

研究报告

采用新型药物抗性选育高效黄酒酵母菌株

黄笃厚 陈双 徐岩*

(江南大学 酿酒科学与酶技术中心 酿造微生物与应用酶学实验室 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学教育部工业生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】黄酒酵母菌种是影响大罐黄酒生产效率的关键因素之一, 高发酵性能黄酒酵母的选育对于提升黄酒生产效率具有重要的实用意义。【方法】以一种药物抗性为基础设计快速初筛方法, 对黄酒酿酒酵母 XY 进行诱变筛选得到克霉唑(CTZ)抗性的黄酒酵母突变株, 进一步以酵母发酵性参数为指标筛选得到发酵速率提高的黄酒酵母新菌株 XY-3。【结果】比较突变菌株与原始菌株酿造性能发现, XY-3 菌株最大发酵速率较原始菌株提高 5.21%。黄酒酿造小试结果显示发酵前 4 天 XY-3 菌株乙醇生成速率明显高于原始菌株, 其最大乙醇生成速率从 XY 菌株的 14.77 g/d 提高到 15.30 g/d。XY-3 酵母菌株发酵速率的提高能够缩短黄酒发酵周期 1–2 天, 有助于提高发酵设备的利用效率。进一步研究发现 XY-3 发酵速率的提升可能与 XY-3 菌株多药物抗性(PDR)有关。【结论】联合使用传统诱变和药物抗性筛选策略选育得到高效黄酒酵母新菌株, 这种筛选策略也为发酵食品行业优良菌株的选育提供了一种新的思路。

关键词: 黄酒, 酿酒酵母, 克霉唑抗性, 高发酵速率

Breeding high-efficiency Chinese rice wine yeast by a new drug resistance strategy

HUANG Du-Hou CHEN Shuang XU Yan*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Laboratory of Brewing Microbes and Applied Enzymology, Center of Brewing Science and Enzyme Technology, MOE Key Laboratory and Industrial Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] High fermentation efficiency is desirable for *Saccharomyces cerevisiae* used in the Chinese rice wine brewing. In this study, we developed a drug resistance screening protocol to obtain a Chinese rice wine yeast strain with higher fermentation efficiency. [Methods] Clotrimazole (CTZ)-resistant strains of *S. cerevisiae* were isolated from the parent Chinese rice wine yeast strain. Then fermentation power, fermentation rate, and brewing property were used to screen mutants with higher fermentation efficiency compared with the parent. [Results] A total of 18 stable CTZ-resistant mutants were obtained through UV mutagenesis from Chinese rice wine yeast strain XY. In these 18 CTZ-resistant mutants, strain XY-3 gave a 5.21% higher max-fermentation rate than that of the strain XY by flask fermentation tests. In lab-scale Chinese rice wine brewing, strain XY-3 (15.30 g/d) also

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(No. 2007BAK36B02, No. 2008BAI63B06)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; 信箱: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2013-01-11; 接受日期: 2013-02-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-08

showed a higher maximum fermentation rate than that of strain XY (14.77 g/d), leading to shorter fermentation period of Chinese rice wine brewing by 1–2 days. **[Conclusion]** Combining traditional mutation with CTZ-resistant screening protocol was an efficient approach to screen Chinese rice wine yeasts with higher fermentation efficiency.

Keywords: Chinese rice wine, Yeast, CTZ-resistance, Fermentation rate

黄酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是黄酒发酵和形成黄酒独特风格关键因素之一,对酿酒过程中酒精发酵生成效率和最终产品品质有显著影响^[1],选育高发酵速率黄酒酵母新菌株对于提升黄酒生产效率具有重要意义。目前我国对于优良黄酒酵母菌种的选育工作滞后,技术手段单一,过程繁琐,效率低下^[2-5],且由于食品安全限制,目前发酵食品优良菌株选育主要还是采用诱变手段进行。日本清酒酿造类似我国黄酒,渡边睦等^[6-7]发现真菌抑制剂抗性酵母发酵速率提高,对其它种类酿酒酵母也有类似报道^[8-11]。进一步研究发现药物抗性突变株显示出多药物抗性(PDR)^[7],且研究表明药物抗性造成的酵母胞内 ATP 水平的变化对酵母发酵速率的提升有重要贡献^[12]。故选育药物抗性酵母能有效富集突变株,提高筛选快速发酵优良酿酒酵母效率。虽然药物抗性作为筛选指标广泛存在于其它菌种选育工作,在快速发酵黄酒酵母的筛选中未见报道。

本文首次以克霉唑(CTZ)作为黄酒酵母抗性指标,通过 UV 诱变方法对黄酒酵母 XY 进行诱变处理,筛选稳定的真菌抑制剂 CTZ 抗性黄酒酵母,再通过发酵力为研究指标筛选出发酵速率高的药物抗性黄酒酵母。通过利用传统诱变与药物抗性结合方法对黄酒酵母进行改造筛选,减少了筛选工作,提高了筛选效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

酵母:黄酒酵母 *S. cerevisiae* XY,我国黄酒行业普遍使用的生产菌种,于本实验室保藏。最终获得酵母 XY-3 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为:CGMCC

No. 6329。

酿酒原料:市售糯米;液化酶(10 000 U/mL),糖化酶(50 000 U/mL),酸性蛋白酶(25 000 U/mL)均购于无锡杰能科生物工程有限公司;麦曲由我国某大型黄酒企业提供。

YPD 固体培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母提取物 10,琼脂 20。

YPD 液体培养基(g/L):葡萄糖 20,蛋白胨 20,酵母提取物 10。

发酵培养基:糯米蒸熟后经麦曲,液化酶,糖化酶和酸性蛋白酶处理,将糖度调到 15°Bx。

CTZ 固体培养基:YNB 6.7 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。CTZ 浓度梯度为 0、5、10、15、20、30、40 mg/L。

氯霉素培养基:YNB 6.7 g/L,甘油 20 g/L,氯霉素 2 g/L。

放线菌酮培养基:YNB 6.7 g/L,葡萄糖 20 g/L,放线菌酮 0.1 mg/L。

1.2 试验试剂

Yeast Nitrogen Base without amino acids (YNB)、氯霉素、放线菌酮均购于 Sigma 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵培养基的制备:500 g 糯米 30 °C 浸泡 2 d 后蒸熟,依次加水 1 L,糖化酶、液化酶、酸性蛋白酶各 200 μL,麦曲 75 g,混匀后 60 °C 水浴,间歇搅拌且保温 10 h 后过滤离心,取清液待用。

1.3.2 不同浓度梯度 CTZ 平板配制:配制葡萄糖 20 g/L,YNB 6.7 g/L,琼脂 20 g/L 的基础培养基后,加入不同量 CTZ 配制成浓度梯度分别为 0、5、10、15、20、30、40 mg/L 的 CTZ 平板。

1.3.3 黄酒酵母 CTZ 致死浓度测定:从固体斜面上接种酵母至 10 mL YPD 液体培养基 30 °C 静置

培养活化 24 h, 取样品稀释至 10^{-4} , 将稀释液涂布含有不同浓度梯度 CTZ 平板后, 30°C 培养 7–10 d, 观察酵母生长情况。

1.3.4 药物抗性酵母的获得: 以 UV (照射时间 3 min) 对 XY (200 r/min 摇床培养 8 h 到对数期) 进行诱变, 诱变菌涂布于含致死浓度 CTZ 平板避光培养 7–10 d, 能生长菌株即为药物抗性菌株, 以传代 5 代酵母菌点种至 CTZ 平板检测抗性稳定性。

1.3.5 快速发酵酵母筛选: 以酵母进行 10 mL 发酵培养基发酵 1 d 后, 发酵液残糖浓度与酵母三角瓶发酵最大发酵速率为指标筛选快速发酵酵母, 选择残糖浓度低且最大发酵速率高于 XY 的诱变菌为优良菌, 测定最大发酵速率时发酵结束时间以 CO_2 不再失重为止。

1.3.6 残糖浓度测定: 发酵液经离心取上清液, DNS 法测定还原糖浓度^[13]。

1.3.7 酵母发酵力与最大发酵速率测定: 5 mL 活化后酵母接种于 100 mL 发酵培养基中(带发酵栓三角瓶), 30°C 静置培养, 每隔一段时间测 CO_2 失重情况, 以 CO_2 失重多少代表酵母发酵力, 发酵力数据通过 Origin 求导拟合得到发酵速率曲线, 最大点即酵母最大发酵速率^[14]。

1.3.8 传代稳定性检测: 通过斜面划线传代 30°C 培养, 比较第 1 代、第 10 代及第 20 代发酵力差别。

1.3.9 2 L 黄酒酿造试验研究: 黄酒酿造过程参照陈双等所报道方法进行^[15], 具体过程如下: 1 000 g 糯米浸泡 2 d, 蒸熟后加入水 1 000 mL, 麦曲 150 g, 液化酶与糖化酶各 300 μL , 酵母培养液 250 mL。 30°C 前发酵 4 d 后, 17°C 后发酵 10 d。定时取样测量乙醇浓度及甘油浓度。乙醇及甘油浓度测定采用 HPLC 法进行^[16]。发酵 14 d 结束后过滤, 即为黄酒成品酒。

1.3.10 黄酒总糖, 总酸, 氨基氮, pH 测定: 参照国标方法 GB/T 13662-2008 方法进行。

1.3.11 乙醇耐受性研究: 以 1×10^7 cells/mL 接种量将出发菌株与突变株酵母接种于含 20% (体积比)

乙醇 YPD 培养基, 30°C 静置培养 3 d, 取样以亚甲基美蓝染色法测定酵母死亡率。

1.3.12 多药物抗性研究: 以 1×10^7 cells/mL 接种量将出发菌株与突变菌株酵母接种于氯霉素, 放线菌酮培养基, 30°C 、200 r/min 摇床培养 1 d 后, 检测前后 OD_{600} 变化情况。

2 结果与讨论

2.1 CTZ 抗性菌的分离及抗性稳定性检测

由前期预实验确定了黄酒酵母紫外诱变的最佳试验条件: 菌浓度 1×10^9 cells/mL, UV 处理时间: 3 min, 黄酒酵母致死率为 68.92%。通过不同浓度 CTZ 对黄酒酵母 XY 生长抑制试验得出 CTZ 对黄酒酵母的致死浓度为 20 mg/L, 这与国外的研究结果相似^[6]。图 1 表示以此条件对黄酒酵母 XY 菌株进行紫外诱变处理后的菌株在 20 mg/L CTZ 平板上的生长情况, 能够生长的菌株即为 CTZ 抗性黄酒酵母菌株。分离挑选得到 28 株 CTZ 抗性酵母, 由 CTZ 抗性稳定性实验进一步确定其中有 18 株诱变菌株对 CTZ 抗性稳定, 进入下一轮筛选过程。

2.2 高发酵速率黄酒酵母突变株初筛

最大发酵速率与耗糖能力是黄酒酵母发酵的两个重要指标。发酵液残糖浓度越低, 表示酵母利用糖越完全, 即耗糖能力越强, 因此以发酵液的残糖浓度能表征酵母耗糖能力。如表 1 所示, 综合考



图 1 黄酒酵母诱变菌株 20 mg/L CTZ 平板生长情况
Figure 1 Growth of yeast mutants on 20 mg/L CTZ plate

表 1 酵母发酵液残糖浓度及最大发酵速率		
Table 1 Residual sugar content of fermented medium and maximum fermentation rate of each yeast		
菌株	残糖浓度	最大发酵速率
Strains	Residual sugar content (g/L)	Maximum fermentation rate (g/h)
XY	5.523	0.191
XY-1	5.737	0.188
XY-3	5.494	0.196
XY-4	5.611	0.179
XY-5	5.698	0.190
XY-6	6.058	0.195
XY-7	6.185	0.176
XY-8	5.620	0.191
XY-10	6.029	0.186
XY-11	6.020	0.183
XY-12	6.100	0.181
XY-15	6.564	0.177
XY-16	5.445	0.194
XY-18	5.513	0.198
XY-19	5.620	0.190
XY-21	6.400	0.186
XY-23	5.844	0.191
XY-26	5.523	0.189
XY-28	5.465	0.196

虑酵母发酵液残糖浓度与最大发酵速率，XY-3、XY-16、XY-18 和 XY-28 发酵液残糖浓度低于原始菌株 XY，且最大发酵速率较 XY 高，故可选择 XY-3、XY-16、XY-18 和 XY-28 进入下一轮发酵筛选。比较传统筛选方法，如谢广发报道采用 TTC 平板法所筛选酵母基数为几十株^[2]，毛青钟从传统发酵醪中分离酵母菌为 50 株以上^[17]，而药物 CTZ

抗性筛选方法能富集快速发酵正突变黄酒酵母菌株，富集到 18 株待筛选酵母，且通过试管发酵试验进而筛选得到 4 株黄酒酵母，从而减少筛选酵母基数，提高筛选效率。

2.3 快速发酵酵母复筛及发酵力稳定性检测
通过比较各菌株的发酵力，由表 2 可知 XY-3 优于其它菌株。由图 2 可知，XY-3 最大发酵速率

表 2 各菌株发酵力比较					
Table 2 Fermentation power of each yeast					
发酵时间	CO ₂ 失重				
	CO ₂ weight loss (g)				
Fermentation time (h)	XY	XY-3	XY-16	XY-18	XY-28
0	0	0	0	0	0
9	0.80±0.01	0.84±0.02	0.81±0.01	0.81±0.02	0.80±0.02
14	2.05±0.01	2.15±0.02	2.05±0.03	2.05±0.05	2.05±0.03
19	3.40±0.02	3.60±0.02	3.45±0.04	3.40±0.01	3.45±0.02
23	4.15±0.05	4.31±0.03	4.15±0.04	4.15±0.03	4.15±0.05
32	5.00±0.02	5.20±0.04	4.95±0.02	4.95±0.04	5.00±0.01
37	5.15±0.04	5.26±0.02	5.15±0.02	5.10±0.04	5.20±0.02
55	5.35±0.01	5.45±0.01	5.30±0.04	5.35±0.03	5.35±0.02
60	5.35±0	5.45±0	5.35±0.01	5.35±0	5.35±0

为 0.303 g/h, 较 XY 最大发酵速率达 0.288 g/h 提高 5.21%。且由表 3 可知, XY-3 传代到 20 代发酵力与第 1 代接近, 具有较好的稳定性。故综合以上所述, 可确定 XY-3 为稳定的发酵速率高的优良菌。日本学者渡边睦等发现药物抗性清酒酵母菌在整个发酵过程发酵力均高于原始菌株^[6], 而 XY-3 在后期发酵力与 XY 较近, 这可能是由于日本清酒酿造一直处于低温酿造过程^[7], 而黄酒酵母在 30 °C 发酵测定其发酵力, 而在此温度下黄酒酵母能快速消耗还原糖, 积累乙醇, 从而到发酵结束表现出一致的发酵力。

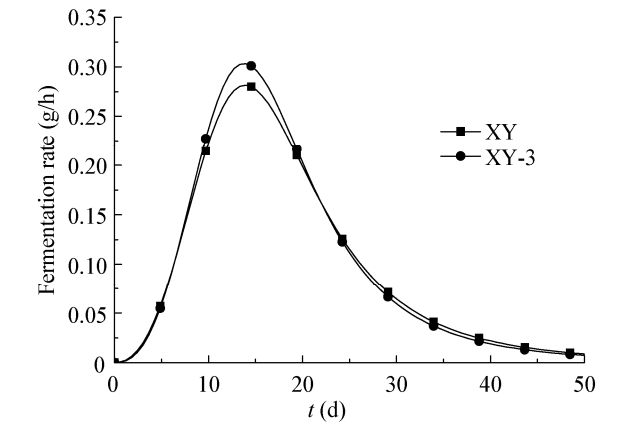


图 2 XY 与 XY-3 发酵速率曲线
Figure 2 Fermentation rate of XY and XY-3

2.4 2 L 黄酒酿造试验研究

为验证黄酒酵母 XY-3 在酿造环境下是否保持优势, 对 XY-3 进行实验室 2 L 黄酒酿造, 由图 3 可知, XY-3 在前酵阶段乙醇生成量与生成速率明显高于 XY, 当发酵至第 4 天时 XY-3 乙醇积累量接近最大值, 而 XY 发酵第 6 天才接近最大值; 后酵时二者一致, 最终乙醇生成量二者相当, 其原因是前 4 天黄酒酵母迅速耗糖, 积累大量乙醇, 故二者前 4 天平均乙醇生成速率是相当的, 正如表 4 所示, 这也是与清酒酿造的差别所在, 而比较前 4 天 XY-3 与 XY 前酵最大乙醇生成速率

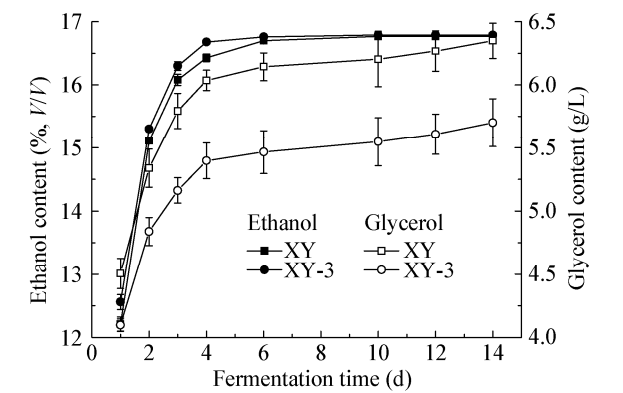


图 3 XY 与 XY-3 黄酒酿造乙醇及甘油浓度变化
Figure 3 Ethanol and glycerol content curve of Chinese rice wine brewed by XY and XY-3

表 3 XY-3 发酵力稳定性 Table 3 Fermentation power stability of XY-3				
发酵时间 Fermentation time (h)	CO ₂ 失重 CO ₂ weight loss (g)			
	XY	XY-3-1	XY-3-10	XY-3-20
0	0	0	0	0
5	0.01±0.01	0.05±0.02	0.05±0.01	0.05±0.02
10	0.48±0.01	0.58±0.08	0.56±0.03	0.56±0.05
15	1.29±0.02	1.45±0.05	1.43±0.07	1.42±0.07
24	3.16±0.05	3.34±0.06	3.38±0.09	3.38±0.06
29	3.74±0.06	4.00±0.05	3.94±0.02	3.97±0.02
34	4.16±0.04	4.26±0.02	4.26±0.02	4.24±0.01
39	4.39±0.01	4.52±0.04	4.53±0.01	4.52±0
48	4.86±0	4.99±0	4.99±0	4.99±0
53	5.12±0	5.15±0	5.14±0	5.15±0
58	5.12±0	5.15±0	5.14±0	5.15±0
63	5.12±0	5.15±0	5.14±0	5.15±0

注: XY-3-n, n 代表传代数。
Note: XY-3-n, n represents the generations.

可知 XY-3 较 XY 高。酿酒酵母在乙醇发酵过程中会产生副产物甘油, Sumio Michnick 与 Elke Nevoigt 研究指出, 酵母甘油产量的增加会降低乙醇的产量或降低乙醇生成速率, 而降低甘油的生成量可提升乙醇生成速率^[18-19], 由图 3 可知, XY-3 的甘油产量低于 XY, 这与 Sumio Michnick 与 Elke Nevoigt 研究结果一致。

如表 5 所示, 从两株酵母菌发酵 14 d 后所酿造黄酒成品酒的理化指标看来, 二者在酒精度、总糖、总酸及氨基氮总量及 pH 差别不大, 因此相对 XY 而言, XY-3 所酿黄酒在一般理化指标上并未产生变化, 总体来说理化指标与王梅报道一致^[20]。通过黄酒国家标准(GB/T 13662-2008)可知, XY-3 黄酒成品符合黄酒国家标准中干型或半干型优级黄酒的标准。

2.5 酵母 XY-3 与 XY 乙醇耐受性与药物抗性研究

日本学者渡边睦等研究发现真菌抑制剂抗性清酒酵母发酵速率的提升与酵母多药物抗性 (PDR)现象的获得直接相关^[7,12,21]。为了初步探索

本研究中 CZT 抗性酵母发酵速率提升的原因, 我们对抗性菌株 XY-3 的乙醇耐受性和其他种类真菌抑制剂抗性进行了分析。如表 6 所示, 在 20% 乙醇耐受性环境中, XY-3 菌株与亲株乙醇耐受能力并没有显著性的差异。但 XY-3 菌株对真菌抑制剂如氯霉素、放线菌酮的抗性较亲株 XY 有明显提高, 显示 XY-3 表现出一定程度的 PDR 现象, 这与渡边睦等^[6-7]的研究结论相符, 因此推测黄酒酵母 XY-3 发酵速率的提升可能与其多药物抗性的获得相关。

表 4 前 4 天最大乙醇生成速率与平均乙醇生成速率 Table 4 Maximum ethanol producing rate and average ethanol producing rate in the first 4 d		
菌株 Strains	最大乙醇生成速率 Maximum ethanol producing rate (g/d)	平均乙醇生成速率 Average ethanol producing rate (g/d)
XY	14.77	4.10
XY-3	15.30	4.15

表 5 成品酒理化比较 Table 5 Physicochemical indexes of Chinese rice wine brewed by XY and XY-3					
菌株 Strains	酒精度 Ethanol content (%，V/V)	总糖 Total sugar (g/L)	总酸 Total acid (g/L)	氨基氮 Amino nitrogen (g/L)	pH
XY	16.77±0.02a	6.30±0.16a	4.26±0.09a	0.78±0.06a	4.20±0.05a
XY-3	16.79±0.01a	6.27±0.13a	4.21±0.11a	0.82±0.04a	4.17±0.05a

注：相同字母表示差异不显著($P\geq0.05$).
Note: Same letters indicate the non-existence of a significant difference between samples ($P\geq0.05$).

表 6 XY-3 与 XY 乙醇耐受性与药物抗性 Table 6 Ethanol tolerance and drug resistance of XY-3 and XY			
菌株 Strains	死亡率(%，乙醇 20%) Lethal rate (%，ethanol 20%)	ΔOD_{600}	
		氯霉素 Chloramphenicol (2 000 mg/L)	放线菌酮 Cycloheximide (0.1 mg/L)
XY	83.54±9.81a	0.02±0.01a	0.98±0.01a
XY-3	78.53±5.55a	0.05±0.01b	1.04±0.01b

注：不同字母表示差异显著($P\leq0.05$), 相同字母表示差异不显著($P\geq0.05$).
Note: Different letters indicate the existence of a significant difference between samples ($P\leq0.05$), same letters indicate the non-existence of a significant difference between samples ($P\geq0.05$).

3 结论

选育高发酵速率黄酒酵母菌株对提高黄酒生产效率具有重要意义,本文在高发酵速率黄酒酵母选育过程中首次通过以 CTZ 抗性为指标,有效富集突变株,实现了目标菌株的高效筛选。所筛选优良黄酒酵母菌 XY-3 最大发酵速率较原始菌株 XY 提高 5.21%, 药物抗性试验显示 XY-3 表现出多药物抗性表型,这可能是其发酵速率提升的原因。CTZ 抗性作为筛选指标选育快速发酵优良黄酒酵母,能提高筛选效率,对优良黄酒酵母的选育具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, et al. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history[J]. Molecular Ecology, 2007, 16: 2091-2102.
- [2] 谢广发, 郑志强, 马晋, 等. 快速发酵黄酒酵母菌的筛选[J]. 中国酿造, 2010, 221(8): 12-14.
- [3] Li Y, Park JY, Shiroma R, et al. Improved ethanol and reduced xylitol production from glucose and xylose mixtures by the mutant strain of *Candida shehatae* ATCC 22984[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166: 1751-1790.
- [4] 王晓娟. 低产尿素黄酒酵母的选育及黄酒发酵工艺研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2009.
- [5] 张建伟, 肖冬光, 张翠英, 等. 优良黄酒酵母单倍体的分离筛选[J]. 酿酒科技, 2010, 191(5): 36-41.
- [6] 広畑修二, 渡辺睦, 西村顕, 等. 清酒酵母のクロトリマゾール耐性株の醸造特性[J]. 生物工学会誌, 1994, 72(4): 283-289.
- [7] 溝口弘子, 渡辺睦, 西村顕, 等. クロトマゾール耐性の付与による清酒酵母の発酵力改善[J]. 生物工学会誌, 1998, 76(5): 194-199.
- [8] Graves T, Narendranath N, Ronan P. Development of a "Stress Model" fermentation system for fuel ethanol yeast strains[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2007, 113(1): 263-271.
- [9] Dominic P, Frederic D, Stephen B, et al. *Saccharomyces cerevisiae* genome shuffling through recursive population mating leads to improved tolerance to spent sulfite liquor[J]. Applied and Environmental, 2011, 77(4): 4736-4743.
- [10] Jones R, Russel I, Stewart G. The use of catabolite derepression as a means of improving the fermentation rate of brewing yeast strains[J]. Journal of the Master Brewers' Association of the Americas, 1989, 26: 56.
- [11] Ana M, Antonio C, Francisco C, et al. Improved properties of Baker's yeast mutants resistant to 2-Deoxy-D-Glucose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4279-4285.
- [12] Mutsumi W, Hiroko M, Akira N. Disruption of the ABC transporter genes *PDR5*, *YOR1*, and *SNQ2*, and their participation in improved fermentative activity of a sake yeast mutant showing pleiotropic drug resistance[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(6): 569-576.
- [13] 赵凯, 许鹏举, 谷广辉. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
- [14] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 189-191.
- [15] Chen S, Xu Y. The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2010, 2(116): 190-196.
- [16] Takashi W, Itsuki W, Mami Y, et al. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 1844-1848.
- [17] 毛青钟. 传统绍兴黄酒发酵醪中酵母的分离及其生物学特性研究[J]. 江苏调味副食品, 2007, 25(4): 18-24.
- [18] Michnick S, Roustan JL, Remize F, et al. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase[J]. Yeast, 1997, 13(9): 783-793.
- [19] Neviogt E, Pilger R, Mast-Gerlach E, et al. Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer[J]. FEMS Yeast Research, 2000, 2(2): 225-232.
- [20] 王梅. TTC 在黄酒酵母选育中的应用[J]. 酿酒, 2001, 28(5): 62-64.
- [21] Mizoguchi H, Watanabe M, Nishimura A. Characterization of a *PDR1* mutant allele from a clotrimazole-resistant sake yeast mutant with improved fermentative activity[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 88(1): 20-25.