

酱香型白酒发酵中地衣芽孢杆菌与酿酒酵母的相互作用

凌杰 吴群 徐岩* 范文来

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学酿造微生物与应用酶学研究中心 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】为解析酱香型白酒酿造群体微生物的发酵过程,研究了酱香型白酒酿造中重要微生物地衣芽孢杆菌与酿酒酵母之间的相互作用,并对它们之间的作用机制进行初步探讨。【方法】通过地衣芽孢杆菌与酿酒酵母共培养体系的构建,认识了两者的相互作用,初步分析了酿酒酵母产生抑制物的分子量,耐热性及对蛋白酶敏感性等特性。【结果】研究表明,酿酒酵母发酵造成的酸性环境以及某些代谢物质能够抑制地衣芽孢杆菌的生长,这些物质分子量大于 10 kD,对热和蛋白酶敏感。【结论】白酒酿造中酿酒酵母通过产酸以及大分子的蛋白质类物质对地衣芽孢杆菌生长形成抑制,该研究促进了对白酒酿造群体微生物发酵过程的解析。

关键词: 酱香型白酒, 地衣芽孢杆菌, 酿酒酵母

Interactions between *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation of soy-sauce flavor liquor

LING Jie WU Qun XU Yan* FAN Wen-Lai

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

Abstract: [Objective] In order to analyze the microbial community in the fermentation proc-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000806); 江苏省产学研前瞻性联合研究项目(No. BY2010116); 中国白酒 169 计划项目; 国家 863 计划项目(No. 2012AA021301)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; 邮箱: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-12-08; 接受日期: 2013-01-18

ess of Chinese liquor, the interactions between *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae* which were crucial microorganisms to the quality of soy-sauce flavor liquor was studied. [Methods] By building the co-culture system of *B. licheniformis* and *S. cerevisiae*, the interaction was investigated. The molecular, heat-resistance activity and protease sensitivity of the inhibitors produced by *S. cerevisiae* were also analyzed. [Results] The growth of *B. licheniformis* could be inhibited, due to acidic environment caused by the growth of *S. cerevisiae*. Besides, *S. cerevisiae* also produced certain inhibitors (>10 kD), which is sensitive to heat and protease treatment, inhibiting the growth of *B. licheniformis*. [Conclusion] *S. cerevisiae* could result in an acidic environment and inhibit the growth of *B. licheniformis*. This work would promote the understanding of the microbial community in the Chinese liquor fermentation process.

Keywords: Soy-sauce flavor liquor, *Bacillus licheniformis*, *Saccharomyces cerevisiae*

酱香型白酒是中国五大香型白酒之一, 具有酱香突出, 优雅细腻, 酒体醇厚, 香味谐调, 回味悠长, 空杯留香持久等特点, 它独特的香型风格与其独特的酿造微生物发酵过程紧密相关。因此, 科学地认识和理解酱香型白酒酿造过程及其机制, 对我国酱香型白酒酿造科学理论体系的发展具有重要意义。

中国白酒发酵属于典型的自然发酵过程, 其特点是在开放的生产环境中, 众多不同微生物共同发酵, 相互作用, 最终形成了具有独特风格的白酒产物。因此, 认识微生物群体发酵机制的关键之一是认识微生物之间的相互作用。研究微生物之间的相互作用对于白酒酿造机制的认识以及酿造技术发展具有重要作用, 国际上对发酵食品中功能微生物间相互作用进行了大量研究, 丰富并发展了发酵食品本质因素的理论基础。研究内容包括乳制品中酵母及细菌间的相互作用^[1-4], 面包发酵中酵母与乳酸菌的相互作用^[5-8], 肉制品中乳酸菌和李斯特菌的相互作用^[9-10]等。通过对这些微生物间相互作用的深入研究, 从而促进了提高发酵食品质量研究方向的发展。其中, 葡萄酒酿造过

程中酿酒酵母与非酿酒酵母间的相互作用研究效果最显著^[11-14], 研究者通过对酿酒酵母与非酿酒酵母相互作用关系的认识, 对两种酵母之间的关系进行了有针对性的调节, 不但提高了葡萄酒的品质以及生产效率, 同时生产稳定性也得到进一步的提高, 为葡萄酒的现代化与机械化发展提供了重要理论与实践基础。

以上研究充分表明了酱香型白酒酿造微生物之间相互作用研究的意义与价值。但是, 与其它酿造食品相比, 酱香型白酒酿造微生物更为复杂, 包括酵母、细菌与霉菌, 除了产酒的酿酒酵母在酿造饮料酒生产中具有普遍性外, 细菌中芽孢杆菌是中国白酒中独特的微生物, 其中的地衣芽孢杆菌则是酱香型白酒生产中独特的产酱香特征风味功能细菌^[15-17]。因此, 研究产酒酵母(酿酒酵母)与产酱香特征风味细菌(地衣芽孢杆菌)的相互作用对于有效控制酱香型白酒的产量及品质具有重要的作用。但是, 目前国内还没有关于白酒功能微生物相互作用研究的报道。因此, 本文首次研究了酱香型白酒生产中产特征风味的地衣芽孢杆菌与酿酒酵母间的相互作用, 不仅对解析酱香型白酒酿造机制

具有重要价值, 而且对实现酱香型白酒稳定、高效生产具有重要理论价值。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 菌种: 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*, CGMCC3963), 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, CGMCC4747), 均筛选自茅台酱香型白酒酿造酒醅中。

1.1.2 培养基: 酵母种子液 YPD (g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20; 细菌种子液 LB (g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10; 营养琼脂培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂粉 20; YPD 平板培养基(g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 琼脂粉 20; 混合发酵培养基为高粱汁, pH 约为 6^[18]。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌酵母的纯培养(SF)及共培养(MF)体系中生长曲线的测定: 在发酵培养基中分别接入地衣芽孢杆菌和酿酒酵母, 及混合接入发酵培养基中, 接种浓度均为 1×10^6 CFU/mL, 在 37 °C、200 r/min 的条件下培养 24 h 后, 分别采用营养琼脂培养基和 YPD 平板对地衣芽孢杆菌和酿酒酵母计数。

1.2.2 不同接种量对微生物相互作用的影响: 在发酵培养基中接入地衣芽孢杆菌和酿酒酵母, 细菌接种浓度为 1×10^6 CFU/mL, 酿酒酵母:地衣芽孢杆菌分别按 1:1、1:100、1:10 000 的 3 种比例, 在 37 °C、200 r/min 条件下培养 24 h 后, 测定细菌和酵母的生物量。

1.2.3 外界条件对细菌酵母相互作用的影响: (1) 不同温度对微生物相互作用的影响: 在发酵培养基中接入地衣芽孢杆菌和酿酒酵母, 接种浓度均为 1×10^6 CFU/mL, 分别置于 30 °C、35 °C、37 °C、40 °C、45 °C 温度下, 200 r/min

培养 24 h 后, 平板稀释涂布测定细菌和酵母的生物量; (2) 不同初始 pH 对微生物相互作用的影响: 调节发酵培养基的初始 pH 分别为 4、5、6、7、8, 接入地衣芽孢杆菌和酿酒酵母, 接种浓度均为 1×10^6 CFU/mL, 200 r/min 培养 24 h 后, 测定细菌和酵母的生物量。

1.2.4 微生物相互作用机制初步研究: (1) 酵母产生抑制物在细胞中的定位: 酿酒酵母在高粱汁中发酵 4 d 后, 离心取上清, 并收集酵母细胞。超声波破碎细胞后, 分别在细胞破碎液及发酵上清液中补加 LB 培养基, 调节 pH 至 7.0, 超滤除菌。接入地衣芽孢杆菌, 37 °C、200 r/min 培养, 绘制地衣芽孢杆菌生长曲线; (2) 酿酒酵母产生抑制物的分子量: 调节发酵 4 d 的酿酒酵母上清液 pH 至 7.0, 并补充 LB 培养基, 分别用 10、50、100 kD 的超滤膜截留含不同分子量的酿酒酵母发酵上清液。接种地衣芽孢杆菌, 37 °C、200 r/min 培养, 定时取样测定地衣芽孢杆菌生物量; (3) 抑制物对蛋白酶和热的敏感性: 用 1 g/L 的胃蛋白酶在 37 °C 处理发酵 4 d 的酵母上清液 1 h 后调节 pH 至 7.0, 另取发酵 4 d 的酵母上清液调节其 pH 至 7.0, 用 1 g/L 的胰蛋白酶和蛋白酶 K 在 37 °C 处理 2 h。取发酵 4 d 的酵母上清液调节其 pH 至 7.0, 121 °C 热处理 15 min。接入地衣芽孢杆菌, 37 °C、200 r/min 培养, 定时取样测定地衣芽孢杆菌生物量。

2 结果与分析

2.1 纯培养及共培养体系中微生物的生长特征

以地衣芽孢杆菌的纯培养(SF)为对照, 从图 1 中可以看出, 共培养(MF)中, 地衣芽孢杆菌的生长明显受到了酿酒酵母的抑制; 无论是 SF 还是 MF 中, 酿酒酵母的生长趋势表现一致, 表明地衣芽孢杆菌的存在未能对酿酒酵母

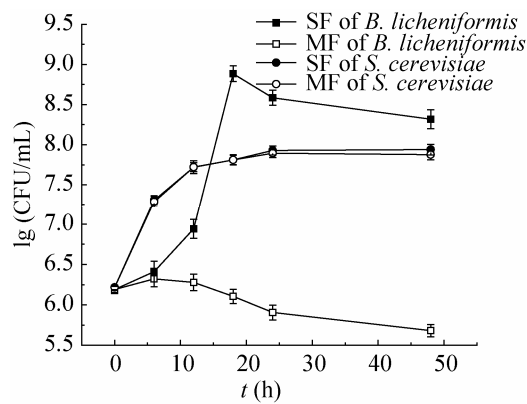


图 1 纯培养(SF)及共培养(MF)中地衣芽孢杆菌和酿酒酵母的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of *B. licheniformis* and *S. cerevisiae* in SF and MF

的生长表现出抑制或者促进作用。

2.2 不同初始接种量对微生物相互作用的影响

由于酿酒酵母对芽孢杆菌的抑制作用，因此，降低酿酒酵母的接种量，考察了两者不同接种比例对共培养体系的影响。如图 2 所示，即使将酿酒酵母接种量降低 10 000 倍，酿酒酵母还是能正常生长，而地衣芽孢杆菌的生长仍会受到很强的抑制作用($P<0.05$)。而这也解释了在酱香型白酒实际生产中的现象，即使堆积初始酵母含量很低，但经堆积过程酵母得到了大量富集，而即使地衣芽孢杆菌堆积初始含量很高，在堆积过程中却没有明显增殖。

2.3 环境因素对发酵过程中微生物相互作用的影响

2.3.1 温度对微生物相互作用的影响：酱香型白酒生产中，酒醅的温度是不断变化的。在堆积过程中，随着堆积时间的延长，堆积醅温度逐渐升高可至 50 °C，入窖发酵过程中酒醅温度也存在着先上升后下降的趋势。因此，本文研究了 30 °C、35 °C、37 °C、40 °C 和 45 °C 5 个温度梯度对地衣芽孢杆菌和酿酒酵母纯培养及共培养体系中各自生长特征的影响。

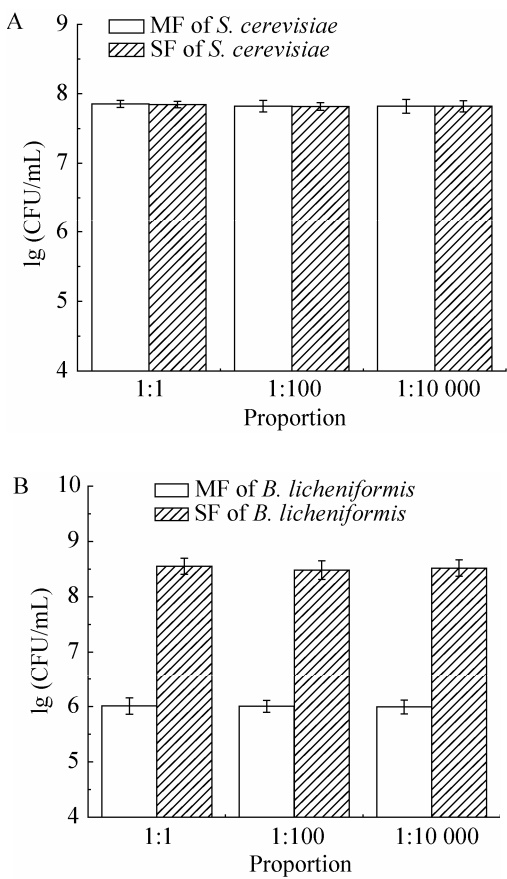


图 2 比例对共培养体系中地衣芽孢杆菌生长的影响
Fig. 2 Effects of proportion on the growth of *B. licheniformis* in MF

如图 3A 所示，在酿酒酵母纯培养体系中，即使 40 °C 的温度并未对酿酒酵母的生长产生影响，表明了酿酒酵母较好的耐高温性能。以纯培养为对照，在共培养体系中，酿酒酵母的生长也并无明显变化($P>0.05$)。如图 3B 所示，在地衣芽孢杆菌纯培养体系中，温度对其生长并无明显作用；而在共培养体系中，30 °C–40 °C 的温度之间，地衣芽孢杆菌生长仍然受到很强的抑制作用($P<0.05$)，但 45 °C 条件下，这种抑制作用明显减弱。该结果表明温度升高到 45 °C 以上，可能是因为酵母自身生长受到抑制，其对细菌的抑制作用降低，细菌开始生长并增殖。温度变化对细菌与酵母相互关系的影响，

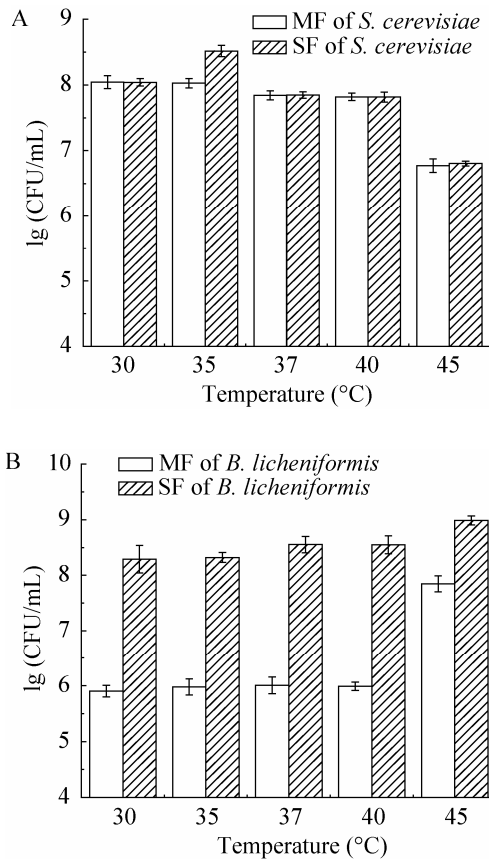


图3 温度对混合发酵中地衣芽孢杆菌生长的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the growth of *B. licheniformis* in MF

表明了酱香型白酒高温发酵中对细菌与酵母的生长产生调节作用的价值。

2.3.2 pH 对微生物相互作用的影响：酱香型白酒生产过程中“酸高”是一大特点，因此本文研究了不同 pH 对地衣芽孢杆菌和酿酒酵母相互作用的影响。

图 4A 显示，无论是纯培养还是共培养体系，pH 并未表现出对酿酒酵母生长的影响($P>0.05$)，表明酿酒酵母较好的耐酸性。同时，发酵培养基初始 pH 的调节并未改变共培养体系中地衣芽孢杆菌生长受抑制的现象($P<0.05$)，而且较低的 pH 对纯培养中地衣芽孢杆菌的生长也产生抑制作用(图 4B)。在共培养体系中由于酵母的

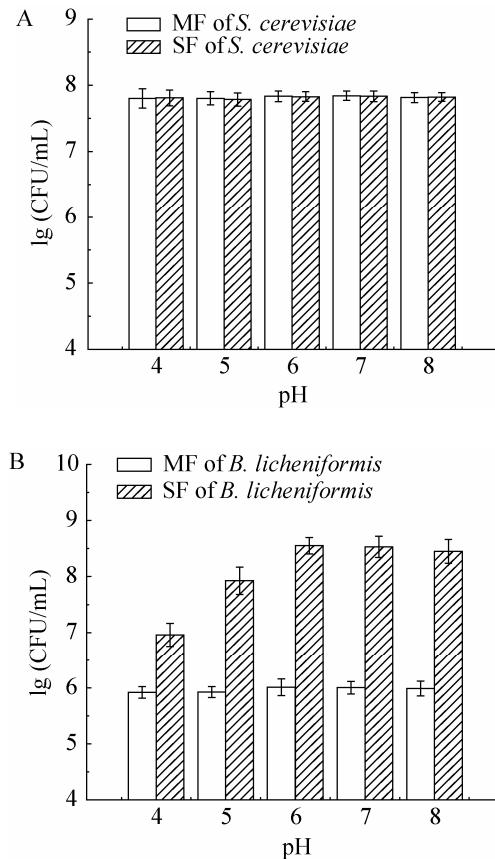


图4 pH 对混合发酵中地衣芽孢杆菌生长的影响

Fig. 4 Effects of pH on the growth of *B. licheniformis* in MF

产酸作用，发酵 1 d 后发酵液 pH 低至 3.8，至发酵终点 pH 达到 3 左右，该结果表明酿酒酵母发酵产生的酸性环境对地衣芽孢杆菌的生长也会存在抑制作用。

2.4 地衣芽孢杆菌与酿酒酵母相互作用机制初步研究

2.4.1 酵母产生抑制物在细胞中的定位：在葡萄酒酿造中研究发现，酿酒酵母在生长过程中会产生许多嗜杀因子以抑制其他微生物的生长，但目前尚未有关于酿酒酵母与地衣芽孢杆菌相互作用研究的报道。因此，本文初步研究了酱香型白酒酿造重要微生物酿酒酵母对地衣芽孢杆菌的抑制作用机制。

首先,对酿酒酵母产生抑制物质的定位进行分析。为排除酸的影响,将酵母处理液 pH 调节至 7.0。从图 5 中可以看到,酵母细胞破碎后的胞内物质对地衣芽孢杆菌的生长无明显影响($P>0.05$);而 pH 已调节至 7.0 的酵母上清液依然能表现出对地衣芽孢杆菌的抑制作用,这种抑制作用在 8 h 后较为明显($P<0.05$),至 16 h 时各试验组地衣芽孢杆菌生物量已无明显差异($P>0.05$),可能是酵母产生的抑制物受到芽孢杆菌的降解,逐渐失活。

2.4.2 酿酒酵母分泌大分子抑制物的研究:如图 6 所示,酿酒酵母产生的分子量小于 10 kD 的发酵上清液中物质未表现出对地衣芽孢杆菌的抑制作用($P>0.05$),而分子量大于 10 kD 的物质,对地衣芽孢杆菌的生长具有抑制作用($P<0.05$)。其中,分子量在 50–100 kD 范围内的物质可能由于被降解速度较慢,抑制作用维持时间较长。

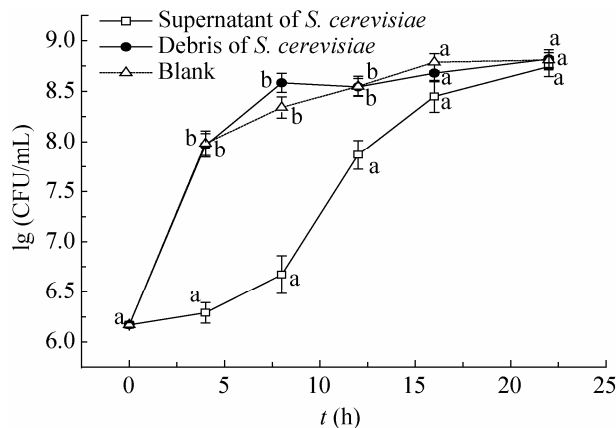


图 5 酿酒酵母细胞破碎液及发酵上清液对地衣芽孢杆菌生长的影响

Fig. 5 Effects of *S. cerevisiae* debris and its supernatant on the growth of *B. licheniformis*

注:图中不同字母表示两者间差异显著($P\leq 0.05$); Blank 表示 *B. licheniformis* 在 LB 中纯培养的空白对照。

Note: Different letters indicate the existence of a significant difference between samples ($P\leq 0.05$); Blank is *B. licheniformis* cultured in LB medium.

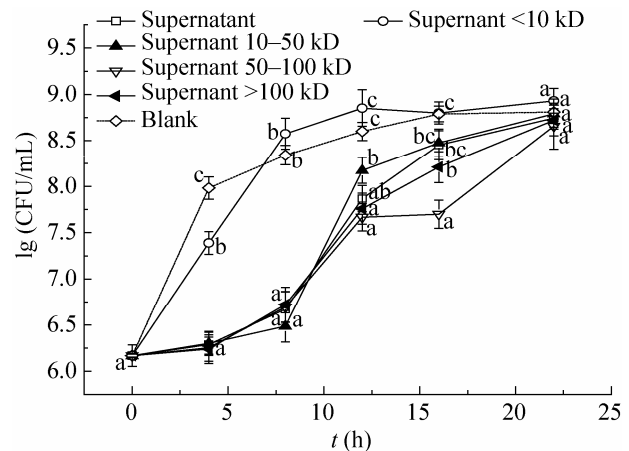


图 6 不同分子量的酿酒酵母发酵上清液对地衣芽孢杆菌生长的影响

Fig. 6 Effects of different molecular sizes of supernatant produced by *S. cerevisiae* on the growth of *B. licheniformis*

注:图中不同字母表示两者间差异显著($P\leq 0.05$); Blank 表示 *B. licheniformis* 在 LB 中纯培养的空白对照。

Note: Different letters indicate the existence of a significant difference between samples ($P\leq 0.05$); Blank is *B. licheniformis* cultured in LB medium.

2.4.3 抑制物对蛋白酶和热的敏感性:如图 7 所示,相对于未处理上清液对照组来说,经热处理及蛋白酶处理后的酿酒酵母发酵上清液,在 4、8、12 h 时可见其对地衣芽孢杆菌的抑制作用明显降低($P<0.05$),表明酿酒酵母产生的某些抑制物对热敏感,对蛋白酶也敏感,可能是某些蛋白类抑制物。

3 讨论

在酱香型白酒酿造过程中,产酱香特征风味的地衣芽孢杆菌和影响出酒率的酿酒酵母之间的作用对白酒的出酒率及风味具有重要的控制作用。研究表明,地衣芽孢杆菌的生长会受到酿酒酵母较强的抑制作用,进而减弱了其在酱香型白酒生产中功能作用的发挥,而高温可以减弱这种抑制作用,这也是酱香型白酒高温堆积与高温发酵的一个重要的原因。

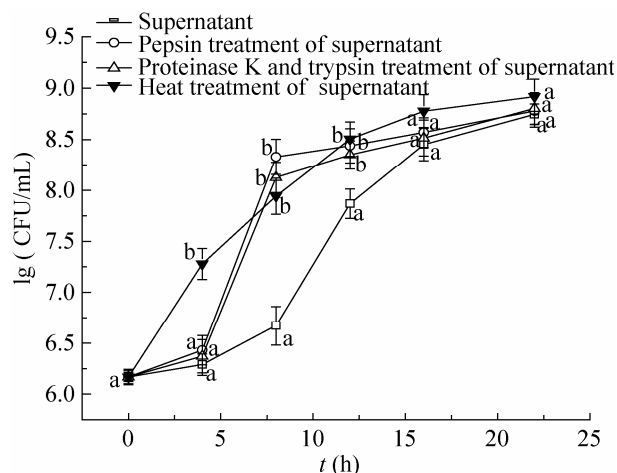


图7 酿酒酵母产生的抑制物对蛋白酶和热的敏感性
Fig. 7 Inhibiting factors on protease and thermal sensitivity

注: 图中不同字母表示两者间差异显著($P \leq 0.05$).

Note: Different letters indicate the existence of a significant difference between samples ($P \leq 0.05$).

同时, 本文初步分析了两种微生物相互作用的机制, 一方面是由于酿酒酵母在生长过程中造成的酸性环境对地衣芽孢杆菌生长存在抑制, 另一方面, 酿酒酵母能产生的某些分子量大于 10 kD 的蛋白类物质, 对地衣芽孢杆菌的生长也具有抑制作用。而在无酵母细胞存在时, 地衣芽孢杆菌可以逐渐克服这种抑制作用而实现生长。因此, 这种抑制作用产生的机制以及如何控制该抑制作用, 实现两种微生物的共同发酵将是进一步深入研究的方向, 对于白酒酿造的机制以及生产控制具有重要的理论指导意义。

参考文献

- [1] Narvhus JA, Gadaga TH. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 86(1/2): 51–60.
- [2] Gadaga TH, Mutukumira AN, Narvhus JA. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2001, 68(1): 21–32.
- [3] Mounier J, Gelsomino R, Goerges S, et al. Surface microflora of four smear-ripened cheeses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6489–6500.
- [4] Sieuwerts S, Molenaar D, van Hijum SA, et al. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(23): 7775–7784.
- [5] Vuyst LD, Neysens P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(11): 43–56.
- [6] Guerzoni ME, Vernocchi P, Ndagijimana M, et al. Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli-yeasts interactions[J]. Food Microbiology, 2007, 24(2): 139–148.
- [7] Paramithiotis S, Gioulatos S, Tsakalidou E, et al. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(12): 2429–2433.
- [8] Yazar G, Tavman S. Functional and technological aspects of sourdough fermentation with *Lactobacillus sanfranciscensis*[J]. Food Engineering Reviews, 2012, 4(3): 171–190.
- [9] Leroy F, Lievens K, De Vuyst L. Interactions of meat-associated bacteriocin-producing *Lactobacilli* with *Listeria innocua* under stringent sausage fermentation conditions[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(10): 2078–2084.
- [10] Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 106(3): 270–285.
- [11] Nissen P, Arneborg N. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Archives of Microbiology, 2003, 180(4): 257–263.
- [12] Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism[J]. Yeast, 2003, 20(4): 331–341.

- [13] Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T, et al. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 108(3): 336–345.
- [14] Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 86(1/2): 11–22.
- [15] 吴群, 徐岩. 高温大曲中地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* CGMCC3963)的耐高温特征[J]. *微生物学报*, 2012, 52(7): 910–915.
- [16] 张荣, 徐岩, 范文来, 等. 酱香大曲中地衣芽孢杆菌及其特征风味代谢产物的分析研究[J]. *工业微生物*, 2010, 40(3): 7–12.
- [17] Xu Y, Ji K, Piggott J. Moutai (Maotai): production and sensory properties[J]. *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research*, 2012: 315–330.
- [18] 唐洁. 清香型小曲酒微生物群落结构及功能的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2012.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn