

食品工业科技

SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY

- 荷兰《文摘与引文数据库》(Scopus)
- 瑞典开放存取期刊目录 DOAJ
- 美国《化学文摘》CA
- 英国《食品科技文摘》FSTA
- 日本科学技术振兴机构数据库JST
- 世界期刊影响力指数 (WJCI) 报告
- 食品科学与工程领域高质量科技期刊分级目录第一方阵T1
- 北大核心期刊
- 中国精品科技期刊
- 中国科技核心期刊CSTPCD
- 中国核心学术期刊RCCSE
- 中国农林核心期刊A
- 中国生物医学Sino Med

半月刊 ISSN 1002-0306 CN 11-1759/TS

邮发代号: 2-399

乳酸胁迫对*Pichia kudriavzevii*固态发酵特性的影响

潘婉舒, 林晓芳, 杨小平, 徐洋, 侯鑫

Effects of Lactic Acid Stress on the Solid-state Fermentation of *Pichia kudriavzevii*

PAN Wanshu, LIN Xiaofang, YANG Xiaoping, XU Yang, and HOU Xin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050193>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

潘婉舒, 林晓芳, 杨小平, 等. 乳酸胁迫对 *Pichia kudriavzevii* 固态发酵特性的影响 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 116–122. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050193

PAN Wanshu, LIN Xiaofang, YANG Xiaoping, et al. Effects of Lactic Acid Stress on the Solid-state Fermentation of *Pichia kudriavzevii*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 116–122. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050193

· 生物工程 ·

乳酸胁迫对 *Pichia kudriavzevii* 固态发酵特性的影响

潘婉舒¹, 林晓芳^{2,*}, 杨小平³, 徐洋¹, 侯鑫¹

(1. 宜宾学院农林与食品工程学部, 四川宜宾 644000;

2. 四川省春源品悟酒业有限公司, 四川成都 611530;

3. 玉蝉集团有限公司, 四川泸州 646603)

摘要: 浓香型白酒糟醅富含乳酸, 库德毕赤酵母 (*Pichia kudriavzevii*) 为其中优势酵母。为探究乳酸对浓香型白酒优势酵母固态发酵特性的影响, 在不同浓度的乳酸胁迫下, 从碳源消耗、生长因子利用、高温耐受性以及主要代谢产物生成等方面, 考查 *P. kudriavzevii* (编号: PY1) 的生长代谢转变。结果表明, 乳酸胁迫对 *P. kudriavzevii* 菌落与细胞形态无明显影响, 对细胞生长有一定抑制, 且这种可逆抑制可被氨基酸及维生素削弱, 当培养温度超过 44 °C, 乳酸对菌株生长的影响逐渐让位于温度。代谢方面, 乳酸可提高葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、果糖和蔗糖利用率; 增加乙醇和酯类生成量、降低高级醇生成量。综上, 乳酸可通过影响酵母生长代谢影响浓香型白酒风味形成, 可作为浓香型白酒发酵调控因子。

关键词: 毕赤酵母, 乳酸胁迫, 生长, 代谢, 固态发酵

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)04-0116-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050193

本文网刊:



Effects of Lactic Acid Stress on the Solid-state Fermentation of *Pichia kudriavzevii*

PAN Wanshu¹, LIN Xiaofang^{2,*}, YANG Xiaoping³, XU Yang¹, HOU Xin¹

(1. Faculty of Agriculture, Forestry and Food Engineering, Yibin University, Yibin 644000, China;

2. Sichuan Chunyuan Pinwu Wine Industry Co., Ltd., Chengdu 611530, China;

3. Yuchan Group Co., Ltd., Luzhou 646603, China)

Abstract: Nongxiangxing Baijiu distiller's grains are rich in lactic acid. *Pichia kudriavzevii* is the dominant yeast. The effects of lactic acid on the solid-state fermentation characteristics of Nongxiangxing Baijiu of the dominant yeast were explored under lactic acid stress of different concentrations. The growth and metabolism changes of *Pichia kudriavzevii* (PY1) were investigated from the aspects of carbon source consumption, growth factor utilization, high temperature tolerance and main metabolite production. Results showed that, the lactic acid stress had no significant effect on the colony and cell morphology of *P. kudriavzevii*, but had a certain inhibition on the growth of cell. This reversible inhibition could be weakened by amino acids and vitamins. When the culture temperature exceeds 44 °C, the effect of lactic acid on the growth of the strain was gradually replaced by temperature. In metabolism, lactic acid could improve the utilization rate of glucose, galactose, maltose, fructose and sucrose, increase the production of ethanol and esters, and reduce the production of higher alcohols. In summary, the lactic acid could affect the flavor formation of Nongxiangxing Baijiu by affecting the growth and metabolism of yeast, and could be used as the fermentation regulation factor of Nongxiangxing Baijiu.

收稿日期: 2023-05-17

作者简介: 潘婉舒 (1993-), 女, 硕士, 助教, 研究方向: 食品微生物与发酵工程, E-mail: 554296239@qq.com。

* 通信作者: 林晓芳 (1986-), 女, 学士, 工程师, 研究方向: 白酒酿造技术, E-mail: 365521963@qq.com。

Key words: *Pichia kudriavzevii*; lactic acid stress; growth; metabolite; solid state fermentation

发酵食品中,酵母与乳酸菌的相互作用一直是研究的热点^[1],如:改善产品风味、改善食品益生特性与质构、提高酒类发酵效率等。浓香型白酒糟醅乳酸含量高达 20~100 g/kg,可作为研究乳酸环境酵母生长代谢的范例。库德毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)是浓香型白酒发酵过程中的优势酵母^[2-5],可产有机酸、酯类和酚类等多种浓香型白酒风味物质,改善酒体风味^[6-7],对浓香型白酒产量及品质有重要影响。

在浓香型白酒这一多微共酵发酵体系中,*P. kudriavzevii* 的生长代谢受到多种生化及环境因子的影响,特别是乳酸。乳酸是浓香型白酒发酵糟醅中含量最高的有机酸^[8-10],且其含量不仅与微生物产酸有关,还受蒸酒压力、时间的影响,故不同窖池乳酸含量存在差异^[11-14]。Deng 等^[11]研究发现乳酸会抑制白酒中核心酵母生长代谢,同时酵母可通过降解乳酸来适应此种乳酸胁迫。张勤等^[15]筛选到 2 株可在含 68 g/L 乳酸中生长良好的耐酸酵母菌株,能够降解环境中的酸,说明酵母应对乳酸胁迫的重要机制为降解乳酸。还有研究发现一些耐乳酸酵母菌株具有较强维持细胞膜稳定性和积累海藻糖及麦角固醇的能力,这也是其对抗乳酸的重要作用机理^[16]。乳酸的生成会影响发酵环境 pH,不同酵母的最适产酒、产酯 pH 存在差异,进而影响糟醅中酵母代谢产物^[17],这种差异对糟醅中酵母的生长代谢有何影响,至今尚无定论。

本研究针对 1 株分离自浓香型白酒糟醅、产香性能优良的 *P. kudriavzevii* 菌株,分别在不同乳酸浓度的 YNB 培养基及五粮粉培养基培养 *P. kudriavzevii* 菌株,检测其在碳源和氮源利用率、耐高温以及代谢产物等方面的差异,探究乳酸胁迫对 *P. kudriavzevii* 菌株发酵性能的影响,为其生产应用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Pichia kudriavzevii 菌株 PY1 分离自浓香型白酒糟醅,现保存于固态发酵资源利用四川省重点实验室;根霉粉 安琪酵母股份有限公司;发酵原料:五粮粉(高粱 36%、大米 22%、糯米 18%、小麦 16%、玉米 8%)、糠壳 四川省春源品悟酒业有限公司;五粮固体培养基(100 g/18 mL):五粮粉 80 g、糠壳 20 g,混匀蒸制备用,补加 18 mL 无菌水;五粮液体培养基(100 g/200 mL):五粮粉 80 g、糠壳 20 g,混匀蒸制备用,补加 200 mL 无菌水;YNB-乳酸培养基:在 YNB 培养基基础上,使用前按比例添加过 0.22 μm 滤膜的乳酸;WL 培养基、YPD 培养基、YNB 培养基 青岛海博生物科技有限公司;乳酸、氯化钠、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、DNS 显色剂、D-半乳糖、L-赖氨酸、L-组氨酸、L-亮氨酸等 分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司;维生素 B₁、维生素 B₂、维

生素 B₆ 纯度 ≥ 98%,成都科龙试剂有限公司;糖化酶 夏盛酶生物技术有限公司。

SpectraMax M2 多功能酶标仪 美谷分子仪器(上海)有限公司;A91plus 气相色谱仪 常州磐诺仪器有限公司;Lynx6000 离心机 赛默飞世尔科技公司;MSDDR701 光学显微镜 迈时迪(东莞)科技有限公司;BSD-YX2200 摇床 上海沪粤明科学仪器有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株活化 将甘油保藏的 PY1 酵母菌株无菌操作接种 1 mL 至 20 mL 的 YPD 液体培养基中,28 °C 摇床培养 2 d,采用平板划线法接种至 WL 固体培养基,28 °C 培养 2 d 分离,挑取适量纯培养菌株至 WL 培养基重复划线接种,经 3 次划线纯化后,复接种于 YPD 液体培养基,28 °C 摇床培养 2 d 后获得实验用菌液,放入 4 °C 的冰箱中保藏备用。实验前挑取适量液体保存的 PY1 酵母菌株至 WL 培养基划线接种,获得 PY1 酵母菌株单菌落。

1.2.2 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株液、固态生长的影响 液态培养:将 PY1 酵母菌株单菌落接种到不含乳酸的 YNB 培养基中,进行不同乳酸浓度的连续培养(28 °C 2 d/阶段),阶段培养结束后按比例补加过 0.22 μm 滤膜的乳酸,分别至乳酸浓度为 20、40 g/L。阶段培养结束后检测酵母细胞存活率,再收集培养细胞,接种到不含乳酸(0 g/L)的 YNB 培养基,28 °C 下培养 2 d,检测酵母细胞存活率,探究不同浓度乳酸对酵母菌株存活率的影响,确定酵母菌株最大耐受乳酸添加量。

固态培养:将 PY1 酵母菌株单菌落分别划线接种于无乳酸和最大耐受(40 g/L)乳酸添加量的 WL 固体培养基,28 °C 下培养 2 d,观察并记录菌落形态变化。

存活率:液体和固体培养均采用无菌接种环挑取少许菌体于 10 mL 无菌水中稀释,混合均匀后吸取 0.2 mL 稀释液滴于血细胞计数板中央,添加 1 滴美蓝染色剂,染色 3 min,在光学显微镜下观察菌体菌落、细胞形态并记录死细胞数(染为蓝色)和总细胞数目,按照公式计算存活率,计算公式如下^[18]:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{活细胞数目}(\text{个})}{\text{总细胞数目}(\text{个})} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.3 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株高温耐受性的影响 白酒糟醅发酵期间内部温度可达到 50 °C,故出于实际应用考虑,评估 PY1 酵母菌株的生长上限温度。将 PY1 酵母菌株单菌接种到 YNB 培养基,不同培养温度(44、46、48 °C)培养 2 d,以发酵结束后酵母菌数(OD_{560 nm} 值)评估酵母菌株耐高温特性。

1.2.4 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株碳源利用的影响

将 PY1 酵母菌株单菌落依次划线接种到添加 20 g/L 乳酸和 5 g/L 不同碳源(葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖、果糖、蔗糖)的 YNB 培养基中, 28 °C 下培养 2 d, 考查 PY1 酵母菌株对不同碳源的利用情况。并设置不添加乳酸不同碳源 YNB 培养基培养 PY1 酵母菌株作为对照组。发酵结束后, 采用 DNS 法^[19]测定样品中剩余糖含量, 评估乳酸对 PY1 酵母菌株不同碳源利用情况的影响。

1.2.5 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株生长因子作用效果的影响

五粮提取液制备: 称取 2 kg 五粮粉与 4 L 水煮至开花, 冷却至 40 °C 左右, 加入 2.8 g 糖化酶搅拌均匀, 用纱布过滤。将滤液 4000 r/min 离心 5 min 备用。将 PY1 酵母菌株单菌落分别接种到添加 20 g/L 乳酸的五粮提取液和 YNB 混合培养基(1:1, v/v)中, 参照文献[20]设置生长因子。分别添加 0.5 g/L 不同生长因子(赖氨酸、组氨酸、亮氨酸、磷酸氢二钠、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 B₆), 28 °C 下培养 36 h, 测定发酵过程中(0、12、24、36 h)酵母菌数(OD_{560 nm} 值), 并以酵母在 560 nm 处的吸光度增加值($\Delta OD_{\text{增加值}} = OD_{\text{测定值}} - OD_{0\text{h}}$), 评估乳酸胁迫下 PY1 酵母菌株对不同生长因子的利用情况。并设置不添加乳酸不同生长因子 PY1 酵母菌株作为对照组。

1.2.6 乳酸添加量对 *P. kudriavzevii* 菌株液态发酵

产挥发性代谢产物的影响 将 PY1 酵母菌株单菌落分别接种到不同浓度乳酸(0、20、40 g/L、回 0)的 YNB-葡萄糖培养基(添加 5 g/L 葡萄糖), 28 °C 条件下培养 36 h, 采用气相色谱^[13,21]的方法测定发酵液挥发性代谢产物。气相色谱检测采用 Lzp 930 色谱柱(50 m×0.25 mm×0.25 μm), 进样温度 220 °C, 检测温度 250 °C, 进样量 0.4 μL, 载气为氮气, 流速 1 mL/min, 分流比 10:1, 升温程序: 55 °C 保持 3 min, 以 3.5 °C/min 升温至 150 °C, 保持 1 min, 再以 10 °C/min 升温至 200 °C, 保持 2 min, 再以 20 °C/min 升温至 220 °C, 保持 10 min。

1.2.7 乳酸胁迫下 *P. kudriavzevii* 菌株固液态发酵

实验 固态发酵: 参照文献[20]研究方法, 将 2% (m/m)根霉粉和 2%(v/m)酵母菌液(OD_{560 nm} 为 0.5)混合依次接种到不同乳酸(0、20 g/L)添加量的五粮固体培养基, 28 °C 发酵 7 d, 为酵母菌固态发酵实验组; 设置不接菌和不添加乳酸的五粮固体培养基为对照组。

液态发酵: 将 2%(m/m)根霉粉和 2%(v/m)酵母菌液(OD_{560 nm} 为 0.5)混合接种到不同乳酸(0、20 g/L)添加量的五粮液体培养基, 28 °C 发酵 7 d, 为酵母菌固态发酵实验组; 设置不接菌和不添加乳酸的五粮液体培养基为对照组。

1.2.8 检测方法 发酵结束后取 10 mL 发酵液测定总酸含量^[22]; 发酵结束后取 100 g 固体(液体)参照文

献[21]样品前处理方法采用气相色谱法^[13]检测固液态发酵代谢产物。葡萄糖采用 DNS^[13]法测定; 总酸含量测定采用酸碱滴定法^[17]。

1.3 数据处理

所有处理组均设 3 个重复, 采用 Excel 2019、SPSS 22.0、GraphPad Prism 9.1.2 处理数据。

2 结果与分析

2.1 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株生长的影响

图 1 展示 *P. kudriavzevii* 菌落及细胞形态。在添加 40 g/L 乳酸的情况下, PY1 酵母菌株菌落形态与细胞形态无明显变化。

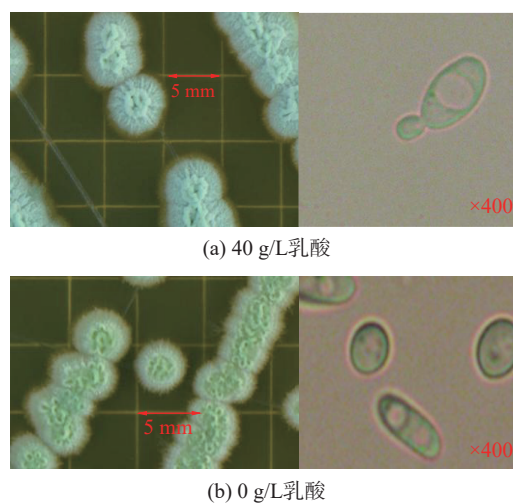


图 1 *P. kudriavzevii* 菌落及细胞形态
Fig.1 Morphology of *P. kudriavzevii* under lactic acid stress

图 2 展示不同浓度乳酸对 *P. kudriavzevii* 存活率的影响, 可以看出, 乳酸胁迫会降低 *P. kudriavzevii* 存活率, 解除乳酸胁迫后酵母菌存活率恢复到原有水平($P < 0.05$)。当乳酸浓度为 20 g/L 时, 酵母菌的存活率开始受到影响, 当乳酸浓度升高到 40 g/L 时, 酵母菌存活率显著降低($P < 0.05$), 为 66.36%。重新解除乳酸胁迫后(乳酸添加量 0 g/L), 酵母菌存活率恢复到原有水平($P < 0.05$), 为 85.62%。表明这种抑制是可逆的, 实际生产中也可通过降低糟醅过高的酸度

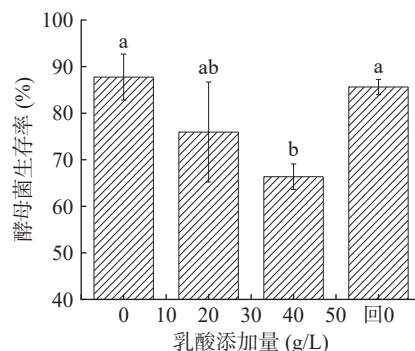


图 2 乳酸浓度对 *P. kudriavzevii* 菌株生长的影响
Fig.2 Effects of lactic acid concentration on the growth of *P. kudriavzevii*

注: “回 0”指乳酸浓度从 40 g/L 降低到 0 g/L; 不同字母表示具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

一定程度恢复酵母的发酵活力。

由图 3 可知, 乳酸浓度为 20 g/L YNB 液体培养基中酵母的生存率下降且不显著, 20 g/L 乳酸浓度对 *P. kudriavzevii* 菌株存活率影响较小; 此外, 浓香型白酒发酵过程中糟醅乳酸含量通常为 10~20 g/kg^[1]。因此, 20 g/L 乳酸浓度可作为 *P. kudriavzevii* 菌株乳酸胁迫液体培养的适宜浓度。该浓度下固液态培养对酵母乳酸耐受性的响应差异。可以看出, 添加 20 g/L 乳酸的固态和液态培养基中, *P. kudriavzevii* 菌株 PY1 的存活率均有所下降, 分别下降了 11.80% 和 6.63%, 但仅固态培养条件下的存活率下降达到显著水平, 表明固态发酵条件下, *P. kudriavzevii* 酵母对乳酸胁迫的响应更强, 20 g/L 的乳酸已可显著抑制 *P. kudriavzevii* 生长。培养结束时, 液态培养酵母菌菌落总数为 10⁷ CFU/mL, 固态培养为 10⁶ CFU/g。

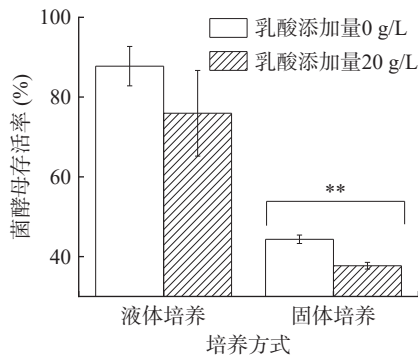


图 3 乳酸胁迫下培养方式对 *P. kudriavzevii* 酵母菌株生长的影响

Fig.3 Effects of culture methods on the growth of *P. kudriavzevii* under lactic acid stress

注: “**”表示与无乳酸组比较存在极显著差异($P<0.01$)。

2.2 乳酸与温度对 *P. kudriavzevii* 生长的影响

白酒糟醅发酵期间窖内发酵最高温度可达 50 °C, 能够耐受较高温度的酵母菌株更能适应浓香型白酒窖池内部环境^[23]。图 4 可以看出, 在 20 g/L 乳酸、44 °C 高温共同作用下, *P. kudriavzevii* 菌株仍能很好地生长(OD 值>0.5), 表明该酵母能适应糟醅

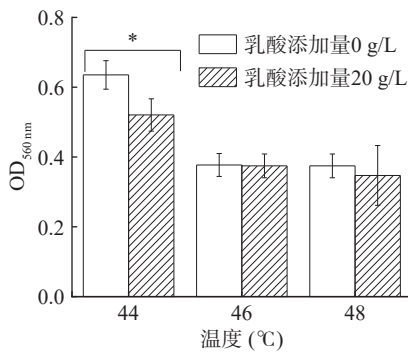


图 4 乳酸胁迫下高温对 *P. kudriavzevii* 菌株生长的影响

Fig.4 Effect of high temperature on the growth of *P. kudriavzevii* under lactic acid stress

注: “*”表示与无乳酸组比较存在显著差异($P<0.05$)。

的高温高酸环境, 但相较于对照组, 20 g/L 的乳酸胁迫可显著抑制 PY1 酵母菌株的生长($P<0.05$); 当温度升高至 46 °C 以上, PY1 酵母菌株的生长受到明显抑制(OD 值<0.5), 且这种抑制与是否存在 20 g/kg 的乳酸胁迫无关, 表明环境温度 44 °C 以下, *P. kudriavzevii* 的生长受乳酸和温度共同影响, 且相同温度下乳酸胁迫可显著抑制酵母生长($P<0.05$); 温度超过一定范围时, *P. kudriavzevii* 的生长主要受高温抑制, 乳酸胁迫对其生长影响不显著。因此, 浓香型白酒发酵应尽量控制糟醅温度低于 44 °C, 乳酸浓度低于 20 g/L。

2.3 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株利用碳源的影响

由表 1 可知, 相同碳源乳酸胁迫下碳源利用率和对照组差异不显著; 但乳酸胁迫下不同碳源利用率存在差异, 其中 D-半乳糖含量最低(3.27 g/L)、碳源利用率最高为 34.60%。在添加 20 g/L 乳酸胁迫条件下, *P. kudriavzevii* 菌株对碳源的利用量均有不同程度的提升, 其中葡萄糖利用率提高了 1.2%、D-半乳糖提高了 4.2%、麦芽糖提高了 14.6%、果糖提高了 6.2%、蔗糖提高了 1.6%, 可见乳酸胁迫对 PY1 酵母菌株利用麦芽糖的影响最大, 麦芽糖的利用率从 9% 上升到 23.6%, 表明乳酸胁迫可促进 *P. kudriavzevii* 菌株对碳源的利用, 特别是对淀粉水解产物麦芽糖的利用, 这有助于提升浓香型白酒糟醅的淀粉利用率, 特别是在白酒发酵中后期随着乳酸菌的大量增殖, 乳酸浓度逐渐上升^[24], 能够在乳酸环境下进一步利用各种碳源的 *P. kudriavzevii* 仍可持续发酵, 榨干糟醅中的可发酵糖, 这对提高浓香型白酒原料利用率有重要意义。

表 1 乳酸胁迫对 *P. kudriavzevii* 利用碳源的影响

Table 1 Effect of lactic acid stress on carbon source utilization by *P. kudriavzevii*

乳酸添加量 (g/L)	含糖量(g/L)				
	葡萄糖	D-半乳糖	麦芽糖	果糖	蔗糖
0	4.73±0.14 ^a	3.48±0.21 ^b	4.55±0.54 ^a	4.44±0.22 ^a	4.45±0.15 ^a
20	4.67±0.16 ^a	3.27±0.28 ^d	3.82±0.31 ^b	4.13±0.18 ^{bc}	4.37±0.23 ^{ab}

注: 不同字母代表同一行具有显著性差异, $P<0.05$ 。

2.4 乳酸胁迫下主要生长因子对 *P. kudriavzevii* 菌株的促进作用

表 2 为固态发酵条件下, 不同生长因子对 *P. kudriavzevii* 菌株生长的促进作用(以酵母在 560 nm 处的吸光度增加值计)。结果显示 7 种生长因子在有乳酸胁迫的情况下均可促进 *P. kudriavzevii* 菌株生长, 并且生长因子可在一定程度上削弱乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株生长的抑制作用, 其中维生素 B₁ 对乳酸胁迫的纠正效果最明显($\Delta OD_{560\text{ nm}}=0.342$), 表明添加维生素 B₁ 可能有助于改善发酵中后期优势酵母 *P. kudriavzevii* PY1 的生长情况, 延长其发酵过程。

表2 生长因子对 *P. kudriavzevii* 菌株生长的影响
Table 2 Effects of growth factors on the growth of *Pichia kudriavzevii*

组别	发酵时间(h)			
	0	12	24	36
无生长因子-乳酸	0	0.115±0.01 ^{cd}	0.095±0.02 ^{de}	0.168±0.05 ^{cd}
无生长因子	0	0.094±0.01 ^d	0.082±0.01 ^{ef}	0.148±0.05 ^d
赖氨酸	0	0.142±0.01 ^{bc}	0.185±0.01 ^{abc}	0.284±0.04 ^a
赖氨酸-乳酸	0	0.150±0.02 ^b	0.085±0.01 ^{ef}	0.173±0.10 ^{cd}
组氨酸	0	0.155±0.00 ^{ab}	0.224±0.06 ^{ab}	0.336±0.07 ^a
组氨酸-乳酸	0	0.149±0.02 ^b	0.075±0.01 ^{ef}	0.151±0.06 ^{cd}
亮氨酸	0	0.128±0.00 ^{bc}	0.161±0.01 ^{bcd}	0.269±0.02 ^{ab}
亮氨酸-乳酸	0	0.159±0.02 ^{ab}	0.074±0.03 ^{ef}	0.152±0.00 ^{cd}
磷酸氢二钠	0	0.133±0.01 ^{bc}	0.195±0.02 ^{ab}	0.294±0.02 ^a
磷酸氢二钠-乳酸	0	0.084±0.01 ^d	0.018±0.00 ^f	0.132±0.02 ^d
维生素B ₁	0	0.183±0.00 ^a	0.239±0.09 ^a	0.342±0.04 ^a
维生素B ₁ -乳酸	0	0.186±0.02 ^a	0.094±0.02 ^{de}	0.186±0.05 ^{bcd}
维生素B ₂	0	0.095±0.00 ^d	0.182±0.04 ^{abc}	0.160±0.00 ^{cd}
维生素B ₂ -乳酸	0	0.142±0.03 ^{bc}	0.122±0.06 ^{cde}	0.105±0.06 ^d
维生素B ₃	0	0.133±0.03 ^{bc}	0.186±0.01 ^{abc}	0.295±0.06 ^a
维生素B ₃ -乳酸	0	0.132±0.01 ^{bc}	0.157±0.02 ^{bcd}	0.249±0.08 ^{abc}

注：“-乳酸”表示添加乳酸组别；无“-乳酸”表示未添加乳酸组别；表中OD值为酵母在OD₅₆₀ nm处的吸光度增加值；不同字母代表同一列显著性差异，P<0.05。

2.5 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株液态发酵主要挥发性代谢产物的影响

酵母菌在 YNB 液体培养基中主要挥发性代谢产物的 GC 分析结果如表 3 所示。酵母菌发酵代谢产物与其利用的碳源有关，YNB 液体培养基不同于传统酿造环境可以用于酵母菌发酵前体物质较少，酵母菌在 YNB 液体培养基中挥发性代谢产物种类较少，仅有甲醇、乙醛、乙醇、乙酸乙酯、异丁醇等几种，其中，乙酸乙酯含量随乳酸浓度的升高而降低，说明乳酸胁迫导致酵母菌的数量下降，已有研究发现，乙酸乙酯的生成与酵母菌关系密切^[25-27]，推测其为初级代谢产物，本研究也证实了这一点，可以看出，当乳酸添加量增加到 40 g/L 时，乙酸乙酯含量最低

(0.16 mg/L)，乙酸乙酯的减量与酵母数量的减少有关，故该酵母菌株代谢产酯能力减弱。但在赋予 *P. kudriavzevii* 更丰富的发酵前体物质(五粮粉)后，*P. kudriavzevii* 产酯能力明显提升，在同等条件下乙酸乙酯含量增加到 1561.75 mg/L(表 4)。随着乳酸胁迫作用的增强，异丁醇含量从 0.34 mg/L 显著减少到 0.13 mg/L(P<0.05)，解除乳酸胁迫后异丁醇的含量减少，这也与表 3 酵母菌株模拟生产应用结果相符，说明乳酸胁迫的作用可有效降低 PY1 酵母的高级醇产量，有助于提升白酒的品质^[28-29]。

表3 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株 YNB 培养基液态发酵主要挥发性代谢产物影响

Table 3 Effects of lactic acid on volatile metabolites produced by YNB medium liquid fermentation of *P. kudriavzevii*

化合物 (mg/L)	乳酸添加量			
	0 g/L	20 g/L	40 g/L	回0 g/L
乙醛	ND	ND	0.27±0.02	ND
乙酸乙酯	0.45±0.11 ^a	0.31±0.06 ^b	0.16±0.01 ^c	0.14±0.00 ^e
甲醇	ND	0.38±0.04	ND	ND
乙醇	2727.43±38.00 ^d	5948.94±2.59 ^a	5638.36±12.23 ^b	5016.30±3.75 ^e
异丁醇	0.34±0.09 ^a	0.13±0.01 ^b	0.13±0.00 ^b	0.19±0.01 ^b

注：不同字母表示同一行差异显著，P<0.05；“ND”为未检出。

2.6 乳酸对 *P. kudriavzevii* 菌株固态发酵主要挥发性代谢产物的影响

由表 4 可知，添加乳酸的固、液态发酵结束时酸含量(以去除初始乳酸添加量计)分别为 15.52 g/L 和 23.30 g/L，均低于不添加乳酸的对照组。说明 20 g/L 乳酸胁迫的环境下，抑制了酸的产生，同时酵母菌株也将一部分代谢产生的酸类物质转化为酯类物质。主要产物气相色谱检测结果同见表 4。

在乳酸胁迫情况下，固态发酵酵母菌株在乳酸胁迫的调控下，乙醛含量下降，有助于减少产品的刺激性气味且促进乙醇生成^[29]；*P. kudriavzevii* 菌株固态发酵产乙醇 3.740 g/L，较不添加乳酸的对照组增加了 11%，产乙酸乙酯、丁酸乙酯分别为 1561.75、

表4 *P. kudriavzevii* 菌株固液态发酵主要产物及含量

Table 4 Main products and contents of solid and liquid fermentation of *P. kudriavzevii*

化合物(mg/L)	固态发酵		液态发酵	
	添加20 g/L乳酸	不添加乳酸	添加20 g/L乳酸	不添加乳酸
乙醛	9.53±3.21	11.39±2.32	12.98±0.89	10.97±6.89
乙酸乙酯	1561.75±582.19 ^a	1235.98±81.14 ^a	ND	698.76±311.47 ^b
丁酸乙酯	181.70±84.53	ND	ND	ND
甲醇	ND	ND	905.74±170.35	ND
乙醇	3740.30±145.79	3374.65±1695.93	4473.93±1058.20	4618.25±894.17
正丙醇	39.94±26.78 ^b	63.79±2.82 ^{ab}	62.43±6.43 ^a	77.61±5.32 ^a
异丁醇	96.96±13.54 ^a	113.38±8.01 ^a	52.26±21.28 ^b	83.97±12.95 ^{ab}
异戊醇	148.01±21.29 ^a	134.61±15.02 ^a	34.85±0.60 ^b	57.86±8.94 ^b
合计	5778.19	4933.80	5742.19	5747.42
总酸	(15.52±0.10)×10 ³	(25.22±0.10)×10 ³	(23.30±0.03)×10 ³	(30.03±0.17)×10 ³

注：不同字母表示同一行差异显著，P<0.05，总酸度以乙酸计，“ND”为未检出。

181.70 mg/L, 说明乳酸胁迫可提高 *P. kudriavzevii* 菌株固态发酵产乙醇及主要酯类香气成分的量, 这也与其在 YNB 培养基中的液态发酵结果一致。微生物多样性受到微生物数量和均匀度的影响, 当某一微生物丰度较高时会影响其他种类微生物的生长, 固态发酵低于其液态发酵乙醇含量, 但固态发酵菌密度 (10^6 CFU/g) 低于液态发酵 (10^7 CFU/mL), 更有利于实现 *P. kudriavzevii* 菌株与其它微生物协同发酵。*P. kudriavzevii* 菌株固态发酵均未检测出甲醇含量, 兼具较高的安全性^[30-31]。同时, 该酵母菌株固态发酵产正丙醇、异丁醇、异戊醇的情况各有不同, 对正丙醇, 乳酸胁迫可显著增大固态发酵糟醅中的正丙醇生成量差异, 使固态发酵的正丙醇含量显著低于液态发酵; 对异丁醇, 该酵母固态发酵时的异丁醇生成量高于液态发酵, 且乳酸可降低固液态发酵糟醅中的异丁醇生成量; 而异戊醇的生成量则主要受发酵方式的影响, 与是否存在乳酸胁迫无关。总体来看, 乳酸胁迫对 *P. kudriavzevii* 产风味物质的影响因其发酵方式而不同, 在液态发酵条件下, 乳酸胁迫可显著降低 *P. kudriavzevii* 的乙酸乙酯产量, 增加其甲醇产量; 固态发酵条件下, 乳酸胁迫对 *P. kudriavzevii* 产风味物质的影响相对较小, 表明固态发酵方式可为乳酸胁迫提供更好的缓冲。

3 结论

本研究先通过 *P. kudriavzevii* PY-1 菌株存活率确定最适乳酸胁迫浓度 20 g/L, 且该浓度对酵母菌菌落形态与细胞形态无明显影响, 但对细胞生长有一定抑制, 在 44 °C 温度以下, 乳酸对温度均可抑制菌株生长, 但在 44 °C 以上, 乳酸的影响不起主导作用。乳酸胁迫 *P. kudriavzevii* 菌株发酵特性影响结果如下: 乳酸对 *P. kudriavzevii* 的可逆抑制作用可被一些生长因子削弱; 乳酸胁迫也可提高酵母对葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖、果糖和蔗糖的利用率; 菌株代谢产乙醇升高、异丁醇含量降低; 应用此菌株模拟乳酸胁迫下白酒生产(固态发酵), 酯类物质含量增高、高级醇含量降低, 且均未检测出甲醇含量。*P. kudriavzevii* 菌株兼具较高安全性和改善酒体品质的发酵潜能, 有望成为一种极具商业潜力的白酒生产酵母。

参考文献

[1] 刘豪栋, 杨映津, 林高节, 等. 酵母与乳酸菌的相互作用模式及其在发酵食品中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(9): 268-274. [LIU Haodong, YANG Yijin, LIN Gaojie, et al. Recent progress in understanding the interaction patterns between yeast and lactic acid bacteria and their applications in fermented foods[J]. Food Science, 2022, 43(9): 268-274.]

[2] 贾丽艳, 张丽, 李惠源, 等. 果香风味导向的库德毕赤酵母 FJZ 的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 276-282. [JIA Liyan, ZHANG Li, LI Huiyuan, et al. The screening and identification of *Pichia kudriavzevii* FJZ by flavor-oriented technology and its biological characteristics[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(1): 276-282.]

[3] 王德培, 胡阳, 焦富. 库德里阿兹威氏毕赤酵母在发酵工业中的研究进展[J]. 酿酒科技, 2021, 324(6): 95-101. [WANG Depai, HU Yang, JIAO Fu. Research progress in the application of *Pichia kudriavzevii* in industrial fermentation[J]. Liquor-Making Science and Technology, 2021, 324(6): 95-101.]

[4] JAVIER A D R, MARÍA L, ELADIO B, et al. Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces noncerevisiae* species against a *S. cerevisiae* wine strain in wine fermentation: Competition, physiological fitness, and influence in final wine composition[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 150.

[5] 吕想, 高甜甜, 刘伟, 等. 基于 GC-IMS 分析非酿酒酵母与酿酒酵母混合发酵脐橙酒挥发性香气成分[J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 139-148. [LÜ Xiang, GAO Tiantian, LIU Wei, et al. GC-IMS-based analysis of volatile aroma components of navel orange wines fermented with a mixture of non-*Saccharomyces* yeast and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 139-148.]

[6] 卜光明, 周化斌, 周茂洪, 等. 酿造酒中非酿酒酵母的研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 346-352. [BU Guangming, ZHOU Huabin, ZHOU Maohong, et al. Research progress on the non-saccharomyces in the brewing wine fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(14): 346-352.]

[7] 赵志军, 王瑞卿, 刘延波, 等. 酿酒糟醅中生香酵母的筛选及培养条件[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(9): 61-67. [ZHAO Zhijun, WANG Ruiqing, LIU Yanbo, et al. Screening of aroma-producing yeast in distiller's grains and optimization of culture conditions[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(9): 61-67.]

[8] ZHENG X W, YAN Z, NOUT M J R, et al. Microbiota dynamics related to environmental conditions during the fermentative production of Fen-Daqu, a Chinese industrial fermentation starter[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 182-183: 57-62.

[9] WU Q, XU Y, CHEN L. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to Chinese Maotai-flavour liquor making[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(4): 301-307.

[10] LIU P L, XIONG X M, WANG S, et al. Population dynamics and metabolite analysis of yeasts involved in a Chinese miscellaneous-flavor liquor fermentation[J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(8): 553-565.

[11] DENG N, DU H, XU Y. Cooperative Response of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* to Lactic acid stress in Baijiu fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(17): 4903-4911.

[12] 谢再斌, 王太玉, 王茜, 等. 异常威克汉姆酵母在白酒酿造中的应用研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(5): 18-22. [XIE Zaibin, WANG Taiyu, WANG Qian, et al. Application of *Wickerhamomyces anomalus* in Baijiu-brewing[J]. China Brewing, 2022, 41(5): 18-22.]

[13] 雷学俊, 杨康卓, 张建敏, 等. 多粮浓香型白酒糟醅中香气成分的空间分布规律[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(21): 48-54. [LEI Xuejun, YANG Kangzhuo, ZHANG Jianmin, et al. Spatial distribution of aroma compounds in fermented grains of multi-grains strong-aroma Baijiu[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(21): 48-54.]

[14] SHU B O, YING J, WANG T, et al. Microbiota and chemical compounds in fermented *Pinelliae Rhizoma* (Banxiaqu) from different areas in the Sichuan province, China[J]. Polish Journal of Microbiology, 2019, 68(1): 2544-4646.

- [15] 张勤. 耐酸酵母的选育及初步应用[D]. 无锡: 江南大学, 2011. [ZHANG Qin. Screening and application of acid-resistant yeast[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011.]
- [16] 程书梅, 李慧颖, 顾金兰, 等. 酿酒酵母的乳酸抗性机制[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(2): 367-368, 372. [CHENG Shumei, LI Huiying, GU Jinlan, et al. Study on mechanism of Lactic resistant of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(2): 367-368, 372.]
- [17] 肖冬光. 白酒酿造过程中酯类物质形成机理探讨[J]. 酿酒科技, 2022(9): 17-24. [XIAO Dongguang. Discussion on the formation mechanism of ester compounds in the production process of Baijiu[J]. Liquor-Making Science and Technology, 2022(9): 17-24.]
- [18] 吴丽华, 陈燕飞, 仪慧兰, 等. 硫酸锌对酵母细胞的毒性作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(2): 129-136. [WU Lihua, CHEN Yanfei, YI Huilan, et al. Cytotoxicity of zinc sulfate on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Northwest A and F University(Natural Science Edition), 2020, 48(2): 129-136.]
- [19] 张小荣, 黄钰芳, 何海, 等. 差示苯酚-硫酸法结合 DNS 法测定红芪多糖(HPS)含量[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(4): 186-189. [ZHANG Xiaorong, HUANG Yufang, HE Hai, et al. Differential phenol-sulfuric acid method combined with DNS method to determine the content of Hedysarum Polysaccharides (HPS)[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2022, 50(4): 186-189.]
- [20] 游玲, 周荣清, 谭壹, 等. *Kazachstania* 属酵母在浓香型白酒糟醅中的分布特征及发酵功能[J]. 生物技术通报, 2021, 37(6): 108-116. [YOU Ling, ZHOU Rongqing, TAN Yi, et al. Distribution and function of *Kazachstania* yeast in the fermentation of strong flavor Baijiu[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(6): 108-116.]
- [21] 游玲, 谭壹, 隆清扬, 等. 浓香型白酒糟醅中酵母 *Geotrichum* sp. 的固态发酵特性[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(1): 55-61. [YOU Ling, TAN Yi, LONG Qingyang, et al. Solid state fermentation characteristics of *Geotrichum* sp. in strong-flavor Baijiu[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(1): 55-61.]
- [22] 王春晓, 袁国亿, 苏伟, 等. 白酒制曲环境和成品曲中产酸微生物分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 120-126. [WANG Chunxiao, YUAN Guoyi, SU Wei, et al. Analysis of Acid-producing microorganisms from Qu-making environment and mature Qu(Baijiu fermentation starter)[J]. Food Science, 2020, 41(18): 120-126.]
- [23] 章钰滢, 班世栋, 赵皓静, 等. 温度对产香酵母产挥发性风味物质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(5): 58-67. [ZHANG Yuhan, BAN Shidong, ZHAO Haojing, et al. Effect of temperature on the volatile compounds produced by aroma producing yeasts[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(5): 58-67.]
- [24] 杜海, 邢敏钰, 徐岩. 芝麻香型白酒酿造过程中乳酸菌分离及其碳源利用特征[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 13-18. [DU Hai, XING Minyu, XU Yan. Isolation of lactic acid bacteria and their characteristic of carbon utilization during the liquor-making process of Chinese roasted sesame-like flavor liquor[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(1): 13-18.]
- [25] 李书婷, 黄志久, 吴正云, 等. 清香型白酒酿造中乳酸乙酯和乙酸乙酯合成代谢调控的研究进展[J]. 酿酒科技, 2022(11): 99-103. [LI Shuting, HUANG Zhijiu, WU Zhengyun, et al. Research progress in the metabolic regulation of ethyl lactate and ethyl acetate during the fermentation of Qingxiang Baijiu[J]. Liquor-Making Science and Technology, 2022(11): 99-103.]
- [26] 焦文婧, 谢菲, 高蕾, 等. 浓香型酒醅中微生物群落及其与乙酸和乙酸乙酯的相关性分析[J]. 中国酿造, 2023, 42(4): 96-102. [JIAO Wenjing, XIE Fei, GAO Lei, et al. Microbial community and their correlations with acetic acid and ethyl acetate in fermented grains of strong-flavor Baijiu[J]. China Brewing, 2023, 42(4): 96-102.]
- [27] 刘小改, 马美荣, 周林艳, 等. 高产乙酸乙酯酵母菌筛选及固态发酵应用研究[J]. 中国酿造, 2020, 39(10): 79-83. [LIU Xiaogai, MA Meirong, ZHOU Linyan, et al. Screening of yeast with high-yield of ethyl acetate and its application in the solid-state fermentation[J]. China Brewing, 2020, 39(10): 79-83.]
- [28] 罗寒, 曾祥炼, 陈良强, 等. 微生物干预降低酱香型白酒酿造中的乳酸[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(15): 63-68. [LUO Han, ZENG Xianglian, CHEN Liangqiang, et al. Microbial intervention to reduce lactic acid in Maotai-flavor liquor brewing[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(15): 63-68.]
- [29] 刘媛春, 曾礼兰, 方帅, 等. 浓香型白酒风味成分对乙醇代谢及关键酶活性影响的体内实验研究[J]. 中国酿造, 2022, 41(6): 122-128. [LIU Aichun, ZENG Lilan, FANG Shuai, et al. Effects of flavor components in strong-flavor Baijiu on ethanol metabolism and key enzyme activities *in vivo* experiments[J]. China Brewing, 2022, 41(6): 122-128.]
- [30] DOUGLASS A P, OFFEI B, BRAUN-GALLEANI S, et al. Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*; One species, four names.[J]. PLoS Pathogens, 2018, 14(7): e1007138.
- [31] 郑雅婷, 李翔, 王鹏程, 等. 毕赤酵母 Sut2 对甲醇代谢的调控研究[J]. 生物学杂志, 2021, 38(4): 29-33. [ZHENG Yating, LI Xiang, WANG Pengcheng, et al. Research of regulation of Sut2 to methanol metabolism in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biology, 2021, 38(4): 29-33.]