分类号：TS261 单位代码：10389

密 级： 学 号：2081203

**福建农林大学博士学位论文**

降酸酵母菌株的构建及其在枇杷酒酿造中的应用研究

学 科 门 类：工学

一级学科名称：食品科学与工程

二级学科名称：农产品加工及贮藏工程研 究 方 向：现代农产品加工技术 研 究 生 ：黄鹭强

指 导 教 师：郑宝东 教授

论文完成时间：二O 一三年四月

**Dissertation for Doctor Degree of Fujian Agriculture and Forestry University**

Study on Constructing of Deacidification Yeast Strain and Its Application in Loquat Wine Brewage

**Discipline: Engineering**

**Subject:** Food Science and **Engineering**

**Speciality:** Agricultural Product Processing **and Storage Research Direction:** Modern Agricultural Product **Processing Technology Doctorate Candidate:** Lu-qiang **Huang**

**Supervisor:** Prof. Bao-dong **Zheng**

**Submitted Date:** April, **2013**

**独创性声明**

本人声明，所呈交的学位（毕业）论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位（毕业）论文作者亲笔签名： 日期：

**论文使用授权的说明**

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位（毕业）论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅; 学校可以公布论文的全部或部分内容， 可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书。 □

不保密，本论文属于不保密。 □

学位（毕业）论文作者亲笔签名： 日期：

指导教师亲笔签名： 日期：

目 录

[目 录](#_Toc68648744) 3

[摘 要](#_Toc68648745) 5

**[Abstract](#_Toc68648746)** 5

[第一章 引 言](#_Toc68648747) 6

**[1.](#_Toc68648748)** [枇杷的栽培、生产及产品开发现状](#_Toc68648748) 6

**[1.1](#_Toc68648749)** [枇杷概述](#_Toc68648749) 6

**[1.2](#_Toc68648750)** [枇杷的生物学特性](#_Toc68648750) 6

**[1.3](#_Toc68648751)** [枇杷的栽培状况](#_Toc68648751) 7

**[1.4](#_Toc68648752)** [枇杷及其相关产品研发和生产](#_Toc68648752) 7

**[2.](#_Toc68648753)** [果酒降酸的研究现状](#_Toc68648753) 7

**[2.1](#_Toc68648754)** [物理降酸法](#_Toc68648754) 7

**[2.2](#_Toc68648755)** [化学降酸法](#_Toc68648755) 7

**[2.3](#_Toc68648756)** [生物降酸法](#_Toc68648756) 7

**[3.](#_Toc68648757)** [生物技术在果酒降酸中研究状况](#_Toc68648757) 7

**[3.1](#_Toc68648758)** [微生物降酸机理](#_Toc68648758) 7

**[3.1.1](#_Toc68648759)** [苹果酸](#_Toc68648759)**[-](#_Toc68648759)**[乳酸发酵（](#_Toc68648759)**[MLF](#_Toc68648759)**[）](#_Toc68648759) 7

**[3.1.2](#_Toc68648760)** [苹果酸](#_Toc68648760)**[-](#_Toc68648760)**[酒精发酵法](#_Toc68648760)**[(MAF)](#_Toc68648760)** 8

**[3.2](#_Toc68648761)** [降酸微生物的研究](#_Toc68648761) 8

**[3.2.1](#_Toc68648762)** [降酸菌株的分离筛选](#_Toc68648762) 8

**[3.2.2](#_Toc68648763)** [原生质体融合选育](#_Toc68648763) 8

**[3.2.3](#_Toc68648764)** [基因工程技术选育](#_Toc68648764) 8

**[3.3](#_Toc68648765)** [固定化降酸技术](#_Toc68648765) 9

**[4.](#_Toc68648766)** [本论文目的意义与研究内容](#_Toc68648766) 9

**[4.1](#_Toc68648767)** [研究目的和意义](#_Toc68648767) 9

**[4.2](#_Toc68648768)** [主要研究内容](#_Toc68648768) 9

**[4.2.1](#_Toc68648769)** [构建降酸酵母菌株](#_Toc68648769) 9

**[4.2.2](#_Toc68648770)** [降酸酵母菌株的发酵特性及其固定化研究](#_Toc68648770) 12

**[4.2.3](#_Toc68648771)** [降酸处理后枇杷酒的感官品质研究](#_Toc68648771) 12

**[4.2.4](#_Toc68648772)** [降酸处理后的枇杷酒营养及抗氧化功效的研究](#_Toc68648772) 12

[第二章 降酸酵母菌株的构建](#_Toc68648773) 13

**[1](#_Toc68648774)** [材料与方法](#_Toc68648774) 13

**[1.1](#_Toc68648775)** [材料](#_Toc68648775) 13

**[1.1.1](#_Toc68648776)** [菌种与载体](#_Toc68648776) 13

**[1.1.2](#_Toc68648777)** [引物序列](#_Toc68648777) 13

**[1.1.3](#_Toc68648778)** [工具酶与主要试剂](#_Toc68648778) 13

**[1.1.4](#_Toc68648779)** [主要培养基和缓冲液](#_Toc68648779) 13

**[1.1.5](#_Toc68648780)** [主要仪器](#_Toc68648780) 13

**[1.2](#_Toc68648781)** [方法](#_Toc68648781) 13

**[1.2.1](#_Toc68648782)** [粟酒裂殖酵母的培养](#_Toc68648782) 14

**[1.2.2](#_Toc68648783)** [粟酒裂殖酵母基因组的提取](#_Toc68648783) 14

**[1.2.3](#_Toc68648784)** [酵母总](#_Toc68648784)**[RNA](#_Toc68648784)**[的提取](#_Toc68648784) 14

**[1.2.4](#_Toc68648785)** [逆转录获得](#_Toc68648785)**[cDNA](#_Toc68648785)** 14

**[1.2.5](#_Toc68648786)** [苹果酸通透酶](#_Toc68648786)**[mae1](#_Toc68648786)**[的克隆](#_Toc68648786) 15

**[1.2.6](#_Toc68648787)****[PCR](#_Toc68648787)**[产物的回收](#_Toc68648787) 15

**[1.2.7](#_Toc68648788)** [目的基因的连接](#_Toc68648788) 16

**[1.2.8](#_Toc68648789)** [转化大肠杆菌](#_Toc68648789) 16

**[1.2.9](#_Toc68648790)** [阳性克隆子的筛选](#_Toc68648790) 16

[1.2.10 序列的测定与分析](#_Toc68648791) 16

**[2](#_Toc68648792)** [结果与分析](#_Toc68648792) 16

**[2.1](#_Toc68648793)** [总](#_Toc68648793)**[RNA](#_Toc68648793)**[的提取](#_Toc68648793) 16

**[2.2](#_Toc68648794)****[mae1](#_Toc68648794)**[基因的克隆](#_Toc68648794) 17

**[2.3](#_Toc68648795)** [阳性克隆子的筛选](#_Toc68648795) 17

**[2.4](#_Toc68648796)** [测序结果及分析](#_Toc68648796) 17

**[2.4.1](#_Toc68648797)****[Mae1-cDNA](#_Toc68648797)**[序列分析](#_Toc68648797) 17

**[2.4.2](#_Toc68648798)****[mae1-DNA](#_Toc68648798)**[与](#_Toc68648798)**[mae1-cDNA](#_Toc68648798)**[序列比对分析](#_Toc68648798) 17

**[3](#_Toc68648799)** [小结](#_Toc68648799) 17

**[1](#_Toc68648800)** [材料与方法](#_Toc68648800) 18

**[1.1](#_Toc68648801)** [材料](#_Toc68648801) 18

**[1.1.1](#_Toc68648802)** [菌种与载体](#_Toc68648802) 18

**[1.1.2](#_Toc68648803)** [引物序列](#_Toc68648803) 18

**[1.1.3](#_Toc68648804)** [工具酶与主要试剂](#_Toc68648804) 18

**[1.1.4](#_Toc68648805)** [主要培养基和缓冲液](#_Toc68648805) 18

**[1.1.5](#_Toc68648806)** [主要仪器](#_Toc68648806) 19

**[1.2](#_Toc68648807)** [方法](#_Toc68648807) 19

**[1.2.1](#_Toc68648808)****[pSH47-mae1](#_Toc68648808)**[表达质粒的构建](#_Toc68648808) 19

**[1.2.2](#_Toc68648809)** [重组表达质粒的大量抽提](#_Toc68648809) 20

**[1.2.3](#_Toc68648810)** [重组表达质粒转化产朊假丝酵母](#_Toc68648810) 21

**[1.2.4](#_Toc68648811)** [产朊假丝酵母转化子的筛选](#_Toc68648811) 22

**[1.2.5](#_Toc68648812)** [重组酵母的发酵验证](#_Toc68648812) 22

**[1.2.6](#_Toc68648813)****[UPLC](#_Toc68648813)**[检测发酵液苹果酸含量](#_Toc68648813) 22

**[2](#_Toc68648814)** [结果与分析](#_Toc68648814) 22

**[2.1](#_Toc68648815)****[pSH47-mae1](#_Toc68648815)**[阳性克隆子的筛选、验证](#_Toc68648815) 22

**[2.1.1 pSH47](#_Toc68648816)**[和](#_Toc68648816)**[pMD-18T](#_Toc68648816)**[（](#_Toc68648816)**[simple](#_Toc68648816)**[）](#_Toc68648816)**[-mae1](#_Toc68648816)**[双酶切](#_Toc68648816) 22

**[2.1.2](#_Toc68648817)** [菌液](#_Toc68648817)**[PCR](#_Toc68648817)**[验证](#_Toc68648817) 23

**[2.1.3](#_Toc68648818)** [质粒](#_Toc68648818)**[PCR](#_Toc68648818)**[验证](#_Toc68648818) 23

**[2.1.4](#_Toc68648819)** [双酶切验证](#_Toc68648819) 23

**[2.2](#_Toc68648820)****[pSH47-mae1](#_Toc68648820)**[重组质粒线性化](#_Toc68648820) 23

**[2.3](#_Toc68648821)** [重组酵母的筛选及](#_Toc68648821)**[PCR](#_Toc68648821)**[验证](#_Toc68648821) 23

**[2.4](#_Toc68648822)****[mae1](#_Toc68648822)**[基因表达转化子的筛选](#_Toc68648822) 24

**[2.5](#_Toc68648823)** [重组酵母菌株](#_Toc68648823)**[CU-6](#_Toc68648823)**[培养特性](#_Toc68648823) 25

**[2.6](#_Toc68648824)** [产朊假丝酵母](#_Toc68648824)**[CU-6](#_Toc68648824)**[传代稳定性](#_Toc68648824) 27

[3. 小结](#_Toc68648825) 27

[第三章 酵母菌株降酸工艺的优化](#_Toc68648826) 27

**[1](#_Toc68648827)** [材料与方法](#_Toc68648827) 27

**[1.1](#_Toc68648828)** [菌种](#_Toc68648828) 27

**[1.2](#_Toc68648829)** [主要仪器](#_Toc68648829) 28

**[1.3](#_Toc68648830)** [主要试剂](#_Toc68648830) 28

**[1.3.1](#_Toc68648831)** [药品](#_Toc68648831) 28

**[1.3.2](#_Toc68648832)** [培养基](#_Toc68648832) 28

**[1.4](#_Toc68648833)** [方法](#_Toc68648833) 28

**[1.4.1](#_Toc68648834)** [产朊假丝酵母的培养](#_Toc68648834) 28

**[1.4.2](#_Toc68648835)** [苹果酸浓度的检测](#_Toc68648835) 28

**[2](#_Toc68648836)** [结果与分析](#_Toc68648836) 28

**[2.1](#_Toc68648837)** [单因素试验](#_Toc68648837) 28

**[2.1.1](#_Toc68648838)** [发酵温度对酵母菌株](#_Toc68648838)**[CU-6](#_Toc68648838)**[降酸效果的影响](#_Toc68648838) 28

**[2. 1.2](#_Toc68648839)** [接种量对酵母菌株](#_Toc68648839)**[CU-6](#_Toc68648839)**[降酸效果的影响](#_Toc68648839) 29

**[2.1.3](#_Toc68648840)****[SO2](#_Toc68648840)**[浓度对酵母菌株](#_Toc68648840)**[CU-6](#_Toc68648840)**[降酸效果的影响](#_Toc68648840) 29

**[2.1.4](#_Toc68648841)** [酒精度对酵母菌株](#_Toc68648841)**[CU-6](#_Toc68648841)**[降酸效果的影响](#_Toc68648841) 29

**[2.1.5](#_Toc68648842)** [残糖对酵母菌株](#_Toc68648842)**[CU-6](#_Toc68648842)**[降酸效果的影响](#_Toc68648842) 30

**[2.2](#_Toc68648843)** [响应面优化试验](#_Toc68648843) 30

**[2.2.1](#_Toc68648844)****[Plackett-Burman](#_Toc68648844)**[法设计确定主要因素](#_Toc68648844) 30

**[2.2.2](#_Toc68648845)** [根据](#_Toc68648845)**[Plackett-Burman](#_Toc68648845)**[结果筛选主要因素](#_Toc68648845) 32

**[2.2.3](#_Toc68648846)** [实验结果](#_Toc68648846) 32

**[2.2.4](#_Toc68648847)** [回归模型的建立](#_Toc68648847) 35

**[2.2.5](#_Toc68648848)** [工艺参数的显著性分析](#_Toc68648848) 35

**[2.2.6](#_Toc68648849)** [响应面分析](#_Toc68648849) 37

**[2.2.7](#_Toc68648850)** [最优值验证](#_Toc68648850) 43

**[3](#_Toc68648851)** [小结](#_Toc68648851) 43

[第四章 降酸酵母菌株的固定化研究](#_Toc68648852) 43

**[1](#_Toc68648853)** [材料与方法](#_Toc68648853) 44

**[1.1](#_Toc68648854)** [菌种](#_Toc68648854) 44

**[1.2](#_Toc68648855)** [材料](#_Toc68648855) 44

**[1. 3](#_Toc68648856)** [主要试剂](#_Toc68648856) 44

**[1.4](#_Toc68648857)** [主要仪器](#_Toc68648857) 44

**[1.5](#_Toc68648858)** [培养基](#_Toc68648858) 44

**[1.6](#_Toc68648859)** [方法](#_Toc68648859) 44

**[1.6.1](#_Toc68648860)** [重组酵母](#_Toc68648860)**[CU-6](#_Toc68648860)**[的培养](#_Toc68648860) 44

**[1.6.2](#_Toc68648861)** [氯化钙溶液的配制](#_Toc68648861) 44

**[1.6.3](#_Toc68648862)** [海藻酸钠溶液的配制](#_Toc68648862) 44

**[1.6.4](#_Toc68648863)** [固定化酵母载体的制备](#_Toc68648863) 44

**[1.6.5](#_Toc68648864)** [苹果酸的测定](#_Toc68648864) 45

**[1.6.6](#_Toc68648865)** [固定化载体的电镜观察](#_Toc68648865) 45

**[1.6.7](#_Toc68648866)** [固定化酵母微球使用寿命的研究](#_Toc68648866) 45

**[2](#_Toc68648867)** [结果与分析](#_Toc68648867) 45

**[2.1](#_Toc68648868)** [海藻酸钠浓度对酵母](#_Toc68648868)**[CU-6](#_Toc68648868)**[降酸的影响](#_Toc68648868) 45

**[2.2](#_Toc68648869)** [氯化钙浓度对](#_Toc68648869)**[CU-6](#_Toc68648869)**[降酸的影响](#_Toc68648869) 46

**[2.3](#_Toc68648870)** [菌浓对](#_Toc68648870)**[CU-6](#_Toc68648870)**[降酸的影响](#_Toc68648870) 46

**[2.4](#_Toc68648871)** [不同固定化材料微球的电镜结构研究](#_Toc68648871) 46

**[2.5](#_Toc68648872)** [不同固定化材料微球的的降酸效果比较](#_Toc68648872) 48

**[2.6](#_Toc68648873)** [固定化酵母微球的耐酒精能力](#_Toc68648873) 48

**[2.7](#_Toc68648874)** [固定化酵母微球的耐](#_Toc68648874)**[SO2](#_Toc68648874)**[能力](#_Toc68648874) 49

**[2.8](#_Toc68648875)** [固定化酵母微球的回收次数研究](#_Toc68648875) 49

[3. 小结](#_Toc68648876) 50

[第五章 降酸处理对枇杷酒品质影响的研究](#_Toc68648877) 50

**[1](#_Toc68648878)** [材料与方法](#_Toc68648878) 50

**[1.1](#_Toc68648879)** [菌种](#_Toc68648879) 50

**[1.2](#_Toc68648880)** [材料](#_Toc68648880) 51

**[1.3](#_Toc68648881)** [主要试剂](#_Toc68648881) 51

**[1.4](#_Toc68648882)** [主要仪器](#_Toc68648882) 51

**[1.5](#_Toc68648883)** [测定方法](#_Toc68648883) 51

**[1.5.1](#_Toc68648884)** [枇杷酒酒精度的测定](#_Toc68648884) 51

**[1.5.2](#_Toc68648885)** [枇杷酒总酸的测定](#_Toc68648885) 51

**[1.5.3](#_Toc68648886)** [枇杷酒单宁的测定](#_Toc68648886) 51

**[1.5.4](#_Toc68648887)** [枇杷酒柔和指数的计算](#_Toc68648887) 51

**[1.5.5](#_Toc68648888)** [枇杷酒色度的测定](#_Toc68648888) 51

**[1.5.6](#_Toc68648889)** [枇杷酒双乙酰的测定](#_Toc68648889) 51

**[1.5.7](#_Toc68648890)** [枇杷酒总糖的测定](#_Toc68648890) 52

**[2](#_Toc68648891)** [结果与分析](#_Toc68648891) 52

**[2.1](#_Toc68648892)** [酵母](#_Toc68648892)**[CU-6](#_Toc68648892)**[对枇杷酒柔和指数的影响](#_Toc68648892) 52

**[2.2](#_Toc68648893)** [酵母](#_Toc68648893)**[CU-6](#_Toc68648893)**[对枇杷酒双乙酰和色度的影响](#_Toc68648893) 53

**[2.3](#_Toc68648894)** [酵母](#_Toc68648894)**[CU-6](#_Toc68648894)**[对枇杷酒的总糖的影响](#_Toc68648894) 54

**[3](#_Toc68648895)** [小结](#_Toc68648895) 54

**[1](#_Toc68648896)** [材料与方法](#_Toc68648896) 54

**[1.1](#_Toc68648897)** [菌种：](#_Toc68648897) 54

**[1.2](#_Toc68648898)** [材料](#_Toc68648898) 54

**[1.3](#_Toc68648899)** [主要试剂](#_Toc68648899) 54

**[1.4](#_Toc68648900)** [主要仪器](#_Toc68648900) 54

**[1.5](#_Toc68648901)** [方法](#_Toc68648901) 55

**[1.5.1](#_Toc68648902)** [顶空固相微萃取法（](#_Toc68648902)**[HS-SPME](#_Toc68648902)**[）](#_Toc68648902) 55

**[1.5.2](#_Toc68648903)** [色谱条件](#_Toc68648903) 55

**[2](#_Toc68648904)** [结果与分析](#_Toc68648904) 55

**[2.1](#_Toc68648905)** [早钟枇杷酒降酸处理香气的变化](#_Toc68648905) 55

**[2.2](#_Toc68648906)** [解放钟枇杷酒降酸处理香气的变化](#_Toc68648906) 61

[35.3 Hexadecanoic acid, methyl ester 棕榈酸甲酯0.0620](#_Toc68648907) 68

**[3](#_Toc68648908)** [小结](#_Toc68648908) 70

[第六章 枇杷酒营养成分及抗氧化特性的研究](#_Toc68648909) 70

**[1](#_Toc68648910)** [材料与方法](#_Toc68648910) 70

**[1.1](#_Toc68648911)** [材料](#_Toc68648911) 70

**[1.2](#_Toc68648912)** [主要试剂](#_Toc68648912) 70

**[1.3](#_Toc68648913)** [主要仪器](#_Toc68648913) 70

**[1.4](#_Toc68648914)** [方法](#_Toc68648914) 70

**[1.4.1](#_Toc68648915)** [维生素](#_Toc68648915)**[A](#_Toc68648915)**[、](#_Toc68648915)**[D](#_Toc68648915)**[、](#_Toc68648915)**[E](#_Toc68648915)**[的测定](#_Toc68648915) 70

**[1.4.2](#_Toc68648916)** [维生素](#_Toc68648916)**[B1](#_Toc68648916)**[的测定](#_Toc68648916) 70

**[1.4.3](#_Toc68648917)** [维生素](#_Toc68648917)**[B2](#_Toc68648917)**[的测定](#_Toc68648917) 71

**[1.4.4](#_Toc68648918)** [维生素](#_Toc68648918)**[C](#_Toc68648918)**[的测定](#_Toc68648918) 71

**[1.4.5](#_Toc68648919)** [水解氨基酸的测定](#_Toc68648919) 71

**[1.4.6](#_Toc68648920)** [矿物质的测定](#_Toc68648920) 71

**[2](#_Toc68648921)** [结果与分析](#_Toc68648921) 71

**[2.1](#_Toc68648922)** [维生素](#_Toc68648922) 71

**[2.2](#_Toc68648923)** [游离氨基酸](#_Toc68648923) 72

**[2.3](#_Toc68648924)** [矿物质成分](#_Toc68648924) 76

**[3](#_Toc68648925)** [小结](#_Toc68648925) 79

**[1](#_Toc68648926)** [材料与方法](#_Toc68648926) 79

**[1.1](#_Toc68648927)** [材料](#_Toc68648927) 79

**[1.2](#_Toc68648928)** [主要试剂](#_Toc68648928) 79

**[1.3](#_Toc68648929)** [主要仪器](#_Toc68648929) 79

**[1.4](#_Toc68648930)** [方法](#_Toc68648930) 79

**[1.4.1](#_Toc68648931)** [总酚含量的测定](#_Toc68648931) 79

**[1.4.2](#_Toc68648932)** [总黄酮含量的测定](#_Toc68648932) 80

**[1.4.3](#_Toc68648933)** [抗坏血酸（维生素](#_Toc68648933)**[C](#_Toc68648933)**[）含量的测定](#_Toc68648933) 80

**[1.4.4](#_Toc68648934)** [总抗氧化能力（](#_Toc68648934)**[T-AOC](#_Toc68648934)**[）的测定](#_Toc68648934) 80

**[1.4.5](#_Toc68648935)** [清除羟自由基能力的测定](#_Toc68648935) 80

**[1.4.6](#_Toc68648936)****[DPPH](#_Toc68648936)**[自由基的清除能力的测定](#_Toc68648936) 80

**[2](#_Toc68648937)** [结果与分析](#_Toc68648937) 80

**[2.1](#_Toc68648938)** [功效成分含量比较](#_Toc68648938) 81

**[2.2](#_Toc68648939)** [总抗氧化能力](#_Toc68648939) 81

**[2.3](#_Toc68648940)** [清除羟自由基能力](#_Toc68648940) 82

**[2.4](#_Toc68648941)****[DPPH](#_Toc68648941)**[自由基清除能力](#_Toc68648941) 83

**[3](#_Toc68648942)** [小结](#_Toc68648942) 84

[第七章 结论与展望](#_Toc68648943) 84

**[1.](#_Toc68648944)** [主要结论](#_Toc68648944) 84

**[2.](#_Toc68648945)** [研究创新点](#_Toc68648945) 84

**[3.](#_Toc68648946)** [研究展望](#_Toc68648946) 84

[参考文献](#_Toc68648947) 84

[附录](#_Toc68648948) 88

摘 要

枇杷酒的发酵多采用酿酒酵母，其利用苹果酸的能力较低，发酵结束后大部分留在成品中。因苹果酸口感酸涩，酒体柔和指数较低，影响枇杷酒的品质。本研究通过克隆粟酒裂殖酵母苹果酸通透酶(*mae*1)基因，构建整合型质粒，并在产朊假丝酵母中表达，使重组酵母菌株具有降解苹果酸的能力。将降酸酵母菌株投放于发酵后的枇杷原酒进行降酸发酵，消耗酒中部分苹果酸，同时增加枇杷酒部分香气成分，改善枇杷酒的感官品质。

研究结论如下：

1、采用Trizol法提取粟酒裂殖酵母的总RNA，以报道的粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶（*mae*1）的序列为依据设计引物，分别以基因组和cDNA为模板，克隆得到苹果酸通透酶（*mae*1）基因。通过双酶切、回收、连接，构建重组表达质粒pSH47-mae1。将pSH47表达质粒上的gal启动子换成PGK1启动子，成功的构建了重组表达质粒pSH47-PG-mae1。将线性化的重组质粒以同源重组的方式整合到产朊假丝酵母的基因组中表达。通过菌液PCR检验和摇瓶筛选，获得重组菌株CU-6。经连续传代实验表明，重组酵母菌株CU-6有良好的传代稳定性。

2、研究了SO2浓度、糖度、酒精度、接种量、温度5个单因素对重组酵母CU-6降酸的影响，筛选出3个主因素（SO2浓度、糖度、酒精度）。利用中心组合设计试验的原理设计交互试验，采用响应面分析法优化枇杷酒的降酸工艺条件。通过响应面分析法得到枇杷酒降酸优化工艺：初始SO2浓度50mg·L-1，酒精度7.8%，残糖量4.3 g·L-1。在苹果酸浓度4.5 g·L-1，接种量1.5%，发酵温度为24℃的条件下发酵5d，产朊假丝酵母CU-6的在枇杷酒中的理论降酸量可达到1.82g·L-1。实验实际值为1.80±0.02 g·L-1，与理论值十分接近。

3、研究6种固定化材料对重组酵母菌株CU-6在枇杷酒的降酸影响。其中2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.6%PVA组合固定化酵母CU-6，降酸效果最好。研究发现固定化后酵母CU-6耐受SO2和酒精度能力适度提高，在SO2浓度80 mg·L-1和酒精度为11%时，降酸量仍可达到1.6 g·L-1。该材料制作的固定化微球连续使用5次以上，酵母的降酸能力仍保持较好。

4、采用固定化酵母CU-6降酸处理后的枇杷酒，感官品质发生一定的变化。早钟和解放钟为原料酿造的枇杷酒经处理后，双乙酰影响较小，色度的影响较大，分别下降了37%和55%，总酸分别下降1.43和1.35 g·L-1，柔和指数分别提高1.44和1.37。降酸处理使枇杷酒中的香气成分比例发生了改变，部分醇类物质比例提高，如苯乙醇、

柏木醇等，部分酯类物质的比例提高，如丁二酸二乙酯等，部分酮类物质增加较多，如5-羟基-4-辛酮。

5、固定化重组酵母菌株CU-6降酸处理后的枇杷酒，其营养组成未发生明显变化。降酸前后的矿物质含量保留较好。降酸处理后游离氨基酸有不同程度的增加，其中必需氨基酸苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等明显增加。早钟和解放钟枇杷酒中的抗氧化活性物质含总酚、总黄酮和维生素C。研究发现，两种枇杷酒降酸前后总抗氧化能力均比对照的国产解百纳干红低，但高于国产雷司令干白；羟自由基清除能力均高于国产解百纳干红，但低于国产雷司令干白；对DPPH自由基表现出较好的清除作用，且随着稀释倍数的增加能力逐渐减弱，当将其稀释20倍时

DPPH自由基的清除能力均仍能维持在60%以上。

关键词：枇杷酒；苹果酸通透酶基因 (*mae*1)；产朊假丝酵母；构建；降酸；固定化； 感官品质；抗氧化

**Abstract**

Malic acid cannot be degraded during loquat wine fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and ultimately result in high total acid level in liquor. Malic acid taste sour and astringent, which impact flavor balance index and sensory quality of loquat wine. Malate permease (mae1) gene of *Schizosaccharomyces pombe* was cloned, integration plasmid was constructed and expressed in *Candida utilis* in the study. Recombinant yeast strains was employed in loquat wine after primary fermentation to deacid, which can degrad malic acid, increase the aroma substrances and improve sensory quality of loquat wine.

Results of the study are as follows,

⑴Total RNA of *Schizosaccharomyces pombe* was extracted of by Trizol method, primers of *mae1* was designed based on reported sequence of *Schizosaccharomyces pombe.* Genome and cDNA as template was employed and Malate permease (*mae*1) was cloned. Recombinant expression plasmid pSH47-mae1 was construct by double enzyme digestion, recovery, connection. Gal promoter pSH47 in expression plasmid was replaced by PGK1 promoter and recombinant expression plasmid pSH47-PG-mae1 was construction. Recombinant plasmid pSH47-PG-mae1 was linearized and homologous recombinated into genome of *Candida utilis* to express. Recombinant yeast strains CU-6 was screened by bacterium liquid PCR inspection and shake flask fermentation. It shows preferable passage stability through continuous subculture experiments.

⑵Effect on degradation of malic acid of recombinant yeast strains CU-6 by concentration of sulfur dioxide, brix, alcoholicity, inoculation, fermentation temperature were study. Concentration of sulfur dioxide, brix, alcoholicity were selected as main effect factors. Response surface methodology (RSM) was applied to optimize deacidification in loquat wine by recombinant yeast strain. The degradation of malic acid was selected as

Response value and the mathematical model was established by Box-Benhnken central composite design. The optimal fermentation conditions were: sulfur dioxide 50 mg·L-1, alcoholicity 7.8%, brix 4.3 g·L-1. Under conditions of concentration of malic acid 4.5 g·L-1, inoculation 1.5%, fermentation temperature 24℃, 1.82 g·L-1 malic acid in loquat wine was degraded by *Candida utilis* CU-6 within 5 days theoretically. With the optimal approch, the

Deacidification of loquat wine reaehed 1.80±0.02 g·L-1.

⑶Six kinds of immobilized materials were compared and deacidification ability of recombinant yeast strains CU-6 applied in loquat wine was study. Group 2% SOA + 1.4%SiO2 + 0.6% PVA as immobilized material showed optimal deacidification ability. Tolerance capacity on sulfur dioxide and alcohol of recombinant yeast strains CU-6 were increased reasonably by immobilization. The deacidification of loquat wine by CU-6 immobilization reaehed 1.60 g·L-1 with concentration of sulfur dioxide 80 mg·L-1 and alcoholicity 11%. Deacidification ability of recombinant yeast strains CU-6 remains well after continuous employ for more than five times.

⑷Sensory quality of loquat wine were changed by immobilized recombinant yeast strains CU-6 after deacidification. After deacidification treatment, diacetyl and tannin changed faintly, chroma were decreased 37% and 55%, total acid were decreased 1.43 g·L-1 and 1.35 g·L-1, flavor balance index were increased 1.44 and 1.37 in zaozhong and Jiefangzhong loquat wine. Component of Aroma components in zaozhong and jiefangzhong loquat wine were varied. The proportion of partial ethanol such as

Phenethanol, cedrol were increased, partial esters such as diethyl succinate and partial ketones such as 5- hydroxy -4- octanone was increased via deacidification treatment.

⑸Nutrients in Zaozhong and Jiefangzhong loquat wine were changes faintly after deacidification treatmen by recombinant yeast strains CU-6. Content of minerals were remained preferably and free amino acids were increased in different degrees after deacidification. Essential amino acid including methionine, threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine were increased significantly. Antioxidants in Zaozhong and Jiefangzhong loquat wine contain total phenolics, total flavonoids and vitamin C. Total antioxidant capacity of loquat wine before and after deacidification was lower than indigenous Cabernet dry red, but higher than indigenous Riesling white; Hydroxyl radical scavenging ability of loquat wine before and after deacidification was higher than indigenous Cabernet dry red, but lower than indigenous Riesling white; loquat wine before and after deacidification showed commendable DPPH scavenging capacity, which was weakened gradually with dilution increasing. It still maintained more than 60% when it diluted 20 times.

**Keywords:** loquat wine; Malate permease gene (*mae*1); *Candida utilis*; construction; Deacidification; Immobilization; Organoleptic quality; anti-oxidation

# 第一章 引 言

果酸是果酒中的重要风味物质之一，是影响果酒感官质量的一个关键因素。果酸的种类、含量与果酒的典型性、品质关系密切，调节着酸碱的平衡，影响其口感、色泽及生物稳定性[1]。适量果酸能使酒醇厚且爽口，同时起到平衡酒的苦味、抑制杂菌生长的作用。含量过高容易导致酒体粗糙、酸涩感明显、难以入口和品质下降[2]。

果酒中的总酸是指所有可以与碱发生中和反应的酸的总和，包括固定酸和挥发酸。根据GB15037-2006《葡萄酒》中的规定，甜葡萄酒、加香型葡萄酒的总酸含量要求在5.0-8.0 g/L（以酒石酸计）范围。ft葡萄酒、沙棘酒等含有较高酸

度的水果，其果酒的酸度一般在12-20 g/L。对于酸度较高的果酒，一般需要进行降酸处理改善口感[3]。

果酒的总酸中，酒石酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸等属于固定酸，而挥发酸以乙酸为主。柠檬酸主要存在于菠萝、柑橘类果实中，口感温和而清爽。如果不考虑酵母的种类、温度、糖度、pH值等的影响条件，并且忽略发酵过程中的细菌污染，柠檬酸的含量将不会发生很大的变化[4]。酒石酸主要存在于葡萄、罗望子中，以酒石酸钾、酒石酸氢钾的形式存在，发酵过程中能以结晶的形式析出，且溶解度随着温度的降低而减小。酒石酸发酵过程中难以被利用，若酒中的酒石酸含量过高，可以通过化学反应生成沉淀来降低含量[5]。苹果酸主要存在于一些不成熟的水果中，如李[6]、ft楂[7]、葡萄[8]等，而在成熟的水果如苹果和枇杷，其含量也可高达到5-6g/l。苹果酸生理代谢较为活跃，是三羧酸循环的中间物，可被部分代谢，又可合成。

挥发酸是果酒中以游离状态或以盐的形式存在的所有脂肪酸的总和，以乙酸为主。其产生的来源有两方面[9]：一是正常的酒精酵母发酵和苹果酸乳酸发酵， 二是异常的乳酸菌和醋酸菌的生长。在正常的酒中挥发酸含量不宜过高，否则影响果酒的品质。

一般果酒酿造的酵母为真酵母中的酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、贝酵母（*Saccharomyces bayanus*）和圆酵母（*Torulaspora*）等，这些酵母利用苹果酸的能力较弱。因此，富含苹果酸的苹果酒、枇杷酒等在发酵结束后，尚有苹果酸未被消耗而留在成品中，进而造成酒体酸涩。采取适当的措施来降低果酒的固

定酸含量，可提高这类果酒的适口性，使酒体趋于圆润。

目前果酒降酸的方法主要有物理法、化学法和生物法。物理降酸法和化学降酸法一般只能对果酒中的酒石酸起作用，对酒质负面影响较大；生物降酸法对生理代谢较为活跃的苹果酸作用效果明显，对酒质负面影响较小。生物降酸中，多采用乳酸菌的苹果酸-乳酸发酵（MLF）和裂殖酵母的苹果酸-酒精发酵（MAF）进行降酸发酵，主要原因是乳酸菌和酵母具有消耗苹果酸的关键酶—苹果酸酶

（*mae2*）和苹果酸通透酶（*mae1*）[10]。实际应用中，当发酵温度较高、pH较高、

S02浓度较低时，MLF没有立即终止，乳酸菌就可能变为病原菌，引起酒体病害

[11]的发生；而裂殖酵母降酸则存在不利副产物过多等[12]缺陷未被广泛采用。产

朊假丝酵母具有一定的降酸能力，但细胞表面缺乏通透酶（*mae1*）。如果将粟酒裂殖酵母的通透酶基因克隆到产朊假丝酵母中表达，构建具有降酸能力同时兼备产香能力的酵母菌株，则有望解决的枇杷酒口感酸涩和香气淡薄的难题。

枇杷酒本身较好的保存枇杷鲜果的营养及药用价值，具有明显的保健功效

[13]：抗氧化；防止高血压、动脉硬化；可预防和辅助治疗咳嗽、喉咙痛等呼吸

道疾病；有一定的防癌功效（含有苦杏仁苷、白藜芦醇）；助消化（含有多种有机酸）等。运用重组酵母菌株进行降酸发酵，可以改变果酒中的氨基酸、有机酸和维生素等微量成分的含量及呈香物质的浓度，改善酒体风味。

因此，利用生物技术构建降酸酵母菌株并运用于枇杷酒生产，可望在解决枇杷酒口感酸涩、香气单薄的基础上，保留原有营养和功效价值，提升枇杷酒综合品质，促进枇杷酒产业发展。

## **1.** 枇杷的栽培、生产及产品开发现状

### **1.1** 枇杷概述

枇杷（loquat）又叫卢橘、金丸，属于蔷薇科（*Rosaceae*）苹果亚科（*Maloideae*）枇杷属（*Eriobotrya*），约有30 多个种，其栽培品种均属普通枇杷（*Eriobotrya japonica* Lindl）。枇杷酸甜多汁，可食率最高可达60%。营养价值高，每100g含水分89.3g，蛋白质0.4～1.1g，脂肪0.1～0.5g，糖类7～12g，果酸0.6g，膳食纤维0.8g，维生素C 8mg, Na 4mg, Ca 17mg, Mg 1.1mg[14]。药用价值高，其叶、花、果、核、根均可入药。枇杷果实具有润燥、清肺等功效[15]；枇杷花中有齐墩果酸等，抗肿瘤抗衰老的三萜皂甙元类[16]；枇杷叶中含有出三萜酸、挥

发油类、黄酮类、多酚、倍半萜及糖苷类等成分等物质[17]，具有显著的抗炎止咳、降血糖、抗病毒、抗氧化作用等；枇杷果仁[18]中有丰富的含苦杏仁苷、氨基酸、脂肪、维生素和淀粉等，具有抗炎、抗肿瘤及免疫作用。

### **1.2** 枇杷的生物学特性

枇杷嫁接3-5年后开始产果，10年后才进入盛果期，40年后产量开始下降，但树龄在80年以上的枇杷还能产果。枇杷原产温带南部，喜温暖，年平均温度

12℃以上均能生长。传统产地福建莆田、江苏洞庭、浙江西塘、安徽歙县等温度均满足此要求。而夏季温度过高（大于35℃），枇杷果易灼伤。枇杷花芽的分化和果实发育对光照要求较高。年降雨量在1000mm以上的地区，有利于枇杷的生长，但春季和夏初雨水过多会导致裂果。枇杷树冠大叶密而根系浅，易受大风影响。表层厚、排水好的砂质土对提高枇杷果品质有促进作用，土壤pH以6左右为最好。枇杷产果期较短，管理要求较高，市场的需求直接影响其产量。目前除鲜果销售外，深加工发展较慢。

### **1.3** 枇杷的栽培状况

枇杷原产我国大渡河上游的汉源县及雅安地区[19]，四川、湖北至今还有野生枇杷分布。在我国有2200年以上的栽培历史，《周礼》记载：“场人掌国之场圃，而树之果蓏(luǒ)珍异之物。珍异，蒲桃、枇杷之属。”日本栽培的枇杷，是唐代由我国传入的，至今尚存“唐枇杷”这一品种，至于田中、茂木、佐佐木等，均是唐枇杷的变种。枇杷分布主要集中在南北纬20-35°，受海洋性气候影响，可分布至45°[20]，目前生产种植枇杷的国家有中国、日本、马来西亚、印度、台湾、西班牙、土耳其、以色列、希腊、意大利、阿尔及利亚、埃及、阿根廷、巴西、澳大利亚等国家和地区。全世界枇杷属植物种类有34个，共600多个品种，其

中140个具有经济价值[21]。

2009年，四川栽培面积约为87.9万亩，总产量约为24.5万吨，主要栽培品

种是大五星、解放钟和早钟6；重庆栽培面积约为40.05万亩，总产量约为10.8万吨，主要栽培品种是大五星、解放钟和早钟6；浙江栽培面积约为18万亩，总产量约为5.7万吨，主要栽培品种是大红袍；广东栽培面积约为6万亩，总产

量约为1.0万吨，主要栽培品种是早钟6和解放钟；福建栽培面积约为36万亩，

总产量约为15万吨，主要栽培品种是早钟6和解放钟。全国收获面积为180 万

亩，总产量约为57.5万吨。

福建属南亚热带和中亚热带的过渡地带，主要产区有莆田、云霄、福清，此外龙岩、永春、宁德等部分地区也有少量出产。其中莆田是中国著名的“枇杷之乡”，莆田的常太镇被农业部授予“南亚热带作物名优基地”，同时被誉为“中国枇杷第一乡”，枇杷已成为福建省重要的特色经济水果。2001年，福建省枇杷栽培面积达33.72万亩，产量约6.83万吨。2011年，福建省枇杷栽培面积为53万亩，其中早钟6占78%，解放钟占22%；莆田市面积27万亩，早钟6占60%，解放钟占40%。福建作为中国枇杷的主要产地，具有良好的资源优势。

### **1.4** 枇杷及其相关产品研发和生产

枇杷出果期短，鲜果保存困难，长途运输不便。因此开发枇杷系列深加工产品，提高附加值是带动产业发展的有效途径之一。目前，全国仅有约14%枇杷产量进入加工环节，大部分以糖水枇杷、果肉枇杷膏、枇杷汁等形式进行加工，销量有限。

糖水枇杷[22]的加工比较简单，其中摘柄、热烫、去核、剥皮等步骤自动化程度较低，劳动强度较大，制约规模发展。果肉枇杷膏是重要的中成药原料，主要以小果、次果为原料，经去核后榨汁过滤，加热浓缩后加入一定比例的砂糖，制成稠胶状膏。枇杷果脯[23]是采用减压渗胶、真空渗糖等生产工艺制得的低糖果脯。枇杷汁[24]是近年兴起的一种果肉饮料，它以鲜果汁为原料加以调配而成，产品色泽金黄，酸甜适口。枇杷叶制作的枇杷膏是传统枇杷糖浆和枇杷膏的重要原料。枇杷花富含类黄酮、类胡萝卜素、齐墩果酸、熊果酸、苦杏仁苷等生物活性成分[16]，有抑菌、止咳、祛痰和抗炎的作用，近几年逐渐被消费者认可，是具发展潜力的代用茶。枇杷果醋[25]是利用醋酸菌发酵枇杷酒，经调配得到的果醋，特点是口味醇厚、风味浓郁、新鲜爽口，具有一定的市场潜力。

目前仅枇杷膏的市场份额较大，枇杷罐头的市场有所萎缩，枇杷汁作为新的产品形式，还有待市场培育。枇杷酒[26]是枇杷深加工品的重要组成部分，可提升产品价值，具有良好市场前景。

福建省枇杷酒主要生产企业主要有：福建云霄金ft春枇杷酒有限公司（年产

2000吨）；莆田市绿森庄园酒业有限公司（年产枇杷酒800吨）；福建红太阳精

品有限公司（年产1000吨以上）；莆田市天妃红枇杷酒业有限公司（年产枇杷酒

800吨，100吨枇杷白兰地）；福建年代酒业有限公司（年产500吨）；福建福清

市青青草枇杷酒酿造有限公司（年产200吨）等。目前枇杷酒系列产品的价格与国产的干白葡萄酒接近。由于滋味酸涩、香气特征不突出、酒体粗糙单薄，市场认知度较低。不少枇杷酒生产企业因此纷纷减产，有的濒临倒闭。枇杷酒市场的萎缩，直接影响了该产业的发展。而从酿造菌种和发酵工艺出发，降低其酸度和提高其香气改善口感，是突破枇杷酒瓶颈的可行途径。

## **2.** 果酒降酸的研究现状

目前国内外对果酒降酸，主要采用物理降酸、化学降酸和生物降酸等方法。主要研究和生产状况如下：

### **2.1** 物理降酸法

物理降酸法，又称低温冷冻降酸法。主要原理是利用冷冻设备对果酒进行降温，从而使酒体中酒石酸盐（酒石酸氢钾、酒石酸钾等）随着温度的降低而结晶沉淀，从而达到降酸的目的。该降酸法一般可以降低酸度达到0.5-2.0 g/L不等（以酒石酸计）[3]。该法的优点是不引入其他物质，操作简便，尤其适于冬季生产。缺点是仅能降低酒石酸盐的含量，不适于其他固定酸去除[27]，应用对象比较有限，常于酸度较高的葡萄酒生产。

### **2.2** 化学降酸法

化学降酸法，主要原理是在果酒中加入化学主要试剂（如碳酸氢钾、碳酸钙、酒石酸钾和双钙盐等），与果汁中的有机酸酸发生中和反应，从而达到降酸的目的。碳酸钙、碳酸氢钾等化学主要试剂一般为弱酸盐，能够与果酒中的强酸盐发生化学反应，强酸被置换出来，从而降低果酒中有机酸的含量。此方法操作简单便利，降酸效果显著。但化学反应往往会影响果酒的口感、色泽，另外由于果酒中溶入大量的金属离子，容易导致酒液的不稳定，如失光、混浊等[3]。

碳酸钙法优点是：与酸反应快、成本低，操作简便的特点。碳酸钙的最高用量为1.5 g/L，在此条件下可以降解1.5 g/L的酸。碳酸钙法存在缺点：碳酸钙和酒石酸反应生成酒石酸钙，果酒易产生邪味；若残留的钙离子浓度过高会抑制发酵进程；钙离子不稳定。

碳酸氢钾降酸法。此方法反应较快，成本也不高。利用碳酸氢钾和酒石酸反

应产生酒石酸钾，酒石酸钾能够和酒石酸发生二步反应，最终生成酒石酸氢钾。林巧等[28]研究表明该法可降解樱桃酒中约2.7 g/L的可滴定酸，同时可保持酒体的稳定。

离子交换树脂法，是通过阴离子交换树脂中的羟基与有机酸发生反应，交换果酒中的酸根，从而达到降酸的目的。王春霞等[29]采用离子交换树脂降解ft楂酒的有机酸，达到了很好的降酸效果。徐怀德[30]的研究表明，利用离子交换树脂法处理树莓干酒，76.9%有机酸得到有效降解，酒的色泽、风味不受影响。

电渗析降酸法，是利用直流电场的作用，通过选择性离子透过膜分别除去构成酒石酸盐的阴阳离子，从而达到降酸并且保持酒体冷稳定的目的。具有操作简单，费用低，处理效率高等优点。诸葛庆[31]利用电渗析技术处理猕猴桃酒，得到了纯正、协调、酒香较为清爽的猕猴桃酒。严斌等[32]利用电渗析技术处理葡萄酒，去除酒中的酒石酸盐，实现低耗能、处理时间短，该法的缺点是酒的感官指标有待改善。

### **2.3** 生物降酸法

物理降酸法和化学降酸法只能对果酒中的酒石酸起作用，而对苹果酸作用效果不明显。生物降酸是利用微生物的作用来分解果汁或果酒中的有机酸，从而达到降酸的目的，微生物降酸不仅使酒的总酸下降，而且能修饰酒的风味，改善酒的口感，提高酒的品质[2]，成为现代降酸主要的研究和发展方向[33]。目前研究较多的是乳酸菌进行的苹果酸-乳酸发酵（malolactic fermentation, MLF）和裂殖酵母进行的苹果酸-酒精（maloalcoholic fermentation, MAF）发酵。

## **3.** 生物技术在果酒降酸中研究状况

传统酿造的枇杷酒口感酸涩，香气单薄，品质粗糙，其主要原因是枇杷果中富含苹果酸，发酵过程不能很好为酵母利用而最终留在酒中，导致枇杷酒酸度较高。加上枇杷本身香气特征不明显，产品的香气单调。这些都制约了枇杷酒行业的快速发展，工艺难题亟待解决。

### **3.1** 微生物降酸机理

#### **3.1.1** 苹果酸**-**乳酸发酵（**MLF**）

苹果酸-乳酸发酵（MLF）是L-苹果酸在乳酸菌（*Lactic acid bacteria*）的苹

果酸-乳酸酶(malolactic enzyme, MLE)的催化下转变成L-乳酸和CO2的过程[34]。能够进行MLF 的乳酸菌分属于明串珠菌属(*Leuconostoc*) 、乳杆菌

（*Lactobacillus*）、足球菌属(*Pediococcus*)和片球菌属（*Pediococcus*）四类。葡萄酒中分离出的乳酸菌中77％属于明串珠菌属(*Leuconostoc*)。它们都能够较专一地把苹果酸转变成乳酸和CO2，从而达到降酸的目的[35]。主要机理是苹果酸在苹果酸乳酸酶（MLE）及Mn2+的参与下，直接转化成乳酸（图1-1）。

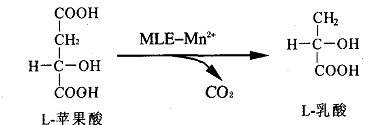


图1-1 苹果酸-乳酸转化的途径

Fig. 1-1 Possible transformation of L-malic acid to L-lactic acid

不少学者采用MLF对果酒进行降酸处理，均取得一定的效果。潘海燕等[36]利用酒类酒球菌（*Oenococcus oeni* L4）处理苹果酒，能耐受50 mg·L-1 SO2 和

6%酒精度，苹果酸降解能力达到228.52 mg·L-1d-1。游新勇等[37]利用Lalvin 31乳酸菌处理木瓜干酒，总酸下降25.82%，获得柔和指数为4.648 的干酒。邢玮等

[38]实用酒酒球菌（CICC6057）对沙棘果酒进行苹果酸乳酸发酵，总酸下降5.6g·L-1，口感变得柔和。李记明[39]等利用乳酸菌处理苹果酒，发现酒精度11-13%条件下，对MLF没有影响，但提高SO2浓度对发酵有抑制作用，总体可降低挥发酸的含量。

MLF的优点是可将苹果酸转化为乳酸从而使葡萄酒的总酸含量下降，明显降低酸涩感；增加酒体稳定性，避免储藏中的微生物污染和再发酵。其缺点是发酵的周期较长，操作不易控制[40]；容易受pH值、温度和SO2等诸多因素的影响；可能分解糖和其他的葡萄酒成分，易引起葡萄酒的多种病害[41]。含糖量高于4 g·L-1的桃红葡萄酒、白葡萄酒等，应该尽量避免苹果酸-乳酸发酵。

#### **3.1.2** 苹果酸**-**酒精发酵法**(MAF)**

苹果酸-酒精发酵法(MAF)是应用微生物对葡萄酒降酸的另一个途径。粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）能正常利用糖作底物生成酒精，其次还

能在厌氧条件下分解苹果酸，最终生成乙醇和CO2（图1-2）。

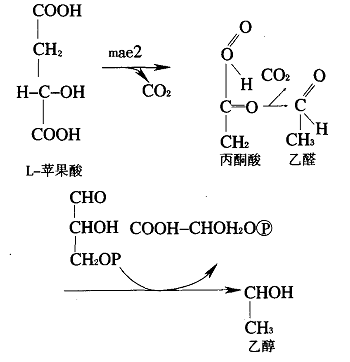


图1-2 苹果酸-乙醇转化的途径

Fig. 1-2 Possible transformation of L-malic acid to alcohol

Taillandier等[42]的研究中显示粟酒裂殖酵母对苹果酸有较高的耐受性，可以降解胞外29.0 g/L的L-苹果酸，但是菌体的生长并不受影响，且糖代谢也不会受抑制。Ogbonna等[43]利用固定化技术将粟酒裂殖酵母置于多相生物反应器中进行

MAF。结果酵母胞外58%～76%的L-苹果酸能够被降解，总酸下降幅度在

17%-38%之间。

MAF可以保持葡萄酒的清爽感，避免乳酸过量带来的缺陷，因此运用于干白葡萄酒[44]的降酸。然而MAF也存在以下缺点：粟酒裂殖酵母最适发酵温度偏高，发酵速度较慢，在自然发酵中容易被酿酒酵母取代并受抑制而影响降酸水平

[45]；直接用粟酒裂殖酵母进行葡萄汁或葡萄酒的发酵易产生不良气味[46]，直接

影响酒的最终品质。

### **3.2** 降酸微生物的研究

在果酒的降酸工艺中，无论乳酸菌的MLF还是粟酒裂殖酵母的MAF，都存在着工艺难以控制，容易影响酒质的特点。筛选具有降酸能力的酵母菌株，除了从水果中自然分离外，育种手段主要有原生质体融合、基因工程技术等，使生产菌株在酿造的同时具有降酸的功能。

#### **3.2.1** 降酸菌株的分离筛选

从自然发酵的果酒中，分离乳酸菌是选育降酸菌株的重要手段之一[47]。许多学者从法、意、葡、西班牙的葡萄酒中分离出的菌株，77%以上均属于葡萄酒明串珠菌（*Leuconostoc*）[48]，其具有耐低pH和高酒精度的能力。李翠霞等[49]从酒精发酵结束后的单品种葡萄酒中分离得到酒类酒球菌（*Oenococcus*），证明具有较好的酿酒适应性，可用于葡萄酒MLF。何志刚等[50]从枇杷中分离出植物乳杆菌，研究发现其可耐受120 mg L-1的总SO2浓度。

选育具有降解苹果酸的酵母，是果酒生物降酸的新兴技术。文连奎、王文华

等[51]的自行筛选的陆生伊萨酵母（*Issatchenkia terricola*）能够降解L-苹果酸和柠檬酸。该菌株对SO2的耐受性可达450 mg L-1，耐5%酒精，最低pH值为2。高卫卫等[52]的研究中发现产朊假丝酵母(*Candida utilis*)可以完全降解L-苹果酸、琥珀酸和柠檬酸等，当葡萄糖时存在对苹果酸的降解有抑制作用。M. Saayman[53]的研究也报道产朊假丝酵母具有降解苹果酸的能力。

#### **3.2.2** 原生质体融合选育

利用原生质体融合(protoplast fusion)技术突破物种间的生殖隔离进行杂交，而且可以使杂交的双亲细胞质基因融合，从而达到改良性状（由胞质基因控制的）的目的。它是选育具有降酸特性的酿酒酵母是菌种选育的一个重要方向。李华等

[54]将酿酒酵母和酒类酒球菌进行原生质体融合，获得一株既能降解酸又能酒精

发酵的融合子。Churdchai等[55]研究中将酿酒酵母和酒类酒球菌进行融合，获得了一株生长特性与酿酒酵母很类似的，并且具有苹果酸-乳酸发酵能力的重组菌株，不足的是该菌株基本丧失了酒精发酵的能力。高玉荣等[56]将酿酒酵母与粟酒裂殖酵母进行原生质体融合，通过遗传稳定，降酸性能、酒精发酵性能进行评估，筛选的融合子能够降解30.4%的苹果酸。

#### **3.2.3** 基因工程技术选育

基因工程( genetic engineering)技术被广泛应用于食品行业[57]，尤其是食品资源的利用、改造和检测等方面发挥了重要的作用。国内外果酒降酸的技术思路，是将乳酸菌和粟酒裂殖酵母的苹果酸降解的相关基因经过克隆、转化到酿酒酵母中，构建苹果酸-乳酸酵母(malolactic yeast)和苹果酸-酒精酵母（malo-alcoholic

yeast），使重组的酿酒酵母可以达到酒精发酵和降酸的目的[58]，从而简化酿造工艺。

Williams[59]、Ansanay[60]等克隆测序苹果酸-乳酸酶基因(*mle*),并转化酿酒酵母，获得了不同程度的表达。Miller等[61]克隆并表达了*mle*基因，同时观测pH值和酒精含量对*mle*基因表达的影响。刘延林、李华等[62]分别克隆苹果酸乳酸酶基因(*mle*)和苹果酸通透酶基因(*mleP*)并转化酿酒酵母，通过对转化子进行功能性检测，结果表明苹果酸的相对降低率为20.18%-20.85%，对照菌株的乳酸生成量为0，酵母的转化子L-乳酸生成量为1.2-1.3g/L，具有一定的苹果酸转化L-乳酸的能力，但未见后续报道。

### **3.3** 固定化降酸技术

固定化技术（immobilization technology）是利用用化学或物理手段，将游离微生物或酶定位在限定的空间区域里，提高微生物细胞或酶的浓度，从而保持较高的生物活性，并实现反复利用的方法。发展至今已见成熟，普遍应用于食品[63]、医药[64]、化工[65]及环保[66]等领域，在酒精和酒类的发酵中[67]也常常采用，该技术具有抗污染能力强、连续使用、易于与产物分离等优点。

近年来，有些学者尝试在葡萄酒的苹果酸-乳酸发酵中使用固定化乳酸菌进行降酸。Maicas等[68]用带正电荷的海绵纤维素来吸附固定*O. oeni*细胞，其对苹果酸-乳酸的转化率高于50%. Kosseva[69]等在用果胶酸盐微胶囊固定乳酸菌细胞进行MLF，降解白葡萄酒中近30%的苹果酸，转化率是游离细胞的2倍以上。刘树文等[70]利用酒明串珠菌( *Leuconostoc oenos*) 3lDH对模式酒进行降酸处理，发现固定化的苹果酸-乳酸酶（MLE）活力最大可达到游离细胞的1.76倍。

也有一部分学者采用固定化酵母，对果酒进行降酸处理，取得较好的效果。Ciani [71]采用海藻酸钙固定裂殖酵母进行MAF降酸，有易于控制、固定化细胞活力稳定等优点。Hong等[72]利用海藻胶和栓皮栎碳混合，固定化东方伊萨酵母

（*Issatchenkia orientalis*）进行降酸，降解了91.6%的苹果酸。

## **4.** 本论文目的意义与研究内容

### **4.1** 研究目的和意义

枇杷本身具有良好的食疗价值，而枇杷酒能够较好的保存枇杷鲜果的营

养及药用价值，具有明显的保健功效。枇杷酒是具有高附加值的产品。传统枇杷酒的生产过程采取一次榨汁一次发酵的形式，生产菌种主要是酿酒酵母。传统枇杷酒的生产工艺流程如下：

枇杷 分选 破碎（破碎机） 压榨（气囊压榨机）



加入亚硫酸

澄清（控温发酵罐） 发酵（控温发酵罐）倒罐（贮酒罐）



活性酵母

冷冻（冷冻机供冷） 过滤（硅藻土过滤机） 除菌（膜过滤机）

（纸板板框式精滤机）（孔径≤0.45μm）

灌装压塞成品包装（贴标签，装箱）

（等液位自动灌装机） （自动压塞机）

瓶的清洗消毒（洗瓶机）图1-3传统枇杷酒生产流程

Fig 1-3 Production flow of traditional loquat wine



传统工艺中，由于酿酒酵母基本不利用原料中的有机酸，尤其是固定酸中的苹果酸，最终造成成品酒总酸偏高，加上苹果酸口感酸涩，柔和指数较低，影响综合品质。选育具有降酸能力的菌种，改进传统酿造技术，有望提高枇杷酒综合品质，促进枇杷酒产业的发展。

目前，国内学者多集中于研究枇杷酒的酿造工艺，对解决枇杷酒酸度高、风味欠佳的关键技术难题报道较少。麻成金等[73]用新鲜枇杷果为原料进行枇杷酒酿造，并进行了20d以上的后发酵和90d的陈酿，但未对酒的酸度情况进行说明；叶顺君等[74]也进行了发酵条件的探讨，未见其对枇杷酒酸度解决方案的进一步研究；马波等[75]则对原酒酸度进行了调整，改善枇杷酒的风味。

枇杷酒降酸工艺的研究，国内外报道较少。本课题组李维新博士从自然发酵的枇杷酒醪中，选育出具有耐硫能力强、苹果酸-乳酸酶(MLE)活力高的优良苹果酸-乳酸发酵（MLF）植物乳杆菌R23。运用于枇杷酒降酸发酵，发酵周期短、

降酸能力强，但存在启动温度较高，需要乳糖协助、投放不便捷等的局限性。产朊假丝酵母（*Candida utilis*），亦称产朊圆酵母或食用圆酵母，能利用胞

外的L-苹果酸[52]、延胡索酸[76]、柠檬酸[77]、琥珀酸、乳酸，并将其作为唯一的碳源。降低成品酒中有机酸（尤其是苹果酸）的含量，适当提高酒精度，是改善枇杷酒柔和指数的有效措施之一，也是改善品质的关键技术。因此，通过基因工程技术构建降酸酵母菌株，应用于枇杷酒的生产，将有助于改变酒中微量组分的含量和比例，提高枇杷酒的柔和指数，同时改变呈香物质的组成，克服化学和物理降酸方法对枇杷酒口感带来的不良影响。

非酿酒酵母包括汉逊酵母（*Hansenula*）、假丝酵母（*Candida*）、裂殖酵母

（*Schizosaccharomyces*）、克勒克酵母（*Kloeckera*）、梅氏酵母（*Metschnikowia*）、接合酵母（*Zygosaccharomyces*）等，其产生酒精的能力弱，但可改变高级醇、酯类和单萜烯醇等成分含量[78]，赋予果酒水果香、酯香、香料香和植物香等[79]，使果酒特色更加凸显。有研究表明[80]，使用耐热克鲁维酵母和酿酒酵母混合发酵，实现了生物降酸；使用酿酒酵母和法尔皮有孢汉生酵母发酵苹果酒，增加了乙酯类物质含量[81]。产朊假丝酵母是一种产香酵母，在发酵过程中会产生一些高级醇、低级脂肪酸和酯类等芳香物质，从而使果酒气味芬芳，果香浓郁[82]。将一次发酵获得的枇杷酒，接种产朊假丝酵母进行降酸发酵（二次发酵），不仅能够有效的降解酒中的苹果酸，还能改善枇杷酒的风味。

### **4.2** 主要研究内容

本研究目标是克隆粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶基因，使其在整合型载体的携带下进入产朊假丝酵母中表达，构建具有降解苹果酸能力的菌株。在传统酿酒酵母发酵枇杷酒之后，以发酵剂的的形式投放重组的产朊假丝酵母进行降酸，在改善酸度的同时，改变枇杷酒部分香气组成，赋予其特有的香气特征。

#### **4.2.1** 构建降酸酵母菌株

苹果酸通透酶是苹果酸的运载蛋白，通过氢离子泵通道运输将苹果酸从细胞外运输到胞质内。苹果酸通透酶由苹果酸通透酶基因( *mae*1)编码，为组成型表达，受氧化磷酸化抑制因子的抑制。苹果酸通透酶在苹果酸的活性运输中起重要作用，也是粟酒裂殖酵母高效降解苹果酸的关键因素之一。产朊假丝酵母是FDA认定的少数可作为食品添加剂的酵母，可用于食品和药品的生产，同时也是一种

有前途的表达载体[83]。粟酒裂殖酵母只有在葡萄糖等其他碳源存在的情况下，才能有效转运并降解苹果酸。而产朊假丝酵母对苹果酸跨膜运输具有机制诱导效应并受到葡萄糖的抑制，进而影响苹果酸的降解。克隆粟酒裂殖酵母苹果酸通透酶*mae1*，将其整合到产朊假丝酵母中表达，构建降酸酵母菌株。基本思路如下：

⑴ 构建整合型质粒

提取粟酒裂殖酵母的总RNA，以报道的粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶基因

*mae*1的序列为依据设计引物，分别以基因组和cDNA为模板，克隆得到苹果酸通透酶基因*mae*1。通过双酶切、回收、连接，构建重组表达质粒pSH47-mae1。将pSH47表达质粒上的GAL启动子换成PGK1启动子，构建重组表达质粒pSH47-PG-mae1。

Amp



URA3

SacI

PGK1promoter

EcoRI

pSH47

SacI GAL1-promoter

EcoRI

6979 bp

Cre

NdeI

781 bp

CYC1-terminator

Amp



URA3

SacI PGK1-promoter

EcoRI

pSH47

7293bp

Cre

NdeI

CYC1-terminator

EcoRI

苹果酸通透酶（mae1）

1317 bp

NdeI

URA3



pSH47-mae1

7579 bp

CYC1-teterminator NdeI

Amp

SacI

mae1

EcoRl PGK1-promoter

图1-4 整合型质粒pSH47-mae1的构建

Fig. 1-4 Construction ofintegrative plasmid pSH47-mae1

⑵表达重组菌株

将pSH47-mae1重组质粒线性化，与感受态产朊假丝酵母混合进行电转化。对酵母转化子的基因组进行PCR验证，筛选重组菌株。对菌株的降酸能力进行比较，并验证高产菌株的传代稳定性。

#### **4.2.2** 降酸酵母菌株的发酵特性及其固定化研究

固定化的酵母细胞，具有生长停滞期短，抗污染能力强，可连续生产，使用简易等特点，在酒类的生产[84]上日益被认可。本研究拟比较不同材料对酵母菌株降酸能力的影响，酵母菌株耐SO2、耐酒精的特性，研究固定化酵母菌株回收使用的效果，为其在枇杷酒降酸发酵提供依据。

#### **4.2.3** 降酸处理后枇杷酒的感官品质研究

固相微萃取（SPME）技术用于枇杷酒的感官品质分析，具有无需有机溶剂，简便快速，集采样、萃取、浓缩于一体的特点[85]，与气相质谱仪联用（GC-MS） 配合使用，近年来在食品成分分析[86]领域发展迅速，是很有前景的分析技术之一。利用顶空固相微萃取（HS-SPME）和气质联用（GC-MS）技术，研究降酸处理前后枇杷酒的香气成分差异、分析其对感官品质的影响。同时研究降酸处理对枇杷酒中苹果酸含量影响，酒精度、糖度、色度及其对柔和指数的影响，对降酸前后的枇杷酒进行感官品质比较分析。

#### **4.2.4** 降酸处理后的枇杷酒营养及抗氧化功效的研究

枇杷果实含有丰富的糖类，包括葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖等；有机酸中苹果酸占83%；此外还含有氨基酸和矿物质等营养素[87]。黄酮类物质和维生素C是果酒中重要的抗氧化活性成分。研究降酸前后枇杷酒氨基酸组成和变化，微量营养素矿物质、维生素的变化，研究其营养保留情况。同时测定其降酸前后总黄酮、总酚等变化，以国产解百纳干红和雷司令干白为对照，研究其总抗氧化能力、羟自由基清除能力和DPPH自由基清除能力，为枇杷酒营养和功效研究提供依据。

# 第二章 降酸酵母菌株的构建

**第一节苹果酸通透酶基因（*mae*1）的克隆**

酿酒酵母在酒精发酵过程中只能代谢微量的苹果酸，主要原因是没有转运胞外L-苹果酸的机制，只能靠简单的扩散[88]。Volschenk[42]单独将苹果酸酶基因

（*mae*2）转进酿酒酵母中，结果阳性酵母转化子不能有效的降解苹果酸，分析原因可能是缺乏苹果酸转运蛋白[10]。由此可见，构建降酸酵母菌株的关键步骤是使细胞具有苹果酸通透酶基因（*mae*1）。

本研究以报道的粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶的序列为依据，设计引物，分别以基因组和cDNA为模板，克隆得到苹果酸通透酶基因（*mae*1）。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 材料

#### **1.1.1** 菌种与载体

大肠杆菌（*Escherichia coli*）DH5a，本实验室购买并保存；

粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）1760购于中国工业微生物菌种保藏中心，编号CICC 1760；

质粒pMD18-T（Amp+, △lac）：购自TaKaRa公司；

#### **1.1.2** 引物序列

P1: 5'-CCGGAATTCATGGGTGAACTCAAGGAA-3'

P2: 5'-GGAATTCCATATGTTAAACGCTTTCATGTTCACT-3'

分别引入EcoRⅠ和NdeⅠ两个酶切位点。

#### **1.1.3** 工具酶与主要试剂

ExTaq DNA聚合酶，限制性内切酶EcoRⅠ、NdeⅠ，逆转录主要试剂盒（购自TAKARA公司）；胶回收主要试剂盒，酵母基因组提取主要试剂盒（购自上海生物工程公司）；PCR引物由上海生物工程公司合成；生化主要试剂的配制参考

《分子克隆III试验指南》[89]。

#### **1.1.4** 主要培养基和缓冲液

(1) YPD培养基（g·L-1）：酵母浸膏10，蛋白胨20，葡萄糖20，pH自然；

(2) LB液体培养基（g·L-1）：蛋白胨10，酵母浸膏5，氯化钠10，pH 7.0（固体培养基在液体培养基的基础上添加25g琼脂粉）；

（3）氨苄青霉素：用无菌的超纯水将氨苄青霉素配成100mg mL-1的储存液，-20℃保存；

(4) 50×TAE电泳缓冲液（g·L-1）：Tris 242 ，冰乙酸57.1mL, 0.5M EDTA 100mL

（pH8.0）；

(5) TE缓冲液：10mmol L-1 Tris-HCl(pH8.0)，1mmol L-1 EDTA（pH8.0）；

（6）碱裂解液Ⅰ：50mmol L-1葡萄糖，10mmol L-1 EDTA(pH8.0)，25mmol L-1 Tris-HCl(pH8.0)，121℃，灭菌15min；

（7）碱裂解液Ⅱ：1% SDS, 0.2N NaOH（现配现用）；

（8）碱裂解液Ⅲ：29.4%乙酸钾，乙酸11.5%（v/v）。

#### **1.1.5** 主要仪器

恒温摇床，SHK-99-II，北京北方同正；凝胶图像分析仪，JS-380A，上海培清；

台式微量高速冷冻离心机，BEKAMN Microfuge 22R，美国；

PCR仪，Applied Biosystems 2720，美国；稳压电泳仪，DYY-8，北京市六一；

电转仪，Bio-Rad，美国。

### **1.2** 方法

#### **1.2.1** 粟酒裂殖酵母的培养

挑取少许保藏在-4℃斜面粟酒裂殖酵母1760，划线到YPD平板28℃培养

48h。挑取单菌落到YPD的液体培养基中，28℃200r/min振荡培养48h备用。

#### **1.2.2** 粟酒裂殖酵母基因组的提取

(1)取酵母菌液1.0 mL, 1000 r/min离心30 s，收集菌体；

(2)每20 mg菌体湿重加600μL酶解缓冲液，同时加入1.2μL的巯基乙醇和50μL蜗牛酶储存液，37℃（恒温水浴）3 h后，5000 r/min离心10 min，去上清；

(3)往沉淀中加入180μL消化缓冲液和20μL蛋白酶稀释液，充分混匀，

56℃水浴30～60min，间或混匀至细胞完全裂解；

(4)水浴后加入1μL RNA酶，用枪混匀，37℃水浴5 min后加入200μL BD

缓冲液，充分混匀；

(5)加入200μL无水乙醇，充分颠倒混匀，将吸附柱放入收集管中，用移液枪将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加至吸附柱中，室温静置2 min, 12000 r/min离心3 min，弃废液；

(6)将吸附柱放回收集管中，加入500μL PW Solution, 10000 r/min离心1 min，弃废液；

(7)将吸附柱放回收集管中，加入600μL Wash Solution, 10000 r/min离心1 min，弃废液，将吸附柱放回收集管中，10000 r/min离心2 min，置于烘箱中干燥20 min；

(8)将吸附柱放入干净的1.5 mL离心管中，往吸附膜中央加入20μL ddH2O，

室温静置5 min, 10000 r/min离心1 min即得到酵母基因组。

#### **1.2.3** 酵母总**RNA**的提取

(1) RNA提取药品及试验器材准备

研钵、玻璃器具、药勺等用锡箔纸包好，置于180℃的烘箱烘烤4 h；枪头、离心管、PCR管等121℃灭菌1 h后烘干备用；用0.01%的DEPC配置75%无水乙醇；RNA室紫外灭菌8 h。

(2)粟酒裂殖酵母液体培养48 h后，离心收集菌体，采用Trizol法提取粟酒裂殖酵母1760的总RNA，具体操作步骤如下：

将收集的菌体轻轻刮到研钵中，加入液氮将菌体磨至粉末状后，分装到

1.5mL离心管中；加入1 mL Trizol主要试剂，充分匀浆，室温静置5 min；在裂

解液中加入0.2 mL氯仿，漩涡振荡15 s，无明显的分层现象，室温静置2 min；

12000 r/min，4℃离心15 min，取上清至另一离心管中；加入等体积的异丙醇，轻轻混匀离心管中液体，室温静置10 min; 12000 r/min，4℃离心10 min，弃上清；轻轻沿离心管壁加入1 mL 75%乙醇，轻轻混匀洗涤沉淀；7500 r/min，4℃离心5 min，弃上清；吹干或者室温晾干，加入适量DEPC H2O溶解RNA沉淀，待完全溶解后，取1μL稀释，测OD260/OD280的吸光值。

#### **1.2.4** 逆转录获得**cDNA**

以提取的总RNA为模板，以Oligo dT为引物进行反转录，按照逆转录试剂盒的说明进行逆转录操作，获得粟酒裂殖酵母的cDNA。反应体系如表2-1。

表2-1 逆转录反应体系

Tab 2-1 Reverse transcription reaction system

反应物体积（μL）

模板0.5

oligo(dT) 1

RNase freed H2O 4.5

75℃保温10min，冰上迅速冷却2min以上后加入以下主要试剂；

|  |  |
| --- | --- |
| buffer | 2 |
| RT enzyme | 0.5 |
| RNase freed H2O | 1.5 |

42℃保温1h，75℃保温15min

#### **1.2.5** 苹果酸通透酶**mae1**的克隆

以粟酒裂殖酵母菌株*mae*1基因（GenBank ID EF125015.1）序列为模板，采用Oligo 7.0设计*mae1*基因扩增引物P1/P2:（下划线处为酶切位点）

P1: 5'-CCGGAATTCATGGGTGAACTCAAGGAA-3' (EcoRⅠ)

P2: 5'-GGAATTCCATATGTTAAACGCTTTCATGTTCACT-3' (NdeⅠ)

分别以基因组和cDNA为模板进行PCR扩增，PCR反应体系见表2-2。

表 2-2 PCR反应体系

Tab 2-2 The PCR reaction system

| 反应物 | 体积(μL) |
| --- | --- |
| 10×ExTaq Buffer | 5 |
| dNTP | 4 |
| 上游引物 | 1 |
| 下游引物 | 1 |
| 模板 | 2 |
| ExTaq 酶 | 0.25 |
| ddH2O | 加至 50 |

PCR反应条件：以粟酒裂殖酵母的cDNA为模板，P1/P2为引物进行mae1

的PCR扩增。反应条件：95℃预变性5min；94℃变性30 s；57℃退火30 s；72

℃延伸80 s ，共30个循环；72℃延伸10 min; PCR产物保存于4℃，取3μL PCR

扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳PCR。

#### **1.2.6** **PCR**产物的回收

使用上海生物工程公司的胶回收试剂盒，进行*mae*1胶回收。具体操作步骤如下：

(1)采用琼脂糖凝胶电泳将目的条带分开后，用干净的手术刀片将目的片段切下，放入1.5 mL离心管中（先称量空离心管质量）；

(2)称量胶块的质量，按每100 mg琼脂糖（不足100 mg用水补足）加入300

μLBuffer B2；

(3)将离心管置于50℃水浴5-10 min，间或混匀，直至胶块完全融化；

(4)将融化完全的液体全部转移至吸附柱，12000 r/min离心30 s，倒掉收集管中的液体，将吸附柱放入同一收集管中；

(5)加500μL Wash Solution, 12000 r/min离心30 s，弃收集管废液，重复两次；

(6)将空吸附柱和收集管放入离心机，12000 r/min离心1 min，室温下晾干

或者用电吹风吹干乙醇。

(7)将吸附柱放入干净的EP管，沿着吸附柱的中心加入20μL ddH2O，室温静置1～2 min, 12000 r/min离心1 min，即得到目的基因的回收产物。

#### **1.2.7** 目的基因的连接

将回收的PCR产物与pMD-18T Vector进行连接反应，反应体系如下表2-3。表2-3 pMD-18T载体与PCR产物连接体系

Tab 2-3 The pMD-18T vector and PCR product ligation system

反应物体积（μL）

Solution I 5

pMD-18T 载体 1

PCR 回收产物 4

ddH2O 加至 10

低速离心混匀，16℃连接12h

#### **1.2.8** 转化大肠杆菌

(1)大肠杆菌DH5α感受态细胞的制备操作步骤如下：

① 挑取少许甘油保存DH5α菌液划线于LB固体培养基上，37℃过夜培养

18 h后；从平板上挑取DH5α单菌落，接种到LB液体培养基中，230 r/min, 37

℃培养12 h；

② 取上述菌液500μL接种于100 mL LB液体培养基中，230 r/min, 37 ℃

培养2～3 h，至OD600＝0.3-0.4;

③ 将菌液分装在3个50 mL离心管，冰浴10 min, 4℃，4000 r/min离心 7

min后弃上清；

④将3管沉淀合于1管，加入30 mL冰预冷的75 mmol CaCl2,重悬沉淀后，冰上放置30 min后，4000 r/min, 4℃离心5 min后弃上清；

⑤ 加入4 mL 冰预冷的75 mmol CaCl2（含15%甘油），重悬沉淀；

⑥ 分装：每个EP管加入200μL菌悬液；

⑦ 冰上放置2-4 h后，-80℃保存备用。

(2)转化

①将10μL连接产物加入到100μL感受态细胞中，用枪头轻轻混匀，置于冰上30 min；

②42℃水浴热击90 s后，迅速将离心管放置冰上2 min；

③ 加入800μL无抗生素LB液体培养基，100 r/min, 37℃振荡培养1.5 h；

④ 室温8000 r/min 离心1 min，用枪吸取750μL上清，保留150μL菌悬液，涂布于含Amp+的LB固体培养基平皿，至菌液被完全吸收后可倒置培养，37℃培养16 h后，观察菌落的生长情况。

#### **1.2.9** 阳性克隆子的筛选

用10μL小枪头挑取转化平板上的几个单菌落，接种于4 mL含氨苄青霉素的抗性LB液体培养基中，做好标记，37℃培养12 h后观察菌液的生长情况；挑取有明显浑浊的试管进行菌液PCR验证，将上述50μL PCR反应体系分装至

3个PCR管中，每个反应体系15μL，分别1μL的菌液为模板，PCR反应条件同上；反应结束后，取3μL的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.2.10 序列的测定与分析

取验证正确的克隆子于15%的甘油保存，并送至上海生工生物技术有限公司测序，分析*mae*1开放阅读框及*mae*1全长序列。

## **2** 结果与分析

### **2.1** 总**RNA**的提取

将提取总RNA纯度和浓度，稀释500倍后分光光度计测定，测得A260 为

0.023, A280为0.015，A260/A280为1.72，经计算后可得样品DNA的浓度为0.46

μg/μL，，浓度和纯度符合要求，可以进行后续的试验。

### **2.2** **mae1**基因的克隆

以粟酒裂殖酵母cDNA作为模板，P1/P2为引物进行*mae1*基因PCR扩增，

PCR产物经过琼脂糖凝胶电泳检测，结果见图2-1。由图2-1可以知，目的条带的大小约为1300 bp，与预计的条带大小相符。

### **2.3** 阳性克隆子的筛选

将PCR产物与pMD-18T(simple)克隆载体连接，转化大肠杆菌DH5a，涂布于氨苄青霉素平板，挑取2个单菌落，以P1/P2为引物进行菌液PCR，用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，结果见图2-2。



图2-1 *mae*1基因PCR电泳

Fig. 2-1 PCR of mae1 M：DL2000Mark；1：*mae*1；

图2-2 重组子菌液PCR

Fig. 2-2 Clony PCR of recombinants

M: DL2000；

由图2-2可知，两个重组子均扩增出目的条带，大小约为1300 bp. *mae*1

已成功的连接到pMD-18T(simple)克隆载体。将验证后的阳性克隆子送至上海生工测序。

### **2.4** 测序结果及分析

#### **2.4.1** **Mae1-cDNA**序列分析

将克隆mae1-cDNA测序结果经过拼接，去载体，去酶切位点等处理后得到

mae1-cDNA基因序列，mae1-cDNA的序列见附录1.

mae1-cDNA基因全长为1316 bp，将测序结果与NCBI数据库中序列进行

Blast同源比对，与已报道的粟酒裂殖酵母苹果酸通透酶的同源性达到99%。将测序正确的阳性重组子命名为pMD18T(simple) - mae1。

#### **2.4.2** **mae1-DNA**与**mae1-cDNA**序列比对分析

通过ClustalX软件对mae1-DNA与mae1-cDNA进行多序列比对，结果见图2-3和图2-4。经序列比对分析，mae1-DNA与mae1-cDNA相差一个核苷酸序列，第13个核苷酸未匹配上。mae1-DNA序列的第十三位为A碱基；mae1-cDNA第十三位不含碱基。这可能是mae1基因中的内含子。



图2-3 mae1-DNA与mae1-cDNA序列比对（从1～700bp）

Fig. 2-3 Sequence alignment of mae1-DNA and mae1-cDNA (from 1 to 700bp)



图 2-4 mae1-DNA与mae1-cDNA序列比对（从701～1317bp）Fig.2-4 Sequence alignment of mae1-DNA and mae1-cDNA (from 701 to 1317bp)

## **3** 小结

研究采用Trizol法提取粟酒裂殖酵母的总RNA，以已报道的粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶基因（*mae*1）的序列为依据设计引物，分别以基因组DNA 和

cDNA为模板克隆得到*mae*1. PCR产物经过回收、连接、转化后，应用氨苄青霉素抗性平板筛选出阳性克隆子，经PCR、酶切验证的阳性克隆子送至测序，获得苹果酸通透酶mae1全长基因组序列和cDNA序列。

通过基因比对分析可知：该基因的全长DNA序列与NCBI报道的粟酒裂殖酵母苹果酸通透酶序列同源性达到100%；该基因cDNA序列同源性达到99%。

将mae1-DNA与mae1-cDNA两个序列进行比对，可知该基因的cDNA序列少了一个碱基，第13位的碱基被剪切。由已报道的粟酒裂殖酵母苹果酸通透酶*mae*1基因的序列中可知，*mae*1不含内含子，本研究的试验结果与报道存在差异。其原因可能是：*mae*1基因存在一个内含子，位置在全长序列中的第13位；另外也有可能是菌株之间的差异而导致了cDNA序列的差异。

苹果酸通透酶基因存在于大多数生物中，果蝇[90]、微生物、具有C4循环的植物中均有报道。微生物中如米曲霉、黑曲霉（C4循环中苹果酸的转运蛋白）、酒类酒球菌、粟酒裂殖酵母等，其苹果酸通透酶基因相应序列在NCBI上已有报道。由Blast结果可知，物种之间的苹果酸通透酶基因的序列差异较大，不具有同源性，这也可能是物种之间苹果酸的代谢水平存在差异的原因之一。

粟酒裂殖酵母能够有效的降解苹果酸，进行苹果酸-乙醇发酵。它对苹果酸有较高的耐受性，能够降解29.0 g L-苹果酸，并且对菌体的生长、糖代谢能力都不会产生不良影响。Grobler等[91]通过粟酒裂殖酵母突变菌株（缺乏苹果酸的转运能力），利用Sourthern blot和Northern blot方法分离得到苹果酸通透酶基因，并通过测序得到其全长序列。Grobler等的结果显示苹果酸通透酶是一个跨膜蛋白，其二级结构与原核、真核生物的膜整合蛋白相似，在模拟的mae1蛋白中不含N-段膜信号肽[92]，但存在一个内膜信号肽模型，在许多对mae1的深入研究中显示*mae*1整体上对二元酸具有选择性，尤其偏好L-苹果酸。粟酒裂殖酵母中分离得到*mae*1的全长序列，是目前唯一从降酸酵母中分离得到的苹果酸转运蛋白，后续研究均以Grobler所获得的序列为基础。Volschenk[46]、Saayman[53]等人以该序列为模板设计引物，进行*mae*1的克隆及其在酿酒酵母中的表达的研究。

综上，目前关于粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶基因的序列基本上已确定，且菌株间差异很小，同源性高。本研究中克隆得到的*mae*1基因，可以用于后续的产朊假丝酵母（*Candida utilis*）异源表达试验中，为构建高效降解L-苹果酸的酵母菌株奠定基础。

**第二节苹果酸通透酶基因（*mae*1）的整合表达**

整合型酿酒酵母可以更有效的减少重组表达质粒丢失，提高酵母转化子的遗传稳定性，解决了游离型重组表达质粒在酵母传代培养过程中目的基因的丢失。研究通过整合型表达质粒pSH47，将苹果酸通透酶基因*mae*1整合到产朊假丝酵母基因组中，构建具有降酸能力的酵母菌株。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 材料

#### **1.1.1** 菌种与载体

大肠杆菌（*Escherichia coli*）DH5a，由本实验室购买并保存；

产朊假丝酵母（*Candida utilis*）1422 购自中国工业微生物菌种保藏中心

（CICC）；

整合型酵母表达质粒pSH47，福建师范大学生命科学学院工业微生物教育部工程研究中心赠予，经实验室改造后含有PGK1 启动子序列；质粒pMD18-T

（Amp+, △lac）：购于TaKaRa公司。

#### **1.1.2** 引物序列

P1: 5'-CCGGAATTCATGGGTGAACTCAAGGAA-3'

P2: 5'-GGAATTCCATATGTTAAACGCTTTCATGTTCACT-3'

分别引入EcoRⅠ和NdeⅠ两个酶切位点。

#### **1.1.3** 工具酶与主要试剂

T4连接酶、exTaq DNA聚合酶，限制性内切酶EcoRⅠ和NdeⅠ（购于

TaKaRa 公司）；胶回收主要试剂盒，酵母基因组提取主要试剂盒（购自上海生物工程公司）；PCR引物由上海生物工程公司合成；生化主要试剂的配制参考分子克隆III试验指南[89]。

#### **1.1.4** 主要培养基和缓冲液

(1) YPD培养基（g·L-1）：酵母浸膏10，蛋白胨20，葡萄糖20，pH自然；

(2) LB液体培养基（g·L-1）：蛋白胨10，酵母浸膏5，氯化钠10，pH 7.0（固体培养基在液体培养基的基础上添加25g琼脂粉）；

(3) YNB降酸模拟培养基（g·L-1）：YNB1.7，硫酸铵5，葡萄糖20，L-苹果酸5；

(4)碱裂解液Ⅰ：50 mmol L-1葡萄糖，10 mmol L-1EDTA(pH8.0)，25 mmol L-1 Tris-HCl(pH8.0)，121℃，灭菌15min；

(5)碱裂解液Ⅱ：1% SDS, 0.2 mmol L-1 NaOH，现配现用；

（6） 碱裂解液Ⅲ：29.4%乙酸钾，乙酸11.5%（v/v）；

(7) STE: 10 mmol L-1 Tris-HCL(pH8.0)，1 mmol L-1 EDTA(pH8.0)，10 mmol L-1 NaCl；

(8) TE: 10 mmol L-1 Tris-HCl(pH8.0)，1 mmol L-1 EDTA（pH8.0）；

(9)氨苄青霉素：用无菌的超纯水将氨苄青霉素配置成100 mg/mL的储存液，-20℃保存；

(10) 50×TAE电泳缓冲液：Tris碱242 mL，冰乙酸57.1mL, 0.5 mol L-1 EDTA

100mL（pH8.0）。

#### **1.1.5** 主要仪器

恒温摇床，SHK-99-II，北京北方同正；凝胶图像分析仪，JS-380A，上海培清；

台式微量高速冷冻离心机，Microfuge 22R，美国贝克曼；

PCR仪，Applied Biosystems 2720，美国应用生物系统；稳压电泳仪，DYY-8，北京市六一仪器；

电转仪，Bio-Rad，美国伯乐。

### **1.2** 方法

#### **1.2.1** **pSH47-mae1**表达质粒的构建

(1)质粒双酶切

分别用限制性内切酶EcoRⅠ和NdeⅠ对pMD-18T(simple) -mae1重组质粒和表达载体pSH47进行双酶切，酶切体系见表2-4。

表2-4 酶切体系

Tab 2-4 Digestion system

反应物体积（μL）

pMD-18T(simple) - 15

mae1/pSH47

| 10×M Buffer | 5 |
| --- | --- |
| EcoRⅠ | 2 |
| NdeⅠ | 2 |
| ddH2O | 加至 50 |

低速离心混匀，37℃酶切 18h

(2)连接与转化

琼脂糖凝胶电泳分析酶切后的条带，回收目的片段mae1和pSH47大片段，连接体系见表2-5。

表2-5 pSH47-PG质粒与*mae*1连接体系

Tab 2-5 The pSH47-PG vector and mae1 ligation system

反应物体积（μL）

10×T4 Buffer 1

mae1 5

pSH47 1

T4-DNA ligase 1

ddH2O加至10

低速离心混匀，16℃连接12h

将连接产物转化大肠杆菌DH5a，具体操作步骤参照本章第一节的方法。

(3) pSH47-mae1重组子筛选

1）菌液PCR验证

用10μL小枪头挑取转化平板上的几个单菌落，接种于4 mL含氨苄青霉素的抗性LB液体培养基中，做好标记，230 r/min，37℃培养12 h后观察菌液的生长情况；挑取有明显浑浊的试管进行菌液PCR验证，将上述50μL PCR反应体系分装至3个PCR管中，每个反应体系15μL，分别1μL的菌液为模板，PCR反应条件同上；反应结束后，取3μL的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2）质粒PCR验证

将菌液PCR验证后的阳性克隆子扩培，提取质粒，步骤如下：

①取1.0 mL培养物倒入1.5 mL离心管中，用4℃离心机12000 r/min，离

心30 s，弃上清；

② 将细菌沉淀重悬于100μL冰预冷的Solution I中，用移液枪吹打混匀；

③加入200μL新配制好的Solution II，盖紧管盖，快速颠倒离心管约5次，以混匀内容物，冰上放置2 min；

④加入150μL冰预冷的Solution III，盖紧管口，反复颠倒离心管数次，使Solution III在粘稠的细菌裂解物中分散均匀，置于冰上3～5 min后，4℃12000

r/min离心5 min，将上清移至新的1.5 mL离心管中；

⑤ 加入等体积的酚/氯仿（1:1），振荡混合有机相和水相，4℃12000 r/min 离心2 min；

⑥ 取上清于干净的1.5 mL的离心管中，加入等体积的氯仿，于4℃12000

r/min离心2min；

⑦ 取上清，用2倍体积的无水乙醇-20℃放置1 h沉淀质粒；

⑧4℃12000 r/min 离心10 min，弃上清液；

⑨ 用1 mL 75%乙醇洗涤质粒，4℃12000 r/min离心3 min，重复洗涤一

次，自然风干，用20μL的ddH2O溶解沉淀后加0.5～1.0μL RNA酶，于37 ℃

水浴15 min, -20℃保存。

以上述阳性克隆子的质粒为模板，进行PCR验证，PCR体系及条件同菌液

PCR。

3） 酶切验证

选取上述验证的阳性克隆子的质粒进行双酶切，分别采用限制性内切酶

EcoRⅠ和NdeⅠ进行双酶切验证，酶切体系如下表2-6。

表2-6 重组质粒pMD18-mae1酶切体系

Tab 2-6 The pMD18-mae1 digestion system

反应物体积（μL）

pMD18-mae1 3

10×T Buffer 1.5

EcoRⅠ 0.2

NdeⅠ 0.2

ddH2O 加至 10

低速离心混匀，37℃酶切 18h

#### **1.2.2** 重组表达质粒的大量抽提

(1)挑取阳性克隆子pSH47-mae1的甘油保种管100μL，接种于100 mL含氨苄青霉素的LB液体培养基中，230 r/min，37℃过夜培养12 h；

(2)将100 mL的培养液分装在3根50 mL离心管，8500 r/min, 4℃离心3 min，弃上清液；

（3）将上述实验得到的3管的沉淀集中于1管，加入2 mL冰预冷SolI，冰上

放置10 min；

(4)加入4mLSolⅡ（现配现用），上下颠倒混匀，冰上放置15 min；

(5)加入3 mL冰预冷SolⅢ，轻轻混匀，冰上放置15 min；

(6) 8500 r/min，4℃离心30 min（观察上清的澄清状况，可适当的延长离心时间）；

(7)吸取上清液，加入2倍体积的无水乙醇，-20℃放置1 h；

(8) 8000 r/min, 4℃离心15 min后，弃上清；

(9)轻轻加入8 mL70%乙醇洗涤沉淀，避免沉淀上浮，8000 r/min，4℃离心

8 min后弃上清，用电吹风吹干乙醇；

(10)加入1mL ddH2O重悬沉淀，将悬浊液分装到两个1.5 mLEP管；

(11)每个EP管加入500μL冰预冷氯化铝（5 M）溶液，冰上放置5 min；

(12) 12000 r/min，4℃离心5 min后，取上清，并分装到3个EP管，每个管加入等体积的异丙醇，冰上放置10 min；

（13）10000 r/min，，4℃离心10 min；

(14)弃上清，加入1mL70%乙醇洗涤沉淀（不吹散），12000 r/min, 4 ℃离心3 min

(15)弃上清，电吹风吹干乙醇，将3管沉淀用500μLddH2O重悬后合于 1

管，加入1μL RNase, 37℃水浴30 min；

(16)加入500μL含13%PEG的NaCl（1.6 mol/L），混匀，冰上放置10 min；

(17) 12000 r/min, 4℃离心10 min后，弃上清，电吹风吹干，加入500μL

ddH2O溶解沉淀；

(18)分别用2倍体积酚、酚氯仿（1:1）、氯仿抽提蛋白质，12000r/min，4℃离心10min；

(19)取上清液，分别加入0.2倍体积SolⅢ，2倍体积无水乙醇，-20℃放置过夜；

(20) 12000 r/min，4℃离心10 min，弃上清，用1 mL70%乙醇洗涤沉淀；

(21) 12000 r/min, 4℃离心3 min，弃上清

(22)电吹风吹干乙醇后加入50μL ddH2O。

#### **1.2.3** 重组表达质粒转化产朊假丝酵母

(1) pSH47-mae1重组质粒的线性化

将pSH47-PG-mae1重组质粒用EcoRⅤ进行单酶切，酶切体系见表2-7。

表2-7 EcoRⅤ酶切体系

Tab 2-7 Digestion system of EcoRⅤ

反应物体积（μL）

质粒10

10×H Buffer 5

EcoRⅤ1

ddH2O加至50

低速离心混匀，37℃酶切5h

取少量的酶切液进行琼脂糖凝胶电泳，分析质粒的线性化效果直至完全线性

化，采用乙醇沉淀法回收目的片段，具体操作步骤参考质粒大量提取步骤22。

(2)酵母感受态细胞的制备及电转

① 将产朊假丝酵母1422接种于50 mL YPD液体培养中，200 r/min, 28 ℃

培养至OD600=1.5；

②将50 mL的菌液分装于两管50 mL离心管，4500 r/min，4℃离心5 min，弃上清；

③ 将两管沉淀合于1管，用25 mL冰预冷的无菌水重悬，洗涤菌体，4500

r/min，4℃离心5 min，用2 mL冰预冷1 mol/L三梨醇重悬沉淀；

④4500 r/min，4℃离心5 min后弃上清，加入200μL冰预冷的1M三梨醇溶液；

⑤取80μL感受态细胞和10μL线性化大量抽提质粒轻轻混匀后，将其转移到冰预冷的电转杯，冰浴5 min；

⑥ 电转条件：电压1200 v，电容25 uF，电阻200Ω，脉冲时间4 ms，电转

杯孔径0.1 mm；

⑦一次电击结束后，迅速加入300μL冰预冷的1mol l-1 ft梨醇溶液，后立即涂布与YPD平板，28℃培养12 h。

⑧ 吸取60μL菌液涂布于YPD平板，共涂布5个平板，28℃倒置培养12 h，观察单菌落的生长情况。

#### **1.2.4** 产朊假丝酵母转化子的筛选

(1)小量法提取重组子酵母基因组

①随机从上述的5个平板共挑出23个单菌落于5 mL的液体YPD培养基中，200 r/min，28℃振荡培养12 h；

② 吸取1.5 mL菌悬液与1.5 mLEP管中，8000 r/min, 4℃离心2 min；

③弃上清，用400μLSTE溶液洗涤菌体，8000 r/min，4℃离心2 min，重复洗涤两次；

④ 加入200μL TE溶液，充分重悬菌体沉淀；

⑤ 加入100μL Tris饱和酚，漩涡振荡30 min，充分破碎细胞后，12000 r/min，

4℃离心5 min；

⑥吸取上清至干净的1.5 mLEP管中，用TE补足200μL，加入等体积的氯仿抽提，12000 r/min，4℃离心5 min，重复两次

⑦ 吸取上清至1.5 mLEP管中，用TE补足200μL，加入1μL RNase, 37 ℃

水浴10 min；

⑧ 加入100μL氯仿，12000 r/min, 4℃离心5 min；

⑨ 吸取上清，即为纯化后的基因组，-20℃保存备用。

(2) PCR验证

以上述酵母转化子的基因组为模板，P1/P2为引物，进行PCR验证，PCR反应体系和PCR反应条件具体参考研究本章第一节*mae*1基因克隆。

#### **1.2.5** 重组酵母的发酵验证

随机挑选16株重组产朊假丝酵母于YPD培养基中活化，分别收集菌体，并用无菌水洗涤两次后，用无菌水重悬菌体，以相同的接种量（106 CFU mL-1）接种于含有0.5% L-苹果酸的YNB模拟果酒培养基中，28℃，200 r/min，振荡培养40 h，采用UPLC检测苹果酸含量。

#### **1.2.6** **UPLC**检测发酵液苹果酸含量

将发酵液经过12000 r/min离心10 min后，经过0.22μm微孔过滤膜处理，采用Waters ACQUITY UPLC超高压液相色谱仪检测发酵液苹果酸的含量。

检测条件：C18不锈钢柱（2.1×50 mm, 1.7 μm）；100%硫酸氢二铵缓冲液

（0.01M, pH2.7）；流速0.05 mL/min；检测波长210 nm；柱温35℃；自动进样，

进样量2μL。

## **2** 结果与分析

### **2.1** **pSH47-mae1**阳性克隆子的筛选、验证

#### **2.1.1 pSH47**和**pMD-18T**（**simple**）**-mae1**双酶切

采用限制性内切酶EcoRⅠ和NdeⅠ双酶切表达载体pSH47 和

pMD-18T(simple) -mae1，酶切电泳图谱见图2-5.



图 2-5 pSH47和mae1-pMD-18T（simple）双酶切

Fig. 2-5 Double digestion of pSH47 and mae1-pMD-18T（simple）

M1: λ-HindⅢdigest；1-2: pSH47表达质粒；3-4: mae1-pMD-18T(simple)

重组子；M2: DL2000

由图2-5可知，表达载体pSH47经过双酶切后，出现两片段，大小分别约为6500 bp、1000bp，大片段为pSH47表达载体片段，小片段为pSH47表达载体上Cre片段；pMD-18T(simple) -mae1经过双酶切后，出现两片段，大小分别约为2600 bp、1300 bp，大片段为pMD-18T（simple）载体片段，小片段为目的基因*mae*1。

琼脂糖凝胶电泳回收目的基因*mae*1及pSH47-PG载体片段，连接并转化大肠杆菌DH5α，涂布于氨苄青霉素的抗性平板上，挑取单菌落于含氨苄青霉素LB液体培养基中，扩大培养后保种，并进行菌液、质粒PCR验证，酶切验证。

#### **2.1.2** 菌液**PCR**验证

通过Amp抗性进行筛选，挑取2个单菌落于含氨苄青霉素的LB液体培养基中扩培，并提取质粒，以P1/P2为引物进行菌液PCR，结果见图2-6。由图2-6可知，两个重组子的菌液PCR均扩增出目的条带，大小与预期的相符。



图2-6 重组子菌液PCR

Fig. 2-6 Clony PCR of recombinants M：DL2000 DNA Marker；

1-2: pSH47-mae1重组子；

图2-7 重组子质粒PCR

Fig. 2-7 Plasmid PCR of recombinants

M: DL2000 DNA Marker；

1-2: pSH47-mae1重组子质粒

#### **2.1.3** 质粒**PCR**验证

提取上述经过菌液PCR的2个阳性的重组子质粒，进行质粒PCR验证，PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析，结果见图2-7。由图2-7可知，2个重组子的质粒均扩增出目的条带，片段大小与预期相符。

#### **2.1.4** 双酶切验证

采用限制性内切酶EcoRⅠ和NdeⅠ对上述经质粒PCR验证的2个阳性克隆子进行双酶切，结果见图2-8。从图中可以看出，pSH47-PG-mae1重组子质粒经过双酶切出现两个条带，大小分别约为6262 bp、1317 bp，大片段为质粒片段，小片段为目的基因*mae*1，条带大小相符。

经过上述3步验证，目的基因*mae*1已成功插入整合型表达载体pSH47-PG。将验证成功的重组质粒命名为pSH47-mae1，送至上海生工测序，片段序列正确，可进行酵母转化。

### **2.2** **pSH47-mae1**重组质粒线性化

采用限制性内切酶EcoRⅤ线性化重组质粒pSH47-mae1，琼脂糖凝胶电泳观察重组质粒的线性化效果，结果见图2-9。



图2-8 重组子双酶切Fig.2-8 Double digestion of recombinants

M: λ-Hind Ⅲdigest；

1-2: pSH47-PG-mae1重组子；

3: mae1

图2-9 重组子单酶切Fig.2-9 Single digestion of recombinants

M: λ-HindⅢdigest；1：pSH47-PG-mae1重组子

由图2-9可知，线性化后的质粒片段大小与预计的重组质粒大小相符。

### **2.3** 重组酵母的筛选及**PCR**验证

取两管80μL刚制备的感受态产朊假丝酵母，分别加入10μL已线性化的重组质粒pSH47-mae1，混匀进行电转化，加入1 mol/L ft梨醇，混匀后涂布与YPD平板上，28℃培养24h。挑取单菌落于液体YPD培养基中扩大培养并保种，分别提取酵母基因组。以*mae*1基因的引物P1/P2对酵母转化子的基因组进行PCR

验证，琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增产物，结果见图2-10。



图 2-10 产朊假丝酵母转化子基因组PCR Fig.2-10 Genome PCR of *Candida utilis* recombinants

M: DL2000 DNA Ladder Marker；

1: pSH47-mae1质粒mae1基因PCR（阳性对照）；

2-24: pSH47-mae1酵母转化子。

由图2-10可知，筛选得到23个转化子，其中有16个转化子扩增出目的条带*mae*1，为阳性转化子，目的基因已成功的整合到产朊假丝酵母基因组。将阳性克隆子保种，备用于后续的发酵试验。

### **2.4** **mae1**基因表达转化子的筛选

选取上述的16株产朊假丝酵母转化子于YNB模拟果酒培养基，28℃振荡培养40 h后，采用UPLC检测培养液中L-苹果酸含量，结果见表2-8。

表2-8 产朊假丝酵母系列转化子的降酸效果比较（*X**SD* ）

Tab. 2-8 Comparison on deacidification of*Candida utilis* recombinants

| 菌株 | 降酸量（g·L-1） | 降解率(%) |
| --- | --- | --- |
| Ck | 1.94±0.010 | 38.80 |
| CU-1 | 2.25±0.017\* | 45.20 |
| CU-4 | 2.17±0.058\* | 44.00 |
| CU-6 | 2.44±0.012\* | 48.60 |
| CU-7 | 2.33±0.020\* | 47.00 |
| CU-8 | 2.21±0.012\* | 44.40 |
| CU-10 | 2.36±0.010\* | 47.40 |
| CU-11 | 2.34±0.012\* | 46.60 |
| CU-12 | 2.25±0.012\* | 44.80 |
| CU-13 | 2.16±0.016\* | 43.00 |
| CU-14 | 2.11±0.016\* | 42.60 |
| CU-16 | 2.07±0.035\* | 41.80 |
| CU-19 | 2.16±0.010\* | 43.40 |
| CU-20 | 2.13±0.058\* | 42.00 |
| CU-21 | 2.19±0.020\* | 43.80 |
| CU-22 | 2.03±0.015\* | 41.00 |
| CU-23 | 2.21±0.010\* | 44.20 |

\**P*＜0.01，与原始菌株Ck相比差异极显著。

由表2-8可知，整合了目的基因*mae*1的产朊假丝酵母转化子降解苹果酸降解率能力明显都高于原始菌株（Ck），*mae*1基因得到了有效表达。其中菌株CU-6的降酸能力最高，苹果酸降解率达到48.6%，而原始菌株苹果酸的降解率只有

38.8%。

### **2.5** 重组酵母菌株**CU-6**培养特性

将产朊假丝酵母CU-6接种在YNB模拟果酒培养基中振荡培养40 h（28℃，

200 r/min），每4 h 取样一次，检测培养基中苹果酸浓度并测定菌体生长情况

（λ/A600），以原始菌株作为对照比较降酸效果，结果见图2-11。



6.0 9.0 Ck



5.0

4.0

苹果酸/g·L-1

3.0

2.0

1.0

0.0

0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40

t/h

8.0

7.0

6.0

5.0

λ/A600

4.0

3.0

2.0

1.0

0.0

CU-6

Ck CU-6



图 2-11 L-苹果酸降解和重组酵母菌株CU-6生长曲线

Fig. 2-11 L-malate acid degradation and growth curve for*Candida utilis* CU-6

由图2-11可知，重组酵母菌株CU-6与原始菌株相比降酸水平得到提高。重组酵母菌株CU-6生长速率在培养开始的8 h内较缓慢，但在12 h后高于原始菌株。重组酵母菌株CU-6降酸速率在培养开始后8 h内，略低于原始菌株；在培养开始后8 h后，则超过原始菌株，并一直延续至培养结束。

### **2.6** 产朊假丝酵母**CU-6**传代稳定性

将筛选得到的重组酵母菌株CU-6接种到YNB基础斜面上，28℃培养培养2d，而后保存在4℃下。每隔1mon接种到同样的斜面培养，重复5次。将所得的5代斜面同时接种到新的YNB斜面上，培养2d后，各接一环到液体培养基活化24h。将获得的菌液按5%接种量接到YNB降酸模拟培养基中，24℃静置培养5d，检测培养基中苹果酸浓度，结果见图2-12。

2

1.8

1.6

降酸量/g·L-1

1.4

1.2

1

CU-6 1 2 3 4 5

传代次数/n

图 2-12 传代次数对重组酵母菌株子CU-6降酸效果的影响

Fig. 2-12 Effect on deacidafication of generation times of recombinants CU-6

注：*P*＞0.05，各代与菌株CU-6相比差异不显著。

由图2-12可知，重组酵母菌株CU-6经过5次传代后，其降酸能力没有明显的下降，均在1.65g·L-1以上。可见，整合型表达质粒pSH47-mae1在产朊假丝酵母稳定表达，可为后续枇杷酒的降酸工艺使用。

## 3. 小结

研究利用酿酒酵母整合型表达质粒pSH47与目的基因连接，构建重组表达质粒pSH47-mae1。酿酒酵母整合型表达质粒pSH47不仅含有酿酒酵母的复制起始点，同时还含有能与产朊假丝酵母具有高度同源性的Ura标记基因序列，是产朊假丝酵母与表达质粒进行同源重组的整合位点[93]。通过pSH47整合型表达载体，可以顺利地将*mae*1基因整合到产朊假丝酵母的基因组。

酵母菌的启动子可分为两大类：一类是来自编码解糖酶基因的解糖启动子，如GAP、ADH1、ENO、HXT7等。这些启动子是组成型表达；另一类是调节型启动子，如GAL1、GAL7、GAL10都是半乳糖启动子，PGK1为葡萄糖诱导型

[94]. 因此pSH47需更换启动子，且必须能够在产朊假丝酵母中启动表达的。由于pSH47表达质粒上的启动子GAL为调节型启动子，需要半乳糖诱导，不利于实际的应用。在酿酒酵母中常用的主要有PGK1、HXT7、ADH1等。PGKI 比

ADHI启动转录的能力强，因此本研究将pSH47表达质粒上的GAL启动子换成

PGK1启动子。试验结果也进一步验证了Volschenk的结论，在本研究筛选的阳性酵母转化子中表达量较高。

研究表明[95, 96]，为赋予酵母转化子抗性筛选，一般在pSH47表达质粒上连接Kanr基因。原核生物中一般利用氨苄青霉素、卡那霉素等来筛选阳性转化子，而真核生物中利用G418来筛选阳性转化子。从转基因食品的安全性考虑，酵母菌株改良中通常用抗性或营养缺陷型标记来筛选，但不符合食品生产应用的要求。因此通过非抗性的方法进行基因转化是食品安全性[97, 98]的重要途径之一。本研究中筛选的阳性酵母转化子后期的应用主要是枇杷酒降酸，对安全性要求比较高，因此本试验采用无抗性标记的表达质粒。与报道的的研究相比，利用酵母转化子的基因组扩增*mae*1目的基因来筛选阳性克隆子，虽然工作繁琐，但有利于提高安全性。

# 第三章 酵母菌株降酸工艺的优化

微生物降酸法能够有效的降解果酒中的苹果酸等，并且增加果酒的风味、保持微生物稳定性，从而提高果酒的质量。目前枇杷酒的降酸研究大多沿用传统的乳酸菌进行苹果酸-乳酸发酵，而利用酵母进行生物降酸法报道较少。枇杷酒经发酵后，酒体中含有一定浓度的SO2、酒精度等，另外碳源、氮源和生长因子等营养物质相对贫乏。这些对重组酵母菌株CU-6的降酸效果均会产生影响。本章以发酵温度、接种量、SO2、酒精度和残糖质量等主要的因素为研究对象，在探讨其对降酸影响的基础上，选择影响显著的因素，采用响应面法优化重组酵母CU-6的降酸工艺，为酵母CU-6在枇杷酒降酸工艺中的应用提供依据。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 菌种

产朊假丝酵母（*Candida utilis*）CU-6：购自中国工业微生物菌种保藏中心

（CICC），经本实验室改造后并保藏。

### **1.2** 主要仪器

双人单面净化工作台，SW-CJ-2FD型，苏州净化；手提式蒸汽灭菌器，SYQ-DSX-280B，上海申安；恒温培养箱，LHS-150SC，上海福玛；

恒温摇床，SHK-99-II，北京北方同正；

高速冷冻离心机PC-6PLUS（Thermo Fisher Scientific），美国热电；

UPLC液相色谱分析仪（Waters ACQUTYTM），美国沃特世；

### **1.3** 主要试剂

#### **1.3.1** 药品

L-苹果酸（进口分装）；蔗糖、无水葡萄糖、(NH4) 2SO4、无水乙醇（均为国产分析纯）；YNB（上海生工）；蛋白胨、酵母粉（OXOID）。

#### **1.3.2** 培养基

YPD培养基（g·L-1）：酵母浸粉10，无水葡萄糖20，蛋白胨20 。

模拟果酒培养基（g·L-1）：YNB 1.7, (NH4) 2SO4 5，苹果酸5，蔗糖、酒精、SO2（根据单因素确定用量）。

### **1.4** 方法

#### **1.4.1** 产朊假丝酵母的培养

将保存在甘油管中的重组酵母CU-6接到3ml YPD液体培养基中活化12h，取1mL接种于YPD培养基中，28℃振荡培养2d.7000r/min离心10min收集菌体，用无菌水洗涤，重复两次，最后用无菌水重悬，调整菌悬液的菌浓为108 CFU mL-1。

#### **1.4.2** 苹果酸浓度的检测

将发酵液经过12000r/min离心10min，取上清液。经0.22μm微孔过滤膜过滤得到的样品，采用Waters ACQUITY UPLC超高压液相色谱检测样品中苹果酸的含量。

检测条件：C18 不锈钢柱（2.1×50mm, 1.7vm）；100%磷酸氢二铵缓冲液

（0.01M, pH2.7）；流速0.05mL/min；检测波长210nm；柱温35℃；自动进样，进样量2μl。

降酸量(g·L-1) =初始发酵液苹果酸的浓度－发酵结束后苹果酸的浓度

## **2** 结果与分析

### **2.1** 单因素试验

#### **2.1.1** 发酵温度对酵母菌株**CU-6**降酸效果的影响

以初始糖度为4 g·L-1, SO2为50 mg·L-1，苹果酸浓度4.5 g·L-1，酒精浓度8%，接种量1.5%，分别在20℃，22℃，24℃，26℃，28℃发酵5d，以降酸量作为评价指标，研究发酵温度对酵母菌株CU-6降酸效果的影响，结果见图3-1。

1.80

1.50

降酸量/g.L-1

1.20

0.90

20 22 24 26 28

温度/℃

图3-1 发酵温度对酵母CU-6降酸量的影响

Fig. 3-1 Effect of culture temperature on deacidification of yeast CU-6

由图3-1可知，随着温度的升高，降酸量不断增大，当发酵温度为24℃时降酸量最大，达1.58 g·L-1，随着温度的增加，降酸量呈下降趋势。温度偏高或偏低，酵母菌株CU-6的生长受抑制，降酸能力下降。因此培养温度以24℃为宜。

#### **2. 1.2** 接种量对酵母菌株**CU-6**降酸效果的影响

以初始糖度为4 g·L-1, SO2为50mg·L-1，苹果酸4.5g·L-1，酒精8%，接种量分别为0.5%，1.0%，1.5%，2.0%，2.5%五个水平，24℃发酵5d，以苹果酸作为评价指标，研究接种量对酵母菌株CU-6降酸量的影响，结果见图3-2。

1.70

1.60

-1

1.50

降酸量/g.L

1.40

1.30

1.20

0.5 1 1.5 2 2.5

接种量/%

图3-2 接种量对酵母CU-6降酸量的影响

Fig. 3-2 Effect of inoculum size on deacidification of yeast CU-6

由图3-2可知，当接种量低于1.5 %时，降酸量随着接种量的增加而增加，当接种量接近1.5%时降酸量最大，达到1.55 g·L-1；当接种量从1.5%增加到2.5%，

降酸量逐渐下降。接种量较小时，自身繁殖代谢慢，杂菌生长较快，影响降酸量效果；当接种量过大时，菌体繁殖旺，自身生长受到抑制，降酸量反而降低。因此接种量为1.5%左右最为适宜。

#### **2.1.3** **SO2**浓度对酵母菌株**CU-6**降酸效果的影响

以初始糖度为4 g·L-1，苹果酸4.5 g·L-1，酒精8%，接种量1.5%, SO2浓度分别为30，40，50，60，70mg·L-1 5个水平，24℃发酵5d，以苹果酸作为评价指标，研究SO2浓度对酵母菌株CU-6降酸量的影响，结果见图3-3。

1.80

1.40

降酸量/g.L-1

1.00

0.60

30 40 50 60 70

SO2/mg. L

-1

图 3-3 SO2对酵母CU-6降酸量的影响

Fig. 3-3 Effect of SO2 concentration on deacidification of yeast strain CU-6

由图3-3可知，当SO2浓度为50 mg·L-1时，酵母菌株CU-6降酸量最大，达到1.66 g·L-1；当SO2浓度大于60 mg·L-1时，降酸量逐渐下降。这可能是因为SO2具有杀菌的作用，可以抑制杂菌的生长。而酵母菌株CU-6对SO2具有一定的耐受性，浓度过低，易导致杂菌生长，从而影响发酵效果和降酸效果；当SO2浓度高于其耐受范围，则易导致发酵过程受抑制，影响其对苹果酸的代谢能力

[99]. 因此SO2的适宜浓度为50 mg·L-1左右。

#### **2.1.4** 酒精度对酵母菌株**CU-6**降酸效果的影响

以初始糖度为4 g·L-1, SO2 50 mg·L-1，苹果酸4.5 g·L-1，接种量1.5%，酒精浓度分别为6%，8%，10%，12%，14% 5个水平，24℃发酵5d，以苹果酸作为评价指标，研究酒精浓度对酵母菌株CU-6降酸量的影响，结果见图3-4。

1.70

1.50

1.30

降酸量/g.L-1

1.10

0.90

0.70

0.50

6.00 8.00 10.00 12.00 14.00

酒精度/%

图3-4 酒精度对酵母CU-6降酸量的影响

Fig. 3-4 Effect of alcoholicity on deacidification of yeast strain CU-6

由图3-4可知，当酒精度小于8%时，酵母菌株CU-6降酸量随着酒精度的增加而逐渐提高；当酒精度为8%时，降酸量最大，达到1.57g·L-1；当酒精度大于8%时，随着酒精浓度的增加，酵母菌株CU-6对酒精的耐受能力下降，导致降酸量逐渐下降，因此酒精度为8%左右较合适。

#### **2.1.5** 残糖对酵母菌株**CU-6**降酸效果的影响

以初始SO2浓度50 mg·L-1，苹果酸4.5 g·L-1，酒精8%，接种量1.5%，糖度分别为1 g·L-1，5 g·L-1，7 g·L-1，10 g·L-1，15 g·L-1 5个水平，24℃发酵5d，以苹果酸作为评价指标，研究初始糖度对酵母菌株CU-6降酸量的影响，结果见图3-5。

1.60

1.40

降酸量/g·L-1

1.20

1.00

0.80

0 5 10 15

残糖/g·L-1

图3-5 残糖对酵母CU-6降酸量的影响

Fig. 3-5 Effect of brix on deacidification of yeast CU-6

由图3-5可知，当残糖为5%时，降酸量最大，达1.52 g·L-1；当残糖大于 5

g・L-1时，降酸量明显下降，当残糖达到15 g·L-1时，降酸量只有0.8 g·L-1。残糖处于较高水平时，酵母菌株CU-6优先利用糖作为碳源而影响降酸，因此初始糖度为5 g·L-1为宜。

### **2.2** 响应面优化试验

#### **2.2.1** **Plackett-Burman**法设计确定主要因素

根据对单因素试验，选用实验次数为N=8的实验设计，对酒精度(*X*1)、接种量(*X*2)、残糖量(*X*3)、温度(*X*4)、SO2 (*X*5) 5个因素进行研究，每个因素分别取两个水平，响应值为降酸量（*Y*），实验设计及结果见表3-1。

表 3-1 N=8的Plaekett—Burman实验设计与响应值

Tab 3-1 Results and design of Plackett-Burman(N=8)

| 实验号 | X1 | X2 | X3 | X4 | X5 | Y |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1.7 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1.58 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 | 1 | 1.628 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1.62 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1.71 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1.42 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1.679 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1.4 |

#### **2.2.2** 根据**Plackett-Burman**结果筛选主要因素

采用SAS软件对各因素进行主效应分析，结果见表3-2。表3-2 Plaekett-Burman回归分析结果

Tab 3-2 Plaekett-BurmanRegression Analysis

水平

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | -1 | 1 |  | | |
| *X*1 | SO2 | 40 | 60 | -9.59124 | 0.0107 | 1 |
| *X*2 | 接种量 | 1 | 1.5 | -1.14214 | 0.3717 | 5 |
| *X*3 | 残糖量 | 4 | 6 | -4.38968 | 0.0482 | 3 |
| *X*4 | 温度 | 24 | 26 | 1.692572 | 0.2326 | 4 |
| *X*5 | 酒精度 | 8 | 10 | -6.06849 | 0.0261 | 2 |

因素名称

T (t值) P(Pr)>｜t｜重要性

从表3-2可知，5个因素中对响应值影响的显著性顺序为：SO2＞酒精度＞残糖＞温度＞接种量。考虑到因素超过3个使实验次数显著增加，因此选择SO2、

酒精度、残糖三个因素进行响应面优化试验。

#### **2.2.3** 实验结果

根据实验因素及水平，安排了17组实验处理组合，发酵条件均为发酵温度

24℃，苹果酸浓度4.5 g·L-1，接种量为1.5%。测定发酵后苹果酸的浓度，以SO2、酒精度、残糖3个为自变量，苹果酸的降酸量*Y*（g·L-1）为响应值，结果见表3-3。表3-3 响应面分析结果及指标预测

Tab 3-3 Results and prediction of Response Surface Analysis

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 *A* | | *B* | *C*  -1 | *Y*  -1 |
| ρSO2/mg∙L-1 | | 酒精度/% | 残糖/g∙L | 降酸量/g∙L |
| 1 | 40 | 7 | 5 | 1.65 |
| 2 | 60 | 7 | 5 | 1.7 |
| 3 | 40 | 9 | 5 | 1.65 |
| 4 | 60 | 9 | 5 | 1.59 |
| 5 | 40 | 8 | 3 | 1.68 |
| 6 | 60 | 8 | 3 | 1.72 |
| 7 | 40 | 8 | 7 | 1.55 |
| 8 | 60 | 8 | 7 | 1.57 |
| 9 | 50 | 7 | 3 | 1.73 |
| 10 | 50 | 9 | 3 | 1.65 |
| 11 | 50 | 7 | 7 | 1.58 |
| 12 | 50 | 9 | 7 | 1.57 |
| 13 | 50 | 8 | 5 | 1.82 |
| 14 | 50 | 8 | 5 | 1.8 |
| 15 | 50 | 8 | 5 | 1.81 |
| 16 | 50 | 8 | 5 | 1.82 |
| 17 | 50 | 8 | 5 | 1.82 |

#### **2.2.4** 回归模型的建立

通过Design Expert软件分别以SO2浓度、酒精度、残糖为自变量，降解量为响应值，对表3-3进行回归拟合，建立如下的工艺参数回归模型：*Y*=1.81+0.00625*A*-0.025*B*-0.064*C*-0.028*AB*-0.005*AC*+0.018*BC*-0.085

*A*2-0.082*B*2-0.099 *C*2

#### **2.2.5** 工艺参数的显著性分析

对响应面的回归参数进行方差分析和显著性检验，结果见表3-4。

表3-4 显著性检验结果

Tab3-4. Significant analysis of the model and factors

| 项 目 | 平方和 | 自由度 | 均 方 | F 值 | Prob > F | 显著性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 模型 | 0.153881 | 9 | 0.017098 | 92.4213 | < 0.0001 | \*\* |
| A | 0.000313 | 1 | 0.000313 | 1.689189 | 0.2349 |  |
| B | 0.005 | 1 | 0.005 | 27.02703 | 0.0013 | \*\* |
| C | 0.032513 | 1 | 0.032513 | 175.7432 | < 0.0001 | \*\* |
| AB | 0.003025 | 1 | 0.003025 | 16.35135 | 0.0049 | \*\* |
| AC | 0.0001 | 1 | 0.0001 | 0.540541 | 0.4861 |  |
| BC | 0.001225 | 1 | 0.001225 | 6.621622 | 0.0368 | \*\* |
| A2 0.030064 | | 1 | 0.030064 | 162.5092 | < 0.0001 | \*\* |
| B2 0.028312 | | 1 | 0.028312 | 153.0356 | < 0.0001 | \*\* |
| C2 0.041685 | | 1 | 0.041685 | 225.3257 | < 0.0001 | \*\* |
| 残差 | 0.153881 | 7 | 0.000185 |  |  | |
| 失拟项 | 0.000313 | 3 | 0.000325 | 4.0625 | 0.1046 | |
| 净误差 | 0.005 | 4 | 0.00008 |  |  | |
| 总和 | 0.032513 | 16 |  |  |  | |

R2=0.9916; R2adj=0.9809; CV=0.8053%

注：\*\*差异极显著，P<0.01；\*差异显著，P<0.05。

由表3-4可知，模型的F模型=99.42> F0.01，且P<0.0001，说明回归模型方程极显著，不同处理间的差异极显著；失拟项P=0.1046> 0.05时，不显著；模型的决定系数R2=0.9916，表明实际值与预测值有99%的的符合度；校正决定系数R2adj=0.9809，说明方程拟合程度较好；离散系数（CV）表示实验的精确度，其值越小，说明实验的精确度越高。本实验中CV值为0.8053%，在可接受范围，说明实验结果可靠，可以用此模型对降酸酵母菌株CU-6的降酸量进行分析和预测。由回归方程系数显著性检验可知，模型的一次项B和C（P＜0.01）影响极显著，A（*P*＞0.05）影响不显著；二次项（P＜0.01）影响显著；交互项AB和BC（*P* ＜

0.05）影响显著，AC（*P*＞0.05）影响不显著。依据方程系数的估计值A=0.00625、

B=0.025和C=0.064，可知影响因子的主效应主次顺序为SO2浓度＞酒精度＞残糖量。

#### **2.2.6** 响应面分析

以降酸量为响应值（*Y*），采用Design Expert（version 8.0）软件分析SO2浓度（*A*）、酒精度（*B*）和残糖（*C*）三个因素之间的两两交互作用，依次得到三

个变量的响应面和等值线图3-6、图3-7和图3-8。

9.00

1.6729

降酸量



1.74456



1.70873

1.63708

1.6729

1.82

1.7625

8.50

1.705

降酸量

B: 酒精度

8.00 5

1.6475

1.59 7.50

9.00

8.50

55.00

60.00

7.00

1.70873

1.6729

1.78039

8.00

B：酒精度

7.50

7.00

40.00

45.00

50.00

A：二氧化硫

40.00 45.00 50.00 55.00 60.00

A：二氧化硫

图3-6 *Y*=f(*A, B*)的响应面与等高线

Fig. 3-6 Response surface plot and contour plot*Y*=*f* (*A, B*)

7.00

1.60822

降酸量

1.69467



1.65145

1.60822

1.83

6.00



1.7379

1.76

1.69 5.00 5

降酸量

C: 残糖

1.62

1.55 4.00

7.00

6.00

55.00

60.00

3.00

1.78 112

1.7379

C: 残糖

5.00

4.00

3.00

40.00

45.00

50.00

A：二氧化硫

40.00 45.00 50.00 55.00 60.00

A：二氧化硫

图3-7 *Y*=f(*A, C*)的响应面与等高线

Fig.3-7 Response surface plot and contour plot *Y*=*f* (*A,C*)

7.00

1.64986



降酸量

1.69416



1.60555

1.64986

1.83

1.7625

6.00

1.78277

1.73846

1.695

降酸量

C: 残糖

5.00 5

1.6275

1.56 4.00

7.00

6.00

5.00

8.00

8.50

9.00

3.00

1.69416

7.00 7.50 8.00 8.50 9.00

C: 残糖

4.00

3.00

7.00

7.50

B：酒精度

B：酒精度

图3-8 *Y*=f(*B, C*)的响应面与等高线

Fig. 3-8 Response surface plot and contour plot*Y*=*f* (*B, C*)

#### **2.2.7** 最优值验证

根据二次回归数学模型进行参数最优分析，获得最佳发酵工艺条件为苹果酸浓度为4.5 g·L-1，接种量为1.5%，发酵温度为24℃，SO2浓度50.8 mg·L-1，酒精度7.8%，残糖量4.32 g·L-1，酵母菌株CU-6的降酸量为1.82 g·L-1。

根据实际操作，将枇杷酒的SO2浓度调整为50mg·L-1，酒精度为8%，残糖量为4 g·L-1，苹果酸浓度为4.5 g·L-1。在接种量为1.5%，发酵温度为24℃，发酵周期5d的条件下，产朊假丝酵母CU-6的降酸量为1.80±0.02g·L-1，重复6次，结果稳定。实验结果与模型预测值相近，说明该模型可行。

## **3** 小结

通过响应面分析法得到枇杷酒降酸优化工艺：初始SO2浓度50mg·L-1，酒精度7.8%，残糖量4.3 g·L-1。在苹果酸浓度4.5 g·L-1，接种量1.5%，发酵温度为

24℃的条件下发酵5d，产朊假丝酵母CU-6的在枇杷酒中的理论降酸量可达到

1.82g·L-1。实验实际值为1.80±0.02 g·L-1，与理论值十分接近。

响应面分析法是采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系，通过对响应曲面及等高线的分析寻求最优工艺参数[100]的有效方法。利用该法获得酒类发酵的最优工艺参数报道[101]较多，是较为成功的一种方法。

通过研究温度、接种量、残糖、SO2浓度和酒精度五个因素，发现降酸酵母菌株CU-6在模拟培养基中降解苹果酸的能力呈现较大的差异。通过通过单因素实验和主效应分析，发现酵母CU-6降解苹果酸的能力，但受到残糖量、SO2浓度和酒精度的影响较为明显。SO2在果酒酿造中通常在榨汁阶段加入，可以防止果汁过度氧化，同时具有抑制有害微生物生长和促进酒体澄清的作用。枇杷经酿酒酵母发酵后，原酒中具备一定的酒度。由于降酸发酵是在枇杷酒原酒发酵结束后，投放降酸酵母菌株，因此要求菌株具备一定的耐受SO2和酒精的能力。研究表明，酵母CU-6具有较好的耐受SO2的能力，但耐受酒精的能力需要提高，才能适应实际酿造的需求。因此，研究合适的固定化材料和使用条件，为其在枇杷酒降酸生产中应用十分必要。

# 第四章 降酸酵母菌株的固定化研究

固定化细胞生产与游离细胞生产相比，具有可以重复使用降低生产成本，减少乙醇、有机酸等的抑制作用等优点[102]，广泛运用在实际生产上。常用的固定化材料有：海藻酸钙凝胶、琼脂凝胶、明胶、多孔氧化铝、SiO2、纤维素、PVA等，固定化方法主要有包埋和吸附两种。吸附法主要是靠带电的微生物细胞和载体之间的静电相互作用力；包埋法是采用物理方法将微生物细胞包埋在载体中。

利用固定化技术生产白酒[67]和果酒[103]日趋普遍，该技术不仅可以降低生产成本，而且可提高果酒的澄清过滤效率，为连续化生产和自动控制提供可能。同时可以获得更快的发酵速度，控制酒风味的形成[104]。研究选择不同的固定化材料以包埋酵母CU-6，提高其SO2和酒精度耐受能力，并研究固定化微球的使用寿命，为其在枇杷酒工业化降酸生产提供理论依据。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 菌种

产朊假丝酵母（*Candida utilis*）CU-6：购自中国工业微生物菌种保藏中心

（CICC），经本实验室改造后并保藏。

### **1.2** 材料

干型解放钟枇杷酒（自酿）：苹果酸4.9g/L, pH为3.6，酒精度为10.5%(v/v)。

### **1. 3** 主要试剂

无水葡萄糖，硫酸铵，无水乙醇，海藻酸钠，CaCl2，PVA，壳聚糖，SiO2，

Al2O3，L-苹果酸（国药集团化学主要试剂有限公司），酵母浸粉，蛋白胨（英国

OXID公司)

### **1.4** 主要仪器

双人单面净化工作台，SW-CJ-2FD型，苏州净化；手提式蒸汽灭菌器，SYQ-DSX-280B，上海申安；恒温培养箱，LHS-150SC，上海福玛；

恒温摇床，SHK-99-II，北京北方同正；

高速冷冻离心机PC-6PLUS（Thermo Fisher Scientific），美国热电；光学显微镜，CX21FS1，日本奥林巴斯；

真空冷冻干燥机，ALPHA 1-2，德国Marin Christ；超高效液相色谱，Waters ACQUTYTM，美国沃特世；冷场发射扫描电镜，JSM -7500F，日本JEOL。

### **1.5** 培养基

YPD培养基（g·L-1）：酵母浸粉10，无水葡萄糖20，蛋白胨20

模拟果酒培养基（g·L-1）：YNB 1.7, (NH4) 2SO4 5，苹果酸5，蔗糖、酒精、SO2（根据实验因素确定用量）。

### **1.6** 方法

#### **1.6.1** 重组酵母**CU-6**的培养

取甘油管保种的重组酵母CU-6 1 mL接种于YPD培养基中，28℃于振荡培养2 d.7000 r/min离心10 min获取酵母菌体，并用蒸馏水洗涤菌体，重复两次，用无菌水重悬后，调整菌浓为1.0×1010 CFUmL-1。按试验所需的浓度进行相应的接种。

#### **1.6.2** 氯化钙溶液的配制

分别称取2.0g，2.5g，3.0g，3.5g，4.0g，4.5g无水CaCl2，定溶于100ml蒸馏水中，配制成质量分数为2.0%，2.5%，3.0%，3.5%，4.0%，4.5%的CaCl2溶液，灭菌，备用。

#### **1.6.3** 海藻酸钠溶液的配制

分别称取称取1g，2g，3g，4g，5g海藻酸钠溶于100ml蒸馏水中，加热使其充分溶解，配制成质量分数为1%，2%，3%，4%，5%的海藻酸钠溶液，灭菌，备用。

#### **1.6.4** 固定化酵母载体的制备

参照文献[105]制备强化载体最佳配比略作调整，添加不同强化剂制得固定化酵母载体，制备方法如下：

Ⅰ、基础固定化酵母载体制备：在100 mL 2.0%海藻酸钠溶液中，加入酵母菌液3 mL搅拌均匀后吸入注射器中，以恒定的速度滴入3.0% CaCl2溶液中，固化30min后将胶珠捞出冲洗干净，置于生理盐水中备用。

Ⅱ、SiO2强化固定化酵母载体：在100 mL 2.0%海藻酸钠、1.4%SiO2中，加入酵母菌液3 mL搅拌均匀吸入注射器中，以恒定的速度滴入3.0% CaCl2溶液中，固化30min后将胶珠捞出冲洗干净，置于生理盐水中备用。

Ⅲ、SiO2―PVA强化固定化酵母载体：在100 mL 2.0%海藻酸钠、1.4%SiO2、0.6% PVA中，加入酵母菌液3 mL搅拌均匀吸入注射器中，以恒定的速度滴入

3.0% CaCl2溶液中，固化30min后将胶珠捞出冲洗干净，置于生理盐水中备用。

Ⅳ、PVA强化固定化酵母载体：在100 mL 2.0%海藻酸钠、0.6%PVA中加入酵母菌液3 mL搅拌均匀后吸入注射器中，以恒定的速度滴入3.0% CaCl2溶液中，固化30min后将胶珠捞出冲洗干净，置于生理盐水中备用。

Ⅴ、SiO2-Al2O3强化固定化酵母载体：在100 mL 2.0%海藻酸钠、1.4%SiO2 、

0.8% Al2O3中加入酵母菌液3 mL搅拌均匀吸入注射器中，以恒定的速度滴入

3.0% CaCl2溶液中，固化30min后将胶珠捞出冲洗干净，置于生理盐水中备用。

Ⅵ、SiO2 -PVA-Al2O3强化固定化酵母载体：在100 mL 2.0%海藻酸钠、

1.4%SiO2、0.6%PVA、0.8% Al2O3、中加入酵母菌液3 mL搅拌均匀后吸入注射器中，以恒定的速度滴入3.0% CaCl2溶液中，固化30min将胶珠捞出冲洗干净，置于生理盐水中备用。

#### **1.6.5** 苹果酸的测定

将发酵液经过12000 r/min离心10 min后，经过0.22μm微孔过滤膜处理，采用Waters ACQUITY UPLC超高压液相色谱仪检测其苹果酸的含量。检测条件：

C18不锈钢柱（2.1×50 mm, 1.7μm）；100%硫酸氢二铵缓冲液（0.01M, pH2.7）；流速0.05 mL/min；检测波长210 nm；柱温35℃；自动进样，进样量2μL。

降酸量（g·L-1）=起始发酵液的苹果酸浓度－发酵结束后的苹果酸的浓度

#### **1.6.6** 固定化载体的电镜观察

将制备好的固定化酵母载体用蒸馏水水冲洗干净后，用滤纸除去载体表面水分并放置在干净的培养皿中，使彼此分散开来。将载体先在－20℃预冻2h，再

放入到－80℃8h，而后放在真空冷冻干燥机干燥8h，干燥结束后35℃烘干

20min。将烘干后的微球用镊子夹碎，放在导电载体上喷金镀膜100s，进行电镜观察。

#### **1.6.7** 固定化酵母微球使用寿命的研究

根据不同固定化载体的理化性质、电镜结构和降酸效果比较，选择较好的固定化酵母的载体，研究固定化酵母载体的使用寿命。制作菌浓3.9×106CFUmL-1的微球，按每100ml加入3g微球的接种量，投入本实验室自酿的枇杷酒进行批式降酸发酵。每批次结束后回收微球投入新鲜的枇杷原酒，反复试验5 批次。

## **2** 结果与分析

### **2.1** 海藻酸钠浓度对酵母**CU-6**降酸的影响

将不同海藻酸钠浓度（1%, 2%, 3%, 4%, 5%）加入3%CaCl2制备的固定化酵母载体，按接种量为3.9×106CFUmL-1，分别加入在上述的YNB降酸模拟培养基中，分别放在26℃培养5 d。发酵结束后，离心、0.22μm微孔滤膜过滤，

UPLC检测发酵液中苹果酸的含量，结果见图4-1。

1.6

1.2

降酸量/g·L-1

0.8

0.4

0

1% 2% 3% 4% 5%

海藻酸钠浓度(%)

图4-1 海藻酸钠浓度对固定化酵母CU-6降酸的影响

Fig 4-1 Effect on deacidification of yeast CU-6 by concentration of SA

由图4-1可知，海藻酸钠浓度对固定化重组酵母CU-6降酸的影响较小，当使用2%的海藻酸钠作为骨架材料时，其降酸量最高，随着海藻酸钠的浓度增加，重组酵母CU-6的降酸量呈下降趋势。微球硬度变大，其网状结构更趋于致密，不利于物质的交换[18]。

### **2.2** 氯化钙浓度对**CU-6**降酸的影响

将2%海藻酸钠加入不同氯化钙浓度（2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%）制备的固定化酵母载体，按接种量为3.9×106CFUmL-1，分别加入在上述的YNB降酸模拟培养基中，分别放在26℃培养5d。发酵结束后，离心、0.22μm微孔滤膜过滤，UPLC检测发酵液中苹果酸的含量，结果见图4-2。

1.6

1.2

降酸量/g·L-1

0.8

0.4

0

2% 2.50% 3% 3.50% 4%

CaCl2浓度(%)

图4-2 氯化钙浓度对固定化酵母CU-6固定化降酸的影响

Fig 4-2 Effect on deacidification of yeast CU-6 by concentration of CaCl2

由图4-2可知，氯化钙浓度对固定化重组酵母CU-6降酸的影响较小，当使用3%的海藻酸钠作为骨架材料时，其降酸量最高，随着氯化钙的浓度增加，重组酵母CU-6的降酸量呈下降趋势。可见微球表面硬度变大不利于物质的交换[18]。

### **2.3** 菌浓对**CU-6**降酸的影响

将按2%海藻酸钠、3% CaCl2制备的固定化酵母载体，按接种量为3.9×104CFU mL-1、3.9×105CFU mL-1、3.9×106CFU mL-1、3.9×107CFU mL-1、3.9

×108CFU mL-1，分别加入在上述的YNB降酸模拟培养基中，分别放在26℃培养5 d。发酵结束后，离心、0.22μm微孔滤膜过滤，UPLC检测发酵液中苹果酸的含量，结果见图4-3：



图 4-3 菌体浓度对固定化酵母CU-6降酸的影响

Fig 4-3 Effect on deacidification of yeast CU-6 by cell concentration

由图4-3可知，随着菌体浓度的增加，固定化的重组酵母CU-6降酸浓度逐渐增加。当浓度高于3.9×106 CFU mL-1时，降酸量增加幅度不大，所以选择该浓度做后续研究。

### **2.4** 不同固定化材料微球的电镜结构研究

Ⅰ、基础固定化酵母载体内部结构在400倍和2000倍条件下的电镜结果见图4-5

和图4-6。



图 4-5 I#材料剖面结构（400倍） 图4-6 I#材料剖面结构（2000倍）

Fig. 4-5 section structure of

Fig. 4-6 section structure of No. I material(×400) No. I material(×2000)

由图4-5和图4-6可知，I#材料制备的载体内部空隙小，小孔较少，菌体基

本成散落状，形成较为致密的立体结构。

Ⅱ、由2.0%海藻酸钠、1.4%SiO2制备的固定化酵母载体内部结构在400倍和2000

倍条件下的电镜结果见图4-7和图4-8。



图4-7

Ⅱ#材料剖面结构（400倍）图4-8

Ⅱ#材料剖面结构（2000倍）

Fig. 4-7 section structure of

Fig. 4-8 section structure of No.Ⅱmaterial(×400) No.Ⅱmaterial(×2000)

由图4-7和图4-8可知，Ⅱ#材料制备的载体内部空隙较大，小孔分布不均，菌体与载体交联度较大，形成不规则的立体结构。

Ⅲ、由2.0%海藻酸钠、1.4%SiO2、0.6%PVA制备的固定化酵母载体内部结构在

400倍和2000倍条件下的电镜结果见图4-9和图4-10。



图4-9

Ⅲ#材料剖面结构（400倍）图4-10

Ⅲ#材料剖面结构（2000倍）

Fig. 4-9 section structure of

Fig. 4-10 section structure of No. Ⅲmaterial(×400) No. Ⅲmaterial(×2000)

由图4-9和图4-10可知，Ⅲ#材料制备的载体内部空隙较大，小孔分布均匀紧凑，菌体与载体交联度较大，形成较为规则的三维网格立体结构。

Ⅳ、由2.0%海藻酸钠、0.6%PVA制备的固定化酵母载体内部结构在400倍和2000

倍条件下的电镜结果见图4-11和图4-12。



图4-11

Ⅳ#材料剖面结构（400倍）图4-12

Ⅳ#材料剖面结构（2000倍）

Fig. 4-11 section structure of

Fig. 4-12 section structure of No. Ⅳmaterial(×400) No. Ⅳmaterial(×2000)

由图4-11和图4-12可知，Ⅳ#材料制备的载体内空隙较大，菌体与载体交联度较小，三维网格结构不均。



Ⅴ、由2.0%海藻酸钠、1.4%SiO2、0.8% Al2O3制备的固定化酵母载体内部结构在400倍和2000倍条件下的电镜结果见图4-13和图4-14。

图4-13

Ⅴ#材料剖面结构（400倍）图4-14

Ⅴ#材料剖面结构（2000倍）

Fig. 4-13 section structure of

Fig. 4-14 section structure of No. Ⅴmaterial(×400) No. Ⅴmaterial(×2000)

由图4-13和图4-14可知，Ⅴ#材料制备的载体内部空隙较小，小孔分布不均，菌体与载体交联度较小，形成不规则的立体结构。



Ⅵ、由2.0%海藻酸钠、0.6%PVA、1.4%SiO2、0.8% Al2O3制备的固定化酵母载体内部结构在400倍和2000倍条件下的电镜结果见图4-15和图4-16，由图可知，

图4-15

Ⅵ#材料剖面结构（400倍）图4-16

Ⅵ#材料剖面结构（2000倍）

Fig. 4-15 section structure of

Fig. 4-16 section structure of No. Ⅵmaterial(×400) No. Ⅵmaterial(×2000)

由图4-15和图4-16可知，Ⅵ#材料制备的载体内部空隙较大，小孔分布不均，菌体与载体交联度较较大，形成不规则的立体结构。

### **2.5** 不同固定化材料微球的的降酸效果比较

将不同固定化酵母载体，按接种量为3.9×106 CFU mL-1，分别加入在上述的

YNB降酸模拟培养基中，分别放在26℃培养4d。发酵结束后，经离心，0.22μm

微孔滤膜过滤，UPLC检测发酵液中苹果酸的含量，结果见图4-17。

2

1.6

1.2

降酸量/g·L-1

0.8

0.4

0

ⅠⅡⅢⅣⅤⅥ固定化微球类型

图 4-17 不同固定化材料对酵母CU-6降酸效果的影响

Fig. 4-17 Effect of different materials on deacidification of yeast CU-6

Ⅰ2%

海藻酸钠

Ⅱ2%海藻酸钠＋1.4%SiO2

Ⅲ2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.6%PVA

Ⅳ2%海藻酸钠＋0.6%PVA

Ⅴ2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.8% Al2O3

Ⅵ2%海藻酸钠＋0.6%PVA＋1.4%SiO2＋0.8% Al2O3

由图4-17可知，通过降酸实验比较，分析6种固定化材料降酸显著性，与材料Ⅰ相比，材料Ⅱ（*P*＜0.05），材料Ⅲ和材料Ⅵ（*P*＜0.01），材料Ⅳ和材料Ⅴ

（*P*＞0.05）。可见材料Ⅲ和材料Ⅵ降酸效果较好，材料Ⅰ和材料Ⅳ次之，材料Ⅱ和材料Ⅴ最差。从制备的简便性看，材料Ⅲ配比更佳。

### **2.6** 固定化酵母微球的耐酒精能力

将酵母固定化在第Ⅲ种载体（2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.6%PVA）上，根据1ml海藻酸钠胶体可以制备胶珠的个数计算固定化酵母载体的量，以接种量为3.9×106 CFUmL-1投入250 mL三角瓶中，加入150 mL YNB（SO2 60 mg·L-1）降酸模拟培养基中进行降酸处理5d，测定苹果酸降低量，结果见图4-18。

1.8

1.6

降酸量/g·L-1

1.4

1.2

1

5 7 9 11 13

酒精度/%

图4-18 酒精度对酵母CU-6固定化微球降酸的影响

Fig. 4-18 Effect of alcoholicity on deacidification of yeast CU-6 microsphere

由图4-18可知，随着酒精浓度的提高，固定化酵母CU-6的降酸效果呈现下降的趋势。当酒精度为13%时，降酸量低于1.4 g·L-1。可见酵母CU-6经固定化

对于酒精度耐受性有所提高，但降酸能力仍受到较高浓度酒精的抑制。

### **2.7** 固定化酵母微球的耐**SO2**能力

将酵母固定化在第Ⅲ种载体（2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.6%PVA）上，根据1ml海藻酸钠胶体可以制备胶珠的个数计算固定化酵母载体的量，以接种量为3.9×106 CFUmL-1投入250 mL三角瓶中，加入150 mL YNB降酸模拟培养基（V/V

9%）中进行降酸处理5d，测定苹果酸降低量，结果见图4-19。

1.8

1.6

降酸量/g·L-1

1.4

1.2

1

40 60 80 100 120

SO2/mg·L-1

图 4-19 SO2浓度对酵母CU-6固定化微球降酸的影响

Fig. 4-19 Effect of SO2 concentration on deacidification of yeast CU-6 microsphere

由图4-19可知，随着SO2浓度的提高，固定化酵母CU-6的降酸效果呈现下降的趋势。当SO2为120 mg·L-1时，降酸量低于1.4 g·L-1。可见酵母CU-6经固定化对于SO2浓度耐受性有所提高，但降酸能力仍受到较高浓度SO2的抑制。

### **2.8** 固定化酵母微球的回收次数研究

将制备的第Ⅲ种固定化酵母载体（2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.6%PVA），根据1ml海藻酸钠胶体可以制备胶珠的个数计算固定化酵母载体的量，以接种量为3.9×106 CFUmL-1投入250 mL三角瓶中，加入150 mL解放钟干型枇杷酒中进行降酸处理5d，进行批式发酵，每批发酵结束后，将胶珠捞出，并用无菌水冲洗干净，再投入到新的培养基中，共回收4次进行5次降酸发酵。将每次发酵结束后的枇杷酒样品，经离心、0.22μm微孔滤膜过滤，UPLC检测发酵液中苹果酸的含量，结果见图4-20。

1.8

1.6

降酸量/g·L-1

1.4

1.2

1

第1次第2次第3次第4次第5次使用次数

图4-20 回收次数对酵母CU-6固定化微球降酸的影响

Fig. 4-20 Effect of recovery times on deacidification of yeast CU-6 microsphere

由图4-20 可知，使用第Ⅲ种固定化材料（2%海藻酸钠＋1.4%SiO2 ＋

0.6%PVA）制备的载体，连续使用5次，降酸能力变化小（*P*＞0.05），枇杷酒的降酸量仍可达1.6g·L-1以上，可见使用该固定化材料组合有利于酵母CU-6稳定降酸。实验证明该固定化微球具有良好的比重，每批次均能浸没发酵液中，且不发生粘结和破裂。

## 3. 小结

通过电镜研究发现，由海藻酸钠制备的固定化酵母载体内部立体结构不明显，菌体被海藻酸钠胶体包裹，有部分孔径供菌体和物质代谢进出。由海藻酸钠和SiO2或Al2O3颗粒制备的固定化酵母载体，内部孔洞较致密，但分布不均且不形成三维空间网状结构。由海藻酸钠和PVA制备的固定化酵母载体内部部分形成三维网状结构，但分布不均且大部分是粘连一片。而由海藻酸钠、PVA、SiO2或

Al2O3颗粒制备的固定化微球，其内部结构交联呈较为规则和致密的小孔，有助于保持好的机械强度和通透性。其纹路交织均匀紧凑，且抵抗剪切力和压缩力的能力较强。

研究表明，选用2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.6%PVA材料固定化的酵母CU-6，具有良好的SO2耐受性和酒精度耐受性，在SO2 80mg·L-1和酒精度11%的状态下，其降酸量仍能维持1.6 g·L-1。该材料制备的微球，连续使用5次后，固定化的酵母仍能保持较好的降酸能力。通过观察，未发现微球出现软化、破裂

和上浮现象。

发酵型果酒主要采用游离型酵母和固定化酵母进行发酵。游离酵母发酵果酒是传统的发酵方法，常见于各种果酒的发酵。固定化酵母最初在酒精生产上被使用，近年来在果酒的生产上逐渐被采用。酵母固定化后形成一定浓度优势，保证不受杂菌的污染，同时减少了发酵过程的乙醇、乙酸、甘油等副产物对酵母的抑制作用[106]。崔艳等[104]利用甘蔗固定化酵母发酵低醇葡萄酒，固定化载体机械强度好、稳定性好特点，解决了该类酒中微生物稳定性较差的缺陷，丰富了酒体的口感和香气。詹耀才等[107]利用固定化酵母生产干型岗稔果酒，发现酒液残糖含量更低，色泽暗红，口感柔和，更易于澄清。

Norton等[108]研究发现，固定化介质内部微环境渗透压高，胁迫酵母细胞产生相容性溶质（如甘油），因此对不良的环境具有较好的耐受性。王杏文等[109]研究结果显示，毕赤酵母发酵木糖生产酒精时，固定化酵母抵御发酵抑制物的能力相对强于游离酵母。枇杷酒中含有丰富的有机酸及一定浓度的乙醇，酵母CU-6通过固定化，在枇杷酒降酸中表现了较好的SO2和酒精耐受性，具有较好的应用前景。虽然，固定化酵母存在传质限制和固定质会抑制菌体生长等缺陷[110]，但与游离细胞相比，仍然具有耐毒害能力强、生产操作简便、成产成本低等[111]优点。

# 第五章 降酸处理对枇杷酒品质影响的研究

**第一节降酸处理前后枇杷酒理化成分的变化**

果酒的品质包括理化指标（酒精度、糖度、总酸、糖酸比等）和感官指标（色泽、口感、香气特点等），各种组成成分和比例对酒体的平衡起重要的协调作用。枇杷酒降酸发酵前后感官品质发生一定的变化，对酒体的平衡产生了影响。研究以实验室自酿的早钟和解放钟枇杷酒为材料，采用固定化酵母CU-6进行降酸发酵，通过理化指标、感官评价和香气成分分析，综合评价固定化降酸发酵对枇杷酒品质的影响。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 菌种

产朊假丝酵母（*Candida utilis*）CU-6：购自中国工业微生物菌种保藏中心

（CICC），经本实验室改造后并保藏。

### **1.2** 材料

干型解放钟枇杷酒（自酿）：苹果酸4.9g/L, pH为3.6，酒精度为10.5%(v/v)；干型早钟枇杷酒（自酿）：苹果酸4.1g/L, pH为3.8，酒精度为10%(v/v)。酵母CU-6经过固定化处理后，采用优化后的条件对两种枇杷酒进行降酸处

理。

### **1.3** 主要试剂

无水乙醇，葡萄糖，单宁酸，（国药集团），Folin—Denis 试剂、菲林试剂

（现配）。

### **1.4** 主要仪器

恒温水浴锅，HH-4型，常州国华；数显酸度计，Easyfive，瑞士梅特勒；

可见/紫外分光光度计，UV-1100，上海美谱达；气相色谱仪，6890N：美国安捷伦；

高速冷冻离心机PC-6PLUS（Thermo Fisher Scientific），美国热电。

### **1.5** 测定方法

#### **1.5.1** 枇杷酒酒精度的测定

枇杷酒样品经离心，0.22μm膜过滤备用[18]。精密量取恒温至20℃的无水乙醇0.3 mL，加内标物正丙醇0.5 mL，加甲醇稀释至50 mL，混匀即可。

色谱柱：HP-FFAP石英毛细管柱，30 m×0.30 mm，0.30μm；载气：氮气，纯度大于99.999 %，流量510 mL/ min；空气流量350 mL/ min；氢气流量；30 mL/ min；柱温程序升温；45保持5min，以5℃/min升至50℃保持5min，再以

20℃升至220℃，保持2min。进样方式；分流进样（分流比为25∶1）；进样量：1μL。

#### **1.5.2** 枇杷酒总酸的测定

参考GB/T 12456-2008《食品中总酸的测定》。

#### **1.5.3** 枇杷酒单宁的测定

参照王福荣[112]的方法，以吸光值为纵坐标，以单宁酸浓度值为横坐标绘制标准曲线。

吸取1～2mL酒样上清液，加入70mL水的100mL容量瓶中。再加入5mL

福林--丹尼斯主要试剂及10mL饱和碳酸钠溶液充分混匀，加水定容至100mL。

30min后以水代替试样制成的空白作参比，在760nm（或650nm）波长处测定吸光度，由吸光度从标准曲线查处相应的单宁含量。用下列公式计算

单宁含量（以单宁酸计，g・L-1）=c×（1/*V*）×（1/1000）×1000式中c---试样吸光度从标准曲线求得单宁含量，mg/100mL；

V---酒样体积，mL；1000---mg换算成 g

#### **1.5.4** 枇杷酒柔和指数的计算

柔和指数=酒精度－（总酸+单宁）。

总酸以1 L枇杷酒中相当于硫酸的克数（g）来表示，单宁以g·L-1计。

#### **1.5.5** 枇杷酒色度的测定

分光光度计测定540nm处的OD值来表示。

#### **1.5.6** 枇杷酒双乙酰的测定

参考GB/T4928-2008并略加改进。

安装双乙酰蒸馏器后，在蒸汽发生瓶中加入蒸馏水，加热至沸腾。通汽预热，准备用25mL容量瓶收集馏出液，快速把预先冷至5℃的100mL样品，转移至蒸馏器内。接着水封，待馏出液接近25mL时取下容量瓶，在20℃下定容。各取馏出液10.0mL于两支比色管中，向第一支比色管中加入0.50mL的邻苯二胺溶液，第二支为对照。放置阴暗处20-30 min，分别向比色管中加入盐酸溶液（3：

1）2.0mL，盐酸溶液(3: 1) 2.5mL.335nm的波长下测定2个处理的吸光度。双乙酰含量：XS =A335×2.4

其中：Xs：双乙酰含量，单位为mg L-1；A335：吸光度。 2.4：吸光度与双乙酰含量的换算系数。

#### **1.5.7** 枇杷酒总糖的测定

枇杷酒总糖经酸水解后用斐林法[112]测定。

①菲林主要试剂的标定

准确吸取菲林主要试剂A液、B液各5ml加入250ml锥形瓶中。而后加入

50ml蒸馏水和3粒玻璃珠。滴加约27ml葡萄糖标准溶液，加热至微沸并保持

2min，加2滴甲基蓝指示剂，趁热以每2sec 1滴的速度继续滴加葡萄糖标准溶液，直至溶液蓝色刚好褪去（滴定终点）。记录下消耗葡萄糖标准溶液的总体积，平行操作3次，取其平均值，按下式计算：

F= m *V*

1000

式中：F──10ml碱性酒石酸铜溶液相当于葡萄糖的量，mg；

m──称取葡萄糖质量，g；

V──标定时消耗葡萄糖标准溶液的总体积，ml。

②测定步骤

吸取一定量的样品（V1）于100ml容量瓶中（使之所含糖量为0.2-04g），加5 ml HCl溶液，加水至20 ml，摇匀。于约68度水浴水解15 min，取出，冷却。用200g L-1 NaOH溶液中和至pH6-7，调温至20℃，加水定容至刻度（V2）。以总糖式样代替葡萄糖标准溶液，按标定菲林主要试剂的方法同样操作，记录消耗式样的体积（V3）。结果按下列公式计算。

## **2** 结果与分析

X1=F 1

*V* 3

*V* 2 

11000

*V*1

#### **2.1** 酵母**CU-6**对枇杷酒柔和指数的影响

柔和指数的概念是Ribereau-Gayon和Peynaud于1961年提出来的，指的是红葡萄酒的肥硕和柔和特性以及味感平衡[113]。它是衡量果酒酒体柔和、协调的一个重要指标。枇杷酒同样含有酒精度、单宁和酸度，研究参照此概念评定枇杷酒味感平衡性。分别测定降酸处理前后的早钟和解放钟枇杷酒中酒精度、单宁和酸度，计算柔和指数的变化，结果见表5-1。

表5-1 酵母CU-6处理前后枇杷酒柔和指数比较

Tab. 5-1 Coparasion of flavor balance index of loquat wine viadeacidification by Yeast CU-6

| 酒精度 | | 单宁 | 酸度（以苹果酸计） | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 处 理 | /% | /g·L-1 | /g·L-1 | 柔和指数 |
| 早钟枇杷酒（Ck） | 10.0 | 0.12 | 4.58 | 5.30 |
| 早钟枇杷酒(De) | 10.0 | 0.11 | 3.15 | 6.74 |
| 解放钟枇杷酒（Ck） | 10.5 | 0.16 | 5.51 | 4.83 |
| 解放钟枇杷酒(De) | 10.5 | 0.14 | 4.16 | 6.20 |

注：Ck代表降酸处理前的样品；De代表降酸处理后的样品。

由表5-1可知，枇杷酒降酸发酵后，早钟和解放钟酒酒精度几乎没有变化，

单宁分别下降0.01 gL-1和0.02 gL-1，总酸分别下降1.43 gL-1和1.35 gL-1，柔和指数分别提高1.44和1.37，达到果酒理想的柔和指数范围（5～7）。

#### **2.2** 酵母**CU-6**对枇杷酒双乙酰和色度的影响

双乙酰和色度是果酒中重要风味物质之一，过高的双乙酰使得酒体产生老化味，而色泽反应了酒陈放的时间，色泽过深酒体可能氧化。分别测定降酸处理前后的早钟和解放钟枇杷酒中双乙酰含量和色度，结果见表5-2。

表5-2 酵母CU-6处理前后枇杷酒双乙酰及色度的比较

Tab5-2 Coparasion on diacetyl and chromaticity of loquat wine via deacidification by yeast CU-6

| 酒 样 | 双乙酰/mg L-1 | 色度/540nm |
| --- | --- | --- |
| 早钟枇杷酒（Ck） | 0.27 | 0.089 |
| 早钟枇杷酒(De) | 0.28 | 0.056 |
| 解放钟枇杷酒（Ck） | 0.23 | 0.087 |
| 解放钟枇杷酒(De) | 0.25 | 0.039 |

注：Ck代表降酸处理前的样品；De代表降酸处理后的样品。

由表5-2可知，枇杷酒降酸发酵后，早钟和解放钟酒的双乙酰影响较小，而对色度的影响较大，分别下降了37%和55%，降酸后的枇杷酒色泽变浅，由琥珀色变成浅金黄色，一定程度上改善了枇杷酒外观品质。

#### **2.3** 酵母**CU-6**对枇杷酒的总糖的影响

分别测定降酸处理前后早钟和解放钟枇杷酒的总糖含量变化，结果如表5-3所示。

表5-3 酵母CU-6处理前后枇杷酒总糖含量比较

Tab5-3 Coparasion on total sugar in loquat wine via deacidification by yeast CU-6

品名总糖（g L-1）品名总糖（g L-1）解放钟枇杷酒（CK）2.8早钟枇杷酒（CK）3.2

解放钟枇杷酒(De) 2.5早钟枇杷酒(De) 3.1

注：Ck代表降酸处理前的样品；De代表降酸处理后的样品。

由表5-3可知，处理前后2种枇杷酒的总糖含量变化较小。由于枇杷酒在一次发酵过程中，糖分大部分被酿酒酵母消耗生成了乙醇等产物。酵母CU-6仅少量利用酒中残糖，主要利用了苹果酸等作为底物。

## **3** 小结

降酸酵母菌株CU-6处理早钟和解放钟枇杷酒，酒中的总酸分别下降1.43 gL-1和1.35 gL-1，单宁降低了0.01 gL-1和0.02 gL-1，双乙酰含量降低了0.01 mg L-1和0.02 mg L-1，色度下降了0.033和0.048，一定程度上改善了枇杷酒外观和口感。降酸发酵对枇杷酒中的糖分几乎不利用，分别下降了0.3 gL-1和0.1gL-1。早钟和解放钟枇杷酒经降酸发酵，苹果酸含量下降进而降低总酸的含量，适当降低单宁的含量，酒度没有变化，总体上提高了枇杷酒的柔和指数，改善了口感。

果酒的理化成分是影响感官品质的主要因素，滋味、色度等是其中重要组成

部分。果酒的甜味感是由酒体中的糖、酒精和甘油等物质组成的，甜味感使酒体舒适和谐圆润[113]。果酒的酒度又称醇浓性，一般情况下当酒度大于11%时，醇浓才被表现出来。酒的厚实感，还要酒中的单宁和酸的共同参与，否则过高的酒度也会导致厚实感降低。合适的单宁含量使酒体厚实丰满浓郁，过度的单宁则会引起酒体生硬粗糙。

枇杷酒中单宁物质较少，酒体的味感平衡主要是甜味、酸味物质和酒精来构成。而干型的枇杷酒中，糖分较低几乎不能感知，其基本味感结构由酒精和酸来维持，单宁物质的作用较小。酒精兼有甜感和灼辣感，因此当酒度较大时而酸度较低时，酒的适口性较好。传统枇杷酒的缺陷在于苹果酸含量较高，而苹果酸是果酒中刺激性最强的酸，因此即使枇杷酒酒度符合常规的要求，酒体平衡也不协调，影响产品的品质。通过酵母CU-6降酸发酵，降低了枇杷酒中的总酸含量，从而使酒体趋于平衡、柔和。

**第二节降酸处理前后枇杷酒香气的变化**

果酒的主要香气成分包括：醇类、酯类、酸类、醛类、酮类、酚类以及萜烯类物质等。目前关于枇杷酒的香气成分研究报道较少，本研究采用顶空固相微萃取（HS-SPME）吸附酒中的香气成分并进行分析，探讨降酸处理前后枇杷酒香气成分变化，研究降酸酵母对香气的贡献，为枇杷酒降酸和增香提供科学依据。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 菌种：

产朊假丝酵母（*Candida utilis*）CU-6：购自中国工业微生物菌种保藏中心

（CICC），经本实验室改造后并保藏。

### **1.2** 材料

干型解放钟枇杷酒（自酿）：苹果酸4.9g/L, pH为3.6，酒精度为10.5%(v/v)；干型早钟6枇杷酒（自酿）：苹果酸4.1g/L, pH为3.8，酒精度为10%(v/v)。酵母CU-6经过固定化处理后，采用优化后的条件对两种枇杷酒进行降酸处

理。

### **1.3** 主要试剂

NaCl（国药集团）。

### **1.4** 主要仪器

恒温磁力搅拌器，HJ-3，常州国华；

电子天平，Sartorius-BS，德国赛多利斯；

气相色谱-质谱联用仪，6890N-5975C，美国安捷伦；

手动固相微萃取（SPME）进样器，2cm-50/30μm DVB/CAR/PDMS萃取头，美国Supelco。

### **1.5** 方法

#### **1.5.1** 顶空固相微萃取法（**HS-SPME**）

先将萃取头插入GC-MS的进样口中，于250℃活化并进行空白表面热解析，直至无色谱峰出现。取枇杷酒10ml样品于40ml顶空瓶中，加入2.0gNaCl充分溶解，立即用封盖器密封。并将固相微萃取装置的不锈钢针头穿过隔垫，露出萃取头，置于样品上方1 cm处，在温度为50℃的超声波中萃取40min。萃取结束后将纤维头缩回，立即插入气相色谱仪进样口，露出纤维头解吸10min。

#### **1.5.2** 色谱条件

色谱柱，HP-INNOwax Polyethylene Glycol ((30m×0.25mm, 0.25μm)，美国安捷伦；

气相色谱条件：分流方式为不分流，柱温采用线性程序升温，起始温度为

40℃，保持3min，以1min 5℃的升温速度升至120℃，再以1min 8℃的升温速度升至200℃，保持10min。载气为He（99.999%），体积流量为1mL／min，进样口温度为250℃。

质谱条件：EI+电离源，电子能量为70eV，灯丝流量为0.20mA，检测器电压为350V。扫描范围为33～450AMU，离子源温度为200℃。

## **2** 结果与分析

### **2.1** 早钟枇杷酒降酸处理香气的变化

早钟枇杷酒经酵母CU-6 降酸处理后，样品经HS-SPME 萃取吸附后，在

GC-MS条件下分析，得到香气成分总离子图，结果见图5-1、5-2。



图5-1 早钟枇杷酒香气成分GC／MS总离子图（降酸前）

Fig．5-1 Chromatogram of aroma compounds from Zaozhong loquat wine using GC/MS(Ck)



图5-2 早钟枇杷酒香气成分GC／MS总离子图（降酸后）

Fig．5-2 Chromatogram of aroma compounds from Zaozhong loquat wine using GC/MS(via deacidification)

由图5-1、5-2可知，早钟枇杷酒经过酵母CU-6降酸处理，其香气成分发生了部分变化。其主要香气成分经NIST05a谱库检索，采取积分后分析列表，其差异见表5-4。

表5-4 早钟枇杷酒降酸前后主要香气成分变化

Tab. 5-4 Changes of aroma of zaozhong loquat wine via deacidation

| 保留时间 | 香气名称（英文） | 面积百分比  香气名称 （%） | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| /min |  |  | Ck | De |
|  | 醇类 |  | 61.211 | 63.124 |
| 7.49 | 2-Hexanol,3-methyl- | 3-甲基-2-己醇 | 4.719 | 2.591 |
| 11.23 | 1-Butanol,3-methyl- | 异戊醇 | 32.294 | 29.233 |
| 12.22 | (2R,4R)-(-)-Pentanediol | (2R,4R)-(-)-戊二  醇 | 0.586 | 0 |
| 19.25 | 2-Butanol, 3-methyl- | 3-甲基-2-丁醇 | 0.073 | 0 |
| 20.88 | 2,3-Butanediol | 2,3-丁二醇 | 2.384 | 1.426 |
| 21.69 | (S)-(+)-1,2-Propanediol (S)- | 1,2-丙二醇 | 0.14 | 0 |
| 24.67 | 1-Propanol, 3-(methylthio)- | 3-甲硫基丙醇 | 0.275 | 0 |
| 25.89 | 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, | 3,7-二甲基-6-辛  烯醇 | 0.192 | 0.112 |
| 28.87 | Phenylethyl Alcohol | 苯乙醇 | 20.283 | 26.115 |
| 36.34 | dl-Threitol | 二硫代苏糖醇 | 0.143 | 0 |
| 36.33 | Glycerin | 甘油 | 0 | 2.808 |
| 33.09 | Cedrol | 柏木醇 | 0 | 0.029 |
| 39.2 | tert-Hexadecanethiol | 叔十六硫醇 | 0.122 | 0 |
| 41.12 Diaziridinone, 1,7-辛二烯-3-醇 | | | 0 | 0.81 |
|  | bis(1,1-dimethylpropyl)- |  |  |  |
|  | 醛类 |  | 1.782 | 0.132 |
| 1.78 | Acetaldehyde | 乙醛 | 0.356 | 0 |
| 23.02 | Benzeneacetaldehyde | 苯乙醛 | 0 | 0.132 |
| 33.84 | Hexadecanal | 十六醛 | 1.426 | 0 |
|  | 酸类 |  | 22.669 | 8.989 |
| 18.28 | Acetic acid | 醋酸 | 2.167 | 0.246 |
| 21.27 | Propanoic acid, 2-methyl- | 异丁酸 | 0 | 0.565 |
| 23.69 | Butanoic acid, 2-methyl- | 2-甲基丁酸 | 0 | 0.716 |
| 26.34 | 2-Propenoic acid | 丙烯酸 | 0 | 0.164 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 保留时间 | 香气名称（英文） | 面积百分比  香气名称 （%） | | |
| /min |  |  | Ck | De |
| 26.63 | Neodecanoic acid | 新癸酸 | 0.394 | 0.375 |
| 27.56 | Hexanoic acid | 己酸 | 0.254 | 0.299 |
| 31.89 | Octanoic Acid | 辛酸 | 2.285 | 3.019 |
| 33.91 | Nonanoic acid | 壬酸 | 0 | 0.146 |
| 35.83 | n-Decanoic acid | 正癸酸 | 3.502 | 1.508 |
| 36.9 | 9-Decenoic acid | 9-癸烯酸 | 0.226 | 0 |
| 38.53 | Benzenecarboxylic acid | 苯甲酸 | 0.18 | 0.375 |
| 39.5 | Dodecanoic acid | 月桂酸 | 0.205 | 0 |
| 39.8 | Eicosanoic acid | 二十酸 | 0.033 | 0 |
| 39.97 | Oleic Acid | 油酸 | 0.036 | 0 |
| 41.39 | Octadecanoic acid | 硬脂酸 | 5.904 | 0 |
| 42.92 | Oleic Acid | 油酸 | 3.337 | 0 |
| 43.13 | Tetradecanoic acid | 肉豆蔻酸 | 1.729 | 0 |
| 48.67 | n-Hexadecanoic acid | 棕榈酸 | 2.417 | 1.576 |
|  | 酯类 |  | 14.168 | 9.407 |
| 2.86 | Ethyl Acetate | 乙酸乙酯 | 2.76 |  |
| 8.46 | 1-Butanol, 3-methyl-, acetate | 乙酸异戊酯 | 0.61 | 0 |
| 18.19 | Octanoic acid, ethyl ester | 辛酸乙酯 | 1.011 | 0 |
| 23.38 | Decanoic acid, ethyl ester | 癸酸乙酯 | 2.038 | 0 |
| 23.86 | Butanedioic acid, diethyl ester | 丁二酸二乙酯 | 0 | 0.21 |
| 24.48 | Ethyl 9-decenoate | 9 -癸烯酸乙酯 | 0.384 | 0 |
| 35.3 | Hexadecanoic acid, methyl ester | 棕榈酸甲酯 | 0.504 | 0.128 |
| 36.02 | Hexadecanoic acid, ethyl ester | 十六酸乙酯 | 0.345 | 0.302 |
| 37.46 | Diethyl Phthalate | 酞酸二乙酯 | 0.085 | 0.4 |
| 37.62 | Ethyl hydrogen succinate | 琥珀酸单乙酯 | 0.277 | 0.908 |
| 38.95 | Octadecanoic acid, methyl ester | 硬脂酸甲酯 | 0 | 0.413 |
| 39.36 Propanoic acid, 2-methyl-, 异丁酸异丁酯 | | | 0 | 2.682 |

2-methylpropyl ester

保留时间

/min

香气名称（英文） 香气名称

面积百分比

（%）

Ck De

39.82 Ethyl Oleate油酸乙酯0 0.485

40.39 Phthalic acid, isobutyl octyl ester邻苯二甲酸二异

辛酯

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 十四烷基酯  2 -三氟甲基苯甲 |  | |
| 酸，4 -甲基戊基  酯 | 0 | 1.115 |
| 油酸甲酯 | 0.44 | 0 |
| 1,2 - 苯二羧酸， 丁基 2 - 甲基丙 | 0 | 0.829 |
| 基酯 |  |  |

40.44 Phthalic acid, butyl tetradecyl ester邻苯二甲酸丁基

2-Trifluoromethylbenzoic acid,

0 0.686

0.109 0

40.51 4-methylpentyl ester

42.2 9-Octadecenoic acid (Z) -, methyl

ester

1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl

43.05 2-methylpropyl ester

46.59 Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl)

ester

己二酸二（2-乙基己）酯

5.605 1.249

酮类0 16.324

26.93 1-Phenethyl-pyrrolidin-2,4-dione 1 -苯乙基吡咯

烷-2,4 -二酮

30.5 2H-Pyran-2,6(3H) -dione 2H-吡喃-2, 6

（3H）-二酮

0 0.279

0 0.148

36.62 5-Hydroxy-4-octanone 5-羟基-4-辛酮0 15.733

49.72 Cyclopentadecanone, 4-methyl- 4-甲基-环十五烷

酮

0 0.164

醚类 0 0.091

22.41 Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy) - 二乙二醇乙醚 0 0.091

酚类 0.171 0

36.64 Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) - 2,4-二叔丁基苯

酚

注：Ck代表降酸处理前的样品；De代表降酸处理后的样品。

0.171 0

由表5-4可知，酵母CU-6处理之前，早钟枇杷酒共检测出挥发性成分40

种，经过降酸发酵，可检测出挥发性成分37种，但成分含量及种类有所不同，新增醚类和酮类成分。枇杷酒降酸处理香气变化具体如下：

⑴从醇类物质的种类上看，酵母CU-6处理之前，早钟枇杷酒中醇类物质11

种，其相对含量为61.211%；经过降酸发酵后，醇类物质8种，相对含量的

63.124%。从醇类物质的含量上看，苯乙醇的含量增加了28.753%，并且新增了甘油和柏木醇两种物质。苯乙醇具有浓郁的玫瑰花香气，对酒的香气具有重要的贡献[114]，甘油和柏木醇具有具有愉快而持久的柏木香气，更能使酒体柔和，富有醇香。

⑵从酯类物质的种类上看，枇杷酒降酸处理前后，酯类物质的种类没有改变；从酯类物质的含量上看，新增加了丁二酸二乙酯等物质，丁二酸二乙酯具有果香味，增强酒体的酯香气。

⑶从酸类物质的种类上看，酵母CU-6处理之前，酸类物质14种，相对含量为22.669%；经过降酸发酵，酸类物质11种，相对含量为8.989%。由此可以看出，酒的酸类物质的种类及相对含量都有所减少。从酸类物质的含量上看，醋酸的相对含量下降明显，正癸酸和棕榈酸相对含量都有所下降，苯甲酸和辛酸略有增加。

⑷从醛类物质和酚类物质的种类上看，酵母CU-6处理之前，醛类物质2种，相对含量为1.782%，酚类物质1种，相对含量为0.171%。；经过降酸发酵，醛类物质1种，相对含量为0.132%；

⑸经过降酸发酵，新增醚类和酮类成分。其中，醚类物质1种，相对含量

0.091%；酮类物质4种，相对含量为16.324%。新增的醚类物质是二乙二醇乙醚，新增的酮类物质分别是1 -苯乙基吡咯烷-2,4 -二酮、2H-吡喃-2，6(3H) -二酮、5-羟基-4-辛酮、4-甲基-环十五烷酮。

### **2.2** 解放钟枇杷酒降酸处理香气的变化

解放钟枇杷酒经酵母CU-6降酸处理后，样品经HS-SPME萃取吸附后，在

GC-MS条件下分析，得到香气成分总离子图，结果见图5-3、5-4。



图5-3 解放钟枇杷酒香气成分GC／MS总离子图（降酸前）

Fig．5-3 Chromatogram of aroma compounds from Jiefangzhong loquat wine using GC/MS(Ck)



图5-4 解放钟枇杷酒香气成分GC／MS总离子图（降酸后）

Fig．5-4 Chromatogram of aroma compounds from Jiefangzhong loquat wine using GC/MS(via deacidification)

由图5-3、5-4可知，早钟枇杷酒经过酵母CU-6降酸处理，其香气成分发生了部分变化。其主要香气成分经NIST05a谱库检索，采取积分后分析列表，其差异见表5-5所示。

表5-5 解放钟枇杷酒降酸前后主要香气成分变化

Tab. 5-5 Changes of aroma of jiefangzhong loquat wine via deacidation

保留面积百分比

时间

/min

香气名称（英文）香气名称

（%）

Ck De

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 醇类 |  | 78.902 | 67.126 |
| 1.47 | Cyclobutanol | 环丁醇 | 0 | 0.157 |
| 7.07 | 1-Propanol, 2-methyl- | 异丁醇 | 6.738 | 2.218 |
| 7.43 | 1,4-Pentanediol 1,4- | 戊二醇 | 0.684 | 0 |
| 11.15 | 1-Butanol, 3-methyl- | 异戊醇 | 53.782 | 0 |
| 11.18 | 1-Pentanol | 1-戊醇 | 0 | 35.926 |
| 14.69 | 2-Hexanol, 3-methyl- 5- | 甲基-2-庚醇 | 0.031 | 0 |
| 15.18 | 1,2-Propanediol | 丙二醇 | 0 | 0.124 |
| 19.3 | 2-Heptanol | 2-庚醇 | 0 | 0.092 |
| 20.46 | 2,3-Butanediol | 2,3-丁二醇 | 0.715 | 0.964 |
|  | 2-Pentanol | 2-戊醇 | 0.045 | 0 |
| 21.69 | 2-Butanol, 3-methyl- | 3-甲基-2-丁醇 | 0 | 0.115 |
| 23.02 | 2-Hexanol, 3-methyl- | 3 - 甲基-2 -  己醇 | 0 | 0.087 |
| 24.66 | 1-Propanol, 3-(methylthio)- | 3-甲硫基丙醇 | 0.218 | 0.188 |
| 25.88 | 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, (R)- (R)- 3,7-二甲基-6- 0.116 0.415 | | | |
|  |  | 辛烯醇 |  |  |
| 26.34 | 2-Propanol, 1-ethoxy- | 1-乙氧基-2-丙  醇 | 0.118 | 0 |
| 28.87 | Phenylethyl Alcohol | 苯乙醇 | 13.352 | 22.634 |
| 29.02 | 1,4-Butanediol | 1,4-丁二醇 | 0.381 | 0 |
| 31.4 | 2-Heptadecanol | 2-十六醇 | 0 | 0.024 |
| 31.67 | 1,6,10-Dodecatrien-3-ol,  3,7,11-trimethyl- | 橙花叔醇 | 0 | 0.085 |
| 33.09 | Cedrol | 柏木醇 | 0 | 0.037 |
| 36.34 | Glycerin | 甘油 | 0.893 | 3.838 |
| 36.88 Cyclohexanol, 3,5-dimethyl- 3,5-二甲基环 0.615 | | | | 0 |
|  |  | 己醇 |  |  |

保留时间

/min

香气名称（英文）香气名称

面积百分比

（%）

Ck De

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | 己醇 |  | |
| 37.78 | Cyclopentanol, 1-methyl- | 1-甲基环戊醇 | 0.146 | 0 |
| 37.89 | 1-Nonadecanol | 十九烷醇 | 0.201 | 0 |
| 38.7 | Phytol | 叶绿醇 | 0 | 0.036 |
| 39.12 | Ethanol, 2-(octadecyloxy)- 2-（十八烷氧 0 0.186 | | | |

36.88 Cyclohexanol, 3,5-dimethyl- 3,5-二甲基环0.615 0

基）-乙醇

39.6 1-Penten-3-ol, 2-methyl- 2-羟基-2-甲基

-1-戊烯-3-醇

0.252 0

醛类0 0

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 18.27 | Acetic acid | 醋酸 | 2.955 | 2.78 |
| 21.27 | Propanoic acid, 2-methyl- | 异丁酸 | 0.568 | 0.984 |
| 23.68 | Butanoic acid, 2-methyl- | 2-甲基丁酸 | 0.683 | 0.937 |
| 26.63 | Neodecanoic acid | 新癸酸 | 0 | 0.399 |
| 27.56 | Hexanoic acid | 己酸 | 0.209 | 0.396 |
| 31.89 | Octanoic Acid | 辛酸 | 1.654 | 4.634 |
| 33.9 | Nonanoic acid | 壬酸 | 0 | 0.083 |
| 35.83 | n-Decanoic acid | 正癸酸 | 1.321 | 1.806 |
| 36.88 | 9-Decenoic acid | 9-癸烯酸 | 0 | 1.367 |
| 38.52 | Benzenecarboxylic acid | 苯甲酸 | 0.162 | 0.252 |
| 48.55 | n-Hexadecanoic acid | 棕榈酸 | 0.347 | 0.561 |
| 49.72 | Erucic acid | 芥酸 | 0.093 | 0 |
| 酯类 10.686 | | | | 7.923 |
| 0.66 | Ethyl Acetate | 乙酸乙酯 | 3.212 | 0 |
| 7.24 | 1-Butanol, 3-methyl-, acetate | 乙酸异戊酯 | 0.862 | 0 |

酸类7.992 14.199

11.51 Methoxyacetic acid, pentyl ester甲氧乙酸戊基

酯

0.196 0

15.24 Ethyl lactate乳酸乙酯0 0.234

17.93 Octanoic acid, ethyl ester辛酸乙酯0.556 0

保留

时间香气名称（英文）香气名称

面积百分比

（%）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| /min |  |  | Ck | De |
| 22.56 | Formic acid, 1-methylethyl ester | 甲酸异丙酯 | 0 | 0.131 |
| 23.27 | Decanoic acid, ethyl ester | 癸酸乙酯 | 0.657 | 0 |
| 23.85 | Butanedioic acid, diethyl ester | 丁二酸二乙酯 | 0.065 | 0.161 |
| 24.39 Ethyl 9-decenoate 9 - 癸烯酸乙 0.24 | | | | 0 |
|  |  | 酯 |  |  |
| 25.13 | 1,3-Propanediol, diacetate | 1,3-丙二醇二  乙酸酯 | 0.038 | 0 |
| 27.93 | Dodecanoic acid, ethyl ester | 月桂酸乙酯 | 0.059 | 0 |
| Ethanol, 三甘醇二乙酸  31.53 2,2'-(1,2-ethanediylbis(oxy))bis-, 酯 0 | | | | 0.111 |
|  | diacetate |  |  |  |
| 31.53 | 2-Pentanol, acetate | 乙酸仲戊酯 | 0.036 | 0 |

32.75 Hexanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester 3-羟基己酸乙

酯

0.061

34.83 n-Hexyl salicylate 水杨酸己酯 0 0.052

### 35.3 Hexadecanoic acid, methyl ester 棕榈酸甲酯 0.062 0

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | 酯 |  | |
| 36.03 | Hexadecanoic acid, ethyl ester | 十六酸乙酯 | 0.369 | 0.346 |
| 37.46 | Diethyl Phthalate | 酞酸二乙酯 | 0.429 | 0.634 |
| 37.63 | Ethyl hydrogen succinate | 琥珀酸单乙酯 | 0.188 | 0.764 |
| 39.37 | Butanoic acid, pentyl ester | 丁酸戊酯 | 2.049 | 2.246 |
| 39.82 | Ethyl Oleate | 油酸乙酯 | 0.443 | 0.287 |
| 40.39 Phthalic acid, isobutyl octyl ester 邻苯二甲酸二 | | | 0 | 0.345 |
| 9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl 9,12,15 - 十八 | | |  |  |
| 41.52 ester, (Z,Z,Z)- 碳三烯酸乙基 | | | 0 | 0.11 |
| 酯 | | |  |  |
| 43.05 Dibutyl phthalate 邻苯二甲酸二 0 | | | | 0.32 |
| 43.06 m-Tolyl isothiocyanate 间甲苯异硫氰 0.386 | | | | 0 |
|  |  | 酸酯 |  |  |
| 46.58 Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester | | 己二酸二(2-  乙基己)酯 | 0 | 1.295 |
| 46.59 | Hexanedioic acid, dioctyl ester | 己二酸二辛酯 | 0.77 | 0 |

35.42 Ethanol, 2-(dodecyloxy) -乙二醇月桂酸

0 0.352

异辛酯

丁酯

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 保留时间 | 香气名称（英文） | 香气名称 | 面积百分比  （%） |
| /min |  |  | Ck De |
| 47.19 | Butanoic acid, ethyl ester | 丁酸乙酯 | 0.069 0.319 |

Pentanoic acid,

50.83 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl,

Isobutyl ester

2,2,4 -三甲基

-3 -羧基异丙基戊酸异丁基酯

0 0.155

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 13.04 | 2-Isopropoxyethylamine 2- | 氨乙基异丙醚 | 0 | 0.12 |
| 20.61 | Diisopropyl ether | 异丙醚 | 0.193 | 0 |
| 26.34 Ethanol, 2-(2-(2-ethoxyethoxy)ethoxy)  22.43 Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)- | | - 三乙二醇单乙  二乙二醇乙醚 | 0  0.124 | 0.174  0 |
|  | 烯烃 |  | 0.067 | 0 |
| 34.21 | 1-Pentadecene | 十五烯 | 0.067 | 0 |
|  | 酮类 |  | 2.647 | 10.461 |
| 36.62 | 5-Hydroxy-4-octanone | 5-羟基-4-辛酮 | 2.647 | 10.461 |

醚类0.317 0.294

醚

注：Ck代表降酸处理前的样品；De代表降酸处理后的样品。

由表5-5可知，酵母CU-6处理之前，解放钟枇杷酒共检测出挥发性成分49

种，经过降酸发酵，可检测出挥发性成分50种，其成分含量及种类有所不同，具体变化如下：

⑴从醇类物质的种类上看，酵母CU-6处理之前，解放钟枇杷酒中醇类物质

18种，相对含量的78.902%；经过降酸发酵后，醇类物质18种，相对含量的

67.126%；从醇类物质的含量上看，苯乙醇的含量增加了69.518%，并且新增了

1-戊醇、柏木醇等物质。苯乙醇具有浓郁的玫瑰花香气，1-戊醇具有醇香，柏木醇具有愉快而持久的柏木香气，更能使酒体柔和，富有醇香。

⑵从酯类物质的种类上看，酵母CU-6处理前后，解放钟枇杷酒酯类物质的种类没有改变；从酯类物质的含量上看，新增加了乳酸乙酯、甲酸异丙酯、三甘醇二乙酸酯、3-羟基己酸乙酯、水杨酸己酯、乙二醇月桂酸酯等物质，乳酸乙酯具有清甜的、带有酸味的水果香气，这三种酯类物质表现出芳香、水果香和甜香

的特征，使酒样酯香气更加浓郁。

⑶从酸类物质的种类上看，酵母CU-6处理之前，酸类物质9种，相对含量为7.992%；经过降酸发酵，酸类物质11种，相对含量为14.199%；从酸类物质的含量上看，除醋酸外，每种酸类物质的相对含量都有所增加。并且，新增了新癸酸、壬酸和9-癸烯酸三种物质。癸酸具有奶香及酸干酪的香气，壬酸具有轻微的油脂气味。

⑷从醚类和酮类物质的种类上看，酵母CU-6处理之前，酮类物质1种，相对含量为2.647%；醚类物质2种，相对含量为0.317%。

## **3** 小结

采用固定化酵母CU-6对枇杷酒进行降酸处理，可适度改变酒中的香气成分比例，提高部分香气物质的比例和组成。研究表明，早钟枇杷酒经CU-6降酸处理，总香气成分减少了3种，酯类减少了4.761%；醇类增加了1.913%，其中苯乙醇的比例增加5.832%；酸类减少了13.68%。解放钟枇杷酒经CU-6降酸处理，总香气成分增加了1种，脂类减少了2.763%；醇类减少了11.776%，其中苯乙醇的比例增加9.282%；酸类增加了6.207%。经发酵和降酸处理而酿造出来的枇杷酒，酒色金黄，澄清透明，有光泽，酒精度适中，口感细腻、柔顺、爽口，回味芳香，具有纯正优雅的苹果香和玫瑰香，酒体丰满，典型性强。

果酒的感官品质主要包括口感和香气，酒中的糖、酸和单宁含量影响口感，而芳香物质的种类和浓度决定着酒的香气。目前枇杷酒香气成分研究报道较少，范志刚等**[115]**采用传统萃取方法研究枇杷酒中的主要香气成分，报道了苯乙醇、内脂、酯类物质等少数香气成分；蒲彪等[116]探讨陈酿对枇杷酒香气形成的影响， 采用HS-SPME与GC-MS技术检测枇杷酒陈酿期间香气成分的变化，陈酿期共检出27种香气成分，醇类和醛类香气成分相对含量总体有所减少，酯类、酸类和萜烯类香气成分相对含量总体有所增加；张丽萍等[117]比较了不同产地的枇杷酒香气特征，认为成熟度和工艺是造成香气差异明显的主要原因。

果酒中的香气来源有三类：一类香气即品种香气，主要是鲜果特征香气物质。二类香气即发酵香气，主要是发酵过程酵母产生的副产物，如甘油、高级醇、酯类等，它与鲜果含糖量呈正相关[113]。三类香气即陈酿香气，在果酒陈酿过程主要由一类香气转化生成。非酿酒酵母属酵母能产生和分泌多种胞外酶，可补充果

酒二类香气，对香气结构具有积极的影响[118]。枇杷果滋味酸甜清淡，一类香气不突出，传统酿造二类香气又偏少，因此通过酵母降酸过程转化一部分二类香气，可以提高果酒感观品质。早钟和解放钟枇杷酒经酵母CU-6降酸发酵，检出苯乙醇、橙花叔醇、柏木醇等物质，其中苯乙醇和橙花叔醇都具有浓郁的玫瑰花香气，柏木醇具有愉快而持久的柏木香气；酯类物质丁二酸二乙酯有所增加，增加了酒体的苹果香气；酮类物质中，5-羟基-4-辛酮（丁偶姻）均能检出，它具有典型的甜奶油和豆蔻香气，这些构成了是枇杷酒的主要特征性香气。

# 第六章 枇杷酒营养成分及抗氧化特性的研究

**第一节枇杷酒营养成分分析**

枇杷鲜果含有丰富的氨基酸、维生素和矿物质等[87]，具有较高的营养保健价值。枇杷果肉中含8种人体必需氨基酸，以亮氨酸的含量最高，含有10种非必需氨基酸，其中以天门冬氨酸、谷氨酸、脯氨酸的含量较高。枇杷果皮中富含枇杷多酚，该活性物质具有抗胃溃疡、抗菌、抗炎、抗肿瘤等[119]特点。经酿造后的枇杷酒，一定程度上改善了枇杷酒的营养和功效成分，还保留了鲜食枇杷无法摄取的皮中的营养成分，发酵过程还能产生某些有益副产物。目前关于枇杷的营养价值报道多，而对枇杷酒及两者之间营养成分差异分析的研究目前尚未见报道。本研究通过测定福建特产的解放钟和早钟以及其酿造的干型枇杷酒的氨基酸、矿物质、维生素等成分含量，分析其主要营养成分差异，为枇杷酒营养价值和保健功效的研究提供理论依据。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 材料

枇杷鲜果（分别为早钟、解放钟，采自福建莆田华亭，采收期4月份）；干型枇杷酒（酿制原料分别为早钟、解放钟，原料采自福建莆田华亭，采收

期4月份）。

酵母CU-6经过固定化处理后，采用优化后的条件对两种枇杷酒进行降酸处理。

### **1.2** 主要试剂

维生素A，维生素B1，维生素B2，维生素C，维生素D，维生素E，芦丁，

Al(NO3) 3，NaNO2（国药集团，均为分析纯）。

### **1.3** 主要仪器

紫外/可见分光光度计，UV-1100型，上海美谱达；恒温水浴锅，HH-4型，常州国华；

氨基酸全自动分析仪，L-8900，日本日立；

超高效液相色谱，Waters ACQUTYTM，美国沃特世；原子吸收分光光度计，SOLAARMKⅡ-M6，美国热电。

### **1.4** 方法

#### **1.4.1** 维生素**A**、**D**、**E**的测定

参照GB5413.9-2010《食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素A、D、

E的测定》所述方法。

#### **1.4.2** 维生素**B1**的测定

参照GB5413.11-2010《食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素B1的测定》所述方法。

#### **1.4.3** 维生素**B2**的测定

参照GB5413.12-2010《食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中维生素B2的测定》所述方法。

#### **1.4.4** 维生素**C**的测定

枇杷酒的维生素C含量测定参照GB 6195-1986水果、蔬菜维生素C含量测定法（2,6-二氯靛酚滴定法）所述方法。

#### **1.4.5** 水解氨基酸的测定

样品中水解氨基酸的测定采用：GB/T5009.124-2003《食品中氨基酸的测定》所述方法。

#### **1.4.6** 矿物质的测定

样品中矿物质的测定方法采用：GB/T5009-2003所述方法。其中钠、钾：GB/T5009.91-2003；钙：GB/T5009.92-2003；铁、镁：GB/T5009.90-2003；锌：GB/T5009.14-2003；铬：GB/T5009.123-2003；硒：GB/T5009.93-2003.

## **2** 结果与分析

### **2.1** 维生素

分别测定早钟和解放钟枇杷鲜果和降酸前后枇杷酒的维生素含量，结果如表

6-1所示。

表 6-1 降酸前后枇杷及枇杷酒中维生素含量的比较

Tab 6-1 Comparasion on content of vitamines in loquats and loquat wines via deacidation

| 品 名  早 钟  鲜果 | | 早钟  枇杷酒 | 早钟  枇杷酒 | 解放钟鲜果 | 解放钟  枇杷酒 | 解放钟  枇杷酒 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 维生素 | | （Ck） | （De） |  | （Ck） | （De） |
| 维生素 B1/μg100mL-1 | 14 | － | － | 16 | － | － |
| 维生素 B2/μg100mL-1 | 23 | 12 | 11 | 30 | 15 | 12 |
| 维生素 C/μg100mL-1 | 6.1 | 0.12 | 0.1 | 6.3 | 0.11 | 0.09 |
| 维生素 A/μg100mL-1 | 111 | － | － | 106 | － | － |

注：Ck代表降酸前的样品；De代表降酸后的样品。

由表6-1可知，2种枇杷鲜果及其酿造的枇杷酒样均检测不出维生素D和维生素Ｅ。且枇杷鲜果经发酵后维生素A和维生素B1都缺失，这可能是因为发酵过程中酵母利用维生素B1和维生素A作为其生长因子从而使其消耗。同时与鲜果相比，发酵后的枇杷酒维生素C的保留较少，这可能是因维生素C易被氧化，随着酒的陈酿时间变长，导致其含量下降。枇杷酒进行降酸处理过程中，其维生素C及维生素B2均呈下降趋势。

### **2.2** 游离氨基酸

分别测定早钟和解放钟枇杷鲜果，降酸处理前后的枇杷酒游离氨基酸含量，结果如表6-2所示。

表6-2 降酸前后枇杷及枇杷酒游离氨基酸的含量比较

品 名

早钟

早钟

解放钟

解放钟

早 钟

解放钟

枇杷酒 枇杷酒 枇杷酒

枇杷酒

鲜果 鲜果

氨基酸（mg L-1）

（Ck） （De）

（Ck） （De）

Tab 6-2 Comparasion on free amino acids content in loquats and loquat wines via deacidation

| 天冬氨酸 | 968 | — | 1.1 | 1838.9 | — | 2.2 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 丝氨酸 | 136 | 2.8 | 4.8 | 112.1 | 2.6 | 2.4 |
| 谷氨酸 | 565 | — | 7.8 | 549 | 1.4 | 2.6 |
| 甘氨酸 | 121 | — | 1.6 | 108 | 0.4 | 1.9 |
| 组氨酸 | 51.1 | — | 1.5 | 52 | — | 2.2 |
| 精氨酸 | 97.2 | — | 8.6 | 85 | 0.2 | 11.7 |
| 苏氨酸 | 106.3 | — | 2.5 | 103 | 0.2 | 2.0 |
| 丙氨酸 | 160 | — | 6.5 | 116 | 0.8 | 7.7 |
| 脯氨酸 | 109.8 | — | 0.6 | 102.6 | — | 0.5 |
| 胱氨酸 | 7.2 | 1.4 | 3.2 | 17.6 | 1.3 | 2.3 |
| 酪氨酸 | 56.5 | — | 2.4 | 60 | — | 2.3 |
| 缬氨酸 | 119.1 | — | 1.0 | 98 | — | 2.2 |
| 蛋氨酸 | 28.3 | — | 0.2 | 15.5 | — | 0.4 |
| 赖氨酸 | 146 | 0.1 | 2.8 | 173 | 0.1 | 6.0 |
| 异亮氨酸 | 111.5 | — | 0.3 | 68 | — | 0.8 |
| 亮氨酸 | 175 | — | 1.6 | 136 | — | 3.6 |
| 苯丙氨酸 | 77.8 | — | 0.8 | 82 | 0.2 | 1.0 |
| 必需氨基酸 | 764 | 0.1 | 9.2 | 675.5 | 0.5 | 16 |
| 非必需氨基酸 | 2271.8 | 4.2 | 38.1 | 3041.2 | 6.7 | 35.8 |
| 合计 | 3035.8 | 4.3 | 47.3 | 3716.7 | 7.2 | 51.8 |

注：Ck代表降酸前的样品；De代表降酸后的样品。

由表6-2可知，枇杷鲜果含有组成较完整和含量较高的氨基酸组分，经发酵

后的枇杷酒游离氨基酸含量则大大减少，其中胱氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸在发酵过程中甚至降低至零。这可能是因为酿造过程的果汁澄清损失和菌种生长消耗造成的。降酸处理后的枇杷酒游离氨基酸总量呈上升趋势，这可能是因为重组酵母CU-6生长过程中分解其他物质生成新的游离氨基酸。

### **2.3** 矿物质成分

分别测定早钟和解放钟枇杷鲜果，鲜果酿制枇杷酒处理前后的矿物质含量，结果如表6-3所示。

表 6-3 降酸前后枇杷及枇杷酒的矿物质含量

Tab 6-3 Comparasion on content of mineral substance in loquats and loquat wines via deacidation

|  | 品 名 |  | 早钟 | 早钟 |  | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  | 解放钟 | 解放钟 |
|  | 早 钟 | 枇杷 | 枇杷 | 解放钟 |  |  |
|  |  |  |  |  | 枇杷酒 | 枇杷酒 |
|  | 鲜果 | 酒 | 酒 | 鲜果 |  |  |
| 矿物质（mg Kg-1） | |  | （Ck） | （De） |  | （Ck） | （De） |
| 钠 |  | 51.8 | 48.5 | 45.0 | 89.2 | 46.0 | 46.0 |
| 钾 |  | 1840 | 1252 | 1237 | 1320 | 1359 | 1330 |
| 镁 |  | 120 | 82.6 | 76.3 | 81.0 | 76.3 | 74.7 |
| 钙 |  | 222 | 57.6 | 51.0 | 156 | 44.0 | 40.3 |
| 铁 |  | 2.0 | 0.6 | 0.5 | 2.15 | 0.4 | 0.4 |
| 锌 |  | 8.2 | 0.3 | 0.3 | 9.7 | 0.4 | 0.4 |
| 铜 |  | 0.36 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 |
| 锰 |  | 2.9 | 2.3 | 1.4 | 3.8 | 2.7 | 2.6 |
| 铬 |  | 0.1 | ＜0.1 | ＜0.1 | 0.1 | ＜0.1 | ＜0.1 |

注：Ck代表降酸前的样品；De代表降酸后的样品。

由表6-3可知，枇杷和枇杷酒均含较高的钾、钙、镁、钠，而铁、锌、铜、锰、硼、铬含量较少。与枇杷鲜果相比，枇杷酒的矿物质含量均有明显下降，这可能是由于在酒的陈酿澄清过程中，矿物质与有机酸结合，生成了不溶性的盐类，随沉淀物的排出而损失。总体上，枇杷酒较好地保存了枇杷原有的矿物质，许多

矿物质含量高于葡萄酒，且基本符合国际葡萄酒酿酒法规中对一些矿质元素含量的限定[120]，具有较高的营养价值和保健功效。

## **3** 小结

枇杷经发酵成枇杷酒后，所含的维生素、氨基酸及矿物质含量均比鲜果降低。经降酸发酵后，枇杷酒的谷氨酸、精氨酸、丙氨酸和丝氨酸的含量较高。并且，呈甜味氨基酸如甘氨酸、丝氨酸、脯氨酸、苏氨酸和丙氨酸，经降酸后含量增加，增添了酒体甜味的口感。呈鲜味的氨基酸如天冬氨酸，经降酸后含量增加，增加了酒体鲜味感。经发酵、降酸处理后的枇杷酒仍富含人体所需的大量元素，如钾、钙、镁、钠等，还有含有铁、锌、铜、锰、铬等必需微量元素。

赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸是人体所需的8种必需氨基酸。研究表明，除色氨酸未检出外，其余7种氨基酸在枇杷鲜果中含量均较丰富。经过酿酒酵母发酵，早钟和解放钟枇杷酒的必需氨基酸降至0.1 mg·L-1和0.5 mg·L-1，含量较低。经过酵母CU-6降酸发酵后，必需氨基酸升高到9.2 mg·L-1和16 mg·L-1。必需氨基酸与非必需氨基酸的比值：降酸前早钟为0.02，解放钟为0.07；降酸后早钟为0.24，解放钟为0.45。

铁、锌、铜、锰、铬属于人体必需18种微量元素，是构成金属酶的必需成分，对于维持人体生理功能具有重要作用。铁参与肌红蛋白、血红蛋白和细胞色素氧化酶等合成；锌影响某些非酶的有机分子配位基的结构构型；铜参与造血和增强防疫功能；锰增强蛋白质代谢和防癌的作用；铬具有调节胆固醇、脂类代谢的作用。研究表明早钟和解放钟枇杷酒降酸发酵前后，铁的含量远低于推荐日摄入量

（15mg d-1）；铬也接近锰的含量接近一半的推荐日摄入量（3.5mg d-1）；铬的摄入量接近推荐日摄入量（50μg d-1）。锌与铜在人体内的吸收运转相互竞争、相互抑制[121]，研究表明[122]高锌低铜可能抑制抗氧化功能，引起脂类代谢紊乱。早钟和解放钟枇杷鲜果中，的Zn/Cu为22.7和48.5，而2种枇杷酒经过降酸发酵，其

Zn/Cu转变为3和4，低于人类较常摄入的植物Zn/Cu(一般为11.4)[123]。随着发酵时间的延长，部分营养素部分被酵母利用或与其他物质发生反应沉淀排出，因此降酸之后呈现不同程度的降低。研究表明，经降酸发酵的枇杷酒，仍具有一定的营养价值。

**第二节枇杷酒抗氧化特性的研究**

自由基是人体组织活动的产物，通常情况下产生和消除处于动态平衡状态

[124]. 当某种原因导致失衡后，自由基就会攻击组织并引发疾病的发生。自由基

对细胞有破坏作用[125]，当细胞损伤死亡增加时引起衰老。

果酒中的抗氧化成分包括黄酮和酚酸类、酶类、抗坏血酸、美拉德反应产物等[126]。枇杷酒含有较丰富的多酚类[127]生理活性成分，这些成分具有抗氧化、保护心脑血管、清除过剩自由基、抗癌等作用。适量饮用枇杷酒，可清除自由基对人体的危害，对人体有一定的保健功能。目前枇杷酒中活性成分研究较少，而其抗氧化能力的研究未见报道。本研究以福建特产的早钟和解放钟枇杷酒为研究对象，以解百纳干红、雷司令干白为对照，通过测定其总酚、总黄酮和维生素C的含量，并在此基础上研究枇杷酒的清除DPPH自由基能力、清除羟自由基能力和总抗氧化能力，对枇杷酒的抗氧化活性成分及抗氧化活性进行分析，为深入研究枇杷酒的各种保健功效提供可靠的科学依据。

## **1** 材料与方法

### **1.1** 材料

自酿早钟干型枇杷酒（V/V 10%），解放钟干型枇杷酒（V/V 10.5%），干红

（品种为解百纳V/V 11.5%），干白（品种为雷司令V/V 12.5%）。

酵母CU-6经过固定化处理后，采用优化后的条件对两种枇杷酒进行降酸处理。

### **1.2** 主要试剂

NaNO2，Al(NO3) 3，芦丁，没食子酸（国药集团），二苯基苦味酰基苯肼（DPPH，

solarbio公司），Folin-Ciocalteu主要试剂（上海生工）；

羟自由基测定主要试剂盒，总抗氧化能力（T-AOC）测定主要试剂盒，维生素C测定主要试剂盒（南京建成生物所）。

### **1.3** 主要仪器

恒温水浴锅，HH-4型，常州国华；

可见/紫外分光光度计，UV-1100型，上海美谱达。

### **1.4** 方法

#### **1.4.1** 总酚含量的测定

采用福林酚法[128]对样品的总酚含量进行定量测定。精确称取0.0500 g的干燥没食子酸标准样品，蒸馏水完全溶解后定容至100 ml的容量瓶中，配制成浓度为0.5mg/ml的没食子酸标准溶液。精密吸取0、0.1 ml、0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、

0.8 ml、1.0ml 0.5mg/ml的没食子酸标准溶液于试管中，并加蒸馏水至1ml，配成一系列不同浓度的标准溶液。然后再加入2.25ml蒸馏水摇匀，再加250μl Folin-Ciocalteu主要试剂，充分摇匀，静置6 min后加入2.5 ml 7.5%Na2CO3溶液，混匀，然后在30℃下避光放置反应80min，以0样为空白，在760 nm处测定吸光值。以吸光度值为纵坐标，没食子酸对照品溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。线性回归方程为：Y=29.007X+0.0112，R2 = 0.9994，其中Y值为吸光度（Abs），

X值为没食子酸标准溶液浓度（μg/ml）。取1.00ml的样品，按照标准曲线绘制的方法进行测定。标准曲线如下：

y = 29.007x + 0.0112 R2 = 0.9994

1

λ/A760

0.8

0.6

0.4

0.2

0

0 0.005 0.01 0.015 0.02 0.025 0.03

浓度/μg·mL-1

图 6-1 没食子酸标准曲线

Fig. 6-1 Standard curve of gallic acid

#### **1.4.2** 总黄酮含量的测定

采用NaNO2—Al(NO3) 3比色法[129]对样品总黄酮进行定量测定。准确称取芦丁标准品10 mg于100ml容量瓶中，用60%乙醇溶解，并用60%的乙醇定容，摇匀，配制成0.10mg/ml的芦丁标准溶液。准确吸取0。l mg/ml的芦丁标准溶液0、

1.0 ml、2.0 ml、3.0 ml、4.0 ml、5.0 ml，分别置于10 ml容量瓶中，各加入30%

乙醇使成5 ml，然后加5%NaNO2溶液0.3 ml，摇匀，放置8min，再加10% Al(NO3) 3溶液0.3 ml，摇匀，静置8 min，加4%NaOH溶液4 ml，蒸馏水定容，摇匀，静置15 min，以0样为空白，510 nm波长处测定吸光值，以吸光值为纵坐标，芦丁浓度为横坐标，绘制标准曲线回归方程为：Y= 0.7077X+ 0.0068, R2 = 0.9993，其中Y值为吸光度（Abs），X值为芦丁浓度（mg/ml）。取1.00ml的样品，按照标准曲线绘制的方法进行测定。标准曲线如下：

y = 0.7077x + 0.0068 R2 = 0.9993

0.8

λ/A510

0.6

0.4

0.2

0.0

0 0.2 0.4 0.6 0.8 1

浓度/mg·mL-1

图 6-2 芦丁标准曲线

Fig. 6-2 Standard curve of rutin

#### **1.4.3** 抗坏血酸（维生素**C**）含量的测定

枇杷酒的维生素C含量测定参照GB 6195-1986水果、蔬菜维生素C含量测定法（2,6-二氯靛酚滴定法）所述方法。

#### **1.4.4** 总抗氧化能力（**T-AOC**）的测定

总抗氧化能力（T-AOC）测定采用氧化还原法，机体中有许多抗氧化物质，能使Fe3+还原成Fe2+，后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物，通过比色可测出其抗氧化能力的高低。主要操作步骤按试剂盒说明进行。

#### **1.4.5** 清除羟自由基能力的测定

Fenton反应是最常见的产生羟自由基的化学反应，H2O2的量和Fenton反应产生的OH**˙**量成正比，当给予电子受体后，用griess主要试剂显色，形成红色物质，其呈色与OH**˙**的多少成正比关系。主要操作步骤按试剂盒说明进行。

#### **1.4.6** **DPPH**自由基的清除能力的测定

DPPH自由基有单电子，其醇溶液呈紫色，当存在自由基清除剂时，可与其单电子配对而使其褪色，其褪色程度与其接受的电子数量成定量关系，在517nm处测其吸光值可得样品的清除DPPH自由基的能力。称取0.0197g DPPH，用用无水乙醇溶解并定容至250ml，混匀，即为2.00×10-4molL-1的DPPH溶液。精确移取2.00 mL的一定浓度样品溶液于10mL试管中，加入2.00 ml DPPH溶液，使总体积为4.00 mL，摇匀，温室放置30分钟，517 nm，吸光值为A样品（用

2.00 ml无水乙醇与2.00 mL样品溶液调零）。向2.00 ml DPPH中加入2.00 ml

水，吸光值为A空白。根据公式得样品清除率η。清除率计算公式为η（%）=（A

空白-A样品）×100/A空白

## **2** 结果与分析

### **2.1** 功效成分含量比较

分别测定降酸处理前后的早钟和解放钟枇杷酒、解百纳干红和雷司令干白的总酚、总黄酮及维生素C含量，比较其差异，结果见表6-5。

表6-5枇杷酒和干红、干白的总酚、总黄酮、维生素C含量的比较（*X**SD*）Tab. 6-5 Comparison on conc. of total phenon, total and维生素C of loquat wine, red wine and white wine

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 功效成分 | 总酚含量 | 总黄酮含量 | 维生素 C 含量 |
| 样品 | （Mg mL-1） | （Mg mL-1） | (μg mL-1) |
| 早钟（Ck） | 0.20 | 0.87 | 120.38 |
| 早钟（De） | 0.22 | 0.81 | 100.16 |
| 解放钟（Ck） | 0.25 | 0.91 | 111.03 |
| 解放钟（De） | 0.29 | 0.84 | 99.40 |
| 解百纳 | 1.31 | 5.60 | 252.41 |
| 雷司令 | 0.14 | 0.22 | 47.31 |

注：Ck代表降酸处理前的样品；De代表降酸处理后的样品。

由表6-5可知，降酸处理前后，早钟和解放钟枇杷酒的总酚、总黄酮和维生素C含量均介于解百纳干红和雷司令干白之间。2种枇杷酒的总酚含量在降酸处理后都略微上升，而总黄酮和维生素C含量降酸处理后都略微下降。

### **2.2** 总抗氧化能力

分别测定降酸处理前后的早钟和解放钟枇杷酒、解百纳干红和雷司令干白的总抗氧化能力，结果见图6-3。

160

120

ml-1

80

总抗氧化能力U

40

0

酒的品种

图 6-3 枇杷酒和干红、干白的总抗氧化能力比较

Fig. 6-3 Comparison on T-AOC of loquat wine, red wine and white wine

由图6-3可知，可知2种枇杷酒总抗氧化能力介于解百纳干红和雷司令干白之间。早钟枇杷酒的总抗氧化能力高于解放枇杷酒。降酸处理之后，早钟枇杷酒和解放枇杷酒的总抗氧化能力都略微下降，但都高于雷司令干白。

### **2.3** 清除羟自由基能力

分别测定降酸处理前后的早钟和解放钟枇杷酒、解百纳干红和雷司令干白的清除羟自由基的能力，结果见图6-4。

2000

1600

ml-1

1200

羟自由基清除能力/U

800

400

0

酒的品种

图 6-4 枇杷酒和干红、干白的清除羟自由基能力比较

Fig. 6-4 Comparison on scavenging capacity of hydroxyl of loquat wine, red wine and white wine

由图6-4可知，可知2种枇杷酒清除羟自由基能力介于解百纳干红和雷司令

干白之间。早钟枇杷酒的清除羟自由基能力高于解放枇杷酒。降酸处理之后，早钟枇杷酒和解放枇杷酒的清除羟自由基能力都略微下降，但都高于解百纳干红。

### **2.4** **DPPH**自由基清除能力

分别测定降酸处理前后的早钟和解放钟枇杷酒、解百纳干红和雷司令干白的清除DPPH自由基的能力，结果见图6-5和图6-6。



100.00%

80.00%

DPPH自由基清除能力/%/

60.00%

40.00%

早钟(Ck)

早钟(De)解百纳雷司令

20.00%

0.00%

5倍10倍20倍50倍100倍稀释倍数

图 6-5 早钟枇杷酒和干红、干白对DPPH自由基的清除能力比较

Fig. 6-5 Comparison on scavenging capacity of DPPH of zaozhong loquat wine, red wine and white wine

由图6-5可知，早钟枇杷酒在降酸处理前后，同一浓度下对DPPH自由基的清除能力介于解百纳干红和雷司令干白，在不同的稀释倍数下表现出不同程度的清除作用。当稀释倍数达到20倍时，DPPH自由基的清除能力达到60%以上，随着稀释倍数的增加清除能力逐步下降，当稀释倍数为50倍时，对DPPH自由基的清除能力低于50%。

100.00%

80.00%

DPPH自由基清除能力/%

60.00%

40.00%

解放钟(Ck)解放钟(de)解百纳

雷司令

20.00%

0.00%

5倍10倍20倍50倍100倍稀释倍数

图 6-6 解放钟枇杷酒和干红、干白对DPPH自由基的清除能力比较

Fig. 6-6 Comparison on scavenging capacity of DPPH of jiefangzhong loquat wine, red wine and white wine

由图6-6可知，解放钟枇杷酒在降酸处理前后，同一浓度下对DPPH自由基

的清除能力介于解百纳干红和雷司令干白，在不同的稀释倍数下表现出不同程度的清除作用。当稀释倍数达到20倍时，DPPH自由基的清除能力达到60%以上，随着稀释倍数的增加清除能力逐步下降；当稀释倍数为50倍时，对DPPH自由基的清除能力低于50%。

## **3** 小结

枇杷酒中含有较丰富的多酚、黄酮、单宁和维生素C等，因此均具有较强的抗氧化活性。研究通过测定早钟和解放钟枇杷酒中的抗氧化活性物质，发现均比对照的解百纳干红低，但高于雷司令干白。2种枇杷酒降酸处理前后，均表现较好的抗氧化活性。

2种枇杷酒均具有抗氧化活性和清除羟自由基能力，早钟和解放钟枇杷酒降酸处理前后，虽其总抗氧化能力和清除羟自由基能力均介于解百纳干红和雷司令

干白之间，但2种枇杷酒的抗氧化能力仍有所差异。

2种枇杷酒对DPPH自由基表现出较好的清除作用，且随着稀释倍数的增加，枇杷酒对DPPH自由基的清除能力逐渐减弱，当将其稀释20倍时，2种枇杷酒对DPPH自由基的清除能力均仍能维持在60%以上。

人体代谢产生的活性氧、活性氮超出自身抗氧化的范围[130]，就易造成伤害。人体组织器官的许多损伤和病变，均与自由基造成的氧化损伤有关[131]。植物中的抗氧化成分包括黄酮类、多酚类、皂苷类和多糖类等[132]，通过清除人体内自由基还原氧化物质保护机体。因此，抗氧化活性物质的研究与开发成为国内研究的热点。

多酚物质具有阻断自由基氧化，螯合金属离子减轻催化，与维生素C等抗氧化剂产生协同效应等，因此具有抗氧化、抗癌、抑菌消炎、抗病毒、提高免疫等[133]多种功能。植物提取物或发酵产物的的抗氧化活性评价，常用DPPH法、羟自由基清除法和清除超氧阴离子自由基法等[134]。研究表明，通过比较降酸前后的枇杷酒、干红和干白的总抗氧化能力、羟自由基清除能力和DPPH自由基清除能力，认为枇杷酒具有较好的体外抗氧化活性，是具有良好保健效果的果酒。

# 第七章 结论与展望

### **1.** 主要结论

本研究通过克隆粟酒裂殖酵母苹果酸通透酶(*mae*1)基因，构建整合型质粒，并成功在产朊假丝酵母中表达。经筛选和响应面法优化发酵工艺，探讨了固定化对降酸的影响并优选了固定化材料，将其运用于枇杷酒的降酸工艺，分析降酸处理前后的主要理化指标、感官指标和香气变化等方面，综合评价枇杷酒的品质改善，同时进行营养分析和体外抗氧化评价，为其功效研究奠定基础。

⑴Trizol法提取粟酒裂殖酵母的总RNA，以报道的粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶（*mae*1）的序列为依据设计引物，分别以基因组和cDNA为模板，克隆得到苹果酸通透酶基因*mae*1。通过双酶切、回收、连接，构建重组表达质粒pSH47-mae1，将pSH47表达质粒上的gal启动子换成PGK1启动子，成功的构建了重组表达质粒pSH47-PG-mae1。将线性化的重组质粒以同源重组的方式整合到产朊假丝酵母的基因组中表达。通过菌液PCR检验和摇瓶筛选，获得重组菌株CU-6。经连续传代实验表明，重组酵母菌株CU-6有良好的传代稳定性。

⑵研究了SO2浓度、糖度、酒精度、接种量、温度5个单因素对重组酵母CU-6降酸的影响，筛选出3个主因素（SO2浓度、糖度、酒精度）。利用中心组合设计试验的原理设计交互试验，采用响应面分析法优化枇杷酒的降酸工艺条件。通过响应面分析法得到枇杷酒降酸优化工艺：初始SO2浓度50mg·L-1，酒精度7.8%，残糖量4.3 g·L-1。在苹果酸浓度4.5 g·L-1，接种量1.5%，发酵温度为24℃的条件下发酵5d，酵母菌株CU-6 的在枇杷酒中的理论降酸量可达到

1.82g·L-1。实验实际值为1.80±0.02 g·L-1，与理论值十分接近。

⑶研究6种固定化材料对重组酵母菌株CU-6在枇杷酒的降酸影响。其中2%海藻酸钠＋1.4%SiO2＋0.6%PVA组合固定化酵母CU-6，降酸效果最好。研究发现固定化后酵母CU-6耐受SO2和酒精度能力适度提高，在SO2浓度80 mg·L-1和酒精度为11%时，降酸量仍可达到1.6 g·L-1。该材料制作的固定化微球连续使用5次以上，酵母的降酸能力仍保持较好。

⑷采用固定化酵母CU-6降酸处理后的枇杷酒，感官品质发生一定的变化。早钟和解放钟为原料酿造的枇杷酒经处理后，双乙酰影响较小，色度的影响较大，分别下降了37%和55%，总酸分别下降1.43 g·L-1和1.35 g·L-1，柔和指数分别提

高1.44和1.37。降酸处理使枇杷酒中的香气成分比例发生了改变，部分醇类物质比例提高，如苯乙醇、柏木醇等，部分酯类物质的比例提高，如丁二酸二乙酯等，部分酮类物质增加较多，如5-羟基-4-辛酮。

⑸固定化重组酵母菌株CU-6降酸处理后的枇杷酒，其营养组成未发生明显变化。降酸前后的矿物质含量保留较好。降酸处理后游离氨基酸有不同程度的增加，其中必需氨基酸苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等明显增加。早钟和解放钟枇杷酒中的抗氧化活性物质含总酚、总黄酮和维生素C。研究发现，两种枇杷酒降酸前后总抗氧化能力均比对照的国产解百纳干红低，但高于国产雷司令干白；羟自由基清除能力均高于国产解百纳干红，但低于国产雷司令干白；对DPPH自由基表现出较好的清除作用，且随着稀释倍数的增加能力逐渐减弱，当将其稀释20倍时DPPH自由基的清除能力均仍能维持在60%以上。

### **2.** 研究创新点

⑴首次克隆粟酒裂殖酵母的苹果酸通透酶（*mae1*），转化到产朊假丝酵母中高效表达，构建降酸酵母菌株。研究证明重组菌株在枇杷酒的降酸发酵中，具有良好的pH耐受性，较好的SO2和酒精耐受性。

⑵首次在枇杷酒发酵后期，接种固定化重组降酸酵母菌株，实现了枇杷酒工业化连续生产，有效进行降酸和增香，该工艺为国内首创。

⑶首次研究了枇杷酒的营养和保健功效，并鉴别了枇杷酒特征性香气成分，为提升枇杷酒产业价值奠定基础。

### **3.** 研究展望

苹果酸含量较高的果酒，如苹果酒、葡萄酒、枇杷酒等，其传统降酸方式多采用乳酸菌的苹果酸-乳酸发酵（MLF）。该工艺虽然可产生一定的乳酸以改善口感，但普遍存在菌种不耐SO2、生产耗时较长、发酵终点不易控制等缺陷。因此，利用酵母尤其是通过基因工程技术构建降酸酵母，实现这类果酒的降酸发酵，成为重要的研究和发展方向之一。然而酵母降酸同样存在一定的技术难题，因此目前在行业内未得到规模化推广。如何实现两个关键酶即苹果酸-乳酸酶基因和苹果酸通透酶基因在酵母菌中的共表达，并提高重组菌株的遗传稳定性，重组菌株的安全性评价等，还有待进一步研究，后续的工业化生产技术也需要深入的开展。

今后的研究工作，除着手筛选耐SO2和耐酒精的能力更高的菌株外，还可通过以下几个方面来解决：⑴研究酵母固定化载体材料和固定化方式，提高降酸酵母的酒精耐受性和SO2耐受性；⑵研究酿酒酵母与具有降酸能力的非酒精酵母的共固定化技术，利用多种酵母在同一系统内协同和促进，形成丰富的营养成分和有益的风味物质，在酒精发酵的同时改善枇杷酒的风味；⑶通过细胞融合等技术手段，筛选即产酒精有能降酸的酵母菌株，实现高酸果酒的一步发酵生产。

枇杷酒中含有很多活性物质，例如有机酸、游离氨基酸、美拉德反应产物等，都对枇杷酒的抗氧化特性产生积极影响。酿造过程中如何保留营养成分，提升功效成分，改善枇杷酒的抗氧化功效，亦有待于今后进一步深入研究。

参考文献

[1]张军，韩英素，高年发，等. HPLC法测定葡萄酒中有机酸的色谱条件研究

[J]. 酿酒科技. 2004, 122(2):91-93.

[2]李华(2007)。葡萄酒工艺学. (北京，科学出版社), pp.

[3]康孟利，凌建刚，林旭东. 果酒降酸方法的应用研究进展[J]. 现代农业科技. 2008，(24)：25-26,30.

[4] Coote N, Kirsop B. The content of some organic acids in beer and other fermented media[J]. Journal of the Institute of Brewing. 1974, 80.

[5] Whiting G. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages-a review[J]. Journal of the Institute of Brewing. 1976, 82(2):84-92.

[6]张学英， 张上隆， 叶正文， 等. 李果实中苹果酸含量与花色素苷合成的关

系初探[J]. 上海农业学报. 2009, 25(003):65-68.

[7]梁国伟， 徐亮， 张宝荣， 等. ft楂酒酿造工艺研究及ft楂酒中有机酸的

HPLC测定[J]. 酿酒科技. 2009, (7):106-108.

[8]罗阳，贺晓光，杨军，等. HPLC 法测定贺兰ft东麓酿酒葡萄中苹果酸含量[J]. 安徽农业科学. 2012, 39(33):20541-20542.

[9]张诗玲，徐瑞敏. 葡萄酒中挥发酸的形成及预防措施[J]. 中外葡萄与葡萄酒. 2007，(005)：56-56.

[10] Volschenk H, Van Vuuren H, Viljoen–Bloom M. Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*[J]. Current genetics. 2003, 43(6):379-391.

[11] Vailiant H, Formisyn P, Gerbaux V. Malolactic fermentation of wine: study of the influence of some physico‐chemical factors by experimental design assays[J]. Journal of Applied Microbiology. 1995, 79(6):640-650.

[12] Redzepovic S, Orlic S, Majdak A, et al. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation[J]. International journal of food microbiology. 2003, 83(1):49-61.

[13]郑文炉（2010）。枇杷文化与产业发展. （福建农林大学）。

[14]翟小芬， 蔡健. 枇杷的营养保健和开发利用[J]. 广州食品工业科技. 2004，

20(3):104-106.

[15]张玉，王建清. 枇杷的营养及功能成分研究进展[J]. 食品科学. 2005, 26(9):602-604.

[16]闫永芳， 孙钧， 孟天真， 等. 枇杷花研究及开发进展[J]. 食品工业科技.

2011, 32(12):544-546,551.

[17]李婷，林文津，徐榕青，等. 枇杷叶的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源. 2010, 29(5)：11-14,20.

[18]林国荣，沈高扬. 枇杷核仁的营养成分分析[J]. 食品科技. 2007, (8):276-277.

[19]章恢志. 枇杷史话[J]. 世界农业. 1987, (6):54-56.

[20]胡又厘，林顺权. 世界枇杷研究与生产[J]. 世界农业. 2002, 273:18-20.

[21]吴锦程. 枇杷的生产与科研[J]. 莆田学院学报. 2004, (3):31-37.

[22]何志刚，李维新，林晓姿，等. 枇杷果蔬什锦罐头的研制[J]. 食品科学. 2007, (8):632-636.

[23]刘洪， 姚茂君， 麻成金. 低糖枇杷果脯的加工[J]. 食品科技. 2004，

(4):38-39.

[24]胡镧铟，马春跃. 天然枇杷汁饮料的开发研制[J]. 食品科学. 1996, (12):48-50.

[25]任香芸， 李维新， 何志刚， 等. 枇杷果醋酿造中优良菌株的筛选[J]. 福建

农业学报. 2008, 23(2):201-204.

[26]苟兴华，夏兵兵，张学锋，等. 枇杷果酒加工工艺的研究进展[J]. 食品研究与开发. 2009，(11)：145-147.

[27]陈继峰, Kremer B. 降酸方法对葡萄酒降酸效果的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒. 2001, (3):17-20.

[28]林巧. 樱桃酒化学降酸效应研究[J]. 中国酿造. 2010, (12).

[29]王春霞，杜连祥，王敏，等. ft楂干酒的降酸研究[J]. 天津科技大学学报. 2004, 19(17-19,24).

[30]徐怀德， 寇莉萍， 姜莉. 树莓干酒澄清和降酸技术研究[J]. 西北林学院学

报. 2004, 19(3):113-115.

[31]诸葛庆，帅桂兰，赵光鳌，等. 猕猴桃酒两种不同降酸方法的研究[J]. 酿酒科技. 2005，(3)：61-64.

[32]严斌，陈晓杰，李伟. 电渗析法在葡萄酒冷稳定处理中的应用研究[J]. 2007, (3):25-27.

[33]张春晖， 夏双梅， 莫海珍. 微生物降酸技术在葡萄酒酿造中的应用[J]. 酿

酒科技. 2000, (2):66-68,70.

[34]李瑞国，韩烨，周志江. 葡萄酒苹果酸乳酸发酵研究进展[J]. 食品研究与开发. 2010, 31(8)：228-233.

[35] Lonvaud-Funel A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine[J]. Antonie Van Leeuwenhoek. 1999, 76(1):317-331.

[36]潘海燕， 徐岩， 赵光鳌， 等. 苹果酒苹果酸乳酸发酵乳酸菌的筛选[J]. 食

品与发酵工业. 2004, 30(10):11-16.

[37]游新勇， 李琼， 王国泽， 等. 木瓜干酒苹果酸乳酸发酵降酸工艺技术研究

[J]. 食品工业科技. 2012, (15):202-205.

[38]邢玮，韩建春. 沙棘果酒苹果酸-乳酸发酵影响因素研究[J]. 2012, 43(2):20-27.

[39]李记明， 司合云， 段辉， 等. 乳酸菌在苹果酒酿造中的应用[J]. 微生物学

通报. 2004, 31(5):81-84.

[40]段雪荣，朱虹. 优质葡萄酒酿造环节之——苹果酸-乳酸发酵[J]. 中外葡萄与葡萄酒. 2009，(9)：46-50.

[41]刘延琳， 李华， 蒋思欣， 等. 苹果酸-乳酸发酵的相关酶和基因的研究进展

[J]. 微生物学通报. 2003, 30(4):103-107.

[42] Taillandier P, Strehaiano P. The role of malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: substrate consumption and cell growth[J]. Applied microbiology and biotechnology. 1991, 35(4):541-543.

[43] Ogbonna JC, Amano Y, Nakamura K, et al. A multistage bioreactor with replaceable bioplates for continuous wine fermentation[J]. American journal of enology and viticulture. 1989, 40(4):292-298.

[44] Snow PG, Gallander JF. Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*[J]. American journal of enology and viticulture. 1979, 30(1):45-48.

[45]高年发， 李小刚， 杨枫. 葡萄及葡萄酒中的有机酸及降酸研究[J]. 中外葡

萄与葡萄酒. 1999, (4):7-11.

[46] Volschenk H, Viljoen‐Bloom M, Subden R, et al. Malo‐ethanolic fermentation in grape must by recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast. 2001, 18(10):963-970.

[47]凌代文， 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 中国轻工业出版社，

1999.

[48] Henick-Kling T, Sandine W, Heatherbell D. Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines[J]. Applied and environmental microbiology. 1989, 55(8):2010-2016.

[49]李翠霞， 李华， 金刚， 等. 新疆葡萄酒产区优良酒类酒球菌的分离， 鉴定

[J]. 食品科学. 2012, 33(01).

[50]何志刚，任香芸，李维新，等. 枇杷酒中苹果酸乳酸发酵优良乳酸菌的分离与鉴定[J][J]. 中国食品学报. 2011, 11(1)：165-171.

[51]文连奎，王立芳，王贵珍. 陆生伊萨酵母降解L-苹果酸和柠檬酸的研究[J].

食品科学. 2011, 32(7):220-223.

[52]高卫卫，杜金华，韩伟，等. 产朊假丝酵母利用有机酸的研究[J]. 食品与发酵工业. 2008，(12)：117-121.

[53] Saayman M, Van Zyl W, Viljoen-Bloom M. Cloning, characterisation, and heterologous expression of the *Candida utilis* malic enzyme gene[J]. Current genetics. 2006, 49(4):248-258.

[54]李华， 何忠宝. 原生质体融合构建葡萄酒降酸酵母的研究[J]. 微生物学杂

志. 2006, (2):5-8.

[55] Churdchai C, Haritchanan S (2000). the Study of protoplast fusion between *Leuconostoc oenos* and *Saccharomyces cerevisiae* for industrial wine production. In Proceedings of 4th International Conference on Food Science and Technology, 121-136.

[56]高玉荣， 李大鹏， 高年发. 利用单灭活原生质体融合技术选育降酸能力强

的葡萄酒酵母[J]. 中国食品学报. 2006, 6(3):106-110.

[57]张占军，王富花. 基因工程技术在食品工业中的研究进展[J]. 生物技术通报. 2011，(02)：75-79.

[58]张春晖，刘树文，夏双梅. 苹果酸降解相关基因在酿酒酵母中的表达[J]. 中国生物工程杂志. 2003，(2)：42-45.

[59] Williams SA, Hodges RA, Strike TL, et al. Cloning the gene for the malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbrueckii* in *Escherichia coli* and yeasts[J]. Applied and environmental microbiology. 1984, 47(2):288-293.

[60] Ansanay V, Dequin S, Camarasa C, et al. Malolactic fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* as compared with engineered *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Yeast. 1998, 12(3):215-225.

[61] Miller BJ, Franz CMAP, Cho GS, et al. Expression of the malolactic enzyme gene (*mle*) from *Lactobacillus plantarum* under winemaking conditions[J]. Current microbiology. 2011, 62(6):1682-1688.

[62]刘延琳， 李华. mleA 基因在酿酒酵母中的整合型表达[J]. 中国农业科学.

2009, 42(4):1372-1377.

[63]李慧荣. 微生物的固定化在食品加工中的应用[J]. 食品研究与开发. 2012, 33(6)：227-229.

[64]郭子杰， 卢冬梅. 固定化技术在医药上的研究应用[J]. 现代食品与药品杂

志. 2007, 17(2):20-23.

[65]贾鹏翔，刘雪莹，刘京龙，等. 固定化酶及其在化工等领域中的应用[J]. 皮革科学与工程. 2004, 14(5)：31-37.

[66]毛书端，张小平，兰永辉，等. 废水营养比对固定化藻菌去除污染物的影响及动力学研究[J]. 环境工程学报. 2012, 6(5)：1525-1530.

[67]侯红萍，王家东. 固定化酵母菌在白酒生产中的应用研究[J]. 中国食品学报. 2005, 5(2)：60-63.

[68] Maicas S, Pardo I, Ferrer S. The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni* [J]. Enzyme and microbial technology. 2001, 28(4):415-419.

[69] Kosseva M, Kennedy J. Encapsulated lactic acid bacteria for control of malolactic fermentation in wine[J]. Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology. 2004, 32(1):55-65.

[70]刘树文，李华. 固定化31DH进行苹果酸一乳酸发酵的研究[J]. 中国农学

通报. 2005, 21(4):86-88.

[71] Ciani M. Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles[J]. Journal of Applied Microbiology. 1995,

79(6):631-634.

[72] Hong S, Lee H, Park H, et al. Degradation of malic acid in wine by immobilized *Issatchenkia orientalis* cells with oriental oak charcoal and alginate[J]. Letters in applied microbiology. 2010, 50(5):522-529.

[73]麻成金， 李加兴， 付伟昌， 等. 枇杷果酒酿造工艺研究[J]. 食品与机械.

2006, (5):54-56,64.

[74]叶顺君，蒲彪. 枇杷果酒酿造工艺研究[J]. 酿酒科技. 2007, (1):76-78.

[75]马波. 枇杷果酒的工艺研究[J]. 北方园艺. 2009, ( 7): 236-238.

[76] Saayman M, Van Vuuren H, Van Zyl W, et al. Differential uptake of fumarate by *Candida utilis* and *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Applied microbiology and biotechnology. 2000, 54(6):792-798.

[77] Cássio F, Leao C. Low-and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*[J]. Applied and environmental microbiology. 1991, 57(12):3623-3628.

[78] Toro M, Vazquez F. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2002, 18(4):351-358.

[79]崔艳，刘金福. 非酿酒酵母在葡萄酒酿造中应用的研究现状[J]. 中国酿造.

2010, (11):13-16.

[80] Kapsopoulou K, Mourtzini A, Anthoulas M, et al. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2007, 23(5):735-739.

[81] Xu Y, Zhao G, Wang L. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2006, 33(3):192-196.

[82]魏彦锋， 蒋锡龙， 孙玉霞， 等. 果酒酵母分离选育的研究进展[J]. 中外葡

萄与葡萄酒. 2008, (6):66-69.

[83]赵颖怡，梁世中. 一种新的食品酵母表达系统：产朊假丝酵母[J]. 生物技术通讯. 2002, 13(006)：457-458.

[84]马磊，李红，杜金华，等. 固定化酵母啤酒连续后发酵工艺[J]. 食品与发酵工业. 2012, 38(004):127-130.

[85]王方，陈维敏，张岱，等. 固相微萃取在发酵酒香气检测上的应用[J]. 中外葡萄与葡萄酒. 2005，(3)：56-59.

[86]司波，陈野. 固相微萃取技术及其在食品分析上的作用[J]. 中国酿造. 2012, 31(011)：4-7.

[87] Shaw P, 林国阳. 枇杷果实的化学成分及加工利用[J]. 福建果树. 1991,

(1):67-69, 22.

[88] Camarasa C, Bidard F, Bony M, et al. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and environmental microbiology. 2001, 67(9):4144-4151.

[89] J.萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 科学出版社, 2008。

[90] Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, et al. Sequence finishing and mapping of Drosophila melanogaster heterochromatin[J]. Science. 2007, 316(5831):1625-1628.

[91] Grobler J, Bauer F, Subden RE, et al. The *mae*1 gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids[J]. Yeast. 2004, 11(15):1485-1491.

[92] Osothsilp C, Subden R. Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Journal of bacteriology. 1986, 168(3):1439-1443.

[93]王艳尊， 雷娟娟， 江贤章， 等. 酿酒酵母*adh*2 和*ald*6 双基因缺失突变

株的构建[J]. 微生物学通报. 2009, 36(2):211-216.

[94]彭炳银，陈晓，沈煜，等. 不同启动子控制下木酮糖激酶的差异表达及其对酿酒酵母木糖代谢的影响[J]. 微生物学报. 2011, 51(7)：914-922.

[95]陈永金， 林晓华， 王艳尊， 等. 酿酒酵母HOR2 基因缺失突变株的构建

[J]. 生物技术. 2010, 20(002):6-8.

[96]宋浩雷，郭晓贤，王艳尊，等. 敲除*sfa*1 基因提高酿酒酵母乙醇合成能力的研究[J]. 微生物学通报. 2007, 34(3)：421-425.

[97]张余洋，欧阳波，叶志彪. 无抗性标记基因转基因植物研究进展[J]. 农业生物技术学报. 2004, 12(5)：589-596.

[98]赵姝娴，林俊芳，王杰，等. 安全选择标记的转基因食用菌研究进展[J]. 食用菌学报. 2007, 14(1)：55-61.

[99]吴竹青，陈景，黄群，等. 响应面法优化雪莲果酒发酵工艺[J]. 食品科学. 2010, 31(23):183-187.

[100]张泽志， 韩春亮， 李成未. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 河南

教育学院学报（自然科学版）. 2011, 20(4):34-37.

[101]袁辉，白云凤. 中心组合和响应面分析优化枇杷果酒发酵工艺[J]. 中国酿造. 2010，(2)：103-106.

[102]王思新，焦中高，孙治军. 固定化细胞技术在果酒生产中的应用[J]. 中国食物与营养. 2003，（1）.

[103]满都日娃，张巧云，孙迪，等. 蓝莓酒酵母固定化载体的研究[J]. 2009, 40(12):90-96.

[104]崔艳， 吕文， 刘金福. 以甘蔗固定化酵母发酵低醇葡萄酒的研究[J]. 中国

酿造. 2012, 31(006):46-49.

[105]薄艳秋，张秀玲. 酵母的固定化及在蓝莓酒发酵中的应用[J]. 食品工业科技. 2012, 33(2)：207-209,231.

[106]陈智理，杨昌鹏，郭静婕. 固定化酵母发酵生产果酒研究进展[J]. 安徽农业科学. 2009, 37(29):14357-14359.

[107]詹耀才，钟细娥，靳桂敏. 岗稔果酒发酵工艺的研究[J]. 现代食品科技. 2008, 24(1)：39-41.

[108] Norton S, D'AMORE T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing[J]. Enzyme and Microbial Technology. 1994, 16(5):365-375.

[109]王杏文， 邱兴天， 季更生， 等. 发酵抑制物和环境因子对游离及固定化酵

母发酵的影响[J][J]. 江西农业大学学报. 2007, 29(5):833-836.

[110]高培培，胡纯铿，洪美，等. 酵母固定化技术在燃料乙醇生产中的应用[J]. 食品与发酵工业. 2010，(003)：125-128.

[111]周天行，林晓珊，董江清. 固定化酵母发酵产酒精载体选择的研究[J]. 食品工业. 2012，(3)：74-76.

[112]王福荣（2012）。酿酒分析与检测. (北京，化学工业出版社), pp.

[113]李华（2006）。葡萄酒品尝学. （北京，科学出版社）。

[114] Ayestarân B, Garrido J, Ancín C. Sedimentation clarification of viura musts utilization of amino acids during fermentation[J]. Food chemistry. 1998, 63(2):191-197.

[115]范志刚， 曾一文， 苏鹏飞. 批把酒发酵过程中的呈香成分变化[J]. 酿酒科

技. 2006, (4):79-80.

[116]蒲彪，张瑶，刘云. 枇杷酒陈酿期间香气成分的变化[J]. 食品科学. 2011, 32(14):293-297.

[117]张丽萍， 黄鹭强， 杨民和. 3 种解放钟干型枇杷酒香气成分分析[J]. 福建

师范大学学报（自然科学版）. 2012, 28(2):120-124.

[118]杨莹，徐艳文，薛军侠，等. 葡萄酒相关酵母的香气形成及香气特征[J]. 微生物学通报. 2007, 34(4)：757-760.

[119] Banno N, Akihisa T, Tokuda H, et al. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2005, 28(10):1995-1999.

[120]李记明， 姜忠军， 段辉， 等. 葡萄酒中主要矿质元素的研究[J]. 中外葡萄

与葡萄酒. 2004, (5):7-10.

[121]孟惠平，于业伟. 微量元素锌铜与血脂代谢关系的研究进展[J]. 微量元素与健康研究. 2012, 29(004)：62-63.

[122]相有章，杨晓霞，边建朝，等. 高锌摄人对机体代谢的影响[J]. 卫生研究. 2004, 33(6):727-731.

[123]祝晨蔯， 赵爱萍. 猕猴桃果实中营养成分的分析（Ⅱ）[J]. 广东药学. 1996，

4:000.

[124]郭金英，宋立霞，刘开永，等. 红葡萄酒， 啤酒和白酒抗氧化作用研究[J]. 酿酒科技. 2009，(009)：41-43.

[125]孙守丽，魏晓东，王冰，等. 抗衰老的生物化学机制研究现状[J]. 中国老年学杂志. 2009, 29(13):1725-1727.

[126] Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants[J]. Journal of natural products. 2000, 63(7):1035-1042.

[127]陈宇， 黄晓丹， 林素英， 等. 枇杷酒中总黄酮的测定[J]. 莆田学院学报.

2010, 17(005):28-31.

[128]王毓宁，李鹏霞，胡花丽，等. Folin-酚法测定水蜜桃果酒中总多酚[J]. 酿酒. 2012, 39(5):60-62.

[129]王琳，张建文，王永泉，等. 保健酒中总黄酮的含量测定[J]. 中国当代医药. 2012, 19(9):54-56.

[130] 赵保路. 自由基生物学与健康[J]. 科学(上海). 2007, 59(5).

[131]刘微微， 任虹， 曹学丽， 等. 天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展

[J]. 食品科学. 2010, 31(17):415-419.

[132]先宏，吴可，孙存普. 中药抗氧化活性的主要成分及其自由基清除作用[J]. 国外医学：中医中药分册. 2003, 25(3)：150-153.

[133]左丽丽，王振宇，樊梓鸾，等. 植物多酚类物质及其功能研究进展[J]. 中国林副特产. 2012，(5)：39-43.

[134]张文博. 植物样品成分的体外抗氧化活性方法研究进展[J]. 广州化工. 2011, 39(24)：14-16.

附**录**

粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）的 mae1-cDNA 序列：

TTAAACGCTTTCTGTTCACTACTAGGAGGATCCGATTCACCACCAGTAGATG TGACATGTGTATCGACTTTTTCCAAAGATGCAGGTGCTTTTTCAGGTGGGA AGGTAGGGTTAAGGACACCTGTATTTGGTTTTGGTGGAGGATGGGCATCTT CGTCTTTGCCAGGATAGCAAAGATCATTGACGAGAAACGCACGGACCATTA AATACATTAGGAGGATCCACTGAATACAAAGAATGACCCCAATGATATGTCC AAACATTTGGAAAGCTTTGGAATCTATCATTTTACCTATCTCAATGGTACAAT TAACAAAACCCACGTTGGGGAAAATGAATGCAAACCATCCACAAGCAAAC TTGAGAGGGGCTCGAGTGAAAAAGCCCGCTAAAAAGCTAACCATGGCGAG ACAGTAACACCAAGCAGCAAGACCCCAAATAAAAATAGCCATAAAGGTAG AAACAAAACCAAGATACTCGGATGAGTTGGCGCCAACAAAAATATAAGGG CGACTGCCCATAGCACCACGCGCAATATTAATTAAGGCCAAACCTGAGAAA GCTGGTGGACCGACAAACATAAACATACCAGGTCGATCTTGGGGTTTTGCC AGGCCTACAGTAAAAAACCGTAAGACACTGACGGCAAACAGTAAAAGATA AACCCAAAAACCAAGTCCTTGAAAGAGGATACCAAAGATAACCATATTTTT TAATTGATGAGCGGGTTGTGTAGAATTGACGGCGCCAGCAATGACACCACA AATCATAGGAGGGAAAATAGGAAGAATCCAAGCAGGAGATGCGGTTTCAA TGGTATATACATGGTTGTTGAAAATTGTAAAAAAAGCCATTACGCAGTATAT AAAGGATACTGCAACGTAAATGTAATAAAGGATTCGAATGACCCACACCAT CCACTCGCCGGTATCAGGATAGGCGTATATGGCAAGCATGTCGATGAACGT GGATATTGAAAGAAGACAAGTAGCAATGAAAAGCTTTTCCAAATGATGGTT CCAGGAATCCTTGATAGTTGAAGGATATTTAATAAAGCGAAAAAGCATGCA TGATCCAAAGAGAGAAAACAAAAAGATTTGAAGAATATAAACAATTTTGCC AATTGTATTAAGACCATAAAATCGAAAGGGGAAAGAACCAATAATCAAACC AACACCACCAGTTGCCATAGTACATGCAAACCAAGACCATGTAAAATGCTT CAGTCGTTGACTGAGAGGGACATGAGGGGCTTTGACATTCCAGTCAAGCA ACTCATGATACCTCTGTTTCAAGATTTCCTTGAGTTCACCCAT

致**谢**

在我论文完成之际，心中激动不已。回想几年的求学之路，我要特别感谢我的导师郑宝东教授，是他为我指明研究的方向，传授科学的真理，同我分享和分担着研究进程的一点一滴。从论文选题、实验研究、数据分析到论文撰写和修定，每一个实验、每一篇文稿，都倾注着郑老师的关怀和专注。宝东教授独到精深的学术见解、精益求精的治学态度、平易朴实的人生理念、乐观向上的拼搏精神，都是我毕生学习的榜样。

我要感谢福建农林大学食品科学学院和福建师范大学生命科学学院，两个单位为我论文工作提供了实验平台和技术支持，使得研究得以顺利开展。感谢两个单位的的老师和同学对我无私的帮助，他们是食品科学学院的张怡副教授、曾绍校副教授、郑亚凤副教授、张龙涛副教授、田玉庭老师、庄玮婧老师、刘文聪高工、郑梅贞老师、郭泽斌博士等，研究生谢婷婷、林志钦、汪颖等，生命科学学院的陈杰博老师；福建师范大学生命科学学院的陈由强教授、杨民和教授、黄建忠教授、陈必链教授、张鼎华教授、谢必峰副教授、林清强副教授、林凤屏老师、黄镇博士等，材料科学学院李小菊博士，研究生张丽萍、张明亮、蔡水淋，本科生严世琼、沈阳坤、王达、宋亦晨、李小妹、雷秀清、周平、黄玛娇、庄萍萍等。

感谢福建省产品质量检验研究院国家加工食品质量监督检验中心孟鹏博士在枇杷及枇杷酒营养成分测定方面的帮助。

同时感谢福建省红太阳精品有限公司国圣酒庄在枇杷酒酿造工作方面给予我的大力支持。

我要感谢家人在求学期间对我的支持和帮助，我的爱人承担了大部分的家务，我的儿子对我的鼓励，这些都是我坚持研究的强大动力。