

研究报告

酱香型白酒酿造主要功能菌株对拜耳接合酵母的作用

许焰 吴群* 徐岩

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 酿造微生物学及应用酶学研究中心
江苏 无锡 214122)

摘要:【背景】拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)是酱香型白酒自然酿造过程中的优势菌株,但白酒酿造功能菌株对其酿造特征的影响尚不清晰。【目的】分析酱香型白酒酿造体系中3株主要功能菌株对*Z. bailii*的作用,揭示其在白酒酿造过程中的发酵特征。【方法】分别构建拜耳接合酵母与酿酒酵母、布氏乳酸杆菌和地衣芽孢杆菌的共培养体系,比较生物量、pH、乙醇及风味物质代谢差异;基于表型差异,从转录组学角度进一步分析拜耳接合酵母与地衣芽孢杆菌共培养的代谢机制。【结果】在共培养体系中,拜耳接合酵母的生长及乙醇代谢受到酿酒酵母的抑制,而不受布氏乳酸杆菌和地衣芽孢杆菌的影响。同时,拜耳接合酵母与酿酒酵母、布氏乳酸杆菌共培养时的风味物质产量下降;但与地衣芽孢杆菌共培养时,其风味代谢却显著提高,其中醇类、酸类、酯类和醛类物质含量较其纯培养时分别上升了41%、36%、44%和73%。转录组数据分析表明,与地衣芽孢杆菌共培养时,拜耳接合酵母中与碳水化合物代谢和氨基酸代谢相关的基因表达显著上调(≥ 2 -fold, $P < 0.05$),而碳水化合物和氨基酸是风味物质的主要来源,其相关基因的表达上调有助于拜耳接合酵母的风味代谢。【结论】共培养体系中,地衣芽孢杆菌促进了拜耳接合酵母风味代谢,使之形成更多的醇类、酸类、酯类及醛类物质。研究拜耳接合酵母与主要酿造微生物共培养时的发酵特征,有助于正确认识其在酱香型白酒发酵过程中的功能和应用。

关键词: 酱香型白酒, 拜耳接合酵母, 相互作用, 转录组学

Effects of main functional strains on *Zygosaccharomyces bailii* in Chinese *Maotai*-flavor liquor fermentation

XU Yan WU Qun* XU Yan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Background] *Zygosaccharomyces bailii* is a dominant strain in Chinese *Maotai*-flavor liquor spontaneous fermentation. However, the effects of other functional strains on *Z. bailii* is unclear. [Objective] We studied the effects of three other main strains on *Z. bailii* by co-culture.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31371822)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918201; E-mail: wuqun_1981@163.com

Received: March 07, 2017; Accepted: April 21, 2017; Published online (www.cnki.net): July 04, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31371822)

*通信作者: Tel: 86-510-85918201; E-mail: wuqun_1981@163.com

收稿日期: 2017-03-07; 接受日期: 2017-04-21; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-07-04

[Methods] *Z. bailii* was separately cultured with *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus buchneri*, or *Bacillus licheniformis*. Biomass, pH, ethanol and flavor compounds were determined during the fermentation. Based on the analysis of phenotypic differences, a comparative transcriptome analysis was used to reveal the fermentation mechanisms of *Z. bailii* in mixed culture with *B. licheniformis*.

[Results] In mixed cultures, the growth and ethanol production of *Z. bailii* were inhibited by *S. cerevisiae*, whereas were not affected by *L. buchneri* or *B. licheniformis*. Meanwhile, flavor compounds production of *Z. bailii* was reduced by *S. cerevisiae* or *L. buchneri*, but was promoted by *B. licheniformis* and among them, alcohols, acids, esters and aldehydes increased by 41%, 36%, 44% and 73%, respectively, compared with those in the *Z. bailii* single culture. Transcriptome analysis of *Z. bailii* showed that genes related to the metabolism of carbohydrate and amino acids, were significantly up-regulated (≥ 2 -fold, $P < 0.05$) in mixed culture with *B. licheniformis*. Flavor compounds mainly derived from the metabolism of carbohydrates and amino acids. Therefore, those up-regulated genes might be beneficial for flavor compounds production of *Z. bailii*. **[Conclusion]** *Z. bailii* produced more favor compounds in the co-culture fermentation with *B. licheniformis*, including alcohols, acids, esters and aldehydes.

Keywords: Maotai-flavor liquor, *Zygosaccharomyces bailii*, Interaction, Transcriptome

拜耳接合酵母是酱香型白酒发酵过程中的优势菌株^[1-2], 认识其在白酒发酵中的功能, 对于解析白酒酿造机制具有重要作用。虽然在其他发酵食品中拜耳接合酵母被认为是腐败酵母, 能够导致蛋黄酱、沙拉酱、调味汁和葡萄酒等食品的腐败^[3-4]。但近期研究表明, 在葡萄酒酿造过程中, 拜耳接合酵母可以与酿酒酵母一同启动发酵, 增加葡萄酒中乙酯的产量, 提高葡萄酒的品质^[5]。因此, 研究拜耳接合酵母与其他酿造微生物的相互作用, 有助于正确认识拜耳接合酵母在食品发酵中的功能。

酱香型白酒酿造是一个多菌种混合发酵的复杂过程, 微生物间的相互作用会对个体生理代谢产生较大影响, 进而影响白酒的品质^[6-7]。在酱香型白酒酿造过程中, 微生物以细菌和酵母占据绝对优势^[8]。酵母中以拜耳接合酵母和酿酒酵母为绝对优势菌株, 进行酒精生产及多种风味物质合成, 对白酒的产酒率、酒质至关重要^[2,6,9]; 细菌中则以芽孢杆菌和乳酸菌为绝对优势菌株, 其中地衣芽孢杆菌能够产生 C4 类化合物, 如吡嗪类、芳香族类、酸类及酚类化合物等, 是产酱香型风味的重要贡献菌株^[10]; 乳酸杆菌的主要代谢产物乳酸, 可用于形成白酒中乳酸乙酯及其他重要香味成分^[7,11]。酿酒酵母、地衣芽孢杆菌、乳酸杆菌的功能都已研究得比较全面^[6-11], 但是拜耳接合酵母的功能目前还不

清晰。因此, 研究拜耳接合酵母与白酒中主要酿造微生物的相互作用, 对解析拜耳接合酵母在酱香型白酒酿造过程中的功能及完善酱香型白酒酿造理论体系具有重要意义。

本文以拜耳接合酵母作为出发菌株, 分别构建酿酒酵母、布氏乳酸杆菌及地衣芽孢杆菌的纯培养和混合培养发酵体系, 并结合转录组学从分子层面研究其相互作用机制, 这有利于深入了解拜耳接合酵母在酱香型白酒酿造过程中的发酵特征及代谢机制, 同时进一步完善酱香型白酒酿造理论体系, 对实现白酒酿造过程中微生物的定向调节与控制具有重要价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

拜耳接合酵母 (*Zygosaccharomyces bailii*) CGMCC4745、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) CCTCCM2014463、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) CGMCC3962 及布氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus buchneri*)^[12]均筛选自茅台酱香型白酒发酵酒醅, 为本实验室的保藏菌株。

1.1.2 培养基

平板培养基: *Z. bailii* 和 *S. cerevisiae* 采用

YPD 培养基^[6], *B. licheniformis* 采用 LB 培养基^[6], *L. buchneri* 采用 MRS 培养基^[7]。发酵培养基: 高粱汁发酵培养基^[6]。

1.1.3 主要试剂和仪器

氯化钠、无水葡萄糖、琼脂粉、乙醇、三氯乙酸, 国药集团化学试剂(北京)有限公司; MRS 培养基、酵母浸膏、蛋白胨, Oxoid 公司; SYBR Green Supermix、PCR 试剂、RNA 提取试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; 液化酶、糖化酶, 江苏锐阳生物科技有限公司。

实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 精密 pH 计, 美国 Mettler-Toledo 公司; 液相色谱仪、气相色谱质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; 凝胶成像仪, 美国 Protein Simple 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养

将-80 °C 冻藏的 *Z. bailii*、*S. cerevisiae*、*L. buchneri* 和 *B. licheniformis* 分别于对应的平板培养基中活化, 挑取单菌落接入高粱汁培养基中培养 16 h 作为种子液, 最后分别按 1×10^6 CFU/mL 浓度接入装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中发酵培养。培养方式为酵母纯培养、细菌纯培养以及 *Z. bailii* 分别与 *S. cerevisiae*、*L. buchneri* 和 *B. licheniformis* 按 1:1 比例进行混合培养。发酵条件为 30 °C、200 r/min 好氧培养 48 h。定时取样, 测定发酵液中的生物量、pH、乙醇及风味物

质含量, 并取 24 h *Z. bailii* 纯培养、*Z. bailii* 与 *B. licheniformis* 混合培养的发酵样品做转录组学分析。

1.2.2 生物量测定

采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 的方法进行生物量测定。*Z. bailii* 以 26S rRNA 基因为目标基因设计专一性引物 ZBF 和 ZBR^[13]; *S. cerevisiae* 以 *MRP2* 为目标基因设计专一性引物 SCF 和 SCR^[14]; *L. buchneri* 以 16S rRNA 为目标基因设计专一性引物 LBF 和 LBR; *B. licheniformis* 以 16S rRNA 基因为目标基因设计专一性引物 BLF 和 BLR (表 1)。用平板计数法计数 *Z. bailii*、*S. cerevisiae*、*L. buchneri* 和 *B. licheniformis* 纯培养发酵液中的浓度, 各菌株分别稀释涂布于对应的平板培养基中, 培养至长出单菌落后进行平板计数。同时, 取 1 mL 各菌株发酵液提取基因组, 以连续 10 倍梯度稀释液作为模板进行 qPCR, 建立基因拷贝数与活菌数之间的标准曲线。实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L: SYBR Green Supermix 10 μ L, 上、下游引物 (20 μ mol/L) 0.4 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。反应条件为: 98 °C 3 min; 98 °C 3 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环, 每次反应结束后, 读板温度从 60 °C 梯度升温至 95 °C, 每隔 0.5 °C 读板一次, 绘制溶解曲线。以阈值循环数 C_t 值为纵坐标, 活菌数的对数为横坐标绘制标准曲线。各菌株的专一性引物序列及实时荧光定量 PCR 标准曲线如表 1 所示。

表 1 各菌株专一性引物及标准曲线

Table 1 Specific primers and standard curves of strains

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	标准曲线 Standard curves (x: Log (CFU/mL), y: C_t)
ZBF	CATGGTGTGTTTGCGCC	$y = -3.488 2x + 43.750, R^2 = 0.999 7$
ZBR	CGTCCGCCACGAAGTGGTAGA	
SCF	GGACTCTGGACATGCAAGAT	$y = -3.055 3x + 43.387, R^2 = 0.998 3$
SCR	ATACCTTCTTAACACCTGGC	
LBF	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	$y = -3.233 9x + 40.235, R^2 = 0.999 4$
LBR	ATTYCACCCTACACATG	
BLF	AAAGCTGATTTGAAAGTCATTGGAGAT	$y = -3.249 3x + 41.081, R^2 = 0.997 9$
BLR	GAGTGCGGAGCGTATCATAGTC	

纯培养及混合培养实验中, 定时提取 1 mL 发酵液中总 DNA 作为模板, 采用相同条件进行实时荧光定量 PCR 特异性扩增, 根据标准曲线计算每毫升发酵液中的活菌数。

1.2.3 检测 pH

使用 pH 计测定发酵液的 pH。

1.2.4 乙醇含量测定

乙醇采用 HPLC 法测定^[6]。样品处理: 将 700 μ L 发酵液与 700 μ L 三氯乙酸(10%)混合, 4 $^{\circ}$ C 放置 1 h, 最后用 0.22 μ m 针头式滤器过滤。标准曲线为: $y=0.000\ 056\ 5x-2.05$, $R^2=0.999\ 8$, x 为峰面积, y 为乙醇浓度(g/L)。

1.2.5 风味物质含量测定

采用气相色谱-质谱(GC-MS)方法对挥发性产物进行检测^[15]。样品处理: 取 8 mL 发酵液, 加入装有 3 g NaCl 的顶空进样瓶中, 并添加 10 μ L 浓度为 100 mg/L 的薄荷醇为内标。

1.2.6 转录组测序

当 *Z. bailii* 纯培养及其与 *B. licheniformis* 混合培养至对数中后期时, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用无菌水洗涤 1 次, 随后于液氮中速冻 10 min 以上, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。转录组序列测定由上海派森诺生物技术有限责任公司完成, 使用 Illumina NextSeq 500 高通量测序平台, 测序方法详见参考文献^[16]。转录组测序中用 RPKM (Reads Per Kilo bases per Million reads) 值衡量每个基因在样本中的表达量, 计算公式为: $RPKM = \text{Total exon reads} / (\text{Mapped reads (millions)} \times \text{Exon length (kb)})$ 。通过 DESeq 方法^[17]筛选差异表达基因, 只有 Fold change ≥ 2 且 $P < 0.05$ 的基因才被认为是差异表达基因。纯培养及混合培养下 *Z. bailii* 的转录组测序数据已提交至 DDBJ 数据库, 序列号分别为 DRX082892 和 DRX082894。

1.2.7 转录组测序结果荧光定量 PCR 验证

对于进行转录组测序的样品, 使用 RNA 提取试剂盒抽提其 RNA, 后用随机引物反转录成 cDNA, 使用基因特异性引物, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测转录组测序结果的可靠性。以 *ACT1* 为内参基因, 引物如下: 5'-CGTTTCTATCCAGGC

CGTGT-3' (上游引物)和 5'-GATGGCATGAGGCATCGAGA-3' (下游引物)。基因特异性引物如下: *ENO1*: 5'-AGGTGCTGAGGTTTACCAGC-3' (上游引物)和 5'-TCTAGAGCCTCTTCGGCAGT-3' (下游引物); *MEP2*: 5'-AGGTATGTTTGCTGCGGTGA-3' (上游引物)和 5'-ACAGCTAACCATCCTTGGGC-3' (下游引物); *RGI1*: 5'-CGCAAGTTTGTGCGTCACTT-3' (上游引物)和 5'-TTCGCATCGTCGGCATA GTG-3' (下游引物)。

2 结果与分析

2.1 混合培养体系中 *Z. bailii* 和主要酿造微生物对彼此生长特征的影响

以 *Z. bailii*、*S. cerevisiae*、*L. buchneri* 及 *B. licheniformis* 纯培养为对照, 研究在混合培养体系下相互作用对微生物生长特征的影响。如图 1A 所示 *Z. bailii* 与 *S. cerevisiae* 共培养时的生物量明显低于纯培养, 表明 *Z. bailii* 的生长受到 *S. cerevisiae* 的抑制。推测原因是 *S. cerevisiae* 产生的乙醇、有毒物质或营养竞争等抑制了 *Z. bailii* 的生长^[18]。*Z. bailii* 与 *L. buchneri* 共培养时发酵前期的生长与纯培养接近, 发酵后期生物量低于纯培养。*Z. bailii* 与 *B. licheniformis* 共培养时的生长和纯培养一致, 表明 *Z. bailii* 的生长不受 *B. licheniformis* 影响。以上结果显示 *Z. bailii* 的生长受到 *S. cerevisiae* 抑制, 但几乎不受 *L. buchneri* 及 *B. licheniformis* 的影响。

同时, 在与 *Z. bailii* 混合培养体系下, *S. cerevisiae* 纯培养和共培养时的生长接近, 没有明显差异, 表明 *Z. bailii* 对 *S. cerevisiae* 的生长没有影响(图 1B); *L. buchneri* 在共培养发酵前期的生物量高于纯培养, 后期与纯培养趋于一致, 表明 *Z. bailii* 对 *L. buchneri* 的生长起促进作用, 原因可能是 *Z. bailii* 的某些产物(如大分子物质、蛋白酶等)促进了 *L. buchneri* 的生长(图 1C)^[19]; *B. licheniformis* 共培养下的生长远低于纯培养, 推测是由于混合培养时 *Z. bailii* 产生的酸类物质导致 pH 下降, 从而抑制了 *B. licheniformis* 的生长(图 1D、图 2)^[20]。此外, 如图 2 所示, 除 *B. licheniformis*

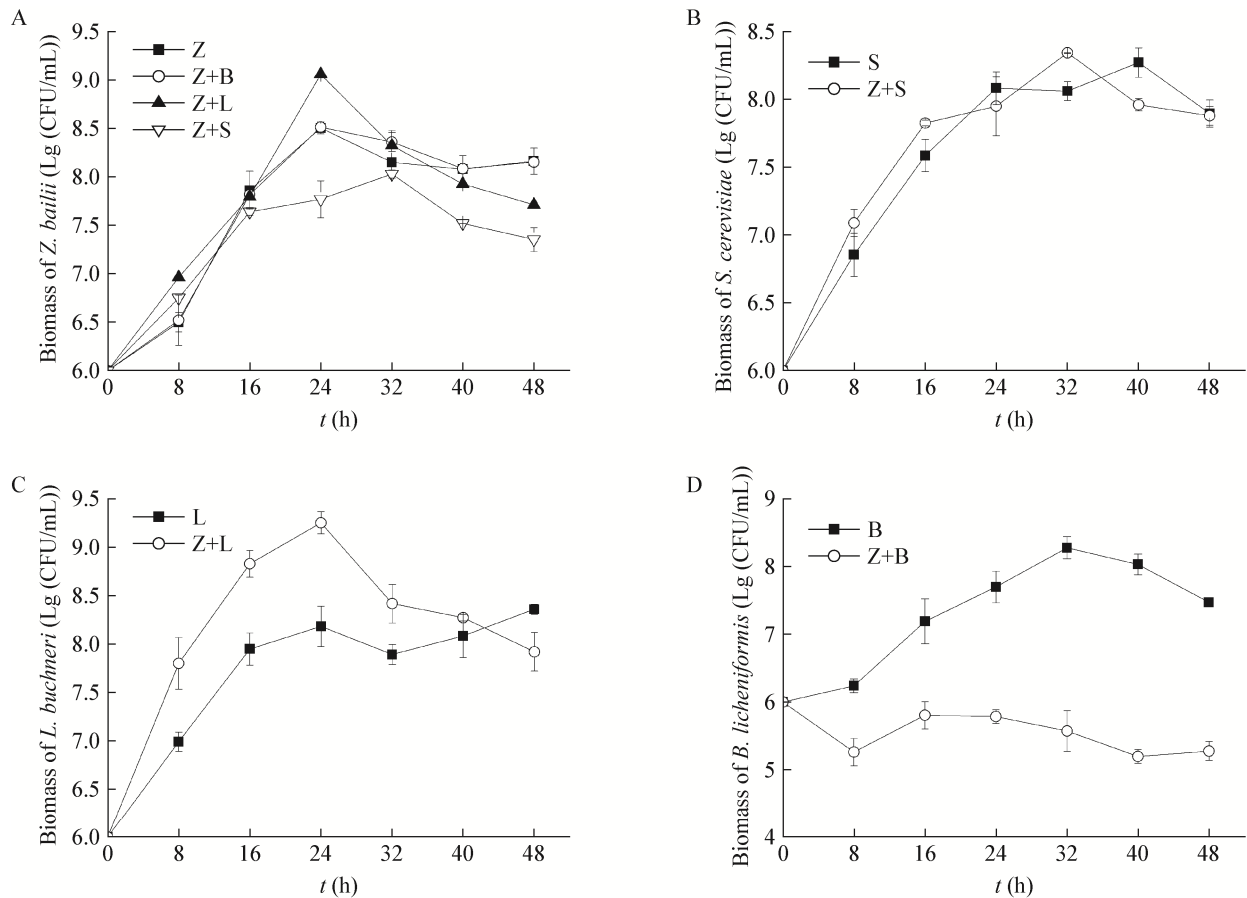


图 1 纯培养及混合培养体系中 *Z. bailii* (A)、*S. cerevisiae* (B)、*L. buchneri* (C) 与 *B. licheniformis* (D) 生长曲线
Figure 1 The growth curve of *Z. bailii* (A), *S. cerevisiae* (B), *L. buchneri* (C) and *B. licheniformis* (D) in single and mixed cultures

注: Z: *Z. bailii* 纯培养; S: *S. cerevisiae* 纯培养; L: *L. buchneri* 纯培养; B: *B. licheniformis* 纯培养; Z+S: *Z. bailii* 和 *S. cerevisiae* 混合培养; Z+L: *Z. bailii* 和 *L. buchneri* 混合培养; Z+B: *Z. bailii* 和 *B. licheniformis* 混合培养。

Note: Z: Single culture of *Z. bailii*; S: Single culture of *S. cerevisiae*; L: Single culture of *L. buchneri*; B: Single culture of *B. licheniformis*; Z+S: Mixed culture of *Z. bailii* and *S. cerevisiae*; Z+L: Mixed culture of *Z. bailii* and *L. buchneri*; Z+B: Mixed culture of *Z. bailii* and *B. licheniformis*.

纯培养时的 pH 上升外, 其他培养模式下 pH 变化都呈下降趋势, 这将有利于白酒中酸类物质的生成, 而酸类物质对白酒的风味和品质有重要贡献^[21]。

2.2 混合培养体系中酵母乙醇代谢差异

乙醇是白酒的主体物质, 在白酒酿造中起极其重要的作用。白酒中, 酵母是乙醇的主要贡献菌, *Z. bailii* 与 *S. cerevisiae* 都可以进行乙醇的生产。发酵过程中, *Z. bailii* 的最高乙醇含量为 3.18 g/L, *S. cerevisiae* 的最高乙醇含量为 9.99 g/L (图 3)。以酵母纯培养为对照分析相互作用对酵母乙醇代谢的影响。

如图 3 所示, 与 *S. cerevisiae* 混合培养时乙醇产量较纯培养乙醇总和明显下降, 发酵终点时乙醇产量下降了约 47%。分析原因, 一方面 *Z. bailii* 共培养时的生物量低于纯培养导致乙醇下降; 另一方面 *S. cerevisiae* 的乙醇生产能力明显优于 *Z. bailii* (图 3), 乙醇产量显著下降表明 *Z. bailii* 对 *S. cerevisiae* 的乙醇代谢有抑制作用。与 *L. buchneri* 及 *B. licheniformis* 混合培养时, *Z. bailii* 共培养下的乙醇产量与纯培养接近, 没有明显差异, 表明 *Z. bailii* 的乙醇代谢几乎不受 *L. buchneri* 和 *B. licheniformis* 影响。

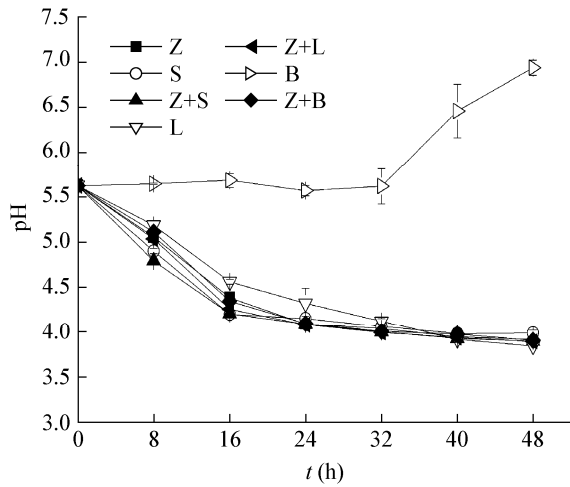


图 2 纯培养及混合培养体系中 pH 变化

Figure 2 pH change in single and mixed cultures

注: Z: *Z. bailii* 纯培养; S: *S. cerevisiae* 纯培养; L: *L. buchneri* 纯培养; B: *B. licheniformis* 纯培养; Z+S: *Z. bailii* 和 *S. cerevisiae* 混合培养; Z+L: *Z. bailii* 和 *L. buchneri* 混合培养; Z+B: *Z. bailii* 和 *B. licheniformis* 混合培养。

Note: Z: Single culture of *Z. bailii*; S: Single culture of *S. cerevisiae*; L: Single culture of *L. buchneri*; B: Single culture of *B. licheniformis*; Z+S: Mixed culture of *Z. bailii* and *S. cerevisiae*; Z+L: Mixed culture of *Z. bailii* and *L. buchneri*; Z+B: Mixed culture of *Z. bailii* and *B. licheniformis*.

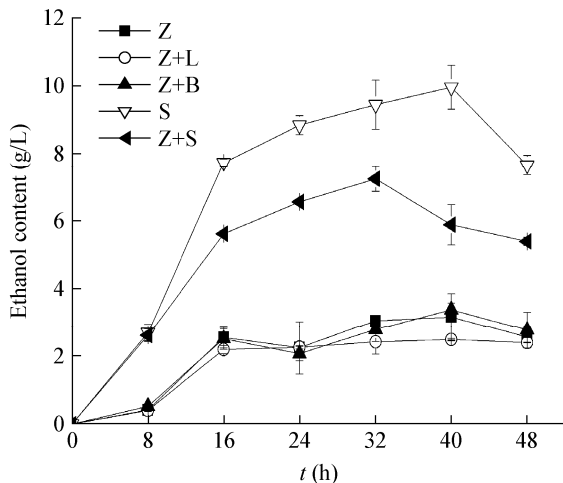


图 3 纯培养及混合培养下产乙醇曲线

Figure 3 The ethanol production curve in single and mixed cultures

注: Z: *Z. bailii* 纯培养; S: *S. cerevisiae* 纯培养; Z+L: *Z. bailii* 和 *L. buchneri* 混合培养; Z+B: *Z. bailii* 和 *B. licheniformis* 混合培养; Z+S: *Z. bailii* 和 *S. cerevisiae* 混合培养。

Note: Z: Single culture of *Z. bailii*; S: Single culture of *S. cerevisiae*; Z+L: Mixed culture of *Z. bailii* and *L. buchneri*; Z+B: Mixed culture of *Z. bailii* and *B. licheniformis*; Z+S: Mixed culture of *Z. bailii* and *S. cerevisiae*.

2.3 混合培养体系中 *Z. bailii* 和主要酿造微生物风味物质代谢差异

风味物质是白酒的重要组成部分,决定了白酒的品质^[21]。以 *Z. bailii*、*S. cerevisiae*、*L. buchneri* 及 *B. licheniformis* 的纯培养为对照,研究在混合培养体系下微生物的风味物质代谢情况。

如图 4A 所示,在 *Z. bailii* 与 *S. cerevisiae* 混合培养体系下,共培养时风味物质总量为 41 363.10 $\mu\text{g/L}$,较 *Z. bailii*、*S. cerevisiae* 纯培养风味总和(47 102.46 $\mu\text{g/L}$)下降约 12%。除总酯含量上升外,总醇、总酸、总醛、总酚和总酮相较于纯培养模式都有所下降,其中总酸和总酚下降显著,分别下降 71%和 42%。*Z. bailii* 对酸类和酚类物质生产有贡献,其产酸能力约为 *S. cerevisiae* 的一半,产酚能力与 *S. cerevisiae* 相当(图 4A)。前期研究表明 *Z. bailii* 的生长受到 *S. cerevisiae* 的抑制(图 1A),所以共培养时 *Z. bailii* 生物量的下调可能是导致风味物质含量下降的原因之一。

在 *Z. bailii* 与 *L. buchneri* 混合培养体系下,共培养时风味物质总量为 8 385.49 $\mu\text{g/L}$,较 *Z. bailii*、*L. buchneri* 纯培养风味总和(9 538.19 $\mu\text{g/L}$)下降约 12%。共培养时除总醇含量不变外,总酸、总酯、总醛、总酮和总酚含量都有所下降,其中醛类物质已检测不到,酸类和酚类含量下降显著,分别下降 61%和 46%(图 4B)。共培养时,二者发酵后期的生物量均低于纯培养(图 1A、C),推测发酵终点时风味物质含量的下调是由于发酵后期二者生物量下降导致的。

在 *Z. bailii* 与 *B. licheniformis* 混合培养体系下,共培养时风味物质总量为 12 134.99 $\mu\text{g/L}$,较 *Z. bailii*、*B. licheniformis* 纯培养风味总和(10 685.91 $\mu\text{g/L}$)上升约 14%。其中总醇、总酸、总酯和总醛含量显著上升,分别上升 41%、36%、44%和 73%;而总酮和总酚含量显著下降,分别下降 90%和 35%。如图 4C 所示,纯培养时,*Z. bailii* 能够生成酸类、酯类、醛类和大量醇类物质,而 *B. licheniformis* 只能产生极少量的醇类物质,不产生酸类、酯类

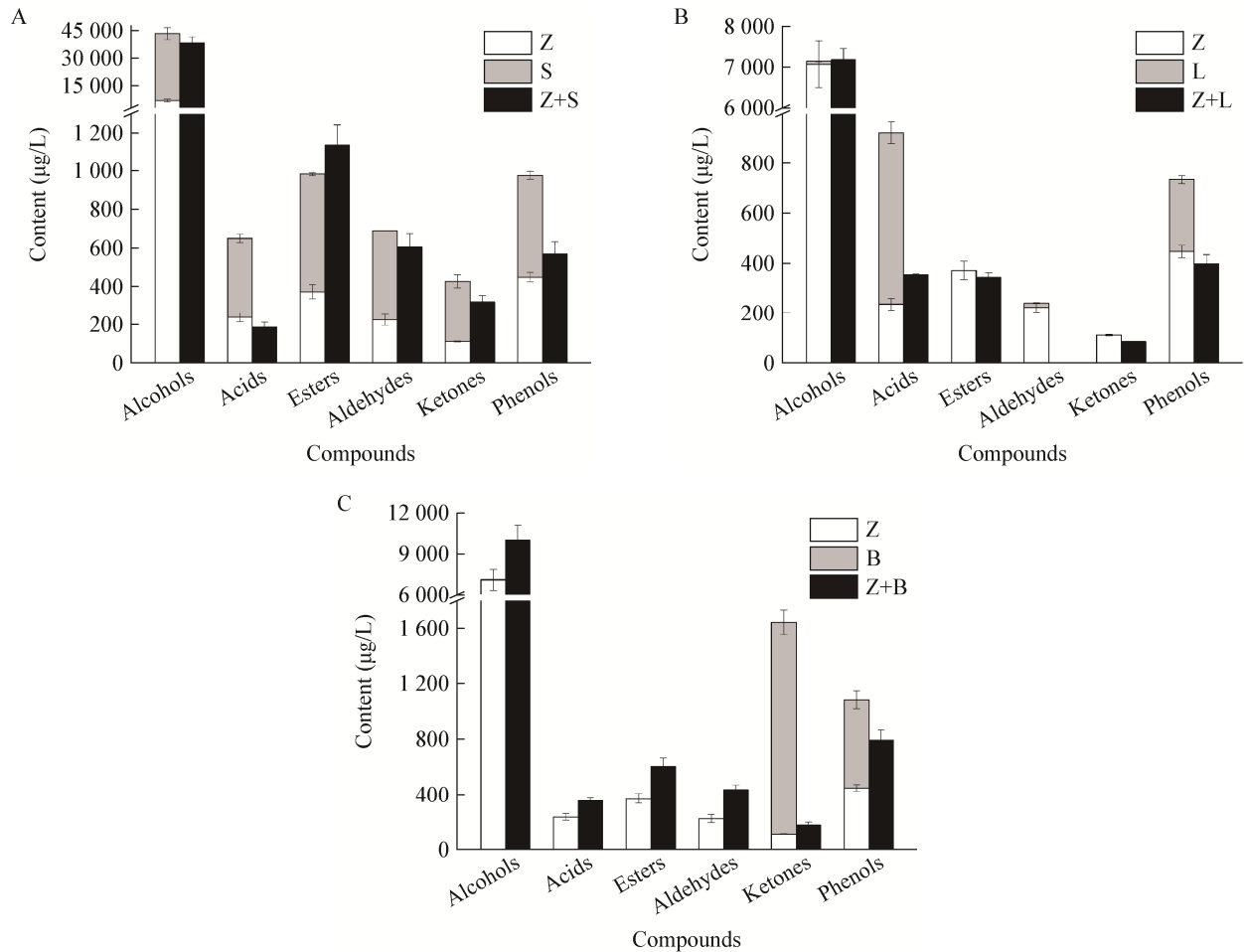


图 4 纯培养及混合培养下各种风味物质含量

Figure 4 Content of various flavor compounds in single and mixed cultures

注：Z：Z. bailii 纯培养；S：S. cerevisiae 纯培养；Z+S：Z. bailii 和 S. cerevisiae 混合培养；L：L. buchneri 纯培养；Z+L：Z. bailii 和 L. buchneri 混合培养；B：B. licheniformis 纯培养；Z+B：Z. bailii 和 B. licheniformis 混合培养。

Note: Z: Single culture of Z. bailii; S: Single culture of S. cerevisiae; Z+S: Mixed culture of Z. bailii and S. cerevisiae; L: Single culture of L. buchneri; Z+L: Mixed culture of Z. bailii and L. buchneri; B: Single culture of B. licheniformis; Z+B: Mixed culture of Z. bailii and B. licheniformis.

和醛类物质。混合培养时，这 4 类风味物质含量明显上升，推测原因是 *B. licheniformis* 的存在使这 4 类风味物质的代谢在 *Z. bailii* 中得到加强，促进了 *Z. bailii* 相关风味物质代谢。此外，酮类和酚类物质主要由 *B. licheniformis* 产生，而共培养时 *B. licheniformis* 生物量显著下降(图 1D)，这可能是导致总酮和总酚含量明显下降的原因(图 4C)。以上结果表明，混合培养时，*S. cerevisiae* 及 *L. buchneri* 会降低 *Z. bailii* 的风味物质代谢，但是 *B. licheniformis* 可能对 *Z. bailii* 风味物质代谢起到

促进作用。

2.4 基于转录组学 *B. licheniformis* 对 *Z. bailii* 的作用研究

Z. bailii 与 *B. licheniformis* 混合培养时，风味物质产量明显提高，其中总醇、总酸、总酯和总醛含量分别较纯培养上升 41%、36%、44%和 73%，推测是由于 *B. licheniformis* 的共存对 *Z. bailii* 风味物质代谢有促进作用。因此，运用转录组学比较 *Z. bailii* 纯培养及其与 *B. licheniformis* 共培养下基因转录表达的情况。

2.4.1 转录测序结果

Z. bailii 在纯培养与混合培养模式下发酵到对数中后期, 收集细胞, 采用高通量测序检测 *Z. bailii* 全基因组基因表达水平。

全基因组表达谱结果表明相对于单菌发酵, 混菌发酵模式下, *Z. bailii* 中共有 119 个基因表达显著改变 (≥ 2 -fold, $P < 0.05$), 其中 53 个基因表达显著上调, 66 个基因表达显著下调。对这些基因进行 KEGG Pathway 功能差异富集分析, 结果显示这些基因共涉及 25 个代谢途径, 其中差异显著的代谢途径主要有碳水化合物代谢、能量代谢、其他氨基酸代谢和翻译途径 ($P < 0.05$) (图 5)。在白酒酿造过程中, *Z. bailii* 主要利用碳水化合物和氨基酸进行乙醇及风味化合物生产^[22-23], 此过程需要消耗大量能量来供给自身生长代谢。因此, 对 *Z. bailii* 中涉及碳水化合物代谢、氨基酸代谢和能量代谢相关的差异表达基因进行深入分析。

2.4.2 碳水化合物转运与代谢分析

共培养体系中, *B. licheniformis* 能够促进 *Z. bailii* 醇类、酸类、酯类和醛类风味物质的产生。通过 Harris 途径(图 6), 葡萄糖经过糖酵解途径和 TCA 循环合成中间体 α -酮酸, α -酮酸再经过 Ehrlich 途径的最后两步代谢生成相应的风味化合物^[22-23]。

转录组分析结果显示混合培养体系下, *Z. bailii* 中与糖异生途径相关的基因 *FBP* (编码果糖-1,6-二磷酸酶)表达显著下调, 一定程度上抑制了糖异生途径, 促进了碳水化合物的分解代谢(表 2)。同时, 糖酵解途径中 *GAPDH*、*PGMI* 和 *ENO1* 基因表达显著上调, 有利于糖酵解途径向丙酮酸和 TCA 循环进行, 进一步代谢生成乙醇及相关风味化合物。此外, 编码丙酮酸脱羧酶的基因 *PDC1* 表达显著上调, 丙酮酸脱羧酶能够促进丙酮酸转化为乙醛, 并能将中间产物 α -酮酸脱羧形成相应的醛类物质, 从而促进相关风味物质合成(图 6)^[24]。碳水

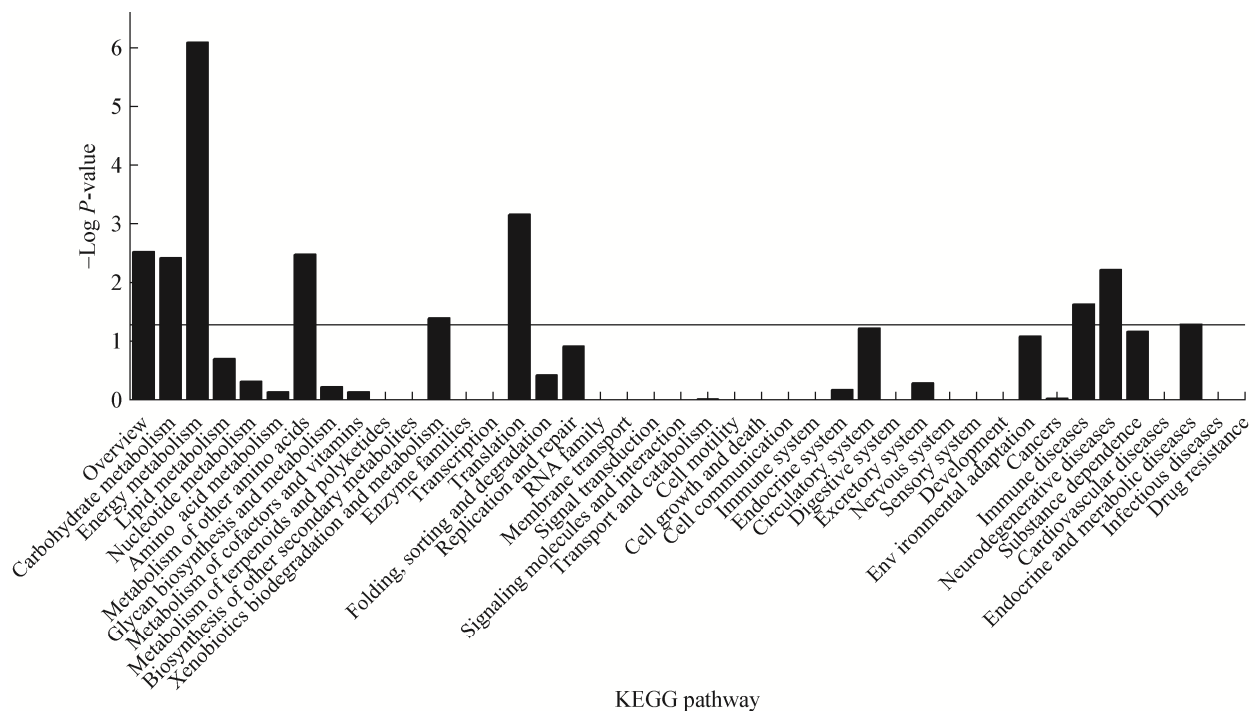


图 5 KEGG pathway 功能差异富集分析

Figure 5 KEGG pathway enrichment analysis

注: 图中的黑线代表 $P=0.05$ 。

Note: The black line in figure represented $P=0.05$.

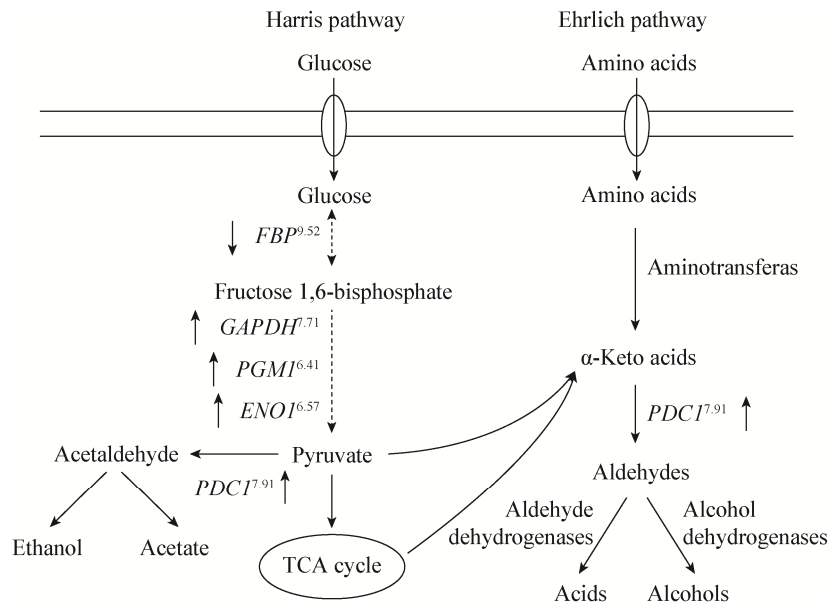


图 6 *Z. bailii* 中风味物质代谢途径分析

Figure 6 The metabolic pathways of flavor compounds in *Z. bailii*

注：基因上标表示 37 °C 条件下该基因的变化倍数。

Note: The superscript numbers indicated the fold change of each gene at 37 °C.

表 2 碳水化合物代谢相关基因

Table 2 Differentially expressed genes involved in carbohydrate metabolism

名称 Name	功能 Function	变化倍数 Fold change	P 值 P-value
<i>FBP</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	-9.52	0.02
<i>PGM1</i>	Phosphoglycerate mutase 1	6.41	0.04
<i>ENO1</i>	Enolase 1	6.57	0.04
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7.71	0.03
<i>PDC1₁</i>	Pyruvate decarboxylase	7.91	0.03
<i>PDC1₂</i>	Pyruvate decarboxylase	7.76	0.03
<i>PDC1₃</i>	Pyruvate decarboxylase	7.61	0.03
<i>PDC1₄</i>	Pyruvate decarboxylase	6.75	0.04
<i>PDC1₅</i>	Pyruvate decarboxylase	6.32	0.05

注：基因下标表示该基因的不同拷贝。

Note: The subscript numbers indicated different copies of genes.

化合物代谢也是乙醇的主要来源,但实验结果表明 *Z. bailii* 与 *B. licheniformis* 共培养时乙醇含量没有明显差异。转录组分析结果显示,与乙醇代谢直接相关的基因(*ADH*)并没有显著变化^[25],因此碳水化合物代谢中表达上调的基因可能更多涉及风味代谢,而不是乙醇代谢。qPCR 验证 *ENO1* 表达提高为 6.22 倍,与转录组测序结果基本一致。由此可

见, *B. licheniformis* 会促进 *Z. bailii* 中与 Harris 途径相关基因的表达上调,从而提高其风味物质代谢能力。

2.4.3 氨基酸的转运与代谢分析

通过 Ehrlich 途径^[23],氨基酸依次在转氨酶、酮酸脱羧酶以及醇脱氢酶或醛脱氢酶作用下生成相应的醇类物质或酸类物质(图 6)。

转录组结果表明, 编码铵转运蛋白的基因 *MEP2* 表达显著上调, 有利于铵离子的转运, 而铵离子可用于谷氨酸的生物合成及提供酵母细胞生长所需氮源, 有助于酵母中氨基酸的生物合成(表 3)^[26]。此外在 Ehrlich 途径中, *PDC1* 基因表达上调(表 2), 有利于 α -酮酸转化为醛类物质, 并进一步代谢为相应的醇类、酸类等风味物质。同时, 分析结果表明与含硫氨基酸合成代谢相关的基因 *METW* 和 *METC* 表达也显著上调, 能够促进 L-同型半胱氨酸的生物合成, 进而转化为其他含硫氨基酸或代谢为含硫化合物(表 3)^[27]。qPCR 验证 *MEP2* 表达提高为 6.20 倍, 与转录组测序结果基本一致。由此可见, *B. licheniformis* 会提高 *Z. bailii* 氨基酸的代谢活力, 有利于风味物质合成。

2.4.4 能量代谢分析

混合培养过程中, *Z. bailii* 的生长代谢都需要消耗能量, 结合转录组数据分析与能量代谢相关的差异表达基因, 研究其能量代谢差异。

转录组分析表明, 与 *Z. bailii* 呼吸生长相关的基因 *RGII* 表达显著上调(表 4)。该基因在细胞

呼吸生长过程中, 参与能量代谢的调控并有助于调节细胞生长^[28]。氧化磷酸化过程作为重要的产能过程, 生物体内 95% 的 ATP 来自这种方式。转录组分析显示与氧化磷酸化过程相关的基因 *COX1*、*CYB* 表达显著上调, 而 *QCR6* 表达显著下调(表 4)。*COX1* 是细胞色素 c 氧化酶的重要组成部分, *CYB* 和 *QCR6* 是细胞色素 c 还原酶的重要组成部分。同时, 编码细胞色素 b2 的基因 *CYB2* 表达也上调, 该酶促进 L-乳酸氧化成丙酮酸, 并伴随 ATP 的生成^[29]。糖酵解中编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶的基因 *GAPDH* 表达上调, 该酶催化的反应中能形成一个高能磷酸基团, 此高能磷酸基团可将能量转移给 ADP 形成 ATP, 供酵母生长代谢。此外, ATP 合成酶相关的基因 *ATP9* 表达也显著上调, 该酶能在跨膜质子动力势的推动下合成 ATP。转录组分析显示, *CYB* 和 *ATP9* 只有共培养模式下才会表达, 其 RPKM 值分别为 157.63 和 807.90, 表明 *B. licheniformis* 会促使 *Z. bailii* 中一些原本不表达的基因进行表达, 进而促进其能量代谢。qPCR 验证 *RGII* 表达提高为 11.98 倍, 与

表 3 氨基酸代谢相关基因

Table 3 Differentially expressed genes involved in amino acids metabolism

名称 Name	功能 Function	变化倍数 Fold change	P 值 P-value
<i>MEP2</i> ₁	Ammonium transporter MEP2	7.50	0.03
<i>MEP2</i> ₂	Ammonium transporter MEP2	9.08	0.02
<i>METW</i> ₁	Putative cystathionine gamma-synthase YLL058W	6.73	0.04
<i>METW</i> ₂	Putative cystathionine gamma-synthase YLL058W	6.99	0.04
<i>METC</i>	Putative cystathionine beta-lyase	12.80	0.04

注: 基因下标表示该基因的不同拷贝。

Note: The subscript numbers indicated different copies of genes.

表 4 能量代谢相关基因

Table 4 Differentially expressed genes involved in energy metabolism

名称 Name	功能 Function	变化倍数 Fold change	P 值 P-value
<i>RGII</i>	Respiratory growth induced protein 1	16.22	0.01
<i>QCR6</i>	Cytochrome b-c1 complex subunit 6	-6.18	0.05
<i>COX1</i>	Cytochrome c oxidase subunit 1	1 536.53	0.01
<i>CYB2</i>	Cytochrome b2, mitochondrial	7.75	0.03

转录组测序结果基本一致。*Z. bailii* 中与能量代谢相关基因的表达整体呈上调趋势,说明 *Z. bailii* 与 *B. licheniformis* 相互作用时,会消耗更多的能量用于自身生长代谢。

3 讨论与结论

Z. bailii 作为酱香型白酒酿造过程中的优势菌株,对白酒的乙醇及风味生产有积极贡献^[9]。通过对 *Z. bailii* 与主要白酒酿造微生物相互作用的研究,结合转录组学探索其在酱香型白酒酿造中的发酵特征及代谢机制,正确认识其白酒酿造中的功能。研究发现,*Z. bailii* 与 *B. licheniformis* 共培养时的生长及乙醇代谢没有变化,但其醇类、酸类、酯类和醛类风味物质的代谢明显提高,分别上升 41%、36%、44%和 73%。同时 *Z. bailii* 与 *S. cerevisiae* 共培养时,其生物量、乙醇及风味代谢下降;与 *L. buchneri* 共培养时,其风味代谢也下调。这些变化表明白酒发酵过程中,*Z. bailii* 能与主要酿造微生物相互作用,影响自身的生长、乙醇及风味物质代谢,进而对白酒酿造的品质产生影响。

同时,应用转录组技术分析 *Z. bailii* 纯培养及其与 *B. licheniformis* 共培养时基因的转录表达情况,发现 *Z. bailii* 中共有 119 个基因表达显著改变,并主要富集于碳水化合物代谢、能量代谢、其他氨基酸代谢等途径。碳水化合物和氨基酸是风味物质的主要来源,其代谢途径中相关基因的表达上调将有助于 *Z. bailii* 风味物质的合成。转录组学分析从分子水平上进一步说明 *B. licheniformis* 对 *Z. bailii* 的风味代谢有促进作用。同时,基于转录组学 *B. licheniformis* 对 *Z. bailii* 的作用研究,为后续研究 *Z. bailii* 分子代谢调控及其与微生物相互作用提供理论参考。

本研究对于深入认识酱香型白酒酿造过程中 *Z. bailii* 与 *S. cerevisiae*、*L. buchneri*、*B. licheniformis* 的相互作用关系及互作机制具有重要意义,为白酒组合发酵技术的应用及白酒酿造过程中微生物的

定向调节与控制提供一定理论参考。同时,转录组学的应用及数据的深入挖掘,为从分子角度全面认识微生物相互作用机制提供指导。

REFERENCES

- [1] Wu Q, Chen LQ, Xu Y. Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese *Maotai*-flavor liquor[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(2): 323-330
- [2] Shao MK, Wang HY, Xu Y, et al. Yeast community structure and its impact on flavor components during the fermentation process of Chinese *Maotai*-flavor liquor[J]. Microbiology China, 2014, 41(12): 2466-2473 (in Chinese)
邵明凯, 王海燕, 徐岩, 等. 酱香型白酒发酵中酵母群落结构及其对风味组分的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2466-2473
- [3] Tristezza M, Lourenço A, Barata A, et al. Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants[J]. Annals of Microbiology, 2010, 60(3): 549-556
- [4] Rossi F, Gaio E, Torriani S. *Staphylococcus aureus* and *Zygosaccharomyces bailii* as primary microbial contaminants of a spoiled herbal food supplement and evaluation of their survival during shelf life[J]. Food Microbiology, 2010, 27(3): 356-362
- [5] Garavaglia J, Schneider RDCDS, Camargo Mendes SD, et al. Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production[J]. Microbiological Research, 2015, 173: 59-65
- [6] Meng X, Wu Q, Wang L, et al. Improving flavor metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* by mixed culture with *Bacillus licheniformis* for Chinese *Maotai*-flavor liquor making[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(12): 1601-1608
- [7] Zhang Y, Du H, Wu Q, et al. Impacts of two main lactic acid bacteria on microbial communities during Chinese *Maotai*-flavor liquor fermentation[J]. Microbiology China, 2015, 42(11): 2087-2097 (in Chinese)
张艳, 杜海, 吴群, 等. 酱香型白酒发酵中两株主要乳酸菌对酿造微生物群体的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2087-2097
- [8] Wang CL, Shi DJ, Gong GL. Microorganisms in Daqu: a starter culture of Chinese *Maotai*-flavor liquor[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(10): 2183-2190
- [9] Zhuang XJ, Wu Q, Xu Y. Physiological characteristics of *Zygosaccharomyces bailii* and its interaction with *Bacillus licheniformis* in Chinese *Maotai*-flavor liquor making[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 251-262 (in Chinese)
庄孝杰, 吴群, 徐岩. 酱香型白酒酿造拜耳接合酵母生理代谢特征及其与地衣芽孢杆菌相互作用[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 251-262
- [10] Zhang R, Wu Q, Xu Y. Aroma characteristics of Moutai-flavour liquor produced with *Bacillus licheniformis* by solid-state

- fermentation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(1): 11-18
- [11] Li WQ. Relationship between Luzhou flavor liquor, lactic acid bacteria, lactic acid and ethyl lactate[J]. Liquor Making, 2010, 37(3): 90-93 (in Chinese)
李维青. 浓香型白酒与乳酸菌、乳酸、乳酸乙酯[J]. 酿酒, 2010, 37(3): 90-93
- [12] Wu LL, Wang HY, Xu Y, et al. Differences of lactic acid bacteria community between soy sauce aroma style and light aroma style liquor fermentation[J]. Microbiology China, 2013, 40(12): 2182-2188 (in Chinese)
吴莉莉, 王海燕, 徐岩, 等. 酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群的差异性分析[J]. 微生物学通报, 2013, 40(12): 2182-2188
- [13] Rawsthorne H, Phister TG. A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 112(1): 1-7
- [14] Salinas F, Garrido D, Ganga A, et al. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine[J]. Food Microbiology, 2009, 26(3): 328-332
- [15] Fan WL, Hu GY, Xu Y. Quantification of volatile terpenoids in Chinese medicinal liquor using headspace-solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Science, 2012, 33(14): 110-116 (in Chinese)
范文来, 胡光源, 徐岩. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定药香型白酒中萜烯类化合物[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 110-116
- [16] Lu XW, Wu Q, Zhang Y, et al. Genomic and transcriptomic analyses of the Chinese *Maotai*-flavored liquor yeast MT1 revealed its unique multi-carbon co-utilization[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1064
- [17] Anders S, Huber W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level-the DESeq package[R]. DESeq Version 1.13.0. Heidelberg: European Molecular Biology Laboratory, 2013
- [18] Zhai MC, Piao YZ, Wang XY, et al. The mutual inhibition between yeasts in the fermentation process of wine[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(1): 18-21 (in Chinese)
翟明昌, 朴永哲, 王祥余, 等. 葡萄酒发酵过程中酵母菌之间相互抑制作用的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(1): 18-21
- [19] Yan B, He YF. A review on symbiotic mechanisms between lactic acid bacteria and yeasts[J]. Food Science, 2012, 33(3): 277-281 (in Chinese)
- 闫彬, 贺银凤. 乳酸菌与酵母菌共生理综述[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 277-281
- [20] Peng SQ, Wu Q, Xu Y. Tolerance characteristics of *Bacillus licheniformis* CGMCC3963 and tolerance mechanisms based on transcriptome analysis[J]. Microbiology China, 2014, 41(12): 2395-2403 (in Chinese)
彭素琴, 吴群, 徐岩. 产酱香地衣芽孢杆菌 CGMCC3963 耐受特征及基于转录组学的耐受机制分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2395-2403
- [21] Zhu SK, Lu X, Ji KL, et al. Characterization of flavor compounds in Chinese liquor Moutai by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(2): 340-348
- [22] Chen ECH. The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1978, 36: 0039
- [23] Ehrlich F. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem eiweißaufbau der Hefe[J]. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1907, 40(1): 1027-1047
- [24] ter Schure EG, Flikweert MT, van Dijken JP, et al. Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(4): 1303-1307
- [25] de Smidt O, du Preez JC, Albertyn J. Molecular and physiological aspects of alcohol dehydrogenases in the ethanol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2012, 12(1): 33-47
- [26] Bogonez E, Satrustegui J, Machado A. Regulation by ammonium of glutamate dehydrogenase (NADP⁺) from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology, 1985, 131(6): 1425-1432
- [27] Perpète P, Duthoit O, de Maeyer S, et al. Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(1): 48-56
- [28] Domitrovic T, Kozlov G, Freire JCG, et al. Structural and functional study of YER067W, a new protein involved in yeast metabolism control and drug resistance[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11163
- [29] Cunane LM, Barton JD, Chen ZW, et al. Crystallographic study of the recombinant flavin-binding domain of Baker's yeast flavocytochrome *b*₂: comparison with the intact wild-type enzyme[J]. Biochemistry, 2002, 41(13): 4264-4272