

高耐性拜耳接合酵母在酱香型白酒中的应用

慕济锺,刘治国,孙仁杰,李超,林良才,张翠英*

(天津科技大学 生物工程学院,天津 300457)

摘要: 传统白酒酿造是开放式的发酵过程,酿造微生物菌群演替及代谢活动极易受到外界环境影响。因此,分离筛选高耐性的核心功能微生物菌株,并将其应用于生产中是解决这些问题的有效手段。该研究在高温、高酸双胁迫条件下从酱香型白酒酒醅中筛选获得9株具有高耐性拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*),并通过模拟白酒发酵表征其发酵能力和风味物质合成能力。结果表明,菌株BM09在37℃、16 g/L乙酸、110 g/L乳酸和14%乙醇溶液条件下生长性能均较为突出,且具有良好的产乙醇和高产酯能力,故将其作为强化菌株,应用于酱香型白酒实际生产中。原位发酵试验表明强化菌剂BM09的应用使得酱香型白酒第7轮次的原料利用率提高29.80%,乙醇产量提升63.10%,同时乙酸乙酯含量提高85.17%,乙醛含量降低70.37%。

关键词: 耐受性;拜耳接合酵母;酱香型白酒;乙酸乙酯;强化菌剂

Application of Highly-tolerant *Zygosaccharomyces bailii* in Sauce-flavor Baijiu

MU Jizhe, LIU Zhiguo, SUN Renjie, LI Chao, LIN Liangcai, ZHANG Cuiying*

(School of Biological Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Traditional Baijiu brewing is an open fermentation process, and the microbial community succession and metabolic activities during brewing are easily affected by external environment. Therefore, to address these issues, it is feasible to isolate and select core functional microbial strains with high tolerance and apply them in production. In this paper, nine yeast strains with high tolerance were selected from the fermented grains of sauce-flavor Baijiu under dual stress conditions of high temperature and high acid, which were identified as *Zygosaccharomyces bailii*. The fermentation and flavor compound synthesis of these strains were characterized by simulating Baijiu fermentation. The results showed that strain BM09 had outstanding growth performance under 37 °C, 16 g/L acetic acid, 110 g/L lactic acid and 14% ethanol, with high ethanol and ester production capacity. Therefore, it was used as an enhancing strain in the actual production of sauce-flavor Baijiu. *In situ* fermentation indicated that BM09 improved the raw material utilization of sauce-flavor Baijiu in the seventh round by 29.80%, increased the ethanol yield by 63.10% and ethyl acetate by 85.17%, while reduced acetaldehyde by 70.37%.

Key words: tolerance; *Zygosaccharomyces bailii*; sauce-flavor Baijiu; ethyl acetate; functional microbial agent

引文格式:

慕济锺,刘治国,孙仁杰,等.高耐性拜耳接合酵母在酱香型白酒中的应用[J].食品研究与开发,2024,45(10):142-149,189.

MU Jizhe, LIU Zhiguo, SUN Renjie, et al. Application of Highly-tolerant *Zygosaccharomyces bailii* in Sauce-flavor Baijiu[J]. Food Research and Development, 2024, 45(10): 142-149, 189.

基金项目:天津市科技计划项目(22ZYJDS00050)

作者简介:慕济锺(1998—),男(汉),硕士,研究方向:生物工程。

*通信作者:张翠英(1979—),女(满),教授,博士,研究方向:现代酿造技术。

中国白酒拥有悠久的历史 and 独特的酿造方法,主要包括清香型、酱香型、浓香型及其他香型,是中国食品工业的重要组成部分^[1-2]。传统白酒酿造体系是一个多微共存的发酵过程,微生物是白酒酿造的核心,不同微生物发酵代谢所产生的风味可赋予酒体不同的风格,进而决定了基酒的产量和品质。而在白酒酿造的过程中,酿造微生物将会面临诸如高温、发酵后期高浓度的酒精含量、酒醅高酸微环境等恶劣的生长条件的挑战,导致原料利用下降、发酵力不足、生产掉排以及基酒风味失衡等生产问题。因此,选育具有高耐受性的关键功能微生物以及开发与之配套的微生态调控技术有助于企业提高生产稳定性,提升基酒品质。

酵母是白酒酿造过程中的关键微生物之一,其可分为酿酒酵母和非酿酒酵母,在白酒生产中起到产酒、生香的关键作用。酵母的抗逆性和代谢性能直接影响酿造体系的稳定和演替变化,更对酒体风味和质量具有重要意义^[3-4]。因此,筛选发酵性能优良且抗逆性强的酵母菌株对稳定白酒生产具有重大意义。目前利用测序技术从酱香型白酒酒醅中已分离鉴定出9种酵母,分别为拜耳接合酵母、酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、膜醭毕赤酵母、胶红酵母、哈萨克斯坦酵母、东方伊萨酵母、汉逊德巴利酵母和白地霉,均具有耐高温和耐酸的特征,其中酿酒酵母、毕赤酵母、粟酒裂殖酵母、拜耳接合酵母这4种酵母是白酒发酵过程中的核心酵母^[5],并且拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)过去被认为是一种腐败酵母^[6],广泛存在于各种发酵食品中,如葡萄酒、茶和醋等^[7]。*Z. bailii*作为酱香型白酒中核心功能酵母,在堆积和窖池阶段均是优势菌群,所占酵母生物量比例可达70%以上,是重要的乙醇生产者,并在乙酯类物质上有高水平生产,如乙酸乙酯^[8]。尽管拜耳接合酵母在酱香型白酒酿造中发挥着重要作用,但是将拜耳接合酵母强化应用于白酒生产发酵过程的研究鲜见报道。因此,筛选具有良好耐受性能,且发酵性能优异的拜耳接合酵母,并开发基于强化菌剂的发酵调控技术对实现传统白酒酿造可控、高效、稳定生产具有重要的应用价值。

本研究通过温度、酸度双重胁迫条件从酱香型白酒中筛选出9株拜耳接合酵母,对其耐高温、耐酸、耐乙醇性能进行检测,并利用模拟发酵试验对其发酵性能及风味物质的生成进行系统评估,最终确定以BM09菌株应用于酱香型白酒第7轮次生产试验中,评价其应用于酱香型白酒酿造过程中的作用,以期传统白酒发酵人工调控技术的开发提供新依据和新思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

高粱:酱香型白酒专用高粱,取自茅台镇某酒厂。

酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YEPD)培养基:20 g/L 葡萄糖,20 g/L 蛋白胨,10 g/L 酵母浸粉,自然 pH,121 °C 下灭菌 20 min。

酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(yeast peptone dextrose agar, YPD)培养基:在 YEPD 培养基中加琼脂 2%,自然 pH,121 °C 下灭菌 20 min。

WL 营养琼脂(wallerstein laboratory nutrient agar, WL)培养基、麦芽汁培养基:广东环凯微生物科技有限公司;葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、阿拉伯糖、木糖、半乳糖(均为分析纯)、磷酸缓冲盐溶液、尿素、硝酸铵、硝酸钾(均为生化试剂):上海源叶生物科技有限公司;蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉(均为生化试剂):天津市北方天医化学试剂公司;乳酸、乙酸、乳酸乙酯、乙酸乙酯、正丙醇、异戊醇、异丁醇、乙醛、糠醛、丙酸(均为色谱纯):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水乙醇、柠檬酸、戊二醛、叔丁醇(均为分析纯):上海麦克林生化科技有限公司;耐高温 α -淀粉酶(35 000~40 000 U/mL)、糖化酶(140 000~150 000 U/mL):山东谦诺生物科技有限公司;酸性蛋白酶(50 000~10 000 U/mL):夏盛(北京)生物科技开发有限公司。

高粱水解液:取高粱 1 kg,过 20 目筛,按照高粱粉与水料液比为 1:3(g/mL)加入 3 L 60~70 °C 的自来水,在 60 °C 下糊化 30 min,然后于恒温水浴锅中,加热至 90 °C 后添加 1 mL 的耐高温 α -淀粉酶进行液化 20 min,液化结束后,在 121 °C 下加热煮沸 20 min,之后补水至原体积,立即冷却降温到 60 °C,加入 2 mL 糖化酶糖化作用 4 h。待糖化结束后迅速降温至 40 °C,添加 1 mL 的酸性蛋白酶在 40 °C 下水浴作用 2 h。冷却至室温并使用 4 层纱布过滤获得清液,将糖度调整至 8、12、16 °Bx,备用。

种子培养基:在糖度为 8 °Bx 和 12 °Bx 的水解液中各加入 0.5% 的酵母浸粉,作为一级种子培养基和二级种子培养基,121 °C 下高温灭菌 20 min 备用。

液态发酵培养基:以糖度为 16 °Bx 的水解液作为液态发酵培养基,121 °C 下高温灭菌 20 min 备用。

1.2 仪器与设备

MS204S 分析天平:上海诚铭科技有限公司;UV-5100B 紫外分光光度计:上海元析仪器有限公司;Agilent 7890B 气相色谱仪、1200SL 液相色谱仪:美国 Agilent 公司;SJ511C 立式压力蒸汽灭菌器、IN613C 恒温培养箱:雅马拓科技贸易(上海)有限公司;Stab MIT 可叠加式全温振荡培养箱:上海润度生物科技有限公司;SIEMAN M-100 生物传感仪:深圳西尔曼科技有限公司;PCT-200 型聚合酶链式反应基因扩增仪:德国 Eppendorf 公司;Syngene GeneGenius 全自动凝胶成像系统:美国 SYNGENE 公司;S-9288 显微镜:深圳纽荷尔科技有限公司;SU1510 扫描电子显微镜:国仪量子技

术(合肥)股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 高耐受性酵母的筛选

取酱香型白酒酒醅 10 g 和 90 mL 无菌生理盐水置于 250 mL 无菌三角瓶中充分混合,在 30 °C、180 r/min 条件下振荡 1 h,吸取 1 mL 菌悬液至麦芽汁培养基中,30 °C 静置培养 48 h,稀释涂布于含 8% 无水乙醇且 pH 值为 2.0 的 YPD 平板上,30 °C 倒置培养 4~5 d,挑取长势良好的单菌落进行纯化,并保存于 4 °C 备用。

1.3.2 高耐受性酵母菌株的鉴定

1.3.2.1 形态学观察及生理生化试验

菌落形态观察:将纯化后的菌株以划线的方式在 WL 培养基上培养,30 °C 培养 2~3 d 后观察,记录菌落形态特征;显微镜观察:利用美兰染色法在显微镜下观

察细胞形态;扫描电子显微镜观察:菌株摇床培养至稳定期,取 5 mL 菌液加入 50 mL 离心管,7 000 r/min 离心 2 min,倒掉上清液;加入 20 mL 5% 固定液戊二醛溶液,涡旋振荡后静置,固定 2 h;加入 20 mL 磷酸缓冲盐溶液,7 000 r/min 离心 5 min,重复洗涤 3 次;分别再用 50%、70%、95% 乙醇溶液依次洗涤 1 次,无水乙醇洗涤两次,7 000 r/min 离心 20 min 后加入叔丁醇洗涤 3 次,4 000 r/min 离心 15 min。所得样品冷冻干燥后形态观察采用扫描电子显微镜。

生理生化试验:参考《酵母菌的特征与鉴定手册》进行生理生化试验^[9],包括糖发酵试验、碳源同化试验、氮源同化试验。

1.3.2.2 菌株分子生物学鉴定

参考赵雪平等^[10]的方法进行菌种鉴定,测序引物序列如表 1 所示。

表 1 测序引物序列

Table 1 Sequence of the primers

名称	序列 5'→3'	扩增序列	PCR 长度/bp
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	26S rDNA	600
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		

1.3.3 菌株耐受性能评估

1.3.3.1 耐温性能评估

采用点板试验法检测菌株的温度耐受性,将测试菌株挑取至 3 mL YEPD 培养基中,30 °C 培养 12~16 h,将菌液 OD₆₀₀ 调整至 0.5,吸取 2 μL 菌液分别滴加至 YPD 平板上,将其置于不同温度(30、35、37、40 °C)培养箱中倒置培养 1~2 d,每隔 12 h 观察菌株生长情况。

1.3.3.2 耐酸性能评估

与耐温性能评估方法类似,在含有不同乳酸(90、100、110 g/L)和乙酸(14、15、16 g/L)的 YPD 平板上进行点板试验,观察菌株生长情况。

1.3.3.3 耐乙醇性能评估

与耐温性能评估方法类似,在含有不同乙醇浓度(12%、13%、14%)的 YPD 培养基上进行点板试验,观察菌株生长情况。

1.3.4 菌株发酵性能检测

一级种子培养:从 YPD 培养基中挑取这 9 株单菌落和对照菌酿酒酵母 AY12 接种至一级种子培养基,装液量 6 mL/15 mL,30 °C 静置培养 24 h。

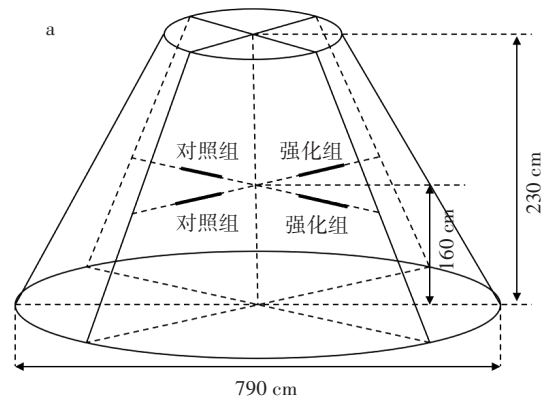
二级种子培养:将一级种子按照 10% 的比例接种至二级种子培养基,装液量 60 mL/150 mL,30 °C 静置培养 24 h。

发酵接种:将二级种子液以 10% 比例接种至液态发酵培养基中,装液量 150 mL/250 mL,30 °C 静置培

养,以 CO₂ 排放量来代表发酵的进程及发酵能力,每隔 12 h 称重 1 次,当两次失重小于或等于 0.1 g 时,发酵结束。

1.3.5 原位发酵试验

从平板挑取单菌落接种于 200 mL YEPD 培养基中,在 30 °C、200 r/min 条件下培养 48 h,用无菌生理盐水进行洗菌后重悬,将酵母菌剂以 10⁶ CFU/g 的接种量加入 20 kg 六轮次摊凉拌曲后的酒醅中,对照组为等体积的无菌生理盐水,混合后将其平均装入 2 个纯棉纱布袋中,放置在不同位置进行堆积发酵,具体位置如图 1a 所示,待堆积发酵结束后,取样进行理化检测,然后将样品进行翻拌,模拟移堆操作,然后再分装至纱布袋中,在窖池原位环境中继续发酵,具体位置如图 1b 所示。发酵结束后,取酒醅进行理化指标检测。



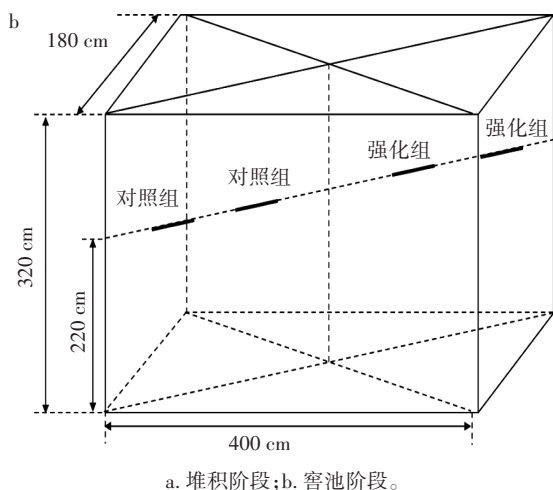


图1 原位堆积发酵和窖池发酵样品位置示意图

Fig.1 Location diagram of samples during *in-situ* stacking fermentation and pit fermentation

1.3.6 乙醇及风味物质检测

发酵代谢物检测:发酵结束后,取 100 mL 发酵液与 100 mL 蒸馏水混合均匀,蒸馏并收集 100 mL 馏出液,并用 0.22 μm 滤膜过滤,分别利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法和气相色谱(gas chromatography, GC)法检测乙醇含量和风味物质含量。

原位发酵酒醅代谢物检测:取 50 g 酒醅与 200 mL 5% 乙醇混合均匀,蒸馏并收集 100 mL 馏出液,并用 0.22 μm 滤膜过滤,分别利用液相法和气相法测定乙醇含量和风味物质含量。

液相检测条件:检测器为示差折光检测器(refractive index detector, RID);色谱柱为 GH0830078H (300 mm \times 7.8 mm);流动相为 5 mmol/L 的稀硫酸,流速为 0.6 mL/min;检测器温度为 45 $^{\circ}\text{C}$,柱温为 65 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 20 μL 。

气相检测条件:火焰离子化检测器(flame ionization detector, FID),毛细管色谱柱 HP-INNOWAX (50 m \times 320 μm \times 1.0 μm);载气为纯度为 99.99% 的高纯氮气;分流比为 1:10;进样口温度 200 $^{\circ}\text{C}$;进样量 1 μL ;检测器温度 200 $^{\circ}\text{C}$ 。升温程序为:50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 8 min,升温速率为 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升温至 180 $^{\circ}\text{C}$,保持 15 min,每个样品处理时间 43 min。

1.3.7 残淀粉的测定

样品中的残余淀粉含量利用酸水解法滴定检测,具体方法参考 T/CBJ 004—2018《固态发酵酒醅通用分析方法》。

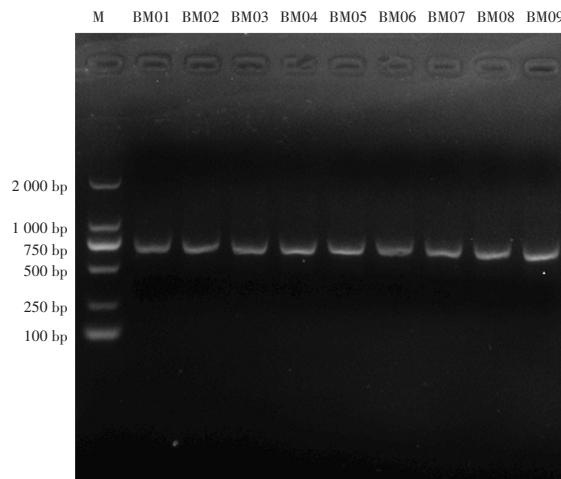
1.4 数据处理

所有试验数据均重复 3 次,数据以平均值 \pm 标准差表示;利用 GraphPad Prism 9 和 Excel 进行图标绘制,利用 SPSS26.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 高耐性菌株的分离纯化

经过 8% 无水乙醇和 pH2.0 的双压力胁迫条件下从酒醅中分离纯化出 9 株菌株,命名为 BM01~BM09,并利用真菌 26S rDNA 序列同源相似性分析进行菌种鉴定,琼脂糖凝胶电泳图见图 2,菌株测序比对结果见表 2。



M.DL2000 DNA marker.

图2 菌株 26S rDNA 序列扩增的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of strain 26S rDNA sequence amplification

表2 菌株测序结果

Table 2 Sequencing results of strains

编号	相似菌株(序列 ID)	相似度/%
BM01	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	100.00
BM02	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	99.83
BM03	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	100.00
BM04	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	99.83
BM05	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	100.00
BM06	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	100.00
BM07	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	100.00
BM08	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	100.00
BM09	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KM055467.1)	100.00

由图 2 可知,9 株菌的序列长度为 600 bp 左右。由表 2 可知,对这 9 株菌进行测序比对表明,与 *Z. bailii* (KM055467.1) 同源相似度在 99.83%~100.00% 之间,由此可以确定这 9 株菌均为拜耳接合酵母。

生理生化试验结果如表 3 所示。

由表 3 可知,9 株菌在生理生化试验中结果表现一致,发酵糖类试验中检测了葡萄糖、蔗糖、麦芽糖及淀粉,其中发酵糖只有葡萄糖,而蔗糖、麦芽糖和淀粉均无法发酵;碳源同化试验检测了阿拉伯糖、木糖、半乳糖、乙醇、乙酸、乳酸及柠檬酸,其中能够被菌株利用的是半乳糖、乙醇和乳酸,阿拉伯糖、木糖、乙酸及柠檬

表3 菌株的生理生化试验结果

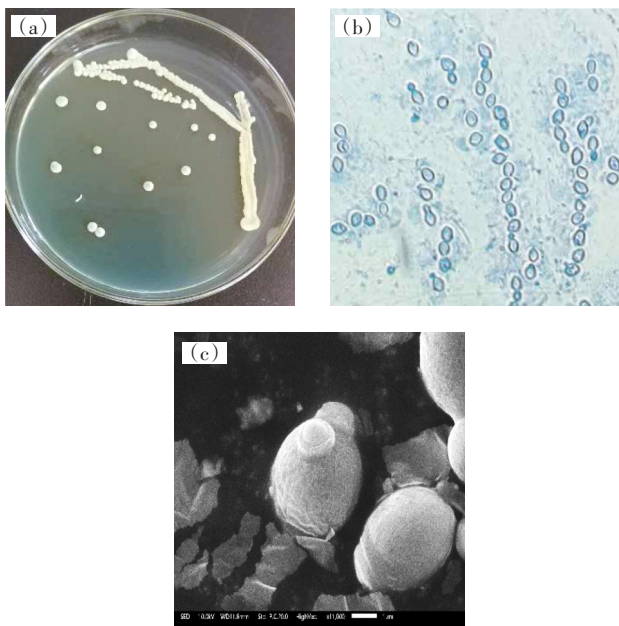
Table 3 Physiological and biochemical tests of strains

发酵糖类	生长情况	碳源同化	生长情况	氮源同化	生长情况
葡萄糖	+	阿拉伯糖	-	尿素	+
蔗糖	-	木糖	-	硝酸钾	-
麦芽糖	-	半乳糖	+	硫酸铵	+
淀粉	-	乙醇	+		
		乙酸	-		
		乳酸	+		
		柠檬酸	-		

注: +表示阳性, -表示阴性。

酸不能被利用;氮源同化试验检测了尿素、硝酸钾及硫酸铵,其中能够被菌株利用的是尿素和硫酸铵,硝酸钾不能被利用。

菌株 BM09 的菌落及细胞形态见图 3。



(a) 在 WL 培养基上菌落形态特征; (b) 显微镜下细胞形态特征(40×油镜); (c) 扫描电子显微镜下细胞形态特征。

图3 菌株 BM09 的菌落及细胞形态

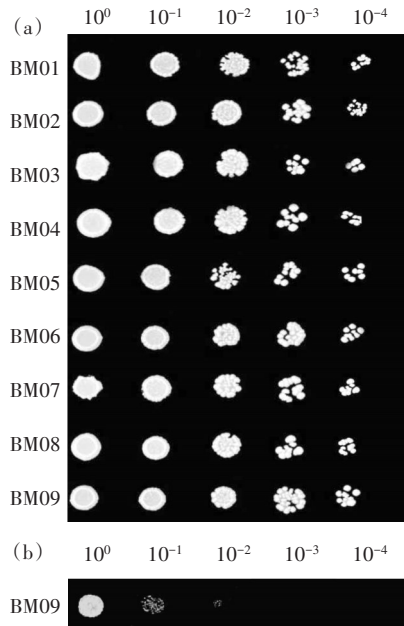
Fig.3 Colony and cell morphology of strain BM09

由图 3 可知, BM09 的菌落呈圆形, 凸起, 颜色为乳白色, 边缘整齐, 不透明, 质地均匀易挑起; 显微镜和电子显微镜下观察, 大多为球形或椭圆形的单细胞, 生殖方式为出芽繁殖, 是典型的酵母特征。

2.2 菌株的耐受性评价

2.2.1 温度耐受性

白酒酿造过程中温度是影响微生物的生长繁殖关键因素之一^[11]。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^[12]。BM01~BM09 在 35 °C 下生长情况见图 4(a), BM09 在 37 °C 下生长情况见图 4(b)。



(a) 35 °C; (b) 37 °C。10⁰ 为原菌液, 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 分别为稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍、10 000 倍的菌液。

图4 菌株在不同温度条件下的生长情况

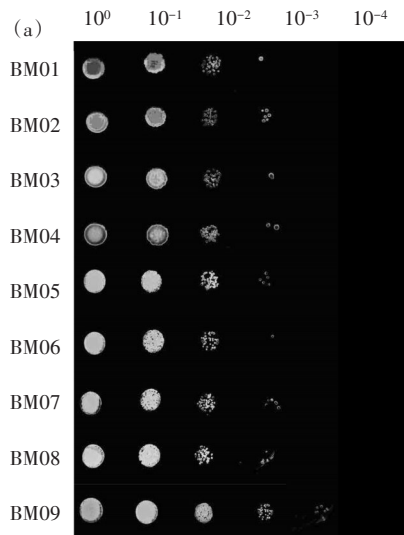
Fig.4 Growth of strains under different temperature conditions

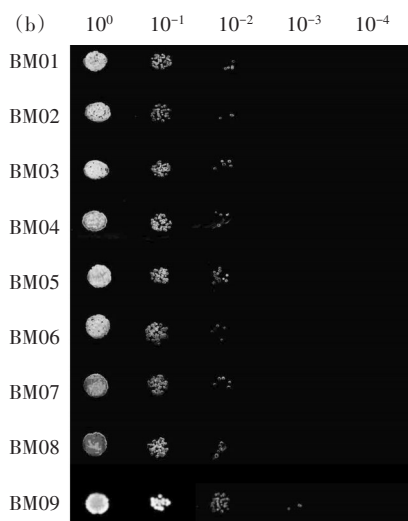
由 4(a) 可知, BM01~BM09 均能够在 35 °C 下生长良好。由图 4(b) 可知, BM09 更是能够在 37 °C 下生长。这些菌株对温度的良好耐受性是其能够在酱香型白酒酒醅中成为优势菌株的原因。

2.2.2 乙酸、乳酸耐受性

在酱香型白酒酿造过程中, 随着轮次的增加, 酒醅酸度逐渐升高, 核心功能酵母被抑制, 导致白酒的产量和品质下降, 所以对酵母的耐酸性的评估是必要的^[13]。乙酸和乳酸是发酵体系中酸度的主要贡献物质^[14], 因此考察了筛选获得菌株在不同乳酸、乙酸浓度下的生长情况, BM01~BM09 在不同胁迫条件下生长情况见图 5。

由图 5(a) 可知, BM01~BM09 能够耐受的乙酸含





(a) 16 g/L 乙酸; (b) 110 g/L 乳酸。10⁰ 为原菌液, 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 分别为稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍、10 000 倍的菌液。

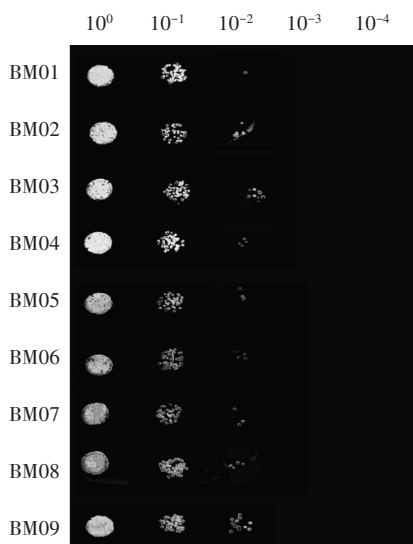
图 5 菌株在不同胁迫条件下生长情况

Fig.5 Growth of strains under different stresses

量为 16 g/L (pH1.62), 其中 BM09 菌液在稀释 10 000 倍的情况下依旧能够生长, 是这 9 株菌中对乙酸的耐受性最强。由图 5 (b) 可知, 在乳酸的胁迫压力下, BM01~BM09 均可以在乳酸含量 110 g/L (pH1.55) 下生长, 其中 BM09 的乳酸耐受性显著强于其他菌株。

2.2.3 乙醇耐受性

发酵过程中酵母是主要的乙醇生产者, 发酵体系中乙醇浓度升高, 细胞受到乙醇毒害作用, 从而抑制酵母生长, 使得发酵力不足, 产量下降^[15]。因此, 高乙醇耐受性是白酒功能酵母所必备的性能。BM01~BM09 在 14% 乙醇溶液胁迫条件下生长情况见图 6。



10⁰ 为原菌液, 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 分别为稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍、10 000 倍的菌液。

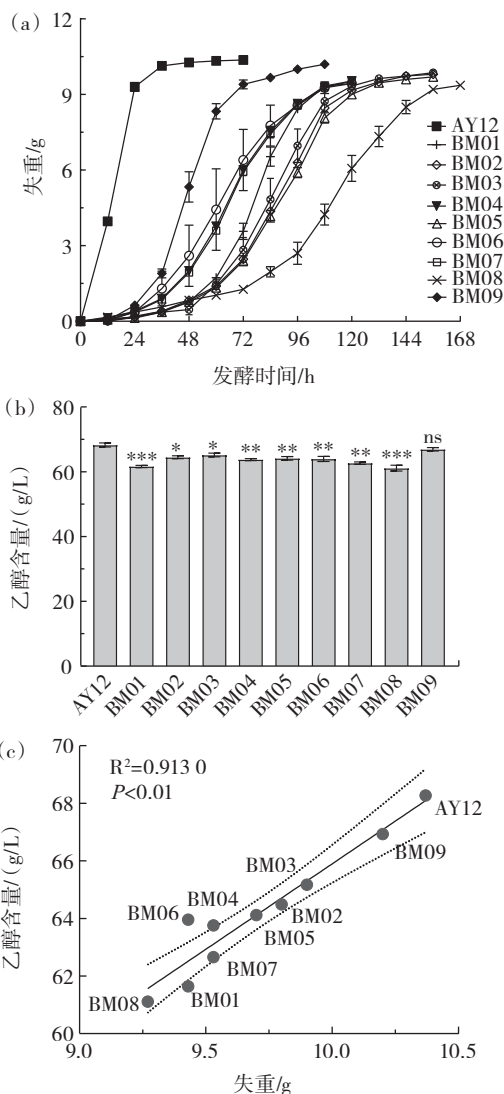
图 6 菌株在 14% 乙醇溶液胁迫条件下生长情况

Fig.6 Growth of strains under 14% ethanol stress condition

由图 6 可知, BM01~BM09 均能够耐受 14% 浓度的乙醇溶液, 其中 BM02、BM03 及 BM09 菌株耐受能力略强于其它菌株。

2.3 菌株发酵性能和代谢特征评价

除了耐受性, 酵母菌株的代谢特性也是影响基酒质量的重要因素。通过利用高粱水解液模拟白酒发酵, 对这 9 株菌的发酵性能和风味物质的合成情况进行了系统分析, 并因工业酿酒酵母 AY12 具备优良的发酵及产酒性能^[16], 所以以实验室保藏的酿酒酵母 AY12 作为对照菌株, 这 9 株菌在高粱水解液发酵条件下代谢特性分析见图 7。



(a) 不同菌株发酵失重变化曲线; (b) 不同菌株在高粱水解液条件下乙醇产量; (c) 不同菌株发酵失重与乙醇产量的关联分析。

显著性分析均以 AY12 为对照进行分析: ns 表示无显著性差异, * 表示在 $P < 0.05$ 水平下有显著性差异; ** 表示在 $P < 0.01$ 水平下有显著性差异; *** 表示在 $P < 0.001$ 水平下有显著性差异。

图 7 菌株在高粱水解液发酵条件下代谢特性分析

Fig.7 Metabolic characteristics of strains under fermentation of sorghum hydrolysate

由图 7(a)可知,酿酒酵母 AY12 发酵 24 h 后开始进入稳定期,而菌株 BM01~BM09 的发酵速度均显著低于酿酒酵母 AY12,其中 BM09 发酵速度最快,在 72 h 后进入稳定期;BM01、BM02、BM03、BM04、BM05、BM06 及 BM07 在 96~108 h 期间分别进入稳定期,而 BM08 发酵速度最慢,在 144 h 后进入稳定期。由图 7

(b)的乙醇产量可知,除了菌株 BM09[(66.93±0.51) g/L],其它菌株的乙醇产量也显著低于酿酒酵母 AY12 [(68.27±0.62) g/L],且由图 7(c)可知,发酵失重与乙醇产量之间的相关分析 R^2 为 0.913 0,相关性良好。

同时,利用 GC 检测这些菌株发酵所产生的主要风味物质,结果见表 4。

表 4 不同菌株在高粱水解液发酵条件下风味化合物的产量

Table 4 Yield of flavor compounds of different strains under fermentation of sorghum hydrolysate

菌株	风味酯/(mg/L)		高级醇/(mg/L)			
	乳酸乙酯	乙酸乙酯	正丙醇	异戊醇	异丁醇	苯乙醇
AY12	1.21±0.03	5.63±0.65	43.56±2.47	172.01±13.51	45.75±3.33	22.26±7.41
BM01	1.26±0.01 ^{ns}	25.50±1.16 ^{****}	57.32±1.82 ^{**}	127.04±4.80 ^{**}	55.21±2.31 [*]	19.37±1.24 ^{ns}
BM02	1.31±0.14 ^{ns}	33.01±3.57 ^{****}	75.18±4.29 ^{***}	152.89±15.37 ^{ns}	65.50±5.87 ^{**}	19.76±0.66 ^{ns}
BM03	1.25±0.07 ^{ns}	28.89±0.27 ^{****}	67.34±1.59 ^{***}	136.65±4.22 [*]	57.34±2.72 ^{**}	17.93±0.93 ^{ns}
BM04	1.22±0.08 ^{ns}	33.38±1.85 ^{****}	66.19±2.18 ^{***}	222.92±6.83 ^{**}	126.03±4.26 ^{****}	13.77±4.16 ^{ns}
BM05	1.29±0.05 ^{ns}	23.88±4.96 ^{****}	66.85±1.73 ^{***}	132.96±4.16 ^{**}	59.05±2.63 ^{**}	16.97±0.15 ^{ns}
BM06	1.43±0.17 ^{ns}	29.72±2.75 ^{****}	64.68±1.90 ^{***}	218.96±1.23 ^{**}	123.82±0.66 ^{****}	18.01±1.25 ^{ns}
BM07	1.42±0.22 ^{ns}	29.42±2.91 ^{****}	63.43±1.37 ^{***}	211.00±1.35 ^{**}	119.35±0.57 ^{****}	18.58±1.34 ^{ns}
BM08	1.41±0.33 ^{ns}	25.84±4.07 ^{****}	60.69±2.74 ^{**}	210.81±2.52 ^{**}	120.52±4.17 ^{****}	17.81±0.94 ^{ns}
BM09	1.53±0.06 [*]	36.29±1.19 ^{****}	44.61±0.87 ^{ns}	168.22±6.33 ^{ns}	45.78±3.26 ^{ns}	20.56±0.63 ^{ns}

注:显著性分析均是以 AY12 为对照进行分析:ns 表示无显著性差异,*表示在 $P<0.05$ 水平下有显著性差异,**表示在 $P<0.01$ 水平下有显著性差异,***表示在 $P<0.001$ 水平下有显著性差异,****表示在 $P<0.0001$ 水平下有显著性差异。

拜耳接合酵母作为产香酵母对酱香型白酒中乙酯类物质产生起到积极作用^[17]。由表 4 可知, BM01~BM09 的乙酸乙酯产量显著高于酿酒酵母 AY12,是 AY12 乙酸乙酯产量的 4.24 倍~6.45 倍,其中 BM09 的乙酸乙酯产量最高,为(36.29±1.19) mg/L。另外,仅有 BM09 的乳酸乙酯产量显著高于酿酒酵母 AY12。此外,高级醇是白酒的风味物质,其含量过高会使得酒味辛辣苦涩,不利于酒体品质^[18],因此筛选的菌株应该对高级醇产量不宜过高。分析发现 BM01~BM09 的高级醇产量和酿酒酵母 AY12 存在差异,其中 BM02、BM04、BM06、BM07 及 BM08 的高级醇产量是酿酒酵母 AY12 的 1.10 倍~1.51 倍,而 BM01、BM03、BM05 及 BM09 的高级醇产量是酿酒酵母 AY12 的 91.31%~98.48%,含量相当。

根据对菌株耐受性、发酵能力和风味化合物合成能力分析,BM09 菌株在温度、乙酸、乳酸及乙醇耐受性方面表现优良,另外在乙醇产量及产酯能力也是表现突出,因此,选取 BM09 作为强化菌剂应用于酱香型白酒原位生产发酵试验。

2.4 强化菌剂原位发酵试验

根据上述的菌株耐受性能分析和模拟白酒发酵的结果,选择菌株 BM09 作为强化菌株进行酱香型白酒原位生产发酵验证,以等体积无菌生理盐水作为对照。将菌株 BM09 培养液以接种量为 10^6 CFU/g 添加于第 7 轮次发酵生产过程中。堆积发酵阶段和窖池发酵阶

段的酒醅理化指标结果见表 5,发酵后的酒样风味物质结果见表 6。

表 5 酒醅中淀粉和乙醇含量

Table 5 Contents of starch and ethanol in fermented grains

不同发酵阶段	对照组		强化组	
	淀粉/%	乙醇/(g/L)	淀粉/%	乙醇/(g/L)
堆积发酵末期	10.85±0.34	0.65±0.03	11.87±0.14 ^{ns}	0.61±0.02 ^{ns}
窖池发酵末期	4.81±0.10	0.84±0.03	4.00±0.12 [*]	1.37±0.01 ^{**}

注:ns 表示无显著性差异,*表示在 $P<0.05$ 水平下有显著性差异,**表示在 $P<0.01$ 水平下有显著性差异。

由表 5 可知,添加 BM09 可以显著提高原料利用率,主要在窖池发酵阶段发挥作用。窖池阶段对照组淀粉从(10.85±0.34)%降低到(4.81±0.10)%,强化组淀粉从(11.87±0.14)%降低到(4.00±0.12)%,淀粉利用率提高了 29.80%。出窖后强化组酒醅中的乙醇含量显著提高了 63.10%,从对照组的(0.84±0.03) g/L 提升到(1.37±0.01) g/L。这些结果证实了高耐性拜耳接合酵母的使用可以显著提升对原料利用率,解决发酵力不足、产能下降的实际生产问题。目前拜耳接合酵母作为强化菌剂应用于白酒生产调节发酵的研究极少,但利用其他非酿酒酵母来强化应用的报道已有不少。如卢君等^[19]利用耐酸粟酒裂殖酵母作为强化菌剂应用于白酒生产试验,基酒产量显著提升了 13.47%~25.97%。林良才等^[20]筛选的一株高耐性库德里阿兹威氏毕赤酵

母在酱香型白酒生产中强化应用,原料利用率提高20%,乙醇产量提升13%。由此可以推断,高耐性非酿酒酵母在白酒生产的应用技术开发,是解决发酵力不足,出酒率低下等实际生产问题的有效手段。

表6 酒样中风味物质含量

Table 6 Contents of flavor compounds in different samples

风味物质	对照组酒样/(mg/L)	菌剂强化组酒样/(mg/L)
乙醛	15.29±1.84	4.53±0.98***
糠醛	19.25±4.99	23.51±3.06 ^{ns}
乙酸乙酯	13.15±0.53	24.35±2.20***
乳酸乙酯	161.84±16.21	154.49±16.31 ^{ns}
正丙醇	6.82±1.58	6.87±0.76 ^{ns}
异丁醇	6.80±1.58	7.78±0.49 ^{ns}
异戊醇	19.25±0.28	20.70±1.17 ^{ns}
苯乙醇	13.81±0.86	14.68±0.86 ^{ns}
乙酸	123.37±10.08	111.69±6.30 ^{ns}
乳酸	40.70±3.57	42.74±3.47 ^{ns}
丙酸	37.99±0.56	38.16±0.73 ^{ns}
丁酸	3.48±1.17	4.17±1.00 ^{ns}

注:ns表示无显著性差异,***表示在 $P<0.001$ 水平下有显著性差异。

由表6可知,菌剂强化组酒样中的乙酸乙酯与乙醛含量分别为(24.35±2.20)、(4.53±0.98) mg/L,对照组酒样中的乙酸乙酯与乙醛含量分别为(13.15±0.53)、(15.29±1.84) mg/L,乙酸乙酯显著提高了85.17%,乙醛显著降低了70.37%,这意味拜耳接合酵母应用于酱香型白酒后面轮次酿造中,可以有效增加基酒中酯类物质、降低乙醛含量,有利于改善第6轮次、第7轮次的基酒杂醇含量高、酯含量低的问题。

3 结论

酱香型白酒独特的酿造工艺造成了一个高温、高酸、高乙醇的酿造环境,这样的环境对功能微生物的耐受能力要求高,酵母的耐受能力越强,在酱香型白酒酿造过程中发挥功能作用更有优势。本研究以调节微生物来改善白酒生产问题为目标,从酱香型白酒酒醅中筛选获得了9株拜耳接合酵母,通过对耐受能力和代谢性能的评估对比,选出了一株高耐性、高产乙醇及高产酯的拜耳接合酵母BM09作为强化菌剂,进行原位发酵试验。结果表明BM09的强化应用提高了酱香型白酒第7轮次酿造中原料的利用率,使乙醇产量提高63.10%,酒体中乙酸乙酯含量提高85.17%,酒体中乙醛含量减少70.37%,改善了7轮次基酒中酯类物质低的现状。本研究结果对拜耳接合酵母在酱香型白酒酿造过程中的功能地位提供了理论支持,其作为功能菌剂添加到第7轮次的发酵结果对功能菌剂的应用及白酒酿造过程中微生物的定向调节与控制提供了重要参考。同时,为实现酱香型白酒稳定高质生产提供了新

的调控手段和策略。

参考文献:

- [1] TU W Y, CAO X N, CHENG J, et al. Chinese Baijiu: The perfect works of microorganisms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 919044.
- [2] GAO L, ZHOU J, HE G Q. Effect of microbial interaction on flavor quality in Chinese Baijiu fermentation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 960712.
- [3] WANG D Q, CHEN L Q, YANG F, et al. Yeasts and their importance to the flavour of traditional Chinese liquor: A review[J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2019, 125(2): 214-221.
- [4] 李景辉. 酱香型白酒生香酵母菌的筛选与应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2021.
LI Jinghui. Screening and applying of aroma-producing yeast in Moutai-flavor Baijiu[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2021.
- [5] WANG M Y, YANG J G, ZHAO Q S, et al. Research progress on flavor compounds and microorganisms of Maotai flavor Baijiu[J]. *Journal of Food Science*, 2019, 84(1): 6-18.
- [6] PALMA M, DE CANAVEIRA ROQUE F, GUERREIRO J F, et al. Search for genes responsible for the remarkably high acetic acid tolerance of a *Zygosaccharomyces bailii*-derived interspecies hybrid strain[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1070.
- [7] XU Y, ZHI Y, WU Q, et al. *Zygosaccharomyces bailii* is a potential producer of various flavor compounds in Chinese Maotai-flavor liquor fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2609.
- [8] 许焰. 酱香型白酒酿造拜耳接合酵母风味代谢特征及机制分析[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
XU Yan. Analysis on the flavor characteristics and mechanisms of *Zygosaccharomyces bailii* in Maotai-flavor liquor making[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [9] 巴尼特. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991.
BARNETT J A. Yeasts: characteristics and identification[M]. Qingdao: Ocean University Press, 1991.
- [10] 赵雪平, 温雅娇, 李正英, 等. 内蒙古乌海地区果园及发酵醪液中酿酒酵母菌的筛选[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(11): 178-183.
ZHAO Xueping, WEN Yajiao, LI Zhengying, et al. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* from orchards and fermentation mash in Wuhai Inner Mongolia[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(11): 178-183.
- [11] 李群, 林斌, 柯锋, 等. 高产乙酸乙酯毕赤酵母筛选及其耐受性能研究[J]. *酿酒科技*, 2022(12): 39-45.
LI Qun, LIN Bin, KE Feng, et al. Screening of yeast strain with high yield of ethyl acetate and study on its tolerance characteristics [J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2022(12): 39-45.
- [12] 庄孝杰, 吴群, 徐岩. 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[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(2): 251-262.
ZHUANG Xiaojie, WU Qun, XU Yan. Physiological characteristics of *Zygosaccharomyces bailii* and its interaction with *Bacillus licheniformis* in Chinese Maotai-flavor liquor making[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(2): 251-262.
- [13] SONG Z W, DU H, ZHANG Y, et al. Unraveling core functional microbiota in traditional solid-state fermentation by high-throughput amplicons and metatranscriptomics sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1294.

(下转第189页)

- XU Zhong, WANG Shengnan, SUN Yue, et al. Development of potato flour steamed bread[J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2018, 34(2): 231-237, 256.
- [16] 李逸鹤, 马栎, 嵇稚雯, 等. 小麦胚紫薯复合馒头的研究[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(24): 84-87.
- LI Yihe, MA Li, JI Zhiwen, et al. Study on the processing technology of steamed bread with purple sweet potato and wheat germ[J]. Food Research and Development, 2014, 35(24): 84-87.
- [17] 张首玉, 曾洁, 孙俊良. α -淀粉酶对馒头品质的影响及抑制回生的机理研究[J]. 食品工业, 2014, 35(3): 31-33.
- ZHANG Shouyu, ZENG Jie, SUN Junliang. Effect of α -amylase on qualities of steamed bread and its inhibition mechanism to retrogradation[J]. The Food Industry, 2014, 35(3): 31-33.
- [18] 张凤姝, 张天语, 曹燕飞, 等. 甘薯全粉对小麦面团及馒头品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(15): 11-16, 39.
- ZHANG Fengjie, ZHANG Tianyu, CAO Yanfei, et al. Effect of sweet potato powder on quality of wheat dough and steamed bread [J]. Food Research and Development, 2020, 41(15): 11-16, 39.
- [19] MONTHE O C, GROSMIRE L, NGUIMBOU R M, et al. Rheological and textural properties of gluten-free doughs and breads based on fermented cassava, sweet potato and sorghum mixed flours[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 101: 575-582.
- [20] 张天语. 紫马铃薯全粉馒头的研制及营养特性分析[D]. 淄博: 山东理工大学, 2019.
- ZHANG Tianyu. Development and nutritional characteristics analysis of purple potato steamed bread[D]. Zibo: Shandong University of Technology, 2019.

加工编辑:张岩蔚
收稿日期:2023-01-30

(上接第 149 页)

- [14] SONG Z W, DU H, ZHANG M H, et al. *Schizosaccharomyces pombe* can reduce acetic acid produced by *Baijiu* spontaneous fermentation microbiota[J]. Microorganisms, 2019, 7(12): 606.
- [15] 杨小冲, 陈忠军, 赵洁, 等. 耐高酒精野生酵母菌株的筛选及其特性研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(8): 67-71.
- YANG Xiaochong, CHEN Zhongjun, ZHAO Jie, et al. Screening of wild yeast strain with high alcohol tolerant and its performance study[J]. China Brewing, 2017, 36(8): 67-71.
- [16] 任津莹, 马艳蕊, 刘港, 等. 一种新型产乙酸乙酯酿酒酵母菌株的构建[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 162-169.
- REN Jinying, MA Yanrui, LIU Gang, et al. Construction of a novel ethyl acetate-producing *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 162-169.
- [17] GARAVAGLIA J, DE CASSIA DE SOUZA SCHNEIDER R, CAMARGO MENDES S D, et al. Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production[J]. Microbiological Research, 2015, 173: 59-65.
- [18] 王荣钰, 赵金松, 苏占元, 等. 酱香型白酒关键酱香风味物质研究现状[J]. 酿酒科技, 2020(6): 81-86.
- WANG Rongyu, ZHAO Jinsong, SU Zhanyuan, et al. Research status of key flavoring compounds of Jiangxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2020(6): 81-86.
- [19] 卢君, 山其木格, 唐平, 等. 耐酸酵母菌株的筛选及其在酱香白酒酿造过程中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2019(10): 106-111.
- LU Jun, SHAN Qimuge, TANG Ping, et al. Screening of acid-tolerant yeast strains and their application in the production of Jiangxiang Baijiu[J]. Liquor - Making Science & Technology, 2019(10): 106-111.
- [20] 林良才, 白茹, 高滢, 等. 高耐性库德里阿兹威氏毕赤酵母的筛选及应用[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(3): 60-67.
- LIN Liangcai, BAI Ru, GAO Ying, et al. Screening of a robust high-tolerance *Pichia kudriavzevii* strain and its application in Baijiu fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(3): 60-67.

责任编辑:王艳
收稿日期:2023-04-21