

高产酯力红曲霉筛选及在西凤浓香调味酒生产中的试用

孟勤燕,张亚维,付万绪

(陕西西凤酒股份有限公司,陕西 凤翔 721406)

摘要: 从20多个大曲、酒醅中分离、纯化得一株具有高酯化性能的红曲霉 M-6,其最佳酯化条件为:时间30 d,温度35℃,pH 3.5,酒精度10%(v/v)。在酿酒生产试用中,加红曲霉 M-6生产的麸曲发酵酒比对照酒己酸乙酯高2倍多,在西凤浓香酒生产中试用效果比较明显,产酒己酸乙酯增高,酒窖香纯正浓郁、酒体醇厚爽净、回味好,质量优于对照样。(孙悟)

关键词: 红曲霉; 高酯化力; 西凤浓香调味酒; 生产试用

中图分类号:TS262.3; TS261.1; TQ925.7 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2006)05-0052-03

Screening of Monascus of High Esterifying Power & Its Trial Application in the Production of Xifeng Luzhou-flavor Blending Liquor

MENG Qin-yan, ZHANG Ya-wei and FU Wan-xu

(Shanxi Xifeng Liquor Co. Ltd., Fengxiang, Shanxi 721406, China)

Abstract: A monascus strain of high esterifying power (M-6) was successfully isolated from more than 20 kinds of Daqu and fermented grains and the best esterification conditions of M-6 were as follows: 30 d esterification, temperature at 35℃, pH value as 3.5, and alcohol content as 10%(v/v). Ethyl caproate content in fermenting liquor (produced by addition of M-6) was over two times of that in contrast liquor. The trial use of M-6 in Xifeng Luzhou-flavor liquor had achieved satisfactory effects compared with contrast samples: evident increment of ethyl caproate content, pure and mellow liquor flavor, enjoyable liquor aftertaste and clean liquor body, and better liquor quality. (Tran. by YUE Yang)

Key words: monascus; high esterifying power; Xifeng Luzhou-flavor blending liquor; trial application

浓香型、清香型、凤香型等酒的风味成分与酒中己酸乙酯、乙酸乙酯、乳酸乙酯等酯类成分的含量有关,特别是浓香型白酒中己酸乙酯的含量高低与酒的质量和风味密切相关。而这些酯的产生与酯酶或者说产酯酶的微生物密不可分。利用微生物的酯化功能来提高酒的酯含量,特别是有关红曲霉酯化能力的研究与应用是近年来酿酒行业的热点。

红曲霉是腐生真菌,它属于真菌门、子囊菌纲、真子囊菌亚纲、曲霉目、曲霉科、红曲霉属。红曲霉属中某些菌类具有较强的酯化生香功能,故有人也称其为酯化菌。而且红曲霉耐湿、耐酸、耐高温、耐酒精,能产生多种酶,有较强的糖化能力,几乎能100%水解淀粉。

由于红曲霉的特殊生理生化功能,故被酿酒界所重视而加以研究。“高产酯红曲霉筛选及在西凤浓香调

味酒生产中的试用”项目,是促使我厂快速提高优质西凤浓香调味酒质量的技术关键。该项目历时2年多,通过从本厂大曲、酒醅及其他名优酒厂的大曲、酒醅共20多个样品中筛选、分离、纯化红曲霉,获得1株具有较高酯化力的红曲霉 M-6,并经形态鉴定和酯化力检测符合立项目标。然后又对 M-6 进行了最佳酯化条件的确定实验。最后将其应用于西凤浓香调味酒的制酒生产试用,结果明显提高了成品酒的己酸乙酯含量,获得了较好的效益。本文总结报道该高产酯红曲霉的选育及在西凤浓香调味酒生产中的试用过程。

1 高产酯红曲霉的分离、筛选

1.1 菌株的分离源

分离样品:本厂大曲、酒醅及一些名优浓香酒厂的

收稿日期:2006-01-05

作者简介:孟勤燕(1974-),女,陕西凤翔人,大学本科,从事白酒酿造微生物研究,发表论文数篇。

大曲、酒醅。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基

10 Bx 麦芽汁, 乳酸 0.7%, 灭菌后加入 10% 的酒精。

1.2.2 分离、纯化培养基

6~8 Bx 糖液, 可溶性淀粉 5%, 蛋白胨 3%, 琼脂 3%, 冰乙酸 0.2%。

1.2.3 酯化用液体培养基

糖液 10 Bx, NaNO_3 0.2%, MgSO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.25%, pH 自然。

1.3 分离、筛选方法

1.3.1 富集培养

称取样品 10 g, 放入 250 mL 三角瓶中, 用 90 mL 无菌水浸泡 30 min, 用玻璃珠打散、澄清。取上清液 1 mL, 用无菌水稀释 10 倍, 取稀释液 0.5 mL 接种于富集培养基中, 35℃ 培养 14 d 后, 转接于另一富集培养基中培养 14 d, 如此反复多次, 选取出现红色菌丝体的生长迅速、菌体健壮的作为分离对象。

1.3.2 分离培养

取选取的富集试样 1 mL 加入到 9 mL 无菌水中, 依次用 10 倍无菌水作系列稀释, 稀释至 10^{-6} 。取各个稀释度的 0.5 mL 样加入到固体培养基平皿中, 32~34℃ 培养 5~6 d。为了控制菌落的过分扩张, 在培养基中加入 0.2% 的去氧胆酸钠, 便于菌落长成后挑取。

1.3.3 纯化培养

选取红色较纯、生长迅速、菌体健壮的菌株转接于试管斜面培养基上, 进一步对其纯化。再经反复多次分离、纯化, 最后得到 7 株菌种, 编号为 M-1, M-2, …… M-7。

1.4 形态特征鉴定

通过培养观察, 经 24 h 培养菌落初呈烟白色, 之后迅速生长, 3 d 后呈紫红色, 菌落大而紧密。7 株菌的形态特征均符合红曲霉属的特征, 菌丝具有横隔多核, 分枝甚繁, 分生孢子着生在菌丝及其分枝顶端, 单生或成链, 闭囊壳呈球形, 有柄, 内有 10 多个球形子囊, 子囊内有子囊孢子。

1.5 筛选高酯化力菌株

1.5.1 酶液的制备

将待测菌株接入酯化用的液体培养基中, 于 32~34℃ 培养 7 d, 将过滤所得上清液作为测定酯化酶活力的酶液。

1.5.2 酯化酶活力测定

分别取 25 mL 酶液, 加 1.7 mL 水, 0.3 mL 己酸, 3

mL 无水乙醇, 32~34℃ 酯化 7 d, 采用皂化法测定总酯, 结果见表 1。

表 1 酯化酶活力测定结果 (mg/100mL)

菌别	总酯	菌别	总酯	菌别	总酯
M-1	347.6	M-4	496.5	M-6	548.6
M-2	501.2	M-5	473.2	M-7	456.7
M-3	351.2				

从表 1 可知, 在 7 株菌的酯化力测定结果中, 产酯性能最高的为 M-6。因此, 可以初步确定 M-6 为分离筛选的高产酯红曲霉。

2 红曲霉 M-6 最佳酯化条件的确定

2.1 产酶培养基

麸曲培养基: 曲面 95%, 谷糠 5%, 水 40%。

麸皮培养基: 麸皮 100%, 水 50%, 葡萄糖 1%, 蔗糖 1%。

2.2 酯化方法

将红曲霉 M-6 菌株依次接入麦芽汁试管斜面、麸曲小三角瓶、麸皮大三角瓶, 最后制成麸曲, 干燥备用。

为优选试验方案, 简化试验次数, 从诸多影响红曲霉酯化作用的因素中, 选取时间、温度、pH 值、酒度 4 个主要影响因素, 采用 $L_9(4^3)$ 正交实验, 按在酒精水溶液中加入 10% 己酸、20% 上述麸曲, 做酯化优选试验。方案及结果见表 2, 表 3。

表 2 因素和位级设计

项目	位级		
	1	2	3
A 时间(d)	10	20	30
B 温度(°C)	25	35	45
C pH 值	2.5	3.5	4.5
D 酒精度	5	10	15

表 3 正交试验结果

实验号	A	B	C	D	质量
	1	2	3	4	己酸乙酯含量(g/L)
1	1	1	1	1	0.09
2	1	2	2	2	0.27
3	1	3	3	3	0.12
4	2	1	2	3	0.16
5	2	2	3	1	0.18
6	2	3	1	2	0.22
7	3	1	3	2	0.24
8	3	2	1	3	0.28
9	3	3	2	1	0.31
T1	0.16	0.16	0.20	0.19	T=1.87
T2	0.187	0.24	0.25	0.24	
T3	0.28	0.22	0.18	0.19	
优水平	A3	B2	C2	D2	

根据表 3 的正交试验结果, 可得出红曲霉 M-6 的

最佳酯化条件为:时间 30 d, 温度 35 , pH3.5, 酒精度 10%(v/v)。同时, 还可看出酯化时间越长, 酯化效果越明显, 但考虑经济效益和综合分析, 一般选 30 d 为宜。

3 红曲霉 M-6 在酿酒生产中的试用

3.1 红曲霉 M-6 在液态发酵中的小试

为确保酯化红曲霉 M-6 在西凤浓香调味酒生产中的试用万无一失, 先在实验室用浓缩果汁为原料, 在液态发酵中使用红曲霉 M-6 制成的麸曲, 对比己酸乙酯生成情况。

3.1.1 发酵液的制作

将浓缩果汁调整到糖度 10 Bx, pH 值 3.5。作成 3 个卡氏罐, 记为 1#, 2#, 3#。1# 罐作对照。

3.1.2 酯化小试方法及结果

在 1#, 2#, 3# 卡氏罐中分别加入 2% 大曲粉, 发酵培养 12 d 后, 再分别加入 5% 乙醇, 1% 己酸。然后在 2#, 3# 罐中加入制作的麸曲, 1# 罐作对照。密封发酵, 17 d 后蒸馏。蒸馏时取 500 mL 发酵液蒸出 100 mL 酒样。对蒸馏液作色谱分析, 结果见表 4。

表 4 蒸馏液色谱分析结果 (mg/100mL)

试验号	己酸乙酯	乙酸乙酯	乳酸乙酯
1#	55.64	30.16	6.99
2#	105.63	17.92	4.18
3#	89.52	15.30	6.80

由表 4 可看出, 加入由红曲霉 M-6 制作的麸曲, 发酵酯化效果明显优于对照样, 己酸乙酯增加了 2 倍多。由此可见, 红曲霉 M-6 菌株具有较高酯化能力。

3.2 红曲霉 M-6 菌在西凤浓香调味酒生产中的试用

白酒酿造是集糖化、发酵、酯化为一体的生化代谢过程。酿造前期主要生成各种酸类和醇类物质, 中后期酸与醇在酯化酶的作用下, 在适当的条件下进行生化反应, 逐步生成各种酯类, 形成白酒的独特风格, 尤其是酯化红曲更具有促进己酸乙酯合成的功能。

基于上述结果, 并在 3.1 中液态小试实验结果的基础上, 在制酒三车间的两个质量相对较差的 4# 和 43#

窖的主发酵的中后期添加红曲霉 M-6 麸曲培养液, 揭窖后对其新产酒的己酸乙酯值与上一排进行对比, 结果见表 5。

表 5 添加红曲霉 M-6 麸曲培养液的试验窖 4#, 43# 产酒与上排的对比结果 (mg/100mL)

窖别	分段摘酒	上排对照	本排	增加值	目标值
4#	前段酒	147.8	245.6	0.978	0.5
	中段酒	223.3	302.2	0.789	
	后段酒	102.6	143.9	0.413	
43#	前段酒	193.0	278.5	0.855	
	中段酒	173.9	229.6	0.557	
	后段酒	109.9	122.2	0.123	

表 5 结果表明, 试验窖所产酒己酸乙酯值均有提高, 特别是所产酒的前段酒、中段酒的己酸乙酯提高值均超过目标值 0.5 g/L, 甚至达到了 0.978 g/L。

4 结论

4.1 从 20 多个大曲、酒醅中分离、纯化得 7 株红曲霉菌种, 再经酯化力筛选, 获得了具有较高酯化性能的红曲霉 M-6。

4.2 红曲霉 M-6 最佳酯化条件确定为: 时间 30 d, 温度 35 , pH 3.5, 酒精度 10%(v/v)。

4.3 红曲霉 M-6 在酿酒生产中的试用阶段, 液态小试是成功的, 加入红曲霉麸曲的比对照所产酒己酸乙酯高 2 倍之多。在西凤浓香酒生产中试用后效果也是比较明显的, 所产酒己酸乙酯增高, 品尝口感也优于对照样, 达到了立项目标。

4.4 红曲霉 M-6 在酿酒生产中的试用, 用的是红曲霉培养液, 菌体占优势, 而红曲霉发挥酯化性能主要是以酶体状态。所以应制作酯化红曲, 将红曲霉 M-6 制成酶体占优势状态的麸曲, 并改进使用方法, 在西凤调味酒生产中作进一步试验。

4.5 红曲霉嗜酸, 在弱酸性环境中能以乳酸为碳源, 繁殖发酵, 同时产生酯化酶促进己酸与乙醇生成己酸乙酯, 从而起到增己降乳的作用。

显, 酒的风味特征更向香浓、味长、幽雅方向转化。用于勾兑酒, 酒的口感更加细腻、绵软, 消费者更容易接受。

3.3 分离得的 SGAS2004.0001 和 SGAS2004.0002 酯化菌株, 培养条件要求较高, 此菌的培养是在公司的净化微生物实验室完成的, 粗放培养条件容易染菌。

3.4 采用麸曲培养, 在种曲的干燥上, 必须严格控制干燥温度, 不能过高, 干燥温度在 25~35 之间, 否则会影响微生物的生物活性和酶活性。

3.1 分离出的 SGAS2004.0001 菌种, 其耐酸能力 (己酸) 为 1%, 最佳酯化能力达到 10%(v/v) 以上, 以 14% 为最佳; 并利用该菌株制成麸曲, 用于我公司的双轮底酒生产和公司的制曲生产中, 通过试验得出: 双轮底酒的己酸乙酯含量平均增加 65 mg/100 mL, 用 SGAS2004.0001 菌种接种的大曲生产, 产酒的己酸乙酯的平均含量增加了 32 mg/100 mL。

3.2 采用分离得的酯化菌种在酿酒生产中应用, 所产酒与原工艺产酒相比, 特别是在感官质量上提高较明

(上接第 51 页)