DOI:10.12441/spyswjs.20240411002 [文章编号] 1673-1689(2025)11-0150-09

解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 产己酸发酵培养基优化

甘广东[1] 张春林[1] 黄 婷[1] 何珺珺[1*] 蒲 春[2] 时 伟[1] 彭铭烨[1] 赵腾飞[1]

(1. 茅台学院酿酒工程系,贵州 仁怀 564500; 2. 江苏洋河酒厂股份有限公司,江苏 宿迁 223800)

摘要:【目的】提高解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 的己酸产量。**【方法】**采用 Plackett-Burman 试验从 8 种培养基成分中筛选出影响己酸产量的显著因素;通过最陡爬坡试验确定显著因素的最佳水平范围;利用 Box-Behnken 试验建立二次多项式回归模型,并对显著因素的交互作用进行分析,预测最优培养基组合。**【结果】**Plackett-Burman 试验筛选出乙酸钠质量浓度、四氢叶酸钙质量浓度和乙醇体积分数为显著影响因素。Box-Behnken 试验建立的回归模型极显著(P<0.01),模型预测的最佳培养基组合为:蔗糖质量浓度 7.50 g/L、酵母膏质量浓度 1.00 g/L、七水硫酸镁质量浓度 0.20 g/L、乙酸钠质量浓度 4.08 g/L、硫酸铵质量浓度 0.45 g/L、四氢叶酸钙质量浓度 2.88 mg/L、磷酸氢二钾质量浓度 0.60 g/L、乙醇体积分数 2.53%,该条件下发酵液中实测己酸质量浓度与模型预测值高度吻合,较优化前提高了 212.47%。**【结论】**作者成功优化了解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 产己酸的发酵培养基。优化后的培养基能显著提升己酸产量,为该菌株在白酒酿造中的实际应用提供了理论依据和技术参考。

关键词:解硫氨酸芽孢杆菌;己酸;发酵;培养基优化;乙酸钠;四氢叶酸钙;乙醇

Optimization of the Fermentation Medium of *Aneurinibacillus* JXN-1 for Caproic Acid Production

GAN Guangdong[1] *ZHANG Chunlin*[1] *HUANG Ting*[1] *HE Junjun*[1*]
PU Chun[2] *SHI Wei*[1] *PENG Mingye*[1] *ZHAO Tengfei*[1]

(1. Department of Brewing Engineering, Moutai Institute, Renhuai 564500, China; 2. Yanghe Distillery Co., Ltd., Suqian 223800, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to increase the caproic acid yield of *Aneurinibacillus* JXN-1. [**Method**] First, a Plackett-Burman design was employed to screen the significant factors affecting caproic acid yield from eight medium components. Subsequently, the path of steepest ascent method was used to determine the optimal concentration ranges of these significant factors. Finally, a Box-Behnken design was utilized to establish a quadratic polynomial regression model, and the interactions among the significant factors were analyzed to predict the optimal medium composition. [**Result**] The Plackett-Burman design identified the mass concentrations of sodium acetate and calcium folinate and the volume fraction of ethanol as significant influencing factors. The regression model established by the Box-Behnken design was highly significant (P<0.01). The predicted optimal medium composition was as follows: sucrose mass concentration of 7.50 g/L, yeast extract mass concentration of 1.00 g/L, magnesium sulfate heptahydrate mass concentration of 0.20 g/L, sodium acetate mass concentration of 4.08 g/L, ammonium sulfate mass concentration of 0.45 g/L, calcium folinate mass concentration of 2.88 mg/L, dipotassium hydrogen phosphate mass concentration of 0.60 g/L, and ethanol volume fraction of 2.53%. Under these conditions, the actual caproic acid yield was in high agreement with the model predicted value, representing

基金项目:贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(KY 字[2020]226);茅台学院高层次人才科研启动经费项目(mygccrc[2022]033)。

通信作者:何珺珺(1986—),女,硕士,副教授,主要从事微生物发酵研究。E-mail:945081668@qq.com

收稿日期:2024-04-11 **修回日期:**2025-06-25

an increase of 212.47% compared with the pre-optimization level. [**Conclusion**] This study successfully optimizes the fermentation medium for caproic acid production by *Aneurinibacillus* JXN-1. The optimized medium significantly enhances the caproic acid yield, providing a theoretical basis and technical reference for the practical application of this strain in Baijiu brewing.

Keywords: *Aneurinibacillus*; caproic acid; fermentation; medium optimization; sodium acetate; calcium folinate; ethanol

石壁泥底是酱香型白酒生产容器，窖泥中微生物的种群和营养成分影响着传统酱香型白酒生产质量和风格的稳定性。有机酸主要由细菌生成，窖泥中微生物以细菌为主，栖息着大量的乙酸菌、丁酸菌[1-2]、己酸菌、乳酸菌等产酸细菌和硫酸盐还原菌、硝酸盐还原菌、甲烷菌等厌氧菌[3]。产己酸的细菌包括梭菌属（*Clostridium*）[4-5]、芽孢杆菌属（*Bacillus*）[6]、假单胞菌属（*Pseudomonas*）[7-8]等，其中芽孢杆菌属（*Bacillus*）为厌氧或兼性厌氧，梭菌属（*Clostridium*）和埃氏巨型球菌（*Megasphaera elsdenii*）为严格厌氧菌[9]，适合白酒生产的固态发酵环境。己酸代谢的前体物质主要为乙醇，乙醇氧化为乙酸，再经脂肪酸合成途径生成己酸[10-11]，但在延长羧酸链的过程中，短链羧酸（乙酸、丁酸、丙酸）和中链羧酸（己酸、辛酸）的积累会逐渐对细胞产生更大的毒性，使羧酸链的延长较为困难[12-13]，因此己酸菌发酵生成的己酸量普遍不高。己酸前体物质除了乙醇还有乳酸。Zhu 等[14]以浓香白酒生产副产物黄水为原料，富集驯化能利用黄水中乳酸生成己酸的菌群；Tao 等[15]从富集菌群中筛选出一株能转化乳酸生成己酸的细菌。

己酸是贡献窖底香的主要成分[16-17]，也是白酒中己酸乙酯[18]的主要来源。己酸乙酯赋予白酒醇厚的窖香香气，且由于其阈值低，可显著改善酒体由于发酵、蒸馏环节操作不当导致的寡淡、水味较重等缺点，增强酒体滋味与绵厚口感。因此，科研人员从多角度不断加大对白酒窖泥微生物的研究[19-21]，着重从窖泥[22]中筛选优质产己酸细菌[23-25]，确定其生理生化及代谢特性，以期用于酿酒生产中，改善窖池微环境，提高白酒中己酸及己酸乙酯含量，提升酒体质量。作者以从窖泥中筛选的产己酸解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 为研究对象，通过 Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验及 Box-Behnken 试验优化解硫胺素芽孢杆菌发酵产己酸的培养基。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1：茅台学院菌种保藏室；乙酸钠、七水硫酸镁、磷酸氢二钾、硫酸铜、硫酸、蔗糖、碳酸钙：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；乙醇、乙醚：分析纯，重庆川东化工（集团）有限公司；硫酸铵：分析纯，成都金山化学试剂有限公司；四氢叶酸钙：分析纯，上海沃凯药业有限公司；酵母膏：生化试剂，国药集团化学试剂有限公司。

解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 种子培养基：乙酸钠 5.00 g、酵母膏 1.00 g、磷酸氢二钾 0.40 g、七水硫酸镁 0.20 g、硫酸铵 0.50 g、蒸馏水 1 000 mL、碳酸钙 10.00 g，pH 6.80~7.40，121 ℃蒸汽灭菌 20 min 后加乙醇 20.0 mL。

解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 发酵培养基：蔗糖 5.00 g、乙酸钠 5.00 g、酵母膏 1.00 g、磷酸氢二钾 0.40 g、七水硫酸镁 0.20 g，硫酸铵 0.50 g，蒸馏水 1 000 mL，121 ℃蒸汽灭菌 20 min 后加乙醇 20.0 mL。

培养箱：DNP-9162 型，上海精宏实验设备有限公司；气相色谱仪：GC7890 型，安捷伦科技有限公司；旋转蒸发仪：RE-3000c 型，上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 发酵培养

将菌种 JXN-1 接入种子培养基中，37 ℃厌氧发酵 5 d；待菌种培养至对数生长期且菌液细胞数达到 10^7 mL^{-1} 以上时，按照 20 mL/100 mL 的接种量接入到发酵培养基中，37 ℃厌氧发酵 7 d。

1.2.2 发酵液中己酸提取与分析

取上清液用浓硫酸调节 pH 至 2~3，过 0.42 μm 滤膜，供色谱分析[26]。

GC 条件：柱子型号为 CP-WAX 57CB（规格 50 m 长、内径 0.25 mm、膜厚 0.2 mm）；初温 35 ℃，保持 6 min，以 4 ℃/min 升温至 75 ℃，保持 10 min，再以 25 ℃/min 升温至 175 ℃，保持 2 min，最后以 10 ℃/min 升温至 215 ℃，保持 24 min。分流比 35∶1，进样量 1 μL，载气为 N_2。内标共 3 个，分别为叔戊

醇、乙酸正戊酯和2-乙基正丁醇。

1.2.3 试验设计

1）Plackett-Burman试验：影响己酸生成的培养基成分较多，根据产己酸细菌的生长特性，在查阅文献资料的基础上选取8种培养基成分（因素）设计Plackett-Burman试验[27-29]。试验因素水平见表1。

表1 Plackett-Burman试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

因素	水平	
	−1	1
蔗糖质量浓度（*A*）/（g/L）	5.00	7.50
酵母膏质量浓度（*B*）/（g/L）	1.00	1.50
七水硫酸镁质量浓度（*C*）/（g/L）	0.20	0.30
乙酸钠质量浓度（*D*）/（g/L）	3.00	4.50
硫酸铵质量浓度（*E*）/（g/L）	0.30	0.45
四氢叶酸钙质量浓度（*F*）/（mg/L）	0.10	0.15
磷酸氢二钾质量浓度（*G*）/（g/L）	0.40	0.60
乙醇体积分数（*H*）/%	1.00	1.50

2）最陡爬坡试验：根据Plackett-Burman试验结果，确定显著影响因素之间的变量关系和最陡爬坡试验的方向与梯度，正效应因素按一定的梯度逐渐增加，负效应因素逐渐减少，分析每一组试验发酵液中己酸质量浓度，确定最优组合作为后续响应面试验的中心点[30-32]。

3）Box-Behnken试验：在Plackett-Burman试验和最陡爬坡试验基础上确定影响己酸生成的显著因素及其水平中心点，利用Design-Expert 8.0.6软件设计Box-Behnken试验[33-34]。

1.3 数据处理

利用Minitab软件处理Plackett-Burman试验和最陡爬坡试验数据，利用Design-Expert 8.0.6软件处理Box-Behnken试验数据。

2 结果与讨论

2.1 Plackett-Burman试验

Plackett-Burman试验结果见表2，各因素的方差与显著性分析见表3。8个因素影响排序依次为*F*（四氢叶酸钙质量浓度）、*H*（乙醇体积分数）、*D*（乙酸钠质量浓度）、*G*（磷酸氢二钾质量浓度）、*E*（硫酸铵质量浓度）、*C*（七水硫酸镁质量浓度）、*B*（酵母膏质量浓度）、*A*（蔗糖质量浓度），其中四氢叶酸钙质量浓度、乙醇体积分数和乙酸钠质量浓度对己酸生成影响极显著（$P<0.01$）。

表2 Plackett-Burman试验结果

Table 2 Plackett-Burman experimental results

试验号	因素								己酸质量浓度/（g/L）
	A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*G*	*H*	
1	1	−1	−1	−1	1	1	1	−1	6.68
2	1	1	−1	1	1	−1	1	−1	5.51
3	1	−1	1	1	−1	1	−1	−1	7.55
4	−1	1	1	−1	1	−1	−1	−1	4.23
5	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	−1	4.31
6	1	1	−1	1	−1	−1	−1	1	6.57
7	−1	−1	1	1	1	−1	1	1	6.80
8	−1	−1	−1	1	1	1	−1	1	8.89
9	−1	1	1	1	1	1	1	−1	8.10
10	−1	1	−1	−1	−1	1	1	1	8.32
11	1	1	1	−1	1	1	−1	1	8.25
12	1	−1	1	−1	−1	−1	1	1	6.32

表3 Plackett-Burman试验各因素的方差与显著性分析

Table 3 Variance and significance analysis of various factors in Plackett-Burman design

变量	自由度	调整平方和	调整均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	8	25.672 6	3.209 1	75.63	0.002 0	**
线性	8	25.672 6	3.209 1	75.63	0.002 0	**
A	1	0.004 4	0.004 4	0.10	0.770 0	
B	1	0.015 4	0.015 4	0.36	0.590 0	
C	1	0.078 4	0.078 4	1.85	0.270 0	
D	1	2.349 7	2.349 7	55.38	0.005 0	**
E	1	0.054 7	0.054 7	1.29	0.340 0	
F	1	16.450 2	16.450 2	387.70	0.000 0	**
G	1	0.310 4	0.310 4	7.32	0.073 0	
H	1	6.409 4	6.409 4	151.06	0.001 0	**
残余	3	0.127 3	0.042 4			
总和	11	25.799 9				

注：“*”表示差异显著（$P<0.05$）；“**”表示差异极显著（$P<0.01$）。

回归模型误差分析结果（表4）显示，预测$R^2=0.92$，表明相关性较好，试验结果的可信度较高。通过Minitab软件分析得到回归模型：$Y_1=6.79+0.019A+0.036B+0.081C+0.445D-0.068E+1.17F+0.16G+0.73H$。

由回归模型中各变量的系数可以看出，因素

表4 Plackett-Burman试验回归模型误差统计分析

Table 4 Error statistical analysis of regression equation in Plackett-Burman design

统计项目	值	统计项目	值
回归标准差	0.21	R^2	0.99
调整R^2	0.98	预测R^2	0.92

A、B、C、D、F、G、H均为正效应，因素E为负效应，3种显著影响因素D、F、H均为正效应。

2.2　最陡爬坡试验

根据Plackett-Burman试验结果，以四氢叶酸钙质量浓度、乙醇体积分数、乙酸钠质量浓度为试验因素设计中心点试验。试验因素水平设计见表5，试验结果见表6。

表5　中心点试验设计

Table 5　Central point experimental design

因素	实际值		中心点	编码值	
	低	高		低	高
乙酸钠质量浓度（X_1）/（g/L）	3.00	1.45	3.75	−1	1
四氢叶酸钙质量浓度（X_2）/（mg/L）	1.00	1.50	1.25	−1	1
乙醇体积分数（X_3）/%	1.00	1.50	1.25	−1	1

表6　中心点试验结果

Table 6　Central point experimental results

试验编号	因素			己酸质量浓度/（g/L）
	X_1	X_2	X_3	
1	3.00	1.00	1.50	7.27
2	4.50	1.00	1.50	7.70
3	3.75	1.25	1.25	7.76
4	4.50	1.50	1.00	8.17
5	4.50	1.50	1.50	8.86
6	3.00	1.50	1.50	8.70
7	3.75	1.25	1.25	7.75
8	3.75	1.25	1.25	7.80
9	4.50	1.00	1.00	6.72
10	3.00	1.00	1.00	6.22
11	3.00	1.50	1.00	7.75

由表7、8可知，模型与线性显著，乙酸钠质量浓度、四氢叶酸钙质量浓度、乙醇体积分数对己酸生成影响极显著（P<0.01），但2个因素之间交互作用不显著（P>0.05）；一阶模型弯曲显著（P<0.05），即中心点影响显著，可进一步开展响应面分析。回归模型为Y_2=−2.39+0.82X_1+4.63X_2+3.64X_3−0.23X_1X_2−0.22X_1X_3−0.78X_2X_3+0.096C_tP_t。

根据回归模型得坡度函数∇f=（δ1，δ2，δ3）=（0.82，4.63，3.64），当最速上升路径Δx_1^*=1时，Δx_2^*=5.67、Δx_3^*=4.44，以此比例实施最陡爬坡试验结果如表9所示。初步选取乙酸钠质量浓度4.05 g/L、四氢叶酸钙质量浓度2.96 mg/L、乙醇体积分数2.57%作为中心点位置。

表7　因素水平回归方差分析

Table 7　Analysis of variance of factor regression

来源	自由度	调整平方和	调整均方	F值	P值	显著性
模型	7	5.915	0.845	428.74	0.000 0	**
线性	3	5.847	1.949	988.88	0.000 0	**
X_1	1	0.285	0.285	144.62	0.001 0	**
X_2	1	3.878	3.878	1 967.75	0.000 0	**
X_3	1	1.684	1.684	854.26	0.000 0	**
2个因素之间交互作用	3	0.048	0.016	8.11	0.060 0	
X_1X_2	1	0.015	0.015	7.77	0.069 0	
X_1X_3	1	0.014	0.014	6.91	0.078 0	
X_2X_3	1	0.019	0.019	9.65	0.053 0	
弯曲	1	0.020	0.020	10.26	0.049 0	*
误差	3	0.006	0.002			
失拟	1	0.005	0.005	6.45	0.126 0	
纯误差	2	0.001	0.007			
合计	10	5.921				

注：“*”表示差异显著（P<0.05）；“**”表示差异极显著（P<0.01）。

表8　因素回归方差分析模型汇总

Table 8　Summary of analysis of variance of factor regression

项目	值	项目	值
回归标准差	0.044	调整R^2	0.99
R^2	0.99	预测R^2	0.95

表9　最陡爬坡试验结果

Table 9　Experimental results of the path of steepest ascent

试验步骤	编码值			实际值			己酸质量浓度/（g/L）
	x_1^*	x_2^*	x_3^*	x_1/（g/L）	x_2/（mg/L）	x_3/%	
原始水平	0	0	0	3.75	1.25	1.25	
Δ	1	5.67	4.44	0.10	0.57	0.44	
原始水平+1	1	5.67	4.44	3.85	1.82	1.69	9.87
原始水平+2	2	11.34	8.88	3.95	2.39	2.13	11.84
原始水平+3	3	17.01	13.32	4.05	2.96	2.57	12.96
原始水平+4	4	22.68	17.76	4.15	3.53	3.01	12.16

2.3　Box-Behnken试验

2.3.1　方差分析与回归模型的建立

试验因素水平见表10，试验结果见表11。

由表12可知，一次项X_1、X_2、X_3，二次项X_1^2、X_2^2、X_3^2，以及交互项X_1X_2的P值<0.01，影响极显著。利用Design-Expert 8.0.6软件得到二次多项式回归模型：Y_3=12.94+0.17X_1+0.26X_2+0.12X_3+0.12X_1X_2+0.063X_1X_3−0.04X_2X_3−0.25X_1^2−0.82X_2^2−0.49X_3^2。

由表13可知，回归模型P<0.01、R^2=0.99、失拟

表 10 Box-Behnken试验因素水平设计

Table 10 Factors and levels of Box-Behnken design

因素	水平		
	−1	0	1
乙酸钠质量浓度(X_1)/(g/L)	3.95	4.05	4.15
四氢叶酸钙质量浓度(X_2)/(mg/L)	2.39	2.96	3.53
乙醇体积分数(X_3)/%	2.13	2.57	3.01

表 11 Box-Behnken试验设计及结果

Table 11 Box-Burman design and experimental results

试验编号	因素			己酸质量浓度/(g/L)
	X_1	X_2	X_3	
1	0	0	0	12.90
2	0	0	0	13.02
3	−1	−1	0	11.56
4	0	−1	−1	11.21
5	1	−1	0	11.72
6	0	0	0	12.91
7	1	0	1	12.56
8	0	−1	1	11.49
9	0	1	−1	11.86
10	−1	1	0	11.78
11	−1	0	−1	11.98
12	0	0	0	12.93
13	1	0	−1	12.14
14	0	1	1	11.98
15	0	0	0	12.93
16	−1	0	1	12.15
17	1	1	0	12.44

表 12 响应面二次模型方差分析

Table 12 Analysis of variance of the quadratic model of response surface

变量	自由度	调整平方和	调整均方	F值	P值	显著性
模型	9	5.410	0.600	159.38	<0.000 1	**
X_1	1	0.240	0.240	64.03	<0.000 1	**
X_2	1	0.540	0.540	143.37	<0.000 1	**
X_3	1	0.120	0.120	32.48	0.000 7	**
X_1X_2	1	0.062	0.062	16.57	0.004 7	**
X_1X_3	1	0.016	0.016	4.14	0.081 0	
X_2X_3	1	0.006	0.006	1.70	0.233 0	
X_1^2	1	0.250	0.250	67.14	<0.000 1	**
X_2^2	1	2.820	2.820	746.43	<0.000 1	**
X_3^2	1	0.990	0.990	262.83	<0.000 1	**
残差	7	0.026	0.004			
失拟项	3	0.017	0.006	2.54	0.194 4	
纯误差	4	0.009	0.002			
总和	16	5.440				

注:“*”表示差异显著(P<0.05);“**”表示差异极显著(P<0.01)。

项 P>0.05,表明回归模型极显著,相关性较好且在试验范围内拟合度较好;调整 R^2 与预测 R^2 的差值为 0.04,表明模型可预测发酵液中的己酸质量浓度;变异系数<10%、信噪比>4,表明试验精确度较好,结果较为合理。

表 13 Box-Behnken试验设计回归方程误差统计分析

Table 13 Error statistical analysis of regression equation in Box-Burman design

项目	值	项目	值
标准差	0.061	R^2	0.99
均值	12.21	调整 R^2	0.99
变异系数/%	0.50	预测 R^2	0.95
预测残差平方和	0.29	信噪比	36.67

由图 1~3 可知,残差的正态概率分布在同一直线附近,线性较好;预测值与残差分布较散,无规律;实际值与预测值基本在同一直线附近。说明所得的响应面回归模型较为合适。

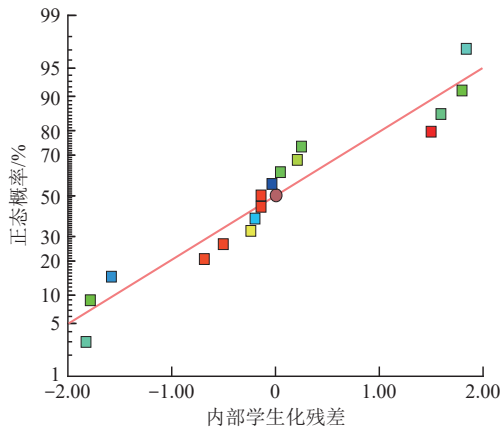


图 1 残差正态分布

Fig. 1 Normal distribution plot of residuals

2.3.2 响应面分析

图 4~6 为乙酸钠质量浓度、四氢叶酸钙质量浓度和乙醇体积分数 3 个因素之间交互作用的等高线和响应面图。其中,乙酸钠质量浓度与四氢叶酸钙质量浓度之间的等高线呈椭圆形,表明 2 个因素之间的交互作用显著,而乙酸钠质量浓度与乙醇体积分数、四氢叶酸钙质量浓度与乙醇体积分数之间的等高线近似椭圆形,表明其交互作用不显著。

通过 Design-Expert 8.0.6 软件优化得出最佳工艺组合为乙酸钠质量浓度 4.08 g/L、四氢叶酸钙质量浓度 2.88 mg/L、乙醇体积分数 2.53%,该条件

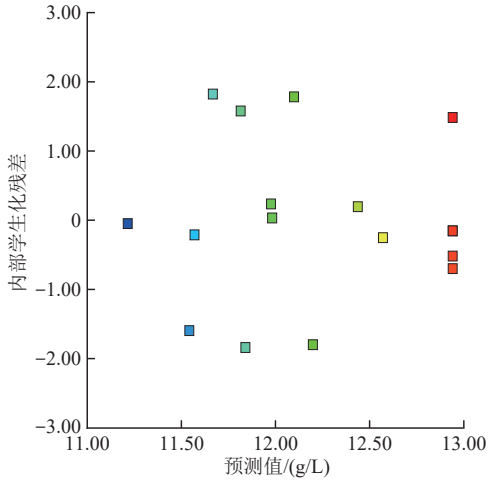


图 2　残差与预测值分布图

Fig. 2　Distribution of residuals and predicted values

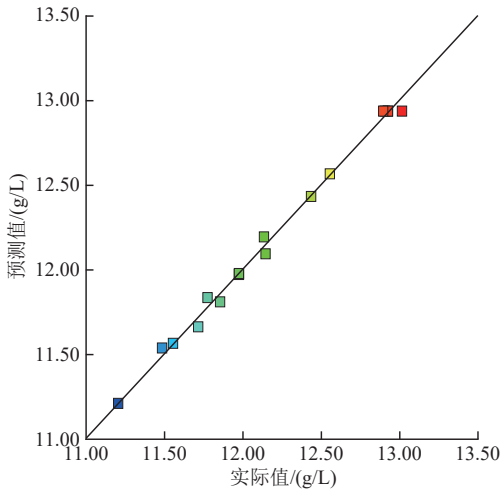
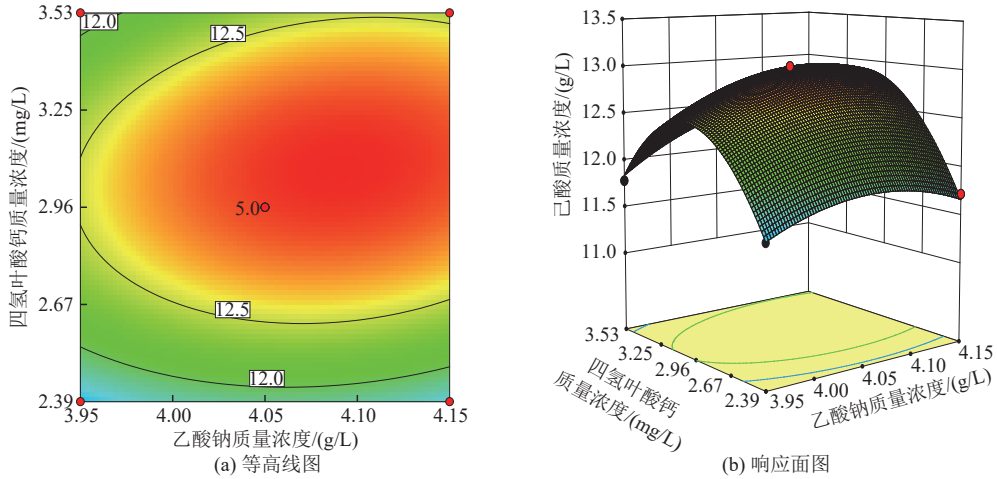


图 3　预测值与实际值分布

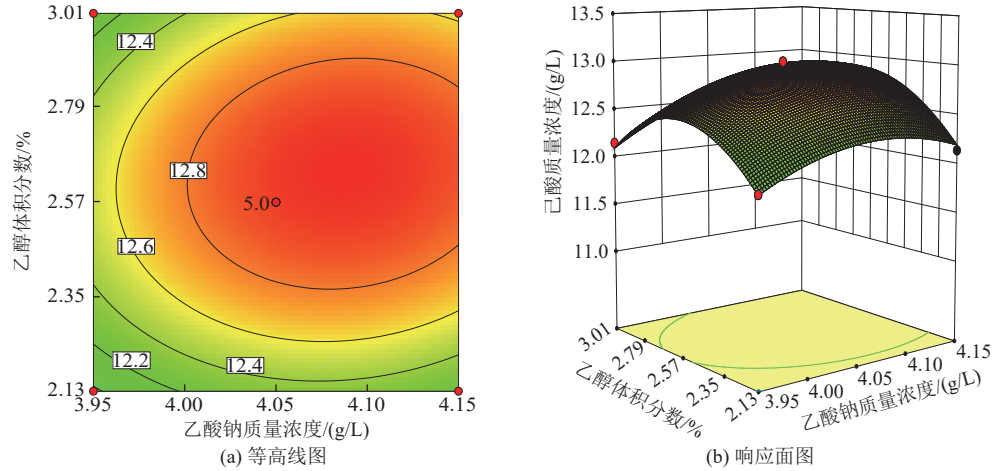
Fig. 3　Distribution of the predicted and actual values



(a) 等高线图　　(b) 响应面图

图 4　乙酸钠质量浓度和四氢叶酸钙质量浓度交互作用对己酸质量浓度的等高线和响应面图

Fig. 4　Contour and response surface plots for the effect of interaction between sodium acetate mass concentration and calcium folinate mass concentration on the mass concentration of caproic acid



(a) 等高线图　　(b) 响应面图

图 5　乙酸钠质量浓度和乙醇体积分数交互作用对己酸质量浓度的等高线和响应面图

Fig. 5　Contour and response surface plots for the effect of interaction between ethanol volume fraction and sodium acetate mass concentration on the mass concentration of caproic acid

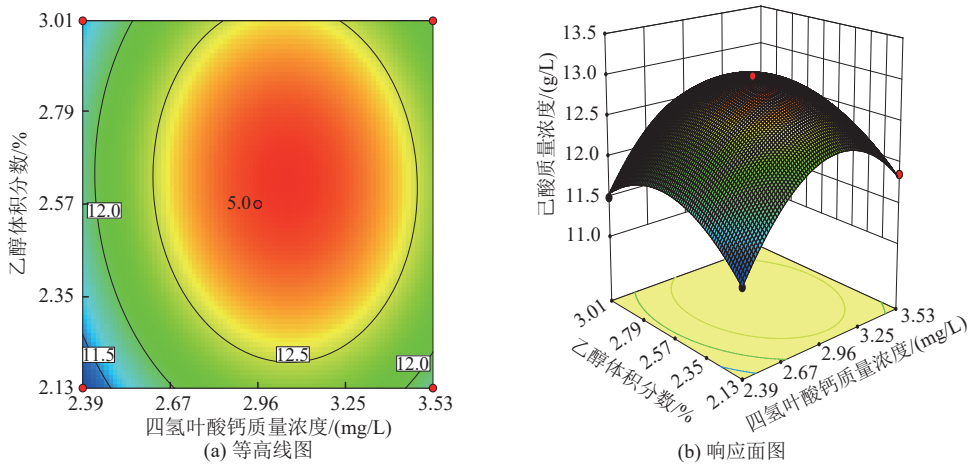


图 6 四氢叶酸钙质量浓度和乙醇体积分数交互作用对己酸质量浓度的等高线和响应面图

Fig. 6 Contour and response surface plots for the effect of interaction between ethanol volume fraction and calcium folinate mass concentration on the mass concentration of caproic acid

下己酸质量浓度预测值为 12.98 g/L。

2.3.3 模型验证

在蔗糖质量浓度 7.50 g/L、酵母膏质量浓度 1.00 g/L、七水硫酸镁质量浓度 0.20 g/L、乙酸钠质量浓度 4.08 g/L、硫酸铵质量浓度 0.45 g/L、四氢叶酸钙质量浓度 2.88 mg/L、磷酸氢二钾质量浓度 0.60 g/L、乙醇体积分数 2.53% 的条件下进行 3 次平行验证实验，所得己酸的平均质量浓度为 12.78 g/L，与模型预测值接近，而且较优化前的 Plackett-Burman 试验低水平试验组的（4.09 g/L）提高了 212.47%。

3 结论

作者以解硫胺素芽孢杆菌 JXN-1 为研究对象，系统优化了其产己酸的发酵培养基配方，显著提升了己酸产量。研究结果表明，通过 Plackett-Burman 试验筛选出乙酸钠质量浓度、四氢叶酸钙质量浓度和乙醇体积分数为关键影响因素，并利用最陡爬坡试验确定了各因素的步长与中心点；通过 Box-Behnken 试验建立了二次回归模型，其预测值与试验值高度吻合，模型可靠性强。

利用响应面法系统性优化培养基组分，突破了传统单因素试验的工作量大、不能快速判别多因素影响的显著性以及因素水平中心、步长等问题，为高效快速筛选微生物代谢关键因素提供了方法参考。然而，本研究仍存在一定局限性。首先，未深入探究四氢叶酸钙的具体作用机制，其在己酸合成中的代谢功能尚未明确；其次，优化条件仅限于实验室规模，未验证其在固态白酒发酵环境中的适用性；此外，本研究未考察其他潜在影响因素的协同效应。未来研究可结合代谢组学与酶学分析，揭示四氢叶酸钙的分子作用机制，并通过模拟窖池发酵环境，验证优化培养基的工业应用潜力。同时，可拓展至菌株改造或复合菌群发酵策略，进一步提升己酸合成效率。

参考文献

[1] TSUKAHARA T, HASHIZUME K, KOYAMA H, et al. Stimulation of butyrate production through the metabolic interaction among lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, and lactic acid-utilizing bacteria, *Megasphaera elsdenii*, in porcine cecal digesta[J]. Animal Science Journal, 2006, 77(4): 454-461.

[2] DUNCAN S H, LOUIS P, FLINT H J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 5810-5817.

[3] 刘治国，方超，张晓元，等. 浓香型白酒窖泥理化因子、微生物群落、感官质量以及相关性研究进展[J]. 食品科学，2023，44(21)：351-358.
LIU Z G, FANG C, ZHANG X Y, et al. Research progress on physicochemical factors, microbial community and sensory quality of Nongxiangxing Baijiu pit mud and correlation among them[J]. Food Science, 2023, 44(21): 351-358.(in Chinese)

[4] WEIMER P J, STEVENSON D M. Isolation, characterization, and quantification of *Clostridium kluyveri* from the bovine rumen[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(2): 461-466.

[5] BARKER H A，TAHA S M. *Clostridium kluyverii*，an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol[J]. Journal of Bacteriology，1942，43(3)：347-363.

[6] SEEDORF H，FRICKE W F，VEITH B，et al. The genome of *Clostridium kluyveri*，a strict anaerobe with unique metabolic features [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，2008，105(6)：2128-2133.

[7] 赵晨婕，刘念，王超凯，等. 窖泥高产己酸菌的分离筛选及发酵性能测试[J]. 中国酿造，2020，39(1)：114-118.
ZHAO C J，LIU N，WANG C K，et al. Isolation，screening and fermentation performance test of high-yield caproic acid bacteria from pit mud[J]. China Brewing，2020，39(1)：114-118.(in Chinese)

[8] MONTGOMERY D C. Design and analysis of experiments [M]. 3rd ed. New York：Wiley，1991.

[9] 张晓宇，郭子贤，吕育财，等. 浓香型白酒生态系统中己酸菌研究进展[J]. 食品与发酵工业，2021，47(12)：302-308.
ZHANG X Y，GUO Z X，LYU Y C，et al. Research progress of caproic acid-producing bacteria in strong-flavor Baijiu ecosystem[J]. Food and Fermentation Industries，2021，47(12)：302-308.(in Chinese)

[10] YU H Q，MU Y. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. Ⅱ：reactor performance in 3-year operation[J]. Biotechnology and Bioengineering，2006，94(5)：988-995.

[11] SPIRITO C M，RICHTER H，RABAEY K，et al. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste[J]. Current Opinion in Biotechnology，2014，27：115-122.

[12] JEON B S，CHOI O，UM Y，et al. Production of medium-chain carboxylic acids by *Megasphaera* sp. MH with supplemental electron acceptors[J]. Biotechnology for Biofuels，2016，9：129.

[13] 马鸿志，武文宇，于子强，等. 微生物合成己酸的基本原理：能量代谢及影响因素[J]. 工程科学学报，2023，45(4)：681-692.
MA H Z，WU W Y，YU Z Q，et al. Mechanism of caproic acid biosynthesis：energy metabolism and influencing factors[J]. Chinese Journal of Engineering，2023，45(4)：681-692.(in Chinese)

[14] ZHU X Y，ZHOU Y，WANG Y，et al. Production of high-concentration *n*-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae bacterium* CPB6[J]. Biotechnology for Biofuels，2017，10：102.

[15] TAO Y，ZHU X Y，WANG H，et al. Complete genome sequence of *Ruminococcaceae bacterium* CPB6：a newly isolated culture for efficient *n*-caproic acid production from lactate[J]. Journal of Biotechnology，2017，259：91-94.

[16] 郭世鑫，姚孟琦，马文瑞，等. 酱香型白酒的研究现状[J]. 中国酿造，2021，40(11)：1-6.
GUO S X，YAO M Q，MA W R，et al. Research status of sauce-flavor Baijiu[J]. China Brewing，2021，40(11)：1-6.(in Chinese)

[17] 戴奕杰，李宗军，田志强. 酱香型白酒大曲和糟醅的细菌多样性分析[J]. 食品科学，2019，40(4)：152-159.
DAI Y J，LI Z J，TIAN Z Q. Analysis of bacterial diversity in Daqu and fermented grains for Maotai-flavor liquor[J]. Food Science，2019，40(4)：152-159.(in Chinese)

[18] WANG C D，CHEN Q，WANG Q，et al. Long-term batch brewing accumulates adaptive microbes，which comprehensively produce more flavorful Chinese liquors [J]. Food Research International，2014，62：894-901.

[19] 张明珠，吴学凤，穆冬冬，等. 基于高通量测序的窖泥原核微生物群落结构及其理化因子相关性分析[J]. 食品科学，2021，42(18)：111-118.
ZHANG M Z，WU X F，MU D D，et al. High throughput sequencing-based analysis of prokaryotic community structure in Chinese liquor fermentation pit muds and its correlation with physicochemical indexes [J]. Food Science，2021，42(18)：111-118.(in Chinese)

[20] 胡晓龙，余苗，曹振华，等. 基于高通量测序的窖泥原核微生物群落多样性在退化窖池中的空间异质性[J]. 食品科学，2021，42(10)：86-93.
HU X L，YU M，CAO Z H，et al. Spatial heterogeneity of prokaryotic microbial community diversity in pit mud from degraded cellar for the production of strong-flavor Baijiu revealed by high throughput sequencing[J]. Food Science，2021，42(10)：86-93.(in Chinese)

[21] 刘梅，邓杰，谢军，等. 基于微生物群落结构相关的窖泥品质理化指标的筛选[J]. 食品科学，2018，39(19)：44-50.
LIU M，DENG J，XIE J，et al. Screening of physicochemical quality indexes of pit mud based on correlation with microbial community structure[J]. Food Science，2018，39(19)：44-50.(in Chinese)

[22] 赵辉，敞颜，王葳，等. 浓香型白酒窖泥中高产己酸兼性厌氧细菌的分离鉴定[J]. 食品科学，2012，33(5)：177-182.
ZHAO H，CHANG Y，WANG W，et al. Isolation and identification of facultative anaerobic strains with high yield of hexanoic acid from Luzhou-flavor liquor pit mud

[J]. Food Science,2012,33(5):177-182.(in Chinese)

[23] 陈让芳,高健,杨燕,等. 浓香型白酒窖泥原核微生物群落与挥发性风味物质相关性分析[J]. 食品与发酵科技,2023,59(3):9-15.
CHEN R F,GAO J,YANG Y,et al. Correlation analysis between prokaryotic microbial community and volatile flavor compounds in pit mud of Luzhou-flavor liquor[J]. Food and Fermentation Science & Technolog, 2023, 59(3):9-15.(in Chinese)

[24] 杨菁瑾,唐雪,杨先超,等. 泸州老窖不同窖龄窖泥中己酸菌遗传多样性及系统发育[J]. 四川农业大学学报,2015,33(2):181-188.
YANG J J,TANG X,YANG X C,et al. Genetic diversity and phylogeny of caproic acid bacteria in different aged Luzhou Laojiao pit mud[J]. Journal of Sichuan Agricultural University,2015,33(2):181-188.(in Chinese)

[25] 周恒刚. 关于窖泥微生物(上)[J]. 酿酒科技,1987(1):2-6.
ZHOU H G. On microorganisms in pit mud (I)[J]. Liquor-making Science & Technology,1987(1):2-6.(in Chinese)

[26] 郭燕,邓杰,任志强,等. 响应面优化酿酒酵母与窖泥酯化细菌协同发酵产丁酸乙酯和己酸乙酯[J]. 食品科学,2021,42(10):209-217.
GUO Y,DENG J,REN Z Q,et al. Optimization of the production of ethyl hexanoate and ethyl butyrate by cofermentation of saccharomyces cerevisiae and esterifying bacteria from pit mud of Chinese Baijiu using response surface methodology[J]. Food Science,2021,42(10):209-217.(in Chinese)

[27] 甘广东,朱超,杨勇,等. 复合微生物菌群在白酒酿造副产物中的应用[J]. 酿酒科技,2013(1):77-81.
GAN G D,ZHU C,YANG Y,et al. Application of complex microbial communities in liquor-making by-product [J]. Liquor-Making Science & Technology,2013(1):77-81.(in Chinese)

[28] 夏蕴实,刘畅,王梓,等. 复合酶水酶法提取鹿油及其脂肪酸组成分析[J]. 食品工业,2021,42(12):108-112.
XIA Y S,LIU C,WANG Z,et al. Analysis of deer oil extraction and its fatty acid composition by complex enzyme water enzyme method[J]. The Food Industry,2021,42(12):108-112.(in Chinese)

[29] 柴美灵,李娜,乔宏萍,等. Box-Behnken法优化甘草多糖提取工艺及其体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技,2021,42(23):192-200.
CHAI M L,LI N,QIAO H P,et al. Application of Box-Behnken design for ultrasonic-assisted extraction of glycyrrhiza polysaccharide and its antioxidant activity analysis *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry,2021,42(23):192-200.(in Chinese)

[30] 李美东,黄秀芳,罗凯. 壶瓶碎米荠多糖的提取、分离及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报,2022,22(4):196-207.
LI M D,HUANG X F,LUO K. Extraction,isolation and antioxidant activity of polysaccharides from *Cardamine hupingshanensis*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2022,22(4):196-207.(in Chinese)

[31] 王萧玉竹,董晋军,许国超,等. 可得然胶生产菌种的筛选及发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(7):732-738.
WANG X Y Z,DONG J J,XU G C,et al. Isolation of a curdlan-producing bacterium and optimization of fermentation medium[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2018,37(7):732-738.(in Chinese)

[32] 王煜伟,李琳琳,王乐,等. 响应面法优化大蒜油的提取工艺研究[J]. 食品研究与开发,2022,43(13):95-100.
WANG Y W,LI L L,WANG L,et al. Optimization of garlic oil extraction process by response surface methodology [J]. Food Research and Development,2022,43(13):95-100.(in Chinese)

[33] 章智,郑娱洁,季书勤,等. 响应面法优化栀子花果胶多糖的提取工艺[J]. 中国食品添加剂,2021,32(11):45-52.
ZHANG Z,ZHENG Y J,JI S Q,et al. Optimization of extraction process of gardenia flower pectin polysaccharide by response surface method[J]. China Food Additives,2021,32(11):45-52.(in Chinese)

[34] GUO W Q,REN N Q,WANG X J,et al. Optimization of culture conditions for hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49 using response surface methodology[J]. Bioresource Technology,2009,100(3):1192-1196.