

敲除 *sfa1* 基因提高酿酒酵母乙醇合成能力的研究*

宋浩雷 郭晓贤 王艳尊 江贤章 黄建忠**

(福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福州 350108)

摘要: *sfa1* 基因编码的酶具有乙醇脱氢酶和甲醛脱氢酶双功能活性,通过设计含有与 *sfa1* 基因两侧序列同源的长引物,以质粒 pUG6 和 pUG66 为模板进行 PCR 构建带有 Cre/loxP 系统的酿酒酵母 *sfa1* 基因敲除组件,转化酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YS₁ 并将质粒 pSH47 转入阳性克隆子,诱导表达 Cre 酶切除筛选标记,在原 ORF 基因处保留一个 loxP 位点,丢失质粒后获得 *sfa1* 基因缺陷型酵母突变株 YS₁-*sfa1*。摇瓶发酵实验表明,突变株 YS₁-*sfa1* 的乙醇分解代谢活性降低,乙醇产量提高 8.0%。

关键词: 酿酒酵母, *sfa1*, 基因敲除, PCR

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2007)03-0421-05

Disrupting *sfa1* Gene to Enhance Biosynthesis of Ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* *

SONG Hao-Lei GUO Xiao-Xian WANG Yan-Zun JIANG Xian-Zhang HUANG Jian-Zhong**

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350007)

Abstract: The *sfa1* gene encoded a bifunctional enzyme with the activities of both alcohol dehydrogenase and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. The gene disruption cassette produced by PCR using the same long oligonucleotides which comprise 19 or 22 nucleotides complementary to sequences in the templates (pUG6 and pUG66 marker plasmid) at 3' end and 45 nucleotides at 5' end that annealed to sites upstream or downstream of the genomic target sequence to be deleted. After two linear disruption cassettes with a Cre/loxP mediated marker were transformed into the cells of *Saccharomyces cerevisiae* YS₁, the positive transformants were checked by PCR to correct the integration of the cassette and concurrent deletion of the chromosomal target sequence. Once correctly integrated into the genome, the select marker can be efficiently rescued by transforming the plasmid pSH47 into YS₁ and inducing the Cre expression with a Cre/loxP-mediated marker removal procedure. The expression of the Cre recombinase finally resulted in the removal of the marker gene, leaving behind a single loxP site at the chromosomal locus. The diploid mutant YS₁-*sfa1* was generated, which could enhance the output of ethanol with 8.0% by shaking culture in flask compared with the original strain YS₁.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, Gene disruption, *sfa1*, PCR

能源是人类赖以生存和发展的关键因素,燃料乙醇作为石油能源的替代物,逐渐成为世界各国研究的热点^[1]。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是传统的乙醇生产菌株,其乙醇生产能力主要取决于乙醇合成与分解代谢的动态平衡。乙醇脱氢酶是酿酒酵母乙醇代谢分解的关键酶。敲除编码乙醇脱氢酶的基因可有效地降低酵母的乙醇分解代谢活性,提高酵母细胞合成乙醇的能力。以 PCR 为基础的基因敲除方法,尤其是 loxP-Marker-loxP 序列组

件和 Cre/loxP 系统准确易行,已被广泛应用于酵母功能基因的分析^[2,3]。

本文采取 Kan^r 和 Ble^r 两种筛选标记共转化法敲除 *sfa1* 基因,获得了乙醇合成量得到提高的基因缺失突变株 YS₁-*sfa1*,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒: 酿酒酵母 (*Saccharomyces*

* 福建省科技重大专项资助(No.05HZ101070193)

** 通讯作者 Tel: 0591-22868212, E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2006-07-03, 修回日期: 2006-09-21

cerevisiae) YS₁ 和大肠杆菌 DH5 α 由福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心提供。

质粒 pUG6、pUG66、pSH47 购于德国 EUROSCARF^[3] (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikr/euroscarf/>) 在大肠杆菌中对氨基青霉素具有抗性。pUG6、pUG66 分别携带 *Kan^r* 和 *Ble^r* 抗性基因, 两端带有 loxP 位点。pSH47 在酵母中能表达 Cre 酶, 带有 Ura 筛选标记。

1.1.2 酶和主要试剂: Ex Taq 酶、rTaq 酶、G418、腐草霉素、分子生物学试剂等分别购于 TaKaRa、Fluca 和 Sigma 公司, PCR 引物由 TaKaRa 公司合成。

1.1.3 培养基: YPD 培养基 酵母提取物 10 g、葡萄糖 20g、蛋白胨 20g, 加水至 1L, 自然 pH, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌 21min。发酵培养基: 葡萄糖 20g、酵母提取物 5g、胰蛋白胨 5g、氯化铵 1.5g、磷酸二氢钾 1.5g、七水硫酸镁 0.65g、氯化钙 2.8g, 用新鲜的甘蔗汁定容至 1L。pH 5.5, 1 \times 10⁵ Pa 灭菌 25min。

1.1.4 引物: 根据引物设计原则和要求, 设计 5 对引物(表 1): 其中引物 L₁、L₂ 含有 45bp 序列分别与 *sfa1* 基因上下游序列同源, 另外的 19bp、22bp 序列是扩增筛选标记的正反向引物。

表 1 引物序列

Primer	sequenc(5'→3')	设计原则和要求
L ₁	ccagcttgagaagtactgacctgaa-	与 <i>sfa1</i> 上游序列同源
	tcgttaagttaactct	
	CAGCTGAAGCTTCGTACCG	扩增筛选标记的正向引物
L ₂	cttcaggtctaactgattgctgaagaac-	与 <i>sfa1</i> 下游序列同源
	taattgtgcacatata	
	GCATAGCCACTAGTGATCTCG	扩增筛选标记的反向引物
A	GTGGCGAATAAGTCTCG	位于 <i>sfa1</i> 基因上游
B	GACATCATCGCCTACAGA	位于 <i>sfa1</i> 基因
C	CTTGATGCTGCCTGTTT	位于 <i>sfa1</i> 基因
D	TCGTATGGGAGGATGTG	位于 <i>sfa1</i> 基因下游
KanB	CAGCCAGTTTACTCTGACCATCT	位于 <i>Kan^r</i> 基因
KanC	CCTCGACATCATCTGCCAG	位于 <i>Kan^r</i> 基因
BleB	ACTGGATGCGCGGTTAG	位于 <i>Ble^r</i> 基因
BleC	CAATCGTATGTGAATGCTGGTC	位于 <i>Ble^r</i> 基因

1.2 方法

1.2.1 Cre/loxP 系统: 依据 Cre/loxP 系统双转化的原理^[3](图 1), 分别以 pUG6、pUG66 质粒为模板, 用引物 L₁-L₂ 进行 PCR 得到基因敲除组件 *sfa1*-1 和 *sfa1*-2, 测序验证后共转化 YS₁ 酵母, 随后将 pSH47 质粒转入阳性克隆子, 诱导表达 Cre 酶切除 *Kan^r* 和 *Ble^r* 基因, 然后在 YPD 培养基中连续传代丢失质粒

pSH47 获得 *sfa1* 基因缺失突变株 YS₁-*sfa1*。

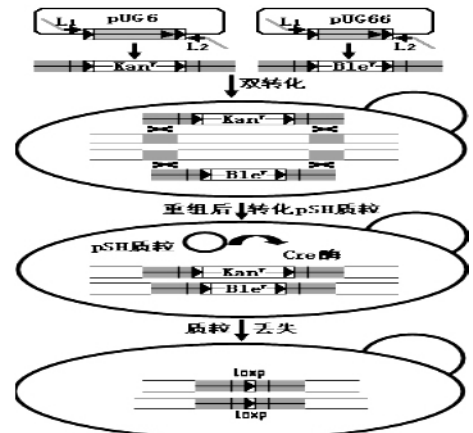


图 1 Cre/loxP 系统双转化法敲除等位基因

1.2.2 基因组 DNA 的提取: 将菌株 YS₁ 摇瓶液体培养, 提取基因组 DNA^[4]。

1.2.3 *sfa1* 基因的 PCR 验证: 以基因组 DNA 为模板, 用引物 A-B、C-D、A-D 进行 PCR。PCR 条件: 95℃ 3min、(94℃ 30s、53℃ 30s、72℃ 3min) 30 个循环、72℃ 10min。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.2.4 质粒 DNA 的制备: CaCl₂ 法制备大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 分别转化质粒 pUG6、pUG66 和 pSH47^[5], 挑取阳性克隆子分别提取质粒 DNA, 酶切进行验证。

1.2.5 基因敲除组件的构建: 以质粒 pUG6、pUG66 为模板, 用引物 L₁-L₂ 进行 PCR 得到转化敲除组件 *sfa1*-1 和 *sfa1*-2。PCR 条件: 95℃ 3min、(94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 1min30s) 30 个循环、72℃ 10min。纯化回收目的产物。

1.2.6 基因敲除组件的验证: 将目的产物连接到 pMD-18T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 分别使用 M13 通用引物和 L₁-L₂ 引物进行菌落 PCR 验证, 筛选阳性克隆子扩培后送外测序。测序结果经过拼接、去载体后与已知序列进行比对。

1.2.7 *sfa1* 基因的敲除 (1) 敲除组件的转化: 制备酵母 YS₁ 感受态细胞, 醋酸锂转化^[6] *sfa1*-1 和 *sfa1*-2 到 YS₁ 中, 得到的菌体洗涤后用 2mL YPD 重悬, 28℃ 摇床培养 2h。离心去上清, 再次用 0.5mL YPD 重悬。(2) 克隆子的筛选: 菌液涂在含 200 μ g/mL G418 的 YPD 平板上, 28℃ 培养 2d~3d 将单菌落影印到含有 8 μ g/mL 腐草霉素的 YPD 平板上, 28℃ 培养 2d, 再次影印到 G418 YPD 平板上, 28℃ 培养 3d~6d。

(3) 克隆子的验证: 挑取 G418 和腐草霉素双抗性克隆子, 液体培养提取基因组 DNA^[8] 作为模板, 进行两次 PCR 验证。用引物 L₁-L₂ 进行初次验证, PCR 条件: 95℃ 3min, (94℃ 30s, 72℃ 90s) 28 个循环, 72℃ 15min。随后用 A-D、A-KanB、KanC-D、A-BleB、BleC-D 引物进行二次验证, PCR 条件: 95℃ 3min, (94℃ 30s, 53℃ 30s, 72℃ 2min ~ 3.5min) 32 个循环, 72℃ 10min。琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

1.2.8 筛选标记的切除 将 pSH47 质粒转入阳性克隆子^[7], 在 YPG(乳糖)培养基中摇床培养 1.5h ~ 2h, 取适量涂布 YPD 平板, 获得单菌落, 分别影印含 G418 或腐草霉素的 YPD 平板, 筛选 Kan^r 和 Ble^r 抗性标记丢失的菌株。提取基因组 DNA^[8], 用引物 A-D、L₁-L₂ 进行 PCR 验证。

1.2.9 pSH47 质粒的诱导丢失: 将得到的菌株在 YPD 培养基中连续传代 10 次, 丢失质粒 pSH47^[3], 得到的菌株使用质粒上特异引物进行验证, 最终获得 *sfa1* 基因双倍体缺陷型菌株 YS₁-*sfa1*。

1.2.10 突变株 YS₁-*sfa1* 发酵产乙醇分析: 将菌株 YS₁ 和突变株 YS₁-*sfa1* 分别接种发酵培养基进行摇瓶发酵。气相色谱分析发酵液中乙醇含量^[9]。色谱分析条件为: Agilent 5973N-6890 气相色谱仪, 色谱柱 HP-FFAR(19091F-105), 载气为氮气; 分流比 30:1; 气化室温度 200℃; 柱箱升温程序: 60℃ 升温至 65℃ (5℃/min), 保持 1min; 然后 20℃/min 升温至 200℃ 结束; FID 检测器温度 250℃。

2 结果

2.1 YS₁ 酵母菌 *sfa1* 基因验证

以 YS₁ 基因组为模板, 用引物 A-B、C-D、A-D 进行 PCR(图 2)。PCR 产物大小与预计条带大小相符, 表明 *sfa1* 基因存在。

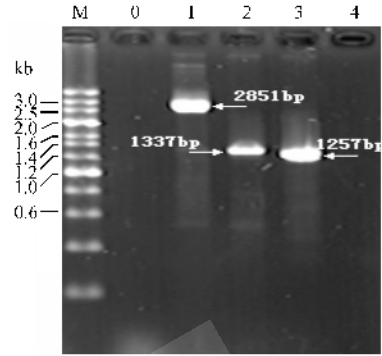


图 2 *sfa1* 基因验证

M 200bp DNA Marker, 1 A-D PCR 产物: 2851bp, 2 A-B PCR 产物: 1337bp, 3 C-D PCR 产物: 1257bp, 4 空白对照

2.2 构建基因敲除组件

以质粒 pUG6 和 pUG66 为模板, 用引物 L₁-L₂ 做 PCR, 合成 *sfa1* 基因敲除组件 *sfa1*-1 和 *sfa1*-2, 琼脂糖电泳分析, 大小分别为 1703bp 和 1274bp, 与预计片段大小相符。

2.3 敲除组件基因测序验证

对敲除组件进行测序, 测序结果如下(图 3、图 4), 与报道序列进行比对, 完全一致。

```

1  CCAGCTTGAG AAGTACTGA CCGTGAATC GTTAAGTTA GTTCTCAGCT GAAGCTTCGT ACGTGCAGG TCGACAACCC TTAATATAAC TTGGTATAAT
101  GTATGCTATA CGAAGTATT AGGTCTAGAG ATCTGTTTAG GTTGCCTCGT CCGCGCCGGG TCACCCGCCG ACGGACATGG AGGCCAGAA TAGCCTCGTT
201  GAGAGCTTTG ACGTGCAGC CTGACGGGCA TGATGTGACT GTCGCCGCTA CATTTAGCCC ATACATCCCC ATGTATAAAT ATTTGCATCC ATACATTTTG
301  ATGGCCGAC GCGCGAAGC AAAAATTACG GCTCGTCGCT GGAGACGTGC GAGCAGGGAA ACGCTCCCT CAGAGACGCG TTGAATTGTC CCCACGCCGC
401  GCGCCTGTAG AGAAATAATA AAGGTTAGGA TTTGCCACTG AGGTTCTTCT TTCATATACT TCCTTTTAAA ATCTTGCTAG GATACAGTTC TCACATCACA
501  TCGGAACATA AACACCATG GGAATGGAAA AGACTCAAGT TTGAGGCCG CGATTAATTT CCAACATGGA TGCTGATTTA TATGGGTATA AATGGCTCG
601  CGATAATGTC GGGCAATCAG GTGCGCAAT CTATCGATTG TATGGGAAG CCGATGCGCC AGAGTTGTTT CTGAAACATG GCAAAGGTAG CGTTGCCAAT
701  GATGTTACAG ATGAGATGAT CAGACTAAAC TGGCTGACGG AATTTATGCC TCTTCCGACC ATCAAGCATT TTATCCGATC TCCTGATGAT GCATGGTTAC
801  TCACCCTGTC GATCCCGGCG AAAACAGCAT TCCAGGTATT AGAAGAATAT CCTGATTCAG GTGAAAATAT TGTGATGCG GTGGCAGTGT TCCTGCGCCG
901  GTTGCATTG ATTCCTGTTT GTAATTTGTC TTTTAACAGC GATCGCGTAT TTCGTCGCG TCAGGCGCAA TCACSAATGA ATACCGTGT GGTGATGCG
1001  AGTGATTTTG ATGACGAGCG TAATGGCTGG CCGTTTGAAC AAGTCTGGAA AGAAATGCAT AAGCTTTTGC CATTCTCACC GBAATCAGTC GTCACATG
1101  GTGATTTGTC ACTTGATAAC CTATTTTTTG ACGAGGGGAA ATTAATAGGT TGTATTGATG TTGACGAGT CCGAATCGCA ACGCAGTC ACGGATCTGC
1201  CATCGTATGG AACTGCCTCG GTGAGTTTTG TCCTTGATTA CAGAAAGGCT TTTTCAAAA ATATGATATT GATAATCCTG ATATGAATAA ATTGCAGTTT
1301  CATTGATGTC TCGATGAGTT TTTCTAATCA GACTGACAAA TAAAAAGATT CTGTGTTTGA AGAAGTTGTC ATTTGTATAG TTTTTTATA TTGTAGTTGT
1401  TCTATTTTAA TCAAATGTTA GCGTGATTTA TATTTTTTTT GCGCTCGACA TCATCTGCCG AGATGCGAAG TTAAGTGGC AGAAAGTAAT ATCATGCGTC
1501  AATCGTATGT GAATGCTGGT CCGTACTACTG CTGTGATTG GATACTAAGC CCGCATCGA GTGTCGAAAA CAGGCTCTGG AGAAGCGTTA ATATAACTTC
1601  GTATAATGTA TGCTATACGA AGTATTAGG TGATATCAGA TCCACTAGTG GCCTATGCTA TATGCGGACA ATTACGTTGT TCAGGAATCA GTTAGACGTC
1701  AAG

```

图 3 *sfa1*-1 敲除组件序列

灰色部分为引物 L₁、L₂, 下划线为 loxP 位点, 中间为 Kan^r 抗性基因

```

1 CCAGCTTGAG AAAGTACTGA CCCTTGAATC GTTAAGTTTA CTTCTCAGCT GAAGCTTCGT ACGCTGCAGG TCGACAACCC TTAATAAAC TTCGTATAAT
101 GTATGCTATA CGAAGTIATT AGGTCTAGAG ATCTGTTTAG CTTCGCTCGT CCCCGCCGGG TCACCCGGCC AGCGACATGG AGGCCAGAA TACCCTCCTT
201 GACAGTCTTG ACGTCCGCAG CTGAGGGGCA TGATGTGACT GTGCCCGTA CATTTAGCCC ATACATCCCC ATGATAATC ATTTGCATCC ATACATTTTG
301 ATGGCCGCAC GGGCGGAAGC AAAAATTACG GCTCCTCGCT GCAGACCTGC GAGCAGGGAA ACGCTCCCT CACAGACGGG TTGAATTGTC CCCACGCCGC
401 GCCCTGTAG AGAAATATAA AAGGTTAGGA TTTGCCACTG AGGTTCTTCT TTCATATACT TCCTTTTAAA ATCTTGCTAG GATACAGTTC TCACATCACA
501 TCCGAACATA AACAAACATG GCCGACCAAG CGACGCCAA CCGCCATCA CBAGATTTGG ATTCACGGCC GCGCTTCTAT GAAAGGTTGG GCTTCGGAAT
601 CTTTTCCGG GACGCCGGCT GGATGATCCT CCAGCGCGGG GATCTCAAG TGGAGTTCTT CCGCCACCCC GGGCTCGATC CCGTCGGAG TTGGTTCAGC
701 TGTCTGCTGA GGCTGGACGA CCTCGCGGAG TTCTACCGGC AGTGCAAACT CGTCGGCATC CAGGAAACCA GCAGCGGCTA TCGCGCATC CATGCCCGG
801 AACTGCAGGA GTGGGAGGC ACGATGGCGG CTTTGGTGA CCGGACGGG ACGCTCCTGC GCCTGATACA GAACGAATTG CTTGCAGGCA TCTCATGATC
901 AGTACTGACA ATAAAAAGAT TCTGTTTTG AAGAACTTG CATTGTATA GTTTTTTAT ATTGTAGTTG TTCTATTTTA ATCAAATGTT AGCGTGATTT
1001 ATATTTTTTT TCGCCTCGAC ATCATCTGCC CAGATGCGAA GTTAAGTGGC CAGAAAGTAA TATCATGCGT CAATCGTATG TGAATGCTGG TCGCTATACT
1101 GCTGTGATT CGATACTAAC GCGGCCATCC AGTGTGAAA ACGAGCTCTC GAGAACCCTT AATAAACCCT CGTATAATGT ATGCTATAAG AAGTTATTAG
1201 GTGATATCAG ATCCACTAGT GGCCTATGCT ATATGCGCAC AATTAAGTTC TTCAGCAATC AGTTAGACCT GAAG

```

图4 *sfa1-2* 敲除组件序列

灰色部分为引物 L₁、L₂, 下划线为 loxP 位点, 中间为 *Ble^r* 抗性基因

2.4 克隆子验证

挑取 G418 平板上典型克隆子单菌落(图5)液体培养后提取基因组 DNA 作为模板,用引物 L₁-L₂ 进行初次验证,扩增产物大小与预期结果相符。其他引物 A-D、A-KanB、KanC-D;A-BleB、BleC-D 二次验证也分别得到预计目的条带(图6)。表明 *sfa1-1* 和 *sfa1-2* 敲除组件与目标基因 *sfa1* 发生了正确重组。

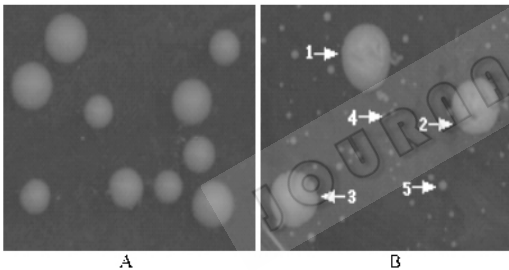


图5 YS₁ 原始菌株与克隆子菌落图

A YS₁ 原始菌株, B YS₁ 典型克隆子, 其中 1、2、3 为阳性克隆, 4、5 为假阳性

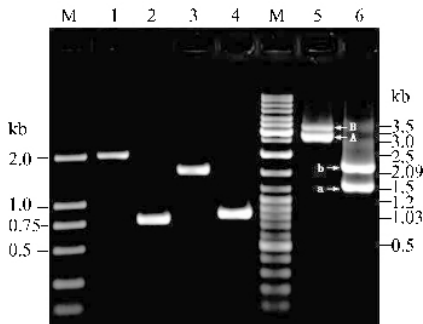


图6 克隆子 PCR 验证电泳图

M 2kb 和 10kb DNA Marker, 1、2 A-BleB、BleC-D PCR 产物 :2049bp 和 758bp, 3、4 A-KanB、KanC-D PCR 产物 :1652bp 和 815bp, 5 A-D PCR 产物 A 和 B :2744bp 和 3173bp, 6 L₁-L₂PCR 产物 a 和 b :1274bp 和 1703bp

2.5 筛选标记的切除和 pSH47 质粒丢失

将 pSH47 质粒转入到阳性克隆子中, YPG 乳糖诱导产生 Cre 酶, 切除 *Kan^r* 和 *Ble^r* 筛选抗性标记, 在原始 *sfa1* 基因位置留下一 loxP 位点。用引物 L₁-L₂、A-D 进行 PCR 扩增, 分别得到 196bp、1666bp 目的条带, 表明抗性标记基因已被正确切除。连续传代后得到的菌株用 pSH47 质粒上特异引物进行菌落 PCR 验证, 无目的条带出现, 说明质粒已经丢失, 最终获得双倍体 *sfa1* 基因缺陷型突变株 YS₁-*sfa1*。

2.6 突变株 YS₁-*sfa1* 发酵产乙醇分析

利用乙醇标准品绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 2400.5319X + 2.790$ ($R = 0.9999$)。将菌株 YS₁ 和突变株 YS₁-*sfa1* 进行发酵产乙醇能力比较(图7)。突变株 YS₁-*sfa1* 乙醇产量较出发菌株 YS₁ 提高 8.0%。

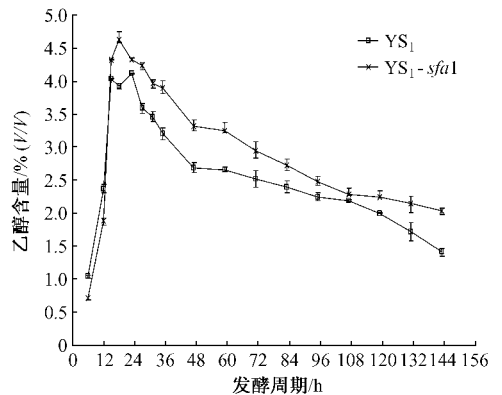


图7 YS₁ 和 YS₁-*sfa1* 发酵产乙醇曲线

3 讨论

突变株 YS₁-*sfa1* 乙醇产率提高 8.0%, 说明 *sfa1*

基因缺失在促进乙醇合成方面起到了一定作用。由于酿酒酵母乙醇代谢受到 *ADH1*、*ADH2* 和 *ADH3* 等^[10]其它相关基因的调节,同时酵母乙醇耐受能力还受到诸如 CuZn 超氧化物歧化酶、Mn 超氧化物歧化酶^[11]、质膜脂肪酸^[12]和溶解氧^[13]等因素的影响,所以 *sfa1* 基因若能结合其它相关基因的敲除会对酵母乙醇合成产生更显著的效果。本研究通过 loxP/Cre 系统两种筛选标记共转化方法成功地获得基因缺失突变菌株 YS₁-*sfa1*,此方法能在不影响其它基因的基础上准确敲除目的基因,一次性就可得到双倍体缺陷型菌株,方便易行。需要指出的是,如果连续敲除基因,还需考虑 Cre 酶发挥作用的范围以及单个或多个 loxP 位点本身重组对菌株的影响。该方法获得的突变菌株其突变发生在染色体水平,能够稳定遗传,并具备无需添加其它生长因子就能生长的优势。loxP/Cre 系统共转化法可用来敲除抑制乙醇生物合成的基因,同时也可用于过量表达促进乙醇生物合成的相关基因^[14],进一步提高乙醇产量。

致谢 本实验得到 Dr. Ulrich Güldener(Munich Information Center for Protein Sequences)和 Dr. Johannes

H Hegemann(Heinrich-Heine-University Düsseldorf)的热心帮助,深表谢意!

参考文献

- [1] 李全顺,徐成海. 节能,2005,8:15~18.
- [2] Güldener U, Heinisch J, Koehler G J, et al. Nucleic Acids Res, 2002,30:e23.
- [3] Hegemann J H, Güldener U, Kohler G J. Methods Mol Biol, 2006,313:129~144.
- [4] Cheng H R, Jiang N. Biotechnology Letters, 2006,28:55~59.
- [5] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第三版). 北京:科学出版社,2002,PP. 96~99.
- [6] Gietz R D, Woods R A. Methods in enzymology, 2002,350:87~96.
- [7] Maitreya T, Takegawa K. Yeast, 2004,21(8):613~617.
- [8] Harju S, Fedosyuk H, Peterson K R. BMC Biotechnology, 2004,4:8~16.
- [9] 张丛文. 计量与测试技术,2005,32(7):46~50.
- [10] Richard-Dickinson J, Eshantha J, Salgado L, et al. Biochemistry and Molecular Biology, 2003,27(10):8028~8034.
- [11] 史文慧,林会兰,张广,等. 工业微生物,2002,32(1)31~35.
- [12] You K M, Rosenfield C L, Knipple D C. Applied and Environmental Microbiology, 2003,69(3):1499~1503.
- [13] 耿曙光,荆忠胜,张兴华. 中国酿造,2004,138:8~10.
- [14] Johansson B, Hahn-Hägerdal B. Yeast, 2002,19:225~331.