

浓香型白酒酯化菌协同产酯的工艺优化

黄治国¹, 蒲领平¹, 罗惠波¹, 林峰², 张宿义², 程国富³, 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) (3. 四川宇晟酒业投资管理有限公司成都分公司, 四川成都 610000)

摘要: 为了提高浓香型白酒中己酸乙酯和丁酸乙酯的产量, 本文以从浓香型窖泥中已筛出的拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*)、广西梭菌 (*Clostridium guangxiense*)、煎盘梭菌 (*Clostridium sartagoforme*) 3 株产酯性能较好的菌株为试验材料, 对 3 株菌进行混合培养试验, 并通过 Box-Behnken 响应面设计方法对各菌株的复配条件进行优化, 并确定最佳复配条件。结果表明: 3 株菌两两之间均有一定的协同作用, 同时添加 3 株菌复配发酵效果最优, 己酸乙酯和丁酸乙酯含量显著高于其他协同发酵试验结果 ($p < 0.05$); 复配发酵中 3 株菌接种量最佳配比为 Y1:Y2:Y3=4:1.5:4.5, 在此优化培养条件下, 己酸乙酯产量可到达 32.25 mg/100 mL, 比优化前 (19.78 mg/100 mL) 提高了 0.63 倍; 丁酸乙酯产量可到达 117.68 mg/100 mL 比优化前 (45.37 mg/100 mL) 提高了 1.59 倍, 优化后己酸乙酯和丁酸乙酯含量显著高于优化前 ($p < 0.05$)。可以通过发挥微生物间的协同作用, 达到提高白酒风味物质的目的。

关键词: 窖泥; 酯化细菌; 己酸乙酯; 丁酸乙酯; 响应面法; Box-Behnken 试验设计

文章编号: 1673-9078(2021)02-64-71

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.2.0750

Optimization of the Conditions for Synergistic Production of Esters by Esterifying Bacteria of Luzhou-flavor Liquor

HUANG Zhi-guo¹, PU Ling-ping¹, LUO Hui-bo¹, LIN Feng², ZHANG Su-yi², CHENG Guo-fu³, DENG Jie¹

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

(3. Chengdu Branch of Sichuan Yusheng Liquor Investment Management Co. Ltd., Chengdu 610000, China)

Abstract: In order to increase the yield of ethyl hexanoate and ethyl butyrate in Luzhou-flavor liquor, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium guangxiense* and *Clostridium sartagoforme* with better ester-producing performance that have been screened from Luzhou-flavor pit mud were used as test materials. The 3 strains were subjected to a mixed culture experiment, and the compounding conditions of each strain were optimized by the Box-Behnken response surface test design method, and the best compounding conditions were determined. The results showed that the three strains had a certain synergistic effect between two of them, and the mixed fermentation effect of adding 3 strains at the same time was the best. The content of ethyl caproate and ethyl butyrate was significantly higher than the results of other cooperative fermentation experiments ($p < 0.05$); the optimal ratio of inoculation amount of 3 strains in compound fermentation was Y1:Y2:Y3 = 4:1.5:4.5. Under the optimized culture conditions, the yield of ethyl caproate could reach 32.25 mg/100 mL, which was 0.63 times higher than that before optimization (19.78 mg/100 mL); the yield of ethyl butyrate could reach 117.68 mg/100 mL, 1.59 times higher than that before optimization (45.37 mg/100 mL). The content of ethyl caproate and ethyl butyrate after optimization was significantly higher than that before optimization ($p < 0.05$). The results showed that the synergistic effect of microorganisms could be used to improve liquor flavor.

Key words: pit mud; esterifying bacteria; ethyl caproate; ethyl butyrate; response surface method; Box-Behnken design

引文格式:

黄治国, 蒲领平, 罗惠波, 等. 浓香型白酒酯化菌协同产酯的工艺优化[J]. 现代食品科技, 2020, 37(2): 64-71

HUANG Zhi-guo, PU Ling-ping, LUO Hui-bo, et al. Optimization of the conditions for synergistic production of esters by esterifying bacteria of Luzhou-flavor liquor [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 37(2): 64-71

收稿日期: 2020-08-12

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); 中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目 (2018JJ007); 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 2019 年科技创新苗子工程项目 (2019CXMZ07)

作者简介: 黄治国 (1978-), 男, 教授, 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

浓香型白酒的酿造是一个复杂的微生物群落相互作用的过程^[1]。窖泥是浓香型白酒主要生香功能菌生长繁殖的载体,酒醅发酵过程中产生的有机酸类和酯类等物质是浓香型白酒浓郁窖香的基础。窖泥中的微生物种类丰富,酯化型微生物能将酸类物质和醇类物质进行酯化产酯,是窖泥中一类重要的功能微生物^[2]。不同的产香微生物协同作用才生成了浓香型白酒以己酸乙酯为主体,三大酯和四大酸辅助香型的独特风格白酒^[3,4],菌株之间的协同作用有利于目标产物的合成,能提高目标产物的产量^[5]。

由于窖泥中高醇、高酸、微氧的极端条件,导致窖泥中的酯化型微生物主要以细菌为主^[6]。细菌是白酒酿造中的重要生香微生物,但目前对酿酒环境中酯化细菌方面的研究相对较少,主要集中在对葡萄球菌、假单胞菌和放线菌等的研究^[7,8]。近年来,关于窖泥中酯类物质的研究以香气物质及其前体物的产生菌为主,许多酯化细菌的研究^[9-11]主要在酒曲环境中进行,且筛选出的酯化细菌均为好氧菌株。因此对酿造环境中产酯细菌有待于进一步的研究和探索,寻找新的窖泥微生物研究途径,扩大对窖泥中微生物资源的利用非常有必要。

响应面优化法广泛应用于食品、生物、环境等各方面^[12-14],它能以很少的实验数量和时间对实验进行全面研究,科学、准确的分析局部与整体之间的关系,在优化配比的条件下,可以提高不同微生物之间的协同效果,有利于代谢产物的积累^[15-17]。本文主要以窖泥中分离出来的3株酯化细菌的接种量为因素,先利用最陡爬坡试验逼近响应值区域,后利用Box-Behnken试验设计对主要影响因子影响己酸乙酯和丁酸乙酯的产量建立二次多项数学模型,并对该模型的显著性利用Design-Expert.V 8.0.6软件进行检验^[18],优化得到复配发酵中各菌株接种量的最佳配比,以期为提高浓香型白酒质量提供理论依据和参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂

拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、广西梭菌(*Clostridium guangxiense*)、煎盘梭菌(*Clostridium sartagoforme*)均由酿酒生物技术及应用四川省重点实验室窖内微生物课题组从优质窖泥中分离得到。

MES培养基、L-半胱氨酸盐酸盐(分析纯,北京奥索莱宝生物技术有限公司),乙酸丁酯(色谱纯)、丁酸钠、硫酸钠、二水合氯化钙、碳酸氢钠、葡萄糖、磷酸二氢钾、酵母膏(分析纯,成都艾科达化学试剂

有限公司)。

1.2 主要仪器设备

LRH-250生化培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司)、AW200SG厌氧工作站(金坛市科技分析仪器有限公司)、CI54DS立式压力蒸汽灭菌锅(厦门仪器有限公司)、SW-CJ-IF超净工作台(苏州集团空气技术有限公司)、AR2140电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)、7890A-5975B气相色谱-质谱联用仪(Agilent科技有限公司)、UV-1200紫外可见分光光度仪(翱艺仪器上海有限公司)、55i+Ds-SM-U1显微成像系统(日本NIKON公司)、Scan1200菌落分析仪(Inter science公司)。

1.3 培养基

计数培养基:称取MES 0.5 g/L、L-半胱氨酸盐酸盐 0.25 g/L、乙酸钠 1 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、氯化钠 1.0 g/L、碳酸氢钠 0.3 g/L、硫酸钠 0.5 g/L、二水合氯化钙 0.15 g/L、六水氯化镁 0.4 g/L、酵母浸粉 1.0 g/L、蛋白胨 1.5 g/L、葡萄糖 3 g/L、丁酸钠 2 g/L, pH 5.5, 121 °C 灭菌 15 min。

发酵培养基:在计数培养基的基础上,添加可溶性淀粉 5 g/L、5%乙醇溶液 5 mL/L。

1.4 试验方法

1.4.1 菌株复配试验

1.4.1.1 混合培养试验

将活化后的菌株Y1、Y2、Y3分别培养至对数期末期后,按1:1的比例分别混合制成Y1-Y2、Y1-Y3、Y2-Y3,按1:1:1的比例混合制成Y1-Y2-Y3种子液,并以5%接种量接种到计数培养基中,34 °C厌氧培养2 d后,再用紫外分光光度计(OD₆₆₀)测定吸光值,以未接种的培养基作为空白,记录结果。

1.4.1.2 复配发酵试验

单菌发酵:将分离的菌株活化后,培养至对数期末期作为种子液,在厌氧工作站中按5%接种量将3株菌分别接种于装有80 mL发酵培养基的厌氧瓶中,移至生化培养箱中34 °C下培养12 d,通过GC-MS检测发酵产物。

将分离的菌株活化后,按1:1的比例分别混合制成Y1-Y2、Y1-Y3、Y2-Y3,按1:1:1的比例混合制成Y1-Y2-Y3种子液,在厌氧工作站中按5%接种量将种子液分别接种于已灭菌并装有80 mL发酵培养基的厌氧瓶中,移至生化培养箱中34 °C培养12 d,通过GC-MS检测发酵产物。

1.4.2 标准曲线的绘制

将分离的菌株活化后, 培养至对数期末期作为种子液, 按 5%接种量分别接种于除氧后的 80 mL 灭菌计数培养基, 34 °C 培养 2 d, 将菌液分别稀释 0、1、2、4、6、8、10 倍, 用紫外分光光度计 (OD₆₆₀) 测吸光值, 以未接种的培养基作为空白对照, 记录结果。再将上述菌液再分别稀释到 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 3 个梯度涂布, 每个梯度涂布三次, 用菌落计数器计数, 并于 660 nm 波长处测定吸光度。以菌株浓度 (CFU/mL) 为横坐标, 以吸光度值为纵坐标, 得出 Y1 菌株拟合公式 = 1×10⁻⁶x-0.0111, R²=0.9997; Y2 菌株拟合公式 = 5×10⁻⁶x+0.0105, R²=0.9986; Y3 菌株拟合公式 = 4×10⁻⁷x-0.0293; R²=0.9995。并在相同 OD 值 0.7 条件下利用上述公式计算出各自所对应的菌体数。

1.4.3 样品检测方法

1.4.3.1 样品预处理

取 5 mL 种子液和 0.25 mL 浓度为 20 mg/100 mL 乙酸正丁酯装入 15 mL 的顶空瓶中, 混匀后于 55 °C 下先平衡 15 min, 再萃取 30 min, 随后进行手动进样。

1.4.3.2 GC-MS 分析方法

(1) 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 °C; 程序升温: 初始温度为 45 °C, 保持 1 min, 然后以 6 °C/min 的升温速率升至 160 °C, 保持 1 min, 再以 20 °C/min 到 230 °C, 保持 6 min。

(2) 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 20~550 amu, 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C, 接口温度 230 °C。

1.4.3.3 定性与定量分析

定性: 通过所测得质谱图与 NIST05a.L 标准谱库比对, 利用匹配度均大于或等于 80 (最大值为 100) 的特征离子进行定性分析, 并鉴定结果^[19]。

半定量: 以 60%乙醇配制浓度为 20 mg/100 mL 的乙酸正丁酯内标溶液, 在 5 mL 发酵液中加入 100 μL 内标溶液, 萃取后, 再根据内标峰面积与样品中所测物质峰面积之比以及内标在样品中的最终浓度来计算检测物质的含量^[20]。

1.4.4 复配优化方法

1.4.4.1 最陡爬坡试验

最陡爬坡试验根据 1.4.1 和 1.4.2 的试验结果, 对达到显著水平的影响因素设定变化方向和步长, 逼近最佳区域, 确定各试验因素取值的中心点。

1.4.4.2 Box-Behnken Design 试验设计

在最陡爬坡试验基础上, 通过 BBD 试验设计与

方差分析得到各接种量的最佳水平, 利用 Design-Expert.V8.0.6 软件进行 Box-Behnken 试验, 以 Y1、Y2 和 Y3 3 株菌的接种量为自变量, 以综合归一值 Y 为响应值, 从而确定 3 株菌协同发酵产己酸乙酯和丁酸乙酯的最优发酵接种配比, 得到编码水平 (表 1)。

表 1 响应面试验因素编码水平

Table 1 Factor code and level of response surface experiments

因素	编码	编码水平		
		-1	0	1
Y1/(cfu/mL)	A	2.8×10 ⁶	3.4×10 ⁶	4.0×10 ⁶
Y2/(cfu/mL)	B	8.0×10 ⁵	1.0×10 ⁶	1.2×10 ⁶
Y3/(cfu/mL)	C	4.0×10 ⁶	5.2×10 ⁶	6.4×10 ⁶

1.4.4.3 验证试验

按照响应面试验所得预测结果, 分别配置 Y1、Y2 和 Y3 菌株的菌悬液, 按 1:1:1 的比例制成复合种子液, 以 5%接种量接种于除氧后的 80 mL 灭菌发酵培养基中, 34 °C 培养 12 d, 通过 GC-MS 分析发酵产物。

1.4.5 数据处理

试验结果均用“平均值±标准偏差”表示, 采用 Design Expert 8.0.6 软件进行响应面试验设计, 并运用 SPSS 16.0 统计软件对试验结果进行 SNK-q 检验和多重比较。每组试验均重复 3 次。

在响应面分析中, 将己酸乙酯和丁酸乙酯的检测指标采用 Hassan 方法归一化为 0~1 之间的值^[21], 如公式 1:

$$D_{\max} = (d_i - d_{\min}) / (d_{\max} - d_{\min}) \quad (1)$$

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

再将己酸乙酯和丁酸乙酯的权重分别设为 0.6 和 0.4, 得到包含己酸乙酯和丁酸乙酯的综合值 Y, 如公式 2:

$$Y = D_{\max}(\text{己酸乙酯}) \times 0.6 + D_{\max}(\text{丁酸乙酯}) \times 0.4 \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 3 株菌混合培养效果

为了研究在混合培养条件不同菌株之间是否存在显著的竞争抑制关系, 本试验对 3 株菌间进行混合培养试验。试验结果如图 1 所示: Y1-Y2、Y1-Y3、Y2-Y3 和 Y1-Y2-Y3 4 个复配组合在 OD₆₆₀ 值上均显著高于 Y1、Y2 和 Y3 单菌株 OD₆₆₀ 值 ($p < 0.05$), 虽然它们在混合培养时依然存在着相互抑制的作用, 且其中每

种菌的生物量可能低于单菌株培养时的生物量，但它们在混培时的总体生物量将会大于其单菌株养时的生物量，这证明在一定条件下这3株菌相互之间混合培养时各菌株体能较为和谐的生长。与单一菌种发酵相比，混合培养方式不但提高了活菌数，而且还减少了发酵后再混配的环节，有效地提高了原材料、设备和能源的利用率^[22]。

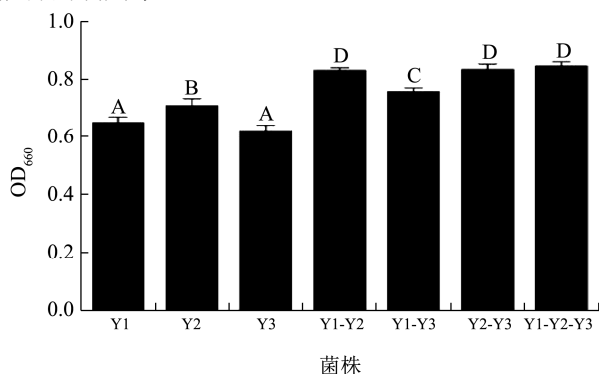


图1 不同菌株间混合培养效果

Fig.1 Mixed culture effect between different strains

注：不同菌株之间 OD₆₀₀ 值差异显著性分别用大写英文字母来表示，无相同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.2 各复配组合发酵产物的差异

混合培养结果表明3株菌间有较好的共生能力，但在代谢产物的合成上是否存在协同促进作用需要进一步研究证明，因此本试验先对3株菌之间进行复配发酵试验。

由表2可知，Y1、Y2、Y3产己酸乙酯(11.16、10.48、5.60 mg/100 mL)和丁酸乙酯(25.56、17.42、10.56 mg/100 mL)，同时也产己酸(4.90、6.51、3.84 mg/100 mL)和丁酸(8.01、9.16、2.41 mg/100 mL)，还有少量的乙酸(0.5、0.36、0.45 mg/100 mL)，3株菌的己酸产量都低于丁酸产量，己酸乙酯产量低于丁酸乙酯产量可能与其酯化的专一性无关，而与其前体物质己酸和丁酸的含量相关；3株菌都产高级醇(正丁醇、正戊醇、正己醇、2-壬醇、1-辛醇)产生，其中正丁醇为Y1和Y2的主要高级醇类产物，产量分别为17.00、12.82 mg/100 mL。在白酒的微量成分中，高级醇是白酒醇甜和助香剂的主要物质，酸类赋予白酒丰满和刺激感；醇与酸酯化成酯，从而使白酒具有良好香味^[23]。

表2 复配发酵试验结果

Table 2 The results of mixed fermentation test

发酵产物/(mg/100 mL)	菌株						
	Y1	Y2	Y3	Y1-Y2	Y1-Y3	Y2-Y3	Y1-Y2-Y3
丁酸乙酯	25.56	17.42	10.56	38.56	23.26	28.95	45.37
己酸乙酯	11.16	10.48	5.60	16.24	15.83	14.38	19.78
正丁醇	17.00	12.82	-	14.61	-	10.41	11.96
正戊醇	0.13	-	-	0.21	-	-	-
庚酸乙酯	0.24	0.36	-	-	0.15	-	0.27
正己醇	0.33	0.29	0.24	0.46	0.28	0.16	0.38
乙酸	0.50	0.36	0.45	0.45	0.15	0.35	0.50
糠醛	-	-	-	-	0.36	-	0.31
2-壬醇	0.16	0.14	-	-	-	-	0.18
1-辛醇	0.19	0.24	-	-	-	0.13	0.13
丁酰乳酸丁酯	0.57	2.95	0.28	0.85	2.50	-	1.88
丁酸	8.01	9.16	2.41	10.57	2.51	8.39	10.74
丁二酸二乙酯	0.11	0.10	0.12	0.07	0.16	0.09	0.11
苯乙酸乙酯	0.28	0.30	0.20	0.35	0.30	0.30	0.38
乙酸苯乙酯	-	0.17	-	-	0.23	0.15	0.16
己酸	4.90	6.51	3.84	6.71	4.15	5.61	7.02
3-苯丙酸乙酯	0.11	0.088	0.064	0.092	0.079	0.086	0.11
苯乙醇	0.35	0.33	0.21	0.45	0.25	0.31	0.40
总化合物	69.44	61.34	23.97	89.86	50.21	69.316	99.5

复配发酵组合 Y1-Y2 和 Y2-Y3 代谢的己酸乙酯 (16.24、14.38 mg/100 mL)、丁酸乙酯 (38.56、28.95 mg/100 mL) 产量都显著 ($p < 0.05$) 高于 Y1、Y2 和 Y3, 复配发酵组合 Y1-Y2-Y3 代谢的己酸乙酯 (19.78 mg/100 mL)、丁酸乙酯 (45.37 mg/100 mL) 和总化合物 (99.5 mg/100 mL) 产量也都显著 ($p < 0.05$) 高于 Y1-Y2、Y1-Y3 和 Y2-Y3 组合, 表明菌株 Y3 与菌株 Y2 有较好的协同作用; Y1-Y2-Y3 组合为最优试验组, 表明从窖泥中筛选出的这 3 株菌能够较好的进行混合协同发酵来提高己酸乙酯和丁酸乙酯的产量。

2.3 复配优化结果

2.3.1 最陡爬坡试验确定显著影响因素水平的中心点

为了最大限度的逼近己酸乙酯和丁酸乙酯产量的真实值, 将 Y1、Y2、Y3 3 株菌复配发酵时分别接种的生物量作为变量进行最陡爬坡试验。结果如表 3 所示: 己酸乙酯和丁酸乙酯的含量随着各菌株接种生物量的变化呈先上升后下降的变化趋势, 在第 5 组试验处己酸乙酯和丁酸乙酯的综合归一值 (Y) 为 0.994 达到最大值, 表明在第 5 组试验中 3 株菌接种量的配比已逼近最佳配比范围。因此对第 5 组试验中各菌株接种生物量的中心点取值进行试验, 并进行数据分析。

表 3 最陡爬坡试验结果

Table 3 The results of path of steepest ascent experiment

编号	Y1/ (cfu/mL)	Y2/ (cfu/mL)	Y3/ (cfu/mL)	己酸乙酯/ (mg/100 mL)	丁酸乙酯/ (mg/100 mL)	Y 综合值
1	1.0×10^6	2.0×10^5	1.0×10^7	12.33	25.85	0
2	1.6×10^6	4.0×10^5	8.8×10^6	15.56	33.35	0.219
3	2.2×10^6	6.0×10^5	7.6×10^6	18.84	48.56	0.500
4	2.8×10^6	8.0×10^5	6.4×10^6	22.25	67.86	0.819
5	3.4×10^6	1.0×10^6	5.2×10^6	24.34	76.94	0.994
6	4.0×10^6	1.2×10^6	4.0×10^6	21.31	77.76	0.849
7	4.6×10^6	1.4×10^6	2.8×10^6	19.49	56.64	0.595
8	5.2×10^6	1.6×10^6	1.6×10^6	18.77	57.81	0.568

表 4 响应面试验设计及结果

Table 4 The results of response surface experiments

Std	Run	Y1/ (cfu/mL)	Y2/ (cfu/mL)	Y3/ (cfu/mL)	己酸乙酯/ (mg/100 mL)	丁酸乙酯/ (mg/100 mL)	Y 综合值
6	1	4.0×10^6	1.0×10^6	4.0×10^6	27.6	111.4	0.601
9	2	3.4×10^6	8.0×10^5	4.0×10^6	24.5	98.6	0.029
1	3	2.8×10^6	8.0×10^5	5.2×10^6	25.1	97.7	0.047
7	4	2.8×10^6	1.0×10^6	6.4×10^6	24.4	97.7	0.003
10	5	3.4×10^6	1.2×10^6	4.0×10^6	31.7	115.8	0.872
8	6	4.0×10^6	1.0×10^6	6.4×10^6	26.3	98.8	0.148
3	7	2.8×10^6	1.2×10^6	5.2×10^6	26.2	98.5	0.135
15	8	3.4×10^6	1.0×10^6	5.2×10^6	28.9	115.6	0.691
12	9	3.4×10^6	1.2×10^6	6.4×10^6	25.5	97.6	0.070
11	10	3.4×10^6	8.0×10^5	6.4×10^6	26.5	97.3	0.127
2	11	4.0×10^6	8.0×10^5	5.2×10^6	25.8	97.6	0.089
14	12	3.4×10^6	1.0×10^6	5.2×10^6	29.4	108.9	0.571
17	13	3.4×10^6	1.0×10^6	5.2×10^6	29.7	111.7	0.653
5	14	2.8×10^6	1.0×10^6	4.0×10^6	26.1	97.5	0.106
16	15	3.4×10^6	1.0×10^6	5.2×10^6	29.1	109.8	0.573
4	16	4.0×10^6	1.2×10^6	5.2×10^6	30.6	123.5	0.976
13	17	3.4×10^6	1.0×10^6	5.2×10^6	31.1	113.3	0.778

表 5 BBD 试验方差分析结果

Table 5 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	1.82	0.20	31.51	<0.0001	**
A-Y1 接种量	1	0.29	0.29	45.31	0.0003	**
B-Y2 接种	1	0.39	0.39	60.57	0.0001	**
C-Y3 接种	1	0.20	0.20	31.04	0.0008	**
AB	1	0.16	0.16	24.96	0.0016	*
AC	1	0.031	0.031	4.78	0.0651	
BC	1	0.20	0.20	31.60	0.0008	**
A ²	1	0.17	0.17	26.56	0.0013	**
B ²	1	0.083	0.083	13.00	0.0087	*
C ²	1	0.24	0.24	37.29	0.0005	**
残差	7	0.045	6.402E-003			
失拟项	3	0.015	4.879E-003	0.65	0.6248	
纯误差	4	0.030	7.544E-003			
总和	16	1.86				
相关系数		R ² =0.9759		R ² Adj=0.9449		

注: *差异显著 $p < 0.05$; **差异极显著 $p < 0.01$ 。

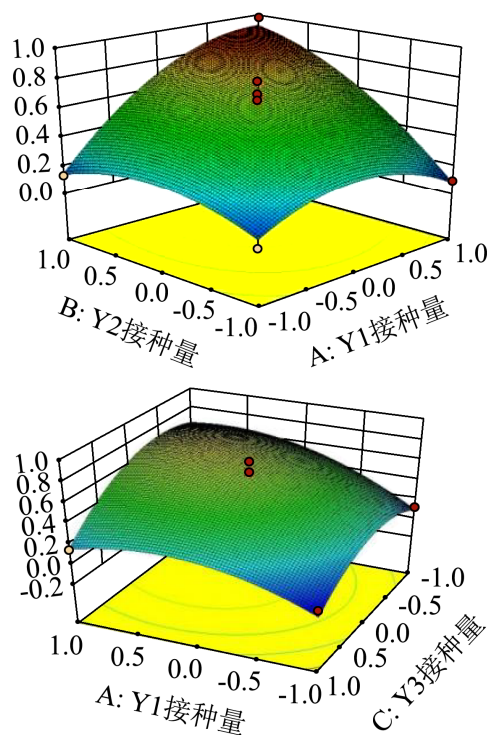
2.3.2 Box-Behnken 试验设计

采用 Design Expert 8.0.6 软件对表 4 中的数据进行多项拟合回归, 并获得己酸乙酯和丁酸乙酯的综合归一值 (Y) 对 Y1 接种量 (A)、Y2 接种量 (B) 和 Y3 接种量 (C) 的二次多项回归方程: $Y \text{ 综合值} = 0.65 + 0.19A + 0.22B - 0.16C + 0.20AB - 0.087AC - 0.22BC - 0.20A^2 - 0.14B^2 - 0.24C^2$ 。利用自变量同编码变量的变换公式 ($X_i = (x_i - x_0) / \Delta$, Δ 为自变量步长, X_i 为自变量编码值, x_i 为自变量实际值, x_0 为自变量在中心处实际值) 将全变量编码水平的二次回归方程转换为全变量非编码水平的二次回归方程: $Y \text{ 综合值} = 0.65324 + 0.19042A + 0.22016B - 0.15761C + 0.19987AB - 0.087431AC - 0.2249BC - 0.20097A^2 - 0.14057B^2 - 0.2381C^2$ 。

进一步对回归模型进行方差分析, 结果见表 5。由表 5 可知, 该模型极显著 ($p < 0.0001$), 失拟项 $P = 0.6248 > 0.05$ (不显著), 说明该回归模型可靠, 可用于 3 菌株接种量的优化。另外, 模型的决定系数 $R^2 = 0.9759$, 说明拟合程度良好; 校正决定系数校正系数 $R^2_{Adj} = 0.9449$, 指出预测值与实际值具有高度的相关性。因此该回归模型可用于对发酵产己酸乙酯和丁酸乙酯试验综合评分值的理论预测。在回归模型中, 一次项 A、B、C 对综合评分值影响极显著 ($p < 0.01$); 模型中交互项 BC 对综合评分值影响极显著 ($p < 0.01$), 而 AB 对综合评分值影响显著 ($p < 0.05$), AC 对综合评分值影响不显著 ($p > 0.05$); 模型中二次项 A²、B² 和 C² 对综合评分值影响达到极显著水平 ($p < 0.01$)。

2.3.3 显著因素水平的优化

为了更直观反映 Y1、Y2 和 Y3 之间的交互作用对归一值 (Y) 的影响, 利用 Design Expert 8.0.6 软件绘制了响应面, 如图 2。结果发现回归模型存在稳定点 (A: 0.51、B: 0.76、C: -0.71), 即菌株 Y1、Y2、Y3 接种量分别为 3.70×10^6 、 1.35×10^6 、 4.35×10^6 cfu/mL, 此时己酸乙酯和丁酸乙酯的归一值 (Y) 的最大估计值为 0.996, 己酸乙酯、丁酸乙酯的最大估计值分别为 32.37、119.41 mg/100 mL。



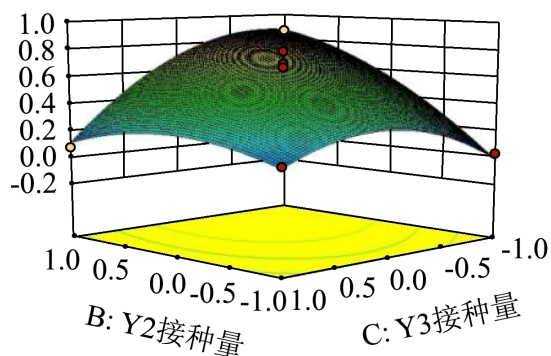


图2 Y1、Y2 和 Y3 3 菌株接种生物量三因素交互作用对综合评分值的影响

Fig.2 The effects of three factors of strains Y1~Y3 on the composite score value

2.3.4 复配发酵优化验证试验结果

为了验证优化后的复配发酵产己酸乙酯和丁酸乙酯效果，以原复配方法为对照进行验证试验。由图 3 可知，应用优化后的复配发酵产物己酸乙酯和丁酸乙酯含量显著高于优化前 ($p < 0.05$)，且与模型预测值差异不显著 ($p > 0.05$)，证明模型有效。

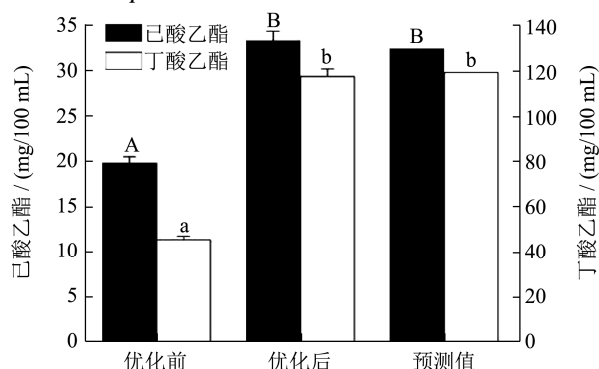


图3 验证试验结果

Fig.3 Results of the validation test

注：己酸乙酯含量和丁酸乙酯含量差异显著性分别用大写和小写英文字母来表示，无相同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

3 结论

3.1 本研究以产酯化力强的菌株 Y1 (*Clostridium beijerinckii*)、Y2 (*Clostridium guangxiense*)、Y3 (*Clostridium sartagoforme*) 为试验对象，以接种量为基础，通过单菌株发酵和协同发酵试验，以达到更强的产酯性能为目的对 3 株酯化细菌进行复配，并结合响应面法优化其产己酸乙酯和丁酸乙酯的发酵工艺。结果显示 3 菌株两两之间均有一定的协同作用，3 菌株同时协同发酵效果最优，丁酸乙酯和己酸乙酯含量显著高于其他协同发酵试验结果 ($p < 0.05$)；3 菌株接种量最佳配比为 Y1:Y2:Y3=4:1.5:4.5。在此条件下，己酸乙酯和丁酸乙酯的产量分别为 32.25 mg/100 mL

和 117.68 mg/100 mL，优化效果显著。

3.2 对浓香型酒而言，合成己酸乙酯的微生物，国内外均少见报道。从微生物而论，酵母菌、霉菌和细菌有酯化能力，实验与应用主要在霉菌与酵母菌上^[24-27]，对细菌的研究少见报道。目前，基于不同种群间的相互作用协同发酵产己酸乙酯和丁酸乙酯研究较少，但这对揭示窖泥酯化微生物在白酒中的实际应用具有重要意义。本研究仅在筛选出的酯化菌中做协同发酵，后续可和产酸菌如己酸菌、丁酸菌的协同发酵方面、对功能菌在酿酒中实际应用方面作进一步研究，如在陶坛中试验与大曲和酒醅协同酿造无窖泥浓香型白酒等。

参考文献

- [1] 周茜,王红,周胜银,等.中国白酒生产企业在白酒质控领域研究动态[J].酿酒科技,2017,9:87-90
ZHOU Qian, WANG Hong, ZHOU Sheng-yin, et al. Research trends of Chinese liquor production enterprises in the field of liquor quality control [J]. Brewing Technology, 2017, 9: 87-90
- [2] 管健,廖蓓,李兆飞,等.白酒功能菌的功能特性及应用研究[J].中国酿造,2017,36(8):1-5
GUAN Jian, LIAO Bei, LI Zhao-fei, et al. Functional characteristics and application of liquor functional bacteria [J]. China Brewing, 2017, 36(8): 1-5
- [3] 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. Progress in microbiological research on luzhou-flavor liquor production [J]. Food and Fermentation Technology, 2012, 48(1): 24-29
- [4] 吴文睿,李安军,汤有宏,等.古井贡酒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-wei, LI An-jun, TANG You-hong, et al. Study on functional anaerobic fermentation flavor substances in Gujingong wine cellar mud [J]. Science and Technology of Wine Making, 2015, 12: 57-61
- [5] 王旭亮,王德良,王异静,等.大曲微生物及其内物质对酵母酒精发酵的协同作用[J].酿酒科技,2014,10:1-5
WANG Xu-liang, WANG De-liang, WANG Yi-jin, et al. Synergistic effect of daqu microorganisms and their internal substances on yeast alcohol fermentation [J]. Science and Technology of Wine Making, 2014, 10: 1-5
- [6] 王钊.白酒窖泥产香细菌新种的鉴定及分离菌株的碳源代谢研究[D].济南:山东大学,2016
WANG Xian. Identification of new species of fragrant

- bacteria from Baijiu pit mud and study on carbon source metabolism of isolated strains [D]. Jinan: Shandong University, 2016
- [7] 李大和,刘念,李国红.浓香型大曲酒酿造中酯化菌研究的现状与展望[J].酿酒科技,2008,2:92-98
LI Da-he, LIU Nian, LI Guo-hong. Current situation and prospect of studies on esterification bacteria in Luzhou flavor daqu liquor [J]. Wine-making Technology, 2008, 2: 92-98
- [8] 沈怡方.白酒中四大乙酯在酿造发酵中形成的探讨[J].酿酒科技,2003,5:28-31
SHEN Yi-fang. Discussion on the formation of four ethyl esters in liquor during fermentation [J]. Liquor-making Technology, 2003, 5: 28-31
- [9] 滕巍,李国莹,刘小波,等.大曲中产酯化酶菌株的分离鉴定及固体发酵工艺优化[J].食品与生物技术学报,2016,35(9):971-977
TENG Wei, LI Guo-ying, LIU Xiao-bo, et al. Isolation and identification of daqu esterase strain and optimization of solid fermentation process [J]. Journal of Food and Biotechnology, 2016, 35(9): 971-977
- [10] 陈雪玲.基于黄水生香麸曲的制备与应用研究[D].昆明:云南师范大学,2016
CHEN Xue-ling. Preparation and application of bran koji based on Huangshui Shengxiang [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2016
- [11] 宫若楠,曹冉,王永芳,等.衡水老白干酒大曲分离具有酯化力霉菌及其特性研究[J].中国酿造,2017,36(11):68-72
GONG Ruo-nan, CAO Ran, WANG Yong-fang, et al. Study on the esterification effect of mildew and its characteristics in the separation of daqu from Hengshui Laobaigan liquor [J]. China Brewing, 2017, 36(11): 68-72
- [12] 慕运动.响应面方法及其在食品工业中的应用[J].郑州工程学院学报,2001,22:91-94
MU Yun-dong. Response surface method and its application in food industry [J]. Journal of Zhengzhou University of Engineering, 2001, 22: 91-94
- [13] Qiu J, Wang Q, Fei S, et al. Optimizing phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment on wheat straw by response surface method for enzymatic saccharification [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2017, 181(3): 1-17
- [14] Fratoddi I, Rapa M, Testa G, et al. Response surface methodology for the optimization of phenolic compounds extraction from extra virgin olive oil with functionalized gold nanoparticles [J]. Microchemical Journal, 2018, 138: 430-437
- [15] 刘乐乐,鲍蓬,廖蓓,等.响应面法优化锰氧化细菌发酵培养基[J].应用与环境生物学报,2011,17(1):130-134
LIU Le-le, BAO Peng, LIAO Pei, et al. Optimization of manganese-oxidizing bacterial fermentation medium by response surface method [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2011, 17(1): 130-134
- [16] Mead R, Pike D J. A review of response surface methodology from a biometrics viewpoint [J]. Biometrics, 1975, 31(12): 803-851
- [17] Hill W J, Hunter W G. A review of response surface methodology; a literature review [J]. Technometrics, 1966, 8: 571-590
- [18] 李茂迁,胡萍萍,王艳艳.Design-Expert 在超临界 CO₂ 萃取工艺优化中的应用[J].广东化工,2011,38(8):8-9
LI Mao-qian, HU Ping-ping, WANG Yan-yan. Application of design-expert in optimization of supercritical CO₂ extraction process [J]. Guangdong Chemical Industry, 2011, 38(8): 8-9
- [19] 曹长江.孔府家白酒风味物质研究[D].无锡:江南大学,2014
CAO Chang-jiang. Study on Kongfu family liquor flavor substances [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014
- [20] 姚霞,明红梅,周健,等.十个浓香型大曲挥发性风味物质的主成分分析[J].食品研究与开发,2015,36(14):15-20
YAO Xia, MING Hong-mei, ZHOU Jian, et al. Principal component analysis of volatile flavor substances in ten Luzhou-flavor daqu [J]. Food Research and Development, 2015, 36(14): 15-20
- [21] Zhang C H, Ma Y J, Yang F X, et al. Optimization of medium composition for butyric acid production by *Clostridium thermobutyricum* using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(18): 4284-4288
- [22] 刘畅,李旭,马放.生物破乳剂产生菌混合培养及其发酵条件的优化[J].微生物学通报,2015,42(5):858-865
LIU Chang, LI Xu, MA Fang. Mixed culture of bacteria producing biological demulsifier and optimization of fermentation conditions [J]. Bulletin of Microbiology, 2015, 42(5): 858-865
- [23] 王明跃,张文学,王海英,等.不同窖龄窖泥细菌的系统发育多样性分析[J].食品科学,2013,34(11):177-181
WANG Ming-yue, ZHANG Wen-xue, WANG Hai-ying, et al. Phylogenetic diversity analysis of cellar mud bacteria in different age groups [J]. Food Science, 2013, 34(11): 177-181

(下转第 146 页)