

## 葡萄牙棒孢酵母 J5 不同培养物的挥发性代谢产物分析

许彬<sup>1</sup>, 刘煜祈<sup>1</sup>, 宋锦波<sup>1</sup>, 李宜笑<sup>1</sup>, 仵花芝<sup>1</sup>, 李慧星<sup>1\*</sup>, 张建辉<sup>2</sup>, 李刚<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 南阳理工学院 生物与化学工程学院 河南南阳 473004

<sup>2</sup> 赊店老酒股份有限公司 河南南阳 473004)

**摘要** 研究葡萄牙棒孢酵母 J5 不同培养物的挥发性代谢产物。以马铃薯、高粱、小麦和红小米的提取物为培养基质,培养葡萄牙棒孢酵母 J5 获得 4 种培养物。采用顶空固相微萃取-全二维气相色谱-四极杆飞行时间质谱测定培养物的挥发性代谢产物,利用化学计量学方法分析数据。结果表明:葡萄牙棒孢酵母 J5 的 4 种培养物中,共检测到 65 种挥发性代谢产物。红小米培养物(HXM)中挥发性代谢产物的种类最丰富,小麦培养物(XM)中挥发性代谢产物的总浓度最高。乙醇、己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸苯乙酯、乙醛、庚酸乙酯在 3 种谷物培养物中含量差异不显著。主成分分析得分图表明,高粱培养物(GL)和 XM 具有相似性。XM 和 HXM 的正交偏最小二乘判别分析模型获得 40 种投影中变量重要性(VIP)>1 且含量差异显著的关键差异挥发性代谢产物,另外有 5 种含量差异显著而 VIP<1 的挥发性代谢产物。HXM 中己醇、乙酸丁酯、庚醛、3-甲基丁醛、2-戊基呋喃、1-辛烯-3 醇、3-甲基-1-丁醇、顺-2-庚烯醛的相对气味活性值(ROAV)>1,与 XM 中的重要香气物质虽有所不同,但这些物质是发酵酒中常见的香气成分,具有优良的风味。这说明采用红小米培养葡萄牙棒孢酵母,用于红谷黄酒增香是可行的。

**关键词** 葡萄牙棒孢酵母; 培养物; 挥发性; 代谢产物; 香气活性

**文章编号** 1009-7848(2026)01-0315-14 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.028

酒类酿造以酿酒酵母为主要酿造微生物,然而许多非酿酒酵母(non-Saccharomyces)也参与其中<sup>[1]</sup>。非酿酒酵母的代谢产物能改善酒体的口感、风味及香气<sup>[2-4]</sup>。葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)是一种广泛存在于发酵制品中的非酿酒酵母,在大曲<sup>[5]</sup>、葡萄汁<sup>[6]</sup>、发酵酒<sup>[7]</sup>、发酵乳制品<sup>[8]</sup>等产品中均有分布。Pereyra 等<sup>[9]</sup>发现 1 株葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae* AgL21)的挥发性代谢产物中含有乙酸乙酯、苯乙醇、乙酸异戊酯等具有香气活性的成分。目前,有研究者将葡萄牙棒孢酵母用于白酒和黄酒的酿造中。屈春云等<sup>[10]</sup>将 1 株葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae* YJ18)应用于米香型白酒酿造中,可有效提高米香型白酒中乳酸乙酯和乙酸乙酯的含量。Zhao 等<sup>[11]</sup>将 1 株来自大曲的葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae* CP-1)用于黄酒发酵,酒中的乙酸乙酯和苯乙醇含量增加。酵母产生代谢产物的种类和含量会因生

长环境的不同而有所差异。Méndez-Zamora 等<sup>[12]</sup>研究克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*)在龙舌兰汁和“M12”培养基中的挥发性代谢产物差异,发现经 30 ℃、48 h 培养后,菌种 PK1 在龙舌兰汁中产生的异丁醇、乙酸乙酯、乙醛含量更高。葡萄牙棒孢酵母具有产香和产酯能力,而其在不同酿酒基质上的产香特征的对比研究未见报道。

红谷黄酒是南阳地区的特色黄酒产品,以红小米为主要酿酒原料。红小米与马铃薯、小麦、高粱等培养基原料在营养成分上存在较大差异<sup>[13-14]</sup>。酵母在红小米培养基中产生的代谢产物可能有别于在其它培养基中产生的代谢产物。四极杆飞行时间质谱广泛应用于代谢物非靶向定性、定量分析,它能够提供较高的质量精度和分辨率,有良好的鲁棒性<sup>[15]</sup>。为阐明葡萄牙棒孢酵母的红小米培养物(HXM)与马铃薯培养物(PDA)、高粱培养物(GL)、小麦培养物(XM)在挥发性代谢产物上的差别,本研究采用顶空固相微萃取-全二维气相色谱-四极杆飞行时间质谱(Headspace solid phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, HS-SPME-GC×GC-

收稿日期: 2025-02-08

基金项目: 河南省科技攻关项目(252102110110); 南阳市重大科技专项(24ZDZX004)

第一作者: 许彬,女,硕士,副教授

通信作者: 李慧星 E-mail: comet686@163.com

QTOFMS)检测葡萄牙棒孢酵母培养物的挥发性代谢产物。分析不同培养物的挥发性代谢产物分布和含量。对检测数据采用化学计量学中的主成分分析(Principal component analysis, PCA),可视化不同培养物中挥发性代谢产物的差异<sup>[16]</sup>。以正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)判别葡萄牙棒孢酵母的红小米培养物与小麦培养物的关键差异挥发性代谢产物<sup>[17]</sup>。从挥发性代谢产物的风味特征和香气贡献角度,探讨红小米培养葡萄牙棒孢酵母的可行性,为红谷黄酒酿造用产香微生物的选择提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

马铃薯、高粱、红小米、小麦,市售;葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae* J5),河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室保藏。

$\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、酵母膏、蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;葡萄糖、氯化钠(均为分析纯级),天津市科密欧化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

气相色谱-四极杆串联飞行时间质谱联用仪(8890-7250),美国安捷伦科技公司;全二维气相色谱固态热调制器(SSM1810),雪景电子科技(上海)有限公司;进样器(CTC),瑞士 CTC Analytics 公司;高速离心机(TGL-16MC),长沙湘锐离心机有限公司;立式高压蒸汽灭菌器(LDZX-50L),上海申安医疗器械厂;糖量计(WZS-60),上海精密科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 培养基质

1) YPD 液体培养基 酵母膏 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 加水定容至 1 L, 115 °C 灭菌 30 min。

2) 马铃薯液体培养基 马铃薯提取液 1 L, 葡萄糖 20 g, 自然 pH 值, 115 °C 下灭菌 30 min。

3) 谷物提取物培养基<sup>[18]</sup>:将高粱、红小米、小麦分别粉碎,取 250 g 粉碎谷物粉与 1 L 去离子水混合,加入 3 g  $\alpha$ -淀粉酶(3 700 U/g),60 °C 酶解 2 h,再加入 3 g 糖化酶(1×10<sup>4</sup> U/g),60 °C 糖化 4

h。最后,用纱布过滤除去沉淀物,并在 8 000 r/min 下离心 15 min,收集上清液。使用糖量计测量糖含量,用超纯水调节糖度至 10 °Bx。将上清液在 115 °C 下灭菌 30 min。

#### 1.3.2 培养方法

1) 种子液的制备 将活化后的酵母接种于 YPD 液体培养基,在 28 °C,120 r/min 下培养 18 h,至对数期。

2) 酵母培养物 吸取一定量的种子液,接种于 150 mL PDA 液体培养基或谷物提取物培养基中,接种后使菌浓度达到 1×10<sup>6</sup> CFU/mL。接种后的培养基质在 28 °C,120 r/min 下培养 24 h,至平稳期。每种培养物平行培养 3 次。

#### 1.3.3 培养物挥发性代谢产物分析

1.3.3.1 样品萃取 采用顶空-固相微萃取法处理样品,萃取头 DVB/CWR/PDMS(80  $\mu$ m)。将 25  $\mu$ L 2-辛醇(99.41  $\mu$ g/mL)、3 g NaCl 与 5 mL 混合均匀的酵母培养物置入顶空瓶中(样品中内标终质量浓度为 0.497  $\mu$ g/mL),于 50 °C 条件下,平衡 15 min。将 250 °C 老化 6 min 的萃取头插入顶空瓶,吸附萃取 30 min,在 250 °C 下解析 5 min,进样分析。

1.3.3.2 气相色谱条件 色谱柱:一维柱 HP-5 柱(30 m×0.25 mm×0.25  $\mu$ m),二维柱 DB-17(1.2 m×0.18 mm×0.18  $\mu$ m);SPME 专用衬管,不分流进样;升温程序:初始柱温 40 °C 保持 3 min,以 5 °C/min 升温至 250 °C 保持 5 min;调制柱 SV(C6-C40),调制周期 6 s;载气 He,流速 1 mL/min;碰撞气 N<sub>2</sub>。

1.3.3.3 质谱条件 电子轰击离子源,电离电压 70 eV,离子源温度 200 °C,传输线温度 250 °C,检测器采集质量数范围 45~500  $m/z$ ,采集频率为 100 spectrum/s。

1.3.3.4 定性、定量方法 对培养物样品的总离子流图进行峰检测,信噪比取 50。将检测到的物质与 NIST 质谱库对比进行定性分析,删除柱流失和含卤素化合物,合并重复项,保留匹配度大于 700 且 3 个平行中至少出现 2 次的化合物<sup>[19]</sup>,最后使用平均值补充缺失值<sup>[20]</sup>。

挥发性代谢产物含量的计算<sup>[21]</sup>:采用半定量计算方法,以 2-辛醇为内标,挥发性代谢产物含量按式(1)计算。

$$\text{挥发性代谢产物含量}(\mu\text{g/mL}) = \frac{A_s}{A_r} \times C_r \quad (1)$$

式中:  $C_r$  为样品中内标的质量浓度,  $0.497 \mu\text{g/mL}$ ;  $A_s$  和  $A_r$  分别为样品中挥发性代谢产物和内标的峰面积。

气味活性值(Odour active value, OAV)<sup>[22]</sup>和相对气味活性值(Relative odor active value, ROAV)<sup>[23]</sup>的计算:采用相对气味活性值(ROAV)评估单个化合物对整体香气的贡献,ROAV 值越大的香气组分越容易被人体感知。对香气贡献最大的香气物质 ROAV=100。ROAV>1 的化合物可以认为是重要香气活性化合物。OAV 和 ROAV 分别按式(2)和式(3)计算。

$$\text{OAV}_i = \frac{C_i}{T_i} \quad (2)$$

$$\text{ROAV} = \frac{\text{OAV}_i}{\text{OAV}_{\max}} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $C_i$  为第  $i$  个挥发性代谢产物的含量,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $T_i$  为第  $i$  个挥发性代谢产物的气味阈值,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\text{OAV}_i$  为第  $i$  个挥发性代谢产物的气味活性值;  $\text{OAV}_{\max}$  为最大的气味活性值。

1.3.4 数据处理 采用 SPSS 23 软件对所得数据进行方差分析和  $t$  检验, 利用 chiplot (<https://www.chipplot.online/>) 绘制柱状图、upset 图和热图, 利用迈维代谢生信云平台 (<https://cloud.metware.cn>) 进行 PCA 分析和 OPLS-DA 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 挥发性代谢产物 GC×GC-QTOF-MS 谱图

本研究中所选培养基质均为适于酵母菌生长的培养基质, 马铃薯培养基适用于真菌的培养<sup>[24]</sup>,

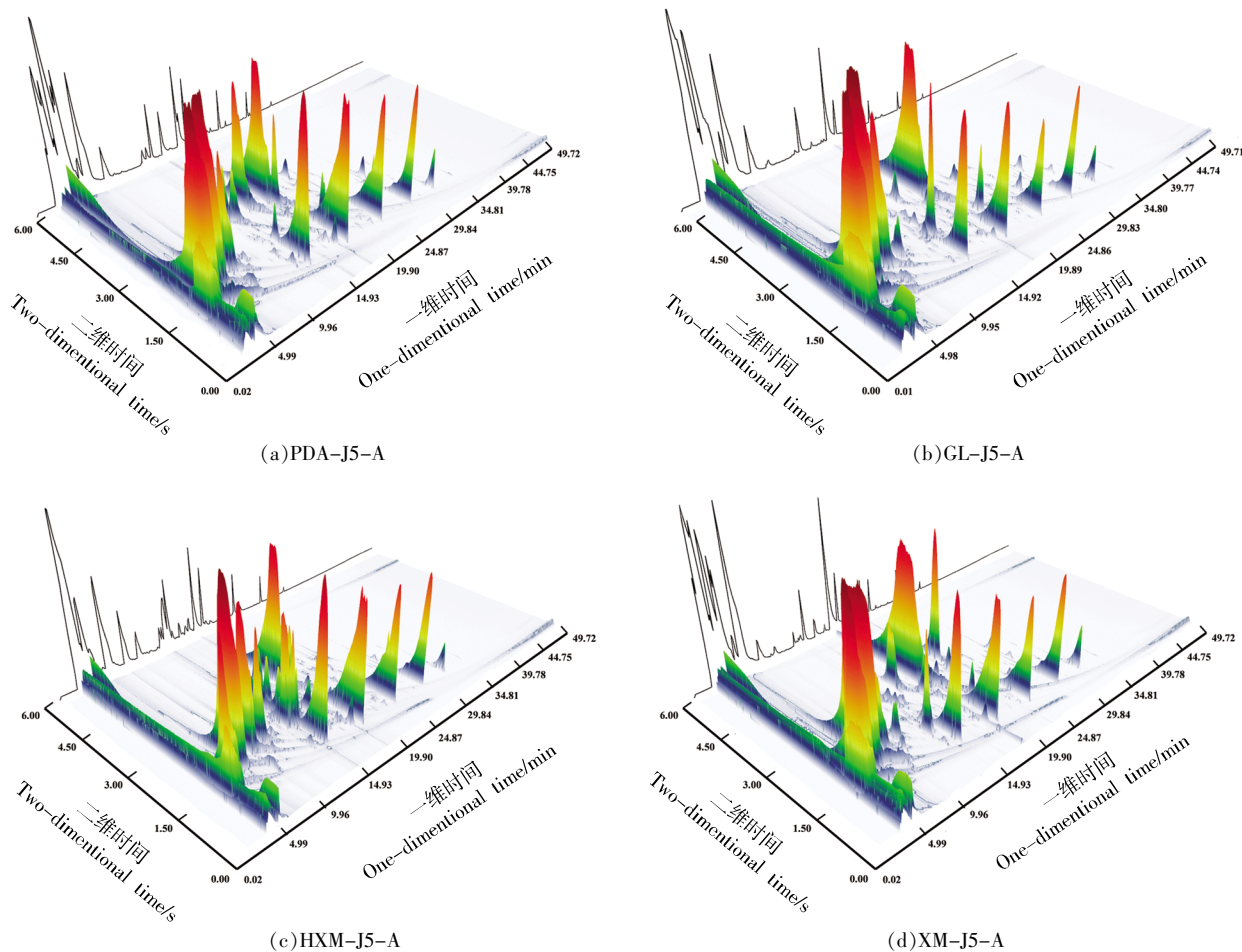


图 1 J5 的 4 种培养物的 GC×GC-QTOF-MS 总离子流色谱图  
Fig.1 GC×GC-QTOF-MS total ion chromatogram of four cultures of J5

高粱是黄酒酿造所用爆高粱曲的主要原料<sup>[25]</sup>,红小米是红谷黄酒酿造的主要原料<sup>[26]</sup>,小麦是黄酒酿造所用麦曲的主要原料<sup>[27]</sup>。4种培养物的GC×GC-QTOF-MS总离子流色谱图如图1所示。4种培养物中均检测出大量挥发性化合物,在一维气相色谱柱上共流出的化合物在二维平面上实现了正交分离,且拖尾较小,分离良好。从图1可以看出,不同培养物的总离子流图在峰数量和峰的相对响应值上存在一定差异,表明不同培养基质的挥发性代谢产物有所不同。

## 2.2 4种J5培养物中挥发性代谢产物的分布

4种培养基质中各类挥发性代谢产物的相对含量和化合物种类数如图2所示。4种培养物中的挥发性代谢产物主要为醇类、酯类和羰基类,三

者之和的相对百分含量在PDA、GL、XM和HXM中分别为(98.97±0.41)%、(98.72±0.19)%、(96.84±0.59)%、(88.00±1.32)%。HXM中醇的相对百分含量高于其它培养物,达到(50.14±1.90)%;GL中酯的相对百分含量高于其它培养物,达到(45.26±1.30)%;PDA和XM中羰基类的相对百分含量接近,并高于另外两种培养物(图1a)。

PDA、GL、XM和HXM中检测到的化合物数量分别为31,27,32,44种(图1b)。HXM中化合物的种类丰富,醇类(12种)、酯类(12种)、酚类(2种)、杂环类(4种)化合物的种类数均高于其它培养物,羰基类化合物的种类与XM相同,高于PDA和GL。说明红小米提取物培养J5可获得更丰富的挥发性代谢产物。

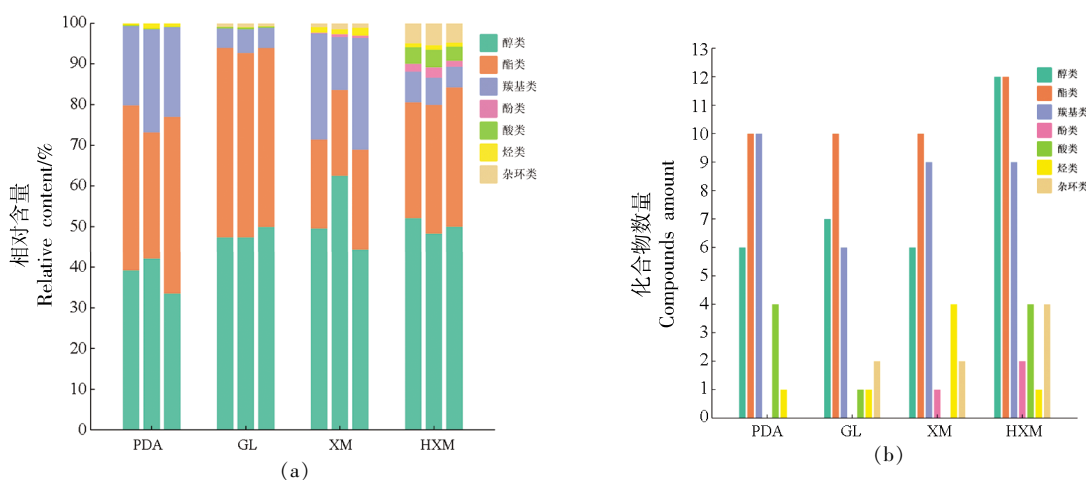


图2 J5培养物中挥发性物质的分布

Fig.2 Distribution of volatile compounds in cultures of J5

## 2.3 4种J5培养物中的挥发性代谢产物的含量

4种J5的培养物中检测到的挥发性代谢产物,如表1所示。共检测到65种挥发性代谢产物,包括醇类14种,酯类18种,羰基类16种,烃类9种,酸类2种,酚类2种,杂环类4种。J5培养物的挥发性代谢产物的总质量浓度在13.008~24.118 μg/mL之间,PDA中挥发性代谢产物总浓度最低,为(13.618±0.121) μg/mL,其次是HXM和GL, XM中挥发性代谢产物总浓度最高,为(22.188±1.734) μg/mL,显著高于其它3种培养物( $P<0.05$ )。

图3为4种培养物中共有挥发性代谢产物的

数量。由图3可知,共存于4种培养物中的化合物有11种(乙醇、3-甲基-1-丁醇、苯乙醇、乙酸乙酯、丙酸乙酯、乙酸丁酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸苯乙酯、乙醛、苯乙醛),说明这些挥发性代谢产物是否产生不受培养物成分影响,其中己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸苯乙酯在4种培养物中的含量差异不显著( $P>0.05$ ,表1)。共存于3种谷物培养基中的化合物有14种,除己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸苯乙酯外,乙醇、乙醛、庚酸乙酯在3种谷物培养基中的含量差异也不显著( $P>0.05$ ),即谷物培养基成分差异不影响这些物质的形成。

表 1 J5 培养物中挥发性代谢产物  
Table 1 Volatile compounds in cultures of J5

类别	化合物	含量/( $\mu\text{g/mL}$ )				
		PDA	GL	XM	HXM	
醇类	乙醇	0.895 $\pm$ 0.086 <sup>a</sup>	2.698 $\pm$ 0.836 <sup>b</sup>	3.100 $\pm$ 0.894 <sup>b</sup>	1.949 $\pm$ 0.520 <sup>ab</sup>	
	3-甲基-1-丁醇	2.874 $\pm$ 0.446 <sup>a</sup>	3.576 $\pm$ 0.430 <sup>a</sup>	5.282 $\pm$ 0.389 <sup>b</sup>	3.097 $\pm$ 0.793 <sup>a</sup>	
	苯乙醇	1.047 $\pm$ 0.079 <sup>a</sup>	1.433 $\pm$ 0.226 <sup>a</sup>	2.671 $\pm$ 0.272 <sup>b</sup>	1.337 $\pm$ 0.366 <sup>a</sup>	
	2-丁醇	0.170 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	0.119 $\pm$ 0.024 <sup>a</sup>	0.317 $\pm$ 0.180 <sup>a</sup>	—	
	异丙醇	0.071 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.033 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	0.062 $\pm$ 0.033 <sup>a</sup>	—	
	己醇	—	0.042 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	—	0.477 $\pm$ 0.110 <sup>b</sup>	
	1-辛烯-3-醇	—	—	0.045 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>	0.166 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	
	3-甲硫基丙醇	0.160 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>	0.046 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	—	0.079 $\pm$ 0.061 <sup>a</sup>	
	2-乙基乙醇	—	—	—	0.047 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	
	2,4-二甲基环己醇	—	—	—	0.024 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	
	3-辛烯-1-醇	—	—	—	0.072 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	
	1-辛醇	—	—	—	0.143 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>	
	1-壬醇	—	—	—	0.044 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	
	戊醇	—	—	—	0.085 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>	
	合计	5.216 $\pm$ 0.602 <sup>a</sup>	7.949 $\pm$ 1.167 <sup>b</sup>	11.476 $\pm$ 1.304 <sup>c</sup>	7.519 $\pm$ 1.321 <sup>b</sup>	
	酯类	乙酸乙酯	3.500 $\pm$ 0.897 <sup>a</sup>	5.038 $\pm$ 0.799 <sup>b</sup>	3.071 $\pm$ 0.535 <sup>a</sup>	2.492 $\pm$ 0.788 <sup>a</sup>
		丙酸乙酯	0.363 $\pm$ 0.026 <sup>b</sup>	0.594 $\pm$ 0.071 <sup>c</sup>	0.366 $\pm$ 0.016 <sup>b</sup>	0.072 $\pm$ 0.035 <sup>a</sup>
乙酸丁酯		0.739 $\pm$ 0.124 <sup>a</sup>	1.043 $\pm$ 0.148 <sup>b</sup>	0.524 $\pm$ 0.098 <sup>a</sup>	1.260 $\pm$ 0.112 <sup>b</sup>	
己酸乙酯		0.172 $\pm$ 0.099 <sup>a</sup>	0.305 $\pm$ 0.063 <sup>a</sup>	0.318 $\pm$ 0.093 <sup>a</sup>	0.348 $\pm$ 0.195 <sup>a</sup>	
辛酸乙酯		0.143 $\pm$ 0.066 <sup>a</sup>	0.107 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>	0.122 $\pm$ 0.061 <sup>a</sup>	0.059 $\pm$ 0.045 <sup>a</sup>	
乙酸苯乙酯		0.077 $\pm$ 0.022 <sup>a</sup>	0.069 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	0.252 $\pm$ 0.278 <sup>a</sup>	0.041 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>	
庚酸乙酯		—	0.051 $\pm$ 0.016 <sup>a</sup>	0.036 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>	0.062 $\pm$ 0.066 <sup>a</sup>	
丁酸乙酯		0.020 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	—	—	—	
乙酸异戊酯		0.055 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	0.141 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup>	0.235 $\pm$ 0.039 <sup>c</sup>	—	
山梨酸乙酯		—	0.031 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	—	—	
壬酸乙酯		—	0.028 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.054 $\pm$ 0.024 <sup>a</sup>	—	
癸酸乙酯		0.009 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.035 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.034 $\pm$ 0.022 <sup>a</sup>	—	
月桂酸乙酯		—	0.010 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	—	—	
乙酸戊酯		—	—	—	0.055 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	
甲酸庚酯		—	—	—	0.179 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	
乙酸己酯		—	—	—	0.140 $\pm$ 0.032 <sup>a</sup>	
乙酸庚酯		—	—	—	0.046 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>	
3-甲硫基丙醇乙酸酯		0.141 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	—	—	0.014 $\pm$ 0.0002 <sup>a</sup>	
合计		5.219 $\pm$ 0.875 <sup>a</sup>	7.451 $\pm$ 1.053 <sup>b</sup>	5.014 $\pm$ 0.818 <sup>a</sup>	4.769 $\pm$ 1.283 <sup>a</sup>	
羰基类		乙醛	0.044 $\pm$ 0.030 <sup>a</sup>	0.442 $\pm$ 0.146 <sup>b</sup>	0.430 $\pm$ 0.252 <sup>b</sup>	0.185 $\pm$ 0.096 <sup>ab</sup>
	苯乙醛	0.779 $\pm$ 0.126 <sup>c</sup>	0.103 $\pm$ 0.043 <sup>a</sup>	0.401 $\pm$ 0.227 <sup>b</sup>	0.201 $\pm$ 0.023 <sup>ab</sup>	
	3-甲基丁醛	0.526 $\pm$ 0.086 <sup>a</sup>	—	1.603 $\pm$ 0.772 <sup>b</sup>	0.066 $\pm$ 0.029 <sup>a</sup>	
	苯甲醛	0.188 $\pm$ 0.019 <sup>b</sup>	—	0.071 $\pm$ 0.020 <sup>a</sup>	0.302 $\pm$ 0.047 <sup>c</sup>	
	可卡醛	0.014 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	—	0.054 $\pm$ 0.022 <sup>b</sup>	—	
	2-苯基-2-丁烯醛	0.105 $\pm$ 0.058 <sup>a</sup>	—	0.267 $\pm$ 0.093 <sup>a</sup>	—	
	乙偶姻	0.058 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>	0.211 $\pm$ 0.039 <sup>b</sup>	0.167 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	—	
	2-己酮	0.032 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	0.041 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	—	—	
	2-甲基丁醛	1.280 $\pm$ 0.176 <sup>b</sup>	0.071 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	1.973 $\pm$ 0.982 <sup>b</sup>	—	

(续表 1)

类别	化合物	含量/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )			
		PDA	GL	XM	HXM
酚类	戊醛	—	—	$0.028 \pm 0.005^a$	—
	2-苯亚甲基己醛	$0.017 \pm 0.002^a$	—	—	—
	庚醛	—	—	—	$0.034 \pm 0.005^a$
	顺-2-庚烯醛	—	—	—	$0.022 \pm 0.004^a$
	椰子醛	—	—	—	$0.054 \pm 0.020^a$
	2-庚酮	—	—	—	$0.037 \pm 0.005^a$
	2-甲基环己酮	—	—	—	$0.041 \pm 0.014^a$
	合计	$3.043 \pm 0.426^b$	$0.868 \pm 0.222^a$	$4.994 \pm 2.038^b$	$0.941 \pm 0.033^a$
	苯酚	—	—	$0.110 \pm 0.057^a$	$0.249 \pm 0.056^b$
	4-乙烯基愈创木酚	—	—	—	$0.039 \pm 0.007^a$
合计	—	—	$0.110 \pm 0.057^a$	$0.288 \pm 0.052^b$	
烃类	3-苯基戊烷	—	—	$0.051 \pm 0.031^a$	—
	1-硝基己烷	—	—	—	$0.047 \pm 0.006^a$
	1-(1-乙氧基乙氧基)-3-甲基丁烷	—	—	$0.072 \pm 0.009^a$	—
	1,2-二乙氧基丁烷	$0.053 \pm 0.028^a$	—	$0.055 \pm 0.014^a$	—
	1,1-二乙氧基-3-甲基丁烷	$0.047 \pm 0.027^a$	—	$0.165 \pm 0.063^b$	—
	4,7-二甲基正十一烷	—	—	—	$0.014 \pm 0.002^a$
	正十一烷	$0.007 \pm 0.002^a$	$0.014 \pm 0.006^a$	—	$0.023 \pm 0.005^b$
	顺-3-庚烯	—	—	—	$0.066 \pm 0.010^a$
	(2,2-二乙氧基乙基)-苯	$0.011 \pm 0.006^a$	—	—	—
	合计	$0.118 \pm 0.057^{ab}$	$0.014 \pm 0.006^a$	$0.342 \pm 0.112^c$	$0.151 \pm 0.023^b$
酸类	2-甲基丁酸	$0.023 \pm 0.005^a$	—	—	—
	己酸	—	$0.064 \pm 0.020^a$	—	$0.592 \pm 0.052^b$
	合计	$0.023 \pm 0.005^a$	$0.064 \pm 0.020^a$	—	$0.592 \pm 0.052^b$
杂环类	三甲基吡嗪	—	$0.073 \pm 0.015^a$	$0.106 \pm 0.030^a$	$0.237 \pm 0.039^b$
	四甲基吡嗪	—	$0.064 \pm 0.019^a$	$0.147 \pm 0.029^b$	$0.277 \pm 0.052^c$
	2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪	—	—	—	$0.042 \pm 0.008^a$
	2-戊基呋喃	—	—	—	$0.195 \pm 0.016^a$
	合计	—	$0.136 \pm 0.034^a$	$0.253 \pm 0.054^a$	$0.752 \pm 0.114^b$

注：“—”表示未检出；同一化合物在不同培养物中标识的字母代表差异显著性( $\alpha=0.05$ )，相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著。

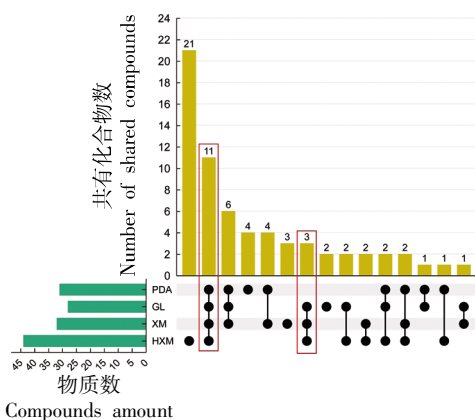


图3 J5的4种培养物挥发性代谢产物的Upset图

Fig.3 Upset plot of volatile metabolites in four cultures of J5

由表1可知,醇类在4种培养物中的含量差异显著,XM中醇类含量最高,为( $11.476 \pm 1.304$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,PDA中醇类含量最低,为( $5.216 \pm 0.602$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,GL和HXM的醇类含量差异不显著( $P > 0.05$ )。乙醇、3-甲基-1-丁醇、苯乙醇在4种培养物中均存在。2-丁醇、异丙醇共存在于PDA、GL和XM 3种培养物中,2-乙基己醇、2,4-二甲基环己醇、3-辛烯-1-醇、1-辛醇、1-壬醇、戊醇仅存在于HXM中。J5虽为非酿酒酵母,但其具有磷酸戊糖代谢途径,因此代谢产物中包含乙醇,这与Shukla等<sup>[28]</sup>的报道一致。3-甲基-1-丁醇和苯乙醇是氨基酸的代谢产物<sup>[29]</sup>,有文献报道这两种高

级醇对黄酒的醉酒作用最强<sup>[30]</sup>,这两种高级醇在 J5 的 XM 培养物中含量最高,分别为 $(5.282 \pm 0.389) \mu\text{g/mL}$ 和 $(2.671 \pm 0.272) \mu\text{g/mL}$ ,在 GL 和 HXM 中含量无差异( $P > 0.05$ )。不同培养物中高级醇类的种类和含量的差异可能是由原料的蛋白质含量和氨基酸组成差异所致。

酯类在 4 种培养物中的含量差异显著,GL 中酯类含量最高,为 $(7.451 \pm 1.053) \mu\text{g/mL}$ ,PDA、XM 和 HXM 的酯类含量差异不显著( $P > 0.05$ )。乙酸乙酯、丙酸乙酯、乙酸丁酯、己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸苯乙酯在 4 种培养物中均存在。庚酸乙酯仅共存于 3 种谷物培养物中,且差异不显著( $P > 0.05$ )。乙酸异戊酯和癸酸乙酯仅共存于 PDA、GL、XM 中,乙酸戊酯、甲酸庚酯、乙酸己酯、乙酸庚酯仅存在于 HXM 中。葡萄牙棒孢酵母能产生多种酯类,这与前人研究结果一致<sup>[9,12,31-32]</sup>。而不同培养物中酯类含量和种类的差异可能是由不同培养环境下酵母酶基因表达差异所致。

羰基类在 4 种培养物中的含量差异显著,XM 中羰基类含量最高,为 $(4.994 \pm 2.038) \mu\text{g/mL}$ ,GL 和 HXM 的羰基类含量无显著差异( $P > 0.05$ )。乙醛和苯乙醛共存于 4 种培养物中,庚醛、顺-2-庚烯醛、椰子醛、2-庚酮和 2-甲基环己酮仅存在于 HXM 中。醛类主要来源于氨基酸分解代谢或不饱和脂肪酸的氧化<sup>[29,33]</sup>,由于培养原料在蛋白质含量、脂肪含量上存在差异,因此产生的羰基类化合物在种类和含量上也存在差异。

4 种培养物中检测到 2 种酚类,苯酚共存于 XM 和 HXM 中,4-乙炔基愈创木酚仅存在于 HXM 中。培养物中酚类可能来自原料的酚酸,在 J5 作用下转化为酚类<sup>[34]</sup>。GL 中未检出酚类,可能是由于高粱提取物中酚酸含量较低,或 J5 不能将高粱浸提物中的酚酸转化为酚类。

4 种培养物中仅检测到 2 种酸类,XM 中未检测到酸类,PDA 中检测到了 2-甲基丁酸,GL 和 HXM 中检测到了己酸。4 种培养物仅有 PDA 中未检测到杂环类,HXM 中杂环类含量高于其它谷物培养物,培养物中的杂环类可能来自于谷物提取物<sup>[35-36]</sup>。

#### 2.4 4 种 J5 培养物挥发性代谢产物的差异性分析

利用 PCA 的主成分得分图可视化不同培养

物中挥发性代谢产物的差异,结果如图 4 所示。由图 4 可知,主成分分析获得的前 2 个主成分能够解释 74.05% 的变异。4 种培养物可被区分为 3 组,其中 GL 和 XM 在挥发性代谢产物上被区分为一组,即二者的成分具有相似性。而 HXM 明显区别于 GL 和 XM,成为独立的一组。高粱是常用的酿酒原料,而小麦是常用的制曲原料<sup>[36]</sup>,本文欲探讨以红小米培养葡萄牙棒孢酵母(制曲)的可行性,因此进一步比较 XM 和 HXM 的关键差异挥发性代谢产物。

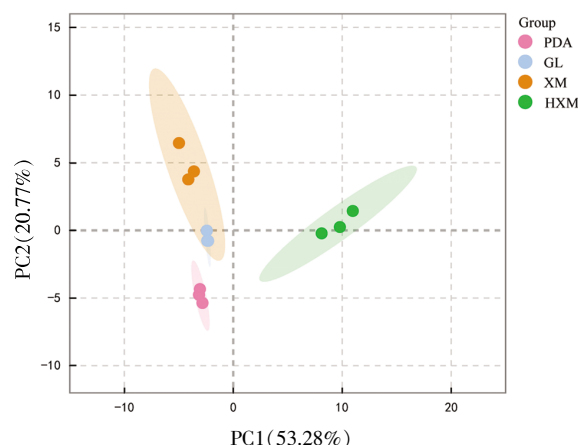


图 4 主成分分析得分图

Fig.4 Scores of PCA

#### 2.5 XM 和 HXM 的关键差异挥发性代谢产物

采用 OPLS-DA 模型来辨别 XM 和 HXM 两种培养物在挥发性代谢产物上的差异。图 5a 为模型主成分得分图,2 个主成分能够解释 86.36% 的变异,两种培养物在第 1 主成分上能明显区分为两组。由图 5b 可知,建立的模型由 2 个正交主成分组成,该模型的  $R^2_x$  为 0.801,  $R^2_y$  为 0.987,  $Q^2$  为 0.980,说明两种培养物在主要挥发性代谢产物上能够稳健分离,该模型具有良好的预测能力<sup>[17]</sup>。OPLS-DA 模型共获得 40 种投影中变量重要性 (Variable importance in projection, VIP) > 1 且含量差异显著的关键差异挥发性代谢产物。

将这 40 种物质的含量标准化,绘制成热图 (图 6),并将能够获得风味特征的化合物在两种培养物中的 OAV 和 ROAV 汇总于表 2。

由图 6 可知,HXM 所包含的醇类中戊醇、己醇、辛醇、2-乙基-辛醇、2,4-二甲基环己醇、1-辛

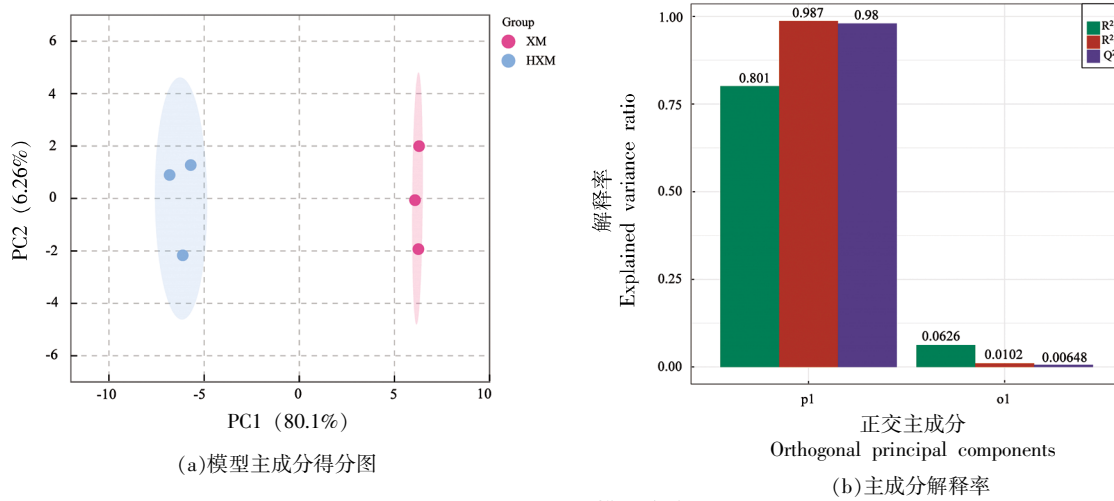


图5 OPLS-DA模型主成分图

Fig.5 Principal component of OPLS-DA

烯-3-醇和1-壬醇是含量高于XM的关键差异挥发性醇类。HXM中己醇和1-辛烯-3-醇的ROAV>1,是重要的香气化合物,由表1可知,两者主要贡献青草、油脂风味。XM中1-辛烯-3-醇的ROAV>1,是重要的香气化合物。HXM中未检测到异丙醇,且该物质在XM中也是非重要香气化合物。

HXM所包含的酯类中,甲酸庚酯、乙酸戊酯、乙酸己酯、乙酸庚酯、乙酸丁酯、3-甲硫基丙醇乙酸酯是含量高于XM的关键差异挥发性酯类。HXM中乙酸丁酯的ROAV>1,是重要的香气化合物,主要贡献果味风味。XM中乙酸异戊酯、丙酸乙酯的ROAV>1,是重要香气化合物,主要贡献香

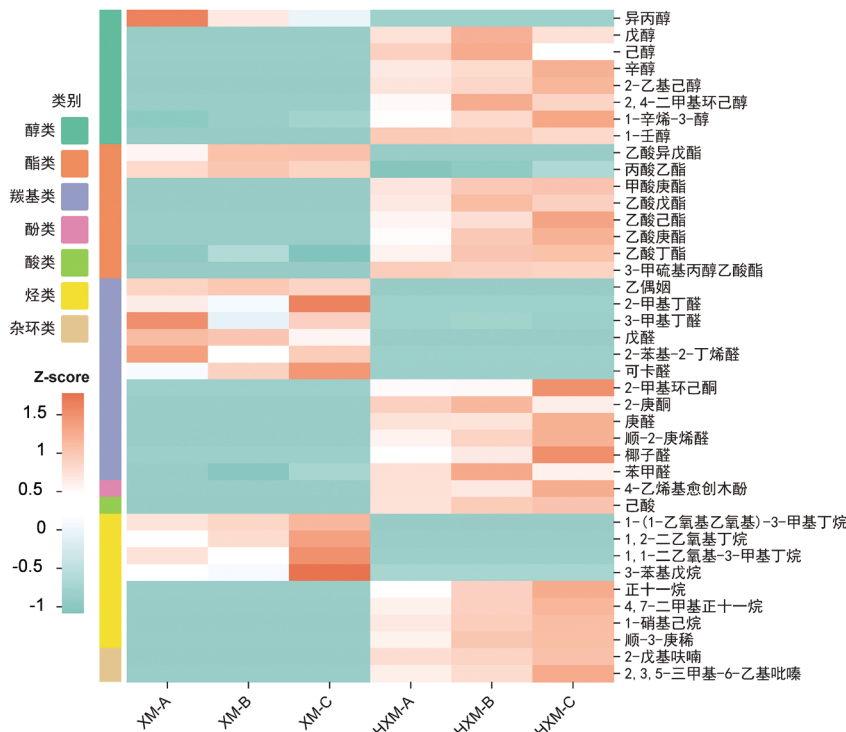


图6 关键差异挥发性代谢产物热图

Fig.6 Heatmap of key differential volatile metabolites

蕉和水果风味。由以上关键差异挥发性酯类的分析可知, HXM 较 XM 含有更多的乙酸酯类, 而乙酸酯是由乙醇或高级醇与乙酰辅酶 A 在醇酰基转移酶的催化作用下形成<sup>[37]</sup>, 推断在红小米培养基中, J5 的醇酰基转移酶的酶活性可能更高。而 HXM 中未检测到乙酸异戊酯, 可能是 HXM 中 3-甲基-1-丁醇(异戊醇)的含量太低导致。

HXM 所包含的羰基类中, 2-甲基-环己酮、2-庚酮、庚醛、顺-2-庚烯醛、椰子醛、苯甲醛是含量高于 XM 的关键差异挥发性羰基类。HXM 中庚醛的 ROAV>1, 是重要的香气化合物, 主要贡献柑橘风味; 顺-2-庚烯醛的 ROAV=100, 是香气贡献最大的挥发性代谢产物, 主要贡献青草风味。HXM 中未检测到乙偶姻、2-甲基丁醛、戊醛、2-苯基-2-

表 2 XM 与 HXM 的关键差异挥发性代谢产物的风味特征

Table 2 Flavor character of primary volatile metabolites in XM and HXM culture

化合物	化合物水中 中阈值 <sup>[38-39]</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	OAV		ROAV		风味特征 <sup>[40-42]</sup>
		XM	HXM	XM	HXM	
异丙醇	9.7879	0.0063	—	0.0003	—	醇味、木质、霉味
戊醇	0.1502	—	0.5655	—	0.0643	杂醇、香脂、香草、甜味、油脂
己醇	0.0056	—	85.1806	—	9.6834	青草、油脂、醇味、树脂、甜味、果味、花香
辛醇	0.1258	—	1.1332	—	0.1288	青草、烧焦味、橙子、玫瑰、蘑菇
2-乙基己醇	25.4822	—	0.0018	—	0.0002	青草、玫瑰
1-辛烯-3-醇	0.0015	29.7821	110.4666	1.5096	12.5581	青草、生青、油脂、蘑菇
1-壬醇	0.0455	—	0.9667	—	0.1099	青草、玫瑰、脂肪、尘土、橙子
乙酸异戊酯	0.00015	1 566.2076	—	79.3874	—	香蕉、果味、甜味
丙酸乙酯	0.01	36.6241	7.2039	1.8564	0.8190	果味、覆盆子、梨、溶剂、芹菜、苦味、 苹果、草本、蜡质、花香、黄瓜、李子、青草
甲酸庚酯	0.043	—	1.2825	—	0.1458	轻盈、果味、香蕉
乙酸戊酯	0.115	—	1.2140	—	0.1380	苹果、甜味、香蕉、青草、草本、苦、果味
乙酸己酯	0.42	—	0.1092	—	0.0124	杏、新鲜、水果、木质、朗姆酒、梨、青草
乙酸丁酯	0.058	9.0407	21.7173	0.4582	2.4689	果味、轻盈、香蕉、梨
3-甲基基丙醇乙酸酯	0.03	—	0.4778	—	0.0543	脂肪、酯味
乙偶姻	0.014	11.8951	—	0.6029	—	黄油、奶油、乳制品
2-甲基丁醛	0.001	1 972.8678	—	100	—	可可、杏仁
3-甲基丁醛	0.0011	1 457.6379	59.7195	73.8842	6.7890	桃子、巧克力、麦芽
戊醛	0.012	2.3397	—	0.1186	—	面包、浆果、麦芽、辛辣、果味、坚果、杏仁
2-苯基-2-丁烯醛						可可、烘烤、朗姆酒
可卡醛						巧克力、苦味、可可、甜味、果味、青草
2-甲基环己酮	0.92	—	0.0441	—	0.0050	薄荷
2-庚酮	0.14	—	0.2634	—	0.0299	椰子、草本、甜味、木质、果味
庚醛	0.0028	—	12.1015	—	1.3757	柑橘、脂肪、草本、酒李、醛类、青草
顺-2-庚烯醛	0.000025	—	879.6473	—	100	青草
椰子醛	0.0097	—	5.5506	—	0.6310	桃子、椰子、蜡质、油性、奶油、甜味、黄油
苯甲醛	0.75089	0.0948	0.4021	0.0048	0.0457	杏仁、樱桃、甜、焦糖
4-乙烷基愈创木酚	0.2903	—	0.1885	—	0.0214	烟熏、丁香、花生
己酸	0.89	—	0.6648	—	0.0756	奶酪、酸味、甜味
2-戊基呋喃	0.0058	—	33.6829	—	3.8291	黄油、水果、青豆、蔬菜、泥土

注:将文献查得的阈值数据单位 mg/kg 换算成  $\mu\text{g/mL}$  以方便计算;“—”表示未检出。

丁烯醛和可卡醛。XM 中 2-甲基丁醛的 ROAV=100, 是香气贡献最大的挥发性代谢产物, 主要贡献可可、杏仁风味。3-甲基丁醛的 ROAV 在两种培养物中均大于 1, 故在两种培养物中都是重要香气化合物, 主要贡献桃子、麦芽风味。

HXM 所包含的 4-乙基愈创木酚、己酸、2-戊基呋喃也是区别于 XM 的关键差异挥发性代谢产物。HXM 中 2-戊基呋喃的 ROAV>1, 是重要的香气化合物, 主要贡献黄油、水果风味。虽然分析结果中也存在关键差异挥发性烷烃类, 但除正十一烷(烷烃气味)外, 未通过文献检索获得该类物质

的阈值和风味特征, 因此在表 2 中未列出这类化合物。

除以上关键差异挥发性代谢产物(VIP>1)外, 三甲基吡嗪、苯乙醇、四甲基吡嗪、3-甲基-1-丁醇、苯酚在 XM 和 HXM 中含量差异也是显著的。HXM 中三甲基吡嗪、四甲基吡嗪和苯酚含量显著高于 XM 中这三者的含量, 苯乙醇和 3-甲基-1-丁醇的含量显著低于 XM 中这两者的含量。3-甲基-1-丁醇在两种培养物中都属于重要的香气化合物(ROAV>1), 主要贡献水果风味。

表 3 XM 与 HXM 的含量差异显著的挥发性代谢产物的风味特征(VIP<1)

Table 3 Flavor character of compounds in XM and HXM culture with significant difference in content (VIP<1)

化合物	化合物水中阈值 <sup>[38]</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	OAV		ROAV		风味 <sup>[40]</sup>
		XM	HXM	XM	HXM	
苯乙醇	0.5642	4.7338	2.3705	0.2400	0.2695	玫瑰、花香
3-甲基-1-丁醇	0.0040	1 320.5354	774.1638	66.9643	88.0084	水果、花香
三甲基吡嗪	0.3501	0.3022	0.6778	0.0153	0.0770	榛子、烘烤、可可
四甲基吡嗪	2.5250	0.0583	0.1099	0.0029	0.01245	巧克力、可可、坚果
苯酚	58.5853	0.0019	0.0042	$9.5233 \times 10^{-5}$	0.0005	酚类

### 3 结论

葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae* J5)是一种具有产香功能的非酿酒酵母, 它的 PDA、GL、XM 和 HXM 4 种培养物中挥发性代谢产物的种类和含量各不相同。4 种培养物中, 共检测到 7 类 65 种挥发性代谢产物, 包括醇类 14 种、酯类 18 种、羰基类 16 种、烃类 9 种、酸类 2 种、酚类 2 种、杂环类 4 种。醇类、酯类、羰基类在 4 种培养物中的占比最高。J5 的 HXM 培养物中挥发性代谢产物的种类更丰富, XM 培养物中挥发性代谢产物的总浓度最高。己酸乙酯、辛酸乙酯、乙酸苯乙酯、乙醇、乙醛、庚酸乙酯的含量不受谷物培养物的影响。

主成分分析结果将 4 种培养物区分为 3 组, 其中 GL 和 XM 在挥发性代谢产物上被区分为一组, 即二者的成分具有相似性。XM 和 HXM 的 OPLS-DA 模型能够解释 86.36% 的变异, 两种培养物在第 1 主成分上能明显区分为 2 组。该模型共获得 40 种 VIP>1 且含量差异显著的关键差异挥发性代谢产物, 另外有 5 种 VIP<1 而含量差异

显著的挥发性代谢产物。己醇、乙酸丁酯、庚醛、3-甲基丁醛、2-戊基呋喃、1-辛烯-3-醇、3-甲基-1-丁醇是 HXM 的重要香气化合物(ROAV>1), 主要贡献青草、水果风味; 顺-2-庚烯醛是 HXM 中香气贡献最大的挥发性代谢产物(ROAV=100), 贡献青草风味。1-辛烯-3-醇、丙酸乙酯、乙酸异戊酯、3-甲基丁醛、3-甲基-1-丁醇是 XM 的重要香气化合物, 主要贡献青草、水果风味; 2-甲基丁醛是 XM 中香气贡献最大的挥发性代谢产物, 贡献可可风味。虽然葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae* J5) 在红小米培养基中产生的挥发性代谢产物与其它培养基质的培养物有显著差异, 且香气贡献最大的挥发性代谢产物也有所差异, 但这些重要香气化合物都具有优良的风味, 是发酵酒中常见的香气成分。因此, 以红小米培养葡萄牙棒孢酵母, 用于红谷黄酒增香是可行的。

### 参 考 文 献

- [1] 卜光明, 周化斌, 周茂洪, 等. 酿造酒中非酿酒酵母

- 的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 346-352.
- BU G M, ZHOU H B, ZHOU M H, et al. Research progress on the non-*Saccharomyces* in the brewing wine fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 346-352.
- [2] CRISTIAN V. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(23): 9861-9874.
- [3] 雷英杰, 赵定锡, 缪婷, 等. 非酿酒酵母筛选及协同发酵对醪糟挥发性风味影响[J]. 食品科学, 2024, 45(15): 94-102.
- LEI Y J, ZHAO D X, MIAO T, et al. Selection of non-*Saccharomyces* yeasts and effect of co-fermentation with them and *Rhizopus* on the volatile flavor components of fermented glutinous rice wine[J]. Food Science, 2024, 45(15): 94-102.
- [4] 郑超群. 基于酿酒酵母和异常汉逊酵母混合发酵技术的黄酒生产工艺及风味成分研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2022.
- ZHENG C Q. Research on the production process and flavor components of rice wine based on the mixed fermentation technology of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula anomolies*[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2022.
- [5] LI W W, FAN G S, FU Z L, et al. Effects of fortification of Daqu with various yeasts on microbial community structure and flavor metabolism[J]. Food Research International, 2020, 129: 108837.
- [6] MINGORANCE-CAZORLA L, CLEMENTE-JIMÉNEZ J, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ S, et al. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19: 297-304.
- [7] PÉREZ -BRITO D, MAGAÑA -ALVAREZ A, LAPPE -OLIVERAS P, et al. Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA fingerprinting[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(1): 14-20.
- [8] NAHIDUL-ISLAM S M, TAKASHI K, HAJIME T et al. Bacterial and fungal microbiota in traditional Bangladeshi fermented milk products analyzed by culture-dependent and culture-independent methods [J]. Food Research International, 2018, 111: 431-437.
- [9] PEREYRA M M, GARMENDIA G, ROSSINI C, et al. Volatile organic compounds of *Clavispora lusitaniae* AgL21 restrain citrus postharvest pathogens[J]. Biological Control, 2022, 174: 105025.
- [10] 屈春云, 李健俊, 刘功良, 等. 一种葡萄牙棒孢酵母及其在白葡萄酒中的应用: 202211205978.2[P]. 2023-02-24.
- QU C Y, LI J J, LIU G L, et al. A strain of *Clavispora lusitaniae* and its application in liquor-making: 202211205978.2[P]. 2023-02-24.
- [11] ZHAO Y C, LIU J, WANG H, et al. Advancements in fermented beverage safety: Isolation and application of *Clavispora lusitaniae* Cl-p for ethyl carbamate degradation and enhanced flavor profile[J]. Microorganisms, 2024, 12(5): 882.
- [12] MÉNDEZ -ZAMORA A, GUTIÉRREZ -AVENDAÑO D O, ARELLANO-PLAZA M, et al. The non-*Saccharomyces* yeast *Pichia kluyveri* for the production of aromatic volatile compounds in alcoholic fermentation[J]. FEMS Yeast Research, 2020, 20(8): foaa067.
- [13] 陈林玉, 宋乐园, 王云雨, 等. 红小米化学成分与营养成分分析[J]. 食品科学, 2021, 42(18): 218-224.
- CHEN L Y, SONG L Y, WANG Y Y, et al. Analysis of chemical and nutritional components of red millet[J]. Food Science, 2021, 42(18): 218-224.
- [14] 李素萍. 红谷黄酒发酵特性与功能成分研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2021.
- LI S P. Study on fermentation characteristics and functional components of red millet huangjiu [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2021.
- [15] ELLIS D J, KERR E D, SCHENK G, et al. Metabolomics of non-*Saccharomyces* yeasts in fermented beverages[J]. Beverages, 2022, 8(3): 41.
- [16] ZHANG L, MI S, LIU R B, et al. Evaluation of volatile compounds in milks fermented using traditional starter cultures and probiotics based on odor activity value and chemometric techniques [J]. Molecules, 2020, 25: 1129.
- [17] THÉVENOT E A, ROUX A, XU Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by imple-

- menting a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14(8): 3322–3335.
- [18] 万兵. 酱香型白酒酿造过程中酿酒酵母和面包乳杆菌交互作用机制解析[D]. 无锡: 江南大学, 2022.  
WAN B. Interaction mechanism analysis of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus panis* during the brewing process of Jiang-flavor liquor[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [19] 吴凡, 范绍辉, 何国良, 等. 全二维气相色谱飞行时间质谱结合 Napping®-UFP 解析清雅型和米香型白酒的香气差异[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(23): 293–298.  
WU F, FAN S H, HE G L, et al. Analysis of aroma difference between Qingya flavor and rice flavor Baijiu by two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry combined with Napping®-UFP[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2023, 49(23): 293–298.
- [20] REN L J, WANG T, SEKLOULI A S, et al. A review on missing values for main challenges and methods[J]. *Information Systems*, 2023, 119: 102268.
- [21] LIU Z P, YANG K Z, HE Z L, et al. Comparison of two data processing approaches for aroma marker identification in different distilled liquors using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry dataset[J]. *Journal of Food Science*, 2023, 88(7): 2870–2881.
- [22] MORENO J A, ZEA L, MOYANO L, et al. Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing[J]. *Food Control*, 2005, 16: 333–338.
- [23] 孙光城, 罗秀群, 林丹, 等. 基于 GC-MS 分析牛肉不同部位对牛肝菌牛肉酱品质及挥发性香气成分的影响[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(19): 216–227.  
SUN G C, LUO X Q, LIN D, et al. Analysis of impact of different parts of beef on the quality and volatile aroma components of boletus beef sauce based on GC-MS[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(19): 216–227.
- [24] 侯亚倩, 张晓红, 张澍, 等. 桃褐腐病拮抗酵母菌的筛选及防治机理[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(11): 4604–4616.  
HOU Y Q, ZHANG X H, ZHANG S, et al. Screening and controlling mechanism of antagonistic yeast against peach brown rot[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(11): 4604–4616.
- [25] 彭金龙, 袁军川. 爆麦曲、爆高粱曲对黄酒发酵和风味的影响[J]. *酿酒科技*, 2020(5): 43–47.  
PENG J L, YUAN J C. Effects of fried wheat Qu and fried sorghum Qu on fermentation and flavor of Huangjiu[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2020(5): 43–47.
- [26] 宋建阳, 岑定运, 梁莉莹, 等. 南阳红谷黄酒发酵过程中挥发性风味物质与微生物群落相关性分析[J]. *中国酿造*, 2023, 42(8): 135–139.  
SONG J Y, CEN D Y, LIANG L Y, et al. Correlation analysis between volatile flavor compounds and microbial community of Nanyang red-millet Huangjiu during fermentation process[J]. *China Brewing*, 2023, 42(8): 135–139.
- [27] 葛松涛, 孙国昌, 寿泉洪, 等. 不同工艺绍兴酒麦曲微生物菌群多样性分析[J]. *中国酿造*, 2023, 42(8): 140–146.  
GE S T, SUN G C, SHOU Q H, et al. Microbial diversity analysis of Shaoxing Huangjiu wheat Qu with different processes[J]. *China Brewing*, 2023, 42(8): 140–146.
- [28] SHUKLA R, HEMANSI, KUMAR G, et al. Biorefinery potential of newly isolated yeast *Clavispora lusitaniae* for co-production of erythritol and ethanol[J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2023, 13: 8061–8073.
- [29] PIRES E J, TEIXEIRA J A, BRÁNYIK T, et al. Yeast: The soul of beer's aroma – A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 1937–1949.
- [30] SUN H L, LIU S P, MAO J Q, et al. New insights into the impacts of Huangjiu components on intoxication[J]. *Food Chemistry*, 2020, 317: 126420.
- [31] ADAME-SOTO P J, ARÉCHIGA-CARVAJAL E T, LÓPEZ M G, et al. Potential production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate by non-*Saccharomyces* yeasts from *Agave durangensis* [J]. *Ann Microbiol*, 2019, 69: 989–1000.
- [32] FAN G S, LIU P X, CHANG X, et al. Isolation and identification of a high-yield ethyl caproate-producing yeast from Daqu and optimization of its fermentation[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 663744.

- [33] 蒋洋, 张翠英, 李于, 等. 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 C Y, LI Y, et al. Effect of flavor substances in alcoholic beverages on ethanol metabolism in human body: A review[J]. Food Science, 2021, 42(15): 242-250.
- [34] NI D R, MAO S F, YANG Y B, et al. Phenolic metabolites changes during Baijiu fermentation through non-targeted metabolomic[J]. Food Chemistry: X, 2024, 23: 101531.
- [35] 马浩, 明红梅, 郑佳, 等. 同时蒸馏萃取结合气相色谱-质谱联用解析不同酿酒原料蒸煮香气成分[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(6): 247-253.  
MA H, MING H M, ZHENG J, et al. Simultaneous distillation extraction combined with GC-MS to analyze steaming aroma composition of different brewing materials[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(6): 247-253.
- [36] 吕佳慧. 白酒酿酒和制曲原料中结合态风味物质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.  
LÜ J H. Bound aroma compounds of liquor-making and qu-making materials[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [37] 马文瑞, 孙志伟, 石俊, 等. 非酿酒酵母 *Nakazawaea ishiwadae* GDMCC 60786 产乙酸乙酯的诱变菌株筛选及其安全性评价[J]. 食品科学, 2023, 44(10): 165-172.  
MA W R, SUN Z W, SHI J, et al. Screening and safety evaluation of ethyl acetate-producing mutant of non-*Saccharomyces yeast Nakazawaea ishiwadae* GDMCC 60786[J]. Food Science, 2023, 44(10): 165-172.
- [38] 里奥·范海默特. 化合物嗅觉阈值汇编[M]. 李智宇, 王凯, 冒德寿, 译. 2版. 北京: 科学出版社, 2018: 242-431.  
VAN GEMERT L J. Compilations of odour threshold values in air, water and other media[M]. LI Z Y, WANG K, MAO D S, translate. Second enlarged and revised edition. Beijing: Science Press, 2018: 242-431.
- [39] 李青卓, 王嘉瑞, 张小龙, 等. 风味物质 4-乙烯基愈创木酚的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(4): 15-19.  
LI Q Z, WANG J R, ZHANG X L, et al. Research progress of flavor substance 4-vinylguaiacol[J]. China Brewing, 2021, 40(4): 15-19.
- [40] FlavorDB Search[EB/OL]. [2025-01-21]. <https://cosylab.iitd.edu.in/flavordb/search>.
- [41] ACREE T, ARN H. Flavornet and human odor space[EB/OL]. [2025-01-21]. <http://www.flavornet.org/index.html>.
- [42] FEMA[EB/OL]. [2025-01-21]. <https://www.femaflavor.org/flavor-library/2-phenyl-2-butenal>.

### Analysis of Volatile Metabolites in Different Cultures of *Clavispora lusitaniae* J5

XU Bin<sup>1</sup>, LIU Yuqi<sup>1</sup>, SONG Jinbo<sup>1</sup>, LI Yixiao<sup>1</sup>, WU Huazhi<sup>1</sup>, LI Huixing<sup>1\*</sup>, ZHANG Jianhui<sup>2</sup>, LI Gang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>School of Biological and Chemical Engineering, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, Henan

<sup>2</sup>Shedianlaojiu Co., Ltd., Nanyang 473004, Henan)

**Abstract** Volatile metabolites of *Clavispora lusitaniae* J5 in different culture were studied. The extracts of potatoes, sorghum, wheat, and red millet were used as the culture medium to cultivate *Clavispora lusitaniae* J5. The volatile metabolites were investigated by means of headspace solid-phase microextraction-two dimensional gas chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, and analyzed by chemometric methods. A total of 65 volatile compounds were detected in cultures of *Clavispora lusitaniae* J5. There was greater abundance of volatile components in HXM, and greater total concentration of volatile components in XM. There was no significant difference in the concentration of ethanol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, phenylethyl acetate, acetaldehyde and ethyl heptanoate among the three types of grain cultures. 40 Key volatile metabolites with variable importance in projection (VIP)>1 and significant differences in content were obtained by the orthogonal partial least-squares regression discriminant analysis model, as well as 5 volatile metabolites with significant differences in content with VIP<1. Hexanol, butyl acetate, heptanal, 3-methylbutanal, 2-

pentyl furan, 1-octen-3-ol, 3-methyl-1-butanol, cis-2-heptanal were the important aroma compounds with relative odor activity values (ROAV)>1 in the culture of HXM. Although they were different from the important aroma compounds in the culture of XM, they were common aroma components in fermented wine. Therefore, it is feasible to cultivate *Clavispora lusitaniae* J5 with red millet for enhancing the aroma of the red-millet Huangjiu.

**Keywords** *Clavispora lusitaniae*; culture; volatile; metabolites; odour active