

红曲霉的分离鉴定及其在米酒中的应用

卫春会¹, 朱金凤¹, 程国富², 任志强^{1,3}, 邓杰^{1,3}, 黄治国^{1,3*}

(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. 四川宇晟酒业投资管理有限公司成都分公司, 四川成都 610000) (3. 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)

摘要: 为满足米酒的多元化发展需求, 该实验以筛选得到的红曲霉进行红曲米酒发酵, 并通过单因素与正交试验进行红曲米酒发酵工艺优化并进行挥发性风味物质的测定。试验从红曲米中分离筛选到1株霉菌, 依据形态和ITS序列鉴定, 确定该菌株为紫色红曲菌 (*Monascus purpureus*), 命名为JXY。以此红曲霉制作的小曲、活性干酵母为糖化发酵剂, 糯米为原料, 经工艺优化发酵后的红曲米酒色泽淡红, 澄清透亮, 酒香浓郁, 富含淡淡的清香, 是一款具有红曲独特风格的低酒度新型保健米酒。此红曲米酒的最佳工艺条件为: 料液比 1:2.0 g/mL, 发酵时间 8 d, 红曲霉种子液接种量体积分数 6%, pH 值 6.0, 发酵温度 28 °C。在此最佳条件下, 红曲米酒酒精度为 13.21%vol, 经 10 名专业人员品评后得到感官评分达最高 92 分, 同时通过挥发性风味物质测定发现酯类物质种类共有 8 种, 醇类物质相对含量达到 82.22%。这对红曲霉在米酒酿造中的应用和红曲米酒的品质提升有一定指导作用。

关键词: 红曲霉; 米酒; 正交试验; 工艺优化; 感官评分

文章编号: 1673-9078(2024)09-135-143

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0900

Isolation and Identification of *Monascus* and Its Application in Rice Wine

WEI Chunhui¹, ZHU Jinfeng¹, CHENG Guofu², REN Zhiqiang^{1,3}, DENG Jie^{1,3}, HUANG Zhiguo^{1,3*}

(1. Sichuan University of Science & Engineering, Liquor Brewing Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, China) (2. Chengdu Branch of Sichuan Yusheng liquor Investment Management Co. Ltd., Chengdu 610000, China) (3. Liquor Brewing Biotechnology and Intelligent Manufacturing Key Laboratory of China Light Industry, Yibin 644000, China)

Abstract: In order to satisfy the diversified development needs of rice wine, in this experiment, the screened *Monascus* was used for Hongqu rice wine fermentation, and the fermentation process of Hongqu rice wine was optimized by the single factor and orthogonal tests, and volatile flavor substances were determined. One mold strain was isolated and screened from Hongqu rice, and according to morphology and ITS sequence identification, the strain was determined was *Monascus purpureus* (named JXY). Using the Xiaoqu made by this *Monascus*, active dry yeast as the saccharification and fermentation agent, glutinous rice as the raw material, the Hongqu rice wine produced via the optimized fermentation process was light red in color, clear and translucent, with rich wine aroma and soft fragrance, thereby being a new type of low-alcohol healthy rice wine with a unique style of Hongqu. The optimal process conditions for this Hongqu rice wine were: material-liquid ratio, 1:2.0 (g/mL); fermentation time, 8 d; inoculation volume fraction of *Monascus* seed liquid, 6%; pH value, 6.0; fermentation

引文格式:

卫春会,朱金凤,程国富,等.红曲霉的分离鉴定及其在米酒中的应用[J].现代食品科技,2024,40(9):135-143.

WEI Chunhui, ZHU Jinfeng, CHENG Guofu, et al. Isolation and identification of *Monascus* and its application in rice wine [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 135-143.

收稿日期: 2023-07-25

基金项目: 四川轻化工大学研究生创新基金项目 (Y2023218); 四川轻化工大学产学研合作项目 (HX2020128)

作者简介: 卫春会 (1980-), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 酿酒生物技术及应用, E-mail: 147516753@qq.com

通讯作者: 黄治国 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酿酒生物技术及应用, E-mail: hzguo@suse.edu.cn

temperature, 28 °C. Under this optimal condition, the alcohol content of Hongqu rice wine was 13.21%vol, and the sensory score reached the highest 92 points during the evaluation by 10 professionals. Meanwhile, a total of 8 types of ester substances and 82.22% relative content of alcohols were found through the determination of volatile flavor substances. This has a certain guiding effect on the application of *Monascus* in rice wine brewing and the quality improvement of Hongqu rice wine.

Key words: *Monascus*; rice wine; orthogonal experiment; process optimization; sensory scores

甜米酒是我国传统的健康酒饮,通常以糯米为原料,通过根霉和酵母等微生物发酵制成^[1]。甜米酒种类繁多,不同地区具有很大差异性。红曲霉是一类小型丝状腐生真菌,其代谢产物在食品、药品领域应用广泛。由红曲霉接种于大米发酵得到的红曲具有防腐、解毒、消食活血、健脾之功效^[2]。红曲酒作为一种传统保健酒^[3],在我国已有1 000多年的历史。在发酵过程中,红曲霉具有糖化力和酯化力^[4],通过代谢生成醌类、酚类和酸类等物质^[5],这些物质丰富了米酒的风味和口感,对产品质量有很大贡献^[6]。因此,红曲霉被认为是酒类合成脂肪酸酯最重要的微生物之一^[7]。而红曲甜米酒作为保健型的功能食品在生产中添加红曲发酵是为了利用红曲在酿造中能够产生的多种有益次生代谢产物,这些有益次生代谢产物进入酒体后,对米酒的外观、色泽以及营养保健价值都有所提升,从而改善米酒的口感、视觉感官等^[8]。

近年来国内对米酒的研究主要集中在对某些特定原料及地域性米酒品质的分析^[9,10]、对米酒生产工艺的研究仅限于利用酒曲发酵及其对香气成分的影响^[11]、对创新提高米酒功能特性的米酒的研究^[12]以及米酒中米淀粉晶体结构对其的质量影响研究^[13],而以红曲霉、酿酒酵母等微生物酿造米酒的发酵工艺条件研究鲜见报道。米酒产品以糯米为主,难以满足多样性的消费需求,为丰富米酒的种类和提升不同经济作物的食用价值,需开发一种新型米酒。红曲米是我国常用的一种食品着色剂^[14],由稻米经红曲霉(*Monascus purpureus*)发酵而成。试验从红曲米中分离出红曲霉纯培养菌株,将其用于米酒的发酵优化,从而提升米酒品质,以期得到一款具有红曲独特风格的米酒,满足米酒的多元化发展需求。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

糯米、红曲米、土豆,市售;黄酒活性干酵母,湖北安琪酵母股份有限公司。

亚硫酸氢钠、氢氧化钠、硫酸、苯酚、酒石酸钾钠、EDTA、葡萄糖、乙酸钠、磷酸氢二钾、柠檬酸氢二铵(分析纯),成都市科隆化学品有限公司;牛肉粉、琼脂粉、蛋白胨(生化试剂),北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.2 主要仪器设备

CP214 电子天平,奥豪斯仪器有限公司;SW-CJ-1F 净化工作台,上海博迅实业有限公司医疗设备;LRH-150-B 生化培养箱,广东泰宏君科学仪器股份有限公司;CI54DS 立式自动压力蒸汽灭菌器,致微仪器公司;ZWYR-D2403 智城恒温培养箱振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;LS-0610 干燥箱,杭州乐乾科学仪器有限公司;1000A 多功能粉碎机,永康市红太阳机电有限公司;MaxQ4000 大型台式恒温冷冻摇床,天津市泰斯特仪器有限公司;LM79-j10 酒精计,成都东立恒达科技有限公司。

1.3 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂粉 20 g/L。用于红曲霉菌株的纯化、活化和保存。

1.4 试验方法

1.4.1 红曲霉菌株的分离与纯化

取少量红曲米,加入带有玻璃珠的无菌水三角瓶中,摇床培养 30 min,接种环蘸取,在 PDA 培养基平板上划线分离,28 °C 恒温培养 48 h,长出白色或红色绒毛状菌丝,挑取单菌落转移接种于 PDA 斜面试管培养基上纯化培养 7 d,重复上述纯化操作 3 次,即可得到红曲霉的纯菌株。

1.4.2 红曲霉菌株的鉴定

1.4.2.1 菌株DNA的提取流程

菌体裂解及抽提→沉淀→洗涤→DNA 收集

1.4.2.2 引物设计

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'.

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

1.4.2.3 菌株序列扩增

PCR 反应条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s；55 °C 退火 30 s；72 °C 延伸 90 s；72 °C 补充延伸 10 min，共 30 个循环。反应体系：10× Buffer 2.5 μL；25 mmol/L Dntp 2.0 μL；MgCl₂ 2.0 μL；10 μmol/L 正向引物 1.0 μL；10 μmol/L 反向引物 1.0 μL；5 U/μL EXTaq 酶 0.5 μL；DNA 模板（原液稀释 20 倍）1.0 μL；ddH₂O 15.0 μL。

1.4.2.4 PCR产物电泳检测

PCR 扩增效率用质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳确认，将目的片段送至上海杰李生物公司测序。

1.4.2.5 微生物多样性系统发育分析

PCR 扩增产物送到上海杰李生物公司测序，将测序结果在 NCBI 中运用 BLAST 比对，用 MEGA6 软件制作系统发育树，分析菌株的种属及其系统发育关系。

1.4.3 三角瓶曲种的制备

参照纯种麸曲制曲工艺^[15]。装入灭菌后的 50 g 麸皮、水 50 mL 于 500 mL 三角瓶中，搅拌均匀，121 °C 下灭菌 20 min。制作菌悬液加 10 mL 无菌水到培养好的红曲霉试管中，制成均匀分散的菌悬液，取 25 μL 稀释 10⁵ 的菌悬液于显微镜下镜检。接种取 10 mL 红曲霉菌悬液倒入灭菌好的麸皮内，搅拌均匀，在 30 °C 下呈堆积状进行培养。培养每隔 8 h 摇瓶 1 次，32 h 摊平，摇床培养 4~5 d。培养好的三角瓶曲种用于小曲制作。

1.4.4 红曲霉小曲制作方法

1.4.4.1 工艺流程

糯米 → 粉碎 → 过筛 → 烘干 → 三角瓶分装 → 加水拌和（加入三角瓶曲种） → 人工成型 → 入箱培养 → 成曲

1.4.4.2 操作要点

粉碎：将 200 g 糯米粉碎成粉，用 100 目筛子筛出 1/4 作为细粉，即粗糯米粉 150 g，细糯米粉 50 g。三角瓶分装：按照粗粉质量分数 2%、细粉质量分数 4%，称粗糯米粉 3 g，细糯米粉 2 g 装入三角瓶备用。加水拌和：计算出体积分数 42% 水分所需加水量，混合后用手将 1.4.3 中的三角瓶曲种与粗粉揉捏成团子形状放入空托盘内，将所得的团子裹上细粉定形，准备 4 层纱布与橡胶圈。将做好的曲放入托盘中，喷上无菌水让托盘表面保持湿润后，放入 28~30 °C 培养 4~5 d。

1.4.5 红曲米酒的酿造

1.4.5.1 工艺流程

糯米挑选 → 清洗 → 浸泡 → 蒸饭 → 淋冷 → 拌曲 → 搭窝、

糖化 → 过滤、澄清 → 成品

1.4.5.2 操作要点

糯米挑选：原料要求颗粒饱满，无虫蛀、无霉变、无其他杂质。洗米、浸米：取 2 000 g 糯米，放入白色橡胶框加水浸泡 24 h。蒸饭：用实验室高压蒸汽锅蒸 40 min 左右。淋冷：将蒸好的饭放于纱布上，用无菌水冲冷，使米饭快速降温至 35 °C 左右。黄酒活性干酵母的活化：酵母用量为投料量的质量分数 1%。取 2.5 g 活性干酵母在 50 mL 质量分数 2% 蔗糖液中 38~40 °C 复水活化，自然降温到 34 °C 以下活化 15~30 min。糖化发酵：将加曲后的米饭装入发酵罐中，搭成喇叭型的凹窝，表面再撒上少许小曲、酵母，充分搅拌均匀，待酒体分层糯米下沉后即可发酵结束。过滤：将发酵结束后的醪糟用 4 层纱布过滤后得到原液成品米酒。煎酒：煎酒的目的是灭菌，以利于久藏。考虑到乙醇沸点为 78 °C，故将温度设在 60 °C，维持 30 min^[16]。

1.4.6 红曲米酒发酵条件优化

1.4.6.1 单因素试验

影响发酵效率的因素较多，研究表明^[17]接种量、发酵时间、发酵温度和料液比等因素对液态发酵影响较大。试验选择红曲霉种子液接种量体积分数（移入种子液的体积和接种后培养液体积的比例）分别为 2%、4%、6% 和 8%；发酵时间分别为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 d；发酵温度分别为 26、27、28 和 29 °C；料液比（糯米量：水，g/mL）1:1.0、1:1.5、1:2.0、1:2.5 和 1:3.0；pH 值分别为 4.0、5.0、6.0 和 7.0，以感官评分和酒精度的含量为指标，确定各因素的最佳发酵条件。

1.4.6.2 正交试验

根据单因素试验所得发酵条件，在料液比 1:2.0 g/mL，发酵时间 8 d 的条件下，选择发酵温度、红曲霉种子液接种量和 pH 值 3 个因素对感官质量的交叉影响进行 L₉(3³) 正交试验，因素与水平编码如表 1 所示。

表 1 正交试验因素与水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels

水平	A 发酵温度/°C	B 接种量/%	C pH 值
1	27	4	5
2	28	6	6
3	29	8	7

1.4.7 理化指标测定方法

小曲糖化力的测定，采用斐林试剂滴定法^[18]；

酒精度的测定, 采用酒精计法^[19]。

1.4.8 感官评分方法

评定小组由 10 名试验人员组成, 主要针对酒的外观, 香气, 滋味和风格进行评价^[20], 评定标准见表 2。

表 2 红曲米酒感官评定标准

指标	评分标准	分数/分
外观 (15分)	淡黄色	1~4
	橙红色	5~10
	柔和的宝石红色	11~15
香气 (35分)	香气不突出, 有异味	1~10
	香气较淡, 无异味	11~24
	纯正醇和的发酵酒香, 无异味	25~35
滋味 (40分)	甜酸醇涩失调, 口感粗糙	1~10
	酸甜适度略欠醇和厚实, 口感较细腻	11~25
	甘甜可口醇厚绵甜, 口感细腻	26~40
风格 (10分)	色、香、味不协调, 风格不明显	1~5
	酒体协调, 具有红曲黄酒独特风格	6~10

1.4.9 挥发性风味物质测定方法

采用顶空-固相微萃取(HS-SPME)法处理样品, 取发酵结束后的红曲米酒 5 mL 加入到 15 mL 样品瓶中, 分别加入 1.5 g NaCl、50 μ L 2-辛醇和磁力转子后, 将样品瓶放于 50 $^{\circ}$ C 水浴磁力搅拌加热台上预热 5 min, 萃取针经 230 $^{\circ}$ C 老化处理 30 min 后插入样品瓶, 于 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴条件下萃取 45 min, 插入 GC-MS 分析仪器进样口, 解析 5 min, 采集样品数据。

气相色谱-质谱条件: DB-WAX (60 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m) 色谱柱; 载气为高纯 He, 流量 1 mL/min, 进样口温度 230 $^{\circ}$ C; 程序升温: 初始温度为 40 $^{\circ}$ C 保持 2 min, 然后以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 110 $^{\circ}$ C 保持 3 min, 再以 5 $^{\circ}$ C/min 升至 150 $^{\circ}$ C 保持 2 min, 最后以 8 $^{\circ}$ C/min 升至 230 $^{\circ}$ C, 保持 6 min。电子离源(EI), 70 eV 电子能量, 采集模式为全扫描, 质量范围 20~550 u, 离子源温度 230 $^{\circ}$ C。

定性: 挥发性风味物质成分利用质谱全离子扫描模式下的总离子流图谱, 依据色谱保留时间和质谱信息、NIST 标准谱库比对结果以及参考相关文献相结合的方法进行定性分析。

定量: 采用内标法, 各挥发性风味物质成分质量浓度计算公式如下:

$$X = \frac{A' \times C}{A} \quad (1)$$

式中:

X—香气物质质量浓度, μ g/L;

A'—测得挥发性风味物质的峰面积;

C—内标物质量浓度, μ g/L;

A—内标物的峰面积。

1.5 数据处理方法

每组试验均重复 3 次, 试验结果均用“平均值 \pm 标准偏差”表示, 用 Excel 2022 软件对数据进行处理, 用 SPSS 22.0 软件进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 红曲霉分离纯化

在 PDA 固体培养基上, 菌株于 30 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d 后可见白色团状菌丝, 7 d 后菌丝转为红色, 红色素扩散至整个培养基中, 菌落形态图如图 1a 所示, 与郑平等^[21]在分离培养基上红曲霉的观察结果相似。菌株在显微镜下形态特征如图 1b 所示。按照《真菌鉴定手册》^[22]所描述的红曲霉菌丝形态特征对筛选的红曲霉纯菌株进行分类鉴定, 初步确定该菌株为红曲霉属(*Monascus*)。

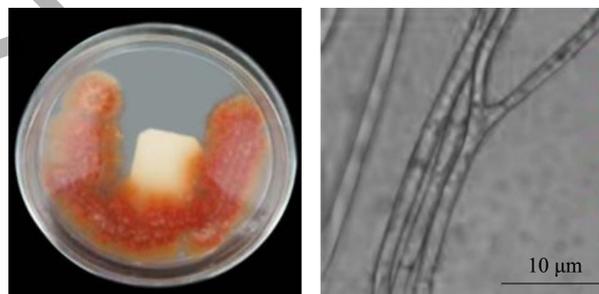


图 1 红曲霉的菌落形态及菌丝形态

Fig.1 Colony morphology and hyphal morphology of *Monascus*

注: (a) 菌落形态; (b) 菌丝形态。

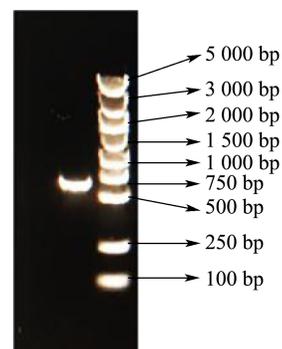


图 2 菌株 PCR 扩增电泳图

Fig.2 PCR amplification electropherogram of the strain

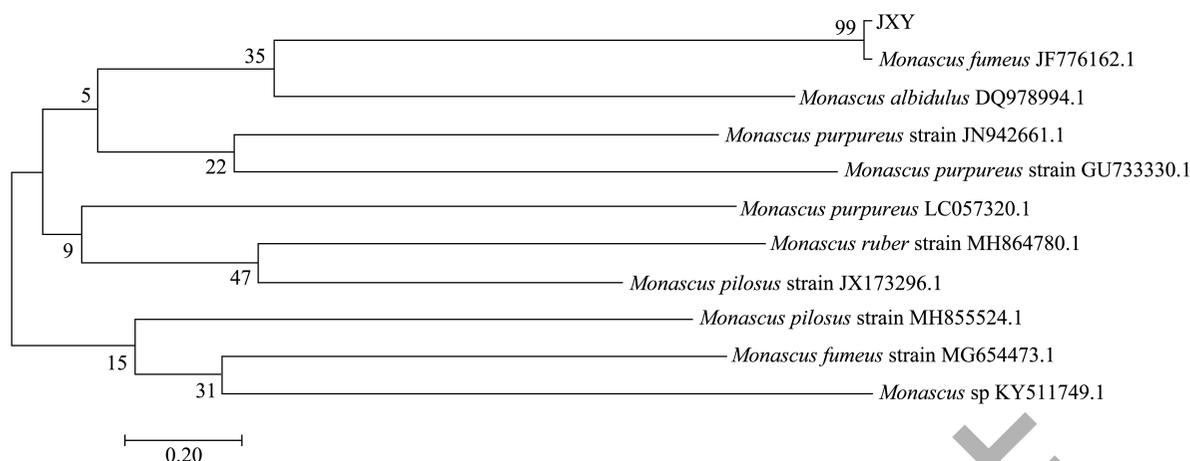


图3 系统树构建图

Fig.3 System tree construction diagram

2.2 红曲霉鉴定

2.2.1 DNA凝胶电泳图

对试验菌株进行 PCR 扩增, 如图 2 知, 该基因片段在 750 bp 左右, 属于正常范围。Maker 和样品的条带亮度较高, 表明 PCR 扩增效果较好。

2.2.2 系统发育树

将该菌株测序结果在 NCBI 进行 BLAST 比对, 并采用邻接法构建系统发育树, 结果如图 3 所示。根据 BLAST 比对, 菌株与 *Monascus fumeus* JF776162.1 相似性达到 99.00%, 且在系统发育树中聚于同一分支, 可以确定菌株为红曲霉 (*Monascus purpureus*), 并将其命名为 *Monascus purpureus* JXY。

2.3 红曲霉小曲的制备结果



图4 红曲霉制作的小曲

Fig.4 Xiaoqu made by *Monascus*

由图 4 可得, 制得的小曲形态为球体形状, 其表面生长红曲霉的菌落, 部分位置可见有菌丝长出, 闻起来有浓烈香味。测得该小曲的糖化力 553.3 U/g, 与陈小琴等^[23]制备的 4 种小曲的糖化力 122.40^a、102.93^b、91.07^c、102.27^b U/g 相比, 糖化力更

高。可能是红曲霉可代谢生成多种酶类, 如葡萄糖淀粉酶、葡萄糖苷酶等, 有利于将淀粉水解为葡萄糖, 故添加红曲霉的小曲要比普通小曲以及添加石斛小曲的糖化力更高, 而较高糖化力有利于发酵更完全, 发酵所得红曲米酒更醇厚。

2.4 红曲米酒发酵条件优化单因素试验

2.4.1 料液比对酒精度和感官评分的影响

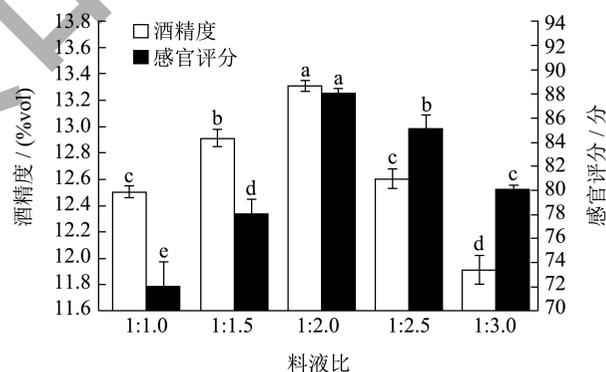


图5 料液比对酒精度和感官评分的影响

Fig.5 Effect of material fluid ratio on alcohol content and sensory scores

注: 不同试验组米酒酒精度或感官评分的差异用字母表示, 无相同字母的差异显著 ($P < 0.05$); 下同。

由图 5 可知, 随着料液比不断增加, 感官评分呈先稳定上升后缓慢下降的变化趋势, 酒精度呈先缓慢上升后稳定下降的变化趋势。这是因为料液比太小时, 发酵液中底物浓度太大, 酵母很难起酵, 感官评分较低, 发酵后醪液的乙醇含量也不高; 料液比太大时, 发酵液底物浓度变小, 可发酵性糖含量减少, 发酵过程低缓, 感官评分降低, 发酵液酒精度降低。因此, 在料液比 1:2.0 g/mL 时, 淀粉

的转化达到平衡状态, 感官评分达到峰值, 酒精度为 13.30%vol 较合理, 酒体较协调, 口感醇厚, 风味突出, 感官评分达到最高 88 分, 显著高于其他组 ($P<0.05$)。李刚凤等^[24]对天麻米酒发酵进行工艺优化, 其料液比为 1:2.0 g/mL 时, 天麻米酒的感官评分最高达到 87 分, 酒精度为 8%vol, 制得天麻米酒口感饱和、风味清香、醇香浓郁。故确定最佳料液比为 1:2.0 g/mL。

2.4.2 发酵时间对酒精度和感官评分的影响

发酵时间与微生物的生长阶段密切相关。如图 6 所示, 随着发酵时间延长, 红曲米酒的感官评分先逐渐上升后缓慢下降, 酒精度先逐渐上升后略有下降。这可能是因为发酵前期 2~3 d 时, 红曲霉处在自身生长阶段, 酵母菌可用营养物质不足, 未能及时进行后酵过程, 导致感官评分较低, 香气物质缺乏; 但随着发酵时间延长到 9~12 d 时, 红曲米酒中的糖分被酵母彻底转化为酒精, 发酵过度, 酒精度普遍较高 (其略有下降可能为乙醇挥发所致), 酒味浓烈, 糖度下降, 感官评分降低, 所以适宜的发酵时间可保证红曲米酒的最佳口感。本试验在 8 d 时, 感官评分达最高值 95 分, 酒精度为 12.80%vol 较合理, 显著高于其他发酵时间 ($P<0.05$)。与孔凡利等^[25]进行番石榴米酒酿造工艺优化时, 得到当发酵时间为 8 d 时, 番石榴米酒酒色澄清, 口感佳, 感官评分最高的研究结果相似。故选择 8 d 为红曲米酒的最佳发酵时间。

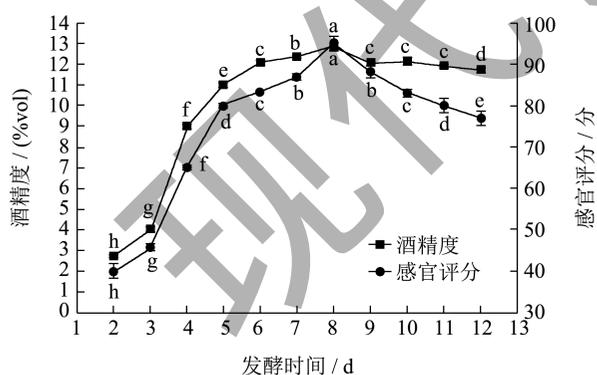


图 6 发酵时间对酒精度和感官评分的影响

Fig.6 Effect of fermentation time on alcohol content and sensory scores

2.4.3 红曲霉种子液接种量对酒精度和感官评分的影响

接种量是决定发酵过程中微生物生长的重要因素, 对红曲米酒的色泽、风味、成分都有影响。由图 7 可知, 随着红曲霉种子液接种量升高, 酒精度

稳定上升, 感官评分呈先上升后下降的变化趋势。这可能是因为接种量小时, 发酵缓慢, 感官评分较低; 接种量大时前期发酵旺盛, 酒精度过高, 酒味变重, 略带苦涩味, 感官评分降低。因此接种量体积分数 6% 时米酒的感官评分最高达到 90 分, 显著高于其他接种量 ($P<0.05$), 其糖化旺盛, 酒体香气协调, 醇甜适口, 无苦涩味, 典型性好。陈雪梅等^[26]使用红曲霉发酵米酒的研究显示, 接种量偏高或偏低都会导致甜米酒的色、香、味欠佳, 根据实验选择适宜的接种量尤为重要, 过高则会增加生产成本。故本试验确定最适接种量为体积分数 6%。

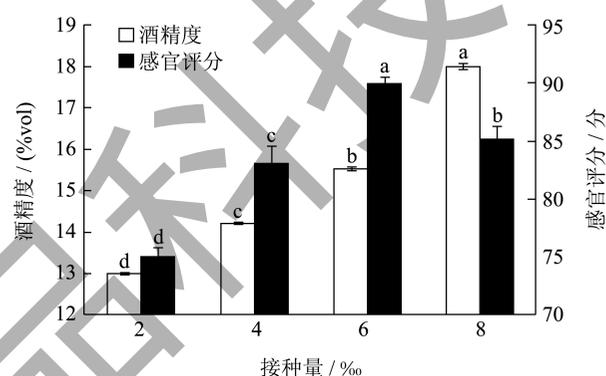


图 7 接种量对酒精度和感官评分的影响

Fig.7 Effect of inoculum size on alcohol content and sensory scores

2.4.4 pH 值对酒精度和感官评分的影响

pH 值是微生物生长和产物合成过程中重要的生理参数之一, 会影响菌体对养分的吸收和代谢产物的分泌, 红曲霉在 pH 值 4.0~7.0 条件下, 发酵能力最强。实验用 1 g/L 的无水柠檬酸溶液制得初始 pH 值为 4、5、6、7 的蒸馏水浸泡糯米 24 h 后进行酒精发酵, 对发酵后的红曲米酒进行酒精度的测定和感官评价, 得到的结果如图 8 所示。由图 8 可知, 随着 pH 值的增加, 感官评分呈现先上升后下降的趋势。这可能是因为初始 pH 值在 4、5、7 时影响了红曲霉的代谢, 不利于其产生红色素, 米酒颜色较暗淡, 感官评分较低。因此由感官评价可以得出 pH 值为 6.0 的米酒具有纯正、优雅、和谐的酒香, 米酒颜色鲜亮透红, 感官评分显著高于其他组 ($P<0.05$), 且酒精度为 13.30 %vol 较合理。蒋冬花等^[27]对 pH 值对红曲霉菌株产生红曲色素进行研究, 当初始 pH 值为 6.08 时, 红曲米色价最高, 且有利于红色素的生成 (色调值=1.05), 可丰富酒体色泽。故确定选择红曲霉的最佳发酵 pH 值 6.0。

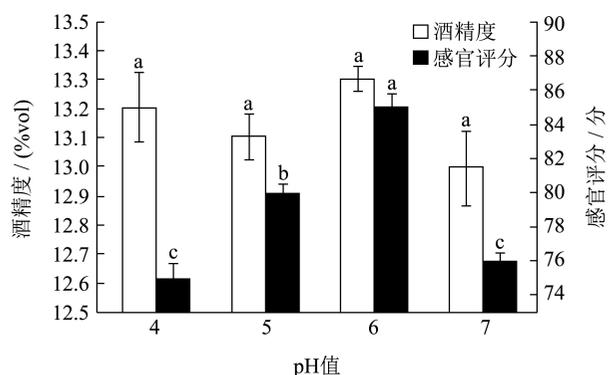


图 8 pH 值对酒精度和感官评分的影响

Fig.8 Influence of pH on alcoholic strength and sensory scores

2.4.5 发酵温度对酒精度和感官评分的影响

发酵温度能影响微生物的生长、繁殖和新陈代谢。图 9 表明，温度对感官评分和酒精度的影响呈先升后降的变化趋势，而酒精度各组差异不显著 ($P>0.05$)。这可能是因为在 26~28 °C 时，随着温度的升高红曲霉的生长与酶活性都得到提高，有利于乙醇的生产和风味物质的形成，但当温度达到 29 °C 时，红曲霉的酶活性受到影响，造成分解淀粉的能力降低，且有其他杂菌的繁殖，影响红曲米酒的风味特征和口感。因此当发酵温度为 28 °C 时，米酒的感官品评得分达到峰值 90 分，发酵的红曲米酒酸甜适中，酒体丰富，澄清透明，感官评分显著高于其他组 ($P<0.05$)。艾晓莉等^[28]对复合型米酒发酵进行优化，在 28 °C 发酵温度下，适合糖化酶分泌、还原糖积累和酵母菌的繁殖，从而有利于乙醇的产生和感官品质的提高。故确定本试验最佳发酵温度为 28 °C。

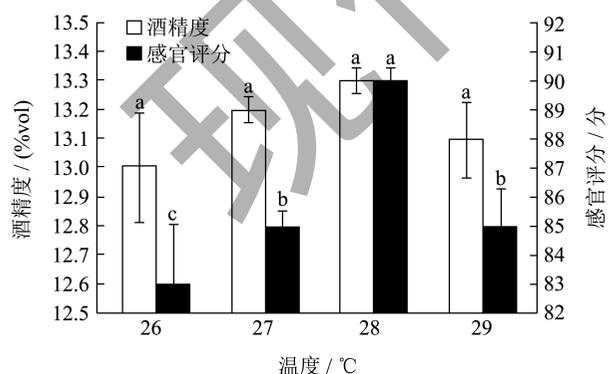


图 9 温度对酒精度和感官评分的影响

Fig.9 Effects of temperature on alcohol content and sensory scores

2.5 红曲米酒发酵条件优化正交试验

由单因素试验所得最优的发酵条件，选择发酵

温度 (A)、红曲霉种子液接种量 (B) 和 pH 值 (C) 为影响因素，以酒精度和感官评分为考察指标进行 3 因素 3 水平的正交试验，结果见表 3，方差分析见表 4。

表 3 发酵条件优化正交试验结果与分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal test for optimization of fermentation conditions

试验号	A	B	C	酒精度 / %vol	感官评分 / 分
1	27	4	5	13.40	82
2	27	6	7	13.87	85
3	27	8	6	14.53	87
4	28	4	6	13.10	84
5	28	6	5	13.21	90
6	28	8	7	14.37	83
7	29	4	7	13.22	83
8	29	6	6	13.34	85
9	29	8	5	14.67	79
k1	84.7	83.0	83.7		
k2	85.7	86.7	86.0		
k3	82.3	84.0	83.7		
R	3.3	3.7	2.3		

注：以感官评分进行极差比较。

由表 3 及表 4 可知，通过极差分析可得 3 个因素对酒精产量影响的大小程度为 $B>A>C$ ；即红曲霉种子液接种量 > 发酵温度 > pH 值，即最佳发酵条件为 $A_2B_2C_2$ ，即发酵温度 28 °C、红曲霉种子液接种量体积分数 6%、pH 值为 6.0。在此条件下进行验证试验，所得红曲米酒成品感官评分为 92 分。

表 4 正交试验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance of the results of the orthogonal tests

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	0.209	2	0.202	5.14	*
B	2.804	2	2.715	5.14	*
C	0.085	2	0.082	5.14	
误差	3.10	6			

注：“*”表示对试验结果影响显著 ($P<0.05$)。

2.6 红曲米酒质量检测结果

用单因素试验与正交优化后得到的最佳因素水平进行红曲米酒发酵，得到的红曲米酒酒精度为 13.21%vol，感官评分为 92 分，这与姚远等^[29]将酵母应用于米酒能提高酒体中醇类物质的相对含量及石思文等^[30]将羊肚菌应用于米酒发酵优化后酒精度

含量达到最高为 10.9%vol, 感官评价为 97 分相比, 红曲霉应用于米酒发酵优化后酒精度更高, 感官品质较好, 整体也具有广阔的市场前景。感官指标评价结果如表 5 所示。

表 5 感官评价结果

Table 5 Results of the sensory evaluation

指标	评价标准	感官评分/分
外观	色泽淡红, 澄清透亮, 无沉淀, 无分层	13
香气	酒香浓郁, 富含淡淡的清香, 风味独特	33
滋味	酒体醇和, 清爽适口, 绵柔微甜	37
风格	酒体丰满醇和, 具有红曲米酒独特风格	9

2.7 红曲米酒挥发性风味物质测定结果

由表 6 可以看出, 通过 HS-SPME 对最佳因素水平发酵得到的红曲米酒进行测定, 共检测出挥发性风味物质 16 种, 主要为醇类和酯类。酯类物质种类最多, 共 8 种, 其中辛酸乙酯相对含量最高为 3.19%。醇类物质相对含量最多达到 82.22%, 其中苯乙醇相对含量最高为 36.11%, 其次是异戊醇相对含量为 27.20%。酮类物质共有 2 种, 相对含量为 4.32%。因而利用红曲霉较强的发酵力和酯化力可以得到醇类物质含量高和酯类物质种类多的米酒。

表 6 挥发性风味物质占比结果

Table 6 Proportion of volatile flavor substances

序号	挥发性风味物质	百分含量/%
1	环丁醇	15.01
2	异丁醇	2.76
3	异戊醇	27.20
4	正庚醇	0.61
5	苯乙醇	36.11
6	丙三醇	0.53

7	乙酸异戊酯	1.47
8	正己酸乙酯	1.41
9	辛酸乙酯	3.19
10	癸酸乙酯	2.97
11	乙酸苯乙酯	2.56
12	十二酸乙酯	0.43
13	十四酸乙酯	0.54
14	十六酸乙酯	0.88

15	仲辛酮	1.76
16	3-羟基-2-丁酮	2.56

3 结论

本试验从红曲米中筛选纯种红曲霉制作小曲, 通过米酒制作工艺制得红曲米酒, 并通过米酒酒精度的测定与感官评价, 采用单因素试验和正交试验优化红曲米酒的发酵工艺条件, 得出最佳发酵工艺条件为: 料液比 1:2.0 g/mL, 发酵时间 8 d, 红曲霉种子液接种量体积分数 6%, pH 值 6.0, 发酵温度 28 ℃。在此最佳条件下, 酿造红曲米酒的酒精度 13.21%vol, 感官评分达到 92 分, 且其挥发性风味物质中酯类物质最多, 共有 8 种, 醇类物质相对含量达到 82.22%, 酿造出的红曲米酒口感醇厚绵甜, 色泽鲜艳透亮, 独具红曲风格。综上, 红曲霉的添加以及合适的发酵工艺条件可以让红曲米酒具有其独特的红曲特色并提升红曲米酒的感官品质。本文丰富了红曲霉在米酒中的应用研究, 并可为企业的红曲米酒规模化生产提供技术支持。

参考文献

- [1] 王奇盛, 异常威克汉姆酵母的筛选及其对米酒发酵的风味研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2022.
- [2] WEI R N, ZHANG Y H, ZHAO L H. Research progress on commonly-used fermented chinese medicinals [J]. Henan Traditional Chinese Medicine, 2021, 41(5): 785-788.
- [3] LV X C, HUANG R L, CHEN F, et al. Bacterial community dynamics during the traditional brewing of Wuyi HongQu glutinous rice wine as determined by culture-independent methods [J]. Food Control, 2013, 34(2): 300-306.
- [4] AJDARI Z, EBRAHIMPOUR A, ABDUL MANAN M, et al. Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011, 2011: 487329.
- [5] 牟穰. 清爽型黄酒酿造微生物群落结构及其与风味物质相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
- [6] XU Y, SUN B, FAN G, et al. The brewing process and microbial diversity of strong flavour Chinese spirits: a review [J]. Journal of The Institute of Brewing, 2017, 123(1): 5-12.
- [7] CHEN M, LIU H, ZHEN D, et al. Research on the esterification property of esterase produced by *Monascus* sp [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(26): 5166-5172.
- [8] 周容, 王奕芳, 李良, 等. 红曲在酿酒行业中的应用进展[J]. 酿酒, 2018, 45(5): 23-28.

- [9] 桂江平,于化泓,余勃,等.基于GC-MS江西米酒风味物质的分析及品质比较[J].中国酿造,2023,42(1):231-237.
- [10] 王芙蓉,赵益梅,李靖,等.苦丁茶米酒的发酵工艺条件优化[J].中国酿造,2023,42(2):205-209.
- [11] 屠婷瑶,贾俊杰,牛曼思,等.发酵型米酒感官风味特征及其风味轮的构建[J].中国酿造,2023,42(2):40-45.
- [12] REN N, GONG W, ZHAO Y, et al. Innovation in sweet rice wine with high antioxidant activity: *Eucommia ulmoides* leaf sweet rice wine [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 9: 1108843.
- [13] LAI Q, LI Y, WU Y, et al. The quality of rice wine influenced by the crystal structure of rice starch [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56: 1988-1996.
- [14] LIN Y L, WANG T H, LEE M H, et al. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 77: 965-973.
- [15] 罗惠波,谢军,黄治国,等.纯种根霉麸曲制曲工艺优化研究[J].四川理工学院学报(自然科学版),2015,28(5):7-11.
- [16] 夏艳秋,志军,朱强,等.红曲黄酒的研制[J].食品与发酵工业,2010,36(6):103-106.
- [17] SHI C, HE J, YU J, et al. Solid state fermentation of rapeseed cake with *Aspergillus niger* for degradingglucosinolates and upgrading nutritional value [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2015, 6: 1-7.
- [18] QB/T4257-2011,酿酒大曲通用分析方法[S].
- [19] GB/T15038-2006,葡萄酒、果酒通用分析方法[S].
- [20] 陈晨,谢玲,张东亚,等.不同甜酒制备工艺优化及品质分析研究[J].酿酒科技,2023,6:28-33.
- [21] 郑平,覃先武,张彦,等.高产开环型monacolin K红曲霉菌株的筛选及其在红曲酒酿造中的应用[J].中国酿造,2023,42(3):129-134.
- [22] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [23] 陈小琴,母应春,苏伟,等.石斛添加量对小曲微生物及风味的影响[J].中国食品学报,2022,22(12):290-302.
- [24] 李刚凤,刘健,杨娟,等.天麻米酒发酵工艺优化[J].食品研究与开发,2019,40(19):118-122.
- [25] 孔凡利,秦炜欣,冯莉,等.番石榴米酒酿造工艺优化[J].食品研究与开发,2023,44(10):125-131.
- [26] 陈雪梅,陈巧珊,黎英.红曲霉在甜米酒酿造中的应用研究[J].食品工业科技,2011,1:181-183.
- [27] 蒋冬花,孙蕾,陈璨,等.高产色素红曲霉菌株的筛选、鉴定和固体发酵条件优化[J].浙江农业学报,2015,9:1639-1645.
- [28] 艾晓莉.复合型米酒发酵工艺优化及品质研究[D].成都:成都大学,2021.
- [29] 姚远,陶玉贵,葛飞,等.两种酿酒酵母发酵对桑葚米酒理化品质及香气成分的影响[J].食品工业科技,2019,40(24):242-250,261.
- [30] 石思文,江洁,崔琳,等.羊肚菌营养强化米酒发酵工艺的优化[J].食品工业科技,2014,35(23):175-181.