

大曲中产酯酶菌株的筛选、鉴定及其酯化黄水作用

龙俐伶¹, 雷学俊², 郑佳², 赵东^{1,2,*}, 罗惠波¹

(1.四川轻化工大学食品与酿酒工程学院, 四川 宜宾 643000; 2.宜宾五粮液股份有限公司, 四川 宜宾 644000)

摘要: 酯酶是催化醇酯化反应生产酯类物质的酶, 从高酯化力大曲中筛选出高产酯酶菌株, 结合形态学观察与分子生物技术进行鉴定, 对其中产酯酶能力最高的菌株进行耐受性分析, 并检测其于黄水发酵中对4大酯的影响效果。结果表明, 从大曲中分离出霉菌67株、细菌66株、酵母7株, 筛选出高产酯酶菌株6株, 其中以拟青霉(*Paecilomyces nostocoides*) DM100和塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*) ZM266酯化力最高, 分别为81.90 mg/(g·7d)与81.76 mg/(g·7d), 塔宾曲霉ZM266的生理耐受性和酯化黄水产酯能力强于拟青霉DM100, 其可耐受pH 3、乙醇体积分数8%、温度42℃的生长环境, 且在酯化黄水过程中对己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯与丁酸乙酯的含量均有显著提高作用。

关键词: 大曲; 酯化力; 霉菌; 筛选; 耐受性; 黄水。

Screening, Identification of Esterase-Producing Strains from Daqu and Their Esterification Effect on Huangshui

LONG Liling¹, LEI Xuejun², ZHENG Jia², ZHAO Dong^{1,2,*}, LUO Huibo¹

(1. School of Food and Liquor Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin 643000, China;

2. Wuliangye Yibin Co. Ltd., Yibin 644000, China)

Abstract: High esterase-producing strains were screened from Daqu with high esterification power and identified by morphological observation combined with molecular biological techniques. The strain with the highest esterase production was subjected to tolerance analysis, and its effects on the four major esters during Huangshui fermentation were determined. The results showed that 67 mold strains, 66 bacterial strains and 7 yeast strains were isolated from Daqu, and 6 high esterase-producing strains were screened. Among them, *Paecilomyces nostocoides* DM100 and *Aspergillus tubingensis* ZM266 exhibited the highest esterification power, reaching 81.90 and 81.76 mg/(g·7d), respectively. *A. tubingensis* ZM266 exhibited stronger tolerance and higher ester production capacity in the esterification of Huangshui than *P. nostocoides* DM100. It could grow under the stress conditions of pH 3, 8% (V/V) ethanol and 42℃, and significantly increased the contents of the four major esters (ethyl caproate, ethyl acetate, ethyl lactate, ethyl butyrate) during the esterification of Huangshui.

Keywords: Daqu; esterification power; mold; screening; tolerance; Huangshui

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.05.007

中图分类号: TS261.1

文献标志码: A

文章编号: 0254-5071 (2026) 05-0048-08

引文格式:

龙俐伶, 雷学俊, 郑佳, 等. 大曲中产酯酶菌株的筛选、鉴定及其酯化黄水作用[J]. 中国酿造, 2026, 45(5): 48-55.

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.05.007. <http://www.chinabrewing.net.cn>

LONG Liling, LEI Xuejun, ZHENG Jia, et al. Screening, identification of esterase-producing strains from Daqu and their esterification effect on Huangshui[J]. China Brewing, 2026, 45(5): 45-55. (in Chinese with English abstract) DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.05.007. <http://www.chinabrewing.net.cn>

收稿日期: 2025-10-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32372310); 四川省科技计划项目(2024ZHYS0030);

四川省科技教育联合基金重点项目(2024NSFSC1964);

酿酒生物技术及应用四川省重点实验室培育项目(NJ2024-PY-1*);

四川轻化工大学人才引进项目(2024RC10)

第一作者简介: 龙俐伶(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物技术与工程。E-mail: longliling0@163.com

*通信作者简介: 赵东(1964—), 男, 教授级高级工程师, 学士, 研究方向为白酒发酵。E-mail: zhaodong-wly@163.com

白酒的挥发性香味物质主要由酯^[1]、酸^[2]、醇^[3]、醛^[4]、酮^[5]、芳香族^[6]等类别组成,浓香型白酒的骨架香气主要包括4大酯,即己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯^[7],这些酯类物质是影响白酒质量的关键成分,而它们的产生又与微生物代谢产酯化酶有极大的相关性。白酒大曲是白酒酿造所需的发酵剂和生香剂,为白酒酿造提供了丰富的微生物、酶和风味物质^[8],因而,挖掘、分离大曲中高产酯化酶的菌种是提升白酒质量的重要手段。

黄水是白酒固态发酵过程中的副产物,其中富含大量的醇和有机酸^[9],它们是合成酯类物质的重要原料。酯酶(E.C.3.1.1.1)又称作羧酸酯酶,负责催化酯类物质的合成和分解,合成反应时,通过将羧基与醇羟基缩合生成酯类化合物和水^[10]。在大曲微生物中产酯酶菌株是很重要的一类微生物,它不仅能催化酯类和其他风味物质的生成,还可以与其他功能微生物协同反应,对白酒的品质起到重要作用^[11]。近年来,关于筛选产酯酵母、细菌的研究较多,如Zhao He等^[12]从大曲中筛选出高产己酸乙酯的假丝酵母用于强化大曲发酵;Maia等^[13]从自发酵甘蔗汁中筛选出一株产酯本土酵母用于葡萄汁发酵;陈聪等^[14]从大曲中筛选到一株产酯格氏乳球菌并观察其厌氧发酵产酯情况;Castro等^[15]筛选出一株产酯芽孢杆菌并提取其胞外酯酶。现有研究多聚焦于产酯酵母、细菌,而霉菌因筛选难度大、耐受性研究不充分,其在黄水酯化中的应用鲜有得到系统挖掘。

本研究从浓香、清香、酱香3种香型大曲中筛选出高酯化力大曲样品,进一步分离出高产酯酶菌株,通过形态特征观察与分子生物学鉴定确定菌种,选择酯化力最高的2株菌探究其生理耐受性并检测其于黄水发酵中的效果,旨在选择出一株适用于浓香型白酒黄水发酵的高产酯酶菌株。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

19个酱香型大曲样本(编号为J1~19)、14个浓香型大曲样本(编号为N1~14) 四川某酒厂;11个清香型大曲样本(编号为Q1~11) 山西某酒厂。

脂肪酶1(10 000 U/g) 夏盛(北京)生物科技有限公司;三丁酸甘油酯、聚乙烯醇(均为分析纯)、脂肪酶2(20 000 U/g) 上海麦克林生化科技有限公司;无水乙醇、正己酸、氢氧化钠、硫酸(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;NH₄H₂PO₄(分析纯) 成都市科隆化学品有限公司;MgSO₄·7H₂O、K₂HPO₄·3H₂O(均为分析纯) 西陇化工股份有限公司;(NH₄)₂SO₄、NaCl(均为分析纯) 上海阿拉丁生化

科技股份有限公司;琼脂粉(生化试剂) 北京奥博星生物技术有限责任公司;酵母浸粉(生化试剂) 安琪酵母股份有限公司;溴甲酚紫 上海源叶生物科技有限公司;橄榄油 中粮福临门食品营销有限公司;麸皮 宜宾市某饲料加工厂。

NB液体培养基^[16]:蛋白胨10 g/L、牛肉浸出粉3 g/L、氯化钠5 g/L, pH 7.2±0.2, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

YPD液体培养基^[17]:蛋白胨20 g/L、葡萄糖20 g/L、酵母浸粉10 g/L, pH 6.5±0.2, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

YPD固体培养基:YPD液体培养基、琼脂20 g/L, 自然pH值, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

PDA液体培养基^[18]:马铃薯200 g/L、葡萄糖20 g/L, pH 5.6±0.2, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

PDA固体培养基:PDA液体培养基、琼脂20 g/L, pH 5.6±0.2, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

NA固体培养基:NB液体培养基、琼脂20 g/L, 自然pH值, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

橄榄油筛选培养基^[19]:(NH₄)₂SO₄ 1 g/L、NH₄H₂PO₄ 1 g/L、NaCl 1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 1 g/L、橄榄油10 mL/L、酵母浸粉5 g/L、溴甲酚紫0.02 g/L、琼脂20 g/L, pH 7.5, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

三丁酸甘油酯筛选培养基^[20]:乳化液200 g/L(三丁酸甘油酯10%、3%聚乙烯醇溶液90%,磁力搅拌器搅拌30 min)、琼脂30 g/L, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

麸皮培养基^[21]:麸皮与蒸馏水1:1(V/V), 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

HVE-50高压蒸汽灭菌锅 日本HIRAYAMA株式会社;RP-140A干培两用箱 上海容威仪器有限公司;THZ-98C恒温振荡器 上海一恒科学仪器有限公司;ME104E/02电子天平、FE28 pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 高酯化力大曲样品的筛选

将大曲样品粉碎后,参考QB/T 4257—2011《酿酒大曲通用分析方法》^[22],称取一定量曲粉放入105 °C烘箱,烘干至质量恒定并计算水分含量,再精确称取相当于绝干量15 g的样品,测定其酯化力,单位为mg/(15 g·7 d)。

1.3.2 产酯酶菌株的初筛

准确称取2.0 g大曲样品粉末,加入18 mL无菌水混匀,室温振荡30 min,静置30 min后吸取上清液进行稀释,取稀释为10⁻⁶~10⁻³的曲液200 μL,均匀涂布于各筛选培养基平板上,各稀释度设置3个平行样,将筛选平板放置于恒温培养箱中培养(霉菌30 °C培养72 h,细菌37 °C培养48 h,酵母菌30 °C培养48 h)。从长好的平板上挑选不同的菌落,在筛选培养基平板上分离纯化至单菌落。

将霉菌接入橄榄油筛选培养基, 30℃恒温培养箱中培养5 d, 选取能使培养基由紫色变至黄色的菌株。

霉菌接入PDA液体培养基并置于30℃、细菌接入NB液体培养基并置于37℃, 酵母菌接入YPD液体培养基并置于30℃, 摇床180 r/min培养48 h。各菌株分别取1.5 mL菌液离心制得粗酶液, 将三丁酸甘油酯筛选培养基平板打孔, 注入0.1 mL粗酶液, 35℃培养2 d, 选取有透明圈的菌株。记录孔径直径(d), 透明圈直径(D), 根据 D/d 值初步判断其产酯酶能力。

1.3.3 高产酯酶菌株的复筛

将筛选得到的霉菌接种于麸皮培养基中, 筛选得到的细菌、酵母按1.3.2节的方法制得种子液, 吸取3 mL种子液接种于麸皮培养基中, 细菌37℃、霉菌与酵母菌30℃培养5 d, 称取相当于绝干量15 g的样品, 参考QB/T 4257—2011^[22], 酯化7 d后蒸馏, 取1 mL蒸馏液与10 μ L质量浓度为0.05 g/L的内标(4-辛醇)混合均匀, 采用气相色谱法检测其己酸乙酯含量, 进而计算麸曲酯化力, 单位为mg/(g·7d)。

色谱条件: DB-WAXUI气相毛细柱(60 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m), 进样口温度250℃, 载气为高纯氦气(He, >99.999%), 流速2 mL/min, 分流比5:1(V/V); 色谱柱升温程序: 40℃保持2 min, 以4℃/min升温至230℃, 保持5 min。氢火焰离子化检测器参数: 检测器温度220℃, 氢气流量30 mL/min; 空气流量300 mL/min; 氮气尾吹气流量25 mL/min^[23]。记录己酸乙酯和4-辛醇的峰面积, 以己酸乙酯的质量浓度为横坐标、己酸乙酯与4-辛醇的峰面积比为纵坐标, 绘制标准曲线得到线性回归方程, 将待测样品按相同方法处理后进样, 记录己酸乙酯与4-辛醇的峰面积比, 将测得的样品峰面积比代入标准曲线方程, 即可计算出样品中己酸乙酯的质量浓度。

1.3.4 高产酯酶菌株的形态学观察

将筛选得到的高产酯酶霉菌挑取少量菌丝, 点接到PDA培养基平板上, 30℃培养72 h, 观察菌落的大小、形状、颜色与菌丝状态; 将一滴无菌水滴在载玻片上, 用接种针挑取少量菌丝置于无菌水中, 盖上盖玻片, 用显微镜观察菌株的形态。

1.3.5 菌株的分子生物学鉴定

对所筛菌株进行分子生物学鉴定, 用Ezup柱式真菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株的基因组DNA, 将提取所得DNA为模板, 以真菌引物NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')与NS6(5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3')进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增。PCR扩增体系: 模板0.5 μ L、10 $\times$ Buffer 2.5 μ L、dNTP 1 μ L、酶0.2 μ L、引物各0.5 μ L, 加双蒸水至25 μ L。PCR

扩增条件: 94℃预变性4 min; 94℃变性45 s, 55℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 共30个循环; 72℃修复延伸10 min; 4℃终止反应。PCR扩增产物采用1%琼脂糖凝胶电泳, 150 V、100 mA条件下电泳20 min后观察条带, 样品委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 将测序结果提交至NCBI的GenBank数据库进行同源性比对, 选择与待测菌株18S rDNA相似度高的基因序列, 使用MEGA 11.0软件, 采用邻接法构建系统进化树。

1.3.6 菌株DM100与ZM266耐受性检测

将浓度为 10^7 CFU/mL的菌株DM100、ZM266孢子悬液按1%的接种量接入50 mL PDA液体培养基中, 设置初始条件为pH 6、乙醇体积分数0%、温度30℃, 分别置于不同的pH值(3、4、5、6、7、8、9)、乙醇体积分数(0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%)、温度(24、27、30、33、36、39、42℃)条件下, 摇床180 r/min培养60 h, 测定菌丝体干质量, 探究菌株pH值、乙醇和温度耐受性^[24]。

1.3.7 DM100与ZM266对黄水中4大酯的影响

将浓度为 10^7 CFU/mL的菌株ZM266与DM100孢子液按5%的接种量接入麸皮培养基中, 设置空白组麸皮不接种, 在30℃条件下恒温培养5 d, 每隔12 h摇瓶将结块摇碎, 制成麸曲并测定麸曲酯化力。取50 mL黄水与体积分数50%的乙醇1:1混合均匀, 分别加入10 g麸曲样品或与麸曲酯化力大致相当的脂肪酶, 置于35℃恒温培养箱中7 d。参考1.3.3节中的方法蒸馏得到50 mL馏出液。采用气相色谱法检测馏出液中4大酯的含量, 以顶空进样方式, 顶空条件参考文献[25], 色谱条件参考文献[26]。

1.4 数据处理

使用Excel 2024对数据进行统计分析处理, 使用OriginPro 2025软件绘图。

2 结果与分析

2.1 高产酯化力大曲的初筛

酯化力是大曲质量评估的核心指标之一, 直接影响产酯功能微生物的筛选效率。酯化力越高的大曲, 越易分离获得高产酯能力菌株。王琳等^[27]监控中高温大曲发酵过程中酯化力最高约200 U; 王玉荣等^[28]检测到南阳地区中高温大曲酯化力为410.08 U, 本研究采用高酯化力、多香型定向筛选策略, 对不同香型大曲的酯化力进行系统测定。由图1可知, 清香型大曲Q5、Q6、Q7及浓香型大曲N3、N6、N7、N9、N12、N13酯化力大于600 U。因此选择这9个大曲进行后续实验。

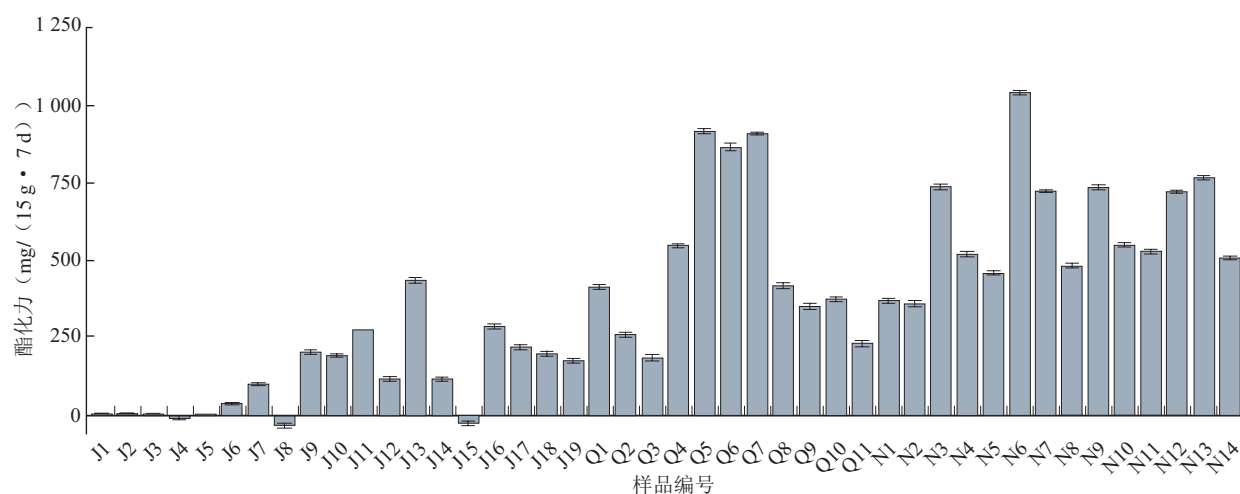


图1 大曲酯化力测定结果

Fig. 1 Determination results of esterification power of Daqu

2.2 产酯酶菌株初筛

从3个清香型大曲样品和6个浓香型大曲样品中初筛得到具有产酯能力的菌株140株,其中霉菌67株、细菌66株、酵母7株,采用三丁酸甘油酯平板打孔法对霉菌、细菌、酵母的产酯酶能力进一步筛选,因霉菌培养液离心所得的酶液几乎不产生透明圈,只以透明圈比值(D/d)为评价指标(图2)筛选细菌、酵母,最终筛选出 D/d 值大于2.5的优势菌株:细菌27株、酵母3株以及全部霉菌,进行下一步实验。

2.3 高酯化菌株的复筛

参考现有报道^[29-30],本研究设定酯化力高于60 mg/(g·7d)为复筛阈值,对67株霉菌及 D/d 值较高的3株酵母及27株细菌进行产酯能力测定。由图3可知,共有6株菌株(DM17、DM18、DM20、DM100、ZM159、ZM266)的酯化力满足要求,其中菌株ZM266与DM100的酯化力最高,分别达81.76 mg/(g·7d)与81.90 mg/(g·7d),显著高于何夷敏等^[31]筛选的分支横梗霉(44.51 mg/(g·7d))。

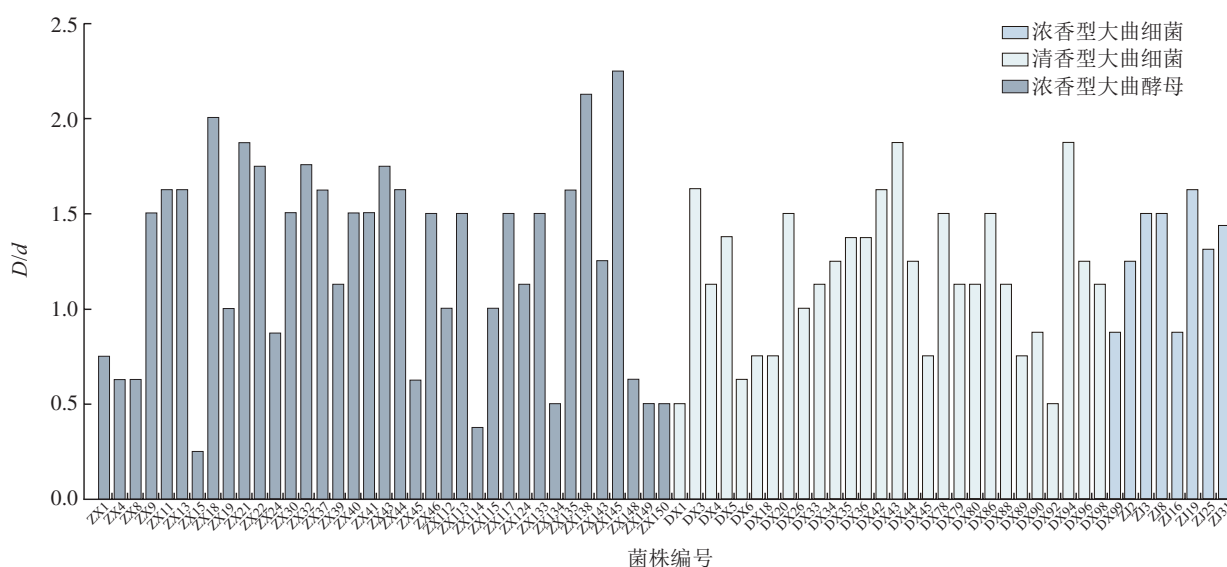
图2 清香型、浓香型大曲中具有产酯酶能力的细菌及酵母 D/d

Fig. 2 Ratios of transparent zones of esterase-producing bacteria and yeasts in light- and strong-aroma Daqu and pore well

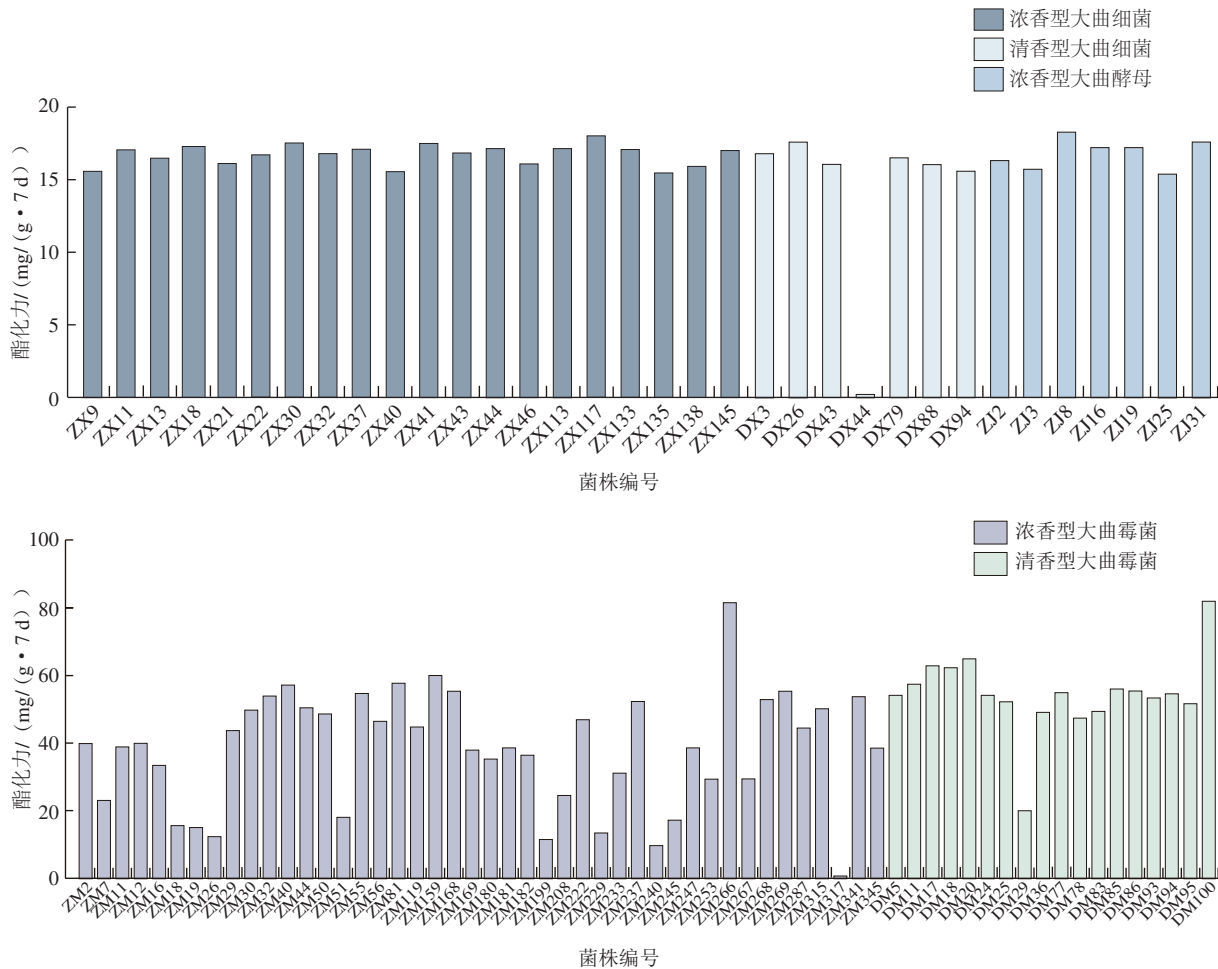
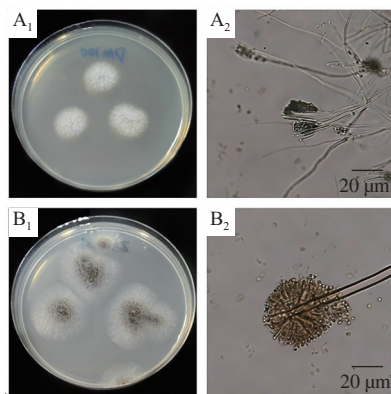


图3 菌株酯化力测定结果

Fig. 3 Determination results of esterification power of strains

2.4 菌株的形态学观察



下标1.菌落形态; 下标2.菌株形态。

图4 菌株ZM266 (A) 与DM100 (B) 菌落形态观察及光学显微镜形态观察

Fig. 4 Colony morphology and optical microscope morphology of strains ZM266 (A) and DM100 (B)

由图4可知, 菌株DM100菌落直径约为2.0 cm, 呈白色茸状, 菌落中心下方为青色, 生长较缓慢;

在显微镜下呈扫帚状, 菌丝细且有隔, 有大量不规则分枝, 具有瓶状的产孢细瓶梗, 底端无色头部呈黑褐色。菌株ZM266菌落直径为3.2 cm, 周围白中间黑, 随着培养时间增长黑色范围逐渐扩大至整个菌落, 黑色区域呈粉末状; 在显微镜下菌丝透明无隔, 其顶囊为球型, 孢子梗顶端呈放射状, 梗上有成串孢子, 孢子为褐色球状。可以基本判断菌株ZM266为曲霉属 (*Aspergillus*)、DM100为青霉属 (*Penicillium*)。

2.5 高产酯酶菌株的分子生物学鉴定

基于18S rDNA序列构建系统发育树 (图5), 结合序列同源性分析对菌株进行鉴定。菌株DM100与 *Paecilomyces nostocoides* (PV739883.1) 相似度为100%, 鉴定为拟青霉 (*Paecilomyces nostocoides*); ZM266与 *Aspergillus tubingensis* (MT775458.1) 相似度为99%, 鉴定为塔宾曲霉 (*Aspergillus tubingensis*)。

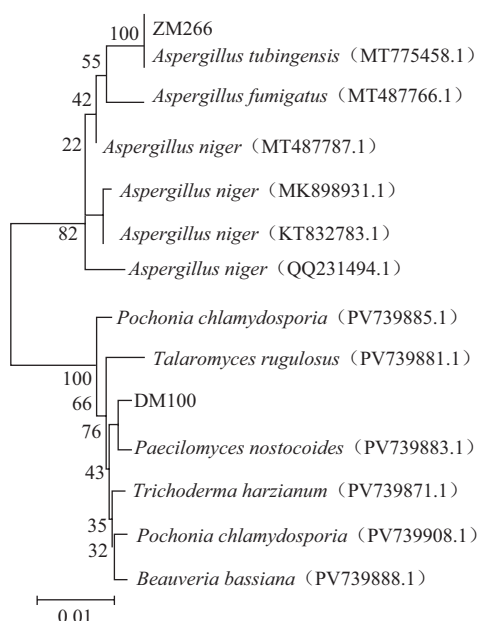


图5 基于18S rDNA序列2株高酯化力菌株的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic trees of two high esterification power strains based on 18S rDNA sequences

2.6 菌株DM100与ZM266的生理耐受性分析

2.6.1 pH值耐受性

在浓香型白酒发酵过程中,大曲pH值呈现先缓慢下降后逐步回升趋于平缓的趋势,范围在5~7.2之间^[32];酒醅pH值持续下降,大体维持在3.5~4.5的范围内^[33];黄水pH值变化较小,始终维持在3.5~4.0之间^[34]。因此,pH值在3~7的范围内生长良好的微生物更有利于浓香型白酒的发酵。由图6可知,随着pH值的升高,拟青霉DM100菌丝体干质量呈现先快速上升后平缓下降的趋势,在pH值为5时生长状况最好,菌丝体质量为 $(0.412\ 8 \pm 0.008\ 8)\text{ g}$,在pH值为3时受抑制情况严重但仍能生长,pH为6~9时生长受到轻微抑制,说明在pH值方面,相较于酒糟与黄水,拟青霉DM100更适合应用于浓香型白酒大曲强化发酵;随着pH值的升高,塔宾曲霉ZM266的菌丝体干质量缓慢增加,pH值为6时菌丝体干质量为 $(0.338\ 2 \pm 0.006\ 9)\text{ g}$,随着pH值的继续升高,菌丝体干质量缓慢减少,该菌的耐酸、碱性均较优,可以应用于浓香型白酒的大曲、酒糟发酵以及黄水酯化液的制作。

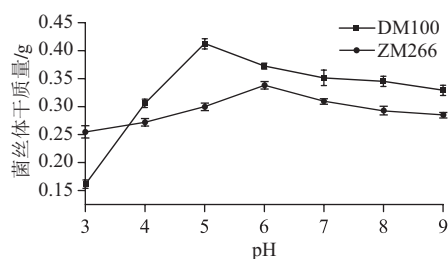


图6 拟青霉DM100与塔宾曲霉ZM266的pH值耐受性
Fig. 6 pH tolerance of *P. nostocoides* DM100 and *A. tubingensis* ZM266

2.6.2 乙醇耐受性

乙醇是白酒发酵过程中的重要产物,乙醇体积分数的高低对白酒的发酵有着直接的影响,高含量的乙醇环境会抑制霉菌的生长^[35],因此分析菌株对乙醇的耐受性对其后续应用具有指导意义。由图7可知,拟青霉DM100与塔宾曲霉ZM266的菌丝体干质量都随着乙醇含量的增多而降低,生长状况逐渐受到抑制,拟青霉DM100在乙醇体积分数为2%时生长受到较小的抑制,当培养液中乙醇体积分数增加至4%时其生长状况受到强烈的抑制,但依旧可以生长,乙醇含量继续增加后,几乎不生长;在培养液中加入乙醇后,塔宾曲霉ZM266的生长受到抑制,在乙醇体积分数为8%时其耐受性明显减弱但仍有一定的生长能力,当乙醇体积分数增加至10%时该菌株几乎不再生长。塔宾曲霉ZM266的乙醇耐受性高于何夷敏等^[31]筛选到的一株最高耐受乙醇体积分数为6%的分支横梗霉,相较于对乙醇耐受性较低的拟青霉DM100,更适合应用于浓香型白酒的发酵。

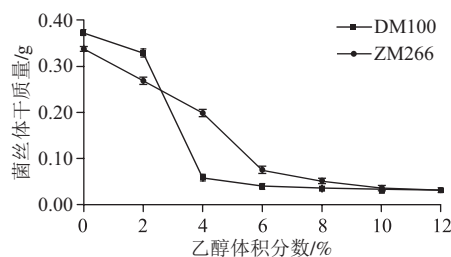


图7 拟青霉DM100与塔宾曲霉ZM266的乙醇耐受性
Fig. 7 Ethanol tolerance of *P. nostocoides* DM100 and *A. tubingensis* ZM266

2.6.3 温度耐受性

温度对浓香型白酒的发酵有着重要的影响。由图8可知,2株菌的最适生长温度均为33℃,在温度低于33℃时,拟青霉DM100的生长状况明显优于塔宾曲霉ZM266,说明拟青霉DM100对低温的耐受性更好;在温度高于33℃后,随着温度的持续上升,与塔宾曲霉ZM266的菌丝体干质量下降较平缓不同,拟青霉DM100的菌丝体干质量的下降趋势更陡,但在42℃时依旧能生长,说明拟青霉DM100对高温具有一定的耐受性,但塔宾曲霉ZM266对高温的耐受性更优,更适合应用于浓香型大曲的发酵,符合拟青霉DM100筛选自清香型大曲,塔宾曲霉ZM266筛选自浓香型大曲。在酒醅发酵过程中温度呈现先快速上升后平缓下降的趋势,温度范围为20.45~33.97℃^[36],在该范围内2株菌都能良好生长。

基于拟青霉DM100和塔宾曲霉ZM266对pH值、乙醇与温度耐受性的综合考量,推测塔宾曲霉ZM266更适用于浓香型白酒的发酵过程。

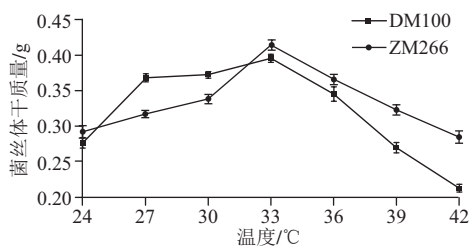


图8 拟青霉DM100与塔宾曲霉ZM266的温度耐受性
Fig. 8 Temperature tolerance of *P. nostocoides* DM100 and *A. tubingensis* ZM266

2.7 DM100与ZM266对黄水中4大酯的影响

黄水中的己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯是白酒风味的核心组分^[37], 浓香型白酒的品质与其己酸乙酯的含量密切相关^[38], 含量适宜时能赋予白酒纯正的窖香, 搭配乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯等形成协调的风味, 让酒质醇厚浓郁、绵甜悠长。由表1可知, 在促进己酸乙酯的酯化方面, 塔宾曲霉ZM266对己酸乙酯的合成作用达空白组的3.83倍, 高于拟青霉DM100, 2株菌的促进效果皆高于市售脂肪酶1、脂肪酶2。推测黄水体低 pH值、高复杂性抑制了拟青霉DM100的菌体生长以及市售脂肪酶的活性, 导致产己酸乙酯效能下降。

表1 拟青霉DM100与塔宾曲霉ZM266对黄水中4大酯含量的影响
Table 1 Effects of *P. nostocoides* DM100 and *A. tubingensis* ZM266 on the contents of four major esters in Huangshui

样品编号	mg/100 mL			
	己酸乙酯	乙酸乙酯	乳酸乙酯	丁酸乙酯
DM100	3.93±0.22**	93.02±0.97**	104.36±1.12**	0.81±0.14**
ZM266	6.86±0.24**	78.10±1.21**	122.6±0.48**	3.16±0.30**
市售脂肪酶1	2.77±0.14**	27.19±0.45**	104.02±0.38**	0.43±0.06
市售脂肪酶2	2.73±0.14**	24.85±0.10**	103.43±0.54**	0.00**
空白	1.79±0.17	29.79±1.41	113.33±0.88	0.45±0.09

注: *与空白组差异显著 ($P<0.05$), **与空白组差异极显著 ($P<0.01$)。

乙酸乙酯是清香型白酒的主体香气成分^[39], 赋予白酒苹果香味。拟青霉DM100与塔宾曲霉ZM266对乙酸乙酯都有显著提高效果, 分别为空白组的3.12倍和2.62倍, 市售脂肪酶则是对乙酸乙酯的合成有显著抑制作用。

乳酸乙酯在米香型白酒中含量最高, 能使酒体醇厚绵长, 其与乙酸乙酯的比例决定了白酒的绵甜度^[40]。在乳酸乙酯的合成上塔宾曲霉ZM266有显著提升效果, 而拟青霉DM100则有着显著抑制的作用。酯化反应是一种可逆反应, 酯化酶既能催化乳酸与乙醇合成乳酸乙酯, 也能催化乳酸乙酯反向水解, 推测2株菌产生的酯化酶种类、活性与催化作用不同, 拟青霉DM100产生的酯化酶与市售脂肪酶促进了乳酸乙酯的水解, 导致黄水中乳酸乙酯的含量下降。

丁酸乙酯是浓香型白酒等酒品中不可或缺的香气成分^[41], 赋予白酒窖泥香与菠萝香味。塔宾曲霉ZM266对

丁酸乙酯的提升效果可以达到7.02倍, 显著高于拟青霉DM100, 市售脂肪酶1对丁酸乙酯的含量几乎无影响, 市售脂肪酶2催化的黄水发酵液中未检测出丁酸乙酯, 说明在黄水体系中, 塔宾曲霉ZM266产生能促进丁酸乙酯生成的酯化酶含量与活力远高于拟青霉DM100与市售脂肪酶。

综上所述, 塔宾曲霉ZM266对己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯与丁酸乙酯的含量皆有显著的提升效果, 更适用于黄水的发酵。

3 结论

本研究从大曲中分离出具有产酯化酶能力的霉菌67株、细菌66株、酵母7株, 从中筛选出酯化能力高于60 mg/(g·7 d)的霉菌6株, 其中酯化力最高的是ZM266与DM100, 分别为81.76 mg/(g·7 d)与81.90 mg/(g·7 d)。通过分子生物技术鉴定菌株ZM266为塔宾曲霉 (*Aspergillus tubingensis*), 菌株DM100为拟青霉 (*Paecilomyces nostocoides*)。通过耐受性分析得出塔宾曲霉ZM266可以在pH值为3、乙醇体积分数8%、温度42 °C的环境生长, 具有良好的耐受性, 在黄水发酵中, 塔宾曲霉ZM266对己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯的含量皆有显著提高效果, 较拟青霉DM100更适合应用于黄水的发酵。本研究仅进行了摇瓶水平的黄水酯化实验, 后续可开展发酵罐放大实验, 优化塔宾曲霉ZM266的应用工艺; 同时可深入研究其酯酶的分离纯化与酶学性质, 为酶制剂的开发提供依据。

参考文献:

- [1] 王玉荣, 侯强川, 田龙新, 等. 基于纯培养和超高深宏基因组测序技术分析茅台镇两企业高温大曲微生物多样性差异[J]. 食品科学, 2024, 45(4): 108-115.
- [2] 张倩, 谢正敏, 郑佳, 等. 白酒中乙醇 $\delta^{13}\text{C}$ 、己酸 $\delta^{13}\text{C}$ 和己酸乙酯 $\delta^{13}\text{C}$ 的相关性研究[J]. 中国酿造, 2025, 44(8): 286-292.
- [3] WEI J, DU H, XU Y. Revealing the key microorganisms producing higher alcohols and their assembly processes during Jiang-flavor Baijiu fermentation[J]. Food Biosci, 2024, 61: 104569.
- [4] DAI W, TAN W, CHEN X, et al. Why aging matters: acetaldehyde-acetal interconversion in Baijiu[J]. J Food Compos Anal, 2025, 148(P1): 108222.
- [5] WU M, YANG Q, ZHANG J, et al. A simple and efficient strategy for visible aldehydes and ketones detection and its application in Baijiu grade discrimination[J]. Food Chem, 2025, 496(Pt3): 146850.
- [6] 聂元皓, 徐岩, 吴群, 等. 芳香族化合物前体物质酪氨酸和苯丙氨酸在白酒中的来源解析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 1-6.
- [7] XU Y, REN C, WANG H, et al. Composition, succession and key species of microbiota in strong aroma-type Baijiu production [M]// XU Y. Science and engineering of chinese liquor (Baijiu): microbiology, chemistry and process technology. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023: 473-501.

- [8] 张清玫, 赵鑫锐, 李江华, 等. 不同香型白酒大曲微生物群落及其与风味的相关性[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 1-8.
- [9] 曾波, 郑佳, 冯政, 等. 浓香型白酒发酵过程中黄水细菌群落结构的演替规律[J]. 中国食品学报, 2024, 24(11): 300-309.
- [10] 薛正莲, 刘阳, 王洲, 等. 基因组改组选育产酯化酶地衣芽孢杆菌[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(8): 43-48.
- [11] WANG X, DU H, ZHANG Y, et al. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during Chinese liquor fermentation [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 84: e02369-17.
- [12] ZHAO H, DU B, ZHAO P, et al. Analysis of ester-producing performance in high-yield ethyl hexanoate yeast and the effect on metabolites in bio-enhanced Daqu, the starter for Baijiu and other traditional fermented foods[J]. J Appl Microbiol, 2024, 135(4): lxae081.
- [13] MAIA L, FELIZARDO L, BARROS D C M, et al. Unveiling the influence of autochthonous yeasts selected from spontaneous fermentation of cachaça on ethanol, ester and fermentation kinetics[J]. Antonie Leeuwenhoek, 2025, 118(8): 104.
- [14] 陈聪, 邹伟, 汤秀娟, 等. 产酯酶格氏乳球菌的筛选、鉴定与基因组注释[J]. 食品科学, 2024, 45(8): 87-95.
- [15] CASTRO G R, STETTLER A O, FERRERO M A, et al. Selection of an extracellular esterase-producing microorganism[J]. J Ind Microbiol, 1992, 10(3/4): 165-168.
- [16] 胡昊. 基于代谢组学和基因组信息的食源性致病菌差异代谢物研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.
- [17] 樊杰, 王燕, 韩慧娟, 等. 不同马克思克鲁维酵母菌株对低醇山楂酒品质的影响[J]. 中国酿造, 2025, 44(12): 195-202.
- [18] 张双双, 陈亮, 许茜茜, 等. 储藏小麦中草酸青霉的分离鉴定及其侵染防控[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(4): 49-53; 79.
- [19] 姚璐晔, 陆嘉虞, 田雨森, 等. 脂肪酶产生菌贝莱斯芽孢杆菌LT-2筛选及产酶条件优化[J]. 生物技术, 2025, 35(3): 304-312; 337.
- [20] 颜丽. 高活力酯化菌株的筛选与优化研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2020.
- [21] 苏凤, 卫春会, 曾波, 等. 中高温大曲中红曲霉的筛选及应用[J]. 食品与机械, 2024, 40(5): 203-209.
- [22] 工业和信息化部. 酿酒大曲通用分析方法: QB/T 4572—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [23] 陈乔, 李侯珠, 赵佳迪. 不同固相微萃取萃取头在浓香型白酒风味分析的对比研究[J]. 酿酒科技, 2022(2): 41-46; 50.
- [24] 倪海斌. 藏曲功能微生物筛选及其应用[D]. 宜宾: 四川轻化工大学, 2022.
- [25] 陈雪玲, 兰小艳, 廖诚, 等. 基于黄水酯化产酯酵母的筛选[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(21): 174-176.
- [26] 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.
- [27] 王琳, 彭黎, 吴华星, 等. 中高温大曲发酵过程理化指标与功能菌属动态分析[J]. 食品与发酵工业, 2026, 52(6): 17-23.
- [28] 王玉荣, 张建辉, 张凯, 等. 泸州和南阳地区中温大曲真菌群落结构和理化品质的差异性及相关性分析[J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 186-195.
- [29] 刘小改, 李洪媛, 周林艳, 等. 清香型大曲中产香细菌的分离筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2022, 41(5): 96-100.
- [30] 郭晋田, 荆旭, 张丽, 等. 响应面法优化红曲霉高产酯化酶发酵工艺[J]. 中国酿造, 2020, 39(2): 73-77.
- [31] 何夷敏, 牟飞燕, 张维, 等. 清香型白酒大曲中产酶产香霉菌的筛选、鉴定及耐受性研究[J]. 中国酿造, 2024, 43(11): 58-63.
- [32] 陈莹琪. 浓香型大曲制曲过程中微生物菌群结构及功能变化[D]. 宜宾: 四川轻化工大学, 2022.
- [33] 文悦, 张宿义, 宋攀, 等. 浓香型白酒酒醅发酵过程中微生物群落阶段性演替规律及形成机理[J]. 食品科学, 2025, 46(19): 144-157.
- [34] 梅漫莉, 王艳丽, 何宏魁, 等. 浓香型白酒酿造过程中黄浆水理化指标和风味物质的变化规律[J]. 中国酿造, 2024, 43(7): 104-109.
- [35] 刘茗铭, 周阳子, 袁乐梅, 等. 酒曲中高产糖化酶霉菌的筛选及其固态发酵产酶条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 118-123.
- [36] 高俊杰. 浓香型酒醅发酵过程中挥发性风味物质及细菌菌群结构的动态变化研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2023.
- [37] 王子豪, 黄平, 郑佳, 等. 白酒酿造副产物黄水研究现状及综合利用研究进展[J]. 中国酿造, 2023, 42(4): 20-28.
- [38] 李俊辉, 刘英杰, 隋丽娜, 等. 浓香型白酒增加己酸乙酯降低乳酸乙酯的研究进展[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 1-4.
- [39] 段如敏, 殷沛沛, 王磊, 等. 清香型大曲中高产乙酸乙酯酿酒酵母的筛选及其对烟叶提取液发酵影响的研究[J]. 食品与发酵科技, 2025, 61(3): 1-9.
- [40] 胡景辉, 常强, 蒋超, 等. 浓香白酒绵甜感官与风味构成相关性研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(21): 68-72; 78.
- [41] 胡淑琳, 成雯雯, 张义丹, 等. 代谢工程优化酿酒酵母合成丁酸乙酯的研究[J]. 食品与发酵工业, 2026, 52(3): 37-46.