

摘要

本研究采用仪器分析结合苦味评定及多元统计方法探究黄酒中的苦味影响因素，并通过改造酿酒酵母、优化酿酒原料组成和酿酒工艺等综合措施降低黄酒的苦味，以期提升黄酒品质和促进黄酒产业的发展。

(1) 通过测定了 16 种半干型黄酒中的挥发性成分和氨基酸等主要成分，结合苦味评定，采用 Pearson 相关性分析各成分与苦味值的相关系数。然后建立偏最小二乘回归 (PLSR) 分析模型，验证苦味相关成分和模型预测的准确性。研究表明黄酒中的苦味物质与挥发性成分相关性高，集中在酒精 ($r=0.850$)、异戊醇 ($r=0.808$)、异丁醇 ($r=0.642$)、正丙醇 ($r=0.623$) 和乳酸乙酯 ($r=0.771$)，与氨基酸相关性不高 ($r=-0.536\sim-0.464$)。另外，总酸 ($r=0.641$) 对苦味有促进作用，总糖 ($r=-0.735$) 对苦味有明显抑制作用。PLSR 分析模型能很好的预测黄酒苦味值，预测准确性达到评定值的 89.7%。

(2) 采用 Cre/loxP 同源重组系统构建 *BAT2* 基因缺失和 *THI3/BAT2* 双基因同时缺失双倍体酵母 XF1-B 和 XF1-TB，将 XF1、XF1-B 和 XF1-TB 菌株在相同条件下分别进行黄酒发酵，探究重组菌对黄酒中高级醇和苦味的影响。研究表明重组菌 XF1-B 和 XF1-TB 与原始菌 XF1 的生长性能相似、基本发酵性能与 XF1 无显著差异。与原始菌 XF1 相比，XF1-B 酿造黄酒中高级醇下降了 15.65%，评定苦味值降低了 20%，预测苦味值降低了 13.99%；XF1-TB 酿造黄酒中高级醇下降了 15.28%，评定苦味值降低了 15%，预测苦味值降低了 13.77%。

(3) 采用先糖化后发酵的酿酒工艺进行原料组成和发酵工艺优化，综合分析氨基氮含量、高级醇含量和苦味评定、感官评分，最终确定最佳原料组合糯米粳米（糯米：粳米=4:1）：麦芽花生饼（麦芽：花生饼=2:1）=9:1，最优发酵工艺糖度 22 Brix、酵母接种量 1.2×10^7 CFU/mL、通气时间 60 min，发酵温度 28 °C 和煎酒温度 85 °C。该优化工艺条件下进行 2 L 黄酒扩大发酵实验，重组菌 XF1-TB 发酵黄酒的总糖 28.94 g/L、总酸 4.41 g/L、酒精度 11.62% vol、氨基氮 392.35 mg/L、高级醇 288.23 mg/L、非糖固形物 47.66 g/L、苦味值 14、感官评分 89，酒的苦味减弱，整体口感品质得到提升。

本研究对黄酒成分和黄酒苦味进行分析得到黄酒苦味主要影响因素，成功构建了酿酒酵母工程菌，并优化了原料组成和发酵工艺，确定了降低黄酒苦味的可行技术方法，这为降低酿造黄酒的苦味来提高黄酒品质提供了新的技术思路。

关键词：黄酒；苦味；高级醇；*BAT2*；液态发酵

Abstract

Instrumental analysis combined with bitterness evaluation and multivariate statistical methods were used to explore the influencing factors of bitterness of *Huangjiu* in this study. To reduce the bitterness of *Huangjiu*, measures such as reforming *Saccharomyces cerevisiae*, optimizing raw material composition and brewing process were adopted, which will improve the quality of *Huangjiu* and promote the development of *Huangjiu* industry.

(1) The main components such as volatile components and amino acids in *Huangjiu* of 16 kinds of semi-dry style were determined. Combined with bitterness evaluation, Pearson correlation was used to analyze the correlation coefficient between each component and bitterness value. Then the partial least squares regression (PLSR) analysis model was established to verify the accuracy of bitterness related components and model prediction. The results showed that the bitter substances in *Huangjiu* were highly correlated with volatile components which were alcohol ($r = 0.85$), isoamyl alcohol ($r = 0.808$), isobutanol ($r = 0.642$), n-propanol ($r = 0.623$) and ethyl lactate ($r = 0.771$) and were not highly correlated with amino acids ($r = -0.536 \sim -0.464$). In addition, total acid ($r = 0.641$) promoted bitterness, and total sugar ($r = -0.735$) significantly inhibited bitterness. PLSR model can well predict the bitterness value of rice wine, and the prediction accuracy reached 89.7 % of the evaluation value.

(2) The Cre/loxP homologous recombination system was used to construct BAT2 gene deletion and THI3/BAT2 double gene deletion diploid yeast XF1-B and XF1-TB. The effect of recombinant strains on higher alcohol and bitterness *Huangjiu* were explored compared with XF1 under the same fermentation conditions. The results showed that the growth performance of the recombinant strains XF1-B and XF1-TB was similar to the original strain XF1, and the basic fermentation performance was not significantly different from that of XF1. Compared with the original strain XF1, the higher alcohols, the assessed bitterness and the predicted bitterness in the *Huangjiu* brewed by XF1-B were decreased by 15.65%, 20%, and 13.99% respectively. Identically, the higher alcohols, the assessed bitterness and the predicted bitterness in the *Huangjiu* brewed by XF1-TB were decreased by 15.28%, 15%, and 13.77% respectively.

(3) The raw material composition and fermentation process were optimized by using the brewing process of first saccharification and then fermentation. The amino nitrogen content,

high alcohol content, bitterness evaluation and sensory score were comprehensively analyzed. Finally, the optimal raw material combination of glutinous rice and japonica rice (glutinous rice: japonica rice = 4:1): Malt and peanut cake (malt: peanut cake = 2:1) = 9:1, the optimal fermentation process was that the sugar was 22 Brix, the yeast inoculation was 1.2×10^7 CFU/mL, the ventilation time was 60 min, the fermentation temperature was 28 °C and the decocting temperature was 85 °C. Under the optimized conditions, the extended fermentation experiment of 2 L *Huangjiu* was carried out. The resulted showed that the total sugar of the recombinant strain XF1-TB fermented *Huangjiu* was 28.94 g/L, the total acid was 4.41 g/L, the alcohol content was 11.62% vol, the amino nitrogen was 392.35 mg/L, and the higher alcohol was 288.23 mg/L, non-sugar solids 47.66 g/L, bitterness and sensory score were 14 and 89 respectively. The bitterness of the *Huangjiu* had been weakened, and the overall taste quality was improved .

In this study. The composition and bitterness of *Huangjiu* were analyzed to obtain the main influencing factors of the bitterness in *Huangjiu*. Then, The *Saccharomyces cerevisiae* engineering strain was successfully constructed, and the raw material composition and fermentation process were optimized, which determined the feasible technical methods for reducing the bitterness of *Huangjiu*. These provided a new technical idea for reducing the bitterness and improving the quality of *Huangjiu*.

Key words: *Huangjiu*; bitterness; higher alcohols; *BAT2*; liquid fermentation

目 录

摘 要.....	I
Abstract	II
目 录.....	IV
第一章 绪 论.....	1
1.1 引言	1
1.2 黄酒	1
1.3 黄酒苦味物质	2
1.3.1 醇类物质.....	2
1.3.2 氨基酸.....	3
1.3.3 苦味肽.....	3
1.3.4 醛类.....	4
1.3.5 酯类.....	4
1.4 多元统计分析方法在酒中的应用	4
1.5 酿酒酵母在酿酒工业中的应用	5
1.5.1 酿酒酵母育种技术.....	5
1.5.2 酿酒酵母中高级醇代谢相关基因.....	6
1.6 黄酒苦味影响因素	6
1.6.1 酿造原料.....	6
1.6.2 酒曲或酶制剂.....	7
1.6.3 发酵温度.....	7
1.6.4 酿造工艺.....	8
1.7 本课题研究的意义与主要内容	8
1.7.1 本课题研究的意义.....	8
1.7.2 本课题研究的内容.....	9
第二章 基于 GC/HPLC 检测和苦味评定解析黄酒苦味.....	10
2.1 引言	10
2.2 实验材料和仪器设备	10

2.2.1 实验材料.....	10
2.3 试验方法	12
2.3.1 挥发性成分的测定.....	12
2.3.2 氨基酸测定.....	12
2.3.3 黄酒理化指标的测定.....	13
2.3.4 苦味值的评定.....	13
2.3.5 相关性分析.....	14
2.3.6 PLSR 苦味分析.....	14
2.3.7 统计分析.....	14
2.4 结果与讨论	14
2.4.1 黄酒中挥发性成分测定结果.....	14
2.4.2 黄酒中氨基酸的测定结果.....	15
2.4.3 黄酒理化指标测定结果.....	18
2.4.5 黄酒中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值相关性结果分析.....	20
2.4.6 偏最小二乘法回归分析模型建立.....	21
2.4.7 黄酒苦味值偏最小二乘法回归预测模型的验证.....	23
2.5 本章小结	25
第三章 酿酒酵母中 <i>BAT2</i> 和 <i>THI3/BAT2</i> 基因缺失对黄酒苦味的影响	26
3.1 引言	26
3.2 实验材料和仪器设备	26
3.2.1 实验材料.....	26
3.2.2 仪器设备.....	30
3.2.3 主要培养基.....	30
3.3 实验方法	31
3.3.1 敲除组件构建.....	31
3.3.2 酿酒酵母电转化.....	31
3.3.3 阳性转化子筛选.....	32
3.3.4 筛选标记去除.....	32

3.3.5 pSH65 质粒丢失	32
3.3.6 双倍体融合	32
3.3.7 黄酒发酵	33
3.3.8 生长曲线	33
3.3.9 理化性质测定	33
3.3.10 高级醇的测定	33
3.3.11 氨基酸的测定	33
3.3.12 苦味值评定	33
3.3.13 统计数据分折	33
3.4 结果与讨论	34
3.4.1 敲除组件的构建与验证	34
3.4.2 重组酵母菌的构建与验证	34
3.4.3 KanMX 抗性筛选标记	35
3.4.4 pSH65 质粒丢失验证	36
3.4.5 基因缺失双倍体融合的重组酵母菌	36
3.4.6 基因敲除对重组菌生长性能的影响	37
3.4.7 基因敲除对重组菌发酵性能的影响	38
3.4.8 基因敲除对重组菌生成高级醇的影响	38
3.4.9 基因敲除对黄酒苦味的影响	40
3.5 本章小结	42
第四章 酿酒原料及工艺优化对黄酒苦味的影响	43
4.1 引言	43
4.2 实验材料	43
4.2.1 实验菌种	43
4.2.2 主要试剂	43
4.2.3 主要仪器设备	44
4.3 实验方法	45
4.3.1 原料组合对黄酒苦味及品质的影响	45

4.3.2 糖化条件优化.....	46
4.3.3 蛋白酶酶解条件对黄酒苦味及品质的影响.....	46
4.3.4 发酵工艺对黄酒苦味及品质的影响.....	47
4.3.5 煎酒条件对黄酒苦味及品质的影响.....	48
4.3.6 发酵分析方法.....	48
4.4 结果与分析	50
4.4.1 原料配比组合对黄酒苦味及品质的影响结果.....	50
4.4.2 糖化条件优化结果.....	53
4.4.3 蛋白酶酶解条件对黄酒苦味及品质的影响结果.....	54
4.4.4 发酵条件对黄酒苦味及品质的影响结果.....	58
4.4.5 煎酒条件对黄酒苦味及品质的影响结果.....	65
4.4.6 扩大酿酒实验结果.....	66
4.5 本章小结	67
结论与展望.....	68
一、结论	68
二、创新点	69
三、展望	69
参考文献.....	70
攻读硕士学位期间取得的研究成果.....	79
致 谢.....	80

第一章 绪论

1.1 引言

黄酒是世界三大古酒之一，是中华民族“瑰宝”，其酒性柔顺，酒味醇厚，富含蛋白质、氨基酸和多糖等营养物质，同时含有活性多肽、多酚、功能多糖、维生素、 γ -氨基丁酸、类黑精和矿物质等生理活性物质^[1]，因此，黄酒相比于白酒，其更健康、酒精度更低，具有保健作用，竞争优势也应该更强。但残酷的市场现实并非如此，其一是因为营销策略不突出，品牌影响力弱^[2]；其二就是黄酒口味参差不齐，风味作为黄酒的重要组成部分，风味在很大程度上影响着消费者的消费选择。黄酒中的苦味与啤酒、咖啡一样是其特征风味，但其持续性后苦消失的慢且余味较长的缺陷使黄酒口感粗糙^[3]，基于此，利用现有技术对黄酒苦味物质进行分析与探究，研究降低黄酒苦味的新工艺和技术，有利于黄酒行业更好地发展。

1.2 黄酒

黄酒是中国最早的酿酒品种，是以稻米或者非稻米粮食为原料，通过添加酒曲或者酶制剂，经过糖化和发酵后形成的一种天然低酒精度饮品，因其酒液色泽橙黄透亮而得名黄酒^[4]。黄酒营养丰富，不仅含有 18 种游离氨基酸和 8 种人体必需氨基酸，蛋白质含量也为酒中之最。除此之外，黄酒中还含有丰富的功能性低聚糖、多酚、类黑精和谷胱甘肽等生理活性成分，具有清除自由基，预防心脑血管、提高免疫功能、抗癌、抗衰老等生理功能^[1]。随着人们健康意识增强，黄酒越来越受到消费者喜爱。

黄酒的分类标准较多。而分类标准使用较多的还是依据黄酒中含糖量的高低来区分，黄酒国标 GB/T 13662-2018 按黄酒含糖量的高低可将黄酒分为四类：干黄酒、半干黄酒、半甜黄酒和甜黄酒。干黄酒又叫元红酒，总糖含量低于或等于 0~15.0 g/L；半干黄酒又叫加饭酒，由于在生产上，半干黄酒的加水量较低，因此还保留了一部分糖分，总糖含量在 15.1~40.0 g/L，我国大多数高档黄酒均属此种类型。半甜黄酒又叫善酿酒，这种酒采用的工艺独特，是用成品黄酒代水，加入到发酵醪中，抑制了酵母菌的生长速度，较多的糖不能转化成酒精，故酒中的糖分较高，总糖含量在 40.1~100 g/L；甜黄酒又叫香雪酒，这种酒糖化至一定程度时，加入 40%~50%浓度的米白酒或糟烧酒，以抑制微生物

物的糖化发酵作用，总糖含量大于 100 g/L^[5]。

传统黄酒的酿造原料一般选用稻米，经过浸泡、蒸煮、摊凉、拌曲、发酵、陈酿、调色、煎酒等工艺制成。黄酒酿造原料对酿造黄酒特点和风味有很大差异。俗话说：“粮为酒之肉”，黄酒酿造原料在北方一般以“粟”为主^[6]，而在南方，黄酒酿造则普遍用“稻米”，尤其是糯米居多，糯米因其含有较多的支链淀粉，因而在糖化过程中能够更容易将大分子糖转化为小分子糖^[7]。随着现代食品技术的发展，在原料加工处理方面，人们改变传统的蒸煮工艺，采用较方便经济的原料前处理方式，如生料法、液化法、膨化法、过热蒸汽焙炒法。

在黄酒酿造过程中，发酵这一过程至关重要，用酒曲酿酒、双边发酵是传统中国黄酒酿造的特色。发酵的最终目的都是将原料中的大分子糖在霉菌或者酶制剂的作用下转化为小分子可发酵性糖，最后在酵母菌的作用下将可发酵性糖转化为酒精。发酵工艺随着科学技术发展也呈现多样化发展趋势，如与传统发酵工艺相比，采用多种酶取代部分或者全部酒曲进行纯种液态黄酒发酵。现代黄酒的酿造过程同样也会有多种糖化发酵状态如固体发酵、固液结合发酵、半固体发酵、液体发酵^[8]。

黄酒与其它酒类相比，还有一道特别的工序，即煎酒。煎酒目的就是杀死酒中微生物，以保持生物稳定性。此外，通过煎酒加热可以促使黄酒中的蛋白质与其他胶体等的热凝固，提高非生物稳定性；同时煎酒能够使酒中氨基酸和糖在高温情况下发生美拉德反应，即丰富黄酒的焦香味，又能使黄酒进一步上色。煎酒高温能除去醛类等如乙醛的不良的挥发性成分，去除杂味，改善黄酒的风味和品质等。

1.3 黄酒苦味物质

1.3.1 醇类物质

黄酒中的醇类既是呈香物质，也是呈味物质，同时醇是生成酯的必不可少的物质，在陈酿过程中，醇能与酸酯化形成酯类物质而使黄酒更具风味。黄酒中的高级醇是指三个碳以上的醇类总称，其来源途径有两种，既一是通过氨基酸的异化作用，即氨基酸通过支链氨基酸转移酶脱氨形成酮酸，酮酸脱羧形成高级醇，也可以通过糖酵解，形成 α -酮酸后再脱羧生成^[9]。有研究表明酒中主要高级醇主要由正丙醇、异丁醇、异戊醇组成，且三者含量的基本比例为 1:2:3^[10]，适量高级醇能赋予黄酒香味并提高黄酒品质，但过

量的高级醇则会使酒产生刺激性气味并产生喝酒上头的症状，这 3 种成分对酒香酒味均有贡献，正丙醇有刺激性青草香和辣味，异丁醇有刺激香并呈味苦，异戊醇有药香并带苦味。在酒精发酵过程中酵母的代谢产物，如酪氨酸产生的酪醇、色氨酸生产的色醇，尤其是酪醇^[11]，虽然在低含量时会给黄酒带来柔和的香气，但含量升高时在呈味方面产生重而长的苦味^[12]。黄酒作为一种酒精饮品，乙醇是酒中含量最高的醇类物质，其含量仅次于水。A. C. NOBLE^[13]等在研究酒中苦味物质时发现乙醇增强了苦味的强度和持续时间。Cretin 等^[14]同样也发现，酒的苦味与乙醇含量成正比，并推测酒精会增强酒的苦味是由于乙醇与酒中其他成分产生叠加交互作用而引起的，而不是乙醇能够直接产生苦味。这种推测一定程度上也证明了基质效应对酒饮料的风味影响，酒饮料自身或多或少都会带有苦味，若为打造高度酒盲目提高酒精度，很可能会破坏酒体原本的风味平衡。

1.3.2 氨基酸

黄酒原料多为稻米，且未蒸馏，因此其保留了最原始的风味以及更多的营养物质，因此黄酒是各类酒中氨基酸含量最丰富的酒种。日本宝酒造株式会社对黄酒中氨基酸进行测定，发现其氨基酸总量可高达 6.6 g/L^[1]。氨基酸是黄酒中重要的营养和风味前体物质，为发酵过程中微生物的生长提供氮源，同时也有助于黄酒的品质，并且氨基酸被微生物分解代谢成高级醇，有助于米酒的醇厚口感。适当的氨基酸含量可以增强黄酒的品质。相比之下，如果某些氨基酸的比例特别高，黄酒的味道就会变得不协调^[15]。各种氨基酸都有自己的味道，并给黄酒带来了独特的风味，有研究表明苦味氨基酸占黄酒中全部氨基酸种类的 44%，故认为黄酒中的苦味有很大一部分来自于氨基酸类物质^[16]。

1.3.3 苦味肽

酿造黄酒用的大米和小麦中均含有 7%~15%的蛋白质，这些蛋白质经曲麦中各种微生物产生的酸性蛋白酶、羧肽酶作用后分解成为小分子的肽、二肽、多肽，因此黄酒中各中肽类物质含量也很丰富，这些肽中也有部分是具有苦味的^[17]。研究表明，肽的苦味来源于肽中的疏水性氨基酸，如精氨酸、亮氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸，其疏水残基是苦味受体的结合位点^[18]，而化合物的苦味与苦味受体。日本清酒中也含有部分肽类物质，Katsumi^[19]等对清酒中大米蛋白进行了研究，发现清酒发酵过程中会产生苦

味，而这种苦味与苦味多肽有关。

1.3.4 醛类

黄酒中醛类物质是黄酒的微量成分组成部分，也属于呈香呈味物质，醛类物质的感官阈值较低，适量的醛对酒的香味和品质有增益作用，酒中辛辣味主要来源于醛类，适当辛辣是白酒和黄酒等酒的独特口感^[20]。酒中主要的醛类是乙醛和乙缩醛，还有少量的甲醛、戊醛、糠醛、丙烯醛等。研究表明，糠醛有焦苦味，在水溶液中呈现苦味和收敛的涩味；丙烯醛苦味极重^[21]；乙醛浓度低时能带来香味，但浓度过高便会产生刺激味道，是否在黄酒中贡献苦味还未知^[22,23]。同时，丙烯醛并非黄酒中常见物质，只有在黄酒发酵不顺畅时或者不正常时，酵母菌和乳酸菌才会产生丙烯醛^[24]。

1.3.5 酯类

黄酒中的酯类是黄酒的香气和品质评判的关键成分，作为酒中最主要的香味成分，赋予黄酒果香味和愉悦感^[25]。不同种类的酒以及不同香型的酒所含有的酯类不同，米酒中最为丰富的酯是乙酸乙酯和乳酸乙酯。且有研究者采用气象色谱-嗅觉法和气味活性值发现乳酸乙酯、乙酸乙酯、己酸乙酯和苯乙酸乙酯为黄酒的主要风味贡献物质^[26, 27]。这些酯类挥发性物质，在低浓度时同样是具有宜人的香气，且将酒陈酿越久，酯类物质生成越多，香气越浓厚。但是因为很多酒中酯类含量较高，而有些酯感官阈值对于其含量而言较低，因此浓度过高时又产生苦味。

1.4 多元统计分析方法在酒中的应用

多元统计分析是数理统计学的一种对大量数据进行综合统计分析的方法^[28]。它用于分析数据量较大的多个自变量和一个因变量之间的关系，在定量的描述并解释自变量和因变量相互关系，通过大量自变量与因变量数据建立预测因变量的值这些方面起重要作用。偏最小二乘回归（Partial least squares regression, PLSR）分析属于多元统计分析方法的一种，与主成分分析较相似，都是通过将数据降维提取主要信息。但 PLSR 不是寻找响应变量和自变量之间最大方差的超平面，而是通过投影将预测变量和观测变量投影到一个新空间，来寻找一个线性回归模型，因此具有预测功能。它集主成分分析、典型

相关分析和多元线性回归分析 3 种分析方法的优点于一身。随着数据量的增大以及数据属性的增多,像过去那样仅凭借着经验和直觉已经不太现实,对隐藏初始数据进行判断很有必要,因此多元统计分析方法应用的重要性就显得尤为突出。多元统计分析方法目前在工业、农业、环境、经济和生物医学等领域都有广泛的应用。酒中物质成分繁多复杂,随着酒组学的出现,普通分析方法已无法将多个变量之间存在的关系进行全面客观的解释,因此,就需要多元统计方法来进行分析,这样能顾全各变量的相关性,能更加客观全面的反映实际情况,越来越多多元分析方法也开始应用于酒类分析。

1.5 酿酒酵母在酿酒工业中的应用

酵母是一类能将发酵性糖转化为酒精的真核微生物,通常呈球形或者卵形,可以以单倍体和二倍体两种生活形态存在,广泛应用于食品、医疗和化工能源等领域。作为一种单细胞真核微生物,酵母是世界上第一个被测出基因组 DNA 全序列的真核生物,既具备一切真核细胞的活动特征,又有背景清楚、生长周期短、容易大规模培养和操作方便等优点^[29]。酿酒酵母在酿酒方面具有举足轻重的地位,可以说没有酿酒酵母的存在就不会有酒精饮料的出现。

1.5.1 酿酒酵母育种技术

酿酒酵母育种技术主要有常规育种技术^[30]、原生质体融合技术^[31,32]、基因工程育种技术三大类。基因工程育种技术是指在分子水平对决定生物性状的基因进行编辑和改造的技术,基因工程技术在酿酒酵母中的应用已经相当成熟,主要技术可以分为三类:导入外源基因构建基因工程菌株、敲除技术在酿酒酵母育种中的应用和反义 RNA 介导的酿酒酵母育种工作^[33]。导入外源基因构建基因工程菌株和反义 RNA 技术在酵母菌育种的应用中都非常有效。同源重组技术作为传统方法,由于其操作简单,设备要求低,成本也较低,效率足够高,因此在酵母菌中的应用依然普遍。利用同源重组技术对基因进行敲除主要是通过 *loxP-kanMX-loxP* 序列组件^[34]和 Cre/*loxP* 切除系统达到敲除的目的^[35]。对于酿酒酵母而言,其同源重组效率较高^[36],同时研究结果表明,标记基因两端只要有 30 bp 同源序列,就有充分条件实现同源重组^[37]。

1.5.2 酿酒酵母中高级醇代谢相关基因

高级醇是生长繁殖产生的初级代谢物，主要在酿酒主发酵期产生，对酵母进行改良控制高级醇的产生是可行的。目前酿酒酵母中高级醇代谢主要有 Ehrlich 分解途径和 Harris 合成代谢两个途径。Ehrlich 途径主要涉及转氨、脱羧和脱氢三个步骤。其中，氨基酸转氨主要由的线粒体中支链氨基酸转氨酶和细胞质中支链转氨酶催化，而线粒体中支链氨基酸转氨酶主要由 *BAT1* 基因编码和细胞质中支链转氨酶编码主要由 *BAT2* 基因编码^[38]。酮酸脱羧主要由 *PDC1*、*PDC5*、*PDC6* 基因编码的丙酮酸脱羧酶、*THI3* 基因编码的类酮酸脱羧酶和 *ARO10* 基因编码的苯丙酮酸脱羧酶催化。研究表明丙酮酸脱羧酶是异丁醇合成的主要脱羧酶，类酮酸脱羧酶是异戊醇合成中的主要脱羧酶，苯丙酮酸脱羧酶是 β -苯乙醇合成的主要脱羧酶^[39]。而脱氢步骤则主要由 *ADHs* 等基因编码的乙醇脱氢酶系、*SFA1* 基因编码的甲醛脱氢酶和 *AADs* 等基因编码醛脱氢酶^[40]。Harris 合成途径则主要由 *ILVs* 基因和 *LEUs* 基因控制 α -酮酸的合成与分解^[41]。*ILV1* 基因编码的苏氨酸脱氨酶催化苏氨酸和 α -酮丁酸之间的氨基转移，*ILV2* 基因编码的乙酰乳酸合酶、*ILV5* 基因编码的乙酰羟酸还原酶和 *ILV3* 基因编码脱水酶催化 α -酮丁酸合成 α -酮异戊酸和 α -酮-3-甲基戊酸进而合成异丁醇和活性戊醇前体^[42]，而 *LEU1* 基因编码的异丙基苹果酸合成酶和 *LEU2* 基因编码的 β -丙基苹果酸脱氢酶催化 α -酮异戊酸合成 α -酮异己酸进而合成异戊醇^[43]。

1.6 黄酒苦味影响因素

酯香浓郁的香气和苦中带甜的口感是黄酒与其他酒类风味的区别^[44]。黄酒因其含有大量醇、醛、酚、酸、酯等呈香呈味物质而赋有风味，呈香呈味物质的产生取决于黄酒酿造过程中的酿造原料、微生物、发酵条件和酿造工艺^[45]，在酿造过程中任意一个细微步骤的改变，都会使呈香呈味物质产生变化^[46]。

1.6.1 酿造原料

黄酒酿造原料多以稻米为主要原料，各种稻米中淀粉含量、淀粉种类、蛋白质以及氨基酸等物质会有较大差异。原料中的糖类会经过分解被酵母代谢生成醇类物质产生苦味，蛋白质能够通过层层分解转化为肽、氨基酸和醇类物质产生苦味，氨基酸中的苦味

氨基酸以及某些氨基酸会生成呈苦味的醇类产生苦味。同时，由蛋白质分解产生的氨基酸和由淀粉分解产生的糖类会产生反应，在黄酒发酵会形成许多风味物质^[47]，因此由不同原料酿制成的黄酒，其苦味也会有所差异。研究表明，采用精度更高的米酿造黄酒能够有效降低苦味。蒋世云^[48]等研究不同淀粉质原料对米酒品质影响发现原料中淀粉支链淀粉与直链淀粉比值越高，米酒感官品质越好，且在原料中淀粉支链淀粉与直链淀粉比值低于 6.57 时，酿制的米酒开始具有苦涩味。

1.6.2 酒曲或酶制剂

随着工业发展，人们也会用酶制剂代替酒曲，因此在现代酿造过程中，酒酿造所用的糖化发酵剂主要分为酒曲或者酶制剂^[49]。黄酒糖化和发酵所用的酒曲中含有多种微生物，主要包括酵母、真菌和细菌。这些微生物在酿造初期代谢产生糖化酶、蛋白酶分解糖类、蛋白质后经酵母代谢生成各类物质^[50, 51]，不同糖化酶和蛋白酶对淀粉和蛋白分子的水解位置不一致，分解的产物会有很大的不同，因此使用不同酒曲或者酶制剂酿造黄酒风格和口味会有很大的不同，对苦味的呈现也会有所差异。此外，酒曲或者酶制剂的用量会影响黄酒的呈味^[52]。当酒曲或者酶制剂的添加量过小时，由于缺乏各种分解酶，使得氨基酸和小分子糖较少，影响出酒率，同时氨基酸不足会导致酵母生长受限制，需要糖转化为氨基酸供酵母生长，因而酒体发酵不顺畅，会产生更多的高级醇使得酒味杂而苦；当酒曲或者酶制剂的添加量较大时，蛋白酶会在糖化或者主发酵时产生更多的氨基酸，氨基酸在满足酵母生长条件后，多余的氨基酸会通过支链氨基酸转移酶转氨后脱羧形成高级醇，导致酒体中高级醇过多，较多的氨基酸和高级醇会更突出黄酒苦味^[53, 54]。并且使用酒曲会使得各种霉菌孢子后期大量自溶进入酒内，导致黄酒产生较重的苦味^[51]。因此，目前有很多研究者使用酶制剂代替酒曲采用液化法酿造新型清爽型黄酒降低黄酒中的苦涩味^[53, 55, 56]。同时若酵母生长过多^[57]，则在后期较多酵母自溶会产生较多氨基酸、蛋白质以及异杂味。

1.6.3 发酵温度

温度是在酿造过程中控制中国黄酒质量的重要参数。温度影响发酵早期的主要微生物生长，不同温度下菌种活性和细胞结构会发生变化，进而影响糯米淀粉的水解、葡萄

糖转化为酒精的酵母的发酵速率，因此，底物的利用率、乙醇产率以及风味物质的含量也会产生变化^[58]。当主发酵温度较高时，酵母的繁殖倍数会增加，且酶活力也会有所提高，从而能够将更多的糖和氨基酸转换成呈苦的高级醇^[59,60]，影响黄酒风味和口感。

1.6.4 酿造工艺

传统黄酒都是双边发酵，也就是边糖化边发酵，先半固态培菌糖化，后液态糖化发酵，这种高浓度配料，伴随蛋白、糖分解糖化与发酵会影响整个酿造过程中的微生物菌群结构，导致其代谢产物发生变化，使得黄酒呈香呈味物质会有不同^[61]，而如今，先糖化后发酵也成为清爽型黄酒酿造工艺的选择，该酿造工艺下，酒口味清爽，苦味较小。除此之外，不同酿造工艺和酒龄的黄酒展现出的苦味也有所差异。相对而言，干型黄酒发酵完全，酒液中的苦味物质含量更高，且含糖量少，对苦味掩盖作用小；半干型常以加饭酿制而成，导致后苦味冗长；甜型黄酒发酵不彻底，含糖量多，对苦味掩盖作用较强。黄酒酿制完成后会进行一定年份的陈酿，陈酿时间久的酒体更稳定、香气更协调，这一过程能够去除黄酒的辛辣味及其他的新的酒味。陈酿阶段酒液中的蛋白质、氨基酸、糖等物质间仍然会进行缓慢的反应，黄酒中的醇、酸会在酯化形成酯使得高级醇下降^[62]，因此陈酿一段时间后黄酒中的苦味会降低^[63]。

1.7 本课题研究的意义与主要内容

1.7.1 本课题研究的意义

黄酒因其独一无二的特色，使得黄酒产业发展具有得天独厚的优势。但传统黄酒自身特色的苦味易转化为欠佳的“后苦味”，这会影响黄酒的多元化消费。黄酒苦味主要源自于黄酒原料中各成分以及黄酒发酵过程中产生的呈味物质，对黄酒苦味物质及其影响因素进行探究并实现黄酒苦味的可控对黄酒产业的发展至关重要。酵母是对黄酒呈味物质的产生影响较大的一类微生物，其可以通过发酵代谢产生多种风味物质从而对酒的品质和口感进行调控，同时，传统黄酒的酿制依赖于不稳定的自然环境，因此容易出现不同批次产品风味品质不稳定的问题，在此基础上，从改善发酵原料和工艺条件的角度对黄酒的品质进行改善是值得研究的问题。

本研究通过仪器分析的方法探讨了黄酒中各成分与苦味值之间的关系，研究不同重

组菌对黄酒的影响，同时，对降低黄酒苦味的工艺进行了优化，这为黄酒品质的提高及选育优良工程菌应用于黄酒领域提供了技术支持，对黄酒产业的深度发展具有一定的参考价值。

1.7.2 本课题研究的内容

(1) 采用仪器分析如气相色谱 (GC)、高效液相色谱仪 (HPLC) 等技术手段测定了 16 种半干型黄酒中的挥发性成分和氨基酸含量等黄酒的主要成分且进行苦味评定，采用 Pearson 相关性分析计算各成分与苦味值的相关系数，并建立偏最小二乘回归 (PLSR) 分析模型，验证苦味相关成分和模型预测的准确性。

(2) 利用融合 PCR 方法构建 *BAT2* 基因敲除组件 *BU-loxP-kanMX-loxP-BD*，用电转化法将其转化到酵母中，将原始菌和构建的重组菌在相同条件下分别进行黄酒发酵，探究酿酒酵母支链氨基酸转氨酶 *BAT2* 基因缺失和类酮酸脱羧酶 *THI3* 基因缺失对黄酒中高级醇和苦味的影响。

(3) 利用分步液态黄酒酿造方法，通过原料和工艺优化，综合分析基本理化性质、氨基氮含量、高级醇含量并进行苦味评定和感官评分，探究酿造原料和不同工艺条件对黄酒苦味的影响，并根据酿造黄酒苦味值和感官评分确定最佳原料配比和发酵工艺条件。

第二章 基于 GC/HPLC 检测和苦味评定解析黄酒苦味

2.1 引言

目前葡萄酒^[64-66]和啤酒^[67,68]中的苦味物质在国内外都有比较系统和全面的研究,而对于黄酒的研究多集中在国内且更多的是对黄酒中香气成分的研究^[69],对于黄酒中苦味物质研究相对较少。黄酒中苦味物质的探究常采用分离纯化黄酒中的物质逐一进行感官评定,这种方法前处理样品方式复杂,且忽略了黄酒中各物质相互作用的影响^[70]。随着酒代谢组学的发展,学者们利用酒代谢组学结合数据统计分析方法探究酒的风味^[71]、品质评价模型^[72]以及酒龄^[73]等特征,使得酒中越来越多的奥秘被揭开,这些方法为分析黄酒苦味的影响因素提供了思路。

本章主要通过使用气相色谱(GC)组分、高效液相色谱仪(HPLC)测定黄酒中挥发性成分、非挥发性氨基酸和黄酒中的理化指标,并结合感官评定及相关性分析和偏最小二乘回归(PLSR)分析探讨和研究黄酒中的各组分与黄酒苦味的关系,以期为后续降低黄酒苦味的酿造技术、开发优良口味黄酒提供科学依据。

2.2 实验材料和仪器设备

2.2.1 实验材料

为降低较大差异的糖度对苦味评定产生影响,选取 20 种半干型黄酒(糖度 15.1~40.0 g/L、酒精度 12% vol~20% vol、编号 HJ1~HJ20):浙江绍兴、宁波等 7 家酒厂市售产品;其它所采用的实验材料列于表 2-1 中。

表 2-1 主要化学材料与试剂

Table 2-1 Main chemical reagents and materials

试剂名称	规格	生产厂家
葡萄糖	分析纯	天津市大茂化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
酒石酸钾钠	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
硫酸铜	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司

表 2-1 主要化学材料与试剂 (续)

Table 2-1 Main chemical reagents and materials (Cont)

盐酸奎宁	分析纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
甲醇	色谱纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
乙醛	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
异戊醇	色谱纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
异丁醇	色谱纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
正丙醇	色谱纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
乙酸丁酯	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
乙酸乙酯	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
乳酸乙酯	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
苯乙醇	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
丁酸	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
丙酮	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
乙醇	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
乙腈	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
正己烷	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
氨基酸标准品	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
异硫氰酸苯酯	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司

本章采用的仪器设备列于表 2-2 中

表 2-2 主要仪器设备

Table 2-2 Main experiment instruments

名称	规格/型号	产地
超声清洗机	AS20500A	天津奥特赛恩斯仪器有限公司
气相色谱仪	GC8100	滕州中科普仪器有限公司
高速台式离心机	TGL-18C	上海安亭科学仪器厂
气相色谱柱(30 m×0.32 mm×1 μm)	LZP-930	滕州中科普仪器有限公司

表 2-2 主要仪器设备（续）

Table 2-2 Main experiment instruments (Cont)

名称	规格/型号	产地
高效液相色谱仪	LC-10A	日本岛津公司
液相色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)	TC-C18	安捷伦科技(中国)有限公司
pH 酸度计	FE28	梅特勒-托利多国际贸易有限公司

2.3 试验方法

2.3.1 挥发性成分的测定

黄酒中挥发性成分采用 GC 法测定^[74]。测定挥发性成份的内标为 17.6 mg/mL 乙酸丁酯。样品过 0.22 μm 孔径滤膜，将 980 μL 样品和 20 μL 内标丙酮置于气相色谱样品瓶中。柱箱的升温程序：先以 50 °C 保持 5 min，再以 10 °C/min 的速度升温至 200 °C 并保持 5 min。选用 LZP-930 白酒分析柱为色谱柱、内标法测定黄酒中挥发性成分和酒精度，高纯氮气为载气，流速设置为 30 mL/min；检测器温度 230 °C，氢气流速 30 mL/min，空气流速 300 mL/min，尾吹氮气速度 30 mL/min；进样口温度 220 °C，进样体积 0.4 μL。

测定挥发性成份的内标为乙酸丁酯，酒液离心后过取滤液 0.22 μm 孔径滤膜，将 980 μL 样品和 20 μL 内标乙酸丁酯置于气相色谱样品瓶中。柱箱的升温程序为：先以 50 °C 保持 5 min，再以 10 °C/min 的速度升温至 200 °C 并保持 5 min。

2.3.2 氨基酸测定

氨基酸的测定主要采用芮鸿飞^[75]等方法并稍作改动。

选用安捷伦 TC-C18 色谱柱（4.6×250mm 5-μm）为色谱柱；采用高效液相色谱外标法测定黄酒中氨基酸的含量。样品前处理：取酒液 200 μL 加 100 μL 1.2% 异硫氰酸苯酯乙腈溶液和 100 μL 14% 三乙胺乙腈溶液，混匀后静置 1h，加入 400 μL 正己烷，旋涡混合器震荡 60 s 后静置 10 min，取下层清液经 0.45 μm 孔径滤膜后，置于液相色谱样品瓶中。

色谱条件：流动相 A：0.01 mol/L 乙酸钠缓冲液-乙腈（97:3，V/V）流动相 B：乙

腈-水 (4:1, V/V); 流速 1.0 ml/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 40 °C; 进样量 10 μ L。梯度洗脱程序表见表 2-3。

表 2-3 分析梯度洗脱程序表

Table 2-3 Analytical gradient elution program table

时间/min	体积分数/%	
	流动相 A	流动相 B
0	100	0
3	100	0
15	88	12
20	80	20
35	75	25
40	65	35
42	0	100
45	100	0

2.3.3 黄酒理化指标的测定

黄酒的总酸(以乳酸计)、总糖(以葡萄糖计): 按照国标 GB/T 13662—2018《黄酒》^[76]测定; 黄酒中酒精含量采用 GC 测定并稍作改动^[77]。测定酒精含量的内标为 7.32 mg/mL 丙酮。样品过 0.22 μ m 孔径滤膜, 将 100 μ L 样品、800 μ L 水和 100 μ L 内标丙酮置于气相色谱样品瓶中。柱箱的升温程序: 先 50 °C 保持 4 min, 再 30 °C/min 的速度升温至 200 °C 并保持 2 min。

2.3.4 苦味值的评定

苦味标准液: 用柠檬酸将纯净水调至与原酒 pH (3.8~4.2) 一致, 用此作为标准液基液; 将盐酸奎宁配制为不同浓度的苦味标准品, 以此为标准进行评分。盐酸奎宁浓度 5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L 和 40 mg/L 分别对应苦味值 5、10、20、30 和 40。

采用标签量值评估法^[78]对成员 (5 男 5 女; 年龄 22~50 岁) 进行为期两个月的口味敏感性训练, 以 2 mg/L 盐酸奎宁为苦味标准物训练苦味。进行苦味训练后所有的评定员都可以识别出 2 mg/L 盐酸奎宁苦味最小范围。每次评定前 1 h 内评定员限制饮食,

且用纯净水漱口，准确移取 10 mL 待测样品于酒杯中，夹上鼻夹后将酒杯中的酒液一次性倒入口腔中充分浸润 5~10 s，并仰头让样品充分浸润咽喉部位两次，保证样品覆盖整个咽喉的表面后吐出，漱口，不同样品之间间隔不低于 3 min，每个样品评定 3 次，评定员确定与样品最接近的苦味标准液并以此确定苦味值。

2.3.5 相关性分析

Pearson 相关系数法常用于评估 2 个连续变量之间的线性关系。将各测定成分含量与苦味值进行 Pearson 相关性分析，通过选择双变量相关分析中的 Pearson 和双侧检验方法，获取相关系数。

2.3.6 PLSR 苦味分析

将测定各成分作为 X 变量，苦味值作为 Y 变量，进行 PLSR 分析，包括数据的降维、苦味值识别以及预测的分析，建立模型并用模型预测苦味值 Y 。

2.3.7 统计数据分析

采用 SPSS 24.0 进行数据的统计学分析、相关性分析；条形图由 Graphpad prism 8.0 软件分析绘制；PLSR 分析由 The Unscrambler X 10.4 软件分析。除方法中特别说明外，各试验设定 3 个平行，数据用“平均值 \pm 标准偏差”表示。

2.4 结果与讨论

2.4.1 黄酒中挥发性成分测定结果

黄酒中大量可挥发性风味物质对黄酒具有呈香作用。根据文献报道以及黄酒常见物质筛选出 9 种挥发性物质对 16 种半干型黄酒进行研究。这 16 种黄酒中乙醛 19~98 mg/L、甲醇 0~40 mg/L、正丙醇 38~122 mg/L、乙酸乙酯 31~158 mg/L、异丁醇 64~132 mg/L、异戊醇 108~238 mg/L、乳酸乙酯 121~580 mg/L、丁酸 63~714 mg/L、 β -苯乙醇 13~200 mg/L。其中高级醇含量最高的是样品 HJ2 578 mg/L，最低的是样品 HJ12

242 mg/L。乙酸乙酯含量最高的是样品 HJ16 158 mg/L，最低的是样品 HJ1 31 mg/L。乳酸乙酯含量最高的是样品 HJ5 580 mg/L，最低的是样品 HJ13 121 mg/L。

表 2-4 黄酒样品中挥发性成分含量 (mg/L) 测定结果

Table 2-4 Determination results of volatile components in *Huangjiu* samples

挥发性成分	HJ1	HJ2	HJ3	HJ4	HJ5	HJ6	HJ7	HJ8	HJ9	HJ10	HJ11	HJ12	HJ13	HJ14	HJ15	HJ16
甲醇	13±3	40±6	20±3	0±0	0±0	0±0	0±0	32±7	8±5	12±1	13±2	16±3	13±2	17±5	18±5	32±7
乙醛	68±12	66±6	93±6	75±10	64±5	65±14	98±7	98±13	71±13	89±9	73±10	60±7	30±5	19±5	99±11	71±14
正丙醇	101±14	66±6	87±6	122±17	84±9	36±6	88±5	82±11	54±10	50±6	52±10	40±8	38±5	57±9	80±6	69±11
乙酸乙酯	37±10	31±6	42±8	65±8	68±10	64±6	77±12	91±7	32±11	41±10	53±11	35±9	38±7	56±12	56±10	158±13
异丁醇	108±6	92±3	110±5	132±6	107±8	61±6	78±3	84±9	121±12	77±10	117±11	64±7	89±10	97±13	117±10	114±10
异戊醇	205±14	220±15	230±13	210±6	238±9	139±8	146±13	166±15	236±17	128±10	197±9	108±8	151±16	146±11	188±11	217±13
乳酸乙酯	401±20	549±9	453±7	184±10	580±17	232±30	242±9	398±24	169±14	226±15	353±13	200±15	121±12	225±12	320±17	398±13
丁酸	432±10	714±15	234±8	480±17	222±14	260±14	356±20	499±26	63±5	220±13	275±15	135±10	110±14	256±12	279±13	206±8
β -苯乙醇	100±11	200±10	136±6	90±7	120±20	113±18	103±14	109±14	69±8	162±13	98±9	30±7	44±6	63±6	88±11	13±1

2.4.2 黄酒中氨基酸的测定结果

表 2-5 黄酒样品中氨基酸含量 (mg/L) 测定结果

Table 2-5 Determination results of amino acids contents (mg/mL) in *Huangjiu* samples

氨基酸	HJ1	HJ2	HJ3	HJ4	HJ5	HJ6	HJ7	HJ8	HJ19	HJ10	HJ11	HJ12	HJ13	HJ14	HJ15	HJ16
Asp	140±13	96±14	95±11	114±5	49±5	203±18	143±9	257±12	110±15	111±11	156±10	90±10	27±5	115±4	162±17	136±10
Glu	240±14	225±12	157±6	235±13	105±15	322±13	117±4	294±32	296±11	321±4	169±10	160±7	70±8	209±11	282±6	260±12
Ser	96±12	67±7	70±7	60±6	39±6	109±13	46±8	154±21	90±12	96±13	111±12	50±11	29±6	121±13	97±13	96±10
Gly	93±8	58±7	65±10	58±7	36±5	99±17	62±6	181±6	76±8	77±10	104±8	252±11	238±12	218±6	85±9	93±11
His [#]	110±13	70±8	66±8	50±5	30±4	94±23	110±13	180±5	77±10	77±11	111±12	44±8	52±6	56±9	123±9	136±10
Arg [#]	475±17	228±12	261±22	279±14	165±11	255±25	218±4	449±12	207±10	189±9	450±23	195±10	164±12	287±10	510±10	398±11
Thr [*]	213±13	93±5	107±8	115±18	41±6	212±21	153±14	357±24	214±9	211±11	233±11	123±9	59±8	205±11	228±12	221±13
Ala	419±13	245±10	205±12	200±24	126±6	235±16	224±23	530±32	380±9	405±11	277±11	231±12	250±10	376±16	266±8	237±7
Pro	344±17	362±10	198±9	175±17	150±5	363±25	140±16	433±8	281±15	282±10	372±18	117±7	77±3	250±14	366±9	344±11
Tyr	174±10	106±5	110±13	147±28	42±5	197±22	95±16	266±32	154±10	162±7	198±13	89±10	64±11	170±9	180±11	167±13
Val ^{*#}	251±15	117±13	209±7	183±2	50±8	270±25	94±13	317±21	101±11	96±11	194±18	84±17	53±10	53±6	191±18	235±12
Met [*]	63±11	39±5	32±5	44±16	8±2	84±7	44±7	67±11	23±3	22±2	32±4	15±3	23±3	27±5	27±5	24±3
Cys	70±12	22±3	24±9	34±5	13±3	41±8	24±2	47±5	54±9	50±7	52±6	42±8	28±4	67±9	58±8	35±8
Ile ^{*#}	152±10	77±7	95±5	97±20	35±8	174±33	76±8	245±28	74±10	79±14	104±7	43±3	30±5	52±11	121±18	145±10
Leu ^{*#}	251±13	132±6	160±41	163±5	72±4	286±10	134±10	412±23	136±6	126±3	214±6	75±11	57±8	100±12	231±20	263±7

表 2-5 黄酒样品中氨基酸含量 (mg/L) 测定结果 (续)

Table 2-5 Determination results of amino acids contents (mg/mL) in *Huangjiu* samples (Cont)

氨基酸	HJ1	HJ2	HJ3	HJ4	HJ5	HJ6	HJ7	HJ8	HJ19	HJ10	HJ11	HJ12	HJ13	HJ14	HJ15	HJ16
Phe*#	210±13	128±7	158±10	178±18	68±4	249±12	134±14	363±9	156±9	148±11	211±9	93±13	77±10	126±10	199±19	218±8
Trp*	44±7	40±7	33±12	45±9	20±5	62±5	35±8	108±15	26±4	22±3	50±10	34±4	19±2	45±7	51±7	62±16
Lys*#	121±12	65±7	72±6	112±25	38±7	128±10	80±17	303±20	145±10	131±9	234±9	104±8	82±8	115±6	200±13	207±10
EAA	1305±17	691±17	866±78	937±13	332±6	1465±80	750±27	2172±123	873±46	835±33	1271±22	572±29	399±29	724±37	1248±66	1375±18
BAA	1570±24	817±11	1021±86	1062±20	458±22	1456±23	846±27	2269±80	894±40	846±26	1517±25	639±34	513±37	789±39	1575±43	1602±39
TAA	3474±42	2123±20	2130±124	2317±54	1110±49	3425±39	2035±9	4924±96	2597±105	2605±76	3270±66	1843±86	1395±59	2592±82	3375±85	3277±88

注：“*”代表必需氨基酸，“#”代表苦味氨基酸，EAA 代表必需氨基酸，BAA 代表苦味氨基酸，TAA 代表总游离氨基酸。

黄酒中含有丰富的氨基酸，这些氨基酸是许多风味物质的前体物质，氨基酸经代谢能生成醇、酯等化合物，因此与挥发性苦味物比，氨基酸在黄酒中的含量一般较多。黄酒中氨基酸的测定结果见表 2-5。由表 2-5 可知，各黄酒样品中一共检出 18 种游离氨基酸，包含 8 种必需氨基酸和 10 种非必需氨基酸。黄酒中必需氨基酸总量在 332~2 172 mg/L，必需氨基酸总量最高的是样品 HJ8，为 2 172 mg/L；最低的是样品 HJ5 为 332 mg/L。黄酒中苦味氨基酸总量在 458~2 269 mg/L，苦味氨基酸总量最高的是样品 HJ8，为 2 269 mg/L，最低的是样品 HJ5，为 458 mg/L。多数苦味氨基酸如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和赖氨酸也是必需氨基酸，相对而言，黄酒中苦味氨基酸总量比必需氨基酸总量多。黄酒中游离氨基酸总量在 1 110~4 924 mg/L，游离氨基酸总量最高的是样品 HJ8，为 4 924 mg/L；最低的是样品 HJ5 为 1 110 mg/L。酒样中氨基酸含量有差异，其中天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸含量均较高，这与宫晓波等^[79]的研究结果相一致。

2.4.3 黄酒理化指标测定结果

表 2-6 黄酒样品理化指标测定结果

Table2-6 Determination results of physical and chemical indexes of *Huangjiu* samples

理化指标	HJ1	HJ2	HJ3	HJ4	HJ5	HJ6	HJ7	HJ8	HJ9	HJ10	HJ11	HJ12	HJ13	HJ14	HJ15	HJ16
总酸	5.7±0.2	6.3±0	6.9±0.3	5.2±0.4	7.2±0.3	5.1±0	5.8±0	8.2±0.3	5.8±0.3	3.6±0.3	5.8±0.4	4.0±0.3	3.6±0.3	4.8±0.3	6.6±0.3	5.5±0.5
总糖	20.2±1.5	23.0±0.7	21.6±0.8	14.5±1.3	23.9±1.4	38.6±0.7	44.0±1.7	16.2±0.8	25.9±0.7	34.4±0.9	16.8±0.8	28.3±0.8	25.5±0.8	25.9±0.8	19.2±0.7	20.0±0.9
酒精	14.3±0.3	14.2±0.2	15.0±0.7	14.2±0.3	12.6±0.2	10.3±1	9.5±0.2	13.4±0.4	11.3±0.2	10.2±0.3	13.4±0.3	10.1±0.3	10.7±0.2	11.7±0.2	15.1±0.3	15.2±0.3

虽然糖和酸不是黄酒中的苦味物质，但是其作为重要的呈味物质，对黄酒的苦味具有重要影响作用。黄酒样品中总酸、总糖和酒精测定结果见表 2-6。由表 2-6 可知，黄酒中总酸含量 3.6~8.2 g/L，符合半干型黄酒 GB/T 13662—2018《黄酒》标准（糯米黄酒 3.0~7.5 g/L，非糯米黄酒 3.0~10.0 g/L）。总糖含量 14.5-44.0 g/L。仅样品 HJ4 总糖含量 14.5 g/L 略低于半干型黄酒标准，样品 HJ7 总糖含量 44.0 g/L 略超半干型黄酒标准，其他均符合半干型黄酒 GB/T 13662—2018《黄酒》标准（15.1~40.0 g/L）。酒精含量 9.5~15.1 g/L，即酒精度为 12.0~19% vol，符合半干型黄酒 GB/T 13662—2018《黄酒》标准（≥8.0 %vol）。

2.4.4 黄酒苦味值分析

黄酒样品苦味值的测定结果如见图 2-1。由图 2-1 可知，样品 HJ1 和 HJ5 的苦味值最高，都为 40；其次是样品 HJ2 的苦味值为 36；样品 HJ3 和 HJ4 的苦味值为 34、样品 HJ8、HJ11、HJ15 和 HJ16 的苦味值为 32；样品 HJ9 的苦味值为 24；样品 HJ10 的苦味值为 20；样品 HJ6、HJ13 的苦味值为 18；样品 HJ12、HJ14 的苦味值为 16；样品 HJ7 的苦味值最低，为 14；其中苦味值<25 的黄酒样品有 7 种占 44%，苦味值>30 的黄酒样品有 9 种，占 56%。经品评可以发现黄酒苦味值相差两个单位在品评过程中就会有显著性差异，黄酒的苦味值在该品评标准下 8~34 为宜，苦味值低于 8 的黄酒其酒特征不明显，有些甚至很寡淡，不具有酒的风味。苦味值高于 34 的黄酒苦味较重，难以吞咽甚至产生不愉悦感。黄酒的苦味值差异主要由于黄酒各组成成分不同而引起^[25]，通过探究黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味的相关性，从而得以从菌种、原料组成和发酵工艺来控制黄酒发酵过程中各组成成分的产生^[52]，降低黄酒苦味并提升黄酒品质。

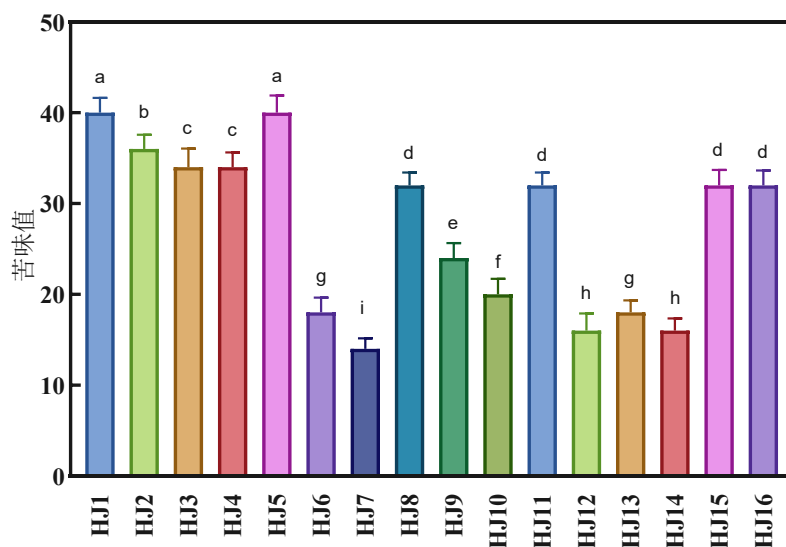


图 2-1 黄酒样品的苦味值测定结果

Fig. 2-1 Determination results of bitterness values of Huangjiu samples

注：不同小写字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)。

2.4.5 黄酒中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值相关性结果分析

黄酒中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值相关性分析结果见图 2-2。由图 2-2 可知, 苦味值与异戊醇 ($R=0.808$)、异丁醇 ($R=0.642$)、正丙醇 ($R=0.623$) 极显著正相关, 这与高级醇是酒的苦味来源结果一致^[13,22,26,27], 异戊醇有药香并带苦味, 异丁醇有刺激香并呈味苦, 正丙醇有刺激性青草香和辣味, 在这三种物质中, 异戊醇的苦味阈值为 6.5 mg/L, 异丁醇的苦味阈值为 75 mg/L, 正丙醇的苦味阈值为 800 mg/L^[80], 除正丙醇外, 异戊醇和异丁醇在黄酒中含量均远远超过其阈值, 而正丙醇虽阈值较高, 但品评时为单一物质, 正丙醇在黄酒中可能会与其它醇类存在叠加效应, 对黄酒贡献苦味。

乳酸乙酯 ($R=0.771$) 作为一种呈香物质, 是黄酒的重要香气成分, 但乳酸乙酯含量过高便会抑制酒的整体香气并产生明显苦涩感^[81]。因乳酸乙酯在半干型黄酒中含量较高 (121~549 mg/L) 且超过了自身的苦味阈值 (70 mg/L)^[80], 所以其在增香的同时也会产生一定的苦味。

通常黄酒中苦味氨基酸占总氨基酸 44%, 会给黄酒带来一定程度的苦味^[3,13,26], 其中部分氨基酸与苦味值呈弱正相关, 包括精氨酸 ($R=0.464$)、缬氨酸 ($R=0.414$)、脯氨酸 ($R=0.376$)、亮氨酸 ($R=0.321$)、异亮氨酸 ($R=0.296$)、苯丙氨酸 ($R=0.246$) 等苦味氨基酸, 其他氨基酸与苦味相关极小或负相关, 特别是甘氨酸 ($R=-0.536$) 作为一种甜味氨基酸与苦味呈显著负相关。由于氨基酸的感官阈值较高^[80], 且蔡宇桥^[82]等研究发现黄酒中氨基氮与苦味呈现负相关而与鲜味正相关, 黄酒中各物质可能存在味感交互作用^[83], 氨基酸提供的鲜味可能增强对酒中甜味的感知、弱化对苦味的感知。这些因素可能是导致黄酒中氨基酸与苦味相关性低的原因。

此外, 总酸 ($R=0.641$) 与黄酒苦味呈极显著正相关, 对苦味有促进作用; 总糖 ($R=-0.735$) 与黄酒苦味呈极显著负相关, 对苦味有明显抑制作用, 糖是一种传统的苦味掩盖物^[30], 在黄酒的风味中同样也发挥了巨大作用。酒精与苦味值呈极显著正相关 ($R=0.850$), 而且酒精浓度越高, 苦味越强烈, 这与 CHENT 等^[31]的高浓度酒精会产生强烈的苦味结论相一致。

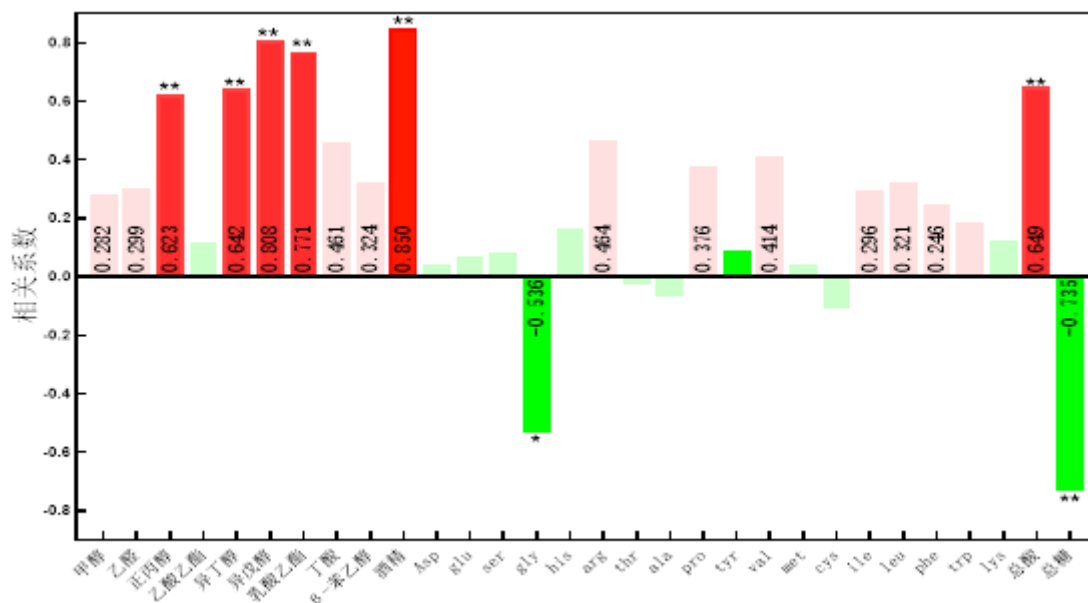


图 2-2 黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值相关性分析结果

Fig. 2-2 Correlation analysis results between volatile components, amino acids and physical and chemical indexes in *Huangjiu* samples and bitterness value

注：“***”表示极显著相关($P < 0.01$)；“**”表示显著相关($P < 0.05$)；无标记表示相关性不显著($P > 0.05$)

2.4.6 偏最小二乘法回归分析模型建立

不同黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值相关性偏最小二乘法回归分析载荷图见图 2-3。PLSR 可进一步验证 Pearson 相关性分析的物质来建立苦味与测定成分之间的可靠性。以各测定成分为 X 预测变量，苦味值为 Y 响应变量进行 PLSR 分析，提取两个主成分，主成分 1 解释了 31%的 X 方差、73%的 Y 方差，主成分 2 解释了 31%的 X 方差、解释了 16%的 Y 方差，两个主成分共解释了 62%的 X 方差、89%的 Y 方差。由图 2-3 可知，位于 2 个椭圆之间的成分如酒精度、异戊醇、异丁醇、正丙醇、乳酸乙酯和绝大部分的氨基酸均能很好的被 PLSR 模型解释，酒精度、异戊醇、异丁醇、正丙醇、乳酸乙酯等与苦味值距离较近，表明相关程度高，而氨基酸类物质与苦味值距离较远，表明相关程度低。这也与邱等^[52]的研究中高级醇比苦味氨基酸更能决定苦味强度的结果相同。苦味值位于内椭圆，对 PLSR 模型总方差贡献显著，能很好的被相关性高的测定成分解释。

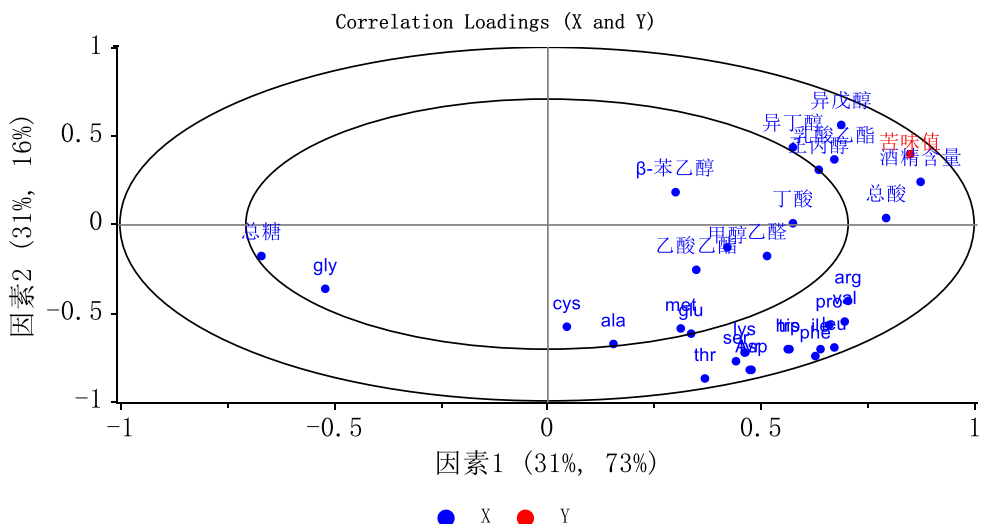


图 2-3 黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值的相关性偏最小二乘法回归分析载荷图

Fig. 2-3 Loadings diagram of PLSR analysis correlation between volatile components, amino acids and physical and chemical indexes in *Huangjiu* samples and bitterness value

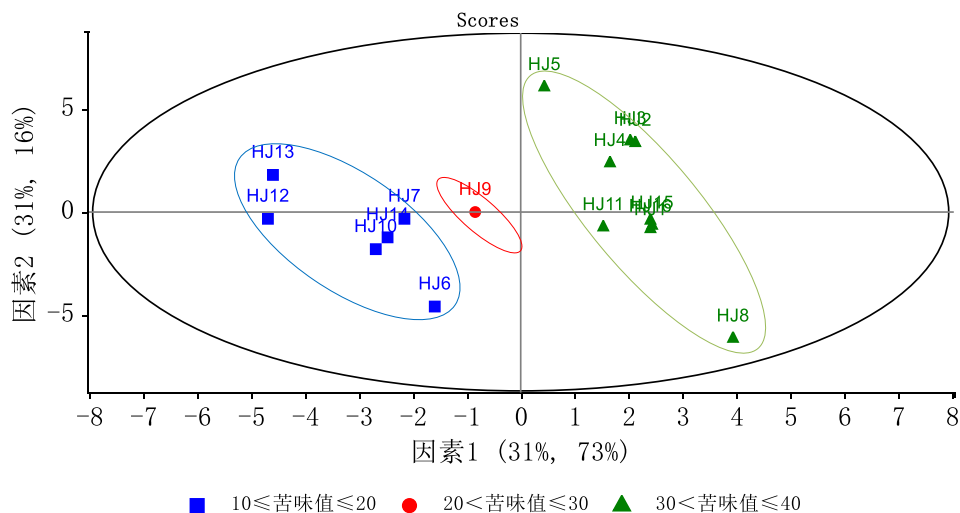


图 2-4 黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值的相关性偏最小二乘法回归分析得分图

Fig. 2-4 Score plot of PLSR analysis correlation between volatile components, amino acids and physical and chemical indexes in *Huangjiu* samples and bitterness value

不同黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值相关性偏最小二乘法回归分析得分图见图 2-4。由图 2-4 可知，随着苦味值的增大，其主成分 1 得分值和主成分 2 得分值呈现逐渐增大的趋势，不同苦味值的黄酒能明显区分开来。且所有样本都落在 95%

的置信区间内，无异常值，这表明黄酒成分与苦味值对应关系分析结果是可信的。

2.4.7 黄酒苦味值偏最小二乘法回归预测模型的验证

为了定量预测黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与苦味值相关性，将 16 种半干型黄酒样品分别按照表 2-7 中挥发性成分、氨基酸及理化指标 ($X_1 \sim X_{30}$) 进行 PLSR 模型验证，并得到黄酒苦味值(Y)预测模型的回归方程如下： $Y=0.0373X_1+0.0330X_2+0.1104X_3-0.0002X_4+0.1216X_5+0.1565X_6+0.1477X_7+0.0717X_8+0.0602X_9+0.1499X_{10}-0.0345X_{11}-0.0133X_{12}-0.0185X_{13}-0.0976X_{14}-0.0091X_{15}+0.0603X_{16}-0.0434X_{17}-0.0336X_{18}+0.0401X_{19}-0.0202X_{20}+0.0472X_{21}-0.0189X_{22}-0.0343X_{23}+0.0202X_{24}+0.0239X_{25}+0.0078X_{26}-0.0034X_{27}-0.0105X_{28}+0.1023X_{29}-0.1385X_{30}-0.0322$ 。此定量模型的自变量拟合度(R_X^2)为 0.62，因变量拟合度(R_Y^2)为 0.883，预测拟合精度(Q^2_{cum})=0.783 > 0.6，说明该模型拟合效果好且预测结果能够被接受。将另外从市场购买的不同价位具有代表性的黄酒样品 HJ17、HJ18、HJ19、HJ20 使用模型进行验证，得到预测苦味值和评定苦味值分别见表 2-7。由表 2-7 可知，样品 HJ17 模型预测苦味值为 32.0，评定苦味值 30，偏差率 6.6%；样品 HJ18 模型预测苦味值为 21.5，评定苦味值 24，偏差率 10.3%；样品 HJ19 模型预测苦味值为 28.0，评定苦味值 30，偏差率 6.6%；样品 HJ20 模型预测苦味值为 27.5，评定苦味值 26，偏差率 5.8%，最大偏差率接近 10%。结果表明，黄酒苦味值预测模型的预测值准确，能达到黄酒苦味值感官评定准确率的 89.7%。

表 2-7 挥发性成分、氨基酸及理化指标预测黄酒样品苦味值模型验证

Table 2-7 Validation of prediction model for bitterness value of *Huangjiu* samples with volatile components, amino acids and physical and chemical indexes

成分	HJ17	HJ18	HJ19	HJ20
甲醇 (X_1) mg/L	30±4	13±2	0±0	32±6
乙醛 (X_2) mg/L	86±9	64±12	110±12	83±14
正丙醇 (X_3) mg/L	66±5	46±8	56±8	58±10
乙酸乙酯 (X_4) mg/L	67±10	37±4	58±9	59±9
异丁醇 (X_5) mg/L	114±9	71±10	103±11	95±9
异戊醇 (X_6) mg/L	175±11	144±21	198±18	198±15
乳酸乙酯 (X_7) mg/L	536±13	215±12	278±12	365±17
丁酸 (X_8) mg/L	525±20	416±8	516±16	289±12

表 2-7 挥发性成分、氨基酸及理化指标预测黄酒样品苦味值模型验证（续）

Table 2-7 Validation of prediction model for bitterness value of *Huangjiu* samples with volatile components, amino acids and physical and chemical indexes (Cont)

成分	HJ17	HJ18	HJ19	HJ20
β -苯乙醇 (X_9) mg/L	96±14	91±7	136±11	132±11
酒精 (X_{10}) g/L	13.6±0.3	10.8±0.2	12.6±0.3	11.9±0.3
Asp (X_{11}) mg/L	155±12	148±11	276±18	103±11
Glu (X_{12}) mg/L	206±15	168±11	210±10	237±12
Ser (X_{13}) mg/L	78±9	96±9	83±6	86±9
Gly (X_{14}) mg/L	95±14	63±13	101±11	68±10
His (X_{15}) mg/L	132±8	68±12	101±16	137±19
Arg (X_{16}) mg/L	375±10	207±11	342±19	322±20
Thr (X_{17}) mg/L	187±10	103±10	202±19	187±11
Ala (X_{18}) mg/L	306±8	127±13	338±16	320±14
Pro (X_{19}) mg/L	323±9	164±8	521±11	133±11
Tyr (X_{20}) mg/L	131±12	76±9	179±18	116±9
Val (X_{21}) mg/L	227±12	121±12	234±22	189±12
Met (X_{22}) mg/L	30±6	24±4	41±7	46±10
Cys (X_{23}) mg/L	27±5	25±5	28±5	34±12
Ile (X_{24}) mg/L	139±12	52±7	153±11	133±19
Leu (X_{25}) mg/L	234±10	108±11	284±10	265±18
Phe (X_{26}) mg/L	197±22	88±6	231±12	202±18
Trp (X_{27}) mg/L	38±5	36±5	47±8	76±10
Lys (X_{28}) mg/L	189±9	79±10	231±12	111±12
总酸 (X_{29}) g/L	6.3±0.3	5.8±0.3	6.3±0.4	5.7±0.2
总糖 (X_{30}) g/L	38.3±0.9	32.1±1.6	38.1±1.4	35±0.8
预测苦味值	32.00	21.55	28.01	27.52
评定苦味值	30±2	24±2	30±3	26±2
偏差率 %	6.6	10.3	6.6	5.8

2.5 本章小结

本试验研究了黄酒样品中挥发性成分、氨基酸及理化指标与其苦味的关系，Pearson 相关性分析结果表明，黄酒的苦味值与挥发性物质如酒精、异戊醇、异丁醇、正丙醇和乳酸乙酯等相关性较高($R=0.623\sim 0.808$)，与苦味氨基酸如脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸等相关性低($R=0.246\sim 0.464$)，与部分氨基酸为负相关，特别是甘氨酸($R=-0.536$)呈显著负相关，酒精与苦味相关性最高($R=0.850$)、总酸对苦味有促进作用($R=0.649$)，总糖对苦味有明显抑制作用($R=-0.735$)。PLSR 模型验证了苦味值与挥发性成分、氨基酸及理化指标的关系，不同苦味值的黄酒可以明显地被模型区分开，黄酒苦味值预测模型的预测值准确，达到黄酒苦味值感官评定准确率的 89.7%。研究结果表明黄酒苦味值可以通过仪器测定黄酒挥发性成分、氨基酸及理化指标直接确定，这为黄酒苦味值的判定提供了一种客观有效的技术方法。

第三章 酿酒酵母中 *BAT2* 和 *THI3/BAT2* 基因缺失对黄酒苦味的影响

3.1 引言

高级醇，也称为杂醇，是酒精饮料中的一类具有呈香特征的风味化合物，对酒精饮料的感官品质和特性有显著的影响。适量的高级醇会使得酒体口感醇厚、柔软、丰满，酒香协调。当高级醇含量过高时，不仅饮用后容易产生口渴和“上头”的强烈醉感^[84]，而且会增强黄酒中杂醇油的异杂味和苦味^[16, 70]。

以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 XF1 的单倍体 XF1 α 7/XF1 α 6 和 *THI3* 基因缺失 XF1-T 单倍体 XF1 α 7-T/XF1 α 6-T 为原始菌采用 Cre/loxP 同源重组系统^[85, 86]构建支链氨基酸转氨酶基因 *BAT2* 缺失重组菌 XF1-B 和 *THI3/BAT2* 同时缺失重组菌 XF1-TB。分别对原始菌 XF1 和重组菌 XF1-B、XF1-TB 进行黄酒发酵和苦味评定，研究 *BAT2* 基因缺失和 *THI3/BAT2* 同时缺失对黄酒中高级醇和苦味的影响。以期为黄酒的苦味控制提供参考。

3.2 实验材料和仪器设备

3.2.1 实验材料

本研究中使用的所有菌株和质粒载体列于表 3-1，其中。

表 3-1 本实验的菌株和质粒

Table3-1 Strains and plasmids used in this study.

菌种或质粒	特征	来源
XF1	工业酿酒酵母二倍体菌株	本实验室
XF α 7	MAT α , 工业酿酒酵母单倍体菌株	本实验室
XF1 α 6	MAT α , 工业酿酒酵母单倍体菌株	本实验室
XF1 α 7-BK	MAT α Δ <i>BAT2</i> :: <i>loxP-kanMX-loxP</i> , haploid yeast strain	本研究
XF1 α 6-BK	MAT α Δ <i>BAT2</i> :: <i>loxP-kanMX-loxP</i> , haploid yeast strain	本研究
XF1 α 7-B	MAT α Δ <i>BAT2</i> :: <i>loxP</i> , haploid yeast strain	本研究

表 3-1 本实验的菌株和质粒（续）

Table 3-1 Strains and plasmids used in this study (Cont)

菌种或质粒	特征	来源
XF1 α 6-B	MAT α Δ BAT2:: <i>loxP</i> , haploid yeast strain	本研究
XF1-B	Δ BAT2:: <i>loxP</i> , diploid yeast strain	本研究
XF1 α 7-T	MAT α Δ THI3:: <i>loxP</i> , haploid yeast strain	本实验室
XF1 α 6-T	MAT α Δ THI3:: <i>loxP</i> , haploid yeast strain	本实验室
XF1 α 7-TBK	MAT α Δ THI3:: <i>loxP</i> Δ BAT2:: <i>loxP-kanMX-loxP</i> , haploid yeast strain	本研究
XF1 α 6-TBK	MAT α Δ THI3:: <i>loxP</i> Δ BAT2:: <i>loxP-kanMX-loxP</i> , haploid yeast strain	本研究
XF1 α 7-TB	MAT α Δ THI3:: <i>loxP</i> Δ BAT2:: <i>loxP</i> , haploid yeast strain	本研究
XF1 α 6-TB	MAT α Δ THI3:: <i>loxP</i> Δ BAT2:: <i>loxP</i> , haploid yeast strain	本研究
XF1-TB	Δ THI3:: <i>loxP</i> Δ BAT2:: <i>loxP</i> , diploid yeast strain	本研究
pUG6	携带 <i>kanMX</i> 抗性基因, 含 Amp 抗性, 宿主为 DH5 α	本实验室
PSH65	Cre 重组酶表达载体, 携带 <i>zeocin</i> 抗性基因, 宿主为 DH5 α	本实验室

本研究中使用的引物列于表 3-2 中。酿酒酵母 (S288c) *BAT2* 基因组序列从 NCBI (序列号: NC-001144.5) 获得。采用 *snappgene* 软件设计引物, 由上海生物工程技术有限公司合成。

表 3-2 本实验使用的引物

Table 3-2 Primers used in this study

引物	序列 (5' \rightarrow 3') ^a
	敲除组件构建引物
<i>BAT2</i> -F1	CCCTCTCTGACACCTCTTG
<i>BAT2</i> -R1	AAACTCGTGGAGATGCT
<i>BAT2</i> -F2	TACTGCTGCGATTGTTT
<i>BAT2</i> -R2	GGATAATTGCAGGTTTCGAC

表 3-2 本实验使用的引物 (续)

Table 3-2 Primers used in this study (Cont)

引物	序列 (5'→3') ^a
	敲除组件构建引物
loxP-F	<u>TAAGGGAAAGCATCTCCACGAGTTTTTCGTACGCTGCAGG</u> TC
loxP-R	<u>ATGGGAGAAACAATCGCAGCAGTAGCGTTGGCCGATTCA</u> T
	验证引物
BAT2-A	CTGTGACCGCACTACAC
BAT2-D	CGACATTACGGAAACGTCT
B-M	TTCCGTCAGTTTAGTC
M-B	GATGAGATGGTCAGACTAAACTG
MAT-a	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG
MAT- α	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
MAT-F	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG

注：下划线部分为用于融合 PCR 的重叠序列

本研究所使用的试剂，如表 3-3 所示。

表 3-3 主要试剂

Table 3-3 Main reagent

试剂名称	规格	生产厂家
蛋白胨	分析纯	广东环凯微生物科技有限公司
酵母提取物	分析纯	广东环凯微生物科技有限公司
琼脂粉	分析纯	广东环凯微生物科技有限公司
葡萄糖	分析纯	天津市科密欧化学试剂开发中心
氯化钠	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
半乳糖	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
乙酸钠	分析纯	天津市大茂化学试剂厂

表 3-3 主要试剂 (续)

Table 3-3 Main reagent (Cont)

试剂名称	规格	生产厂家
Zeocin 抗生素	生化试剂	Invitrogen 公司
氨苄青霉素	分析纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
DTT	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
Tris-HCl	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
山梨醇	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
氯化钾	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
G418 抗生素	分析纯	北京普博欣生物科技有限责任公司
氯化钾	分析纯	天津市大茂化学试剂厂
PrimeSTAR Max 聚合酶	生化试剂	宝生物工程(大连)有限公司
DNA marker	生化试剂	宝生物工程(大连)有限公司
硫酸铜	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
酒石酸钾钠	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
盐酸奎宁	分析纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
乙醇	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
异戊醇	色谱纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
异丁醇	色谱纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
正丙醇	色谱纯	天津市科密欧化学试剂有限公司
苯乙醇	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
乙酸丁酯	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
乙腈	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
正己烷	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
氨基酸标准品	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
异硫氰酸苯酯	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司
丙酮	色谱纯	阿拉丁试剂(上海)有限公司

3.3.2 仪器设备

表 3-4 主要仪器设备

Table 3-4 Main experimental instruments

仪器名称	型号	生产商
超净工作台	VL-4S	再鑫仪器有限公司
摇床	QHZ-98A	太仓市华利达实验设备有限公司
高速台式离心机	TGL-18C	上海安亭科学仪器厂
高速台式冷冻离心机	5804R	德国 Eppendorf 公司
分光光度计	UV-2700	日本岛津公司
自动糖化器	CanNeed-MB-800	肇庆市嘉仪仪器有限公司
生化培养箱	SHH-250 L	重庆市永生实验仪器厂
电热鼓风干燥箱	CS101-3E BN	重庆市永生实验仪器厂
超声清洗机	AS20500A	天津奥特赛恩斯仪器有限公司
便携式电陶炉	GL01-05	中山市高悦电器有限公司
高速台式离心机	TGL-18C	上海安亭科学仪器厂
电子天平	BSA124S	德国赛多利斯集团
灭菌锅	GI80	致微（厦门）仪器有限公司
电泳仪	EPS300	Tanon
PCR 仪	TC1000-S	大龙兴创实验仪器(北京)股份公司
凝胶成像分析系统	Gel Doc2000	Bio-Rad
手持式折光仪	WZS 80	南京晓晓仪器设备有限公司
超净工作台	VL-4S	再鑫仪器有限公司
摇床	QHZ-98A	太仓市华利达实验设备有限公司
气相色谱仪	GC8100	滕州中科普仪器有限公司

3.2.3 主要培养基

(1) 酵母培养基 (YPD): 蛋白胨 20 g/L, 酵母提取粉 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 固体培养基则再加 20 g/L 的技术琼脂粉, 121°C 高压灭菌 20 min。

(2) 细菌培养基 (LB): 蛋白胨 1%, 氯化钠 1%, 酵母提取物 0.5%, 121°C 高压灭

菌 20 min，固体培养基则再加 2%技术琼脂粉，121°C高压灭菌 20 min。

(3) 半乳糖诱导培养基 (YPG): 蛋白胨 2%，半乳糖 2%，酵母提取物 1%，121 °C 高压灭菌 20 min。

(4) McClary 产孢培养基: 葡萄糖 0.1%，氯化钾 0.18%，无水乙酸钠 0.82%，酵母提取粉 0.25%，琼脂 2%，121°C高压灭菌 20 min。

3.3 实验方法

3.3.1 敲除组件构建

以 pUG6 质粒为模板，用引物 loxP-F/loxP-R 进行 PCR 扩增，获得两端与酵母基因组同源的 *KanMX* 抗性基因片段(1736 bp)；以提取的酵母基因组 DNA 为模板，用引物 *BAT2*-F1/ *BAT2*-R1 和 *BAT2*-F2/*BAT2*-R2 分别 PCR 扩增出同源臂 BU(290 bp)和 BD(361 bp)，PCR 条件为 94 °C预变性 2 min，98°C变性 10 s，55°C退火 5 s，72°C延伸 40 s，72 °C 后延伸 1 min，25 循环。利用 *KanMX* 基因两端与两同源臂的重叠碱基进行融合 PCR 连接成 *BAT2* 基因敲除组件 BU-*loxP*- *KanMX*-*loxP*-BD (2338 bp)，融合 PCR 条件为 94 °C 预变性 2 min，98 °C变性 10 s，60 °C退火 5 s，72°C延伸 1 min，72°C后延伸 3 min，35 循环。基因敲除过程如图 3-1 所示。

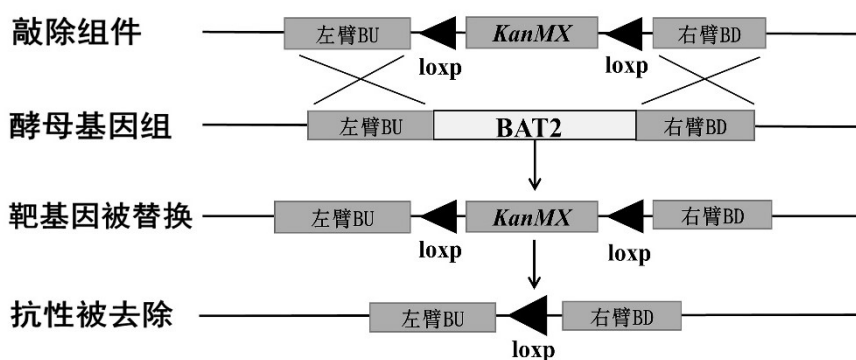


图 3-1 *BAT2* 基因敲除过程

Fig. 3-1 *BAT2* gene knockout process

3.3.2 酿酒酵母电转化

电转化法^[87]将敲除组件导入单倍体酿酒酵母细胞 XF1a7/XF1a6 和 XF1a7-T/ XF1a6-T，加 0.1-0.2 μg 纯化敲除组件 DNA 到感受态细胞，电转化 (1.5 KV、200 Ω、25 mF 的

电容电击 5 ms) 后, 30 °C 水浴, 温育的转化子涂布含 100 µg/mL G418 抗生素的 YPD 平板上培养。

3.3.3 阳性转化子筛选

挑取长势较好的阳性菌落于 50 µL 无菌水中搅动混匀, 立即-20 °C 冷冻 10 min, 吸取解冻后的菌液 1 µL 作为模板, 根据两端的验证引物 *BAT2-A*、*BAT2-D* 进行菌落 PCR 筛选阳性克隆, 菌落 PCR 条件为 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 min, 72 °C 后延伸 5 min, 35 循环。

3.3.4 筛选标记去除

利用电转化法将带有 Cre 重组酶基因的 pSH65 质粒导入 *BAT2* 基因缺失的单倍体酵母细胞 XF1a7-BK/XF1α6-BK 和 XF1a7-TBK/XF1α6-TBK, 涂布于含 200 µg/mL zeocin 抗生素平板上培养 3 天, 挑取阳性菌在 YPG 液体培养基中连续培养 10 h 以上, 以期有足够的时间使半乳糖诱导质粒 pSH65 产生 Cre 重组酶, 通过 Cre 重组酶切除 *loxP* 位点间的抗性基因, 然后涂布于含 G418 平板和不含 G418 平板上, 筛选不能在 G418 抗生素平板生长而能在不含 G418 抗生素平板上生长的酵母菌进行 PCR 验证, PCR 步骤与条件与菌落 PCR 一致。

3.3.5 pSH65 质粒丢失

将抗性去除的重组菌传代培养 15 次以上, 再次用 200 µg/mL zeocin 抗生素平板挑选 pSH65 质粒丢失、无抗性标记的重组酵母菌 XFa7-B/XFα6-B 和 XFa7-TB/XFα6-TB。

3.3.6 双倍体融合

将去掉抗性标记的单倍体酵母菌株 XF1a7-B/XF1α6-B 和 XF1a7-TB/XF1α6-TB 各取 100 µL 接种于含有 3 mL YPD 的试管中摇床震荡培养 8 h, 取 10 µL 菌液在显微镜下观察细胞融合形态, 将有哑铃型的酵母融合菌液稀释涂布于 YPD 平板 30 °C 倒置培养 2 d, 挑取单菌落显微镜观察, 并分散椭圆菌落进行产孢培养验证双倍体 XF1-B 和 XF1-TB, 用引物 MAT-F/MAT-α/MAT-a^[88]进行菌落 PCR 验证。

3.3.7 黄酒发酵

为减少干扰，本实验采用液态发酵黄酒。将浸泡后的糯米加 1.6 倍体积的水蒸熟，打浆后加 0.1~0.3%耐高温淀粉酶 95 °C酶解 20 min 进行液化，再加入糯米质量的 10% 麦芽和 10%花生饼粉、250%水、0.25%中性蛋白酶、0.25%风味蛋白酶和 0.1~0.3%(v/v) 糖化酶进行糖化，条件为：50 °C糖化 4 h、65 °C糖化 1 h。过滤灭菌冷却后备用。将酵母菌接种到 10 mL 上述制备的黄酒发酵液中，30 °C摇床培养 24 h 后，取 1 mL 菌液接种到含 50 mL 黄酒发酵液中，30 °C摇床培养 16 h，得到种子液。取 100 mL 黄酒发酵液接种 3% (v/v) 酵母菌种子液 30 °C发酵 7 d。

3.3.8 生长曲线

生长曲线参照徐佳等^[89]的方法，取斜面菌种 1 环，接到 10 mL YPD 液体培养基中，30 °C，180 r/min 培养 12 h。再以 1%接种量转接至 50 mL YPD 液体培养基继续培养，每隔 2 h 测定 600 nm 处的吸光值。

3.3.9 理化性质测定

见方法 2.3.3。

3.3.10 高级醇的测定

见方法 2.3.1。

3.3.11 氨基酸的测定

见方法 2.3.2。

3.3.12 苦味值评定

见方法 2.3.4。

3.3.13 统计数据分析

见方法 2.3.7。

3.4 结果与讨论

3.4.1 敲除组件的构建与验证

根据 3.3.1 的方法构建敲除组件，以提取的酵母基因组 DNA 为模板，用引物 *BAT2-F1/BAT2-R1* 和 *BAT2-F2/BAT2-R2* 分别 PCR 扩增出同源臂 BU 和 BD；以 pUG6 质粒为模板，用引物 *loxP-F/loxP-R* 扩增出 *loxP-kanMX-loxP*，结果如图 3-2 所示，左同源臂 BU (290 bp) 的和右同源臂 BD (361 bp) 和抗性标记 *loxP-kanMX-loxP*(1736bp)通过融和 PCR 连接，得到 *BAT2* 基因敲除组件 BU-*loxP-kanMX-loxP*-BD (2338 bp)。

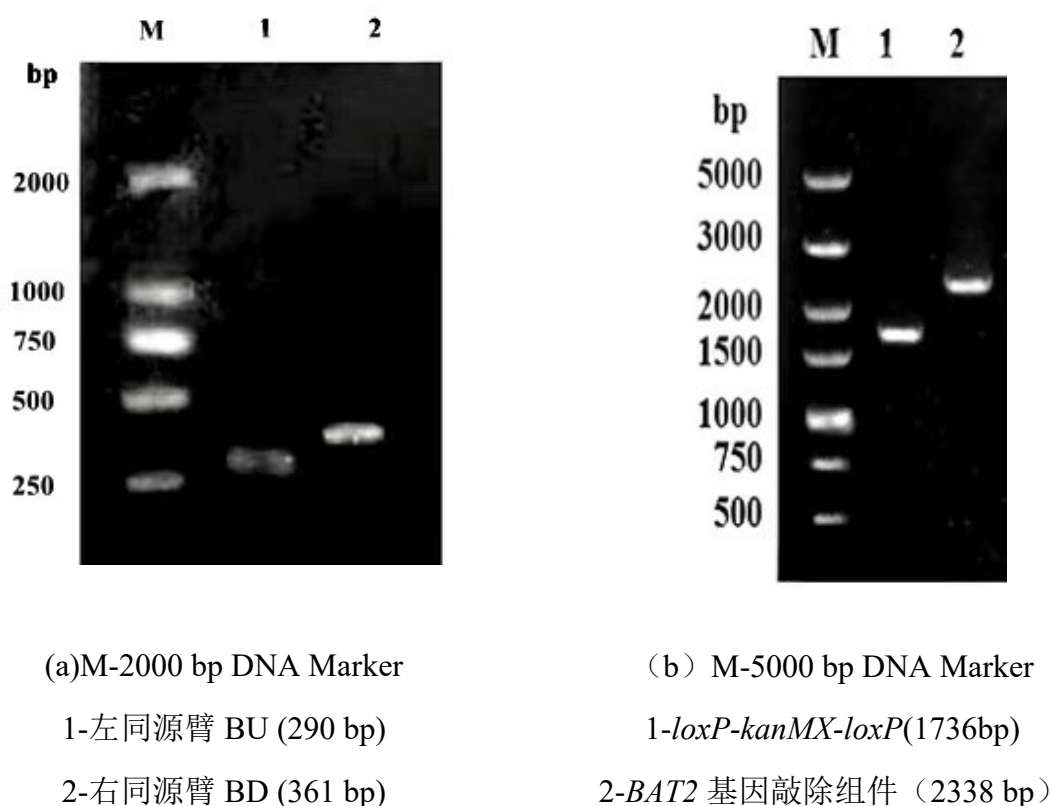
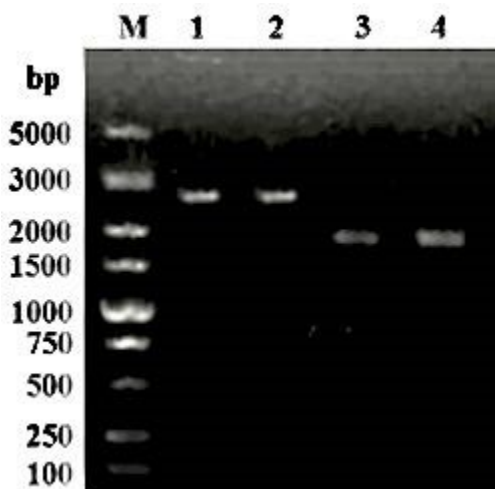


图 3-2 敲除组件的 PCR 验证

Fig. 3-2 PCR verification of disruption cassette

3.4.2 重组酵母菌的构建与验证

根据 3.3.2 的方法通过同源重组转化酵母 XF1a7/XF1a6 和 XF1a7-T/XF1a6-T，然后挑选阳性菌落进行 PCR 验证，结果如图 3-3 所示（以 XF1a7-TBK、XF1a6-TBK 为例），重组菌株 2600 bp，原始菌株为 1692 bp，PCR 验证条带和理论值一致，成功获得 *BAT2* 和 *THI3/BAT2* 基因缺失重组酵母菌。

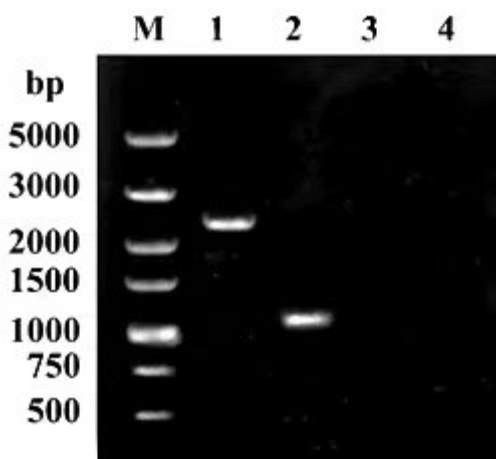


M-5000 bp DNA Marker; 1-重组菌株 XF1a7-TBK (2600 bp); 2-重组菌株 XF1 α 6-TBK (2600 bp); 3-原始菌株 XF1a7 (1692 bp); 4-原始菌株 XF1 α 6 (1692 bp)

图 3-3 原始菌株和重组菌株的 PCR 验证

Fig. 3-3 PCR verification of original and recombinant strains

3.4.3 KanMX 抗性筛选标记



M-5000 bp DNA Marker; 1-XF1a7-TBK (引物 *BAT2-A/BAT2-D*); 2-XF1a7-TB (引物 *BAT2-A/BAT2-D*); 3-XF1a7-TB (引物 *BAT2-A/B-M*); 4-XF1a7-TB (引物 *M-B/BAT2-D*)

图 3-4 重组菌株 XF1a7-TB 的抗性去除验证

Fig. 3-4 Resistant removal verification of strains XF1a7-TB

根据 3.3.4 的方法对重组菌诱导培养, 然后对去除抗性的重组菌的进行 PCR 验证, 验证结果如图 3-4 所示 (以 XF1a7-TB 为例)。以 *BAT2-A* 和 *BAT2-D* 作为引物, 未去除

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/927066131162006052>