

# 耐高温酒精酵母的筛选及 26SrDNA 序列鉴定

李 艾

(唐山学院 环境与化学工程系, 河北 唐山 063000)

**摘要:** 将从不同地点采集到的样品分离后得到 127 株酵母菌, 再经过四级筛选得到 1 株耐高温酒精酵母, 将其命名为 A27, 利用 26SrDNA 的 D1/D2 区域序列分析法对其进行分子鉴定, 结果显示与报道的酿酒酵母 26SrDNA 同源率为 99%, 由此在分子水平上验证了 A27 菌株为酵母属的酿酒酵母。

**关键词:** 高温; 酒精酵母菌; 分离筛选; 鉴定

**中图分类号:** Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-349X(2015)03-0076-04

**DOI:** 10.16160/j.cnki.tsxyxb.2015.03.025

## Isolation of High Temperature Resistant Alcohol Yeast and Its Identification of 26SrDNA Sequence

LI Ai

(Department of Environmental and Chemical Engineering, Tangshan College, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** The author of this paper separated the samples collected from different locations, got 127 yeast strains, then obtained 1 high-temperature alcohol yeast strain after 4 screenings, which was named A27, and finally made a molecular identification of it by using 26 srDNA D1/D2 area sequence analysis method. The results reveal that it has 99% homology of *Saccharomyces cerevisiae* 26SrDNA, thus proving that the strain A27 is *saccharomyces cerevisiae* at the molecular level.

**Key Words:** high temperature; alcohol yeast; screening; identification

随着社会的发展, 人们的环保意识和能源危机意识逐步增强, 用燃料酒精替代汽油逐渐受到重视, 发酵生产燃料酒精也日益受到关注<sup>[1]</sup>。但是, 燃料酒精生产行业在我国存在耗能大、发酵生产强度低等问题, 导致生产成本过高。若能通过选育耐高温酒精酵母菌株, 利用其发酵生产酒精, 实现浓酒精发酵, 则发酵强度将会大大提高, 能耗随之降低, 污染也会减少, 综合经济效益增加<sup>[2-4]</sup>。

菌株的初筛工作以量为主, 质量结合, 既要求有大的处理量, 又要求有一定的准确性, 准确性越高越可以节省以后的复筛工作量。多数情况下, 酵母菌和细菌或霉菌混合在一起, 因此, 必须用富集培养法收集酵母菌, 并且抑制细菌和霉菌的生长。通常在培养基中加入一些氯霉素或者青霉素抑制细菌, 加入适量去氧胆酸钠<sup>[5]</sup>或者孟加拉红抑制真菌, 这样则可从发酵基质中直接分离酒精酵母, 这是一种简便易行且成本低的育种方法。马立安从高温玉米酒精发酵液中

取样, 通过富集培养, 高温驯化与筛选, 得到 2 株优良菌株, 发酵率分别为 73.6% 和 74.2%<sup>[6]</sup>。曹俊峰从甜高粱汁中分离到 1 株高产酒精酵母菌株, 适用于甜高粱汁酒精发酵, 酒精产量最高达 12.8% (v/v)。由于高温可增加酒精对酵母的毒性, 所以选择耐高温酵母菌来提高酵母的酒精耐性<sup>[7]</sup>。

观察形态和生理特征是酵母菌的常规鉴定方法。但是酵母菌主要的存在形式为单细胞, 对其形态特征观察有限, 主要以生理学特征对酵母菌进行种级水平上的分类。然而, 生理学特征表现的都是表型性状, 不能够反映种属间的亲缘关系。随着 DNA 序列分析技术的日益成熟和简易化, 分析酵母菌的 rDNA 及其 ITS 序列愈来愈多地应用于酵母菌的分子系统学和分子分类学的研究中。

酵母菌的鉴定目前国际上通常用 26SrDNA 的 D1/D2 区域进行序列分析。赵丽丽等人利用 26SrDNA 的 D1/D2 区域序列分析法, 对从葡萄、苹果、梨、枣、黄豆酱、酸菜、荔

收稿日期: 2015-03-17

作者简介: 李艾 (1981-), 女, 河北唐山人, 讲师, 硕士, 主要从事生物化工研究。

枝、橙子、干酵母、自发粉中分离得到的18株酵母进行鉴定,并与基因库中基因序列进行了同源性比较<sup>[8]</sup>。白逢彦、陆惠中等人从陕西秦岭地区的叶和果实等不同基物上分离得到子囊菌酵母262株,并利用26SrDNA的D1/D2区域序列分析法同时结合形态学特征对这些菌株进行了分类学研究<sup>[9]</sup>。白逢彦、贾建华等人对根据常规形态和生理生化性状难以确定分类学地位的8株假丝酵母菌,进行了以大亚基26SrDNA中D1/D2区域碱基序列分析为依据的分子分类学研究,确定了各个菌株的归属<sup>[10]</sup>。杨艳艳等人通过26SrDNA的D1/D2区域基因序列分析鉴定了1株分离于碱性工业污水池的耐碱酵母<sup>[11]</sup>。

因此,本文拟对从不同地点采集到的样品进行酵母的分离、筛选,并利用26SrDNA的D1/D2区域序列分析法对最终得到的酵母进行分子鉴定,由此来实现耐高温酒精酵母的选育研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 培养基

富集培养基:含酒精(10%)麦芽汁(10°Brix);一级筛选培养基:YPD固体培养基;二级筛选培养基:TTC上层培养基、TTC下层培养基(YPD固体培养基);三级筛选培养基:麦芽汁培养基添加杜氏小管;四级筛选培养基:麦芽汁培养基。

#### 1.1.2 生化试剂

山梨醇、醋酸钾、盐酸、无水异丙醇、Na<sub>2</sub>EDTA、Tris、SDS、RNaseA、消解酶100T、Taq DNA聚合酶(上海生工)、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0回收试剂盒、DNA Marker(大连宝生物 TaKaRa公司)、DNA测序(上海生工完成)、PCR引物(上海生工合成)。

#### 1.1.3 实验仪器

Whatman T Gradient 基因扩增仪(PCR仪)、DXY-33A型电泳仪、UVIpro凝胶成像系统。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酵母菌的分离

将样品加入到麦芽汁中增菌2 h,再分别加入到富集培养基中,30℃培养24~72 h,镜检观察是否有活菌存在,若有,则取1 mL接入一级筛选培养基中,30℃培养24~72 h,选择具有典型酵母菌菌落特征的单菌落。

#### 1.2.2 酵母菌筛选

##### (1)酵母菌一级筛选

在YPD液体培养基中依次接入分离得到的各菌株,45℃培养24 h,观察其生长情况,筛选出在高温条件下能快速生长的菌株。

##### (2)酵母菌二级筛选

TTC法:TTC(2,3,5-氯化苯基四氮唑)是一种常用的显色剂,它通过发生呈色反应反映出酵母的代谢产物,可以通

过它判断酵母中呼吸酶活力的大小,即酵母产酒精能力的高低<sup>[12]</sup>。在TTC下层培养基的平板中接入经过一级筛选得到的各菌株,36℃培养48 h,当菌落长出后再倒上TTC上层培养基,在阴暗处保温2~3 h。对各菌株产酒精能力进行比较。初筛出性状优良的酵母菌株。

##### (3)酵母菌三级筛选

在带有杜氏小管的麦芽汁液体试管中分别接入二级筛选出的酵母菌,不同温度下培养,分别观察杜氏小管中在12 h,24 h和48 h产气情况。

##### (4)酵母菌四级筛选

麦芽汁发酵法:将三级筛选出的菌株活化,在40℃条件下麦芽汁发酵,记录每日失重情况,待发酵结束时计算总失重。复筛得到性状最为优良的菌株。

#### 1.2.3 酵母菌分子生物学鉴定

酵母总DNA提取:参照《分子克隆实验指南》(第三版)<sup>[13]</sup>提取总DNA。

引物设计:参照Kurtzman和Robnett<sup>[14]</sup>的方法,用引物NL1(5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')和NL4(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3')通过PCR仪扩增供试菌株26SrDNA近5'端的D1/D2区域。

PCR扩增条件:36循环,94℃,1 min;53℃,1 min;72℃,1 min 20 s;72℃,5 min。PCR产物4℃保存,将2%琼脂糖凝胶(含EB0.5 μg/mL)于3 V/cm电压下电泳,记录凝胶成像结果。

产物鉴定:对PCR扩增产物进行胶回收,由上海生工测序,测序结果输入Genebank中比对同源性。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母菌分离结果

来自不同地区不同地点的20份采集样品,共分离得到127株酵母菌,结果见表1。

从分离到的酵母菌数量可看出,果园土壤和腐败水果中分离得到的数量较多。这是因为土壤中微生物资源丰富,腐败水果的环境适宜酵母的生长,但因其周围环境温度偏低,所以分离到的能耐高温的菌株可能较少。米曲霉、黑曲霉发酵基质,米酒、黄酒发酵醪和白酒厂高温大曲、酒糟中菌相复杂,含有的微生物种类较多,分离到的酵母菌株较少,但因发酵过程中环境温度偏高,所以有可能分离到能耐高温的菌株。

### 2.2 酵母菌的筛选结果

#### 2.2.1 一级筛选结果

将127株酵母分别制成菌悬液,在45℃下培养24 h,筛选出35株生长较快的菌株,作为二级筛选的出发菌株。

#### 2.2.2 二级筛选结果

将一级筛选得到的35株酵母分别制成菌悬液,用接种针接种到TTC下层平板上,每个平板接酵母4~8株,待36℃培养48 h菌落长出后,倒入10 mL上层培养基,将菌落

覆盖,避光保温 2~3 h 之后,比较各菌株间颜色的深浅。菌株颜色深表明呼吸酶活力强,具有较强的产酒精能力。记下

每一平板中颜色较深的菌株 1—2 株,共得到 18 株酵母菌作为三级筛选的出发菌株。

表 1 酵母菌分离结果

| 来源             | 形态      | 生殖特征      | 菌株数 |
|----------------|---------|-----------|-----|
| 保定各县苹果园及葡萄园土壤  | 卵圆形、圆形  | 一端出芽、两端出芽 | 32  |
| 腐败水果、果脯、蜜饯及发酵物 | 卵圆形、圆柱形 | 一端出芽、裂殖   | 24  |
| 酒精厂、啤酒厂发酵醪     | 卵圆形、圆筒形 | 一端出芽、裂殖   | 17  |
| 白酒厂高温大曲、酒糟     | 椭圆形、树枝形 | 一端、多端出芽   | 16  |
| 米酒、黄酒发酵醪       | 卵圆形     | 多端出芽      | 12  |
| 米曲霉、黑曲霉发酵基质    | 卵圆形、柠檬形 | 一端、多端出芽   | 10  |
| 污水             | 卵圆形、球形  | 一端出芽      | 5   |
| 酱坯、醋坯          | 椭圆形、圆形  | 一端出芽      | 11  |

### 2.2.3 三级筛选结果

将二级筛选得到的 18 株性状较好的菌株进行三级筛选。将酵母菌接入麦芽汁中,分别在 36 ℃,38 ℃,40 ℃,42 ℃,44 ℃ 下培养,并且在 12 h,24 h 和 48 h 观察杜氏小管中产气情况,实验重复 3 次,其产气结果见表 2。

表 2 酵母菌三级筛选的产气结果

| 菌号 | 时间/h | 培养温度/℃ |      |     |    |    |
|----|------|--------|------|-----|----|----|
|    |      | 36     | 38   | 40  | 42 | 44 |
| 19 | 12   | +++    | +++  | —   | —  | —  |
|    | 24   | ++++   | +++  | +   | —  | —  |
|    | 48   | ++++   | +++  | +   | —  | —  |
| 7  | 12   | ++     | ++   | —   | —  | —  |
|    | 24   | ++++   | +++  | +   | +  | —  |
|    | 48   | ++++   | +++  | +   | +  | —  |
| 13 | 12   | +++    | +++  | ++  | +  | —  |
|    | 24   | ++++   | ++++ | +++ | ++ | +  |
|    | 48   | ++++   | ++++ | +++ | ++ | +  |
| 29 | 12   | ++     | ++   | —   | —  | —  |
|    | 24   | ++++   | +++  | ++  | +  | —  |
|    | 48   | ++++   | +++  | ++  | ++ | +  |
| 45 | 12   | +++    | +    | —   | —  | —  |
|    | 24   | ++++   | ++   | —   | —  | —  |
|    | 48   | ++++   | +++  | —   | —  | —  |
| 71 | 12   | +++    | ++   | +   | —  | —  |
|    | 24   | ++++   | +++  | ++  | +  | —  |
|    | 48   | ++++   | +++  | +++ | ++ | +  |
| 59 | 12   | ++     | +    | —   | —  | —  |
|    | 24   | +++    | ++   | +   | +  | —  |
|    | 48   | +++    | ++   | ++  | +  | —  |
| 10 | 12   | +++    | ++   | —   | —  | —  |
|    | 24   | ++++   | +++  | —   | —  | —  |
|    | 48   | ++++   | +++  | ++  | +  | —  |
| 86 | 12   | ++     | ++   | —   | —  | —  |
|    | 24   | +++    | +++  | +   | +  | —  |
|    | 48   | +++    | +++  | ++  | +  | —  |

|     |    |      |      |     |    |   |
|-----|----|------|------|-----|----|---|
| 27  | 12 | +++  | +++  | +   | —  | — |
|     | 24 | ++++ | ++++ | ++  | +  | + |
|     | 48 | ++++ | ++++ | ++  | ++ | + |
| 78  | 12 | +    | —    | —   | —  | — |
|     | 24 | ++   | +    | —   | —  | — |
|     | 48 | +++  | ++   | +   | —  | — |
| 89  | 12 | ++   | +    | —   | —  | — |
|     | 24 | +++  | ++   | —   | —  | — |
|     | 48 | +++  | +++  | +   | —  | — |
| 97  | 12 | ++   | +    | +   | —  | — |
|     | 24 | +++  | ++   | ++  | +  | — |
|     | 48 | ++++ | +++  | ++  | +  | — |
| 115 | 12 | ++   | +    | —   | —  | — |
|     | 24 | +++  | +++  | +   | +  | — |
|     | 48 | +++  | +++  | ++  | +  | — |
| 99  | 12 | ++   | +    | —   | —  | — |
|     | 24 | +++  | ++   | —   | —  | — |
|     | 48 | ++++ | ++   | +   | —  | — |
| 105 | 12 | +++  | +    | +   | —  | — |
|     | 24 | ++++ | ++   | ++  | +  | — |
|     | 48 | ++++ | +++  | ++  | +  | — |
| 102 | 12 | ++   | ++   | +   | —  | — |
|     | 24 | +++  | ++   | ++  | +  | + |
|     | 48 | ++++ | +++  | +++ | ++ | + |
| 42  | 12 | ++   | —    | —   | —  | — |
|     | 24 | +++  | +    | —   | —  | — |
|     | 48 | +++  | +    | —   | —  | — |

注:根据杜氏小管中产气多少分为 5 个等级:“++++”表示杜氏小管中充满气体;“+++”表示杜氏小管中充满 3/4 气体;“++”表示杜氏小管中充满 1/2 气体;“+”表示杜氏小管中充满 1/4 气体;“—”表示杜氏小管中没有气体。

其中编号为 7,13,27,29,59,71,86,97,102,105,115 的菌株在 42 ℃ 的高温条件下产气较多,可以作为四级筛选的出发菌株。从菌株来源分析,7,13,27 来自白酒厂的高温大

曲、酒糟;105,115 来自酒精厂、啤酒厂发酵醪;29,71,102 来自米酒、黄酒发酵醪;97,59 来自米曲霉、黑曲霉发酵基质;86 来自苹果园和葡萄园的土壤。菌株中的 90% 来自酒曲,自然环境的占到总数的 10%。说明从自然环境中不宜筛选到耐高温酵母,这可能与自然环境温度偏低有关。而高温大曲、酒糟由于发酵过程中温度高,同时周围环境温度也偏高,所以从中分离耐高温酵母菌株的可能性更大。

#### 2.2.4 四级筛选结果

将三级筛选得到的 11 株酵母菌活化后接入 200 mL 麦芽汁进行发酵实验,使活菌浓度达到  $1 \times 10^7$  个/mL,40 °C 培养 72 h。结果见表 3。

表 3 四级筛选的发酵结果

| 菌号  | CO <sub>2</sub> 失重/g |       | 发酵成熟醪残糖 (%) | pH 值 | 酒精体积分数 (% ,v/v) |
|-----|----------------------|-------|-------------|------|-----------------|
|     | 24 h                 | 72 h  |             |      |                 |
| 7   | 9.61                 | 12.91 | 1.015       | 4.04 | 4.60            |
| 13  | 10.16                | 14.25 | 0.831       | 4.00 | 5.40            |
| 29  | 9.90                 | 13.30 | 0.922       | 3.99 | 5.00            |
| 71  | 10.19                | 13.79 | 0.647       | 4.08 | 6.10            |
| 59  | 9.87                 | 13.15 | 0.968       | 4.12 | 5.50            |
| 86  | 10.20                | 13.62 | 0.783       | 4.06 | 5.50            |
| 27  | 10.21                | 14.58 | 0.451       | 4.01 | 6.10            |
| 97  | 10.08                | 13.24 | 0.624       | 4.15 | 5.20            |
| 115 | 9.74                 | 14.68 | 0.571       | 4.20 | 6.00            |
| 105 | 9.81                 | 13.05 | 0.985       | 3.92 | 4.60            |
| 102 | 10.25                | 13.49 | 0.423       | 3.94 | 5.50            |

发酵结果显示,27 号酵母的酒精体积分数比较高,达到 6.1% (v/v),残糖较低,仅残留 0.451%,且发酵力 72 h 失重为 14.58 g。综合考虑,最终发酵用菌株采用 27 号菌株,编号为 A27。

#### 2.3 分子鉴定实验

##### 2.3.1 26SrDNA 的 D1/D2 区域扩增

利用 NL1 和 NL4 一对引物对 A27 酵母 26SrDNA 近 5' 端的 D1/D2 区域进行 PCR 扩增,得到约 600 bp 的目的片段,片段大小与已报道的片段大小(500~600 bp)相符,结果见图 1。

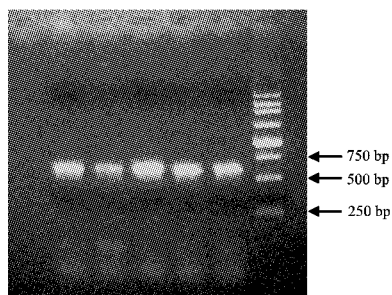


图 1 扩增 26SrDNA 的 D1/D2 区域电泳图

##### 2.3.2 测序结果与同源性比对

将扩增出的 PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化,由上海

生工测序,将测序结果在 Genbank 的 BLAST 上进行比对。结果显示,该序列与报道的酿酒酵母 26SrDNA 近 5' 端的 D1/D2 区域的同源性达到 99%,因此在分子水平上进一步验证了 A27 菌株为酵母属的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

#### 3 结论

(1)本实验是在含有合适酒精浓度的培养基中培养酵母细胞,待酵母菌长出后,再在高温的条件下培养,通过三级筛选得到在高温下生长快速且良好的菌株,此过程中酒精起到了抑制或减缓霉菌和细菌生长的作用,使酵母菌呈现优势生长。说明利用一定浓度的酒精既可分离得到酵母又可以筛选出耐高温的酵母,并且初筛工作量大幅度减轻,能够满足筛选要求。

(2)从不同的环境中都可以分离得到酵母菌,普通酵母随处可见,但极端酵母则只生活在特殊的环境中。高温大曲的温度可高达 60 °C,为筛选到耐高温菌株提供了条件。因此,本实验最终从高温大曲中选育出的酒精酵母 A27,具有一定的耐高温能力,在 54 °C 的高温下仍可生长。

(3)利用 PCR 技术扩增 A27 菌株 26SrDNA 近 5' 端的 D1/D2 区域,将测序结果进行 BLAST 比对,结果表明,该序列与 Genbank 报道的酿酒酵母 26SrDNA 近 5' 端的 D1/D2 区域有 99% 的同源性,因此鉴定 A27 菌株为酿酒酵母。该鉴定方法快速准确,重复性好,在酵母分类学上具有重要的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] 黄宇彤,杜连祥,赵继湘. 世界燃料酒精生产形势[J]. 酿酒,2001,28(5):24-26.
- [2] Peberdy J. Use of the spheroplast fusion technique on ethanol tolerance yeasts[J]. Enzyme Microb Technol, 1980(2):23-29.
- [3] 李磊,刘来亭,秦永林. 美国 DDGS 在饲料中的应用[J]. 饲料研究,2006(11):59-61.
- [4] 董永胜,张德中,王立言,等. 固态发酵耐高温酒精酵母的选育及生产应用[J]. 酿酒,2005,32(5):30-33.
- [5] 陈叶福,王正祥,王晨霞,等. 耐高温酵母菌株的分离鉴定及其酒精发酵初步研究[J]. 微生物学报,2003,30(5):24-27.
- [6] 马立安. 耐高温酒精酵母驯化与筛选[J]. 湖北农学院学报,2000,20(1):73-74.
- [7] 曹俊峰,姚培鑫,马小魁. 发酵甜高粱汁耐高浓度酒精酵母菌的选育[J]. 西北植物学报,2001,21(5):1009-1012.
- [8] 赵丽丽,陈存社,郭凤莲. 26SrDNA 序列分析法鉴定酵母菌[J]. 中国酿造,2008(15):49-51. (下转第 82 页)

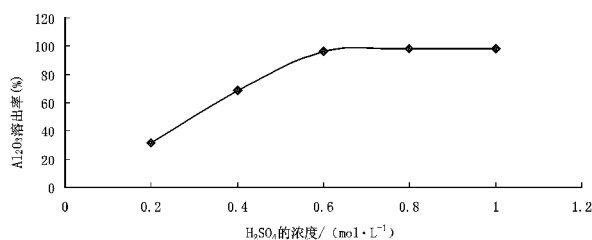


图 4 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度对 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出率的影响

## 2.5 酸浸水浴温度对 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出率的影响

实验条件:煅烧活化温度 750 ℃, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 混合物与粉煤灰的比例为 2 : 1, 达到活化温度后保温时间为 45 min, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 0.6 mol/L。

采用 5 种不同的酸浸水浴温度进行水平实验, 所得的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出率结果见图 5。

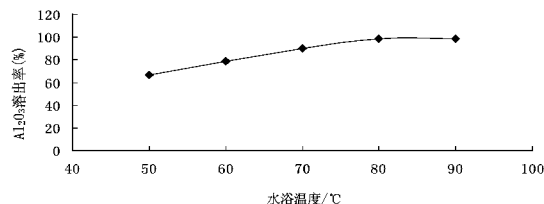


图 5 酸浸水浴温度对 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出率的影响

由图 5 可知, 酸浸水浴温度为 80 ℃ 时, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出率最大, 当超过 80 ℃ 时 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出率增加变缓, 本着节能环保的原则, 选择最佳水浴温度为 80 ℃, 此时 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出率为 98.36%。

## 3 结论

(1) 粉煤灰高附加值利用是当前粉煤灰资源化研究的新方向。

(2) 采用活化-酸浸工艺对粉煤灰中的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶出规律进行研究, 得出最佳工艺条件为: 热处理温度为 750 ℃, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 混合物与粉煤灰的比例为 2 : 1, 热处理保温时间为 45 min, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 0.6 mol/L, 酸浸水浴溶出温度为 80 ℃, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的溶出率为 98.36%。

(3) 活化-酸浸法提取粉煤灰中的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 为提高粉煤灰的附加值开辟了一条新的技术途径, 该方法技术理论成熟、工艺简单易行、溶出率较高, 具有较好的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Blanco F, Gacía M P, Ayala J. Variation in fly ash properties with milling and acid leaching [J]. Fuel, 2005, 84(1): 89-96.
- [2] 石磊. 粉煤灰的综合利用现状与展望 [J]. 再生资源研究, 2006(2): 41-44.
- [3] 刘云颖. 粉煤灰提取氧化铝研究现状 [J]. 无机盐工业, 2007, 39(10): 16-18.
- [4] 余超, 方荣利. 精细化利用粉煤灰制备超细氧化铝 [J]. 无机盐工业, 2005, 37(12): 47-49.
- [5] 孙秀君, 舒新前. 酸浸法提取粉煤灰中氧化铝溶出规律的研究 [J]. 无机盐工业, 2013, 45(11): 44-46.
- [6] 赵俊梅, 张金山, 李小雪. 粉煤灰硫酸化焙烧提取硫酸铝的试验研究 [J]. 轻金属, 2014(1): 14-16.
- [7] 李思琼, 陈杰. 粉煤灰提氧化铝工艺研究进展 [J]. 轻金属, 2013(11): 25-26.

(责任编辑: 李秀荣)

(上接第 79 页)

- [9] 白逢彦, 陆惠中, 王启明, 等. 秦岭地区子囊菌酵母物种多样性研究 [J]. 菌物学报, 2004, 23(2): 183-187.
- [10] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义 [J]. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32.
- [11] 杨艳艳, 易霞, 木合塔尔·阿不都克力木, 等. 一株分离于工业污水池的耐碱酵母 [J]. 生物技术, 2006, 16(4): 25-27.
- [12] 王梅, 张澎湃, 帅桂兰, 等. TTC 在黄酒酵母选育中的

应用 [J]. 酿酒, 2001, 28(5): 62-64.

- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] Kurtzman C P, Robnett C J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(5): 1216-1223.

(责任编辑: 李秀荣)