

# 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵对白酒液态 发酵效率和风味物质的影响

唐洁<sup>1,2</sup> 王海燕<sup>1,2</sup> 徐岩<sup>1,2\*</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)  
(2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【目的】通过酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)在麸皮汁培养基中的混菌发酵,以增加发酵液的风味酯含量并保证发酵效率。【方法】采用两种酵母混合接种、顺序接种混菌发酵方式,以酵母单独接种发酵作对照,测定酵母的发酵性能和发酵液中乙酸乙酯含量,并对发酵结束时风味物质进行半定量;利用无细胞系统,分析两种酵母之间的相互作用。【结果】采用顺序接种混菌发酵方式,避免 *S. cerevisiae* 对 *P. anomala* 的生长竞争性抑制,使两种酵母均能获得较高的生物量;发酵结束时,乙醇浓度为 20.17 g/L,比酿酒酵母单菌种发酵时降低了 9.14%;但乙酸乙酯含量达到 0.74 g/L,比异常毕赤酵母单菌种发酵时提高了 80%;发酵液风味物质的测定结果表明,酿酒酵母与异常毕赤酵母的混合发酵能够形成更多的酯类物质,总酸和高级醇含量却相对较低,有效改善了发酵液的风味特性;在混菌发酵时,碳源是影响酿酒酵母繁殖的重要因素,但酵母的代谢物对异常毕赤酵母产生明显的抑制作用。【结论】混菌发酵,为丰富发酵产物的风味复杂性和增强风格的独特性提供了一条有效的途径。

**关键词:** 酵母, 混菌发酵, 白酒, 乙酸乙酯, 风味物质, 相互作用

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目(No. 2007BAK36B02, 2008BAI63B06); 江南大学食品科学与技术国家重点实验室目标导向课题(No. SKLF-MB-200801)

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

收稿日期: 2011-10-18; 接受日期: 2011-12-26

# Effect of mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala* on fermentation efficiency and flavor compounds in Chinese Liquor

TANG Jie<sup>1,2</sup> WANG Hai-Yan<sup>1,2</sup> XU Yan<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of the Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] To increase ester content and maintain fermentation performance, mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala* in wheat bran liquid medium were used. [Methods] *S. cerevisiae* and *P. anomala* were inoculated using mixed or sequential modes. Fermentation efficiency and the content of ethyl acetate during fermentation process, and volatile compounds in ultimate fermentation liquid were detected with pure culture of yeast as controls. Interactions between yeasts were preliminarily studied through cell-free systems. [Results] Using sequential inoculation, growth of *P. anomala* wasn't inhibited by *S. cerevisiae* and two species could reach high biomass. At the end of fermentation ethanol content was 20.17 g/L, which reduced 9.14% than pure culture of *S. cerevisiae*. But the concentration of ethyl acetate was 0.74 g/L, which increased 80% compared to *P. anomala* monoculture. The mixed fermentation of *S. cerevisiae* and *P. anomala* produced more esters, less alcohols and fatty, and improved flavor characteristics of fermentation liquid. Analysis of cell-free system showed that carbon source was an important factor to affect growth of *S. cerevisiae* and metabolites obviously inhibited propagation of *P. anomala*. [Conclusion] Mixed fermentations of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* provided a feasible way to improve flavor complexity and obtain specific characteristics of fermentation products.

**Keywords:** Yeast, Mixed fermentation, Chinese liquor, Ethyl acetate, Flavor compound, Interaction

传统固态白酒的发酵是一个复杂的多种微生物生物转化的过程, 酵母在其中起着重要作用。根据酵母的作用, 大致可将酵母分成两大类。一类是 *Saccharomyces cerevisiae*, 主要完成酒精发酵, 具有较高的发酵速率和完全的发酵能力。另一类是 non-*Saccharomyces*, 虽然其发酵效率较低, 但能够合成多种酶, 将原料中的前体物质转换成风味物质如酯、酸、高级醇和醛等产物, 对发酵食品风味、质地和色泽的形成有着重要的作用。并且还能抑制发酵过程中一些腐败微生物的繁殖<sup>[1-3]</sup>。与单独培养相比, 酵母的混菌发酵, 能

表现出更好的特性。它们或者代谢产生、增强一些有益的风味化合物如苯乙醇、乙酸苯乙酯等, 或者降解某些异味物质如乙酸、乙醛等, 或者促进酵母的代谢性能, 从而最终改变发酵产物的风味特征<sup>[4-5]</sup>。所以将酿酒酵母和非酿酒酵母共同作为发酵起始菌种, 为丰富发酵产物的风味复杂性和增强风格的独特性提供了一条有效的途径<sup>[6-7]</sup>。在详细剖析葡萄酒发酵中的微生物组成后, 研究的热点之一就是酿酒酵母与非酿酒酵母组合发酵中酵母之间的相互影响和代谢产物的差异分析。

白酒生产具有自身特殊的原料、工艺和微环境,需要重新认识白酒中酿酒酵母与非酿酒酵母在生理和代谢水平上的相互作用。已发现的非酿酒酵母主要包括 *Pichia*、*Saccharomycopsis*、*Issatchenkia*、*Candida*、*Hanseniaspora*<sup>[8]</sup>。毕赤类酵母是主要的产酯酵母,对白酒的风味有重要贡献。其中,*Pichia anomala* 是白酒中普遍存在的菌种。异常毕赤酵母能耐受低 pH、低水活度、高渗透压、厌氧等极端环境。相比有氧,限氧条件不仅能够诱导异常毕赤酵母进行酒精发酵,激活发酵途径中的关键酶,而且对葡萄糖的吸收率和乙醇、甘油、乙酸乙酯等代谢物含量都有所增加<sup>[9-10]</sup>。国内学者虽然对酵母的产酯作用进行了诸多研究,但主要针对实验室条件下单菌种的优化<sup>[11]</sup>,在酿酒环境中酵母产酯和酒精发酵的相互影响及协调作用研究很少。虽然白酒生产是固态发酵,但在实验室条件下模拟白酒固态发酵工艺,存在着发酵、菌体生长、营养物的吸收和代谢产物的分泌在各处的不均匀性,以及明显的浓度梯度及传热、传质困难,使得发酵参数的检测和控制比较困难。因此本研究尝试在限氧条件下先实现酿酒酵母和异常毕赤酵母的混菌液态发酵,实现不同种属酵母的组合发酵,并初步分析两株酵母之间的相互作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)为本实验室从酒醅中分离到的菌株,两株菌采用麦芽汁琼脂培养基斜面保养。

**1.1.2 培养基:** 种子培养基为麦芽汁培养基;发酵培养基为麸皮汁培养基<sup>[12]</sup>。

**1.1.3 试剂及药品:** 2-辛醇(2-Octanol)、4-甲基-2-戊醇(4-Methyl-2-pentanol)购自 Sigma 公司。其他

试剂均为国产色谱纯或分析纯,购于上海生工生物工程公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 液态发酵方式:** 将异常毕赤酵母和酿酒酵母单独接种麸皮汁培养基,摇瓶培养 1 d 后,按  $10^7$  CFU/mL 接种量接入 100 mL 麸皮汁培养基中于 30 °C 静置培养 6 d。两株酵母混合发酵是采用两种方式接种:①分别单独液态培养 1 d 后,按照 1:1 比例接种(混合接种);②根据两种酵母的生长曲线,由于异常毕赤酵母生长较为缓慢,需要近 10 h 才能达到与酿酒酵母相同的生长量。故麦芽汁培养基中先接种异常毕赤酵母,培养 10 h,再接入酿酒酵母(顺序接种)。种子液摇瓶培养 1 d 后,按  $10^7$  CFU/mL 接种量接入麸皮汁培养基于 30 °C 培养箱中恒温静置培养 6 d。每隔 24 h 取样,测定不同培养方式下发酵液的理化指标、酵母的发酵性能和产酯能力,跟踪发酵过程中两种酵母数量变化趋势;并检测发酵结束时发酵液的风味物质。

**1.2.2 发酵液理化指标的测定:** pH 测定采用 METTLER TOLEDO pH 计,还原糖采用 DNS 法测定<sup>[13]</sup>。发酵结束后发酵液中乙醇、葡萄糖用 HPLC 测定<sup>[14]</sup>。乙醇理论转化率=乙醇浓度/(0.51×还原糖浓度)×100%,其中糖转换为乙醇的换算系数为 0.51<sup>[15]</sup>。

**1.2.3 酵母计数:** 因为两种酵母在 YPD 平板上的形态不同,直接采用稀释涂布 YPD 平板测定发酵过程中两种酵母的数量变化。

**1.2.4 酵母发酵性能:** 采用 CO<sub>2</sub> 失重法。每隔 24 h 称重一次,直至发酵结束。

**1.2.5 乙酸乙酯的检测:** 采用液-液微萃取法提取和气相色谱-氢火焰离子化检测器(GC-FID)定量分析。取 5 mL 发酵液于离心管中,加入 5 μL 内标(2-辛醇)溶液和 500 μL 乙醚。充分混匀后静置分层,取有机相进行分析(仪器为安捷伦 6890N

气相色谱仪配有氢火焰离子化检测器 FID)。色谱条件见文献[16]。

**1.2.6 发酵液中风味物质的分析:** 运用顶空固相微萃取技术 (HS-SPME) 和气相色谱-质谱 (GC-MS) 方法分析。样品处理方法及 GC-MS 分析条件见文献[17]。

**1.2.7 无细胞滤液对酵母生长的影响:** 麸皮汁中发酵 4 d 酵母发酵液, 离心收集上清, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔膜过滤除菌获得无细胞滤液<sup>[18]</sup>。在无细胞滤液中添加等体积的葡萄糖溶液和新鲜麸皮汁培养基。将培养好的酵母( $10^7$  CFU/mL)接入上述培养基中, 于 30  $^{\circ}\text{C}$  静置培养 24 h 后测  $OD_{600}$ 。对照分别为酵母接入不接种麸皮汁培养基+新鲜麸皮汁培养基(1:1)和不接种麸皮汁培养基+葡萄糖溶液(1:1)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酵母数量的动态变化及发酵性能的测定

发酵过程中酵母总数的动态变化见图 1。发酵前 48 h, 酵母处于快速生长阶段, 在 48–96 h 保持较高数量, 此后数量缓慢减少。酿酒酵母和异常毕赤酵母单菌种培养时细胞数可达到  $1.6 \times 10^8$  CFU/mL 和  $8.3 \times 10^7$  CFU/mL, 而混菌发酵时细胞量最大也能达到  $10^8$  CFU/mL。毕赤酵母单独培养时细胞数一直位于最低水平。混菌发酵时, 由于酿酒酵母的存在, 体系中酵母总数很快达到较高水平。

混菌发酵过程中两种酵母数量的动态变化过程见图 2。顺序接种混菌培养时异常毕赤酵母数量始终高于混合接种混菌培养, 而酿酒酵母情况却相反。由于混菌发酵时两种酵母竞争利用碳源, 酿酒酵母优先利用葡萄糖而迅速增殖, 异常毕赤酵母营养不足导致生长缓慢, 故混合接种时酿酒酵母数量较高。当异常毕赤酵母先单独培养时, 没有竞争压力, 生长到一定的生物量后再接入酿

酒酵母, 使两种酵母共同繁殖, 获得较高的细胞水平。所以, 顺序接种时异常毕赤酵母数量较高。这与葡萄酒中酿酒酵母与非酿酒酵母混菌发酵的结果相一致<sup>[19]</sup>。此外, 当两种酵母在同一体系中共同发酵时, 由于营养物质和生存空间的限制, 各自的最大生物量都低于单菌种培养的水平<sup>[19–20]</sup>。

普遍认为在与酿酒酵母混合发酵时, 非酿酒酵母会抑制酿酒酵母的发酵性能<sup>[20]</sup>。混菌发酵的结果也验证了这一观点。如图 3 所示, 顺序接种混合发酵时异常毕赤酵母的存在, 主要是降低了起始阶段的发酵速度, 48 h 后发酵速度恢复到单

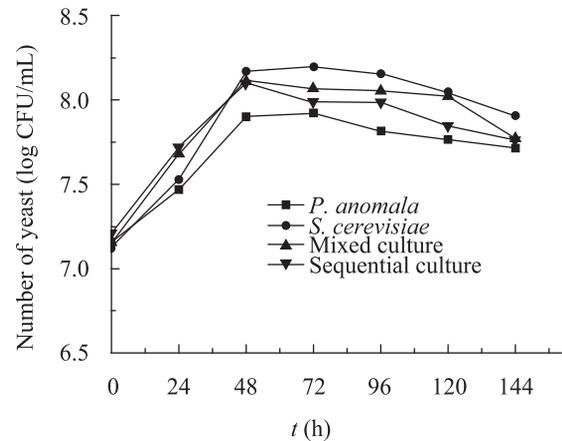


图 1 不同培养方式下酵母活细胞总数的变化

Fig. 1 Total counts of yeast in different fermentations

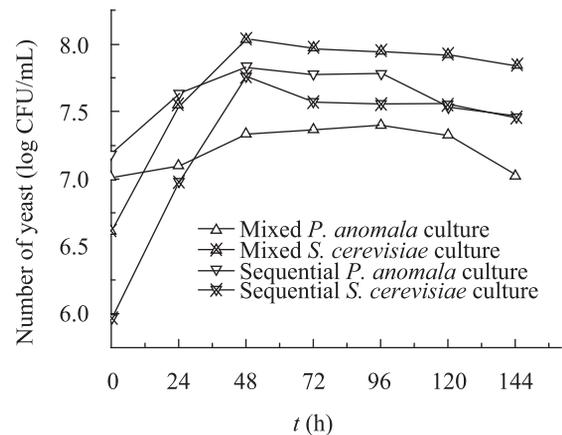


图 2 不同培养条件下混菌发酵过程中酵母动态变化

Fig. 2 Yeast quantity in mixed culture using different inoculating methods

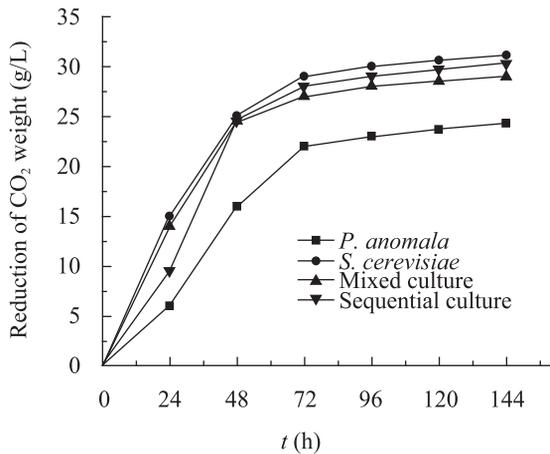


图3 酵母发酵曲线

Fig. 3 Fermentation curves of yeasts

菌种的水平。而混合接种发酵整个系统的发酵能力与酿酒酵母单菌种培养相近, CO<sub>2</sub> 失重两者之差不超过 2 g。

单菌种培养与混菌发酵中乙酸乙酯浓度的变化规律见图 4。发酵 48 h 时乙酸乙酯含量都达到峰值, 最高为 1.5 g/L (顺序混菌接种)。酿酒酵母产酯能力很弱, 发酵液中乙酸乙酯浓度始终低于 0.05 g/L。由于混合接种混菌发酵中异常毕赤酵母的数量偏低, 所以发酵液中乙酸乙酯也较低。虽然顺序接种混菌发酵中异常毕赤酵母数量低于该酵母单菌种培养, 但发酵后期前者发酵液中乙酸乙酯含量更高。这可能是由于酿酒酵母的存在, 提高了发酵液中乙醇浓度, 促进非酿酒酵母的酯合成活性<sup>[21]</sup>。根据发酵体系重要的功能参数——发酵力和乙酸乙酯含量判断, 顺序接种混菌发酵方式中两种酵母都能达到较高的生物量, 完成酒精发酵, 合成了大量的乙酸乙酯。

## 2.2 发酵过程理化指标动态变化

发酵过程中发酵液 pH 的变化如图 5A 所示。发酵 1 d 时 pH 急剧下降, 2-3 d 中 pH 值逐步上升, 此后基本维持不变。单菌种与混菌发酵 pH 值的变化趋势一致。发酵初期酵母形成乙酸等酸性物质, 导致 pH 的降低。经过初期的繁殖, 酵母转入酒精发酵阶段, 其分泌的蛋白酶水解蛋白质生成

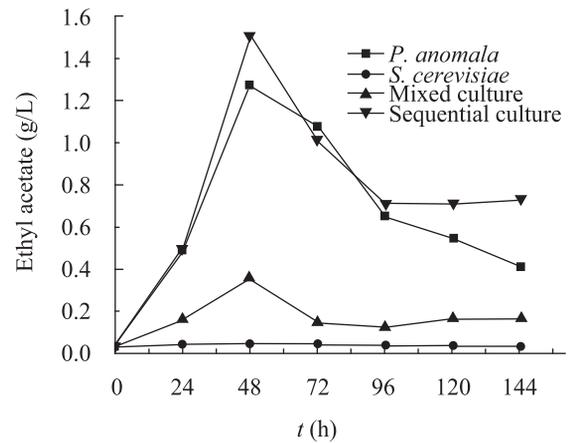
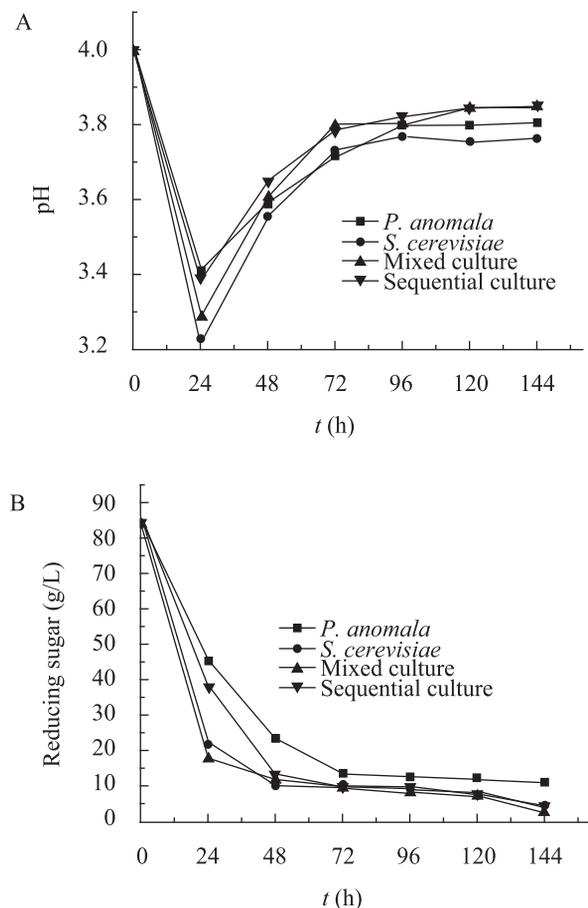


图4 发酵液中乙酸乙酯含量的变化

Fig. 4 Concentration of ethyl acetate under different culturing methods

图5 液态发酵过程中 pH (A) 及还原糖含量的变化 (B)  
Fig. 5 Change of pH (A) and reducing sugar during the liquid fermentation (B)

氨基酸, 氨基酸脱氨作用生成  $\text{NH}_3$ 。并且发酵液中酒精浓度不断上升, 造成 pH 值的上升<sup>[22]</sup>。发酵结束时, 两种混菌方式和单菌种发酵各自 pH 值变化不大。还原糖是判断酵母生长的重要指标。由图 5B 可见, 酵母的生长需利用还原糖, 还原糖含量迅速下降。发酵 48 h 时, 混菌发酵和酿酒酵母单独培养时发酵液中还原糖含量已降至 10 g/L 左右。而异常毕赤酵母单独培养时, 生长速度缓慢, 需发酵 72 h 后还原糖才降至 10 g/L 左右。随后, 酵母数量缓慢减少, 还原糖含量趋于平稳。

### 2.3 发酵产物相关指标分析

发酵 6 d 后, 比较了混菌与单菌种发酵时相关理化指标的差异。由表 1 可知, 异常毕赤酵母单独培养时乙醇含量较低, 乙酸乙酯含量为 0.41 g/L; 酿酒酵母发酵液中乙醇浓度为 22.20 g/L, 乙酸乙酯浓度仅有 0.03 g/L。所以, 异常毕赤酵母与酿酒酵母分别具有较好的产酯和酒精发酵能力。

组合两种酵母进行混菌发酵, 影响了整体的酯合成和酒精发酵水平。从残糖和葡萄糖浓度可以看出, 混菌发酵时酵母对糖的利用程度与酿酒酵母相当。虽然顺序接种混菌发酵的乙醇浓度和理论转化率比酿酒酵母单独培养时降低了约 10%, 但乙酸乙酯产量增加显著, 比异常毕赤

母纯种发酵时乙酸乙酯含量提高了近 80%。因此, 顺序接种混菌发酵保证了发酵的可行性。

### 2.4 发酵液中风味物质的分析

酵母在发酵过程中能代谢产生一些次级代谢产物, 如高级醇类、酸、酯等, 这些物质对白酒的风味具有重要的贡献作用。因此, 用 GC-MS 测定了发酵液中主要的风味物质。测定结果见表 2 (因检测到的醛、酮类物质含量极低, 数据未列出)。

酸类物质中以乙酸为主。乙酸是非酿酒酵母代谢的副产物, 含量过高会形成异味<sup>[23]</sup>。异常毕赤酵母单独培养时产生的乙酸含量最多, 是酿酒酵母的 3.25 倍。乙酸是合成酯的前体物质, 混菌时异常毕赤酵母能将较多的酸转化成酯。所以, 混菌发酵有效地减少了乙酸浓度。

高级醇主要是酵母繁殖的过程中形成的, 酿酒酵母合成高级醇的能力强于非酿酒酵母。单菌种培养时, 酿酒酵母产生的高级醇是异常毕赤酵母的 2.43 倍。与酿酒酵母单独培养时相比, 混合接种发酵时高级醇含量提高了 28%。推测可能是非酿酒酵母在发酵后期的自溶, 为酿酒酵母提供营养物质。或者非酿酒酵母具有某些酶活, 能够为酿酒酵母提供营养来源<sup>[23]</sup>。但顺序接种发酵的高级醇含量却降低了 31%。这不仅与发酵体系中醇

表 1 酿酒酵母和异常毕赤酵母混菌发酵相关酿造指标分析  
Table 1 Brewing indexes of multistarter fermentation of *S. cerevisiae* and *P. anomala*

培养方式 Culture method	残糖 Residual sugar (g/L)	葡萄糖 Glucose residue (g/L)	pH	乙醇 Ethanol (g/L)	乙酸乙酯 Ethyl acetate (g/L)	理论转换率 Theoretical yield of ethanol (%)
酿酒酵母纯培养 Pure <i>S. cerevisiae</i>	4.38±0.5	0.16±0.03	3.76	22.20±0.1	0.03	54
异常毕赤酵母纯培养 Pure <i>P. anomala</i>	11.02±2.0	0.24±0.02	3.80±0.07	11.97±0.9	0.41±0.04	32
混合培养 Mixed culture	2.52±0.3	0.11±0.01	3.85±0.01	19.77±0.2	0.17±0.02	47
顺序培养 Sequential culture	4.42±0.4	0.18±0.09	3.90±0.04	20.17±0.2	0.74±0.08	50

表 2 不同发酵方式对酵母产生主要挥发性风味化合物的影响  
Table 2 Volatile compounds at the end of the different fermentations (mg/L)

组分 Group	化合物 Compound	异常毕赤酵母单菌株 Single <i>P. anomala</i>	酿酒酵母单菌株 Single <i>S. cerevisiae</i>	混合发酵 Mixed culture	顺序发酵 Sequential culture
酸类 Acid	乙酸	2.99±0.01	0.92±0.03	2.02±0.18	1.48±0.37
	辛酸	0.10±0.01	2.06±0.03	1.88±0.15	0.06±0.00
	己酸	0.48±0.02	0.36±0.04	0.23±0.01	0.02±0.00
总和 Subtotal		3.57±0.04	3.34±0.12	4.13±0.35	1.56±0.40
高级醇类 Higher alcohol	苯乙醇	5.35±0.10	12.15±0.13	12.73±0.74	9.07±0.54
	异戊醇	1.28±0.17	3.68±0.10	7.47±0.73	1.81±0.57
	异丁醇	0.20±0.01	0.79±0.05	0.83±0.07	0.64±0.03
总和 Subtotal		6.83±2.32	16.62±0.21	21.03±1.72	11.52±1.17
酯类 Ester	乙酸乙酯	12.09±1.71	2.88±0.28	19.25±0.98	21.72±4.11
	乙酸苯乙酯	1.52±0.01	0.90±0.02	4.09±0.10	4.23±0.01
	己酸乙酯	5.74±0.65	4.00±0.02	4.36±0.71	9.66±0.70
	辛酸乙酯	3.77±0.07	2.68±0.04	2.20±0.56	1.65±0.05
	乙酸异戊酯	0.41±0.06	0.04±0.01	0.59±0.08	0.73±0.27
	庚酸乙酯	1.11±0.08	0.64±0.02	0.50±0.26	0.68±0.11
	棕榈酸乙酯	0.84±0.25	0.67±0.12	0.85±0.14	0.52±0.19
	癸酸乙酯	0.09±0.01	1.64±0.22	3.25±0.12	0.21±0.02
	丁酸乙酯	0.13±0.04	0.09±0.03	0.09±0.01	0.05±0.03
	苯丙酸乙酯	0.10±0.02	0.05±0.01	0.07±0.01	0.06±0.02
	戊酸乙酯	0.08±0.02	0.03±0.00	0.04±0.00	0.06±0.00
苯乙酸乙酯	0.04±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	
总和 Subtotal		25.91±2.02	13.66±0.76	35.32±1.68	39.59±4.50

母的数量有关,而且可能是由于非酿酒酵母将高级醇转化成酯类物质<sup>[24]</sup>。

发酵液中酯类物质主要是醋酸酯和乙酯,它们都是白酒中重要的风味物质。酿酒酵母发酵产生了较多的乙醇,异常毕赤酵母以酯酶合成途径将醇和酸转化为酯<sup>[21]</sup>。所以混合发酵中总酸和高级醇含量都相对较低,酯类相对较高。4种发酵液中检测出的主要醋酸酯为乙酸乙酯和乙酸苯乙酯,异常毕赤酵母纯种发酵、酿酒酵母纯种发酵、顺序接种混合发酵和混合接种混菌发酵中乙酸酯总和分别占相应总酯含量的52.53%、

27.67%、66.08%和65.55%。相比单菌种发酵,混菌发酵有效地提高了发酵液中醋酸酯。发酵体系中有有机酸含量低,使得混菌和单菌种发酵时其他乙酯类的含量都偏低。

## 2.5 无细胞系统酵母菌相互影响观察

在混菌发酵时,酵母会竞争利用有限的营养物质(主要是碳源),也会分泌代谢产物抑制或诱导其他真菌的死亡<sup>[10,25]</sup>。鉴于碳源和代谢物对酵母的抑制作用,将酵母菌株培养在麸皮汁/葡萄糖溶液+酵母无细胞滤液中,以无细胞滤液/对照组的生长相对值来表示酵母生长受抑制的程度。

表3 酵母在无细胞滤液中生长受抑制程度  
Table 3 Growth suppression by addition of cell free filtrate

培养基 Culture medium	相对值(酿酒酵母) Relative value ( <i>S. cerevisiae</i> )	相对值(异常毕赤酵母) Relative value ( <i>P. anomala</i> )
酿酒酵母培养滤液+葡萄糖 1:1 mixture of glucose solution and the cell-free culture filtrate of <i>S. cerevisiae</i>	0.99±0.05	0.74±0.04
异常毕赤酵母培养滤液+葡萄糖 1:1 mixture of glucose solution and the cell-free culture filtrate of <i>P. anomala</i>	0.98±0.01	0.75±0.03
酿酒酵母培养滤液+麸皮汁 1:1 mixture of wheat bran medium and the cell-free culture filtrate of <i>S. cerevisiae</i>	0.86±0.01	0.73±0.03
异常毕赤酵母培养滤液+麸皮汁 1:1 mixture of wheat bran medium and the cell-free culture filtrate of <i>P. anomala</i>	0.91±0.01	0.82±0.02

由表3可知,在无细胞滤液中添加麸皮汁时,酿酒酵母的生长受到一定程度的抑制;但添加葡萄糖溶液时,基本未表现出抑制效应。说明两种酵母的代谢产物对酿酒酵母都无生长抑制作用,碳源是影响酿酒酵母繁殖的重要因素。而对于异常毕赤酵母,不管是添加麸皮汁还是葡萄糖,该酵母都受到了无细胞滤液的抑制,且抑制程度处于相似水平。因此,代谢物抑制作用是影响异常毕赤酵母生长的主要因素。

### 3 结论与展望

本实验在限氧条件下以谷物为培养基,采用酿酒酵母与异常毕赤酵母的混合发酵,分析其对发酵效率和风味物质的影响。异常毕赤酵母易受自身和酿酒酵母代谢物的抑制,生长较为缓慢。故混菌发酵时采用顺序接种混菌培养,使异常毕赤酵母先开始繁殖,削弱了代谢抑制作用,使异常毕赤酵母生长速率提高,此后再接种酿酒酵母。由于酵母之间对营养物质和生存空间的竞争性利用和酵母代谢产物的抑制作用,导致两株酵母生物量都未达到各自纯培养时的水平。但发酵

结束时,整体发酵水平下降不到10%,乙酸乙酯含量提高了80%。因此,混菌发酵时虽然酵母数量减少,但细胞代谢活性却增加。混合发酵时,酿酒酵母增加了发酵液中乙醇含量,底物浓度的增加随之促进了酯的合成。发酵结束时风味物质的测定结果表明,顺序接种混菌发酵能有效地利用发酵液中的酸类物质和高级醇,合成更多的酯类化合物。

葡萄酒发酵过程中,在起始阶段存在较高数量的 *Non-Saccharomyces*,此后酿酒酵母开始繁殖。酿酒酵母产生蛋白类代谢物抑制 *Non-Saccharomyces* 的生长, *Non-Saccharomyces* 的数量迅速下降<sup>[25]</sup>。但模拟白酒生产条件进行酵母的混合发酵时,酿酒酵母主要是抑制了起始异常毕赤酵母的生长,发酵过程中异常毕赤酵母仍能维持较高水平,直至发酵结束。因此,长期白酒环境的驯化、以及不同的原料和发酵条件可能改变了酵母的生长、代谢特性,白酒中酵母的相互作用具有自身的特殊性,需要进行深入的探索。

综上所述,将酿酒酵母与非酿酒酵母进行混菌发酵,在保证酵母酿造性能不变的前提下,对

于提高发酵产品的风味特征具有明显的作用。酵母之间的生长抑制和微量组分协同合成作用, 将影响发酵过程中酵母的生长性能和产品的风格特征。酵母的相互作用为工业条件的优化提供了依据。

## 参 考 文 献

- [1] Gobbi M, Comitini F, Domizio P, et al. Non-*Saccharomyces* yeasts in controlled mixed culture fermentation in winemaking: the role of metabolic interactions[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(Suppl 1): 299–300.
- [2] Ciani M, Comitini F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking[J]. *Annals of Microbiology*, 2011, 61(1): 25–32.
- [3] Querol A, Fleet GH. *Yeasts in Food and Beverages*[M]. Germany: Springer, 2006: 1–9.
- [4] Viana F, Gil JV, Vallés S, et al. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 135(1): 68–74.
- [5] Sáez JS, Lopes CA, Kirs VC, et al. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(2): 170–176.
- [6] Bader J, Mast-Gerlach E, Popovic MK, et al. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2): 371–387.
- [7] 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.
- [8] Wang HY, Gao YB, Fan QW, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqu by PCR-DGGE[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 53(2): 134–140.
- [9] Passoth V, Fredlund E, Druvefors UÅ, et al. *Biotechnology, physiology and genetics of the yeast Pichia anomala*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6(1): 3–13.
- [10] Walker GM. *Pichia anomala: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2011, 99(1): 25–34.
- [11] 刘源才, 郭圣祥, 李锐利, 等. 高产乙酸乙酯酵母的产酯条件研究[J]. *食品与发酵科技*, 2011, 47(2): 22–24.
- [12] 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.
- [13] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 534–536.
- [14] 汪伦记, 董英. 粟酒裂殖酵母发酵菊芋生产燃料乙醇试验[J]. *农业机械学报*, 2010, 41(1): 106–109.
- [15] Mendoza LM, de Nadra MCM, Farías ME. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(7): 1057–1063.
- [16] 陈双, 罗涛, 徐岩, 等. 我国黄酒酵母和酿酒原料对黄酒中拾 $\beta$ -苯乙醇含量的影响[J]. *中国酿造*, 2009(4): 23–26.
- [17] Mo XL, Fan WL, Xu Y. Changes in volatile compounds of Chinese Rice Wine Wheat Qu during fermentation and storage[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2009, 115(4): 300–307.
- [18] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, et al. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 56(3): 403–411.
- [19] Andorrà I, Berradre M, Rozès N, et al. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(2): 215–224.

- [20] Ciani M, Beco L, Comitini F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 108(2): 239–245.
- [21] Kurita O. Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(4): 1051–1058.
- [22] 金耀光. 黄酒酿造酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 酿造特性的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008.
- [23] Lee PR, Ong YL, Yu B. Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*[J]. Food Microbiology, 2010, 27(7): 853–861.
- [24] Moreira N, Mendes F, de Pinho PG, et al. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(3): 231–238.
- [25] Albergaria H, Francisco D, Gori K, et al. *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(3): 965–972.

## 2012年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	生物发酵床养殖技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	3月	80	广东深圳	刘雪 蓝江林 059187308117
2	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专委会委员会议暨学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	4月20-22日	150	重庆	饶贤才 023-68752240
3	第12届中日韩国际酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	5月28-31日	200	日本	金城 010-64807425
4	第三届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	5月底6月初	150	安徽黄山	吕相征 lvxz@cnis.gov.cn
5	中日国际病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	6月11-12日	100	日本札幌	梁华 010-58900644
6	微生物生物安全专业委员会成立大会暨学术讨论会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	6月	60	北京	谢清 010-64806013
7	第九届全国微生物学青年学者学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7月	180	湖北武汉	何正国 hezheng-guo@mail.hzau.edu.cn
8	第四届全国农业微生物研究及产业化研讨会暨第十三届全国杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7月	300	贵州贵阳	刘作易 liuzuoyi@yahoo.com.cn
9	EV71等新疫苗质量研讨会	中国微生物学会生物制品专业委员会	7月	200	待定	徐苗 李冠民 01067095438
10	第三届全国农业生物资源与环境调控学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7-8月	120	内蒙古呼伦贝尔盟	张国良 付卫东 01082109570
11	第四届全国微生物基因组学学术研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	8月	200	山东济南	李越中 lilab@sdu.edu.cn
12	病原微生物功能基因组及其致病机制	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	8月	200	福建福州	汪世华 0591-87984471