

# 黄酒浸米水中微生物及细菌素研究进展

刘彩琴, 陈虹, 王楠, 金建昌 (浙江树人大学生物与环境工程学院, 浙江杭州 310015)

**摘要** 黄酒浸米过程中微生物是由群落控制的, 大量的微生物和丰富的发酵产物是保障黄酒发酵在开放条件下正常和顺利进行的关键因素之一。从浸米水中微生物及作用、具有抑菌活性的微生物及抑菌物质、乳酸菌产细菌素的特性等方面进行综述, 并对今后发展进行展望, 以期对浸米水的综合利用提供一定的参考价值。

**关键词** 乳酸菌; 细菌素; 黄酒

**中图分类号** TS 261.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)32-0004-03

## Research Progress of Antibiotics from Rice Steeping Water of Huangjiu

LIU Cai-qin, CHEN Hong, WANG Nan et al (College of Biology and Environment Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou, Zhejiang 310015)

**Abstract** Microorganism is controlled by community during rice soaking of Huangjiu. Large number of microorganisms and abundant fermented products are the key factors to ensure the Huangjiu fermentation successfully. This paper summarized the research progress of microorganism from rice steeping water of Huangjiu and its function, microorganism with antimicrobial activity and antibiotics, characteristics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. The future research areas were also resumed. It can provide reference for comprehensive utilization of rice steeping water.

**Key words** Lactic acid bacteria; Bacteriocin; Huangjiu

黄酒(Huangjiu)是以稻米、黍米等为主要原料,经浸米、蒸煮、加曲、糖化发酵、压榨、过滤、煎酒、贮存、勾兑而成<sup>[1-2]</sup>,是我国民族特产和传统食品之一。黄酒浸米的主要目的是原料充足吸水,以保障发酵的顺利进行与风味的产生,浸米过程中微生物及其丰富的发酵产物是保障黄酒发酵在开放条件下正常和顺利进行的关键因素之一,同时其多种代谢产物对于黄酒风味和品质有重要影响,比如乳酸菌在发酵过程中产生的有机酸是黄酒风味物质的重要来源<sup>[3-4]</sup>。浸米水中含量丰富的营养物质有淀粉、蛋白质、糖类、有机酸等,其中氨基酸的种类多达18种,还有微量元素、B族维生素和矿物质等<sup>[5]</sup>,还含有一些生理活性物质,其中抑菌物质的研究及应用还处于发展阶段,但应用前景非常广阔。该研究从黄酒浸米水中微生物的种类、产抑菌活性的微生物及细菌素特性进行综述,以期对浸米水的综合利用提供参考。

### 1 浸米水中微生物及作用

一般而言,微生物相互作用是微生物群落结构稳定形成的基础,也是代谢产物分泌的基础。黄酒浸米水中微生物是由群落控制的,大量的微生物和丰富的代谢产物对黄酒品质起关键作用。毛青钟<sup>[6-7]</sup>应用传统微生物培养技术研究发现,浸米水内微生物种类极其丰富,包括细菌、酵母菌和霉菌等类群;浸米前期,浆水表面主要是醋酸杆菌、乳酸杆菌,数量巨大,形成一层半透明状的膜,随后,有些浸米池表面又会形成泡沫花状的白色膜,以产膜酵母、裂殖酵母和白地霉组成,这类微生物对浸米有害;浸米温度越高,此膜出现的比例越大。浆水内的酵母以巨大酵母、假丝酵母和极少量的酿酒酵母等为主,数量少,对浸米水的产酸作用很小,而对浆水中产生的风味成分有一定作用。当浸米水的pH小于4.5时,球菌的数量已很少,很难检测到。以后浆水酸度升高,浸

米过程以杆菌的作用为主,浸米后期,乳酸杆菌所占比例越大(超过85%)。当浸米结束,仅有极少量的乳酸球菌(对生和四链生)存在,乳酸球菌存在于浸米的整个过程,数量非常少,只起到很小的作用。另外,尚有少量的芽孢乳杆菌属和产乳酸的芽孢杆菌如凝结芽孢杆菌、左旋乳酸芽孢杆菌、消旋乳酸芽孢杆菌等存在于浸米的整个过程,但数量非常少<sup>[6-7]</sup>。朱小芳等<sup>[3]</sup>通过分子生物学技术对传统黄酒浸米水中细菌研究发现,浸米过程中乳酸菌属为优势细菌,其丰度含量占比为60.67%,有乳杆菌属(*Lactobacillus*)、片球菌属(*Pediococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、魏斯氏菌属(*Weissella*)、四联球菌属(*Tetragenococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)等,其中乳杆菌属含量占乳酸菌的90%,57.4%的*Lactobacillus*为植物乳杆菌(*L. plantarum*),21.1%的为短乳杆菌(*L. brevis*),其他种均不超过10%,如类食品乳杆菌(*L. paralimentarius*)等。在生产过程中,还有一些微生物虽参与黄酒的发酵,但是在传统的培养过程中不能获得其菌落及生物学信息,所以对其认识相当有限。

### 2 浸米水中分泌抑菌活性的微生物及抑菌物质

在长期的生产实践中发现,相同工艺、相同底物发酵浓度酿成的绍兴黄酒,因浸米时间不同(传统摊饭法酿酒,浸米时间长达16~26d,机械化黄酒生产时浸米时间缩短至2~5d)<sup>[8]</sup>,其贮藏的安全性不一致,浸米时间长酿得的酒,入坛后能够久藏不坏,反之则不易久藏,有人认为与浸米发酵过程中微生物代谢产物息息相关,这类物质统称为抑菌成分,而且这种抑菌成分伴随着发酵,最后进入成品黄酒中。能分泌抑菌物质的乳酸菌有乳球菌属、乳杆菌属和片球菌属等,抑菌物质有有机酸(乳酸、乙酸、苯甲酸、丙酸)、过氧化氢、CO<sub>2</sub>、双乙酰、乙醛、D-氨基酸、抗真菌肽、罗氏菌素(reuterin)和细菌素(bacteriocins)等<sup>[9-10]</sup>。成潇龙等<sup>[11]</sup>以金黄色葡萄球菌为指示菌研究发现黄酒酿造浸米水中抑菌物质为乳酸链球菌素。酵母分泌的抑菌物质研究较少,对仅有的一些报

**基金项目** 浙江树人大学绍兴黄酒学院科研专项项目。  
**作者简介** 刘彩琴(1975—),女,甘肃涇川人,副教授,博士,从事食品科学研究。  
**收稿日期** 2018-07-17

道分析发现:酿酒酵母 IFST062013 的抑菌能力与其分泌的  $\alpha$ -干扰素 (IFN- $\alpha$ )、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 和白介素 10 (IL-10) 有关<sup>[12]</sup>,酿酒酵母 CCMI 885 的抑菌能力与其分泌的抗菌肽 (AMPs) 有关<sup>[13]</sup>。

### 3 乳酸菌产细菌素生物特性研究进展

乳酸菌在食品领域有很重要的生理功能,而其分泌的细菌素的开发及应用是目前研究的热点之一。研究发现乳酸菌细菌素是乳酸菌在代谢过程中通过核糖体途径合成的一类具有抗菌活性的多肽类物质<sup>[14]</sup>,除了具有能被人体内的蛋白酶降解、不在体内蓄积等优点之外,还具有较好的稳定性及适合工业化生产的特点<sup>[15]</sup>,目前细菌素具有抗病毒<sup>[16]</sup>、调节肠道菌群<sup>[17-18]</sup>、促进植物生长<sup>[19]</sup>、抑菌<sup>[20]</sup>等功能,所以在食品、医药和兽药等领域有广阔的应用前景。美国 FDA 认证细菌素为 GRAS 生物制剂。

目前,依据热稳定性可将乳酸菌产生细菌素分为对热稳定的 Class I 和 Class II,以及对热不稳定的 Class III<sup>[21]</sup>。

Class I 是由核糖体合成、翻译后被修饰得到的一类肽类 (RiPPs),分子量小于 10 kD,包括所有合成过程中需要酶修饰的肽,经修饰之后氨基酸和结构更利于其功能的发挥,这些修饰如:羊毛硫氨酸、杂环化、N- 和 C-端被一个肽键链接起来的环化和糖基化作用;Class I 的基因里包含一个对酶识别、肽转录和控制肽失活的前导肽,此前导肽位于核心肽段上<sup>[22]</sup>。Class I 的代表性物质有羊毛硫肽类化合物 (Lanthipeptides),如 Nisin A;环化的肽类化合物 (Cyclized peptides) 如促肠活动素 (Enterocin AS-48);含吡咯或唑啉环的线性肽 (LAPs, Linear azolo-containing peptides) 如链球菌溶血素 (Streptolysin S);Sactibiotics 如 Subtilisin A;含有糖基片段类 (Glycocins) 如 Glycocin F;套索肽类 (Lasso peptides) 如 E.coli 产的 Microcin J25。2010 年 Mkrtychyan 等<sup>[23]</sup>从嗜酸乳杆菌培养液中分离得到分子量大小只有 1.15 kD 的 I 类细菌素,其氨基酸序列为 Asn-Val-Gly-Val-Leu-X-Pro-Pro-X-Leu-Val。

Class II 分子量小于 10 kD,在合成过程中不需要修饰,理化性质稳定,又分为 IIa、IIb、IIc 和 II d 4 个亚类。IIa 类细菌素是 II 类细菌素中主要的亚种,抗菌谱相比 I 类细菌素较窄,仅对乳酸菌、李斯特菌等革兰氏阳性菌表现出抗菌活性,极少数对大肠杆菌、沙门氏菌等革兰氏阴性细菌表现抗菌活性<sup>[24]</sup>;以植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 产生的乳酸片球菌素 (Pediocin PA-1) 为主要代表,具有保守的 N-末端 YGNGVXC 保守序列<sup>[15]</sup>;IIb 类细菌素是由 2 种不同的肽分子组成的多肽,当每种肽的肽比率相等时才会发挥协同作用,产生最佳抗微生物活性<sup>[25]</sup>,已报道的有乳球菌素 G (lactococcin G)、莴苣苦素 F (lactacin F)、乳杆菌素 705 (lactobacillin 705)、乳球菌素 Q (lactococcin Q)、肠道菌素 X (enterocin X) 和肠道菌素 NKR-5-3AZ (enterocin NKR-5-3AZ)<sup>[24,26]</sup>。IIc 类细菌素的分子主链具有头-尾环化的结构特征,已报道的有肠道菌素 AS-48 (enterocin AS-48)、加萨霉素 (gasserincin A)、环孢菌素 A、丁基弧菌素 AR10、溶血素、卡诺菌素 A、

乳环素 Q、加尔维因 M (Galviin M)、白细胞环素 Q (leucocyclin Q)、环孢霉素和环孢霉素 4185 等<sup>[27]</sup>。II d 类细菌素包括非单线性肽,sec 依赖性细菌素以及具有 N-末端前导序列,并在翻译后立即有活性的无前导序列细菌素,已报道的是从泰国发酵猪肉香肠中分离出的 Bac7293A 和 Bac7293B<sup>[25]</sup>。

Class III 分子量大于 10 kD,代表性物质之一如溶菌素 (Bacteriolysins) 是一种不耐热的大分子抗菌蛋白,不同的结构域分别负责易位、受体结合和致死功能,以通过水解靶细胞的细胞壁使细胞溶解<sup>[28-29]</sup>;代表性物质之二为非裂解素 (Non-lytic),其相关研究较少。

### 4 乳酸菌细菌素的抑菌机理

不同类型的细菌素抑菌机理不同,细胞膜蛋白、膜电位、pH、脂质组成、特定氨基酸和结构域等对抑菌活性有影响,总的来说包括细胞膜损伤机制、阻碍细胞分裂和细胞壁损伤机制<sup>[30-31]</sup>。

Nisin 作为 Class I 的代表,被联合国粮农组织和美国食品药品监督管理局所认可并批量商业化生产,作为一种天然防腐剂被广泛应用于食品的保鲜和预防食物中毒,它仅对蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、产气荚膜杆菌 (*Clostridium perfringens*)、链球菌 (*Streptococcus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和单增李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 等革兰氏阳性菌有抑制作用,对革兰氏阴性菌没有抑制作用,而且 Nisin 具有双重的作用机制,Nisin 浓度很低时,通过抑制细胞壁合成起作用;当 Nisin 浓度相对较高时,主要是通过孔膜形成来起作用<sup>[32-33]</sup>;Class II 类细菌素的抗菌机理在近几年才渐为人知,主要是由于细菌素吸附在细胞膜并在其上形成孔道,使得细胞膜的通透性增加,从而引起细胞内各种离子的渗漏和能量物质的消耗,导致细胞解体死亡<sup>[34]</sup>;Class III 细菌素已发现的数量还不太多,研究也并不深入,具体作用机制还在研究<sup>[35]</sup>。

### 5 展望

黄酒是我国的民族特产和传统食品,也是世界上最古老的饮料酒之一。浸米过程产生的浸米水是黄酒生产中的主要副产物,其中的乳酸菌产生的细菌素是天然的抗菌肽或蛋白质,潜在用于食品保藏和保健、饲料行业、医疗工业领域而备受关注,特别是在食品保藏方面具有巨大的潜在价值,其前景十分广阔。Class II 类乳酸菌细菌素具有较稳定的理化性质,为当前研究的热点,但是研究相对较少。就目前应用效果来看,不同的细菌素联合或细菌素与动植物来源的抗菌肽联合使用可拓宽抑菌范围和(或)增强抑菌效果。

### 参考文献

- [1] CHEN S, XU Y. The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine[J]. Journal of the institute of brewing, 2010, 116(2): 190-196.
- [2] 陈历水, 沈雪梅, 刘蕾, 等. 黄酒生产过程中细菌群落结构与生物胺含量变化分析[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(11): 76-83.
- [3] 朱小芳, 张凤杰, 俞剑桑, 等. 黄酒浸米水中细菌群落结构及优势菌代谢分析[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 82-86.
- [4] 张凤杰, 王德良, 薛洁, 等. 黄酒酿造过程中优势细菌产生生物胺的检测与评价[J]. 酿酒科技, 2016(4): 17-20.

- [5] 孙士勇,曹钰,陆健,等.适用于黄酒米浆水处理的酵母菌的筛选[J].食品与生物技术学报,2018,37(3):316-322.
- [6] 毛青钟.黄酒浸米浆水及其微生物变化和作用[J].酿酒科技,2004(3):73-76.
- [7] 毛青钟.冬酿春榨绍兴黄酒[J].酿酒,2018,45(1):106-108.
- [8] 程斐,周高峰,谢广发,等.适用于黄酒生物酸化浸米的乳酸菌筛选[J].食品与生物技术学报,2013,32(10):1079-1084.
- [9] CINTAS L M, CASAUS M P, HERRANZ C, et al. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria[J]. Food science and technology international, 2001, 7: 281-305.
- [10] REIS J A, PAULA A T, CASAROTTI S N, et al. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications[J]. Food engineering reviews, 2012, 4(2): 124-140.
- [11] 成潇龙,杨海麟,章升,等.黄酒酿造浸米水中抑菌物质的分离纯化鉴定及其活性的测定[J].中国酿造,2015,34(5):48-51.
- [12] FAKRUDDIN M, HOSSAIN M N, AHMED M M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 17(1): 64-75.
- [13] BRANCO P, FRANCISCO D, MONTEIRO I M, et al. Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2017, 101(1): 159-171.
- [14] KONISKY J. Colicine and other bacteriocins with established modes of action[J]. Annual review of microbiology, 1982, 36(1): 125-144.
- [15] 张旭,赵斌,张香美,等.产细菌素乳酸菌的筛选及细菌素相关基因的分析[J].中国农业大学学报,2013,18(4):168-177.
- [16] WACHSMAN M B, CASTILLA V, DE RUIZ HOLGADO A P, et al. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro[J]. Antiviral research, 2003, 58(1): 17-24.
- [17] DONIA M S, CIMERMANCIC P, SCHULZE C J, et al. A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics[J]. Cell, 2014, 158(6): 1402-1414.
- [18] STERN N J, SVETOCH E A, ERUSLANOV B V, et al. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system[J]. Antimicrobial agents & chemotherapy, 2006, 50(9): 3111-3116.
- [19] SUBBRAMANIAN S, SMITH D L. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome—from an agriculture perspective[J]. Frontiers in plant science, 2015, 6(227): 555-559.
- [20] HART P, OPPEDIJK S F, BREUKINK E, et al. New insights into nisin's antibacterial mechanism revealed by binding studies with synthetic lipid II analogues[J]. Biochemistry, 2016, 55(1): 232-237.
- [21] ALVAREZ-SIEIRO P, MONTALBÁN-LÓPEZ M, MU D D, et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family[J]. Applied microbiology & biotechnology, 2016, 100(7): 2939-2951.
- [22] ARNISON P G, BIBB M J, BIERBAUM G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature[J]. Natural product reports, 2013, 30(1): 108-160.
- [23] MKRTCHYAN H, GIBBONS S, HEIDELBERGER S, et al. Purification, characterisation and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er317/402 strain N[J]. International journal of antimicrobial agents, 2010, 35(3): 255-260.
- [24] PEREZ R H, ZENDO T, SONOMOTO K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications[J]. Microbial cell factories, 2014, 13(S1): 1-13.
- [25] DHEWA T. Screening, production purification and potential use of bacteriocins from lactic acid bacteria of meat and dairy food origin[J]. International proceedings of chemical biological & environment, 2012, 39: 35.
- [26] 张晓宁,尚一娜,陈境,等.乳酸菌细菌素的作用机制及在肉制品中的应用[J].食品研究与开发,2018,39(11):192-199.
- [27] ACEDO J Z, VAN BELKUM M J, LOHANS C T, et al. Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46M46[J]. Applied & environmental microbiology, 2015, 81(8): 2910-2918.
- [28] LAI A C Y, TRAN S, SIMMONDS R S. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 215(1): 133-138.
- [29] JOHNSEN L, FIMLAND G, NISSEN-MEYER J. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum[J]. Journal of biological chemistry, 2005, 280(10): 9243-9250.
- [30] 任路雅,杨艳艳,章检明,等.乳酸菌抗菌肽(细菌素)抗菌机理的研究进展[J].中国食品添加剂,2015(1):143-149.
- [31] MONTVILLE T J, CHEN Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: Recent progress and unresolved questions[J]. Applied & environmental microbiology, 1998, 50(5): 511-519.
- [32] BREUKINK E, DE KRUIJFF B. The lantibiotic nisin, a special case or not? [J]. Biochim biophys acta, 1999, 1462(1/2): 223-234.
- [33] NES I F, HOLO H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria[J]. Biopolymers, 2000, 55(1): 50-61.
- [34] DRIDER D, BENDALI F, NAGHMOUCHI K, et al. Bacteriocins: Not only antibacterial agents[J]. Probiotics & antimicrobial proteins, 2016, 8(4): 177-182.
- [35] ROCES C, COURTIN P, KULAKAUSKAS S, et al. Isolation of *Lactococcus lactis* mutants simultaneously resistant to the cell wall-active bacteriocin Lcn972, lyszyme, nisin, and bacteriophage c2[J]. Applied & environmental microbiology, 2012, 78(12): 4157-4163.

(上接第3页)

- [34] TORRE S, MOE R. Temperature, DIF and photoperiod effects on the rhythm and rate of stem elongation in *Campanula isophylla* Moretti[J]. Scientia horticulturae, 1998, 72(2): 123-133.
- [35] 李海云,李长新,张复君,等.不同光周期对西葫芦幼苗生长的影响[J].北方园艺,2009(5):17-19.
- [36] BLOM T J, TSUJITA M J, ROBERTS G L. Far-red at end of day and reduced irradiance affect plant height of easter and Asiatic hybrid lilies[J]. Hortscience, 1995, 30: 1009-1012.
- [37] LUND J B, BLOM T J, AASLYNG J M. End-of-day lighting with different red / far-red ratios using light-emitting diodes affects plant growth of *Chrysanthemum × morifolium* Ramat. 'Coral charm' [J]. Hortscience, 2007, 42: 1609-1611.
- [38] KOPSELL D A, LEFSRUD M G, AUGÉ R M, et al. Biomass production and pigment accumulation in kale grown under increasing photoperiods[J]. Hortscience, 2006, 41(3): 603-606.
- [39] ALI M B, KHANDAKER L, OBA S. Comparative study on functional components, antioxidant activity and color parameters of selected colored leafy vegetables as affected by photoperiods[J]. Journal of food agriculture & environment, 2009, 7(3): 392-398.

## 科技论文写作规范——引言

扼要地概述研究工作的目的、范围、相关领域的前人工作和知识空白、理论基础和分析、研究设想、研究方法和实验设计、预期结果和意义等。一般文字不宜太长,不需做详尽的文献综述。在最后引出文章的目的及试验设计等。“引言”两字省略。