	-	+/-	+/-	-	-	++	+
YEPDS	+	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-

[†] Y₁为出发菌株;“-”为不生长;“+/-”为生长微弱;“+”为正常生长;“++”为生长旺盛。

表 2 酿酒酵母单倍体(n)突变菌株生长谱[†]Table 2 Auxanogram of *Saccharomyces cerevisiae* (n) mutants

菌株	Y ₁ (n)	Hs ₁ *	Hs ₂ *	Hs ₃ *	Hs ₄ *	Hs ₅ *	Hs ₆ *	Hs ₇ *
YEPD	++	+	+	++	++	++	++	++
YEPDK	++	+	++	+	++	++	+	+
YEPDS+K	+	-	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-
YEPS	++	-	+	+	+	+/-	+	+
YEPDS	+	+/-	-	-	+/-	-	+/-	+/-

[†] Y₁为出发菌株;“-”为不生长;“+/-”为生长微弱;“+”为正常生长;“++”为生长旺盛。



YEPDS+K培养 YEPDK培养 YEPS培养 YEPDS培养

图 2 影印培养筛选低渗敏感性突变株

Figure 2 Screening hypotonic-sensitive mutants by replica plating

低渗培养基(YEPDS)中添加了表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS),SDS能形成低渗环境,并作用于细胞膜上的脂类和蛋白质,促进胞内物质释放到胞外,进而引起酵母细胞的自溶^[18]。由表1、2可知,出发菌株Y₁(2n,n)在等渗培养基(YEPDK)、等渗保护培养基(YEPDS+K)、低渗培养基1(YEPS)及低渗培养基2(YEPDS)中均能生长,说明其不具有低渗敏感性。而Hs₁、Hs₂*、Hs₅*3株突变株在YEPDK上均生长旺盛,在低渗培养基(YEPDS)上则生长被抑制,且当在低渗培养基中添加4.5%氯化钾(YEPDS+K)后3株突变株的生长均得到部分恢复,因此选择突变株Hs₁、Hs₂*、Hs₅*作进一步分析。对比发现,Hs₁、Hs₂*、Hs₅*存在一些特性差异,在酵母菌常规培养基(YEPD)上,Hs₁、Hs₂*生长状况一般,而Hs₅*生长茂盛,说明常规条件下Hs₅*更易繁殖;在低渗条件相对较弱的培养基(YEPS)上Hs₁、Hs₅*生长微弱,而Hs₂*则正常生长,说明Hs₁、Hs₅*的渗透压敏感性强于Hs₂*,因此,初步推测Hs₁、Hs₂*、Hs₅*为低渗敏感性突变株,且Hs₅*在低渗时更易发生自溶。

2.3 低渗敏感性突变株自溶程度考察

2.3.1 低渗敏感性突变株胞外FDP测定 FDP是酵母细胞

内糖酵解途径中的中间产物,由于其不断参与代谢反应所以存在时间非常短。正常情况下,未经处理的细胞其通透性较差,FDP在胞外很难得到积累^[19],而低渗敏感性突变株在低渗条件下细胞的通透性发生改变,培养液中FDP的浓度升高,因此FDP是衡量酵母细胞低渗敏感程度的重要指标。测定酿酒酵母及其突变株在低渗条件下培养2h时的菌体浓度及其胞外FDP浓度,菌体浓度以数量级10⁷个为单位,计算出FDP在发酵液中的浓度,结果见图3、4。由图3可知,在酿酒酵母二倍体突变株中,Hs₁胞外FDP含量最高,为出发菌株的1.55倍,说明二倍体突变株中Hs₁的渗透压敏感性最强。由图4可知,在酿酒酵母单倍体突变株中,Hs₂*、Hs₅*的胞外FDP浓度明显高于其它菌株,分别为出发菌株的1.94、2.37倍。由图3、4可以确定Hs₁、Hs₂*、Hs₅*3株突变株为低渗敏感性突变株,其中Hs₅*低渗敏感性最强,其细胞外FDP浓度达25.82 μg/mL。

2.3.2 低渗敏感性突变株核酸、蛋白质胞外渗透率测定 正常情况下难以分泌到胞外的大分子物质核酸、蛋白质渗透率也是可以衡量酵母细胞自溶程度的重要指标。对比分析添

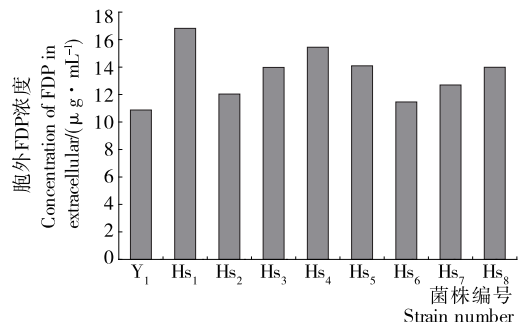


图 3 二倍体突变株胞外FDP浓度

Figure 3 Concentration of FDP in diploid mutant in extracellular

加 SDS 前后突变株 H_{S_1} 、 $H_{S_2}^*$ 、 $H_{S_5}^*$ 以及出发菌株 Y_1 的核酸、蛋白质渗透率,结果见图 5、6。由图 5、6 可知,突变株 H_{S_1} 、 $H_{S_2}^*$ 、 $H_{S_5}^*$ 核酸、蛋白质渗透率均明显大于出发菌株,说明紫外诱变导致突变株的细胞壁/膜结构发生改变,当其处于低渗环境时会出现适度自溶,因此胞外大分子物质含量增大。此外从图 5、6 还可以看出,出发菌株 Y_1 在添加 SDS 前后的核酸、蛋白质渗透率变化很小,而突变株核酸、蛋白质的渗透率随着添加 SDS 发酵时间的延长而越来越高,其原因是突变株在低渗环境中生长微弱,同时细胞溶胀作用引起了膜不可逆的破坏,促进核酸、蛋白质等物质的外泌^[20]。其中 $H_{S_5}^*$ 大分子渗透率最大,发酵 6 h 时,其胞外核酸、蛋白质渗透率分别达 2.07, 1.86, 为出发菌株的 3.22 倍及 3.64 倍。由此证明突变株 H_{S_1} 、 $H_{S_2}^*$ 、 $H_{S_5}^*$ 属于具有大分子外泌能力的低渗敏感性突变株,且 $H_{S_5}^*$ 在低渗条件下展现出最强的外泌特性。

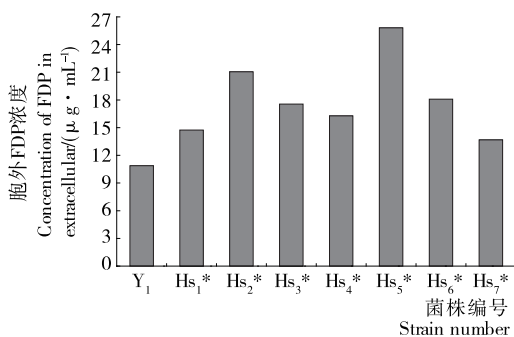


图 4 单倍体突变株胞外 FDP 浓度

Figure 4 Concentration of FDP in haplotype mutant in extracellular

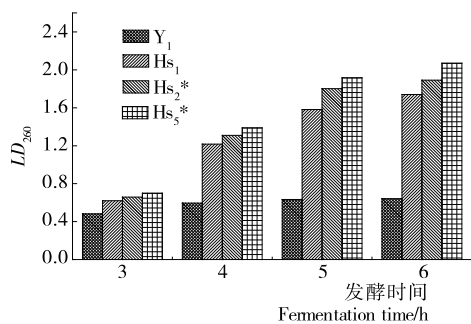


图 5 突变株核酸渗透率

Figure 5 The LD_{260} of mutant

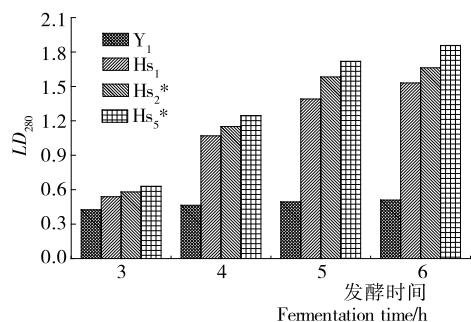


图 6 突变株蛋白质渗透率

Figure 6 The LD_{280} of mutant

3 结论

酿酒酵母作为外源基因最理想的真核生物表达系统,其细胞通透性对胞内产物的有效释放具有重要意义。通过简单的诱变处理,利用低渗培养基定向筛选出 3 株低渗敏感性自溶突变株,即 H_{S_1} 、 $H_{S_2}^*$ 、 $H_{S_5}^*$ 。对比其低渗条件下自溶程度可以发现: $H_{S_5}^*$ 突变株自溶程度最高,其胞外 FDP 浓度达 25.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$,为出发菌株的 2.37 倍,核酸及蛋白质渗透率分别为 2.07, 1.86, 为出发菌株的 3.22 倍及 3.64 倍,可以较大程度地提高酿酒酵母对外源蛋白的分泌能力。将低渗敏感突变株 $H_{S_5}^*$ 与前期筛选的温度敏感突变株 T_{S_1} 对比分析发现 $H_{S_5}^*$ 具有更强的胞内物质释放能力。

温度和渗透压在微生物培养中都是易于控制的条件,筛选对渗透压、温度敏感性强的目标菌株,有利于简化胞内产物的提取工艺,为其工业化应用奠定基础。

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] 何秀萍, 刘增然, 刘春秀, 等. 酵母菌细胞自溶突变株的研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 283-287.
- [3] GANEVA V, GALUTOV B, TEISSIE J. High yield electroextraction of proteins from yeast by a flow process[J]. Analytical Biochemistry, 2003, 315(1): 77-84.
- [4] FONSECA R A S, RAFAEL R S, 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.
- [5] ROLLINI M, MUSATTI A, MANZONI M. Production of glutathione in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Process Biochemistry, 2010, 45(4): 441-445.
- [6] 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.
- [7] 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): e7 184.
- [8] 郭科, 周兵. 酵母 *Ndilp* 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.
- [9] 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.
- [10] SHIMIZU J, YODA K, YAMASAKI M. The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae hpo2* mutant is due to a mutation in *PKC1*, Which regulates expression of β -glucanase[J]. Mol Gen Genet, 1994, 242: 641-648.
- [11] 岳希洁, 蒋雪薇, 罗晓明, 等. 酿酒酵母温度敏感性突变株的选育[J]. 食品与机械, 2016, 32(8): 9-12.
- [12] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 242-244.
- [13] 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.

(下转第 154 页)

对枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌的最低抑制浓度为 4 mg/mL。通过各菌株抑制效果的比较可以看出,柳叶蜡梅叶不同极性萃取物对不同菌株的最小抑制浓度不同,其中二氯甲烷萃取物活性最强,可进一步通过柱层析分离二氯甲烷萃取物,能够筛选出针对不同菌株的有效活性成分,从而开发出有针对性的抑菌药物。

3 结论

经过以上试验,可知柳叶蜡梅叶不同极性萃取物的总酚含量丰富,均具有较强的还原能力和 DPPH 自由基清除能力。乙酸乙酯萃取物的抗氧化能力最为显著,可能与其高含量的总酚物质有关^[24-25]。体外抑菌试验显示,除正丁醇和水萃取物无明显抑制作用外,其它 3 种萃取物对大肠杆菌、金黄葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和绿脓杆菌均具有显著的抑菌效果。本试验系统地探究了柳叶蜡梅叶萃取物的抗氧化和抑菌性能,填补了之前没有柳叶蜡梅叶主要活性成分分离及抗氧化、抑菌性能系列数据的空白,为该植物的进一步活性成分分离及开发利用提供试验依据。但柳叶蜡梅叶中总酚物质种类繁多,需更深入地分离纯化,以筛选出更加明确有效的抗氧化和抑菌活性成分。

参考文献

[1] 王丽, 鄢连和, 杨婷婷, 等. 畚药食凉茶研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(6): 1 004-1 006.

[2] 温慧萍, 雷伟敏, 吴宇锋, 等. 柳叶蜡梅茎叶水提物的“消导止泻”研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(11): 943-946.

[3] 陈向阳, 毕淑峰, 姚瑶, 等. 柳叶蜡梅叶挥发油体外抗氧化活性[J]. 光谱实验室, 2013, 30(3): 1 484-1 487.

[4] LI Dan, JIANG Yu-yan, JIN Zhi-min, et al. Isolation and absolute configurations of diastereomers of 8 α -hydroxy-T-muurolol and (1 α , 6 β , 7 β)-cadinane-4-en-8 α , 10 α -diol from *Chimonanthus salicifolius*[J]. Phytochemistry, 2016, 122: 294-300.

[5] MA Guang-lei, YANG Guo-xun, XIONG Juan, et al. Salicifoxazines A and B new cytotoxic tetrahydro-1,2-oxazine-containing tryptamine-derived alkaloids from the leaves of *Chimonanthus salicifolius*[J]. Tetrahedron Letters, 2015, 56(27): 4 071-4 075.

[6] 章瑶, 华金渭, 王秀艳, 等. 柳叶蜡梅叶氯仿部位化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2 661-2 664.

[7] 张健健, 陆天飞, 董彪, 等. 柳叶蜡梅提取物对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 肝脏, 2014, 19(2): 112-114.

[8] 耿敬章. 柳叶蜡梅叶总黄酮超声波协同复合酶提取及抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(21): 124-129.

[9] 周靖, 钱超, 宋莹莹, 等. 野生柳叶蜡梅叶挥发油成分的 GC-MS 分析及其抗氧化活性[J]. 华西药学杂志, 2013, 28(3): 238-240.

[10] 刘敏, 周茜, 郝红伟, 等. 复方中草药提取物抑菌活性成分研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 159-161.

[11] 马士巧, 马海乐, 潘忠礼, 等. 黑蜂蜂胶不同极性提取物的体外抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 53-58.

[12] 邢利沙, 陈海霞, 王佳, 等. 大蒜不同极性萃取物的体外抗氧化性[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(4): 219-222.

[13] SINGLETON Vernon L, ORTHOFER Rudolf, LAMUELA-RAVENTOS Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent[J]. Method in Enzymology, 1999, 299(2): 152-178.

[14] 宋丽军, 侯旭杰, 李雅雯, 等. 核桃青皮中多酚的超高压提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 178-182.

[15] 赵国建, 王向东, 王焕. 提取方法对核桃青皮多酚提取效果的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(1): 351-355.

[16] 刘安, 王振, 刘林峰, 等. 辣椒碱体外抗氧化作用研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 179-181.

[17] ZENG Ling-bin, ZHANG Zhong-rong, LUO Zhu-hua, et al. Antioxidant activity and chemical constituents of essential oil and extracts of *Rhizoma Homalomenae*[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 456-463.

[18] 郭晓青, 陈晓靓, 杨春梅, 等. 紫苏叶活性成分及抗氧化性研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 179-181, 185.

[19] 陆敏佳, 蒋玉蓉, 袁俊杰, 等. 藜麦叶片多酚最佳提取工艺及其抗氧化性研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(1): 101-106.

[20] 曹清明, 邬靖宇, 钟海雁, 等. 油茶叶中黄酮的超声辅助提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 162-166.

[21] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 等. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. 食品工业, 2016, 37(11): 122-125.

[22] 李钟美, 黄和. 高良姜提取物抑菌活性及稳定性研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(2): 55-59.

[23] WILKINSON Jenny M, HIPWELL Michael, RYAN Tracey, et al. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(1): 76-81.

[24] GUO Tan, WEI Lei, SUN Juan, et al. Antioxidant activities of extract and fractions from *Tuber indicum* Cooke & Masee[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1 634-1 640.

[25] 周凯, 胡泉炎, 周沫霖, 等. 龙眼核提取物的体外抗氧化及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(4): 167-171.

(上接第 26 页)

[14] 王迎辉, 卢晓霆, 常启龙. 啤酒废酵母制备 1,6-二磷酸果糖的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(11): 231-233.

[15] STRATHEN J N, JONES E W, BROACH J R. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Life cycle and inheritance [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1981: 43-48.

[16] 严小琼, 黄思思, 覃香香, 等. 热带假丝酵母产生子囊孢子的条件及单倍体分离的研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(2): 201-206.

[17] 龚熠, 伍时华, 易弋, 等. 酿酒酵母子囊孢子单倍体形成和制备的研究[J]. 中国酿造, 2011(9): 80-84.

[18] 李祥, 彭莉, 王毅, 等. 酵母自溶研究[J]. 中国酿造, 2001(5): 17-19.

[19] 王镜岩, 朱圣更, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 63-65.

[20] 冀照君, 孙波, 迟玉杰, 等. 方波脉冲电穿孔法提高酵母菌细胞通透性的条件优化[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 50-54.