

## 李崎



教授, 博士长期从事酿酒科学与工程、酿酒微生物、酶工程和传统发酵食品酿造的研究, 主要承担《现代酿酒科学与技术》、《酒类风味化学与感官评价》、《酿酒工艺学》和《酒类风味化学与感官评定》课程的讲授工作。近年来共发表高水平研究论文 30 篇, 累计影响因子达 65, 他引 150 余次, 出版译著 3 部; 申请发明专利 60 项, 授权发明专利 30 项; 主持包括国家自然科学基金、国家科技支撑计划在内的省部级科研项目 5 项; 获得河南省科技进步三等奖一项 (2004, 排名第二), 美国 ASBC 杂志编委。指导学生获得江苏省优秀专业硕士学位论文论文。2002 年度江南大学“三育人”先进个人、2005 年无锡市九三学社先进个人、2010 年教育部新世纪人才、2010 年江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人、2009–2011 年度无锡市优秀教育工作者、2012 年获“奠基未来, 感动无锡”教育年度人物称号、2015–2016 年度江南大学“巾帼标兵”称号, 中国酿酒工业协会啤酒分会专业技术委员会委员、全国专业标准化技术委员会啤酒分会委员、第六届啤酒国家特邀评委、南京工业大学兼职教授、无锡市第 13 届政协委员、第 14 届政协常委、九三学社无锡市委副主委、九三学社江南大学委员会主委。

## 低乙醛 Lager 型啤酒酵母研究进展

刘春风<sup>1,2</sup> 赵云<sup>1,2</sup> 李崎<sup>1,2\*</sup> 王金晶<sup>1,2</sup> 钮成拓<sup>1,2</sup> 王林祥<sup>3</sup>

① 江南大学教育部工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122

② 江南大学生物工程学院酿酒科学与工程研究室 江苏 无锡 214122

③ 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122

**摘 要:** 啤酒酵母是啤酒酿造的核心, 对啤酒风味及风味稳定性具有重要影响。乙醛是影响啤酒风味和风味稳定性最重要的醛类化合物, 是酒精饮料中引起人类致癌的物质之一, 主要通过啤酒酵母的生物代谢产生, 存在于啤酒发酵过程及成品啤酒中。因此, 筛选或选育优良的低产乙醛啤酒酵母菌株将成为有效解决啤酒风味稳定性的途径之一。近年来, 随着基因工程技术的发展及啤酒酵母基因组的不断阐明, 人们对啤酒酵母菌种改良展开了大量的研究, 以期解决啤酒酿造问题, 改善啤酒质量。本文对采用传统方式及基因工程手段选育低产乙醛啤酒酵母的最新研究进展进行了综述。其中, 对低乙醛啤酒酵母选育的手段及策略进行了讨论并对低乙醛啤酒酵母选育的研究热点及发展趋势进行了展望。

**关键词:** 啤酒, 乙醛, 啤酒酵母, 菌种改良, 风味稳定性

基金项目: 国家自然科学基金 (31601558, 31571942 & 31771963); 江苏省现代工业发酵协同创新中心

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31601558, 31571942 & 31771963), Collaborative Innovation Center of Jiangsu Modern Industrial Fermentation in Jiangnan University.

\* Corresponding author. E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn, Tel/Fax: 86-510-85918176

Received: 2018-03-30, accepted: 2018-07-17

## Research advances in lager brewer's yeast with low acetaldehyde production

LIU Chun-Feng<sup>1,2</sup> ZHAO Yun<sup>1,2</sup> LI Qi<sup>1,2</sup> WANG Jin-Jing<sup>1,2</sup> NIU Cheng-Tuo<sup>1,2</sup> WANG Lin-Xiang<sup>3</sup>

①The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

②Lab of Brewing Science and Engineering of Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

③State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** Brewer's yeast has great influence on beer flavor and flavor stability. Acetaldehyde is the most important aldehyde compound affecting beer flavor and flavor stability, and is one of carcinogens in alcoholic beverages. Acetaldehyde is mainly generated during the biological metabolism of brewer's yeast and exists in brewing process and finished beers. Therefore, screening or breeding brewer's yeast with low acetaldehyde productivity will be one of the effective ways to solve beer flavor stability. In recent years, with the development of genetic engineering technology and the continuous elucidation of brewer's yeast genome, a lot of researches have been carried out on the improvement of brewer's yeast to solve the problem of brewing and improve beer quality. In this paper, the recent research progresses in the selection of brewer's yeast with low-yield acetaldehyde by traditional and genetic engineering methods are reviewed, and among them, the methods and strategies used to decrease the acetaldehyde production from brewer's yeast are discussed. The research hot spot and development trend of brewer's yeast strains with lower acetaldehyde productivity are also predicted.

**Key words:** beer, acetaldehyde, brewer's yeast, strain improvement, flavor stability

乙醛 ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) 是一种高挥发性、低分子量的有机醛类。在 1 个大气压下, 乙醛的沸点是  $21^\circ\text{C}$ , 易于与水混合, 在水溶液中以 50% 乙醛和 50% 水合物的形式存在, 且存在可逆平衡 (Seeman *et al.* 2002)。乙醛是一种反应活性很高的化合物, 它可以与大量亲核物质发生反应, 且会同其他醛类、酮类和酯类化合物发生缩合反应。国际癌症研究机构 (IARC) 指出 (Brooks & Zakhari 2014): 乙醛是酒精饮料中引起人类致癌的物质之一, 这使得研究者们更加关注作为乙醇的初级氧化代谢产物乙醛的生物学效应 (Sheridan & Elias 2015)。

风味稳定性是啤酒最重要的质量指标之一 (Bamforth 2009), 自上世纪以来一直是啤酒行业的研究热点。消费者主要通过饮用啤酒时的风味差异或变化来识别啤酒的好坏或特定品牌的啤酒, 啤酒中的乙醛是影响啤酒风味的重要因素。乙醛是啤酒酵母酒精发酵过程中产生的一种重要的感官羰基化合物, 适量的乙醛会赋予啤酒特殊的品质特征, 而当乙醛含量过高时, 会使啤酒产生不愉快的

青草、烂苹果等味道 (Burroughs & Sparks 1973; Zoecklein 1995)。随着贮藏时间的延长, 啤酒会产生“老化风味”, 而造成这种不良风味的主要原因就是啤酒中的醛类物质。影响成品啤酒中乙醛含量高低的因素包括原辅料、酿造工艺、啤酒酵母、储存及物流条件等 (Petkova & Jonkova 2010)。乙醛含量已经成为国内啤酒风味改良的瓶颈, 一直难有突破。在过去的工业实践中, 酿造科学家注意到将酚类化合物、抗坏血酸钠、还原酮、谷胱甘肽及亚硫酸盐等抗氧化物质添加到啤酒中可以降低啤酒中乙醛的含量 (Matsufuji *et al.* 2013), 抑制啤酒的氧化损害, 间接修饰过量乙醛造成的啤酒生青味, 从而改善啤酒的风味稳定性。但是随着人们食品安全意识的日益提高, 啤酒工厂对外来添加物的管控越来越谨慎和严格, 这些外来添加物的使用越来越少, 甚至完全不使用。

啤酒酵母从根本上决定了啤酒产品中风味物质乙醛的合成和积累。传统上, 根据啤酒酵母絮凝性能的差异, 酿造者将其区分为 Ale 型啤酒酵母

(上面发酵啤酒酵母)和 Lager 型啤酒酵母(下面发酵啤酒酵母),由于 Lager 啤酒占啤酒市场的绝大部分(90%以上),有关啤酒酵母的报道也很大程度上集中在 Lager 型啤酒酵母的研究(Saerens *et al.* 2010)。Lager 型啤酒酵母发酵温度低于 Ale 型酵母,通常在 8–15℃之间,且易于沉积在发酵罐底部,Lager 型啤酒较 Ale 型啤酒口味更加清爽,更适合中国消费者的饮酒习惯。

近年来酿造科学家针对啤酒及啤酒原料中的内源性抗氧化物质(Woffenden *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2013)、生产工艺参数(Leitao *et al.* 2011)及乙醛等醛类化合物(da Costa *et al.* 2004; Wang *et al.* 2013)对啤酒风味稳定性的影响进行了大量研究,但这并不能从根本上解决啤酒风味问题。而啤酒酵母自身会代谢产生很多抗氧化物质以及乙醛等老化物质,这些物质协同作用对啤酒风味稳定性具有重要影响,也成为啤酒在储存过程中进一步发生风味劣变的化学基础。此外,由于活的啤酒酵母具有很好的还原活性,其本身可以还原发酵液中的乙醛。因此,筛选或选育优良的低产乙醛啤酒酵母菌株将成为有效解决啤酒风味稳定性和啤酒食品安全问题的途径之一。本文将对低乙醛啤酒酵母的最新研究展开综述。

## 1 低乙醛啤酒酵母的考察及选育手段

目前,为了选育低乙醛啤酒酵母菌株,要求优选的啤酒酵母菌株发酵生产的啤酒/或其在储存过程中乙醛含量较低(低于啤酒中乙醛的风味阈值),同时酵母的生长性能和其他发酵性能指标不发生显著变化。此外,Bamforth(1999)也从实用性角度指出,啤酒酵母除了可以代谢产生乙醛等羰基化合物外,自身还具有一定的还原羰基化合物的能力,进而影响啤酒的风味稳定性。因此,研究者在控制啤酒中乙醛含量的同时,往往也会一并关注啤酒中其他风味物质的代谢及啤酒风味稳定性指标。在发酵过程中,提高啤酒酵母抵抗一系列环境应力(如高浓度乙醛)对生长代谢的影响,增强酵母菌株自身的还原能力,也可以有效降低啤酒酵母菌株

的乙醛产量,避免啤酒风味老化的潜在风险,延长啤酒的风味保鲜期。因此,选育在高浓度乙醛条件下具有较好环境耐受性能的啤酒酵母也将成为选育低乙醛酵母菌株的重要目标之一。

### 1.1 以酶活性的变化为考察指标

从酵母乙醛的代谢途径看(图1),乙醛的代谢主要受丙酮酸脱羧酶 PDC(pyruvate decarboxylase)、乙醇脱氢酶 ADH(alcohol dehydrogenase)、乙醛脱氢酶 ALDH(acetaldehyde dehydrogenase)、乙酰辅酶 A 合成酶 ACS(acetoacetyl coenzyme A synthetase)的影响。要降低乙醛的含量,单纯的从代谢途径上看,加强或者削弱一些关键性的酶,就可以达到目的。

丙酮酸脱羧酶催化依赖于硫胺素 PPI 和  $Mg^{2+}$  的丙酮酸脱羧反应(Remize *et al.* 2000),生成乙醛和  $CO_2$ ,该酶存在多个同工酶,分别由 PDC1、PDC5(Seebboth *et al.* 1990)和 *pdh6*(Hohmann 1991)3 个结构基因编码。Remize *et al.* (2000)敲除了 Lager 型酵母中的丙酮酸脱羧酶基因,突变菌株细胞中丙酮酸脱羧酶活力较出发菌株下降了 4 倍,成功降低了近 30%的乙醛含量。然而,突变菌株生长过程的  $CO_2$  生成率降低,最终导致发酵时间的延长。

乙醛脱氢酶是细胞质丙酮酸脱氢酶 PDH(pyruvate dehydrogenase)通路的第二个功能酶,位于酵母细胞的线粒体中,可以氧化乙醛生成乙

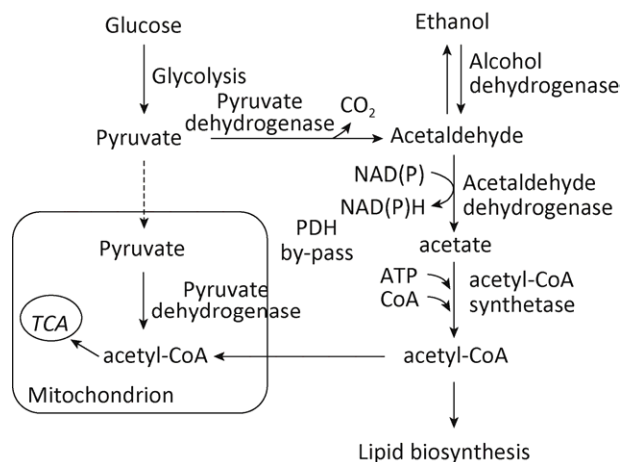


图 1 PDH 代谢通路中涉及到的酶系 (Remize *et al.* 2000)

Fig. 1 Enzymes involved in the PDH bypass (Remize *et al.* 2000).

酸。该酶存在多个同工酶,分别由以下 5 个结构和功能基因编码: *ALD2*(YMR170c)、*ALD3*(YMR169c)、*ALD4*(YOR374w)、*ALD5*(YER073w)和 *ALD6*(YPL061w)。其中,*ALD2*和 *ALD3*以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸  $\text{NAD}^+$  (nicotinamide adenine dinucleotide) 作为辅因子的压力诱导型乙醛脱氢酶,受葡萄糖抑制 (Navarro-Aviño *et al.* 1999); *ALD6* 是乙醛脱氢酶家族中主要的依赖  $\text{Mg}^{2+}$  激活的同工酶,优先利用  $\text{NAD}^+$ ,在碳源乙醇和葡萄糖的利用上具有重要作用; *ALD5* 编码线粒体中的乙醛脱氢酶,在调节或合成电子转运链组件中发挥一定作用; *ALD4* 编码  $\text{K}^+$  激活的乙醛脱氢酶。Meaden *et al.* (1997) 敲除了 Lager 型酵母中的 *ALD6* 基因,与野生型菌株 V5 相比,突变株中的乙醛脱氢酶酶活降低了 30%,发酵性能无显著变化,然而乙醛产量增加了 32%,作者进一步在酵母菌株 V5adh6 上敲除了 *ALD4* 基因,与野生型菌株 V5 相比,乙醛产量增加至原来的 2.5 倍。由于 *ADH1* 和 *ADH2* 有较强的同源性,赵丽娟等 (2005) 通过 DNAMAN 和 DNASTAR 软件分析比对,找出非同源区域,设计 PCR 引物 F718 和 R719,以质粒 pFA6a-kanMX4 为模板进行 PCR 扩增,获得一段带有筛选标识和同源区域的目的基因,采用醋酸锂转化法,将此基因转入到 Lager 型酵母体内,使目的基因与酵母 *ADH2* 基因发生同源重组,破坏酵母乙醇脱氢酶 *ADH2* 基因的表达,构建出一株基因工程菌,该菌株 *ADH2* 酶活降低 50%。蔡勇等 (2008) 采用自克隆手段破坏 Lager 型啤酒酵母中的 *ADH2* 基因,乙醇脱氢酶 2 酶活降低 35%,进而导致了乙醛含量的降低,此过程中并无外源基因介入,从食品安全的角度考虑更具有实际意义。

乙酰辅酶 A 合成酶 ACS 催化乙酸向乙酰辅酶 A 的代谢,该酶的同工酶由两个结构基因 *ACS1* 和 *ACS2* 分别编码。Remize *et al.* (2000) 研究发现: *ACS2* 基因过表达 Lager 酵母菌株中乙酰辅酶 A 合成酶活力较出发菌株提高了 4–7 倍,酵母发酵时间缩短,然而乙酸产量无任何变化,乙醛产量反而提高了近 43%。因此,如若将酵母菌株中的 *ACS2* 基因进行敲除操作,很有可能会在削弱 *ACS2* 酶活的

同时,降低乙醛产量。

## 1.2 以游离态乙醛产量为考察指标

低乙醛啤酒酵母菌株的选育,归根结底是选育代谢物乙醛产量降低的啤酒酵母菌株,因此,准确地测定出发和改良菌株的乙醛产量是成功选育菌种的必要手段。乙醛在啤酒中的风味阈值为 10–25mg/L,国外优秀啤酒中乙醛含量均可以达到 3mg/L 以下 (Harrison 1970)。到目前为止,啤酒及其发酵过程不同时间点样品中乙醛含量的检测几乎指的是游离态乙醛的含量测定。然而,乙醛的亲电性使其可以与酒精饮料中的各种亲核物质 (醇、硫醇、 $\text{SO}_2$  和黄酮类等) 发生可逆反应 (Delcour *et al.* 1982) (图 2)。在啤酒体系中 (pH 4.0),乙醛参与啤酒中蛋白质和多酚之间的聚合反应,多酚之间可以通过 “ $\text{CH}_3\text{CH}-$ ” 桥聚合,促进了啤酒中浑浊的形成 (Delcour *et al.* 1982)。此外,乙醛在酸性条件下易与乙醇反应生成乙缩醛 (即结合态的乙醛)。乙缩醛是一种在香水和制药工业上广泛应用的生产原料,也可用作酒精饮料的调味剂。关于啤酒中乙醛的研究多集中在游离态乙醛,然而啤酒在酿造及储藏过程中会发生醇醛缩合反应,影响啤酒的货架期,同时,结合态醛类能在体内代谢为游离态的醛,因此选育低产乙醛啤酒酵母菌株过程中,在考察啤酒中游离态乙醛的同时应该检测乙缩醛的含量。

乙醛是食品发酵过程中的一种天然副产物,其准确检测和定量分析有助于评价啤酒酵母菌株的风味代谢特征及发酵进程。在过去的 50 年中,科学家们一直致力于寻找一种可以精确检测乙醛含量的方法,这些方法往往需要多步处理程序 (Lehmpuhl & Birks 1996),测定结果的标准偏差增大 (Güzel-Seydim *et al.* 2000)。游离态乙醛含量的检测主要采用气相色谱 (GC) 和高效液相色谱法 (HPLC) (Lachenmeier & Sohnius 2008; Ioannidou *et al.* 2016)。为了能够更加准确地对样品中的乙醛进行定量分析,GC 法通常要结合样品的固相微萃取或衍生化处理技术 (Howard *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005); 由于乙醛不具有紫外和荧光吸收基团,采用 HPLC 进行样品检测前也需要使用 2,4-



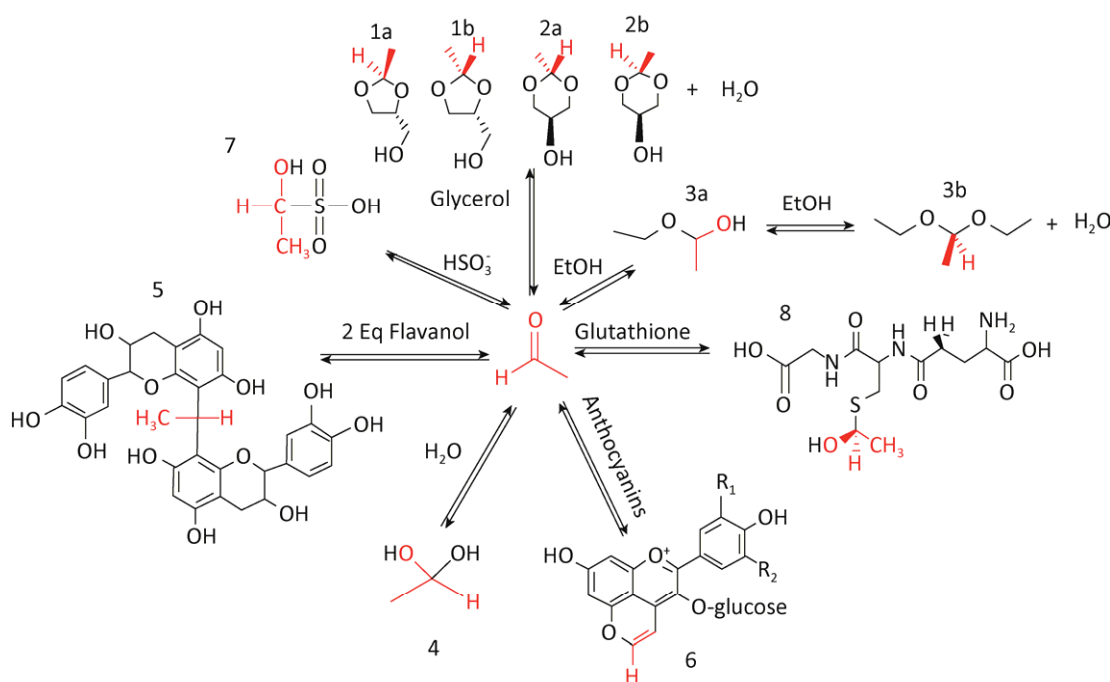


图 2 乙醛和各种风味化合物之间的平衡反应描述 (Peterson & Waterhouse 2016) 1a 和 1b: 反式和顺式二氧戊烷; 2a 和 2b: 反式和顺式二氧己烷; 3a: 乙基半缩醛; 3b: 二乙氧基乙烷; 4: 乙醛水合物; 5: 亚乙基儿茶素二聚物; 6: 原花青素 (Vitisin B); 7: 羟乙磺酸; 8: 谷胱甘肽加合物

Fig. 2 Molecular depiction of some of the equilibria formed between acetaldehyde and its various derivatives (Peterson & Waterhouse 2016). 1a and 1b: Trans- and cis-dioxolane; 2a and 2b: Trans- and cis-dioxane; 3a: Ethyl hemiacetal; 3b: Diethoxyethane; 4: Acetaldehyde hydrate; 5: Ethylidene-bridged catechin dimer; 6: Pyranoanthocyanins (Vitisin B); 7: Hydroxyethylsulfonic acid; 8: The glutathione adduct.

二硝基苯胂等试剂对啤酒样品进行衍生化处理 (Eichelberger & Bashe 1992; Elias *et al.* 2008)。Peterson & Waterhouse (2016) 近来利用核磁共振技术 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 考察了乙醛缩合反应中的动力学特性, 为啤酒及其酿造过程样品中乙缩醛含量的检测提供了重要的方法学参考。然而, NMR 技术所依托的核磁共振仪价格昂贵, 直接导致了检测成本的上升。Liu *et al.* (2018) 建立了一种同时检测啤酒发酵和储藏过程中游离和结合态乙醛的 HS-GC 色谱法, 该方法的精密度好、回收率高、检测限低、操作简便易行, 为低产乙醛啤酒酵母的选育提供了可靠的方法学保障。

## 2 低乙醛啤酒酵母选育策略

迄今为止, 研究者为了获得具有优良性状的实

验和生产菌株开发了许多研究方法, 包括杂交育种、原生质体融合育种、紫外诱变育种、同源重组育种、基因自克隆育种等, 各种菌种选育方法的优缺点及目前的应用现状见表 1。习惯上, 牲畜和农作物领域的遗传改良常采用有性繁殖的方式, 然而, 工业微生物菌株由于缺少生殖周期, 因而几乎不会采用上述育种策略 (Cebollero *et al.* 2007)。经典和传统的酵母育种主要依靠酵母形成孢子, 孢子间交配形成新种, 以期获得优良特性。但是, Lager 型啤酒酵母含有异源多倍体基因组, 产孢能力差、孢子存活率低, 很难获得稳定的单倍体菌株进行杂交育种 (Andersen *et al.* 2000)。原生质体融合技术是另一项应用于啤酒酵母菌株遗传改良的育种技术, 在改善酵母絮凝性方面取得了成功应用, 然而, 在原生质体融合过程中, 由于来自两个母本的基因

表 1 不同菌种选育方法的优缺点及应用

Table 1 The advantages and disadvantages of different strain breeding methods and their applications

育种方法	原理	优点	缺点	应用
Breeding method	Principle	Advantage	Disadvantage	Application
杂交育种 Hybridization breeding	基于基因重组，将两个或多个品种的优良性状通过交配集中在一起，再经过选择和培育，获得新品种的方法 Based on gene recombination, collecting the good traits of two or more varieties through mating, and then selecting and cultivating them to obtain new varieties.	可以将两个或多个优良性状集中在一起 Two or more good traits can be grouped together	依赖于有性繁殖的方式；不会产生新基因，且杂交后代会出现性状分离，育种过程缓慢，过程复杂；在多倍体菌株育种方面难于实现 Dependent on the way of sexual reproduction. No new genes will be produced, and hybrid offspring will have character separation, etc. the breeding process is slow and the process is complex. It is difficult to achieve in the breeding of polyploid strains	牲畜、农作物和海洋生物等领域 The areas of livestock, crops and marine life, etc. (Cebollero <i>et al.</i> 2007; Zhan <i>et al.</i> 2008; Garcia <i>et al.</i> 2012)
原生质体融合 育种 Protoplast fusion breeding	通过人为的方法，使遗传性状不同的两个细胞的原生质体进行融合，借以获得兼有双亲遗传性状的稳定重组子 的过程	可实现远缘菌株的基因重组，重组频率高、受结合型或致育型限制小、遗传物质传递完整；可与其他育种方法相结合	由于来自于两个母本的基因型特征并不一定会简单地平均分配到融合菌株中，因而育种结果难于预见；实验模型的建立如抗性标记的选择对实验影响很大	植物、细菌、真菌等领域 Plants, bacteria, fungi, etc. (Attfield & Bell 2003; Mao <i>et al.</i> 2010)
诱变育种 Mutation breeding	用物理、化学因素诱导动植物的遗传特性发生变异，再从变异群体中选择符合人们某种要求的单株/个体，进而培育成新的品种的育种方法 The genetic characteristics of plants and animals are mutated by physical and chemical factors, and then a single plant/individual that meets certain requirements of people is selected from the mutated population, and then new varieties are cultivated	操作简单，能够提高突变率，在较短的时间内获得更多的优良变异类型 Simple operation, the mutation rate can be increased, and more excellent types of mutations could be obtained in a short period of time	诱发突变的方向难以控制，突变体难以集中多个理想性状；后期工作量太大，有很大的盲目性；某些物理和化学诱变剂存在操作安全隐患 The direction of induced mutation is difficult to control, and it is difficult for the mutants to concentrate multiple ideal traits. The late workload is too large and there is a great deal of blindness. Some physical and chemical mutagenic agents have operational safety hazards	植物、细菌、真菌等微生物领域 Plants, bacteria, fungi, etc. (Li <i>et al.</i> 2004; Wang <i>et al.</i> 2013; Shen <i>et al.</i> 2016; Fu <i>et al.</i> 2018)

待续

续表 1

基因工程育种	将基因工程应用于育种工作	把特定的基因组合到载体上, 操作复杂; 基因工程菌的食品安	植物、动物、微
Genetic	中, 通过基因导入, 培育出一	再转入工程菌中, 定向改组	全性问题仍未有效解决
engineering	定要求的新品种的育种方法	DNA, 克服远源基因不融合; Complicated operation. The food	Plants, animals,
breeding	Genetic engineering is applied	不受种属限制, 可根据人类	safety problem of genetically microorganisms,
	to breeding, and new varieties	的需要, 有目的地进行	engineered bacteria is still not etc. (Nevoigt et
	with certain requirements	The specific genes are effectively solved	al. 2002; Wang et
	could be cultivated through combined into the vectors		al. 2005; Cai et al.
	gene introduction method	and then transferred to the	2008; Gonçalves
		engineering bacteria, and	et al. 2010; Wang
		the DNA is recombinant to	et al. 2010; Wang
		overcome the infusion of	et al. 2014; Yao
		distant genes. It is not subject	et al. 2017)
		to species restrictions and can	
		be conducted purposefully	
		according to human needs.	

型特征并不一定会简单地平均分配到融合菌株中, 因而育种结果往往是不可预见的 (Attfield & Bell 2003)。近年来, 随着 DNA 序列分析的完成, 酵母作为外源基因克隆和表达的受体及载体系统逐步完善, 酵母的人工育种得到广泛和实质性的开展。因此, 可以从酵母菌种改良的角度出发筛选, 抑或采用基因工程技术构建低产乙醛的啤酒酵母菌株, 从而从本质上提高啤酒的风味稳定性。

2.1 传统育种手段选育低产乙醛啤酒酵母菌株

为了提高啤酒风味稳定性, 李崎等 (2004) 采用紫外诱变, 进而利用高浓度蛋氨酸连续驯养, 获得了一株乙醛和双乙酰等老化前驱物质产量减少的 Lager 型啤酒酵母菌株 M<sub>4</sub><sup>1</sup>。沈楠 (2013) 进一步以 M<sub>4</sub><sup>1</sup> 为出发菌株, 经过紫外线诱变处理、DMS (dimethylsulfide) 平板初筛和乙醛培养基驯养复筛, 获得了一株低产乙醛 Lager 型啤酒酵母 D-A-14, 与出发菌株相比, 采用该突变株发酵的啤酒中乙醛含量降低了 70% 左右, 啤酒的风味稳定性以及协调性有所改善。王君伟 (2016) 采用锌离子-UV 诱变与高浓乙醛平板选育结合法, 以乙醇脱氢酶酶活性作为筛选指标, 低产乙醛 Lager 型啤酒酵母菌株的筛选率可达到 60%。Wang et al. (2013) 采用 UV 诱变的传统育种技术, 以乙醇为唯一碳源, 4-MP (4-Methyl pyrazole) 为筛选

标记筛选到一株低产乙醛、同时乙醇产量有所提高的 Lager 型啤酒酵母突变株 MA12。陈璐等 (2012) 以啤酒酿造 Lager 酵母 TS-01 为出发菌株, 依次利用含乙硫氨酸、羟基正缬氨酸的平板进行定向育种, 利用硝酸铅平板分离出高抗氧化性能的菌株 TK-10, 然后通过 EBC 管、100L 中试发酵实验, 发现优选菌株的发酵度较高, 发酵液中 SO<sub>2</sub> 含量增高的同时、乙醛含量有所降低。Garcia et al. (2012) 将 lager 型啤酒酵母孢子与 *Saccharomyces cerevisiae* 进行杂交从而获得了 13 株乙醛应力抗性增强的 Lager 型啤酒酵母杂合体, 这些酵母在发酵结束后的活力也有所提升。

综上所述, 由于啤酒酵母应用领域的特殊性, 啤酒研究者和酿造者们更加倾向于采用传统育种技术选育低产乙醛啤酒酵母菌株, 并在该领域获得了很多成功。然而采用传统育种技术获得所需表型的概率极低, 也极易发生性状的回复突变。随着基因编辑技术的发展, 在基因水平上对啤酒酵母进行修饰, 最终实现降低乙醛含量的目的已经成为可能。因此可采用不同的基因工程技术手段或者多目标策略构建低产乙醛啤酒酵母菌株并进行相关机理探索。

2.2 采用同源重组手段选育低产乙醛啤酒酵母

同源重组 (homologous recombination) 是指

发生在非姐妹染色单体之间或同一染色体上含有同源序列的 DNA 分子之间或分子之内的重新组合。通过分子生物学手段,破坏酵母代谢形成乙醛的一个支路途径,从而达到降低酵母的乙醛产量。

王德良等(2005)通过 PCR 技术获得一段带有筛选标识和同源区域的目的基因,通过醋酸锂转化法,使目的基因与 Lager 型啤酒酵母 *ADH2* 基因发生同源重组,得到一株 *ADH2* 基因被破坏的工业啤酒酵母,该突变株乙醇脱氢酶 2 活力降低为原来的 1/2, 100L 中试发酵实验结果显示:改良菌株中的乙醛、双乙酰的生成量明显低于出发菌株,而死亡率高于出发菌株,改良菌株发酵到第 7 天时产生的乙醛含量为 3mg/L。同样, Wang *et al.* (2014) 利用同源重组的方式构建了一株 *ADH2* 基因缺失、同时 *SOD1* (super oxide dismutase) 和 *GSH1* (glutathione) 基因过表达的 Lager 型啤酒酵母菌株 ST31 ( $\Delta adh2::SOD1+\Delta ilv2::GSH1$ ), 该菌株乙醛产量较出发菌株下降了 29%。Cambon *et al.* (2006) 通过同源重组删除乙醛脱氢酶 *ALD6* 基因后达到了降低乙醛的目的,最终将乙醛含量降低到 8mg/L。Gonçalves *et al.* (2010) 和 Wang *et al.* (2010) 采用同源重组技术在 Lager 型啤酒酵母中破坏了调控乙醛合成的乙醇脱氢酶基因 *ADH2*, 同时引入来源于其本身的谷胱甘肽合成酶基因 *GSH1*, 成功构建了一株工业啤酒酵母突变株 Y31, 其乙醛产量降低了 31.25%, 风味稳定性较出发菌株提高了 1.3 倍), 而且通过同源重组的方法引入的功能基因不携带任何抗药性基因,使获得的工程菌株更适用于工业生产。然而,敲除了 *ADH2* 的 Lager 型啤酒酵母菌株可能会由于乙醇的积累或者酵母生长缓慢而获得不想要的表型。此外,采用重组 DNA 技术获得的酵母菌株不能用于商业化啤酒的生产。为了有效地解决这一问题, Kim *et al.* (2014) 采用逆向代谢组学进行低乙醛啤酒酵母的选育,首先确定了酵母稳定期生长的特殊调控因子 PHX1, 该基因可以调控酵母细胞存活、压力抗性和产孢能力等,进而采用整合代谢组和转录组学分析的手段,对 PHX1 基因缺失型菌株和其出发菌株的 mRNA 丰

度和细胞内代谢物的代谢流进行全局分析,发现突变菌株中催化丙酮酸向乙醛的代谢流减弱,进而降低发酵产品中的乙醛含量。

### 2.3 采用酵母“基因自克隆技术”构建低乙醛啤酒酵母菌株

在食品及饮料酒领域,酵母基因工程菌、转基因作物并不受消费者欢迎。自克隆和非自克隆技术是根据基因来源的不同而区分的两种遗传修饰技术 (Akada 2002)。由于没有异源 DNA 引入基因自克隆菌株,采用酵母“基因自克隆技术”对酵母基因组进行改造,有助于消费者消除对贴有基因工程菌标签的产品的恐惧感,卡塔赫纳生物安全议定书对自克隆酵母并不进行管控。因此,基因自克隆技术在构建发酵性能改良的生物安全啤酒工业酵母菌株中具有重要的实际应用价值。

Wang *et al.* (2005) 利用自行构建的含有铜抗和  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的基因盒子,中断工业 Lager 型啤酒酵母菌株的 *ADH2* 基因,获得自克隆菌株 RY1 和 RY2, PCR 和酶活力测定结果显示: *GSH1+CUP1* 基因的插入仅仅敲除了 *ADH2* 基因的一个拷贝,中试规模酿造实验发现重组菌株的乙醛产量较野生型菌株降低了 21%–22%, 菌株的抗氧化能力有所改善,感官品评结果优于出发菌株,由于没有外源基因的引入,该重组菌株可以应用于啤酒工业生产。蔡勇等 (2008) 利用自克隆技术首次将啤酒酵母工业菌株中的 *ADH2* 基因敲除,同时在该位点插入一个 *CUP1* 基因和 *GSH1* 基因,获得了低 *ADH2* 酶活性、高 GSH 含量的啤酒酵母工程菌,自克隆菌株的酶活是出发菌株的 65%,为构建低乙醛的啤酒酵母工程菌奠定了基础。

### 2.4 采用多基因调控策略构建低乙醛啤酒酵母菌株

乙醛的代谢直接与丙酮酸脱羧酶、乙醇脱氢酶、乙醛脱氢酶、乙酰辅酶 A 合成酶的活性息息相关,因此,可以采用多基因调控策略构建低乙醛啤酒酵母菌株。此外,由于乙醛是造成啤酒风味老化的前驱物质之一,研究者为了能够获得抗老化性能优良的啤酒酵母菌株,往往会对除乙醛代谢相关基因之外的老化或抗老化基因同时进行编辑改造。



Wang *et al.* (2005) 通过在同一株酵母中过表达具有分泌能力的 *SOD1* 和 *GSH* 基因, 同时敲除 *ILV2* 和 *ADH2* 基因, 构建了一株发酵性能良好、乙醛产量降低的 Lager 型酵母菌株, 由该菌株酿造的啤酒风味及抗氧化性能均明显增强。Nevoigt *et al.* (2002) 研究发现: 甘油-3-磷酸脱氢酶同工酶 *GPD1* (glycerin-3-phosphate dehydrogenase) 基因在啤酒酵母中的过表达会造成 Lager 型啤酒酵母乙醇产量的急剧下降 (较出发菌株下降了 18%), 在啤酒酵母的二次发酵过程中发酵液里乙醛含量有所降低, 但是未能降低到啤酒产品中所规定的乙醛风味阈值以下。由于在乙醛代谢途径中, 乙醇会通过乙醇脱氢酶 (*ADH* 基因调控) 的作用降解为乙醛, 乙醛进而经由乙醛脱氢酶 (*ALDH* 基因调控) 降解为乙酸, 因此, 如果同时对啤酒酵母菌株采取 *GPD1* 基因、*ADH* 基因及 *ALDH* 基因的多基因调控策略, 对酵母菌株的乙醛代谢调节将起到更明显的效果。

啤酒酵母从根本上决定了啤酒产品中风味物质乙醛的合成和积累。传统上, 酿造者将其区分为 Ale 型啤酒酵母和 Lager 型啤酒酵母两大类 (Saerens *et al.* 2010)。Lager 啤酒酵母起初被归类为 *Saccharomyces carlsbergensis* (Hansen 1908), 进而被归类为 *S. cerevisiae*, 后来被重命名为 *S. pastorianus* (Vaughan-Martini & Martini 1987)。Lager 型啤酒酵母菌株的染色体组成复杂, 早期的 DNA-DNA 杂交技术 (Tamai *et al.* 1998; Yamagishi & Ogata 1999)、蛋白质组学分析 (Joubert *et al.* 2000) 及随机扩增多态性 DNA 实验 (Teresa Fernandez-Espinar *et al.* 2003) 均显示 *S. pastorianus* 含有两套染色体: *S. cerevisiae* 型和 *S. bayanus* 型。近年来, 科学家研究发现, Lager 型啤酒酵母基因组中含有的染色体类型并非仅仅局限于 *S. cerevisiae* 和 *S. bayanus* 两种类型, 不同的 Lager 啤酒酵母的基因组组成不尽相同 (Rainieri *et al.* 2006; Dunn & Sherlock 2008), 其中, *S. bayanus* 和 *S. bayanus* var. *uvarum* 基因型较 *S. cerevisiae* 具有更强的低温耐受性, 使得 Lager 型

啤酒酵母菌株能够在较低的发醇温度下进行啤酒的发醇; Lager 型啤酒酵母菌株中不同类型的亚基因组与特定的工厂环境/地理坐标有关, 且在基因组重排、拷贝数变异、染色体倍性和 DNA 序列多态性方面存在差异 (Nakao *et al.* 2009)。因此, 由于 Lager 型啤酒酵母基因组倍性的复杂性, 采用多基因改造策略在 Lager 型工业啤酒酵母的低乙醛酵母菌株选育中存在较大难度。但是由于啤酒组分的复杂性, 多基因改造策略极有可能是降低工业啤酒酵母菌株乙醛产量、提高啤酒综合抗老化能力最适合的啤酒酵母选育策略。

### 3 展望

乙醛是影响人类身体健康的潜在风险物质之一, 同时, 乙醛作为一种功能性风味物质普遍存在于啤酒、白酒和葡萄酒等发酵型酒精饮料中, 是影响啤酒风味稳定性的老化前驱物质之一。世界各地的研发团队试图对啤酒酵母进行改造, 以期获得低乙醛抗老化啤酒酵母菌株。综上所述, 啤酒乙醛含量控制中亟需解决的问题包括: 1) 啤酒酵母菌株发酵生产的啤酒/或其在储存过程中乙醛含量低于啤酒中乙醛的风味阈值, 同时酵母的生长性能和其他发酵性能指标不发生显著变化; 2) 到目前为止, 啤酒及其发酵过程中不同时间点样品中乙醛含量检测几乎指的是其中游离态乙醛的含量测定。然而, 乙醛的亲电性使其可以与酒精饮料中的各种亲核物质 (醇、硫醇、 $\text{SO}_2$  和黄酮类等) 发生可逆反应, 因此, 如何准确地测定啤酒中游离态和结合态乙醛含量是有效控制乙醛含量的技术保证; 3) 由于 Lager 型啤酒酵母异源多倍体的杂交属性和极差的孢子形成能力, 对其进行遗传学改造将极具挑战性。针对上述问题, 在酵母菌株层面通过增加或降低啤酒酵母乙醛代谢途径中的相关酶活性、对乙醛代谢相关基因进行编辑改造、降低啤酒发酵过程中及成品啤酒中的乙醛含量始终是低乙醛啤酒酵母选育的主要研究方向。

微生物菌株改造的最终目的是使其能够满足工业化生产的需要。目前, 采用传统育种抑或基因

工程育种手段选育出的低产乙醛酵母菌株已经很多,但普遍存在同出发菌株相比,风味品质、死亡率、发酵度等指标变差的情况,因此,在将其应用于工业化生产方面还需要进行更全面的改进和优化。例如,将低乙醛啤酒酵母选育菌株与高活力、发酵性能优良的啤酒酵母进行杂交育种,取长补短,使最终获得的优选菌株满足工业化生产的需要;在生产工艺控制上,可以通过降低酵母使用代数、改善发酵麦汁营养组成、有效监控酵母发酵温度和压力、严格控制种酵母保存和移植时间等措施来获得优秀的啤酒产品。

由于通过异源重组 DNA 如抗性基因的基因工程菌使用的生物安全性问题,限制了其商业化应用的推广。相比之下,由于没有异源 DNA 的引入,采用“基因自克隆技术”对酵母基因组进行改造,有助于消费者消除对贴有基因工程菌标签的产品的恐惧感(Akada 2002),因而该技术极具吸引力(Saerens *et al.* 2010)。此外,采用基因工程技术如 CRISPR/Cas9 等基因编辑系统对 Lager 型啤酒酵母进行多基因综合改造是未来的一个发展方向,这将极大地提升啤酒酵母的发酵性能、促进啤酒品质的提高。同时,随着 Lager 型啤酒酵母基因组学方法,采用系统生物学、代谢工程和各种组学研究方法及高通量筛选方法的结合,也将为低乙醛抗老化啤酒酵母菌株的选育打开新通道,在未来推动这一领域的发展。

## [REFERENCES]

- Akada R, 2002. Genetically modified industrial yeast ready for application. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6): 536-544
- Andersen T, Hoffmann L, Grifone R, Nilsson-Tillgren T, Kielland-Brandt M, 2000. Brewing yeast genetics. EBC Monograph Nürnberg, Fachverlag Hans Carl. 140-147
- Attfield A, Bell P, 2003. Genetics and classical genetic manipulations of industrial yeasts. Springer, Berlin. 120-131
- Bamforth CW, 1999. The science and understanding of the flavour stability of beer: a critical assessment. *Brauwelt International*, 17(2): 98-110
- Bamforth CW, 2009. The flavor instability of beer. In: Beer: a quality perspective. Academic Press, New York. 85-109
- Brooks PJ, Zakhari S, 2014. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(2): 77-91
- Burroughs LF, Sparks AH, 1973. Sulphite-binding power of wines and ciders. II. Theoretical consideration and calculation of sulphite-binding equilibria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24: 199-206
- Caesar R, Palmfeldt J, Gustafsson JS, Pettersson E, Hashemi SH, Blomberg A, 2007. Comparative proteomics of industrial lager yeast reveals differential expression of the cerevisiae and non-cerevisiae parts of their genomes. *Proteomics*, 7(22): 4135-4147
- Cai Y, Mu Q, Wang ZY, Zhang BY, Yan BJ, 2008. Construction of self-cloning industrial brewing yeast with high-glutathione production and low-ADH II enzyme activity. *Microbiology*, 35(8): 1171-1175 (in Chinese)
- Cambon B, Monteil V, Remize F, Camarasa C, Dequin S, 2006. Effects of GPD1 overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking ALD6 genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7): 4688-4694
- Cebollero E, Gonzalez-Ramos D, Tabera L, Gonzalez R, 2007. Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnology Letters*, 29: 191-200
- Chen L, Wan XJ, Yin H, He Y, Lin H, 2012. Screening of brewer's yeast strain TK-10 with high antioxygenic property and its industrial fermentation. *Food and Fermentation Industries*, 38(7): 77-81 (in Chinese)
- da Costa MS, Gonçalves C, Ferreira A, Ibsen C, de Pinho PG, Ferreira ACS, 2004. Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(26): 7911-7917
- Delcour JA, Dondeyne P, Trousdale EK, Singleton VL, 1982. The reactions between polyphenols and aldehydes and the influence of acetaldehyde on haze formation in beer.

- Journal of the Institute of Brewing*, 88(4): 234-243
- Dunn B, Sherlock G, 2008. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*, 18: 1610-1623
- Eichelberger JW, Bashe WJ, 1992. Determination of carbonyl compounds in drinking water by dinitrophenylhydrazine derivatization and high performance liquid chromatography. *EPA Method*, 554: 1-24
- Elias RJ, Laurie VF, Ebeler SE, Wong JW, Waterhouse AL, 2008. Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, 626: 104-110
- Fu F, Sui ZH, Sun LQ, 2018. Research advance on the algal mutation breeding technologies. *Biotechnology Bulletin*, 34(10): 1-6 (in Chinese)
- Garcia Sanchez R, Solodovnikova N, Wendland J, 2012. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. *Yeast*, 29(8): 343-355
- Gonçalves LM, Magalhães PJ, Valente IM, Pacheco JG, Dostálek P, Sýkora D, Rodrigues JA, Barros AA, 2010. Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography–diode-array detection–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(24): 3717-3722
- Güzel-Seydim ZB, Seydim AC, Greene AK, Bodine AB, 2000. Determination of organic acids and volatile flavor substances in Kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13: 35-43
- Hansen EC, 1908. Investigations on the physiology and morphology of budding yeast. XII. New studies of bottom fermenting brewers yeast. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*, 7: 179-217
- Harrison GAF, 1970. The flavour of beer—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 76(5): 486-495
- Hohmann S, 1991. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 173(24): 7963-7969
- Howard KL, Mike JH, Riesen R, 2005. Validation of a solid-phase microextraction method for headspace analysis of wine aroma components. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56: 37-45
- Ioannidou MD, Samouris G, Achilias DS, 2016. Acetaldehyde contamination of water, alcoholic, and non-alcoholic beverages stored in glass or plastic bottles. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 98(10): 1183-1190
- Joubert R, Brignon P, Lehmann C, Monribot C, Gendre F, Boucherie H, 2000. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. *Yeast*, 16: 511-522
- Kim JY, Kim EJ, Maury LL, Bähler J, Roe JH, 2014. A metabolic strategy to enhance long-term survival by Phx1 through stationary phase-specific pyruvate decarboxylases in fission yeast. *Aging (Albany NY)*, 6(7): 587-601
- Lachenmeier DW, Sohnius EM, 2008. The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: evidence from a large chemical survey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8): 2903-2911
- Lehmpuhl DW, Birks JW, 1996. New gas chromatographic-electron-capture detection method for the determination of atmospheric aldehydes and ketones based on cartridge sampling and derivatization with 2,4,6-trichlorophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, 740: 71-81
- Leitao C, Marchioni E, Bergaentzle M, Zhao M, Didierjean L, Taidi B, Ennahar S, 2011. Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4): 1249-1255
- Li Q, Pan XQ, Gu GX, 2004. Improvement of beer flavor stability by screening anti-staling brewers' yeast. *Chinese Journal of Biotechnology*, 20(6): 912-917 (in Chinese)
- Liu C, Li Q, Niu C, Zheng F, Zhao Y, 2018. Simultaneous determination of diethylacetal and acetaldehyde during beer fermentation and storage process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, doi: 10.1002/jsfa.9008
- Mao Y, Wang D, Huang ZB, Xing JM, 2010. Application of microbial protoplast fusion technology in genetic breeding. *China Biotechnology*, 30(1): 93-97 (in Chinese)
- Matsufuji Y, Yamamoto K, Yamauchi K, Mitsunaga T,

- Hayakawa T, Nakagawa T, 2013. Novel physiological roles for glutathione in sequestering acetaldehyde to confer acetaldehyde tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 297-303
- Meaden PG, Dickinson FM, Mifsud A, Teissier W, Westwater J, Bussey H, Midgley M, 1997. The *ALD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic,  $Mg^{2+}$ -activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast*, 13: 1319-1327
- Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M, Ashikari T, 2009. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research*, 16(2): 115-129
- Navarro-Aviño JP, Prasad R, Miralles VJ, Benito RM, Serrano R, 1999. A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast*, 15(10A): 829-842
- Nevoigt E, Pilger R, Mast-Gerlach E, Schmidt U, Freihammer S, Eschenbrenner M, Garbe L, Stahl U, 2002. Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Research*, 2: 225-232
- Peterson AL, Waterhouse AL, 2016. <sup>1</sup>H NMR: a novel approach to determining the thermodynamic properties of acetaldehyde condensation reactions with glycerol, (+)-catechin, and glutathione in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64: 6869-6878
- Petkova N, Jonkova G, 2010. Effect of some technological factors on the content of aldehyde in beer. *Scientific Study & Research-Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 11(3): 359-364
- Rainieri S, Kodama Y, Kaneko Y, Mikata K, Nakao Y, Ashikari T, 2006. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3968-3974
- Remize F, Andrieu E, Dequin S, 2000. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic *Mg21* and mitochondrial *K1* acetaldehyde dehydrogenases *Ald6p* and *Ald4p* in acetate formation during alcoholic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3151-3159
- Saerens SMG, Duong CT, Nevoigt E, 2010. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 86(5): 1195-1212
- Seeboth PG, Bohnsack K, Hollenberg CP, 1990. *pdc1(0)* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene: cloning of *PDC5*, a gene homologous to *PDC1*. *Journal of Bacteriology*, 172(2): 678-685
- Seeman JI, Dixon M, Haussmann H-Jr, 2002. Acetaldehyde in mainstream tobacco smoke: formation and occurrence in smoke and bioavailability in the smoker. *Chemical Research Toxicology*, 15(11): 1331-1350
- Shen N, 2013. Screening of brewer's yeast with low acetaldehyde. Master Thesis, Jiangnan University, Wuxi. 12-26 (in Chinese)
- Sheridan MK, Elias RJ, 2015. Exogenous acetaldehyde as a tool for modulating wine color and astringency during fermentation. *Food Chemistry*, 177: 17-22
- Tamai Y, Momma T, Yoshimoto H, Kaneko Y, 1998. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast*, 14: 923-933
- Teresa Fernandez-Espinar M, Barrio E, Querol A, 2003. Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 20: 1213-1226
- Vaughan-Martini A, Martini A, 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 53: 77-84
- Wang DL, Song XL, Zhang WJ, 2005. Study on reduction of acetaldehyde in beer by molecular biology. *Beer Technology*, 12: 18-23 (in Chinese)
- Wang J, Shen N, Yin H, Liu C, Li Y, Li Q, 2013. Development of industrial brewing yeast with low acetaldehyde production and improved flavor stability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 169(3): 1016-1025
- Wang JJ, Wang ZY, Liu XF, Guo XN, He XP, Wensel PC, Zhang BR, 2010. Construction of an industrial brewing yeast strain to manufacture beer with low caloric content and

- improved flavor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4): 767-774
- Wang JW, 2016. Study on the key enzymes of acetaldehyde metabolism of beer yeast and rapid screening of yeast with low acetaldehyde. Master Thesis, Qilu University of Technology, Jinan. 27-49 (in Chinese)
- Wang Q, O'Reilly J, Pawliszyn J, 2005. Determination of lowmolecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. *Journal of Chromatography A*, 1071: 147-154
- Wang Z, Bai X, He X, Zhang B, 2014. Secretion expression of SOD1 and its overlapping function with GSH in brewing yeast strain for better flavor and anti-aging ability. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(9): 1415-1424
- Woffenden HM, Ames JM, Chandra S, Anese M, Nicoli MC, 2002. Effect of kilning on the antioxidant and pro-oxidant activities of pale malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17): 4925-4933
- Yao ZP, Cheng Y, Wan HJ, Li ZM, Ye QJ, Ruan MY, Wang RQ, Zhou GZ, Yang YJ. 2017. Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in plant genetic engineering breeding. *Molecular Plant Breeding*, 15(7): 2647-2655 (in Chinese)
- Yamagishi H, Ogata T, 1999. Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Systematic Applied Microbiology*, 22: 341-353
- Zhan AB, Hu XL, Bao LS, Lu W, Peng W, Wang ML, Hu JJ, 2008. Molecular identification of scallop planktonic larvae using species-specific microsatellites. *Acta Oceanologica Sinica*, 27(5): 134-146
- Zhao LJ, Wang DL, Cheng YL, Zhou JZ, Ge BG, 2005. Research on deletion of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase II gene. *Food and Fermentation Industries*, 31(11): 30-33 (in Chinese)
- Zhao H, Li H, Sun G, Yang B, Zhao M, 2013. Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4): 910-917
- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS, 1995. Wine analysis and production. Chapman and Hall, New York. 38-49
- [附中文参考文献]
- 蔡勇, 母茜, 王肇悦, 张博润, 晏本菊, 2008. 低乙醇脱氢酶 II 活性的抗老化啤酒酵母工程菌的构建. *微生物学通报*, 35(8): 1171-1175
- 陈璐, 万秀娟, 尹花, 贺扬, 林洪, 2012. 抗氧化啤酒酵母菌株 TK-10 的选育及工业生产验证. *食品与发酵工业*, 38(7): 77-81
- 付峰, 隋正红, 孙利芹, 2018. 藻类诱变育种技术研究进展. *生物技术通报*, 34(10): 1-6
- 李崎, 潘学启, 顾国贤, 2004. 选育抗老化啤酒酵母提高啤酒风味稳定性的研究. *生物工程学报*, 20(6): 912-917
- 毛雨, 王丹, 黄占斌, 邢建民, 2010. 微生物原生质体融合育种技术及其应用. *中国生物工程杂志*, 30(1): 93-97
- 沈楠, 2013. 低产乙醛啤酒酵母的选育. 江南大学硕士论文, 无锡. 12-26
- 王德良, 宋绪磊, 张五九, 2005. 采用分子生物学降低啤酒中乙醛含量的研究. *啤酒科技*, 12: 18-23
- 王君伟, 2016. 啤酒酵母乙醛代谢关键酶及低乙醛菌株快速筛选的研究. 齐鲁工业大学硕士论文, 济南. 27-49
- 姚祝平, 程远, 万红建, 李志邈, 叶青静, 阮美颖, 王荣青, 周国治, 杨悦俭, 2017. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物基因工程育种中的应用. *分子植物育种*, 15(7): 2647-2655
- 赵丽娟, 王德良, 程玉来, 周建中, 葛邦国, 2005. 利用基因敲除技术破坏酿酒酵母乙醇脱氢酶 II 基因的初步研究. *食品与发酵工业*, 31(11): 30-33

(本文责编: 王敏)