

产番茄红素红酵母基因组重排 实验条件的优化

李洁,王刚,张利平*

(河北大学生命科学学院,河北省微生物多样性研究与应用重点实验室,河北保定 071002)

摘要:目的:探索基因组重排技术应用于产番茄红素红酵母育种中关键步骤的最优条件。方法:本实验以3株产生番茄红素的红酵母cp-2-11、cp-2-6、cp-28为实验菌株,研究菌体培养时间、酶解浓度、酶解时间、灭活条件以及融合时间对基因组重排的影响。结果:当菌体培养12h,酶解浓度为2%,酶解70min时,原生质体制备与再生率最佳;15W紫外灯,照射距离为35cm,磁力搅拌50r/min的条件下照射18min,60℃下灭活35min作为双亲灭活条件;35%聚乙二醇4000(PEG-4000)作为融合剂,处理23min为最佳融合时间。结论:通过基因组重排最佳条件的确定,后续重排实验的效率得到很大的提升,最终筛选出了高产的目的菌株,产量较融合亲本提高了122%。

关键词:基因组重排技术,红酵母,番茄红素

Optimizing process of genome shuffling in *Rhodotorula* sp. producing lycopene

LI Jie, WANG Gang, ZHANG Li-ping*

(College of Life Science, Hebei University, Key Lab of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, Baoding 071002, China)

Abstract: Objective: Exploring the optimum conditions of the genome shuffling which applied to the key steps of *Rhodotorula*. Method: With *Rhodotorula* cp-2-11, cp-2-6, cp-28 as the tested material, we explored the effects of several factors including cell age, enzyme concentration, hydrolysis time, inactivation conditions, fusion time on genome shuffling. Results: The protoplast preparation rate and regeneration rate was supreme when the cell age was 12 hours, the enzyme concentration was 2% and the hydrolysis time was 70 minute. 15W UV light, the irradiation distance was 35cm irradiates 18 minute and 60℃ water bath inactive 35 minutes were used as the conditions of Inactivation, fused 23 minute in 35% PEG as the fusion condition. Conclusions: Through determining the optimum conditions of genome shuffling, the follow-up work was improved effectively. After several rounds of genome shuffling, the high yield strains were breed, which increased by 122% than original strains.

Key words: genome shuffling; *Rhodotorula*; lycopene

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)08-0228-05

基因组重排技术是1998年由Stemmer等^[1]提出的一种新的育种方式。2002年,Stephanopoulos^[2]在Nature Biotechnology上发表文章,对基因组重排技术及其应用潜力进行了高度评价。该技术将重组的对象从单个基因扩展到整个基因组,是分子定向化在全基因组水平上的延伸,可以更有效地对菌种的性状进行优化组合^[3]。与传统育种方式相比,具有工作量少、选育的菌种性能稳定、不需要详细的遗传背景、适用范围更为广泛等特点,已被广泛利用。但是在利用红酵母发酵生产番茄红素的研究中,基因组重排育种的应用尚未见报道。番茄红素是类胡萝

卜素的一种,最早是由Millardet^[4]于1875年从番茄中获得的粗提物,当时命名为Solanorubin。1903年Schunck^[5]发现番茄中红色素的吸收光谱与类胡萝卜素不同,将这种红色素更名为Lycopene。目前发现番茄红素具有多种生物学功能,如清除自由基^[6]、诱导细胞间连接通讯、抑制肿瘤细胞增殖、增强免疫力、调节环加氧酶新陈代谢等^[7-8],是国际上功能性食品研究的热点。类胡萝卜素已被WHO等国际组织定为A类营养色素,并在50多个国家获准为营养、色素双重功用的食品添加剂,被广泛应用于保健食品、医药和化妆品工业^[9]。本实验采用河北省微生物多样性研究与应用重点实验室中保藏的红酵母菌株cp-2-11、cp-2-6、cp-28作为实验菌株,研究菌龄、酶解浓度、酶解时间、灭活条件以及融合时间对菌株原生质体制备、灭活、融合与再生产生的影响。

收稿日期:2012-11-07 *通讯联系人

作者简介:李洁(1986-),女,在读研究生,研究方向:药物微生物遗传育种。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

菌株 河北省微生物多样性研究与应用重点实验室保藏的红酵母菌株cp-2-11、cp-2-6、cp-28; 蔗糖 AR级; 山梨醇 纯度 $\geq 98.0\%$; 磷酸缓冲液 (Phosphate Buffer, PB) 由 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 配制, pH=5.8; 高渗磷酸缓冲液 (Phosphate Buffer Saline, PBS) PB溶剂中加入15%的山梨醇; 去壁酶液 将蜗牛酶溶于PBS中, 微孔滤膜过滤除菌, 配制成不同浓度的酶液; 促融合剂 实验直接使用35%聚乙二醇 (Polyethylene Glycol-4000, PEG-4000) 用高渗磷酸缓冲液配制作作为促融合剂; 上层YEPDS高渗培养基 (g/L) 葡萄糖20, 蛋白胨10, 酵母粉5, 蔗糖170, 琼脂8, pH6.0, 121 $^{\circ}C$, 0.1MPa灭菌30min; 下层YEPDS高渗培养基 (g/L) 葡萄糖20, 蛋白胨10, 酵母粉5, 蔗糖170, 琼脂12, pH6.0, 121 $^{\circ}C$, 0.1MPa灭菌30min; YPD斜面培养基 (g/L) 葡萄糖20, 蛋白胨10, 酵母粉5, 琼脂12, pH6.0, 121 $^{\circ}C$, 0.1MPa灭菌30min; YPD种子培养基 (g/L) 葡萄糖20, 蛋白胨10, 酵母粉5, pH6.0, 121 $^{\circ}C$, 0.1MPa灭菌30min。

Sigma 3K-15 台式高速冷冻离心机 Sigma; FA1104型电子天平 上海天平仪器厂; SW-CJ-2FD型 双人单面超净工作台 安泰公司; HH-B11型电热恒温培养箱 上海跃进科学仪器厂; LDZX-40型立式自动电热压力蒸汽灭菌器 北京市医疗设备总厂; L-2000型分析型高效液相色谱仪 日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原生质体制备^[10] 将各亲本菌株cp-2-11、cp-2-6、cp-28分别在YPD斜面培养基上活化2次, 28 $^{\circ}C$ 培养4d。从活化好的新鲜斜面上挑取适量菌体, 分别接入装有10mL YPD种子培养基的发酵管中, 于28 $^{\circ}C$ 、180r/min条件下培养一定时间。取2mL培养液到无菌的离心管中, 6000r/min, 离心5min去上清, 用PB溶液洗涤2次后收集菌体。加入2mL 0.2%的巯基乙醇-PB溶液, 30 $^{\circ}C$ 保温后离心去上清液。加入2mL一定浓度的蜗牛酶-PBS溶液, 28 $^{\circ}C$ 下振荡水浴保温一定时间后, 3000r/min离心5min去除酶解液 (离心转速不能大于3000r/min, 以免原生质体破裂)。用PBS溶液洗涤两次, 将制得的原生质体悬浮于PBS中。

1.2.2 原生质体灭活 本实验采用双亲灭活法, 将制备的亲本菌株原生质体悬液分为两份, 分别采取紫外灭活和热灭活。紫外灭活: 15W紫外灯, 照射距离为35cm, 磁力搅拌50r/min的条件下照射一定时间。热灭活: 在60 $^{\circ}C$ 的水浴锅中, 水浴一定时间。分别取0.2mL灭活原生质体涂于双层再生培养基YEPDS, 28 $^{\circ}C$ 培养, 作为对照。

1.2.3 原生质体融合与再生 分别取紫外线灭活和热灭活的原生质体-PBS悬液各5mL于已灭菌的50mL离心管中, PBS洗涤2次, 3000r/min离心5min去上清。用0.4mol/L $CaCl_2$ 洗涤一次, 加入6mL促融合剂35% PEG-4000, 轻摇混合。27 $^{\circ}C$ 静置保温一定时间。3000r/min离心5min去上清, PBS溶液洗涤两次, 将沉淀再次悬浮于PBS溶液中。将融合后的菌体悬液与上

层YEPDS高渗培养基混合 (培养基温度不宜过高), 取10mL于下层YEPDS高渗培养基上, 28 $^{\circ}C$ 下培养7~8d。生长出的菌株即为重组子。

1.2.4 重排的循环进行 将重组子挑出, 标号并进行发酵培养, HPLC检测番茄红素产量^[10], 筛选出多株高产菌株。稳定高产的菌株即可作为下一轮的基因组重排的亲本菌株, 继续原生质体的制备、灭活、融合与再生过程, 如此循环数轮, 最终经过数轮重排, 选育出高产番茄红素的目的菌株。

1.2.5 单因素对基因组重排过程的影响

1.2.5.1 菌体培养时间对原生质体制制备和再生的影响 活化后的红酵母接种到YPD液体培养基后分别培养10、11、12、13、14、15、16h, 将不同培养时间下的菌株制备成原生质体, 将原生质体稀释适当的倍数后涂布于YEPDS双层再生培养基上, 计算原生质体制备率和再生率^[11]。

原生质体制备率的计算公式为: 原生质体制备

$$\text{率}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

原生质体再生率的计算公式为: 原生质体再生

$$\text{率}(\%) = \frac{C-B}{A-B} \times 100$$

式中, A: 酶处理前的菌体稀释后涂布平板, 长出的菌落数; B: 酶处理后的菌体用无菌水稀释后涂布平板, 未脱壁的原生质体长出的菌落数; C: 酶处理后的菌体用PBS稀释后涂布平板, 未脱壁的菌体和原生质体再生后长出的菌落数之和。

1.2.5.2 酶解浓度对原生质体制制备和再生的影响^[12]

将活化的菌种接种YPD液体培养基, 培养12h, 收集菌体, 分别采用浓度0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3%的蜗牛酶对菌株进行酶解, 制备成原生质体。将制得的原生质体适当稀释后涂于YEPDS双层再生培养基, 根据再生菌落数计算其制备率和再生率。

1.2.5.3 酶解处理时间对原生质体制制备和再生的影响^[12] 将活化的菌种接种于YPD液体培养基, 培养12h, 收集菌体, 采用浓度2%的蜗牛酶溶液28 $^{\circ}C$ 下恒温低速振荡, 分别在30、50、70、90、110、130min时取样, 适当稀释后涂于YEPDS双层再生培养基, 根据再生菌落数计算其制备率和再生率。

1.2.5.4 原生质体的紫外线灭活致死曲线的绘制^[13]

取待灭活的原生质体各0.5mL于无菌的50mL离心管中, PBS溶液洗涤两次后, 用PBS悬浮, 吸取7mL菌悬液平铺在放有转子的无菌平板上, 置于紫外灯下照射, 分别在3、6、9、12、15、18、21min时取样, 适当稀释后涂布于YEPDS再生培养基, 28 $^{\circ}C$ 培养5~7d后, 计数再生菌落数, 计算致死率。

$$\text{原生质体致死率}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

式中, A: 酶处理后涂布双层再生平板长出的菌落数; B: 紫外灭活处理后, 涂布双层再生平板长出的菌落数。

1.2.5.5 原生质体的热灭活致死曲线的绘制 取待灭活的原生质体各0.5mL于无菌的50mL离心管中, PBS溶液洗涤两次, 悬浮于20mL PBS溶液中, 置于

60℃水浴锅中水浴,分别在5、10、15、20、25、30、35min时取样,适当稀释后涂于YEPDS再生培养基,28℃培养5~7d后,计数再生菌落数,计算紫外致死率。

$$\text{原生质体致死率}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

式中,A:酶处理后涂布双层再生平板长出的菌落数;B:经热灭活处理后,涂布双层再生平板长出的菌落数。

1.2.5.6 PEG融合时间对融合率的影响 取双灭活的原生质体各5mL于已灭菌的50mL离心管中,PBS洗涤2次,3000r/min离心5min去上清。用0.4mol/L CaCl₂洗一次,3000r/min离心5min去上清。加入2mL PBS溶液,轻轻摇匀,将原生质体悬浮于其中,再加入6mL促融剂,轻摇混合。27℃静置保温,分别在10、20、30、40、50min时取样,涂于YEPDS再生培养基,同时取未灭活原生质体稀释后涂布再生平板,28℃培养5~7d后,根据长出的重组子计算融合率。

$$\text{原生质体融合率}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

式中,A:融合再生的菌落数;B:未灭活再生的菌落数。

2 结果与分析

2.1 菌体培养时间对原生质体制备与再生的影响

微生物生理状态是决定原生质体制备率的主要因素之一,特别是菌龄,当菌体处于对数期时,细胞代谢活性最强,细菌旺盛生长,代时最短,细胞数量呈对数增加,因此,菌体培养时间以对数生长期即培养10~16h的菌体为宜。培养时间对原生质体制备率和再生率的影响见图1,当培养时间低于12h时,原生质体形成率较高,但再生率较低;12h时,原生质体制备率降低不显著($p>0.05$),此时原生质体再生率最高;培养时间超过14h后,原生质体形成率和再生率都降低。因此,实验采用培养12h的菌体进行原生质体的制备。

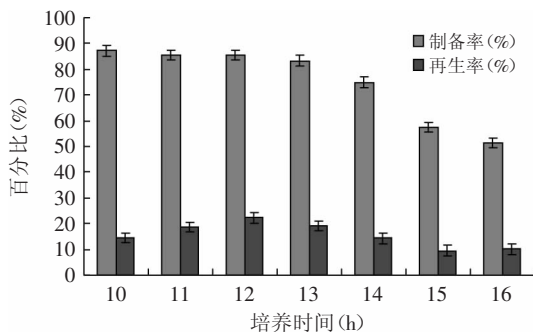


图1 培养时间对原生质体制备率和再生率的影响

Fig.1 Effect of cell age on preparation rate and regeneration rate of protoplast

2.2 酶浓度对原生质体制备率与再生率的影响

如图2所示,原生质体的制备率随着酶浓度的增加而升高,当酶浓度小于1.0%时,制备率较低,不适于原生质体制备;当酶浓度达到1.5%时,原生质体制备率急剧增加达到84.4%;此后制备率增加趋势变

缓,最高达到93.9%。

在0%~2%的浓度区间,原生质体的再生率随着酶浓度的增加而上升,当酶浓度达到2%时,原生质体再生率达到最高值32.4%。高浓度的酶会对原生质体产生一定的毒性,使其失活,降低其再生率,由图2可以看出,当浓度超过2%时,再生率下降明显,当酶浓度为3%时,再生率下降为8.7%。

蜗牛酶浓度过低时,细胞壁不能得到充分的酶解,所以形成的原生质体就少,制备率则相对较低。蜗牛酶是一种混合酶,因而当蜗牛酶浓度增加时,杂酶浓度也会相应增加,当达到一定浓度时就会影响原生质体的活性。同时,高浓度的蜗牛酶会使细胞壁酶解过于充分,细胞表面没有细胞壁残留,使原生质体再生时失去引物,大大降低了原生质体的再生率。综合考虑蜗牛酶浓度对原生质体形成率和再生率的影响,本实验选择蜗牛酶的浓度为2%。

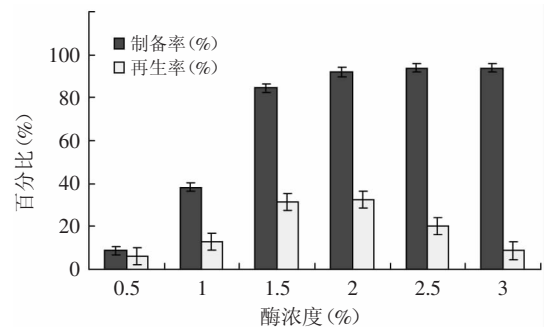


图2 酶浓度对原生质体制备率与再生率的影响

Fig.2 Effect of enzyme concentration on preparation rate and regeneration rate of protoplast

2.3 酶解时间对原生质体形成率和再生率的影响

如图3所示,原生质体制备率随酶解时间的增加而升高,原生质体的再生率在30~70min的区间内随时间的增加而升高,到达70min时,达到最高值19.6%。但随着酶解时间继续增长,原生质体制备率增加,而原生质体的再生率却随之降低^[9]。分析原因可能是随着蜗牛酶作用时间的增加,导致蜗牛酶对细胞脱壁的酶解过于充分,使细胞失去了细胞壁再生的引物;同时随着时间的增加,蜗牛酶中杂酶会对原生质体产生损害,降低了原生质体的活性,所以菌体的原

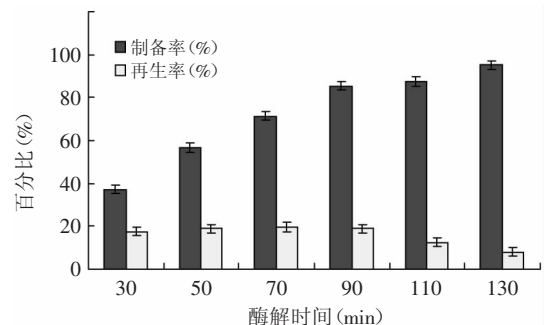


图3 酶解时间对原生质体形成率和再生率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis time on preparation rate and regeneration rate of protoplast

生质体再生率会随着酶解时间的延长而降低。综合考虑制备率与再生率,最终确定采用70min为最适酶解时间。

2.4 紫外线灭活原生质体时间的确定

如图4所示,从紫外灭活致死曲线中可以看出,当紫外线照射时间在0~10min时,原生质体致死率急剧增加,10min以后,致死率的变化趋势变缓,当紫外线照射15min时致死率已达到99.95%;18min时,致死率达到100%。紫外线照射原生质体时,由于染色体DNA强烈吸收紫外线,因而损伤细胞核从而使细胞生理性失活。为了确保灭活率及可再生率,本实验选择紫外线灭活时间18min。

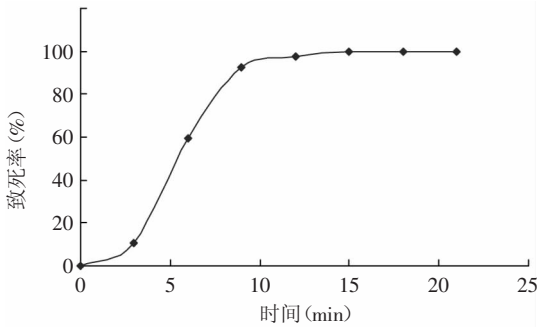


图4 紫外线灭活时间对原生质体致死率的影响
Fig.4 Effect of UV time on lethality of protoplast

2.5 热灭活原生质体时间的确定

如图5所示,从热灭活致死曲线中可以看出当水浴温度为60℃时,在0~10min内,致死率急剧增加,15min时已达到95.24%,在25min时致死率已达到99.64%,当时间为35min时原生质体致死率就已达100%。热处理会使细胞质上的部分功能蛋白和酶蛋白失活,造成原生质体不能再生。为了确保致死率与再生率,最终选择60℃灭活35min作为原生质体灭活的热处理条件。

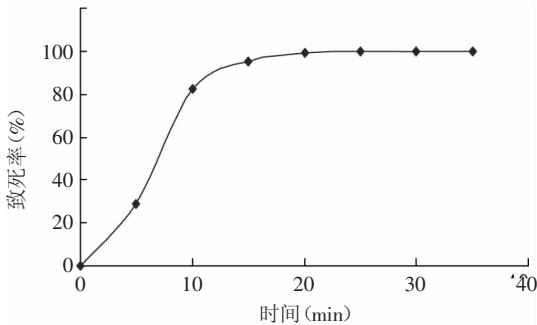


图5 热灭活时间对致死率的影响

Fig.5 Effect of thermal inactivation time on lethality of protoplast

2.6 PEG融合时间对原生质体融合率的影响

如图6所示,当融合时间为23min时,原生质体的融合率最高,处理时间高于或低于23min,融合率都相对有所下降。这是由于原生质体中加入PEG溶液后迅速地发生黏着,融合几乎是立即发生的,但是基因组间的充分融合,还需要一定的时间,因此如果

PEG处理时间过短,就会导致融合率过低。如果延长PEG的处理时间,由于PEG对原生质体细胞有毒害作用,使原生质体丧失活性,从而也会导致融合率降低。因此,实验选用23min作为融合时间。

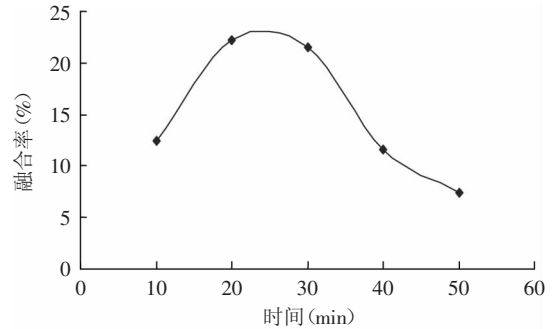


图6 融合时间对融合率的影响

Fig.6 Effect of fusion time on fusion rate

2.7 验证实验

将本实验得到的最优条件作为基因组重排的实验条件,应用于产番茄红素红酵母菌株的育种工作中,最终筛选出高产的目的菌株,产量可达103.47μg/mL,较融合亲本(46.64μg/mL)提高了122%。

3 结果与讨论

本文以获得高产番茄红素的红酵母菌为目的,对基因组重排步骤中菌体培养时间、酶解浓度、酶解时间、双亲灭活条件,以及融合剂的融合时间对基因组重排的影响进行研究,确定了最佳条件:菌体培养时间为12h,酶解浓度为2%,酶解时间为70min时,原生质制备率与再生率最佳;15W紫外灯,照射距离为35cm,磁力搅拌50r/min的条件下照射18min,60℃下灭活35min作为双亲灭活条件;35%聚乙二醇4000(PEG-4000)作为融合剂,处理23min为最佳融合时间。

通过基因组重排最佳条件的确定,后续重排实验的效率得到很大的提升,最终筛选出高产的目的菌株,产量较融合亲本提高122%。相比于其他的育种技术^[12,14-15],基因组重排技术的应用,可以更有效地提高红酵母产番茄红素的水平,是对产番茄红素红酵母育种工作的新尝试,为今后番茄红素的工业化生产提供宝贵的理论支持。

参考文献

[1] Zhang Y, Perry K, Vinci V, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. Nature, 2002, 415: 644-646.
 [2] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 666-668.
 [3] 赵靖. 基因组重排技术原理及应用研究[J]. 广州化工, 2012, 40(6): 29-30.
 [4] Nguyen M, L Schwartz S J. Lycopene: chemical and biological properties[J]. Food Technology, 1999, 53(2): 38-45.
 [5] 李灿明, 黄时海, 张云开, 等. 灭活原生质体融合技术提高

(下转第239页)

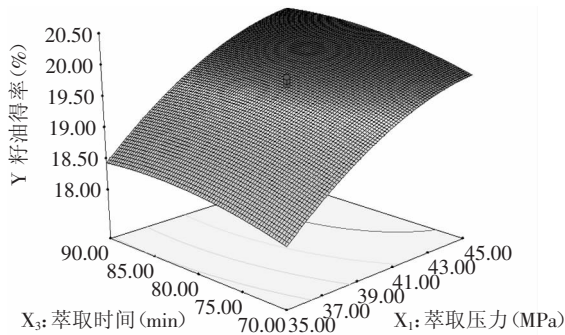


图6 萃取压力和萃取时间对石榴籽油得率的响应面分析
Fig.6 Response surface analysis for the effect of extraction pressure and extraction time on oil yield

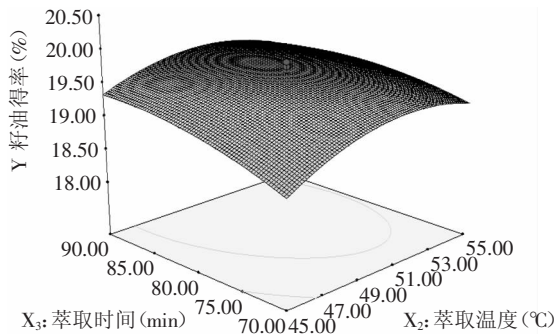


图7 萃取温度和萃取时间对石榴籽油得率的响应面分析
Fig.7 Response surface analysis for the effect of extraction temperature and extraction time on oil yield

平缓,表明各因素之间对石榴籽油得率的交互作用均不显著。

2.2.4 最优条件的确定及验证实验 由Design-Expert软件分析得到SC-CO₂萃取石榴籽油的最佳工艺条件:萃取压力44.51MPa、萃取温度49.59℃、萃取时间88.63min。考虑到实际操作的限制性,将工艺参数修正为萃取压力45MPa、萃取温度50℃、萃取时间90min。在此优化条件下共进行3次平行验证实验,得到石榴籽油的平均得率为20.3%,与预测值20.32%非常接近,说明采用RSM法优化得到的提取条件可靠,具有使用价值。

3 结论

3.1 通过采用Design-Expert软件分析萃取压力、萃

取温度、萃取时间三因素对石榴籽油得率的影响,得到超临界萃取工艺参数的回归方程为: $Y=19.68+0.90X_1+0.13X_2+0.19X_3+0.081X_1X_2+0.036X_1X_3-0.10X_2X_3-0.33X_1^2-0.35X_2^2-0.16X_3^2$,方差分析结果表明,模型显著失拟项不显著,决定系数达0.9799,该方程能预测石榴籽油得率随各参数变化的规律,且能够利用响应面法较好地石榴籽油的超临界萃取工艺进行回归分析和参数优化。

3.2 优化后确定的超临界CO₂萃取石榴籽油的最佳工艺条件:萃取压力45MPa、萃取温度50℃、萃取时间90min,石榴籽油得率为20.3%。该研究结果为采用超临界CO₂萃取石榴籽油提供了一定的理论基础和参考。

参考文献

- [1] 张海峰,白杰,张英.我国石榴资源及其开发利用的研究进展[J]. 饮料工业,2009(8):1-3.
- [2] 苗利,夏德水,高丽娜,等.水酶法提取石榴籽油工艺研究[J]. 食品工业科技,2010,31(12):266-268.
- [3] 杭志奇,韩清波,许景松.石榴籽成分分析[J]. 安徽农业科学,2010,38(33):18740-18741.
- [4] KAUFMAN M, WIESMAN ZEEV. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol Fingerprinting [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(25): 10405-10413.
- [5] Mohammad H E, Fereshteh G, Seyed S. Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane [J]. Food and Bioproducts Processing, 2012, 90(1): 32-36.
- [6] 赵文英,崔波,朱政,等.提取方法对石榴籽油提取率及抗氧化活性的影响[J]. 中国林副特产, 2010, 107(4): 4-6.
- [7] 杨兆艳,白宏伟,王璇.石榴籽油提取工艺的研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(2): 18-20.
- [8] 朱丽莉,童军茂,李疆,等.微波辅助有机溶剂提取石榴籽油工艺的研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(4): 11-13.
- [9] 李敬华,蔡为荣.超临界CO₂流体萃取香榧油的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 228-231.
- [10] 王鸿,邓泽元,刘蓉,等.响应曲面法优化山落菜根多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 46-50.

(上接第231页)

豆豉纤溶酶菌产酶量[J]. 食品工业科技, 2009(8): 140-142.

- [6] 肖春玲. 樱桃番茄色素的抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 117-120.
- [7] 邓建军. 番茄红素功能活性研究进展[J]. 中国食品工业, 2012(4): 50-51.
- [8] 解瑞宁,沈新南. 番茄红素生物学作用及与慢性病的关系[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(1): 112-113.
- [9] 陈学荣. 粘红酵母生产类胡萝卜素b的发酵条件研究[J]. 食品工业科技, 2010(6): 223
- [10] 詹萍,苏龙,周乃东. 红酵母原生质体制备和再生条件研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1154-1155, 1172.

- [11] 王海兵,吴晓英,刘世龙,等. 红酵母番茄红素提取工艺优化[J]. 食品科学, 2011(32): 45-48.
- [12] 顾蕾,陆玲,袁生. 红酵母原生质体制备及其紫外诱变育种的研究[J]. 食品工业科技, 2004(4): 60-62, 65.
- [13] 廖宇静,张利平,谢响明,等. 微生物遗传育种学[M]. 第一版. 北京:气象出版社, 2010, 8: 570-575.
- [14] 高艳,谭兴和,周红丽,等. 南阳酵母2-577原生质体制备和再生条件的研究[J]. 食品科技, 2008(8): 5-8.
- [15] 张宁,虞龙,沈以凌. 氮离子注入番茄红素产生菌诱变育种的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008, 26(5): 286-288.