

酒醅来源酵母菌合成异戊醇能力与途径解析

谷欣哲^{1,2,3,4}, 方芳^{*1,2,3,4}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

3 江南大学食品合成生物技术教育部工程研究中心, 江苏 无锡 214122

4 江南大学江苏省食品合成生物技术工程研究中心, 江苏 无锡 214122

谷欣哲, 方芳. 酒醅来源酵母菌合成异戊醇能力与途径解析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3740-3752

Gu Xinzhe, Fang Fang. Synthesis ability and pathways of isoamyl alcohol in yeasts from fermented grains[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3740-3752

摘要: 【背景】异戊醇是酵母菌在白酒发酵过程中通过氨基酸合成代谢途径和氨基酸分解代谢途径合成的主要高级醇, 其含量影响白酒饮用的舒适度。【目的】分析和比较分离自浓香型白酒酒醅中的酵母菌合成异戊醇的能力, 揭示酵母菌合成异戊醇的途径。【方法】从酒醅中分离具有异戊醇合成能力的酵母菌株, 比较不同生长时期酵母菌合成异戊醇的能力, 通过前体物代谢分析它们合成异戊醇的途径。【结果】分离自酒醅的 5 株酵母的异戊醇合成能力从强到弱依次为 *Naumovozyma castellii* JP3-1、*Saccharomyces cerevisiae* JP3、*Pichia fermentans* JP22、*Pichia kudriavzevii* JP1 和 *Naumovozyma dairenensis* CBS421。这些酵母合成异戊醇的时期主要在对数生长期, *N. castellii* JP3-1、*P. fermentans* JP22 和 *N. dairenensis* CBS421 在稳定生长期也合成异戊醇。*S. cerevisiae* JP3、*N. castellii* JP3-1 和 *N. dairenensis* CBS421 在整个生长时期主要通过 Harris 途径合成异戊醇; *P. kudriavzevii* JP1 在整个时期主要通过 Ehrlich 途径合成异戊醇; *P. fermentans* JP22 在对数生长期通过 Harris 途径和 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力接近, 在稳定生长期主要通过 Harris 途径合成异戊醇。【结论】本研究揭示了酒醅来源 5 个属种酵母合成异戊醇的途径、能力与其生长时期的关系, 研究结果可为解析浓香型白酒发酵过程异戊醇合成、积累机制及实施白酒发酵过程异戊醇合成的精准调控提供理论依据。

关键词: 异戊醇; 酿酒酵母; 毕赤酵母; 纳氏酵母; 合成途径; 浓香型白酒

基金项目: 国家自然科学基金(32172182)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32172182)

*Corresponding author: E-mail: ffang@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-01-16; Accepted: 2022-02-22; Published online: 2022-03-22

Synthesis ability and pathways of isoamyl alcohol in yeasts from fermented grains

GU Xinzhe^{1,2,3,4}, FANG Fang^{*1,2,3,4}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Engineering Research Center of Ministry of Education on Food Synthetic Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 Jiangsu Province Engineering Research Center of Food Synthetic Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Isoamyl alcohol is the main higher alcohol synthesized by yeast via the catabolic Ehrlich pathway or by anabolic amino acid metabolism during Chinese spirit fermentation, and the content of isoamyl alcohol influences the drinkability of Chinese spirit. [Objective] To analyze and compare the ability of yeasts isolated from fermented grains to synthesize isoamyl alcohol and reveal the synthetic pathways of isoamyl alcohol in the yeasts. [Methods] Isoamyl alcohol-synthesizing yeast strains were isolated from fermented grains of strong-aroma Chinese spirit, and their capability of synthesizing isoamyl alcohol at different growth phases was compared. Moreover, the synthetic pathways of isoamyl alcohol in these strains were detected based on the metabolism of its precursors. [Results] The capability of synthesizing isoamyl alcohol by the five yeast strains isolated from the fermented grains was in the order of *Naumovozyma castellii* JP3-1>*Saccharomyces cerevisiae* JP3>*Pichia fermentans* JP22>*P. kudriavzevii* JP1>*Naumovozyma dairenensis* CBS421. Overall, isoamyl alcohol was synthesized mainly at the logarithmic phase, and it was also synthesized at the stationary phase of *N. castellii* JP3-1, *P. fermentans* JP22, and *N. dairenensis* CBS421. In addition, it was synthesized via the Harris pathway in the whole growth periods of *S. cerevisiae* JP3, *N. castellii* JP3-1, and *N. dairenensis* CBS421 and via the Ehrlich pathway in the whole growth period of *P. kudriavzevii* JP1. At the logarithmic phase, the isoamyl alcohol-synthesizing ability of *P. fermentans* JP22 through Harris pathway was identical to that through the Ehrlich pathway. However, *P. fermentans* JP22 at the stationary phase mainly synthesized isoamyl alcohol via the Harris pathway. [Conclusion] This study revealed the relationship of the synthesis ability and pathways of isoamyl alcohol in five yeast strains isolated from fermented grains with their growth phase. The result lays a theoretical basis for analyzing the mechanism of isoamyl alcohol synthesis and accumulation in the fermentation process of strong-aroma Chinese spirit and the precisely regulating isoamyl alcohol synthesis during the fermentation of strong-aroma Chinese spirit.

Keywords: isoamyl alcohol; *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia*; *Naumovozyma*; synthetic pathway; strong-aroma Chinese spirit

白酒发酵体系是混菌发酵体系, 酵母菌是微生物体系中的关键功能微生物之一^[1]。它们与白酒中的醇和酯等风味物质的合成与形成有

关, 对白酒的风味和品质有重要的影响^[2-4]。高级醇是白酒中风味物质的重要组成部分, 其含量的高低会影响白酒的品质和饮用舒适度^[5]。异

戊醇是浓香型白酒中的主要高级醇,其味微甜偏苦,含量过高时会导致酒体口感苦涩,增加白酒饮后的不适感,表现为“上头”和“易醉”^[6-11]。由于浓香型白酒发酵的复杂性,目前对发酵过程中各类酵母参与合成异戊醇的途径尚不完全清楚,这使得精准调控发酵过程中异戊醇的合成变得较为困难。在白酒发酵过程中,有多种酵母参与发酵,来源于酒醅的很多酵母菌属均可以合成异戊醇,但合成能力存在差异^[12-16],合成途径及其合成水平受环境因素影响的调控机制也可能不完全一样。因此,揭示白酒发酵体系中各类酵母合成异戊醇的途径和能力差异,对于评估它们在不同发酵时期对异戊醇合成的贡献,从而实现精准调控白酒发酵过程中的异戊醇合成水平具有重要意义。

在白酒发酵过程中,以 *Saccharomyces cerevisiae* 为代表的酵母菌可以通过氨基酸合成代谢途径(Harris 途径)和氨基酸分解代谢途径(Ehrlich 途径)合成异戊醇^[12,17]。通过氨基酸合成代谢途径(Harris 途径)合成异戊醇是指葡萄糖经过糖酵解作用生成丙酮酸,丙酮酸在乙酰乳酸合酶(acetolactate synthase, ILV2)、羟酸还原原异构酶(acetohydroxyacid reductoisomerase, ILV5)和二羟酸脱水酶(dihydroxyacid dehydratase, ILV3)的作用下生成 α -酮异戊酸,生成的 α -酮异戊酸进一步在2-异丙基苹果酸合酶(2-isopropylmalate synthase, LEU4)、3-异丙基苹果酸脱水酶(3-isopropylmalate dehydratase, LEU1)和3-异丙基苹果酸脱氢酶(3-isopropylmalate dehydrogenase, LEU2)的作用下生成 α -酮异己酸,若氨基供给充足, α -酮异己酸与氨基结合生成亮氨酸;若氨基供应不足, α -酮异己酸则通过脱羧、还原反应生成异戊醇^[18-19]。氨基酸分解代谢途径(Ehrlich 途径)则是亮氨酸或缬氨酸经过转氨、脱羧和还原反应

生成异戊醇^[20]。对清香型白酒发酵过程中微生物与风味物质的相关性分析表明,酵母与白酒中的异戊醇呈现较强的正相关^[21],并且 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Pichia kudriavzevii* 是主要合成高级醇的酵母菌;其中 *P. kudriavzevii* 影响 *S. cerevisiae* 合成高级醇的量^[17,22]。在研究浓香型糟醅中优势酵母与风味物质含量变化规律时发现, *Geotrichum silvicola*、*S. cerevisiae*、*P. kudriavzevii* 和 *Zygosaccharomyces bailii* 可能参与浓香型白酒中主要高级醇异戊醇的合成^[23]。对白酒发酵过程酒醅中微生物宏转录组的分析证实, *S. cerevisiae*、*P. kudriavzevii* 和 *Naumovozyma dairenensis* 等是浓香型白酒发酵过程中合成异戊醇的重要酵母菌^[24]。其中,在浓香型白酒发酵的第一个异戊醇合成时期(0-7 d)对异戊醇合成有贡献的酵母菌主要是 *S. cerevisiae* 和 *P. kudriavzevii*, 而且 *S. cerevisiae* 主要通过 Harris 途径合成异戊醇而 *P. kudriavzevii* 主要通过 Ehrlich 途径合成异戊醇^[24]。上述研究虽然证实了 *Saccharomyces*、*Pichia* 等微生物与白酒发酵过程异戊醇的合成相关,但是除酿酒酵母外,其他属种的酵母菌合成异戊醇的途径和水平尚不十分清楚。因此,解析酒醅酵母合成异戊醇的能力与途径,阐明酒醅酵母合成异戊醇的机制,实现白酒发酵过程中异戊醇的精细化调控,对于改善白酒的风味和品质有重要意义。

本研究将以分离自浓香型白酒酒醅的具有异戊醇合成能力的酵母菌为研究对象,通过分析它们合成异戊醇的途径与合成能力及生长时期对异戊醇合成的影响,阐明酒醅酵母在不同生长时期合成异戊醇的能力及合成途径,以期为实现白酒发酵过程中精准调控异戊醇的合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品收集

研究所使用大曲和入池酒醅由某浓香型酒厂提供,按照“五点取样法”取发酵时间为 0、3、7、14 d 的发酵酒醅,分别混匀后放置于无菌密封袋中,置于 -80°C 保存。

1.1.2 菌株与培养方法

酵母菌 *Pichia kudriavzevii* JP1、*Saccharomyces cerevisiae* JP3 和 *Pichia fermentans* JP22 为本课题组保藏菌株,均分离自浓香型白酒发酵酒醅;*Naumovozyma dairenensis* CBS421 购自生物风菌种保藏管理中心,*Naumovozyma castellii* JP3-1 为本研究获得,分离自浓香型白酒发酵酒醅。酵母使用 YPD 培养基进行活化,培养条件为 30°C 、220 r/min,培养 24 h。

酵母菌的计数采用稀释涂布平板法计数,使用孟加拉红琼脂平板计数。

1.1.3 培养基

实验中使用的培养基为 YPD 培养基^[16]、孟加拉红琼脂培养基^[24]和胰蛋白胨生理盐水溶液(g/L)^[25]。

1.1.4 主要试剂和仪器

葡萄糖、氯化钠、氯化铵、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠,国药集团化学试剂有限公司;亮氨酸,生工生物工程(上海)股份有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物,OXOID 有限公司;孟加拉红琼脂,青岛海博生物技术有限公司;异戊醇、叔戊醇标准品, Sigma-Aldrich 公司;; TIANamp Yeast DNA Kit, 天根生化科技有限公司;引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

气相色谱仪和紫外可见分光光度计,岛津公司;高效液相色谱, Agilent 公司;恒温培

养箱,上海跃进医疗器械厂;台式高速离心机和低温冷冻离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

1.2 酵母菌株的分离与鉴定

称取 10 g 酒醅样品装至有玻璃珠和 90 mL 胰蛋白胨生理盐水溶液的三角瓶中, 30°C , 160 r/min 培养 30 min。取上清液进行梯度稀释,涂布孟加拉红平板上, 30°C 培养至长出单菌落,挑取单菌落连续平板划线 3 次。

用 TIANamp Yeast DNA Kit 提取真菌的基因组 DNA,用表 1 中引物进行 PCR 扩增,扩增产物纯化后送苏州金唯智生物科技有限公司测序,测序数据在 NCBI 数据库中进行同源序列搜索,确定菌株的属种信息。

1.3 发酵毕赤酵母异戊醇合成途径基因注释

NCBI 数据库中虽有发酵毕赤酵母的全基因组,但缺少基因注释信息,本研究通过基因注释和 PCR 扩增验证的方式构建了 *Pichia fermentans* JP22 异戊醇合成途径。基因注释采用 2 种方法:(1) 以数据库中与 *Pichia fermentans* 亲缘关系较近的 *Pichia kudriavzevii* 基因组中相关基因为模板设计引物(表 1),测定扩增产物(以本研究所用 *Pichia fermentans* JP22 的基因组 DNA 为模板)的核苷酸序列,将获得的序列在 NCBI 中进行 BLASTx 比对,记录 top hit 为 *Pichia fermentans* 基因的登录号,再通过 BLASTp 核对相关基因是否为异戊醇合成途径的相关基因。(2) 从 NCBI 中下载 *Pichia fermentans* strain fo/MP/02 的基因组(登录号为 QAWB00000000),用开放阅读框架(open reading frame, ORF)逐一寻找各 contig 中的开放阅读框架,根据它们编码的氨基酸序列,通过 BLASTp 比对分析寻找方法(1)未识别的异戊醇合成途径的相关基因。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Primers used in this study

Target gene	Primer name	Sequence (5'→3')
26S rRNA	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
LEU2	KL2F1	ATCGTTCTTTTACCAGGAGACCA
	KL2R	GAGAGGAGCTTCTTCACTTCTGC
ILV5	KI5F	CAGCAGCAAGACTTGCAAGA
	KI5R	CTGGTCTCAACTTTCTGACTTCCT
BAT	FBF	TACTCTGCAACCTTGAAAACCTTG
	FBR	ATGTTCACTTCTTATCTTAAACAGTCAAGA
ILV5	FI5F	TAGTTGTTTTCTGGTCTCAACTTTCTG
	FI5R	ATGTACAGAAACGCAGCTGCAA
ILV2	FI2F	ATGCTCTCCAGATCAGTCTTCAGG
	FI2R	TCAATGCTTACCACCAGTTCTCTT
LEU2	FL2F	TCAATGCTTACCACCAGTTCTCTT
	FL2R	TTATGCGAGAAGCTTCTTCACTTC
LEU4	FL4F	TCAAACCTTGAGAAGACCCTTAGAC
	FL4R	ATGTTCAAACAAACTTTAGTGGTTCTC
PDC	FPF	ATGGAGAGACAAAGAGCGACTG
	FPR	CTATTCTGATATTGCTTCAACTTTTC

对识别到的基因根据基因的全长设计引物(表 1),以本研究中的 *Pichia fermentans* JP22 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物纯化后送苏州金唯智生物科技有限公司测序,并与数据库中基因的序列进行比对。

1.4 酵母菌合成异戊醇途径与合成时期分析

1.4.1 酵母合成异戊醇的能力验证

酵母活化之后以 10^5 CFU/mL 接种于装有 YPD 培养基带发酵栓的三角瓶中,30 °C 静置培养 48 h 后测定上清液中异戊醇含量。

1.4.2 酵母合成异戊醇的途径

酵母接种于含有 YPD 培养基带发酵栓的三角瓶中 30 °C 静置培养,培养至对数生长期(酿酒酵母培养至活菌数为 4×10^7 CFU/mL,其余 4 株酵母培养至活菌数为 5×10^6 CFU/mL),4 °C、5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 PBS 清洗菌体 2 遍,菌体量按照 10^7 CFU/mL 重悬于 PBS、含有 50 mmol/L 葡萄糖的 PBS、含 50 mmol/L 铵离子的 PBS、含 50 mmol/L 葡萄糖和铵离子

的 PBS 及含 50 mmol/L 亮氨酸的 PBS 中,30 °C 静置 2 h。测定上清液中异戊醇、葡萄糖、亮氨酸的含量。

1.4.3 酵母合成异戊醇的时期

将酵母菌株接种于装有 YPD 培养基的带发酵栓的三角瓶中,30 °C 静置培养 48 h。培养过程中每隔 12 h 进行取样,测定酵母菌数量和上清液中异戊醇含量。

1.5 酵母菌生长时期对异戊醇合成途径的影响

将酵母菌株接种于装有 YPD 培养基的带发酵栓的三角瓶中,30 °C 静置培养至对数生长期、稳定生长前期(酿酒酵母培养至活菌数为 8×10^7 CFU/mL,其余 4 株酵母培养至活菌数为 10^7 CFU/mL)和稳定生长中期(酵母培养至稳定生长前期的活菌数后再继续培养 12 h),4 °C、5000 r/min 离心 5 min 收集菌体,PBS 清洗菌体 2 遍,分别重悬至原培养基体积的 PBS、含 50 mmol/L 葡萄糖的 PBS、含 50 mmol/L 铵离子的 PBS、含 50 mmol/L 葡萄糖和铵离子的 PBS、

含 50 mmol/L 亮氨酸的 PBS 中, 30 °C 静置 1 h。反应后测定菌株数量和上清液中异戊醇、葡萄糖、亮氨酸的含量。单位菌体异戊醇的合成量定义为每 10^6 CFU/mL 酵母合成异戊醇的量。

1.6 检测方法

1.6.1 葡萄糖含量检测

葡萄糖采用高效液相色谱法^[22]测定。色谱柱: Aminex HPX-87H, 7.8 mm×300 mm; 流动相: 0.005 mol/L H₂SO₄; 柱温: 40 °C; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL/次; 检测器: 示差检测器; 分析时间: 30 min。

1.6.2 氨基酸含量检测

氨基酸含量采用高效液相色谱法^[26]测定。

发酵液 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 加入 5% (质量体积分数)的三氯乙酸除蛋白, 处理后的上清液经 0.22 μm 水系滤膜过滤后备用。氨基酸的含量测定采用邻苯二甲醛 (*o*-phthalaldehyde, OPA)进行柱前衍生测定。色谱柱: ODS HYPERSIL (250 mm×4.6 mm×5 μm); 流动相: A 相为 5 g/L 乙酸钠(含 0.2 mL/L 三乙胺, 5 mL/L 四氢呋喃), B 相为 5 g/L 乙酸钠-甲醇-乙腈(体积比为 1:2:2)溶液; 柱温: 40 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL/次; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 338 nm; 分析时间: 38 min。

1.6.3 异戊醇含量分析

向待测液体中加入终浓度为 10 mg/L 的叔戊醇, 采用顶空-气相色谱-氢离子火焰检测器检测异戊醇含量^[27]。具体方法: 色谱柱为 DB-Wax (30.0 m×0.32 mm×0.25 μm), 平衡温度 70 °C, 平衡时间 35 min。进样口温度 200 °C, 检测器温度 260 °C, 分流比 3:1; 升温程序: 初始温度 40 °C, 保持 5min, 然后以 10 °C/min 的速度升至 180 °C保持 5 min。使用氮气作为载气, 流速为 9 mL/min^[28]。

2 结果与分析

2.1 酒醅来源酵母菌合成异戊醇的能力与合成时期比较

本研究前期已获得与白酒中异戊醇合成相关的 *P. kudriavzevii* JP1、*S. cerevisiae* JP3 和 *P. fermentans* JP22^[24]。对浓香型白酒发酵过程中与异戊醇合成相关微生物的分析表明, *Naumovozyma* 酵母也与白酒窖内发酵过程异戊醇的合成呈正相关性^[24]。为研究在浓香型白酒发酵过程中与异戊醇合成相关的酵母, 本研究同时考察了 *P. kudriavzevii* JP1、*S. cerevisiae* JP3、*P. fermentans* JP22、*N. castellii* JP3-1 (本研究分离自酒醅)和 *N. dairenensis* CBS421 合成异戊醇的能力。由图 1 可以看出, *N. castellii* JP3-1、*N. dairenensis* CBS421、*P. kudriavzevii* JP1、*S. cerevisiae* JP3 和 *P. fermentans* JP22 在 YPD 培养基中均具有合成异戊醇的能力。*N. castellii* JP3-1 和 *S. cerevisiae* JP3 合成异戊醇的能力较强, *P. fermentans* JP22 和 *P. kudriavzevii* JP1 合成能力次之, *N. dairenensis* CBS421 合成能力最低。浓香型白酒发酵过程酒醅中相对丰度较高的是 *P. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* 和 *N. castellii*, 较低的是 *P. fermentans* 和 *N. dairenensis*^[24]。因此, 白酒发酵过程酒醅中各类酵母的丰度与数量变化对浓香型白酒异戊醇合成的贡献也有一定影响, 对不同酵母在浓香型白酒发酵过程中对异戊醇合成的贡献应结合其异戊醇合成能力和数量变化进行分析。此外, 通过考察酒醅来源酵母的生长与异戊醇合成之间的关系发现, *P. kudriavzevii* JP1 和 *S. cerevisiae* JP3 主要在对数生长期合成异戊醇; *P. fermentans* JP22 和 *N. castellii* JP3-1 均有 2 个异戊醇合成时期, 即对数生长期和稳定期前期, 其中 *N. castellii* JP3-1 合成异戊醇的主要时期为稳定期前期; *N. dairenensis* CBS421 在整个生长时期均能合成异戊醇(图 1)。

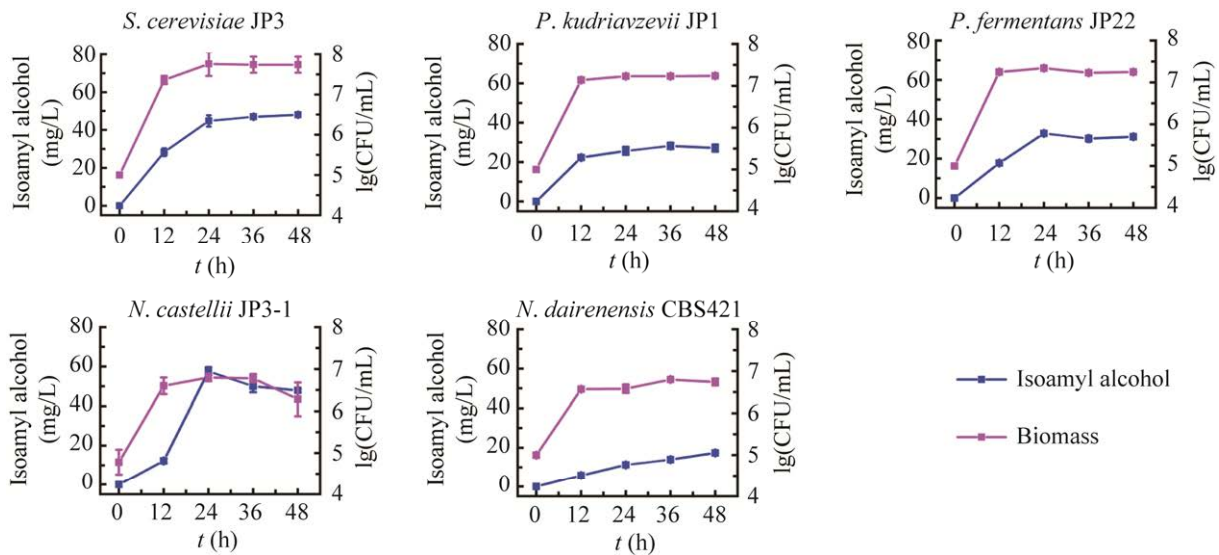


图 1 酵母菌生长与异戊醇合成之间的关系

Figure 1 The relationship between growth of yeast strains and synthesis of isoamyl alcohol.

2.2 酒醅来源酵母菌合成异戊醇途径解析

2.2.1 发酵毕赤酵母异戊醇合成途径基因的发现

前期研究证实,在 YPD 培养基体系中 *P. fermentans* JP22 合成异戊醇的能力低于 *S. cerevisiae* JP3 但高于 *P. kudriavzevii* JP1; 在五粮固体培养基中 *S. cerevisiae* JP3 和 *P. fermentans* JP22 合成异戊醇的量高于对照和 *P. kudriavzevii* JP1^[24]。这说明 *P. fermentans* 对浓香型白酒发酵过程异戊醇的合成有贡献,然而在浓香型白酒发酵酒醅转录组数据中并无 *P. fermentans* 异戊醇合成途径相关基因的表达量^[24]。这是因为 NCBI 数据库中仅有 *P. fermentans* 的全基因组序列,无各基因的注释。为进一步分析 *P. fermentans* 在白酒发酵过程中对异戊醇合成的贡献,本研究构建了 *P. fermentans* 合成异戊醇的途径。采用开放阅读框(open reading frame, ORF)蛋白序列比对的方法识别到 BAT、ILV2、LEU4 和 PDC 的基因序列;通过设计同属酵母异戊醇合成相关基因 ILV5、LEU2 的引物进行 PCR,鉴别了 ILV5、LEU2 基因序列。

未识别的基因有 ILV3、LEU1 和 ADH,对已识别的基因设计引物进行了 PCR 验证(图 2),PCR 产物测序后与数据库中已识别到的基因序列进行了比对,序列的相似度为 99%以上。根据酿酒酵母的异戊醇合成途径,基于发酵毕赤酵母已经识别的 BAT、ILV2、LEU4、PDC、ILV5 和 LEU2 基因^[18-19,29-30],本研究重新绘制了 *P. fermentans* JP22 合成异戊醇的途径(图 3)。



图 2 发酵毕赤酵母异戊醇合成途径基因的 PCR 验证

Figure 2 PCR verification of isoamyl alcohol synthetic pathway genes of *P. fermentans*.

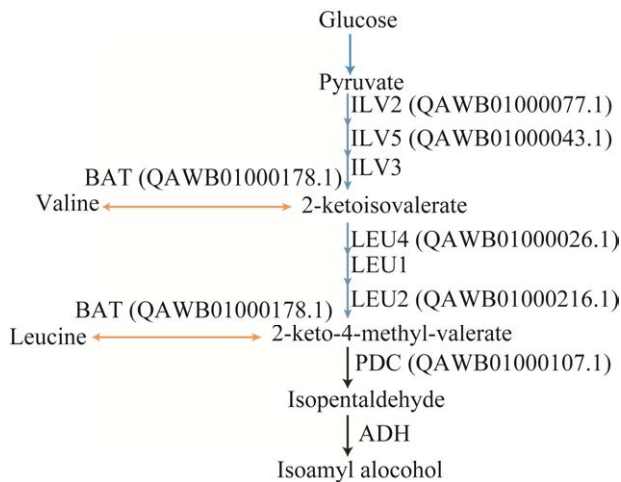


图 3 发酵毕赤酵母异戊醇合成途径 ILV2: 乙酰乳酸合酶; ILV5: 羟酸还原异构酶; ILV3: 二羟酸脱水酶; LEU4: 2-异丙基苹果酸合酶; LEU1: 3-异丙基苹果酸脱水酶; LEU2: 3-异丙基苹果酸脱氢酶; PDC: 丙酮酸脱羧酶; ADH: 醇脱氢酶; BAT: 支链氨基酸转氨酶

Figure 3 Synthetic pathways of isoamyl alcohol synthesis in *P. fermentans*. ILV2: Acetolactate synthase; ILV5: Acetohydroxyacid reductoisomerase; ILV3: Dihydroxyacid dehydratase; LEU4: 2-isopropylmalate synthase; LEU1: 3-isopropylmalate dehydratase; LEU2: 3-isopropylmalate dehydrogenase; PDC: Pyruvate decarboxylase; ADH: Alcohol dehydrogenase; BAT: Branched-chain amino acid aminotransferase.

2.2.2 酒醅来源酵母菌合成异戊醇途径的初步解析

酵母可以通过氨基酸合成代谢途径和氨基酸分解代谢途径合成异戊醇, 所以体系中前体的种类与含量可以影响酵母合成异戊醇的途径。为了确定酒醅来源酵母菌合成异戊醇的途径, 本研究考察了它们在含有不同前体的反应体系中合成异戊醇的能力。由图 4 可知, 当体系中含有葡萄糖但缺少氨基时, 考察的所有酵母菌都利用葡萄糖合成异戊醇且不合成亮氨酸; 有氨基供给(添加葡萄糖和铵离子)时, 酵母

合成异戊醇水平降低并合成亮氨酸。这说明 *P. kudriavzevii* JP1、*S. cerevisiae* JP3、*P. fermentans* JP22、*N. castellii* JP3-1 和 *N. dairenensis* CBS421 均可通过氨基酸合成代谢途径(Harris 途径)合成异戊醇。其中 *N. castellii* JP3-1 通过 Harris 途径合成异戊醇水平高于 *N. dairenensis* CBS421、*S. cerevisiae* JP3、*P. fermentans* JP22 通过 Harris 途径合成异戊醇水平高于 *P. kudriavzevii* JP1 低于 *S. cerevisiae* JP3。当反应体系中只含有亮氨酸时, 这 5 株酵母菌均能合成异戊醇, 表明它们均可通过氨基酸分解代谢途径(Ehrlich 途径)合成异戊醇。其中, *N. castellii* JP3-1 通过 Ehrlich 途径合成异戊醇水平显著高于 *S. cerevisiae* JP3, *N. dairenensis* CBS421 通过 Ehrlich 途径合成异戊醇水平显著低于 *S. cerevisiae* JP3, 略高于 *P. fermentans* JP22 和 *P. kudriavzevii* JP1。

2.3 生长时期对酵母异戊醇合成途径的影响

本研究发现, 不同属种酵母菌在不同生长时期合成异戊醇的能力存在差异(图 1)。为了进一步了解酒醅来源酵母菌在浓香型白酒窖内发酵复杂环境下合成异戊醇的情况, 考察了处于不同生长时期酵母菌合成异戊醇的能力及其合成异戊醇的途径, 从而为评估白酒发酵各阶段酵母菌对异戊醇合成的贡献与影响提供理论参考。由图 5A 可以看出, *S. cerevisiae* JP3 对数生长期和稳定期合成异戊醇的能力和途径差异不大, 以 Harris 途径为主。*P. kudriavzevii* JP1 合成异戊醇能力低于 *S. cerevisiae* JP3, 合成途径以 Ehrlich 途径为主, 并且对数生长期和稳定期合成情况无显著差异(图 5B)。*P. fermentans* JP22 合成异戊醇的途径在不同生长时期存在显著差异。对数生长期其通过 Harris 途径和 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力基本相同, 在稳定期主要通过 Harris 途径合成异戊醇且合成能

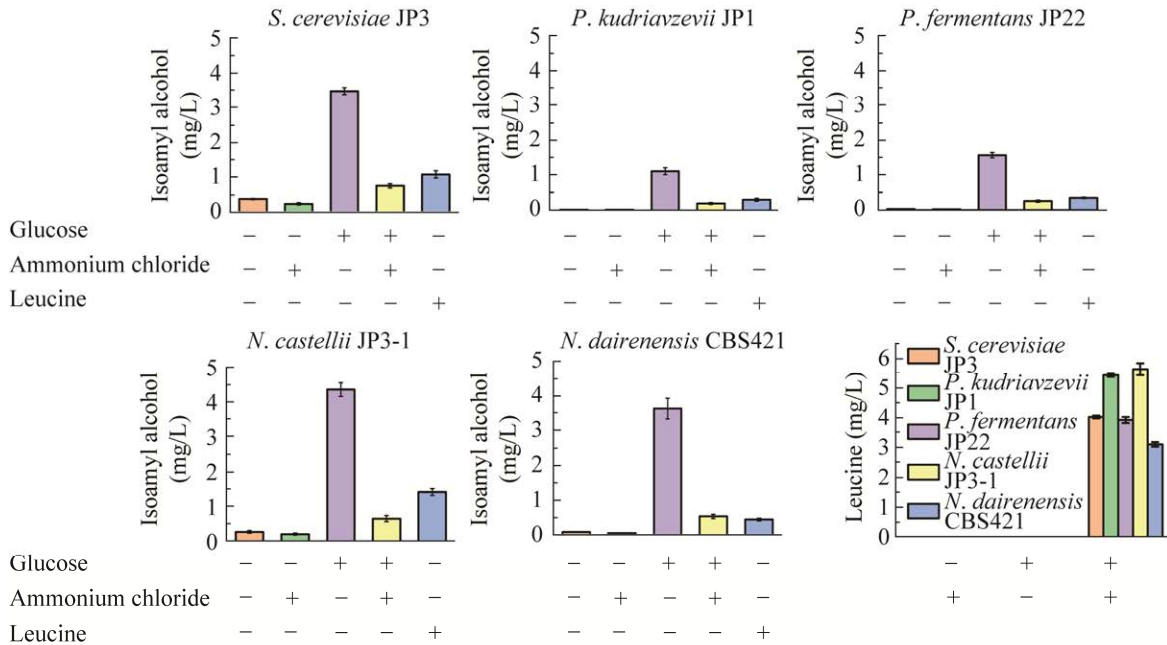


图4 酒醅来源酵母菌合成异戊醇途径分析 +: 含有; -: 不含有

Figure 4 Analysis synthetic pathways for synthesis of isoamyl alcohol in yeast strains isolated from fermented grains. +: Present; -: Absent.

力显著增加, 其稳定期前期合成异戊醇能力是对数期细胞的 2.2 倍, 并且高于 *S. cerevisiae* JP3 通过 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力(图 5C)。 *N. castellii* JP3-1 在对数生长期和稳定期前期合成异戊醇情况与 *S. cerevisiae* JP3 相似, 主要通过 Harris 途径合成异戊醇, 而且其合成能力显著高于 *S. cerevisiae* JP3, 但其稳定期后期通过 Harris 途径和 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力基本相同(图 5D)。 *N. dairenensis* CBS421 合成异戊醇能力是所有考察酵母菌中最高的, 而且不论是在对数生长期还是稳定期均主要通过 Harris 途径合成异戊醇(图 5E)。虽然 *N. dairenensis* CBS421 通过 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力比通过 Harris 途径低, 但其对数期细胞通过 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力却是所有酵母中最高的, 分别是 *S. cerevisiae* JP3、*P. kudriavzevii* JP1、*P. fermentans* JP22 和 *N. castellii* JP3-1 的 3.9、2.5、2.2 和 10.0 倍。酵母的生长时期会影

响酵母通过 Harris 途径和 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力, 这表明除发酵体系中碳源与氮源的比例会影响酵母两条异戊醇合成途径的活跃程度外, 生长时期也会影响酵母通过两条途径合成异戊醇的能力^[31-32]。

浓香型白酒窖内发酵过程中异戊醇合成分为两个时期: 0-7 d 的第一时期和 14-21 d 的第二时期。在第一个合成时期, 体系中还有氧气的存在并且在大曲酶系作用下糖和其他营养物质逐渐生成, 需氧酵母的生长和合成异戊醇主要在这一时期。这一时期, *Saccharomyces* 和 *Naumovozyma* 的丰度逐渐增加, *Pichia* 的相对丰度较为稳定^[24]。由此推测, 浓香型白酒窖内发酵过程第一个异戊醇合成时期是多个属种的酵母通过以 Harris 途径为主的多条途径合成。这一时期 *S. cerevisiae* 的含量最高, 因此 *S. cerevisiae* 通过 Harris 途径合成异戊醇是这一时期异戊醇的主要生成途径。 *Pichia* 的含量比 *S.*

cerevisiae 低, 它们对这一时期异戊醇合成的贡献低于 *S. cerevisiae*。其中 *P. kudriavzevii* 主要在这一时期的后期通过 Ehrlich 途径合成异戊醇, *P. fermentans* 前期通过 Harris 途径、后期通过 Ehrlich 途径合成异戊醇。*Naumovozya* 合成异戊醇能力虽然较强, 但它们在酒醅中的

含量较低, 可能在白酒发酵前期, 因为优势酵母(*S. cerevisiae* 和 *Pichia*)的营养竞争未检测到 *Naumovozya* 对异戊醇合成的贡献^[24], 但它们在这一时期的后期对异戊醇的合成有贡献, 并且该时期其主要通过 Ehrlich 途径合成异戊醇。

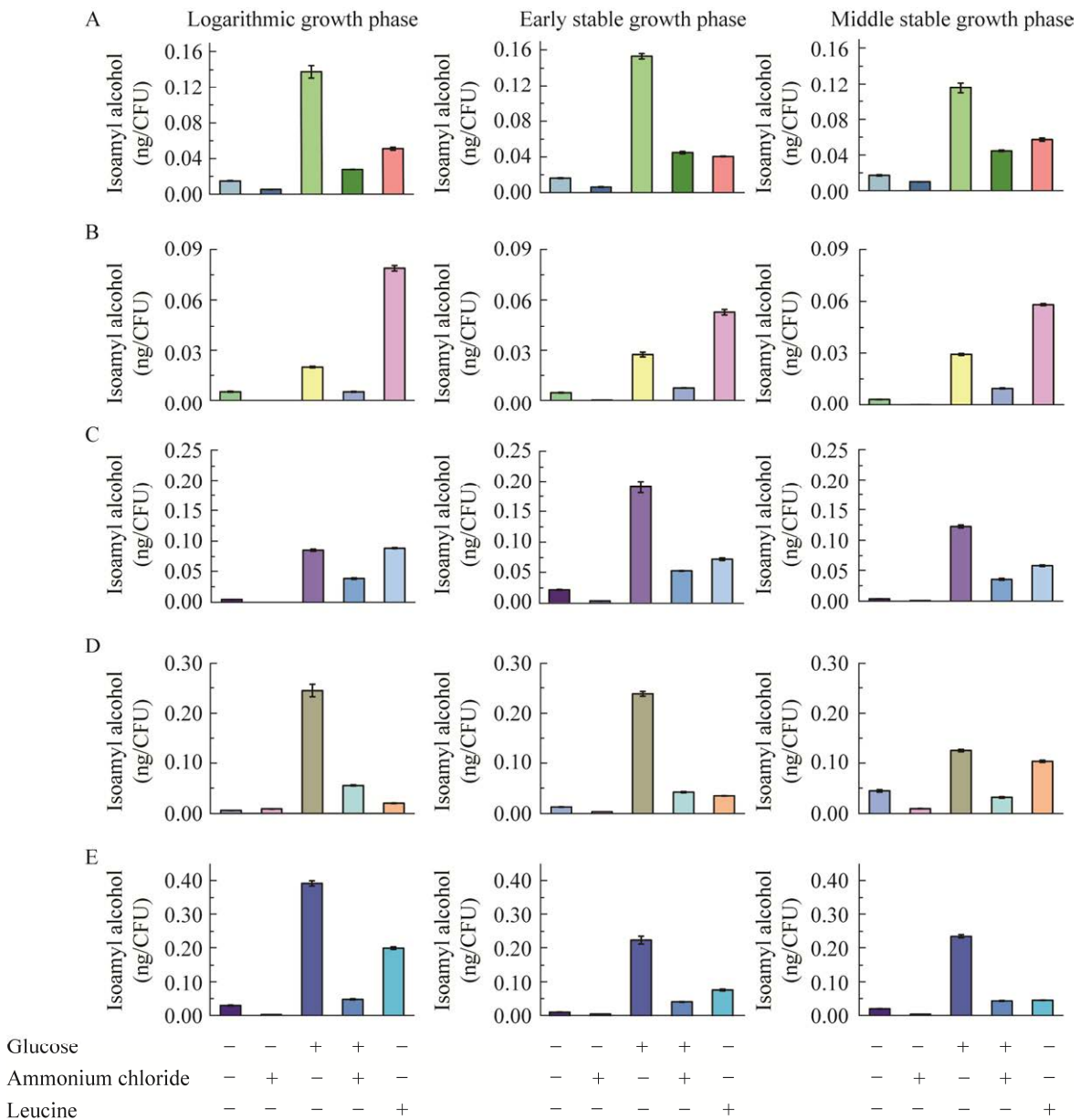


图 5 酵母生长时期对其合成异戊醇途径的影响 +: 含有; -: 不含有

Figure 5 Effect of yeasts' growth phase on isoamyl alcohol synthetic pathways. +: Present; -: Absent. A: *S. cerevisiae* JP3; B: *P. kudriavzevii* JP1; C: *P. fermentans* JP22; D: *N. castellii* JP3-1; E: *N. dairenensis* CBS421.

3 讨论与结论

浓香型白酒发酵过程中有多种酵母参与异戊醇的合成,除酿酒酵母外其他酵母合成异戊醇的途径尚不完全清晰,实现对异戊醇合成的有效调控尚存在一定困难。因此,解析酒醅中具有异戊醇合成能力酵母合成异戊醇的时期和途径等,有利于理解白酒发酵过程中异戊醇的形成过程,为实现白酒发酵过程异戊醇合成与积累的有效调控提供理论依据。

本研究证实了酒醅酵母 *S. cerevisiae* JP3、*P. fermentans* JP22、*P. kudriavzevii* JP1、*N. castellii* JP3-1 和 *N. dairenensis* 均可以合成异戊醇,并且 *N. castellii* JP3-1 合成异戊醇水平较高。这些酵母合成异戊醇主要在其对数生长期, *P. fermentans* JP22、*N. castellii* JP3-1 和 *N. dairenensis* CBS421 在生长稳定期也能合成异戊醇。在发现了 *P. fermentans* JP22 的异戊醇合成途径相关基因的基础上,证明了 *S. cerevisiae* JP3、*P. fermentans* JP22、*P. kudriavzevii* JP1、*N. castellii* JP3-1 和 *N. dairenensis* CBS421 均可以通过氨基酸合成代谢途径(Harris 途径)和氨基酸分解代谢途径(Ehrlich 途径)合成异戊醇。酵母的生长时期会显著影响 *P. fermentans* JP22、*N. castellii* JP3-1 和 *N. dairenensis* CBS421 通过 Harris 途径或 Ehrlich 途径合成异戊醇的能力,酵母的生长时期对 *S. cerevisiae* JP3 和 *P. kudriavzevii* JP1 通过 Harris 途径或 Ehrlich 途径合成异戊醇能力的影响不显著。*N. castellii* JP3-1、*N. dairenensis* CBS421 和 *P. fermentans* JP22 对白酒发酵过程中异戊醇的合成有重要贡献。酒醅酵母在不同生长时期通过两条途径合成异戊醇的能力及酵母在酒醅中的相对丰度会直接或间接地影响白酒发酵过程中异戊醇的积累,这为深入理解白酒发酵过程中异戊醇的积累及有效调控提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] Fang C, Du H, Jia W, Xu Y. Compositional differences and similarities between typical Chinese baijiu and western liquor as revealed by mass spectrometry-based metabolomics[J]. *Metabolites*, 2018, 9(1): 2
- [2] 曾朝珍, 张永茂, 康三江, 张霁红, 张芳, 张海燕. 发酵酒中高级醇的研究进展[J]. *中国酿造*, 2015, 34(5): 11-15
Zeng CZ, Zhang YM, Kang SJ, Zhang JH, Zhang F, Zhang HY. Research progress of higher alcohols in fermented wine[J]. *China Brewing*, 2015, 34(5): 11-15 (in Chinese)
- [3] 杨国华, 邱树毅, 黄永光. 酱香白酒生产中产香微生物研究[J]. *中国酿造*, 2011, 30(4): 24-27
Yang GH, Qiu SY, Huang YG. Microbiology research of liquor production[J]. *China Brewing*, 2011, 30(4): 24-27 (in Chinese)
- [4] Liu J, Wu Q, Wang P, Lin JC, Huang L, Xu Y. Synergistic effect in core microbiota associated with sulfur metabolism in spontaneous Chinese liquor fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(24): e01475-e01417
- [5] 蒋洋, 张翠英, 李于, 肖冬光. 酒类风味物质对人体乙醇代谢影响的研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(15): 242-250
Jiang Y, Zhang CY, Li Y, Xiao DG. Effect of flavor substances in alcoholic beverages on ethanol metabolism in human body: a review[J]. *Food Science*, 2021, 42(15): 242-250 (in Chinese)
- [6] 曾礼兰, 刘媛春, 方帅, 孙群, 胡承. 基于香气活力值分析白酒风味化合物对乙醇代谢关键酶的影响[J]. *中国酿造*, 2021, 40(2): 170-174
Zeng LL, Liu YC, Fang S, Sun Q, Hu C. Effects of flavor compounds of Baijiu on the activities of the key enzymes of ethanol metabolism by odor activity value[J]. *China Brewing*, 2021, 40(2): 170-174 (in Chinese)
- [7] 格绒泽仁, 皇甫洁, 韩兴林, 江伟, 王德良, 刘书亮. 浓香型白酒饮用后不适感关键高级醇类物质关联性判定新方法[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(14): 191-195
Gerong ZR, Huang FJ, Han XL, Jiang W, Wang DL, Liu SL. A method for determining associations between drinking discomforts and key higher alcohols in strong-aroma Baijiu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(14): 191-195 (in Chinese)
- [8] 徐佳楠, 皇甫洁, 刘薇, 倪永培, 董建辉, 项兴本, 王少磊, 韩兴林, 王德良. 影响浓香型白酒醉酒程度的风味物质特异性分析[J]. *中国酿造*, 2020, 39(7): 156-162

- Xu JN, Huang FJ, Liu W, Ni YP, Dong JH, Xiang XB, Wang SL, Han XL, Wang DL. Analysis of flavor substances affecting the intoxication of strong-flavor Baijiu[J]. *China Brewing*, 2020, 39(7): 156-162 (in Chinese)
- [9] Gao WJ, Fan WL, Xu Y. Characterization of the key odorants in light aroma type Chinese liquor by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(25): 5796-5804
- [10] Xie J, Tian XF, He SG, Wei YL, Peng B, Wu ZQ. Evaluating the intoxicating degree of liquor products with combinations of fusel alcohols, acids, and esters[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2018, 23(6): 1239
- [11] Wang XX, Fan WL, Xu Y. Comparison on aroma compounds in Chinese soy sauce and strong aroma type liquors by gas chromatography – olfactometry, chemical quantitative and odor activity values analysis[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 239(5): 813-825
- [12] Wang DQ, Chen LQ, Yang F, Wang HY, Wang L. Yeasts and their importance to the flavour of traditional Chinese liquor: a review[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2019, 125(2): 214-221
- [13] 肖敏, 王贵银, 刘复今. 高粱固态白酒发酵中菌类产生高级醇的研究[J]. *食品与发酵工业*, 1996, 22(3): 1-7
Xiao M, Wang GY, Liu FJ. Study on higher alcohols production by microbes in the course of *Sorghum* solid-state Chinese-liquor fermentation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 1996, 22(3): 1-7 (in Chinese)
- [14] 游玲, 任羽, 王涛, 杨志荣. 酵母对浓香型白酒糟醅中高级醇生成的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2): 23-28
You L, Ren Y, Wang T, Yang ZR. Effects of yeasts on higher alcohols forming in Chinese strong-flavored liquor producing[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(2): 23-28 (in Chinese)
- [15] 张双燕. 清香型白酒风味物质形成与大曲微生物相关性研究[D]. 北京: 北京理工大学硕士学位论文, 2016
Zhang SY. Correlation study between flavor substances and daqu microbes in Fen-flavor liquor[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Institute of Technology, 2016 (in Chinese)
- [16] 张霞, 郑佳, 赵东, 乔宗伟, 安明哲, 杨康卓, 罗青春. 多粮浓香型白酒中特征酵母菌与耐酸乳杆菌的关系[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(7): 1571-1581
Zhang X, Zheng J, Zhao D, Qiao ZW, An MZ, Yang KZ, Luo QC. Relationship between typical yeasts and *Lactobacillus acetotolerans* in multi-grain strong aroma Baijiu[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(7): 1571-1581 (in Chinese)
- [17] 曲冠颐, 唐洁, 姜健, 杨强, 刘源才, 吴群, 陈申习, 徐岩. 小曲清香型白酒发酵过程微生物菌群合成高级醇代谢特征[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(11): 32-37
Qu GY, Tang J, Jiang J, Yang Q, Liu YC, Wu Q, Chen SX, Xu Y. Metabolism characteristics of higher alcohols synthesized by microbiota in the fermentation process of light aroma type Baijiu started by Xiaoqu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(11): 32-37 (in Chinese)
- [18] Pires EJ, Teixeira JA, Brányik T, Vicente AA. Yeast: the soul of beer's aroma: a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(5): 1937-1949
- [19] Giudici P, Romano P, Zambonelli C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1990, 36(1): 61-64
- [20] El-Dalatony MM, Saha S, Govindwar SP, Abou-Shanab RAI, Jeon BH. Biological conversion of amino acids to higher alcohols[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(8): 855-869
- [21] 庞晓娜. 环境微生物对清香型白酒特征风味物质的影响[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018
Pang XN. Effect of environment microbiota on the characterized flavor compounds of light-flavor baijiu[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [22] Jiang J, Liu YC, Li HH, Yang Q, Wu Q, Chen SX, Tang J, Xu Y. Modeling and regulation of higher alcohol production through the combined effects of the C/N ratio and microbial interaction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(38): 10694-10701
- [23] 谭壹. 浓香型白酒糟醅优势酵母多样性及发酵特性研究[D]. 成都: 西华大学硕士学位论文, 2020
Tan Y. Study on yeast diversity and fermentation characteristics of Luzhou-flavor liquor fermented grains[D]. Chengdu: Master's Thesis of Xihua University, 2020 (in Chinese)
- [24] 田源. 浓香型白酒发酵过程高级醇形成机制解析[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2020
Tian Y. The mechanism of higher alcohols formation during Chinese Luzhou-flavor liquor fermentation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2020 (in

- Chinese)
- [25] 勾文君, 田源, 孔小勇, 吴菲菲, 方芳. 洋河酒窖泥细菌群落结构与菌株产酸能力分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1651-1661
- Gou WJ, Tian Y, Kong XY, Wu FF, Fang F. Bacterial composition in pit mud of Yanghe liquor and identification of acid producing bacteria[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1651-1661 (in Chinese)
- [26] Araque I, Bordons A, Reguant C. Effect of ethanol and low pH on citrulline and ornithine excretion and arc gene expression by strains of *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus pentosaceus*[J]. Food Microbiology, 2013, 33(1): 107-113
- [27] 芦丽, 宫旭. 静态顶空气相色谱法测定保健酒中的高级醇类和酯类[J]. 中国药师, 2019, 22(12): 2354-2358
- Lu L, Gong X. Determination of purified alcohols and esters in health wine by static headspace-gas chromatography[J]. China Pharmacist, 2019, 22(12): 2354-2358 (in Chinese)
- [28] 勾文君, 方芳. 窖泥梭菌扰动减控白酒发酵过程正丁醇生成[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(15): 43-49
- Gou WJ, Fang F. Control and reduction of n-butanol synthesis during Baijiu fermentation interfered with *Clostridia* in pit mud[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(15): 43-49 (in Chinese)
- [29] Hazelwood LA, Daran JM, Van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson JR. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(8): 2259-2266
- [30] 刘灿珍, 秦伟帅, 孙玉霞, 赵新节. 酿酒酵母高级醇合成路径及关键基因[J]. 中国酿造, 2018, 37(8): 9-13
- Liu CZ, Qin WS, Sun YX, Zhao XJ. Synthesis pathway and key genes of the higher alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Brewing, 2018, 37(8): 9-13 (in Chinese)
- [31] 雷宏杰. 高浓麦汁氮源组成对酵母氨基酸同化及发酵调控影响的研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2014
- Lei HJ. Study of the effects of nitrogen composition in high gravity wort on the assimilation of amino acids by lager yeast and fermentation control[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2014 (in Chinese)
- [32] 孙中贯, 刘琳, 王亚平, 王雪山, 肖冬光. 酿酒酵母高级醇代谢研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 429-447
- Sun ZG, Liu L, Wang YP, Wang XS, Xiao DG. Higher alcohols metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*: a mini review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(2): 429-447 (in Chinese)