

## 酿酒功能菌的基因组测序及基因功能注释

麻静静<sup>1,3</sup>, 李惠源<sup>2,3</sup>, 高文静<sup>1,3</sup>, 韩英<sup>2,3</sup>, 贾丽艳<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>山西农业大学食品科学与工程学院 山西太谷 030801

<sup>2</sup>山西杏花村汾酒厂股份有限公司 山西汾阳 032209

<sup>3</sup>山西省白酒生物工程研究生教育创新中心 山西太谷 030801)

**摘要** 为挖掘库德毕赤酵母 FJZ 在清香型白酒酿造过程中的代谢机制, 基于 Illumina Novaseq 和 PacBio 测序平台对菌株 FJZ 进行基因组测序, 将测序数据在碳水化合物活性酶(CAZy)数据库进行比对, 并通过 GO、KOG 和 KEGG 数据库进行基因功能注释。CAZy 分析表明: 菌株 FJZ 具有催化酚类化合物转化合成芳香化合物的香草醇氧化酶(VAO)活性, 具有羧酸酯酶催化合成和分解乙酸乙酯、乳酸乙酯的能力, 具有甘露糖转移酶催化甘露糖转移到底物生成多萜寡糖的前体的能力等。在 GO 数据库共注释分子功能类别的基因 6 320 个, 具有转移烷基或芳基、糖基、酰基等与酯合成相关的转移酶活性。在 KEGG 的 7 类功能数据库中共注释基因 7 815 个, 其中代谢相关的基因有 1 406 个, 萜类和聚酮类物质代谢相关的基因 30 个。在 KOG 共注释到基因 3 704 个, 辅酶运输和代谢相关的基因 83 个等。本研究为清香型白酒酿造过程中酶系的研究, 以及白酒风味物质形成机理和酒醅功能菌结构探索提供参考依据。

**关键词** 库德毕赤酵母; CAZy 分析; 功能注释; 酶活性

**文章编号** 1009-7848(2024)05-0214-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.017

酿酒酵母是白酒发酵过程中的优势菌, 消耗糖类物质产生乙醇, 为其它微生物生长代谢提供底物, 在酿酒过程中发挥着重要作用。然而, 酿酒酵母产生的风味物质种类单一且产量较低, 醛类、酮类、乙酰类、萜烯类、氮化合物和硫化物等微量风味物质的产生需要非酿酒酵母的代谢<sup>[1]</sup>。非酿酒酵母库德里阿兹威氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)是毕赤酵母属中最常见的一种, 其具有趋酸、嗜温、兼性厌氧、产蛋白转移酶的特点, 对于高盐、高温、低 pH 值及高乙醇等环境胁迫具有良好的耐受性, 其诸多的优势使其成为酿酒酵母的良好补充, 可应用于白酒、果酒等发酵产品中增加风味<sup>[2-5]</sup>。

产果香风味的库德毕赤酵母 CGMCC16167 (简称“菌株 FJZ”), 是贾丽艳等<sup>[6]</sup>从清香型白酒的酒醅中分离筛选出来的, 经过传统纯培养、生理生化试验以及分子生物学鉴定, 确定其为库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*), 并命名为库德毕赤酵

母 FJZ, 同时采用 SPME-GC-MS 法分析其香气物质, 共检出 25 种果香味、花香味、可可香等挥发性香味物质, 确立了其在清香型白酒风味贡献领域的重要地位。此外, 韩英等<sup>[7]</sup>确定了菌株 FJZ 的高产乙酸乙酯的最佳发酵工艺, 使该菌株应用于清香型白酒酿造。Wang 等<sup>[8]</sup>通过构建模型确定 5 个属的核心微生物群呈现出与天然微生物类群相似的可重复的动态特征, 毕赤酵母就是其中一类。为进一步研究其代谢机制, 本文通过基因组测序和基因功能注释, 将所有预测得到的蛋白编码基因与数据库 CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database)<sup>[9-11]</sup>、KOG (EuKaryotic Orthologous Groups)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 和 GO (Gene Ontology) 中包含的蛋白质进行比较, 若该蛋白质与这些数据中的某一蛋白质具有显著的序列相似性, 则可以初步确定该蛋白具有和数据库中的蛋白质具有相似甚至是相同的功能。此方法的核心目标是对所有蛋白编码基因进行深入的功能性解析<sup>[11]</sup>, 从而探索库德毕赤酵母 FJZ 在酿造过程中的作用, 为白酒酿造过程中功能微生物的探索提供参考依据。

收稿日期: 2023-05-28

基金项目: 山西省基础研究计划项目(202303021221254)

第一作者: 麻静静, 女, 硕士生

通信作者: 贾丽艳 E-mail: liyangjia1979@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

前期的研究<sup>[9]</sup>已将菌株 FJZ 从酒醅中提取出来,并保藏于中国菌种保藏中心。

YEPD 培养基(蛋白胨 20 g/L,酵母膏 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 2%,蒸馏水 1 L),青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

DG-100 可见光分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;TG16A-WS 台式高速离心机,上海博讯实业有限公司;YXQ-LS-50S11 多功能摇床,上海博讯实业有限公司;GNP-9160 电热恒温培养箱,北京医疗设备工厂。

### 1.3 菌株 FJZ 的 DNA 提取

接种菌龄适宜的库德毕赤酵母 FJZ<sup>[9]</sup>,培养后进行 DNA 的提取。本次测序工作在南京派森诺基因科技有限公司进行。

### 1.4 碳水化合物活性酶(CAZY)分析

在基因组序列分析中,采用 hmmscan(版本 3.1b2,发布于 2015 年 2 月)这一软件工具,以预测存在于基因组序列中的 CAZy 酶类基因。

### 1.5 蛋白编码基因功能注释

蛋白编码基因的 KOG 注释采用 blast 软件来完成,所采用的数据库为 eggNOG (V4)。本次 KEGG 注释主要采用 KAAS(Ver. 2.1)自动化注释系统完成。GO 注释采用 InterPro (version 66.0, release 2017.11.23)软件来完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组基本信息

在本次测序试验中,共获得 12 185 540 条 reads,这些 reads 的碱基总数达到了 3 058 570 540。在所有的 reads 中,最长的序列长度为 113 464 bp,而最短的序列长度为 200 bp。这些序列的长度主要集中在 8 000 bp 左右。在所有的碱基中,GC 含量为 38.65%。在测定过程中,模糊碱基的比例仅为 0.012%。在所有的碱基中,识别准确率在 99%以上(Q20)的碱基占比为 94.1%,而识别准确率在 99.9%以上(Q30)的碱基占比为 86.6%。在组装过程中,得到了 15 个重叠群这些重叠群的总长度为 10 857 027 bp。在这些重叠群中,最长的重叠

群长度为 2 223 723 bp,而最短的重叠群长度为 5 277 bp。

### 2.2 菌株 FJZ 全基因组 CAZy 家族基因的注释情况

基因注释结果显示,菌株 FJZ 全基因组共有 131 个基因编码 CAZy 酶,共分布在 56 个家族中,覆盖 CAZy 家族 (GT、CE、AA、CBM 和 GH)5 个家族。其中 GT 家族编码数量最多,为 69 个基因,其次是 GH 家族编码 39 个基因,CE 和 AA 家族均编码 10 个基因,以上家族都具有 CAZy 酶活性,共有 128 个基因;CBM 家族编码 3 个基因,碳水化合物结合模块 CBM 是指具有能与碳水化合物结合成结构域的一类家族,单独的 CBM 不具有催化功能活性,常常与其它有催化活性的家族搭配,如许多有糖苷水解活性的酶蛋白同时也含有 CBM 结构域<sup>[11]</sup>。各类家族及亚家族所含编码基因数量的统计结果如表 1 所示。

表 1 菌株 FJZ 分析结果统计

Table 1 Statistics of strain FJZ analysis results

碳水化合物酶	注释到的基因数量	占总预测到的 ORF 数量的比例/%
糖基转移酶(GT)	69	1.5412
多糖裂解酶(PL)	0	0.0000
碳水化合物酯酶(CE)	10	0.2234
辅助活性酶(AA)	10	0.2234
碳水化合物结合模块(CBM)	3	0.0670
糖苷水解酶(GH)	39	0.8711

2.2.1 辅助活性酶(AA)家族 AA 家族具有氧化还原酶活性,能降解纤维素和木质素。本次共注释 10 个基因,分布在 5 个 AA 家族中。其中 AA4 家族有 4 个基因,AA6 家族有 3 个基因,AA1\_2、AA2 和 AA7 均为 1 个编码基因。

AA4 家族的香草醇氧化酶(VAO)能催化各种酚类化合物的转化,产生芳香族化合物<sup>[12]</sup>。在木质素降解过程中,AA4 酶具有催化关键中间体的活性。

AA6 家族的 1,4-苯醌还原酶是参与芳香族化合物的生物降解和保护真菌细胞免受活性醌类化合物影响的胞内酶。在真菌降解芳香族化合物

的过程中,醌类是关键的中代谢产物。

AA1\_2 亚家族包含的铁氧化还原酶是参与铁稳态的关键酶,能催化  $\text{Fe}^{2+}$  氧化为  $\text{Fe}^{3+}$ <sup>[13]</sup>。

AA2 家族酶的已知成员包括锰过氧化物酶(MnP)、木质素过氧化物酶(LiP)以及多功能过氧化物酶(VP)。

LiP 能氧化酚或非酚类芳香底物,从酚类或非酚类的苯环夺取电子,将其氧化成自由基,导致底物中的 C-C 键和醚键的氧化裂解。MnP 将 Mn(II) 氧化为 Mn(III),进而氧化各种能够降解或修饰木质素聚合物的酚类模型化合物。VP 是一种杂交的 Lip 样的 MnP 酶,它结合了 LiP 和 MnP 的催化特性,因此能够氧化 Mn(II)、酚类和非酚类底物<sup>[14]</sup>。

AA7 家族主要包含低聚糖氧化酶和壳寡糖氧化酶,能与 GH 家族配合降解木制纤维素。寡糖氧化酶<sup>[15]</sup>是作用底物范围广泛的新型氧化酶,可催化多种寡糖氧化形成相应的醛酸,根据作用底物的不同将寡糖氧化酶分为壳寡糖氧化酶(Chito-oligosaccharide oxidase, COOX)、葡萄糖寡糖氧化酶(Gluco-oligosaccharide oxidase, GOOX)、木寡糖氧化酶等(Xylo-oligosaccharide oxidase, XOOX)。葡萄糖寡糖氧化酶(GOOX)能将还原糖氧化为内酯并自发水解为相应的酸。GOOX 能够氧化多种碳水化合物(D-葡萄糖、麦芽糖、乳糖、纤维二糖、麦芽糖和纤维低聚糖),同时消耗氧气。

2.2.2 碳水化合物结构域(CBM)家族 共注释 3 个基因,分布在 3 个 CBM 家族(CBM1、CBM21、CBM32)中,每个家族只有 1 个编码基因,CBM1 家族的结构域是指在真菌中发现的大约 40 个氨基酸残基组成的结构域,它具有与纤维素绑定结合的功能,可能出现在序列的 N 端或 C 端,有保守的半胱氨酸位点。

2.2.3 碳水化合物酯酶(CE)家族 CE 家族共注释到 10 个基因,分布在 5 个 CE 家族中。CE1 有 4 个、CE9 为 3 个、CE10/14/4 均为 1 个。

CE1 家族的乙酰木聚糖酯酶<sup>[16]</sup>(水解乙酰化木聚糖,降解半纤维素等)、肉桂酰酯酶<sup>[17]</sup>(EC3.3.3.73,又称阿魏酸酯酶,是羧酸酯水解酶的一个亚类,与其它水解酶如木聚糖酶、纤维素酶和木质素酶相互联合作用,降解植物细胞壁中多糖与木质素,产生游离的阿魏酸、香豆酸和肉桂酸)<sup>[18-19]</sup>;CE9 家族

主要是 N-乙酰氨基葡萄糖 6-磷酸去乙酰化酶等酶的活性。CE10 家族的催化活性主要是芳酯酶、羧基酯酶、乙酰胆碱酯酶、胆碱酯酶、甾醇酯酶和 A 酯酶等酶活性。

CE4 家族有乙酰木聚糖酯酶、壳寡糖去乙酰化酶等。CE14 为二乙酰壳二糖去乙酰化酶和真菌硫醇 S-偶联酰胺酶等。

羧酸酯酶是白酒酿造过程中微生物合成酯类物质(己酸乙酯、乳酸乙酯)和催化酸、醇等底物实现酯化作用的酯化酶。该酶的存在说明菌株 FJZ 的酯合成能力。张杰等<sup>[20]</sup>通过分子建模和分子动力学模拟的手段,发现该酶的分解三丁酸甘油酯为丁酸和甘油,具有平衡酒体中丁酸和丁酸乙酯的功能,在协调酒体的风味中具有重要作用。

2.2.4 糖苷水解酶(GH)家族 糖苷水解酶(GH)家族是整个 CAZy 酶家族中最大的家族,本次共注释 39 个基因,分布在 20 个家族,其中 GH72 有 5 个,GH17 和 GH76 均有 4 个,GH132 和 GH18 均为 3 个,GH16、GH3、GH47、GH63 和 GH5\_9 均有 2 个编码基因。其它 10 个 GH 家族注释到的基因数量较少,均只有 1 个编码基因。

GH72 家族基因具有  $\beta$ -1,3-葡聚糖基转糖基化酶的活性。GH76 家族具有  $\alpha$ -1,6-甘露聚糖酶的活性。酿酒酵母细胞壁外层的甘露寡糖就是由细胞壁中的甘露聚糖酶酶解形成<sup>[21]</sup>。GH17 家族的催化活性有内切-1,3- $\beta$ -葡萄糖苷酶和葡聚糖 1,3- $\beta$ -葡萄糖苷酶等酶活性。GH18 家族的催化活性有几丁质酶、内切- $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖酶木聚糖酶抑制剂、刀豆蛋白 B、钠碱等。GH132 家族具有  $\beta$ -1,3-葡萄糖苷酶等酶的活性。GH15 家族的葡萄糖淀粉酶、葡萄糖醛酸酶和海藻酶的活性。

2.2.5 糖基转移酶(GT)家族 GT 是本次注释到基因数量最多的家族,共注释 69 个,分布在 23 个 GT 家族中。其中数量最多的是 GT71 (13 个),GT15 次之 (11 个);GT32 有 6 个,GT39 有 5 个,GT2 有 4 个,GT8/62/4/20/22 有 3 个,其它 GT 家族基因数量较少,有 11 个 GT 家族分别只有 1 个编码基因。

GT71 编码具有催化活性的  $\alpha$ -甘露糖转移酶可催化甘露糖形成多萜寡糖的前体;GT15 具有糖脂 2- $\alpha$ -甘露糖转移酶和  $\alpha$ -1,2-甘露糖转移酶,



是蛋白质修饰途径 *N*-糖基化的一个重要蛋白,催化甘露糖转移到底物 DPGn2M3 上进而生成 DPGn2M4 和 DPGn2M5 这 2 种多萜醇寡糖前体的反应。李庆猛<sup>[22]</sup>通过体外试验证明该酶在内质网膜外侧具有糖基转移酶活性,以 DPGn2M3 为底物,为糖基供体催化形成多萜醇寡糖前体。GT2 家族蛋白已知的催化活性有纤维素合成酶、几丁质合成酶、葡萄糖基转移酶、葡聚糖合酶、甘露聚糖合酶等酶活性。GT32 包含  $\alpha$ -1,4-*N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶和  $\alpha$ -1,4-*N*-乙酰半乳糖胺基转移酶等酶活性<sup>[23]</sup>。

### 2.3 基因功能注释

测序获得的所有基因序列与 NR、KOG、KEGG、Swiss-Prot 和 GO 几个数据库进行对比和功能注释<sup>[24]</sup>。结果发现有 4 477 个基因序列注释到这几个数据库,其中 NR、KOG、KEGG、Swiss-Prot 和 GO 数据库比对上的基因序列分别有 4 462, 3 704, 2 722, 3 748, 3 373 个,占基因总数的比值分别为 99.66%, 82.73%, 60.80%, 83.72%, 75.34%,重叠区域共有基因序列为 2 500 个(如图 1 所示)。

2.3.1 KOG 功能注释 如图 2 所示,菌株 FJZ 的全基因序列根据基因功能被划分为 25 个类别,其

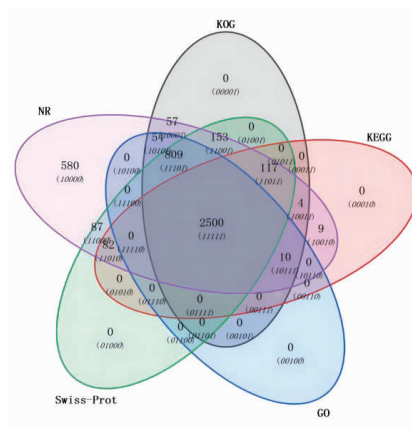


图 1 功能注释韦恩图

Fig.1 Venn diagram of functional annotation

中 3 704 个基因已被注释,占全基因序列的 82.73%。较为丰富的类别是“翻译、核糖体结构和生物合成(349)”,接下来是“翻译后修饰、蛋白质周转伴侣蛋白(313)”“细胞内运输、分泌和囊泡运输(280)”“转录(245)”“碳水化合物的运输和代谢(220)”。注释较少的是“细胞外结构(4)和细胞核结构(4)”。另外,还参与“脂质转运和代谢(131)、氨基酸运输和代谢(201)、能源生产和转换(188)、无机离子转运和代谢(111)、辅酶转运和代谢(83)。”需要注意的是,功能未知的基因(S)有 641 个,占比

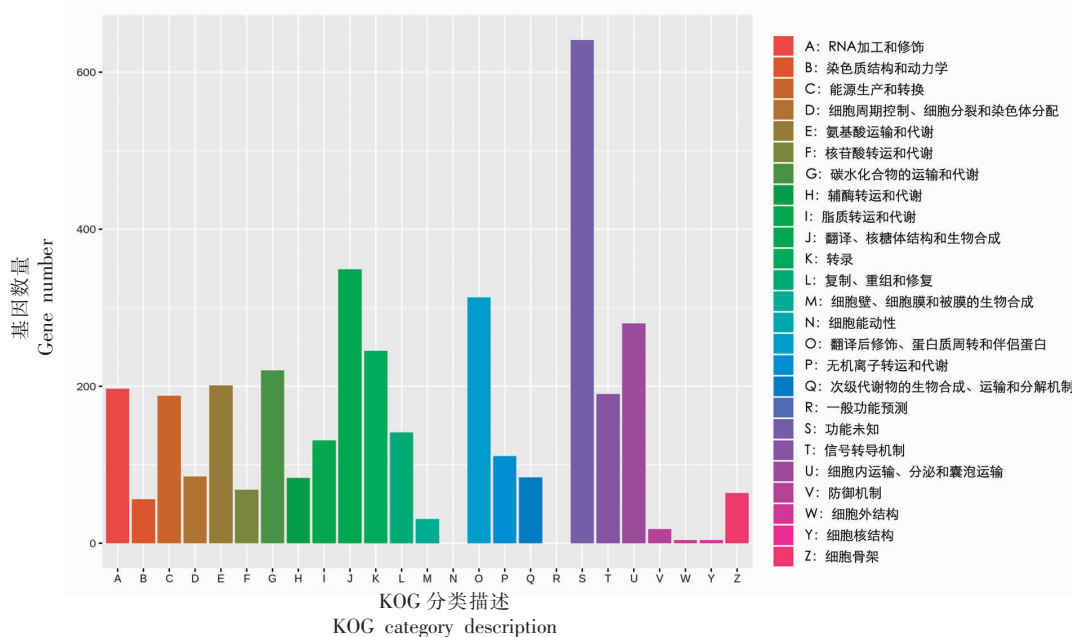


图 2 KOG 分类注释结果统计

Fig.2 KOG classification and annotation results statistics

17.31%,需要进一步研究<sup>[25]</sup>。

乙酸和乳酸可作为己酸和丁酸合成的底物,辅酶和还原物质的还原力是该途径的重要物质。

细胞内的辅酶涉及广泛的氧化还原反应,影响产物的形成。其中 NADH 和 NADPH 2 种辅酶在分解和合成代谢中发挥作用。在酿酒酵母细胞

内,NADH 主要参与分解代谢,在好氧条件下通过 NADH 脱氢酶氧化并产生 ATP。NADPH 主要参与合成代谢,氨基酸、脂类及核苷酸的合成都需要 NADPH 提供还原力<sup>[26]</sup>。

2.3.2 KEGG 功能注释 KEGG 功能分类注释结果统计,如图 3 所示。

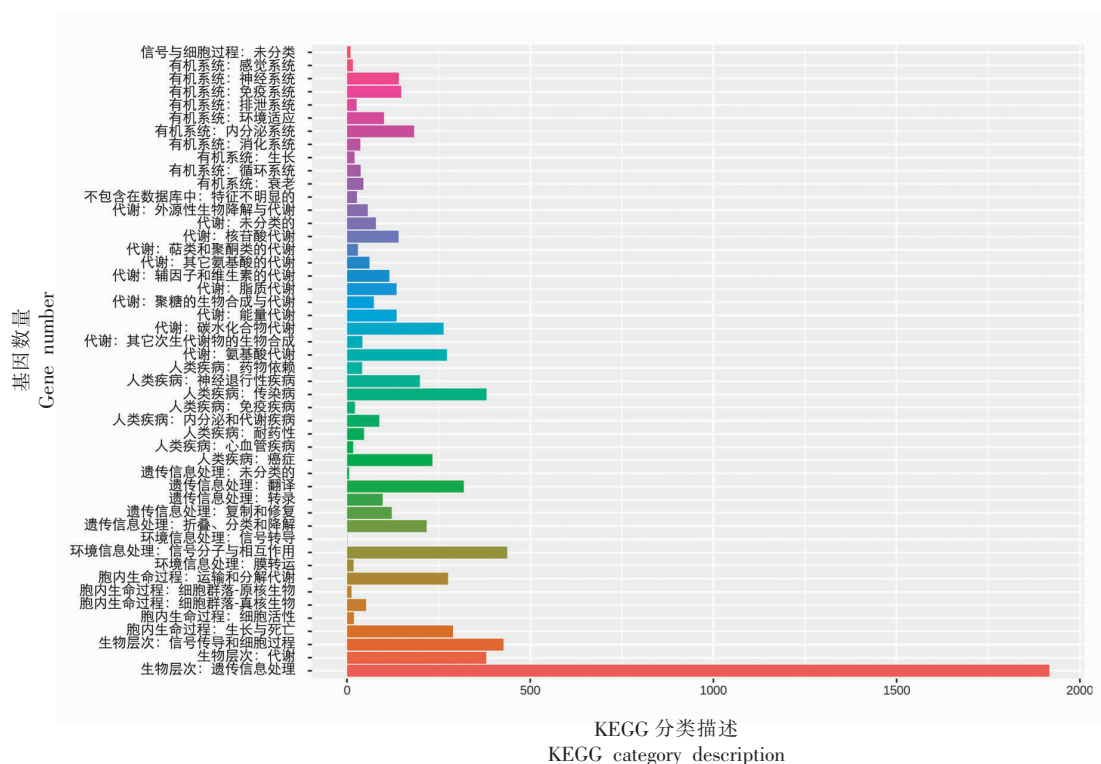


图 3 菌株 FJZ 蛋白编码基因的 KEGG 注释

Fig.3 KEGG annotation of strain FJZ protein coding gene

通过 KEGG 数据库对菌株 FJZ 基因组的注释<sup>[27]</sup>,结果分为 7 类,共注释 7 815 个基因,包含生物层次(Brite hierarchies)2 724 个、胞内生命过程(Cellular processes)648 个、环境信息处理(Environmental information processing)456 个、遗传信息处理(Genetic information processing)761 个、人类疾病(Human diseases)1 028 个、代谢(Metabolism)1 406 个、有机系统(Organismal systems)755 个<sup>[27]</sup>。不包含在 KEGG Pathway 和 KEGG Brite 数据库中的基因 27 个,未分类的基因 10 个。

其中代谢 1 406 个基因,包含氨基酸代谢 273 个、其它氨基酸的代谢 61 个、其它次生代谢物的生物合成 42 个、碳水化合物代谢 264 个、能量代

谢 135 个、聚糖的生物合成和代谢 73 个、脂质代谢 135 个、辅因子和维生素的代谢 116 个、萜类和聚酮类的代谢(羟甲基戊二酰-CoA 合酶)30 个、核苷酸代谢 141 个、外源性生物降解与代谢 57 个及未分类的 79 个。

2.3.3 GO 功能注释 通过 GO 功能注释分析(图 4),分为分子功能(Molecular function, MF)、细胞组分(Cellular component, CC)、生物过程(Biological process, BP)3 类<sup>[28]</sup>。分子功能是对生物分子在生物学层面上的活性的描述,例如催化活性或结合活性。生物过程是由一系列有序的功能组成的多步骤过程,例如细胞周期。细胞组分是指基因产物存在于哪种细胞器或基因产物组中,例

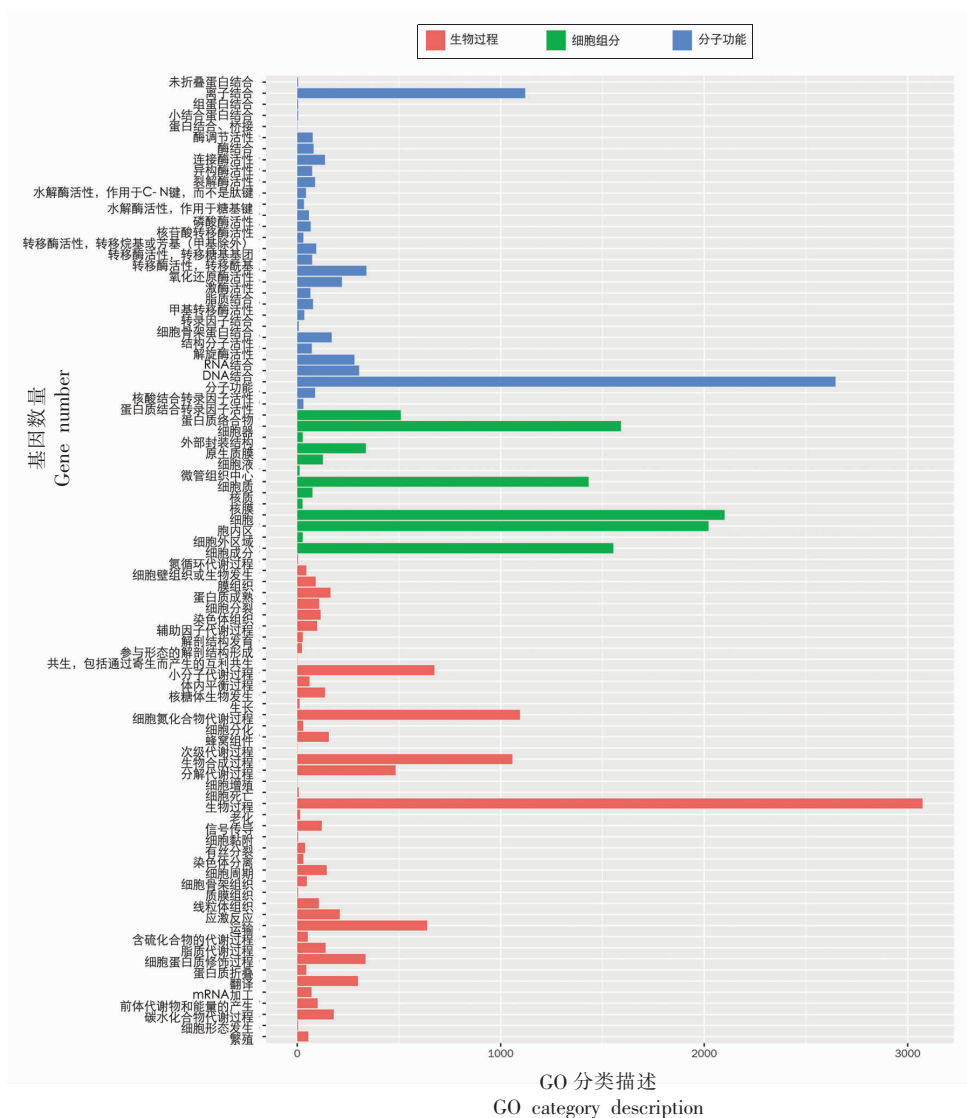


图 4 菌株 FJZ 蛋白编码基因的 GO 功能注释

Fig.4 GO functional annotation of the strain FJZ protein encoding gene

如糙面内质网、核糖体、蛋白酶体等,这决定了基因产物在何处发挥作用。

在对 FJZ 菌株的全基因组进行 GO 功能注释的过程中,共获得了 26 260 个 GO 注释。在生物过程部分,发现共有 11 622 个基因被注释,这些基因占据了全基因组的 44.3%。在分子功能部分,发现涉及到的基因数量为 19 069 个,约占全基因组的 72.6%,其中,结合活性和催化活性的基因数量分别为 2 026 个和 1 793 个,占有相对较大的比例。

包含转移酶、水解酶、氧化还原酶等。转移酶

转移酰基、烷基或芳基、甲基、糖基等;磷酸转移酶以醇基为受体,参与戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化,是白酒酿造过程产酯相关的酶。细胞组分(Cellular component)9 838 个,约占全基因组 37.5%,其中细胞涉及 2 100 个基因,胞内涉及 2 021 个基因。

### 3 结论

白酒酿造过程中的芳香味和美好滋味的产生,都是酶催化作用的产物。白酒酿造有关的酶有分解原料的淀粉酶类、纤维素酶、蛋白质分解酶等

分解酶,也有如磷酸化酶、脱氢酶、脱羧酶、转移酶、酯酶等为发酵积累甘油、琥珀酸、高级醇等副产物的发酵酶。

本试验对菌株 FJZ 进行全基因组测序后,经过 CAZy 酶分析,表明菌株 FJZ 具备分解酶类如淀粉酶来消化高粱等营养物质,具备催化酚类化合物转化合成芳香化合物的香草醇氧化酶(VAO)活性,具有羧酸酯酶催化合成和分解乙酸乙酯、乳酸乙酯的能力,具有甘露糖转移酶催化甘露糖转移到底物生成多萜寡糖的前体的能力等。GO 数据库注释分子功能的基因 6 320 个,具有转移烷基或芳基、糖基、酰基等与酯合成相关的转移酶活性,其中的磷酸转移酶参与戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化。在 KEGG 的 7 类功能数据库中共注释基因 7 815 个,其中代谢相关的基因有 1 406 个,萜类和聚酮类物质代谢 30 个。经过 CAZy 分析和 GO、KOG 和 KEGG 数据库基因功能注释,表明菌株 FJZ 对于己酸乙酯和乳酸乙酯两种风味物质的合成及酚类、酯类、酸类、萜类和聚酮类等白酒微量风味物质的合成具有重要的作用。

该研究为清香型白酒酿造过程中酶系的研究以及白酒风味物质形成机理和酒醅功能菌株 FJZ 的生态角色的探索提供依据。

### 参 考 文 献

- [1] XU Y Q, ZHAO J R, LIU X, et al. Flavor mystery of Chinese traditional fermented Baijiu: The great contribution of ester compounds [J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130920.
- [2] 蒲鹏飞. 非酿酒酵母与酿酒酵母的相互作用及其对海红果酒品质的影响[D]. 西安: 陕西科技大学, 2018.  
PU P F. The interaction between non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on the quality of Haihong Wine[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2018.
- [3] 王德培, 胡阳, 焦富. 库德里阿兹威氏毕赤酵母在发酵工业中的研究进展[J]. 酿酒科技, 2021(6): 95-101.  
WANG D P, HU Y, JIAO F. Research progress in the application of *Pichia kudriavzevii* in industrial fermentation[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2021(6): 95-101.
- [4] 林良才, 白茹, 高滢, 等. 高耐性库德里阿兹威氏毕赤酵母的筛选及应用[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 60-67.  
LIN L C, BAI R, GAO Y, et al. Screening of a robust high-tolerance *Pichia kudriavzevii* strain and its application in Baijiu fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(3): 60-67.
- [5] XU W Y, QI X X, HE X X, et al. Effects of stress on the growth and cadmium removal ability of *Pichia kudriavzevii* G43 overexpressed *GST* gene[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(11): 3620-3626.
- [6] 贾丽艳, 张丽, 李惠源, 等. 果香风味导向的库德里阿兹威氏 FJZ 的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 276-282.  
JIA L Y, ZHANG L, LI H Y, et al. The screening and identification of *Pichia kudriavzevii* FJZ by flavor-oriented technology and its biological characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 276-282.
- [7] 韩英, 李惠源, 贾丽艳, 等. 库德里阿兹威氏 FJZ 固态发酵产乙酸乙酯工艺的优化[J]. 酿酒科技, 2021(9): 131-135, 140.  
HAN Y, LI H Y, JIA L Y, et al. Optimization of ethyl acetate production process of *Pichia kudriavzevii* FJZ by solid-state fermentation[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2021(9): 131-135, 140.
- [8] WANG S, WU Q, NIE Y, et al. Construction of synthetic microbiota for reproducible flavor compound metabolism in Chinese light-aroma-type liquor produced by solid-state fermentation[J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(10): e03090-18.
- [9] CANTAREL B L, COUTINHO P M, RANCUREL C, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: D233-D238.
- [10] VINCENT L, HEMALATHA GOLACONDA R, ELODIE D, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(1): D490-D495.
- [11] 陶永新. 草菇分别在稻草诱导下和菌柄伸长中 CAZy 家族的表达调控[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.  
TAO Y X. Expression and regulation of CAZy family genes of *Volvariella volvacea* grown on the rice straw as well as during stipe elongation[D]. Fuzhou:



- Fujian Agriculture and Forestry University, 2015.
- [12] LEFRINK N G H, HEUTS D P H M, FRAAIJE M W, et al. The growing VAO flavoprotein family[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 474(2): 292-301.
- [13] 张强. “川羊肚菌1号”中两个关键性AA1家族酶活性鉴定及生化特性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- ZHANG Q. Biochemical characterization of two important AA1 family enzymes of *Morchella importuna* SCYDJ1-A1[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2019.
- [14] ANTHONY L, ELODIE D, VINCENT L, et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes [J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(41): 1-14.
- [15] 彤丽格, 罗会颖, 孟昆. 寡糖氧化酶研究进展[J]. 生物技术进展, 2020, 10(1): 46-52.
- TONG L G, LUO H Y, MENG K. Progress on oligosaccharide oxidase [J]. Current Biotechnology, 2020, 10(1): 46-52.
- [16] 曹杰. 草菇乙酰木聚糖酯酶的重组表达及其酶学特性[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- CAO J. Recombination expression and enzymatic characterization of acetate xylan esterase in *Volvariella volvacea*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2007.
- [17] 陈艳. 乙酰木聚糖酯酶的优化表达及催化特性研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- CHEN Y. Fermentation optimization and catalytic properties of acetyl xylan esterase[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.
- [18] 王婕妤. 阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的异源表达及酶学特性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- WANG J Y. Heterologous expression of ferulic esterase in *Pichia pastoris* and analysis of its enzymatic properties[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [19] 黄雪月, 张梁, 李赢, 等. 黑曲霉阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的组成型表达[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 68-78.
- HUANG X Y, ZHANG L, LI Y, et al. Constitutive expression of feruloyl esterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 68-78.
- [20] 张杰, 侯珺淇, 代振玉, 等. 一株产羧酸酯酶菌的鉴定及酯酶特征的研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 126-134.
- ZHANG J, HOU J Q, DAI Z Y, et al. Identification of a strain with carboxylesterase and its enzymatic character[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 126-134.
- [21] LIU M Q, LIU G J, YAN X F. Co-expression of *Polygonum sibiricum* glutathione transferase and cysteine synthase genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 25(6): 687-694.
- [22] 李庆猛. 酵母来源 $\alpha$ -1,2甘露糖转移酶Alg11的异源表达、纯化和活性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- LI Q M. Expression, purification and activity assay of yeast  $\alpha$ -1,2 mannosyltransferase Alg11[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [23] 郑楠, 郭庆焕, 何亚辉, 等. 乙酰辅酶A含量对酿酒酵母乙酸乙酯合成的影响[J]. 中国酿造, 2018, 37(5): 150-156.
- ZHENG N, GUO Q H, HE Y H, et al. Effect of acetyl-CoA content on ethyl acetate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Brewing, 2018, 37(5): 150-156.
- [24] DENG A P, LI J P, YAO Z B, et al. SMRT sequencing of the full-length transcriptome of the *Coelomactra antiquata*[J]. Front Genet, 2021, 12: 741243.
- [25] 李雪萍, 许世洋, 范雨轩, 等. 木贼镰孢基因功能注释及比较基因组学分析[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 8-15.
- LI X P, XU S Y, FAN Y X, et al. Genes functional annotation and comparative genomic analysis of *Fusarium equiseti* [J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(1): 8-15.
- [26] JENSEN J, KA J, RYAN Z C, et al. An NADH: Quinone oxidoreductase active during biodegradation by the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(6): 2699-2703.
- [27] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 27-30.
- [28] POWELL S, FORSLUND K, SZKLARCZYK D, et al. eggNOG v4.0: Nested orthology inference across 3686 organisms[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42: D231-D239.



## Genome Sequencing Analysis and Gene Function Annotations of Functional Brewing Fungi

Ma Jingjing<sup>1,3</sup>, Li Huiyuan<sup>2,3</sup>, Gao Wenjing<sup>1,3</sup>, Han Ying<sup>2,3</sup>, Jia Liyan<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>*School of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi*

<sup>2</sup>*Shanxi Xinghuacun Fenjiu Factory Co., Ltd., Fenyang 032209, Shanxi*

<sup>3</sup>*The Graduate Education Innovation Center on Baijiu Bioengineering in Shanxi Province, Taigu 030801, Shanxi*

**Abstract** In order to explore the metabolic mechanism of *Pichia kudriavzevii* FJZ in the brewing process of light-aroma Baijiu, the genome of the strain FJZ was sequenced based on Illumina Novaseq and PacBio sequencing platform, and the sequencing data was compared and analyzed in the carbohydrate active enzyme (CAZy) database, gene function annotation was also performed in GO, KOG and KEGG databases. In the CAZy analysis, it was shown that the strain FJZ had the activity of vanillyl alcohol oxidase (VAO) that catalyzed the conversion of phenolic compounds into aromatic compounds, carboxylesterase catalyzed the synthesis and decomposition of ethyl acetate and ethyl lactate, it had  $\alpha$ -1,2-mannose transferase to catalyze mannose to form a precursor to polyterpenoid oligosaccharides. In the GO database, 6 320 genes with molecular function was annotated, it included transferase activities related to ester synthesis, they had the function of transferring alkyl or aryl groups, sugar groups, acyl groups, etc. In the KEGG's seven functional database, a total of 7 815 genes were annotated, of which 1 406 genes were metabolic-related genes, and 30 genes were included terpenoids and polyketides. KOG annotated a total of 3 704 genes, coenzyme transport and metabolism 83 genes. This study provides a basis for the study of enzyme lines in the brewing process of light-aroma baijiu, as well as the formation mechanism of liquor flavor substances and the structure of functional bacteria of liquor.

**Keywords** *Pichia kudriavzevii*; CAZy analysis; functional annotations; enzyme activity