

## 基于黄水酯化产酯酵母的筛选

陈雪玲<sup>1</sup>, 兰小艳<sup>1</sup>, 廖诚<sup>2</sup>, 陈惠<sup>1</sup> (1. 宜宾职业技术学院, 四川宜宾 644003; 2. 宜宾市叙州区南广中心校, 四川宜宾 644000)

**摘要** 为得到可用于黄水酯化的产酯酵母, 以四大酯为评价指标, 将分离自浓香型白酒产区的 17 株酵母先通过改良酸醇酯化体系进行产酯能力初筛, 再将初筛得到的 7 株酵母应用于黄水酯化进行复筛。结果表明: 在改良酸醇酯化体系中有 16 株酵母能促进己酸乙酯合成, 有 7 株与对照差异显著; 7 株酵母均能提高黄水己酸乙酯, 其中 H1Y-24 与对照差异极显著, 并且能降低乳酸乙酯, 使酯化液四大酯量比关系更加协调。

**关键词** 黄水; 酵母; 产酯能力; 己酸乙酯

中图分类号 TS261.9 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)21-0174-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.21.044



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Screening of Ester-producing Yeast in Yellow Water Esterification

CHEN Xue-ling<sup>1</sup>, LAN Xiao-yan<sup>1</sup>, LIAO Cheng<sup>2</sup> et al (1. Yibin Vocational and Technical College, Yibin, Sichuan 644003; 2. Nanguang Primary School in Xuzhou District of Yibin City, Yibin, Sichuan 644000)

**Abstract** In order to obtain ester producing yeast for yellow water esterification, four esters were used as evaluation indexes, seventeen strains of yeast isolated from Luzhou flavor liquor producing areas were screened for ester production capacity through improved acid alcohol esterification system, then the seven yeast strains were used in yellow water esterification for rescreening. The results showed that in the improved acid alcohol esterification system, 16 strains of yeast could promote the synthesis of ethyl caproate, and 7 strains were significantly different from the control. The results showed that all the seven yeast strains could increase ethyl hexanoate in yellow water, and the difference between H1Y-24 and the control was significant, and could reduce ethyl lactate and higher alcohols, making the relationship between the four ester ratio of esterification liquid more harmonious.

**Key words** Yellow serofluid; Yeast; Ester production capacity; Ethyl hexanoate

黄水是浓香型白酒酿造过程特有的副产物, 其产量大, 物质丰富, 直接排放将造成资源浪费及环境污染<sup>[1]</sup>。向黄水中添加产香微生物将其发酵为黄水酯化液用于白酒生产, 是目前黄水资源再利用的主要手段<sup>[2]</sup>。现有研究表明, 白酒企业目前所用黄水酯化体系较为复杂, 一般有大曲、酯化酶、窖泥、酒尾等物质, 导致酯化结果重现性差, 且酯化时间较长, 设备利用率低<sup>[3]</sup>。该研究将分离筛选自宜宾白酒产区的产香酵母制成麸曲粗酶制剂, 以己酸乙酯生成量为主, 其他风味物质为辅作检测指标, 先通过改良的混酸醇酯化体系进行酯化力初筛, 再将筛选所得的酵母应用于黄水酯化力筛选, 以期得到可应用于黄水生香的潜在酵母, 同时为浓香型白酒企业制备黄水酯化液提供参考。

## 1 材料与方

**1.1 材料与仪器** 麸皮, 购自宜宾某面粉加工厂; 黄水, 采自宜宾某浓香型白酒企业; 供试酵母(表 1), 保存于固态发酵资源利用四川省重点实验室。气相色谱仪、顶空进样器(美国安捷伦公司); LZP-930 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.5 μm)(郑州谱析公司)。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 菌种制备。** 酵母菌悬液制备: 斜面菌种经 YPD 液体培养基活化、扩培后, 于 4 °C 保存备用。

**1.2.2 酵母麸曲的制备。** 麸皮与水 1:1 拌匀, 121 °C 灭菌 30 min, 按 5% 接种量接种菌悬液, 置 28 °C 培养 72 h, 培养结

束后于 35 °C 干燥烘箱 4 h, 备用。

表 1 供试菌株特点

Table 1 Characteristics of experimental strains

序号 No.	菌株 Strains	分离源 Location of separation
1	Z8Y-91	窖房空气
2	Z8Y-15	窖房空气
3	Z9Y-91	曲房空气
4	H9Y-16	曲房空气
5	W8Y-18	窖房空气
6	S432Y-42	糟醅
7	S432Y-32	糟醅
8	S433Y-12	糟醅
9	S532Y-32	糟醅
10	S622Y-24	糟醅
11	S433Y-15	糟醅
12	S422Y-9	糟醅
13	S442Y-9	糟醅
14	H5Y-28	糟醅
15	Z4Y-31	糟醅
16	H1Y-24	窖泥
17	H6Y-19	糟醅

**1.2.3 酵母麸曲在混酸体系中产酯能力评价。** 5 g 麸曲与 100 mL(含四大酸各 0.25 mL、无水乙醇 10 mL)混合酸醇水溶液于 150 mL 三角瓶中, 在 35 °C 下酯化 100 h 后, 取 10 mL 酯化液于 20 mL 顶空瓶, 4 °C 保存待检。以未加麸曲为空白对照。

**1.2.4 生香麸曲应用于黄水酯化能力评价。** 25 g 麸曲与 500 mL 黄水于 500 mL 三角瓶中, 保鲜膜封口, 置 35 °C 酯化

**基金项目** 宜宾职业技术学院院级一般项目(ZRKY21YB-11, ZRKY21YB-10); 宜宾职业技术学院院级重点项目(ybzysc20-01)。

**作者简介** 陈雪玲(1985—), 女, 四川安岳人, 讲师, 硕士, 从事微生物发酵研究。

**收稿日期** 2021-01-28; **修回日期** 2021-05-28

5 d 后,取 10 mL 酯化液于 20 mL 顶空瓶,4 ℃ 保存待检。以未加麸曲为黄水空白对照,以未加菌液的麸皮为麸皮对照。

**1.2.5 酯化体系反应产物检测。**酯化液均以顶空进样方式进行气相色谱检测。顶空条件:加热箱 90 ℃,定量环 100 ℃,传输线 120 ℃;GC 循环 34 min,样品瓶平衡 20 min,压力平衡 0.10 min,进样时间 0.50 min。酯化液色谱条件参考文献[4]。

## 2 结果与分析

### 2.1 17 株酵母催化混酸醇生成四大酯比较

(1) 17 株酵母对己酸乙酯合成能力。由表 2 可知,17 株酵母有 16 株能合成己酸乙酯,与空白对照比值在 1.2~4.7。经方差分析,有 9 株酵母促进己酸乙酯生成量与空白对照差异显著,提高率在 100% 以上,表明这 9 株酵母合成己酸乙酯能力较好。

(2) 17 株酵母对乙酸乙酯合成能力。17 株酵母合成的乙酸乙酯均高于空白对照,且与空白对照比值在 1.2~1.9,说明供试酵母均能合成乙酸乙酯,这与前人报道的非酿酒酵母能够合成以乙酸乙酯为主的酯类物质的结论一致<sup>[5]</sup>。经方差分析,有 10 株酵母合成乙酸乙酯生成量达显著差异,表明这 10 株酵母对促进乙酸乙酯生成有更好的潜力。

(3) 17 株酵母对乳酸乙酯合成能力。在粮醅堆积或者在窖内发酵过程中,细菌等微生物代谢产生大量乳酸,由于其难以挥发,便与乙醇合成乳酸乙酯,最终影响产品质量<sup>[6]</sup>。通常浓香型白酒企业在生产中都会采取一些“降乳”措施。从 17 株酵母对乳酸乙酯合成能力来看,有 4 株生成的乳酸乙酯低于空白对照,说明这 4 株有抑制或分解乳酸乙酯的能力,在浓香型白酒生产中具有一定的“降乳”潜能。另外,乳酸乙酯对其他香型白酒(如清香型)呈味有重要贡献,其余 13 株能不同程度地促进乳酸乙酯合成,且有 2 株能显著提高乳酸乙酯含量,表现出更好的催化能力。

(4) 17 株酵母对丁酸乙酯合成能力。丁酸乙酯在浓香型白酒四大酯中含量最少,仅为己酸乙酯 10% 左右,然而其香气强度值仅次于己酸乙酯<sup>[7]</sup>。由表 2 可知,与空白对照相比,所有试验菌株对催化合成丁酸乙酯均有促进作用,且与空白对照比值为 1.2~2.4。经方差分析,有 3 株酵母催化合成的丁酸乙酯生成量达显著差异,具有更好的合成能力。

根据浓香型白酒主体风味特征选出生成己酸乙酯显著,同时排除生成乳酸乙酯显著的酵母,初步筛选出 H1Y-24、S432Y-42、Z8Y-15、Z8Y-91、Z9Y-91、S432Y-32、S422Y-9 这 7 株酵母应用于下一轮黄水酯化试验筛选。

表 2 17 株酵母促进四大酯生成能力比较

Table 2 Comparison of promoted synthesis ability 4 esters with 17 yeasts

试验组 Experimental group	己酸乙酯 Ethyl hexanoate	乙酸乙酯 Ethyl acetate	乳酸乙酯 Ethyl lactate	丁酸乙酯 Ethyl butyrate
S432Y-42	3.87±0.21(4.7)**	7.24±1.32(1.5)**	4.05±0.06(1.1)	3.03±1.13(1.6)
H1Y-24	3.30±0.04(4.0)**	9.30±0.14(1.9)**	4.56±0.27(1.2)	4.37±0.11(2.4)**
H5Y-28	2.77±0.16(3.3)**	7.59±0.35(1.6)**	5.05±0.15(1.4)*	3.52±0.20(1.9)**
Z8Y-91	2.16±0.16(2.6)**	6.40±0.73(1.3)	4.73±0.26(1.3)	2.78±0.29(1.5)
W8Y-18	2.03±0.25(2.4)**	8.36±0.17(1.8)**	5.08±0.35(1.4)*	3.16±0.23(1.7)*
S432Y-32	1.92±0.77(2.3)**	6.67±0.96(1.4)*	4.54±0.21(1.2)	2.99±0.74(1.6)
S422Y-9	1.78±0.58(2.1)*	6.69±0.52(1.4)*	3.92±0.62(1.1)	2.94±0.55(1.6)
Z8Y-15	1.73±0.26(2.1)*	5.72±0.23(1.2)	3.36±0.88(0.9)	2.88±0.33(1.6)
Z9Y-91	1.64±0.48(2.0)*	7.48±0.27(1.5)**	3.98±0.56(1.1)	2.85±0.65(1.5)
S433Y-12	1.57±0.41(1.9)	6.90±0.65(1.4)**	3.76±0.44(1.0)	2.89±0.64(1.6)
H9Y-16	1.56±0.14(1.9)	6.36±0.64(1.3)	4.33±0.30(1.2)	2.45±0.21(1.3)
S532Y-32	1.39±0.29(1.7)	5.97±0.52(1.2)	3.77±0.61(1.0)	2.54±0.49(1.4)
S433Y-15	1.17±0.12(1.4)	6.50±0.48(1.3)*	3.85±0.65(1.0)	2.39±0.22(1.3)
Z4Y-31	1.13±0.08(1.4)	6.87±0.70(1.4)**	3.61±0.53(0.9)	2.45±0.09(1.3)
S442Y-9	1.07±0.22(1.3)	6.12±0.15(1.3)	2.99±0.47(0.8)	2.33±0.35(1.3)
S622Y-24	1.02±0.24(1.2)	5.65±0.90(1.2)	3.50±0.67(0.9)	2.19±0.24(1.2)
H6Y-19	0.65±0.11(0.8)	6.36±1.23(1.3)	3.53±0.80(0.9)	2.58±0.60(1.4)
空白对照 Blank control	0.83±0.14(1.0)	4.81±0.20(1.0)	3.71±0.20(1.0)	1.84±0.25(1.0)

注:括号内数据为试验组与空白组的比值;\*表示与空白组差异显著( $P<0.05$ ),\*\*表示与空白组差异极显著( $P<0.01$ )

Note: The data in brackets are the ratio of the experimental group and the blank group. \* indicates significant difference with blank control ( $P<0.05$ ), and \*\* indicates extremely difference with blank control ( $P<0.01$ )

**2.2 7 株酵母应用于黄水酯化复筛** 由表 3 可知,7 株酵母对黄水中己酸乙酯合成能力,仅有 2 株与黄水对照呈极显著差异,其中 H1Y-24 效果最好,H1Y-24 在黄水中己酸乙酯合成量是黄水对照 7.0 倍,另外还有 1 株酵母(S422Y-9)甚至低于黄水对照,有 3 株酵母(Z9Y-91、S432Y-32、S422Y-9)己酸乙酯合成量均低于麸皮对照,这与初筛结果不一致,说明在黄水反应体系中,反应更复杂,且酵母菌株对合成己酸

乙酯能力的差异性更大。这可能由于酵母是通过菌体生长过程中代谢产生的酶发生作用,而通过在麸皮上的培养和烘干,菌体可能衰老甚至死亡,在黄水中起作用的活菌较少,导致酶活低<sup>[8]</sup>。

与黄水对照相比,7 株酵母中仅有 H1Y-24、Z8Y-15、Z8Y-91 酵母促进乙酸乙酯能力优于其他菌株,而且提高倍数也明显低于混酸醇水溶液酯化体系,这与在混酸醇水溶液

的试验结果差异较大,可能由于黄水本身成分复杂,且其中酸性物质多,影响了供试菌株的产酯能力,从侧面反映出白酒酿造的复杂性。

黄水中乳酸乙酯含量极高,与黄水对照相比,有3株酵母(H1Y-24、Z9Y-91、S432Y-32)能降低黄水中的乳酸乙酯,但都不显著。7株酵母中都能提高丁酸乙酯含量,且有1株(H1Y-24)达差异极显著,说明此菌促进丁酸乙酯合成具有一定的应用前景。

在浓香型白酒中,酯是主要的香味物质,其中四大酯占

总酯98%以上,它们含量及比例对白酒风味起着决定性作用<sup>[9]</sup>。通常,五粮液四大酯量比关系为己酸乙酯:乙酸乙酯:乳酸乙酯:丁酸乙酯=1:0.4~0.5:0.4~0.5:0.13<sup>[10]</sup>。从黄水中四大酯的比例关系看出,黄水对照中乳酸乙酯非常高,为己酸乙酯49.6倍。通过酵母麸曲的处理,H1Y-24、S432Y-42酵母能显著提高己酸乙酯含量,降低了乳酸乙酯含量,说明这些菌株通过增加己酸乙酯含量可改善黄水的四大酯比例,使其量比向协调方向发展,具有较好的应用效果。

表3 7株酵母对黄水中四大酯的影响

Table 3 Synthesis ability comparison of 7 yeasts to 4 esters in yellow serofluid

mg/L

试验组 Experimental group	己酸乙酯 Ethyl hexanoate	乙酸乙酯 Ethyl acetate	乳酸乙酯 Ethyl lactate	丁酸乙酯 Ethyl butyrate
H1Y-24	5.38±5.21**	1.26±2.79	34.39±13.20	1.35±0.28**
S432Y-42	3.08±2.14**	0.98±0.87	37.04±11.25	0.47±0.54
Z8Y-15	1.61±0.98	1.24±0.05	38.30±15.95	0.30±0.68
Z8Y-91	1.96±2.11	1.17±0.87	39.25±10.44	0.25±0.15
Z9Y-91	0.94±0.99	0.84±0.24	34.71±11.99	0.14±0.57
S432Y-32	0.81±0.15	0.90±1.64	36.87±10.38	0.18±0.39
S422Y-9	0.73±0.32	0.63±0.45	38.76±7.98	0.16±0.71
麸皮对照 Bran control	1.28±0.34	0.82±0.75	37.12±11.87	0.14±0.10
黄水对照 Yellow water control	0.76±0.37	0.97±0.47	37.72±13.26	0.13±0.16

注:\*表示与黄水对照差异显著( $P<0.05$ ),\*\*表示与黄水对照差异极显著( $P<0.01$ )

Note:\* indicates significant difference with yellow water control ( $P<0.05$ ),and \*\* indicates extremely significant difference with yellow water control ( $P<0.01$ )

### 3 结论

该研究先通过改良酸醇酯化体系,评价了17株酵母的四大酯合成能力,再将筛选得到的7株酵母应用于黄水酯化,得到如下结论:

(1)通过在2种酯化体系中比较发现,供试菌株合成四大酯的能力趋势基本一致,表明采用改良的酸醇酯化体系对酵母麸曲进行酯化力测定具有可行性,且可同时考察四大酯合成能力,较以往以己酸乙酯含量为指标更全面、科学。

(2)7株酵母在改良酸醇酯化体系中能显著提高己酸乙酯含量,但在黄水中仅有2株(H1Y-24、S432Y-42)能显著提高,这是由于黄水自身物质复杂,导致结果重现性差,也可能是酵母在麸皮上培养烘干,导致活菌体少,今后将对酵母的应用方式等参数作进一步研究。

(3)H1Y-24能显著提高黄水己酸乙酯含量,也能提高乙酸乙酯和丁酸乙酯含量,同时能降低黄水中乳酸乙酯含

量,使黄水四大酯量比关系向协调方向发展,表明该酵母具有一定的应用前景。

### 参考文献

- [1] 李可,范志刚,王俊芳,等.浓香型白酒发酵黄水中微生物群落结构解析[J].食品与生物技术学报,2015,34(11):1155-1161.
- [2] 李娟.黄浆水的综合开发利用[D].济南:山东轻工业学院,2012.
- [3] 陈帅,赵金松,郑佳,等.红曲与产酯酵母酯化黄水代谢物的特征[J].食品科学,2013,34(7):1-5.
- [4] 陈雪玲,王涛,游玲,等.复合菌剂制备强化大曲的应用研究[J].酿酒科技,2015(9):58-61,64.
- [5] 蒲春,胡沂淮,贾亚伟,等.产酯酵母的筛选及其发酵特性研究[J].酿酒科技,2013(3):47-49,53.
- [6] 赖登泽.浓香型白酒生产中“增己降乳”科学、合理性的研究[J].酿酒,2007,34(5):4-7.
- [7] 李志斌,李净.浓香型白酒中的重要物质——辛酸乙酯含量及其贡献分析[J].酿酒,2013,40(3):33-36.
- [8] 姜涛,任国军,杨玉珍,等.高酸高酯发酵液的制备[J].酿酒,2015,42(4):37-44.
- [9] 泸州老窖集团有限责任公司.泸型酒技艺大全[M].北京:中国轻工业出版社,2011:383.
- [10] 郗晔.红曲霉处理黄水的研究[J].酿酒,2015,42(5):25-27.
- [11] 徐林楠,张凯,胡红雪,等.基于Yaahp软件的铜陵市生态环境质量评价研究[J].可持续发展,2020,10(2):133-139.
- [12] 孔洋洋,韩海荣,康峰峰,等.莫莫格国家级自然保护区生态评价[J].浙江农林大学学报,2013,30(1):55-62.
- [13] 吴征镒.中国植被[M].北京:科学出版社,1980.
- [14] 熊清华,艾金森.高黎贡山研究文丛:第1卷:高黎贡山自然与生物多样性研究[M].北京:科学出版社,2006.
- [15] 王文杰,潘英姿,李雪.区域生态质量评价指标选择基础框架及其实现[J].中国环境监测,2001,17(5):17-21.
- [16] 柴勇,孟广涛,武力.高黎贡山自然保护区国家重点保护植物的组成特征及其资源保护[J].西部林业科学,2007,36(4):57-63.
- [17] 国家林业局.自然保护区自然生态质量评价技术规程:LY/T 1813—2009[S].北京:中国标准出版社,2009.
- [18] 张琰,张森.基于AHP法的董寨国家级自然保护区生态评价[J].广东农业科学,2012,39(6):145-148.
- [19] 徐丽.森林类自然保护区生态质量评价研究:以鼎湖山自然保护区为例[D].武汉:华中农业大学,2014.
- [20] 李崧,邱微,赵庆良,等.层次分析法应用于黑龙江省生态环境质量评价研究[J].环境科学,2006,27(5):1031-1034.
- [21] 鲁小波,马斌斌,陈晓颖,等.基于集对分析与AHP的自然保护区生态旅游健康度评价[J].西部林业科学,2015,44(1):129-134.

(上接第148页)