酿酒酵母发酵过程中褪黑素及其同分异构体变化规律的研究

王成，施雪莹，肖华，王丽花，文云，王晓磊，战吉成，黄卫东

（中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京市葡萄科学与酿酒技术重点实验室，北京 100083）

摘要：本文研究了 A、B、F 三株酿酒酵母在模拟葡萄汁发酵过程中褪黑素及同分异构体产生及变化的规律，并初步探讨了与酵母酒精发酵进程的关系，最后用草莓、蓝莓、桑葚、树莓四种浆果发酵进行了验证。结果发现褪黑素含量在发酵的第 1 d 达到最大值，A、B、F 菌含量分别为 0.773、0.647、0.825 ng/mL，随后迅速下降。褪黑素同分异构体含量在发酵的第 3 d 达到最大值，A、B、F 菌含量分别为 34.89、19.24、26.79 ng/mL，后期逐渐下降，且同分异构体含量远高于褪黑素($p<0.01$)。草莓、蓝莓、桑葚、树莓发酵前后褪黑素含量无显著性差异，同分异构体含量分别达到 64.4、7.37、81.9、55.5 ng/mL，均显著高于褪黑素的含量。总之，褪黑素及其同分异构体在酒精发酵初期产生，中后期逐渐下降，推测与酵母发酵初期逆境代谢密切相关。

关键词：褪黑素；同分异构体；酒精发酵；浆果

文章篇号：1673-9078(2015)8-77-82 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.014

Variations in the Content of Melatonin and Its Isomer During Ethanol Fermentation by Different *Saccharomyces cerevisiae* Strains

WANG Cheng, SHI Xue-ying, XIAO Hua, WANG Li-hua, WEN Yun, WANG Xiao-lei, ZHAN Ji-cheng, HUANG Wei-dong

(College of Food Science and Nutritional Engineering, Beijing Key Laboratory of Viticulture and Enology, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The variations in melatonin and its isomer content were studied during ethanol fermentation by three different *Saccharomyces cerevisiae* strains, that is, A, B, and F. Additionally, the relationship between melatonin/melatonin isomer and the fermentation process was preliminarily explored and verified by wine fermentation of four types of berries (strawberry, blueberry, mulberry, and raspberry). The results showed that the melatonin content reached the maximum on day 1 and then decreased rapidly. Maximum values obtained for *S. cerevisiae* strains A, B, and F were 0.773, 0.647, and 0.825 ng/mL, respectively. The content of melatonin isomer reached the maximum on day 3 and then gradually decreased toward later stages. The maximum values obtained for *S. cerevisiae* strains A, B, and F were 34.89, 19.24, and 26.79 ng/mL, respectively. Thus, the content of the melatonin isomer was significantly higher than that of melatonin ($p < 0.01$). However, there were no significant differences in melatonin content before and after wine fermentation of the berries (strawberry, blueberry, mulberry, and raspberry), whereas the melatonin isomer content after fermentation was 64.4, 7.37, 81.9, and 55.5 ng/mL, respectively, which was significantly higher than the melatonin content. In summary, melatonin and its isomer were produced in the early fermentation stage and their individual content gradually decreased during the mid-to-late stage, which was speculated to be closely related to the stress response by *S. cerevisiae* during early stages of fermentation.

Key words: melatonin; isomer; ethanol fermentation; berries

收稿日期：2014-10-16

基金项目：科技部十二五科技支撑计划项目（2012BAD31B07）；农业部公益性行业专项（201303073-2）

作者简介：王成（1986-），男，在读博士研究生，研究方向：酿酒酵母逆境生理代谢

通讯作者：黄卫东（1961-），男，教授，博士生导师，研究方向：酿酒葡萄逆境生理，酿酒酵母逆境生理代谢

褪黑素，学名 N-乙酰基-5-甲氧基色胺，又称松果体素，是动植物内广泛存在的一种小分子生物胺类物质，具有重要的生理作用，其分子量 232，主要是由 5 号位上的甲氧基。中间的吲哚基和 3 号位上的乙酰基构成（图 1a）。其在人体和动物体内的含量极少，只有 pg/mL 水平[1]，但生理作用十分重要，主要作用有调节昼夜节律、缓解睡眠障碍、抗氧化、抗衰老、抗

肿瘤等等[2]。褪黑素在植物体中也广泛存在，其含量分布差异巨大，从 pg/g 到 μg/g 都有分布，但一般含量高于人体和动物体[3]。目前已知褪黑素在许多水果，如葡萄、香蕉、苹果、樱桃、石榴等都已经发现，在其深加工食品中，如果酒、果醋、果汁等食品中，也发现了褪黑素大量存在[4]。通过进食富含褪黑素的食品，可以补充人体褪黑素自身分泌的不足。

褪黑素的同分异构体是最近几年在发酵食品中新发现的一种营养物质。2011 年 Rodriguez-Naranjo[5]等人首次在葡萄酒中利用 HPLC-MS 的方法发现了褪黑素同分异构体的存在。褪黑素从结构上看，3 号位上的乙酰基和 5 号位甲氧基理论上可以自由在吲哚环上组合，构成可能的 42 中同分异构体[6]，但从目前已知的文献可以得到，含量最高的，已经鉴定出结构的，最主要的同分异构体就是 3 号位上的乙酰基转移到 1 号位上，5 号位的甲氧基位置不变，形成 N-1-乙酰基-5-甲氧基-色胺的物质，结构如图 1b[7]。从结构上看，由于褪黑素及其同分异构体主要的官能团结构类似，推断其可能具有类似的生理功能，这需要进一步的深入研究。

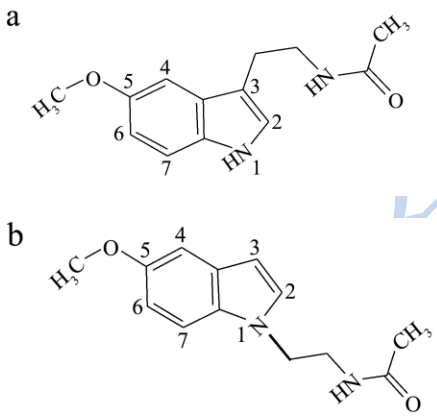


图 1 褪黑素(a)及其主要的同分异构体(b)结构示意图

Fig.1 Structure of melatonin (a) and its majorisomer (b)

褪黑素的检验目前文献报道已经有多种方法，如 ELISA（酶联免疫法）、HPLC-FD（高效液相结合荧光）、HPLC-MS 等，检测结果也都比较灵敏，但 ELISA 常用于检测人体及动物体中微量的褪黑素，用于食品检测容易引起结果产生较大的误差，而且由于褪黑素同分异构体没有标准品，导致 HPLC-FD 法只能检测褪黑素，不能检测其同分异构体。因此，HPLC-MS 通过二级质谱的 MRM 检测模式不仅可以灵敏的检测褪黑素，也能初步鉴定其同分异构体，是目前国际上检测褪黑素及其同分异构体的主要方式。

目前有关褪黑素同分异构体的研究比较少，且只在发酵产品中发现了同分异构体，暗示褪黑素同分异构体与微生物之间的密切关系，但尚无文献报道其产生规律和产生机理。本文以模拟葡萄汁发酵体系为手段，首次利用三株不同的酿酒酵母，研究酒精发酵过程中褪黑素及其同分异构体的产生变化规律，并初步探讨其与酵母酒精发酵进程之间的相互关系，并用草莓、蓝莓、桑葚、树莓四种真实浆果汁进行验证。同时首次在这些浆果酒中发现了褪黑素及其同分异构体的存在。希望发现褪黑素及其同分异构体在发酵过程中的变化规律，发现不同菌株对褪黑素及同分异构体的影响，发现真实汁与模拟汁之间褪黑素及其同分异构体发酵过程中含量变化差异，为将来后续的深入研究提供基础支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株

Saccharomyces cerevisiae AWRI R_2（简称 A 菌株），是一株商业葡萄酒酿酒酵母，由 Marivin（Australian）公司生产，发酵性能优异，是许多葡萄酒厂中广泛使用一株商业菌株。

Saccharomyces cerevisiae Freddo（简称 F 菌株），是一株商业葡萄酒酿酒酵母，购于 Erbslöh (Germany) 公司。

Saccharomyces cerevisiae BH8（简称 B 菌株）分离自本土选育红葡萄酒酿造品种“北红”葡萄汁的自然发酵液，为本实验室分离菌种。该菌种经中科院微生物研究所鉴定为酿酒酵母。

以上菌株均保藏在 YPD 斜面培养基上，每 6 个月对菌种进行一次转接。

商业酿酒酵母“RED FRUIT”(*Saccharomyces cerevisiae*)为活性干酵母，由意大利英纳帝斯（enartis）公司提供，中文名为“红果香”，用于草莓、蓝莓、桑葚、树莓四种浆果的酒精发酵。

1.1.2 培养基

YPD 液体培养基（用于种子培养）：酵母浸粉 1%，蛋白胨 2%，葡萄糖 2%。

模拟葡萄汁培养基（MSM培养基）可以模拟标准葡萄汁的主要成分，同时排出酚类、花色苷等物质的干扰适于研究酿酒酵母的发酵特性。配制参考Marullo等[8]的方法，模拟葡萄汁的成分为(g/L)：葡萄糖100、果糖100、酒石酸3、柠檬酸0.3、L-苹果酸0.3、KH_2PO_4(2)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2)，氮源：$(NH_4)_2SO_4$(0.3)、Asn(0.6)，无机盐 (mg/L):$MnSO_4 \cdot H_2O$(4)、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$(4)、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$(1)、KI(1)、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$(0.4)、

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$(1)、$H_3BO_3$(1)。维生素(mg/L):肌醇(300)、生物素(0.04)、硫酸铵(1)、吡哆醇(1)、烟酸(1)、泛酸(1)，脂肪酸(mg/L):棕榈酸(1)、棕榈烯酸(0.2)、硬脂酸(3)、油酸(0.5)、亚油酸(0.5)、亚麻酸(0.2)。pH值调整为3.3。总N为190mg/L。

1.2 主要试剂和仪器设备

1.2.1 主要的试剂

褪黑素标样购于美国Sigma公司，其他试剂均为分析纯级别。

1.2.2 主要的仪器设备

恒温培养箱、超净工作台、Shinadzauy220万分之一天平、飞鸽牌冷冻离心机、超低温冰箱、安捷伦1200系列液相系统，安捷伦6460三重四极杆串联质谱仪。

1.3 方法

1.3.1 菌种采集、活化与接种方法

接种 1 环斜面上保藏的三株酵母菌分别到 100 mL YPD 液体培养基中。28 ℃摇床培养 12 h 至对数期（OD_{600}约为 1.4~1.5），转速为 120 r/min。取 0.4 mL 对数期的均液加入到含 400 mL MSM 模拟葡萄汁培养基的厌氧发酵瓶中，接种量为 1%，发酵瓶上端连接发酵栓，发酵栓中加入 5 mL 浓硫酸隔绝空气，将厌氧发酵瓶放入恒温摇床，28 ℃ 120 r/min 发酵，以 CO_2 的减重量小于 0.1 g 作为发酵终点。每个处理设置称重组和取样组，每个组别设置三个平行。

1.3.2 真实浆果汁的酒精发酵方法

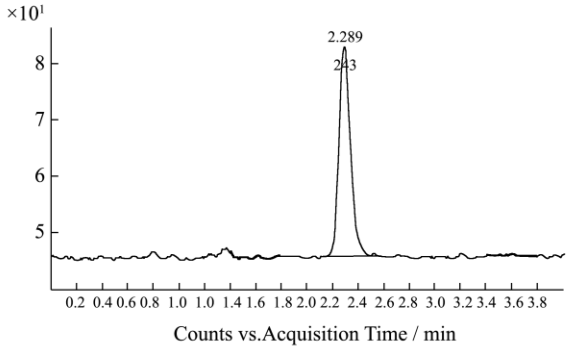
取草莓、蓝莓、桑葚、树莓四种浆果各 0.8 kg，人工破碎，匀浆，放入 1 L 的广口玻璃瓶中，加入果胶酶浓度为 30 mg/L，搅拌均匀，后加入亚硫酸使 SO_2 浓度达到 40 mg/L，混匀。第二天添加酵母“红果香”浓度为 200 mg/L，酵母提前用果汁活化 20 min 后加入。酵母加入后混匀，罐口用 5 层纱布封口，放于避光处 25 ℃发酵，每天早中晚 3 次用玻璃棒均匀搅拌 2 min。等到发酵后期皮渣下降后，停止发酵，将皮渣分离，自然静置沉淀后得到发酵果酒。取样待测。

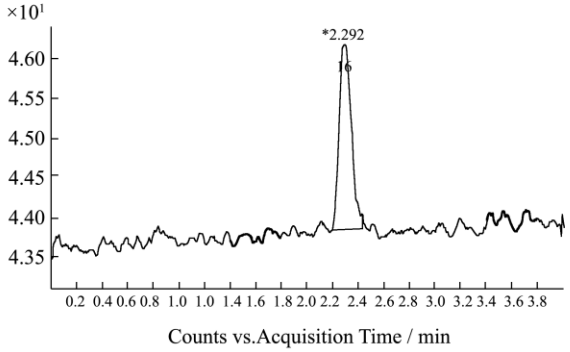
1.3.3 乙醇的测定方法

采用高效液相色谱法，参照 Moreira[9]等的方法并稍作修改。取样组每天定时从发酵瓶的取样口中用无菌注射器在超净台上取样 2 mL，立刻液氮冷冻，放入 -20 ℃冰箱保存，发酵结束后统一 4 ℃解冻，4000 r/min 离心 5 min，取上清液过 0.22 μm 有机相膜，上机检测。

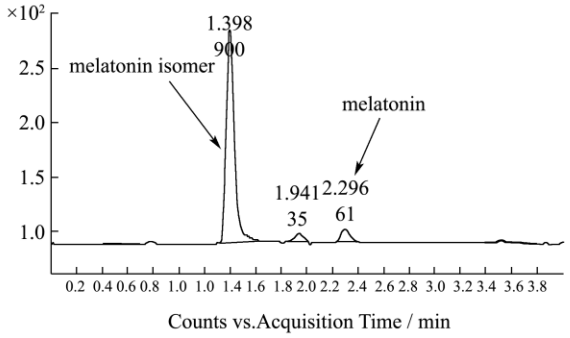
色谱条件：Bio-Rad HPX-87H 色谱柱（300 mm×7.8 mm），示差检测器（RID，waters-2414）。柱温 55 ℃，流速 0.5 mL/min，等度洗脱，进样量 10 μL，以峰面积外标法定量。流动相：0.005 mol/L H_2SO4；流动相经溶剂过滤器过滤，滤膜为 0.22 μm 水相膜（四氟乙烯膜）。以外标法定量。

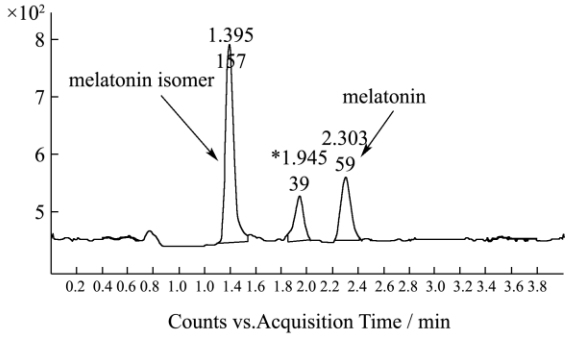
1.3.4 褪黑素及其同分异构体检测方法



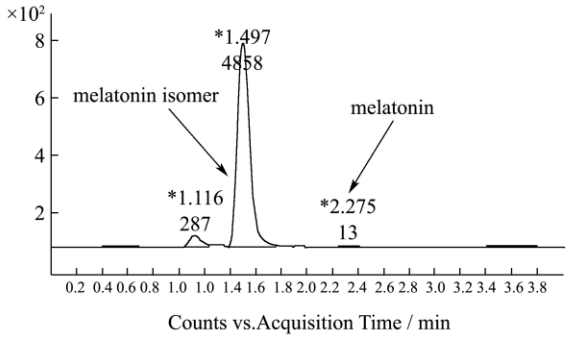


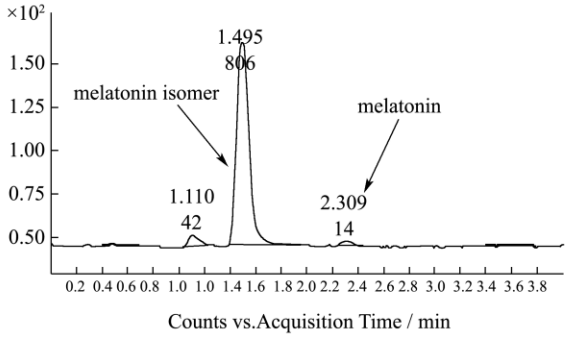
A





B





C

图 2 褪黑素及其同分异构体的 LC-MS/MS 检测图谱

Fig.2 LC-MS/MS chromatograms for melatonin and its isomer

注：A：1 ng/mL 褪黑素标准品，B：模拟葡萄汁,C：桑葚酒。上图表示 MRM (233→174 和 233→216)，下图表示 MRM (233→174)。

参考 Kocadaglı 等[10]的方法，并进行了修改和优化。最终得到优化的实验方法如下：取 1.3.3 中的上清液 1 mL 于 5 mL 的离心管中，加入 3 mL 50%的乙醇水溶液，涡旋混匀 30 s，取 1 mL 过 0.22 μm 有机相膜（四氟乙烯膜），进 LC-MS 检测。

LC-MS 检测条件：液相色谱为 Agilent1200 series HPLC system，质谱为 Agilent 6460 triple quadruple mass spectrometer (Waldbornn, Germany)。色谱柱为 VP-ODS 岛津 9022005（150×2.0 mm）商品号 228-34937-94。流动相为水:乙腈=65%:35% (*V*/*V*)，均含有 0.3%的甲酸。流速 0.3 mL/min，柱温 40 ℃，进样量 5 μL。

质谱条件：干燥气 N_2，流速 10 L/min，温度 375 ℃。喷射电压 1000 V，正向毛细管电压 4000 V，检测模式为多重反应监测（multiple reaction monitoring, MRM）模式，碎裂电压 70 V，以主要的碎片离子 m/z 174.2 为定性依据，以不同浓度的褪黑素外标法定量。选用 $MRM_{(233\to174)}$作为褪黑素的检测方式，选用 $MRM_{(233\to216,\ 233\to174)}$，既两种碎片离子总和作为褪黑素同分异构体的检测方式。

真实果汁和果酒的褪黑素及其同分异构体检测方法与模拟汁相同。褪黑素及其同分异构体质谱图见图 2。

1.3.5 数据处理

所有试验重复三次，数据统计分析利用 SPSS17.0 软件 ANOVA 和 Duncan 分析方法，0.05 显著水平。

2 结果与分析

2.1 模拟葡萄汁发酵过程中褪黑素及其同分异构体变化规律及其与酒精发酵的关系

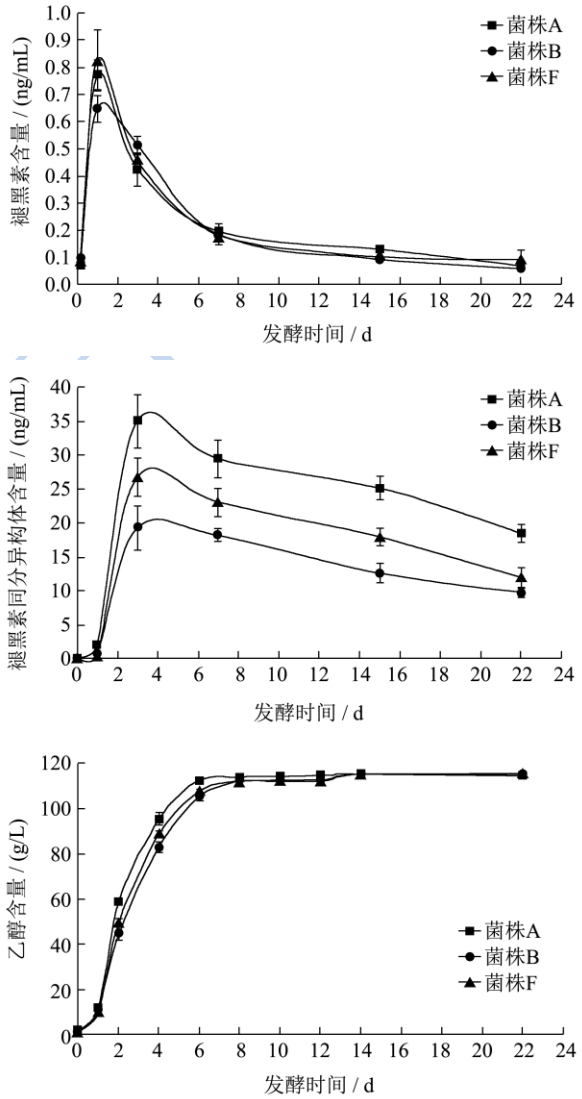


图 3 三株酿酒酵母在模拟葡萄汁培养基发酵过程中乙醇、褪黑素及其同分异构体含量的变化

Fig.3 Changes in the content of ethanol and of melatonin and its isomer during fermentation in MSM by three *Saccharomyces cerevisiae* strains

褪黑素及其同分异构体在葡萄酒及其他发酵食品中被发现，暗示了褪黑素及其同分异构体的产生与酵

母之间可能存在某种关联[11]，但目前尚未有研究证明。同时不同的文献研究之间也相互矛盾，有研究证明褪黑素就是酵母在酒精发酵过程中产生的[12]，但同时有人研究葡萄酒中的褪黑素主要来源于葡萄原料[13]。

从图 3 中可以看出，在模拟葡萄汁培养基中发酵开始前并不含有褪黑素及其同分异构体，但随着发酵的进行，褪黑素及其同分异构体开始出现，所以通过我们的实验证明了褪黑素及其同分异构体可以在发酵过程中产生。褪黑素的含量在发酵的第 1 d 达到了最大值，A、B、F 菌株含量分别为 0.773、0.647、0.825 ng/mL，最后都逐渐下降。褪黑素的同分异构体含量则在发酵的第 3 d 达到最大值，A、B、F 菌含量分别为 34.89、19.24、26.79 ng/mL，并逐渐缓慢下降。而且褪黑素同分异构体含量远远高于褪黑素的含量，不同菌株之间的褪黑素及同分异构体含量变化的趋势比较一致，褪黑素的含量三株菌无显著性差异，但同分异构体含量有显著差异（$p<0.05$），菌株 A 含量最高，菌株 F 次之，菌株 B 含量最低。这与三株菌的发酵能力相一致，从图 3 中乙醇含量变化可以发现，菌株 A 乙醇产生速度快于菌株 F，菌株 B 最慢。发酵能力强的菌株 A 产生的褪黑素同分异构体含量最多，同时发酵能力最弱的 B 菌株其产生的褪黑素同分异构体含量最少，这暗示在发酵的初期，褪黑素同分异构体含量越高，越可能有效的增强酵母适应发酵初期逆境胁迫的能力，从而加快发酵进程。同时在发酵前期，褪黑素及其同分异构体含量最高，暗示这两种物质可能与酵母的逆境胁迫应答密切相关，Rodriguez-Naranjo[14]等人也研究发现在酵母发酵的整个过程中，褪黑素存在先升后降的趋势，这个趋势与酵母的生长曲线有关联，推断褪黑素与酵母的生长代谢关系密切，可能是作为一种信号分子参与酵母的生长代谢。在发酵进程的后期，褪黑素作为一种抗氧化的活性物质，可能由于氧化、降解的等因素逐渐的下降，这与 Rodriguez-Naranjo[14]等人的研究结果类似。

褪黑素同分异构体与褪黑素有相同的官能团，且在酵母中大量产生，目前尚未有褪黑素同分异构体在动植物中存在的报道，而褪黑素作为一种自然界广泛存在的进化保守小分子物质，理应在酵母中出现。因此推断褪黑素同分异构体极有可能就是褪黑素在酵母中的存在形式，其生理作用与褪黑素在动物体内的作用类似，Zheng Eelderink-Chena[15]等人研究发现一些褪黑素结构类似物，参与了酵母的昼夜节律的调控，但具体的作用机制还有待于进一步深入研究。

酵母在发酵进程的初始阶段，要经受严酷的逆境胁迫条件（高渗透压、高糖、低 pH、高 SO_2 等）。此时酵母在发酵初期的适应期内要进行一系列的调控活动来使酵母适应这种环境，然后进入对数期快速增殖，在此期间褪黑素及其同分异构体产生并且含量升高，极有可能参与了酵母发酵初期的逆境调控，但目前尚未有相关的机制报道。褪黑素及其同分异构体对酵母发酵初期的代谢调控的作用机制有待于进一步深入详细研究，这也是以后研究的重点。

2.2 四种真实浆果发酵前后褪黑素及其同分异构体含量变化

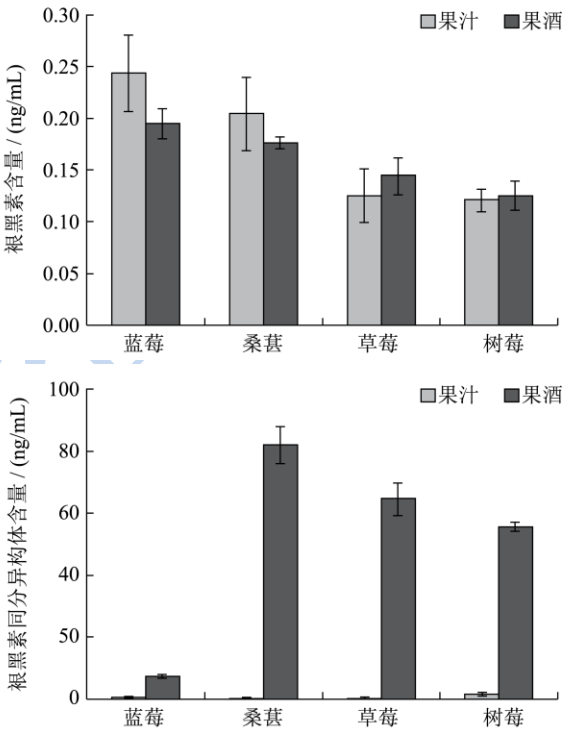


图 4 四种浆果汁发酵前后褪黑素及其同分异构体含量对比

Fig.4 Comparison of the content of melatonin and its isomer before and after fermentation of four different berries

通过前面的实验我们验证了褪黑素及其同分异构体在模拟葡萄汁培养基中的产生及变化规律，但在真实果汁中是否与模拟汁规律一致，尚不得而知，因此我们通过研究蓝莓、桑葚、草莓、树莓四种浆果在发酵前后的变化来验证我们的研究。从图 6 可以发现，在发酵前后的果汁和果酒中，四种浆果褪黑素含量差异不显著，其中蓝莓的褪黑素含量最高，但含量都在 0.3 ng/mL 以内。但发酵前后四种浆果的褪黑素同分异构体含量差异巨大，发酵后果酒褪黑素同分异构体含量显著高于发酵前的果汁，同时不同浆果酒之间褪黑素同分异构体的含量差异显著，桑葚的褪黑素同分含量最高达到 81.9 ng/mL，草莓 64.4 ng/mL，树莓 55.5

ng/mL，蓝莓 7.37 ng/mL，同时四种浆果同发酵前褪黑素同分异构体含量极低。实验结果可以说明，真实汁褪黑素同分异构体变化与模拟汁类似，都是在发酵过程中产生的。但不同的浆果含量差异巨大，且真实果酒中褪黑素同分异构体含量显著高于模拟汁中的含量，说明真实汁和模拟葡萄汁对褪黑素的产生也有很大的影响。相比于模拟汁，真实浆果中成分复杂，含有大量的多酚、黄酮、花青素等抗氧化物质，这些物质对浆果发酵进程都有影响，可能对褪黑素及其同分异构体的产生存在影响。

3 结论

褪黑素及其同分异构体是近些年来在食品中，特别是发酵食品中新发现的功能性营养物质，但是其产生机理和规律尚不清楚。本文通过研究证实了褪黑素及其同分异构体是在酿酒酵母发酵过程中产生的，含量在发酵的初期达到最大，后期逐渐下降，不同酵母品种之间褪黑素同分异构体有较大差异，商业菌株产量显著高于野生菌株，同时发酵过程中褪黑素同分异构体产量越高，发酵速度越快。褪黑素及其同分异构体含量变化可能与酿酒酵母在发酵初期的逆境代谢密切相关。最后通过四种真实的浆果发酵进行了验证，发现与模拟汁相比，真实浆果汁发酵后褪黑素同分异构体的含量显著增高，桑葚酒中褪黑素同分异构体含量最高。但褪黑素及其同分异构体参与酿酒酵母发酵初期逆境胁迫应答的机制还不清楚，同时真实果汁发酵后为何褪黑素同分异构体含量显著高于模拟汁？果汁中的多酚、黄酮、花青素等成分是否对褪黑素及其同分异构体的含量产生了影响？其影响机制是什么？这些都是后续的研究重点。

参考文献

[1] Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging [J]. Toxicology, 2010, 278: 55-67

[2] Paredes S D, Korkmaz A, Manchester L C, et al. Phytomelatonin: a review [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60: 57-69

[3] Janas K M, Posmyk M M. Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application [J]. Acta Physiol Plant, 2013, 35: 3285-3292

[4] Iriti M, Rossoni M, Faoro F. Melatonin content in grape: myth or panacea? [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86: 1432-1438

[5] Rodriguez-Naranjo M I, Gil-Izquierdo A, Troncoso A M, et al. Melatonin: a new bioactive compound in wine [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2011, 24: 603-608

[6] Tan D X, Hardeland R, Manchester H C, et al. Emergence of naturally occurring melatonin isomers and their proposed nomenclature [J]. Journal of Pineal Research, 2012, 53: 113-121

[7] Gomez F J, Raba J, Cerutti S, et al. Monitoring melatonin and its isomer in vitis vinifera cv. malbec by UHPLC-MS/MS from grape to bottle [J]. Journal of Pineal Research, 2012, 52: 349-355

[8] Marullo P, Bely M, Masneuf-Pomarede I, et al. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains [J]. FEMS Yeast Research, 2004, 4: 711-719

[9] Moreira N, Mendes F, Hogg T, et al. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 103: 285-294

[10] Kocadağlı T, Yılmaz C, Gokmen V. Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2014, 153: 151-156

[11] Mas A, Guillamon J M, Torija M J, et al. Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation [J]. BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 898045, 7 pages, http://dx.doi.org/10.1155/2014/898045

[12] Rodriguez-Naranjo M I, Gil-Izquierdo A, Troncoso A M, et al. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines [J]. Food Chemistry, 2011, 126: 1608-1613

[13] Vitalini S, Gardana C, Zanzotto A, et al. From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin content, total polyphenols and antiradical activity of red wines [J]. Journal of Pineal Research, 2011, 51: 278-285

[14] Rodriguez-Naranjo M I, Torija M J, Mas A, et al. Production of melatonin by Saccharomyces strains under growth and fermentation conditions [J]. Journal of Pineal Research, 2012, 53: 219-224

[15] Eelderink-Chen Z, Mazzotta G, Sturre M, et al. A circadian clock in *Saccharomyces* cerevisiae [J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America (PNAS), 2010, 107: 2043-2047