

研究报告

ILV2 基因缺失对啤酒酵母生长与双乙酰代谢的影响

石婷婷 李凭 肖冬光*

(工业发酵微生物教育部重点实验室 天津市工业微生物重点实验室 天津科技大学生物工程学院
天津 300457)

摘要:【目的】旨在应用分子生物学方法降低啤酒发酵液中双乙酰含量,改善啤酒感官质量。【方法】以酿酒酵母 S2 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为出发菌株,通过同源重组敲除四倍体啤酒酵母 α -乙酰乳酸合成酶部分基因(*ILV2*),构建缺失一个和两个 *ILV2* 等位基因的突变株 QI2-1 和 QI2-2,并进行啤酒发酵实验。【结果】*ILV2* 基因的缺失,会导致菌株初始生长速率的降低。其中 QI2-2 较为明显,12 h 时,突变株与出发菌株的生长速率达到一致。啤酒发酵结果表明,与出发菌株相比,突变株 QI2-1 双乙酰峰值与双乙酰最终含量分别降低 17.50% 和 17.83%,而 QI2-2 分别降低 51.67% 和 45.65%。其他啤酒指标如酒精度、发酵度、残糖和风味物质等略有变化,但都在优质啤酒指标范围内,符合啤酒发酵的质量要求。【结论】通过同源重组敲除部分 *ILV2* 基因和选育低产双乙酰菌株是降低啤酒双乙酰含量、提高啤酒质量的有效方法,具有一定的实际应用价值。

关键词: 啤酒酵母, *ILV2* 基因, 双乙酰, 啤酒发酵

Effect of disrupting *ILV2* gene on growth and diacetyl metabolism of brewer's yeast

SHI Ting-Ting LI Ping XIAO Dong-Guang*

(Key Laboratory of Industrial Fermenting Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: [Objective] The purpose is to reduce diacetyl content in beer fermentation liquor by molecular biology methods and improve sensory quality of beer. [Methods] Based on S2 (*Saccharomyces cerevisiae*, tetraploid), mutant strains, including single *ILV2* allele disruption (QI2-1) and two *ILV2* alleles disruption (QI2-2) were constructed by homologous recombination to destroy acetyl lactic acid synthase gene (*ILV2*), and beer fermentation experiment was carried on. [Results] It could reduce the initial growth rate of strains because of the disruption of *ILV2* gene, especially QI2-2, while the growth rate of mutant strains was same as the host strain after 12 h. Beer fermentation

Foundation item: National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2012AA022108); The Ministry of Education "Cheung Kong Scholars and Innovation Team Development Plan" (No. IRT1166)

*Corresponding author: Tel: 86-22-60601667; Fax: 86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

Received: September 10, 2015; Accepted: December 28, 2015; Published online (www.cnki.net): January 04, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2012AA022108); 教育部“长江学者和创新团队发展计划”(No. IRT1166)

*通讯作者: Tel: 86-22-60601667; Fax: 86-22-60602298; E-mail: xdg@tust.edu.cn

收稿日期: 2015-09-10; 接受日期: 2015-12-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-04

experiment showed that *ILV2* gene could reduce the production of diacetyl, and the diacetyl peak and diacetyl concentration decreased by 17.50% and 17.83% in QI2-1, 51.67% and 45.65% in QI2-2, respectively, compared with that in the host strain S2. Other indicators such as alcohol, beer fermentation degree, residual sugar and flavor changed slightly, but they were in the range of high quality beer suggested, and conformed to the requirements of the index of beer fermentation. **[Conclusion]** It is an effective method to reduce diacetyl content and improve the quality of beer by constructing low-diacetyl strains using homologous recombination with the disruption of Part of *ILV2* gene, and it has certain actual application value.

Keywords: Beer yeast, *ILV2* gene, Diacetyl, Beer fermentation

双乙酰, 又称 2,3-丁二酮, 是啤酒发酵过程中的重要副产物, 也是判断啤酒成熟的重要标志之一。啤酒中双乙酰的含量超过阈值就会产生令人不快的馊饭味, 严重破坏啤酒的风味, 并影响啤酒的感官质量^[1-2]。在啤酒生产中, 如何降低发酵液中双乙酰的含量, 提高啤酒的质量, 一直是啤酒生产企业关注的实际问题, 也是相关科研人员的重要研究课题。

啤酒中的双乙酰主要是由啤酒酵母细胞通过缬氨酸代谢途径产生的 α -乙酰乳酸(α -Acetolactate)分泌至细胞外, 再经过非酶促的氧化脱羧反应合成的^[3]。 α -乙酰乳酸由丙酮酸生成, 关键酶是乙酰乳酸合成酶, 该酶的编码基因是 *ILV2*, 去除或改变 *ILV2*, 可减少 α -乙酰乳酸的生成, 从而减少双乙酰的生成。张吉娜等^[4]用 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(*GSH1*)替换了啤酒酵母的 *ILV2* 基因, 发酵结果表明双乙酰产量降低了 25%, 发酵周期缩短了 3 d。嘉士伯实验室的研究人员^[5]通过限制性内切酶切除, 全部敲除了 *ILV2* 基因, 从而不能合成 α -乙酰乳酸, 也不会生成双乙酰, 但这同时也阻断了酵母合成缬氨酸和异亮氨酸的途径, 影响啤酒酵母的生长和啤酒发酵, 所以 *ILV2* 基因不能完全敲除。为了进一步研究 *ILV2* 的缺失对啤酒双乙酰和酵母生长的影响, 本研究应用分子生物学的方法分别敲除四倍体酿酒酵母一个和两个 *ILV2* 等位基因, 并进行啤酒发酵实验, 综合分析发酵液中双乙酰等风味物质的变化和菌株的生长情况, 并确定合适的啤酒酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

酿酒酵母菌株 S2 (*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母表达载体 pUG6 (包含 *KanMX* 基因表达盒)、pGAPza 质粒均由天津科技大学天津市工业微生物重点实验室保藏。

1.2 试剂和仪器

高保真性 DNA 扩增酶 Trans *Taq*TM HiFi, 北京全式金生物技术有限公司; DNA 提取试剂盒, 大连宝生物公司; 硫酸盐遗传霉素(G418), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 博来霉素(Zeocin), Invitrogen 公司; 鲑鱼精 DNA, 北京索莱宝科技有限公司。引物委托鼎国生物技术有限公司合成。

DYY-4C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; PCT-200 型 PCR 基因扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司; 全自动生长曲线分析仪, 芬兰 Bioscreen 公司; 7890A 气相色谱仪, 北京安捷伦科技有限公司。

1.3 主要培养基

YEPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10, 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, pH 6.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

YEPD (G418)培养基: YEPD 固体培养基融化后, 降温至 60 °C 左右时加入一定量的 G418 储存液, 使得 G418 的最终浓度为 600 mg/L。

YEPD (Zeocin)培养基: YEPD 固体培养基融化后, 降温至 60 °C 左右时加入一定体积的 Zeocin 储存液, 使得 Zeocin 的最终浓度为 500 mg/L。

YPG 半乳糖诱导培养基(g/L): 半乳糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

麦芽汁培养基: 称量一定量粉碎的麦芽, 按 1:4 的料水比于 65 °C 进行糖化, 调整外观糖度至 12 ° Brix, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

固体培养基需加 20 g/L 琼脂。

1.4 实验方法

1.4.1 引物设计: 根据 NCBI 公布的 *S. cerevisiae* S288c 的 *ILV2* 基因序列和 pUG6 质粒序列, 设计长引物敲除一个和两个 *ILV2* 等位基因, 具体引物设计见表 1。

1.4.2 PCR 扩增反应: 20 μL 体系: 10×Trans *Taq*TM HiFi Buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μL, 10 μmol/L 上游引物 1 μL, 10 μmol/L 下游引物 1 μL, DNA 模板 1 μL, Trans *Taq*TM HiFi 0.5 μL, ddH₂O 13 μL。

1.4.3 一个和两个 *ILV2* 等位基因敲除盒的构建: 以 QI2-1-UP/QI2-1-DOWN 和 QI2-2-UP/QI2-2-DOWN 两对长引物为引物, 以质粒 pUG6 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 110 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.4.4 化转与转化子的鉴定: 酵母转化采用醋酸锂转化法^[6]。转化后的细胞涂布于含有 600 mg/L G418 的 YEPD 平板上, 30 °C 培养 48 h, 提取酵母转化子的基因组为模板, 以 K-UP 和 K-DOWN、I1K1-UP

和 I1K1-DOWN 及 I2K2-UP/I2K2-DOWN 分别为引物进行 PCR 验证。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 108 s, 28 循环; 72 °C 10 min。

1.4.5 筛选标记 *KanMX* 的剔除: 将 pGAPza 质粒转化于酵母菌株中, 转化后的细胞涂布于含有 500 mg/L zeocin 的 YEPD 平板上, 30 °C 培养 48 h, 挑取单菌落于半乳糖培养基中诱导 4–6 h, 稀释涂布, 挑出单菌落于 YEPD 平板上, 再影印到 G418 抗性平板上。挑出在 YEPD 平板上生长而在 G418 抗性平板上不生长的菌株, 30 °C、180 r/min 培养 24 h。以此菌株基因组为模板, K-UP 和 K-DOWN 为引物进行 PCR 验证。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 108 s, 28 个循环; 72 °C 10 min。

1.4.6 转化子生长曲线的绘制: 挑取一环酵母菌接种于 5 mL 麦芽汁培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 16 h; 取酵母细胞液 20 μL, 培养基 380 μL, 混合于孔板中, 使用全自动生长曲线分析仪 (Type 11001-F09) 测定生长曲线。以菌株的 OD₆₀₀ 值为纵坐标, 时间为横坐标绘图。

1.4.7 双乙酰的测定: 应用邻苯二胺比色法测定双

表 1 本实验所用引物
Table 1 Primers used in this paper

引物 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	长度 Sizes (bp)
QI2-1-UP	TAGAAAGTATTTTACAAAATCTAAACCCTTTGAGCTAAGAGGAGATAAATA CAACAGAATCAATTTTCAACAGCTGAAGCTTCGTACGC	89
QI2-1-DOWN	ACGATTAATAATAATAAAGTCTGCATTTTTACTGAAAATGCTTTTGAAAT AAATGTTTTGAAAT GCATAGGCCA CTAGTGGATC TG	89
QI2-2-UP	GCCTCTAAAAGGCCAGAGCCTGCTCCAAGTTTCAATGTTGATCCATTAGA ACAGCCCGCTGAACCTTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	89
QI2-2-DOWN	TGGGCCCTTGGTAGAAACGAATCTTTCAACTTAGCGTCCAATTCCTCTTG CTTCTTACTCTTAAA CAGCTGAAGCTTCGTACGC	86
I1K1-UP	CAGAACTTTGCCACTAATACC	21
I1K1-DOWN	TCAAGACTGTCAAGGAGGG	19
I2K2-UP	TGTAAACAGAACTTTGCCACTA	22
I2K2-DOWN	GATACCTTGACGGAGCCAC	19
K-UP	CAGCTGAAGCTTCGTACGC	19
K-DOWAN	GCATAGGCCACTAGTGGATCTG	22

乙酰的含量^[7]。用双乙酰蒸馏器蒸馏啤酒发酵液,分别吸取馏出液 10 mL 于两支比色管中。一支管作为样品管加入 0.5 mL 邻苯二胺溶液,另一支管作为空白对照不加邻苯二胺溶液,充分摇匀后,同时置于暗处放置 20–30 min,然后于样品管中加 4 mol/L 盐酸溶液 2 mL,于空白管中加 4 mol/L 盐酸溶液 2.5 mL,混匀。在 335 nm 波长处,用 1 cm 比色皿测定样品吸光度。

双乙酰(mg/L) = $A_{335} \times 2.4$, 2.4 为吸光度与双乙酰含量的换算系数。

1.4.8 残糖、酒精度及发酵度的测定:残糖应用斐林试剂法测定^[8];酒精度和发酵度的测定依据啤酒分析方法采用密度瓶法测定^[7]。

1.4.9 风味物质的测定:啤酒发酵液经蒸馏后采用气相色谱法测定。内标物为乙酸正戊酯。气相色谱仪为 Agilent 7890C;色谱柱 19091N-213: 30 m × 320 μm × 0.5 μm,配 FID 检测器。载气为高纯氮,流速 2.5 mL/min。初始柱温 50 °C,保持 2 min,以 5 °C/min 的升温速度升至 80 °C,保持 2 min,最后以 10 °C/min 的升温速度升至 100 °C。检测器温度为 250 °C,进样口温度为 230 °C,进样量 0.4 μL。分流比 20:1。

1.5 啤酒发酵实验

一级种子培养:取斜面菌种一环,接种于装有 5 mL 12 °Brix 麦汁培养基的试管中,28 °C、180 r/min 培养 24 h。

二级种子培养:一级种子液按 10% 的接种量接入盛有 50 mL 12 °Brix 麦汁的 150 mL 三角瓶内,16 °C 静置培养 72 h。

啤酒发酵:二级种子液 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min,洗涤 2 次,获得鲜酵母,鲜酵母按 0.5% 的接种量接入盛有 250 mL 12 °Brix 麦汁的 380 mL 矿泉水瓶内,10 °C 静置发酵 15 d。

2 结果与分析

2.1 *ILV2* 敲除突变株的构建

2.1.1 一个 *ILV2* 等位基因的敲除:按照 1.4.3 和

1.4.4 的方法,获得缺失一个 *ILV2* 等位基因的突变株,命名为 QI2-1,PCR 验证结果见图 1。以 K-UP 和 K-DOWN 为引物,能够扩增得到 1 600 bp 的片段,与理论上 *KanMX* 基因大小一致,说明 *KanMX* 基因已经整合到出发菌株染色体上;再以 I1K1-UP 和 I1K1-DOWN 为引物,能够扩增得到 711 bp 的片段,而以阴性对照 S2 基因组为模板,没有扩增出相应的片段,说明转化子发生了正确的同源重组,*KanMX* 基因已经在酵母 *ILV2* 位点发生了正确的整合。

2.1.2 筛选标记 *KanMX* 的剔除:按照 1.4.5 的方法,剔除突变株 QI2-1 的 *KanMX* 基因(图 2)。选取在不含 G418 的平板上生长而在含 G418 的平板上不生

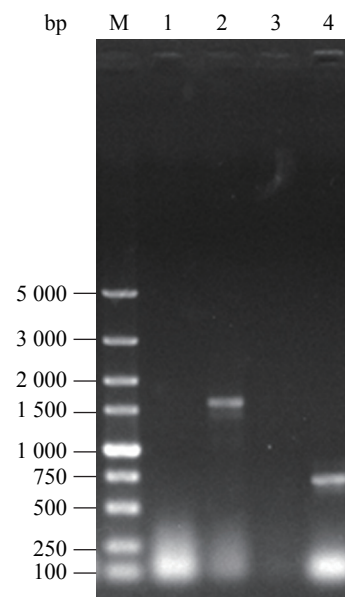


图 1 一个 *ILV2* 等位基因缺失突变株 PCR 验证

Figure 1 PCR analysis of mutant strain with one *ILV2* allele disruption

注: 1、2: 以 K-UP 和 K-DOWN 为引物进行验证; 3、4: 以 I1K1-UP 和 I1K1-DOWN 为引物进行验证; 1、3: 模板为出发菌株 S2 的基因组; 2、4: 模板为缺失一个 *ILV2* 等位基因的突变株 QI2-1 的基因组。

Note: 1, 2: PCR verification with primers K-UP and K-DOWN; 3, 4: PCR verification with primers I1K1-UP and I1K1-DOWN; 1, 3: The PCR template is the genome of the host strain S2; 2, 4: The PCR template is the genome of mutant strain with one *ILV2* allele disruption.

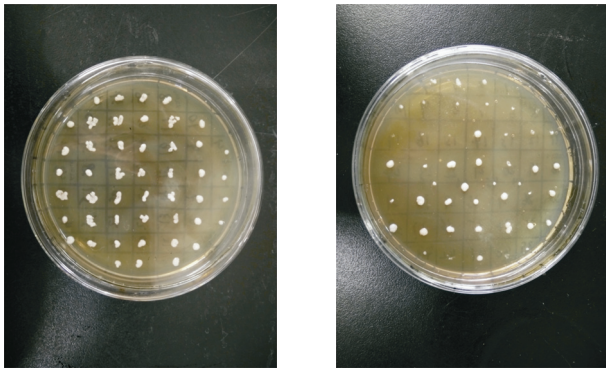


图2 QI2-1的 *KanMX* 抗性基因剔除前后生长情况
Figure 2 Growth status of QI2-1 and QI2-1 (*KanMX* excised)

注: A: QI2-1 点接种于 YEPD 平板; B: *KanMX* 抗性基因剔除后菌株点接种于含有 G418 的 YEPD 平板.

Note: A: QI2-1 grows on YEPD; B: QI2-1 (*KanMX* excised) grows on YEPD with G418.

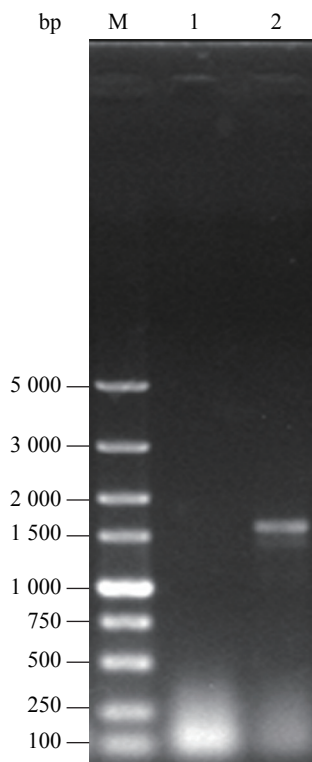


图3 QI2-1 剔除 *KanMX* 基因 PCR 验证

Figure 3 PCR analysis of the *KanMX* excision of QI2-1

注: 1: 模板为 QI2-1 剔除 *KanMX* 抗性基因后的基因组; 2: 模板为 QI2-1 的基因组.

Note: 1: The PCR template is the genome of QI2-1 (*KanMX* excised); 2: The PCR templates is the genome of QI2-1.

长的单菌落基因组为模板, 以 K-UP 和 K-DOWN 为引物进行 PCR 验证, 不能扩增出 1 600 bp 的 *KanMX* 片段, 而以阳性对照 QI2-1 基因组为模板能扩增出 1 600 bp 的 *KanMX* 片段(图 3)。说明重组菌株染色体上的 *KanMX* 抗性基因已经被剔除了。

2.1.3 两个 *ILV2* 等位基因的敲除: 按照 1.4.3 和 1.4.4 的方法, 获得缺失两个 *ILV2* 等位基因的突变株, 命名为 QI2-2, PCR 验证结果见图 4。以 K-UP/K-DOWN 和 I2K2-UP/I2K2-DOWN 为引物, 能够扩增得到 1 600 bp 和 744 bp 的片段, 而以阴性对照 S2 基因组为模板没有扩增出相应的片段, 说明转化子发生了正确的同源重组, *KanMX* 基因已经在酵母 *ILV2* 第 2 个等位基因位点发生了正确的整合。

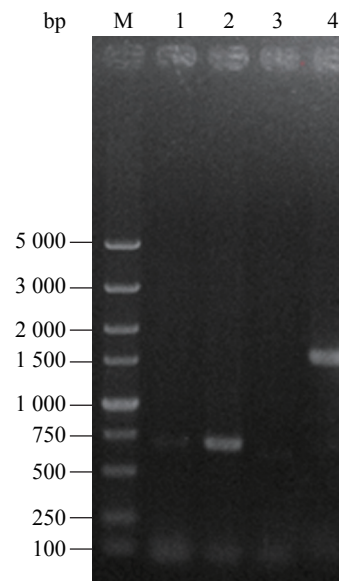


图4 两个 *ILV2* 等位基因缺失突变株 PCR 验证

Figure 4 PCR analysis of the mutant strain with two *ILV2* allele disruptions

注: 1、2: 以 K-UP 和 K-DOWN 为引物进行验证; 3、4: 以 I2K2-UP 和 I2K2-DOWN 为引物进行验证; 1、3: 模板为出发菌株 S2 的基因组; 2、4: 模板为缺失两个 *ILV2* 等位基因的突变株 QI2-2 的基因组.

Note: 1, 2: PCR verification with primers K-UP and K-DOWN; 3, 4: PCR verification with primers I2K2-UP and I2K2-DOWN; 1, 3: The PCR template is genome of the host strain S2; 2, 4: The PCR template is the genome of mutant strain with two *ILV2* allele disruption.

2.2 生长速率的测定

按照 1.4.6 的方法, 分别测定菌株 QI2-1、QI2-2 和 S2 在麦芽汁培养基中的生长速率, 并绘制菌株的生长曲线(图 5)。结果表明, 突变株 QI2-1 和 QI2-2 对酵母的生长有一定的影响, 突变株比出发菌株 S2 的初始生长速率慢, 但是 12 h 后, 突变株的生长速率与出发菌株达到一致。这可能是由于啤酒酵母 S2 是四倍体, *ILV2* 部分敲除可能只是使 *ILV2* 的表达量减少了, 并没有完全不表达。此外, 麦芽汁本身含有一定量的缬氨酸, 缬氨酸的含量占总氨基氮的 15%–20%^[9], 不会影响后期啤酒发酵。

2.3 双乙酰含量的测定

在啤酒发酵过程中测定菌株 QI2-1、QI2-2 和 S2 的双乙酰的峰值, 发酵结束时, 测定了各菌株的双乙酰含量(图 6)。结果表明 QI2-1 和 QI2-2 对啤酒发酵中降低双乙酰水平有显著效果, QI2-1 和 QI2-2 的双乙酰峰值分别为 0.95 mg/L 和 0.58 mg/L, 较出发菌株 S2 分别降低了 17.5% 和 51.67%; 发酵结束时, QI2-1 和 QI2-2 的双乙酰最终含量分别为 0.45 mg/L 和 0.30 mg/L, 较出发菌株 S2 分别降低了 17.83% 和 45.65%。

2.4 啤酒发酵结束后残糖、酒精度及发酵度的测定

发酵结束时, 测定了菌株 QI2-1、QI2-2 和 S2

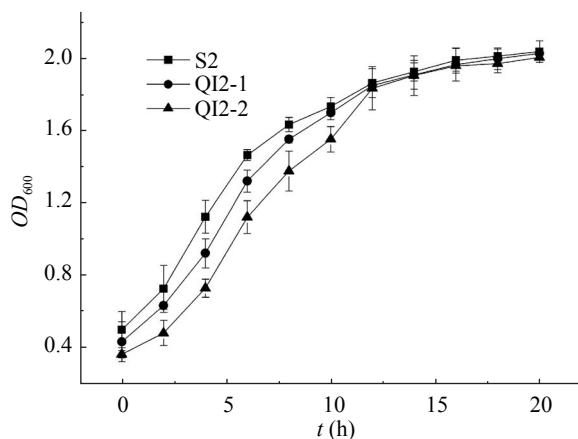


图 5 不同菌株的生长速率
Figure 5 Growth rates of different strains

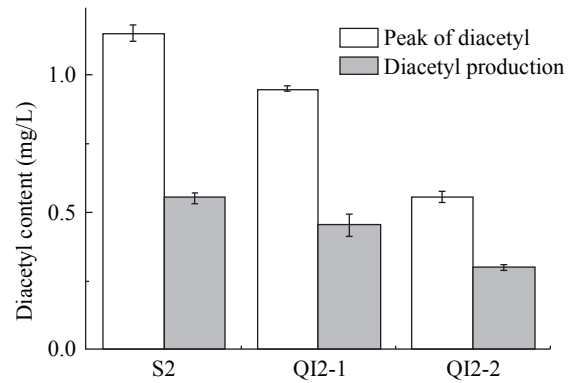


图 6 不同菌株的双乙酰含量
Figure 6 Diacetyl content of different strains

的酒精度、真正发酵度和残糖, 结果见表 2。

由表 2 看出, 在发酵结束后突变株相比于出发菌株, 残糖略高, QI2-2 的酒精度略低于 S2。在发酵结束后突变株与出发菌株在酒精度、残糖和真正发酵度等指标上没有明显差异, 并且各项指标均符合国家规定的标准, 说明突变株 QI2-1 和 QI2-2 并没有明显影响这些啤酒基础指标, 符合啤酒发酵的质量要求。

2.5 啤酒发酵结束后挥发性风味物质的测定

发酵结束时, 测定了菌株 QI2-1、QI2-2 和 S2 代谢产生的挥发性风味物质, 结果见表 3。

结果表明, 突变株 QI2-1 与出发菌株 S2 相比, 其发酵液中含有的某些主要高级醇和酯类物质的含量略有降低, 而 QI2-2 发酵液中的乙酸乙酯略有提高, 异丁醇降低。这可能是缬氨酸代谢途径中某些物质代谢流发生变化导致一些醇类物和酯类物质代谢能力的变化, 但各物质的浓度都在优质啤酒

表 2 不同菌株的酒精度、真正发酵度和残糖
Table 2 Alcohol, fermentation degree and residual sugar of different strains

菌株 Strains	酒精度 Alcohol (%vol)	真正发酵度 Fermentation degree (%)	残糖 Residual sugar (g/L)
S2	5.60±0.20	77.51±2.60	6.40±0.10
QI2-1	5.80±0.20	77.12±2.20	6.70±0.10
QI2-2	5.48±0.20	76.02±2.80	6.70±0.20

表3 不同菌株的挥发性风味物质
Table 3 The flavor component profiles of different strains

挥发性物质种类 Types of volatile substances	S2 (mg/L)	QI2-1 (mg/L)	QI2-2 (mg/L)
苯乙醇 Phenylethyl alcohol	14.40±0.14	11.01±0.24 ^a	13.38±0.19
乙酸乙酯 Ethyl acetate	12.04±0.20	12.08±0.21	14.78±0.42 ^a
正丙醇 Are propanol	14.18±0.20	12.70±0.30 ^a	14.42±0.12
异丁醇 Isobutyl alcohol	12.81±0.22	10.89±0.30 ^a	11.34±0.12
乳酸乙酯 Ethyl lactate	19.30±0.15	17.53±0.24 ^a	19.65±0.20
异戊醇 Isoamyl alcohol	54.04±2.26	50.52±3.12 ^a	54.11±2.16

注：^a：重组菌株与出发菌株代谢产风味物质的含量具有明显的差异(Student's t test $P \leq 0.05$)。

Note：^a：Values of the recombinant yeast strains are significantly (Student's t test $P \leq 0.05$) different from those of the host strain.

建议的范围之内。

3 讨论

本文通过同源重组构建缺失一个 *ILV2* 等位基因和两个 *ILV2* 等位基因的突变株 QI2-1 和 QI2-2，不仅降低了啤酒双乙酰含量，而且对啤酒其他指标基本没有影响。嘉士伯实验室^[5]完全去除 *ILV2* 基因阻断合成缬氨酸和异亮氨酸的途径，对酵母的生长和后期的啤酒发酵造成不利影响，导致发酵性能有所下降，需在发酵液中添加某些氨基酸来满足啤酒发酵的要求，这样就会增加啤酒生产的成本。与之相比，本文 *ILV2* 基因的部分敲除并没有阻断酵母本身合成缬氨酸和异亮氨酸的途径，不会对酵母生长和啤酒发酵造成不利影响，并且显著降低了双乙酰的含量，具有一定的实际应用价值。

参考文献

- [1] Saison D, De Schutter DP, Uyttenhove B, et al. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds[J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1206-1215
- [2] Meilgaard MC. Flavor chemistry of beer: part II: flavour and threshold of 239 aroma volatiles[J]. Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly, 1975, 12(3): 151-168
- [3] Sun ML. In beer diacetyl ingredient formation and control[J]. Liquor Making, 2007, 34(4): 67-69 (in Chinese)
孙美玲. 啤酒中双乙酰成分的形成与控制[J]. 酿酒, 2007, 34(4): 67-69
- [4] Zhang JN, He XP, Guo XN, et al. Genetically modified industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(6): 942-946 (in Chinese)
张吉娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 942-946
- [5] Li Y, Tie CJ, Wang ZX, et al. Construction of diacetyl-low brewer's yeast[J]. Liquor Making, 2002, 29(6): 77-79 (in Chinese)
李艳, 铁翠娟, 王正祥, 等. 低双乙酰啤酒酵母工程菌的构建[J]. 酿酒, 2002, 29(6): 77-79
- [6] Daniel Gietz R, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method[J]. Methods in Enzymology, 2002, 350: 87-96
- [7] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (AQSIQ), Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 4982-2008, Method for analysis of beer[S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2008: 5-14 (in Chinese)
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4982-2008, 啤酒分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 5-14
- [8] Cai DY. Liquor-Making Industry Analysis Manual[M]. Beijing: Light Industry Press, 1988 (in Chinese)
蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1988
- [9] Shi HY, Kou CR. Controt of valine and process of ZHI-MAI[J]. Liquor Making, 2001, 28(4): 86-87 (in Chinese)
石海英, 寇春荣. 缬氨酸与制麦工艺控制[J]. 酿酒, 2001, 28(4): 86-87