

絮凝特性对自絮凝颗粒酵母耐酒精能力的影响及作用机制

Effect of Flocculence of a Self-flocculating Yeast on its Tolerance to Ethanol and the Mechanism

胡纯铿^{1*}, 白凤武², 安利佳²

HU Chun-Keng^{1*}, BAI Feng-Wu² and AN Li-Jia²

1. 华侨大学生物工程与技术系, 泉州 362011

2. 大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116024

1. Department of Bioengineering, Huaqiao University, Quanzhou 362011, China

2. Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

摘 要 首次报道絮凝特性提高酵母菌耐酒精能力的现象及其机制。融合株 SPSC 与其两亲本粟酒裂殖酵母变异株和酿酒酵母变异株于 30℃ 经 18% (V/V) 酒精冲击 7 h 的存活率分别为 52%、37% 和 9%。细胞膜磷脂脂肪酸组成分析表明, 两絮凝酵母(融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株)的棕榈酸含量均约为非絮凝酵母(酿酒酵母变异株)的两倍, 而棕榈油酸和油酸的含量明显低于后者。研究表明, 当两絮凝酵母在培养中由于柠檬酸钠的作用(抑制絮凝体的形成)而以游离细胞生长存在时, 其细胞膜磷脂棕榈酸含量显著下降, 而棕榈油酸和油酸的含量明显增加, 结果细胞膜磷脂脂肪酸组成特点与酿酒酵母变异株相似; 而且实验表明, 絮凝特性的消失伴随菌体耐酒精能力的急剧下降, 变得与酿酒酵母变异株的水平相当。这些结果提示两絮凝酵母具有较强的耐酒精能力与其细胞膜磷脂脂肪酸组成中含有更高比例的棕榈酸有关。

关键词 耐酒精, 絮凝特性, 磷脂脂肪酸组成

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0123-06

Abstract Investigation was undertaken for the purpose of examining any possible correlation between flocculence of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* mutant and *Saccharomyces cerevisiae* mutant (called fusant SPSC for short) and the tolerance of this strain to ethanol. When exposed to 18% (V/V) ethanol for 7 h at 30℃, 52%, 37% and 9% of viability levels remained for the cells of fusant SPSC and its two parental strains, *Sch. pombe* mutant and *S. cerevisiae* mutant respectively. Analysis of phospholipid fatty acid composition of plasma membrane showed that the content of palmitic acid of each flocculating yeast (fusant SPSC or *Sch. pombe* mutant) was around 2-fold higher than that of free *S. cerevisiae* mutant, with remarkably lower contents of palmitoleic and oleic acids than the latter. When 0.1 mol/L sodium citrate was initially included in the medium in which cells of each flocculating yeast were grown, free cells rather than aggregates were finally obtained. Furthermore, the content of palmitic acid in the phospholipid fatty acid composition of the plasma membranes of the free cells of each flocculating yeast was found to decrease significantly, with a marked increase in the contents of palmitoleic and oleic acids. As a result, the characteristics of the phospholipid fatty acid composition of the plasma membranes of the free cells of each flocculating yeast were similar to those of *S. cerevisiae* mutant. Meanwhile, the disappearance of flocculence of each flocculating yeast caused by the action of sodium citrate brought about a steeply decreased tolerance of the free cells to ethanol, thus being equivalent to that of

Received: May 31, 2004; Accepted: July 26, 2004.

This work was supported by Grant from the State "863" High Technology Research and Development Project of China (No. 2002AA647060).

* Corresponding author. Tel: 86-595-22693508; E-mail: ckhu@hqu.edu.cn

国家高技术研究发展计划项目(No. 2002AA647060)资助。

S. cerevisiae mutant. These data suggest that the stronger ethanol tolerance of each flocculating yeast is related to the higher content of palmitic acid in the phospholipid fatty acid composition of the plasma membranes. Thus, the enhancement by flocculence on the tolerance of yeast cells to ethanol as well as its mechanism are first reported in this work.

Key words ethanol tolerance, flocculence, phospholipid fatty acid composition

微生物的絮凝现象最早由巴斯德(Louis Pasteur)在酵母菌中观察到,后来,人们又在细菌和单细胞藻类中发现絮凝现象^[1]。酵母菌的絮凝是一个非常复杂的过程,絮凝的形成受许多因素的影响,例如,菌株类型(遗传背景、生理状态和代谢等)、培养基成分和培养条件(温度、通气、搅拌、pH、离子和螯合剂等)^[1-5]。有关酵母菌的絮凝机制主要有两种假设:其一,相邻细胞的细胞壁组分中的阴离子通过 Ca^{2+} 相互联系在一起是絮凝形成的原因^[1, 5, 6]。其二,絮凝的形成是依靠细胞表面的一种外源凝集素样糖蛋白特异性识别相邻细胞的甘露聚糖受体而实现的,并且需要 Ca^{2+} ,因为 Ca^{2+} 可促进糖蛋白与甘露聚糖的结合^[2, 7-9]。Shankar等人^[10]后来直接分离纯化了这类蛋白质,并且由实验结果推测蛋白质和甘露聚糖之间主要依靠氢键键合。因此,第二种假设是目前对酵母菌絮凝机制较为认同的观点^[2, 10]。

微生物的絮凝特性具有重要的应用价值。絮凝酵母应用于啤酒酿造可利于在后期工序中加速啤酒澄清、避免因菌体自溶而使啤酒风味受到影响。在乙醇发酵中,采用絮凝酵母可大大减少分离过程的能耗。利用菌体自絮凝形成颗粒作为一种固定化手段,是细胞固定化技术中新的概念^[11]。这种固定化细胞技术具有方法简单、无附加成本、反应器中菌体浓度高、酵母连续使用寿命长、设备生产能力强、发酵时间短等明显的技术和经济上的优势,展示了良好的工业化应用前景^[11, 12]。

絮凝能力赋予酵母菌最明显的特征是菌体细胞形成聚集体(aggregate),实际上,这也是人们对絮凝酵母多方面利用的基础。那么,当细胞形成聚集体后,絮凝酵母的生命活动有何变化?例如,絮凝是否会对菌体耐酒精能力产生影响呢?有关这方面的研究工作尚未见诸报道。因此,本工作旨在考察絮凝特性与酵母菌耐酒精能力之间是否存在相关性。

1 材料与方法

1.1 菌种

融合株 SPSC 系由粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)变异株和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)变异株两亲本经原生质体融合技术选育而

成^[12],粟酒裂殖酵母变异株具有自絮凝能力,酿酒酵母变异株具有优良的酒精发酵性能,融合株 SPSC 既具有优良的酒精发酵性能又具有强自絮凝特性。

1.2 培养基

融合株 SPSC 生长培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母浸出膏 3.85,蛋白胨 3。粟酒裂殖酵母变异株生长培养基(g/L):葡萄糖 10 或 30(见 1.3.2),酵母浸出膏 5,麦芽浸出膏 3,蛋白胨 3。酿酒酵母变异株生长培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母浸出膏 5,麦芽浸出膏 3,蛋白胨 3。

1.3 培养方法

1.3.1 融合株 SPSC 絮凝颗粒的形成:斜面菌体接入生长培养基于 30℃在旋转式摇床(150 r/min)上培养 18 h。

1.3.2 粟酒裂殖酵母变异株絮凝颗粒的培养:斜面菌体接入含 10 g/L 葡萄糖的生长培养基,于 30℃在旋转式摇床(150 r/min)上培养,每天更换 1 次培养基,4~5 d 可形成絮凝颗粒,该絮凝颗粒具有良好的沉降性能,静置后收集沉降的菌体,以 5%的接种量(菌体湿重/培养基体积)接入含 30 g/L 葡萄糖的生长培养基培养。

1.3.3 酿酒酵母变异株的培养:斜面菌体接入生长培养基于 30℃在旋转式摇床(150 r/min)上培养 20 h。

1.4 高浓度酒精冲击下菌体存活率的测定

将菌体用去离子水洗涤 2 次,后于 30℃和 18% (V/V) 酒精条件下进行冲击试验,定期取样检测残余活细胞数目。菌体的耐酒精能力以存活率(Viability)表示, $\text{Viability} (\%) = (C_t / C_0) \times 100\%$, C_0 和 C_t 分别表示冲击时间为 0 和 t 小时的残余活细胞浓度^[13]。

1.5 细胞膜的分离提取和磷脂脂肪酸组成的分析

将菌体用去离子水洗涤 2 次,然后用 1.2 mol/L 山梨醇溶液洗涤 2 次,按文献[14]报道的方法制备球形体,再将其悬于 0.9% (W/V) NaCl 溶液进行渗透裂解,收获膜提取物,按文献[15]报道的方法分离细胞膜。细胞膜蛋白质含量按 Bradford 报道的方法^[16]进行定量。

取出一定量细胞膜提取物,用氯仿:甲醇(2:1,

V/V)溶剂萃取,然后分离萃取物,加入 0.88% (W/V) KCl 溶液,充分摇匀后让它于 4℃ 过夜分相。后取出下相置于旋转蒸发器上进行干燥浓缩,将浓缩物快速溶于少量氯仿:甲醇(2:1, V/V)溶剂,采用薄层层析法^[17]分离细胞膜磷脂与其它脂类成分。然后,将硅胶板上磷脂斑点连同吸附剂一起刮下,通过甲基化反应^[17]以生成各种脂肪酸甲基酯,冷却后用氯仿萃取。脂肪酸甲基酯采用气相色谱法分析(美国安捷伦 6890A 气相色谱仪,配氢焰离子化检测器,进样口温度 270℃,检测器温度 250℃,柱温采用程序升温控制)。

1.6 细胞膜透性系数的测定

将菌体用去离子水洗涤至上清液在 260 nm 处的吸收可以忽略。然后,将菌体转入 15% (V/V) 酒精缓冲液中,并将其置于缓速转动的旋转式摇床(30℃)上,定期分别检测溶液在 260 nm 和 280 nm 处的吸收值直至二者均达到平衡值。细胞膜透性系数 (P')由下式求得^[18]:

$$\ln(C_e^* - C_e) = \ln(C_e^* - C_e^0) - (1 + V_i/V_e)(A/V_i)P't,$$

其中 t 表示时间(h), C_e 表示胞外核苷酸浓度(mol/cm³), A 表示细胞膜总表面积(cm²), V_i 表示胞内液体总体积(cm³), V_e 表示胞外液体总体积(cm³), C_e^0 和 C_e^* 分别表示 $t = 0$ 和 $t = \infty$ 时的 C_e 。

1.7 质膜 ATP 酶活力的测定

酶活力的测定按 Serrano 描述的方法^[19]在一个工作体积为 500 μL 的体系进行。该体系包括:适量质膜提取物(膜蛋白含量 30~60 μg), 50 mmol/L MES (用 Tris 调 pH 为 5.8), 10 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L 叠氮化钠, 0.2 mmol/L 钼酸铵, 100 mmol/L KNO₃。体系于 30℃ 恒温水浴保温 6 min, 然后,加入终浓度为 2 mmol/L 的 ATP 启动酶促反应,反应时间为 6~9 min。后加入 1.5 mL 2% (V/V) H₂SO₄ [含 0.5% (W/V) SDS 和 0.5% (W/V) 钼酸铵]以中止酶促反应。然后离心,取出上清液,加入 20 μL 10% (W/V) 维生素 C,于 30℃ 保温 5 min,通过测定溶液于 750 nm 波长处的光密度以定量酶促反应释放出的无机磷。1 个质膜 ATP 酶活力单位定义为:在上述条件下,每分钟释放 1 纳摩尔(nmol)无机磷所需要的膜蛋白量。

2 结果与分析

2.1 融合株 SPSC 与两亲本耐酒精能力的比较

由图 1 可见,经过 7 h 冲击,融合株 SPSC、粟酒

裂殖酵母变异株和酿酒酵母变异株的存活率分别为 52%、37% 和 9%,表明融合株 SPSC 的耐酒精能力明显高于两亲本。值得注意的是,两絮凝酵母(融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株)的耐酒精能力均显著高于游离酵母(酿酒酵母变异株)。

表 1 不同酵母菌体细胞膜磷脂脂肪酸组成的比较
Table 1 Fatty acid composition of phospholipids in plasma membranes of different yeast cells^a

Yeast cells ^b	Fatty acid composition/%						Δ/mol ^c
	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	
SPSC	3.2	1.6	33.6	26.8	12.0	22.6	0.51
(SPSC)'	0.9	0.7	15.6	41.1	8.6	33.0	0.75
SP	0.8	1.3	36.3	23.1	11.3	27.3	0.52
(SP)'	0.6	0.3	18.3	32.1	6.6	42.0	0.74
SC	1.0	0.5	16.5	35.5	7.8	38.6	0.75

a: Fatty acids are denoted by number of carbon atoms; number of unsaturated linkages;
b: SPSC, SP and SC represent cells of fusant SPSC, *Sch. pombe* mutant and *S. cerevisiae* mutant respectively,
whereas (SPSC)' and (SP)' represent free cells of fusant SPSC and *Sch. pombe* mutant respectively;
c: Unsaturation index (Δ/mol) = [1 × (% monoene) + 2 × (% diene) + 3 × (% triene)]/100

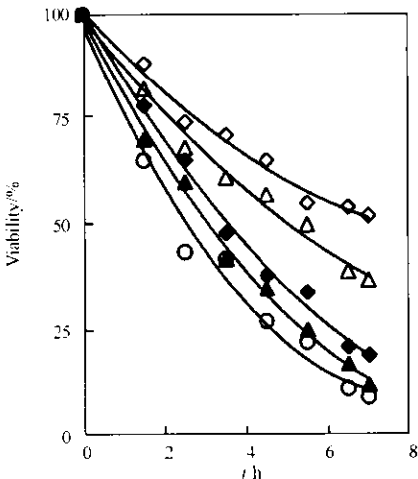


图 1 不同酵母细胞于 30℃ 在 18% (V/V) 酒精冲击下的存活率比较
Fig. 1 Viability of different yeast cells subjected to 18% (V/V) ethanol at 30℃
—◇— cells of fusant SPSC; —△— cells of *Sch. pombe* mutant; —○— cells of *S. cerevisiae* mutant; —◆— free cells of fusant SPSC; —▲— free cells of *Sch. pombe* mutant

2.2 融合株 SPSC 与两亲本细胞膜磷脂脂肪酸组成的比较

那么,造成它们耐酒精能力差异的原因是什么?

由于细胞膜脂类成分与酵母菌耐酒精性能关系密切^[20],因此,首先分析融合株 SPSC 与两亲本的细胞膜磷脂脂肪酸组成特点,结果见表 1。可见,融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株的细胞膜磷脂脂肪酸组成特点相似,二者细胞膜磷脂的棕榈酸(16:0)含量均约为酿酒酵母变异株的 2 倍,而棕榈油酸(16:1)和油酸(18:1)含量明显低于后者,因此,两絮凝酵母的细胞膜脂肪酸不饱和度明显低于游离酵母,这些结果提示二者耐酒精能力明显高于游离酵母可能与它们细胞膜磷脂棕榈酸含量增加有关。

表 2 融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株质膜 ATP 酶活力及二者于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下的细胞膜透性

Table 2 Plasma membrane permeability coefficients(*P'*) of cells subjected to 15% (V/V) ethanol at 30℃, and plasma membrane ATPase activities, of fusant SPSC and *Sch. pombe* mutant

Yeast cells ^a	<i>P'</i> /(cm/h)	ATPase (u/mg protein)
SPSC	2.05×10^{-6}	680
SP	3.03×10^{-6}	410

^aThe denotations of SPSC and SP are identical to those described in Table 1.

2.3 两絮凝酵母的游离菌体与酿酒酵母变异株在耐酒精能力和细胞膜磷脂脂肪酸组成方面的比较

实验表明,在生长培养基起始添加一定浓度(0.1mol/L)柠檬酸钠,可阻止融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株培养过程中絮凝体的形成,结果获得它们的游离细胞。由图 1 可见,二者游离菌体的耐酒精能力明显低于各自的絮凝体,而更接近于酿酒酵母变异株的水平。表 1 显示,与各自的絮凝体相比,二者游离菌体的细胞膜磷脂棕榈酸(16:0)含量显著下降,而棕榈油酸(16:1)和油酸(18:1)含量明显增加,结果,二者游离菌体的细胞膜磷脂脂肪酸组成特点与酿酒酵母变异株相似。

2.4 融合株 SPSC 耐酒精能力高于粟酒裂殖酵母变异株的原因

两絮凝酵母的耐酒精能力均显著高于酿酒酵母变异株(图 1);同时,融合株 SPSC 的耐酒精能力也明显高于粟酒裂殖酵母变异株(图 1),可是,二者的细胞膜磷脂脂肪酸组成相似,看来尚有其它原因在影响着二者的耐酒精能力。由表 2 可见,融合株 SPSC 的细胞膜透性低于粟酒裂殖酵母变异株,这与我们观察到的有关降低膜透性可提高菌体耐酒精能力

表 3 己烯雌酚对生长中的菌体质膜 ATP 酶的抑制作用及伴随菌体于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下细胞膜透性的升高

Table 3 Inhibition of plasma membrane ATPase activities of growing cells by stilbestrol and the concomitant increase in plasma membrane permeability of respective cells subjected to 15% (V/V) ethanol at 30℃

Yeast cells ^a	Culture condition ^b	ATPase (u/mg protein)	<i>P'</i> /(cm/h)
SPSC	+	480	3.12×10^{-6}
	-	680	2.05×10^{-6}
SP	+	320	4.33×10^{-6}
	-	410	3.03×10^{-6}

^aThe denotations of SPSC and SP are identical to those described in Table 1;

^b“+” and “-” represent cells grown in the presence and absence of 25 μmol/L stilbestrol respectively.

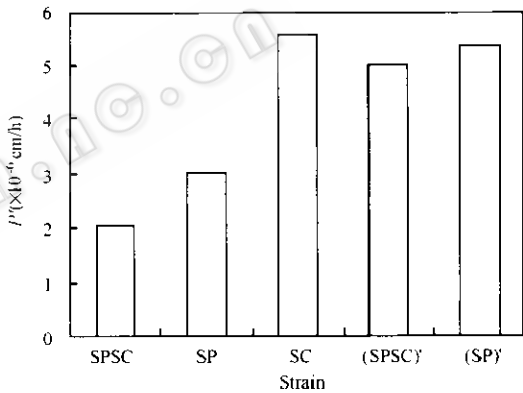


图 2 不同酵母细胞于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下细胞膜透性的差异

Fig. 2 Plasma membrane permeability coefficients of different yeast cells subjected to 15% (V/V) ethanol at 30℃

The denotation of each kind of cell is identical to that described in Table 1.

的实验现象相吻合^[13, 21]。同时,融合株 SPSC 质膜 ATP 酶活力约为粟酒裂殖酵母变异株的 1.7 倍,那么,是否二者膜透性的差异与质膜 ATP 酶活力的差别有关?为了探索这个问题,在二者的菌体培养中起始添加 25μmol/L 己烯雌酚(质膜 ATP 酶抑制剂),其它条件不变,然后考察二者菌体的细胞膜透性和质膜 ATP 酶活力有何变化,结果见表 3。可见,融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株的质膜 ATP 酶活力分别被抑制 29% 和 22%,而细胞膜透性系数却分别增加 52% 和 43%,即二者酶活力被抑制均伴随细胞膜透性的增加,这说明质膜 ATP 酶对维持菌体较低的细胞膜透性具有一定的贡献。因此,融合株 SPSC

耐酒精能力高于粟酒裂殖酵母变异株,可能与其具有较高的质膜 ATP 酶活力以维持更低的细胞膜透性有关。

3 讨 论

有关絮凝特性对酵母菌耐酒精能力的影响国内外尚未见到报道。本文首次报道絮凝特性提高酵母菌耐酒精能力的现象及其机制。研究表明,絮凝酵母(融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株)耐酒精能力高于游离酵母(酿酒酵母变异株)可能与其细胞膜磷脂脂肪酸组成中含有更高比例的棕榈酸(16:0)和更低比例的棕榈油酸(16:1)及油酸(18:1)有关(图 1 和表 1);进一步研究表明,当絮凝酵母在培养中由于柠檬酸钠的作用(抑制絮凝体的形成)而以游离细胞生长存在时,其细胞膜磷脂棕榈酸含量显著下降,结果细胞膜磷脂脂肪酸组成特点与酿酒酵母变异株相似(表 1);而且实验表明,絮凝特性的消失伴随菌体耐酒精能力的急剧下降,变得与酿酒酵母变异株的水平相当(图 1)。图 2 比较不同属(粟酒裂殖酵母变异株和酿酒酵母变异株)和不同细胞群体形态(游离菌体和絮凝菌体)的酵母在高浓度酒精冲击下的细胞膜透性,结果表明细胞膜磷脂棕榈酸含量的增加(表 1)可明显降低菌体在高浓度酒精冲击下的细胞膜透性,而膜透性的降低与耐酒精能力的提高相吻合(图 1)。

通过比较融合株 SPSC 和粟酒裂殖酵母变异株的耐酒精能力发现,质膜 ATP 酶具有调节细胞膜透性的功能,它对维持细胞膜较低通透性具有一定贡献,而且,质膜 ATP 酶影响细胞膜透性的现象在酿酒酵母变异株中也观察到(表 4):酶活力被抑制 33%,细胞膜透性系数增加 55%,这提示质膜 ATP 酶调节细胞膜透性具有一定程度的普遍意义。

我们近期的研究^[13, 21]表明,镁离子和钙离子可通过降低受高浓度酒精冲击菌体的细胞膜透性而显著提高菌体的耐酒精能力;本研究表明絮凝特性影响菌体细胞膜磷脂脂肪酸组成特点,而磷脂脂肪酸组成特点会影响细胞膜透性(图 2),同时,质膜 ATP 酶也会影响细胞膜透性,而二者影响细胞膜透性的结果是明显影响菌体的耐酒精能力。实验表明,融合株 SPSC 细胞膜磷脂脂肪酸组成特点与亲本粟酒裂殖酵母变异株相似,含有较高比例的棕榈酸;而质膜 ATP 酶活性较高,表现亲本酿酒酵母变异株的特点;而且研究表明,细胞膜磷脂棕榈酸含量增加和质膜 ATP 酶活性较高对提高菌体耐酒精能力是有利

表 4 己烯雌酚对生长中的酿酒酵母变异株质膜 ATP 酶的抑制作用及伴随菌体于 30℃ 在 15% (V/V) 酒精冲击下细胞膜透性的升高

Table 4 Inhibition of plasma membrane ATPase activity of growing cells of *S. cerevisiae* mutant by stilbestrol and the concomitant increase in membrane permeability of cells subjected to 15% (V/V) ethanol at 30℃

Culture condition ^a	ATPase (u/mg protein)	P'/(cm/h)
+	470	8.63 × 10 ⁻⁶
-	700	5.55 × 10 ⁻⁶

^a "+" and "-" represent cells grown in the presence and absence of 25 μmol/L stilbestrol respectively.

的。因此,融合株 SPSC 耐酒精能力高于两亲本可能与其综合了两亲本耐酒精的遗传优势有关。

REFERENCES(参考文献)

[1] Esser K, Kues U. Flocculation and its implication for biotechnology. *Process Biochemistry*, 1983, 18: 21 - 23

[2] Dengis PB, Nelissen LR, Rouxhet PG. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top-and bottom-fermenting strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61: 718 - 728

[3] Stratford M. Yeast flocculation: a new perspective. *Advances in Microbial Physiology*, 1992, 33: 1 - 71

[4] Soares EV, Seynaeve J. Induction of flocculation of brewer's yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by changing the calcium concentration and pH of culture medium. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 1827 - 1832

[5] Sousa MJ, Teixeira JA, Mota M. Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 1992, 14: 213 - 218

[6] Smit G, Straver MH, Lugtenberg BJJ *et al.* Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58: 3709 - 3714

[7] Masy CL, Henquinet A, Mestdagh MM. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition by sugars. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38: 1298 - 1306

[8] Masy CL, Kockerols M, Mestdagh MM. Calcium activity versus "calcium threshold" as the key factor in the induction of yeast flocculation in simulated industrial fermentations. *Canadian Journal of Microbiology*, 1991, 37: 295 - 303

[9] Stratford M, Assinder S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*, 1991, 7: 559 - 574

[10] Shankar CS, Umesh-Kumar S. A surface lectin associated with flocculation in brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 1994, 140: 1097 - 1101

- [11] Bai FW (白凤武). Application of self-immobilization cell technology for biochemical engineering. *Progress in Biotechnology (China)* (生物工程进展), 2000, **20**: 32–36
- [12] Bai FW (白凤武), Jin Y (靳艳), Feng PS (冯朴荪) *et al.* Studies of ethanol fermentation using a fusant SPSC floes—description of floes, growth and ethanol fermentation kinetics. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15**: 455–460
- [13] Hu CK, Bai FW, An LJ. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**: 1191–1194
- [14] Dickinson DP, Isenberg I. Preparation of spheroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of General Microbiology*, 1982, **128**: 651–654
- [15] Schibeci A, Rattray JBM, Kidby DK. Isolation and identification of yeast plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, **311**: 15–25
- [16] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248–254
- [17] Cartwright C, Veazey FJ, Rose AH. Effect of ethanol on activity of the plasma membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 1987, **133**: 857–865
- [18] Mizoguchi H, Hara S. Effect of fatty acid saturation in membrane lipid bilayers on simple diffusion in the presence of ethanol at high concentrations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, **81**: 406–411
- [19] Serrano R. *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Letters*, 1983, **156**: 11–14
- [20] D'Amore T, Panchal CJ, Russell I *et al.* A study of ethanol tolerance in yeast. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1990, **9**: 287–304
- [21] Hu CK (胡纯铿), Bai FW (白凤武), An LJ (安利佳). Enhancements in ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by calcium ion through decrease in plasmalemma permeability. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19**: 715–719