

絮凝颗粒粒度分布对自絮凝酵母 SPSC01 乙醇耐受能力的影响

雷娟娟, 赵心清, 薛闯, 葛旭萌, 白凤武

生物科学与工程系, 大连理工大学, 大连 116023

摘要: 利用激光聚焦反射式颗粒测量系统, 通过调节不同的搅拌速率, 得到了分批补料培养条件下粒度分布不同的四个絮凝酵母 SPSC01 颗粒群体, 进而对絮凝颗粒群体分布对乙醇耐受性进行了系统研究。经过 6 h、20%乙醇的冲击, 颗粒粒度为 100、200、300 和 400 μm 的自絮凝酵母 SPSC01 的存活率分别为 3.5%、26.7%、48.8%和 37.6%。这表明不同粒度分布的絮凝颗粒群体乙醇耐受性具有明显差别, 在一定粒度范围内乙醇耐受性达到最高, 乙醇耐受性最高的酵母群体的乙醇得率系数 85.5%, 比乙醇耐受性最低的颗粒群体提高了 7.2%。粒度为 100、200 和 300 μm 的自絮凝酵母颗粒群体总麦角固醇、游离麦角固醇及海藻糖含量与粒度大小成正相关, 但在粒度为 400 μm 的絮凝颗粒群体中总麦角固醇、游离麦角固醇及海藻糖含量呈下降趋势, 与其乙醇耐受性低于 300 μm 絮凝颗粒的结果相一致。对细胞膜透性的研究表明, 颗粒粒度为 300 μm 的絮凝酵母颗粒细胞膜通透性(P')最低, 分别仅为颗粒粒度为 100 μm 和 200 μm 颗粒群体的 43%和 52%, 表明粒度分布不同的絮凝颗粒群体乙醇耐受性的差别与细胞膜透性密切相关。

关键词: 自絮凝酵母颗粒, 粒度分布, 在线检测, 乙醇耐受性

Influence of Floc Size Distribution on the Ethanol Tolerance of a Self-flocculating Yeast Strain SPSC01

Juanjuan Lei, Xinqing Zhao, Chuang Xue, Xumeng GE, and Fengwu Bai

Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China

Abstract: Ethanol tolerance of self-flocculating yeast SPSC01 was studied in a 3-L bioreactor under fed-batch culture. Yeast floc populations with the average sizes around 100, 200, 300, and 400 μm were obtained by adjusting the mechanical stirring rates of the fermentation system. When subjected to 20% (V/V) ethanol shock for 6 h at 30°C, the remained cell viability was 3.5%、26.7%、48.8% and 37.6% for the aforementioned four floc populations, respectively. The highest ethanol yield 85.5% was achieved for the 300 μm flocs, 7.2% higher than that of the 100 μm flocs. The amounts of trehalose and ergosterol (including free ergosterol and total ergosterol) were positively correlated with the average size distributions from 100 to 300 μm . However, in the 400 μm flocs, the content of trehalose and ergosterol decreased, which coincided with its reduced ethanol tolerance compared to that of the 300 μm flocs. Furthermore, when subjected to 15% (V/V) ethanol shock at 30°C, the equilibrium nucleotide concentration and plasma membrane permeability coefficient(P') of the 300 μm flocs accounted for only 43% and 52% respectively of those of the 100 μm and 200 μm populations. The effect of floc size distribution on the ethanol tolerance of the self-flocculating yeast strain SPSC01 was closely re-

Received: May 22, 2007; Accepted: June 4, 2007

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30500011).

Corresponding author: Xinqing Zhao. E-mail: xqzhao@dlut.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30500011)。

lated to plasma membrane permeability. An optimal floc size distribution with the highest ethanol tolerance and ethanol production level could be obtained by controlling mechanical stirring speed of the bioreactor, which provides basis for the process optimization of fuel ethanol production using this self-flocculating strain.

Key words: self-flocculating yeast, floc size distribution, on-line monitoring, ethanol tolerance

燃料乙醇作为可再生的清洁能源, 不仅能缓解当前石油资源短缺的情况, 而且能减缓石油基液体燃料大量消费导致生态环境的不断恶化, 因此在世界范围内正在得到越来越广泛的应用。由于高浓度的乙醇对酵母菌的生长、发酵和存活都具有毒害作用, 酵母菌乙醇耐性的提高对于乙醇发酵, 尤其是超高浓度乙醇发酵技术具有重要的意义。

酵母菌的絮凝特性最早被应用于啤酒酿造以利于在后期工序中加速啤酒澄清、避免因菌体自溶而引起的啤酒风味损害^[1,2]。利用这种微生物菌体自絮凝形成的颗粒作为一种固定化手段, 是细胞固定化技术中新的概念^[3,4]。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、设备生产能力高、发酵时间短等明显的技术和经济上的优势, 大大减少分离过程的能耗, 展示了良好的工业化应用前景^[5]。近期在对燃料乙醇工程中使用的自絮凝酵母 SPSC01 的研究中我们发现, 与游离状态的细胞相比, 絮凝酵母的乙醇耐受性明显提高^[6], 并发现, 絮凝酵母菌株细胞膜氨基酸组成、棕榈酸含量和质膜 ATP 酶的激活与乙醇耐性有密切关系^[7-9], 当絮凝酵母 SPSC01 变为游离态时, 菌体的乙醇耐性急剧下降, 变得与酿酒酵母变异株的水平相当, 细胞膜透性的降低与乙醇耐性的提高相一致^[6]。可见, 絮凝颗粒群体特征的改变是酵母菌乙醇耐性提高的原因。大量研究发现, 除了细胞膜脂肪酸^[10]和质膜 ATP 酶^[11]外, 酵母菌的乙醇耐性还可能与麦角固醇(胆固醇)^[12,13]、海藻糖^[12]等多种成分有关。然而, 迄今为止, 有关酵母自絮凝形成颗粒这一细胞群体形态改变对菌体内这些生化成分的改变还没有研究。

本课题组建立了自絮凝酵母颗粒粒度分布的在线测量和定量表征方法^[14], 为研究反应器中自絮凝酵母细胞群体结构与乙醇耐性之间的关系奠定了重要基础。本论文通过调整反应器的机械搅拌速率, 利用在线粒度监测系统, 对分批补料发酵过程中自絮凝酵母 SPSC01 的颗粒大小及分布与乙醇耐受性

的关系进行了定量研究, 并考察了絮凝颗粒不同大小的群体麦角固醇和海藻糖含量的差别, 以及不同粒度分布的颗粒体系在高浓度乙醇冲击下细胞膜透性的变化, 为进一步通过控制絮凝酵母粒度提高发酵终点的乙醇浓度奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

自絮凝颗粒酵母 SPSC01, 由本实验室保存。

1.2 培养基

摇瓶生长培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 30, 酵母粉 4, 蛋白胨 3, pH 自然, 自来水配制。

发酵培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 125, 酵母粉 5, 蛋白胨 4, pH 自然, 自来水配制。

补料培养基 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 600, 酵母粉 15, 蛋白胨 12, pH 自然, 自来水配制。

1.3 摇瓶培养

取一环新鲜斜面活化的菌体接入装有 100 mL 生长培养基的 250 mL 摇瓶中, 在旋转式摇床上 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 30°C 培养 24 h 后, 静置沉降酵母颗粒, 倾去上清液, 换入新鲜生长培养基继续培养 24 h, 所获得的絮凝酵母作为种子培养物进行补料分批发酵。

1.4 补料分批发酵

在装料工作体积为 3 L 的发酵罐中先加入 2 L 的发酵培养基, 然后接入絮凝酵母摇瓶培养物, 使菌体浓度达到 $3(\text{dw})\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 发酵 12 h 后开始补料, 补料流速为 $35 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, 整个发酵过程中不通气。

1.5 分析方法

1.5.1 发酵参数测定

乙醇浓度采用气相色谱分析(Agilent 6890A GC, FID 检测器); 菌体浓度以单位体积发酵液中细胞干重来表示; 葡萄糖的分析采用葡萄糖自动分析仪(SBA250 型生物传感分析仪)。

1.5.2 FBRM 测量方法

使用美国 Laser-Tech 公司的新型颗粒在线检测系统--聚焦光束反射测量与分析系统(Focused Beam

Reflectance Measurement, FBRM), 在线检测整个发酵过程中絮凝颗粒群体的粒度分布。

1.5.3 菌体乙醇耐受性的测定

收获发酵终点的酵母菌体,用无菌去离子水洗涤两次,于 30°C 在 20%(V/V)乙醇浓度下进行冲击实验,定期取样检测残余活细胞数目,菌体的乙醇耐受性以存活率(Viability)表示。

1.6 胞内总麦角固醇和游离麦角固醇含量的测定^[15, 16]

总麦角固醇和游离麦角固醇按参考文献[15]的实验方法提取后,根据文献[16]的比色法进行定量。

1.7 海藻糖含量的测定^[17]

海藻糖的提取及定量根据参考文献[17]的实验方法。

1.8 胞外核苷酸浓度和细胞膜透性系数(P')的测定

将收获的菌体用去离子水反复洗涤直至上清液在 260 nm 处的吸收值近似为零。将菌体转入 15%(V/V)乙醇缓冲液(配置于 0.1 mmol·L⁻¹柠檬酸钠 pH5.0 解絮缓冲液)中,并将其置于 100 r/min 缓速转动的摇床(30°C)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。某一时刻胞外核苷酸浓度由下式计算^[18]: $Nucleotide = (11.87 \times A_{260} - 10.40 \times A_{280}) \times 100/9$, 核苷酸浓度以每 mL 溶液含磷的 μg 数表示。细胞膜透性系数(P')由下式求得:

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

其中, t 表示时间(h), C_e 表示胞外核苷酸浓度(mol·cm⁻³), A 表示细胞膜总面积(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 。

1.9 统计学分析

所有的实验结果均来自两批独立的补料分批发酵,为避免取样的偏差,每批发酵取 3 个样品进行参数的测定,每次测定取 3 次测量的平均值。所得到的实验数据均使用 SPSS13.0 处理,得到平均值和方差。

2 实验结果

2.1 不同颗粒大小及分布的 SPSC01 絮凝颗粒群体乙醇耐受性的比较

分批补料发酵过程中通过调节反应器的搅拌速

率得到了粒度分布不同的四个颗粒体系,在发酵过程中通过 FBRM 系统在线监测平均粒度的分布,得到不同颗粒体系在 60 h 发酵过程中每 5 min 的粒度大小的平均值(mean±SD),分别为 96±91 μm 、205±87 μm 、295±90 μm 和 403±98 μm ,在下文中分别称为 100 μm 、200 μm 、300 μm 和 400 μm 颗粒体系。

图 1 给出了不同颗粒体系的乙醇耐受性差异,可见经过 6 h、20%的乙醇冲击,平均粒度为 100 μm 、200 μm 、300 μm 和 400 μm 的絮凝颗粒体系存活率分别为 3.5%、26.7%、48.8%和 37.6%,这表明自絮凝酵母 SPSC01 的乙醇耐受性与其颗粒粒度的分布密切相关,即在一定的颗粒大小(本文中 300 μm 范围内)的颗粒群体中,颗粒粒度越大其乙醇耐受性越高。

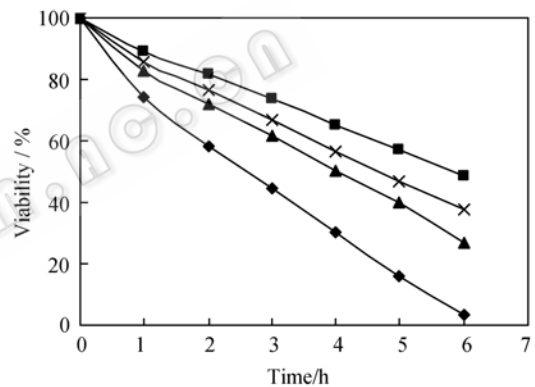


图 1 不同颗粒体系的 SPSC01 20% 酒精冲击下的存活率
Fig. 1 Viability of the floc populations subjected to 20%(V/V) ethanol shock at 30°C

The average size Distribution of the floc populations were: ◆, 100 μm ; ▲, 200 μm ; ■, 300 μm ; and ×, 400 μm

表 1 进一步比较了这几组颗粒群体的发酵性能,可见平均粒度为 100 μm 、200 μm 、300 μm 和 400 μm 的颗粒体系,乙醇得率分别为 78.3%、81.1%、85.5%

表 1 不同颗粒体系的分批补料发酵的性能比较
Table 1 Ethanol fed-batch fermentation results of different floc populations

Floc size/ μm	Biomass DCW /($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ethanol con. /($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ethanol yield, $Y_{E/S}^*$ /%
100	10.78	113.0	78.3
200	10.03	117.2	81.2
300	10.07	123.4	85.5
400	10.32	118.8	82.3

*Ethanol yield $Y_{E/S} = \frac{E}{0.511(S_{input} - S_{remained})} \times 100$, E , mass of ethanol; S , mass of glucose.

和 82.3%，乙醇耐性最高的酵母群体的乙醇产量较耐性最低的提高了 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，乙醇得率比乙醇耐性最低的颗粒提高了 7.2%，这说明在一定的絮凝颗粒粒度范围内，絮凝粒度的增大，不仅能提高菌体对高浓度乙醇的耐性，也提高了发酵终点的乙醇浓度。但是大于一定的颗粒大小范围后，乙醇耐性和发酵终点的乙醇浓度没有进一步升高反而出现下降，这可能与粒度太大导致的传质阻力影响了营养物质的运输有关。

2.2 不同颗粒大小及分布的 SPSC01 絮凝颗粒群体麦角固醇含量的比较

不同颗粒群体细胞内总麦角固醇和游离麦角固醇的含量如表 2 所示。颗粒粒度为 $100 \mu\text{m}$ 、 $200 \mu\text{m}$ 、 $300 \mu\text{m}$ 的自絮凝酵母细胞膜总麦角固醇和游离麦角固醇的含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)分别为 2.25、3.11、4.02 和 0.41、0.92、1.76，与颗粒平均粒度成正相关，但当颗粒超过 $300 \mu\text{m}$ 的时候，其总麦角固醇和游离麦角固醇的含量出现略微下降，分别为 $3.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 2 不同颗粒体系的 SPSC01 细胞膜总麦角固醇和游离麦角固醇含量的比较

Table 2 Total ergosterol and free ergosterol of different floc populations

Floc size / μm	Amount [mean \pm SD (median; range)] of	
	Total ergosterol / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)(DCW)	Free ergosterol / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)(DCW)
100	2.25 \pm 0.04(2.25; 0.14)	0.41 \pm 0.020(0.41; 0.07)
200	3.11 \pm 0.03(3.13; 0.09)	0.92 \pm 0.023(0.92; 0.08)
300	4.02 \pm 0.03(4.02; 0.09)	1.76 \pm 0.06(2.00; 0.20)
400	3.61 \pm 0.031(3.65; 0.13)	1.38 \pm 0.05(1.40; 0.20)

2.3 不同颗粒大小及分布的 SPSC01 颗粒群体细胞膜透性系数(P')的差异

从以上的实验数据可以看出，颗粒大小及分布不同的絮凝酵母 SPSC01 的乙醇耐性存在很明显的差别，而且不同的颗粒体系麦角固醇含量也存在明显差别。由于麦角固醇含量与细胞膜的流动性和透性密切相关，因此本文进一步考察了不同颗粒体系细胞膜的通透性。图 2 是不同颗粒粒度大小的 SPSC01 在 30°C 15%(V/V)乙醇冲击下的胞内核苷酸泄漏导致的胞外核苷酸浓度随时间的变化图，乙醇耐性能力强的颗粒体系胞外核苷酸浓度的泄漏速度低。

表 3 列出了不同颗粒群体在 30°C 、15%(V/V)乙醇冲击下细胞膜透性系数(P')的区别。从表 3 看出，在一定的颗粒粒度大小($300 \mu\text{m}$ 范围内)及分布的条件

下，颗粒粒度小的菌体的细胞膜透性系数 P' 比较大。这说明，颗粒粒度的增大导致的菌体乙醇耐性的提高是与其在乙醇冲击下的较低的细胞膜透性系数密切相关的。

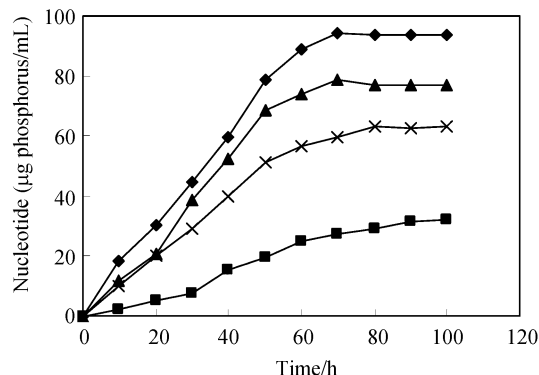


图 2 不同颗粒体系的 SPSC01 在 15% (V/V) 酒精冲击下胞外核苷酸浓度的差异

Fig. 2 Intracellular nucleotide secretion of different floc populations subjected to 15%(V/V) ethanol shock treatment at 30°C . The floc populations with average size distributions were represented as: \blacklozenge , $100 \mu\text{m}$; \blacktriangle , $200 \mu\text{m}$; \blacksquare , $300 \mu\text{m}$; and \times , $400 \mu\text{m}$

表 3 不同颗粒体系的 SPSC01 于 30°C 在 15%(v/v) 酒精冲击下细胞膜透性系数的差异

Table 3 Plasma membrane permeability coefficient (P') of different floc populations subjected to 15%(V/V) ethanol shock at 30°C

Floc size / μm	P' /($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)
100	3.5×10^{-7}
200	2.9×10^{-7}
300	1.5×10^{-7}
400	2.0×10^{-7}

2.4 不同颗粒体系细胞内海藻糖含量的比较

不同絮凝颗粒体系胞内海藻糖含量如表 4 所示。从表 4 看出：随着 SPSC01 颗粒粒度由 $100 \mu\text{m}$ 提高到 $300 \mu\text{m}$ ，胞内的海藻糖含量也从 $136 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 增加到 $275 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，粒度在 $300 \mu\text{m}$ 内的海藻糖含量与颗粒粒度成正相关，但当平均颗粒达到 $400 \mu\text{m}$ 的时候，胞内海藻糖含量略有下降。

表 4 不同颗粒体系的 SPSC01 的胞内海藻糖含量的比较

Table 4 Trehalose of different floc populations

Floc size/ μm	Amount [mean \pm SD (median; range)] of trehalose
	($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of SPSC01 dry mass)
100	136.7 \pm 0.44(136.5; 1.50)
200	215.5 \pm 0.77(215.4; 2.67)
300	275.4 \pm 0.91(275.4; 3.15)
400	238.3 \pm 0.87(238.3; 2.98)

3 讨论

麦角固醇是酵母菌细胞膜的重要组成部分, 细胞中的麦角固醇以游离态及结合态两种形式存在, 游离的麦角固醇主要存在酵母细胞的细胞膜上, 能影响细胞膜上蛋白的活性, 稳定细胞膜磷脂和蛋白质, 增加细胞膜的坚固性, 从而影响物质的运送及细胞膜的流动性^[15], 而细胞膜的流动性是与其乙醇耐受性相关的。不同酵母中麦角固醇对乙醇耐性的影响存在差别, 有的酵母菌种中麦角固醇与乙醇耐受性未发现相关性^[19]。结果表明, 不同粒度分布的絮凝酵母 SPSC01 颗粒乙醇耐受性存在明显的差别, 而且不同的絮凝酵母群体胞内总麦角固醇和游离麦角固醇含量存在明显差别, 尤其是游离麦角固醇的含量相差很大, 乙醇耐受性最高的 300 μm 颗粒游离麦角固醇含量大约是耐受性最弱的 100 μm 颗粒的 4 倍左右 (表 2), 显示了耐性强的颗粒内部存在相对较强的麦角固醇的合成活性。对不同粒度颗粒的细胞膜透性研究表明, 乙醇耐受性最强的颗粒在高浓度乙醇冲击下细胞膜的透性最低 (表 3)。

很多研究证明海藻糖可作为细胞在多种胁迫 (包括乙醇冲击和热冲击等) 条件下的保护剂。海藻糖能与细胞膜磷脂极性磷酸基团结合而稳定细胞膜, 同时海藻糖含量的增加可抑制由乙醇诱导的细胞内含物的泄漏从而提高菌体的耐乙醇性能, 从而能保护菌体免受乙醇冲击的伤害^[20]。本文的研究结果表明, 絮凝酵母颗粒不同大小的群体海藻糖的合成活性也有所不同, 尤其是乙醇耐受性最强的 300 μm 的颗粒和耐受性最弱的 100 μm 的颗粒相比差别很大 (表 4)。

絮凝酵母 SPSC01 在一定颗粒范围内 (在本实验条件下为 300 μm) 乙醇耐受性最佳, 因此调节絮凝颗粒的大小分布对提高乙醇的耐受性和乙醇产量很重要。本文的结果为进一步工程调控絮凝酵母粒度分布在合适的范围打下良好的理论基础。这种在乙醇发酵过程中发现的酵母菌的群体特征对乙醇耐性的影响及胞内生化成分的变化也提示了微生物群体特征的研究和控制的重要性。微生物群体的颗粒大小在活性污泥对毒性物质的敏感度研究中也有研究^[21], 类似的, 最近在微胶囊固定化细胞的研究中也发现, 与游离细胞相比, 固定在微胶囊中的微生物群体对

渗透胁迫的抗性增强^[22], 本文的研究结果揭示, 微生物聚集的颗粒大小不同, 其群体的生理生化特性和群体的功能也有很大差别, 并为相关的微生物群体的培养特征研究提供了新的思路。

4 结论

(1) 不同颗粒大小及分布的融合株 SPSC01 絮凝颗粒体系乙醇耐受能力有明显的差别。絮凝颗粒在一定的范围内乙醇耐受性最强。

(2) 颗粒粒度的变化伴随着融合株 SPSC01 细胞内总麦角固醇和游离麦角固醇含量的变化, 并在一定的粒度范围内成正相关。游离麦角固醇的含量变化显著于总麦角固醇的含量。

(3) 融合株 SPSC01 颗粒粒度的增大对菌体乙醇耐受性的提高与降低其在高浓度乙醇冲击下的细胞膜透性系数密切相关。

(4) 絮凝颗粒粒度的变化伴随着融合株 SPSC01 胞内海藻糖含量的变化, 胞内海藻糖含量的差别在乙醇耐受性最强和最弱的颗粒中表现很明显。

符号说明:

- A — 细胞膜总表面积 cm^2 ,
 C_e — 胞外核苷酸浓度, $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$
 C_e^0 — $t = 0$ 时的 C_e , $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$,
 C_e^∞ — $t = \infty$ 时的 C_e , $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$
 P' — 细胞膜透性系数,
 t — 时间, h
 V_e — 胞外液体总体积 cm^3 ,
 V_i — 胞内液体总体积 cm^3
 $Y_{E/S}^*$ — 酒精得率, %

REFERENCES

- [1] Jin YL, Speers RA. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res Int*, 1998, **31**: 421–440.
- [2] Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **61**: 197–205.
- [3] Xu TJ, Zhao XQ, Bai FW. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme Microbial Technol*, 2005, **37**: 634–640.
- [4] Bai FW, Jin Y, Feng PS, He XL. Studies of ethanol fermentation using a fusant SPSC flocs-description of flocs,

- growth and ethanol fermentation kinetics. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1999, **15**: 455–460.
- 白凤武, 靳艳, 冯朴荪, 何秀良. 融合株SPSC发酵生产酒精的工艺研究—自絮凝细胞颗粒粒径分布、细胞生长和产物酒精生成动力学. *生物工程学报*, 1999, **15**: 455–460.
- [5] Bai FW, Feng PS, Xie J, Li N. Hydrodynamic behavior of 500 L suspended-bed bioreactor suitable for continuous ethanol fermentation using flocs. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 1995, **46**: 106–111.
- 白凤武, 冯朴荪, 谢健, 李宁. 500升絮凝颗粒酵母连续发酵悬浮床生物反应器流体力学行为. *化工学报*, 1995, **46**: 106–111.
- [6] Hu CK, Bai FW, An LJ. Effect of flocculence of a self-flocculating yeast on its tolerance to ethanol and the mechanism. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**: 123–128.
- 胡纯铿, 白凤武, 安利佳. 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. *生物工程学报*, 2005, **21**: 123–128.
- [7] Hu CK, Bai FW, An LJ. Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotechnol*, 2005, **21**: 809–813.
- [8] Hu CK, Bai FW, An LJ. Influence of phospholipid fatty acid composition of plasma membrane on sensitivity of plasma membrane ATPase of a self-flocculating yeast to *in vivo* ethanol activation and its relationship to ethanol tolerance. *Chin J Biotechnol*, 2004, **20**: 784–789.
- [9] Hu CK, Bai FW, An LJ. Influence of phospholipid fatty acid composition of plasma membrane of a self-flocculating yeast on its tolerance to ethanol and the mechanism. *China Biotechnology*, 2004, **24**: 88–92.
- 胡纯铿, 安利佳, 白凤武. 细胞膜磷脂棕榈酸含量对自絮凝颗粒酵母耐酒精能力的影响及作用机制. *中国生物工程杂志*, 2004, **24**: 88–92.
- [10] Hermann JH, Sonja I, Michele S. Ethanol tolerance and membrane fatty acid adaptation in *adh multiple* and *null mutants* of *Kluyveromyces lactis*. *Res Microbiol*, 2000, **151**: 777–784.
- [11] Aguilera F, Peinado RA, Millan C, Orteg JM, Mauricio JC. Relationship between ethanol, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol*, 2006, **110**: 34–42.
- [12] Tracey MS, Kenneth W. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock protein and trehalose. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **169**: 191–197.
- [13] Pasanen AL, Kati YP, Pasanen P, Kalliokoski P, Tarhanen J. Ergosterol content in various fungal species and bio-contaminated building materials. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 138–142.
- [14] Ge XM, Zhao XQ, Bai FW. On-line monitoring and characterization of flocculating yeast cell flocs during continuous ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **90**: 523–531.
- [15] Megumi S, Mitsueda SI, Mariko A. Effects of culture condition on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**: 2381–2388.
- [16] Shang F, Wen HH, Wang X, Tan TW. High-Cell-Density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Jou Biosci Bioeng*, 2006, **101**: 38–41.
- [17] Zhang WJ. Investigative Technology of Biochemistry on Glycoconjugate. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1999, 17.
- 张惟杰主编. 糖复合物生化研究技术. 浙江大学出版社, 1999: 17.
- [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. *J Ferment Bioeng*, 1996, **81**: 406–411.
- [19] Chi Z, Kohlwein SD, Paltauf F. Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, **22**: 58–63.
- [20] Iwahashi H, Obuchi K, Fujii S, Komatsu Y. The correlative evidence suggesting that trehalose stabilizes membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol*, 1995, **41**: 763–769.
- [21] Henriques ID, Holbrook RD, Kelly RT 2nd, Love NG. The impact of floc size on respiration inhibition by soluble toxicants—a comparative investigation. *Water Res*, 2005, **39**: 2559–2568.
- [22] Sun ZJ, Lü GJ, Li SY, Xie YB, Yu WT, Wang W, Ma XJ. Probing the role of microenvironment for microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *J Biotechnol*, 2007, **128**: 150–161.