

构建高产谷胱甘肽啤酒酵母基因工程菌提高啤酒抗老化能力的研究 Improvement of Beer Anti-staling Capability by Genetically Modifying Industrial Brewing Yeast with High Glutathione Content

蒋凯¹, 李崎^{1*}, 顾国贤¹

JIANG Kai¹, LI Qi^{1*} and GU Guo-Xian¹

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China

摘要 根据同源重组的原理, 将来源于啤酒酵母工业菌株 G03 的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(*GSH1*)和筛选标记 *Kan* 取代质粒 pRJ-5 中 18S rDNA 内部约 340bp 的 DNA 片段, 构建重组质粒 pRKG。以 pRKG 为模版, PCR 得到以 18S rDNA 为整合位点包含 *GSH1* 和 *Kan* 的基因片段 18S rDNA : (*Kan-GSH1*)。用此片段转化啤酒酵母工业菌株 G03, 通过 G418 抗性筛选得到啤酒酵母工程菌。实验室小试表明, 工程菌的谷胱甘肽含量比受体菌株提高 16.6%, 啤酒的抗老化能力得到了显著提高, 而常规指标没有发生显著变化。连续传代 5 次后胞内 GSH 含量基本不变遗传稳定性良好。由于表达 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的基因来源于受体菌株自身, 是通过自克隆技术改造工业啤酒酵母的一次有益的尝试。

关键词 啤酒酵母, 谷胱甘肽, 老化与抗老化, 工程菌, 风味稳定性

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1071-06

Abstract Based on homologous recombination, recombinant plasmid pRKG was constructed by replacing the internal fragment of 18S rDNA of pRJ-5 with a copy of γ -glutamylcysteine synthetase gene (*GSH1*) from the industrial brewing yeast strain G03 and a copy of G418 resistance gene (*Kan*) used as the dominant selection marker respectively. The fragment 18S rDNA : (*Kan-GSH1*) obtained through the PCR reaction was integrated to the chromosomal DNA of G03 strain, and recombinants were screened by G418 resistance. It was shown that the GSH content of beer fermented with the recombinant strain SG1 was 16.6% higher than that of G03, and no significant difference in routine fermentation parameters was found. To test the genetic stability, strains SG1 was inoculated into flasks and transferred continuously 5 times. The intracellular glutathione content of strain kept constant basically. It is an instructive attempt of genetically modifying industrial brewing yeast, as *GSH1* was obtained from the host itself.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, glutathione, staling and anti-staling, genetically modified strain, flavor stability

在啤酒生产过程中, 由于原料、生产工艺和酵母等的影响, 啤酒的风味老化不可避免。啤酒的风味老化已经成为近年来研究的热点^[1-8]。啤酒中的自由基活性很高, 自由基反应构成网状结构涵盖了大

部分老化反应, 具有风味活性的羰基化合物很多通过自由基反应形成^[5-8]。谷胱甘肽(GSH)作为重要的抗氧化物质, 可以和许多氧自由基发生非酶促反应, 对平衡不同亚细胞环境的氧化还原势能^[9, 10], 维

Received : February 26, 2007 ; Accepted : April 5, 2007.

This work was supported by a grant from the Hi-Tech Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2006AA020204).

* Corresponding author. Tel : +86-510-85918176 ; Fax : +86-510-85805219 ; E-mail : liqi@sytu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863)项目资助(No. 2006AA020204)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

持啤酒酵母体内的氧化还原环境具有重要作用^[11];酵母中 GSH 含量丰富,而在啤酒生产时酵母代谢分泌一部分 GSH 可以显著提高啤酒的抗风味老化能力,延长啤酒的风味保鲜期^[2,3]。

在 GSH 的合成过程中, γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(GSH I)受到 GSH 的反馈抑制,由 GSH I 催化的反应是 GSH 生物合成过程的限速步骤^[2-4,10]。通过提高相应基因 *GSH1* 的拷贝数来增强 GSH I 的活性,则可以提高 GSH 的生成量。

酵母基因组中核糖体 DNA(rDNA)有 100~200 个重复单元,以此为整合位点可以提高整合拷贝数,在酿酒酵母(*S. cerevisiae*)中已有应用^[12,13]。本研究通过构建以 18S rDNA 为整合位点包含 *GSH1* 基因和 *Kan* 基因的转化片段,与工业啤酒酵母染色体中与酿酒酵母同源的 18S rDNA 发生同源重组,获得 GSH 生成量显著提高的重组菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、pPIC9K 载体(Invitrogen 公司产品)由沈微副教授惠赠,工业啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 G03 本实验室保藏,pMD18-T Simple Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。

1.1.2 主要试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa);碱性磷酸酶(CIAP)、Super *Pfu* DNA 聚合酶、质粒抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;PCR Purification Mini Kit、Gel Extraction Mini Kit 购自上海华舜生物工程有限公司;酵母提取物和蛋白胨为 OXOID 公司产品;遗传霉素(G418)、GSH 还原酶、NADPH、DTNB、ATP 等购自 Sigma 公司,除特别注明外,实验用各种试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基:LB 培养基按照文献[14]配制,固体和液体培养基在需要时加入硫酸卡那霉素至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或氨苄青霉素至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。培养酵母菌用 YEPD 培养基按照文献[15]配制。发酵用麦汁培养基采用全麦芽糖化制得,酒花添加量 0.8 g/L^[2]。

1.2.2 基因操作:大肠杆菌转化按氯化钙法进行^[14]。啤酒酵母染色体 DNA 的提取及啤酒酵母的遗传转化按文献[15]的方法进行。PCR 产物纯化,从琼脂糖凝胶回收 DNA 以及质粒的提取等操作按照各个公司提供的说明书进行。常规基因操作均参考文献[14]。

1.2.3 引物设计和 PCR 扩增:

(1)啤酒酵母 18S rDNA 的扩增:根据 GenBank 公布的酿酒酵母的 18S rDNA 序列,设计引物:

PfDNA01: 5'-GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC-3';

PfDNA02: 5'-CTTGTTCGACTTTTAgTTCC-3'。

以 G03 的染色体 DNA 为模板,进行高保真 PCR 扩增。PCR 反应参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 40s,52 $^{\circ}\text{C}$ 1min 10s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2min 10s,重复 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 15min 使产物延伸完全。

(2)卡那基因 *Kan* 的扩增:根据 pPIC9K 载体全序列设计引物:Pkan01: 5'-ACCGGAATTCGCAAGGAGATGGCGCCAAC-3';Pkan02: 5'-AATTGAGCTCAA GTGAGGGAGCCACGGTTG-3'。画线部分分别为 *EcoRI* 和 *SacI* 的酶切位点。以经 *EcoRI* 线性化的 pPIC9K 载体为模板,进行高保真 PCR 扩增。PCR 反应参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 40s,69 $^{\circ}\text{C}$ 1min 20s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2min 10s,重复 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 15min 使产物延伸完全。

(3) γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH1* 的扩增:根据 GenBank 公布的酿酒酵母的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(*GSH1*)序列,设计引物:Pgsh101: 5'-ACCAGAGCTCGATAAGTTATGCCACCAGTGC-3';Pgsh102: 5'-ACCAGAGCTCAAATGGCCAATATTCTACGTG-3'。其中,画线部分为 *SacI* 的酶切位点。以 G03 的染色体 DNA 为模板,进行高保真 PCR 扩增。PCR 反应参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 40s,66 $^{\circ}\text{C}$ 1min 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2min 30s,重复 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 15min 使产物延伸完全。

1.2.4 DNA 测序:将 PCR 扩增得到的 *GSH1* 末端加 A 处理后,与 pMD18-T Simple Vector 连接得到质粒 pGJ-1 用于测序。测序采用 Sanger 双脱氧末端终止法,由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2.5 重组质粒的构建:将 18S rDNA 与 pMD18-T Simple Vector 连接得到质粒 pRJ-5 用 *EcoRI* 与 *SacI* 酶切,与同样酶切的 *Kan* 片段连接,得到质粒 pRK-2。将经过测序验证的 pGJ-1 中的 *GSH1* 用 *SacI* 酶切后,插入到质粒 pRK-2 的 *SacI* 酶切位点,得到质粒 pRKG。

1.2.6 目的片段的获得:以构建好的质粒 pRKG 为模板,采用 PfDNA01、PfDNA02 一对引物进行高保真的 PCR 扩增。PCR 反应参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 40s,52 $^{\circ}\text{C}$ 1min30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3min,重复 35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 15min 使产物延伸完全。

1.2.7 重组菌的遗传稳定性分析:从新鲜转化的平板上挑取单菌落转接在 YEPD 斜面上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48h。然后转接至 5mL YEPD 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养,每 24h 转接一次,共转接 5 次。取菌液涂

布 YEPD 平板, 30℃ 培养后挑取单菌落, 分别点种 YEPD 和含 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 的 YEPD 平板, 通过计数测定重组菌的遗传稳定性。

1.2.8 重组工业酵母的酿造实验:

(1) 实验室规模发酵实验: 将啤酒酵母接种于 10mL 麦汁培养基, 25℃ 培养 2d, 吸取 1mL 至 9mL 麦汁培养基, 22℃ 培养 2d; 全部接入 50mL 麦汁培养基, 19℃ 培养 2d, 培养液全部接入 250mL 麦汁, 11℃ 发酵 6d, 6℃ 后酵 10d。

(2) 啤酒老化相关指标的测定: 细胞内及啤酒中谷胱甘肽参照文献 [2] 测定。DPPH 的测定参照文献 [16], TRAP 的测定参照文献 [5], 其他常规指标按照参考文献 [17] 进行检测。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒的构建

卡那基因 (*Kan*) 是一种来自细菌的基因, 编码一种非活性酶 (氨基糖苷酸转移酶)。该基因在酵母中表达能使酵母对遗传霉素 G418 产生抗性, 本研究中采用该抗性作为显性选择标记筛选转化子。

用 *Eco*RI 与 *Sac*I 酶切 pRJ-5, 与同样酶切的 *Kan* 片段连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 后在 Amp^r-Kan^r 双抗 LB 平板筛选得到转化子, 经鉴定得到质粒 pRK-2。用 *Sac*I 酶切质粒 pGJ-1, 得到 *GSH1* 片段, 插入到质粒 pRK-2 的 *Sac*I 酶切位点, 得到质粒 pRKG (图 1)。酶切验证可以看出质粒 pRKG 构建正确 (图 2), 18S rDNA 内部约 340 bp 的片段被 *GSH1*

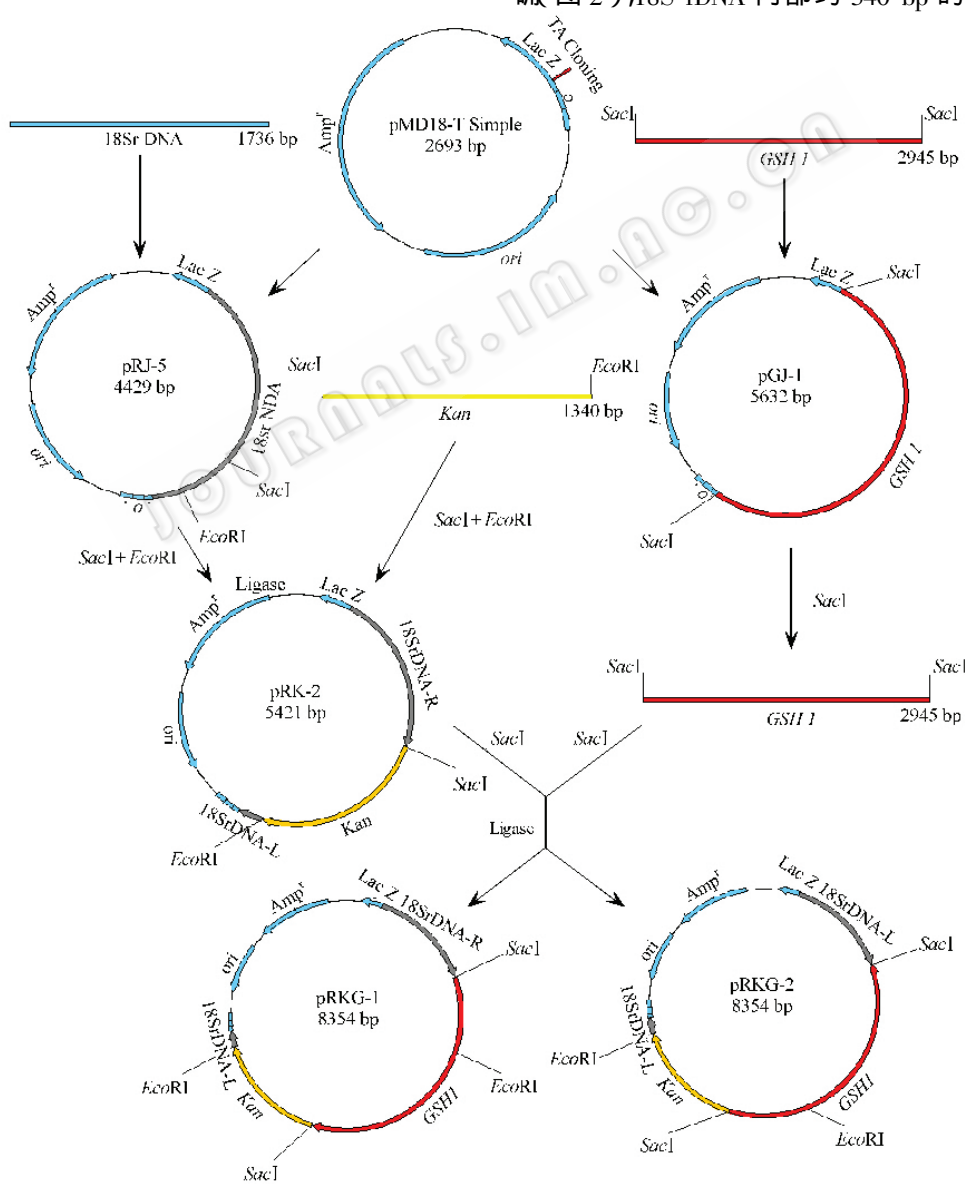


图 1 重组质粒 pRKG 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pRKG

与 *Kan* 取代。GSH1 与 pRK-2 有两种连接方式,得到的两个质粒 pRKG-1 和 pRKG-2 均可以进行后续实验。

以看到,在 1.7kb 处均有一条带,说明重组酵母染色体存在多个 18S rDNA 拷贝,转化片段只与其中部分发生重组。

将 SG1 转接至 YEPD 培养基中,30℃、200r/min 培养 48h,以新鲜培养基为对照,测定培养液的 GSH 含量。SG1 能够较多的生成 GSH(数据未列出),故以此重组菌进行进一步试验。

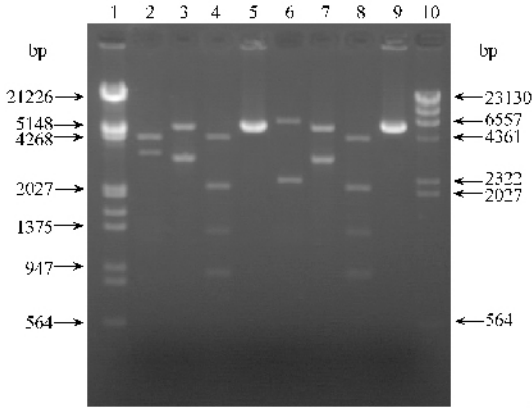


图2 重组质粒 pRKG 的酶切、PCR 验证图

Fig.2 Digestion patterns and PCR analysis of plasmid pRKG 1:λDNA/*Hind*III + *Eco*R I marker ; 2:pRKG-1/*Eco*R I ; 3:pRKG-1/*Sac*I ; 4:pRKG-1/*Eco*R I + *Sac*I ; 5:pRKG-1/PCR with PrDNA ; 6:pRKG-2/*Eco*R I ; 7:pRKG-2/*Sac*I ; 8:pRKG-2/*Eco*R I + *Sac*I ; 9:pRKG-2/PCR with PrDNA ; 10:λDNA/*Hind*III marker.

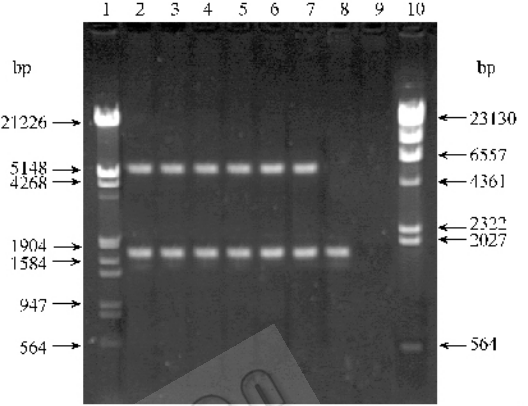


图4 重组菌的 PCR 分析

Fig.4 PCR analysis of the transformants

1:λDNA/*Hind*III + *Eco*R I marker ; 2~7: PCR products of the transformants ; 8: PCR product of G03 ; 9: the negative control ; 10: λDNA/*Hind*III marker.

2.2 目的片段的获得及酵母菌的转化

2.2.1 目的片段的获得:用 PrDNA01、PrDNA02 一对引物 PCR 得到的大小约 5660 bp 的 DNA 片段 18S rDNA:(*Kan-GSH1*)。此片段两端包含酵母 18S rDNA 的序列,内部具有 G418 抗性片段 *Kan* 和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因 *GSH1*。

2.3 重组菌的遗传稳定性分析

将重组菌株 SG1 和受体菌株 G03 在无 G418 选择压力的条件下,连续转接 5 次,统计生长的菌落数。结果表明在含 200μg/mL G418 的 YEPD 平板上受体菌 G03 不能生长,工程菌 SG1 全部可以生长,表明重组菌具有较强的遗传稳定性。

2.2.2 啤酒酵母的转化:纯化 18S rDNA:(*Kan-GSH1*) 扩增片段,醋酸锂法转化酵母菌株 G03,在含 200μg/mL G418 的 YEPD 平板筛选重组子。使该基因片段与 18S rDNA 发生同源重组(图 3)。

2.4 啤酒酵母工程菌的酿造实验

2.4.1 酵母合成谷胱甘肽能力的分析:按照 1.2.8 (1)中的方法进行小试实验。主酵期间每天取样,测定酵母细胞内和发酵液中 GSH 的含量。图 5 显示,随着发酵过程的进行,胞内 GSH 含量逐步增加,但发酵液中 GSH 含量的却是逐渐减少。这可能是因为随着发酵过程的进行,GSH 延缓了自由基反应而自身消耗掉一部分。因此虽然 *GSH1* 基因的拷贝数增加使得工程菌胞内 GSH 的合成量提高,但反映到发酵液中 GSH 的净含量却是逐渐降低。第 6 天主酵结束时发酵液中 GSH 含量,啤酒酵母工程菌 SG1 比受体菌 G03 高 16.6%,酵母细胞内 GSH 含量 SG1 则比 G03 高 60.3%。工程菌相比受体菌胞外 GSH 的含量的增加幅度不如胞内大,可见通过提高啤酒酵母 GSH 的分泌能力来提高啤酒的抗老化能力还是具有广阔的研究前景。

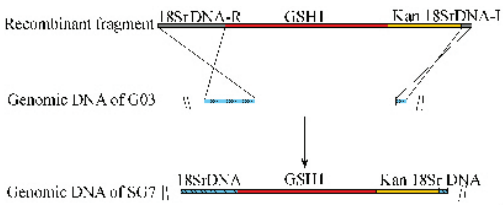


图3 啤酒酵母工程菌的构建

Fig.3 Construction of the recombinant industrial brewing yeast

2.2.3 转化子的验证:重组子 DNA 水平上的鉴定采用 PCR 的方法。在含 G418 的选择性平板上生长出的菌落经划线分离获得单菌落后,命名为 SG1,SG2 等。以重组子染色体 DNA 为模板,引物 PrDNA01 和 PrDNA02 扩增长度约 5.7kb 的 18S rDNA:(*Kan-GSH1*) 基因片段(图 4),说明转化子的 18S rDNA 基因内部已经整合有卡那基因(*Kan*)与 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因(*GSH1*)。从图 4 中可

2.4.2 对啤酒抗老化能力的影响:对发酵 10d 后的成品啤酒进行分析。工程菌 SG1 发酵后啤酒的理

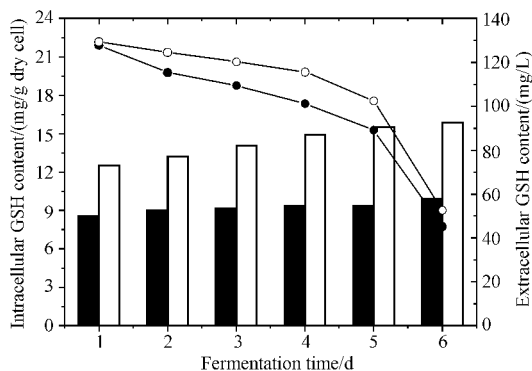


图5 啤酒酵母工程菌和受体菌胞内外谷胱甘肽含量的比较

Fig.5 The intracellular and extracellular content of GSH of the recombinant strain and host strain

Intracellular GSH content of the recombinant (□); Intracellular GSH content of the hos(■); Extracellular GSH content of the recombinant(○); Extracellular GSH content of the hos(●).

化指标如真正发酵度、双乙酰、酒精度等与受体菌G03基本相同(表1),说明基因工程菌的发酵性能并未发生明显的变化。而老化相关指标,如表征老化物质(羰基化合物)含量的TBA降低了13.8%,表征啤酒抗老化能力(自由基清除能力)的DPPH清除量、TRAP值则分别升高了17.6%和15.6%,与感官品评相关性良好的SI则增加了36.5%,可见啤酒的抗老化能力增强显著,而风味稳定性也得到了明显的提高。

表1 啤酒酵母工程菌和受体菌成品啤酒分析
Table 1 Analysis of beer of recombinant strain and host strain (mean ± S. D, n = 3)

Parameter	G03	SG1
TBA	0.29 ± 0.0036	0.25 ± 0.0044
Major staling parameter		
DPPH-scavenging quantity/(mg/L)	31.55 ± 0.96	37.12 ± 0.30
TRAP	0.844 ± 0.044	0.976 ± 0.036
SI	27.59 ± 0.77	37.65 ± 0.52
Routine parameter		
Color/(EBC)	5.5	5.4
pH	4.23	4.21
Diacetyl/(mg/L)	0.08	0.09
Total polyphenol/(mg/L)	186	183
Fermentation degree	65.35	64.96
Ethanol/(% W/W)	3.51	3.59
Flocculation/%	79.90	81.03
Original extract/(% W/W)	11.10	11.00

3 讨论

应用基因工程手段可以在不改变其他发酵性能的基础上对啤酒生产菌株进行改良,具有较好的实际应用前景。啤酒酵母工业菌株一般为原养型多倍

体菌株,需要有适合的酵母显性选择标记来筛选目的转化子,而使用同源重组的方法可以提高基因表达的稳定性。目前已有通过在 α -乙酰乳酸合成酶内部插入GSH1来构建抗老化啤酒酵母工程菌的研究^[2]。与利用低拷贝整合载体相比,本研究以酵母基因组中核糖体DNA为整合位点,利用rDNA具有一定重复单元这一特点使GSH1拷贝数增加,GSH的表达量增加更为显著,较受体菌提高60.3%。这也为建立一套适合工业啤酒酵母的基因操作策略打下基础。目的基因GSH1也来自受体菌株自身,使得工程菌的安全性得到一定程度的保证。而Kan则对啤酒酵母是一个外源基因,因此工程菌还需要对其进行敲除才可以应用到实际生产中。

GSH结构上带有一个活性巯基,可以清除体内的自由基,但正常情况下其不会大量产生,只有通过相应方法如紫外诱变解除GSH对GSH I的反馈抑制,或者提高GSH1的拷贝数才可以实现。啤酒中含有的800多种有机和无机化合物中许多物质具有抗氧化功能^[8],可以作为啤酒中潜在的内源抗氧化剂,它们很大一部分由麦芽和酒花带入,另一部分来自发酵阶段酵母的代谢。提高啤酒内源性抗氧化物质含量可以克服外加抗氧化剂引起的对啤酒风味协调性的破坏。谷胱甘肽是酵母自身在代谢过程中产生的小分子短肽,其不会影响啤酒原有的风味和口感^[2,3]。

随着对啤酒酵母细胞中谷胱甘肽代谢途径研究的深入,相关调控基因不断发现,跨膜分泌机理逐渐阐明^[10],使得在分子水平上对工业酵母进行改造成为可能。通过强化GSH合成酶系可以提高胞内GSH含量,如何使其分泌到胞外也是需要解决的问题之一。GSH是啤酒酵母中硫代谢网络中的一个中间产物,提高其产量的同时还要考虑其他产物,如二氧化硫、硫化氢、二甲基硫等对啤酒风味影响较大的化合物变化。最后,工程菌应用的安全性还需要进一步检验,这样生产的啤酒才会为消费者所接受,最终由生产企业应用到生产实践中。

致谢 感谢江南大学工业生物技术教育部重点实验室沈微副教授、许正宏教授在实验过程中给予的指导和帮助。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Vanderhaegen B, Neven H, Verachtert H, et al. The chemistry of beer aging — a critical review. *Food Chem*, 2006, **95**: 357 –
- © 中国科学出版社微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Zhang JN(张吉娜), He XP(何秀萍), Zhang BR(张博润), *et al.* Genetically modified industrial brewing yeast with high glutathione and low-diacetyl production. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2005, **21**(6):942-946.
- [3] Li X(李崎), Pan X(潘学启), Gu GX(顾国贤). Improvement of beer flavor stability by screening anti-staling brewers' yeast. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004, **20**(6):912-917.
- [4] Fan X, He X, Guo X, *et al.* Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**:415-417.
- [5] Araki S, Kimura A, Shimizu C, *et al.* Estimation of antioxidative activity and its relationship to beer flavor stability. *J Am Soc Brew Chem*, 1999, **57**(1):34-37.
- [6] Onate-jaen A, Bellido-milla D, Hernandez-artiga MP. Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food Chem*, 2006, **97**:361-369.
- [7] Bamforth CW, Muller RE, Walker MD. Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing: a review. *J Am Soc Brew Chem*, 1993, **51**(3):79-88.
- [8] Andersen ML, Outtrup H, Skibsted LH. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**:3106-3111.
- [9] Drakulic T, Temple MD, Guido R, *et al.* Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 2005, **5**:1215-1228.
- [10] Pocs I, Prade AR, Penninx JM. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol*, 2004, **49**:1-76.
- [11] Wheeler GL, Grant CM. Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol Plant*, 2004, **120**:12-20.
- [12] Omura F, Shibano Y. Reduction of hydrogen sulfide production in brewing yeast by constitutive expression of MET25 gene. *J Am Soc Brew Chem*, 1995, **53**(2):58-62.
- [13] Liu XY(刘向勇), Shen Y(沈煜), Guo T(郭亭), *et al.* Construction of a ribosomal DNA multi-copy integration vector and application in the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Shandong University*(山东大学学报), 2005, **40**(3):105-109.
- [14] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, *et al.* *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [16] Yan M(严敏), Li X(李崎), Gu GX(顾国贤). The estimation of endogenesis antioxidative activity of beer by DPPH radical scavenging capacity. *Science and Technology of Food Industry*(食品工业科技), 2005, **26**(8):82-83, 87.
- [17] Guan DY(管敦仪). *Handbook of Brewing Industry*(啤酒工业手册). Beijing: Light Industry Press, 1982.