

麸皮红曲培养及酯化黄水条件的优化

张立强¹, 崔瑞迎¹, 周荣清^{1,2,3,*}, 黄 钧¹, 吴重德¹

(1. 四川大学轻纺与食品学院, 成都 610065;

2. 四川大学制革清洁技术国家工程实验室, 四川成都 610065;

3. 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川泸州 646000)

摘要: 本文采用浅盘发酵法制作麸皮红曲, 旨在提供一种发酵时间短且不易染菌的麸皮红曲的固态发酵方法。采用单因素实验的方法研究原料配比、料层厚度、水分、培养温度和时间对麸皮红曲酯化力的影响, 并且以酯化力为标准确定麸皮红曲的最佳制作条件。将红曲应用于黄水的酯化以提高己酸乙酯和乳酸乙酯的含量。通过 GC-MS 测定并比较总酯、挥发性组分的相对含量, 探究乙醇浓度与 pH 对酯化过程的影响以确定最佳的酯化条件, 从而达到酿酒副产物的回收利用。麸皮红曲的最佳发酵条件为: 原料配比(麸皮: 黄水: 自来水 = 100: 15: 75, w/v/v)、料层厚度(1.8 cm)、水分(47%)、培养温度(32 °C)、培养时间(48 h)。黄水酯化研究表明, 初始乙醇浓度分别为 15% 和 20%, pH 为 3.5 时, 酶促催化反应 15 d, 所得总酯的含量分别为 0.63 g/100 mL 和 0.64 g/100 mL, 其中代表性挥发性组分(己酸乙酯和乳酸乙酯)的相对百分含量从 14.33% 分别增加到 42.70% 和 31.30%。

关键词: 红曲, 酯化力, 黄水, 总酯含量, 条件优化

Manufacture of bran *qu* with *Monascus* and optimization of the conditions of esterifying *Huang shui*

ZHANG Li-qiang¹, CUI Rui-ying¹, ZHOU Rong-qing^{1,2,3,*}, HUANG Jun¹, WU Chong-de¹

(1. College of Light Industry, Textile & Food Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. National Engineering Lab for Clean Technology of Leather Manufacture, Chengdu 610065, China;

3. National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, China)

Abstract: In the present study, the bran *qu* was manufactured with *Monascus* by a salver fermentation method, the objective of this study was to provide a solid-state fermentation method which consumed less time and prevented bacterial contamination. A single factor experiment was conducted to investigate the effect of the ratio of materials, material thickness, moisture content, cultivation temperature and time on the esterifying capacity of bran *qu*. The optimal manufacture conditions of bran *qu* were determined based on the esterifying capacity. In addition, the bran *qu* was applied to esterify *Huang shui* to improve the ethyl capronate and ethyl lactate contents. Also the effect of initial ethanol content and pH on the esterifying process was studied by comparing the relative contents of total esters and volatile compounds detected by GC-MS, the esterifying conditions of *Huang shui* were optimized in order to reuse the liquor byproducts. The results showed that the optimal fermentation conditions of bran *qu* were as follows: ratio of raw materials (bran: yellow water: tap water, 100: 15: 75, w/v/v), material thickness (1.8 cm), moisture (47%), cultivation temperature (32 °C) and time (48 h). The results of esterifying *Huang shui* suggested that when the initial ethanol contents were 15% and 20% respectively, initial pH was 3.5, and enzymatic reaction time was 15 d, the content of total esters obtained were 0.63 g/100 mL and 0.64 g/100 mL respectively, among which the relative contents of representative components (ethyl capronate and ethyl lactate) were respectively increased from 14.33% to 42.70% and 31.30%.

Key words: Red starter; esterification capacity; *Huang shui*; total ester content; condition optimization

中图分类号: TS261.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)19-0171-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.028

红曲霉是曲霉属子囊菌类真菌, 其菌丝顶端单 一或成串地生成分生孢子。因种属而异, 前期白色

收稿日期: 2014-10-23

作者简介: 张立强(1987-), 男, 博士研究生, 研究方向: 发酵工程研究, E-mail: hellomervyn@126.com。

* 通讯作者: 周荣清(1960-), 男, 博士, 研究方向: 现代发酵技术和酶工程及其应用, E-mail: zhourqing@scu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助(31171742)。

的菌丝成熟后变为淡红色、紫红色、烟灰色等^[1-3]。红曲霉经培养、发酵能够产生多种代谢物质如淀粉酶、蛋白酶、酯化酶、脂肪酸、有机酸和红曲色素等^[4-6]。而且红曲霉还合成多种活性组分,如 Monacolin K 等,具有降血压等保健功能^[7]。基于这些特点,以大米为原料经固态发酵生产的红曲米已应用到医药、食品、白酒和保健酒等领域中^[8-9],且在提高酒的酯类含量及改善品质方面成效显著^[10-12]。黄水为酿酒过程中产生的副产物,其中含有大量的含氮化合物、糖类、酸类及各种芳香组分的前体物质,直接排放不仅污染环境而且浪费资源。许多学者在黄水中添加生物酶制剂对其中的可利用物质进行了转化,制备了含有多种香味物质的白酒调味液^[13-15],不仅使黄水变废为宝,而且大大减少了环境的污染。当前,红曲米在黄水的酯化中成效显著,成为黄水回收利用的研究热点之一^[16-17]。虽然以大米为原料生产红曲具有技术简单、操作成熟且易掌握等优点,但仍然存在发酵周期长、成本高、易染杂菌且产品质量不稳定等缺点。为解决以上问题,本文以麸皮为原料,通过系列单因素实验优化了麸皮红曲的制作条件,以期建立一种成本低廉、发酵时间短且不易染菌的麸皮红曲制作方法。基于优化的条件制作了麸皮红曲,并对麸皮红曲酯化黄水的条件进行了探究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种 实验室分离保藏菌株红曲霉 A13;菌种保藏培养基 麦芽汁斜面培养基^[16];种子和扩大培养基 麸皮培养基;实验与检测所用化学试剂购置于本地化学试剂商店,均为分析纯级。

气-质联用仪 Trace GC Ultra DSQ II Thermo, 美国;配备 HP-5MS 毛细管色谱柱(30.0 m × 320 μm × 0.25 μm, Agilent) 美国。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养 35 g 润湿的麸皮(麸皮:水 = 100:90)装入 500 mL 三角瓶中,121 °C 湿热灭菌 30 min。待冷却至 40 °C 以下,接种红曲霉孢子悬液,置于(32 ± 0.2) °C 恒温箱中培养 4~5 d,检查无污染后作为种子待用。

1.2.2 扩大培养 称取 250 g 麸皮润湿后,121 °C 湿热灭菌 30 min。待冷却至 40 °C 以下,置于无菌浅盘(5 cm × 25 cm × 45 cm)中,以 3‰ 的量接种三角瓶麸皮种子。然后置于(32 ± 0.2) °C 恒温箱中培养 2~3 d,得到麸皮红曲。

1.3 培养条件对麸皮红曲酯化力的影响的研究

在 1.2.2 的基础上,分别改变原料配比、曲盘料层厚度、曲坯水分、培养温度及时间等参数,探究其对红曲酯化力的影响。

1.3.1 不同原料配比的影响 麸皮:自来水 = 100:90 (w/v);麸皮:黄水:自来水 = 100:15:75 (w/v/v)。其他条件为:料层厚度 1.8 cm、培养温度 32 °C 和培养时间 48 h。

1.3.2 不同曲盘料层厚度的影响 料层厚度分别为

1.2、1.8 和 3.0 cm,分别相当于 150、250 和 400 g 的装曲量。其他条件为:水分 47%、培养温度 32 °C 和培养时间 48 h。

1.3.3 不同水分的影响 麸皮曲的水分分别为 27%、37%、47%、57% 和 67%。其他条件为:料层厚度 1.8 cm、培养温度 32 °C 和培养时间为 48 h。

1.3.4 不同培养温度的影响 培养温度分别为 28、30、31、32、34 °C。其他条件为:水分 47%、料层厚度 1.8 cm 和培养时间为 48 h。

1.3.5 不同培养时间的影响 培养时间分别为 36、48、72、96、120 h。其他条件为:水分 47%、料层厚度 1.8 cm 和培养温度 32 °C。

1.4 应用麸皮红曲酯化黄水研究

分别调整黄水中初始乙醇的浓度及 pH,加入适量的红曲粉(换算成对应的酶活力),于(32 ± 0.2) °C 恒温酯化 15 d。红曲酯化酶活力(mg/100 mL) = 100 mL 黄水中加入的红曲质量(g) × 28.30 (20% 乙醇下的红曲酯化力,mg/g)。通过测定总酯、挥发性组分确定麸皮红曲酯化黄水的最佳条件。

1.4.1 初始乙醇浓度对黄水酯化的影响 反应液中乙醇体积分数分别为 5%、10%、15%、20% 和 30%,pH 为 3.5(黄水自然 pH)^[18],其余条件同 1.4。

1.4.2 初始 pH 对黄水酯化的影响 反应液中乙醇体积分数为 20%,反应体系的 pH 分别调节为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5,其余条件同 1.4。

1.5 分析方法

1.5.1 主要理化指标 酯化力的检测参考文献^[18]所述方法;总酯的测定 参考文献^[19]所方法。

1.5.2 挥发性组分 参考文献^[18]所述的方法检测挥发性组分。

1.5.2.1 顶空-固相微萃取法(HS-SPME)条件 吸取 1 mL 酯化液于 5 mL 顶空瓶中,在 45 °C 恒温水浴锅中预平衡 15 min 后,插入 CAR/PDMS (75 μm, Supelco, 美国)固相微萃取针头萃取 40 min,取出针头,于 GC-MS 进样口解吸 3 min,进行挥发性组分分析。

1.5.2.2 GC-MS 条件 色谱柱为 HP-5MS 石英毛细管柱。程序升温如下,初始温度为 40 °C,在此温度下保持 5 min。然后以 4 °C/min 升至 100 °C 并保持 5 min。最后以 6 °C/min 升至 220 °C 并保持 8 min。进样口温度为 250 °C。以高纯氦气为载气,流速为 1.0 mL/min。离子源温度和连接口温度分别为 230 °C 和 250 °C。EI 电子能量为 70 eV。质量扫描范围为 35~400 amu。

1.6 数据处理

检测样品的质谱图通过与标准谱库(NIST05)比对鉴定,匹配度大于 800(最大值为 1000)的结果才予以报道。使用 X-caliber 软件系统对数据进行处理,采用峰面积归一化法确定各组分的相对含量。利用 Origin Pro 8.5.1 作图软件对单因素实验数据进行作图分析。利用 SPSS 17.0 软件对数据进行显著性分析($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

表1 不同原料配比条件下的红曲酯化力

Table 1 Esterifying capacity of bran *qu* under different ratio of materials

原料配比	麸皮:自来水 = 100:90 (w/v)	麸皮:黄水:自来水 = 100:15:75 (w/v/v)
酯化力(mg/g)	26.67 ± 3.32	36.05 ± 1.87

2.1 培养条件对麸皮红曲酯化力的影响

2.1.1 不同原料配比的影响 如表1所示,原料对比对红曲酯化力影响显著,以15%的黄水替代自来水用于润料,使红曲的酯化力提高了35.17%。黄水中所含的组分能促进红曲霉的生长及酯化酶的合成,而且黄水的pH较低^[17],其中的乳酸、乙酸及少量乙醇不仅能抑制杂菌繁殖,亦能诱导酯化酶的合成,是致使酯化力提高的原因之一。

2.1.2 不同料层厚度的影响 结果表明,在一定范围内改变料层厚度,酯化力的变化不显著(表2, $p > 0.05$)。不同的料层厚度不仅影响物料的传质与传热,也会影响物料中的溶氧量。料层过厚则影响传热和CO₂释放,不仅抑制红曲霉的生长繁殖和酯化酶的合成,而且导致耐高温细菌的生长繁殖及原料的水解。料层过薄则保温和保湿效果较差,不利于红曲霉的生长繁殖和酯化酶的合成,导致酯化力较低。当料层厚度为1.8 cm时获得的麸皮红曲的酯化力最高,为(35.23 ± 2.35) mg/g。因此,培养麸皮红曲的最适料层厚度为1.8 cm。

表2 料层厚度对红曲酯化力的影响

Table 2 Effect of materials thickness on the esterifying capacity of bran *qu*

料层厚度 (cm)	1.2	1.8	3.0
酯化力 (mg/g)	32.70 ± 2.04 ^a	35.23 ± 2.35 ^a	30.30 ± 3.12 ^a

注:上标字母a表征显著性分析差异大小,标注相同字母表示样品间无显著性差异,标注不同字母表示样品间存在显著差异。

2.1.3 不同水分的影响 不同水分条件下所得麸皮红曲的酯化力如图1所示。不同水分条件下,红曲的酯化力差异显著($p < 0.05$),表明水分对红曲的酯化力有较大影响。随着水分的上升,红曲的酯化力呈现先增后降的趋势,并在47%处达到最大值。水

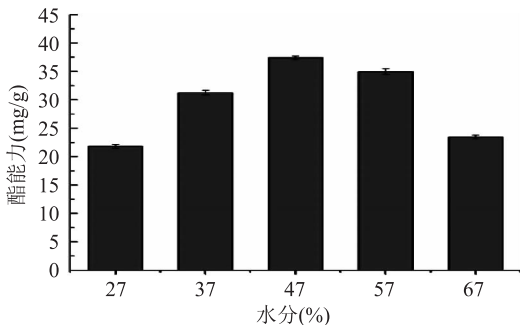


图1 水分含量对红曲酯化力的影响

Fig.1 Effect of moisture content on the esterifying capacity of bran *qu*

分是影响霉菌生长和酶活性的重要因素之一^[19]。水分过低则不利于营养物质的溶解及吸收,过高则影响溶氧量,从而影响微生物的生长繁殖及新陈代谢。曲坯水分含量为47%时所获麸皮红曲的酯化力最高,因此,培养红曲的最适的水分含量为47%。

2.1.4 不同培养温度的影响 如图2所示,不同培养温度条件下所得麸皮红曲的酯化力差异显著($p < 0.05$)。培养温度从28℃增至32℃,所得红曲的酯化力呈现线性增加的趋势。但继续增加培养温度,红曲的酯化力显著降低。因此,红曲的酯化力对培养温度敏感,且32℃为麸皮红曲的最适培养温度。

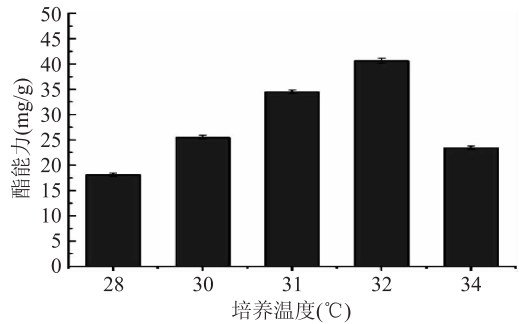


图2 培养温度对红曲酯化力的影响

Fig.2 Effect of cultivation temperature on the esterifying capacity of bran *qu*

2.1.5 不同培养时间的影响 培养时间分别为36、48、72 h时,酯化力的大小几乎不变,在37 mg/g(dw)左右。延长培养时间所得红曲的酯化力明显降低。培养96 h所获红曲的酯化力降至25 mg/g以下。浅盘制曲培养霉菌从静止期到稳定期一般需要20~30 h左右,在达到稳定期之前菌丝不断生长,微生物活性值增加。到达稳定期,孢子开始形成,微生物活性仍有所升高,但速率明显降低^[20]。因此,36 h到72 h麸皮红曲的酯化力虽有所上升,但速率很小。可能是因为麸皮红曲培养至36 h左右时,红曲霉的生长已经进入了稳定期,且一直延续到72 h。而培养72 h之后,红曲酯化力迅速下降,可能是由菌体衰老死亡及大量的孢子生成所致。

2.2 麸皮红曲酯化黄水条件的优化

2.2.1 初始乙醇浓度和pH对总酯的含量的影响 如图4所示,初始乙醇浓度及pH对黄水酯化的影响显著($p < 0.05$)。初始乙醇浓度对黄水酯化液的总酯的影响规律如图4A所示。与5%的乙醇浓度相比,初始浓度为10%时,总酯的含量增至0.60 g/100 mL。初始浓度为15%时,总酯的含量为0.63 g/100 mL。初始乙醇的浓度进一步增大到20%,总酯的含量增至0.64 g/100 mL。初始乙醇浓度继续增至30%,酶活力受到抑制,但非酶促酯化作用增强,所形成酯的量明显降低^[21]。

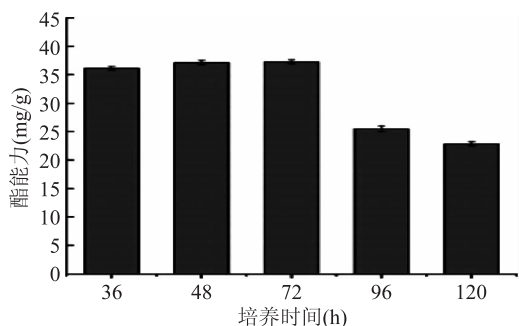


图3 培养时间对红曲酯化力的影响

Fig.3 Effect of cultivation time on the esterifying capacity of bran qu

当乙醇的初始浓度为20%时,研究黄水 pH 变化(2.5~4.2)^[14]对其酯化的影响(图4B)。结果表明,pH 从2.5 增至3.0 时,酯化酶活力增强,总酯含量增加至最高。继续提高 pH,酯化酶活力降低,总酯的含量降低。pH 升高使酯化酶的活力降低可能导致其酯化力减小。因此,酯化力受 pH 的影响明显。

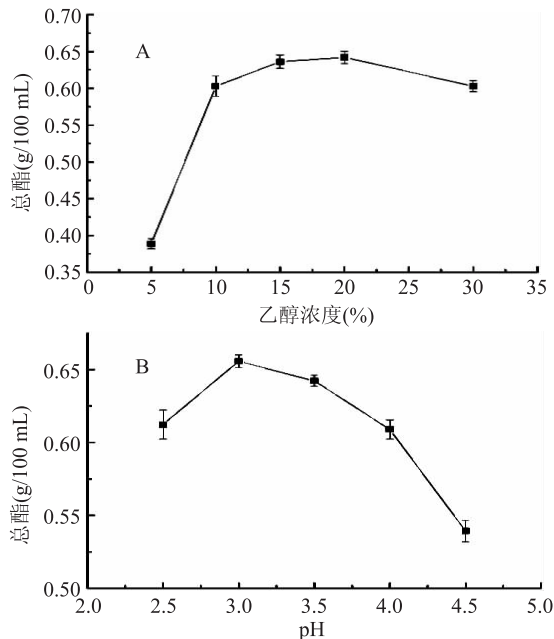


图4 不同乙醇浓度和初始 pH 对总酯的含量的影响

Fig.4 Effect of initial ethanol content and pH value on total esters content

注:A:初始乙醇浓度;B:初始 pH。

2.2.2 初始乙醇浓度和 pH 对黄水酯化液的挥发性组分的影响 不同初始乙醇浓度和 pH 条件下,黄水酯化 15 d 后,其挥发性组分的组成及相对含量如表 3 所示。共检出 49 种挥发性组分:6 种酸类组分、21 种酯类组分、1 种醇类组分、2 种酮类组分、3 种醛类组分、4 种酚类组分、2 种呋喃类组分、3 种吡嗪类组分以及 7 种其他类组分。其中酸类、酯类、酚类和醛类组分的相对百分含量较高。黄水中仅检出了 45 种组分。初始 pH 对挥发性组分有较大的影响。pH 为 2.5 时,仅戊酸乙酯未被检出。酸类、酚类、醛类组分显著降低,分别从 33.17%、7.85% 和 17.79% 降至

15.82%、2.33% 和 10.2%;酯类组分则从 28.97% 增至 47.19%。pH 升至 3.0、3.5、4.0 和 4.5 时,酸类组分分别降至 7.28%、7.89%、6.47% 和 2.35%。酯类组分则分别提高至 47.19%、56.56%、59.16%、48.87% 和 50.93%。酚类和醛类组分亦有差异。值得进一步研究的是,在 pH 为 3.0 时,仅检出了 43 种组分,黄水中含有的乙酸、戊酸乙酯、2,6-二甲基吡嗪和辛酸甲酯等组分未被检出。在 pH3.5 时,检出 48 种组分,1,2-二甲基-十六烷则未被检出。在 pH4.0 和 4.5 时,检出了 49 种组分。酯化反应新形成了庚酸乙酯、异戊醇、1,2-二乙基-3,5-二甲基吡嗪和 2,2'-[氧双(亚甲基)双呋喃]等 4 种组分。

类似 pH 对黄水酯化的影响规律,初始乙醇浓度的增加使酸类、酚类和醛类组分的相对百分含量减小,且小于 pH 对此类组分的影响。而初始乙醇浓度对酯类组分的影响大于 pH 的影响。初始乙醇浓度为 5% 时,检出了 46 种组分,黄水中乙酸和戊酸乙酯未检出,庚酸乙酯、异戊醇和 2,2'-[氧双(亚甲基)]双呋喃被检出。初始乙醇浓度为 10% 时,检出了 47 种组分,3-羟基-3-甲基-2-丁酮未被检出。初始乙醇浓度为 15% 时,检出了 45 种组分,检出了庚酸乙酯、异戊醇和 2,2'-[氧双(亚甲基)双呋喃,戊酸乙酯、己酸异戊酯和 1,2-二甲基-十六烷未检出。初始乙醇浓度为 20% 时,黄水中未被检出的 4 种组分被检出,1,2-二甲基-十六烷未检出。在 30% 的初始乙醇浓度条件下,检出 48 种组分,异戊醇被检出。整体上,酸类组分减少的幅度最大,黄水中酸类组分的相对含量顺序为己酸(17.66%) > 丁酸(2.56%) > 戊酸(1.56%)。

不同初始 pH 及乙醇浓度条件下酯化黄水所得酯化液中的浓香型白酒主要香味组分的相对含量存在显著差异(表 4 和表 5, $p < 0.05$)。初始 pH 对浓香型白酒主要香味组分(己酸乙酯和乳酸乙酯)的影响小于初始乙醇浓度的影响。

表4 初始 pH 对挥发性组分的影响

Table 4 Effect of initial pH value on volatile compounds

pH	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
主体酯类组分 (%) [*]	26.65 ^b	26.72 ^b	31.30 ^a	15.20 ^d	16.06 ^c

注:上标字母表征显著性分析差异大小,标注相同字母表示样品间无显著性差异,标注不同字母表示样品间存在显著差异。

^{*} 浓香型白酒的酯类组分:己酸乙酯和乳酸乙酯,表 5 同。

表5 初始乙醇浓度对挥发性组分的影响

Table 5 Effect of initial ethanol content on volatile compounds

乙醇浓度 (%) _(v/v)	5	10	15	20	30
主体酯类组分 (%) [*]	20.64 ^d	30.82 ^c	42.70 ^a	31.30 ^b	18.97 ^c

3 结论

3.1 在麸皮中加入黄水可以有效地提高麸皮红曲的酯化力,水分、培养温度和时间对麸皮红曲的酯化力影响较大。单因素实验结果表明,麸皮红曲的最佳

表3 酯化液中挥发性组分 GC-MS 检测结果
Table 3 Results of volatile compounds in esterification liquid analyzed by GC-MS

保留时间 (min)	物质名称	初始值 (黄水)	相对峰面积百分比(%)									
			酯化 15 d 后的黄水酯化液									
			不同 pH					不同乙醇浓度(%)				
			2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5	10	15	20	30
酸类物质												
20.65	乙酸	0.74	1.58	0	0.56	0.61	0.12	0	0.53	0.62	0.56	0.27
25.21	丁酸	2.56	2.76	1.49	1.43	1.09	0.25	2.07	1.20	1.12	1.43	1.74
27.5	戊酸	1.56	1.10	0.56	0.54	0.43	0.24	1.00	0.56	0.42	0.54	0.72
29.56	己酸	17.66	9.64	4.67	4.85	3.27	0.69	8.10	4.59	3.51	4.85	6.19
32.43	4-羟基苯膦酸	0.73	0.28	0.36	0.28	0.34	0.55	0.64	0.41	0.27	0.28	0.19
33.26	辛酸	9.92	0.46	0.20	0.23	0.73	0.50	0.80	0.27	0.29	0.23	0.30
	总酸	33.17	15.82	7.28	7.89	6.47	2.35	12.61	7.56	6.23	7.89	9.41
酯类物质												
7.78	戊酸乙酯	0.69	0	0	2.90	0.70	0.70	0	0.01	0	2.90	0
12.28	己酸乙酯	11.27	10.66	22.96	27.44	11.19	11.19	16.62	25.20	38.69	27.44	10.89
16.1	庚酸乙酯	0	0.70	1.11	1.03	0.75	0.39	1.39	1.52	1.49	1.03	1.21
16.61	乳酸乙酯	3.06	15.99	3.76	3.86	4.01	4.87	4.02	5.62	4.01	3.86	8.08
18.13	辛酸甲酯	0.04	0.03	0	0.03	0.11	1.55	0.19	0.09	0.09	0.03	0.02
19.66	辛酸乙酯	2.74	0.95	1.12	0.92	0.69	1.11	1.60	1.68	1.28	0.92	1.63
20.4	己酸异戊酯	0.39	0.05	0.07	0.04	0.05	0.07	0.19	0.17	0	0.04	0.05
22.95	2-羟基-4-甲基-戊酸乙酯	0.61	0.78	0.51	0.64	0.56	0.75	0.73	0.74	0.45	0.64	0.43
23.51	3-(甲基磺基)丙酸乙酯	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06	0.09	0.04	0.05	0.04	0.04	0.01
25.81	苯甲酸乙酯	0.08	0.20	0.36	0.36	0.61	0.51	0.72	0.74	0.40	0.36	0.22
26.1	琥珀酸二乙酯	0.90	0.67	0.49	0.62	0.92	6.43	1.13	2.33	0.58	0.62	0.32
28.21	1-丙氨酸-N-(2-呋喃甲酰基)-乙酯	1.56	0.81	1.08	0.75	1.02	1.24	1.75	0.97	0.63	0.75	0.59
28.35	苯乙酸乙酯	3.75	6.68	5.98	6.87	14.42	16.35	10.90	13.33	6.64	6.87	2.60
28.89	乙酸苯乙酯	0.10	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.12	0.04	0.03	0.03	0.02
29.36	十二烷酸乙酯	0.07	0.15	0.28	0.17	0.61	0.50	0.19	0.12	0.15	0.17	0.26
30.17	苯丙酸乙酯	0.73	1.53	1.23	1.35	3.71	2.77	2.22	2.25	1.37	1.35	0.77
32.08	十四酸乙酯	0.07	0.08	0.23	0.19	0.22	0.07	0.09	0.08	0.09	0.19	0.37
32.91	十四酸乙酯	0.21	0.54	0.85	0.64	1.40	0.51	0.46	0.29	0.48	0.64	1.08
34.01	十五烷酸乙酯	0.23	0.51	1.35	1.10	1.05	0.27	0.37	0.37	0.54	1.10	1.74
35.56	棕榈酸甲酯	0.12	0.34	0.44	0.34	0.51	0.15	0.17	0.16	0.26	0.34	0.43
36.13	棕榈酸乙酯	2.33	6.46	14.67	9.84	6.34	1.36	1.88	2.39	4.11	9.84	14.54
	总酯	28.97	47.19	56.56	59.16	48.97	50.93	44.78	58.15	61.33	59.16	45.26
醇类物质												
11.19	异戊醇	0	0.54	0	0.12	0.06	0.06	0.12	0	0.07	0.12	0.24
酮类物质												
14.21	3-羟基-3-甲基-2-丁酮	0.05	0.16	0.01	0.06	0.02	0.08	0.07	0	0.11	0.06	0.18
32.66	二氢-5-戊基-2(3H)-呋喃酮	0.05	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.05	0.03	0.01	0.01	0.01
	总的酮类	0.1	0.18	0.03	0.07	0.04	0.11	0.12	0.03	0.12	0.07	0.19
酚类物质												
33.67	1-4-甲基苯酚	6.47	1.86	2.85	1.74	2.47	3.31	7.27	4.32	1.81	1.74	0.88
32.74	4-乙基-2-甲氧苯酚	0.38	0.04	0.07	0.05	0.06	0.16	0.13	0.07	0.04	0.05	0.02
31.49	1,2-二甲氧基-4-甲酚	0.96	0.42	0.32	0.25	0.27	0.21	0.53	0.32	0.22	0.25	0.23
29.79	1,2-二甲氧酚	0.04	0.01	0.02	0.02	0.03	0.06	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
	总的酚类	7.85	2.33	3.26	2.06	2.83	3.74	7.98	4.74	2.08	2.06	1.14
醛类物质												
20.79	糠醛	17.52	10.02	7.79	8.69	8.27	11.81	18.42	13.30	6.90	8.69	9.92
23.71	5-甲基-2-呋喃甲醛,	0.23	0.14	0.17	0.12	0.14	0.26	0.32	0.15	0.11	0.12	0.08

续表

保留时间 (min)	物质名称	初始值 (黄水)	相对峰面积百分比(%)									
			酯化 15 d 后的黄水酯化液									
			不同 pH					不同乙醇浓度(%)				
			2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5	10	15	20	30
			酸类物质									
31.01	二氢化茛-4-甲醛	0.04	0.04	0.06	0.06	0.10	0.16	0.10	0.07	0.05	0.06	0.05
总的醛类		17.79	10.2	8.02	8.87	8.51	12.23	18.84	13.52	7.06	8.87	10.05
			吡嗪类物质									
15.64	2,6-二甲基吡嗪	0.07	0.04	0	0.03	0.04	0.06	0.08	0.01	0.04	0.03	0.03
18.32	三甲基吡嗪	0.14	0.26	0.24	0.23	0.93	0.67	0.20	0.12	0.14	0.23	0.25
20.3	1,2-二乙基-3,5-二甲基吡嗪	0	0.02	0	0.01	0.02	0.06	0	0.01	0	0.01	0
总的吡嗪类		0.21	0.32	0.24	0.27	0.99	0.79	0.28	0.14	0.18	0.27	0.28
			呋喃类物质									
14.52	2,2-[氧双(亚甲基)]双呋喃,	0	0.06	0.03	0.03	0.03	0.01	0.03	0.02	0.03	0.03	0
24.64	2-乙酰基-5-甲基-呋喃	0.14	0.06	0.07	0.04	0.06	0.16	0.19	0.09	0.05	0.04	0.03
总的呋喃类		0.14	0.12	0.1	0.07	0.09	0.17	0.22	0.11	0.08	0.07	0.03
			其他类物质									
32.66	二氢-5-戊基-2(3H)-呋喃酮	0.05	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03	0.05	0.03	0.01	0.01	0.01
27.95	己酸酸酐	0.51	0.35	0.22	0.15	0.18	0.21	0.61	0.40	0.12	0.15	0.22
27.16	1,2-二甲氧基苯	0.16	0.08	0.12	0.09	0.13	0.22	0.20	0.13	0.07	0.09	0.08
26.44	十七烷	0.02	0.05	0.06	0.03	0.17	0.07	0.06	0.04	0.04	0.03	0.07
25.46	1,2-二甲基-十六烷	0.01	0.01	0.01	0	0.03	0.07	0.07	0.04	0	0	0.01
23.71	5-甲基-2-呋喃甲醛,	0.23	0.14	0.17	0.12	0.14	0.26	0.32	0.15	0.11	0.12	0.08
21.6	十五烷	0.03	0.01	0.04	0.01	0.61	0.05	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01
总的其他类		1.01	0.66	0.64	0.41	1.28	0.91	1.35	0.82	0.36	0.41	0.48

发酵条件如下:原料配比(麸皮:黄水:自来水 = 100:15:75, w/v/v)、料层厚度 1.8 cm、水分 47%、培养温度 32 ℃、培养时间 48 h。

3.2 初始乙醇浓度对黄水酯化液的总酯的含量及挥发性组分组成的影响比初始 pH 的影响更显著。酸类、酚类和醛类组分呈单调减的趋势,总酯的含量及己酸乙酯和乳酸乙酯等浓香型白酒的主要香味组分则呈非单调增的趋势。黄水酯化的最佳条件为:乙醇浓度 15% 和 20%, pH 为 3.5。在此条件下酯化黄水 15 d, 所得黄水酯化液中总酯的含量分别为 0.63 g/100 mL 和 0.64 g/100 mL, 其中浓香型白酒主体组分(己酸乙酯和乳酸乙酯)的相对百分含量分别为 42.70% 和 31.30%。

参考文献

- [1] Blanc P. Recent research and development of Monascus fermentation products[J]. I F R J, 2013, 21(1): 1-12.
- [2] 逯慎杰, 刘秀河. 功能性红曲中功能成分的研究进展[J]. 江苏调味副食品, 2011, 1: 17-21.
- [3] 彭熙敏, 刘超兰, 韩瑞枝, 等. 红曲霉培养条件对酯化力影响的研究[J]. 酿酒科技, 2009, 1: 17-20.
- [4] Chen S, Lv B, Du X, et al. Pigment from red fermented rice as colouring agent for stirred skimmed milk yoghurts[J]. Int J Dairy

Technol, 2012, 65(2): 287-292.

- [5] Liu Q, Xie N, He Y, et al. MpigE, a gene involved in pigment biosynthesis in Monascus ruber M7 [J]. Appl Microbiol Biot, 2014, 98(1): 285-296.
- [6] 贾波, 周立平. 红曲霉研究之现状及发展前景[J]. 中国食品添加剂, 2002, (6): 32-35.
- [7] 朱效刚, 许贇荣. 红曲的保健功能及产品开发趋势[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 128-130.
- [8] Lv X C, Weng X, Zhang W, et al. Microbial diversity of traditional fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine as determined by PCR-mediated DGGE[J]. Food Control, 2012, 28(2): 426-434.
- [9] 任飞, 韩珍琼, 熊双丽, 等. 红曲保健酒的研制[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 624-627.
- [10] 程江红, 何汝良, 程江浩, 等. 酯化红曲工艺研究及其在酿酒工业中的应用[J]. 中国酿造, 2006, 25(3): 54-55.
- [11] 朱效刚. 红曲功能性成分分析及发酵法生产的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [12] 庄名扬, 胡森. 酯化酶粗酶制剂生产及在浓香型酒的应用: 缩短浓香型白酒发酵周期[J]. 酿酒科技, 1993, 2: 22-26.
- [13] 刘宾, 陈义伦, 于忠良. 黄水酯化液酶法制备技术研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(2): 116-121.

(下转第 180 页)

表1 金属离子对阿魏酸酯酶活性的影响

Table 1 The effect of metal ion on feruloyl esterase enzyme activity

离子浓度 (5 mmol/L)	空白	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Fe ²⁺
相对酶活(%)	100.15 ± 1.38 ^b	154.87 ± 4.61 ^a	105.37 ± 2.00 ^b	57.59 ± 1.84 ^f	67.26 ± 1.78 ^e	73.87 ± 3.28 ^{cd}
离子浓度 (5 mmol/L)	Zn ²⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Mn ²⁺	Hg ⁺	EDTA
相对酶活(%)	68.13 ± 0.90 ^{de}	30.10 ± 1.12 ^g	26.17 ± 1.15 ^g	75.52 ± 0.79 ^c	14.03 ± 1.66 ^h	55.13 ± 1.60 ^f

3 结论

3.1 小麦阿魏酸酯酶的最适温度为 35 ℃, 酶活为 0.126 U/g; 最适 pH 为 6.0, 酶活为 0.125 U/g。

3.2 小麦阿魏酸酯酶在 25~35 ℃ 保存 120 min 比较稳定, 存活率在 97.9% 以上; 60 ℃ 保温 120 min, 酶的存活率仅为 4.6%, 基本失活, 65、70、75 ℃ 保存时, 分别在 80、20、10 min 的时候, 酶失活; 阿魏酸酯酶在 pH5.5~pH6.0 条件下保存最稳定。

3.3 Ca²⁺ 对阿魏酸酯酶有强烈的激活作用; Hg⁺ 对阿魏酸酯酶有强烈的抑制作用; EDTA 对于阿魏酸酯酶的抑制也较强。

参考文献

[1] Faulds CB, Williamson G. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from streptomyces olivochromogenes[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137: 2337-2345.

[2] Sindhu Mat hew, T Emilia Abraham. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2004, 24(2-3): 59-83.

[3] 王洪川, 陈洪章. 高产阿魏酸酯酶菌株的筛选及其固态发酵的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 11-14.

[4] Mattila P, Kumpulainen J. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 3660-3667.

[5] 王丹. 小麦与麦芽中阿魏酸及其阿魏酸酯酶的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.

[6] 崔云前, 曹小红, 王春玲, 等. 发酵行业 4-乙炔基愈创木酚和 4-乙基愈创木酚研究进展[J]. 中国酿造, 2009(4): 14-17.

[7] 王晓会, 王憬, 王欣, 等. 小麦啤酒中特征香气组分 4-乙炔基愈创木酚测定方法的建立和应用[J]. 啤酒科技, 2012(12):

6-9.

[8] 张乃斌. 上面发酵高 4-VG 含量青稞啤酒工艺的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2013.

[9] Jin Y H, Zhang K L, Du J H. Effects of wheat protein content on endosperm composites and malt quality[J]. J Inst Brew, 2008, 114(4): 289-293.

[10] QB/T 1686-2008. 啤酒麦芽[S]. 2008.

[11] 欧仕益, 李炎, 高孔荣. 麦麸膳食纤维清除羟自由基的研究[J]. 营养学报, 1999, 21(2): 191-195.

[12] 赵娟. 阿魏酸酯酶基因的克隆与表达及在植物纤维材料降解中的应用[D]. 济南: 山东大学, 2012.

[13] Sovrano S, Buiaiti S, Anese M. Influence of malt browning degree on lipoxygenase activity[J]. Food Chemistry, 2006, 99(4): 711-717.

[14] Nele Vanbeneden, Tom Van Roey, Filip Willems, et al. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing[J]. Food Chemistry, 2008, 111: 83-91.

[15] G Mukherjee, R K Singh, A Mitra, et al. Ferulic acid esterase production by streptomyces sp[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 211-213.

[16] W Zeng, H Z Chen. Air pressure pulsation solid state fermentation of feruloyl esterase by Aspergillus niger[J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 1371-1375.

[17] 王聪, 杜金华, 张开利, 等. 小麦芽脂肪酶酶学性质以及制麦过程的酶活变化[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(5): 105-110.

[18] Ahmed Eid Fazary, Suryadi Ismajji, Yi-Hsu Ju. Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of Aspergillus awamori feruloyl esterase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2009, 44: 240-248.

(上接第 176 页)

[14] 罗惠波, 张宿义, 卢中明. 浓香型白酒黄水的应用探索[J]. 酿酒科技, 2004, 1: 40-41.

[15] 张宿义, 卢中明, 周军. 黄酒调味液在白酒调味中的应用[J]. 酿酒科技, 2002, 2: 45-46.

[16] 陈帅, 刘琨毅, 郑佳, 等. 基于响应面法优化酿酒黄水酶促酯化条件的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 205-209.

[17] 陈帅, 赵金松, 郑佳, 等. 红曲与产酯酵母酯化黄水代谢物的特征[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 1-5.

[18] Gao X L, Cui C, Zhao H F, et al. Changes in volatile aroma

compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(4): 889-898.

[19] 王世宽, 潘明, 徐艳丽, 等. 浓香型大曲发酵过程中霉菌消长情况的研究[J]. 中国酿造, 2010, 29(1): 42-45.

[20] 李振权, 蔡静平, 黄淑霞, 等. 不同生理状态霉菌对储粮品质危害性的研究[J]. 粮油加工, 2007, 7: 96-98.

[21] 陈帅, 郑佳, 刘琨毅, 等. 红曲酯化酶促反应及其代谢产物特征[J]. 食品与发酵工业, 2011, 38(2): 47-51.