

中高温大曲中红曲霉的筛选及应用

Screening and application of *Monascus* in medium and high temperature Daqu

苏 凤¹ 卫春会^{1,2} 曾 波¹ 黄治国^{1,2}

SU Feng¹ WEI Chunhui^{1,2} ZENG Bo¹ HUANG Zhiguo^{1,2}

江 科¹ 任志强^{1,2}

JIANG Ke¹ REN Zhiqiang^{1,2}

(1. 四川轻化工大学酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 宜宾 644000;

2. 中国轻工业酿酒生物技术及智能制造重点实验室, 四川 宜宾 644000)

(1. *Sichuan Key Laboratory of Brewing Biotechnology and Application, Sichuan University of Science & Engineering, Yibin, Sichuan 644000, China*; 2. *China Key Laboratory of Light Industry Brewing Biotechnology and Intelligent Manufacturing, Yibin, Sichuan 644000, China*)

摘要:目的:优化酯化红曲霉麸曲的生产工艺,并探究酯化红曲霉麸曲对浓香型白酒的影响。方法:从大曲中筛选出 5 株红曲霉,采用酯分解法检测菌株产酯化酶能力,选择产酶能力最突出的菌株制备红曲霉麸曲。通过单因素及正交试验优化制曲工艺,并将其应用到白酒生产中。结果:5 株菌株中产酯化酶能力最强的是 J-3 菌株,其在水分 50%,菌株接种量 4%,pH 4.0,培养温度 32 °C 的条件下,可制得酯化酶活力高达 77.78 mg/g 的麸曲。将该麸曲按接种量不同添加到糟醅中发酵,较未添加麸曲的糟醅,在麸曲接种量为 1% 时,糟醅中乙酸乙酯含量提高了 4.84 倍,己酸乙酯含量提高了 3.55 倍。在接种量为 1.5% 时,丁酸乙酯含量提高了 4.72 倍。且添加酯化红曲霉麸曲能够提高酒精度与淀粉的利用率,显著提高糟醅中总酯含量。结论:将红曲霉麸曲按照适宜的接种量添加到糟醅中,能够提高浓香型白酒的质量。

关键词:红曲霉;麸曲;酯化力;浓香型白酒

Abstract: Objective: The production process of esterified *Monascus* bran koji was optimized, and its effect on Luzhou-flavor liquor was explored. Methods: Five strains of *Monascus* were screened from Daqu, and the esterifying enzyme production

ability of the strains was detected by the ester decomposition method. The strain with the most prominent enzyme production ability was selected to prepare *Monascus* bran koji. The koji-making process was optimized by single factor and orthogonal experiments and applied to liquor production. Results: Among the five strains, the J-3 strain had the strongest ability to produce esterification enzyme. Under the conditions of 50% moisture, 4% inoculation amount, pH 4.0 and 32 °C culture temperature, the esterification enzyme activity was as high as 77.78 mg/g bran koji. The bran koji was added to the fermented grains according to different inoculation amounts. Compared with the fermented grains without bran koji, when the inoculation amount of bran koji was 1%, the content of ethyl acetate in the fermented grains increased by 4.84 times, and the content of ethyl caproate increased by 3.55 times. When the inoculation amount was 1.5%, the content of ethyl butyrate increased by 4.72 times. The addition of esterified *Monascus* bran koji can improve the utilization rate of alcohol and starch, and significantly increase the total ester content in fermented grains. Conclusion: Adding *Monascus* bran koji to fermented grains according to the appropriate inoculation amount can improve the quality of Luzhou-flavor liquor.

Keywords: *Monascus*; mouldy bran; esterification force; Nongxiangxing Baijiu

基金项目:四川省科技创新创业苗子工程项目(编号:23MZGC0042);四川化工职业技术学院项目(编号:HX2020282)

作者简介:苏凤,女,四川轻化工大学在读硕士研究生。

通信作者:任志强(1985—),男,四川轻化工大学讲师,博士。

E-mail: hiqren@foxmail.com

收稿日期:2023-07-24 改回日期:2024-04-22

红曲菌属(*Monascus*)能够产生多种酶系,包括酯化酶、糖化酶及酸性蛋白酶等,在发酵食品中具有非常重要的意义^[1-2]。其中,酯化酶可催化多种有机酸与乙醇酯

类物质,使浓香型白酒的香气更加丰满协调^[3-5]。

通常以麸皮作为原料培养红曲霉,而麸曲制备的功能红曲成本低廉,且培养时间相对较短,制得的麸曲某些功效较大米低,但也能有较好的效果^[6]。马美荣等^[7]从大曲及糟醅中分离出了 8 株红曲霉,并将其应用于清香麸曲酒生产,能够使糟醅总酯含量提高 44.86%,乙酸乙酯含量增加 87.30%,显著改善了麸曲酒的口感和风味。但目前对于红曲霉的研究主要集中于黄水生香,针对从大曲中筛选红曲霉并将其制作成麸曲应用于浓香型白酒酿造的研究较少。而且酯类物质在白酒风味中主要体现在“香”上,但其生成周期长且产量低,往糟醅中添加高产酯化酶的微生物是常用于提高白酒中酯含量的方法。

研究拟从大曲出发,筛选出能产酯化酶的红曲菌株,制备成价格低廉,酯化能力强的麸曲,并将该麸曲的应用到麸曲白酒中。通过分析酒醅的理化性质及酯类物质,以期阐明从大曲中筛选的红曲霉对浓香型白酒酿造的影响,为后续提升浓香型白酒的品质提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

麦芽浸粉、酵母浸粉、蛋白胨、无水葡萄糖:分析纯,成都市科隆化学品有限公司;

三丁酸甘油酯、无水乙醇、甘油、乙酸、己酸:分析纯,成都艾科达化学试剂有限公司;

真菌 DNA 提取试剂盒:成都福际生物技术有限公司;

大曲、黄水、高粱、糠壳:四川省某酒厂。

1.2 仪器与设备

立式自动压力蒸汽灭菌锅:GI54DS 型,致微(厦门)仪器有限公司;

台式高速离心机:PiCo21 型,赛默飞世尔科技公司;

气相色谱仪:7890A 型,上海安捷伦科技有限公司;

显微镜:DM3000 型,德国徕卡仪器有限公司;

凝胶成像系统:ChemiDoc XPS+型,美国 BIO-RAD 公司;

快速梯度 PCR 扩增仪:C1000 Touch 型,美国 BIO-RAD 公司;

气相色谱-质谱联用仪:GC7890-5975MSD 型,美国 Agilent 公司;

电泳仪:164-5070 型,美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 培养基

(1) 麦芽汁固体培养基(1 L):蛋白胨 4 g、葡萄糖 10 g、酵母浸粉 3 g、麦芽汁浸粉 10 g、琼脂 20 g,121 °C 灭菌 20 min。

(2) 麦芽汁液体培养基(1 L):蛋白胨 4 g、葡萄糖 10 g、酵母浸粉 3 g、麦芽汁浸粉 10 g,121 °C 灭菌 20 min。

(3) 三丁酸甘油酯培养基(1 L):三丁酸甘油酯 25 mL、聚乙烯醇 2.5 g、琼脂 20 g,121 °C 灭菌 20 min^[8]。

(4) 25%甘油硝酸盐培养基(G25N 培养基)(1 L):酵母膏 5 g、蔗糖 30 g、氯化钾 0.5 g、硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、七水合硫酸镁 0.5 g、七水合硫酸铁 0.01 g、甘油 25 mL、琼脂 20 g,121 °C 灭菌 20 min^[9]。

1.3.2 酯化红曲霉菌的筛选 利用红曲霉耐酸且嗜好乳酸的特点^[10],向麦芽汁培养基中加入 3% 体积分数的乳酸,制备成选择培养基。准确称取大曲粉 10 g 于 90 mL 无菌水中,置于摇床摇匀 30 min。取 1 mL 曲液到 9 mL 无菌水中进行稀释,按 10 倍体系梯度稀释至 10^{-5} ,吸取 $100 \mu\text{L} \cdot 10^{-1} \sim 10^{-5}$ 的稀释曲液于加有 5% 乙醇的麦芽汁固体培养基上涂布,每个梯度 3 个平行,30 °C 培养。待菌落长出,根据红曲霉特征^[6],挑选出其中呈黄色、橘色、红色的菌落,进行平板划线,得到纯种菌株。并将挑选的菌株于 G25N 培养基划线培养,观测菌株的生长情况与菌落形态,采用平板湿室培养法^[11]观察菌株显微结构。

1.3.3 红曲菌株的酯化力验证 采用酯分解法^[9]验证菌株水解三丁酸甘油酯能力,检测菌株的酯化能力。将筛选得到的菌株,接种到麦芽汁液体培养基,120 r/min 30 °C 恒温培养 5 d 后,取 30 μL 培养液于打孔的三丁酸甘油酯培养基中,30 °C 反应 2 d,观察透明圈大小。将孔径记为内径 d ,将透明圈直径记为外径 D 。根据 D/d 值验证酯分解能力强弱。

1.3.4 红曲霉菌胞内/胞外酶检测 将红曲霉接种到装有灭菌后麦芽汁液体(100 mL)培养基的三角瓶中,120 r/min 30 °C 恒温培养 5 d^[12],待到菌体充分生长后,用纱布过滤并分别收集菌体和清液,将收集到的清液补充到 100 mL 得到待测胞外酶液,菌体用研钵充分研磨后补充水分到 100 mL 得到待测胞内酶液。在三丁酸甘油酯平板上打孔,并分别移入 50 μL 上述两种酶液,30 °C 反应 2 d,每组设置 3 个平行。

1.3.5 酯化红曲菌株分子生物学鉴定 采用福际试剂盒提取菌株的 DNA,并以其为模板,采用通用引物 NS-1 (5'-GTAGTCATATGCTTGCTCTC-3') 和引物 NS-4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') 进行 PCR 扩增^[13]。PCR 扩增体系:DNA 模板 2 μL ,Taq PCR Master Mix 25 μL ,引物各 1 μL ,超纯水 21 μL 。PCR 扩增程序:96 °C 预变性 1 min;96 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。PCR 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳后,于凝胶成像仪中观察条带是否符合送样标准,将符合送样标准的 PCR 扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司。PCR 扩增产物序列提交至美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information,NCBI)的数据库中进行 BLAST 搜索,选取同源性较高的菌株,用 MEGA11.0 软件中的邻接(neighbor-joining,NJ)法构建系统发

育树^[13-14]。

1.3.6 红曲霉麸曲制备条件优化

(1) 单因素试验:固定麸曲的质量,红曲霉菌种。对制曲的初始条件菌株接种量、水分、pH、温度进行单因素优化。保持其中3个因素不变,对另外1个变量进行单因素试验以确定优化试验的自变量。单因素试验中各因素的水平分别为:固定水分为50%,pH值为5.0,温度为30℃,接种量设置为麸曲质量的2%,4%,6%,8%,10%,12%。固定接种量为5%,pH值为5.0,温度为30℃,水分设置为麸曲质量的35%,40%,45%,50%,55%,60%。固定接种量为5%,水分为50%,温度为30℃,pH设置为3.5,4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5。固定接种量为5%,pH值为5.0,水分为50%,初始温度设置为26,28,30,32,34,36℃,将制备得到的麸曲烘干粉碎,以酯化力为指标,确定菌株的最佳产酶条件^[8]。

(2) 正交优化试验:根据单因素试验结果及制曲过程中的实际情况,进行适当调整,拟定不同因素水平。考察水分、接种量、pH、初始温度对麸曲制备的初始条件的影响,寻找酯化红曲霉麸曲制备的最佳组合,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验。并检测所制备的红曲霉麸曲酯化力,检测方法参照《白酒生产技术全书》^[15]。

1.3.7 发酵试验 以梗高粱为原料,清蒸后的糠壳添加量为原料的20%;高粱粉碎至3~4瓣,沸水润粮8h,将已清蒸的糠壳与原料混合,黄水与水按比例(酸度为15 mmol/100 g)混合加热作为量水,打量水至原料的55%(量水温度在80℃以上),摊晾后加入20%的大曲及一定量的己酸菌液并添加0%,0.5%,1%,2%的酯化红曲麸曲,混合均匀在25℃发酵20 d产酒,随后提高温度至34℃,保温40 d发酵完成后,检测出窖糟醅的相关理化指标,检测方法参照《酿酒分析与检测》^[16],水分及淀粉含量均用质量分数表示,酒精度参照 GB/T 10345—2007,取100 g酒醅,在500 mL蒸馏瓶中,加入200 mL去离子水和几颗沸石,煮沸后缓慢加热,收集馏出液

100 mL。静置数分钟后,放入干净、干燥的酒精计(不能接触筒壁),同时插入温度计,水平观测数值,记录酒精度与温度,查 GB/T 10345—2007 白酒分析方法中的附录B,换算成20℃时的酒精度。

1.3.8 糟醅主要风味物质测定

(1) 样品处理:取100 g糟醅于蒸馏烧瓶中,加入100 mL去离子水,蒸馏出100 mL液体作为酒样。取1 mL酒样,加入10 μL内标物(乙酸正戊酯)进行测定。

(2) 气相色谱质谱条件:采用DB-WAX(60.0 m×0.25 mm×0.25 μm)毛细管色谱柱;手动进样,进样口温度为230℃,不分流;起始柱温40℃,保持3 min后以4℃/min升至150℃,保持2 min,以8℃/min升至230℃保持6 min;离子源温度为230℃;EI电子强度70 eV;扫描范围35~400 amu^[17]。

1.4 数据处理与分析

每组试验设置3组平行,结果用“平均值±标准差”表示,GC-MS检测数据采用NIST 8.0谱库进行风味物质检索。采用SPSS 22.0软件对数据进行显著性分析,Origin 2018软件作图。

2 结果与分析

2.1 红曲霉的筛选及形态学鉴定

利用选择培养基对大曲中的微生物进行筛选分离,初步分离出5株菌落形态差异较大的菌株,并按照J-1~J-5依次进行编号命名。将菌株接种到G25N培养基上,5株菌均能在G25N培养基上生长,初期均长出白色菌落,随着培养时间的延长,菌落呈橙色或红色,如图1所示。J-1菌株菌落中央呈橘红色,边缘呈橙黄色,背面呈深红色;J-2菌株中央呈淡红色,边缘红色,菌丝向基内生长蔓延,难挑起,菌落向上凸起呈褶皱状,背面呈深红色;J-3菌株菌落形态呈中央橙红色,边缘白色;菌丝长且浓密,菌落为圆形或椭圆形;J-4菌株呈暗红色,边缘粉白色,菌丝向基内生长蔓延,难挑起,菌落向上凸起呈褶皱

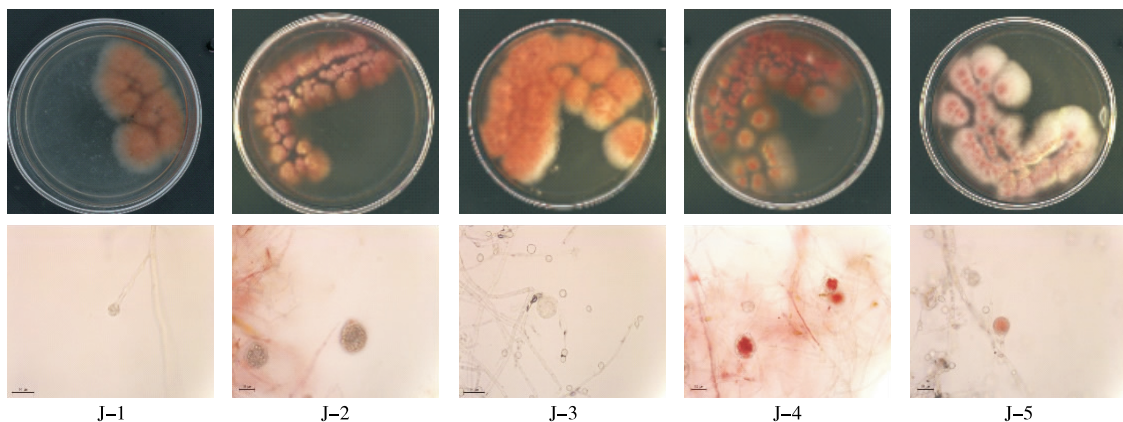


图1 菌株形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of strains (×40)

状;J-5 菌株中央浅红色,边缘白色,菌丝短且浓密,并向四周蔓延,菌落呈圆形或椭圆形,背面呈橙红色。

在显微镜下,5 种菌株的菌丝均可观察到菌丝内存在横隔,分枝,在菌丝顶端有圆形的闭囊壳,其中包含许多球形子囊,成熟的子囊呈红色。根据菌落特征、显微结构及菌株在 G25N 培养基上的生长情况,可以初步判断 5 株菌株均是红曲霉。

2.2 红曲霉酯化力验证

由表 1 可知,5 株菌在三丁酸甘油酯平板上均能形成透明圈,且透明圈内外径比均达到 2 以上,其中 J-3 菌株能够达到 3.03,显著大于其他 4 菌株的,表明 J-3 菌株拥有高于其他菌株的产酯化酶能力。

表 1 透明圈内外径比[†]

Table 1 Inner and outer diameter ratio of transparent ring

编号	内径 d/mm	外径 D/mm	D/d
J-1	7.00	18.72	2.67±0.42 ^b
J-2	7.00	14.71	2.10±0.27 ^c
J-3	7.00	21.22	3.03±0.39 ^a
J-4	7.00	15.43	2.20±0.63 ^c
J-5	7.00	15.81	2.26±0.47 ^c

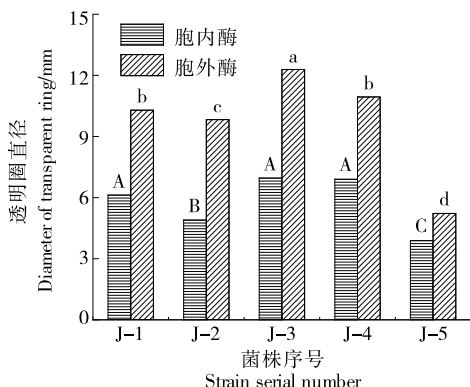
† 同一指标字母不同表示差异显著(P<0.05)。

2.3 红曲菌株胞内/胞外酯化酶活力差异

由图 2 可知,5 株菌株胞外酶含量皆高于胞内,且 J-3 菌株的胞外酶含量要远高于其他 4 株菌。说明红曲霉合成的酯化酶更多的是运输到胞外,在相同培养条件下 J-3 菌株能够产生更多或者更高酶活的酯化酶。

2.4 菌株分子生物学鉴定

选取产酯化酶能力最强的菌株 J-3,采用 DNA 试剂盒法提取菌株的 DNA,利用 NS-1 及 NS-4 引物进行 PCR 扩增后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 扩增,结果

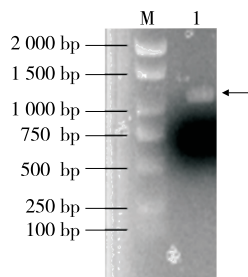


同一指标字母不同表示差异显著(P<0.05)

图 2 胞内外酶活比

Figure 2 Intracellular and extracellular enzyme activity ratio

(图 3)发现:电泳条带在 1 000~1 500 bp,符合引物扩增条带大小^[18],且未出现多条带和拖尾现象,可用于送样检测。



M. Maker 1. 样品

图 3 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Figure 3 PCR electrophoresis results

利用 NCBI 对菌株 J-3 的序列进行比对,利用 MEGA11.0 软件进行分析,构建系统发育进化树。如图 4 所示,菌株 J-3 与红色红曲霉 (*Monascus ruber*) DAOM139276(JN938993)菌株在同一分支上,同源性可达 100%。

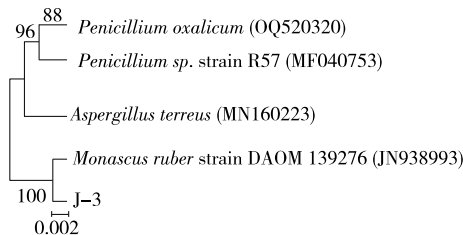


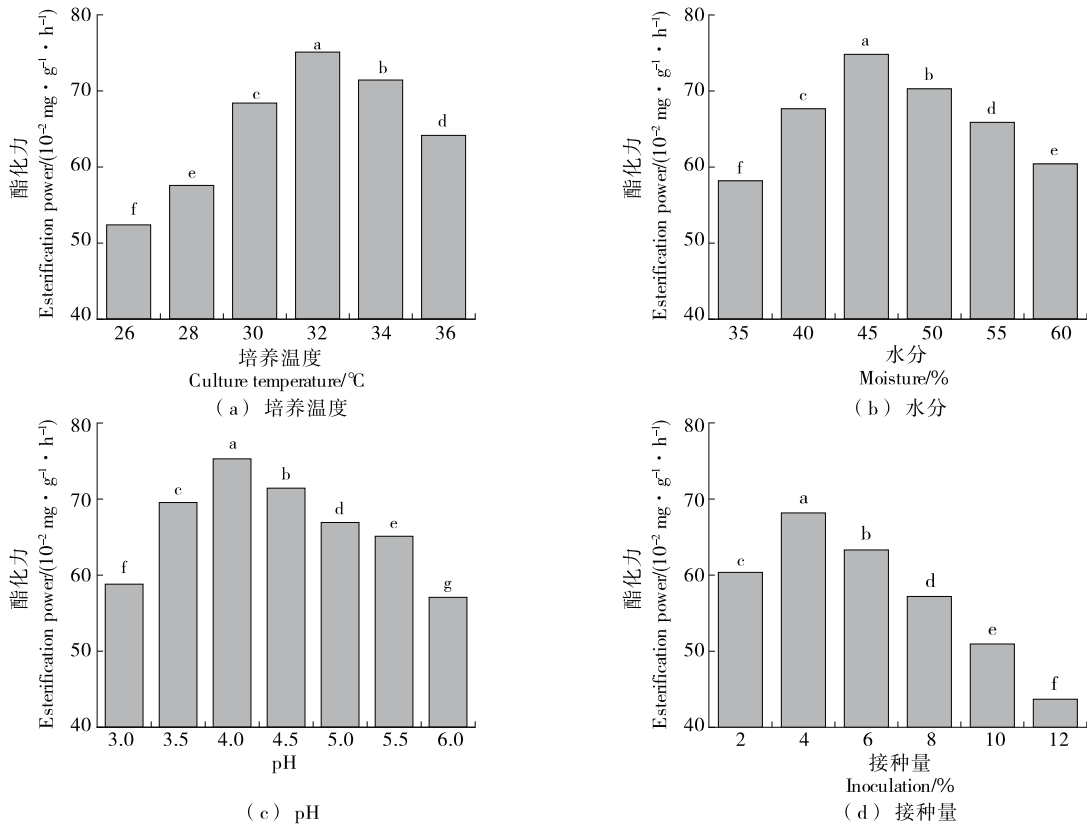
图 4 系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain

2.5 红曲霉麸曲制备条件优化

2.5.1 单因素试验 如图 5 所示,麸曲酯化力随培养温度的升高呈先上升后下降的趋势,麸曲酯化力在培养温度为 32℃ 时达到峰值 70.20 mg/g,显著高于其他培养温度下制备的麸曲(P<0.05),温度对微生物的影响主要是通过影响各种酶的活力来实现^[19]。因此,微生物在不同温度条件下积累的代谢产物有较大的差异。而水分的影响均显著,整体呈先升高后减少的趋势。水分为 45% 时,麸曲酯化力达到峰值 69.64 mg/g 且显著高于其他水分下制备的麸曲(P<0.05)。水是微生物生长繁殖中必不可少的一种组分,影响微生物的代谢速度^[20]。在相同的培养时间内,高水分活度条件下,微生物传代次数多,菌种也更易老化,衰退。这些原因共同导致红曲霉麸曲酯化力随水分的增加呈先上升后下降的趋势。

J-3 菌株麸曲的酯化力随 pH 的增大呈先上升后下降的趋势,并在 pH 为 4.0 时达到峰值 70.58 mg/g,显著高于其他 pH 下制得的麸曲(P<0.05)。这可能是由于在不利于生长的 pH 条件下,菌株会通过代谢活动去解除



同一指标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 5 不同初始条件对 J-3 菌株麸曲产酯化酶的影响

Figure 5 Effects of different initial conditions on the production of esterification enzyme by J-3 strain mouldy bran

pH 引起的胁迫,从而使得目标产物的积累减少。同时麸曲酯化力随菌株接种量的增加呈先上升后下降的趋势,并在接种量为 4% 时,麸曲酯化力达到峰值为 68.17 mg/g,显著高于其他水平的 ($P < 0.05$)。由此可以推测接种量过高时,菌株大量增殖,快速消耗营养物质,菌株快速老化,导致菌株酯化酶产量较少,同时菌株快速增长繁殖也会使得曲料结块严重,影响曲料内部氧含量及局部温度,从而影响酯化酶活。

2.5.2 正交试验 根据单因素试验结果确定的试验因素水平取值见表 2。

由表 3 可知,J-3 菌株的最佳产酯化酶制曲工艺为水分 50%,接种量 4%,pH 4.0,培养温度 32 °C,4 个因素对 J-3 菌株麸曲酯化力的影响大小为 pH > 培养温度 > 水分 > 接种量。

表 2 菌株正交因素水平表

Table 2 Orthogonal factors level table of J-3 strain

水平	A 水分/%	B 接种量/%	C pH	D 初始温度/°C
1	40	2	3.5	30
2	45	4	4.0	32
3	50	6	4.5	34

在最佳工艺条件下利用 J-3 菌株制备麸曲进行验证实验。结果发现:在最优工艺下制得的麸曲酯化力为 77.78 mg/g,显著高于 9 个正交试验中酯化力最大的组合(A₁B₂C₂D₂) ($P < 0.05$),而且酯化红曲霉麸曲的酯化

表 3 J-3 菌株正交试验结果

Table 3 Orthogonal test table of J-3 strain

编号	A	B	C	D	酯化力/(mg·g ⁻¹)
1	3	2	3	1	71.38
2	3	3	1	2	72.91
3	2	1	3	2	70.66
4	2	3	2	1	71.41
5	2	2	1	3	69.62
6	1	3	3	3	69.40
7	1	1	1	1	71.21
8	3	1	2	3	72.64
9	1	2	2	2	73.81
<hr/>					
k ₁	71.48	71.50	71.25	71.33	
k ₂	70.56	71.60	72.62	72.46	
k ₃	72.31	71.24	70.48	70.56	
R	1.74	0.36	2.14	1.90	

力显著高于同等检测条件下普通大曲(42.17±0.92)的酯化力,证明工艺优化成功。

2.6 酯化红曲霉麸曲接种量对发酵后糟醅理化的影响

由表 4 可知,出窖糟醅酸度随麸曲添加量的增加呈先减小后增加再减少的趋势,在麸曲添加量为 1%时,糟醅酸度达到峰值(39.54 mmol/100 g)且显著高于其他水平的($P<0.05$)。发酵结束后,糟醅还原糖含量处于一个较低

的水平(5.14~5.76 g/kg),在这一水平微生物很难利用^[21],且不同接种量的糟醅的还原糖差异并不显著。而接种了麸曲的糟醅的淀粉含量显著低于未接种麸曲的($P<0.05$),这可能是因为麸曲中的微生物会消耗一部分淀粉用于自身代谢及繁殖^[22]。出窖糟醅水分含量为 67.11%~69.03%,随着麸曲接种量的增加,糟醅水分逐渐上升,并在接种量为 1.5%时与未接种组差异达到显著水平($P<0.05$)。

表 4 红曲霉麸曲接种量对发酵后糟醅理化的影响[†]

Table 4 Changes of acidity of fermented grains

接种量/%	酸度/ (10 ⁻² mmol·g ⁻¹)	还原糖/ (g·kg ⁻¹)	水分/%	淀粉/%	酒精度/%	总酯/ (10 ⁻² mg·g ⁻¹)
0	39.29±0.41 ^a	5.61±0.17 ^a	67.11±0.56 ^b	15.40±0.15 ^a	7.19±0.10 ^b	17.69±1.24 ^d
0.5	38.29±0.33 ^c	5.75±0.22 ^a	68.20±0.38 ^{ab}	14.47±0.16 ^b	7.24±0.06 ^b	18.52±1.57 ^c
1.0	39.54±0.36 ^a	5.14±0.16 ^a	68.32±0.30 ^{ab}	12.33±0.14 ^b	7.45±0.11 ^{ab}	25.63±1.29 ^a
1.5	38.74±0.41 ^b	5.21±0.29 ^a	69.02±0.46 ^a	12.53±0.15 ^b	7.64±0.09 ^a	24.79±1.68 ^b

† 同一指标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

酒精度是衡量发酵成功与否的关键,直接关乎经济效益,通过强化发酵来提高酒质应该秉持不显著影响酒精产量为前提。随着酯化红曲霉接种量的增加,糟醅酒精度呈上升趋势。当酯化红曲霉麸曲添加量在 1.5%时能够显著提高糟醅中酒精度($P<0.05$)。这可能是由于红曲霉在生长过程中不仅能够代谢产生酯化酶,也能代谢产生糖化酶^[15],发酵过程中,能够在一定程度提高原料中淀粉的水解量,提高了微生物对原料的利用率,从而使产酒量有所提高^[23]。白酒中的酯类物质是大多数香型的主体香味物质,其含量多少更是决定白酒品质的关键因素。糟醅中总酯含量随接种量的增加呈先增加后减少的趋势,在接种量为 1.0%时,糟醅总酯含量达到峰值 25.63 mg/100 g 后逐渐趋于稳定。接种不同量酯化红曲后,糟醅中总酯含量均有显著提高。

2.7 酯化红曲霉麸曲接种量对发酵后糟醅主要酯类物质的影响

酯类物质是在白酒发酵的中后期,由窖内微生物利用醇类、酸类为原料生成,主要为乙酯,约占香味物质的 60%,是白酒中的主要芳香化合物^[3-5]。其中己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯及其前体被称为浓香型白酒中的“四大酸、四大酯”,共同构成了浓香型白酒的风味骨架。由表 5 可知,乙酸乙酯含量随麸曲接种量的增加呈先增加后趋于稳定的趋势,在麸曲接种量为 1%时达到

峰值(4.55 mg/100 g),相较未接种麸曲,乙酸乙酯含量提高了 4.84 倍。丁酸乙酯含量随麸曲接种量的增加呈上升趋势,并在接种量为 1.5%时达到峰值(2.17 mg/100 g),较未接种组,丁酸乙酯含量提高了 4.72 倍。乳酸乙酯含量随着接种量的增加呈减少的趋势,空白组乳酸乙酯含量较试验组高 1.9~2.8 倍,接种酯化红曲霉麸曲能够大幅减少发酵过程中乳酸乙酯的含量,乙酸和乙醇可以生产乙酸乙酯,在后期乙酸乙醇大量生成,可能对乳酸乙酯的生成造成了抑制作用。而己酸乙酯含量随酯化红曲霉接种量的增加呈先上升后趋于稳定的趋势,并在接种量为 1.0%时达到峰值(17.03 mg/100 g),接种麸曲后己酸乙酯含量较未接种提高了 3.55 倍。说明将酯化红曲霉麸曲按照适宜的接种量添加到糟醅中,对酒质有较好的改良。

3 结论

研究以浓香型大曲为菌源,通过分离纯化筛选出了 5 株红曲霉菌株,并选择产酯化酶能力最突出菌株 J-3 制备麸曲。通过对酯化红曲霉麸曲生产工艺的优化,得到 J-3 菌株制备麸曲的最佳工艺为:水分 50%,接种量 4%,pH 4.0,培养温度 32℃。在最佳工艺下,利用 J-3 菌株制备红曲霉麸曲,麸曲酯化力可达 77.78 mg/g,显著高于同等检测条件下大曲的酯化力 42.17 mg/g。将该红曲霉麸曲按照不同接种量添加到糟醅中,发酵结束后发现,添加

表 5 主要酯类物质差异[†]

Table 5 Differences in main esters

接种量/%	乙酸乙酯/(10 ⁻² mg·g ⁻¹)	丁酸乙酯/(10 ⁻² mg·g ⁻¹)	乳酸乙酯/(10 ⁻² mg·g ⁻¹)	己酸乙酯/(10 ⁻² mg·g ⁻¹)
0	0.94±0.19 ^c	0.46±0.24 ^d	6.61±0.25 ^a	4.79±0.13 ^d
0.5	2.32±0.12 ^b	0.78±0.26 ^c	3.48±0.12 ^b	10.66±0.34 ^c
1.0	4.55±0.18 ^a	1.14±0.16 ^b	2.32±0.17 ^c	17.03±0.27 ^a
1.5	4.01±0.17 ^a	2.17±0.21 ^a	2.13±0.15 ^c	16.11±0.43 ^a

† 同一指标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

酯化红曲霉麸曲能够提高酒精度与淀粉的利用率,显著提高了糟醅中总酯含量,能够有效提升白酒的质量。后续将在实际生产中探究酯化红曲霉麸曲的应用可行性。

参考文献

- [1] CHEN W P, HE Y, ZHOU Y X, et al. Edible filamentous fungi from the species monascus: Early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 2015, 14(5): 555-567.
- [2] 胡娜, 吴鑫颖, 李付丽, 等. 紫色红曲霉 FBKL3.0018 产酯化酶的酶学性质研究[J]. *中国酿造*, 2017, 36(5): 123-127.
HU N, WU X Y, LI F L, et al. Enzymatic properties of esterifying enzyme from *Monascus purpureus* FBKL3.0018[J]. *China Brewing*, 2017, 36(5): 123-127.
- [3] SEENIVASAN A, SATYA ESWARI J, SANKAR P, et al. Metabolic pathway analysis and dynamic macroscopic model development for lovastatin production by *Monascus purpureus* using metabolic footprinting concept [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 154: 107437.
- [4] LIU L, WU S, WANG W, et al. Sulfonation of *Monascus* pigments to produce water-soluble yellow pigments[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 173: 107965.
- [5] XU Y Q, WANG X C, LIU X, et al. Discovery and development of a novel short-chain fatty acid ester synthetic biocatalyst under aqueous phase from *Monascus purpureus* isolated from Baijiu[J]. *Food Chemistry*, 2020, 338: 128025.
- [6] HUANG D, SHANG Z C, LI Y L, et al. Isolation of rhizopus producing esterifying enzyme and study on its enzyme production conditions[J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 36: 550-553.
- [7] 马美荣, 周林艳, 李晶晶, 等. 红曲霉的分离筛选及初步应用研究[J]. *酿酒科技*, 2020(6): 61-64.
MA M R, ZHOU Y L, LI J J, et al. Isolation screening and preliminary application of *Monascus*[J]. *Brewing Technology*, 2020, (6): 61-64.
- [8] 蔡颖慧, 潘佩平, 黄潇, 等. 红曲霉产琥珀酸与酯化酶的变化规律[J]. *食品科学*, 2014, 35(13): 178-181.
CAI Y H, PAN P P, HUANG X, et al. The changes of succinic acid and esterification enzyme produced by *Monascus*[J]. *Food Science*, 2014, 35(13): 178-181.
- [9] 李志强, 刘颖, 林凤, 等. 福建古田红曲生产用红曲霉菌主要种类的鉴别[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(5): 64-69.
LI Z Q, LIU Y, LIN F, et al. Identification of major *Monascus* sp. involved in industrial production of Gutian Hongqu[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2017, 43(5): 64-69.
- [10] HA J H, KLAEBE A, FRANÇOIS J, et al. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 311-314.
- [11] 徐士菊, 强义国, 周德庆. 一种简便的微生物载片培养法[J]. *生物学教学*, 1980(1): 36-37.
XU S J, QIANG Y G, ZHOU D Q. A simple microbial slide culture method[J]. *Biology Teaching*, 1980(1): 36-37.
- [12] 李付丽. 紫色红曲霉产酯化酶的研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2015: 10-30.
- LI F L. Study on the production of esterification enzyme by *Monascus purpureus*[D]. Guiyang: Guizhou University, 2015: 10-30.
- [13] 周康熙, 陈思鹏, 王泽楠, 等. 红曲中红曲菌的鉴定及优质菌的筛选[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(1): 296-305.
ZHOU K X, CHEN S P, WANG Z N, et al. Identification of *Monascus* strains isolated from hongqu and screening of high-quality strains[J]. *Chinese Journal of Food*, 2023, 23(1): 296-305.
- [14] DONADINI M, DENTALI F, SQUIZZATO A, et al. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis[J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 71(1): 7-14.
- [15] 沈怡方. 白酒生产技术全书[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 624-625.
SHEN Y F. *Liquor production technology book*[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998: 624-625.
- [16] 王福荣. 酿酒分析与检测[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 31-33.
WANG F R. *Brewing analysis and detection*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 31-33.
- [17] ZHANG C, AO Z, CHUI W Q, et al. Characterization of the aroma-active compounds in Daqu: A tradition Chinese liquor starter[J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(1): 69-76.
- [18] 黄春凯, 左小明, 王红蕾, 等. 一株产纤维素酶菌株的分离、鉴定及产酶特性[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(4): 646-653.
HUANG C K, ZUO X M, WANG H L, et al. Isolation, identification and characterization of a cellulase-producing strain [J]. *Microbiological Bulletin*, 2015, 42(4): 646-653.
- [19] JOMEZ E J, DELGADO J A, GONZALEZ J M. Influence of water availability and temperature on estimates of microbial extracellular enzyme activity[J]. *Peer J*, 2021, 9(12): 10994.
- [20] 朱义族, 李雅颖, 韩继刚, 等. 水分条件变化对土壤微生物的影响及其响应机制研究进展[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(12): 4 323-4 332.
ZHU Y Z, LI Y Y, HAN J G, et al. Research progress on the effect of water condition change on soil microorganisms and its response mechanism[J]. *Applied Ecology*, 2019, 30(12): 4 323-4 332.
- [21] CHEN D, SHENG M L, WNAG S, et al. Dynamic changes and formation of key contributing odorants with amino acids and reducing sugars as precursors in shiitake mushrooms during hot air drying[J]. *Food Chemistry*, 2023, 424: 136409.
- [22] ZONG X Y, WEN L, MOU T T, et al. Effects of multiple cycles of sorghum starch gelatinization and fermentation on production of Chinese strong flavor Baijiu[J]. *Journal of Cereal Science*, 2022, 108: 103561.
- [23] 张浩. 液态发酵法生产浓香型白酒的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2017: 20-30.
ZHANG H. Study on the production of Luzhou-flavor liquor by liquid fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2017: 20-30.