

# 红曲与酵母共培养对红曲菌产酯的影响

刘桂君<sup>1</sup>, 尚宏忠<sup>1</sup>, 李艳敏<sup>2</sup>, 高畅<sup>2</sup>, 刘红霞<sup>2</sup>, 朱婷婷<sup>2</sup>

(1 北京市辐射中心微生物辐射育种实验室, 北京 100012; 2 北京顺鑫农业股份有限公司牛栏山酒厂, 北京 101301)

**摘要:** 主要研究酵母对红曲产乙酸乙酯能力的影响, 6株红曲单菌株液体培养乙酸乙酯产量大小关系为 M4>M5>M3>M1>M2>M6; 红曲、酿酒酵母 Y001 和生香酵母 Y005 液体共培养, 乙酸乙酯产量大小关系为 M5>M1>M2>M3>M4>M6。结果表明, 与酿酒酵母、生香酵母共培养对红曲乙酸乙酯产量影响较大。应用到酿酒生产中, 发现3种微生物混合菌种强化发酵的基酒中乙酸乙酯含量比普通基酒有较大提高。品评结果表明, 添加混合菌强化发酵的基酒在香气、口味上均有改善。

**关键词:** 红曲; 酿酒酵母; 生香酵母; 酯化力; 乙酸乙酯

中图分类号: TS261.1; TQ925.7; TQ920.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2011)10-0057-04

## Effects of Co-culture of Yeast and *Monascus sp.* On the Yield of Ethyl Acetate

LIU Guijun<sup>1</sup>, SHANG Hongzhong<sup>1</sup>, LI Yanmin<sup>2</sup>, GAO Chang<sup>2</sup>, LIU Hongxia<sup>2</sup> and ZHU Tingting<sup>2</sup>

(1. Lab for Microbial Radiation Breeding, Beijing Radiation Center, Beijing 100012;

2. Niulanshan Distillery, Shunxin Agriculture Co.Ltd., Beijing 101301, China)

**Abstract:** The effects of yeast on ethyl acetate-producing capability of red starter (*Monascus*) were studied. The yield of ethyl acetate of 6 red starter strains by liquid culture ranked in decreasing sequence as follows: M4>M5>M3>M1>M2>M6. However, the yield of ethyl acetate of 6 red starter strains by liquid co-culture with *S.cerevisiae* or ester-producing yeast ranked in decreasing sequence as follows: M5>M1>M2>M3>M4>M6. The results suggested that co-culture of red starter strains with yeast strains had great effects on ethyl acetate yield. In liquor-making practice, it was found that ethyl acetate content in base liquor by co-fermentation of red starter strains and yeast strains increased greatly than that in base liquor by common fermentation. Besides, tasting results also suggested that base liquor by co-fermentation of red starter strains and yeast strains got improved in aroma and taste.

**Key words:** *Monascus*; *Saccharomyces cerevisiae*; ester-producing yeast; esterifying capacity; ethyl acetate

红曲在酿酒中应用已有几千年的历史。红曲霉能够产生多种生物酶, 如淀粉酶、麦芽糖酶、酯化酶、脂肪酶、蛋白酶等。红曲发酵可有效分解利用原料中的淀粉, 将淀粉分解为微生物可利用的单糖, 与酒醅中其他微生物如根霉、黑曲霉等糖化力强的微生物共同作用, 可以更充分有效地将原料中的淀粉利用, 提高原料的糖化程度, 为提高出酒率提供原料基础。红曲发酵还可以产生大量的有机酸, 提高基酒的口感和丰满度。实验证明, 添加红曲可有效提高基酒总酸含量; 红曲中, 有的菌种具有较高的乙醇生产能力, 其中 *Monascus. anka*、*Monascus. ruber*、*Monascus. purpureas* 等均具有相似的乙醇生成能力, 可达到与酵母相同的发酵水平, 能产生 7.0% 以上的乙醇, 还能够产生异丁醇、异戊醇及少许正丁醇, 带有浓郁的甜味<sup>[1]</sup>; 红曲应用到白酒生产中主要的作用还是具有很强的酯化力, 能够利用酒醅中的乙醇、乙酸、己酸、乳酸等成

分, 大量合成乙酸乙酯、己酸乙酯、乳酸乙酯等酒中的主要酯类物质, 而且红曲基酒的总酯含量大大提高。王元太指出<sup>[2]</sup>, 采用人工高酯化能力的红曲霉菌种接种到强化大曲中, 可使 50% 以上的成曲断面出现红线和红心。使用该大曲生产的清香型原酒, 其总酯高达 5.0 g/L 以上, 如用于低度酒的调味酒, 结合其他生产工艺措施, 其总酯含量可高达 6.0 g/L 以上。

红曲的代谢产物中高级脂肪酸是一个重要的成分, 红曲可以产生豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生酸等多种, 对生产基酒的酒体的风味具有很好改善作用。红曲还可以产生 20 多种氨基酸, 其中包括人体必需的 8 种氨基酸, 为白酒中醇、酸、酮、醛、吡嗪等香味物质的形成提供了丰富的原料基础<sup>[3]</sup>。

笔者首先测定摇床液体培养红曲的酯化能力, 然后将红曲与酿酒酵母和生香酵母共培养, 测定其乙酸乙酯

收稿日期: 2011-05-19; 修回日期 2011-08-22

作者简介: 刘桂君, 女, 助理研究员, 主要从事微生物发酵及酿酒的研究, “清香大曲及酒醅中地衣芽孢杆菌的分离鉴定”曾获得第六届全国白酒行业生产技术与发展研讨优秀论文二等奖。

产量,研究共培养对红曲酯化能力的影响;最后将红曲、酿酒酵母和生香酵母按照一定比例添加到白酒酒醅中发酵,研究对基酒中酯类物质含量的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌种:红曲菌株 M1、M2、M3、M4、M5、M6,酿酒酵母 Y001,生香酵母 Y005,由牛栏山酒厂生产用酒醅和大曲中分离得到。

原料:高粱、稻壳为生产用原料。

红曲分离培养基:麦芽汁(8°Bx)900 mL,无水乙醇 100 mL,琼脂 25 g,用乳酸调 pH 值 4.0,121 °C 灭菌 20 min。倒平板前加 30 mg/L 链霉素 1.0~2.0 mL,用于抑制原核微生物如细菌和放线菌的生长<sup>[4]</sup>。

### 1.2 红曲的分离纯化

红曲分离采用稀释涂布平板法,取大曲或酒醅 5 g,加入到装有 45 mL 无菌水的三角瓶中,摇床 35 °C 培养 30 min,稀释后菌悬液浓度为  $10^{-1}$ ,从三角瓶中吸取 1.0 mL 菌悬液加入到装有 9.0 mL 无菌水的无菌试管中,混匀,稀释后浓度为  $10^{-2}$ ,依次稀释  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 。用无菌移液管吸取 0.1 mL 菌悬液在红曲分离培养基上,用涂布棒涂布均匀,置于 35 °C 恒温培养箱中培养。

开始红曲生长比较缓慢,仅有很短的菌丝,与其他霉菌区分不是很明显。后来逐渐形成单个菌落,红曲的特征逐渐明显,白色的菌丝逐渐变红,产生红色素,并且产生大量的孢子,使得红曲很容易与其他霉菌分开。在适宜浓度的平板中将红曲单菌落挑出转接到新平板中纯化培养,挑取菌落不同部位菌丝及孢子进行显微镜观察,直到镜检为纯菌种,停止纯化<sup>[5]</sup>。

应用上述方法,从牛栏山酒厂的大曲和酒醅中共分离筛选得到 6 株红曲,编号分别为 M1、M2、M3、M4、M5、M6。这 6 株红曲分别来自不同工艺、不同生产时间的大曲和酒醅中,在麦芽汁平板上培养特征各不相同,生化性能也各不相同。

### 1.3 红曲的液体培养

红曲液体培养基为麦芽汁(8°Bx),1000 mL 三角瓶装液 400 mL,121 °C,灭菌 20 min。将斜面试管菌种转接到三角瓶液体培养基中,置于 35 °C 恒温摇床,转速 150 r/min,培养 5~6 d。一部分待用,一部分蒸馏,馏出液待测定。

### 1.4 酿酒酵母和生香酵母的液体培养

酿酒酵母和生香酵母液体培养基为麦芽汁(12°Bx),1000 mL 三角瓶装液 400 mL,121 °C,灭菌 20 min。首先用 250 mL 三角瓶培养酵母液体种子,然后用液体种子

接种到 1000 mL 三角瓶中,接种量为 10%,培养 48 h,一部分待用,一部分蒸馏,馏出液待测定。

### 1.5 红曲、酿酒酵母及生香酵母的液体共培养

将培养好的红曲(按 1.3 方法)、酿酒酵母和生香酵母培养液(按 1.4 方法)按照比例接种,酿酒酵母和生香酵母接种量分别为 5%(20 mL),在无菌状态下,接入到装有 400 mL 红曲培养液的三角瓶中,然后再加入 60 mL 麦芽汁(8°Bx),此时的三角瓶中液体总体积为 500 mL。将三角瓶用封口膜封好,并用保鲜膜包裹,放置到恒温培养箱中,28 °C 静置培养,待发酵结束,7~10 d,取出蒸馏。

### 1.6 基酒的生产

普通基酒的生产:破碎好的高粱(4 瓣、6 瓣、8 瓣)用热水浸润 24 h,装甑清蒸 90 min,主要目的是使高粱中淀粉糊化的同时排除杂味。蒸完后取出摊凉,加入大曲粉后,拌匀,入缸发酵,待酒醅发酵成熟(28 d),添加适量辅料,拌匀,蒸酒,蒸完后取出酒醅摊凉,加入大曲粉后,拌匀,入缸发酵,待酒醅发酵成熟(28 d),添加辅料,拌匀,蒸酒,蒸完酒的酒醅作为酒糟废弃处理,重新进行下一轮次的实验,2 次蒸馏得到的酒除去酒头和酒尾后分段存放,即为普通基酒<sup>[6]</sup>。

红曲基酒的生产:在普通基酒生产工艺基础上稍作改进,在加入大曲粉后,加入一定比例的红曲,拌匀,入池或入缸发酵。

生香酵母基酒的生产:在普通基酒生产工艺基础上稍作改进,在加入大曲粉后,加入一定比例的生香酵母,拌匀,入池或入缸发酵。

红曲、酿酒酵母和生香酵母基酒的生产:在普通基酒生产工艺基础上稍作改进,在加入大曲粉后,加入按一定比例配比的强化菌种,红曲、酿酒酵母及生香酵母,拌匀,入池或入缸发酵。

### 1.7 蒸馏液及基酒成分的测定

蒸馏液及基酒成分的测定采用气相色谱仪,用内标法测定,内标物为乙酸正丁酯。取样品 5 mL,加入内标物 2 mL,定容 10 mL,进样测定。柱温 90 °C,检测器 135 °C,汽化室 135 °C,载气流量 30 mL/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 红曲、酿酒酵母和生香酵母液体培养乙酸乙酯产量

6 株红曲 M1、M2、M3、M4、M5、M6,酿酒酵母 Y001,生香酵母 Y005,液体培养分别采用同一批培养基、同样接种量、同样培养时间,同一批测定乙酸乙酯含量,保持实验条件一致。经过测定,得到液体培养红曲、酿酒酵母和生香酵母的乙酸乙酯产量,结果见表 1。

由表 1 数据得到,6 株液体培养红曲产乙酸乙酯的

表1 液体培养红曲、酿酒酵母和生香酵母产乙酸乙酯产量结果 (mg/100 mL)

项目	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Y001	Y005
乙酸乙酯	0.4	0.3	1.0	1.3	1.1	0.2	63.7	110.2

产量高低不同,其中M4、M5产乙酸乙酯能力最强,M3、M1、M2和M6则相对较差。酿酒酵母Y001菌株发酵产乙酸乙酯产量为63.7 mg/100 mL,是红曲的60倍,生香酵母Y005菌株发酵产乙酸乙酯产量可达110.2 mg/100 mL,是红曲的100倍,是酿酒酵母的1.7倍。在单菌株培养下,红曲产乙酸乙酯产量较低;酿酒酵母和生香酵母发酵产乙酸乙酯产量相对较高。

## 2.2 红曲、酿酒酵母及生香酵母液体共培养蒸馏液分析

选择6株红曲菌株,分别为M1、M2、M3、M4、M5、M6,在同一培养条件下进行实验,分析与酿酒酵母和生香酵母液体共培养对红曲发酵液中乙酸乙酯含量的影响,结果见表2,乙酸乙酯含量的对比关系见图1。

表2 红曲、酿酒酵母和生香酵母液体共培养发酵液蒸馏测定结果 (mg/100 mL)

项目	M1	M2	M3	M4	M5	M6
乙醛	38.5	46.2	13.6	7.9	16.6	21.9
甲醇	0.9	/	/	1.2	1.2	0.6
乙酸乙酯	964.9	637.4	518.2	421.4	969.4	322.4
正丙醇	24.4	30.5	30.7	22.7	21.7	15.9
仲丁醇	/	/	/	/	/	/
乙缩醛	13.2	24.4	6.4	3.2	6.6	7.1
异丁醇	35.2	36.5	76.6	75.9	103.3	42.8
正丁醇	0.7	/	3.2	6.2	12.1	3.2
异戊醇	62.1	76.1	85.5	69.7	103.4	48.6
乳酸乙酯	10.1	1.4	/	3.9	/	/

注:表2中“/”表示未检测到。

由表2和图1可知,6株红曲与酿酒酵母和生香酵母共同培养发酵液蒸馏后,乙酸乙酯含量由高到低分别

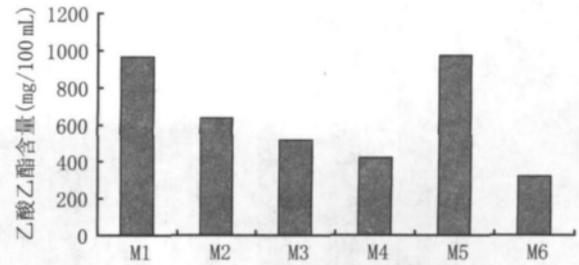


图1 红曲、酿酒酵母及生香酵母液体共培养乙酸乙酯含量对比

为:M5>M1>M2>M3>M4>M6,与单菌株液体培养红曲产乙酸乙酯含量由高到低:M4>M5>M3>M1>M2>M6的顺序不同。由此可见,酿酒酵母和生香酵母对红曲产酯能力具有一定影响,能够使自身产酯低的红曲菌株产酯能力大大提高。分析原因如下:单菌种培养红曲可能由于自身合成的底物——乙醇和乙酸的能力有限,所以生成的乙酸乙酯含量也就受限制;加入酿酒酵母和生香酵母之后,产生大量的乙醇和乙酸,在底物相对充足的条件下,红曲的酯化作用充分,生成的乙酸乙酯含量大大提高。上述数据充分表明,酿酒酵母和生香酵母对红曲产酯具有很好的促进作用。

## 2.3 基酒成分含量分析

主要对普通基酒,单独添加酿酒酵母、生香酵母、红曲生产的基酒,添加红曲、酿酒酵母和生香酵母生产的基酒成分进行测定,对比分析添加强化菌种对基酒乙酸乙酯含量的影响,分析结果见表3和图2。

由表3和图2可知,加入单菌株酿酒酵母、生香酵母对基酒乙酸乙酯含量提高效果不明显;加入红曲、酿酒酵母和生香酵母3种微生物对基酒乙酸乙酯含量有提高作用,说明仅有酿酒酵母或生香酵母不能大幅度提高基酒

表3 各种基酒测定结果

名称	乙醛	甲醇	乙酸乙酯	正丙醇	仲丁醇	乙缩醛	异丁醇	正丁醇	异戊醇	乳酸乙酯	
普通	15.9	6.3	210.3	17.8	/	33.2	18.4	/	58.9	30.9	
酿酒酵母	16.3	7.1	212.4	16.5	/	28.7	16.4	/	57.2	31.5	
生香酵母	16.1	7.8	213.7	18.7	/	22.4	15.9	/	58.3	29.6	
M1	a	19.5	4.8	313.4	19.7	/	77.7	16.8	/	50.0	12.4
	b	15.7	7.5	403.8	16.4	/	70.1	13.9	/	46.8	12.3
M2	a	13.3	9.5	284.8	17.9	/	19.6	15.8	0.7	57.5	9.2
	b	9.2	8.0	344.0	13.9	/	14.9	12.8	1.3	46.7	10.2
M3	a	9.9	8.7	230.8	22.8	/	31.6	16.1	0.7	54.9	17.3
	b	8.5	6.2	300.9	19.3	/	51.2	17.3	/	51.3	14.5
M4	a	13.2	3.5	222.4	18.1	/	45.6	15.9	0.6	50.2	22.3
	b	10.3	5.1	236.4	19.9	/	55.9	13.8	/	48.8	17.2
M5	a	19.2	6.9	407.8	16.5	/	41.4	16.0	/	44.8	8.9
	b	13.3	3.4	432.6	17.1	/	54.6	16.4	/	43.8	4.5
M6	a	9.8	7.8	215.4	17.0	/	18.4	13.7	0.4	49.3	25.5
	b	8.8	7.9	218.6	16.8	/	15.8	14.3	0.6	55.1	16.7

注:表中a代表只添加红曲作为强化菌种发酵蒸馏得到的基础酒;b代表添加红曲、酿酒酵母和生香酵母作为强化菌种发酵蒸馏得到的基础酒;“/”表示未检测到。

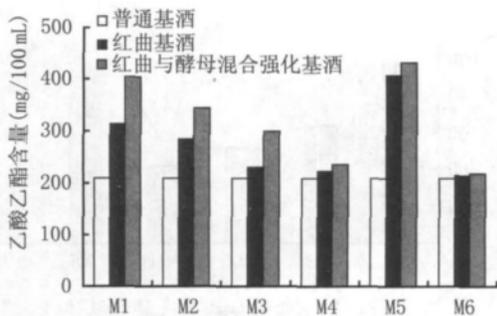


图2 各种基酒乙酸乙酯含量对比

乙酸乙酯含量, 需要与红曲共同作用来提高乙酸乙酯含量。在混合3种微生物强化发酵基酒中, 乙酸乙酯提升幅度最大的为M1和M5, 提高效果不明显的为M4和M6。只添加红曲的基酒, 乙酸乙酯含量增加主要是因为大曲中含有的酿酒酵母和生香酵母共同起作用, 达到提高乙酸乙酯含量的目的。按照本文方法除添加大曲外, 又按一定比例额外添加酿酒酵母和生香酵母, 这对乙酸乙酯含量提高具有明显作用, 以M1菌株提高幅度最大, 比单独添加红曲菌株基酒乙酸乙酯含量提高90.4 mg/100 mL。实验结果表明, 与酿酒酵母、生香酵母共培养能够促进红曲产生乙酸乙酯。

#### 2.4 基酒品评结果

对生产基酒感官进行品评, 结果见表4。

表4 基酒感官品评结果对比

样品	香气	口味	风格
普通基酒	清香正, 乙酸乙酯香气明显	入口柔和, 酒体较丰满, 后味长, 余味爽净	具有本品突出的风格
红曲基酒	清香纯正, 乙酸乙酯香气突出	入口柔和, 酒体较丰满, 后味长, 余味爽净	具有本品突出的风格
红曲、酿酒酵母和生香酵母基酒	清香纯正, 乙酸乙酯香气明显, 协调的复合香气	入口甜, 柔和, 酒体协调, 丰满, 后味长, 余味爽净	具有本品突出的风格

### 3 讨论

#### 3.1 单菌株培养的红曲, 乙酸乙酯产量较低, 主要由于

自身产生乙酸和乙醇微量, 没有充足的乙酸乙酯合成底物; 红曲的酯化能力不能发挥, 无法生成大量的乙酸乙酯。

3.2 单菌株培养的酿酒酵母和生香酵母能够产生大量的乙酸乙酯, 与红曲共培养能够大大提高乙酸乙酯产量, 证明乙酸乙酯不是主要由生香酵母产生, 而是3种菌株共同作用的结果。

3.3 红曲、酿酒酵母和生香酵母混合培养, 其中酿酒酵母能够提供大量的乙酸和乙醇, 有利于促进红曲通过酯化作用合成乙酸乙酯, 同时生香酵母也有生成乙酸乙酯的作用。添加菌种对红曲的酯化能力产生一定的影响, 对提高每株红曲生成乙酸乙酯量的程度不同, 有的提高幅度大, 有的提高幅度小。

3.4 液体培养红曲、酿酒酵母和生香酵母提高乙酸乙酯含量的规律在基酒的生产上同样适用。红曲的添加有助于基酒乙酸乙酯含量的提高, 红曲、酿酒酵母和生香酵母的添加更有利于基酒乙酸乙酯含量的提高, 而且通过品评发现, 混合菌种强化发酵对酒质的改善有很好的作用。

3.5 红曲、酿酒酵母和生香酵母共培养对红曲产酯影响的大小与菌株种类、添加量配比等关系密切, 研究共培养对红曲产酯的影响, 需要进一步对发酵机理、代谢关系进行研究, 是一个复杂的过程。

#### 参考文献:

- [1] 庄名扬. 红曲霉在中国白酒生产中的应用[J]. 酿酒, 2005(5): 101-102.
- [2] 王元太. 清香型白酒中温大曲生产工艺的改进[J]. 酿酒, 2000(4): 69-70.
- [3] 刘桂君, 李兰英. 红曲在牛栏山酒厂二锅头生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2008(4): 75-77.
- [4] 李晓楼. 大曲中红曲霉的简易分离方法[J]. 中国西部科技, 2007(5): 29-30.
- [5] 朱婷婷, 刘桂君. 应用红曲生产牛栏山二锅头基酒的研究[J]. 酿酒科技, 2009(9): 89-91.
- [6] 刘桂君, 刘红霞, 胡建华, 等. 地衣芽孢杆菌在牛栏山二锅头基酒生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2009(8): 83-84.

## 伊力特清洁生产拉开序幕

本刊讯 2011年9月21日 新疆伊力特实业股份有限公司四楼培训室内, 来自相关科室、酿酒厂厂长、车间主任等关键岗位人员150余人认真聆听了新疆旭日环境保护咨询公司的2名专家就清洁生产相关法律和清洁生产的益处、标准、意义以及作用的相关论述。

此次培训拉开了该公司推行清洁的序幕。据了解, 清洁生产是一种创新理念, 这种理念将整体预防的环境战略持续应用到生产过程、产品和服务中, 以增加生态效率和减少人类及环境的风险。通过提高能源、资源利用效率, 减少废物产生量, 达到环境与经济“双赢”目的。

素有“新疆第一酒”之称的伊力特公司发展处于上升时期, 市场竞争和社会的进步使得公众对环境的要求日益提高, 对白酒制造业生产也提出新的要求。通过开展卓有成效的清洁生产审核, 吨产品能源消耗必将进一步降低, 资源综合利用效率进一步提高, 最终达到提升企业管理、加快结构调整力度的目的, 使企业走上可持续发展的快车道。(朱绿琴)