

浓香型白酒窖泥产酸菌协同发酵条件优化

卫春会¹, 张兰兰¹, 罗惠波¹, 刘淼², 张宿义², 黄治国¹, 邓杰¹

(1. 四川轻化工大学酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000)

(2. 泸州老窖股份有限公司, 四川泸州 646000)

摘要: 浓香型白酒中己酸和丁酸的含量影响着己酸乙酯和丁酸乙酯的含量, 从而影响白酒的风味。为提高浓香型白酒中己酸和丁酸的含量, 本文以特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)、空气芽孢杆菌(*Bacillus aerius*)、丁酸梭菌亚种(*Clostridium butyricum subsp*) 3株窖泥产酸功能菌进行协同发酵; 并将协同发酵产酸效果较好的SJ-1、SJ-3、SJ-8和优质窖泥富集菌液等量接种进行协同发酵, 利用单因素试验优化其协同发酵产己酸和丁酸的发酵条件; 通过部分因子试验、最陡爬坡试验和Box-Behnken响应面设计模型优化己酸和丁酸的发酵培养基。优化结果为: 接种量3%、培养温度28℃、发酵时间12d、pH 6.4、蛋白胨5.10 g/L、乙酸钠5.04 g/L和丁酸钠4.45 g/L, 在此条件下己酸和丁酸产量分别为1156.21 mg/100 mL、2345.84 mg/100 mL, 比优化前提高了3.32倍、3.22倍。本研究以期为提高白酒风味物质和窖池养护提供理论依据。

关键词: 产酸菌; 协同发酵; 响应面法; 己酸; 丁酸

文章编号: 1673-9078(2021)01-54-64

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.01.0731

Optimization of Synergistic Fermentation Conditions of Acid Producing Bacteria in Luzhou-flavor Liquor Mud

WEI Chun-hui¹, ZHANG Lan-lan¹, LUO Hui-bo¹, LIU Miao², ZHANG Su-yi², HUANG Zhi-guo¹, DENG Jie¹

(1. Liquor Making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 644000, China)(2. Luzhou Laojiao Co. Ltd., Luzhou 646000, China)

Abstract: The content of hexanoic acid and butyric acid in Luzhou-flavor liquor affects the content of ethyl caproate and ethyl butyrate, which affected the flavor of liquor. In order to increase the content of hexanoic acid and butyric acid in Luzhou-flavor liquor, three strains of *Bacillus tequilensis*, *Bacillus aerius*, and *Clostridium butyricum subsp* were used in this paper. The acid-producing functional bacteria carry out cooperative fermentation; SJ-1, SJ-3, SJ-8 and high-quality pit mud-enriched bacteria liquid were inoculated in equal amounts for cooperative fermentation, and single-factor test were used to optimize the fermentation conditions of synergistic fermentation broth to produce hexanoic acid and butyric acid. The fermentation medium of hexanoic acid and butyric acid was optimized by fractional factorial designs, the steepest climbing test and the Box-Behnken test design model in response surface method. The optimized results were, inoculum volume 3%, culture temperature 28℃, fermentation time 12 d, pH 6.4, peptone 5.10 g/L, sodium acetate 5.04 g/L and sodium butyrate 4.45 g/L. Under these conditions, the output of hexanoic acid and butyric acid were 1156.21 mg/100 mL and 2345.84 mg/100 mL, which were 3.32 times and 3.22 times higher than before optimization. This research aims to provide a theoretical basis for improving the flavor substances of liquor and the maintenance of pits.

Key words: acid producing bacteria; cooperative fermentation; response surface methodology; hexanoic acid; butyric acid

引文格式:

卫春会,张兰兰,罗惠波,等.浓香型白酒窖泥产酸菌协同发酵条件优化[J].现代食品科技,2021,37(1): 54-64

WEI Chun-hui, ZHANG Lan-lan, LUO Hui-bo, et al. Optimization of synergistic fermentation conditions of acid producing bacteria in Luzhou-flavor liquor mud [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 54-64

收稿日期: 2020-08-04

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2018JY0509); 四川省科技厅应用基础研究项目(2019YJ0462); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室开放基金项目(NJ2018-04); 自贡市科技创新苗子工程项目(2019CXMZ07)

作者简介: 卫春会(1980-), 女, 高级实验师, 研究方向: 酿酒生物技术及应用

通讯作者: 邓杰(1988-), 男, 实验师, 研究方向: 酿酒生物技术及应用

中国白酒是一种具有悠久历史的蒸馏酒,很多重要的场合都离不开白酒的身影,白酒已成为我国文化的一部分^[1,2]。浓香型白酒由于其与众不同的发酵工艺和独特的风味特征,其生产及销售比例占白酒总量的70%以上,在行业中占有重要地位^[3-6]。浓香型白酒窖香浓郁,其香气主要来源于发酵、蒸馏和陈酿过程,其风味物质绝大部分是在发酵阶段产生,是发酵过程中原料在窖池和酒曲微生物及酶作用下的分解产物、微生物的代谢产物、代谢物之间的相互转化^[7-11]。窖泥中微生物的种类、数量、种群间的相互作用以及代谢的多样性对白酒品质具有重要影响^[12,13]。长期的工艺操作使窖泥富集了种类繁多、功能各异的有益于酿酒的微生物菌群^[14-17]。产酸菌是最重要的窖泥功能菌之一,如己酸菌和丁酸菌,其数量的多少及功能强弱直接影响着浓香型大曲酒中特征风味物质的形成^[18]。但在以往的研究结果中发现,复合功能微生物菌群从香味成分、酒质都明显优于纯功能菌株发酵,如张健等^[19]以复合功能菌、纯种己酸菌液、混合培养菌液分别培养人工窖泥,发现在微生物数量及感官评价上,复合功能菌液及混合培养菌液的人工窖泥优于纯种己酸菌培养的人工窖泥。万朕^[20]从优质窖泥筛选,2株产酸功能菌,己酸菌 BLT-B03 产酸量 2.50 g/L、丁酸菌 BLT-B02 产酸量 3 g/L,将其与酵母复配得到复合菌液应用于新窖池的强化,经过强化后,新窖池的生产能力已接近 10 年窖龄的老窖池水平。任剑波等^[21]将优良窖泥功能菌株制成复合功能菌液,并用不同培养配方来培养复合功能菌液,通过对复合功能菌液的外观特征、微生物指标及微量成分分析表明,培养配方对菌液微生物生长、风味物质含量的影响是很明显的。因此,将纯菌种功能菌进行复配,并对其培养配方进行优化研究是很有必要的,有利于改善和提高浓香型白酒的质量。

菌的特性和发酵条件(包括培养基)影响着微生物发酵的生产水平,微生物的发酵产物的形成很大程度上受发酵条件的影响,每一种代谢产物都有其最适培养基配比和生产条件^[22,23]。目前对窖泥中功能菌的研究主要集中进行分离筛选及应用于窖泥养护,对功能菌与其它菌种进行复配及培养工艺优化的研究相对较少。本研究在已选育的优良产酸功能菌株的基础上,将其进行协同发酵,采用 Box-Behnken Design (BBD) 响应面试验确定其产己酸和丁酸协同效果的最优组合,并进行培养条件及培养配方优化。通过不同产酸菌株的协同发酵,以制备产酸复合菌液,强化其发酵代谢产白酒风味物质的含量,从而提高己酸和丁酸产量,为功能菌应用于窖池保养、人工窖泥培养及制作

酯化液方面提供理论指导,可有效改善窖泥微生态环境,从而提高浓香型白酒的质量。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

特基拉芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*, SJ-1)、空气芽孢杆菌 (*Bacillus aerius*, SJ-3)、丁酸梭菌亚种 (*Clostridium butyricum subsp.*, SJ-8), 由酿酒生物技术及应用四川省重点实验室从浓香型白酒窖泥中分离筛选并保藏。

试剂: MES 和 L-半胱氨酸盐酸盐、琼脂糖(生化试剂),均购自 Solarbio; 氯化钠、酵母粉、酵母膏、葡萄糖、硫酸钠、碳酸氢钠、磷酸氢二钾、琼脂粉、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、乙酸钠(分析纯),均购自成都艾科达化学试剂有限公司; 2-辛醇(色谱纯),成都艾科达化学试剂有限公司; 己酸、丁酸(色谱纯), Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

1.2 培养基

1.2.1 RCM 培养基 (g/L) ^[24]

蛋白胨 10.00、牛肉粉 10.00、酵母粉 3.00、葡萄糖 5.00、可溶性淀粉 1.00、氯化钠 3.00、乙酸钠 3.00、L-半胱氨酸盐 0.50、琼脂 0.50, pH 6.8, 蒸馏水 1 L, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.2 发酵培养基 (g/L)

MES 0.50、磷酸二氢钾 0.50、硫酸钠 0.50、氯化钠 1.00、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.40、碳酸氢钠 0.30、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.15、酵母浸粉 1.00、蛋白胨 1.50、葡萄糖 0.50、乙酸钠 3.00、可溶性淀粉 5.00、丁酸钠 3.00、L-半胱氨酸盐 0.25, pH 6.8, 蒸馏水 1 L, 121 °C 灭菌 15 min。

1.2.3 富集培养基 (g/L)

K_2HPO_4 0.40、无水乙醇 20.00、酵母膏 1.00、乙酸钠 5.00、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.20、硫酸铵 0.50、黄水 0.10, pH 6.8, 蒸馏水 1 L, 121 °C 灭菌 15 min。

1.3 仪器与设备

恒温培养箱(LRH-250), 上海一恒科技有限公司; 全自动高压灭菌锅(HVE), Hirayama; 厌氧工作站(AW200SG), 金坛市科技分析仪器有限公司; 厌氧罐(GM-300), Retsch; 氮气吹浓缩仪(BF-2000M), 北京八方世纪科技; 气相色谱-质谱联用仪 GC-MS (7890A-5975B), 安捷伦公司。

1.4 方法

1.4.1 菌株活化

将保藏菌株 SJ-1、SJ-3 和 SJ-8 分别接种于 RCM 液体培养基进行活化,于 34 ℃ 厌氧培养 10 d;将窖泥按 3%接种于富集培养基中,于 34 ℃ 厌氧条件下培养 10 d,制成富集菌液。

1.4.2 菌株复配

将活化后的菌株 SJ-1、SJ-3 和 SJ-8 分别制成 10^5 个/mL 的种子液,于 80 ℃ 水浴处理 10 min,分别按 5%的接种量接种于发酵培养基中进行协同发酵,于 34 ℃ 厌氧培养 10 d,通过 GC-MS 检测己酸和丁酸的产量;选择产酸能力效果较好 SJ-1、SJ-3 和 SJ-8 的作为复配优势菌株,与富集菌液分别按 5%接种量接种,制成混菌种子液 YY-SJ 接种发酵培养基中,于 34 ℃ 厌氧培养 10 d,并分析发酵液中己酸和丁酸的含量。

1.4.3 发酵条件优化

在发酵培养基的基础上,分别对接种量、发酵温度、发酵时间进行单因素试验。将活化的混菌种子液 YY-SJ 于 80 ℃ 水浴处理 10 min,选择 YY-SJ 种子液的接种量分别为 1%、3%、5%、7%、9%、11%;发酵温度分别为 24、28、32、36、40、44 ℃;发酵时间分别为 4、6、8、10、12、14 d,在厌氧条件下发酵,以己酸和丁酸含量为考察指标并进行验证试验,确定各因素的最佳发酵条件。

1.4.4 优化发酵培养基试验设计^[25-27]

1.4.4.1 部分因子试验设计

采用部分因子试验研究影响己酸和丁酸产量的 5 个培养营养因子:初始 pH (A)、乙醇 (B)、蛋白胨 (C)、乙酸钠 (D) 和丁酸钠 (E)。每个因素都设高 (+1)、中 (0)、低 (-1) 三个水平,以己酸和丁酸的综合值 Y 作为响应值,试验设计及编码见表 1 所示。

表 1 部分因子试验设计因素水平表

Table 1 Factors and levels of fractional factorial design

因素因子编码		水平范围		
		-1	0	1
pH	A	5	6	7
乙醇/%	B	0	1	2
蛋白胨/(g/L)	C	1	5	9
乙酸钠/(g/L)	D	0	3	6
丁酸钠/(g/L)	E	0	3	6

1.4.4.2 最陡爬坡试验

根据上一步部分因子试验回归方程中各因素的系数确定最陡爬坡试验的步长和爬坡方向,以最陡爬坡试验结果的最大响应值作为 Box-Behnken 试验分析的中心点^[28]。

1.4.4.3 响应面试验设计

由最陡爬坡试验确定了蛋白胨、乙酸钠、丁酸钠 3 个因素取值的中心点,在优化的发酵条件基础上,运用 Design-Expert.V 8.0.6 软件和 Box-Behnken Design (BBD) 设计响应面试验,分别以蛋白胨、乙酸钠和丁酸钠添加量作为变量,并选取适当的水平,以己酸和丁酸的综合值 Y 为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面试验,试验设计的因素水平及编码值见表 2。

表 2 响应面试验因素及水平

Table 2 Factors and levels of central composite design

因素	编码	编码水平		
		-1	0	1
蛋白胨/(g/L)	A	4.2	5.4	6.6
乙酸钠/(g/L)	B	4.2	4.8	5.4
丁酸钠/(g/L)	C	3.8	4.2	4.6

1.4.5 样品处理方法

取 10 mL 发酵液,酸化处理调节 pH 至 4,添加 15%的无水乙醚作为萃取溶剂,充分震荡 15 min,静置分层 2 h,再次震荡 10 min,使有机相充分溶于萃取试剂中,再静置 8 h 分层。吸取上层有机相于离心管中,以 6000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,氮吹浓缩 0.5 mL 于进样瓶中,加入一定量的 2-辛醇作为内标混匀,进行 GC-MS 分析。

1.4.6 丁酸和己酸定性和定量分析方法^[29]

气相色谱 (GC) 条件:DB-WAX (60 m×250 μm×0.25 μm) 色谱柱;载气为高纯 He,流速 1 mL/min,进样口温度 230 ℃;程序升温:初始温度为 60 ℃ 保持 1 min,然后以 8 ℃/min 的升温速率升至 180 ℃ 保持 2 min,再以 15 ℃/min 到 230 ℃,保持 5 min。

质谱 (MS) 条件:电子离子源 (EI),70 eV 电子能量,采集模式为全扫描,质量范围 20 u~550 u,离子源温度 230 ℃,四级杆温度 150 ℃,接口温度 230 ℃。

定性方法:将所得质谱图与 NIST05a.L 标准谱库比对,选择匹配度大于 80 (最大值为 100) 特征离子进行定性分析。

定量方法:内标法。以 30 mg/100 mL 的 2-辛醇为标准物,根据公式 1 得出丁酸和己酸的含量。

$$Cs = \alpha \times \frac{As \times Ci}{Ai} \quad (1)$$

式中, i : 相对校正因子,其中 $i_{(己酸)}=0.98$, $i_{(丁酸)}=1.12$; As : 待测物峰面积; Ci : 标准物浓度 (mg/100 mL); Ai : 标准物峰面积; Cs : 待测物浓度 (mg/100 mL)。

1.4.7 数据处理

采用 Design-Expert.V 8.0.6 软件进行响应面试验设计,并利用 SPSS 16.0 统计软件对试验结果进行多重比较与 q 检验。重复 3 次。

在响应面分析中,对己酸和丁酸的检测指标采用 Hassan 方法,将各指标均归一化为 0~1 之间的值。如公式 2:

$$D_{\max} = (d_i - d_{\min}) / (d_{\max} - d_{\min}) \quad (2)$$

式中: d_i : 每组试验所测得的真实值; $d_{\max}$: 试验组中的最高值; $d_{\min}$: 试验组中的最低值。

考虑到己酸和丁酸均是浓香型白酒的主要风味物质前体。因此,将己酸和丁酸的权重值分别设为 0.5,得到己酸和丁酸的综合值 Y ,如公式 3:

$$\text{综合值 } Y = D_{\max(\text{己酸})} \times 0.5 + D_{\max(\text{丁酸})} \times 0.5 \quad (3)$$

2 结果与分析

2.1 菌株协同发酵风味物质结果分析

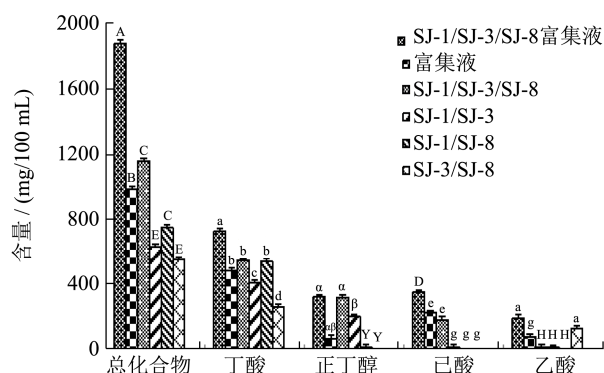


图1 不同菌株协同发酵对产物挥发性化合物含量的影响

Fig.1 Effects of different bacterial strains on the volatile compounds content of the products by collaborative fermentation

注:挥发性总化合物、丁酸、正丁醇、己酸和乙酸的差异性显著性分别用大写英文字母、小写英文字母、希腊字母、音标扩增字母和西里字母表示,无相同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

在前期单菌发酵的风味物质检测的研究结果表明, SJ-1、SJ-3 和 SJ-8 的风味物质较好,且具有产酸功能,其对浓香型白酒的风味有一定的贡献。其中 SJ-1、SJ-8 产丁酸,且 SJ-8 丁酸产量为 378.63 mg/100 mL, SJ-3 产己酸乙酯和丁酸乙酯分别为 36.73 mg/100 mL、34.63 mg/100 mL; 将菌株 SJ-1、SJ-3、SJ-8 作为优势菌株与富集菌液协同发酵时,产物挥发性总化合物、己酸和丁酸含量显著高于其他各菌株协同发酵及富集液单独发酵 ($p < 0.05$),此结果与杨爱华^[30]、陈新杰^[31]、曹新志^[32]等研究关于多种产酸菌混合培养产酸量优于单一产酸菌培养相似。将两种或两种以上菌种混合培养可形成“互补”作用,不同菌群产生的代谢产物、代谢酶系等物质能互为利用,从而有利于产物

的积累^[32,33]。不同菌株组合的协同发酵代谢产物试验结果如图 1 所示。

2.2 菌株协同发酵条件及验证

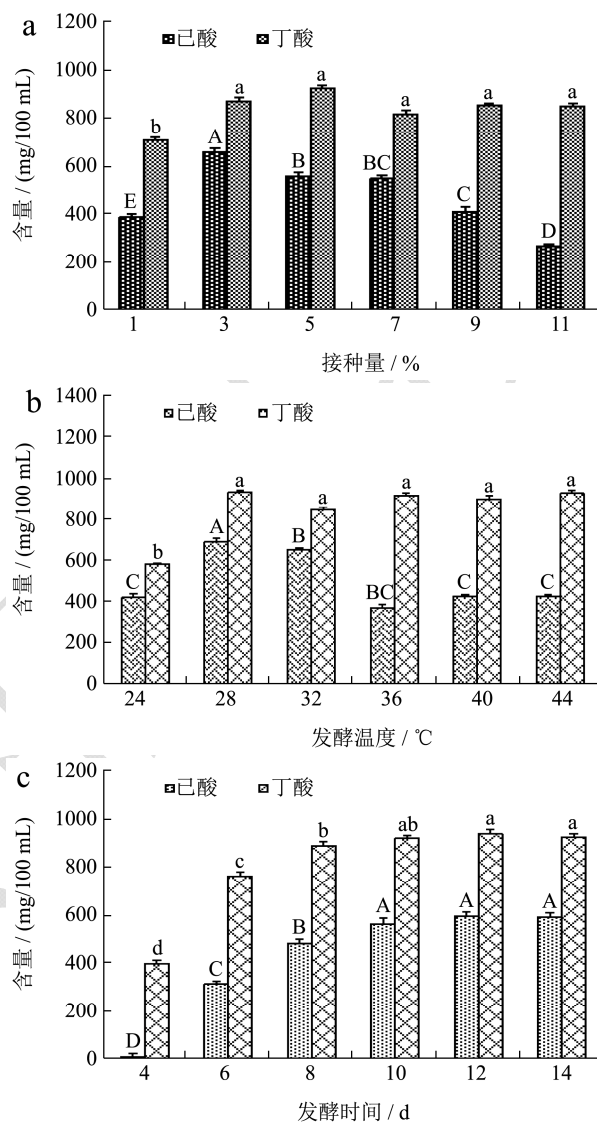


图2 接种量 (a)、发酵温度 (b)、发酵时间 (c) 对己酸和丁酸含量的影响

Fig.2 Effects of inoculation amount (a), fermentation temperature (b) and fermentation time (c) on the production of hexanoic acid and butyric acid

接种量的多少影响菌种在发酵过程中的生长速度,从而直接影响发酵周期^[34]。由图 2a 可知,己酸含量随接种量的增加呈上升后下降趋势,且在接种量为 3% 时,己酸量达到最大值,为 658.13 mg/100 mL,产己酸量显著高于其它接种量 ($p < 0.05$);丁酸含量随接种量增加呈上升后趋于稳定趋势,在接种量为 3% 时,丁酸量为 871.96 mg/100 mL,丁酸含量变化稳定无显著差异 ($p > 0.05$)。这说明在菌株接种量为 3% 时,产酸细菌活力强,协同作用达到了最优值,故选择接

种量为 3%。

由图 2b 可知,发酵温度对己酸的产量呈先上升后下降的趋势,当发酵温度为 28 ℃时,己酸和丁酸产量都达最高,分别为 692.09 mg/100 mL、933.34 mg/100 mL,产己酸量显著高于其它发酵温度 ($p<0.05$); 丁酸含量随发酵温度的增长呈上升后趋于稳定 ($p>0.05$)。浓香型白酒糟醅发酵温度一般不高于 35 ℃左右,适当的温度对发酵过程中产酸和产酯有积极影响,有利于功能菌快速被激活、繁殖及代谢,从而提高白酒质量^[35,36],这说明该结果符合实际生产的需求。故选择发酵温度为 28 ℃。

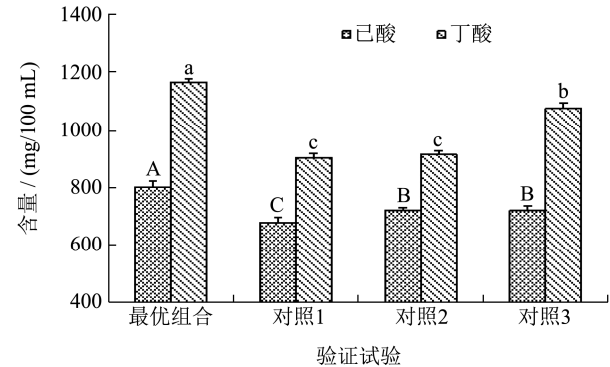


图 3 最优培养条件验证结果

Fig.3 Verification results of optimal culture conditions

注: 最优组合: 接种量 3%、发酵温度 28 ℃、发酵时间 12 d; 对照 1: 接种量 3%; 对照 2: 发酵温度 28 ℃; 对照 3: 发酵时间 12 d; 己酸和丁酸含量差异显著性分别用大写和小写英文字母表示, 无相同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。

由图 2c 可知,在发酵 4~10 d 时,己酸和丁酸量随发酵时间的增加呈上升趋势 ($p<0.05$); 在 12~14 d 时,己酸和丁酸含量趋于稳定且显著高于 4~10 d 的产量 ($p>0.05$),在发酵时间为 12 d,己酸和丁酸产量均达到最高,分别为 593.68 mg/100 mL、937.35 mg/100 mL。这可能是因为随着发酵时间的增长,培养基中的营养物质减少,且菌株发酵代谢产物过多可能抑制了菌株的协同发酵作用^[34]。故选择发酵时间为 12 d。通过验证试验结果表明: 发酵条件最优因素水平组合的丁酸和己酸都含量显著高于各对照组 ($p<0.05$),如图 3 所示。

2.3 发酵培养基响应面试验结果

2.3.1 部分因子试验

通过选用 N=5、试验组数为 16 次的部分因子试验,确定培养基的主要影响因子,试验设计及测定结果见表 3,方差分析见表 4。

由表 3 和表 4 可知,蛋白胨 (C) 对综合值 Y 的具有极显著影响 ($p<0.0001$), pH (A)、乙醇 (B)、乙酸钠 (D) 和丁酸钠 (E) 对综合值 Y 具有显著影响 ($p<0.01$); 模型中的交互项 AE 和 BD 对综合值 Y 具有极显著影响 ($p<0.0001$); 对部分因子试验结果进行回归分析,模型的确定系数 $R^2=0.988$,表明回归方程模型有效; 根据效应系数,乙酸钠、丁酸钠对综合值 Y 为正影响, pH、乙醇、蛋白胨对综合值 Y 为负影响。

表 3 部分因子试验设计及测定结果

Table 3 Results of factor test design and measurement

Std	Run	pH	乙醇	蛋白胨	乙酸钠	丁酸钠	己酸/(mg/100 mL)	丁酸/(mg/100 mL)	Y 综合值
1	1	-1	-1	-1	-1	1	0.00	1414.01	0.239
4	2	1	1	-1	-1	1	0.00	1656.77	0.330
10	3	1	-1	-1	1	1	497.81	1707.45	0.597
3	4	-1	1	-1	-1	-1	2.88	781.28	0.001
12	5	1	1	-1	1	-1	636.19	1236.12	0.487
6	6	1	-1	1	-1	1	764.44	1177.43	0.530
5	7	-1	-1	1	-1	-1	813.38	1091.23	0.521
16	8	1	1	1	1	1	1005.75	2105.43	1.000
14	9	1	-1	1	1	-1	857.25	2021.07	0.890
7	10	-1	1	1	-1	1	34.09	1676.28	0.355
8	11	1	1	1	-1	-1	852.19	1705.62	0.773
2	12	1	-1	-1	-1	-1	391.50	1039.88	0.390
9	13	-1	-1	-1	1	-1	426.09	1417.68	0.452
11	14	-1	1	-1	1	1	0.00	1777.15	0.376
13	15	-1	-1	1	1	1	16.88	1852.34	0.413
15	16	-1	1	1	1	-1	918.00	2074.25	0.945

表4 部分因子试验方差分析

Table 4 Factor test analysis of variance

因素	系数	F 值	P 值	显著性
模型	0.520	7214.03	0.0001	*
A-pH	-0.052	3696.91	0.0003	*
B-乙醇	-0.066	5993.56	0.0002	*
C-蛋白胨	-0.120	19492.98	<0.0001	**
D-乙酸钠	0.031	1356.76	0.0007	*
E-丁酸钠	0.017	379.59	0.0026	*
AB	0.012	201.35	0.0049	*
AC	-0.041	2276.76	0.0004	*
AD	0.031	1367.62	0.0007	*
AE	-0.100	15201.78	<0.0001	**
BC	-0.020	563.94	0.0018	*
BD	0.160	35341.89	<0.0001	**
CE	0.071	6914.38	0.0001	*
DE	-0.027	994.82	0.0010	*

注: *表示显著 ($p<0.01$); **表示极显著 ($p<0.0001$).

2.3.2 最陡爬坡试验

响应面拟合方程只在接近最佳值考察区域才近似真实情况,为了建立有效的响应面拟合方程则需逼近此区域,常用最陡爬坡法快速逼近最佳值区域^[37]。因此为了最大限度接近丁酸和己酸产量的真实值,选择pH、乙酸钠、丁酸钠和蛋白胨作为无乙醇条件下的变量,适当降低蛋白胨用量、pH值,增加乙酸钠和丁酸钠的用量。结果见表5。

己酸和丁酸的综合值Y随培养基中各组分含量的变化呈现先上升后下降的趋势。第4组、5组试验中

己酸、丁酸的含量分别达到最大值,其中第4组试验中综合值Y为0.960,达到最优试验结果,表明各显著影响因素在培养基中各组分的含量已接近最佳浓度范围。即pH为6.4,蛋白胨为5.4 g/L、乙酸钠为4.8 g/L、丁酸钠为4.2 g/L,以此浓度为中心点进行下一步Box-Behnken试验分析。

2.3.3 Box-Behnken 试验设计

通过Design-Expert.V 8.0.6软件进行BBD试验设计及数据进行多元二次回归拟合,以Y综合值为响应值,析因部分试验12次,中心点重复试验次数为5次。BBD试验设计及结果见表6。全变量编码水平的二次回归方程如下:

$$Y=0.86-0.044A+0.19B+0.21C-0.056AB-0.12AC-0.056BC-0.29A^2-0.21B^2-0.17C^2$$

由表7方差分析可知:该二次回归模型 $p<0.01$,达到极显著水平;模型中失拟项 $p=0.0654>0.05$,表明失拟项不显著,说明该试验模型可以相对客观良好反应各个因素与Y综合值之间的关系;回归方程决定系数 $R^2=0.8992$,确定因素 $R^2_{adj}=0.7697$,说明该模型可解释90%响应值变化,即Y综合值的变化有90%来自所取自变量因素蛋白胨、乙酸钠、丁酸钠3项条件的变化。该二阶回归方程对实验拟合情况好,说明试验方法的可靠性比较高,可用发酵产己酸和丁酸对试验综合评分值的理论预测。回归方程中C、 A^2 对综合评分值极显著($p<0.01$),B、 B^2 对综合评分值影响显著($p<0.05$),A、AB、AC、BC、 C^2 不显著($p>0.05$)。由此可知,各因素对己酸和丁酸产量综合值Y的影响程度主次顺序为:C>B>A,即丁酸钠>乙酸钠>蛋白胨。

表5 最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Experimental design and results of steepest ascent path

编号	pH	蛋白胨/(g/L)	乙酸钠/(g/L)	丁酸钠/(g/L)	己酸/(mg/100 mL)	丁酸/(mg/100 mL)	Y 综合值
1	7.0	9.0	3.0	3.0	916.95	1712.04	0.445
2	6.8	7.8	3.6	3.4	1007.10	1919.28	0.684
3	6.6	6.6	4.2	3.8	1008.28	2181.54	0.905
4	6.4	5.4	4.8	4.2	1042.88	2217.31	0.960
5	6.2	4.2	5.4	4.6	842.06	2264.94	0.853
6	6.0	3.0	6.0	5.0	538.31	1729.76	0.183
7	5.8	1.8	6.4	5.4	469.49	1771.64	0.168
8	5.6	0.6	6.8	5.8	358.77	1667.81	0.000

表6 BBD 试验设计及结果

Table 6 Box-Behnken design and corresponding results

Std	Run	蛋白胨/(g/L)	乙酸钠/(g/L)	丁酸钠/(g/L)	己酸/(mg/100 mL)	丁酸/(mg/100 mL)	Y 综合值
12	1	5.4	5.4	4.6	1074.62	2298.45	0.674
6	2	6.6	4.8	3.8	967.80	2104.24	0.271

转下页

接上页

14	3	5.4	4.8	4.2	1167.28	2359.74	0.902
17	4	5.4	4.8	4.2	1108.17	2302.58	0.736
4	5	6.6	5.4	4.2	996.00	2313.76	0.557
2	6	6.6	4.2	4.2	908.32	1996.76	0.048
3	7	4.2	5.4	4.2	1147.56	2289.45	0.788
5	8	4.2	4.8	3.8	957.28	1956.87	0.086
9	9	5.4	4.2	3.8	942.43	2054.54	0.172
1	10	4.2	4.2	4.2	906.79	2004.22	0.054
10	11	5.4	5.4	3.8	1002.57	2167.20	0.402
8	12	6.6	4.8	4.6	1024.20	2191.02	0.466
11	13	5.4	4.2	4.6	1099.54	2253.93	0.666
16	14	5.4	4.8	4.2	1162.57	2267.23	0.789
15	15	5.4	4.8	4.2	1199.74	2339.32	0.934
7	16	4.2	4.8	4.6	1123.67	2307.87	0.768
13	17	5.4	4.8	4.2	1152.15	2397.62	0.919

表 7 BBD 试验方差分析结果

Table 7 The results of anova analysis of Box-Behnken design

来源	自由度	均方和	均方	F 值	p 值	显著性
模型	9	1.430	0.160	6.94	0.0091	**
A-蛋白胨	1	0.016	0.016	0.68	0.4360	
B-乙酸钠	1	0.270	0.270	11.95	0.0106	*
C-丁酸钠	1	0.340	0.340	14.70	0.0064	**
AB	1	0.013	0.013	0.55	0.4819	
AC	1	0.059	0.059	2.58	0.1520	
BC	1	0.012	0.012	0.54	0.4875	
A ²	1	0.350	0.350	15.16	0.0059	**
B ²	1	0.180	0.180	7.84	0.0265	*
C ²	1	0.120	0.120	5.35	0.0540	
残差	7	0.160	0.023			
失拟项	3	0.130	0.043	5.56	0.0654	
纯误差	4	0.031	7.7E-0033			
总和	16	1.590				
相关系数		R ² =0.8992				
			R ² _{adj} =0.7697			

注: *差异显著 $p<0.05$; **差异极显著 $p<0.01$ 。

2.3.4 显著因素水平的优化

为了更直观反映蛋白胨(A)、乙酸钠(B)和丁酸钠(C)添加量之间的交互作用对综合值 Y 的影响,利用 Design-Expert 软件绘制出各因素与响应值之间三维空间曲线图和等高线图,如图 4。响应面图形的响应值是实验中各试验因子 A、B 和 C 两两交互作用,及最佳参数和各参数之间的相互作用所构成的曲面图;曲面越陡峭,各因素对响应值的影响就越显著;同一等高线上的每个点代表的数值相同,而等高线的形状可反映各因素之间交互作用的显著性,等高线为椭圆形,

则试验因子两两交互作用差异性显著,若为圆形则差异性不显著^[38-40]。

回归模型存在稳定点蛋白胨 A、乙酸钠 B、丁酸钠 C 的编码值分别为 5.10、5.04、4.45,此时 Y 综合值为 0.962,己酸和丁酸的产量分别为 1184.21 mg/100 mL 和 2387.84 mg/100 mL。即当蛋白胨、乙酸钠和丁酸钠的添加量分别为 5.10、5.04 和 4.45 g/L 时,该模型预测的最大 Y 综合值为 0.962,己酸和丁酸的产量最大估计值分别为 1184.21 mg/100 mL 和 2387.84 mg/100 mL。

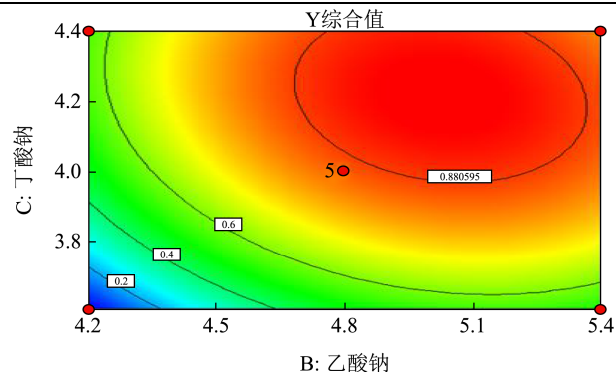
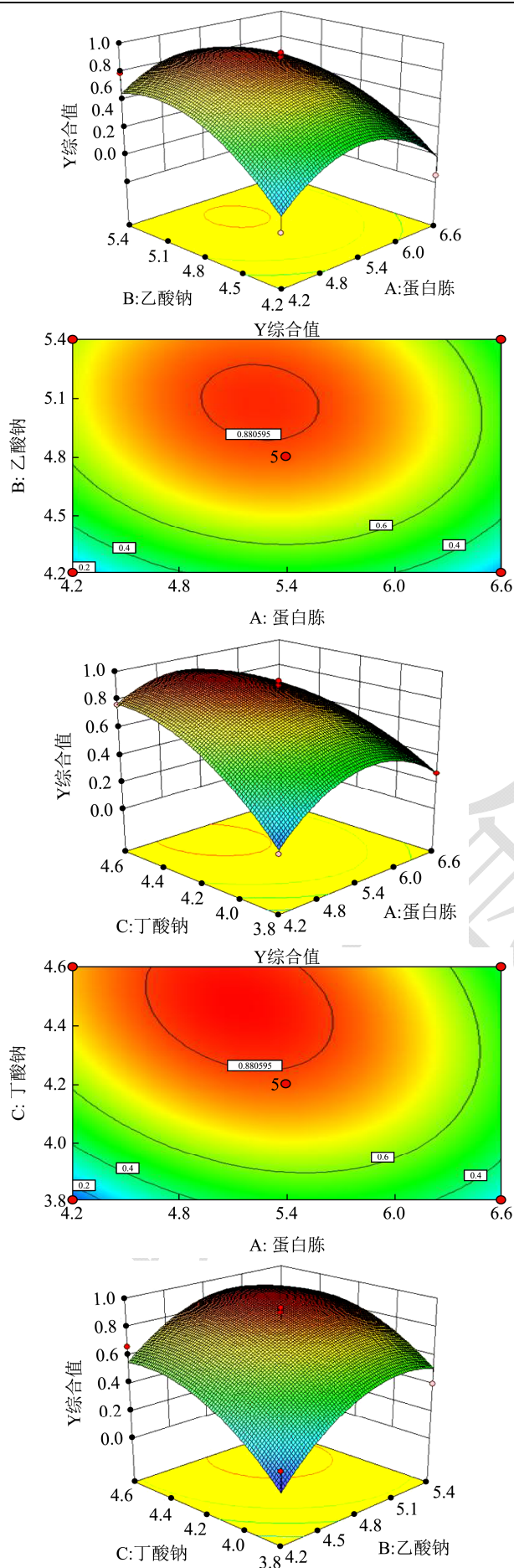


图4 蛋白胨A、乙酸钠B和丁酸钠C添加量三因素交互作用对综合评分值的影响

Fig.4 Effect of three factors of peptone sodium A, acetate B and butyrate C amount on the composite score value

2.3.5 验证试验

为表明响应面模型的有效性, 对其结果及其验证试验。利用优化后的发酵培养基条件(蛋白胨5.10 g/L、乙酸钠5.04 g/L、丁酸钠4.55 g/L)进行3组平行试验, 产己酸含量和丁酸含量分别为1156.21、2345.84 mg/100 mL; 以未优化发酵培养基为对照组进行验证试验, 且试验结果与模型预测值进行对比, 其结果见图5所示, 应用优化后的发酵培养基发酵产物己酸和丁酸含量都显著高于优化前 ($p < 0.05$) (图5a); 验证试验结果与模型预测值差异不显著 ($p > 0.05$) (图5b)。

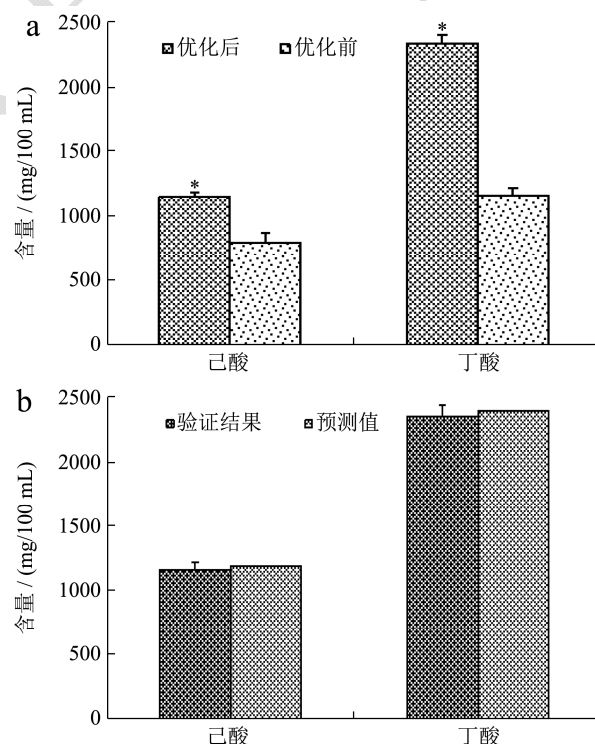


图5 营养因子优化验证

Fig.5 Nutrient factor optimization verification

注: 己酸和丁酸含量差异用“*”表示, 有“*”表示差异显著 ($p < 0.05$), 无“*”表示差异不显著 ($p > 0.05$)。

3 结论

3.1 本研究通过对特基拉芽孢杆菌 (*Bacillus tequilensis*, SJ-1)、空气芽孢杆菌 (*Bacillus aerius*, SJ-3)、丁酸梭菌亚种 (*Clostridium butyricum* subsp, SJ-8) 3 株菌株与优质窖泥富集菌液分别按 5% 的接种量进行复配; 通过单因素试验和响应面优化得到最佳发酵条件: 接种量 3%、培养温度 28 °C、发酵时间 12 d、pH 6.4、蛋白胨 5.10 g/L、乙酸钠 5.04 g/L 和丁酸钠 4.45 g/L; 丁酸钠对己酸和丁酸的产量影响极显著 ($p<0.01$), 乙酸钠影响显著 ($p<0.05$), 而蛋白胨不显著 ($p>0.05$), 但蛋白胨的二次项影响极显著 ($p<0.01$)。在优化后的最佳发酵条件下代谢产生的己酸和丁酸产量分别为 1156.21、2345.84 mg/100 mL, 相较于初始条件, 优化后的发酵条件使己酸含量和丁酸含量分别增加了 3.32 倍和 3.22 倍。结果表明: 将不同产酸菌株进行协同发酵有利于提高己酸和丁酸的产量, 其中特基拉芽孢杆菌 SJ-1、空气芽孢杆菌 SJ-3、丁酸梭菌亚种 SJ-8 和富集菌液协同发酵产己酸和丁酸的量最佳; 发酵培养基的营养因子影响己酸和丁酸的生成。

3.2 白酒酿造过程中, 功能菌液的质量影响着窖泥微生物生态功能, 进而影响白酒的质量和风格特征, 通过厌氧梭菌和芽孢杆菌的复配工艺研究并优化其产酸培养基, 以此来强化其发酵代谢产白酒风味物质的含量, 同时为功能菌在浓香型大曲酒的养窖、护窖、培养人工窖泥、制作酯化液等应用方面提供理论参考, 以改善和提高浓香型大曲酒的质量。

参考文献

- [1] 周金虎, 李良, 方尚玲, 等. 窖泥中高产愈创木酚类功能菌的筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(3): 64-70
ZHOU Jin-hu, LI Liang, FANG Shang-ling, et al. Screening and identification of functional bacteria with high yield guaiacol in the mud [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(3): 64-70
- [2] 孙宝国, 吴继红, 黄明泉, 等. 白酒风味化学研究进展[J]. 中国食品学报, 2015, 15(9): 1-8
SUN Bao-guo, WU Ji-hong, HUANG Ming-quan, et al. Recent advances of flavor chemistry in Chinese liquor spirits (Baijiu) [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(9): 1-8
- [3] 程伟, 吴丽华, 徐亚磊, 等. 浓香型白酒酿造微生物研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(3): 1-4
CHENG Wei, WU Li-hua, XU Ya-lei, et al. Research progress on brewing microbes in the production process of Luzhou-flavor liquor [J]. China Brewing, 2014, 33(3): 1-4
- [4] 吴文睿, 李安军, 汤有宏, 等. 古井贡窖泥功能厌氧菌发酵风味物质的研究[J]. 酿酒科技, 2015, 12: 57-61
WU Wen-rui, LI An-jun, TANG You-hong, et al. The flavoring compounds produced by the fermentation of functional anaerobic bacteria from Gujing Gongjiu pit mud [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 12: 57-61
- [5] 陈彬, 闫寅卓, 王德良, 等. 不同窖龄窖泥中微生物代谢产物及其规律研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(12): 207-214
CHEN Bin, YAN Yin-zhuo, WANG De-liang, et al. The microbial metabolites and regularity of the different stages in pit mud [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(12): 207-214
- [6] 徐发. 我国白酒行业现状和发展趋势分析[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2010
XU Fa. Analysis of the current situation and development trend of the China's liquor industry [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2010
- [7] 沈怡方. 白酒风味质量形成的主要因素[J]. 酿酒科技, 2005, 11: 19-23
SHEN Yi-fang. The main factors influencing the formation of liquor flavor [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2005, 11: 19-23
- [8] Jin G Y, Zhu Y, Xu Y. Mystery behind Chinese liquor fermentation [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 63: 18-28
- [9] 田源, 孔小勇, 方芳. 浓香型白酒发酵过程微生物合成正丙醇途径解析[J]. 微生物学报, 2020, 7: 1421-1432
TIAN Yuan, KONG Xiao-yong, FANG Fang, et al. Microbial n-propanol synthesis during Luzhou-flavor liquor fermentation [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 7: 1421-1432
- [10] Fan W, Qian M C. Headspace solid phase microextraction and gas chromatography-olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese "Yanghe Daqu" liquors [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005, 53(20): 7931-7938
- [11] 庄名扬. 中国白酒香味物质形成机理及酿酒工艺的调控[J]. 酿酒, 2007, 43(2): 109-113
ZHUANG Ming-yang. Mechanism of Chinese liquor aroma substance formation and regulation of brewing technology [J]. Liquor Making, 2007, 43(2): 109-113
- [12] 马特, 宋连宝, 赵辉. 白酒窖泥中蛋白酶产生菌的筛选及复配[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 146-151

- MA Te, SONG Lian-bao, ZHAO Hui. Screening of protease-producing strains in liquor pit mud and mixed-culture fermentation for enhanced production [J]. Food Science, 2016, 37(7): 146-151
- [13] 赵爽,杨春霞,徐曼,等.浓香型白酒生产中酿酒微生物研究进展[J].食品与发酵科技,2012,48(1):24-29
- ZHAO Shuang, YANG Chun Xia, XU Man, et al. A review of research progress about Luzhou-flavor liquor making microbes in liquor production [J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2012, 48(1): 24-29
- [14] Mazza P, Monciardini P, Cavaletti L, et al. Diversity of actionplanes and related genera isolated from an Italian soil [J]. MicrobEcol, 2003, 45(4): 362-372
- [15] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews, 1995, 59(1): 143-169
- [16] 罗惠波,甄攀,黄治国.浓香型白酒窖池细菌群落[J].微生物学通报,2010,37(11):1621-1627
- LUO Hui-bo, ZHEN Pan, HUANG Zhi-guo. Research on bacterial community in Luzhou-flavor liquors pit [J]. Microbiology China, 2010, 37(11): 1621-1627
- [17] 杨菁瑾,唐雪,杨先超,等.泸州老窖不同窖龄窖泥中己酸菌遗传多样性及系统发育[J].四川农业大学学报,2015,33(2): 181-188
- YANG Jing-jin, TANG Xue, YANG Xian-chao, et al. Genetic diversity and phylogeny of caproic acid bacteria in different aged Luzhou Laojiao pit mud [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2015, 33(2): 181-188
- [18] Yuan H W, Tan L, Chen H, et al. Vinegar production from post-distillation slurry deriving from rice shochu production with the addition of caproic acid-producing bacteria consortium and lactic acid bacterium [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 124(6): 653-659
- [19] 张健,张宿义,秦辉,等.不同功能菌液人工窖泥的培养研究[J].酿酒科技,2018,11:45-52
- ZHANG Jian, ZHANG Su-yi, QIN Hui, et al. Culture of manmade pit mud by different functional bacteria liquid [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2018, 11: 45-52
- [20] 万朕.窖泥功能菌筛选及 DYH-1 养窖液的应用研究[D].武汉:湖北工业大学,2011
- WAN Zhen. Isolation of function microorganism in the mud pit and the research of application for the DYH-1 pit solution [D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2011
- [21] 任剑波,姚万春,唐玉明,等.窖泥复合功能菌液培养配方研究[J].酿酒,2014,41(5):47-50
- REN Jian-bo, YAO Wan-chun, TANG Yu-ming, et al. Studies on the cultivate formula of hybrid functional microorganism of pit mud [J]. Liquor Making, 2014, 41(5): 47-50
- [22] 黄新仁,黎小军,陶思俊,等.基于响应面的米曲霉产 α -淀粉酶的发酵培养基优化[J].广东农业科学,2012,39(3):81-83
- HUANG Xin-ren, LI Xiao-jun, TAO Si-jun, et al. Optimization the α -amylase production by *Aspergillus oryzae* in fermentation medium using response surface methodology [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(3): 81-83
- [23] 储炬,李友荣.现代工业发酵调控学(第二版)[M].北京:化学工业出版社,2006:240-241
- CHU Ju, LI You-rong. Modern Industrial Fermentation Regulation and Control (Second Edition) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 240-241
- [24] Hirsch A, Grinstead E. Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin [J]. Journal of Dairy Research, 1954, 21(1): 101-110
- [25] Box G E P, Hunter W G, Hunter J S. Statistics for experimenters [J]. Interscience, 2005, 39(3): 387-388
- [26] Myers R H, Montgomery D C. Response surface methodology: process and product in optimization using designed experiments [J]. Technometrics, 1996, 59(3): 284-286
- [27] Jeon B S, Moon C, Kim B C, et al. In situ extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by *Clostridium* sp. BS-1 [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2013, 53(53): 143-151
- [28] 卢超,陈景鲜,王国霞,等.枯草芽孢杆菌 L07 产中性蛋白酶发酵条件优化[J].食品与发酵工业,2020,16:148-153
- Lu Chao, Chen Jing-xian, Wang Guo-xia, et al. Optimization of fermentation conditions for neutral protease produced by *Bacillus subtilis* L07 [J]. Food and Fermentation Industries: 2020, 16: 148-153
- [29] 汪文鹏,王艳丽,吴树坤,等.浓香型白酒窖泥中 3 株厌氧菌的分离鉴定及代谢产物分析[J].食品科技,2018,43(2):15-20
- WANG Wen-peng, WANG Yan-li, WU Shu-kun, et al. Isolation and identification of three anaerobic bacteria strains in Luzhou-flavor liquor and metabolites analysis [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 15-20
- [30] 杨爱华,刘雪,张学梅,等.浓香型窖泥功能菌的培养工艺改进试验[J].酿酒科技,2018,10:120-125
- YANG Ai-hua, LIU Xue, ZHANG Xue-mei, et al. Improvement of the culture of functional bacteria in pit

- mud of Nongxiang Baijiu [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2018, 10: 120-125
- [31] 陈兴杰,吴攀攀,徐敏锐,等.窖泥己酸菌和丁酸菌联合接种发酵液有机酸检测与分析[J].酿酒,2017,44(3):60-64
CHEN Xin-jie, WU Pan-pan, XU Min-rui, et al. Detection and analysis of organic acids in fermented liquid by inoculating caproic acid bacteria and butyric acid bacteria [J]. Liquor Making, 2017, 44(3): 60-64
- [32] 曹新志,黄春萍,熊俐,等.共培养对己酸菌生长代谢影响的初步研究[J].中国酿造,2010,11:35-38
CAO Xin-zhi, HUANG Chun-ping, XIONG Li, et al. Effect of co-cultivation on growth and metabolism of caproic acid bacteria [J]. China Brewing, 2010, 11: 35-38
- [33] 周新虎,陈翔,甘广东,等.产酸菌混合发酵代谢特性的研究[J].酿酒科技,2015,6:41-44
ZHOU Xin-hu, CHEN Xiang, GAN Guang-dong, et al. The metabolism of acid-producing bacteria in mixed fermentation [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 6: 41-44
- [34] 郭燕,邓杰,任志强,等.响应面优化酿酒酵母与窖泥酯化细菌协同发酵产丁酸乙酯和己酸乙酯[J/OL].食品科学: 1-14[2020-08-09]. <http://ffiy208e51c2dd88406685526280e50de659hw6c6nxcvff6qxq.fffb.suse.cwkeji.cn:999/kcms/detail/11.2206.TS.20200722.1607.218.html>
GUO Yan, DENG Jie, REN Zhi-qiang, et al. Optimization for the production of ethyl hexanoate and ethyl butyrate by cooperative fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and esterifying bacteria in put mud using response surface methodology [J/OL]. Food Science: 1-14[2020-08-09]. <http://ffiy208e51c2dd88406685526280e50de659hw6c6nxcvff6qxq.fffb.suse.cwkeji.cn:999/kcms/detail/11.2206.TS.20200722.1607.218.html>
- [35] 赖登燊,梁诚.入窖七因素的变化规律及相互关系的研究(二):入窖温度[J].酿酒科技,2011,1:33-36
LAI Deng-yi, LIANG Cheng. Study on the change rules of seven factors for pits entry and their correlations (II): pit entry temperature [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2011, 1: 33-36
- [36] 刘英杰,张志伟,韩墨,等.己酸菌培养条件和不同微生物对己酸菌生长代谢影响的研究[J].中国调味品,2018,43(2): 8-11
LIU Ying-jie, ZHANG Zhi-wei, HAN Mo, et al. Research on culture condition and different microbial effects on metabolism of caproic acid bacteria [J]. China Condiment, 2018, 43(2): 8-11
- [37] 张晓萍,杨静,勇强,等.响应面优化法在纤维素酶合成培养基设计上的应用[J].林产化学与工业,2010,30(3):29-34
ZHANG Xiao-ping, YANG Jing, YONG Qiang, et al. Statistical optimization of process parameters on cellulase production [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2010, 30(3): 29-34
- [38] Liu W, Yu Y, Yang R Z, et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from *Gynura medica* leaf using response surface methodology and chemical composition analysis [J]. Int. J. Mol. Sci, 2010, 11(11): 4750-4763
- [39] Popov S V, Ovodova R G, Golovchenko V V, et al. Characterisation of the oral adjuvant effect of lemnian, a pectic polysaccharide of *Lemna minor* L [J]. Vaccine, 2006, 24(26): 5413-5419
- [40] Jiang Y Q, Wang H, Zhao C F, et al. Establishment of stable microalgal-bacterial consortium in liquid digestate for nutrient removal and biomass accumulation [J]. Bioresource Technology, 2018, 268: 300-307

(上接第 53 页)

- [16] Katharina Schmölzer, Gutmann Alexander, Diricks Margo, et al. Sucrose synthase: a unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development [J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(2): 88-111
- [17] 唐小雁,陈美琪,林影,等.毕赤酵母全细胞催化合成新型高倍甜味剂莱鲍迪苷 A[J].现代食品科技,2019,36(1):150-155
TANG Xiao-yan, CHEN Mei-qi, LIN Ying, et al. *Pichia pastoris* whole cell-catalyzed synthesis of a novel high-intensity sweetener rebaudioside A [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 36(1): 150-155
- [18] Y Wang, Chen L, Li Y, et al. Efficient enzymatic production of rebaudioside A from stevioside[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(1): 67-73
- [19] 刘欢,李艳,严明,等.重组酿酒酵母全细胞催化合成莱鲍迪苷 A[J].食品与发酵工业,2012,38(7):6-10
LIU Huan, LI Yan, YAN Ming, et al. Whole cell catalyzed synthesis of rebaudioside A by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(7): 6-10