

酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯发酵条件的优化

刘朋肖^{1,3}, 常 煦⁴, 成柳洁^{1,3}, 丁 泽³, 龚 艺³, 李秀婷^{1,2,3}, 范光森^{1,2,3*}

¹北京工商大学 北京食品营养与人类健康高精尖创新中心 北京 100048

²北京工商大学 北京市食品添加剂工程技术研究中心 北京 100048

³北京工商大学食品学院 北京 100048

⁴安琪酵母股份有限公司 酿造与生物能源研究所 湖北宜昌 334003)

摘要 以酿酒酵母 Y3401 为研究对象,对该菌株发酵产己酸乙酯条件进行优化。首先,通过单因素对其培养基条件(pH 值和糖度)及诱导条件(温度、转速、接种量、乙醇添加量、己酸添加量、前体添加时机和诱导时间)进行优化,然后通过 Plackett-Burman 试验,筛选出 5 个显著影响酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的因素,再通过最陡爬坡试验确定最大响应区域,最后采用 Box-Behnken 试验设计及响应面分析,确定其最优产己酸乙酯条件为:糖度 14 Brix、初始 pH 7、温度 25 ℃、转速 180 r/min、接种量 3.5%、乙醇添加量 8%、己酸添加量 0.059%、前体添加时机 30 h、诱导时间 31 h。在此培养条件下己酸乙酯产量达 10.1 mg/L。本研究结果有助于酿酒酵母 Y3401 更好地应用于白酒发酵中。

关键词 酿酒酵母; 己酸乙酯; 响应面法; 发酵条件

文章编号 1009-7848(2022)02-0178-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.02.020

酿酒酵母是酒饮料生产中的重要菌株,不仅具有产乙醇能力,而且还有产酯能力,被广泛应用于白酒、啤酒和葡萄酒等产品酿造中,其性能的好坏直接关系这些酒饮料的出酒率和品质^[1-2]。基于酿酒酵母对酿酒的重要性,有关酿酒酵母的研究相对较多,主要集中于探讨酿酒酵母产乙醇能力,探究酿酒酵母与其它微生物共培养时的相互作用,而有关酿酒酵母发酵产酯的研究较少^[3-4]。酿酒酵母产香(产酯)特性与菌种密切相关,有研究表明不同酿酒酵母发酵相同原料时所产风味物质差异显著,筛选既能高产乙醇又具有突出产酯能力的酿酒酵母菌株在酒饮料生产中至关重要^[5-6]。在日本清酒研究中,分离获得一株高产己酸乙酯的酿酒酵母(清酒酵母)Kyokai No.7,并在清酒酿造中进行应用,后续又通过化学诱变技术获得高产己酸乙酯(产乙醇能力未受到影响)的突变菌株,进一步提高了清酒的品质^[7-9]。

白酒是我国国酒,科研工作者应在传承基础上对其创新,从而将其发扬光大。在这一过程中,系统研究我国白酒酿造过程中的重要功能微生物

是重中之重,是揭开我国白酒酿造神秘面纱的突破口,是走向智能化调控酿造的基础。众所周知,酿酒酵母是白酒酿造中众多微生物中优先关注的菌株之一,研究我国白酒酿造中的酿酒酵母多样性及其功能对于提高我国白酒品质具有重要意义^[3]。浓香型白酒是我国生产量和消费量最大的白酒品种,以浓香型白酒为研究对象具有典型性。己酸乙酯是浓香型白酒的主体风味物质,是评价浓香型白酒品质的重要指标,提高浓香型白酒酿造中己酸乙酯含量有利于提升其品质,提高优质酒率^[10]。传统浓香型白酒酿造过程中,己酸乙酯主要在发酵后期由己酸和乙醇在酯化酶作用下发生酯化反应产生,其中己酸是由生活于窖泥内部的己酸菌产生,其所产己酸只有渗透到窖泥外层中的酒醅中才有机会与乙醇酯化产生己酸乙酯,这正是浓香型白酒发酵周期长,粮耗高的原因之一^[11-12]。酿酒酵母是白酒酿造中不可缺少的菌株,其可通过醇酰基转移酶催化合成己酸乙酯,如能获得高产己酸乙酯的酿酒酵母,将会对浓香型白酒酿造发挥重要作用。肖冬光团队一直致力于通过分子生物学改造白酒酿酒酵母,获得了多株性能优良的高产己酸乙酯的酿酒酵母菌株,对于提升我国白酒品种具有重要的意义^[12-15]。我国不同地域、不同酿造工艺、不同香型白酒酿造中的微生物

收稿日期: 2021-02-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31701592)

作者简介: 刘朋肖(1994—),女,硕士

通信作者: 范光森 E-mail: fanguangsen@btbu.edu.cn

种群存在较大差异,相同菌属之间由于环境的长期选择也存在多样性,其特性也有所不同,从酿造环境中通过传统筛选获得性能优良的功能微生物菌株是探究白酒酿造的重要有效途径,因此采用筛选分离方法获得高产己酸乙酯的酿酒酵母不仅行之有效,而且不失为提高浓香型白酒酿造中己酸乙酯含量的有效途径之一,研究和选育高产己酸乙酯酿酒酵母菌株具有重大的现实意义^[3-4,16]。研究团队前期筛选获得一株高产乙醇的酿酒酵母 Y3401,在研究其产香特性时发现其能产己酸乙酯(在提供前体物质己酸时),并且其产量高于大多数酿酒酵母产己酸乙酯能力(一般在 0.5 mg/L 左右)^[4,17-18]。目前,有关我国白酒来源的酿酒酵母产己酸乙酯的研究较少。本文通过单因素、Plackett-Burman(PB)试验、最陡爬坡试验和响应面优化酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯条件,为其在白酒中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y3401 为北京工商大学食品与健康学院食品微生物及酶技术研究实验室自行筛选及保存。

乙醇、己酸、己酸乙酯, Sigma 公司; 色谱级正庚烷, 麦克林公司; 耐高温 α -淀粉酶、糖化酶, 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖、酵母浸粉、蛋白胨等试剂均为国产生物或分析纯级试剂; 高粱购自于河南许昌地区。

YPD 培养基配方如下: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母浸粉 10 g/L, 自然 pH, 121 °C 条件下灭菌 20 min。

高粱酶解液参考 Fan 等^[9]的方法: 250 g 高粱粉碎至 100 目以下后, 按照固液比 1:4 加入蒸馏水, 煮沸糊化后, 利用耐高温 α -淀粉酶于 90 °C 下液化 1 h, 冷却至 60 °C, 加入糖化酶糖化 2 h。糖化后, 趁热过滤后于室温离心 10 min, 离心转速为 10 000 r/min, 上清液糖度调至 8 Brix 后分装于三角瓶中 (30 mL/250 mL), 115 °C 灭菌 20 min。

1.2 仪器和设备

YQX-SG46-280S 高压蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; BCN-1360 型生物洁净

工作台, 北京东联哈尔仪器公司; 电子天平、pH 计, 赛多利斯科学仪器有限公司; LHS-100CL 恒温恒湿培养箱, 上海一恒仪器设备有限公司; TU-19 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; Microfuge 2R 离心机, 北京田林恒泰科技有限公司; 1260series 高效液相色谱仪, Agilent 科技有限公司; TSQTM8000 evo 三重四级杆气质联用仪 (GC-MS), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯条件优化

1.3.1.1 单因素实验 将酿酒酵母 Y3401 接种于 YPD 液体培养基中于 28 °C 活化培养 24 h, 按照 0.3% 接种量接种于高粱酶解液培养基中, 28 °C, 180 r/min 培养 24 h, 完成第 1 阶段细胞的积累, 然后加入 2% 乙醇和 0.02% 己酸继续培养, 完成第 2 阶段己酸乙酯的合成。采用单因素——考察培养基条件 (糖度和 pH 值) 及其第 2 阶段发酵条件 (温度、转速、接种量、乙醇添加量、己酸添加量、前体添加时机和诱导时间) 对酿酒酵母合成己酸乙酯的影响, 具体因素与水平见表 1。每组试验做 3 个平行, 得到的每个因素的最优水平用于后续试验, 通过气质联用仪 (GC-MS) 检测其己酸乙酯含量。

表 1 单因素及其实验水平

Table 1 Factors and levels of single factor design

因素	水平
糖度/Brix	2, 4, 6, 8, 10, 12, 14
pH 值	4, 5, 6, 7, 8, 9
乙醇添加量/%	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16
己酸添加量/%	0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10
温度/°C	18, 20, 22, 25, 28, 30
转速/r·min ⁻¹	150, 180, 210, 240, 270
接种量/%	0.10, 0.33, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 7.50, 10.00
前体添加时机/h	0, 8, 16, 24, 32, 40, 48
诱导时间/h	0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80

1.3.1.2 PB 试验 以上述考察的单因素及其水平为基础, 本试验选用 $n=17$ 的 PB 设计对 8 个因素 (乙醇添加量、己酸添加量、接种量、pH 值、转速、前体添加时机、诱导时间和温度) 进行考察, 每个

因素取+1和-1两个水平,本试验取单因素实验中最优水平两端具有显著性差异的水平作为+1和-1两个水平,响应值为己酸乙酯含量(mg/L),编码水平如表2所示,用软件 Design-Expert 11(Stat-Ease, Inc. USA)进行数据处理,比较各因素的 t 值和可信度。

1.3.1.3 最陡爬坡试验 根据 PB 试验得到了对响应值最显著的5个因素,将这5个因素进行最陡爬坡试验,依据 PB 试验获得的回归模型和试验经验设定5个因素的步移方向和步长,共设置5个梯度,每个梯度3个平行,其余条件按照单因素最优值进行,采用 GC-MS 检测己酸乙酯含量,最终确定后续响应面试验中的显著因素范围,确定试验设计的中心点。

1.3.1.4 响应面试验 根据 1.3.1.2 节和 1.3.1.3 节的试验结果,采用接种量、己酸乙酯添加量和诱导时间3个因素进行响应面试验,中心点为爬坡试验中己酸乙酯含量最高组(第2组)对应因素的取值。利用软件 Design-Expert 11 进行 Box-Behnken 试验设计(表3)及数据分析。

1.3.2 己酸乙酯含量测定方法 将发酵液离心,取上清液与正庚烷等体积混合,萃取2 min后取有机相部分于1.5 mL离心管中,加入适量无水硫酸钠除去痕量水。用有机滤膜过滤后采用 GC-MS 检测己酸乙酯含量。GC-MS 色谱条件参照 Fan 等^[9]方法,毛细管色谱柱为 DB-WAX(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度为250℃;分流比为37:1;采用程序升温,升温程序为50℃,保留2 min,以10℃/min速率升至180℃,保留2 min,再以6℃/min速率升至230℃,保留2 min;检测器温度250℃;载气为He,流速1 mL/min;EI电离源,电子能量70 eV;扫描范围50~350 amu;离子源温度250℃;接口温度250℃。

己酸乙酯标准曲线的绘制采用外标法,准确称取0.0869 g己酸乙酯纯品,用正庚烷定容至100 mL,分别将其稀释至20,50,100,200,400倍,经 GC-MS 检测其峰面积,以己酸乙酯含量为 x 轴,峰面积为 y 轴,绘制己酸乙酯标准曲线。

1.3.3 数据分析 每组试验进行3个平行,采用 SPSS 21.0 对试验数据进行差异显著性检验分析;利用 Excel 2016 和 Design-Expert 11 绘图软件处

表2 PB 试验设计的因素与水平

Table 2 Factors and levels of the variables in PB design

因素	水平	
	-1	+1
乙醇添加量(X_1)/%	6	10
己酸添加量(X_2)/%	0.02	0.06
接种量(X_3)/%	1	3
pH 值(X_4)	6	8
转速(X_5)/r·min ⁻¹	150	210
前体添加时机(X_6)/h	24	40
诱导时间(X_7)/h	16	32
温度(X_8)/℃	22	28

表3 Box-Behnken 试验因素及编码水平

Table 3 Factors and levels for the Box-Behnken design

因素	水平	
	-1	+1
接种量(A)/%	2	4
己酸添加量(B)/%	0.02	0.06
诱导时间(C)/h	24	36

理试验数据并绘制图表。

2 结果与讨论

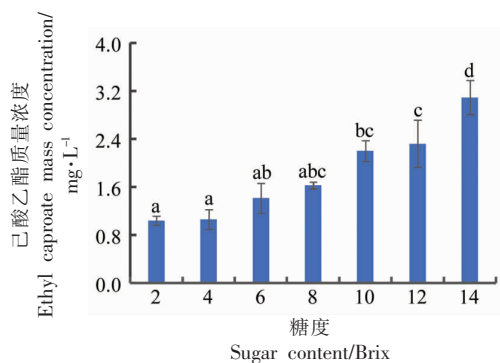
2.1 单因素实验

2.1.1 高粱酶解液糖度对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响 鉴于本文所选用菌株酿酒酵母 Y3401 筛选自白酒酿造环境,并且主要探究其在白酒酿造中的应用潜力,为此,本研究采用白酒酿造主要原料高粱的酶解液为发酵培养基探究其合成己酸乙酯能力。高粱酶解液糖度反映了其含有葡萄糖等还原糖的浓度,糖度不同,则含有的酵母所能利用的碳水化合物浓度不同,从而影响到酵母的生长、繁殖和代谢。由图1可见,随着高粱酶解液糖度的不断增加,酿酒酵母 Y3401 所产己酸乙酯的质量浓度不断增加,在高粱酶解液糖度最高时产量最大,达到3.1 mg/L。高粱酶解液中可利用碳水化合物是酵母生长繁殖的动力能源,对其合成己酸乙酯具有重要影响,当糖度较低时,酵母的生长繁殖受到可利用碳水化合物含量不足的影响,其所产

己酸乙酯含量较低;随着糖度的增高,可利用碳水化合物含量提高,从而促进菌体的生长和繁殖,有利于己酸乙酯的合成。不同菌株合成酯类化合物所需要的高粱酶解液糖度不同,这是由其耐糖溶液的耐受不同及其所合成酯类化合物种类有关^[19-20]。如钟姝霞等^[21]优化异常毕赤酵母 Y2 合成乙酸乙酯最佳高粱酶解液糖度为 12 Brix;而 Fu 等^[20]优化异常威克汉姆酵母 YF1503 产乙酸乙酯最佳高粱酶解液糖度为 8.5 Brix。本研究所采用高粱经酶解处理后最高糖度为 14 Brix,故在 PB 试验时不再进行考察。

2.1.2 高粱酶解液 pH 值对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响 环境 pH 值不仅影响酵母的生长繁殖,而且还会影响其代谢途径,尤其是与代谢产物合成相关酶的活力,对酵母合成有关代谢产物起到重要调控作用^[3]。通过优化高粱酶解液初始 pH 值发现(图 2),随着培养基初始 pH 值的升高,酿酒酵母 Y3401 合成己酸乙酯的质量浓度先增加后下降,当初始 pH 值为 7.0 时,己酸乙酯合成量最高,为 2.4 mg/L。前期已有研究结果表明该酵母能在较宽广的 pH 值范围(4~9)内生长良好,这表明 pH 值可能主要是通过影响酵母代谢合成己酸乙酯途径中相关酶的活力调控己酸乙酯的合成。值得注意的是,该菌株在 pH=4 时合成少量己酸乙酯,而在 pH \geq 5 时合成较高量的己酸乙酯,依据张浩等^[22]研究的结果可以判断发酵过程中所产己酸乙酯主要来源于酿酒酵母 Y3401 的生物合成作用,而由前体物质乙醇和己酸化学合成己酸乙酯的量可忽略。

2.1.3 温度对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响 温度对酵母的生长影响较大,合适的温度有利于酵母生长和代谢产物的积累。本试验首先采用 28 °C 完成该酵母细胞的积累,然后选取 18~30 °C 的范围考察温度对酵母合成己酸乙酯的影响。由图 3 可以看出,在己酸乙酯合成阶段,随着培养温度的升高,己酸乙酯含量先增加后降低,当培养温度为 25 °C 时,酵母 Y3401 合成己酸乙酯的量最高,达 1.9 mg/L。较高或者较低温度不仅影响酵母的继续生长,而且与己酸乙酯合成相关酶活力也会受到温度的影响,从而不利于己酸乙酯的合成^[19]。



注:含有相同的字母表示采用 Tukey test 检验时组间没有显著差异($P>0.05$),下同。

图 1 高粱浸出液糖度对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

Fig.1 Effect of sugar content of sorghum extract on ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

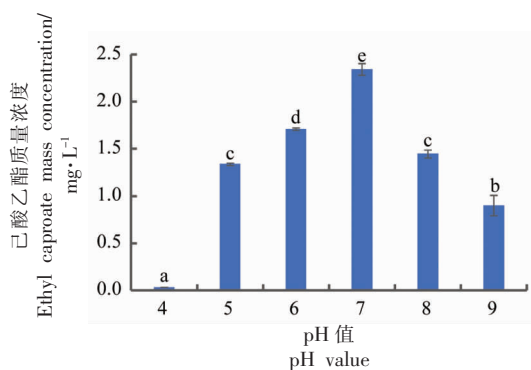


图 2 高粱浸出液 pH 值对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

Fig.2 Effect of pH value of sorghum extract on ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

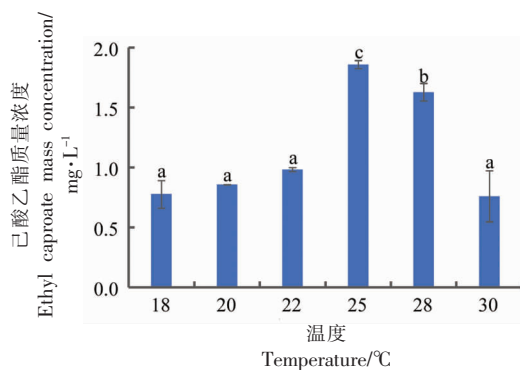


图 3 温度对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

Fig.3 Effect of temperature on the ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

2.1.4 转速对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

发酵摇瓶转速会影响到培养基溶氧量,进而影响到微生物的生长^[3]。本文考察了转速对酵母 Y3401 合成己酸乙酯的影响,结果如图 4 所示,随着转速的提高,酵母 Y3401 合成己酸乙酯的质量浓度先增加后降低,当转速为 180 r/min 时,己酸乙酯产量最高,达 1.6 mg/L,显著高于其它转速条件。转速的变化对酵母的生长和代谢有一定的影响,转速过低溶氧水平低,会影响细胞的正常生长;转速过高,一方面会抑制糖酵解途径,减少乙醇合成前体物质,降低乙醇得率而影响己酸乙酯的合成,另一方面则是高剪切力和高氧浓度下会增加己酸对细胞的毒害作用下,从而影响菌体正常生长和生理代谢,进而影响合成己酸乙酯速率^[3,23]。

2.1.5 接种量对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

接种量不仅会影响微生物生长规律,尤其是延缓期的长短,而且会影响微生物代谢产物的积累^[3]。合适的接种量,有利于目标代谢产物的合成。由图 5 可以看出,随着接种量的增加,酵母 Y3401 合成的己酸乙酯质量浓度先增加后降低,当接种量为 2% 时,己酸乙酯产量最高,达 6.8 mg/L。一般来看,接种量过少,酵母生长的延缓期较长,第 1 阶段细胞积累量相对较低,不利于第 2 阶段己酸乙酯的合成;接种量过高,虽能在第 1 阶段快速积累大量细胞,但往往因大量细胞的积累已消耗大量营养物质和氧气,并且加剧细胞之间对营养物质和氧气的竞争,从而在第 2 阶段因营养物质不足而导致合成己酸乙酯的速率降低^[3]。

2.1.6 乙醇添加量对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

乙醇是酵母 Y3401 合成己酸乙酯的重要前体物质,对酵母 Y3401 合成己酸乙酯起到重要作用。由图 6 可以看出,己酸乙酯质量浓度随着乙醇添加量的增加先增加后下降,当乙醇添加量为 8% 时,己酸乙酯产量达到最高,为 3.0 mg/L。在乙醇添加量较低时,酵母 Y3401 催化乙醇和己酸合成己酸乙酯前体不足,因此合成的己酸乙酯质量浓度较低;而乙醇添加量较高时,会对酵母的生长和代谢产生一定的抑制作用,影响其合成己酸乙酯的代谢活动,从而导致合成己酸乙酯的质量浓度降低^[19]。Fu 等^[20]研究发现异常威克汉姆酵母 YF1503 在乙醇添加量为 6% 时所产己酸乙酯最

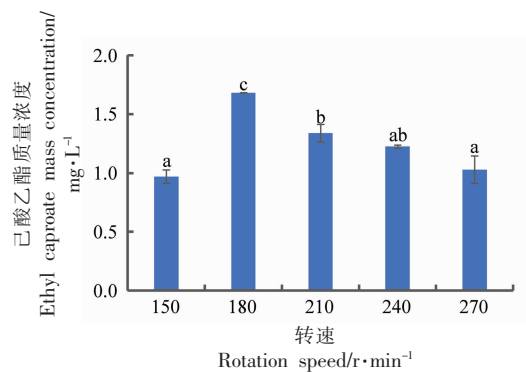


图 4 转速对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

Fig.4 Effect of rotation speed on the ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

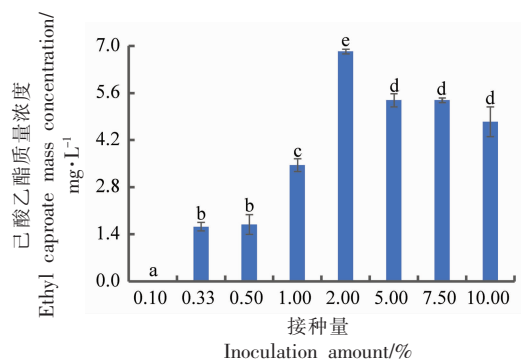


图 5 接种量对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

Fig.5 Effect of inoculation amount on the ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

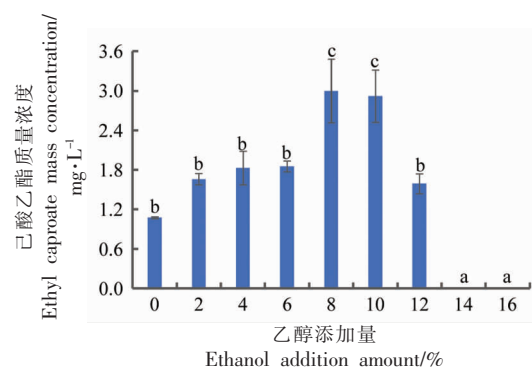


图 6 乙醇添加量对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

Fig.6 Effect of ethanol addition amount on the ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

高,这与本文所添加乙醇量基本一致,这与酵母对乙醇耐受性有关,两者在乙醇体积分数为 6%~8% 时受到的影响较小。值得注意的是,在未添加乙醇

时也有己酸乙酯合成,这是由于酵母 Y3401 在高粱酶解液中会产生少量乙醇,自身产生的乙醇与添加的己酸在酵母的作用下合成己酸乙酯,然而由于该酵母在高粱酶解液中生成的乙醇含量较低(约为 15 g/L),因此会随着乙醇添加量的增加己酸乙酯合成有所增加;而当乙醇添加量增加到 $\geq 14\%$ 时,高体积分数的乙醇会抑制酵母的生长和代谢,因此未检测到己酸乙酯的合成,进一步证实己酸乙酯的合成需要酵母 Y3401 细胞的生命活动。

2.1.7 己酸添加量对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响 己酸是酵母 Y3401 合成己酸乙酯的另一重要前体物质,对酵母 Y3401 合成己酸乙酯同样发挥重要作用。由图 7 可以看出,随着己酸添加量的增加,己酸乙酯质量浓度的变化趋势与乙醇添加量类似,呈现先增加后降低趋势,在己酸添加量为 0.04% 时,酵母 Y3401 合成己酸乙酯最多,为 3.7 mg/L。在己酸添加量较低时,合成己酸乙酯的前体物质含量不足,因此合成己酸乙酯的量较低,尤其是未添加己酸时,未检测到己酸乙酯,这充分表明酵母 Y3401 合成己酸乙酯需要前体物质——己酸;己酸添加量较高时,会对酵母 Y3401 产生抑制,从而引起己酸乙酯质量浓度降低。王瑞明等^[24]研究表明 0.05% 己酸即会对酵母生长产生较大影响。因此,己酸添加量高于 0.04% 时,高体积分数的己酸对酵母生长的影响导致其合成己酸乙酯质量浓度下降。

2.1.8 前体添加时机对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响 由于前体物质乙醇和己酸在较高体积分数下会对酵母 Y3401 生长代谢产生影响,继而影响到其代谢转化乙醇和己酸合成己酸乙酯,因此两者添加时机对其合成己酸乙酯存在一定的影响。由结果分析发现(图 8),在细胞积累培养中后期(第 1 阶段)添加前体物质更有利于己酸乙酯的合成,其中在培养 32 h 时添加前体物质合成己酸乙酯的量最高,达到 3.0 mg/L。这可能是由于酵母细胞在培养前期对前体物质比较敏感,特别是较高体积分数的前体物质还有可能对细胞生长产生一定的抑制作用,并且此时合成己酸乙酯的酶在培养体系中积累量较少,因此合成己酸乙酯含量较低;而较迟添加前体物质,虽然细胞浓度较高,但

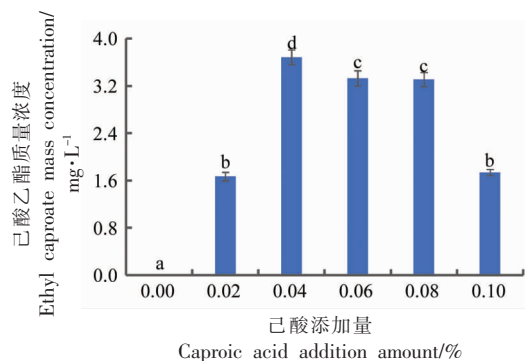


图 7 己酸添加量对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响
Fig.7 Effect of caproic acid addition amount on the ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

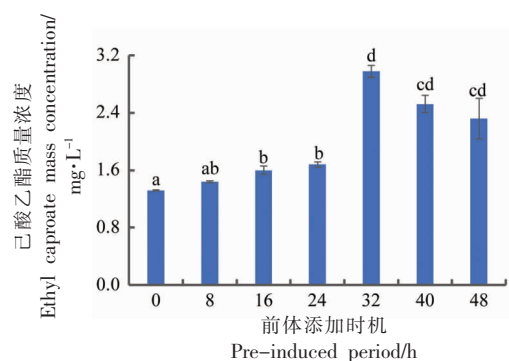


图 8 前体添加时机对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响
Fig.8 Effect of pre-induced period on the ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

由于培养基的营养物质含量下降,细胞代谢活动受到部分影响,从而引起代谢转化生成己酸乙酯能力下降。

2.1.9 诱导时间对酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

图 9 表明,随着诱导时间的延长,酵母 Y3401 合成己酸乙酯含量呈现先增加后下降趋势,在 16~24 h 内,己酸乙酯合成量最高。值得注意的是,在未添加乙醇和己酸前体发酵的 24 h 内,未检测到己酸乙酯的含量,这表明,在没有前体物质(尤其是己酸)存在时,酵母 Y3401 不能合成己酸乙酯,即进一步证实该酵母合成己酸乙酯需要己酸前体物质的存在。加入前体物质后,由于前期积累了大量的酵母细胞及对应合成己酸乙酯需要的酶,因此通过生物代谢能快速积累己酸乙酯;而随着诱导时间的延长,前体物质不断消耗,合成己酸乙酯

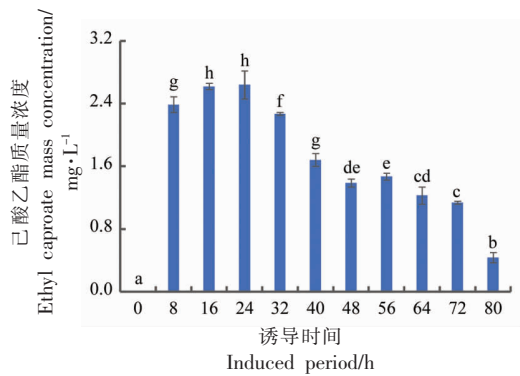


图9 诱导时间对酿酒酵母 Y3401 产己酸乙酯的影响

Fig.9 Effect of induced period on the ethyl caproate production by *S. cerevisiae* Y3401

表4 PB 试验设计及产己酸乙酯结果

Table 4 Experimental design of PB and the results for ethyl caproate production

试验号	因素											己酸乙酯质量浓度/ mg·L ⁻¹
	乙醇添加量 (X ₁)	己酸添加量 (X ₂)	接种量 (X ₃)	pH 值 (X ₄)	转速 (X ₅)	前体添加时机 (X ₆)	诱导时间 (X ₇)	温度 (X ₈)	虚拟项 1(X ₉)	虚拟项 2(X ₁₀)	虚拟项 3(X ₁₁)	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.6
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	7.0
3	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	2.9
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	2.8
5	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	2.5
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1
7	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	5.8
8	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.3
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1
10	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	3.1
11	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	6.5
12	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2.6
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.7
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.1
15	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.8
16	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	2.1
17	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	2.0

通过对试验结果进行分析, 可得最优回归方程为:

$$Y = 3.35 - 0.3667X_1 + 0.8667X_2 + 1.2800X_3 - 0.4167X_4 - 0.1000X_5 - 0.3833X_6 + 0.5500X_7 - 0.2667X_8$$

为进一步分析各因素对合成己酸乙酯的影响, 对试验结果进行了方差分析(表5)和显著性分析(表6)。从表5中可以看出, 回归模型的 F 值为 14.81, 相应的 P 值为 0.0005, 小于 0.001, 说明该模型极显著。相关系数 $R^2=0.9368$, 预测值与试

验值之间高度相关, 说明该模型可以很好的模拟合成己酸乙酯的发酵过程, 拟合程度高, 试验设计可靠。从表6可以看出, 对合成己酸乙酯影响显著的因素是接种量、己酸添加量、诱导时间、pH 值和前体添加时机, 可信度均在 97% 以上, 因此选择以上 5 个显著因素作为下一步爬坡试验的对象, 进行下一步优化。对于其它因素, 则由于其对合成己酸乙酯的影响不显著, 故选取单因素中最优水平进行下一步试验。

2.2 PB 试验

根据单因素实验结果, 选取单因素结果中最优水平为中心值, 设计了 11 因素 $n=17$ 的 PB 试验(5 个中心值, 设置 3 个虚拟项 X_9, X_{10} 和 X_{11}), 试验设计及试验结果如表 4 所示, 每组试验的响应值取 3 次重复试验的平均值。

表 5 PB 试验回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	38.84	8	4.85	14.81	0.0005
误差	2.62	8	0.3278		
总离差	41.46	16			

$R^2 = 0.9368$

表 6 PB 试验模型偏回归系数与显著性检验分析

模型项	回归系数	标准误差	F 值	P 值	显著性
截距	3.35	-	-	-	-
乙醇添加量	-0.3667	0.1653	13.52	0.0573	
己酸添加量	0.8667	0.1653	2.35	0.0008	***
接种量	1.2800	0.1653	1.50	<0.0001	***
pH 值	-0.4167	0.1653	99.03	0.0358	*
转速	-0.1000	0.1653	8.90	0.5619	
前体添加时机	-0.3833	0.1653	23.57	0.0490	*
诱导时间	0.5500	0.1653	5.03	0.0104	*
温度	-0.2667	0.1653	22.49	0.1453	

注:***. $P < 0.001$ 差异极显著;**. $P < 0.01$ 差异高度显著;*. $P < 0.05$ 差异显著;可信度(%)=(1-P 值)×100。

2.3 最陡爬坡试验

根据 Plackett-Burman 试验结果各因素的正、负效应并结合单因素实验结果,确定各因素的最陡爬坡试验的方向和步长,试验设计及结果见表 7。由表 7 可见,己酸乙酯含量呈现先增加后降低趋势,第 2 组试验己酸乙酯产量最高,即接种量

3%,己酸添加量 0.04%,诱导时间 30 h,pH=7,前体添加时机为 30 h 时,己酸乙酯产量为 9.2 mg/L,说明此时比较接近最佳响应区域。因此,结合 Plackett-Burman 中因素显著性,选择第 2 组中的接种量、己酸添加量、诱导时间 3 个因素及其对应水平作为响应面试验的因素和中心点。

表 7 最陡爬坡试验设计及结果

试验次数	接种量/%	己酸添加量/%	诱导时间/h	pH 值	前体添加时机/h	己酸乙酯质量浓度/ mg·L ⁻¹
1	1	0.02	24	8	36	3.3
2	3	0.04	30	7	30	9.2
3	5	0.06	36	6	24	5.0
4	7	0.08	42	5	18	3.8
5	9	0.10	48	4	12	2.2

2.4 Box-Behnken 试验

根据三因素三水平的响应面试验设计,共设定 17 个试验点,其中析因部分试验 12 次,中心点重复试验次数为 5 次,Box-Behnken 试验设计及

响应值见表 8,运用 Design-Expert 软件对试验结果数据进行多元二次回归拟合,分析结果见表 9。回归方程如下:

$$Y = 9.12 + 1.09A + 2.98B + 0.9625C + 0.275AB -$$

$$0.25AC+0.0025BC-1.29A^2-1.66B^2-1.99C^2$$

从表9可以看出,模型P值显著($P<0.0001$),而失拟项不显著($P>0.05$),说明拟合程度良好,回归方程可以很好地描述各因素和己酸乙酯产量的关系,回归方程决定系数 $R^2=0.9882$,调整系数 $R^2_{adj}=0.9730$,说明,该二阶回归方程可以解释响应面中2.7%的可变性,对试验拟合情况良好,方程预测值与真实值间的相关性高,可以用该方程确定己酸乙酯合成的最佳条件。

同时,由表9可得,一次项A、B和C达到极显著水平($P<0.001$),由F值可知,各因素对产己酸乙酯的影响顺序为:己酸添加量>接种量>发酵时间;另外, A^2 、 B^2 和 C^2 对其曲面效应也为极显著。根据回归方程,得出各因素交互作用对己酸乙酯产量影响的响应面图(图10),由响应面图可以看出 $AB>AC>BC$ 。另外,由图还可直观看出随着各因素数值的增加,响应值呈现先上升后略有下降趋势,拟合曲线均为凸形,有最大值,通过Design-

表8 Box-Behnken 试验设计及产己酸乙酯结果

Table 8 The Box-Behnken design and the results for ethyl caproate production

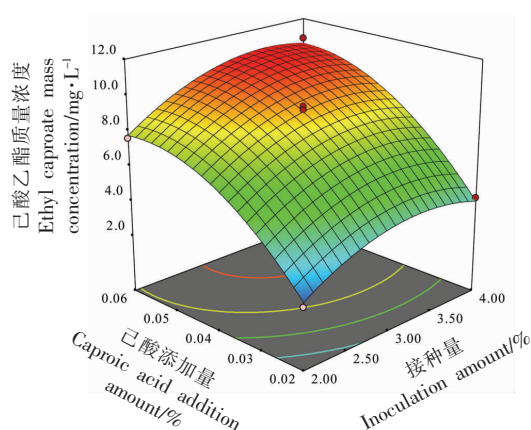
标准 序号	试验 序号	接种量 (A)	己酸添 加量(B)	诱导时 间(C)	己酸乙 酯质量 浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	标准 序号	试验 序号	接种量 (A)	己酸添 加量(B)	诱导时 间(C)	己酸乙 酯质量 浓度/ $mg \cdot L^{-1}$
5	1	-1	0	-1	4.1	12	10	0	1	1	9.7
9	2	0	-1	-1	1.3	7	11	-1	0	1	5.9
1	3	-1	-1	0	2.1	11	12	0	-1	1	3.8
15	4	0	0	0	9.1	13	13	0	0	0	9.2
16	5	0	0	0	9.3	10	14	0	1	-1	7.1
2	6	1	-1	0	4.2	3	15	-1	1	0	7.6
14	7	0	0	0	9.1	17	16	0	0	0	9.2
8	8	1	0	1	7.1	6	17	1	0	-1	6.3
4	9	1	1	0	10.8						

表9 Box-Behnken 试验设计回归方程方差分析

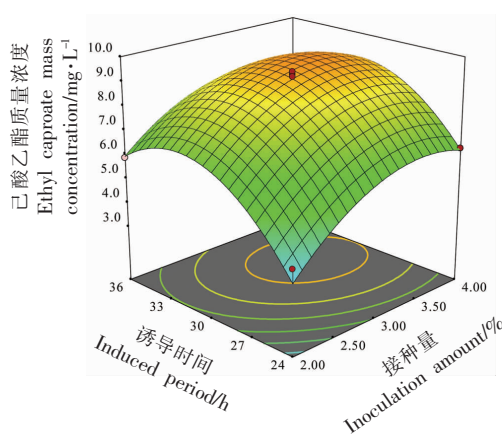
Table 9 Experimental design regression equation analysis of variance of the Box-Behnken design

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	127.34	9	14.15	65.14	< 0.0001	***
A	9.46	1	9.46	43.56	0.0003	***
B	70.81	1	70.81	325.97	< 0.0001	***
C	7.41	1	7.41	34.12	0.0006	***
AB	0.3025	1	0.3025	1.39	0.2765	
AC	0.2500	1	0.2500	1.15	0.3189	
BC	0.0025	1	0.0025	0.01	0.9176	
A^2	6.95	1	6.95	32.01	0.0008	***
B^2	11.60	1	11.60	53.42	0.0002	***
C^2	16.59	1	16.59	76.38	< 0.0001	***
残差	1.52	7	0.2172			
失拟值	1.25	3	0.4175	6.23	0.0547	
纯误差	0.2680	4	0.0670			
相关系数	$R^2 = 0.9882$	$R^2_{Adj} = 0.9730$				

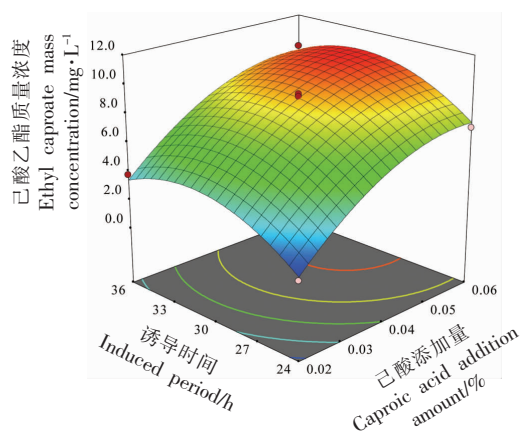
注:***, $P<0.001$ 差异极显著;** $P<0.01$ 差异高度显著;* $P<0.05$ 差异显著。



(a) 接种量与己酸添加量之间的交互作用



(b) 接种量与诱导时间之间的交互作用



(c) 己酸添加量与诱导时间之间的交互作用

图 10 各因素间相互作用的己酸乙酯产量响应曲面及其等高线图

Fig.10 Response surface and contour map of ethyl caproate yield under the interaction of various factors

Expert 软件求解方程,得到预测最优条件与响应面设计中心值一致,即己酸添加量 0.059%、接种量 3.5%、诱导时间 31 h,最终预测值为 10.9 mg/mL,为验证结果的可信度,采用最优条件进行验证试验,测得己酸乙酯的含量为 10.1 mg/L(结果为 3 次重复试验的平均值),与模型预测值偏差 7.9%,二者基本吻合,具有良好的拟合性,优化模型可靠。该优化结果相比单因素优化最高值 (6.8 mg/L)提升了 48%。

3 结论

酿酒酵母是白酒酿造中的重要功能菌株,其不仅影响到白酒出酒率,而且对白酒品质也有一定的影响。这一影响,不仅包括酿酒酵母菌株与白酒酿造环境中微生物菌群相互作用而引起酿造环境中微生物菌群特定的规律变化,还包括酿酒酵母本身所产风味物质。为此,本文对前期筛选获得的一株高产乙醇并具有突出产酯能力的酿酒酵母 Y3401 合成己酸乙酯条件进行了系统优化。通过,单因素实验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 试验,最终获得其产己酸乙酯的条件为:高粱培养基糖度为 14 Brix、初始 pH=7、温度 25 °C、转速 180 r/min、接种量 3.5%、乙醇添加量 8%、己酸添加量 0.059%、前体添加时间 30 h、诱导时间 31 h。在此培养条件下,其合成己酸乙酯量为 10.1 mg/L,较优化前有了大幅提升,为其更好应用于白酒酿造中提供了良好的理论基础。

参 考 文 献

- [1] 张华东, 李霄霄, 任雪, 等. 己酸菌对高产酯酿酒酵母酒精发酵及酯醇代谢的影响[J]. 中国调味品, 2020, 45(5): 83-87, 99.
ZHANG H D, LI X X, REN X, et al. Effects of caproic acid bacteria on alcohol fermentation and ester-alcohol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* with high-yield ester[J]. China Condiment, 2020, 45(5): 83-87, 99.
- [2] 王松, 汤涵岚, 王陟垚, 等. *Saccharomyces cerevisiae* 对浓香型白酒发酵的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(21): 142-146, 150.

- WANG S, TANG H L, WANG Z Y, et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the fermentation of strong-flavoured liquor[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(21): 142-146, 150.
- [3] 范光森, 刘朋肖, 吴秋华, 等. 有氧条件下酿酒酵母 YF1914 产乙醇发酵条件优化及其产香特性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 52-58.
- FAN G S, LIU P X, WU Q H, et al. Optimization of cultural conditions for ethyl alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae* YF1914 in aerobic conditions and its aroma-producing characteristics[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(13): 52-58.
- [4] FAN G S, TENG C, XU D, et al. Enhanced production of ethyl acetate using co-culture of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(5): 564-570.
- [5] WONDRA M, BEROVIC M. Analyses of aroma components of chardonnay wine fermented by different yeast strains[J]. Food Technology and Biotechnology, 2001, 39(2): 141-148.
- [6] TORRENS J, URPI P, RIU-AURNATELL M, et al. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 124(1): 48-57.
- [7] TAKAHASHI T, OHARA Y, SUENO K. Breeding of a sake yeast mutant with enhanced ethyl caproate productivity in sake brewing using rice milled at a high polishing ratio[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017, 123(6): 707-713.
- [8] ICHIKAWA E, HOSOKAWA N, HATA Y, et al. Breeding sake yeasts with improved ethyl caproate productivity[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(8): 2153-2154.
- [9] ARIKAWA Y, YAMADA M, SHIMOSAKA M, et al. Isolation of sake yeast mutants producing a high level of ethyl caproate and/or isoamyl acetate[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(6): 675-677.
- [10] 许春艳, 孙宝国, 徐友强, 等. 合成己酸乙酯酯化酶产生菌的鉴定及产酶条件优化[J]. 中国食品学报, 2020, 20(5): 138-147.
- XU C Y, SUN B G, XU Y Q, et al. Identification of ethyl hexanoate synthesis esterifying enzymes production strain and its enzyme production conditions optimization[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(5): 138-147.
- [11] ZHANG J, ZHANG C, DAI L, et al. Effects of overexpression of the alcohol acetyltransferase-encoding gene *ATF1* and disruption of the esterase-encoding gene *IAH1* on the flavour profiles of Chinese yellow rice wine [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(12): 2590-2596.
- [12] CHEN Y F, LUO W W, GONG R, et al. Improved ethyl caproate production of Chinese liquor yeast by overexpressing fatty acid synthesis genes with *OPI1* deletion[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 43(9): 1261-1270.
- [13] 何亚辉, 马艳蕊, 薛星祥, 等. 脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶对酿酒酵母己酸乙酯合成的影响[J]. 天津科技大学学报, 2020, 35(2): 13-21.
- HE Y H, MA Y R, XUE X X, et al. Effect of fatty acid acyl-co A synthetase on the synthesis of ethyl caproate in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2020, 35(2): 13-21.
- [14] 李锋, 陈叶福, 郭建, 等. 过表达 *EHT1* 基因对酿酒酵母己酸乙酯生产能力的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(3): 93-98, 176.
- LI F, CHEN Y F, GUO J, et al. Effects of overexpressed *EHT1* on ester production of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 93-98, 176.
- [15] CHEN Y F, LI F, GUO J, et al. Enhanced ethyl caproate production of Chinese liquor yeast by overexpressing *EHT1* with deleted *FAA1*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(3): 563-572.
- [16] 范光森, 许岱, 富志磊, 等. 古井贡酒曲中酵母的分离及其产香挥发性风味物质分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 220-229.
- FAN G S, XU D, FU Z L, et al. Screen of aroma-producing yeast strains from Gujinggong *Daqu* and analysis of volatile flavor compounds produced by them[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(7): 220-229.
- [17] 罗伟伟, 强化脂肪酸合成途径促进酿酒酵母合成己酸乙酯的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016.

- LUO W W. Research of improving ethyl caproate production in *Saccharomyces cerevisiae* by strengthening fatty acid synthesis[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016.
- [18] FAN G S, TENG C, XU D, et al. Improving ethyl acetate production in Baijiu manufacture by *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed culture fermentations[J]. Biomed Research International, 2019(4): 1-11.
- [19] FAN G S, SUN B G, XU D, et al. Isolation and identification of high-yield ethyl acetate-producing yeast from Gujingong *Daqu* and its fermentation characteristics[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2018, 76(2): 117-124.
- [20] FU Z L, SUN B G, LI X T, et al. Isolation and characterization of a high ethyl acetate-producing yeast from Laobaigan *Daqu* and its fermentation conditions for producing high-quality Baijiu [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2018, 32(5): 1218-1227.
- [21] 钟姝霞, 万世旅, 边名鸿, 等. 一株高产乙酸乙酯酵母的鉴定及产酯条件的研究[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 75-79.
- ZHONG S X, WAN S L, BIAN M H, et al. Identification and ester-producing conditions of a high ethyl acetate-producing yeast[J]. China Brewing, 2017, 36(2): 75-79.
- [22] 张浩, 胡智慧, 刑爽, 等. 酸浓度和 pH 值对浓香型大曲酯化酶催化活力的影响[J]. 中国酿造. 2017, 36(5): 41-45.
- ZHANG H, HU Z H, XING S, et al. Effect of acid concentration and pH on esterifying enzyme catalytic activity of Luzhou-flavor *Daqu*[J]. China Brewing, 2017, 36(5): 41-45
- [23] 喻扬, 王永红, 储炬, 等. 控制发酵过程氧化还原电位优化酿酒酵母乙醇生产[J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 878-884.
- YU Y, WANG Y H, CHU J, et al. The Influence of controlling redox potential on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(5): 878-884.
- [24] 王瑞明, 王燕. 己酸对酵母菌生理代谢的影响[J]. 酿酒科技, 1996(6): 16-17.
- WANG R M, WANG Y. Effect of caproic acid on physiological metabolism of yeast[J]. China Brewing, 1996(6): 16-17.

Optimization of Fermentation Conditions for Ethyl Caproate Production from *Saccharomyces cerevisiae* Y3401

Liu Pengxiao^{1,3}, Chang Xu⁴, Cheng Liuji^{1,3}, Ding Ze³, Gong Yi³, Li Xiuting^{1,2,3}, Fan Guangsen^{1,2,3*}

(¹Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology & Business University, Beijing 100048

²Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology & Business, Beijing 100048

³School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

⁴Institute of Brewing and Bioenergy, Angel Yeast Co. Ltd., Yichang 334003, Hubei)

Abstract *Saccharomyces cerevisiae* Y3401 with high-yield for ethyl caproate was selected, and the fermentation conditions of ethyl caproate from it were optimized. Firstly, the medium conditions (including initial pH value and sugar content) and induction conditions (including temperature, rotation speed, inoculation amount, ethanol addition amount, caproic acid addition amount, pre-induced period, and post-induced period) were optimized by single factor design. Then, five significant factors for ethyl caproate production were screened by Plackett-Burman design, and the maximum response area was determined by the steepest ascent design. Finally, the optimal fermentation conditions of Y3401 for producing ethyl caproate were obtained by response surface methodology. The optimal conditions were as follows: sugar content 14 Brix, initial pH 7, inoculum size of 3.5%, ethanol content 8%, caproic acid content 0.059%, pre-induced period 30 h, and post-induced period 31 h incubated at 25 °C with 180 r/min. Under the condition, the yield of ethyl caproate reached 10.1 mg/L. These results are helpful for the application of *S. cerevisiae* Y3401 in Baijiu brewing.

Keywords *Saccharomyces cerevisiae*; ethyl caproate; response surface methodology; fermentation conditions