

模拟白酒固态发酵中异常威克汉姆酵母的提酯增香作用

富志磊^{1,2}, 马景浩¹, 周泉宇¹, 詹夏晖¹, 徐江琪³, 刘晓艳^{1,4}, 范光森^{1,4*},
滕超¹, 孙宝国^{1,3}, 李秀婷¹

(¹北京工商大学食品与健康学院 北京 100048

²河北民族师范学院 生物与食品科学学院 河北承德 067000

³北京工商大学 食品风味化学北京市重点实验室 北京 100048

⁴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)

摘要 采用模拟白酒固态发酵方法研究异常威克汉姆酵母 YF1503(酵母 YF1503)在提高白酒酿造过程中乙酸乙酯含量,改善白酒品质方面的作用。首先,考察在不同发酵方式和接种量条件下酵母 YF1503 提高乙酸乙酯的情况,然后,采用顶空固相微萃取-气质联用技术比较分析了试验组与对照组中的挥发性风味物质成分与含量。结果发现,酵母 YF1503 在以盖封的 Y 式发酵方式和以水封的 F 式发酵方式下能提高发酵体系中乙酸乙酯的含量,其中以 Y 式发酵方式效果最佳;在所试的 5 种接种量水平下,酵母 YR1503 都能明显提升乙酸乙酯含量,综合各个发酵时间点的乙酸乙酯含量,以接种量为 10%时效果突出;添加酵母 YF1503 后,发酵体系中挥发性风味物质种类和含量都有所增加,尤其是酯类化合物。综上所述,酵母 YF1503 具有增加白酒酿造中酯类等风味化合物,改善白酒品质的潜力。

关键词 异常威克汉姆酵母; 模拟白酒固态发酵; 乙酸乙酯; 发酵方式; 主成分分析

文章编号 1009-7848(2023)05-0175-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.018

白酒是世界六大著名蒸馏酒之一,因独特的风格而独树一帜。白酒同其它蒸馏酒一样,主要成分是乙醇和水,除此之外,还含有一些呈香与呈味的微量成分。白酒中的微量成分种类众多,远超其它蒸馏酒,这正是白酒风格的独到之处。有研究表明,白酒中鉴定出的风味物质在 2 000 种左右,包括酯类、醇类、醛类、醚类、酮类、呋喃类、酸类、含氮或含硫化合物等,正是这些众多化合物的有机组合和相互缔结,形成不同香型白酒的风味轮廓,是不同香型和不同品质白酒差异的物质基础^[1]。在白酒众多风味物质中,具有水果香、花香和甜香的酯类化合物在白酒中最为突出,其在白酒中的种类最多,多达 500 余种,且含量在微量成分中最高,占有所有微量成分的 75%~95%,赋予不同香型白酒的特有风格和品质,也是白酒区别于其它蒸馏酒最为显著之处^[2]。然而,受各种因素的影响,酿造的基酒中酯类化合物,尤其是对白酒品质具有

重要影响的酯类化合物含量不高,使白酒的优质酒产率低。基于酯类化合物在白酒中的重要性以及基酒中酯类化合物含量低的现状,已有较多学者关注白酒中酯类化合物的形成机制和影响因素^[3-7]。

相关研究表明,白酒中酯类化合物的形成有 3 个途径,分别是原料带入,酸-醇自身化学反应和微生物发酵产生(实质是酸-醇酶促反应)^[2]。这 3 个途径中,微生物发酵产酯是白酒中酯类化合物最为重要的来源^[2]。为此,挖掘白酒酿造中产酯类化合物的微生物菌株,探究其合成酯类化合物的规律和内在机制,以及这些微生物菌株在白酒酿造中的提酯增香作用,具有重要的意义。本研究团队前期从白酒酿造环境中获得 1 株高产乙酸乙酯的异常威克汉姆(*Wickerhamomyces anomalus*)酵母菌株 YF1503,在摇瓶发酵水平上可产 17 g/L 以上的乙酸乙酯,为当前报道的产乙酸乙酯最高菌株之一^[8]。本文基于该菌株优良的高产乙酸乙酯特性,探讨其在模拟白酒固态发酵中的产酯能力,为后期在白酒酿造中的应用提供参考。

收稿日期: 2022-05-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31701592)

第一作者: 富志磊,男,博士生

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

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌株 异常威克汉姆酵母 YF1503 为本实验室筛选和保存。

1.1.2 培养基 YPD 培养基参考如下方式配制: 20 g/L 胰蛋白胨、20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母浸粉, 115 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂及仪器 葡萄糖、酵母浸粉、蛋白胨等试剂, 购自北京奥博星生物技术有限责任公司; 甲醇(色谱纯级)、乙酸乙酯标准品和二辛醇购自 Sigma 公司; 高粱购自山东沂南; 大曲由河北衡水老白干酒业股份有限公司提供(曲砖为贮存 2 个月曲)。

BL-2200H 型电子分析天平, 岛津国际贸易(上海)有限公司; PHS-3C pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; TENSUC 恒温摇床, 上海天呈实验仪器制造有限公司; 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 生物洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; TU-19 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Microfuge 2R 离心机, 北京田林恒泰科技有限公司; 1260series 高效液相色谱

谱仪, Agilent 科技有限公司; TSQTM8000 evo 三重四级杆气质联用仪, 美国 ThermoFisher Scientific。

1.2 方法

1.2.1 酵母 YF1503 细胞的收集 将实验室筛选保存的酵母 YF1503 接种于 YPD 培养基中, 在 30 °C、180 r/min 的条件下活化 24 h, 然后以 1% 的接种量再次转接到 YPD 培养基中培养 48 h, 培养条件同第一次活化条件, 培养结束后于 4 °C、5 000 r/min 离心收集酵母细胞菌体, 然后用预冷的生理盐水重悬酵母细胞, 常温放置、待用。

1.2.2 模拟白酒固态发酵 取 800 g 带壳红高粱, 采用粉碎机将高粱颗粒破碎为 4~5 瓣后, 加入 1.6 L 80 °C 热水, 充分混匀并浸泡 24 h, 添加 200 g 稻壳, 再次混匀后, 均匀平铺在上层垫有纱布的篦子上(不宜过厚), 置于沸水蒸锅内, 盖盖蒸粮 1.5 h。立即将粮食取出, 混匀, 平铺摊凉。待粮食温度为 30 °C 左右, 加入 100 g 老白干大曲粉(20~40 目), 试验组中接入 10% (以总重量计) 的上述准备的酵母细胞菌悬液, 对照组以生理盐水代替菌悬液。混匀后分装在 2 L 陶瓷坛中, 于常温进行固态发酵(图 1)。



图 1 模拟白酒固态发酵流程图

Fig.1 The process of simulated solid-state fermentation for Baijiu production

1.2.3 不同发酵方式对模拟白酒固态发酵产乙酸乙酯的影响 依据 1.2.2 节的方式处理好高粱, 并分装于陶瓷坛中, 发酵前, 按照 4 种不同方式处理

陶瓷坛, 分别为开口发酵, 记为 W; 3 层纱布封口式发酵, 记为 S; 盖坛盖式发酵, 记为 Y; 盖坛盖并水封式发酵, 记为 F(如图 1)。处理好后于常温下

进行发酵7 d,每天取样检测乙酸乙酯浓度(每种处理方式都分别进行两组,试验组中添加异常威克汉姆酵母 YF1503 菌悬液,对照组添加生理盐水)。

1.2.4 不同酵母接种量对模拟白酒固态发酵产乙酸乙酯的影响 采用1.2.3节中的Y式发酵方式探究不同酵母接种量对模拟白酒固态发酵产乙酸乙酯的影响,接种量分别为0%,5%,10%,15%,20%和25%,常温发酵7 d,每天取样检测乙酸乙酯浓度。

1.2.5 乙酸乙酯的测定 将发酵酒醅充分混匀后,准确称取10 g酒醅,置于三角瓶中,加入40 mL蒸馏水,常温密封浸泡过夜,再超声浸提30 min后,离心取上清,过膜后,采用高效液相色谱检测乙酸乙酯浓度,具体参考Fu等^[8]的方法。采用C18反相柱(ZORBAX Eclipse Plus C-18,4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为 $V_{\text{甲醇}}:V_{0.1 \text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4 \text{ 溶液}}=1:1$,流速为1 mL/min;检测波长为210 nm,柱温35 ℃,进样量5 μL。乙酸乙酯的计算采用外标法进行。

1.2.6 顶空固相微萃取-气质联用测定酒醅挥发性成分 参照Wang等^[9]的方法,准确称取1 g混匀的酒醅,置于15 mL气质小瓶中,加入5 mL饱和食盐水和1 μL 0.5 g/L的2-辛醇,于60 ℃平衡30 min后,于60 ℃吸附30 min,进行气质检测挥发性风味物质。

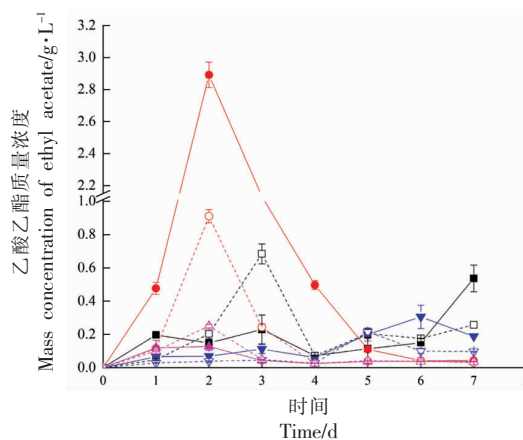
1.2.7 数据分析 每组试验进行2个平行,采用SPSS 24.0对试验数据进行统计学分析;利用Excel 2016和Origin 2017绘图软件处理试验数据并绘制图表。

2 结果与分析

2.1 不同发酵方式对模拟白酒固态发酵产乙酸乙酯的影响

为探究酵母 YF1503 在白酒酿造中提酯增香的特性,参照各地传统白酒酿酒工艺以及现代机械化酿造工艺的特点,模拟了4种不同的固态发酵体系。4种模拟固态发酵体系之间的差异主要体现在封口方式上,封口方式的差异导致4种模拟固态发酵体系之间在溶氧水平和热量传递存在方面不同,继而影响酵母 YF1503 的功能特性。由

图2可以看出,当采用W式发酵时,除第1天和7天外,试验组中乙酸乙酯含量低于对应对照组。通过观察发现,采用该种发酵方式,由于开口发酵,空气流通较好,发酵体系中水分损失相对较快,从而导致体系中有大量的霉菌繁殖,这在一定程度上影响了酵母 YF1503 的生长,未能较好地发挥酵母 YF1503 高产乙酸乙酯的功能特性。另外,酵母 YF1503 在该发酵体系中的强化,在一定程度上也导致了发酵体系中微生物菌群结构的变化,这可能是部分试验组中乙酸乙酯含量低于对照组的原因之一^[9]。当采用S式发酵时,虽然在一定程度上减弱了空气的流通效果和水分损失速率,以及避免了酿造环境空气中的微生物的干扰,但结果与W式发酵类似,体系中仍有大量霉菌快速繁殖以及酵母 YF1503 和发酵体系中原有微生物菌群相互影响,从而使得试验组中乙酸乙酯含量低于其对照组。当采用Y式发酵时,试验组中乙酸乙酯含量明显高于对应对照组。研究发现,在该种发酵方式下,发酵体系中水分在整个发酵过程中适量,且该种发酵方式空气流通相对较弱,故氧气含量控制在较为适宜的浓度,这种发酵方式所营造的微环境对发酵体系中的微生物菌群结构的变化有利于酵母 YF1503 发挥其产乙酸乙酯的特性,



注:“■”和“□”为W式发酵方式;“▲”和“△”为S式发酵方式;“●”和“○”为Y式发酵;“▼”和“▽”为F式发酵。实心标记为试验组,空心标记为对照组。

图2 不同发酵方式对模拟白酒固态发酵产乙酸乙酯的影响

Fig.2 Effect of different fermentation modes on ethyl acetate production in simulated solid-state fermentation for Baijiu production

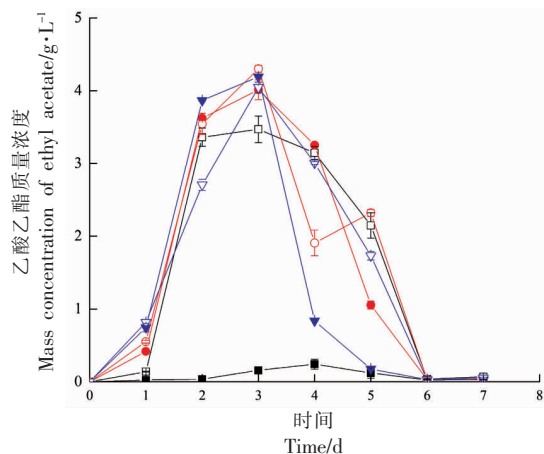
是适合酵母 YF1503 提酯增香的理想发酵方式。值得注意的是,在此发酵体系下,霉菌生长繁殖的速率相比前 2 种发酵方式慢,这是该发酵体系中微环境对霉菌的抑制作用所致。当采用 F 式发酵时,试验组中乙酸乙酯含量略高于其对照组,这可能是由于此种发酵体系创造的极低的氧气含量和较高的水分含量有利于酵母 YF1503 与发酵体系中其它微生物的相互协作,此种发酵方式在应用酵母 YF1503 提质增香方面也有较好的效果。值得注意的是,除了 W 式发酵方式外,其它 3 种方式中试验组乙酸乙酯的变化趋势与其对应对照组基本一致,仅是含量上有所不同,然而从乙酸乙酯变化趋势来看,采用这 3 种模拟发酵方式进行菌株强化更易于被生产企业者所接受,以此来提酯增香。

另外,从不同发酵方式对乙酸乙酯含量的影响比较分析发现,未接入酵母 YF1503 的 4 种对照组中,采用 Y 式发酵效果最佳,其次为 W 式发酵,优于 S 式和 F 式发酵;接入酵母 YF1503 的 4 种试验组规律与对照组之间的规律一致,由此可见,不同的酿造方式会影响白酒中风味物质含量及其变化情况,这正是白酒酿造企业非常重视酿造工艺的佐证。试验结果还表明,发酵过程中存在一定的氧气含量有助于白酒酿造过程中乙酸乙酯含量的提高,相关研究表明,酿造过程中窖池溶氧过剩,有利于醋酸菌和产酯酵母大量繁殖,从而在发酵过程中产生大量乙酸和乙酸乙酯^[10],而就本研究的目的来讲,通过综合比较分析表明,适宜的氧气含量有助于酵母 YF1503 在白酒酿造体系中实现提酯增香,而氧气含量过多或者过少则不利于其发挥功能。综上所述,在这 4 种模拟固态发酵方式中,以 Y 式发酵效果最佳,因此,后续试验采用 Y 式发酵进行。

2.2 不同酵母接种量对模拟白酒固态发酵产乙酸乙酯的影响

酒曲是白酒酿造的原动力,为白酒酿造提供需要的微生物和酶制剂,对酿造的白酒品质具有重要的影响^[11]。一般而言,为了尽量保证白酒品质的相对稳定性,各酒企都会选定固定的酒曲来源而不人为进行随意改变。随着对白酒酿造机理研究的深入,使用特定的功能微生物菌种(群)酿造

或改善白酒成为一种必然趋势,并已有相关研究取得一定的成效^[9,12]。研究发现,特定功能微生物的引入会对白酒酿造过程中微生物菌群结构产生一定影响,从而影响白酒的品质^[9]。功能菌株的不同接种量对白酒酿造中微生物菌群结构的影响不同,这必然会影响到其发挥相应的功能特性。图 3 显示了酵母 YF1503 的不同接种量对乙酸乙酯含量的影响,结果表明,在以 Y 式发酵方式时,不同接种量条件下,发酵体系中乙酸乙酯含量变化趋势类似,都随着发酵时间的延长呈现先增加后降低的趋势,并且都在发酵第 3 天时体系中乙酸乙酯含量达到最高,然而不同接种量对乙酸乙酯含量的增加或减少速率不同,这可能是由于体系中酵母 YF1503 生物量不同以及不同接种量条件下发酵体系中微生物菌群结构及其变化不同所致^[9,13-14]。另外,与对照组进行比较发现,在 Y 式发酵方式下,不同的酵母 YF1503 接种量都对乙酸乙酯含量提升有积极效果,试验组中乙酸乙酯的含量都有显著提升,尤其是在发酵 2~3 d。综合分析每天乙酸乙酯含量情况以及考虑到未来应用中的经济成本,以 10% 的接种量较为理想。



注:“■”、“□”、“●”、“○”、“▼”和“▽”分别表示接种量为 0%, 5%, 10%, 15%, 20% 和 25%。

图 3 不同酵母接种量对模拟白酒固态发酵产乙酸乙酯的影响

Fig.3 Effect of different inoculation amount on ethyl acetate production in simulated solid-state fermentation for Baijiu production

2.3 酵母 YF1503 对模拟白酒固态发酵体系中风味物质的影响

以 Y 式发酵探究酵母 YF1503 对白酒酿造风味的影响(酵母接种量采用 10%),结果如表 1 和图 4 所示。由表 1 可以看出,发酵体系中接入酵母 YF1503 后,不仅风味物质种类增多(由对照组的 41 种增加到 54 种),而且各类风味物质的含量也在不同程度上得到提高。在众多风味物质中,酯类化合物变化最为明显,相比对照组,试验组中增加

了 7 种酯类,包括乙酸异丁酯、丙酸正戊酯、2,3-丁二醇二乙酯、乙二醇二乙酸酯、1,3-丙二醇二乙酸酯、乙酸香叶酯和丙位癸内酯,并且在整个发酵过程中,试验组中酯类化合物总含量都明显高于对照组,由此可见,酵母 YF1503 不仅可以提高发酵体系中乙酸乙酯含量,而且能提高发酵体系中风味物质种类及含量,对于改善白酒品质具有潜在的应用价值,这与之前的研究结果类似^[9]。

表 1 固相微萃取-气质联用分析模拟白酒固态发酵中的挥发性风味物质

Table 1 Analysis of volatile flavor compounds in simulated solid-state fermentation for Baijiu production by solid phase microextraction coupled with GC-MS

风味	Y0 或 C0/ mg·kg ⁻¹	试验组/mg·kg ⁻¹						对照组/mg·kg ⁻¹			
		Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y8	C2	C4	C6	C8
乙酸乙酯	0.00	11.29	33.12	12.14	4.85	0.00	0.00	0.35	1.31	0.32	0.00
乙酸异丁酯	0.00	0.22	1.03	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
乙酸异戊酯	0.00	3.65	8.14	2.43	1.80	0.01	0.00	0.16	0.97	0.30	0.00
丙酸正戊酯	0.00	0.00	0.14	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
己酸乙酯	0.00	0.04	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.00	0.00
辛酸乙酯	0.00	0.08	0.06	0.05	0.00	0.00	0.00	0.07	0.08	0.00	0.00
2,3-丁二醇二乙酯	0.00	0.14	0.36	1.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
乙二醇二乙酸酯	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1,3-丙二醇二乙酸酯	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
反式-4-癸烯酸乙酯	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	2.11	0.00
乙酸苜酯	0.00	0.23	0.59	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
乙酸香叶酯	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
苯乙酸乙酯	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.07	0.09	0.03
乙酸苯乙酯	0.00	1.55	8.72	4.60	2.40	0.03	0.00	0.06	1.17	1.49	0.12
丙酸-2-苯乙酯	0.00	0.00	0.13	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21	0.00
丙位癸内酯	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
软脂酸乙酯	0.00	0.00	0.10	0.13	0.12	0.11	0.20	0.42	1.19	1.26	0.00
棕榈酸甲酯	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
反油酸乙酯	0.00	0.00	0.05	0.00	0.07	0.07	0.13	0.14	0.51	0.53	0.12
亚油酸乙酯	0.09	0.10	0.12	0.07	0.04	0.07	0.14	0.19	0.72	0.64	0.11
酯类(20)	0.10	17.37	52.59	21.48	9.28	0.30	0.47	1.43	6.14	7.05	0.38
异丁醇	0.00	0.08	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.20	0.41	0.00	0.00
异戊醇	0.06	1.13	0.51	0.25	0.39	0.09	0.03	1.83	2.08	0.00	0.00
正己醇	0.09	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.01	0.00	0.00
3-辛醇	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04	0.00	0.00	0.02	0.05	0.03
1-辛烯-3-醇	0.02	0.00	0.00	0.00	0.04	0.03	0.01	0.03	0.15	0.50	0.24
正庚醇	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
苯甲醇	0.00	0.00	0.07	0.08	0.13	0.09	0.05	0.09	0.19	0.12	0.05
2,3-丁二醇	0.00	0.00	0.07	0.00	0.19	0.14	0.10	0.07	0.38	0.00	0.00
苯乙醇	0.07	1.81	1.18	2.08	2.83	1.50	0.81	1.41	4.31	1.92	4.96
十一醇	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00

(续表 1)

风味	Y0 或 C0/ mg·kg ⁻¹	试验组/mg·kg ⁻¹						对照组/mg·kg ⁻¹			
		Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y8	C2	C4	C6	C8
鲸蜡醇	0.00	0.00	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
醇类(11)	0.27	3.08	1.86	2.47	3.61	1.89	1.00	3.68	7.56	2.59	5.28
愈创木酚	0.00	0.61	0.20	0.20	0.36	0.19	0.28	0.22	0.36	0.31	0.29
苯酚	0.00	0.31	0.19	0.00	0.27	0.15	0.16	0.14	0.25	0.00	0.18
4-乙基愈创木酚	0.00	6.41	4.67	4.59	5.18	4.07	5.25	3.45	5.93	7.84	3.91
4-乙基苯酚	0.00	0.79	0.42	0.48	0.61	0.59	1.20	1.14	2.34	2.63	1.50
4-乙烯基愈创木酚	0.17	4.01	4.08	3.13	4.54	2.09	2.79	0.23	0.44	0.50	2.70
2,4-二叔丁基苯酚	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
酚类(6)	0.18	12.13	9.56	8.40	10.96	7.09	9.68	5.18	9.32	11.28	8.58
正十四烷	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02	0.04	0.05	0.03
正十五烷	0.00	0.00	0.19	0.06	0.07	0.00	0.08	0.08	0.11	0.15	0.00
正十六烷	0.04	0.08	0.23	0.08	0.08	0.07	0.00	0.12	0.12	0.16	0.09
正十七烷	0.03	0.06	0.12	0.04	0.04	0.04	0.04	0.08	0.07	0.07	0.05
烷烃(4)	0.07	0.14	0.54	0.20	0.22	0.14	0.16	0.30	0.34	0.43	0.17
3-羟基-2-丁酮	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.54	0.04	0.07	0.87	1.72	0.55
3-乙酰氧基-2-丁酮	0.00	0.72	0.33	0.78	0.52	0.06	0.00	0.00	0.21	3.22	0.33
香叶基丙酮	0.00	0.00	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
仲辛酮	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00
酮类(4)	0.00	0.72	0.35	0.80	0.90	0.60	0.20	0.07	1.08	4.94	0.88
癸醛	0.02	0.00	0.03	0.00	0.07	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
2-壬烯醛	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
椰子醛	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
醛类(3)	0.06	0.00	0.03	0.02	0.07	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
2-甲基丙酸	0.00	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
乙酸	0.00	0.00	0.11	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	1.84	0.20
异戊酸	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.16	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00
酸类(3)	0.00	0.28	0.11	0.03	0.22	0.16	0.18	0.00	0.12	1.84	0.20
苯乙烯	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
川芎嗪	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2,3-二氢苯并呋喃	0.09	1.62	1.13	0.69	0.79	0.34	0.26	0.00	0.27	0.25	0.33
其它(3)	0.15	1.62	1.13	0.69	0.79	0.34	0.26	0.00	0.27	0.25	0.33

注: Y0、Y1、Y2、Y3、Y4、Y5 和 Y8 为采用 Y 式方式发酵, 接种量为 10%, 分别发酵 0, 1, 2, 3, 4, 5 d 和 8 d 的样品; C0、C2、C4、C6 和 C8 为对照组, 分别发酵 0, 2, 4, 6 d 和 8 d 的样品; 下同。

以发酵过程中含量最高的 15 种风味物质, 包括乙酸乙酯、乙酸异丁酯、乙酸异戊酯、2,3-丁二醇二乙酯、乙酸苄酯、乙酸苯乙酯、软脂酸乙酯、异戊醇、苯乙醇、4-乙基愈创木酚、4-乙基苯酚、4-乙烯基愈创木酚、3-羟基-2-丁酮、3-乙酰氧基-2-丁酮和 2,3-二氢苯并呋喃作为因子进行主成分分析。由图 5 可以看出, 特征值大于 1 的主成分有 4 个, 分别记为 F1、F2、F3 和 F4, 其特征值依次为 6.676, 3.631, 1.445 和 1.356, 其累积贡献率达 87%

以上, 能够较好地代表原始数据所反映的信息, 故提取这 4 个因子来反映固态模拟发酵不同发酵期间 15 种风味物质的原始信息。进一步分析 15 种风味物质浓度与主成分之间的相关性, 可以看出, 第 1 主成分代表乙酸乙酯、乙酸异丁酯、乙酸异戊酯、2,3-丁二醇二乙酯、乙酸苄酯、乙酸苯乙酯、4-乙烯基愈创木酚和 2,3-二氢苯并呋喃 8 种风味物质的影响, 可单独解释风味物质浓度方差信息量的 44.509%; 而第 2 种成分代表软脂酸乙酯、4-

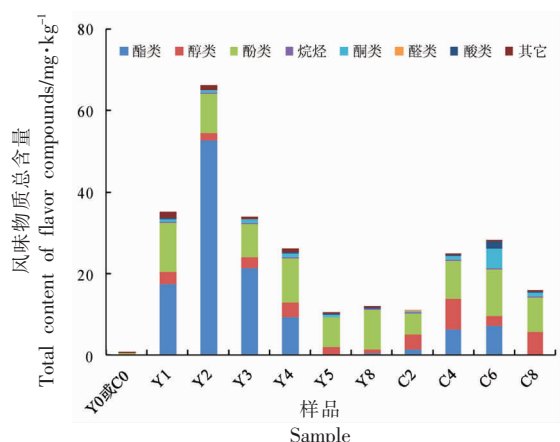


图 4 不同样品中的挥发性风味物质含量

Fig.4 Content of volatile flavor compounds in different samples

乙基愈创木酚、4-乙基苯酚、3-羟基-2-丁酮和 3-乙酰氧基-2-丁酮 5 种风味物质的影响作用,可单独解释风味物质浓度方差信息量的 24.206%;第 3 主成分代表异戊醇 1 种风味物质的影响作用,可单独解释风味物质浓度方差信息量的 9.636%;3 者累积可解释总信息的 78.351%,能反映不同样品中 15 种风味化合物的绝大多数信息。

对 10 组发酵样品在主成分 F1 和 F2 的分布情况进行了分析,由图 6 可以看出,10 组发酵样品分布在 3 个不同区域,其中 Y1、Y2、Y3 和 Y4 为 I 组,主要分布在第 1 象限,为接入酵母 YF1503 发酵前期样品,能够明显的与其它样品组进行区分,这充分表明酵母 YF1503 能较好的改善白酒风味,并且能快速凸显其功能,效果突出。由图 6 可以看出 I 组样品与第 1 主成分代表风味成分关联最为密切,尤其是酯类化合物,即添加酵母 YF1503 于发酵体系后能很好的改善白酒样品中的酯类化合物。C4 和 C6 为 II 组,分布在第 2 象限,是对照组中期发酵的样品;其余 5 个样品组为 III 组,主要分布在第 3 象限,为试验组发酵后期与对照组的前期和后期样品。由此可见,酵母 YF1503 具有较好的改善白酒风味品质的潜力,尤其是在增加酯类化合物的种类和含量方面。

3 结论

本文采用模拟白酒固态发酵体系对异常威克汉姆酵母 YF1503 在提高白酒中酯类化合物含量,增强白酒香气方面进行了探究。首先,参考不

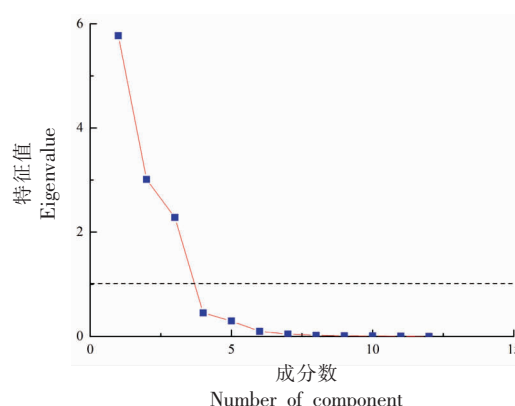


图 5 主成分分析碎石图

Fig.5 Scree plot of PCA

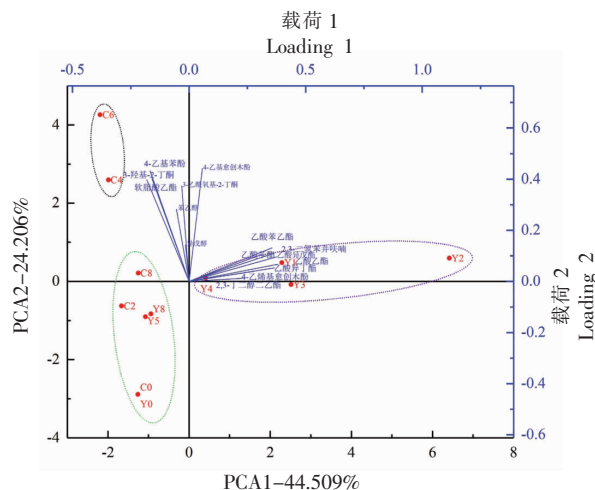


图 6 模拟白酒固态发酵体系中风味物质的载荷图

Fig.6 Principal component analysis of flavor compounds in simulated solid-state fermentation for Baijiu

同地区白酒酿造工艺特点,并结合未来白酒酿造工艺发展趋势模拟了 4 种发酵方式对酵母 YF1503 在提高白酒酿造体系中乙酸乙酯含量的影响。结果表明,以 Y 式发酵方式,酵母 YF1503 在提高发酵体系中乙酸乙酯含量方面效果最为突出;其次,分析了酵母 YF1503 在不同接种量条件下对发酵体系中乙酸乙酯含量的影响,结果表明,在以 Y 式发酵方式下,不同酵母接种量都能提高酿造体系中的乙酸乙酯,综合不同发酵时间以及成本,选择 10% 的接种量为佳。最后,采用顶空固相微萃取-气质联用测定了两组发酵体系中的挥发性风味物质,结果表明添加酵母 YF1503 的试验组不仅增加了挥发性风味物质种类,而且提升

了挥发性风味物质的含量,突出表现在酯类化合物方面。综上所述,异常威克汉姆酵母 YF1503 具有改善白酒品质的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] SONG X B, WANG G N, ZHU L, et al. Comparison of two cooked vegetable aroma compounds, dimethyl disulfide and methional, in Chinese Baijiu by a sensory-guided approach and chemometrics[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 146: 111427.
- [2] 范光森, 吴秋华, 刘朋肖, 等. 脂肪酶在白酒酯类化合物合成中的作用研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(1): 351-360.
FAN G S, WU Q H, LIU P X, et al. Research progress on the role of lipase in the synthesis of esters in Baijiu[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(1): 351-360.
- [3] 范光森, 王允中, 刘朋肖, 等. 醇酰基转移酶催化合成白酒中的乙酸乙酯研究进展[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(11): 294-304.
FAN G S, WANG Y Z, LIU P X, et al. Research progress in catalytic synthesis of ethyl acetate in Baijiu by alcohol acyltransferase[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(11): 294-304.
- [4] DENG Y H, XIONG A Y, ZHAO K, et al. Mechanisms of the regulation of ester balance between oxidation and esterification in aged Baijiu[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 17169.
- [5] CUI D Y, ZHANG Y, XU J, et al. PGK1 promoter library for the regulation of acetate ester production in *Saccharomyces cerevisiae* during Chinese Baijiu fermentation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(28): 7417-7427.
- [6] LI W, WANG J H, ZHANG C Y, et al. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* genetic engineering on the production of acetate esters and higher alcohols during Chinese Baijiu fermentation[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(6): 949-960.
- [7] LI W, CUI D Y, WANG J H, et al. Overexpression of different alcohol acetyltransferase genes with BAT2 deletion in *Saccharomyces cerevisiae* affects acetate esters and higher alcohols[J]. *European Food Research and Technology*, 2018, 244(3): 555-564.
- [8] 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.
- [9] WANG W H, FAN G S, LI X T, et al. Application of *Wickerhamomyces anomalus* in simulated solid-state fermentation for Baijiu production: Changes of microbial community structure and flavor metabolism[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 598758.
- [10] 谢玉球, 时晓, 周二干, 等. 浓香型原酒乙酸乙酯偏高的原因及解决措施[J]. *酿酒*, 2017, 44(6): 42-46.
XIE Y Q, SHI X, ZHOU E G, et al. Causes and measures for the higher ethyl acetate in base liquor of Luzhou flavor liquor[J]. *Liquor Making*, 2017, 44(6): 42-46.
- [11] FAN G S, FU Z L, TENG C, et al. Effects of aging on the quality of roasted sesame-like flavor Daqu[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 67.
- [12] HE G Q, HUANG J, WU C D, et al. Bioturbation effect of fortified Daqu on microbial community and flavor metabolite in Chinese strong-flavor liquor brewing microecosystem[J]. *Food Research International*, 2020, 129: 108851.
- [13] HE G Q, HUANG J, ZHOU R Q, et al. Effect of fortified Daqu on the microbial community and flavor in Chinese strong-flavor liquor brewing process[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 56.
- [14] HE G Q, DONG Y, HUANG J, et al. Alteration of microbial community for improving flavor character of Daqu by inoculation with *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis* [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 111: 1-8.

Effect of *Wickerhamomyces anomalus* on Increasing Ester Compounds and Aroma in Simulated Solid-state Fermentation for Baijiu Production

Fu Zhilei^{1,2}, Ma Jinghao¹, Zhou Quanyu¹, Zhan Xiahui¹, Xu Jiangqi³, Liu Xiaoyan^{1,4}, Fan Guangsen^{1,4*}, Teng Chao¹, Sun Baoguo^{1,3}, Li Xiuting¹

¹School of Food and Health, Beijing Technology and Business University (BTBU), Beijing 100048

²School of Biology and Food Science, Hebei Normal University for Nationalities, Chengde 067000, Hebei

³Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University (BTBU), Beijing 100048

⁴Beijing Engineering and Technology Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University (BTBU), Beijing 100048)

Abstract In this study, simulated solid-state fermentation for Baijiu production was adopted to investigate the application of *Wickerhamomyces anomalus* YF1503 in improving the content of ethyl acetate in the brewing process and the quality of Baijiu. Firstly, the effects of different fermentation modes and inoculation amount on the improvement of ethyl acetate by *Wickerhamomyces anomalus* YF1503 were investigated. Then, the components and contents of volatile flavor substances in the experimental group and the control group were compared and analyzed by headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. Results showed that *Wickerhamomyces anomalus* YF1503 could increase the content of ethyl acetate in the Y-type fermentation mode with lid seal and the F-type fermentation mode with water seal, and the Y-type fermentation mode had the best effect. And, the five inoculation levels could significantly increase the content of ethyl acetate. When the inoculation amount was 10%, the effect of synthesizing the content of ethyl acetate at each fermentation time point was outstanding. Results also showed that the types and contents of volatile flavor substances in the fermentation system increased, especially esters, after the addition of *Wickerhamomyces anomalus* YF1503. In conclusion, *Wickerhamomyces anomalus* YF1503 has potential to increase the flavor compounds and improve the quality of Baijiu.

Keywords *Wickerhamomyces anomalus*; simulated solid-state fermentation for Baijiu production; ethyl acetate; fermentation mode; principle component analysis