

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.05.005

常压室温等离子体选育高产酒精及酸的酿酒酵母

Breeding of *Saccharomyces cerevisiae* high-yield of alcohol and acid by atmospheric room temperature plasma

王犁烨¹ 王浩臣¹ 马珊² 刘维兵¹ 李泽涵¹

WANG Li-ye¹ WANG Hao-cheng¹ MA Shan² LIU Wei-bing¹ LI Ze-han¹

宋晶晶¹ 杨华峰³ 张颖⁴ 武运¹

SONG Jing-jing¹ YANG Hua-feng³ ZHANG Ying⁴ WU Yun¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆维吾尔自治区科技项目服务中心, 新疆 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆仪尔高新农业开发有限公司, 新疆 焉耆 841000; 4. 吐鲁番市质量与计量检测所, 新疆 吐鲁番 838000)

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China; 2. Science and Technology Project Service Center of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 3. Xinjiang Yier Gaoxin Agricultural Development Co. Ltd, Yanqi, Xinjiang 841000, China; 4. Turpan Quality and Quantity Inspection Institute, Turpan, Xinjiang 838000, China)

摘要:对从葡萄表面筛选的 Y₆ 菌株进行常压室温等离子体 (ARTP) 诱变, 通过单因素试验确定, 处理时间 100 s, 致死率 98.70% 为最佳诱变条件。采用三苯基氯化四氮唑 (TTC) 法、溴甲酚绿法以及杜氏小管等筛选出产酒精和产酸强的目标菌株 Y₆₋₈, 同时对其遗传稳定性进行研究。结果表明, 将诱变菌株 Y₆₋₈ 与出发菌株接进糖度相同的葡萄汁中, 诱变菌株的产酒精、产酸能力分别提高了 28.13% 和 214.93%, 并且遗传性能稳定。

关键词:常压室温等离子体; 酿酒酵母; 产酸; 产酒精

Abstract: The Y₆ strain screened from the grape surface was subjected to atmospheric pressure room temperature plasma (ARTP) mutagenesis, and the *Saccharomyces cerevisiae* strain with strong alcohol production ability, high acid production ability and stable fermentation performance were selected. The single-factor test confirmed that the optimal mutagenesis condition was lethality rate at 98.70% treated for 100 s. The target strain Y₆₋₈ producing alcohol and producing acid was screened by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) method, bromo-

cresol green medium method and Du's tubule, and then its genetic stability was studied. The results showed that the mutagenized strain Y₆₋₈ was added to the grape juice with the same sugar content, and the alcohol production and acid production capacity of the mutagenized strain were increased by 28.13% and 214.93%, respectively, and the genetic performance was stable.

Keywords: ARTP; *Saccharomyces cerevisiae*; acid production; alcohol production

随着消费者对饮食健康及养生关注度的不断加深, 中国葡萄酒的需求量逐年增长, 酿酒工业呈现快速发展态势^[1]。新疆作为中国最古老的葡萄种植产区, 地区生态环境独特, 区位优势明显, 是发展酿酒葡萄的理想产区^[2]。但该地日温差大、降雨量少, 使得酿酒葡萄原料具有糖高酸低的特点, 酸度过低会使葡萄酒颜色黯淡无光, 口感单调、不清新, 直接影响到新疆地区葡萄酒的品质^[3-5], 因此需要选育高产酸的酵母菌株进行发酵, 改善葡萄酒酸度低的现状。

目前, 通常采用传统分离筛选的方法从自然界中筛选酿酒酵母菌株, 但分离得到的野生菌株在发酵性能和功能上都具有一定的局限性。因此需要对已知菌株进行诱变, 从基因层面上改变酵母菌的性质及功能, 从而达到生产需要^[6-8]。传统的诱变方法操作复杂, 对人体和环境存在一定的危害, 新型常压室温等离子体 (ARTP) 生物

基金项目:新疆维吾尔自治区重大科技专项 (编号: 2017A01001-2); 固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金项目 (编号: 2016GTJ003)

作者简介:王犁烨, 女, 新疆农业大学在读硕士研究生。

通信作者:武运 (1965—), 女, 新疆农业大学教授, 硕士。

E-mail: wuyunster@sina.com

收稿日期:2018-12-08

诱变育种技术,因其操作简单,对人体环境无毒无害,已成为生物诱变育种领域的一个研究热点^[9-11]。赵宇等^[12]、曲文娟等^[13]、秦艳飞等^[14]采用 ARTP 对高核酸酿酒酵母、产蛋白酶菌株以及产恩拉霉素菌株进行处理,获得生产所需的诱变菌株,但目前还没有学者通过 ARTP 筛选高产酒精和酸的酿酒酵母。

本试验拟以从葡萄表面筛选的 Y_6 菌株为出发菌,通过 ARTP 诱变对其功能进行改造,以期获得高产酒精及酸且发酵性能稳定的目标酿酒酵母菌株,通过微生物代谢来增加葡萄酒的酒精度和酸度,以提高新疆葡萄酒品质。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

酵母菌株 Y_6 :新疆农业大学食品科学与药学院微生物实验室提供;

酵母浸粉、蛋白胨、琼脂粉:北京奥博星生物技术有限责任公司;

葡萄糖、无水乙醇、:分析纯,天津市致远化学试剂有限公司;

2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC):分析纯,上海蓝季生物科技发展有限公司;

溴甲酚绿:分析纯,天津市北联精细化学品开发有限公司;

马铃薯葡萄糖琼脂:青岛高科园海博生物技术有限公司;

磷酸二氢钾、硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$):分析纯,天津市光复科技发展有限公司。

1.1.2 培养基

酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose medium, YPD):20 g 葡萄糖+20 g 蛋白胨+10 g 酵母浸粉+20 g 琼脂+1 000 mL 蒸馏水;

TTC 上层培养基:0.05 g TTC+0.5 g 葡萄糖+2 g 琼脂+100 mL 蒸馏水;

TTC 下层培养基:10 g 葡萄糖+2 g 蛋白胨+5 g 酵母浸粉+1 g KH_2PO_4 +0.4 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ +20 g 琼脂+1 000 mL 蒸馏水,调 pH 为 5.5~5.7;

溴甲酚绿培养基:PDA 基础培养基+0.01% 溴甲酚绿,调 pH 为 6.0。

1.1.3 仪器与设备

常压室温等离子体诱变仪:II S 型,无锡源清天木生物科技有限公司;

分析天平:FA2014N 型,北京东南仪诚实验室设备有限公司;

立式高压灭菌器:LDZX-50KBS 型,上海申安医疗器械厂;

生物安全柜:HR40-A2 型,青岛海尔特种电器有限公司;

霉菌培养箱:MJX-160-Z 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

紫外可见光光度计:TU-1810 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

PH 计:FE20 PLUS 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

手持糖度计:PAL-1 型,北京阳光亿事达科技有限公司;

漩涡混合器:VORTEX-5 型,华利达实验设备有限公司;

离心机:SF-TDL-6A 型,上海菲恰尔分析仪器有限公司;

葡萄酒全自动检测仪:Y15 型,西班牙 Biosystem 公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌悬液的制备 首先挑取一环存放于冰箱的 Y_6 酵母菌接种于 YPD 液体培养基中,在 28 °C 下培养 24 h;然后将菌液以 2% 的接种量接入新配的 YPD 液体培养基中,在 28 °C 下培养 24 h 后,制得菌悬液。

1.2.2 Y_6 酵母生长曲线的测定 将活化好的 Y_6 菌液以 5% 的接种量接种到 YPD 液体培养基中,在 28 °C 下培养,每间隔 2 h 取 1 次样,在波长 600 nm 测吸光值,以空白培养基为对照,根据测得的吸光值绘制 Y_6 酵母的生长曲线,确定 Y_6 酵母的生长对数期。

1.2.3 ARTP 诱变试验 试验参数:选择纯度为 99.999% 的氦气作为工作气体,流量为 10 SLM,电源功率设定为 120 W,操作温度 20 °C,处理时间分别为 0,20,40,60,80,100,120,140 s。诱变试验:在超净工作台中吸取 1 mL 在液体培养基中培养至对数期的出发菌株 Y_6 的菌液,在 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用无菌生理盐水洗涤 3 次后吸取 10 μ L 放在载片上,用无菌镊子将载片依次放在对应的凹槽中,并将装有 1 mL YPD 液体培养基的 EP 管固定在下方,即可进行诱变试验,诱变后将装有载片的 EP 管放在漩涡器上剧烈震荡 1 min,将诱变菌洗脱下来,梯度稀释 10^{-6} ~ 10^{-7} 后,吸取 100 μ L 涂布在平板上,在 28 °C 培养箱中避光培养 48 h,计算致死率,选择最佳诱变时间。

1.2.4 致死率计算

$$Z = \left(1 - \frac{X_1}{X}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

Z——菌株的致死率,%;

X_1 ——ARTP 诱变后的菌落数;

X ——对照组的菌落数。

1.2.5 高产酒精及酸酿酒酵母初筛

(1) TTC 培养基筛选:采用划线法将挑选出的突变菌株接种于 TTC 下层培养基中,在 28 °C 条件下培养 48 h 后,在 TTC 下层培养基上覆盖一层 TTC 上层培养基,并于 28 °C 的条件下培养 3 h,观察培养皿中的显色情况,从中筛选出产酒精能力强的突变菌株。

(2) 溴甲酚绿培养基筛选:先在培养皿中倒入一层刚好可以覆盖培养皿底部的溴甲酚绿培养基,待其凝固后放入牛津杯,再在牛津杯外围倒入一层溴甲酚绿培养基,培养基凝固后取出牛津杯,将 TTC 培养基筛选出的颜色较深的酵母菌株进行活化,将吸取 100 μ L 菌液接种于牛津杯空洞内,在 28 °C 条件下培养 24 h,观察黄色圈,选择菌落周围出现较大黄色圈的菌株进行发酵能力试验。

(3) 菌株发酵能力测试:两步筛选出的突变酵母菌株,以 5% 的接种量分别接种于装有 10 mL YPD 液体培养基的试管中后,放入杜氏小管,并确保杜氏小管内无气泡,在 28 °C 的条件下培养,每 12 h 观察一次突变菌株产气情况,记录杜氏小管内的填充度。根据试验结果,筛选出发酵性能好,起酵快、生长旺盛的菌株。

1.2.6 高产酒精及酿酒酵母的复筛 将葡萄汁 115 °C,灭菌 20 min,分装在 5 个三角瓶中,每瓶 150 mL,测定葡萄汁的糖度为 23.6 Brix,总酸为 4.94 g/L。将上几步筛选的诱变菌株和出发菌株同时以 5% 的接种量接种于葡萄汁中,在 25 °C 条件下培养 10 d,测定菌株产酒精和产酸能力,确定目标菌株。

1.2.7 遗传稳定性试验 将突变酵母菌株连续传代培养 5 次,将每一代菌株以 5% 的接种量接种于糖度为 22.8 Brix,总酸为 5.32 g/L 的葡萄汁中,在 28 °C 条件下培养 10 d,测定突变菌株的产酒精和产酸能力,从而验证菌株的突变性能是否能够稳定遗传。

1.3 数据处理

试验数据通过 Excel 2018 软件及 Origin 8.5 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 Y_6 酵母菌生长曲线

酵母菌株所处的生理状态在一定程度上影响了菌株诱变的效果,酵母菌处于对数生长期时,其个体之间的形态、化学组成和生理特性等基本一致,数目以稳定的几何指数增长且对环境因素的作用十分敏感^[15-16]。因此,在此阶段进行诱变,可以增加基因突变、稳定遗传的几率^[17]。如图 1 所示,将 Y_6 酵母菌接入液体培养基中,前 4 h 酵母菌处于迟缓期,微生物的代谢系统需要适应新环境,因此数目增长缓慢。在 4~16 h 酵母菌数量增长迅速处于对数生长期,在 16 h 后酵母菌进入稳定期,因此本试

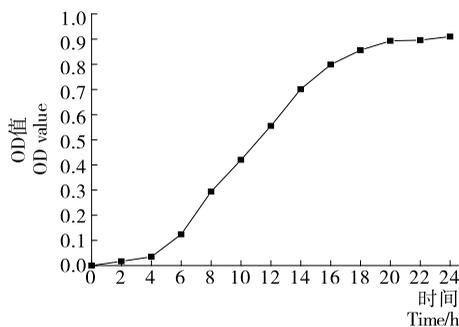


图 1 Y_6 酵母菌生长曲线

Figure 1 Y_6 yeast growth curve

验选择在 10 h 时对酵母菌进行诱变试验。

2.2 最佳诱变时间的确定

诱变处理剂量或时间不仅影响致死率,同时影响突变效率,在一个合适的突变效率区间进行有效的筛选是菌种选育的关键之处^[18]。如图 2 所示,随着常压室等离子体处理时间的延长, Y_6 酵母的致死率急剧升高,当处理时间为 100 s 时,致死率达到 98.7%,当处理时间为 120 s 时,酵母菌无一存活,说明常压室温等离子体产生的活性粒子能够破坏细胞结构,也能够穿过细胞壁到达细胞内打断基因、蛋白质分子等,从而导致大部分微生物死亡^[19],但当能量适中时,少数经过 ARTP 照射的酵母菌会通过本身的自动修复系统进行修复,由于细胞中 DNA 的不完全修复可能会引起控制产生目标性状功能的遗传片段发生改变,从而导致性状功能发生改变^[20-21]。一般认为出发菌株稳定时,选用致死率在 90% 以上菌株,以求得突变幅度较大的目标菌株^[22],因此试验选择处理时间为 100 s,致死率为 98.7% 的诱变菌株。

2.3 高产酒精及酸酿酒酵母初筛

2.3.1 TTC 培养基的筛选结果 TTC 作为一种显色剂,能对酵母的代谢产物发生显色反应,并且通过反应颜色的深浅来判断酵母中呼吸酶活力大小,从而判断酵母产酒精能力的高低。通常情况下,产酒精能力越强的酵母菌株在 TTC 培养基上显现的颜色越深。采用划线法将

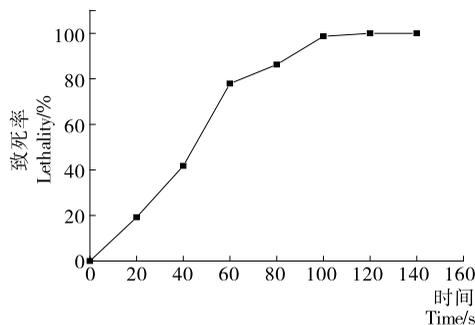


图 2 处理时间对 Y_6 酵母菌致死率的影响

Figure 2 Effect of Different processing Time on Lethality of Y_6 Yeast

39株诱变菌株接种到TTC培养基上,结果如表1所示, Y₆-5、Y₆-8、Y₆-10、Y₆-14、Y₆-15、Y₆-17、Y₆-28、Y₆-31、Y₆-32、Y₆-33、Y₆-35,11株菌株显色最为明显,为深红色,比出发菌Y₆显现的颜色更深,说明这11株酵母菌株在经过等离子体处理后,产酒精能力有所增强。而Y₆-3、Y₆-6、Y₆-11、Y₆-27、Y₆-34、Y₆-39,这6株酵母菌都和出发菌Y₆显色一致,为红色,但为了进一步了解菌株的产酸能力是否提高,将筛选出的11株深红色酵母菌进行溴甲酚绿培养基筛选试验。

表1 39株诱变酵母菌株TTC培养基筛选结果[†]

Table 1 Screening results of 39 strains of mutagenized yeast strain TTC medium

菌株编号	显色情况	菌株编号	显色情况	菌株编号	显色情况	菌株编号	显色情况
Y ₆ -1	-	Y ₆ -11	+++	Y ₆ -21	-	Y ₆ -31	++++
Y ₆ -2	-	Y ₆ -12	-	Y ₆ -22	-	Y ₆ -32	++++
Y ₆ -3	+++	Y ₆ -13	-	Y ₆ -23	-	Y ₆ -33	++++
Y ₆ -4	-	Y ₆ -14	++++	Y ₆ -24	-	Y ₆ -34	+++
Y ₆ -5	++++	Y ₆ -15	++++	Y ₆ -25	-	Y ₆ -35	++++
Y ₆ -6	+++	Y ₆ -16	++	Y ₆ -26	++	Y ₆ -36	++
Y ₆ -7	-	Y ₆ -17	++++	Y ₆ -27	+++	Y ₆ -37	-
Y ₆ -8	++++	Y ₆ -18	-	Y ₆ -28	++++	Y ₆ -38	++
Y ₆ -9	++	Y ₆ -19	-	Y ₆ -29	-	Y ₆ -39	+++
Y ₆ -10	++++	Y ₆ -20	-	Y ₆ -30	-	Y ₆	+++

[†] “++++”表示深红色;“+++”表示红色;“++”表示粉色;“+”表示浅粉色;“-”表示无色。

表2 11株诱变酵母菌株溴甲酚绿培养基筛选结果

Table 2 Screening results of 11 strains of mutagenized yeast strain bromocresol green medium mm

菌株编号	牛津杯内径	24 h后黄色圈直径	黄色圈实际直径	菌株编号	牛津杯内径	24 h后黄色圈直径	黄色圈实际直径
Y ₆ -5	5.79	25.93	20.14	Y ₆ -28	5.49	28.25	22.76
Y ₆ -8	6.30	35.86	29.56	Y ₆ -31	5.21	28.78	23.57
Y ₆ -10	6.02	28.53	22.51	Y ₆ -32	8.17	17.13	8.96
Y ₆ -14	7.27	19.05	11.78	Y ₆ -33	7.14	30.29	23.15
Y ₆ -15	6.72	34.21	27.49	Y ₆ -35	5.74	24.35	18.61
Y ₆ -17	7.47	25.56	18.09	Y ₆	6.96	29.24	22.28

2.3.3 杜氏小管筛选 将上步筛选出的7株诱变菌株接种在装有杜氏小管的试管中,当12h时,菌株Y₆-15和Y₆-33的杜氏小管中产气较多,其他诱变菌株均无明显反应;当24h时,菌株Y₆-8中的杜氏小管充满了气体,并且杜氏小管浮在液面上,Y₆-31和Y₆-33与出发菌株Y₆的产气能力相同,在杜氏小管中有4/5的气体,其他菌株的产气能力相对较弱;当36h时,除Y₆-15和Y₆-28之外,其他菌株都将杜氏小管中充满气体;在36,48h时,所有菌株都将杜氏小管中充满气体。综上所述,可以判断7株诱变菌株的起酵能力为:Y₆-8>Y₆-33=Y₆-31>Y₆-15>Y₆-10>Y₆-28,因此初步确定Y₆-8为目标菌株。

2.3.2 溴甲酚绿培养基的筛选 溴甲酚绿一般被用作酸碱指示剂,当pH值在3.8时,显现出黄色;当pH值在5.4时,显现出蓝绿色。将溴甲酚绿加入培养基中,可以判断酵母菌株产酸能力的强弱。将TTC筛选出的17株菌株接种到溴甲酚绿培养基中,结果如表2所示,Y₆-8、Y₆-10、Y₆-14、Y₆-15、Y₆-28、Y₆-31、Y₆-33这7株诱变菌株在溴甲酚绿培养基上的黄色圈均大于出发菌株Y₆,可以初步判断这7株突变菌株的产酸能力强于出发菌株。

2.4 诱变菌株复筛

将7株菌株分别接种到葡萄汁后,其产酒精产酸情况如表4所示,与出发菌株相比,诱变菌株的产酸产酒精能力明显增强,与初筛结果一致,说明ARTP处理能够改变菌株的某些基因,从而改变菌株的功能。6株菌株产酒精能力依次为:Y₆-8>Y₆-31>Y₆-15>Y₆-33>Y₆-10>Y₆-28;6株突变菌株的产酸能力也存在一定的差别,其能力强弱依次为:Y₆-8>Y₆-15>Y₆-31>Y₆-33>Y₆-28>Y₆-10,但菌株产主要有机酸种类基本一致,为L-乳酸、酒石酸以及苹果酸。由此可以猜测菌株经过ARTP处理后,虽然产酸能力的强弱得到了改变,但产主要有机酸种类不会发生改变。GB 15037—2006《葡萄酒》中限定葡萄

表 3 6 株诱变酵母菌株杜氏小管 60 h 间产气情况[†]

Table 3 6 strains of mutagenized yeast strain Du's tube for 60 hours of gas production

菌株编号	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
Y ₆ -8	+	+++++	+++++	+++++	+++++
Y ₆ -10	++	++	+++++	+++++	+++++
Y ₆ -15	+++	+++	++++	+++++	+++++
Y ₆ -28	-	+	++	+++++	+++++
Y ₆ -31	++	++++	+++++	+++++	+++++
Y ₆ -33	+++	++++	+++++	+++++	+++++
Y ₆	+	++++	+++++	+++++	+++++

[†] “+++++”表示杜氏小管中充满气体;“++++”表示杜氏小管中充满 4/5 的气体;“+++”表示杜氏小管中充满 1/2 的气体;“++”表示杜氏小管中充满 1/3 的气体;“+”表示杜氏小管中充满 1/5 的气体;“-”表示杜氏小管中无气体。

表 4 6 株诱变酵母菌株与出发菌株产酒精产酸情况

Table 4 6 strains of mutagenized yeast strains and starting strains produce alcohol and produce acid

菌株编号	总酸/ (g · L ⁻¹)	产酸量/ (g · L ⁻¹)	挥发酸/ (g · L ⁻¹)	L-乳酸/ (mg · L ⁻¹)	酒石酸/ (mg · L ⁻¹)	柠檬酸/ (mg · L ⁻¹)	苹果酸/ (mg · L ⁻¹)	酒精度/ % vol
Y ₆ -8	7.22	2.28	0.32	2 210.00	2 567.00	382.00	1 586.00	12.50
Y ₆ -15	6.89	1.95	0.39	2 103.00	2 449.00	364.00	1 477.00	11.70
Y ₆ -31	6.85	1.91	0.42	2 098.00	2 379.00	365.00	1 387.00	12.00
Y ₆ -33	6.54	1.60	0.35	1 956.00	2 249.00	370.00	1 453.00	11.50
Y ₆ -28	5.93	0.99	0.51	1 575.00	2 309.00	310.00	1 129.00	9.80
Y ₆ -10	5.75	0.81	0.42	1 673.00	2 213.00	298.00	1 005.00	10.30
Y ₆	5.65	0.71	0.40	1 639.00	2 109.00	301.00	980.00	9.60

酒中挥发酸 ≤ 1.2 g/L, 以上菌株均符合要求, 因此, 最终将 Y₆-8 确定为目标菌株。

2.5 遗传稳定性试验

将突变菌株 Y₆-8 培养 5 代, 把每一代菌液接种到葡萄汁中发酵 10 d, 发酵液的酒精度和总酸分析结果见图 3。由图 3 可知, 第 3 代菌株产酒精能力最强为 12.7% vol, 第 5 代菌株产酸能力最强为 2.26 g/L。虽然 5 代菌株的产酸和产酒精能力存在微小差距, 产酸能力都维持在 2.2 g/L 左右且挥发酸含量在 0.33 g/L 左右, 产酒

精能力都维持在 12% vol 以上。由此可以表明, 突变菌株 Y₆-8 的高产酸和酒精性能可以稳定的遗传。

3 结论

本研究以葡萄表面筛选出的酿酒酵母菌株 Y₆ 为出发菌, 通过单因素试验确定 ARTP 处理时间的最佳时间。通过 TTC 培养基试验、溴甲酚绿培养基试验以及杜氏小管试验对突变菌株进行初步筛选, 最后再经葡萄汁发酵试验和遗传稳定性试验确定目标菌株为 Y₆-8, 该突变菌株的产酸能力和产酒精能力较出发菌株 Y₆ 分别提高了 214.93% 和 28.13%, 该菌株在一定程度上可以解决新疆葡萄酒糖高酸低的现状, 提高新疆葡萄酒品质。同时说明 ARTP 诱变能够高效率改变菌株的发酵性能。但该研究仅将诱变菌株 Y₆-8 在红葡萄酒发酵过程中给予验证, 在白葡萄酒的生产中还有待进一步验证。

参考文献

[1] 武运, 田歌, 陈新军, 等. 新疆葡萄酒产业发展趋势新视角探析[J]. 中国酿造, 2018, 37(10): 195-199.
 [2] 王蕾. 基于“五力模型”的新疆葡萄酒产业价值链分析[J]. 中国酿造, 2017, 36(1): 196-200.
 [3] 李慧, 王惠玲, 吴雅琨, 等. 天然葡萄酒酵母菌种的分离、鉴

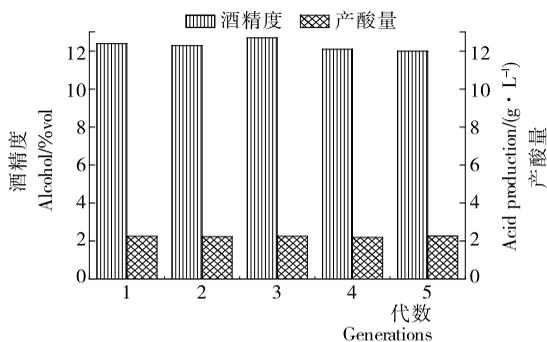


图 3 Y₆-8 连续 5 代产酒精和产酸情况

Figure 3 Y₆-8 continuous 5 generations of alcohol production and acid production

- 定和酿造性能评价[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(11): 14-20.
- [4] 王染霖. 天山北麓酿酒葡萄产区葡萄与葡萄酒品质研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2015: 2-5.
- [5] 马莉涛. 玛纳斯河流域酿酒葡萄赤霞珠和梅鹿辄的适应性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2008: 6-9.
- [6] NIELSEN J, PRONK J T. Metabolic engineering, synthetic biology and systems biology [J]. *Fems Yeast Research*, 2012, 12(2): 103-103.
- [7] 杨明琰, 郭爱莲, 沈俭, 等. 高产 SOD 酵母菌的诱变选育及发酵条件研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 147-150.
- [8] KIM J W, CHIN Y W, PARK Y C, et al. Effects of deletion of glycerol-3-phosphate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase genes on glycerol and ethanol metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioprocess & Biosystems Engineering*, 2012, 35(1/2): 49-54.
- [9] YUAN Jun, ZHAO Ben, SUN Meng-yu, et al. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6(13): 3 154-3 158.
- [10] LU Yuan, WANG Li-yan, MA Kun, et al. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 55(1): 17-22.
- [11] 陈瑞龙, 庄莹, 贺彬彬, 等. 植物乳杆菌细菌素高产菌株的诱变选育及其对肉丸的防腐保鲜作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 121-127.
- [12] 赵宇, 刘珊珊, 陈叶福, 等. ARTP 诱变以及基因组重排筛选具有耐高温性能的酿酒酵母[J]. 现代食品科技, 2017, 33(11): 37-41.
- [13] 曲文娟, 张天, 马海乐, 等. 高产蛋白酶菌株等离子体诱变及其在提高豆粕发酵效果中的应用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 133-140.
- [14] 秦艳飞, 余飞, 朱振坤, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变选育恩拉霉素高产菌株[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(3): 32-36.
- [15] 郑莉焯. 耐高渗啤酒酵母的选育及其发酵特性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013: 16-19.
- [16] 熊建春. 甘蔗威士忌酯香酵母菌的选育及发酵工艺研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010: 25-30.
- [17] 司晓光, 郭刚, 王小霞, 等. 常压室温等离子体快速诱变选育丙酮酸高产菌株[J]. 食品工业科技, 2014, 35(20): 241-243.
- [18] 薛刚, 陈利娟, 吴斌, 等. ARTP 诱变选育高温蛋白酶高产菌株及其酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(1): 177-180, 206.
- [19] 李小坤, 王旺, 林影, 等. 常压室温等离子体(ARTP)诱变选育高核酸酿酒酵母[J/OL]. 现代食品科技: 1-9[2018-12-04].
- [20] 朱瑞敏, 邱晨曦, 韩悦, 等. 微生物育种物理诱变技术 ARTP 的应用进展[J]. 生物技术世界, 2016(4): 20-23.
- [21] 赵天惠. 枯草芽孢杆菌脉冲强光诱变及其发酵性能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017: 21-26.
- [22] 江汉湖, 董明盛. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 189-210.
- (上接第 25 页)
- [14] 邹毅, 李楠. 甘蔗酒、卡沙萨酒和朗姆酒比较研究[J]. 轻工科技, 2013(11): 1-3.
- [15] 王正学. 一种利用甘蔗酿酒的方法: 中国, 103642660 B[P]. 2015-02-11.
- [16] DUARTEALMEIDA J M, SALATINO A, GENOVESE M I, et al. Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products [J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(2): 660-664.
- [17] 黄美娥, 高忠松, 张羽, 等. 白茅根—甘蔗饮料的研制[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 141-143.
- [18] 张宇, 邱林权, 陈绍军, 等. 紫甘薯—甘蔗酒发酵工艺条件的优化[J]. 中国酿造, 2014, 33(10): 151-155.
- [19] 李文辉, 李宛妍, 李俊毅, 等. 杨梅酒发酵酸度变化影响因素的研究[J]. 酿酒科技, 2017(8): 55-60.
- [20] 杨芳, 刘铁, 刘燕, 等. 发酵型桑葚果酒主要成分动态变化规律及香气成分分析[J]. 食品与机械, 2018, 34(6): 15-20.
- [21] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 15-20.
- [22] YOU Ling, WANG Tao, YANG Zhi-rong, et al. Performance of indigenous yeasts in the processing of Chinese strong-flavoured liquor during spontaneous mixed solid-state or submerged fermentation [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(121): 295-303.
- [23] 王洋, 叶阳, 叶翠, 等. 不同澄清方式对红枣米酒澄清效果的研究[J]. 食品工业, 2016(1): 1-5.
- [24] 武晓娜, 康富帅, 阎锐鸣, 等. 低甲醇甘蔗酒的酿造工艺研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(6): 670-671.
- [25] 武晓娜. 降低甘蔗蒸馏酒中甲醇生产量的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 34-36.
- [26] 齐晓茹, 师旭, 王颖, 等. 赤霞珠干红葡萄酒中甲醇、乙酸乙酯、高级醇含量的测定[J]. 酿酒科技, 2018(3): 27-33.
- [27] 汪家铭. 异戊醇发展前景乐观[J]. 应用科技, 1999(4): 16-18.
- [28] 宋慧丽. 河西走廊原产赤霞珠干红葡萄酒酿制中挥发性风味物质变化的分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009: 19-21.
- [29] 范丽. 苹果酒酵母中合成酯类化合物关键酶的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005: 18-19.
- [30] WANG Pei-xuan, MAO Jian, MENG Xiang-yong, et al. Changes in flavour characteristics and bacterial diversity during the traditional fermentation of Chinese rice wines from Shaoxing region [J]. *Food Control*, 2014, 44(44): 58-63.
- [31] 薛家玲, 苏伟明, 胡雪琼, 等. 蔗汁、糖浆和废糖蜜酿制甘蔗酒的风味比较[J]. 食品工业科技, 2014, 35(8): 192-196.