

研究报告

## 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

庄孝杰 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:**【目的】拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)是酱香型白酒酿造过程优势菌株。通过研究拜耳接合酵母酿造相关生理代谢特征及其与酿造环境中其它功能菌株的相互作用,探索其在白酒酿造过程中的贡献。【方法】从酱香酒酿造中筛选一株性能优良的拜耳接合酵母,比较其与模式菌株(*Z. bailii*, ATCC 58445)的生理代谢特征。通过组合发酵研究其与产酱香特征风味细菌地衣芽孢杆菌的相互作用。【结果】从酱香型酒醅中筛选得到一株性状优良的拜耳接合酵母(*Z. bailii* 15),可耐受 pH 2.0 和 37 °C 高温及 8%酒精浓度(体积比),较模式株更适应酿造环境,酒精产量(33.58 g/L)也远高于模式株(19.04 g/L),且与酱香型白酒酿酒酵母 MT1 (34.29 g/L)相当。该菌可产多种风味物质,与模式株相比,独特产生法呢醇、十二醇、2-壬醇、2-乙基己醇、癸酸、月桂酸、辛酸、辛酸乙酯、苯乙酮、4-叔丁基苯酚。共培养体系中,30 °C 条件下地衣芽孢杆菌对拜耳接合酵母生长影响不大,而在 37 °C 地衣芽孢杆菌抑制拜耳接合酵母生长。此外,地衣芽孢杆菌对拜耳接合酵母乙醇转化率有促进作用,共培养体系风味物质种类及含量也都受到很大影响。【结论】拜耳接合酵母在酱香型白酒酿造体系中产酒精、产风味方面表现优异,对酱香型白酒生产具有重要贡献。

**关键词:** 酱香型白酒, 拜耳接合酵母, 耐受性, 风味物质, 相互作用

## Physiological characteristics of *Zygosaccharomyces bailii* and its interaction with *Bacillus licheniformis* in Chinese Maotai-flavor liquor making

ZHUANG Xiao-Jie 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:** [Objective] *Zygosaccharomyces bailii* is the dominant strain in the brewing process of

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31371822)

\*Corresponding author: Tel: 86-510-85918201; E-mail: wuqun\_1981@163.com

Received: February 28, 2016; Accepted: April 26, 2016; Published online (www.cnki.net): June 08, 2016  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31371822)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; E-mail: wuqun\_1981@163.com

收稿日期: 2016-02-28; 接受日期: 2016-04-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

*Maotai*-flavor liquor. To explore the contributions *Z. bailii* made to the brewing procedure, its physiological characteristics and interaction with other functional strains in the brewing environments was studied. **[Methods]** One excellent phenotype *Z. bailii* strain was filtered from the fermented grains of *Maotai*-flavor liquor, and then comparing its physiological characteristic, metabolic function with ATCC 58445 and studying the combined fermentation with *Maotai*-flavor characteristics bacteria *Bacillus licheniformis*. **[Results]** *Z. bailii* 15 with excellent phenotype from fermented grains was obtained, which could tolerate pH 2.0, 37 °C, 8% alcohol concentration (*V/V*) and more suitable for the brewing environment when comparing with ATCC 58445. Its ethanol production (33.58 g/L) was even to the *Saccharomyces cerevisiae* MT1 (34.29 g/L), which was far higher than the type strain (19.04 g/L). It can specifically produce 3,7,11-Trimethyl-2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 1-Dodecanol, 2-Nonanol, 2-Ethylhexanol, Decanoic acid, Lauric acid, Octanoic acid, Ethyl octanoate, Acetophenone, 4-Tert-butylphenol. In the co-culture system, *B. licheniformis* inhibits the growth of *Z. bailii* at 37 °C, but has little effect on 30 °C. In addition, MT6 promotes the conversion of ethanol produced by *Z. bailii* 15, it can also affects the species and content of flavor greatly. **[Conclusion]** *Z. bailii* shows a significant performance in ethanol production and flavor production, which made it have a great contribution to the *Maotai*-flavor liquor production.

**Keywords:** *Maotai*-flavor liquor, *Zygosaccharomyces bailii*, Tolerance, Flavor, Interaction

酵母是白酒酿造过程中重要的微生物，它可以分解酿造原料产生酒精和多种风味物质成分，对产酒率和酒质至关重要。拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)在白酒酿造过程中普遍存在<sup>[1-2]</sup>，在酱香型白酒堆积及发酵阶段均为优势菌株，所占酵母生物量比例最高达到 70%，远超过酿酒酵母<sup>[1]</sup>。在其它发酵食品中，拜耳接合酵母被认为是腐败菌，广泛存在于腐败的葡萄酒、果汁、果酱等食品中<sup>[3-7]</sup>。而拜耳接合酵母作为酱香型白酒发酵过程中的优势菌种，因形态上的相似而长期被误认为是酿酒酵母，其在酱香型白酒酿造过程中所扮演角色的相关研究并不多。

酱香型白酒酿造过程经历独特的高温制曲、堆积和窖池发酵过程，只有耐受高温、高酸、高浓度乙醇等多种胁迫因素的微生物能够在该环境中得到富集。同时，白酒酿造是多菌种混菌发酵过程，微生物相互作用对微生物生理代谢影响较大。微生物间通过彼此影响，改变个体的生长及发酵特征，继而改变微生物群体的整体结构与功能，最终影响发酵食品的安全与品质<sup>[8]</sup>。多种微生物相互作用对白酒最终的酒质和风味造成重要影响。拜耳接合酵母为体系中的优势菌株，也是重

要的乙醇贡献菌，细菌则以芽孢杆菌为主导，其中地衣芽孢杆菌能够产生 C4 类化合物，如吡嗪类化合物、挥发性酸、芳香族以及酚类化合物等，是影响酱香型白酒口感品质的重要风味贡献菌株<sup>[9]</sup>。研究两者相互作用对于解析拜耳接合酵母对酱香型白酒酿造的作用，探索白酒酿造生物机制，进一步完善酱香型白酒酿造理论体系具有意义。

本文从酱香型酒醅中分离筛选到优良性能的菌株 *Z. bailii* 15。通过其与模式株生理生化特征的差异比较，发现该菌对高温、高酸、高浓度乙醇具有高耐受力，发酵性能高效并能生成多种挥发性物质，这些性状使得拜耳接合酵母在酿造环境中得以富集并对酒质产生重要影响。分析其与产酱香特征风味细菌之间的相互作用，探索相互作用对白酒酿造过程中二者生物量的变化及产酒精、风味物质的影响。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的理论价值，对白酒生产具有指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种：模式株(*Z. bailii* , ATCC 58445)购于

日本技术评价研究所生物资源中心。本研究室筛选得到的 15 株拜耳接合酵母、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* MT1) 及地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* MT6) 均分离自贵州某酱香型白酒车间酒醅。

**1.1.2 培养基:** YPD 培养基<sup>[10]</sup>, LB 培养基<sup>[10]</sup>, WL 培养基<sup>[11]</sup>, 高粱汁发酵培养基<sup>[12]</sup>。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 葡萄糖、琼脂、氯化钠、乳酸、乙醇、三氯乙酸及培养基试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; PCR 试剂购自生物工程(大连)有限公司; 液化酶、糖化酶购自江苏锐阳生物科技有限公司。

气相色谱质谱联用仪(GC 6890N-MSD5975)、气相色谱仪(GC 6890N)和液相色谱仪(Agilent 1200)均购自美国 Agilent 公司; 酶标仪购自美国 Thermo Electron 公司; PCR 仪(Nexus GX2)购自德国 Eppendorf 公司; 凝胶成像仪(FluorChen FC3)购自美国 Protein Simple 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 酒醅中酵母的筛选: 分离纯化。**称取 5 g 酒醅于 100 mL 含玻璃珠的无菌生理盐水中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 20 min; 平板稀释法<sup>[13]</sup>菌株分离, 设  $10^{-1}$  到  $10^{-3}$  三个稀释梯度, 每稀释梯度 3 个平行, 涂布于 WL 平板, 30 °C 培养 4~5 d; 挑选 WL 平板上中央绿色或蓝绿色, 边缘白色, 表面光滑的圆形菌落<sup>[11]</sup>, 在 YPD 平板上划线于 30 °C 培养 4~5 d 并编号。

**1.2.2 菌种鉴定:** (1) 采用珠磨法<sup>[14]</sup>提取基因组。(2) PCR 反应体系和条件见参考文献[15], 反应以 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 为 26S rRNA 基因序列的上下游引物。PCR 产物纯化后测序, 鉴定为拜耳接合酵母并编号。

**1.2.3 耐受性研究:** 分别在目标菌株复筛实验中接种 15 株待筛拜耳接合酵母菌株, 发酵性能差异研究实验中接种目标菌株和模式菌株至 4 mL YPD

液体培养基, 30 °C、200 r/min 振荡培养 18 h 作为种子液。等量接种至不同温度梯度、酒精梯度、pH 梯度的 5 mL YPD 液体培养基静置培养 48 h, 每梯度 3 个平行。测定  $OD_{600}$  值, 比较生长情况。

**1.2.4 菌株形状特征差异研究:** 菌落形态观察, 显微镜、电镜观察细胞形态。拜耳接合酵母划线于 YPD 平板 30 °C 培养 4 d, 单菌落观察, 新鲜平板进行电镜观察。挑取单菌落于 5 mL YPD 液体培养基中 30 °C、200 r/min 振荡培养 18 h, 显微镜下观察。

**1.2.5 混菌相互作用机制初步研究:** 培养拜耳接合酵母目标菌株与地衣芽孢杆菌种子液, 两者按  $1 \times 10^6$  CFU/mL 浓度接入 50 mL 高粱汁培养基, 培养方式为酵母纯培养, 细菌纯培养以及两者混合培养。设 30 °C 和 37 °C 两个培养温度, 200 r/min 培养 48 h。(1) 平板计数法检测纯培养及共培养生物量, 分别采用 YPD 平板(添加 Amp, 50 mg/L)、LB 平板进行酵母、细菌计数。(2) pH 计检测 pH 变化。

**1.2.6 发酵性能研究:** 分别在目标菌株复筛实验中接种 15 株待筛拜耳接合酵母菌株, 发酵性能差异研究实验中接种目标菌株和模式菌株至 4 mL 高粱汁培养基, 30 °C、200 r/min 振荡培养 18 h 作为种子液。等量接种至 50 mL 高粱汁培养基, 锥形瓶发酵栓厌氧培养。发酵结束后, 发酵液 6 000 r/min 离心 10 min 取上清。(1) DNS 法<sup>[16]</sup>测还原糖, 标准曲线:  $Y(g/L) = (1.787 - 4X + 0.0572) \times \text{稀释倍数}$ ,  $R^2 = 0.9999$ 。(2) HPLC 法<sup>[17]</sup>测乙醇, 样品处理: 500  $\mu$ L 发酵液+1 000  $\mu$ L 三氯乙酸(10%), 4 °C 放置 1 h, 标准曲线为:  $Y(g/L) = 0.0000144876X - 0.00796$ ,  $R^2 = 0.99916$ ; 乙醇转化率=乙醇量/(初糖-残糖)。(3) 二乙酰-胍法测尿素<sup>[18]</sup>。

**1.2.7 高级醇检测:** GC 法测定高级醇<sup>[19]</sup>。

**1.2.8 挥发性物质测定:** 样品处理: 3 g NaCl+8 mL 发酵上清液+10  $\mu$ L 内标(4-甲基-2-戊醇), 混匀, 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法<sup>[20]</sup>测风味物质。

## 2 结果与分析

### 2.1 优良拜耳接合酵母菌株筛选

经分离纯化共从酒醅中得到 15 株拜耳接合酵母菌株,拟通过耐受性及发酵性能分析筛选出一株优良拜耳接合酵母菌株作为后期研究目标菌株。

如图 1 所示,15 株拜耳接合酵母均能够耐受 37 °C 的高温,其中 1、2、13、15 号菌株耐受能力强,1、2、5、6、13、15 号菌株在 35 °C 下的生长状况反而优于 30 °C。待筛拜耳接合酵母菌株均能够在 pH 2.0 环境下生长良好,其中菌株 1、2、

11、13 表现出很强的耐受能力。酒精耐受性分析,所有拜耳接合酵母菌株在 6%酒精浓度下生长良好,其中第 2、4、6、8、11、13、15 号菌株在 8%酒精浓度下生长仍较旺盛。

乙醇是白酒的重要发酵产物。高级醇是白酒中的风味物质,但含量较高会导致酒味辛辣苦涩,不利于品质<sup>[21]</sup>。然而尿素是致癌物质氨基甲酸乙酯的主要前体物质<sup>[22-23]</sup>。本试验旨在筛选出一株高产乙醇却低产高级醇和尿素的菌株。测定 15 株拜耳接合酵母发酵产物相关指标。如表 1 所示,

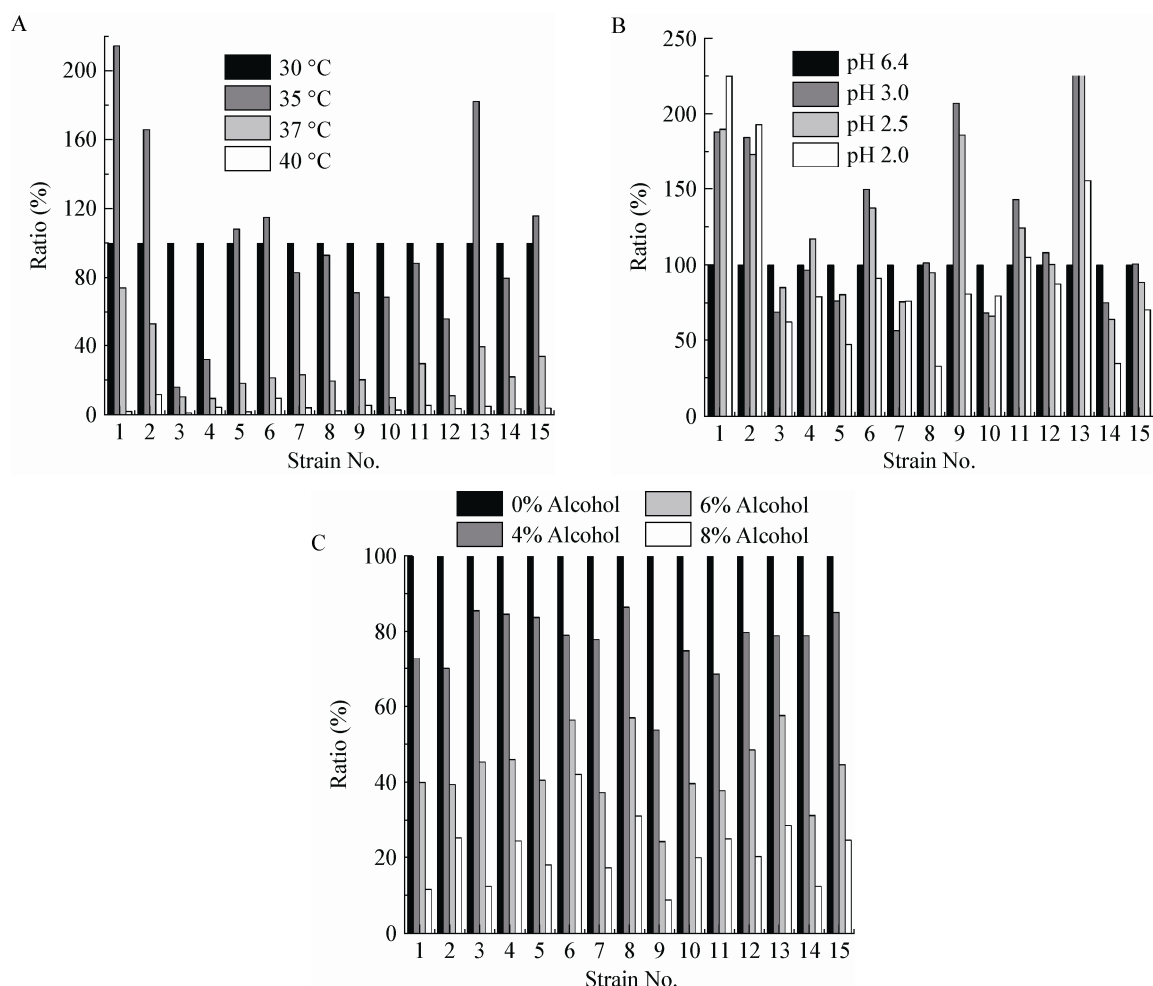


图 1 耐受性试验

Figure 1 Tolerance test

注：A：温度耐受性；B：pH 耐受性；C：乙醇耐受性。A、B、C 分别以 30 °C、原始 pH (pH 6.4)、无酒精条件下生物量为对照，设为 100%。

Note: A: Temperature tolerance; B: pH tolerance; C: Ethanol tolerance. Set the biomass at 30 °C, original pH (pH 6.4), no alcohol condition as comparison as 100%.

表 1 高粱汁发酵试验复筛  
Table 1 Secondary screening by fermentation test with sorghum juice

菌株编号 Strain No.	乙醇含量 Ethanol concentration (g/L)	乙醇转化率 Ethanol conversion rate (%)	异戊醇含量 Isomyl alcohol concentration (mg/L)	尿素含量 Urea concentration (mg/L)	发酵时间 Fermentation time (h)
1	26.96±3.85	36.40±6.46	5.63±0.75	28.08±4.07	144
2	29.97±2.89	41.77±0.42	10.52±1.34	42.01±2.12	144
3	32.48±4.51	40.65±0.27	9.40±0.62	46.48±5.51	144
4	34.10±4.11	41.03±0.21	11.84±1.45	44.38±4.34	144
5	27.18±3.09	42.87±0.40	19.23±1.65	44.12±1.91	144
6	29.35±4.29	38.09±0.42	9.83±0.63	33.86±4.91	144
7	35.97±1.89	46.46±0.24	15.77±0.92	33.34±4.21	144
8	30.15±4.21	38.62±0.21	9.97±1.14	35.97±2.01	144
9	30.96±2.98	42.70±2.70	6.68±0.83	42.54±4.49	144
10	32.58±3.61	40.01±0.20	9.37±1.17	35.44±4.38	144
11	31.85±2.74	41.76±0.21	7.51±1.22	42.81±2.80	144
12	34.06±4.02	41.70±1.76	8.25±0.73	41.49±0.22	144
13	28.72±3.68	39.02±1.57	7.90±1.03	44.64±3.31	144
14	31.77±1.76	41.66±0.21	18.08±0.21	47.53±5.32	144
15	33.58±5.49	41.91±0.53	6.70±1.12	41.22±5.21	144

1、6、7、8、10 号菌株产尿素含量低。4、7、12、15 号菌株发酵产乙醇量更大，最高能达到 35.97 g/L。乙醇转化率较高的有 2、5、7、9、11、12、15 号菌株，均在 41.5%–46.5%之间。而 1、9、15 号菌株在低产高级醇(异戊醇)方面表现良好。

综合分析，15 号拜耳接合酵母菌株在温度耐受性、乙醇耐受性、低产高级醇、高产乙醇、高乙醇转化率方面表现优良，选取 15 号菌株作为目标菌株进一步研究，命名为 *Z. bailii* 15。

2.2 菌株形状特征

研究发现 15 株酱香型白酒酿造中的拜耳接合酵母菌落形态与细胞形态接近，以 *Z. bailii* 15 特征为代表，与模式株 ATCC 58445 进行比较，结果见图 2。*Z. bailii* 15 菌落呈圆形且表面光滑，模式株菌落不规则且表面粗糙呈粉态，二者菌落形态相差很大，见图 2A、D。光学显微镜与电镜观察细胞形态，*Z. bailii* 15 呈球形或椭圆形，以单细胞存在，细胞总体较模式株大(图 2B、E)；而模式株则

以假菌丝的形态存在，芽殖时各细胞以狭小的面积相连，呈藕节状(图 2C、F)，细胞更加狭长，长宽比约为 1.45 (*Z. bailii* 15 为 1.14)。形态特征上，相对模式株狭长的细胞形态并呈藕节状相连而言，酒醅中筛选得到的拜耳接合酵母以单细胞形式存在，且呈球形或椭圆形，这些差异更有利于其在酒醅中广泛分布及更充分地利用酿造原料。

2.3 耐受性

如图 3A 所示，在 30、33、35 °C 培养条件下，*Z. bailii* 15 及模式株均生长良好。*Z. bailii* 15 在 30、33、35 °C 培养条件下生物量变化幅度小(<8%)，而模式株变化幅度大于 76%。吴徐建<sup>[24]</sup>在不同轮次堆积酒醅温度变化的研究中发现，30–35 °C 为各轮次不同位点酒醅的普遍温度范围。*Z. bailii* 15 在 30、33、35 °C 三个条件下生长旺盛且生物量稳定，这是其长期适应高温且温度变化频繁的酿造环境所致，同时也是其成为酱香酒发酵优势菌株的重要原因之一。

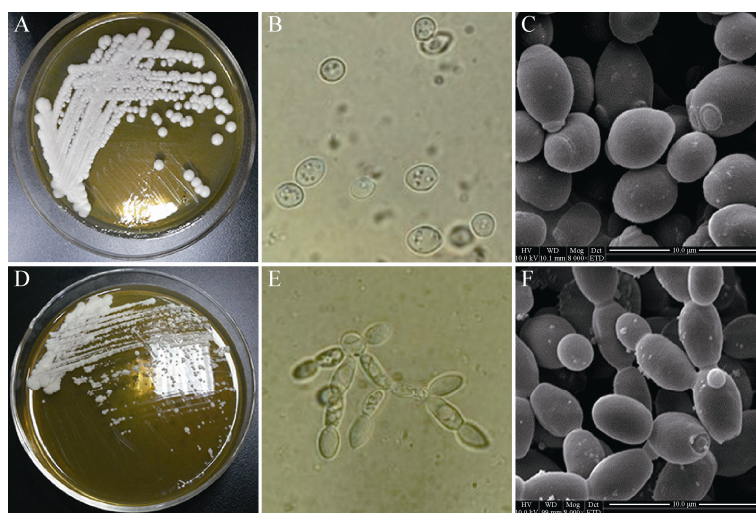


图2 *Z. bailii* 15、ATCC 58445 在 YPD 培养基上菌落及微观形态比较

Figure 2 The comparison of colonies morphology and micromorphologies of *Z. bailii* 15 and ATCC 58445 cultured on YPD medium

注：A、B、C 分别为 *Z. bailii* 15 菌落形态、显微镜(1 000×)及电镜下微观形态(8 000×)；D、E、F 分别为 ATCC 58445 菌落形态、显微镜(1 000×)及电镜下微观形态(8 000×)。

Note: A, B and C stand for the colony morphology, the micromorphologies of microscope (1 000×) and electron microscope (8 000×) of *Z. bailii* 15; D, E and F stand for the colony morphology, the micromorphologies of microscope (1 000×) and electron microscope (8 000×) of ATCC 58445.

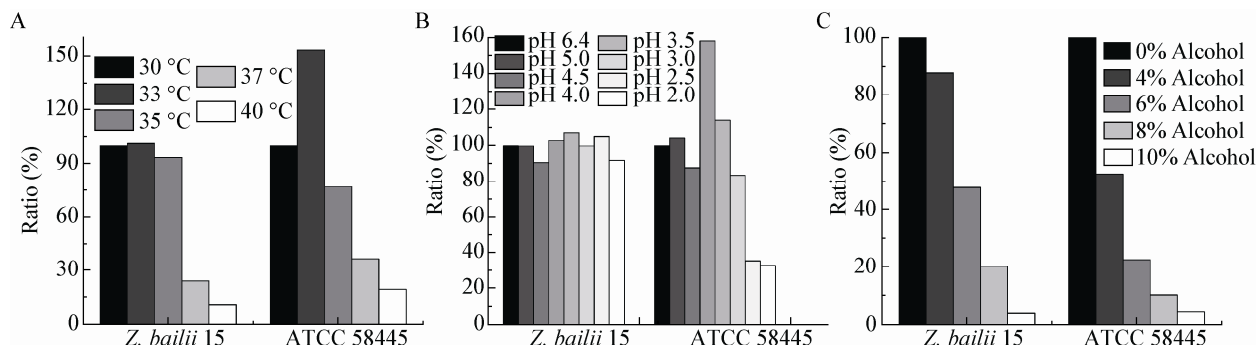


图3 耐受性试验

Figure 3 Tolerance test

注：A：温度耐受性；B：pH 耐受性；C：乙醇耐受性。A、B、C 分别以 30 °C、原始 pH (pH 6.4)、无酒精条件下生物量为对照，设为 100%。

Note: A: Temperature tolerance; B: pH tolerance; C: Ethanol tolerance. Set the biomass at 30 °C, original pH (pH 6.4), no alcohol condition as comparison as 100%.

白酒发酵后期为低 pH 环境，只有低 pH 耐受菌株能够继续发酵。如图 3B 所示，*Z. bailii* 15 pH 耐受性远强于模式株，能够在 pH 2.0 生长良好，而模式株在 pH 2.5 培养条件下生物量急剧下降停止生长。低 pH 胁迫迫使拜耳接合酵母做出适应，

反过来，拜耳接合酵母大量生长对白酒品质做出更大影响。

由图 3C 可知，*Z. bailii* 15 乙醇耐受性比模式株强。*Z. bailii* 15 在 8%酒精浓度培养基中仍能生长。模式株虽能在 4%酒精浓度条件下生长，但生

表 2 发酵性能差异研究  
Table 2 Research of the differential fermentation properties

菌株 Strain	乙醇含量 Ethanol concentration (g/L)	乙醇转化率 Ethanol conversion rate (%)	异戊醇含量 Isomyl alcohol concentration (mg/L)	尿素含量 Urea concentration (mg/L)	发酵时间 Fermentation time (h)
<i>Z. bailii</i> 15	33.58±5.49	41.91±0.53	6.70±1.12	41.22±5.21	144
ATCC 58445	19.05±2.21	44.67±0.56	9.42±1.01	46.49±4.22	144

物量较对照(无酒精)下降 49%，而 *Z. bailii* 15 仅下降 11%；在 6%酒精浓度下生物量则降低为 21%，而 *Z. bailii* 15 生物量为对照组的 48%。酒精耐受性的差异与 *Z. bailii* 15 长期适应白酒酿造高酒精浓度环境有关。

2.4 发酵性能比较

比较 *Z. bailii* 15 与模式株发酵性状(表 2)，两者乙醇转化率相差不大，模式株乙醇转化率为 44.66%，略高于 *Z. bailii* 15 (41.91%)，然而 *Z. bailii* 15 发酵产物乙醇含量为模式株的 1.76 倍，这说明了 *Z. bailii* 15 经酿造环境长期驯化，更加高产乙醇。此外，*Z. bailii* 15 在低产尿素低产高级醇方面表现更好，含量仅为模式株的 71.4%。

酿酒酵母被认为是白酒酿造中最重要的乙醇贡献微生物，与同一酒醅中分离出的高产乙醇酿酒酵母 MT1 进行发酵性能比较。MT1 的发酵性能更加高效，108 h 即发酵结束，而 *Z. bailii* 15 在 144 h 发酵结束。并且根据公式折算后 MT1 的乙醇转化率为 46.91%，略高于 *Z. bailii* 15 (41.91%)<sup>[15]</sup>。然而发酵结束后，*Z. bailii* 15 和 MT1 乙醇含量接近，分别为 33.58 g/L 和 34.29 g/L。而且在白酒酿造各个阶段，拜耳接合酵母生物量高于酿酒酵母，这说明拜耳接合酵母在产酒精上的贡献甚至可能比酿酒酵母更大，其在白酒酿造产乙醇方面尤为重要。

2.5 挥发性物质比较研究

比较 *Z. bailii* 15 和模式株发酵代谢挥发性产物，如表 3 所示 *Z. bailii* 15 风味总量为 415.27 μg/L，远高于模式株(229.09 μg/L)。其中，*Z. bailii* 15 发酵产物总醇量达到模式株的 2.64 倍，含有 4 种特有醇类。该菌特异产法呢醇，其橙花叔醇产量约为模式株的 1.60 倍。橙花叔醇是白酒的主要风味物质，干

甜而少清，香气持久；法呢醇为萜烯类物质，具有甜香、花香、清香，也是白酒中的重要风味物质<sup>[15]</sup>。从表 3 中看出 *Z. bailii* 15 产酸更丰富，特异产癸酸、月桂酸、辛酸。脂类物质中，*Z. bailii* 15 特异产辛酸乙酯。此外，*Z. bailii* 15 特异产苯乙酮、4-叔丁基苯酚；2,5-二叔丁基酚为模式株的 2.40 倍。以上结果表明 *Z. bailii* 15 在产醇、产脂、产酸方面均有很好的表现，风味代谢能力远高于模式株。

表 3 风味物质差异研究  
Table 3 Research of the differential flavor compounds

菌株编号 Strain No.	风味物质名称 Name of flavor compounds	风味物质含量 Flavor compounds concentration (μg/L)	
		<i>Z. bailii</i> 15	ATCC 58445
1	2-Methyl-1-propanol	20.08±1.21	9.38±0.84
2	Isopentyl formate	42.64±3.16	45.74±4.01
3	Ethyl hexanoate	ND	4.83±0.61
4	Ethyl octanoate	4.37±0.23	ND
5	2-Ethylhexanol	4.67±0.14	ND
6	2-Nonanol	3.42±0.09	ND
7	Benzaldehyde	16.27±1.33	12.42±1.39
8	Isobutyric acid	ND	46.21±6.01
9	Acetophenone	5.04±0.71	ND
10	1-Dodecanol	2.12±0.08	ND
11	Nerolidol	9.00±0.33	5.51±0.74
12	Octanoic acid	37.75±3.09	ND
13	Decanoic acid	19.48±1.39	ND
14	4-Tert-butylphenol	2.98±0.18	ND
15	2,5-Di-tert-butylphenol	233.44±21.71	97.30±8.57
16	Farnesol	5.36±2.68	ND
17	Geranyl acetate	ND	7.70±0.71
18	Dodecanoic acid	8.65±1.39	ND

注：ND：未检测到。

Note: ND: Not detected.



## 2.6 拜耳接合酵母、地衣芽孢杆菌相互作用

为研究拜耳接合酵母、地衣芽孢杆菌在纯培养与共培养发酵体系中相互作用所引起的差异,对共培养引起的两者生物量、发酵性能以及产风味物质的变化进行了研究。

**2.6.1 *Z. bailii* 15 与 MT6 混菌状态下生物量变化:**以 *Z. bailii* 15、MT6 纯培养为对照,研究共培养相互作用造成的生物量影响。如图 4A 所示,30 °C 时, *Z. bailii* 15 在纯培养与共培养条件下的生长趋势接近,纯培养生物量略高于共培养。MT6 共培养生物量远低于纯培养(图 4B)。表明 MT6 受到 *Z. bailii* 15 的抑制。研究发现,MT6 纯培养时,初始 pH 稳定在 5.6–6.0;而共培养发酵结束

时, pH 逐渐下降至 4.1。这可能是 30 °C 条件下, *Z. bailii* 15 生长旺盛大量产酸,抑制了 MT6 生长。

然而,37 °C 培养条件下,尽管 *Z. bailii* 15 纯培养与共培养生长均呈上升趋势,但 *Z. bailii* 15 共培养最高生物量远低于纯培养,MT6 抑制了 *Z. bailii* 15 的生长(图 4C、D);然而 MT6 在纯培养与共培养状态下生物量接近。这是由于 MT6 纯培养与共培养状态下, pH 均在 5.5–6.0 之间; *Z. bailii* 15 纯培养时 pH 逐渐下降至 4.1, *Z. bailii* 15 在 pH 4.0 下生长略优于 pH 5.5–6.0 是共培养条件下 *Z. bailii* 15 受到抑制的原因之一。除 pH 的影响外, MT6 某些代谢物质可能对 *Z. bailii* 15 产生了抑制作用。综合分析,37 °C 条件下, *Z. bailii* 15 生

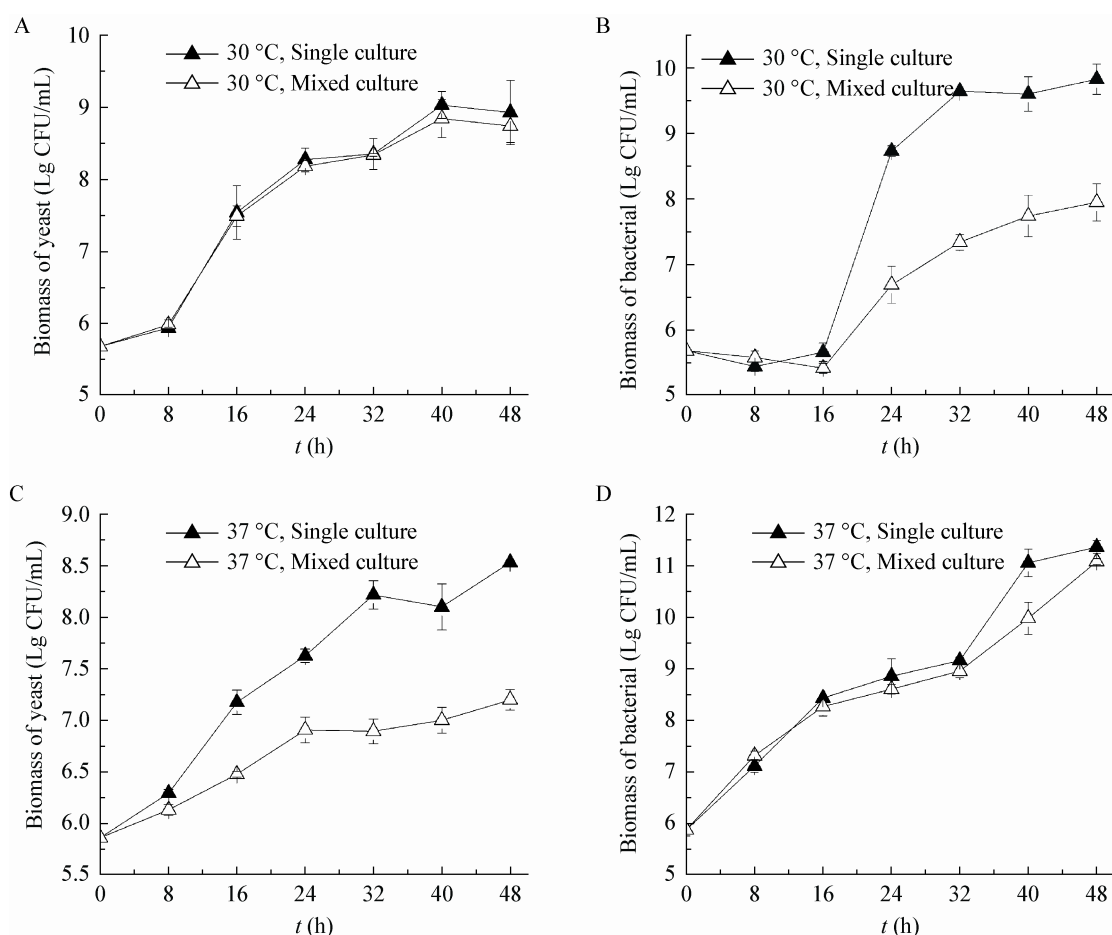


图 4 纯培养及混合培养体系中 *Z. bailii* 15、MT6 生长曲线  
Figure 4 The growth curve of *Z. bailii* 15, MT6 in single and mixed culture



长较弱, 协同 pH 抑制及 MT6 代谢抑制物共同作用造成了 *Z. bailii* 15 的生物量下降, 具体机理有待进一步验证。

**2.6.2 *Z. bailii* 15 纯培养与共培养产乙醇差异:** 检测发酵产物残糖含量、乙醇含量。MT6 几乎不消耗还原糖且不产乙醇。如图 5 所示, 30 °C 和 37 °C 条件下, *Z. bailii* 15 纯培养乙醇产量高于共培养。其中, 37 °C 条件下培养 48 h, *Z. bailii* 15 纯培养产乙醇 2.11 g/L, 较共培养高 46.1%。分析原因, *Z. bailii* 15 纯培养、共培养产乙醇与生物量变化趋

势一致, 生物量的差异很可能是 *Z. bailii* 15 两种状态下产乙醇差异原因之一。除产量差异外, 在 30 °C 和 37 °C 条件下菌株共培养的乙醇转化率分别为 19.5% 和 21.7%, 高于纯培养条件下的 13.7% 和 18.4%。MT6 的共存促进了 *Z. bailii* 15 乙醇转化率的提高, *Z. bailii* 15 将碳源更多地利用于乙醇合成。

**2.6.3 *Z. bailii* 15、MT6 纯培养与共培养代谢风味物质研究:** 如图 6A 所示, 30 °C 条件下纯培养与共培养产风味情况。共培养条件下风味物质总量为 5 715.95 μg/L, 较 *Z. bailii* 15、MT6 纯培养风味

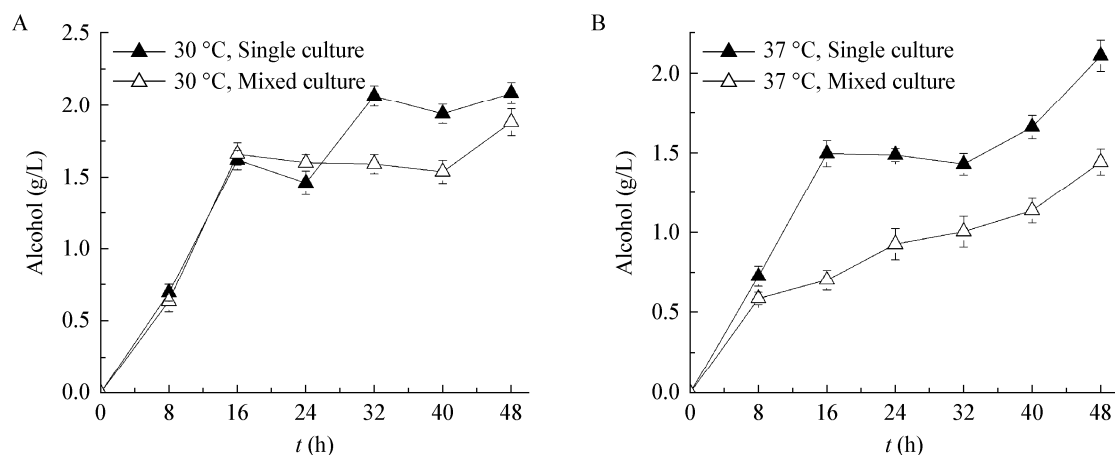


图 5 *Z. bailii* 15 纯培养、共培养产乙醇曲线

Figure 5 The ethanol production curve of *Z. bailii* 15 in single and mixed culture

注: A: 30 °C, *Z. bailii* 15 纯培养、共培养产乙醇曲线; B: 37 °C, *Z. bailii* 15 纯培养、共培养产乙醇曲线。

Note: A: At 30 °C, the ethanol production curve of *Z. bailii* 15 in single and mixed culture; B: At 37 °C, the ethanol production curve of *Z. bailii* 15 in single and mixed culture.

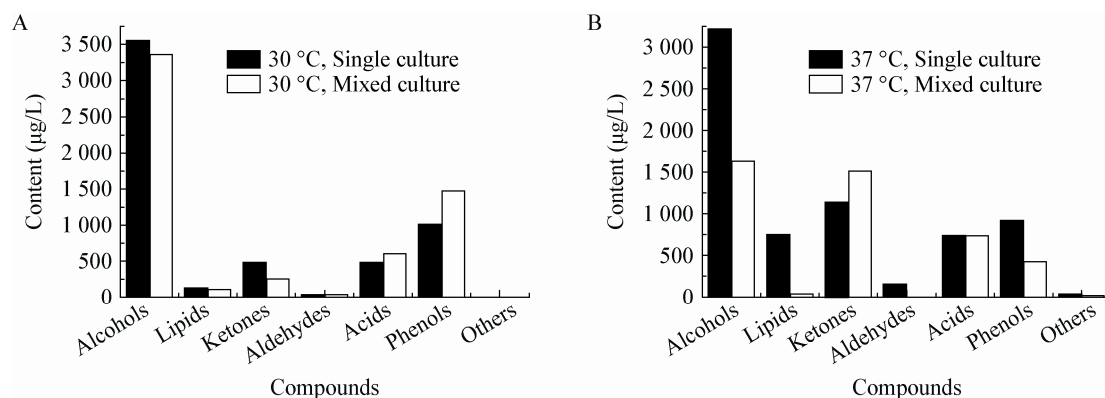


图 6 *Z. bailii* 15、MT6 纯培养与共培养下各种类风味物质含量

Figure 6 Content of various flavor compounds of *Z. bailii* 15 and MT6 in single and mixed culture

注: A: 30 °C, *Z. bailii* 15、MT6 纯培养与共培养下各种类风味物质含量; B: 37 °C, *Z. bailii* 15、MT6 纯培养与共培养下各种类风味物质含量。

Note: A: At 30 °C, content of various flavor compounds of *Z. bailii* 15 and MT6 in single and mixed culture; B: At 37 °C, content of various flavor compounds of *Z. bailii* 15 and MT6 in single and mixed culture.

总和略微下降(5 842.75  $\mu\text{g/L}$ )。其中总酚和总酸含量上升显著,总醇、总脂、总醛略微下降,而总酮含量下降明显。

部分物质为 *Z. bailii* 15 和 MT6 共同产生,无法确切区分共培养中各风味物质的生产主体,拟通过比较共培养风味与 *Z. bailii* 15、MT6 纯培养风味之和探索共培养相互作用影响。结合 PCA 分析(图 7), S1、S3 几乎重合,表明在 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下, MT6

纯培养风味不丰富,对两者风味之和贡献很小。从 S3、S4 可知,两者共培养对风味有一定影响,主要体现在醇类、脂类及酮类上。其中, *Z. bailii* 15 产 2-庚醇、 $\gamma$ -壬内酯、香叶基丙酮、2-庚酮、2-壬酮,受相互作用影响出现较大上升,含量分别上升 87.40%、15.63%、37.36%、31.78%、50.28%。此外,乙酸由 181.97  $\mu\text{g/L}$  上升为 340.03  $\mu\text{g/L}$ , 上升 86.85%; 苯酚含量由 35.71  $\mu\text{g/L}$  上升为 135.17  $\mu\text{g/L}$ ;

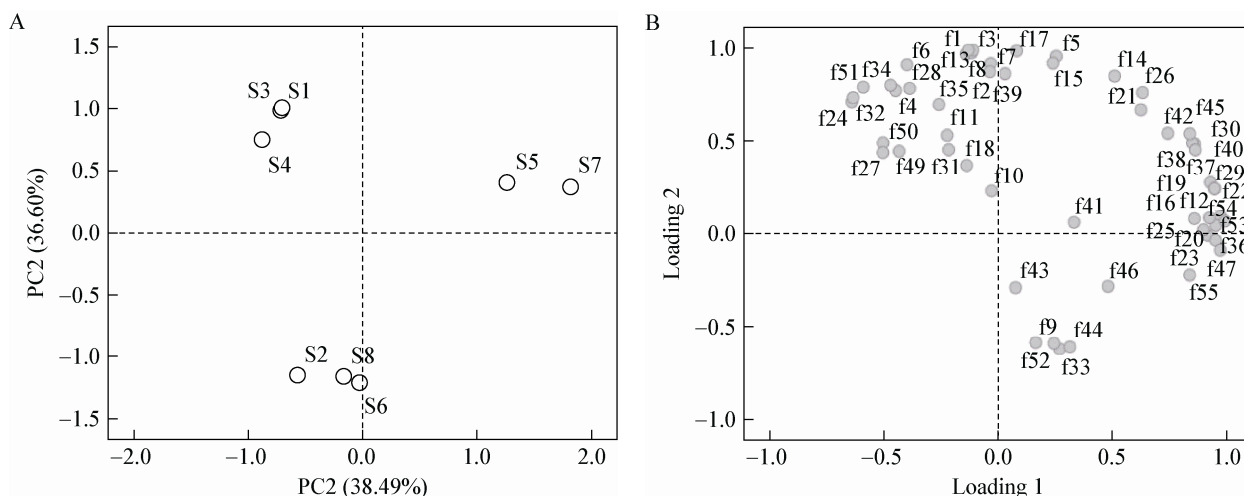


图 7 30  $^{\circ}\text{C}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  条件下, *Z. bailii* 15、MT6 纯培养与共培养风味 PCA 分析

Figure 7 PCA analysis of the flavor of *Z. bailii* 15 and MT6 in single and mixed culture at 30  $^{\circ}\text{C}$  and 37  $^{\circ}\text{C}$

注: A: 30  $^{\circ}\text{C}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  条件下, *Z. bailii* 15、MT6 纯培养与共培养风味数据的主成分分析; B: 30  $^{\circ}\text{C}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  条件下, *Z. bailii* 15、MT6 纯培养与共培养所有风味物质因子载荷图。S1: 30  $^{\circ}\text{C}$ , *Z. bailii* 15 纯培养风味; S2: 30  $^{\circ}\text{C}$ , MT6 纯培养风味; S3: 30  $^{\circ}\text{C}$ , *Z. bailii* 15、MT6 纯培养风味之和; S4: 30  $^{\circ}\text{C}$ , 共培养风味; S5: 37  $^{\circ}\text{C}$ , *Z. bailii* 15 纯培养风味; S6: 37  $^{\circ}\text{C}$ , MT6 纯培养风味; S7: 37  $^{\circ}\text{C}$ , *Z. bailii* 15、MT6 纯培养风味之和; S8: 37  $^{\circ}\text{C}$ , 共培养风味。f1: 异丁醇; f2: 2-甲基-1-丁醇; f3: 异戊醇; f4: 2-庚醇; f5: 正己醇; f6: 2-壬醇; f7: 2-乙基己醇; f8: 3-甲基-3-丁烯-1-醇; f9: 2,3-丁二醇; f10: 1-辛醇; f11: 1-壬醇; f12: 糠醇; f13:  $\beta$ -香茅醇; f14: 橙花醇; f15: 苯乙醇; f16: 十二醇; f17: 反式-橙花叔醇; f18: 苯甲醇; f19: 异丁酸己酯; f20: 己酸乙酯; f21: 乙酸异戊酯; f22: 庚酸乙酯; f23: 辛酸乙酯; f24: 壬酸乙酯; f25: 己酸己酯; f26: 乙酸苯乙酯; f27: 癸酸乙酯; f28: 十六酸乙酯; f29:  $\gamma$ -癸内酯; f30:  $\gamma$ -壬内酯; f31: 香叶基丙酮; f32: 2-庚酮; f33: 3-羟基-2-丁酮; f34: 2-壬酮; f35: 大马酮; f36: 壬醛; f37: 癸醛; f38: 苯甲醛; f39: 乙酸; f40: 丙酸; f41: 异丁酸; f42: 丁酸; f43: 2-甲基丁酸; f44: 4-甲基戊酸; f45: 苯甲酸; f46: 4-甲基己酸; f47: 庚酸; f48: 4-甲基苯酚; f49: 苯酚; f50: 愈创木酚; f51: 对乙烯基愈创木酚; f52: 2-甲氧基-4-甲基苯酚; f53: 2,4-二叔丁基苯酚; f54: 萘; f55: 苯并噻唑。

Note: A: Principal component analyses of the flavor of *Z. bailii* 15 and MT6 in single and mixed culture at 30  $^{\circ}\text{C}$  and 37  $^{\circ}\text{C}$ ; B: Loading plot for all of the compounds of *Z. bailii* 15 and MT6 in single and mixed culture at 30  $^{\circ}\text{C}$  and 37  $^{\circ}\text{C}$ . S1: 30  $^{\circ}\text{C}$ , flavor of *Z. bailii* 15 in single culture; S2: 30  $^{\circ}\text{C}$ , flavor of MT6 in single culture; S3: 30  $^{\circ}\text{C}$ , the sum of flavor of *Z. bailii* 15 and MT6 in single culture; S4: 30  $^{\circ}\text{C}$ , flavor in mixed culture; S5: 37  $^{\circ}\text{C}$ , flavor of *Z. bailii* 15 in single culture; S6: 37  $^{\circ}\text{C}$ , flavor of MT6 in single culture; S7: 37  $^{\circ}\text{C}$ , the sum of flavor of *Z. bailii* 15 and MT6 in single culture; S8: 37  $^{\circ}\text{C}$ , flavor in mixed culture. f1: 2-Methylpropanol; f2: 2-Methylbutanol; f3: 3-Methylbutanol; f4: 2-Heptanol; f5: 1-Hexanol; f6: 2-Nonanol; f7: 2-Ethyl-1-hexanol; f8: 3-Methyl-3-buten-1-ol; f9: 2,3-Butanediol; f10: 1-Octanol; f11: 1-Nonanol; f12: 2-Furanmethanol; f13:  $\beta$ -Citronellol; f14: Nerol; f15: 2-Phenylethanol; f16: 1-Dodecanol; f17: Trans-nerolidol; f18: Benzyl alcohol; f19: Hexyl 2-methylpropanoate; f20: Ethyl hexanoate; f21: 3-Methylbutyl acetate; f22: Ethyl heptanoate; f23: Ethyl octanoate; f24: Ethyl nonanoate; f25: Hexyl hexanoate; f26: 2-Phenylethyl acetate; f27: Ethyl decanoate; f28: Ethyl hexadecanoate; f29:  $\gamma$ -Decalactone; f30:  $\gamma$ -Nonanolactone; f31: Geranylacetone; f32: 2-Heptanone; f33: 3-Hydroxy-2-butanone; f34: 2-Nonanone; f35: Damascenone; f36: Nonanal; f37: Decanal; f38: Benzaldehyde; f39: Acetic acid; f40: Propanoic acid; f41: Isobutyric acid; f42: Butanoic acid; f43: 2-Methyl butyric acid; f44: 4-Methylpentanoic acid; f45: Benzoic acid; f46: 5-Methylhexanoic acid; f47: Heptanoic acid; f48: 4-Methylphenol; f49: Phenol; f50: Guaiacol; f51: 2-Methoxy-4-vinylphenol; f52: 2-Methoxy-4-methyl-phenol; f53: 2,4-Di-tert-butylphenol; f54: Naphthalene; f55: Benzothiazole.

愈创木酚由 294.54  $\mu\text{g/L}$  上升为 650.00  $\mu\text{g/L}$ , 均出现较大上升。其中,  $\gamma$ -壬内酯、香叶基丙酮、2-庚酮、愈创木酚等为重要的酱香贡献风味物质, 其含量的大幅上升有利于白酒品质。

如图 6B 所示, 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 共培养风味总量较 *Z. bailii* 15 和 MT6 纯培养风味总和出现下降, 由 6 941.07  $\mu\text{g/L}$  下降为 4 337.06  $\mu\text{g/L}$ 。其中总醇、总脂、总酚下降幅度均在 49% 以上, 而醛类则检测不到。此外, 总酮含量由 1 142.64  $\mu\text{g/L}$  上升 32.04% 至 1 508.70  $\mu\text{g/L}$ , 主要体现在 3-羟基-2-丁酮变化上, 其含量由 1 126.65  $\mu\text{g/L}$  上升为 1 503.93  $\mu\text{g/L}$ 。总酸含量虽几乎不变, 不同种类含量变化却很大, 其中, 2-甲基丁酸由 199.56  $\mu\text{g/L}$  上升为 443.97  $\mu\text{g/L}$ , 乙酸、4-甲基己酸、丁酸、苯甲酸等大幅下降。结合 PCA 分析(图 7), 从 S5、S7 位置看, 37  $^{\circ}\text{C}$  *Z. bailii* 15 纯培养风味远比 MT6 纯培养丰富。而共培养中, 从 S6、S8、S5 位置可以分析出共培养中 *Z. bailii* 15 对风味贡献很小, 说明 *Z. bailii* 15 受到明显抑制, 风味产量降低, 这一特征不利于白酒生产。该实验结果说明并非在所有条件下两菌株相互作用均能有利于白酒生产, 深入研究混菌相互作用机制并有目的地控制生产条件及菌群结构显得十分重要。

### 3 结论

通过各项生理代谢的系统性研究, 可以看出酱香酒酿造中 *Z. bailii* 15 具有高环境耐受力、高效发酵的特征, 并可产生多种挥发性风味物质。这些特征能很好地适应白酒酿造高温、高酸、高乙醇等胁迫因素, 并对白酒风味有积极贡献。其发酵产乙醇能力甚至与同一酒醅分离得到的优良酿酒酵母 MT1 相当, 结合生物量上的优势, 拜耳接合酵母在白酒酿造产酒精的贡献很可能比酿酒酵母更大。拜耳接合酵母一直被认为是腐败酵母, 而研究结果表明其在白酒酿造过程中则是不可或缺的功能菌株。酱香型白酒酿造过程中, 酵母与细菌的相互作用对白酒品质具有重要的控制作用。本文研究了产酒精优势菌株 *Z. bailii* 15 与产酱

香风味菌株地衣芽孢杆菌 MT6 两者相互作用机制。共培养体系中, MT6 对 *Z. bailii* 15 乙醇转化率具有明显促进作用。其中, 30  $^{\circ}\text{C}$  时, *Z. bailii* 15 抑制 MT6 生长, MT6 对 *Z. bailii* 15 风味多样性有积极贡献, 有利于白酒生产。而 37  $^{\circ}\text{C}$  时, MT6 抑制 *Z. bailii* 15 生长且风味产量降低。

本研究结果对拜耳接合酵母在白酒酿造过程中的功能地位提供了理论支持, 其与地衣芽孢杆菌 MT6 共培养结果对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十分有价值。同时, 对白酒生产实践中原料利用率和产酒率及酒质的提高、白酒体系的完善均有一定的贡献。

### 参考文献

- [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] Evans DG, Everis LK, Betts GD. Use of survival analysis and classification and regression trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, pH, sucrose, sorbate and temperature[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 92(1): 55-67
- [4] 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
- [5] 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
- [6] López-Malo A, Palou E. Modeling the growth/no-growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in mango puree[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(3): 516-520
- [7] Gliemmo MF, Campos CA, Gerschenson LN. Effect of several humectants and potassium sorbate on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* in model aqueous systems resembling low sugar products[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 77(4): 761-770
- [8] Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking[J]. FEMS Yeast Research, 2010, 10(2): 123-133
- [9] 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
- [10] Meng X, Wu Q, Xu Y. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus licheniformis* and interaction mechanisms based on proteomic analysis[J]. Microbiology China, 2015, 42(9): 1511-1518

- 1679-1688 (in Chinese)  
孟醒, 吴群, 徐岩. 酿酒酵母与地衣芽孢杆菌相互作用及基于蛋白组学的作用机制分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(9): 1679-1688
- [11] Cavazza A, Grando M, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini[J]. Vignevini, 1992, 19(9): 17-20
- [12] Wu Q, Ling J, Xu Y. Starter culture selection for making Chinese sesame-flavored liquor based on microbial metabolic activity in mixed-culture fermentation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(14): 4450-4459
- [13] Du LX, Lu FP. Microbiology Experiment Technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005: 365 (in Chinese)  
杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 365
- [14] Ausubel FM. Short Protocols in Molecular Biology[M]. Translated by Jin YX, Bao HZ, Zhao LY, et al. Beijing: Science Press, 2008: 7-9 (in Chinese)  
奥斯伯 FM. 精编分子生物学实验指南[M]. 金由辛, 包慧中, 赵丽云, 等译. 北京: 科学出版社, 2008: 7-9
- [15] Lu XW, Wu Q, Xu Y. Specific physiological characteristic of *Saccharomyces cerevisiae* in Chinese Maotai-flavor liquor making[J]. Microbiology China, 2015, 42(11): 2098-2107 (in Chinese)  
路晓伟, 吴群, 徐岩. 中国酱香型白酒酿造酿酒酵母的独特生理代谢特征[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2098-2107
- [16] Wang JL, Nie GX, Li SZ, et al. Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS method[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010(4): 115-118 (in Chinese)  
王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS 法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010(4): 115-118
- [17] Watanabe T, Watanabe I, Yamamoto M, et al. A UV-induced mutant of *pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1844-1848
- [18] Cao Z, Wan M, Sun LG, et al. Comparison of two methods of measuring the concentration of urea[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2010, 14(1): 135-136 (in Chinese)  
曹昭, 万敏, 孙陆果, 等. 两种尿素浓度测定方法的比较[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(1): 135-136
- [19] Chen LQ, Wu Q, Xu Y. Characteristics of low fusel alcohol yielded by *Schizosaccharomyces pombe* in Maotai-flavor quor-making[J]. Industrial Microbiology, 2013, 43(3): 1-6 (in Chinese)  
陈良强, 吴群, 徐岩. 酱香型白酒低产杂醇油粟酒裂殖酵母特性的研究[J]. 工业微生物, 2013, 43(3): 1-6
- [20] 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
- [21] Zong XY, Bian MH, Li L, et al. Regulation of higher alcohols in liquor production with biological agents added[J]. Food & Machinery, 2012, 28(4): 5-7, 46 (in Chinese)  
宗绪岩, 边名鸿, 李丽, 等. 生物制剂调控浓香型白酒高级醇产量[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 5-7, 46
- [22] Zhao XR, Du GC, Zou HJ, et al. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages[J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 32(2): 97-107
- [23] Fu ML, Liu J, Chen QH, et al. Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(6): 1297-1302
- [24] Wu XJ. Diversity and dynamics of yeasts and bacteria during the solid state fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavor liquor making[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)  
吴徐建. 酱香型白酒固态发酵过程中酵母与细菌群落结构变化规律的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013