

高温大曲产酯酵母的筛选、鉴定及发酵条件

蒋泽元*, 王庆兰, 卢青青, 何炜龙

茅台学院 酿酒工程系, 贵州 仁怀 564507

蒋泽元, 王庆兰, 卢青青, 何炜龙. 高温大曲产酯酵母的筛选、鉴定及发酵条件[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 397-409.

JIANG Zeyuan, WANG Qinglan, LU Qingqing, HE Weilong. Screening, identification, and fermentation condition optimization of ester-producing yeast in high-temperature Daqu[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 397-409.

摘要: 【背景】高温大曲是酱香型白酒酿造发酵的基础, 在整个酿造过程中发挥重要作用, 高温大曲中产酯酵母与酒中风味物质的形成密切相关。【目的】筛选获得高温大曲中的产酯酵母, 对其发酵特性进行探究。【方法】采用 YPD 培养基, 通过稀释涂布法、形态观察从酱香大曲中对产酯酵母进行初筛、复筛及产酯量的测定, 菌株经分子生物学鉴定、产酯影响因素、单因素试验, 以及可溶性淀粉、蛋白胨、磷酸二氢钾三因素响应面优化发酵条件。【结果】获得 5 株产酯酵母, 其中菌株 EY3 的产酯量最高, 达到 2.16 g/L, 鉴定结果表明菌株 EY3 是异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*), 其最适产酯培养温度为 30 °C、pH 5.0、乙醇浓度为 7%、接种量为 3%, 最佳产酯碳源是可溶性淀粉、氮源是蛋白胨、无机盐是磷酸氢二钾; 优化后最大产酯量的培养条件为: 可溶性淀粉 11.4 g/L、蛋白胨 3.0 g/L、磷酸二氢钾 0.4 g/L、最大产酯量(3.43±0.22) g/L。【结论】本研究报道了高温大曲中的一株高产酯酵母为异常威克汉姆酵母, 对其发酵条件进行了优化, 丰富了高温大曲中产酯酵母的多样性。

关键词: 高温大曲; 产酯酵母; 分离; 鉴定; 发酵条件优化

Screening, identification, and fermentation condition optimization of ester-producing yeast in high-temperature Daqu

JIANG Zeyuan*, WANG Qinglan, LU Qingqing, HE Weilong

Department of Brewing Engineering, Moutai Institute, Renhuai 564507, Guizhou, China

Abstract: [Background] High-temperature Daqu is the basis of brewing and fermentation of

资助项目: 茅台学院高层次人才科研启动基金(mygccrc[2022]015, mygccrc[2022]046)

This work was supported by the Research Foundation for Scientific Scholars of Moutai Institute (mygccrc[2022]015, mygccrc[2022]046).

*Corresponding author. E-mail: jiangzeyuan@mtxy.edu.cn

Received: 2024-04-01; Accepted: 2024-05-30; Published online: 2024-06-20

Maotai-flavor liquor, playing an important role in the whole brewing process. The ester-producing yeast in high-temperature Daqu is associated with the formation of flavor components in liquor. **[Objective]** To isolate and optimize the fermentation conditions of the ester-producing yeast in high-temperature Daqu. **[Methods]** We employed the YPD medium, the dilution-coating method, and morphological observation to screen the ester-producing yeast strains in high-temperature Daqu and determine the ester production. After the strain was identified based on molecular evidence, single factor tests and response surface methodology were employed to optimize the fermentation conditions (soluble starch, peptone, and potassium dihydrogen phosphate) of the strain for ester production. **[Results]** Five ester-producing yeast strains were obtained, in which strain EY3 showcased the highest ester production of 2.16 g/L. Strain EY3 was identified as *Wickerhamomyces anomalus*, and it demonstrated the highest ester production at 30 °C, pH 5.0, ethanol concentration of 7%, and inoculation amount of 3%. The optimum carbon source, nitrogen source, and inorganic salt in the medium for ester production by this strain were soluble starch, peptone, and potassium dihydrogen phosphate, respectively. The fermentation conditions for maximum ester production were optimized as 11.4 g/L soluble starch, 3.0 g/L peptone, and 0.4 g/L potassium dihydrogen phosphate, under which the ester production reached (3.43±0.22) g/L. **[Conclusion]** We screened out a high-yielding ester yeast strain *W. anomalus* from high-temperature Daqu and optimized the fermentation conditions of this strain, which enriched the diversity of ester-producing yeast.

Keywords: high-temperature Daqu; ester-producing yeast; isolation; identification; optimization of fermentation conditions

大曲是酱香型白酒酿造发酵的基础,在白酒酿造过程中发挥重要作用^[1]。大曲中含有丰富的微生物及多种酶系^[2-6],这些微生物中大多数是细菌,霉菌次之,酵母最少^[7]。大曲是一种多微生物的混合制剂,不同的发酵环境使不同的微生物成为优势菌株,所产生的代谢物含量和种类不同,酿造出不同香型的白酒^[8]。目前白酒公认的香型有12种^[9-10]。研究表明,不同香型白酒中酯类物质的种类和含量不尽相同,酯类是白酒风味物质的重要贡献者,有4种主要酯类,即乙酸乙酯、乳酸乙酯、己酸乙酯和丁酸乙酯^[11-12]。

产酯酵母是一类代谢过程中能产生酯类物质化合物的酵母菌的总称,属于产膜酵母(*Candida pelliculosa*)或假丝酵母(*Candida*),大多数为异形汉逊酵母(*Hansenula anomala*),少数为

小圆形酵母^[13]。不同的菌种、培养条件和生产工艺所产的酯不同^[14],从而形成了不同香型白酒的风格特征^[15-17]。利用优良的产酯酵母不仅能提高白酒中主体香味物质的含量,同时也可对乙酸甲酯、辛酸乙酯等次要香味物质的产量产生影响^[18]。高温大曲中产酯酵母的研究和利用有待深入,本研究拟从高温大曲中筛选高产酯酵母,探索其产酯影响因素,通过优化培养基条件以期获得最佳产酯量的发酵条件,为进一步研究和利用高温大曲中高产酯酵母菌奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

高温大曲取自贵州省仁怀市茅台镇某酱香型白酒厂。

1.2 主要试剂和仪器

真菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京索莱宝科技有限公司; 2×Taq PCR Master Mix, 上海李记生物科技有限公司; 蛋白胨、葡萄糖、琼脂粉、可溶性淀粉、牛肉膏, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 无水乙醇、葡萄糖、氯化钠、硫酸, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 硫酸亚铁、硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钙、氯化钠, 天津市大茂化学试剂厂; 硫酸铵、硫酸锌, 天津博迪化工股份有限公司; 三丁酸甘油酯(分析纯), 上海麦克林生化科技有限公司。紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 显微镜, 常州上特仪器制造有限公司; TD5Z 医用离心机, 杭州瑞析科技有限公司; PCR 仪和凝胶成像系统, 成都百乐科技有限公司; 恒温培养箱, 上海森信实验仪器有限公司。

1.3 培养基

麦芽汁培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)培养基和产酯培养基参考文献[19]配制; 三丁酸甘油酯固体培养基参考杨强等^[20]的配方。

1.4 产酯酵母菌株的分离与纯化

酵母的初筛: 取 10 g 大曲样品加入 90 mL 无菌水, 30 °C、180 r/min 振荡混匀 1 d 后进行 10 倍梯度稀释, 将 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 梯度的稀释液涂布于 PDA 培养基上, 30 °C 恒温培养 48 h; 观察菌落长势和形态并进行光学显微镜镜检。镜检后的酵母菌经过 3 次转接培养获得纯培养酵母菌。

产酯酵母复筛: 将纯化后的酵母菌接种到三丁酸甘油酯固体培养基, 30 °C 恒温培养 48 h,

观察菌落周围产生的透明圈, 透明圈越大说明产酯能力越强。

1.5 种子液的制备

将获得的酵母菌接种到 YPD 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h。室温下 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 重悬于无菌生理盐水中, 调整细胞浓度约 1×10⁸ cells/mL 获得种子液。

1.6 酯含量的测定

将种子液按 5% 的接种量接种于产酯培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 测定各组中酯的含量, 总酯含量测定参考 Chen 等^[21]的方法稍作修改, 即取 1 mL 除菌体后的发酵液加入 9 mL 去离子水, 滴加 1–2 滴酚酞, 用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液(C)滴定至粉红色, 加入 10 mL 0.1 mol/L NaOH 标准溶液(V_a)置于 30 °C 下皂化过夜, 再用 0.1 mol/L H₂SO₄ 标准溶液(C₁)反向滴定至红色刚刚消失。记录消耗的 H₂SO₄ 溶液体积 V_b, 空白培养基作对照。并利用公式(1)计算总酯的含量。

$$\text{总酯(g/L)} = \frac{(C \times V_a - C_1 \times V_b \times 2) \times 88.12}{1.0 \times 1000} \quad (1)$$

式中: 88.12 为乙酸乙酯的摩尔质量分数(g/mol)。

1.7 生长曲线的测定

将菌种接种到 YPD 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 48 h, 每隔 4 h 取样, 以空白对照调零测定 OD₆₀₀ 吸光值, 绘制菌株的生长曲线图。

1.8 分子生物学鉴定

参照真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书的操作方法提取菌株的基因组 DNA, 以其为模板, 采用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3') 进行 PCR 扩增^[22]。PCR 反应体系(25 μL): 引物 ITS1、ITS4 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, DNA

模板 1 μL , $2\times\text{Taq PCR Master Mix}$ 12.5 μL , ddH₂O 10.5 μL 。PCR 反应条件^[23]: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 35 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后委托重庆拟南芥生物科技有限公司进行测序。将测序结果提交至 NCBI 的 GenBank 数据库中, 采用 BLAST 进行同源序列检索, 选取同源性较高菌株的序列, 利用软件 MEGA 11 中的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树^[24], 确定目标菌株的分类学地位。

1.9 不同因素对菌株产酯的影响

温度对菌株产酯的影响: 按 3% 接种量将菌株接种于产酯培养基中, 分别于 25、30、35、40 和 45 °C, 180 r/min 振荡培养 24 h 后测定各组的产酯量。pH 对菌株产酯的影响: 按 3% 接种量将菌株接种于初始 pH 值分别为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 的产酯培养基中。乙醇对菌株产酯的影响: 按 3% 接种量将菌株接种于初始乙醇含量分别为 3%、5%、7%、9%、11% 的产酯培养基中。接种量对菌株产酯的影响: 按 1%、2%、3%、4%、5% 的接种量将菌株接种于产酯培养基中。以上各组均于 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后测定各组的产酯量。

1.10 产酯发酵培养条件优化的单因素试验

产酯发酵培养条件优化分别以 10.0 g/L 碳源种类(可溶性淀粉、半乳糖、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖), 5.0 g/L 氮源种类(酵母膏、蛋白胨、硝酸钠、硫酸铵), 0.5 g/L 无机盐种类(硫酸亚铁、硫酸镁、磷酸二氢钾、硫酸锌、氯化钙), 每组试验重复 3 次。

1.11 响应面设计试验

根据单因素试验结果, 选取碳源、氮源和

无机盐为因素, 以菌株产酯量为响应值, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件的 Box-Behnken 功能设计三因素三水平响应面试验, 因素水平设计见表 1。

配制 YPD 培养基 50 mL, 先加入乙醇 7%、接种菌液 3%, 接着分别加入可溶性淀粉 5.0、10.0、15.0 g/L, 蛋白胨 1.0、3.0、5.0 g/L、磷酸二氢钾 0.1、0.3、0.5 g/L, 30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 取菌液 35 mL 于 100 mL 锥形瓶中, 并加入 25 mL 0.1 mol/L NaOH 在暗处反应 24 h, 然后用 0.1 mol/L H₂SO₄ 进行滴定直到粉红色转变为橙黄色, 记录消耗的 H₂SO₄ 体积并根据公式(1)计算发酵液产酯量。

1.12 数据处理

使用 GraphPad Prism 9.0 软件^[25]进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义; 使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图。采用 SPSS 对单因素数据进行处理分析, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行二次多元回归拟合分析^[26]。

2 结果与分析

2.1 产酯酵母的筛选

按照 1.4 的方法进行产酯酵母的初筛和复筛, 最终获得 5 株产酯酵母菌, 分别编号 EY1、EY2、EY3、EY4 和 EY5。其结构和形态如图 1 和表 2 所示。

表 1 响应面设计

Table 1 Response surface design

| 水平 Level | A 碳源 A Carbon source (g/L) | B 氮源 B Nitrogen source (g/L) | C 无机盐 C Inorganic salt (g/L) |
|-------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 5.0 | 1.0 | 0.1 |
| 2 | 10.0 | 3.0 | 0.3 |
| 3 | 15.0 | 5.0 | 0.5 |

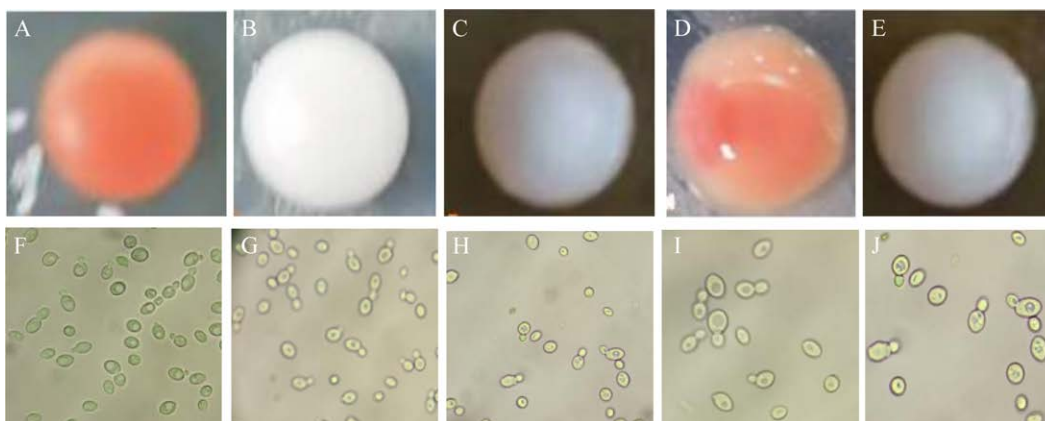


图 1 产酯酵母菌落形态和显微形态 A-E: EY1-EY5 的菌落形态; F-J: EY1-EY5 的显微形态(400×)。
Figure 1 Colony morphology and microscopic morphology of ester-producing yeast. A-E: Colony morphology of EY1-EY5; F-J: Microstructure of EY1-EY5, respectively (400×).

表 2 产酯酵母菌落形态和显微形态

Table 2 Morphology and microstructure of ester-producing yeast

| 菌株 Strains | 菌落形态 Colony morphology | 显微形态 Microscopic morphology |
|---------------|---|--|
| EY1 | 表面光滑平整, 不黏稠, 呈橘红色 The surface is smooth, not sticky, appears orange-red | 球形或椭球形, 出芽生殖 Spherical or ellipsoid, budding reproduction |
| EY2 | 表面光滑平整, 不黏稠, 呈乳白色 The surface is smooth, not sticky, appears milky white | 球形或椭球形, 出芽生殖 Spherical or ellipsoid, budding reproduction |
| EY3 | 表面光滑平整, 不黏稠, 呈乳白色 The surface is smooth, not sticky, appears milky white | 球形或椭球形, 出芽生殖 Spherical or ellipsoid, budding reproduction |
| EY4 | 表面光滑平整, 黏稠, 呈橘黄带红色 The surface is smooth, sticky, appears orange-red | 球形或椭球形, 出芽生殖 Spherical or ellipsoid, budding reproduction |
| EY5 | 表面光滑平整, 不黏稠, 呈乳白色 The surface is smooth, not sticky, appears milky white | 球形或椭球形, 出芽生殖 Spherical or ellipsoid, budding reproduction |

2.2 产酯量测定结果

为了测定 5 株酵母菌的产酯能力, 分别取 5 株菌的种子液 200 μ L 接种到 20 mL YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 2 d, 采用 1.6 的方法测得产酯量如图 2A 所示, 相关产量为菌株 EY3>菌株 EY2>菌株 EY5>菌株 EY4>菌株 EY1, 菌株 EY3 的产酯能力最强, 达到 (2.16 \pm 0.13) g/L。菌株 EY3 的生长曲线如图 2B 所示, 菌株 EY3 在培养 24 h 后进入稳定期。后续对菌株 EY3 进行深入研究。

2.3 分子生物学鉴定结果

利用 ITS1 和 ITS4 引物扩增菌株 EY3 核糖体间隔区 ITS1 区, 测得序列长度为 597 bp, 将所得序列提交至 NCBI 数据库进行同源性比对并构建系统发育树, 结果如图 3 所示。根据同源比对发现菌株 EY3 与异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*) (GenBank 登录号 MK343432.1) 序列的相似性达 99.49%, 系统发育树显示菌株 EY3 与 *W. anomalus* 聚在同一分支, 初步鉴定菌株 EY3 为异常威克汉姆酵母

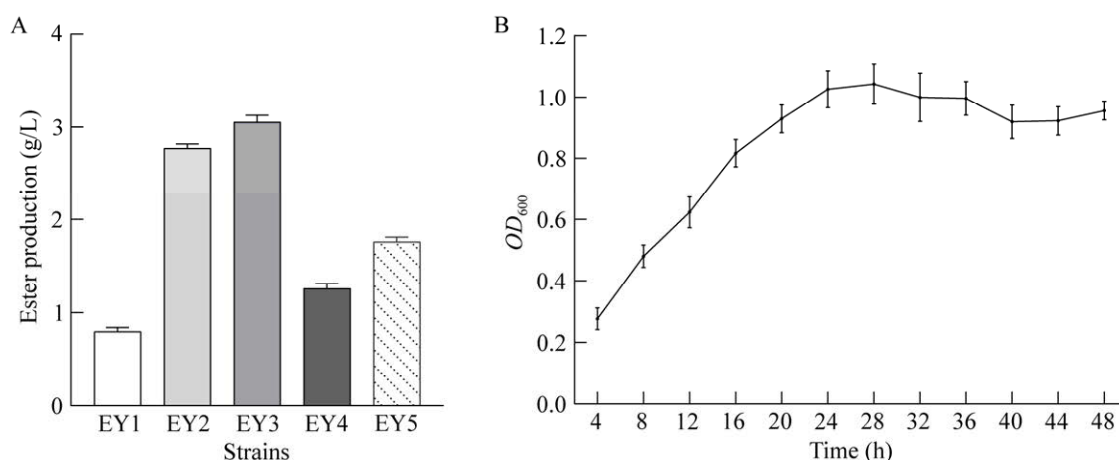


图2 酵母菌产酯量(A)和菌株 EY3 的生长曲线(B)

Figure 2 The ester production of yeast (A) and growth curve of strain EY3 (B).

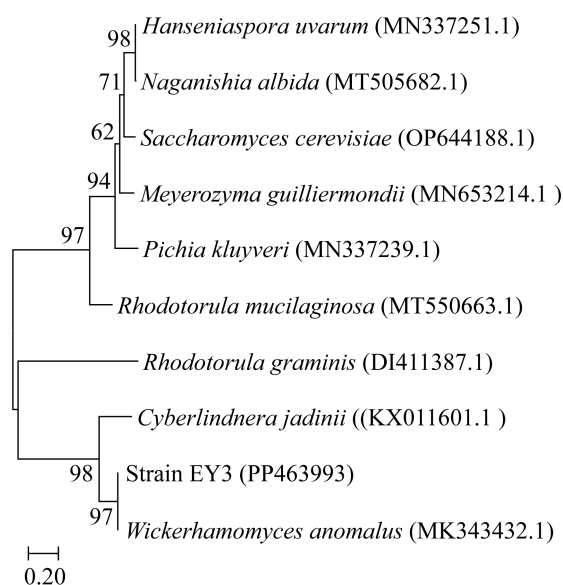


图3 基于菌株 EY3 的 ITS 序列构建的系统发育树 发育树节点数值表示 bootstrap 值; 发育树标尺为 0.20, 表示平均每个核苷酸位置有 0.20 个差异; 括号中序号为 GenBank 登录号。

Figure 3 The phylogenetic tree based on the ITS sequences of strain EY3. The node value of phylogenetic tree represents the bootstrap value. The scale was 0.20, representing the difference of each nucleotide position was 0.20. The serial number in parentheses is the GenBank accession number.

(*W. anomalus*)。已有研究表明, 异常威克汉姆酵母是酿造微生物中的重要一员, 具有一定的产酯能力^[27]。

2.4 菌株 EY3 产酯能力影响因素分析

如图 4A 所示, 30 °C 时菌株 EY3 的产酯量最高, 这与吴健等^[28]研究发现的异常威克汉姆酵母最优培养温度为 30 °C 的结果一致, 与陈玉香等^[29]研究发现的 30 °C 发酵有利于酯类物质峰值出现的结果也一致。菌株 EY3 在 pH 5.0 时, 产酯量显著增加(图 4B), 表明 pH 5.0 是菌株 EY3 的最适产酯 pH, 酿酒体系一般都偏酸性, 因此菌株 EY3 在酿酒发酵中具有较好的潜在利用价值。菌株 EY3 在乙醇浓度为 7% 时产酯量最高; 乙醇浓度为 9% 时菌株 EY3 的产酯量无显著变化, 表明菌株 EY3 在乙醇浓度为 9% 也能正常产酯; 乙醇浓度为 11% 时, 菌株 EY3 的产酯量显著减少, 表明菌株 EY3 在乙醇浓度为 11% 时, 产酯能力受到抑制(图 4C); 高浓度的乙醇破坏细胞壁和细胞膜的结构, 对酵母有毒害作用^[30-31], 进而影响菌株 EY3 的产酯能力。菌株 EY3 的产酯量随着接种量的增加逐渐增加, 当接种量为 3% 时, EY3 产酯量达到最高(图 4D),

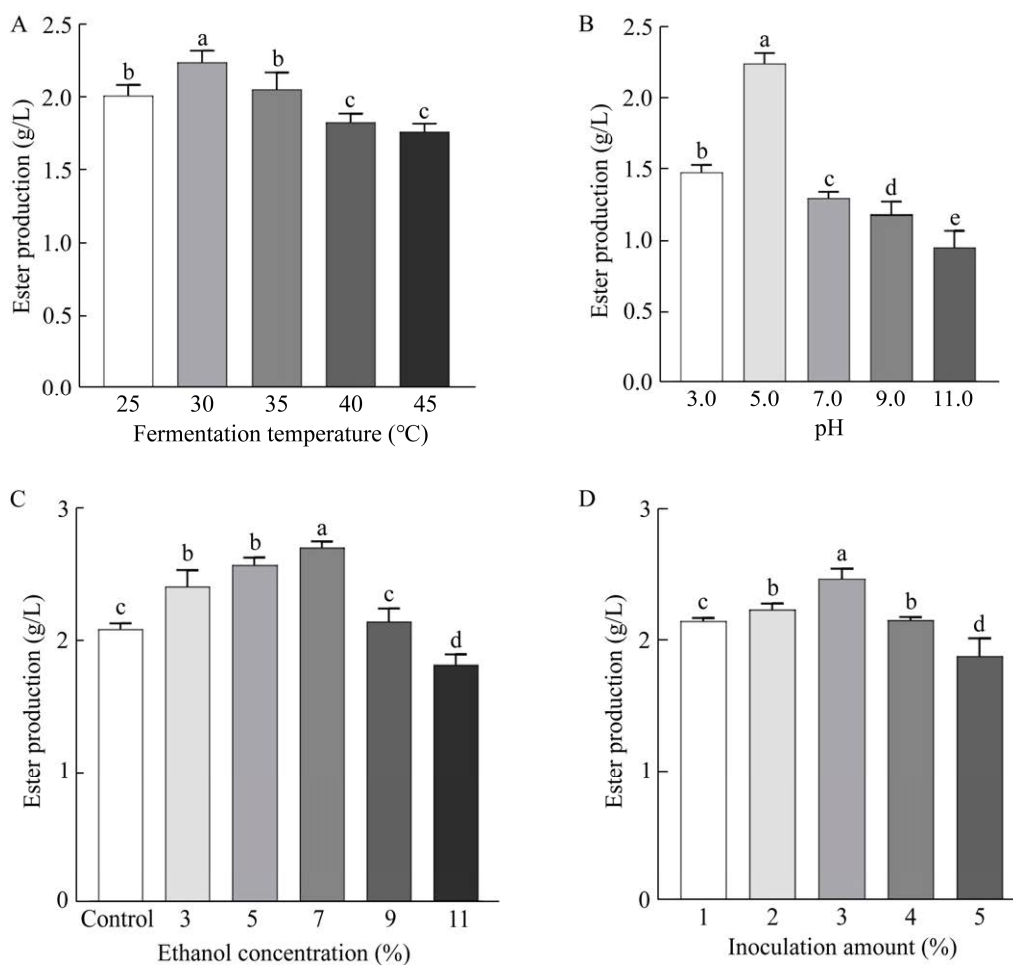


图4 酵母菌株 EY3 的产酯生物学特性 A: 温度; B: pH; C: 乙醇浓度; D: 接种量。不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 4 The ester-producing biology characteristics of the yeast strain EY3. A: Temperature; B: pH; C: Ethanol concentration; D: Inoculum amount. Different lowercase letters indicate a significant difference ($P<0.05$).

接种量低, 酵母细胞数量不足, 影响产酯量; 接种量高, 营养物质消耗过快也会影响产酯量。

2.5 培养条件优化结果

2.5.1 培养条件单因素优化

由图 5 可知, 菌株 EY3 添加可溶性淀粉的产酯量显著高于添加其他碳源(图 5A), 可溶性淀粉的添加为 10.0 g/L 时, 菌株 EY3 的产酯量最高(图 5B); 菌株 EY3 添加蛋白胨的产酯量显著高于添加其他氮源(图 5C), 蛋白

胨的添加量为 5.0 g/L 时, 菌株 EY3 的产酯量最高(图 5D); 菌株 EY3 添加磷酸二氢钾的产酯量显著高于添加其他无机盐(图 5E), 磷酸二氢钾的添加量为 0.5 g/L 时, 菌株 EY3 的产酯量最高(图 5F)。

2.5.2 培养条件响应面优化

以可溶性淀粉(X_1)、蛋白胨(X_2)和磷酸二氢钾(X_3)添加量为自变量, 菌株 EY3 酵母产酯量(Y)为响应值, 试验设计及结果见表 3。根

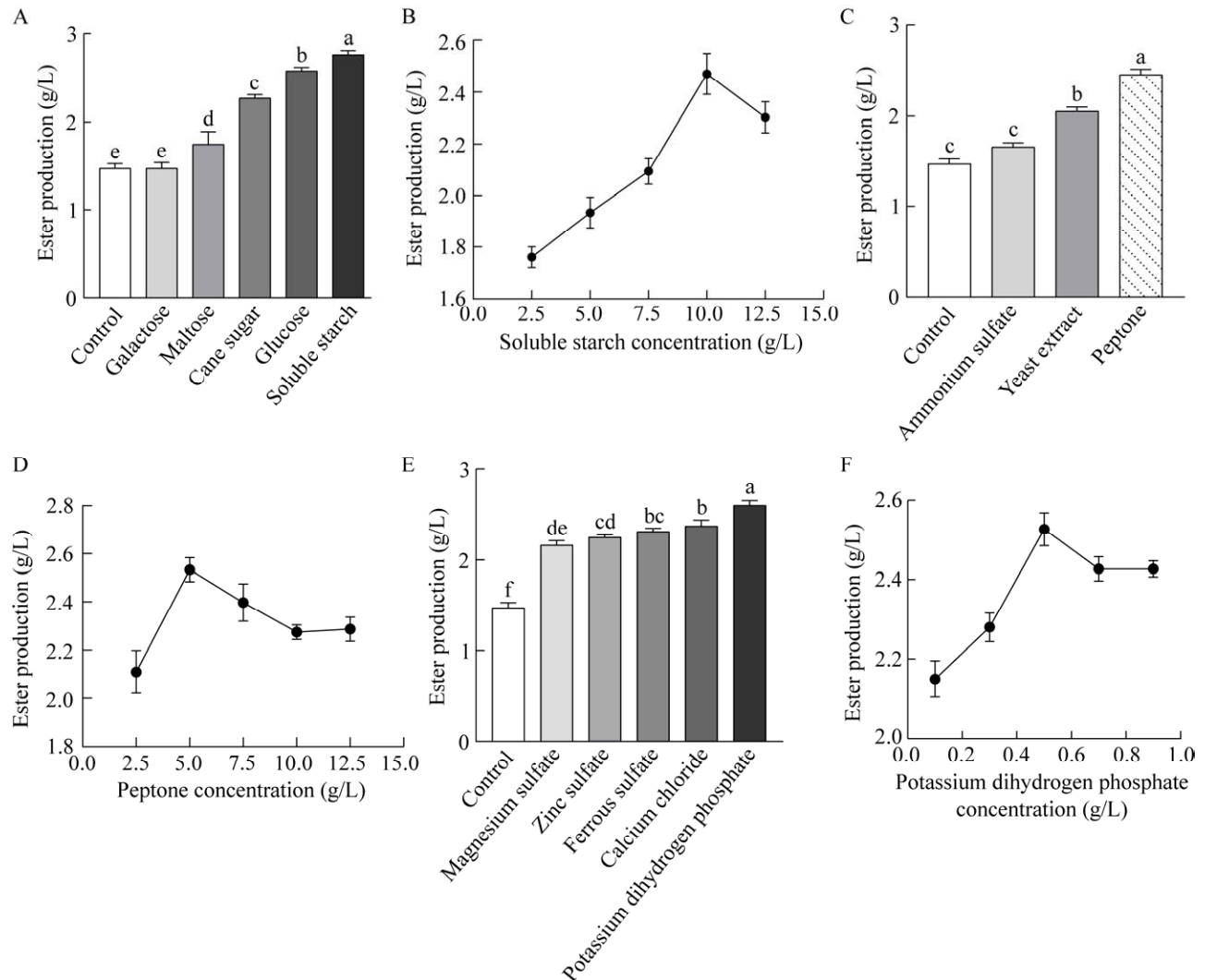


图5 单因素对菌株EY3产酯的影响 A: 碳源种类; B: 可溶性淀粉; C: 氮源种类; D: 蛋白胨; E: 无机盐种类; F: 磷酸二氢钾。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 5 Effect of a single factor on the ester production of strain EY3. A: Carbon source species; B: Soluble starch; C: Nitrogen source species; D: Peptone; E: Inorganic salt species; F: Potassium dihydrogen phosphate. Different lowercase letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

据 Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 数据及结果进行多元回归分析, 得到菌株 EY3 产酯量(Y)对以可溶性淀粉(X_1)、蛋白胨(X_2)和磷酸二氢钾(X_3)添加量的二阶多项式回归模型方程如下:

$$\text{产酯量}(Y) = 3.17 + 0.071X_1 + 0.038X_2 + 0.20X_3 - 0.043X_1X_2 + 0.27X_1X_3 - 0.028X_2X_3 - 0.27X_1^2 - 0.62X_2^2 - 0.45X_3^2$$

经过方差分析, 结果如表 4 所示。由表 4 可知, 该模型的 $P < 0.001$, 极显著, 失拟项 $P = 0.6585 > 0.0500$ (不显著), 说明该模型与实际拟合度较好, 可靠性高, 可用于分析培养基成分对菌株 EY3 产酯量的影响。由 P 值可知, 一次项 X_3 、二次项 X_1^2 、交互项 X_1X_3 对菌株 EY3 产酯量的影响显著($P < 0.05$), 二次项 X_2^2 和二次项

X_3^2 对菌株 EY3 酵母产酯量的影响极显著 ($P<0.001$)。由 F 值可知, 各因素对菌株 EY3 产酯量的影响顺序为磷酸二氢钾添加量>可溶性淀粉添加量>蛋白胨添加量。

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 数据进行二次多元回归拟合分析, 得到二次回归方程响应面及等高线见图 6。3D 模型图可以看出可溶性淀粉浓度和蛋白胨的浓度对酵母产酯量的影响响应模型偏向于圆形, 且图像坡度不明显(图 6A、6B), 说明二者的交互作用对菌株 EY3 产酯无显著影响, 坡度整体偏向于可溶性淀粉, 可推断可溶性淀粉的浓度变化对菌株 EY3 产酯量的影响大于蛋白胨的浓度变化对 EY3 产酯量

的影响。3D 模型图发现蛋白胨浓度和磷酸二氢钾浓度对 EY3 产酯量的影响是显著的, 这种影响表现为响应模型几乎成椭圆形(图 6C、6D), 表明它们之间的交互作用非常强, 椭圆的中心点基本位于图像的中心, 表明它们对菌株 EY3 产酯的影响是相似的。3D 模型(图 6E、6F)可以看出可溶性淀粉浓度和磷酸二氢钾浓度对菌株 EY3 产酯量的影响响应模型偏向于圆形, 且图像坡度不明显, 这表明二者的交互作用对菌株 EY3 产酯量的影响效应不显著, 坡度更倾向于可溶性淀粉, 这表明, 可溶性淀粉浓度的变化对菌株 EY3 产酯量的影响要大于磷酸二氢钾浓度变化对菌株 EY3 产酯量的影响。

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface plots experiments

| 试验号 Test number | X_1 可溶性淀粉浓度 X_1 Soluble starch concentration (g/L) | X_2 蛋白胨浓度 X_2 Peptone concentration (g/L) | X_3 磷酸二氢钾浓度 X_3 Potassium dihydrogen phosphate concentration (g/L) | 产酯量 Ester production (g/L) |
|--------------------|---|--|---|-------------------------------|
| 1 | 15.0 | 3.0 | 0.5 | 3.06±0.21 |
| 2 | 10.0 | 3.0 | 0.3 | 2.98±0.27 |
| 3 | 5.0 | 5.0 | 0.3 | 2.39±0.14 |
| 4 | 5.0 | 3.0 | 0.1 | 2.39±0.26 |
| 5 | 10.0 | 5.0 | 0.5 | 2.26±0.11 |
| 6 | 15.0 | 1.0 | 0.3 | 2.26±0.19 |
| 7 | 10.0 | 1.0 | 0.5 | 2.32±0.24 |
| 8 | 10.0 | 3.0 | 0.3 | 3.07±0.13 |
| 9 | 5.0 | 3.0 | 0.5 | 2.26±0.25 |
| 10 | 5.0 | 1.0 | 0.3 | 2.15±0.18 |
| 11 | 10.0 | 3.0 | 0.3 | 3.26±0.16 |
| 12 | 15.0 | 5.0 | 0.3 | 2.33±0.23 |
| 13 | 10.0 | 3.0 | 0.3 | 3.37±0.27 |
| 14 | 10.0 | 3.0 | 0.3 | 3.16±0.20 |
| 15 | 15.0 | 3.0 | 0.1 | 2.11±0.25 |
| 16 | 10.0 | 1.0 | 0.1 | 1.89±0.17 |
| 17 | 10.0 | 5.0 | 0.1 | 1.94±0.14 |

表 4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

| 方差来源 Source of variance | 自由度 Variance | 均方 Mean square | F 值 Variance ratio | P 值 P value | 显著性 Significance |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|----------------|---------------------|
| 模型 Model | 9 | 0.410 | 21.23 | 0.000 3 | *** |
| X ₁ | 1 | 0.041 | 2.10 | 0.190 5 | |
| X ₂ | 1 | 0.011 | 0.58 | 0.470 4 | |
| X ₃ | 1 | 0.310 | 15.94 | 0.005 2 | ** |
| X ₁ X ₂ | 1 | 7.225E-003 | 0.37 | 0.560 3 | |
| X ₁ X ₃ | 1 | 0.290 | 15.09 | 0.006 0 | ** |
| X ₂ X ₃ | 1 | 3.025E-003 | 0.16 | 0.704 2 | |
| X ₁ ² | 1 | 0.300 | 15.47 | 0.005 7 | ** |
| X ₂ ² | 1 | 1.610 | 83.46 | <0.000 1 | *** |
| X ₃ ² | 1 | 0.840 | 43.43 | 0.000 3 | *** |
| 残差 Residual | 7 | 0.019 | | | |
| 失拟项 Unplanned item | 3 | 0.014 | 0.58 | 0.658 5 | |
| 纯误差 Pure error | 4 | 0.024 | | | |
| 总和 Summation | 16 | | | | |

：P<0.01；*：P<0.001。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件预测得到最佳发酵培养基为：可溶性淀粉添加量 11.44 g/L、蛋白胨添加量 3.03 g/L、磷酸二氢钾添加量 0.36 g/L。在此条件下，预测最大产酯量为 3.21 g/L。为了验证该模型的有效性，将最佳发酵培养基修正为：可溶性淀粉添加量 11.4 g/L、蛋白胨添加量 3.0 g/L、磷酸二氢钾添加量 0.4 g/L。在此条件下，菌株 EY3 的产酯量为(3.43±0.22) g/L，是未优化前(2.16 g/L)的 1.6 倍，差异极显著(P<0.001)，与预测值基本吻合，表明该模型可靠。

3 讨论与结论

本试验从高温大曲中筛选到一株高产酯酵母菌，形态学及分子生物学鉴定该菌株为异常威克汉姆酵母(*W. anomalus*)，其最适产酯培养温度为 30 °C、pH 5.0、乙醇浓度为 7%、接种

量为 3%，最佳产酯碳源是可溶性淀粉、氮源是蛋白胨、无机盐是磷酸二氢钾，单因素优化结果表明：最佳碳源是可溶性淀粉，其最适添加量为 10.0 g/L；最佳氮源为蛋白胨，其最适添加量为 5.0 g/L；最佳无机盐为磷酸二氢钾，其最适添加量为 0.5 g/L。三因素响应面优化结果表明：对菌株 EY3 产酯量的影响顺序为磷酸二氢钾添加量>可溶性淀粉添加量>蛋白胨添加量。3D 优化模型显示蛋白胨与磷酸二氢钾的相互影响最为显著。通过响应面方法优化的培养基组成是(g/L)：可溶性淀粉 11.4、蛋白胨 3.0、磷酸二氢钾 0.4。在此条件下，菌株 EY3 的产酯量为(3.43±0.22) g/L，是未优化之前的 1.6 倍，差异极显著(P<0.001)，是李欢欢等^[32]研究的汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)的产酯量 1.17 g/L 的 2.9 倍，为进一步驯化利用该高产酯酵母奠定基础。

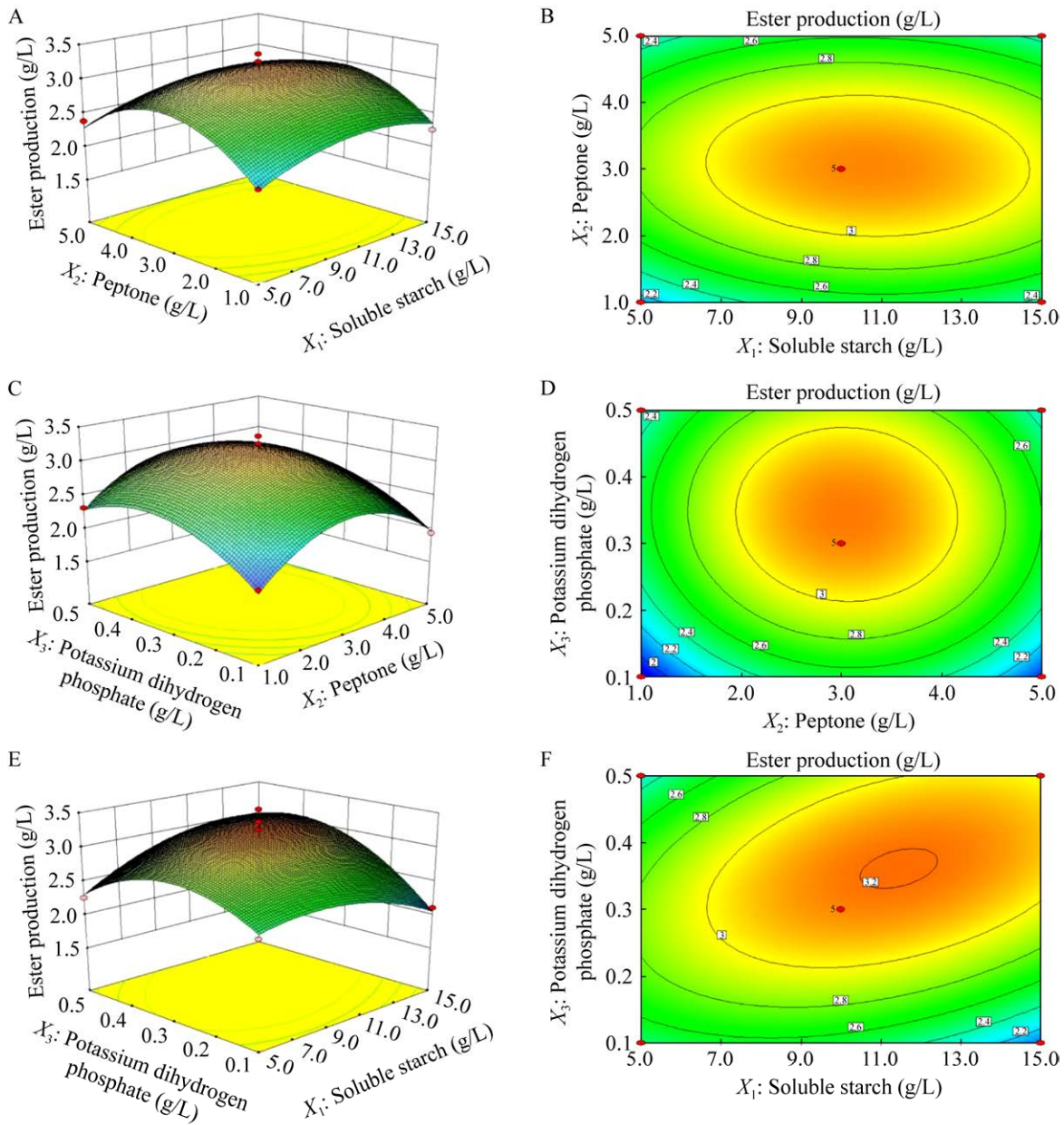


图 6 各因素间交互作用对菌株 EY3 产酯量影响的响应曲面及等高线 A: 蛋白胨和可溶性淀粉添加量的响应面图; B: 蛋白胨和可溶性淀粉添加量的等高线图; C: 磷酸二氢钾和蛋白胨添加量的响应面图; D: 磷酸二氢钾和蛋白胨添加量的等高线图; E: 磷酸二氢钾和可溶性淀粉添加量的响应面图; F: 磷酸二氢钾和可溶性淀粉添加量的等高线图。

Figure 6 Response surface plots and contour lines of effects of interaction between each factor on ester production of strain EY3. A: Addition of peptone and soluble starch response surface; B: Addition of peptone and soluble starch contour; C: Addition of potassium dihydrogen phosphate and peptone response surface; D: Addition of potassium dihydrogen phosphate and peptone contour; E: Addition of potassium dihydrogen phosphate and soluble starch response surface; F: Addition of potassium dihydrogen phosphate and soluble starch contour.

REFERENCES

- [1] 傅金泉. 《中国酒曲集锦》里的故事记忆[J]. 酿酒, 2017, 44(5): 114-115.
FU JQ. Story memory in China jiuqu collection[J]. Liquor Making, 2017, 44(5): 114-115 (in Chinese).
- [2] 范伟业. 宏蛋白质组学解析浓香型大曲酶系组成[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2021.
FAN WY. Metaproteomic analysis of enzymatic composition in Nong-flavor daqu[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2021 (in Chinese).
- [3] 张宗启. 酱香型白酒大曲中功能微生物菌群及其酶系研究进展[J]. 酿酒科技, 2021(3): 92-99.
ZHANG ZQ. Research progress in functional microbial community and enzymes in Jiangxiang daqu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2021(3): 92-99 (in Chinese).
- [4] 刘晶晶. 大曲酶系和代谢物组分析及其中产复合酶菌株的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2018.
LIU JJ. Analysis of enzymes and metabolomics in daqu, and application of compound enzyme-producing Bacillus from daqu[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [5] 卫春会, 黄治国, 黄丹, 邓杰, 杨晓东, 乔晓艳. 高温大曲高产蛋白酶菌株的分离鉴定及其产酶性能研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 24-29.
WEI CH, HUANG ZG, HUANG D, DENG J, YANG XD, QIAO XY. Separation and identification of high protease yielding strains and study on enzyme production performance of high-temperature Daqu[J]. Food & Machinery, 2014, 30(4): 24-29 (in Chinese).
- [6] 刘茗铭. 高温大曲中产香功能微生物的筛选及其应用研究[D]. 自贡: 四川轻化工大学硕士学位论文, 2019.
LIU MM. Screening of aroma-producing microorganisms in high-temperature daqu and application of aroma-producing microorganisms[D]. Zigong: Master's Thesis of Sichuan University of Science & Engineering, 2019 (in Chinese).
- [7] 孙利林, 李立郎, 胡萍, 田亚, 麻颖垚, 袁再顺. 酱香型白酒大曲的微生物菌群结构及风味成分分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 299-306, 193.
SUN LL, LI LL, HU P, TIAN Y, MA YY, YUAN ZS. Analysis of microbial community structure and flavor composition of Maotai-flavor Daqu[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 299-306, 193 (in Chinese).
- [8] 信春晖, 许玲, 董乔娟, 蔡鹏飞, 于文娟, 于盼盼, 赵纪文. 酿酒微生物对酒体质量及风格的影响[J]. 酿酒, 2016, 43(2): 38-47.
XIN CH, XU L, DONG QJ, CAI PF, YU WJ, YU PP, ZHAO JW. Effect of brewing microorganisms on liquor quality and style[J]. Liquor Making, 2016, 43(2): 38-47 (in Chinese).
- [9] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2015.
SHEN YF. Complete Book of Liquor Production Technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2015 (in Chinese).
- [10] 马荣山, 于影. 麸曲酱香型白酒的酿制研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(1): 138-140.
MA RS, YU Y. Brewing of sauce-flavor liquor with bran koji[J]. China Brewing, 2010, 29(1): 138-140 (in Chinese).
- [11] 李大和, 李家顺, 李天道. 产酯酵母在浓香型曲酒生产中的应用[J]. 酿酒, 1990, 17(6): 17-20.
LI DH, LI JS, LI TD. Application of ester-producing yeast in Luzhou-flavor liquor production[J]. Liquor Making, 1990, 17(6): 17-20 (in Chinese).
- [12] 李志军, 郭荆学, 周静芳, 许勇. 生香活性干酵母在浓香型白酒生产中的应用研究[J]. 酿酒科技, 1999(4): 22-23.
LI ZJ, GUO JX, ZHOU JF, XU Y. Study on the application of aroma-producing active dry yeast in Luzhou-flavor liquor production[J]. Liquor-Making Science & Technology, 1999(4): 22-23 (in Chinese).
- [13] 张安东, 贝盏临, 张欣, 张浩. 产香酵母在食品工业中的应用[J]. 绿色科技, 2015(11): 260-264.
ZHANG AD, BEI ZL, ZHANG X, ZHANG H. Application of aroma-producing yeast in food industry[J]. Journal of Green Science and Technology, 2015(11): 260-264 (in Chinese).
- [14] 王国良, 宋俊梅, 曲静然. 生香酵母及其应用[J]. 食品工业, 2004, 25(3): 16-17, 29.
WANG GL, QU JR, Wang GL. Aroma producing yeast and its application[J]. The Food Industry, 2004, 25(3): 16-17, 29 (in Chinese).
- [15] WANG MY, YANG JG, ZHAO QS, ZHANG KZ, SU C. Research progress on flavor compounds and microorganisms of Maotai flavor Baijiu[J]. Journal of Food Science, 2019, 84(1): 6-18.
- [16] HE GQ, HUANG J, ZHOU RQ, WU CD, JIN Y. Effect of fortified Daqu on the microbial community and flavor in Chinese strong-flavor liquor brewing process[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 56.
- [17] 吴三多. 五大香型白酒的相互关系与微量成分浅析[J]. 酿酒科技, 2001(4): 82-85.
WU SD. Research on correlations and trace components of five flavour types of liquor[J]. Liquor-making Science & Technology, 2001(4): 82-85 (in Chinese).
- [18] 刘君, 李玲珊, 赵文鹏, 袁思棋. 中高温大曲产酯酵母代谢产酯性能研究[J]. 酿酒科技, 2021(12): 33-38, 46.
LIU J, LI LS, ZHAO WP, YUAN SQ. Ester-producing capacity of ester-producing yeasts from medium/high-temperature daqu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2021(12): 33-38, 46 (in Chinese).
- [19] 杜琳琳, 于鑫, 刘丽萍, 朱立磊, 赵祥颖, 张颖超, 韩墨, 刘建军. 产香酵母的筛选及其在液态食醋酿造中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(8): 169-175.
DU LL, YU X, LIU LP, ZHU LL, ZHAO XY, ZHANG YC, HAN M, LIU JJ. Screening of aroma-producing yeast strain and its application in liquid vinegar brewing[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(8): 169-175 (in Chinese).
- [20] 杨强, 唐洁, 杨生智, 夏金阳, 王喆, 刘源才. 清香型小曲白酒产酯酵母的筛选及应用[J]. 酿酒科技, 2016(1): 78-80.
YANG Q, TANG J, YANG SZ, XIA JY, WANG Z, LIU YC. Screening and application of ester-producing yeast strains in the production of Qingxiang xiaou Baijiu[J].

- Liquor-Making Science & Technology, 2016(1): 78-80 (in Chinese).
- [21] CHEN LH, WANG SX, LIU B, FENG SB. Flavor characteristics of hullless barley wine fermented with mixed starters by molds and yeasts isolated from Jiuqu[J]. Food Bioscience, 2023, 52: 102349.
- [22] 谢丽源, 张勇, 彭金华, 邓科君, 彭卫红, 郭勇, 贾定洪, 甘炳成. 桑黄真菌分子鉴定及遗传多样性分析[J]. 菌物学报, 2010, 29(3): 347-356.
- XIE LY, ZHANG Y, PENG JH, DENG KJ, PENG WH, GUO Y, JIA DH, GAN BC. Molecular identification and genetic diversity of a traditional Chinese medicinal fungus 'Sanghuang'[J]. Mycosystema, 2010, 29(3): 347-356 (in Chinese).
- [23] 李剑梅, 徐国华, 杨泽涛, 王艳华, 韩冰. 桑黄菌株 S-1 形态学观察及 ITS 系统发育分析[J]. 食用菌, 2016, 38(2): 20-22, 26.
- LI JM, XU GH, YANG ZT, WANG YH, HAN B. Morphological observation and phylogenetic analysis of *Phellinus igniarius* strain S-1[J]. Edible Fungi, 2016, 38(2): 20-22, 26 (in Chinese).
- [24] ALLMAN ES, RHODES JA, SULLIVANT S. Statistically consistent k-mer methods for phylogenetic tree reconstruction[J]. Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology, 2015, 24(2): 153-171.
- [25] BERKMAN SJ, ROSCOE EM, BOURRET JC. Comparing self-directed methods for training staff to create graphs using GraphPad Prism[J]. Journal of Applied Behavior Analysis, 2019, 52(1): 188-204.
- [26] YU HS, LEE NK, KIM WJ, LEE DU, KIM JH, PAIK HD. Optimization of an industrial medium and culture conditions for probiotic *Weissella cibaria* JW15 biomass using the plackett-burman design and response surface methodology[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 32(5): 630-637.
- [27] 谢再斌, 王太玉, 王茜, 覃先武, 李武阳, 常煦, 陈晖, 许引虎. 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 ZB, WANG TY, WANG Q, QIN XW, LI WY, CHANG X, CHEN H, XU YH. Application of *Wickerhamomyces anomalus* in baijiu-brewing[J]. China Brewing, 2022, 41(5): 18-22 (in Chinese).
- [28] 吴健, 何伟, 王建成, 杨玉蓉, 蓝彩红, 刘盛钢, 杨涛. 响应面法优化风味米曲制备工艺[J]. 中国酿造, 2020, 39(7): 120-124.
- WU J, HE W, WANG JC, YANG YR, LAN CH, LIU SG, YANG T. Optimization of preparation technology of flavor rice starter by response surface methodology[J]. China Brewing, 2020, 39(7): 120-124 (in Chinese).
- [29] 陈玉香, 张雯, 蔡琪琪, 倪莉. 发酵温度对异常威克汉姆酵母产挥发性风味物质的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(9): 122-128.
- CHEN YX, ZHANG W, CAI QQ, NI L. Effect of fermentation temperature on volatile flavor compounds produced by *Wickerhamomyces anomalus*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(9): 122-128 (in Chinese).
- [30] 张强, 郭元, 韩德明. 酿酒酵母乙醇耐受性的研究进展[J]. 化工进展, 2014, 33(1): 187-192.
- ZHANG Q, GUO Y, HAN DM. Research progress in the ethanol tolerance of yeast[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2014, 33(1): 187-192 (in Chinese).
- [31] 张穗生, 黄日波, 周兴, 黎贞崇, 黄志民. 酿酒酵母乙醇耐受性机理研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1604-1608.
- ZHANG SS, HUANG RB, ZHOU X, LI ZC, HUANG ZM. Advances in research on the mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol tolerance[J]. Microbiology China, 2009, 36(10): 1604-1608 (in Chinese).
- [32] 李欢欢, 曾雪莹, 谢娟, 刘玲, 徐学锋. 产香酵母的筛选鉴定及产酯条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(6): 87-92.
- LI HH, ZENG XY, XIE J, LIU L, XU XF. Screening and identification of aroma-producing yeasts and optimization of ester production conditions[J]. China Brewing, 2022, 41(6): 87-92 (in Chinese).