

研究报告



重组 4-甲基苯酚消减乳酸菌的构建及其在白酒酿造体系中的功能

官璐婵¹ 任聪^{1,3} 高江婧¹ 徐岩^{*1,2,3}

1 江南大学生物工程学院酿造微生物学与应用酶学研究室 江苏 无锡 214122

2 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122

3 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】4-甲基苯酚是众多发酵食品中的异臭味物质, 阈值较低, 如白酒中百万分之一的 4-甲基苯酚即可对白酒风味造成不利影响。【目的】构建能消减 4-甲基苯酚的乳酸菌菌株, 探索其在白酒酿造中的应用潜力。【方法】将来源于谷氨酸棒杆菌的 4-甲基苯基磷酸酯合成酶编码基因 *creI* 与 *creH* 在短乳杆菌中表达, 探究过表达菌株对白酒酿造体系中 4-甲基苯酚的消减能力。【结果】*creIH* 过表达菌株在液体培养基中可有效消减 4-甲基苯酚, 消减能力达 2 130 $\mu\text{g/L}$; 在模拟白酒固态酿造体系中, *creIH* 过表达菌株消减 4-甲基苯酚的能力达 530 $\mu\text{g/kg}$, 消减率为 37.9%。【结论】首次构建了 4-甲基苯酚的消减乳酸菌菌株, 为白酒酿造体系中 4-甲基苯酚的消减提供了新的策略。

关键词: 4-甲基苯酚, 消减策略, 乳酸菌, 白酒酿造

Construction of *p*-cresol reduction recombinant lactic acid bacterium to decrease *p*-cresol in Chinese liquor fermentationGONG Lu-Chan¹ REN Cong^{1,3} GAO Jiang-Jing¹ XU Yan^{*1,2,3}

1 Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 State Key Laboratory of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

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

Abstract: [Background] *p*-cresol is an off-odor in a variety of fermented foods. With low threshold, ppm's *p*-cresol can adversely affect the flavor of Chinese liquor. [Objective] Recombinant lactic acid bacterium with *p*-cresol reduction capability was constructed and tested in Chinese liquor fermentation. [Methods] The genes (*creI* and *creH*) coding 4-methylbenzyl phosphate synthase were cloned from *Corynebacterium glutamicum* and ectopically expressed in *Lactobacillus brevis*. The reduction capability of *creIH* overexpression strain was determined in Chinese liquor fermentation. [Results] The *creIH* overexpression strain eliminated *p*-cresol up to 2 130 $\mu\text{g/L}$ in liquid medium and 530 $\mu\text{g/kg}$ in simulated solid-state fermented grains. The reduction rate in simulated solid-state fermentation reached 37.9%.

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604103)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 16-06-2019; Accepted: 09-08-2019; Published online: 16-09-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1604103)

*通信作者: Tel: 0510-85918201; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-06-16; 接受日期: 2019-08-09; 网络首发日期: 2019-09-16

[Conclusion] This is the first report that lactic acid bacterium with *p*-cresol reducing capability was constructed. It provides a novel strategy to eliminate *p*-cresol in Chinese liquor fermentation.

Keywords: *p*-cresol, Off-odor, Lactic acid bacteria, Chinese liquor fermentation

4-甲基苯酚(*p*-cresol)是一种可随水蒸气挥发,呈现窖泥臭、皮革臭、焦皮臭、动物臭的苯酚类化合物^[1]。作为酪氨酸的降解产物^[2],现已发现奶酪、葡萄酒、威士忌和白酒等发酵食品中均含有微量的4-甲基苯酚^[3-6]。4-甲基苯酚阈值低(46%酒精中的阈值为 116.97 $\mu\text{g/L}$)^[7],百万分之一的4-甲基苯酚即可对食品的风味造成不良影响。

根据生产工艺不同,白酒可细分为十二大香型,其中药香型、浓香型、酱香型、兼香型等基于泥窖或半泥窖发酵的白酒中均检测到了4-甲基苯酚^[8],它的含量在 1.8–3.6 mg/L 之间^[9],是产生窖泥臭的重要化合物^[7,10]。目前对白酒中4-甲基苯酚的研究主要集中在含量检测与来源分析^[8,11],尚缺少对白酒酿造过程中4-甲基苯酚进行生物法消减的研究。

4-甲基苯酚的去除手段包括物理化学法和生物法。物理化学法如催化氧化、吸附剂吸附等,处理成本高和易产生毒性副产物限制了其应用范围^[12-13]。利用活性炭吸附虽然能较好地消除白酒中的4-甲基苯酚,但也会非特异性吸附其他风味物质,对白酒的品质会有较大影响^[8]。4-甲基苯酚微生物降解法在环境修复领域得到了广泛的研究,4-甲基苯酚降解菌可从富含高4-甲基苯酚的环境中进行筛选,目前发现的4-甲基苯酚降解菌包括谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、产碱杆菌(*Advenella* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、黏鞭霉(*Gliomastix indicus*)等^[14-20],这些微生物多生长于中性和弱碱性环境中,培养基中超过一定浓度的4-甲基苯酚会对其生长产生抑制作用。因白酒酿造体系为酸性环境,发酵过程中产生的乳酸、乙酸、丁酸和己酸等使酒醅的pH值低至3.5左右^[21-22],现已发现的

4-甲基苯酚降解菌难以在白酒酿造体系中生长。因此,如何在保证风味不丢失的情况下有效去除白酒酿造体系中的4-甲基苯酚仍需深入研究。

乳杆菌在白酒酿造过程中逐步占据主导地位,在发酵中后期成为白酒酿造体系中的优势微生物^[23]。乳杆菌中的大部分种被公认为安全级微生物,在食品、医药、饲料等相关领域被广泛应用。白酒酿造体系中的乳杆菌不具有降解4-甲基苯酚的途径,若将食品级菌株,如谷氨酸棒杆菌的4-甲基苯酚降解途径导入乳杆菌中,可使重组乳酸菌具有降解4-甲基苯酚的能力。谷氨酸棒杆菌的4-甲基苯酚降解的关键酶包括4-甲基苯基磷酸酯合成酶(CreIH)、磷酸基团识别体(CreJEF)、磷酸水解酶(CreD)、醇脱氢酶(CreC)、醛脱氢酶(CreG)^[24]。该降解途径是有别于其他4-甲基苯酚降解菌株的独特降解途径,其通过4-甲基苯基磷酸酯合成酶将4-甲基苯酚磷酸酯化成4-甲基苯基磷酸酯,减少4-甲基苯酚的同时,产生的4-甲基苯基磷酸酯更易被途径中其他酶识别,促进4-甲基苯酚的完全降解^[22,24]。

白酒作为蒸馏酒,含有4-甲基苯酚主要是由于酒醅中产生的4-甲基苯酚易被蒸馏到原酒中,若将4-甲基苯酚转化成高沸点物质即可减少原酒中的4-甲基苯酚含量。本研究将来源于谷氨酸棒杆菌的4-甲基苯基磷酸酯合成酶编码基因(该酶的两个亚基由 *creI* 和 *creH* 共同编码^[24])导入来源于白酒酿造体系的高酸耐受性短乳杆菌中,使其具有4-甲基苯酚的消减能力,以期有效降低白酒酿造体系中4-甲基苯酚的含量,对解决4-甲基苯酚引起的异臭味问题、提高白酒品质具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

文中所用的菌株和质粒见表1。

表 1 文中涉及的菌株和质粒
Table 1 The strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特性与用途 Characters/Applications	来源 Sources
pMG36e	Expression, P32, erythromycin resistance	[25]
pMG36e-creIH	pMG36e carrying the creIH, P32, erythromycin resistance	This study
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	p-Cresol degradation strain	ATCC
<i>Escherichia coli</i> Top10	Recipient for cloning experiments	Invitrogen
<i>Lactobacillus brevis</i> D17	Isolated from fermentation system of Chinese liquor production	[26]
<i>Lactobacillus brevis</i> D17/pMG36e	D17 carrying pMG36e	This study
<i>Lactobacillus brevis</i> D17/pMG36e-creIH	D17 carrying pMG36e-creIH	This study

1.2 主要试剂和仪器及培养基

基因工程工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 4-甲基苯酚购自西格玛奥德里奇公司; 其他试剂均为国产分析纯。

气相色谱质谱联用仪 GC 6890N-MSD 5975 购自 Agilent 公司; 荧光定量 PCR 仪 StepOnePlus Real-Time PCR System 购自 Thermo Fisher 公司。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 9×10^4 Pa 灭菌 30 min。GYP 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母提取物 10.0, 胰蛋白胨 5.0, 无水乙酸钠 2.0, $MgSO_4$ 0.2, NaCl 0.1, $FeSO_4\cdot7H_2O$ 0.1, $MnSO_4\cdot H_2O$ 0.1, 葡萄糖单独灭菌后加入, 9×10^4 Pa 灭菌 30 min。在液体培养基中加入 2% (质量体积比)琼脂粉制成固体平板。4-甲基苯酚母液(18.33 mg/mL)用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌后, 按需要加入培养基中。红霉素按需要加入, 乳酸菌使用的终浓度为 1–4 $\mu g/mL$, 大肠杆菌使用终浓度为 200 $\mu g/mL$ 。

1.3 方法

1.3.1 谷氨酸棒杆菌降解 4-甲基苯酚能力测试

将平板上活化后的谷氨酸棒杆菌接种至 5 mL LB 培养基中, 30 $^{\circ}C$ 静置培养 24 h, 再按 10% (体积比)接种至 5 mL LB 培养基中, 30 $^{\circ}C$ 静置培养 12 h 作为种子。种子按 10% (体积比)接种至 5 mL LB 培养基中, 再加入 2 μL 4-甲基苯酚(终浓度约为 7.3 mg/L), 37 $^{\circ}C$ 静置培养 48 h。

1.3.2 短乳杆菌的耐酸性测定

将短乳杆菌 D17 的种子液按 10% (体积比)接

种量接种于含有 10.0 g/L 谷氨酸钠的 GYP 培养基中, 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养 12 h。4 $^{\circ}C$ 、6 000 r/min 离心 10 min 收集细胞后, 用 pH 7.0 的磷酸钾缓冲液洗菌一次。用含有或不含 10 mmol/L 谷氨酸钠的 pH 7.0 磷酸钾缓冲液重悬菌体, 使其 OD_{600} 为 1.0。37 $^{\circ}C$ 静置分别培养 0、1、2、2.5 h 时, 立即加入 9 倍体积含有或不含 10 mmol/L 谷氨酸钠的 pH 2.5 磷酸钾缓冲液于菌悬液中, 继续静置培养 3 h 结束。取出样品立即用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液按 10^{-1} – 10^{-5} 稀释, 选择合适的梯度取 100 μL 稀释液涂于 GYP 平板上, 37 $^{\circ}C$ 静置培养 24 h 后计算平板上菌落数。

1.3.3 短乳杆菌在浓香型白酒酿造体系中的生长

将短乳杆菌 D17 的种子液按 10% (体积比)接种量接种于 GYP 培养基中, 37 $^{\circ}C$ 、200 r/min 培养 12 h。4 $^{\circ}C$ 、6 000 r/min 离心 10 min 收集细胞后, D17 湿菌体按 0.2% (质量比)接种于某浓香型白酒的初始发酵酒醅中, 室温下(20–30 $^{\circ}C$ 左右)密封发酵 30 d, 其中不添加 D17 的发酵作为对照。同时取相应的 0 d 酒醅样品冻存于–20 $^{\circ}C$, 待发酵结束后同时分析。

取发酵结束后的样品, 提取 0 d 及发酵 30 d 酒醅的混菌 DNA。根据在白酒酿造体系中存在的乳杆菌与短乳杆菌的基因组差异, 确定了短乳杆菌的氨基甲酰磷酸合成酶编码基因 *cps* 的部分片段是其特有的。以此特有基因片段设计仅短乳杆菌可扩增的特异性引物 *Fcps/Rcps* (表 2)。以酒醅的全基因组 DNA 为模板, 采用此特异性引物进行荧光定量 PCR (qPCR)。PCR 反应体系为

表 2 文中涉及的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
F- <i>creI</i> - <i>SacI</i>	ATTCGAGCTCTAATGACCAACAGTTTGAACATCCCCGTTTG
R- <i>creI</i> - <i>SmaI</i>	ATCCCCCGGGTACTTCGTGCCGGTCATTGCG
F- <i>SmaI</i> -RBS- <i>creH</i>	ATCCCCCGGGCAGCTTAACCGCAAAGTAGACAAATATAAAGGAGGTCCAAATTATGGCTAATAAATCTTCCCCAAGCCCTC
R- <i>Hind</i> III- <i>creH</i>	ACCCAAGCTTCTAGGCATGTGTATCCACCCCATG
<i>Fcps</i>	ATTGTGGTGACTCCGCCTCAGA
<i>Rcps</i>	CCGTTGTTCGTGCTGCCAGT

10 μ L, 包括 2.5 μ L DNA 模板(10 ng/ μ L), 引物各 20 mmol/L, SYBR-Green-I 5 μ L, 超纯水 1.5 μ L。实时荧光定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 溶解曲线阶段: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 增加至 95 $^{\circ}$ C 15 s, 增加梯度为 0.5 $^{\circ}$ C。16S rRNA 基因为参考, 确定酒酿中短乳杆菌 *cps* 片段的相对丰度, 以此表征短乳杆菌在白酒酿造体系中的生长情况。

1.3.4 表达载体的构建及短乳杆菌的转化

根据谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 *creI* 与 *creH* 的基因序列设计引物(表 2)。为了 *creI* 与 *creH* 在短乳杆菌宿主中能串联表达, 在 *creI* 与 *creH* 之间加入适合短乳杆菌的核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)。RBS 通过 RBS Calculator V 2.0 在线设计, 经计算分析筛选, 采用 RBS 序列(5'-CAGCTTAACCGCAAAGTAGACAAATATAAAGGAGGTCCAAAT-3')串联 *creI* 与 *creH*。以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的基因组为模板, 用引物对 F-*creI*-*SacI*/R-*creI*-*SmaI* 与 F-*SmaI*-RBS-*creH*/R-*Hind* III-*creH* 分别扩增 *creI* 与 *creH*。PCR 反应体系(50 μ L): 模板(100 ng/ μ L) 2 μ L, 引物各 20 mmol/L, PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μ L, 超纯水 21 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。采用 Omega 胶回收试剂盒回收片段 *creI* 与 *creH*。采用重叠 PCR 将 RBS、*creI* 与 *creH* 连接, 取等摩尔 *creI*、*creH* 片段加水补足为 5 μ L, 再加入 5 μ L

PrimeSTAR Max DNA Polymerase, 共 10 μ L 体系。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 15 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。以得到的 PCR 产物为模板, PCR 反应体系(50 μ L): 模板(PCR 产物) 2 μ L, 引物 F-*creI*-*SacI* 与 R-*Hind* III-*creH* 各 20 mmol/L, PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μ L, 超纯水 21 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 最终获得 *creI*-RBS-*creH*。用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Hind* III 对 *creI*-RBS-*creH* 进行双酶切后连接至质粒 pMG36e 中, 得到过表达载体 pMG36e-*creIH*。将过表达载体 pMG36e-*creIH* 电转入短乳杆菌中, 经含 4 μ g/L 红霉素的 GYP 平板筛选, 挑取单克隆, 纯化后得到 *creIH* 过表达菌株, 提取过表达菌株的全质粒进行 PCR 验证后, 送 PCR 产物测序。测序正确的克隆即为 *creIH* 过表达短乳杆菌菌株。同时短乳杆菌中转入质粒 pMG36e 的为空白对照菌。

1.3.5 短乳杆菌质粒维持率测定

制备 *creIH* 过表达短乳杆菌种子液, 按 10% (体积比)接种量接种于无红霉素抗性的 GYP 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 静置培养, 每 24 h 取样。菌悬液用生理盐水(0.9% NaCl)进行连续稀释后, 分别取 100 μ L 稀释液涂于无红霉素及含有终浓度为 4 μ g/mL 红霉素的 GYP 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后分别计菌落数。质粒维持率为抗性平板上的菌落数与无抗性平板菌落数的比值。

1.3.6 短乳杆菌 *creIH* 过表达菌株消减 4-甲基苯酚的发酵实验

(1) 在液体培养基中降解 4-甲基苯酚

筛选获得的 *creIH* 过表达短乳杆菌与空白对照菌,制成种子液后按 10% (体积比)接种量接种于 5 mL GYP 发酵培养基中(含终浓度约为 7.3 mg/L 的 4-甲基苯酚), 37 °C 静置培养 48 h。

(2) 在白酒酿造体系中消减 4-甲基苯酚

制备 100 mL *creIH* 过表达短乳杆菌的种子液,经 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 收集细胞后,用 10 mL 无菌生理盐水重浮。取 1 mL 菌液接种至 100 g 的出池底层酒醅中,搅拌均匀,密封后 37 °C 静置培养 48 h。

1.3.7 4-甲基苯酚的 SPME-GC-MS 检测

取去除菌体的发酵上清 1 mL,加入 7 mL 超纯水、3.0 g NaCl 及 10 μ L 200 μ g/L 的 3,4-二甲基苯酚内标液后置入 20 mL 顶空瓶中,密封。对于酒醅样品的处理:称取 5.0 g 酒醅于 50 mL 离心管中,加入 10%乙醇溶液 5 mL,涡旋混匀并浸泡 30 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液 8 mL 置于 20 mL 顶空瓶中,加入 10 μ L 3,4-二甲基苯酚内标液。采用 SPME-GC-MS 检测方法^[27]分析 4-甲基苯酚的含量。SPME 萃取条件: DVB/CAR/PBDS 萃取头萃取 45 min,萃取温度为 45 °C。GC 条件:进样口温度 250 °C,载气 He,流速 2 mL/min,不分流进样,色谱柱为 CP-Wax (60 m \times 0.25 m \times 0.25 μ m)。检测时的升温程序为:50 °C 恒温 2 min,以 6 °C/min 的速度升温至 230 °C,保持 15 min。MS 条件:EI 电离源,电子能量 70 eV,离子源温度 230 °C,扫描范围 35.00–350 aMU。质谱分析用数据库来源于 NIST05a.L (Agilent)。

1.3.8 白酒酿造体系中乳酸与乙醇的检测

称取 2.0 g 酒醅,加入 6.0 g 超纯水,漩涡振荡 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清 700 μ L,加入 700 μ L 10%三氯乙酸,常温下沉淀 30 min,过 0.22 μ m 有机滤膜后,用 HPLC 检测乙醇及乳酸含量^[28]。HPLC 条件为:BioRad Aminex-HPX-87H 色

谱柱,5 mmol/L 硫酸为流动相,流速为 0.6 mL/min,柱温 60 °C,示差检测器检测,分析时间为 30 min,进样量为 10 μ L。

2 结果与分析

2.1 谷氨酸棒杆菌降解 4-甲基苯酚能力测试

谷氨酸棒杆菌能以芳香化合物为唯一碳源生长,包括 4-甲基苯酚,但谷氨酸棒杆菌降解低浓度 4-甲基苯酚的能力尚不清楚。基于白酒酿造体系中 4-甲基苯酚含量低的特点,首先探究谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 对低浓度 4-甲基苯酚的降解能力。在不添加谷氨酸棒杆菌的对照组中,4-甲基苯酚的含量为初始添加值,4-甲基苯酚未发生降解;而加入谷氨酸棒杆菌的实验组中几乎无 4-甲基苯酚残留(图 1),说明谷氨酸棒杆菌对于低浓度的 4-甲基苯酚有较好的降解作用。但谷氨酸棒杆菌无法在酸性厌氧发酵环境中生存,不适用于在白酒酿造体系中降解 4-甲基苯酚。因此,为了获得具有降解 4-甲基苯酚的菌株,需要选择合适的宿主。

2.2 4-甲基苯酚消减宿主菌株的选择

2.2.1 短乳杆菌 D17 菌株的耐酸能力

研究表明,在白酒酿造过程中,乳酸菌逐渐占据主导地位,说明乳酸菌可较好地存活于酸性的白酒酿造体系中。前期实验室筛选获得一株来自酿造体系的短乳杆菌 D17,其具有谷氨酸脱羧酶系统^[26],该系统是乳酸菌有效的耐受系统之一。

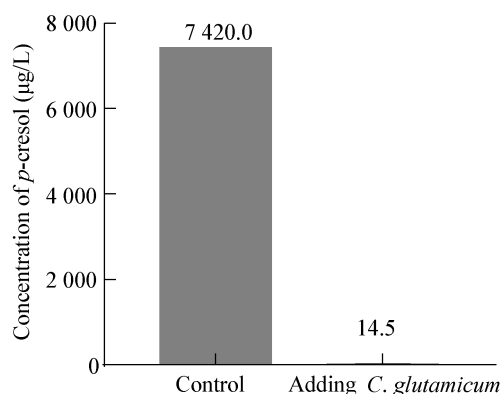


图 1 谷氨酸棒杆菌降解 4-甲基苯酚

Figure 1 Degradation of *p*-cresol by *Corynebacterium glutamicum*

为了确定来自酿造体系的短乳杆菌 D17 是否能重新定植于酿造体系中,首先对其耐酸能力进行了测定。如图 2 所示,通过添加 10 mmol/L 的谷氨酸钠,在 pH 2.5 的缓冲刺激下,菌株的耐酸性显著高于不存在谷氨酸钠时,说明菌株只要在谷氨酸钠存在时即具有良好的耐酸性。考虑到白酒酿造体系中富含谷氨酸(500–2 500 mg/kg)^[29-30],因此推测短乳杆菌 D17 可通过谷氨酸脱羧系统的抗酸能力重新在酸性基质的白酒酿造体系中存活。

2.2.2 短乳杆菌 D17 菌株在模拟白酒酿造体系中的生长情况

如图 3A 所示,与对照组相比,添加短乳杆菌 D17 的实验组发酵 30 d 后酒精含量稍有降低,但与对照组差异不显著,酒精浓度均达到 80.0 g/L 左右,说明在密封罐中模拟白酒酿造是正常的。同时,如图 3B 所示,相比对照组,添加短乳杆菌 D17 的乳酸含量较高,说明短乳杆菌 D17 可在白酒酿造体系中正常生长并代谢产生乳酸。通过荧光定量 PCR 分析,以短乳杆菌的特异性基因氨基甲酰磷酸合成酶编码基因 *cps* 片段的相对丰度表征短乳杆菌的生长情况。如图 3C 所示,在对照组中,初始 0 d 及发酵 30 d 的酒醅中,短乳杆菌特有的 *cps* 片段丰度均较低,说明对照组中短乳杆菌的含量较低。与对照组 0 d 相比,添加短乳杆菌 D17

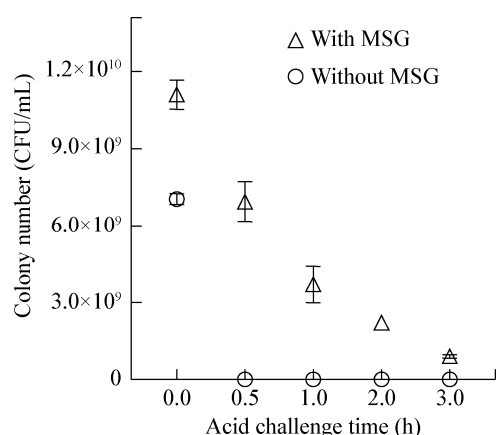


图 2 短乳杆菌 D17 的耐酸能力

Figure 2 Acid resistance of *L. brevis* D17 under acid challenge

Note: MSG: Monosodium glutamate.

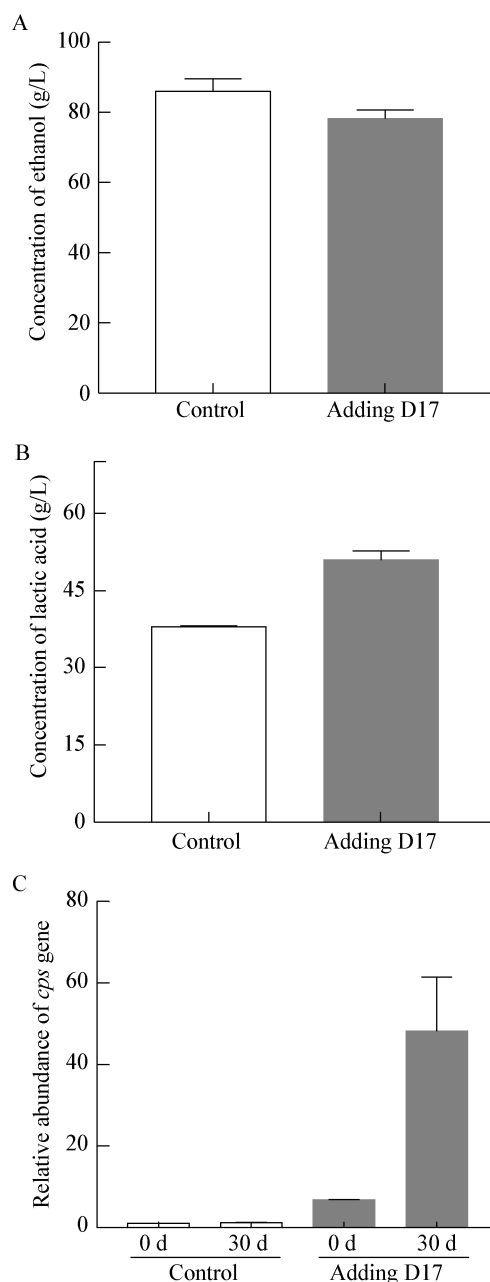


图 3 短乳杆菌 D17 菌株在白酒模拟发酵体系中的生长情况

Figure 3 Growth of *L. brevis* D17 in simulated fermentation system of Chinese liquor production

注: Control: 对照; Adding D17: 发酵前加入短乳杆菌 D17 菌株。A: 对照与实验组产生的乙醇; B: 对照与实验组产生的乳酸; C: 对照与实验组中 *cps* 的相对丰度。

Note: Control: Regular fermentation; Adding D17: *L. brevis* D17 cells was added prior to fermentation. A: Ethanol production of control and adding D17; B: Lactic acid production of control and adding D17; C: Relative abundance of *cps* between control and adding D17.

后, 实验组中 0 d 即有一定含量的 *cps* 片段, 说明用 *cps* 片段的丰度表征酿造体系中短乳杆菌的生长是可行的。添加短乳杆菌 D17 发酵 30 d 后, *cps* 片段的丰度显著增加, 说明来自白酒酿造体系的短乳杆菌 D17 可重新在白酒酿造体系中生长。因此, 用短乳杆菌 D17 作为出发菌株构建的 4-甲基苯酚消减菌株也可定殖于白酒酿造体系。

2.3 4-甲基苯酚消减菌的构建

谷氨酸棒杆菌的 4-甲基苯酚降解途径区别于其他菌, 主要是其含有的 4-甲基苯基磷酸酯合成酶能将 4-甲基苯酚的酚羟基进行磷酸酯化^[24]。而 4-甲基苯酚在白酒中能检出, 主要是由于 4-甲基苯酚的沸点(202 °C)高于乙醇(78 °C)和水(100 °C), 但由于固体蒸馏的夹带作用较强, 4-甲基苯酚能随酒精及其他风味成分一起被蒸馏出来。若将 4-甲基苯酚转变为 4-甲基苯基磷酸酯, 沸点将增加至 347 °C 以上(参照磷酸单苯酯 CAS 号为 701-64-4 的沸点, 347 °C), 照此推测被蒸馏出的 4-甲基苯酚将减少。4-甲基苯酚的磷酸酯化主要是由 CreI 和 CreH 协同发挥作用, CreI 为磷酸烯醇式丙酮酸/丙酮酸结合的丙酮酸磷酸激酶(pyruvate binding pyruvate phosphate dikinase), CreH 为磷酸烯醇式丙酮酸利用酶(utilizing enzyme)^[22,24]。本研究采用 *creI* 与 *creH* 串联表达方式在短乳杆菌中表达。

以谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 基因组为模板分别扩增 *creI* (图 4A)与 *creH* (图 4B), 与 RBS 串联后连接至表达载体 pMG36e, 获得过表达载体 pMG36e-*creIH* (图 4C)。过表达载体经测序验证正确后, 电转至短乳杆菌 D17 中得到 *Lactobacillus brevis* D17 (pMG36e-*creIH*)过表达菌株(图 4D)。同时将空质粒 pMG36e 电转入短乳杆菌 D17 中, 得到空白对照菌 *Lactobacillus brevis* D17 (pMG36e)。

2.4 CreIH 异源表达乳杆菌菌株对 4-甲基苯酚的消减能力

2.4.1 过表达菌株的过表达质粒稳定性

构建的 *creIH* 短乳杆菌过表达菌株需要应用

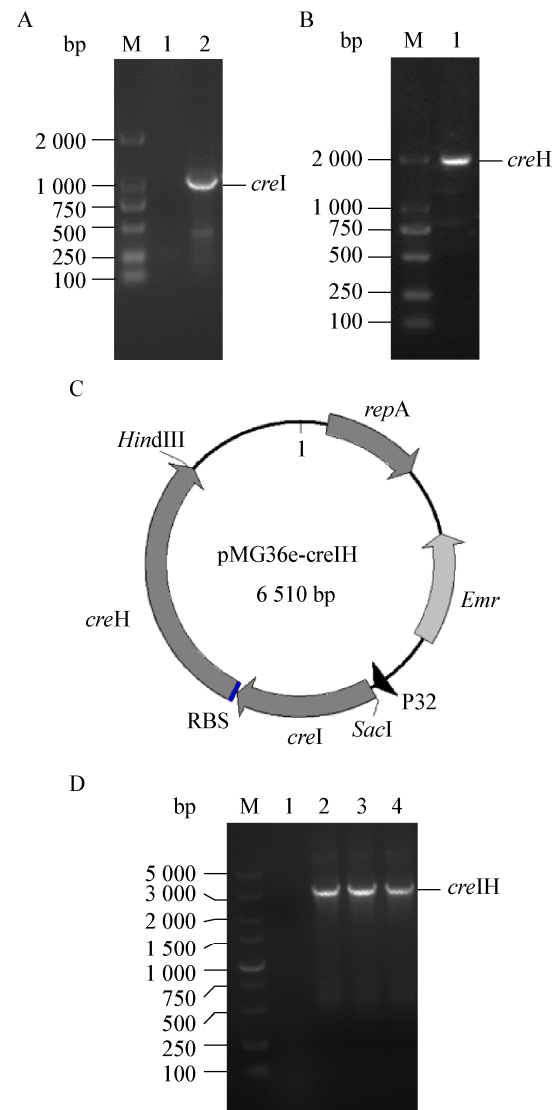


图 4 短乳杆菌 4-甲基苯酚消减菌的构建

Figure 4 Construction of *L. brevis* D17 overexpression strain with *p*-cresol reduction

注: A: *creI* 扩增: M: DL2000 DNA Marker; 1: 短乳杆菌 D17 基因组; 2: 谷氨酸棒杆菌基因组。B: *creH* 扩增: M: DL2000 DNA Marker; 1: 谷氨酸棒杆菌基因组。C: 构建的 *creIH* 过表达质粒。D: *creIH* 过表达短乳杆菌的 PCR 验证: M: DL5000 DNA Marker; 1: 短乳杆菌 D17 基因组; 2-4 短乳杆菌 D17 *creIH* 过表达菌株质粒。

Note: A: Amplification of *creI* by PCR: M: DL2000 DNA Marker; 1: Genomic DNA from *L. brevis* D17; 2: Genomic DNA from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. B: Amplification of *creH* by PCR: M: DL2000 DNA Marker; 1: Genomic DNA from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. C: *creIH* overexpressing plasmid. D: Verification of *creIH* overexpression in *L. brevis* D17 by PCR: M: DL5000 DNA Marker; 1: Genomic DNA from *L. brevis* D17; 2-4: Total DNA from *L. brevis* D17 transformed with pMG36e-*creIH* plasmid.

于白酒酿造体系中消减 4-甲基苯酚,但红霉素的添加会引起白酒酿造体系中发酵菌群紊乱,且存在食品安全隐患,因此在白酒酿造体系中不适合添加红霉素发酵。在测试 *creIH* 过表达菌株对 4-甲基苯酚的消减效果前,对该过表达菌株的过表达质粒稳定性进行了测试。由图 5 可以看出,随着发酵时间的延长,*creIH* 过表达菌株中的质粒维持率逐步降低,但发酵 72 h 质粒维持率仍可达 80%。可见所用的 pMG36e 质粒在短乳杆菌 D17 菌株中较稳定。

2.4.2 过表达菌株消减 4-甲基苯酚

creIH 过表达菌株与空白对照菌在不添加红霉素且接种量相同的条件下,37℃ 静置培养 48 h,4-甲基苯酚消减结果如图 6 所示。结果表明,空白对照菌几乎不消减 4-甲基苯酚,而 *creIH* 过表达菌株

可消减 4-甲基苯酚,4-甲基苯酚消减量达 2 130 μg/L。说明 *creIH* 已在短乳杆菌中成功表达,推测 *creIH* 过表达菌株中合成的 4-甲基苯基磷酸酯合成酶发挥了将 4-甲基苯酚转换为 4-甲基苯基磷酸酯的作用。

2.4.3 过表达菌株在白酒酿造体系中对 4-甲基苯酚的消减能力

为探究 *creIH* 过表达菌株对白酒酿造体系中 4-甲基苯酚的消减效果,选取含有 4-甲基苯酚的出池酒醅模拟发酵验证。将 *creIH* 过表达菌株与空白对照菌制成菌悬液,按相同接种量接入出池酒醅中,不添加红霉素,静置培养 48 h。4-甲基苯酚消减结果如表 3 所示,结果表明:空白对照菌株对 4-甲基苯酚几乎无消减能力,而 *creIH* 过表达菌可消减 530 μg/kg 左右的 4-甲基苯酚,消减率达 37.9%。

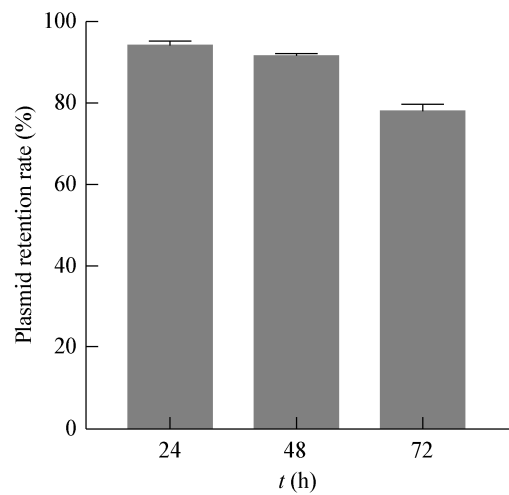


图 5 *creIH* 过表达质粒在短乳杆菌 D17 中的维持率
Figure 5 The retention rate of *creIH*-overexpressing plasmid in *L. brevis* D17

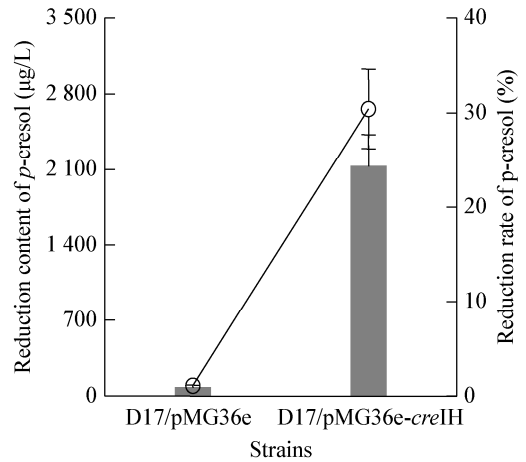


图 6 过表达 *creIH* 的短乳杆菌 D17 菌株消减 4-甲基苯酚的能力
Figure 6 The *p*-cresol reduction capability of *L. brevis* D17 with *creIH* overexpression

表 3 在短乳杆菌 D17 菌株中过表达 *creIH* 降低了白酒酿造酒醅中的 4-甲基苯酚含量

Table 3 The overexpression of *creIH* in *L. brevis* D17 decreased *p*-cresol in fermented grains of Chinese liquor production

菌株 Strains	4-甲基苯酚含量 Concentration of <i>p</i> -cresol (μg/kg)			消减率 Reduction rate (%)
	初始 Initial	残留 Residual	消减 Reduction	
D17/pMG36e	1 400±50	1 320±60	30±50	2.1
D17/pMG36e- <i>creIH</i>	1 400±50	870±30	530±40	37.9

3 讨论与结论

4-甲基苯酚作为异臭味物质常影响发酵食品的风味和品质^[31]。目前发现多种 4-甲基苯酚降解菌具有较好的 4-甲基苯酚降解能力, 如谷氨酸棒杆菌对低浓度(百万分之一) 4-甲基苯酚的降解率可达 99%以上, 但此类菌株需在中性或弱碱性环境中才能生长, 无法应用于酸性的发酵食品体系^[16,19]。本研究中, 我们在短乳杆菌中表达谷氨酸棒杆菌 4-甲基苯酚降解途径中的关键酶 4-甲基苯基磷酸酯合成酶, 通过将 4-甲基苯酚磷酸酯化, 提高产物沸点, 以实现 4-甲基苯酚在白酒酒体中的消减。我们选用的短乳杆菌 D17 菌株筛选自白酒酿造体系, 且具有较好的耐酸性能, 适合作为 4-甲基苯酚降解酶系表达的宿主菌。

本研究表明, 4-甲基苯基磷酸酯合成酶过表达菌株在模拟白酒酿造体系中能有效消减 4-甲基苯酚, 该研究为消减白酒发酵过程中以 4-甲基苯酚为代表的酚类异臭物质提供了新的思路。完整的谷氨酸棒杆菌 4-甲基苯酚降解酶系由 5 个酶复合体组成, 本研究仅对 4-甲基苯基磷酸酯合成酶编码基因进行了过表达。当然, 随着短乳杆菌遗传操作工具的完善, 未来有望将谷氨酸棒杆菌完整的 4-甲基苯酚降解基因簇导入乳杆菌中, 并按照食品级乳酸菌菌株的构建规范进行表达, 以实现乳酸菌对 4-甲基苯酚的完全降解。

REFERENCES

- [1] Liu B, Du H, Wang XS, et al. Detecting source of *p*-cresol in strong flavor Chinese liquor by high throughput sequencing[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(1): 108-117 (in Chinese)
刘博, 杜海, 王雪山, 等. 基于高通量测序技术解析浓香型白酒中窖泥臭味物质 4-甲基苯酚的来源[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(1): 108-117
- [2] Kriek M, Martins F, Challand MR, et al. Thiamine biosynthesis in *Escherichia coli*: identification of the intermediate and by-product derived from tyrosine[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(48): 9223-9226
- [3] Karagül-Yüceer Y, Cadwallader KR, Drake M. Volatile flavor components of stored nonfat dry milk[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(2): 305-312
- [4] Togay SO, Guneser O, Karagul Yuceer Y. Evaluation of physicochemical, microbiological, sensory properties and aroma profiles of goat cheeses provided from Canakkale[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2017, 70(4): 514-525
- [5] Mayr CM, Parker M, Baldock GA, et al. Determination of the importance of in-mouth release of volatile phenol glycoconjugates to the flavor of smoke-tainted wines[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(11): 2327-2336
- [6] Zheng J, Liang R, Wu CD, et al. Discrimination of different kinds of *Luzhou-flavor* raw liquors based on their volatile features[J]. *Food Research International*, 2014, 56: 77-84
- [7] Fan WL, Xu Y. Determination of odor thresholds of volatile aroma compounds in Baijiu by a forced-choice ascending concentration series method of limits[J]. *Liquor Making*, 2011, 38(4): 80-84 (in Chinese)
范文来, 徐岩. 白酒 79 个风味化合物嗅觉阈值测定[J]. *酿酒*, 2011, 38(4): 80-84
- [8] Zhang C. Investigation of off-flavor compounds in Chinese liquor[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)
张灿. 中国白酒中异臭物质研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013
- [9] Zhao DR, Shi DM, Sun JY, et al. Characterization of key aroma compounds in Gujingong Chinese Baijiu by gas chromatography-olfactometry, quantitative measurements, and sensory evaluation[J]. *Food Research International*, 2018, 105: 616-627
- [10] Fan WL, Xu Y. Volatile compounds of fermented-mud in Baijiu (Chinese Liquor)[J]. *Liquor Making*, 2010, 37(3): 24-31 (in Chinese)
范文来, 徐岩. 白酒窖泥挥发性成分研究[J]. *酿酒*, 2010, 37(3): 24-31
- [11] Du H, Liu B, Wang XS, et al. Exploring the microbial origins of *p*-cresol and its co-occurrence pattern in the Chinese liquor-making process[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 260: 27-35
- [12] Chen ZZ, Liu YD, Hua YJ, et al. Photocatalytic oxidation degradation of bio-treated effluents of textile and dyeing wastewater and its removal efficiency of organic substances[J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(9): 1792-1797 (in Chinese)
陈志铮, 刘勇弟, 化艳娇, 等. 光催化氧化(UV+TiO₂)法处理印染废水生化出水及其各类有机物去除[J]. *环境化学*, 2013, 32(9): 1792-1797
- [13] Singh RK, Kumar S, Kumar S, et al. Development of parthenium based activated carbon and its utilization for adsorptive removal of *p*-cresol from aqueous solution[J].

- Journal of Hazardous Materials, 2008, 155(3): 523-535
- [14] Singh T, Srivastava N, Bhatiya AK, et al. Analytical study of effective biodegradation of *p*-cresol using *Serratia marcescens* ABHI001: application in bioremediation[J]. 3 Biotech, 2017, 7(6): 384
- [15] Xenofontos E, Tanase AM, Stoica I, et al. Newly isolated alkalophilic *Advenella* species bioaugmented in activated sludge for high *p*-cresol removal[J]. New Biotechnology, 2016, 33(2): 305-310
- [16] Arya D, Kumar S, Kumar S. Biodegradation dynamics and cell maintenance for the treatment of resorcinol and *p*-cresol by filamentous fungus *Gliomastix indicus*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 198: 49-56
- [17] Tallur PN, Megadi VB, Ninnekar HZ. Biodegradation of *p*-cresol by immobilized cells of *Bacillus* sp. strain PHN 1[J]. Biodegradation, 2009, 20(1): 79-83
- [18] Surkatti R, El-Naas MH. Biological treatment of wastewater contaminated with *p*-cresol using *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel[J]. Journal of Water Process Engineering, 2014, 1: 84-90
- [19] Wojcieszynska D, Hupert-Kocurek K, Greń I, et al. High activity catechol 2,3-dioxygenase from the cresols-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(6): 853-858
- [20] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(1): 77-89
- [21] Song ZW, Du H, Zhang Y, et al. Unraveling core functional microbiota in traditional solid-state fermentation by high-throughput amplicons and metatranscriptomics sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1-12
- [22] Li T, Chen X, Chaudhry MT, et al. Genetic characterization of 4-cresol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 192: 355-365
- [23] Wang XS, Du H, Zhang Y, et al. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(4): e02369-17
- [24] Du L, Ma L, Qi FF, et al. Characterization of a unique pathway for 4-cresol catabolism initiated by phosphorylation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(12): 6583-6594
- [25] Van De Guchte M, Van Der Vossen JMBM, Kok J, et al. Construction of a *Lactococcal* expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(1): 224-228
- [26] Gong LC, Ren C, Xu Y. Deciphering the crucial roles of transcriptional regulator GadR on gamma-aminobutyric acid production and acid resistance in *Lactobacillus brevis*[J]. Microbial Cell Factories, 2019, 18(108): 1-12
- [27] Liu B. The origin study of off-odor compound *p*-cresol in Chinese strong aroma type liquor[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2016 (in Chinese)
刘博. 浓香型白酒中窖泥异味物质 4-甲基苯酚的产生机制研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2016
- [28] Liu SQ, Skinner-Nemec KA, Leathers TD. *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 converts a concentrated mixture of xylose and glucose into ethanol and other products[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(2): 75-81
- [29] Wang ZY, Xiao M. Comprehensive utilization of distiller's grains and its development foreground[J]. Liquor-making Science & Technology, 2004(1): 64-67 (in Chinese)
王肇颖, 肖敏. 白酒酒糟的综合利用及其发展前景[J]. 酿酒科技, 2004(1): 64-67
- [30] Cui L. Nutrition component of Chinese liquor and its benefit to human health[J]. Liquor Making, 2008, 35(1): 15-18 (in Chinese)
崔利. 中国白酒的营养成分及对人体健康的作用[J]. 酿酒, 2008, 35(1): 15-18
- [31] Nie YH. Study on the influencing factors of *p*-cresol and its precursor in strong aroma type Chinese liquor[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2018 (in Chinese)
聂元皓. 影响浓香型白酒酿造过程中 4-甲基苯酚及其前体物质产生的因素探究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2018