

研究报告

酱香型白酒发酵中两株主要乳酸菌对酿造微生物群体的影响

张艳 杜海 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 酿酒科学与酶技术中心 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】研究从酱香型白酒发酵酒醅中分离得到的 2 株主要乳酸菌 *Lactobacillus homohiochii* XJ-L1 和 *Lactobacillus buchneri* XJ-L2 对酱香型白酒发酵中酿造微生物群体的作用, 并探索该种相互作用对酱香型白酒品质的影响。【方法】结合抑菌实验和组合发酵实验研究 *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 对酿造微生物群体生长的影响, 通过对纯培养和共培养体系中代谢物的比较, 研究 2 株优势乳酸菌对主要酿造酵母风味相关代谢产物的影响。【结果】*L. buchneri* XJ-L2 能够抑制 3 株芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* XJ-B1, *Bacillus subtilis* XJ-B2, *Bacillus licheniformis* XJ-B3)、5 株霉菌(*Aspergillus oryzae* XJ-M1, *Aspergillus niger* XJ-M2, *Aspergillus flavus* XJ-M3, *Aspergillus albicans* XJ-M4, *Rhizopus oryzae* XJ-M5)、2 株酵母(*Schizosaccharomyces pombe* XJ-Y4, *Geotrichum candidum* XJ-Y5)的生长; *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 能够促进 3 株主要酵母(*Saccharomyces cerevisiae* XJ-Y1, *Zygosaccharomyces bailii* XJ-Y2, *Pichia galeiformis* XJ-Y3)的生长, 同时促进其酸类、醇类、酯类等风味物质的代谢。【结论】*L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 可促进 3 株主要酵母的生长代谢, 同时 *L. buchneri* XJ-L2 明显抑制细菌、霉菌和少数酵母的生长, 以此促进和维持主要酵母在酱香型白酒发酵过程中的生态地位, 从而影响酒中酸类、醇类、酯类等风味物质的形成, 保证酱香型白酒的品质。因此, 适当比例的乳酸菌对维持酿造微生物区系平衡, 生产典型酱香品质白酒具有重要意义。

关键词: 乳酸菌, 酱香型白酒, 微生物群体, 白酒风味

Impacts of two main lactic acid bacteria on microbial communities during Chinese *Maotai*-flavor liquor fermentation

ZHANG Yan DU Hai WU Qun XU Yan*

(The 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] Objectives of this study were to investigate the impacts of two major lactic acid bacteria (*L. homohiochii* XJ-L1 and *L. buchneri* XJ-L2) on the microbial communities and flavor quality of Chinese *Maotai*-flavor liquor. [Methods] Bacteriostatic tests *in vitro* and mixed culture

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021301, 2013AA102108); 国家自然科学基金项目(No. 31271921, 31000806, 31371822); 2011 协同创新计划

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

收稿日期: 2015-02-03; 接受日期: 2015-04-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-24

fermentation were carried out to investigate the interactions between main lactic acid bacteria and the other major microorganisms during fermentation. **[Results]** *L. buchneri* XJ-L2 could inhibit the growth of three *Bacillus* strains (*B. amyloliquefaciens* XJ-B1, *B. subtilis* XJ-B2, *B. licheniformis* XJ-B3), five mold strains (*A. oryzae* XJ-M1, *A. niger* XJ-M2, *A. flavus* XJ-M3, *A. albicans* XJ-M4, *R. oryzae* XJ-M5) and two yeasts (*Sc. pombe* XJ-Y4, *G. candidum* XJ-Y5). *L. homohiochii* XJ-L1 and *L. buchneri* XJ-L2 could promote the growth of three main yeasts (*S. cerevisiae* XJ-Y1, *Z. bailii* XJ-Y2, *P. galeiformis* XJ-Y3), and benefited for the production of acids, alcohols, esters etc. **[Conclusion]** The two main lactic acid bacteria, *L. homohiochii* XJ-L1 and *L. buchneri* XJ-L2, could maintain the ecological status of the main yeasts in the fermentation process through promoting the growth of three main yeasts and inhibiting *bacillus*, mold and few yeasts (*L. buchneri* XJ-L2 was more obvious). In addition, lactic acid bacteria affected the formation of acids, alcohols, esters and other flavor compounds and benefited for *Maotai*-flavor liquor fermentation. The appropriate proportion of lactic acid bacteria could enhance the balance of fermentation microflora. It is significant for the aroma production of Chinese *Maotai*-flavor liquor.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Maotai*-flavor liquor, Microbial communities, Chinese liquor flavor

乳酸菌广泛存在于多种混合菌发酵食品中, 例如乳制品、面制品、泡菜等。这些传统发酵食品在多种微生物类群相互作用下形成独特的风味特征^[1-3]。针对传统发酵体系中的乳酸菌, 国内外学者进行了广泛深入的研究。研究发现乳酸菌在发酵食品中的作用是双重的^[4-7]: 一方面, 乳酸菌代谢物与其他微生物发酵产生的酸、醇、酮等物质相互作用, 使产品具有独特的风味; 另一方面, 乳酸菌的代谢产物过量积累也会影响发酵食品的品质, 使发酵过程异常, 最终影响产品的品质与口感。

在中国白酒中, 乳酸是代表白酒特征的一种有机酸类, 对酒精有掩盖作用, 在酒中起到调和酒味的缓冲功能; 乳酸乙酯在酒体的呈味和呈香中发挥重要作用, 其在中国白酒中较高的含量是区别于国外蒸馏酒的显著特征^[8]。乳酸菌的主要代谢产物乳酸是形成乳酸乙酯及其他香味成分的重要基础物质。酱香型白酒具有二次投料、多轮次循环发酵的工艺特点, 上一轮次的发酵产物, 尤其乳酸等不易挥发物质的不断积累, 必然影响到下一轮次的微生物结构以及产酒品质^[9]。随着基于分子生物学的未培养技术的应用, 越来越多研究者在中国白酒发酵中的细菌结构组成中发现了乳酸菌的准确种属, 并确定其在发酵过程中的变化趋势。如吴莉莉等^[10]发现清香型和酱香型白酒发酵中优势乳酸菌的种

类和含量均有不同, 并通过可培养和未培养的方法确定了酱香型白酒中的主要乳酸菌是 *Lactobacillus homohiochii* 和 *Lactobacillus buchneri*。邵明凯^[11]在酱香型白酒发酵中的细菌结构中发现, 随着发酵轮次的增加乳酸菌的含量不断增加, 发酵到最后一轮次时乳酸菌成为绝对优势细菌。因此, 深入研究乳酸菌在酱香型白酒发酵中的地位与作用, 对全面了解影响酱香白酒品质的因素, 并以此指导生产提高优质酱香酒率有重要意义。

目前, 对中国白酒酿造微生物的研究集中在主要酵母和芽孢杆菌等酿造功能方面。例如, 酿酒酵母作为最主要的酿造微生物群体, 对乙醇的产生及其他风味物质的产生有重要作用^[11-12]; 霉菌在白酒发酵过程中能够分泌多种酶降解淀粉、蛋白质等大分子物质, 为酵母和细菌的生长提供营养基质^[13-14]。传统观点认为, 乳酸菌在中国白酒发酵过程中主要产生负面影响, 对乳酸菌的关注主要体现在生产上控制乳酸菌的数量以控制乳酸乙酯的含量, 从而保证白酒的品质^[15]。针对乳酸菌在中国白酒发酵中的地位及作用并未有相关深入研究报告。

针对以上研究现状及科学问题, 本研究以从酱香型白酒发酵酒醅中分离筛选到的两株主要乳酸菌——*L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2^[10]为主要研究对象, 明确其抑菌效果。并从环境耐受

性以及风味贡献等多角度探究与酵母的组合发酵, 分析阐述乳酸菌对酱香型白酒酿造微生物群体的作用, 探究乳酸菌在酱香型白酒生产过程中的作用及其对最终酱香品质的影响。为后期全面深入研究乳酸菌在酱香型白酒发酵中的功能奠定基础, 并以此指导实际生产, 提高优质酱香白酒出酒率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 乳酸菌: *Lactobacillus homohiochii* XJ-L1、*Lactobacillus buchneri* XJ-L2; 酵母: *Saccharomyces cerevisiae* XJ-Y1、*Zygosaccharomyces bailii* XJ-Y2、*Pichia galeiformis* XJ-Y3、*Schizosaccharomyces pombe* XJ-Y4、*Geotrichum candidum* XJ-Y5、*Pichia membranifaciens* XJ-Y6、*Issatchenkia orientalis* XJ-Y7; 芽孢杆菌: *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-B1、*Bacillus subtilis* XJ-B2、*Bacillus licheniformis* XJ-B3; 霉菌: *Aspergillus oryzae* XJ-M1、*Aspergillus niger* XJ-M2、*Aspergillus flavus* XJ-M3、*Aspergillus albicans* XJ-M4、*Rhizopus oryzae* XJ-M5; 所有菌种均分离自同一贵州地区典型酱香型白酒的发酵环境和生产过程中。

1.1.2 药品及培养基: MRS 培养基、酵母浸膏、蛋白胨购自 Oxoid 公司; PDA 培养基、氯化钠、无水葡萄糖、乳酸、乙醇、琼脂粉购自国药集团化学试剂(北京)有限公司; 用于 HPLC 和 GC-MS 的乳酸、乙醇、薄荷醇、磷酸二氢钠、甲醇、硫酸均为色谱级, 购自 Sigma 公司。

高粱汁培养基: 高粱: 水=1:4 (质量体积比), 加淀粉酶蒸煮液化, 加糖化酶糖化, 过滤离心, 调节糖度至 10 °Bx。

1.1.3 主要仪器和设备: 厌氧培养箱(BUG BOX) 购自英国 Ruskinn 公司; 5 mm 单孔琼扩打孔器购自北京普博斯生物科技有限公司; Corning Transwell 12 孔细胞培养板购自 Corning 公司; 酶标仪购自 Thermo 公司; pH 计购自 Mettler Toledo 公司; 超声波清洗仪购自天津 Autoscience 公司; 高效液相色

谱仪 Agilent 1200 和气相色谱质谱联用仪 GC 6890N-MSD 5975 均购自美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抑菌实验: (1) 打孔法检测乳酸菌对细菌和酵母的抑制特性: 参照 Schillinger 等^[16]的方法。无菌发酵液制备: *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 种子液分别按 1%接种量接种于 4 mL 无菌 MRS 培养液中, 37 °C 厌氧箱中静置培养 4 d, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清, 0.22 μm 水系针头式过滤器过滤, 收集滤液即为乳酸菌无菌发酵液。待检测细菌和酵母的种子液用无菌生理盐水(0.9% NaCl)稀释适当倍数, 分别涂布于 LB 和 YPD 平板, 固定 1 h 后打孔, 将无菌发酵液加入孔中, 正置培养(细菌 12 h, 酵母 48 h), 十字交叉法测量抑菌圈半径。

(2) 双层平板法检测乳酸菌对霉菌的抑制特性: 参照 Magnusson 等^[17]的方法。底层平板为 MRS 平板, 将 *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 在平板的两侧分别密集划线, 37 °C 厌氧箱中培养 4 d。上层平板: 配制 0.7%的素琼脂半固体试管, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min, 冷却至 50 °C, 将混合均匀的孢子液加入试管中并振荡混匀后倾倒在底层平板上, 轻轻晃动以使孢子液均匀分布, 静置 30 min 至上层平板凝固, 30 °C 正置培养 3 d, 观察霉菌生长情况。

1.2.2 混菌发酵实验: 选取 2 株优势乳酸菌 *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2, 与 3 株主要酵母 *S. cerevisiae* XJ-Y1、*Z. bailii* XJ-Y2 和 *P. galeiformis* XJ-Y3, 分别组合发酵。具体操作步骤如下: 采用 Stadie 等^[18]所使用的 Coning Transwell 培养系统。将灭菌后的高粱汁培养液分装到孔内, 静置平衡 2 h, 将乳酸菌与酵母种子液按 1:1 的比例分别接种于 Transwell 嵌套内和孔内, 每个组合设置 3 组平行, 以纯培养组为对照, 30 °C 静置培养 3 d, 间隔 24 h 取样, 测定乳酸菌和酵母 OD₆₀₀, 比较其生长情况。

1.2.3 乳酸菌的乙醇耐受性和酵母的乳酸耐受性实验: (1) 乳酸菌的乙醇耐受性: 调节 MRS 培养液

乙醇浓度分别为 0、2%、4%、6%、8%、10%、12%，接种 *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 (1%)，37 °C 厌氧箱静置培养 48 h，测定 OD_{600} 比较其生长情况。

(2) 酵母的乳酸耐受性：乳酸调节 YPD 液体培养基 pH 为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0，接种 *S. cerevisiae* XJ-Y1、*Z. bailii* XJ-Y2 和 *P. galeiformis* XJ-Y3 (1%)，30 °C、200 r/min 摇床培养 24 h，测定 OD_{600} 比较其生长情况。

1.2.4 乳酸和乙醇的检测：使用 HPLC 的方法检测纯培养和混合发酵体系中乳酸和乙醇的含量，实验方法参照文献 [11,19]。乳酸标准曲线为： $y=0.002\ 853x+0.005\ 389$ ， $R^2=0.999$ ， x 为峰面积， y 为乳酸浓度(g/L)。乙醇标准曲线为： $y=0.000\ 003x+0.002$ ， $R^2=0.998$ ， x 为峰面积， y 为乙醇浓度(g/L)。

1.2.5 挥发性风味物质的检测：使用 SPME GC-MS 检测纯培养和混合发酵体系中挥发性代谢物的含量，方法参照文献 [20]；薄荷醇(100.00 mg/L)作为内标。

2 结果与分析

2.1 优势乳酸菌对主要酿造微生物的影响情况

分析了从酱香型白酒发酵酒醅中分离筛选到的 2 株优势乳酸菌 *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2，对从同一发酵环境中分离筛选到的酿造微生物^[11,21] (包括 7 株酵母、3 株芽孢杆菌和 5 株霉菌)生长的抑制情况，以探究乳酸菌在酿造微生物区系中的作用。

由表 1、2 可知，*L. homohiochii* XJ-L1 对所选 7 株酵母、3 株细菌和 5 株霉菌的生长均无抑制作用；而 *L. buchneri* XJ-L2 对 7 株酵母中的 2 株(*Sc. pombe* XJ-Y4、*G. candidum* XJ-Y5)以及 3 株芽孢杆菌和 5 株霉菌的生长均有抑制作用(图 1)。根据吴莉莉等^[10]的研究，*L. homohiochii* 存在于整个发酵过程中，而 *L. buchneri* 仅存在于发酵中后期，且在上层发酵酒醅中的含量高于中下层。二者与其他微生物的生态关系与其在微生物发酵过程中的动态变化具有相关性。

L. buchneri XJ-L2 的抑制作用可防止微生物过

表 1 2 株乳酸菌对细菌和酵母的抑制情况
Table 1 Inhibition of two lactic acid bacteria strains to *Bacillus* and yeasts

类别 Classes	实验菌种 Experimental strains	<i>L. buchneri</i> XJ-L2	<i>L. homohiochii</i> XJ-L1	空白对照 Blank control
酵母 Yeast	<i>S. cerevisiae</i> XJ-Y1	-	-	-
	<i>Z. bailii</i> XJ-Y2	-	-	-
	<i>P. galeiformis</i> XJ-Y3	-	-	-
	<i>Sc. pombe</i> XJ-Y4	++	-	-
	<i>G. candidum</i> XJ-Y5	+	-	-
	<i>P. membranifaciens</i> XJ-Y6	-	-	-
	<i>I. orientalis</i> XJ-Y7	-	-	-
细菌 Bacteria	<i>B. amyloliquefaciens</i> XJ-B1	+	-	-
	<i>B. subtilis</i> XJ-B2	+	-	-
	<i>B. licheniformis</i> XJ-B3	+	-	-

注：-：无抑菌圈；+：抑菌圈半径 0.2–0.3 cm；++：抑菌圈半径大于 0.3 cm。

Note: -: No inhibition zone; +: The radius of inhibition zone was from 0.2 to 0.3 cm; ++: The radius of inhibition zone was greater than 0.3 cm.

表 2 2 株乳酸菌对霉菌的抑制情况
Table 2 Inhibition of two lactic acid bacteria strains to mold

类别 Classes	实验菌种 Experimental strains	<i>L. buchneri</i> XJ-L2	<i>L. homohiochii</i> XJ-L1
霉菌 Mold	<i>A. oryzae</i> XJ-M1	+	-
	<i>A. niger</i> XJ-M2	+	-
	<i>A. flavus</i> XJ-M3	+	-
	<i>A. albicans</i> XJ-M4	+	-
	<i>R. oryzae</i> XJ-M5	+	-

注: -: 无抑菌区域; +: 有抑菌区域。

Note: -: No inhibition; +: Inhibition.

量生长, 有助于维持酿造微生物区系平衡。文献已报道多种发酵环境中, *L. buchneri* 能够抑制多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌的生长, 维持发酵体系的稳定^[22-23]。此外, 研究发现 *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 对主要酿酒酵母 *S. cerevisiae* XJ-Y1 均无抑制作用。据报道, 以 *S.*

cerevisiae 为主的酱香型白酒发酵酵母菌群产酯丰富, 对优质酱香白酒风味的形成有重要的作用^[11]。同时乳酸菌与酵母共培养时, 乳酸菌能够通过酸化培养环境促进酵母的生长^[24]。因此, 进一步研究 *L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 对酱香型白酒发酵中主要酵母的影响, 对进一步了解乳酸菌对酿造微生物群体的影响具有重要意义。

2.2 优势乳酸菌与主要功能酵母的相互作用

2 株乳酸菌与 3 株酵母纯培养和混合培养方式及对应编号如表 3 所示。纯培养和共培养条件下酵母和乳酸菌的生长情况如图 2 和图 3 所示。

与纯培养时相比, 2 株乳酸菌对 3 株酵母的生长均有促进作用, 且 *L. buchneri* XJ-L2 的促进作用较 *L. homohiochii* XJ-L1 明显(图 2)。*P. galeiformis* XJ-Y3 促进了 2 株乳酸菌的生长, 而 *S. cerevisiae* XJ-Y1 则抑制了 2 株乳酸菌的生长, *Z. bailii* XJ-Y2 对 2 株乳酸菌的生长无明显作用(图 3)。这种相互作用关系的差异, 与酵母的产乙醇能力及乳酸菌的乙

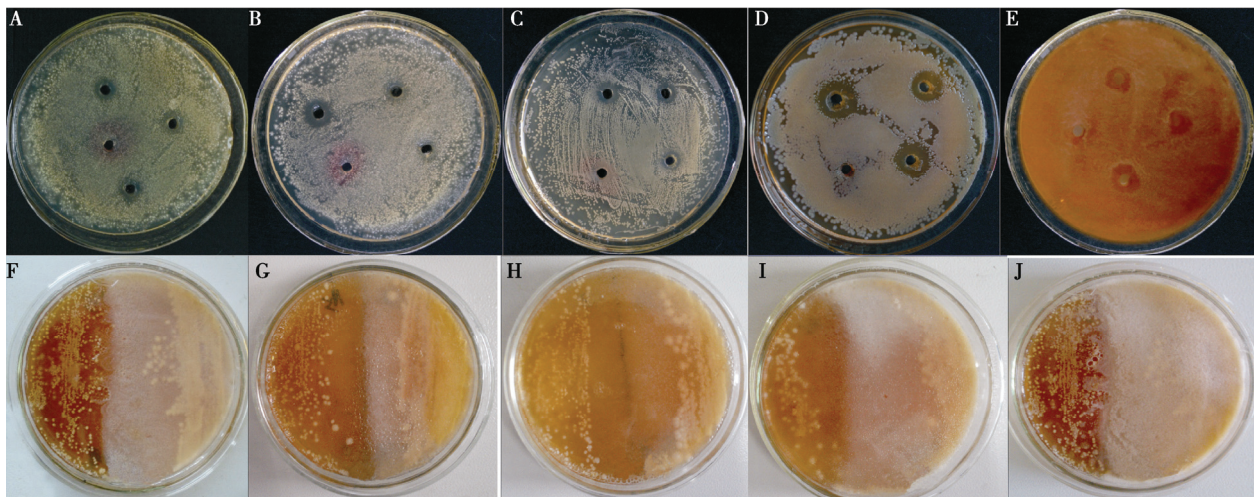


图 1 *L. buchneri* XJ-L2 对芽孢杆菌、酵母和霉菌的抑制情况

Figure 1 Inhibition of *L. buchneri* XJ-L2 to *Bacillus*, yeasts and mold

注: A: *B. licheniformis* XJ-B3; B: *B. subtilis* XJ-B2; C: *B. amyloliquefaciens* XJ-B1; D: *Sc. pombe* XJ-Y4; E: *G. candidum* XJ-Y5; F: *R. oryzae* XJ-M5; G: *A. albicans* XJ-M4; H: *A. niger* XJ-M2; I: *A. flavus* XJ-M3; J: *A. oryzae* XJ-M1. A-E 中无抑菌圈的孔中所加为无菌 MRS 培养液作为空白对照, 另外 3 个孔中均为 *L. buchneri* XJ-L2 的无菌发酵液。F-J 的底层平板右侧为 *L. homohiochii* XJ-L1, 左侧为 *L. buchneri* XJ-L2。

Note: A: *B. licheniformis* XJ-B3; B: *B. subtilis* XJ-B2; C: *B. amyloliquefaciens* XJ-B1; D: *Sc. pombe* XJ-Y4; E: *G. candidum* XJ-Y5; F: *R. oryzae* XJ-M5; G: *A. albicans* XJ-M4; H: *A. niger* XJ-M2; I: *A. flavus* XJ-M3; J: *A. oryzae* XJ-M1. A-E: MRS was in one of four holes and *L. buchneri* XJ-L2 was in three others. Left of F-J was *L. buchneri* XJ-L2 and right of F-J was *L. homohiochii* XJ-L1.

表 3 2 株乳酸菌与 3 株酵母纯培养和混合培养对应编号

Table 3 Number for pure culture and co-culture of two lactic acid bacteria strains and three yeasts

对应编号 Number		<i>L. homohiochii</i> XJ-L1	<i>L. buchneri</i> XJ-L2
		X	N
<i>P. galeiformis</i> XJ-Y3	Y1	X1	N1
<i>Z. bailii</i> XJ-Y2	Y2	X2	N2
<i>S. cerevisiae</i> XJ-Y1	Y9	X9	N9

醇耐受能力相关。因此研究乳酸菌的乙醇耐受性和酵母菌的乳酸耐受性,可以从环境耐受性方面进一步了解乳酸菌和酵母菌混合培养时影响彼此生长的原因。

2.3 酵母的乳酸耐受性和乳酸菌的乙醇耐受性研究

由图 4A 可知,随乙醇浓度递增,2 株乳酸菌生长受抑制程度上升,*L. homohiochii* XJ-L1 在乙醇

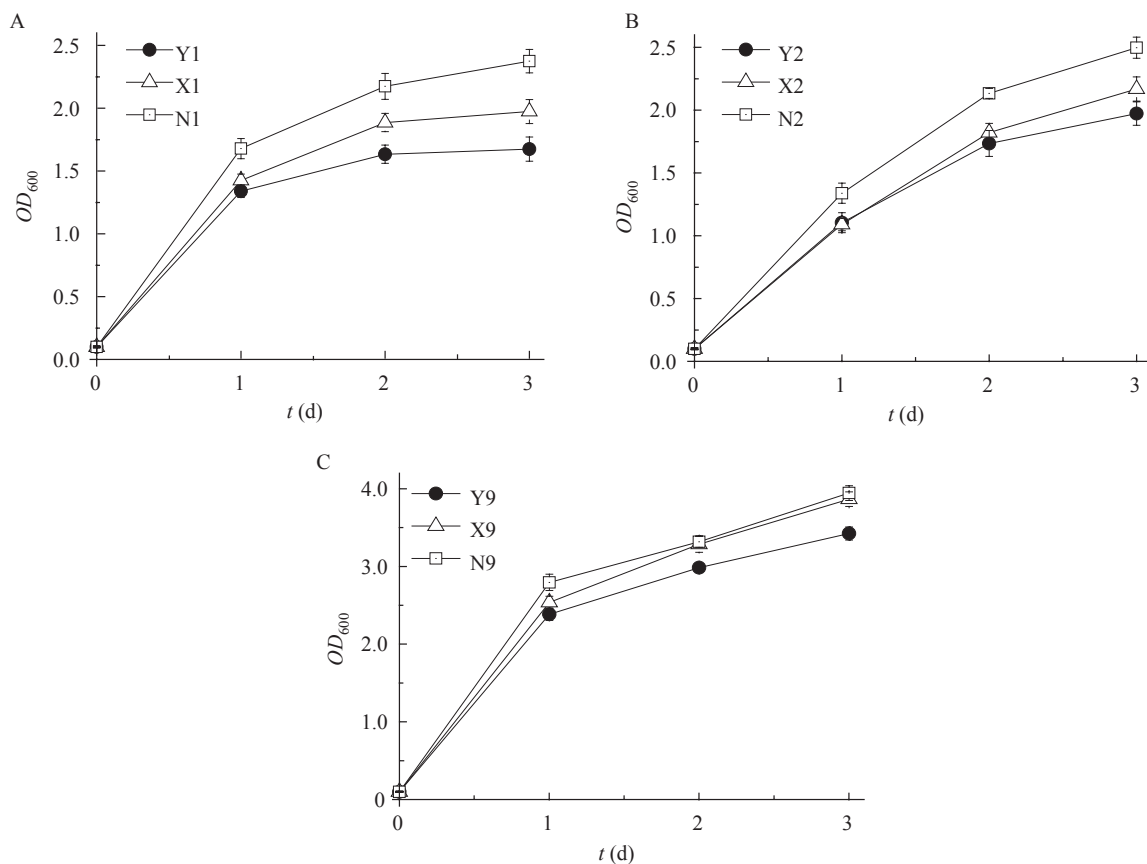


图 2 纯培养和共培养体系中酵母菌的生长变化情况

Figure 2 The growth change of yeasts in pure culture and co-culture systems

注: Y1: *P. galeiformis* XJ-Y3 的纯培养; X1: *P. galeiformis* XJ-Y3 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; N1: *P. galeiformis* XJ-Y3 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养; Y2: *Z. bailii* XJ-Y2 的纯培养; X2: *Z. bailii* XJ-Y2 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; N2: *Z. bailii* XJ-Y2 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养; Y9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 的纯培养; X9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; N9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养。

Note: Y1: Pure culture of *P. galeiformis* XJ-Y3; X1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. homohiochii* XJ-L1; N1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. buchneri* XJ-L2; Y2: Pure culture of *Z. bailii* XJ-Y2; X2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. homohiochii* XJ-L1; N2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. buchneri* XJ-L2; Y9: Pure culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1; X9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. homohiochii* XJ-L1; N9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. buchneri* XJ-L2.

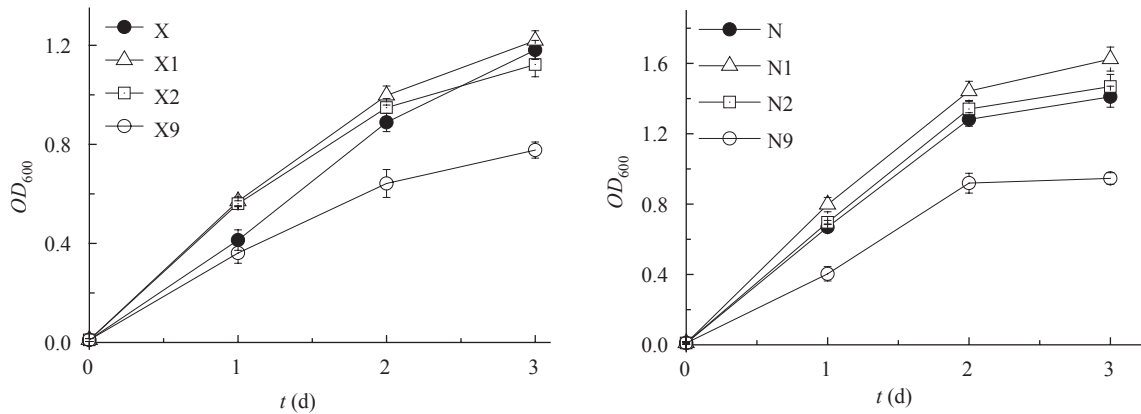


图3 纯培养和共培养体系中乳酸菌的生长变化情况

Figure 3 The growth change of lactic acid bacteria in pure culture and co-culture systems

注: X: *L. homohiochii* XJ-L1 的纯培养; X1: *P. galeiformis* XJ-Y3 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; X2: *Z. bailii* XJ-Y2 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; X9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; N: *L. buchneri* XJ-L2 的纯培养; N1: *P. galeiformis* XJ-Y3 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养; N2: *Z. bailii* XJ-Y2 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养; N9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养.

Note: X: Pure culture of *L. homohiochii* XJ-L1; X1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. homohiochii* XJ-L1; X2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. homohiochii* XJ-L1; X9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. homohiochii* XJ-L1; N: Pure culture of *L. buchneri* XJ-L2; N1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. buchneri* XJ-L2; N2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. buchneri* XJ-L2; N9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. buchneri* XJ-L2.

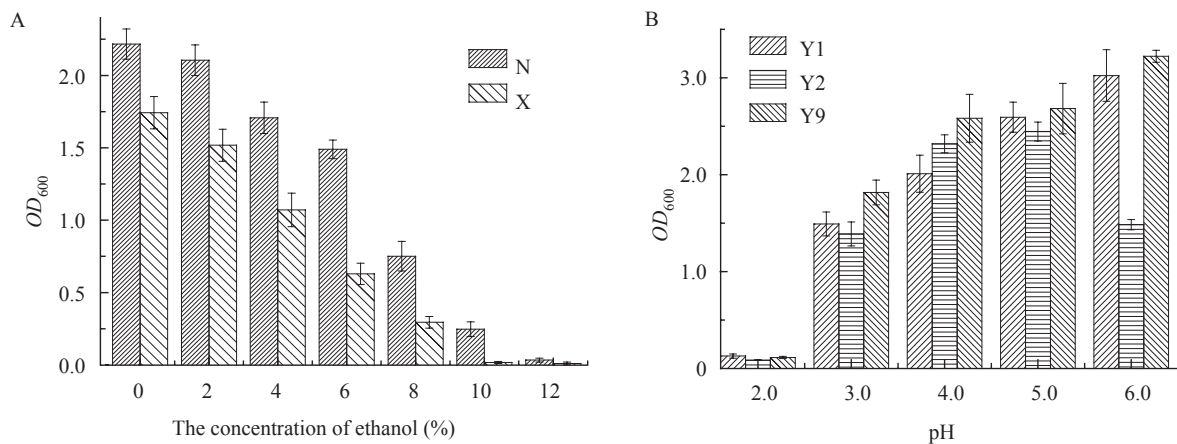


图4 乳酸菌的乙醇耐受性和酵母的乳酸耐受性情况

Figure 4 Ethanol tolerance of two lactic acid bacteria strains and lactic acid tolerance of three yeasts

注: A: 2 株乳酸菌的乙醇耐受性; B: 3 株酵母的乳酸耐受性; N: *L. buchneri* XJ-L2 的纯培养; X: *L. homohiochii* XJ-L1 的纯培养; Y1: *P. galeiformis* XJ-Y3 的纯培养; Y2: *Z. bailii* XJ-Y2 的纯培养; Y9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 的纯培养.

Note: A: Ethanol tolerance of two lactic acid bacteria; B: Lactic acid tolerance of three yeasts. N: Pure culture of *L. buchneri* XJ-L2; X: Pure culture of *L. homohiochii* XJ-L1; Y1: Pure culture of *P. galeiformis* XJ-Y3; Y2: Pure culture of *Z. bailii* XJ-Y2; Y9: Pure culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1.

浓度为 8% 时几乎不生长, *L. buchneri* XJ-L2 在乙醇浓度为 10% 时几乎不生长, 说明 2 株乳酸菌对乙醇具有较强的耐受性。因此, 酵母代谢物中低浓度的乙醇不能抑制乳酸菌的生长, 而且代谢物中丰富的氨基酸等营养物质能够促进乳酸菌的生长。由图 4B 可知, pH 为 3.0 时 3 株酵母仍能大量繁殖, 而 *Z. bailii* XJ-Y2 在 pH 为 5.0 时的生长较 pH 为 6.0 时好, 另外 2 株酵母在 pH 为 5.0 时其生长也未受到明显抑制, 说明此 3 株酵母均具有较强的乳酸耐受性。因此, 乳酸菌代谢产物中以乳酸为主的有机酸未能抑制酵母生长, 其形成的弱酸性环境促进了酵母的生长。研究表明酵母对乳酸菌的主要产物乳酸以及乳酸菌对酵母的产物乙醇均具有较好的耐受性。

2.4 共培养体系中乳酸菌和酵母菌对彼此主要代谢产物的影响

为验证酵母的耐乙醇能力和乳酸菌的耐乳酸能力, 同时探究第 3 天发酵结束时混合培养体系中乳酸菌和酵母对各自主要代谢物产量的影响, 分析发酵结束后发酵体系中乙醇和乳酸的含量。

混合培养体系与纯培养体系中乙醇的产量基本一致, 且仅在乳酸菌与 *S. cerevisiae* XJ-Y1 的混合培养体系中乙醇浓度超过 20 g/L (图 5A)。与纯培养时相比, 2 株乳酸菌与 *P. galeiformis* XJ-Y3 混合培养体系中乳酸产量未有明显变化, 而与 *Z. bailii* XJ-Y2 共培养时乳酸产量降低了 20% 左右, 与 *S. cerevisiae* XJ-Y1 共培养时降低了 50% 左右, 混合培

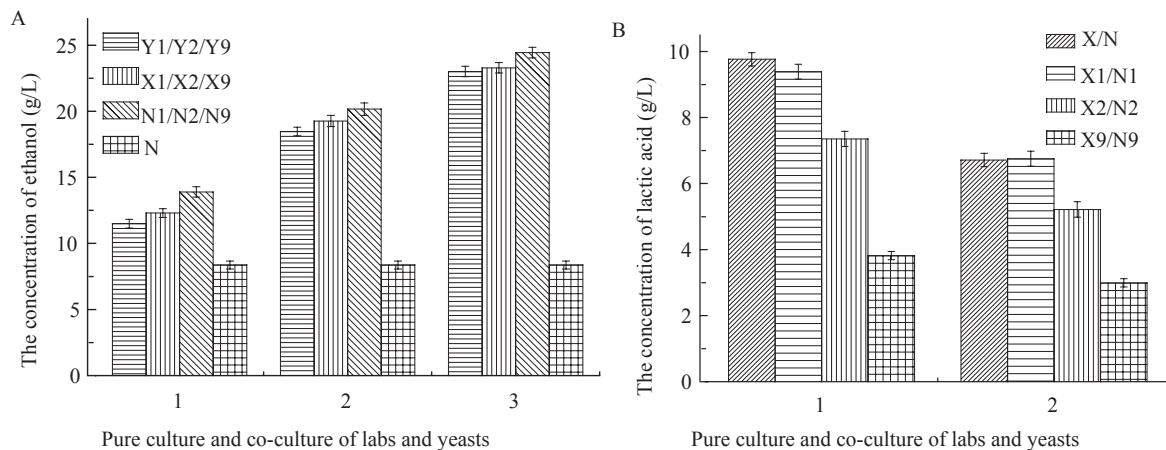


图 5 纯培养和共培养体系中乙醇和乳酸含量变化情况

Figure 5 The concentration of ethanol and lactic acid in pure culture and co-culture systems

注: A: 纯培养和共培养体系中乙醇含量; 1: *P. galeiformis* XJ-Y3 的纯培养和共培养体系; 2: *Z. bailii* XJ-Y2 的纯培养和共培养体系; 3: *S. cerevisiae* XJ-Y1 的纯培养和共培养体系. B: 纯培养和共培养体系中乳酸含量; 1: *L. homohiochii* XJ-L1 的纯培养和共培养体系; 2: *L. buchneri* XJ-L2 的纯培养和共培养体系. Y1: *P. galeiformis* XJ-Y3 的纯培养; Y2: *Z. bailii* XJ-Y2 的纯培养; Y9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 的纯培养; X1: *P. galeiformis* XJ-Y3 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; X2: *Z. bailii* XJ-Y2 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; X9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 和 *L. homohiochii* XJ-L1 的共培养; N1: *P. galeiformis* XJ-Y3 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养; N2: *Z. bailii* XJ-Y2 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养; N9: *S. cerevisiae* XJ-Y1 和 *L. buchneri* XJ-L2 的共培养; N: *L. buchneri* XJ-L2 的纯培养; X: *L. homohiochii* XJ-L1 的纯培养.

Note: A: The concentration of ethanol in pure culture and co-culture systems; 1: Pure culture and co-culture systems of *P. galeiformis* XJ-Y3; 2: Pure culture and co-culture systems of *Z. bailii* XJ-Y2; 3: Pure culture and co-culture systems of *S. cerevisiae* XJ-Y1. B: The concentration of lactic acid in pure culture and co-culture systems; 1: Pure culture and co-culture systems of *L. homohiochii* XJ-L1; 2: Pure culture and co-culture systems of *L. buchneri* XJ-L2. Y1: Pure culture of *P. galeiformis* XJ-Y3; Y2: Pure culture of *Z. bailii* XJ-Y2; Y9: Pure culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1; X1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. homohiochii* XJ-L1; X2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. homohiochii* XJ-L1; X9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. homohiochii* XJ-L1; N1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. buchneri* XJ-L2; N2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. buchneri* XJ-L2; N9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. buchneri* XJ-L2; N: Pure culture of *L. buchneri* XJ-L2; X: Pure culture of *L. homohiochii* XJ-L1.

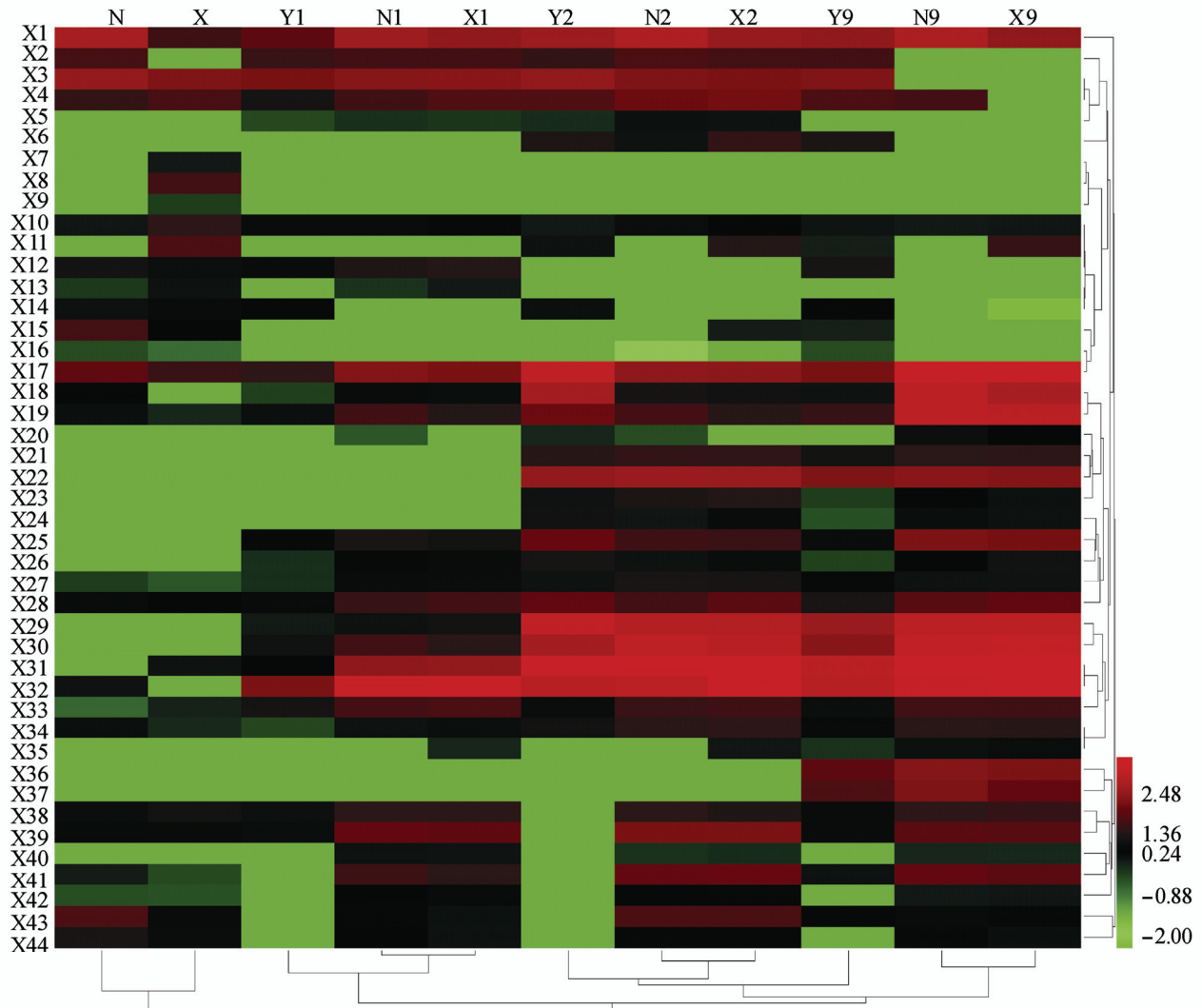


图 6 2 株乳酸菌与 3 株酵母纯培养和共培养体系中挥发性风味物质含量热图
 Figure 6 Heat map of volatile flavor substances in the pure culture and co-culture systems of two lactic acid bacteria strains and three yeast strains

Note: N: Pure culture of *L. buchneri* XJ-L2; X: Pure culture of *L. homohiochii* XJ-L1; Y1: Pure culture of *P. galeiformis* XJ-Y3; N1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. buchneri* XJ-L2; X1: Co-culture of *P. galeiformis* XJ-Y3 and *L. homohiochii* XJ-L1; Y2: Pure culture of *Z. bailii* XJ-Y2; N2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. buchneri* XJ-L2; X2: Co-culture of *Z. bailii* XJ-Y2 and *L. homohiochii* XJ-L1; Y9: Pure culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1; N9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. buchneri* XJ-L2; X9: Co-culture of *S. cerevisiae* XJ-Y1 and *L. homohiochii* XJ-L1; X1: Acetic acid; X2: Butanoic acid; X3: Hexanoic acid; X4: 3,5-Dimethyl-benzaldehyde; X5: 2-Octanol; X6: Benzaldehyde; X7: 4-Methyl-pentanoic acid; X8: 2,3-Butanedione; X9: 2,3-Dihydro-benzofuran; X10: 2-Methoxy-phenol; X11: 3-Hydroxy-2-butanone; X12: Heptanoic acid; X13: 4-Ethyl-2-methoxy-phenol; X14: 2-Furanmethanol; X15: 2-Heptanone; X16: 2-Nonanone; X17: Octanoic acid; X18: Ethyl octanoate; X19: n-Decanoic acid; X20: Ethyl nonanoate; X21: 2-Methyl-1-propanol; X22: Ethyl acetate; X23: Ethyl heptanoate; X24: 3-(Methylthio)-1-propanol; X25: 3-Methyl-1-butanol; X26: Ethyl benzeneacetate; X27: 1-Hexanol; X28: Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone; X29: 2-Methyl-1-butanol; X30: 2-Phenylethyl acetate; X31: 3-Methyl-1-butanol; X32: Phenylethyl alcohol; X33: Phenol; X34: 1-Octanol; X35: 1-Heptanol; X36: Ethyl decanoate; X37: Ethyl 9-decenoate; X38: Nonanoic acid; X39: 2-Ethyl-1-hexanol; X40: 3-Ethyl-3-heptanol; X41: 1-Nonanol; X42: Benzyl alcohol; X43: 2-Nonanol; X44: 2-Undecanol.

养体系中乳酸最高浓度不足 10 g/L (图 5B)。实验结果进一步证实乳酸菌对乙醇和酵母对乳酸均具有较强的耐受性, 同时说明乳酸菌的生长对酵母代谢乙醇的能力几乎无影响, 而部分酵母菌的生长可抑制乳酸菌代谢乳酸的能力。但是乳酸菌对酵母代谢白酒风味物质的影响尚不清楚, 因此, 进一步对混合发酵体系中与白酒风味相关的其他代谢物进行研究。

2.5 共培养体系中乳酸菌对重要挥发性风味物质的影响

分析第 3 天发酵结束时 2 株乳酸菌与 3 株酵母纯培养和混合培养体系中挥发性风味组分, 选择色谱峰面积大于 10 000 的共 44 种风味物质进行分析, 其中含有酯类 8 种, 醇类 17 种, 酸类 8 种, 酮类 6 种, 醛类 2 种和酚类 3 种。聚类分析后绘制风味物质热图(图 6)。

由图 6 可知, 2 株乳酸菌代谢物中酸类、醇类、酮类、酚类物质的种类丰富。*L. homohiochii* XJ-L1 代谢酮类和酚类的种类较多, 其中双乙酰、3-羟基-2-丁酮、2-甲氧基苯酚的含量均大于 30 $\mu\text{g/L}$ 。而双乙酰、3-羟基-2-丁酮、2-甲氧基苯酚在白酒呈香中发挥一定的作用^[25]。*L. buchneri* XJ-L2 的代谢物中酸类和醇类的种类较多, 其中乙酸、丁酸、己酸、辛酸、2-壬醇和 2-十一醇的含量均大于 50 $\mu\text{g/L}$ 。而这些饱和脂肪酸和饱和脂肪醇作为重要的风味化合物都曾在白酒中检测到^[25]。

3 株酵母的纯培养和混合培养体系中的挥发性风味物质明显聚为两类, 且 *S. cerevisiae* XJ-Y1 的纯培养和混合培养代谢物含量差异最为明显。与纯培养时相比, 3 株酵母的混合培养体系中, *P. galeiformis* XJ-Y3 的代谢物中乙酸、己酸、庚酸等有机酸含量提高, *Z. bailii* XJ-Y2 的代谢物中苯乙醇、2-乙基-正己醇、3-乙基-3-庚醇等醇类含量增加最显著, 而 *S. cerevisiae* XJ-Y1 的代谢物中酯类含量显著增加, 如乙酸乙酯、乙酸-2-苯乙酯、9-癸酸乙酯等。综上可知, 与纯培养时相比, 酵母与乳酸菌的混合培养体系中部分酸类、醇类和酯类的含量增

多。而此 3 类物质是白酒中的主要呈味物质, 其含量变化对白酒品质有着重要的影响^[26]。

因此, 酱香型白酒发酵中乳酸菌除通过自身代谢物直接对白酒风味产生影响外, 还可以通过影响酵母的生长和代谢, 促进白酒呈味物质的产生, 间接提升白酒风味进而影响优质酱香型白酒的酿造。

3 结论

通过对酱香型白酒发酵中 2 株主要乳酸菌对酿造微生物群体影响的研究, 初步阐述了乳酸菌如何通过影响酿造微生物群体的生长间接影响酱香型白酒品质。*L. homohiochii* XJ-L1 和 *L. buchneri* XJ-L2 通过对酱香型白酒发酵中酿造微生物群体尤其是酵母的抑制或促进作用, 维持了酿造微生物区系平衡, 从而影响了白酒风味物质的形成, 保证了酱香型白酒的品质。

酱香型白酒具有二次投料、多轮次发酵、一年一个大轮回的工艺特点^[9]。随着轮次的增加, 发酵酒醅中的营养物质不断减少, 有机酸等难挥发性代谢产物不断积累, 发酵环境越来越不利于环境耐受性较差、营养要求较高的菌种生长。发酵到最后两个轮次, 乳酸菌大量繁殖, 严重抑制了其他微生物的生长, 使酿造微生物区系失去平衡, 导致最后两轮次所产酒品质变差, 不再具有典型的酱香型特征。因此, 适当比例的乳酸菌对维持酿造微生物区系平衡、生产典型酱香品质白酒有一定贡献。后续将对乳酸菌在何种条件下会快速大量繁殖导致酿造体系的失衡, 以及如何提前预防乳酸菌造成负面影响进行深入研究, 这将对提高酱香型酒的产品质量有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Liu SN, Han Y, Zhou ZJ. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods[J]. Food Research International, 2011, 44(3): 643-651
- [2] Minervini F, Di Cagno R, Lattanzi A, et al. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(4): 1251-1264
- [3] Wullschleger S, Lacroix C, Bonfio B, et al. Analysis of lactic acid bacteria communities and their seasonal variations in a

- spontaneously fermented dairy product (Malian fènè) by applying a cultivation/genotype-based binary model[J]. *International Dairy Journal*, 2013, 29(1): 28-35
- [4] Bujňáková D, Kmeť V. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products[J]. *Folia Microbiologica*, 2012, 57(4): 263-267
- [5] Zotta T, Ricciardi A, Parente E. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115(2): 165-172
- [6] Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria—potential for control of mould growth and mycotoxins: a review[J]. *Food Control*, 2010, 21(4): 370-380
- [7] Gobetti M, de Angelis M, Corsetti A, et al. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2005, 16(1/3): 57-69
- [8] Li WQ. Relationship between Luzhou flavor liquor, lactic acid bacteria, lactic acid and ethyl lactate[J]. *Liquor Making*, 2010, 37(3): 90-93 (in Chinese)
李维青. 浓香型白酒与乳酸菌、乳酸、乳酸乙酯[J]. *酿酒*, 2010, 37(3): 90-93
- [9] Shen YF. *Liquor Production Technology Encyclopedia*[M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1998: 357-359 (in Chinese)
沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 357-359
- [10] Wu LL, Wang HY, Xu Y, et al. Differences of lactic acid bacteria community between soy sauce aroma style and light aroma style liquor fermentation[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(12): 2182-2188 (in Chinese)
吴莉莉, 王海燕, 徐岩, 等. 酱香型与清香型白酒发酵过程中乳酸菌菌群的差异性分析[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(12): 2182-2188
- [11] Shao MK. Bacterium and yeast community structures and their implications for flavor components during the fermentation process of Chinese *Maotai*-flavor liquor[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)
邵明凯. 酱香型白酒发酵中细菌和酵母群落结构及其对风味组分影响的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014
- [12] Wu Q, Xu Y, Chen LQ. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese *Maotai*-flavor liquor making[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(4): 301-307
- [13] Xu Y, Ji KL. *Moutai (Maotai): production and sensory properties*[A]/Piggott J. *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research*[M]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2012: 315-330
- [14] Zheng XW, Tabrizi MR, Nout MJR, et al. *Daqu*-a traditional Chinese liquor fermentation starter[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2011, 117(1): 82-90
- [15] Hang WX, Qiao ZW, Shigematsu T, et al. Analysis of the bacterial community in *Zaopei* during production of Chinese *Luzhou-flavor* Liquor[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2005, 111(2): 215-222
- [16] Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(8): 1901-1906
- [17] Magnusson J, Ström K, Roos S, et al. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 219(1): 129-135
- [18] Stadie J, Gulitz A, Ehrmann MA, et al. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir[J]. *Food Microbiology*, 2013, 35(2): 92-98
- [19] Duan YT. Establishment and related research about nine kinds of organic RP-HPLC detection systems in grapes and wine[D]. Beijing: Master's Thesis of China Agricultural University, 2007 (in Chinese)
段云涛. 葡萄和葡萄酒中9种有机酸 RP-HPLC 检测体系的建立及其相关研究[D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2007
- [20] Kong Y, Wu Q, Zhang Y, et al. *In situ* analysis of metabolic characteristics reveals the key yeast in the spontaneous and solid-state fermentation process of Chinese light-style liquor[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(12): 3667-3676
- [21] Chen B, Wu Q, Xu Y. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese *Maotai*-flavor liquor[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 179: 80-84
- [22] Gong HS, Meng XC, Liu HJ. Purification and biological characteristics of bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus buchneri* KLD51. 0364[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(2): 193-199 (in Chinese)
贡汉生, 孟祥晨, 刘红娟. 一株布氏乳杆菌所产类细菌素的初步纯化与部分特性[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(2): 193-199
- [23] Yildirim Z, Yildirim M. Characterization of buchnericin LB produced by *Lactobacillus buchneri* LB[J]. *Turkish Journal of Biology*, 2001, 25(1): 73-82
- [24] Smid EJ, Lacroix C. Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, 24(2): 148-154
- [25] Fan WL, Xu Y. *Flavor Chemistry of Alcoholic Beverage*[M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 2014: 99-102 (in Chinese)
范文来, 徐岩. 酒类风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2014: 99-102
- [26] Fan WL, Shen HY, Xu Y. Quantification of volatile compounds in Chinese soy sauce aroma type liquor by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(7): 1187-1198