

云南 5 个地区戟叶酸模花中酵母菌和类酵母的多样性

周巧¹ 李治滢² 杨丽源² 周新丽² 董明华² 李绍兰^{2*} 张琦^{1*}

(1. 昆明理工大学 生物工程技术研究中心 云南 昆明 650500)

(2. 云南大学 云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

摘要: 【目的】研究云南 5 个地区(晋宁、祥云、程海、泸沽湖、洱海)的戟叶酸模(*Rumex hastatus*)花中的酵母菌和类酵母。【方法】采用涂布平板法对 5 个地区的戟叶酸模花中酵母菌和类酵母进行分离,通过 26S rDNA D1/D2 区域序列分析并结合形态观察对分离获得的酵母菌和类酵母进行鉴定;采用胞外酶定性筛选培养基进行产酶筛选;用苏丹黑 B 染色法筛选产油脂菌株。【结果】从戟叶酸模花中分离得到 82 株酵母菌和 99 株类酵母;82 株酵母菌鉴定为 6 个属 16 个种和 1 个潜在新种,99 株类酵母鉴定为短梗霉属(*Aureobasidium*)的普鲁兰类酵母(*A. pullulans*)及 3 个变种;戟叶酸模花中的优势属是类酵母短梗霉属,其次为红酵母属(*Rhodotorula*)和隐球酵母属(*Cryptococcus*);筛选到 134 株具有产胞外酶活性和 83 株产油脂的酵母菌和类酵母。【结论】研究结果显示 5 个地区的戟叶酸模花中酵母菌和类酵母种类多样性较为丰富,并具有产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶和油脂的特点,有潜在的应用前景。

关键词: 戟叶酸模, 酵母菌和类酵母多样性, 胞外酶筛选, 油脂筛选

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160006, 31160016); 云南省科技条件平台建设计划项目(No. 2009DA002); 云南省教育厅科学研究基金项目(No. 09Z0006)

*通讯作者: 张琦: 信箱: qzhang37@gmail.com

李绍兰: Tel: 86-871-65033540; 信箱: shlli@ynu.edu.cn

收稿日期: 2012-07-17; 接受日期: 2012-11-12

Yeast and yeast-like diversity in the flowers of *Rumex hastatus* from five regions in Yunnan

ZHOU Qiao¹ LI Zhi-Ying² YANG Li-Yuan² ZHOU Xin-Li²
DONG Ming-Hua² LI Shao-Lan^{2*} ZHANG Qi^{1*}

(1. Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China)

(2. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: [Objective] Study on yeast and yeast-like collected from the *Rumex hastatus* in five regions (Jinning, Xiangyun, Chenghai, Luguhu and Erhai) of Yunnan province. [Methods] The yeasts and yeast-like were isolated by spreading plate and identified by using large-subunit 26S rDNA gene D1/D2 domain sequence analysis and morphological. The ability of the yeast strains to produced extracellular enzyme and lipid were tested by screening media and Sudan black-B staining method. [Results] 82 yeasts and 99 yeast-like strains were isolated from the *Rumex hastatus* in five regions. The yeast strains were identified as belonging to 6 genera and 16 species and 1 suspected new species. And the yeast-like strains were identified as 1 species and 3 variety. The dominant genera in *Rumex hastatus* flowers were yeast-like *Aureobasidium*, followed by *Rhodotorula* and *Cryptococcus*. It has been obtained that 134 strains produced extracellular enzyme and 83 strains produced lipid. [Conclusion] The diversity of yeasts and yeast-like species from *Rumex hastatus* flowers in five regions are more abundant. With characteristics of producing amylase, protease, cellulase, lipase and lipid, these strains will have a potential value of application.

Keywords: *Rumex hastatus*, Yeast and yeast-like diversity, Screening extracellular enzymes, Screening lipid

云南地处中国西南边陲, 北纬 21°8'32"-29°15'8", 东经 97°31'39"-106°11'47"。地理位置特殊, 地形地貌复杂, 气候类型丰富多样, 因此特殊的地理位置和气候特征使云南省具有丰富的动植物资源和微生物资源。酵母菌在自然环境中分布较为广泛, 而植物的花是酵母菌的重要栖息地之一, 许多学者对其中的酵母菌进行了研究, 发现了许多酵母新类群^[1]。戟叶酸模为蓼科 (Polygonaceae) 酸模属 (*Rumex* L.) 植物, 生于海拔

1 800 m-2 100 m 的山坡或沟谷湿地, 在我国民间具有悠久的入药历史, 常用于发热解表、宣肺止咳, 并用于治疗四肢关节肿痛、风湿骨痛、漆疮等^[2]。由于戟叶酸模的药用价值, 近年来引起了人们的普遍关注。戟叶酸模含有丰富的糖类和有机酸而呈酸性^[2], 花中含有花蜜等特点使戟叶酸模自身适于酵母菌的生长^[3]。因此研究戟叶酸模中酵母菌和类酵母的多样性及其应用价值, 具有重要的意义。

本研究从云南 5 个地区的戟叶酸模花中分离酵母菌和类酵母 181 株, 采用 26S rDNA D1/D2 区域序列分析并结合形态特征进行了分类研究, 探讨戟叶酸模花中酵母菌的物种多样性。同时, 采用筛选培养基对分离自戟叶酸模花的酵母菌和类酵母进行产胞外酶菌株筛选; 苏丹黑 B 染色法定性筛选产油脂菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 戟叶酸模样品分别采自云南昆明晋宁磷矿富磷区、云南大理祥云县、云南丽江永胜县程海湖边、云南省丽江市宁蒗彝族自治县泸沽湖周边以及云南省大理洱海周边。摘取戟叶酸模的花分装于无菌纸袋中, 密封标记带回实验室备用。

1.1.2 试剂和仪器: 试剂: 2×Power Taq PCR MasterMix、DNA marker、GoldView 购自大连宝生物有限公司; Tris、EDTA、SDS、Triton-100 购自昆明硕阳科技有限公司; 引物 NL1、NL4 由北京百泰克生物有限公司合成。仪器: 凝胶成像仪 SYDR/1305, 美国 Syngene 公司; 离心机, 美国 Thermo 公司; PCR 扩增仪 PTC-200, 美国 MJ Research 公司。

1.1.3 培养基: 酸化的 YM 培养基(g/L): 酵母膏 3, 蛋白胨 5, 麦芽汁 3, 葡萄糖 10, 琼脂 20, 灭菌后冷却至 45 °C 加入 1 mol/L 的盐酸 0.7 mL 到 100 mL 培养基中, pH 3.7; PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 15; 马丁氏培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 5, KH₂PO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, 孟加拉红 0.033, 琼脂 1.8%。以上培养基均在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.2 菌株的分离纯化和保藏

取每个样区的戟叶酸模花 10 g, 无菌操作剪碎, 装入 100 mL 无菌水三角瓶中, 振荡 30 min,

取 0.2 mL 于酸化的 YM、马丁氏和 PDA 培养基上, 用无菌玻璃刮子刮匀, 置 28 °C 恒温培养箱中培养 72–120 h, 挑取不同形态菌落, 每种菌落重复挑 3 个, 用平皿划线法纯化菌株。纯化菌株真空冷冻干燥保藏。

1.3 分类鉴定

分离获得的酵母菌和类酵母株采用经典的分类方法^[4]进行形态学观察, 并结合 26S rDNA D1/D2 区域序列分析进行分类鉴定。

1.3.1 基因组 DNA 的提取: 参照文献[5]方法提取。

1.3.2 PCR 扩增与测序: 26S rDNA D1/D2 区域序列的 PCR 扩增和测序参照文献[6]的方法。用引物 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 扩增所分离菌株的 26S rDNA D1/D2 区域。PCR 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min, 最后于 4 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增的目标产物。所得产物送上海生物工程有限公司进行测序。

1.3.3 序列分析: 供试菌株 26S rDNA D1/D2 测序结果采用 DNASTar 软件进行图谱分析, 对序列进行人工校对, 校正后的序列在 GenBank 核酸序列数据库(Nucleotide)中进行同源性搜索(BLAST search), 选取与供试菌株关系较近的模式菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列比较其相似程度^[7]。应用 ClustalX 进行序列比对, 用 MEGA 4.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining)进行分子系统学分析, 并进行 1 000 次 Bootstrap 检验后构建系统发育树^[7–9]。

1.4 产胞外酶定性筛选实验

将从戟叶酸模上分离得到的酵母菌和类酵母在 YM 培养基上活化后, 进行胞外淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶的定性筛选, 方法参照文

献[10–13]。

1.5 产油脂定性筛选

产油脂酵母的定性筛选采用苏丹黑 B 染色法,方法步骤参照文献[14]进行。

2 结果

2.1 酵母菌和类酵母分离鉴定结果

从云南 5 个地区的戟叶酸模花中共分离得到酵母菌和类酵母 181 株:晋宁和祥云各得到 27 株,从程海、泸沽湖和洱海地区得到酵母菌和类酵母分别为 25 株、15 株和 87 株(表 1)。根据目前酵母菌的分子分类标准,测试菌株的 26S rDNA D1/D2 序列与已知种的差异小于 1%,并有

形态特征的支持时,则可对其做出种的鉴定;与最近缘的已知种的差异大于 2%时,则可初步确定为新种;当大于 1%并小于 2%时,则需要结合 ITS 序列分析和生理生化特征比较对其做出分类学处理^[7–9]。鉴定结果为,82 株酵母菌鉴定为 6 个属 16 个种和 1 个潜在新种;另外 99 株类酵母鉴定为短梗霉属的 1 个种及 3 个变种。有 1 株菌 YM25139 (JQ964208)与隐球酵母属(*Cryptococcus* sp., EU002793)相似率为 98%,两者在 26S rDNA D1/D2 区域有 11 个碱基的差异,先归于 *Cryptococcus* sp.,需要进一步研究以确定分类学地位(表 1)。其中,从晋宁分离的酵母和类酵母有 3 个属 5 个种及 3 个变种;祥云的有 3 个属 5

表 1 5 个地区酵母菌和类酵母种群数量分布图
Table 1 Distribution of yeast and yeast-like species in five regions

属 Genus	种 Species	晋宁 Jinning	祥云 Xiangyun	程海 Chenghai	泸沽湖 Luguhu	洱海 Erhai	Total
Yeast-like							
<i>Aureobasidium</i>	<i>A. pullulans</i>	2	2	2	6	31	43
	<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	3			1	4	8
	<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	2					2
	<i>A. pullulans</i> var. <i>namibiae</i>	8	11	14	4	9	46
Yeast							
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. flavescens</i>	4	5			2	11
	<i>C. zeae</i>	2					2
	<i>C. podzolicus</i>	3					3
	<i>C. wieringae</i>		1				1
	<i>C. luteolus</i>			1			1
	<i>C. magnus</i>				1		1
	<i>C. sp.</i>				1		1
	<i>C. victoriae</i>				1	1	2
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. mucilaginoso</i>	3				1	4
	<i>R. nothofagi</i>		3	3		12	18
	<i>R. graminis</i>		5	3		16	24
	<i>R. fujisanensis</i>					2	2
<i>Rhodospiridium</i>	<i>R. kratochvilovae</i>					1	1
<i>Sporidiobolus</i>	<i>S. pararoseus</i>			1		6	7
<i>Sporobolomyces</i>	<i>S. carnicolor</i>					2	2
	<i>S. odoratus</i>			1			1
<i>Leucosporidium</i>	<i>L. scottii</i>				1		1
Total		27	27	25	15	87	181

个种及 1 个变种; 程海的有 5 个属 6 个种及 1 个变种; 泸沽湖的有 3 个属 4 个种和 1 个潜在新种及 2 个变种; 洱海的有 6 个属 10 个种及 2 个变种。

从 5 个地区的酵母菌和类酵母中选取每个种的代表菌株共 28 株作为供试菌株与相应的模式菌株的 26S rDNA D1/D2 进行比较构建系统进化树(图 1)。

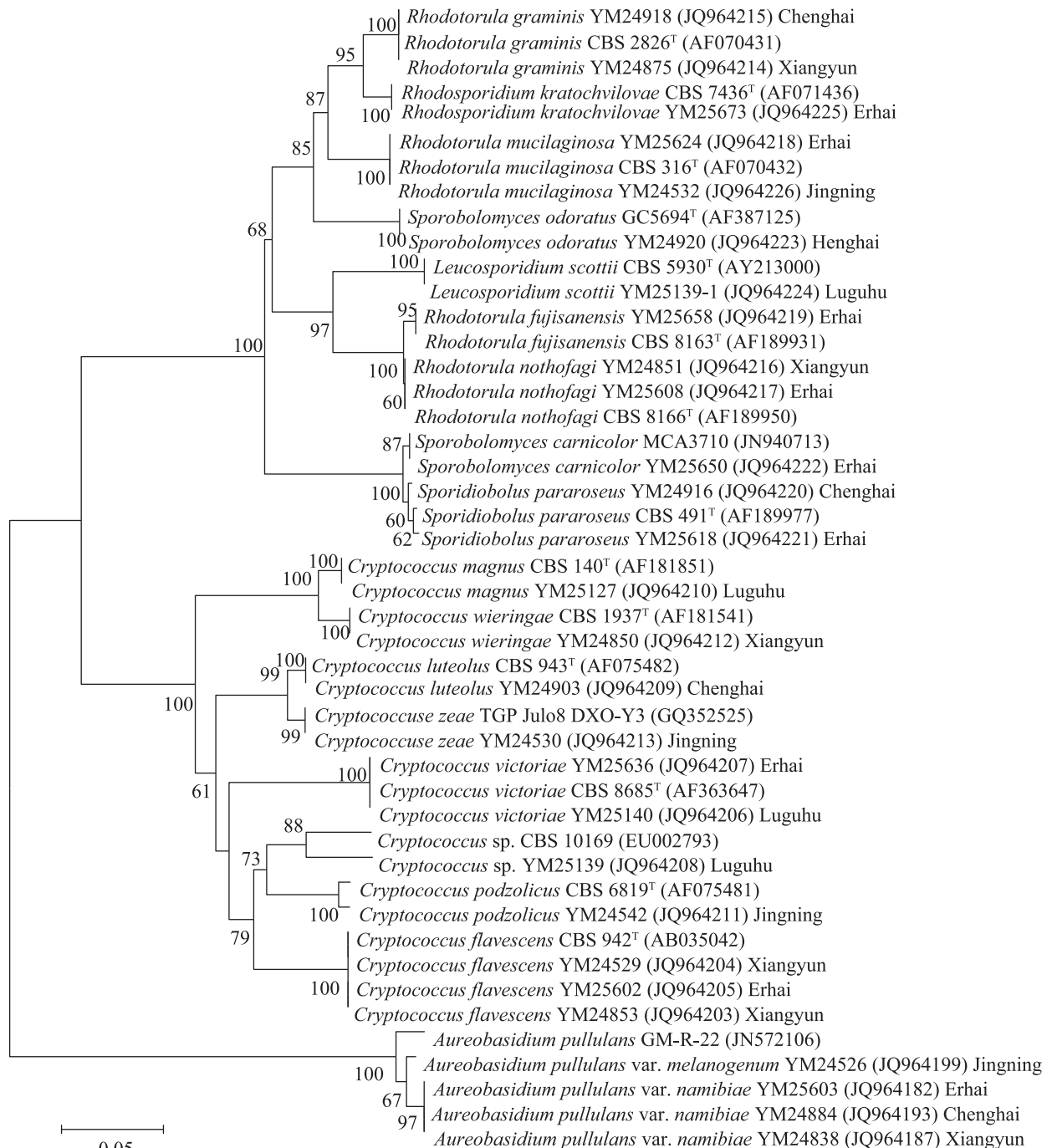


图 1 基于 26S rDNA D1/D2 序列构建的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 26S rDNA D1/D2 domain

Note: Sequence alignment. Numbers in parentheses represent the sequences, accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar: 0.05 sequence divergence.

2.2 类酵母短梗霉属

从 5 个地区共分离得到短梗霉属类酵母 99 株, 占总分离菌株数的 54.7%。对其核糖体大亚基 26S rDNA D1/D2 序列进行比较分析, 鉴定为 1 个种及 3 个变种: *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* 8 株, *A. pullulans* var. *melanogenum* 2 株, *A. pullulans* var. *namibiae* 46 株, *A. pullulans* 43 株 (表 1)。从 5 个地区选取不同变种与模式菌株的 26S rDNA D1/D2 序列相似性进行比较构建系统进化树(图 2)。结果显示大多数不同地区和同一地区相同的变种在系统进化树上聚在一个分支上; 但同一地区相同的变种在菌落形态及颜色方面却有一定差异(图 3), 图 3 表示分布在洱海中的菌株 YM25603 和 YM25610, YM25649 和 YM25655 相同种的形态差别, 它们在图 2 的系统进化树上

前两株未聚在一起, 后两株聚在一起, 这也是短梗霉属在遗传上不稳定的特点所决定^[15]。

2.3 181 株酵母菌和类酵母产酶活性及产油脂实验结果

181 株酵母菌和类酵母通过产酶筛选培养基的筛选和通过苏丹黑 B 染色法筛选, 具胞外酶活性的菌株共 134 株(占总菌株数 74.03%)和产油脂活性的 83 株(45.86%)。其中, 1 株维多利亚隐球酵母(*Cryptococcus victoriae* YM25636)能产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶。普鲁兰类酵母(*Aureobasidium pullulans*)和禾本红酵母(*Rhodotorula graminis*)均能产胞外酶和油脂。结果表明, 产油脂的菌株最多, 其次是脂肪酶、淀粉酶和纤维素酶, 产蛋白酶的菌株最少, 结果见表 2。

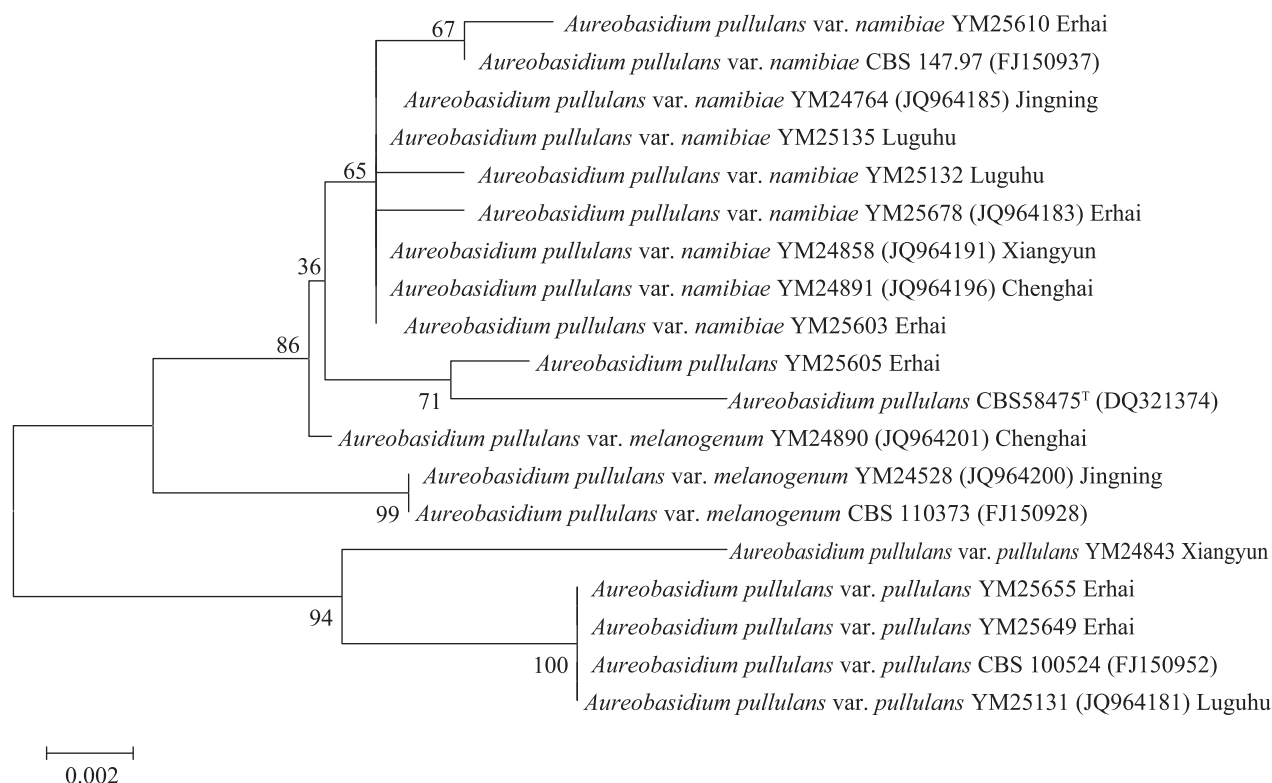


图 2 基于 26S rDNA D1/D2 序列构建的 *Aureobasidium* 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 26S rDNA D1/D2 domain of strain *Aureobasidium*

Note: Sequence alignment. Numbers in parentheses represent the sequences, accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap based on 1 000 replicates. Bar: 0.002 sequence divergence.

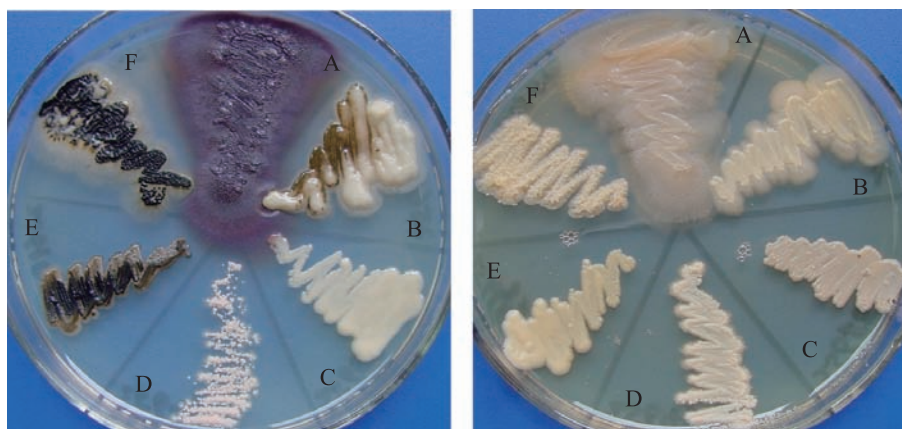


图 3 短梗霉属不同变种的宏观形态

Fig. 3 Macromorphology of different *Aureobasidium pullulans* varieties

Note: Macromorphology of different *Aureobasidium pullulans* varieties incubated for 7 d at 28 °C in the dark on PDA (left) and on YM (right). A: *A. pullulans* var. *melanogenum* YM24528; B: *A. pullulans* var. *namibiae* YM25603; C: *A. pullulans* var. *namibiae* YM25610; D: *A. pullulans* var. *pullulans* YM25649; E: *A. pullulans* var. *pullulans* YM25655; F: *A. pullulans* YM25605.

表 2 181 株酵母菌和类酵母菌产胞外酶和脂肪筛选结果

Table 2 The results of production of extracellular enzymes and lipid in 181 yeasts and yeast-like

属 Genus	种 Species	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Proteinase	纤维素酶 Cellulase	脂肪酶 Lipase	油脂 Lipid
Yeast-like						
<i>Aureobasidium</i>	<i>A. pullulans</i>	31	4	20	49	39
Yeast						
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. flavescens</i>			2	5	8
	<i>C. zeeae</i>					1
	<i>C. podzolicus</i>			1		2
	<i>C. wieringae</i>				1	
	<i>C. luteolus</i>				1	1
	<i>C. magnus</i>			1	1	1
	<i>C. sp.</i>					1
	<i>C. victoriae</i>	1	1	1	1	
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. mucilaginosus</i>			2	1	1
	<i>R. nothofagi</i>		1	2	1	10
	<i>R. graminis</i>	1	1	2	19	16
	<i>R. fujisanensis</i>					1
<i>Sporidiobolus</i>	<i>S. pararoseus</i>	1		1	2	1
<i>Sporobolomyces</i>	<i>S. carnicolor</i>	1	1		1	
	<i>S. odoratus</i>					1
Total		35	8	32	82	83

3 分析与讨论

3.1 5个地区戟叶酸模花中酵母菌和类酵母的多样性

云南5个地区戟叶酸模花中分离到181株酵母菌和类酵母, 研究结果表明: 在云南5个地区基本上具有相似的酵母菌和类酵母分布, 从各个样区菌株数的分布来看(表1), 类酵母短梗霉属、红酵母属和隐球酵母属在5个地区中占有明显的优势, 是云南5个地区戟叶酸模花上的优势属。类酵母短梗霉属不仅分布广而且数量多, 占总数的54.7%, 这由于短梗霉属是植物上的优势种, 它们能够转化和利用植物腐叶的纤维素为自身提供营养^[16], 产胞外纤维素酶实验已证实了这一点。红酵母属共48株, 占总数的26.52%。其次为隐球酵母属, 占总菌株数的12.15%; 隐球酵母属的种类较多, 共有7个种和一个潜在新种。普鲁兰类酵母(*A. pullulans*)及其变种*A. pullulans* var. *namibiae* 在5个样区均有分布, 类酵母*A. pullulans* var. *pullulans*、浅黄隐球酵母(*Cryptococcus flavescens*)、*Rhodotorula nothofagi* 和禾本红酵母(*Rhodoeurula graminis*)在3个样区均有分布。类酵母*A. pullulans* var. *melanogenum*、*Cryptococcus zea*、*Cryptococcus podzolicus* 存在于晋宁样区, *Cryptococcus wieringae* 仅在祥云样区分离到, *Cryptococcus luteolus* 和香气掷孢酵母(*Sporobolomyces odoratus*)是程海戟叶酸模花特有的种, 大隐球酵母(*Cryptococcus magnus*)和斯高特白冬孢酵母(*Leucosporidium scottii*)只在泸沽湖戟叶酸模花分离得到, 富士山红酵母(*Rhodotorula fujisanensis*)、圆红冬孢酵母(*Rhodospiridium kratochvilovae*)、肉色掷孢酵母(*Sporobolomyces carnicolor*)只分布在洱海戟叶酸模花中, 也就是说每个样区都有自己独特的种。结果还显示云南5个地区的戟叶酸模花中分布的

类群均为担子菌酵母和类酵母, 未分离到子囊菌酵母, 这与云南本地区其他植物中分布的酵母菌和类酵母有所不同^[17], 一方面是分离中所使用的培养基不同, 有效的培养基成分对分离酵母和类酵母至关重要; 另一方面戟叶酸模花中含有酸模素, 是该属植物抗菌的有效成分, 它们对酵母菌都有抑制作用^[18], 这对花上微生物群落的特点可能也存在一些影响。

3.2 产酶活性酵母和类酵母的应用价值

酵母细胞可以产生多种生物活性物质, 如蛋白质、脂肪酸、淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶等, 具有重要的潜在应用价值。淀粉酶能以价格低廉的淀粉作为底物生产单细胞蛋白和乙醇^[10]; 蛋白酶可应用于医药、食品、化学等工业^[11]; 纤维素酶广泛应用于农产品加工、石油开采、医药、资源再生等方面^[12]; 脂肪酶在油脂化工和有机合成工业等方面也具有广泛的用途^[19]; 微生物油脂中的多不饱和脂肪酸可预防、治疗心血管疾病, 制取生物柴油及高档食用调和油等^[14]。从181株酵母菌和类酵母中筛选出能产胞外淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、脂肪酶和油脂的活性酵母菌和类酵母134株。表2结果显示, 类酵母短梗霉属和禾本红酵母的能产4种胞外酶和油脂; 维多利亚隐球酵母能产4种胞外酶; *Rhodotorula nothofagi* 产3种胞外酶和油脂; *Rhodospiridium kratochvilovae* 和斯高特白冬孢酵母(*Leucosporidium scottii*)在本研究中不产胞外酶和油脂。目前已有文献报道陆地类酵母中只有短梗霉属可产生纤维素酶^[20], 而本次研究中发现5株隐球酵母属、6株红酵母属和1株锁掷孢酵母属也可产生纤维素酶, 说明戟叶酸模花中酵母菌和类酵母有独特的应用价值。其他可产生胞外酶的酵母菌和类酵母与相关文献报道的一致。此次筛选出产胞外酶的菌株占总菌株数的74.03%, 大于水体酵母菌产胞外酶的活性菌株^[10], 而环境中的

酵母菌菌株基本上是安全的^[21-22], 所以酸模中的酵母菌和类酵母有潜在的应用前景, 对产油脂酵母菌和类酵母的进一步研究正在进行。

致谢: 特别感谢高戈同学对晋宁、祥云和程海三地酸模酵母菌和类酵母研究工作的支持。谨此致谢!

参 考 文 献

- [1] Wang SA, Jia JH, Bai FY. *Candida alocasiicola* sp. nov., *Candida hainanensis* sp. nov., *Candida heveicola* sp. nov. and *Candida musiphila* sp. nov., novel anamorphic, ascomycetous yeast species isolated from plants[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008, 94(2): 257-265.
- [2] 韦群辉, 谭文红, 顾瑛媛, 等. 彝族药窝津津的生物学研究[J]. *中华中医药杂志*, 2009(S1): 65-67.
- [3] Labeda DP. *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*[M]. America: McGraw Hill Publishing Company, 1990: 60.
- [4] Yarrow D, Kurtzman CP, Fell JW. *Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts*[A]/Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts. A Taxonomic Study*[M]. New York: Elsevier, 1998: 77-100.
- [5] Nisioutou AA, Spiropoulos AE, Nychas G-JE. Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 6705-6713.
- [6] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(4): 331-371.
- [7] 王辰, 白逢彦. 海南热带雨林腐木上酵母菌物种多样性研究[J]. *菌物学报*, 2009, 28(3): 354-362.
- [8] Fell JW, Noekhout T, Fonseca A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(3): 1351-1371.
- [9] 周新丽, 李治滢, 杨丽源, 等. 云南程海湖酵母菌多样性及应用[J]. *微生物学报*, 2011, 51(4): 547-553.
- [10] 王晓红, 池振明. 产淀粉酶海洋酵母菌的筛选及鉴定[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2007, 12(37): 95-100.
- [11] 陈嵘, 关珊珊, 吕国忠, 等. 产蛋白酶毛霉菌株的初步筛选[J]. *微生物学杂志*, 2008, 28(1): 101-104.
- [12] 张亮, 池振明. 1株产纤维素酶海洋酵母菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2007, 37(S2): 101-108.
- [13] 张云波, 刘其友, 贾惠平. 一株脂肪酶的筛选和产酶条件及其酶性质的研究[J]. *广西大学学报: 自然科学版*, 2008, 32(3): 270-275.
- [14] 赵丰丽, 余芸, 张弘, 等. 产脂酵母产脂培养条件研究及脂肪检测方法初探[J]. *生物技术*, 2006, 16(5): 47-50.
- [15] 崔堂兵, 郭勇, 郑穗平. 出芽短梗霉的研究进展[J]. *工业微生物*, 2002, 32(2): 41-47.
- [16] Vega-Estrada J, Flores-Cotera L, Santiago A. Draw-fill batch culture mode for production of xylanases by *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58(4): 435-438.
- [17] 孙卉卉, 陈尚武, 李德美, 等. 云南弥勒产区水晶葡萄醪中酵母菌多样性的研究[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(1): 103-108.
- [18] 张兰胜, 王俊锋, 程永现. 酸模属植物研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(5): 865-870.
- [19] 宋炜, 蒋丽娟, 申爱荣, 等. 高产脂肪酶酵母菌株的分离筛选及紫外诱变[J]. *中南林业科技大学学报: 自然科学版*, 2009, 29(3): 55-59, 64.
- [20] Kudanga T, Mwenje E. Extracellular cellulase production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51(9): 773-776.
- [21] Chi ZM, Liu J, Zhang W. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomycopsis fibuligera* sdu[J]. *Enzyme Microbial Technology*, 2001, 28(2/3): 240-245.
- [22] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective[J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1599-1616.