酿酒酵母乙醇脱氢酶 II 基因反义干扰及对乙醇发酵的影响

薛婷[1,2]，陈栋才[1,2]，柳燕[1,2]，苏小玫[1,2]，林荣华[1,2]，陈由强[1,2]
（1.福建师范大学生命科学学院，福建福州 350117）（2.福建省发育与神经生物学重点实验室，福建福州 350117）

摘要：通过构建酿酒酵母沉默表达载体 PURH-ADH2，使 ADH2 基因在 PGK 强启动子、CYC1 终止子在特定区域内进行干扰和表达。采用 BamHI 和 XmalI 限制性内切酶对 SADH2 基因和 PURH 质粒进行双酶切，构建反义重组表达质粒 PURH-SADH2，通过高效酵母转化法和电转法将重组质粒组件转化至酿酒酵母 SY01 细胞中，获得阳性克隆菌株 JY01。酿酒酵母 JY01 突变菌株与出发菌株 SY01 和 Y01 发酵试验结果相比，JY01 甘油脱氢酶酶活比出发菌株 Y01 与 SY01 分别下降了 16.31%和 13.5%；当酿酒酵母 Y01、SY01 和 JY01 菌株发酵 36~60 h 时，JY01 菌株甘油含量相比 Y01 分别下降了 16.34%、14.25%、14.89%；当酿酒酵母突变菌株发酵 48 h 时，Y01、SY01 和 JY01 的乙醇浓度分别为 6.243 g/100 mL、7.145 g/100 mL 和 7.288 g/100 mL，酿酒酵母 JY01 发酵液乙醇量比比原始菌株 Y01 乙醇含量提高了 14.33%。结果表明通过反义干扰 ADH2 基因 5’ UTR 序列，能有效干扰酵母工程菌株 ADH2 转录与表达，削弱甘油积累途径，促进乙醇代谢途径。

关键词：酿酒酵母；乙醇脱氢酶；甘油脱氢酶；PURH-ADH2；PCR
文章篇号：1673-9078(2015)11-135-141 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.022

Anthocyanin Antisense Interference of Ethanol Dehydrogenase II in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Influence on Ethanol Fermentation

XUE Ting[1,2], CHEN Dong-cai[1,2], LIU Yan[1,2], SU Xiao-mei[1,2], LIN Rong-hua[1,2], CHEN You-qiang[1,2]
(1.College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)
(2.Key Laboratory of Developmental and Neural Biology, Fuzhou 350117, China)

Abstract: The aim was to interfere with and repress the expression of the alcohol dehydrogenase II (*ADH2*) gene in a specific region by constructing a silencing expression vector *PURH-ADH2*. The silencing expression vector contained the *ADH2* gene, a PGK strong promoter, and a *CYC1* terminator. Using *Bam*HI and *Xma*I restriction enzymes for the double digestion of the *SADH2* and *PURH* plasmid, the antisense recombinant expression plasmid *PURH-SADH2* was constructed. Through high-efficiency yeast transformation and electroporation, the recombinant plasmid components were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* SY01 cells, and positive JY01 clone strains were obtained. Fermentation test results of the *S. cerevisiae* JY01 mutant strain compared with the original strains, SY01 and Y01, showed that glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity decreased by 16.31% and 13.5%, respectively. When *S. cerevisiae* Y01, SY01, and JY01 were fermented for 36 h, 48 h and 60 h, the glycerol production of JY01 decreased by 16.34%, 14.25%, and 14.89%, respectively, compared with that in the original Y01 strain. After a 48-h fermentation, the ethanol concentrations of Y01, SY01, and JY01 were 6.243 g/100 mL, 7.145 g/100 mL, and 7.288 g/100 mL, respectively. The ethanol production of JY01 was 14.33% higher than that observed in the original Y01 strain. Results showed that the antisense interference of the *ADH2* 5′ UTR sequence can effectively interfere with *ADH2* transcription and expression in engineered yeast strains, weaken glycerol accumulation pathways, and promote ethanol-metabolic pathways.

Key words: alcohol dehydrogenase; glycerol dehydrogenase; polymerase chain reaction (PCR); *PURH-SADH2*; *Saccharomyces cerevisiae*

收稿日期：2015-01-05
基金项目：现代农业产业技术体系建设专项资金（CARS-20-4-4）
作者简介：薛婷（1988-），女，助理实验师，研究方向：生物化学与分子生物学
通讯作者：陈由强（1956-），男，教授，博导，研究方向：植物生理与分子生物学

酿酒酵母中乙醇脱氢酶Ⅰ、乙醇脱氢酶Ⅱ、乙醇脱氢酶Ⅲ、乙醇脱氢酶Ⅳ和乙醇脱氢酶Ⅴ等五个基因与乙醇代谢相关，其中 ADH2 催化乙醇氧化为乙醛[1~2]。当培养基中葡萄糖消耗殆尽时，ADH2 能够催化乙醇生成乙醛，导致乙醇合成量的大大减少。当乙醇作为唯一碳源时，缺少乙醇脱氢酶 II 活性的菌株生长受到抑制，导致副产物甘油的积累[3]。甘油是酿酒酵母乙醇代谢途径中的主要副产物,降低甘油生成，可以提高乙醇的产率和原料的利用率。因此，干扰乙醇脱氢酶Ⅱ途径产乙醛，可提高酵母乙醇的合成能力。酿酒酵母 ADH1 和 ADH2 序列的相似性近达 90%，但对底物的亲和力存在显著的差异性。大量研究表明，ADH2 在葡萄酒的生物老化过程中起着关键的作用[4]，如酿酒酵母在含有高浓度乙醇的介质中生长能够产生大量的乙醛[5~7]。与 mRNA 互补或与其它 RNA 互补的 RNA 分子统称之为反义 RNA。当反义 RNA 与 mRNA 特异性的互补结合，这在某种程度上抑制了 mRNA 的翻译。应用反义 RNA 是原核生物基因表达调控的方式之一。近几年来经过人工操作合成反义 RNA，并将其导入细胞内形成二聚体 RNA 复合物，实现阻断特定基因的转录和表达[8~9]。曹罗元[10]等应用重叠延伸 PCR 融合甘油-3-磷酸脱氢酶基因和 KanMX 筛选标记基因，构建 pYES2.0-GPD1/KanMX 反义表达载体，获得的突变菌与原始菌株相比，甘油脱氢酶比活力下降了 20.04%，乙醇合成量提高了 9.74%。本研究通过构建酿酒酵突变菌 SY01ADH2 基因 5'UTR 互补的反义表达载体 *PURH-SADH2*，产生与 ADH2mRNA 5'UTR 互补的反义 RNA，干扰了 ADH2 基因转录，削弱甘油积累途径，促进乙醇代谢途径，为酵母菌的基因改良提供了积极的理论实践基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

菌株：酿酒酵母工程菌Y01（*Saccharomyces cerevisiae*Y01）和酿酒酵母突变菌SY01（Y01-GPD1沉默突变菌）保存于福建师范大学农业部甘蔗遗传改良重点实验室。pSH65 质粒、大肠杆菌 *DH5α*(*Escherichia.coil*)、pUG6质粒由福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心黄建忠教授赠予。

PURH 过表达质粒由福建师范大学农业部甘蔗遗传改良重点实验室保存，该质粒带有 rDNA 片段，PGK 强启动子，CYC1 终止子以及 *KanMX* 抗性基因筛选标记。pMD-19T 克隆载体从 Takara 公司购买所得。

1.2 主要试剂

限制性内切酶BamH I、Xma I（Xma I与Sma I酶切位点一样，但酶切结果不一样，Xma I产生粘性末端，Sma I产生平末端）购于NEB（北京）公司，T4 DNA 连接酶和Ex Taq高保真酶在Takara公司购买所得，PCR 扩增引物均由软件设计后送上海生工生物工程有限公司合成。G418、zeocin购于BBI和Sigma公司，凝胶纯化试剂盒购自Promega公司。

1.3 主要仪器设备

高速冷冻离心机（型号：H-2050R；公司：长沙湘仪离心机仪器有限公司）；隔水式恒温培养箱（公司：上海一恒科学仪器有限公司）；Real-Time PCR System（型号：7500；公司：美国 Applied Biosystems）；Thermal Cycler PCR 仪（型号：2720；公司：美国 Applied Biosystems）；超净台（型号：HJ-CJ-1D；公司：上海苏净实业有限公司）；恒温摇床（型号：THZ-82A；公司：国华企业）；紫外分光光度计（公司：上海美谱达）；FID 检测器（公司：Agilent）；数显三用恒温水浴箱（公司：上海朗比仪器有限公司）；台式高速离心机（型号：D-37520；公司：美国 Thermo）。

1.4 试验方法

1.4.1 扩增引物的设计

根据GenBank公布的酿酒酵母乙醇脱氢酶Ⅱ基因序列，采用5'UTR 反义RNA设计原则，设计该菌株ADH2基因5'UTR反义RNA序列。PCR扩增与酿酒酵母Y01 ADH2 5'UTR互补的DNA序列（命名为*SADH2*基因），通过*BamH I*、*Xma I*双酶切反向插入到表达载体PURH，构成反义表达载体*PURH-SADH2*，在F1/F2引物的5'端添加*BamH I*、*Xma I*限制性酶切位点及保护碱基，设计引物F1、F2，用于扩增*SADH2*基因片段。

F15' **CG**GGATCCCATACAATCAACTATCAACT 3'

F25' **TCCC**CCCGGGAATATTATCTTTTATTC 3'

注：下划线部分为引物添加的酶切位点，粗体部分为酶切位点的保护碱基。

1.4.2 *SADH2* 基因扩增与克隆

以提取的酿酒酵母 RNA 为模板，PCR 扩增体系与程序如下：预变性：95 ℃（5 min）、变性：94 ℃（30 s）、退火：56 ℃（30 s）、延伸:72 ℃（40 s）。将扩增得到的片段胶回收纯化后与 pMD-19T 克隆过夜连接并转化大肠杆菌 *DH5α*，涂布含氨苄青霉素的 LB 平板。挑取白色菌落，37 ℃，220 r/min，摇菌过

夜，提取质粒进一步用酶切和测序鉴定。阳性重组质粒命名为 *PURH-SADH2*。

1.4.3 反义干扰表达质粒的构建与验证

PCR 扩增获得乙醇脱氢酶Ⅱ5'UTR 互补的 DNA 序列 *SADH2* 片段，应用 *BamH I*、*Xma I* 双酶切反向插入到表达载体 *PURH* 的 PGK 强启动子与 CYC1 终止子之间，构成反义干扰表达载体 *PURH-SADH2*，如图 1 所示。

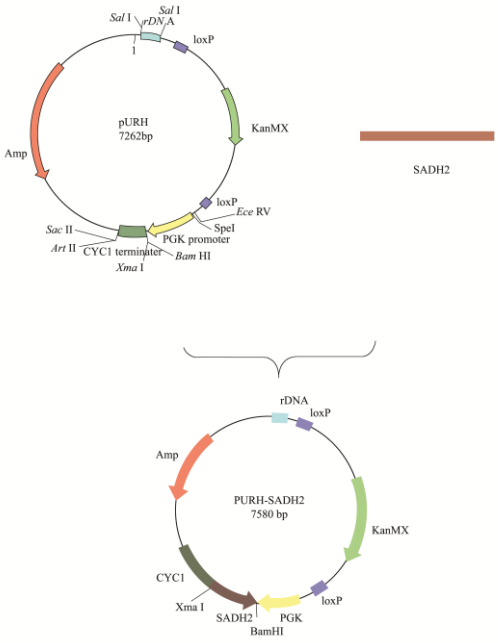


图 1 重组质粒图谱

Fig.1 Recombinant plasmid

1.4.4 酿酒酵母 Y01、SY01、JY01 生长试验

将 Y01、SY01、JY01 菌株于 YPD 固体培养基划线培养，分离得到的菌落分别接种到 YPD 培养基中，30 ℃，200~220 rpm，隔 2 h 取 2~3 mL 的菌液用于吸光值检测，绘制其生长曲线。

1.4.5 葡萄糖标准曲线的绘制

精确称取葡萄糖 0.05 g 于 100 mL 的烧杯中，加入蒸馏水搅拌直至充分溶解，转移到容量瓶中进行定容并上下颠倒混匀，得葡萄糖标准溶液为 1.00 mg/mL。以 OD_{540} 光度值为 Y 轴，葡萄糖含量值为 X 轴绘制标准曲线（图 2），回归方程：y=1.4265x+0.0225（R^2=0.9977）。

1.4.6 发酵液残糖的测定

每 12 h 在超净台取发酵液 5 mL 于玻璃试管中（20 mL），添加 20%硫酸 5 mL 进行混匀，沸水浴反应 25~30 min 后立即用冷水冷却至室温，用 20% NaOH 溶液中和即停止反应，过滤后定容至 10 mL，采用 DNS 法[13]测定溶液中发酵残糖的浓度。

1.4.7 甘油脱氢酶酶活测定

在含有400 μg/mLG418的YPD平板上挑选阳性克隆子，4000×g ，离心5 min收集菌体细胞，并用PBS缓冲（pH 7.0）液清洗2~3次。采用超声波提取技术，在800 W，工作3 s，停止2 s，50循环的体系下处理菌体细胞获得粗酶液。向96孔板中加入检测反应液0.1 mL(三乙醇胺磷酸缓冲液（pH=8；0.5%牛血清白蛋白；0.18 mmol/L NADH；1 mmol/L二羟丙酮磷酸)[10]，37 ℃，5 min。再加入0.1 mL粗酶液，30 ℃放置5 min，在340 nm波长下测定酶反应过程中的吸光值[7]。酶活力单位的定义为在30 ℃条件下，1 min氧化1 μmoL NADH的酶量。

1.4.8 甘油含量测定

分别按照 5%接种量，将酿酒酵母菌株 Y01、SY01 与 JY01 三组平行样接至 150 mL YPD 液体培养基中进行 30 ℃发酵，12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 取样，按照德国罗氏甘油检测试剂盒（BioVision,Shanghai,China）说明检测甘油含量。

1.4.9 乙酸、乙醇含量测定

应用德国 Roche 乙醇检测试剂盒（BioVision, Shanghai,China）操作方法和气相色谱分别检测发酵液中乙醇和乙酸的含量。将 Y01、SY01 与 JY01 菌株按照 1:20 的比例加入到 150mLYPD 液体培养基中进行 30 ℃发酵（三组平行实验），测定 12~120 h 发酵培养期间的乙醇含量，并于发酵结束后检测乙酸的含量。

1.4.10 数据分析

每组实验做三个平行，实验数据表示为 mean±SE，采用单向 ANOVA 法分析多组平均值的差异显著性，并采用 Tukey 法进行多重范围检验。t 检验被用来评估统计两组之间的差异显著性。P<0.05 表示实验数据差异显著。

2 结果分析

2.1 *SADH2* 基因扩增与克隆

根据酿酒酵母乙醇脱氢酶序列设计引物 F1、F2，以酿酒酵母总 RNA 为模板进行 PCR 扩增，获得酿酒酵母 ADH2 基因 5'UTR 反义组件 *SADH2*。电泳结果表明，DNA 片段大小符合预设计反义组件 *SADH2* 的片段大小为 318 bp（图 2）。为了进一步验证 *SADH2* 基因反义序列的准确性，将回收后的片段与 PMD-19T 克隆载体按一定的比例过夜连接，转化大肠杆菌进行菌落 PCR 验证及测序，结果与预期大小一致（图 3）。

2.2 PURH-SADH2 载体构建及验证

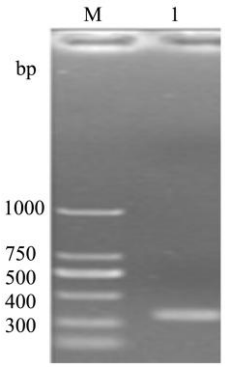


图 2 *SADH2* PCR 产物

Fig.2 *SADH2* amplification

注：M: 1000 DNA Marker; Lane1: *SADH2* 318 bp。

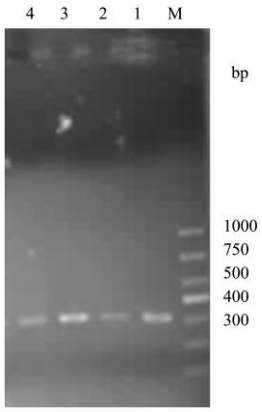


图 3 菌液 PCR 验证

Fig.3 Bacterial PCR validation

注：M: 1000 DNA Marker; Lane 1-4: *SADH2* 基因大小 318 bp。

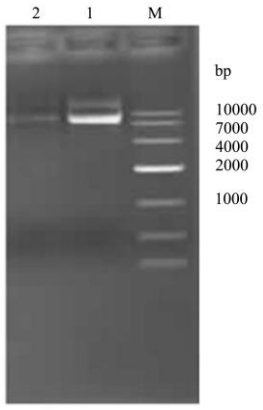


图 4 *PURH-SADH2* 重组子酶切鉴定结果

Fig.4 *PURH-SADH2* digestion

注：M: 10000 DNA Marker; Lane1: *PURH-SADH2* 质粒双酶切，Lane2: PURH-SADH2 质粒 BamH I 单酶切。

2.3 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 生长曲线测定

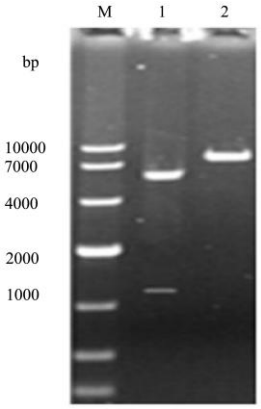


图 5 PURH-SADH2 重组子酶切鉴定结果

Fig.5 *PURH-SADH2* digestion

注：M:10000 DNA Marker; Lane1: PURH-SADH2 质粒 Spe I/Sac II 双酶切; Lane2: PURH-SADH2 质粒 BamH I 单酶切。

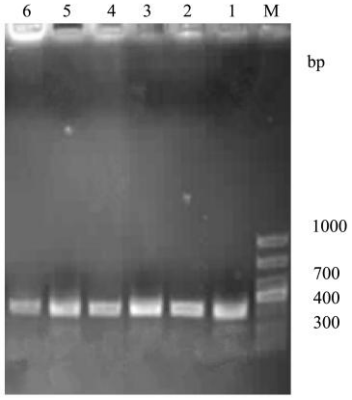


图 6 *PURH-SADH2* 重组子酵母基因组 PCR 验证

Fig.6 PCR verification of the *PURH-SADH2* recombinant yeast genome

注：M: 1000 DNA Marker; Lane 1~6: *SADH2* 基因大小为 318 bp。

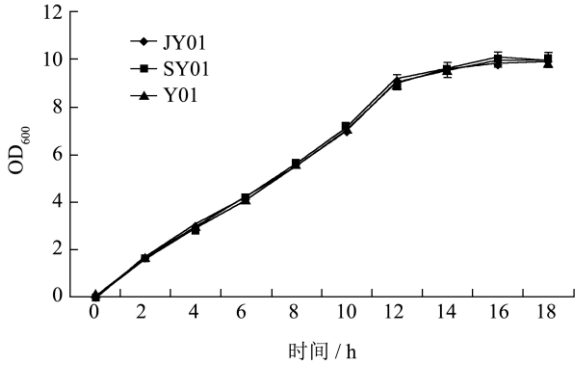


图 7 酿酒酵母 JY01、SY01、Y01 生长曲线测定

Fig.7 Culture curve of *Saccharomyces cerevisiae* JY01, SY01, and Y01

提取载体 PURH-SADH2 质粒，采用 Bam HI 单酶切与 Spe I/Sac II 双酶切鉴定，得到两条带大小与预

期相符（图 4、图 5）。以重组菌的基因组 DNA 为模板，以 F1、F2 为引物 PCR 扩增目的片段（图 6），扩增大小与预期一致。通过单双酶切比较，说明 PURH-SADH2 反义表达载体构建成功。

接种酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 菌株于 YPD 培养基，30 ℃，220 r/min 培养，每隔 2 h 取样检测 OD_{600} 值。每组做三批实验取其平均值，以 OD_{600} 值为 Y 轴，时间为 X 轴来绘制标准生长曲线（图 7）。对 8~12 h 对数期平均比生长速率做 t-检验，发现 SY01 与 JY01 在 α=0.05 的 t<t 临界值，说明 Y01、SY01 经 ADH2 基因干扰沉默后，其生长性状不存在差异性。

2.4 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 发酵残糖测定

将 JY01、SY01、Y01 分别接种至 150 mL 的发酵培养基中进行厌氧发酵。每 12 h 取发酵液，取 1 mL 预处理的发酵液于试管（10 mL）中，加入 1.5 mL 已配制的 DNS 试剂混匀沸水显色后冷却，加蒸馏水定容至 10 mL 充分摇匀，在 OD_{540} nm 波长处测定光密度吸收值，三组平行取平均值，按葡萄糖标准曲线给出的方程计算出相应的残糖量作图（图 8）。从图中可以看出，出发菌株 Y01、SY01 在 72 h 时葡萄糖基本消耗，而相对与出发菌株，突变株 JY01 的残糖一直较高，葡萄糖的消耗速率也比较慢，糖耗时间长，说明突变株 JY01 在一定程度上抑制了糖的代谢。

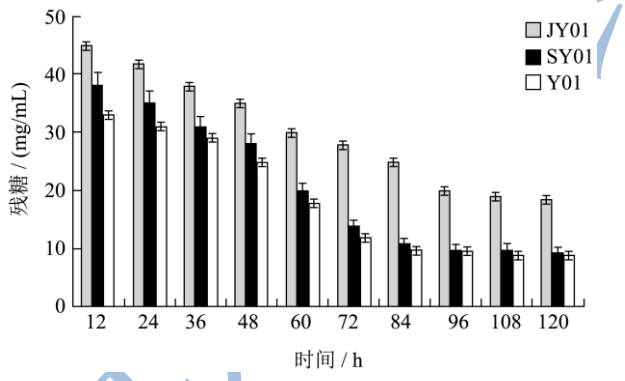


图 8 酿酒酵母 JY01 与 SY01 发酵残糖量分析

Fig.8 Residual sugar in JY01 and SY01 after fermentation

2.5 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 GPDH 酶活检测

采用 PEG/LiAc/ssDNA 方法将 *PURH-SGPD1* 重组质粒转化到酿酒酵母 SY01 菌种中，并在含有 200~400 μg/mL G418 的 YPD 平板，30 ℃培养，2~5 d，获得的阳性克隆子命名为 JY01。Y01、JY01 和 SY01 于发酵培养基中培养，在 12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 等阶段取三组平行样检测甘油-3-磷酸脱氢酶的比活力，可通过检测 NADH 的变化量来测定甘油磷酸脱氢酶酶活（图 9）。当发酵在 36 h 时，JY01 甘油脱氢酶酶活相比 Y01 与 SY01 的甘油脱氢酶酶活分别下降 14.22%和 11.14%；当发酵在 72 h 时，JY01 甘油脱氢酶酶活相比 Y01 与 SY01 的甘油脱氢酶酶活分别下降了 16.31%和 13.5%。

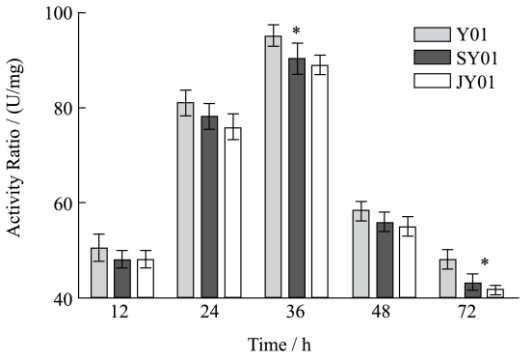


图 9 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 甘油脱氢酶比活力

Fig.9 GPDH activity ratio of *Saccharomyces cerevisiae* Y01, SY01, and JY01

注：*P<0.05（36h: t=4.836，p<0.01;72h:t=5.18,p<0.01）。

2.6 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 甘油含量检测

分别按照 5%接种量，将酿酒酵母菌株 Y01、SY01 与 JY01 三组平行样接至 50 mL 培养基中进行 30 ℃发酵，12、24、36、48、60、72 h 取样按照德国罗氏甘油检测试剂盒说明检测甘油含量（图 10）。当酿酒酵母 Y01、SY01 和 JY01 菌株发酵 36~60 h 时，JY01 菌株甘油含量相比 Y01 分别下降了 16.34%、14.25%、14.89%，当发酵 36 h 时，酿酒酵母 JY01 菌株的甘油含量比 Y01 菌株下降达到最大。

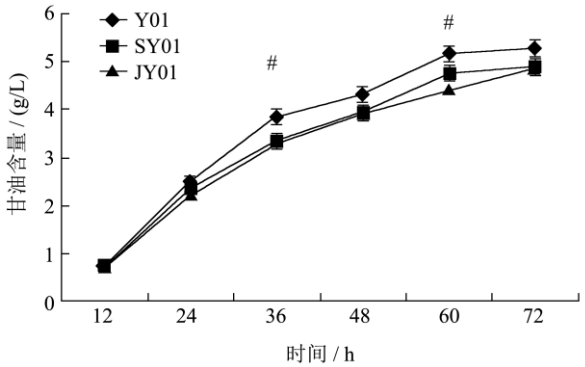


图 10 酿酒酵母 Y01 菌株、SY01 与 JY01 菌株甘油检测

Fig.10 Determination of glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* Y01, SY01, and JY01

注：#P<0.05。

2.7 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 菌株乙酸、乙醇含量检测

应用德国 Roche 乙醇检测试剂盒操作方法，将 Y01、SY01 与 JY01 在同等条件下发酵培养（三组平行实验），测定 12~120 h 发酵培养期间，每隔 12 h 取样检测，结果如图 11。

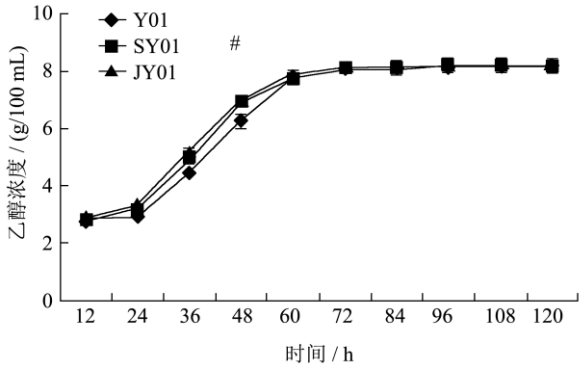


图 11 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 乙醇含量检测

Fig.11 Determination of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* Y01, SY01, and JY01

从图 11 可得，当酿酒酵母突变菌株发酵 48 h 时，Y01、SY01 和 JY01 的乙醇浓度分别为 6.243 g/100 mL、7.145 g/100 mL 和 7.288 g/100 mL。酿酒酵母 JY01 发酵液乙醇量比原始菌株 Y01 乙醇含量提高了 14.33 %。

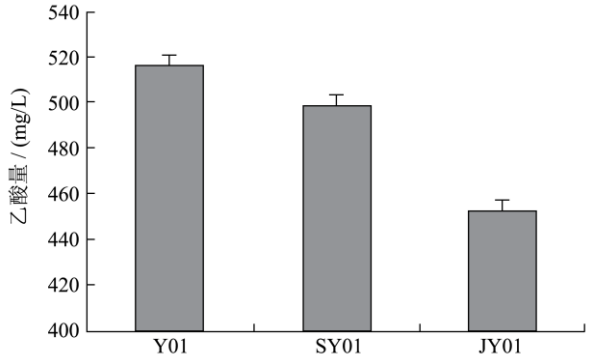


图 12 酿酒酵母 Y01、SY01 与 JY01 乙酸含量检测

Fig.12 Determination of acetate in *Saccharomyces cerevisiae* Y01, SY01, and JY01

发酵结束后检测乙酸含量，突变株 JY01 的乙酸合成量较出发菌株 Y01 降低了 13.87%。结果如图 12。

3 结论

酿酒酵母乙醇脱氢酶II是酿酒酵母中重要的乙醇氧化酶，它能够将乙醇氧化成乙醛，经乙醛脱氢酶的催化进一步转化为乙酸，最后进入三羧酸循环，为生物体提供能量。在发酵培养过程中，当葡萄糖消耗殆尽时，ADH2开始利用乙醇作为碳源，催化乙醇生成乙醛，导致乙醇合成量的大大减少。因此，破坏ADH2催化乙醇分解代谢反应能提高酿酒酵母合成乙醇的能力。如王艳尊[2]等以酿酒酵母乙醇脱氢酶II基因缺陷型YS2-△adh2为出发菌株，应用同源重组方法二次PCR扩增，结合重叠延伸PCR构建乙醛脱氢酶Ⅵ（ald6）基因敲除组件，成功获得基因缺失突变的YS2-△adh2-△ald6菌株，与出发菌株相比，突变菌乙醇产量提高了12.5%。但一些研究表明，绝大多数细胞难以发生同源重组介导的基因敲除，基因敲除成功的几率低且敲除突变菌株对渗透压非常敏感，不利于酵母的生长；同时，由于基因拷贝数或基因同效，使基因敲除后不能达到基因功能全无的效果。本研究通过构建酿酒酵突变菌SY01ADH2基因5’UTR互补的反义表达载体*PURH-SADH2*，产生与ADH2mRNA 5’UTR 互补的反义RNA，应用反义RNA 技术对ADH2基因5’UTR序列进行沉默，干扰ADH2催化乙醇氧化为乙醛的反应，促进乙醇代谢途径，以获得高产的乙醇突变菌株并能较好地保留该基因的代谢功能。本研究通过*BamHI*和*XmalI*对*SADH2*和*PURH*质粒进行双酶切，构建反义重组表达质粒*PURH-SADH2*，通过高效酵母转化法和电转法[12]结合将线性化的重组质粒组件转化至酿酒酵母SY01细胞中，经煮冻煮和蜗牛酶酶解法结合破酵母细胞壁后，进行菌液PCR，获得阳性克隆菌株（命名JY01）。突变菌株JY01与对照菌Y01相比，甘油脱氢酶酶活（GPDH）下降幅度达到16.31%；当发酵培养48h时，Y01、SY01和JY01等三株菌株的乙醇浓度分别达到6.243 g/100 mL、7.145 g/100 mL和7.288 g/100 mL，且JY01乙醇量比对照菌株Y01提高了14.33%。实验结果表明，酿酒酵母乙醇脱氢酶基因mRNA5’UTR的反义RNA能在某种程度上降低酿酒酵母ADH2基因的转录水平，通过反义RNA技术对特定基因进行沉默，为酿酒酵母菌株的基因改良奠定了积极的理论实践基础。

参考文献

[1] 郭晓贤.酿酒酵母乙醇脱氢酶Ⅱ基因的敲除[D].福建省福州:福建师范大学,2007
GUO Xiao-xian. KnockoutAlcohol Dehydrogenase GeneⅡin *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Fuzhou:Fujian Normal University, 2007

[2] 王艳尊,雷娟娟,江贤章,等.酿酒酵母 adh2 和 ald6 双基因缺失突变株的构建[J].微生物学通报,2009,2:211-216
WANG Yan-zun, LEI Juan-juan, JIANG Xian-zhang, et al.

Construction of *saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in adh2 and ald6 genes [J]. Microbiology China, 2009, 2: 211-216

[3] I N Grigorieva, T I Romanova, V N Maksimov, et al. ADH2 gene polymorphism and alcohol consumption style in chronic pancreatitis [J]. Pancreatology, 2013, 13: 283–287

[4] Leanne M Timpson, Ann-Kathrin Liliensiek, Diya Alsafadi, et al. A comparison of two novel alcohol dehydrogenase enzymes(adh1 and adh2) from the extreme halophile haloferaxvolcanii [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 195-203

[5] Viviana Paianoa, Giancarlo Bianchia, Enrico Davolia, et al. Risk assessment for the italian population of acetaldehyde in alcoholic and non-alcoholic beverages [J]. Food Chemistry, 2014, 154: 26-31

[6] Yoshimi Matsufuji, Kohei Yamamoto, Kosei Yamauchi, et al. Novel physiological roles for glutathione in sequestering acetaldehyde to confer acetaldehyde tolerance in *saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(1): 297-303

[7] BosuKim1, Bo-Ram Cho2, Ji-Sook Hahn. Metabolic engineering of *saccharomyces cerevisiae* for the production of 2-phenylethanol via ehrlich pathway [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 111(1): 115-124

[8] Ariel A Bazzini, Miler T Lee, Antonio J Giraldez. miRNA-Mediated gene silencing by translational repression followed by mrna deadenylation and decay [J]. Science, 2012, 336(6078): 237-240

[9] Lukas Stalder, WolfHeusermann, LenaSokol, et al. The rough endoplasmatic reticulum is a central nucleation site of sirna-mediated rna silencing [J]. The EMBO Journal, 2013, 32(8): 1115-1127

[10] 曹罗元.酿酒酵母 ALD4 基因敲除与 GPD1 基因沉默研究[D].福建省福州市:福建师范大学,2010

CAO Luo-yuan. Study on ALD4 Gene Disruption and GPD1 Silencing in *Saccharomyces Cerevisiae* Industrial Strain Y01 [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2010

[11] WenjinHe, ShichaoYe, TingXue, et al. Silencing the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *saccharomyces cerevisiae* results in more ethanol being produced and less glycerol [J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(12): 1375-1377

[12] 薛婷.酿酒酵母乙醇脱氢酶与 3-磷酸甘油脱氢酶基因沉默研究[D].福建省福州市:福建师范大学,2011

XUE Ting. Silencing the alcohol dehydrogenase and the glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes in *saccharomyces cerevisiae* [D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2011

[13] 孙小丁,姜守刚,杨丽新.DNS 法测定谷氨酸发酵过程中总糖的研究[J].发酵科技通讯,2009,38(3):22-25

SUN Xiao-ding, JIANGShou-gang, YANG Li-xin. Determination of total sugar in glutamate fermentation by dns method [J]. The Fermentation Technology of Communication, 2009, 38(3): 22-25

现代食品科技