

熟麦曲促进黄酒发酵的机理研究

刘双平^{1,2}, 刘彩霞², 王小壮¹, 周志磊^{1,2}, 毛健^{1,2,3*}

(¹江南大学食品学院 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏无锡 214122

²江南大学(绍兴)产业技术研究院 浙江绍兴 312000

³浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司 国家黄酒工程技术研究中心 浙江绍兴 312000)

摘要 熟麦曲是接种纯黄曲霉培养的麦曲,广泛应用于现代黄酒生产中。为探究熟麦曲在黄酒发酵中的作用机理,本研究通过控制熟麦曲添加比例,分析熟麦曲对黄酒酿造的影响,进一步研究黄曲霉菌丝自溶特性,并通过黄曲霉菌丝(可自溶)和孢子(不自溶)与酵母共培养试验分析菌丝自溶对黄酒发酵的影响。研究发现随着熟麦曲添加比例增加,发酵体系中酵母生物量显著提升 37.61%~135.90%,乙醇含量、氨基酸态氮、氨基酸以及有机酸分别显著提升 15.87%,70.00%,28.46%,92.41%以上。研究黄曲霉菌丝自溶发现,菌丝自溶可为发酵体系提供氨基酸、糖、核苷酸等生物分子,有效提升发酵体系中酵母生物量 1.32 倍,显著影响乙醇、氨基酸态氮、杂醇以及氨基酸含量。综上,熟麦曲一方面通过丰富的酶物质促进原料分解,影响黄酒发酵;另一方面,熟麦曲中大量菌丝体在发酵过程中发生自溶,为发酵提供氮源,促进黄酒发酵进程。

关键词 黄酒酿造;黄曲霉;自溶;氮源

文章编号 1009-7848(2023)04-0057-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.04.006

在黄酒酿造过程中,淀粉被麦曲中的淀粉酶糖化成葡萄糖和其它糖类,谷物中的蛋白质被蛋白酶和羧肽酶水解变成肽和氨基酸^[1],这些营养物质可被酵母吸收,用于细胞生长、发酵和风味形成^[2]。研究发现不同糖化剂(麦曲和混合商品酶)对黄酒发酵过程和香气特性的影响不同,商品酶不能代替麦曲,麦曲是黄酒酿造中不可缺少的^[3-4]。

麦曲分为生麦曲和熟麦曲,其中生麦曲经自然发酵培养,微生物结构复杂,而熟麦曲是以黄曲霉为强化菌株的纯培养麦曲,以其较高的酶活力广泛应用于黄酒酿造中^[5]。分析发现,强化菌株黄曲霉占熟麦曲群落结构的 75%以上,占接种生麦曲^[6]群落结构的 32.72%,同时在黄酒发酵过程中相对含量大于 1%^[7]。因此,黄曲霉是黄酒酿造中的主要微生物,对黄酒的发酵具有重要作用^[8]。目前,已有关于黄曲霉在麦曲和发酵过程占比的报道^[5,9-10],然而,关于熟麦曲影响黄酒发酵的机理研究较少。

发酵食品的风味特性通常受到自溶过程的影响^[11]。食品发酵过程中存在大量的自溶现象,Iding 等^[12]发现在葡萄酒、啤酒和面包中存在酵母的自溶现象,对产品风味产生影响。Xu 等^[13]发现酱油中米孢霉自溶影响酱油风味的产生。虽然自溶现象普遍存在,但是对黄曲霉菌丝在黄酒酿造过程中自溶的研究尚属空白。本研究深入解析菌丝自溶对黄酒酿造理化指标和风味的影响,并探讨产生这种影响的原因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株 实验过程使用菌株酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*)HJ 和黄曲霉(*Aspergillus flavus*, *A. flavus*)SU-16,均为黄酒生产工业菌株。

1.1.2 培养基 YPD 培养基、PDA 培养基按照文献^[13]配制。

黄酒模拟液:将米粉(100 g)、麦曲(0.86 g)、水(2 L)和液化酶(2 mL)混匀,90 °C液化 2 h,随后利用乳酸调节 pH 值至 4.0,加入 2 mL 糖化酶,于 60 °C条件下糖化 2 h。

1.1.3 材料及试剂 生麦曲、熟麦曲、糯米,浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司;葡萄糖、蛋白胨、

收稿日期: 2022-04-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072205);国家自然科学基金重点项目(22138004)

第一作者: 刘双平,男,博士,副教授

通信作者: 毛健 E-mail: maojian@jiangnan.edu.cn

琼脂糖、DNS、氢氧化钠、甲醛,国药集团化学试剂有限公司;风味相关标准品均为色谱纯级,购自上海安普实验技术有限公司、国药化学试剂有限公司和美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 黄酒发酵 参照绍兴机械化酿酒工艺,将酒母、生麦曲、熟麦曲以及水按照一定比例落料发酵(表1)^[14]。将熟麦曲分别以0%,0.3%,0.6%,0.9%,1.8%,3%的质量比添加至发酵体系中,分析熟麦曲对黄酒发酵的影响。

1.2.2 黄酒模拟发酵 在黄酒模拟液中,以酿酒酵母 HJ 纯培养为对照组,以添加黄曲霉孢子和菌丝为试验组,最终接种浓度为 1.0×10^6 CFU/mL。在 28 °C 条件下培养 120 h,检测酵母生物量、发酵指标和挥发性风味物质。

1.2.3 qPCR 法测定酵母生物量 根据 Elizabeth 等^[15]的方法,按照文献[13]对酵母进行计数。

1.2.4 黄曲霉菌丝收集及菌丝自溶检测 取 200 μ L 黄曲霉 SU-16 孢子悬浮液加入 200 mL PDA 液体培养基中,28 °C 摇瓶培养(150 r/min)48 h~72 h,至菌丝体生长至恒定大小(约 10 mm),过滤收集菌丝体,用生理盐水清洗 2 次,随后置于-80 °C 冰箱中预冷 12 h 以上,在冷冻干燥机中冻干 72 h 以上,冻干结束后置于 4 °C 冰箱中保存。

将 0.2 g 干菌丝与 100 mL 蒸馏水混合,在 35 °C 厌氧环境中培养 10 d 制备自溶物。自溶物样品每隔 24 h 取样 1 次。用凯氏定氮法测定总氮和蛋白质含量^[16],用 HPLC 法测定总游离氨基酸和核苷酸^[17],用比色法测定还原糖,用 pH 计测定 pH 值。

1.2.5 理化指标的检测 参照黄酒(GB/T 13662-2018)^[18]进行总酸(以乳酸计)、氨基态氮和乙醇含量的测定,采用 3,5-二硝基水杨酸比色法^[19]测定还原糖的含量。

1.2.6 黄酒中风味物质的测定 氨基酸和有机酸的测定采用 HPLC,参考文献[17]并稍作修改,氨基酸测定根据保留时间调整波长切换时间,有机酸测定依照保留时间调整流速和分析时间。挥发性风味物质的测定采用 SPME 结合 GC-MS 的方法,测定方法参考文献[20]。

1.2.7 数据分析 利用 Microsoft Office Excel 2016 软件及 Origin Pro 9.0 软件进行数据整理计

表 1 黄酒发酵体系落料配料表

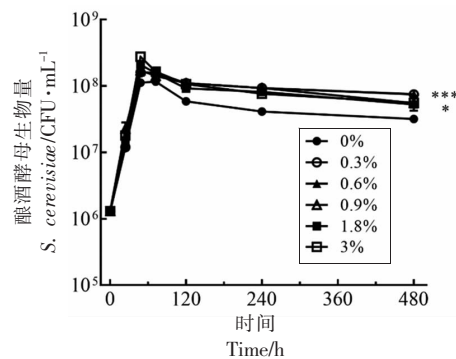
原料	添加量/g	质量比(糯米基准)/%
糯米	1 500.0	-
米饭	2 250.0	150.0
生麦曲	175.5	11.7
熟麦曲	13.5	0.9
酒母	171.0	11.4
清水	1 926.0	128.4
总计	4 536.0	302.4

算和图谱制作,利用 Graphpad 7.0 软件进行显著性分析,除特殊说明外,各样品均设置 3 个平行,数据用“平均值 \pm 标准偏差”表示。

2 结果与分析

2.1 熟麦曲对黄酒发酵的影响

2.1.1 熟麦曲对酿酒酵母的影响 为探究黄酒酿造中熟麦曲对黄酒发酵和品质的影响,通过添加不同比例熟麦曲进行黄酒发酵。分析不同比例熟麦曲黄酒发酵过程中酵母生物量的变化(图1)发现,在黄酒发酵初期,酵母菌大量繁殖,在 72 h 达到峰值,随后逐渐下降进入稳定期。同时,随着熟麦曲添加量的增加,酵母繁殖速度逐渐加快,生物量达到 $1.61 \times 10^8 \sim 2.76 \times 10^8$ CFU/mL 之间,明显高于未添加熟麦曲组酵母的生物量 (1.17×10^8 CFU/mL)。同时,随着熟麦曲添加量的增多,对数生长期衰亡的速率也越快,未添加熟麦曲酵母对数生长期较添加组有所延长。由此可知,熟麦曲添加量越多,酵母繁殖越快的同时衰亡也随之加快。



注:*. $P < 0.05$; ***. $P < 0.001$ 。

图 1 不同熟麦曲添加量黄酒发酵酵母菌株的生长情况
Fig.1 Growth of yeast strains in rice wine fermentation with different supplemental levels of ripe wheat koji

酵母在发酵过程中利用还原糖生成乙醇,分析残糖量(以还原糖计)和乙醇的变化(图 2),0~24 h 产糖率高于耗糖率,还原糖含量增加,熟麦曲添加越多,产糖速度越快。发酵过程中,还原糖的最高质量浓度均在 120 g/L 以下,低于抑制酵母细胞生长和发酵的浓度^[21]。在 72 h 内酵母数量达到峰值(图 1),较高的酵母质量浓度和适当的还原

糖浓度使发酵效率提高。如图 2b 所示,在前酵过程中(0~120 h),乙醇含量与加入熟麦曲比例呈正相关。发酵结束时,熟麦曲添加组的乙醇(>16.50% vol)高于未添加熟麦曲组(14.81% vol),此与还原糖含量以及酵母繁殖速度有关(图 1)。快速的乙醇积累还可以抑制发酵中腐败微生物的生长^[22],保证黄酒的质量安全。

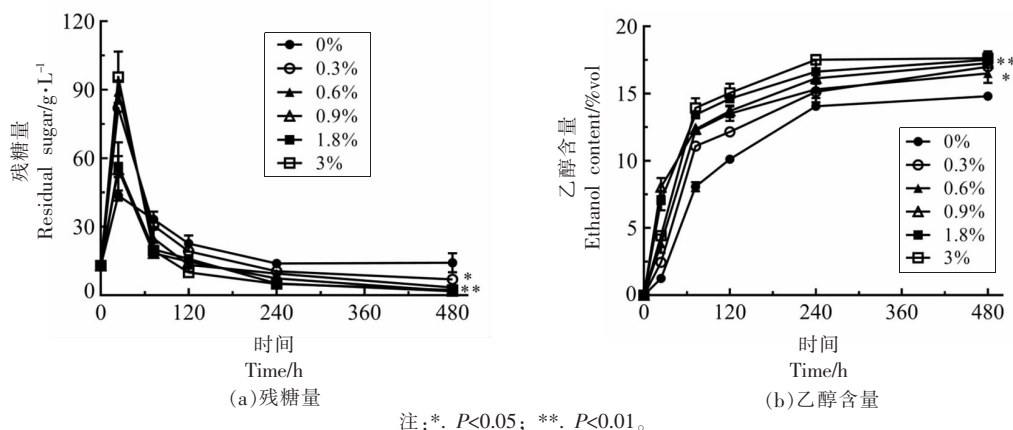


图 2 熟麦曲对黄酒发酵的影响

Fig.2 Effects of cooked wheat koji on Huangjiu fermentation kinetics

2.1.2 熟麦曲对黄酒重要指标的影响 分析熟麦曲对黄酒重要指标的影响(表 2),研究发现各指标参数值均在正常范围内^[18]。所有发酵过程的残糖量均小于 7 g/L (不含熟麦曲的残糖量为 14.24 g/L)。添加熟麦曲的乙醇含量达到 16.50%vol 以上,显著高于未添加组(14.81%vol)。总酸含量在 2.79 g/L 以上,其中不添加熟麦曲的总酸含量最高,为 4.49 g/L,这可能是由于糖化酶的缺乏,导致酵母代谢缓慢,其它细菌产酸多。同时,熟麦曲对黄酒中氨基酸态氮总量有显著影响,熟麦曲添加量越多,发酵液中氨基酸态氮总量越高。有研究指出含氮物质可由蛋白酶水解蛋白质产生,熟麦曲中丰富的蛋白酶可为发酵过程提供更多的氮源。不添加熟麦曲样品中氨基酸态氮的含量较低,发酵结束时发酵醪中的氨基酸态氮的含量仅为 0.50 g/L,这可能是由于发酵醪中蛋白酶含量低,原料中的氮源释放不完全。有机酸的含量随着熟麦曲添加量的增加显著增加,特别是乳酸、乙酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸和草酸(数据未显示)。有机酸不仅可以作为重要的风味物质,还是某些

风味物质的前体^[23]。发酵醪中游离氨基酸含量与熟麦曲添加量呈正相关,氨基酸是发酵醪中氮的主要来源^[24],其在被酵母利用的同时,又会代谢产生于黄酒发酵过程中,直至达到平衡,游离氨基酸及其代谢产物的含量将进一步影响黄酒的风味和品质。综上所述,添加熟麦曲显著减少残糖量(以还原糖计),增加乙醇含量,其使发酵更加彻底,同时显著增加氨基酸态氮、氨基酸和有机酸含量,其使原料中的蛋白质水解更彻底,提高发酵醪中的游离氨基酸、有机酸水平,影响黄酒的风味。

2.1.3 熟麦曲对于黄酒中挥发性风味物质的影响

杂醇是黄酒中重要的香气组成部分,构成了黄酒独特的香气骨架,其主要来源于酵母发酵和氨基酸转化^[25]。不同熟麦曲添加比例的黄酒中的杂醇(正丙醇、异丁醇、异戊醇、2-苯乙醇)含量,如图 3a 所示,当熟麦曲添加量为 0.9%时,杂醇的总量最高。与不添加熟麦曲相比,0.3%熟麦曲的样品中仅正丙醇含量有显著差异,添加量 0.6%和 3%熟麦曲的样品中,仅 2-苯乙醇有显著差异。结果表明,当熟麦曲添加量为 0.3%时,异丁醇和 2-苯乙

表2 不同添加量熟麦曲发酵黄酒的指标

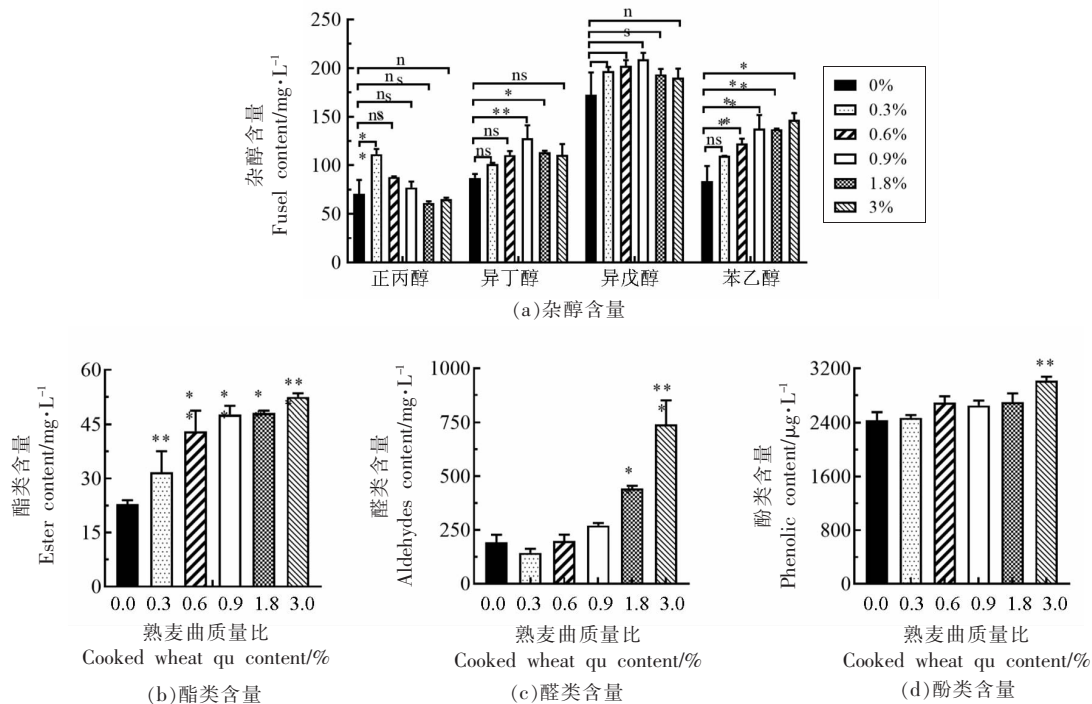
指标	0%CWQ	0.3%CWQ	0.6%CWQ	0.9%CWQ	1.8%CWQ	3%CWQ
pH	4.39 ± 0.09 ^a	4.86 ± 0.01 ^b	5.04 ± 0.01 ^c	5.10 ± 0.02 ^c	5.27 ± 0.00 ^d	5.22 ± 0.01 ^d
乙醇含量/%vol	14.81 ± 0.10 ^a	17.00 ± 0.00 ^b	16.50 ± 0.71 ^b	17.27 ± 0.00 ^b	17.53 ± 0.36 ^b	17.64 ± 0.52 ^b
残糖量/g·L ⁻¹	14.24 ± 4.18 ^a	6.97 ± 0.58 ^b	3.45 ± 1.23 ^b	1.91 ± 0.02 ^b	1.79 ± 0.44 ^b	2.37 ± 1.43 ^b
总酸/g·L ⁻¹	4.49 ± 0.30 ^a	2.79 ± 0.00 ^b	2.89 ± 0.08 ^b	3.26 ± 0.03 ^b	3.26 ± 0.28 ^b	3.86 ± 0.08 ^b
氨基酸态氮/g·L ⁻¹	0.50 ± 0.09 ^a	0.85 ± 0.03 ^b	1.30 ± 0.05 ^c	1.58 ± 0.08 ^d	1.96 ± 0.03 ^e	2.27 ± 0.07 ^f
有机酸/g·L ⁻¹	6.57 ± 1.64 ^a	8.44 ± 0.20 ^a	11.08 ± 0.06 ^b	11.95 ± 0.97 ^b	14.52 ± 1.24 ^b	14.73 ± 0.88 ^b
游离氨基酸/g·L ⁻¹	3.16 ± 0.53 ^a	6.08 ± 0.10 ^b	8.56 ± 0.19 ^c	9.81 ± 0.64 ^c	10.81 ± 0.24 ^c	11.08 ± 0.09 ^c

注:数值表示为“平均值±标准差”(n=3),同一行不同字母表示差异有统计学意义(P<0.05)。

醇含量最高,且随熟麦曲添加量的增加而降低;异丁醇、异戊醇随熟麦曲添加量的增加呈先增加后降低的趋势,2-苯乙醇随熟麦曲添加量的增加而增加,差异显著。醇类主要由酵母利用氮源代谢形成,由于添加熟麦曲改变了醪液中的氮源组成,从而影响酵母氮代谢形成风味物质。酯类、醛类和酚类的含量随熟麦曲添加量的增加而有所增加(图3),添加0.3%、0.6%、0.9%、1.8%、3%的熟麦曲对酯类的促进率分别为112.86%、99.21%、67.01%、

98.80%、129.24%。

综上,熟麦曲添加量越多,发酵过程中酵母活力越高,还原糖利用率、乙醇产生率越高,氨基酸态氮、氨基酸等含氮物质增加,此与熟麦曲可提供大量酶类物质^[26]促进大分子物质酶解有关,由此可知,熟麦曲可通过为发酵体系提供大量酶类物质,进而影响黄酒发酵中重要指标以及风味物质的含量。



注:ns. $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$ 。

图3 熟麦曲对挥发性风味物质的影响

Fig.3 Effect of cooked wheat koji on volatile flavor compounds

2.2 黄曲霉菌丝自溶分析

根据以上研究可知,熟麦曲可通过其较高的酶活力促进黄酒发酵,然而也有研究表明,微生物自溶同样可对发酵产品产生重要影响。Tanguler 等^[6]发现,发酵过程中酵母自溶可增加氨基酸的含量,其影响氨基酸态氮以及风味的产生;Emiliani 等^[27]发现黑曲霉自溶物中含有大量的 *d*-葡萄糖和糖肽,在自溶过程中部分细胞壁溶解^[27],为发酵提供原料。Xu 等^[11]研究发现,米曲霉的自溶,可促使酿造酱油中产生重要的醇类和酯类物质。在清酒、黄酒、酱油等酿酒行业中,菌丝自溶十分常见,本实验室前期研究表明,黄曲霉 SU-16 的生物量在发酵过程中并没有显著增加,而是有所降低(数据未显示),这可能是菌丝自溶导致。因此,为验证黄曲霉菌丝自溶对黄酒发酵的影响,首先分析菌丝体自溶过程中生物大分子的变化。

细胞通常由蛋白质、游离氨基酸、核苷酸和还原糖组成,在自溶过程中,细胞壁破裂,细胞质内

溶物溶解到周围环境中。如表 3 所示,菌丝自溶过程中,菌丝体蛋白质和游离氨基酸含量在第 1 天迅速增加,第 6 天蛋白质质量浓度最高,为 (116.37 ± 95) mg/L,溶解蛋白量占菌丝体总量的 18.05%。第 7 天,蛋白溶解量降至 (78.77 ± 3.10) mg/L,随后变化不大。同时游离氨基酸含量在第 6 天达到最高,为 (134.66 ± 10.16) mg/L,之后略有下降。不同的是,在整个诱导自溶过程中核苷酸的含量增加,2~4 d 大多数核苷酸溶解于溶液中,然后缓慢增加。在自溶的第 10 天,核苷酸的溶解含量为 (135.25 ± 5.10) mg/L,达到最高值。菌丝在自溶 1~6 d,还原糖含量缓慢增加,到第 7 天达到稳定值,其溶出量在第 10 天达到最大为 (4.63 ± 0.55) g/L,占菌丝体干重的 1.76%。检测自溶 10 d 的生物大分子含量发现,SU-16 的干菌丝体由 32.23% 的蛋白质,10.21% 的核苷酸和 13.10% 的总糖组成。由此可知,菌丝自溶可为发酵体系提供一定的生物大分子,其是否对发酵体系产生影响需进一步研究。

表 3 黄曲霉 SU-16 自溶过程中生物分子的变化

Table 3 The changes of biomolecules during *A. flavus* SU-16 autolyzing

自溶时间/d	蛋白质/mg·L ⁻¹	游离氨基酸/mg·L ⁻¹	核苷酸/mg·L ⁻¹	还原糖/g·L ⁻¹	pH
1	62.06 ± 1.03	104.87 ± 11.87	1.03 ± 0.08	2.48 ± 0.31	5.43 ± 0.03
2	81.16 ± 2.74	101.58 ± 8.18	1.13 ± 0.05	2.88 ± 0.65	5.41 ± 0.04
3	83.55 ± 5.17	103.60 ± 4.65	85.6 ± 1.51	3.13 ± 0.75	5.44 ± 0.06
4	92.33 ± 2.52	102.93 ± 4.05	96.23 ± 2.15	3.30 ± 0.44	5.41 ± 0.06
5	101.45 ± 5.17	105.65 ± 6.43	102 ± 2.54	3.19 ± 0.49	5.39 ± 0.09
6	116.37 ± 8.95	134.66 ± 10.16	112 ± 3.83	3.72 ± 0.73	5.43 ± 0.06
7	78.77 ± 3.10	128.47 ± 8.10	118 ± 5.49	4.06 ± 0.70	5.42 ± 0.08
8	83.55 ± 5.17	125.63 ± 4.52	124 ± 5.28	4.02 ± 0.43	5.49 ± 0.01
9	83.57 ± 5.17	128.01 ± 5.98	127 ± 6.15	4.52 ± 0.85	5.45 ± 0.08
10	84.74 ± 8.27	128.10 ± 5.32	135.25 ± 5.10	4.63 ± 0.55	5.52 ± 0.06

2.3 菌丝自溶对于黄酒发酵以及风味的影响

本试验在黄酒模拟液中利用可自溶的黄曲霉菌丝和不可自溶的黄曲霉孢子与酵母共培养进行发酵试验,比较发酵过程中酵母生长、理化指标以及风味物质的差异,从而明晰菌丝自溶对于黄酒发酵的影响。

2.3.1 菌丝自溶对于酵母生长、重要指标的影响

酵母生长量如图 4 所示,添加黄曲霉的酵母的生长趋势与对照组相同,然而在发酵过程中,添加

黄曲霉组始终高于对照组,在 36 h 达到最大值,添加的菌丝和孢子样品酵母的生物量是对照组的 1.32 倍,显著升高($P < 0.05$),可见,不论是菌丝或是孢子均可显著提高酵母的生长和繁殖能力。

研究菌丝自溶对理化指标的影响。如图 5 所示,与对照组相比,黄曲霉菌丝体添加组的乙醇含量提高了 2.61% vol ($P < 0.05$),耗糖速度加快,120 h 残糖含量约为 2.52 g/L,比对照组低 18.53 g/L ($P < 0.01$)。同时,添加菌丝体样品发酵液中总酸和

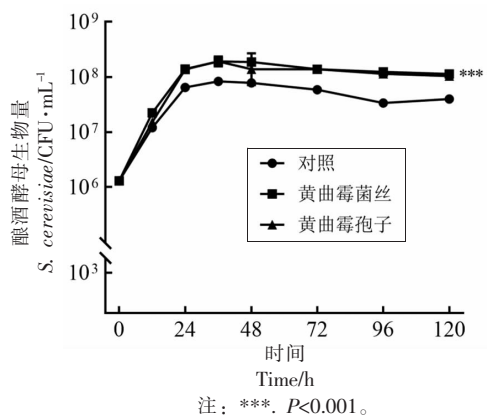


图4 添加不同形态黄曲霉对黄酒发酵酵母菌株的影响
Fig.4 Growth of the yeast strain used during rice wine fermentation with different *A. flavus* forms

氨基酸态氮含量显著高于对照组($P<0.05$)。黄曲霉孢子发酵 120 h 时,乙醇含量提高了 0.51% vol,残糖含量为 26.12 g/L(略高于对照),总酸含量显著高于对照组($P<0.05$)。综上所述,菌丝体的添加对酵母的生长繁殖、乙醇产量和氨基酸态氮含量均有显著影响。相关研究表明,氮源与酵母细胞生长速率呈正相关,发酵液中丰富的小分子肽和游离氨基酸可以促进酵母的生长,提高酵母细胞的耗糖率,增加乙醇的产量^[28-29]。由此可知,熟麦曲可以通过黄曲霉菌丝自溶,为发酵醪提供氮源,进而加速发酵进程。

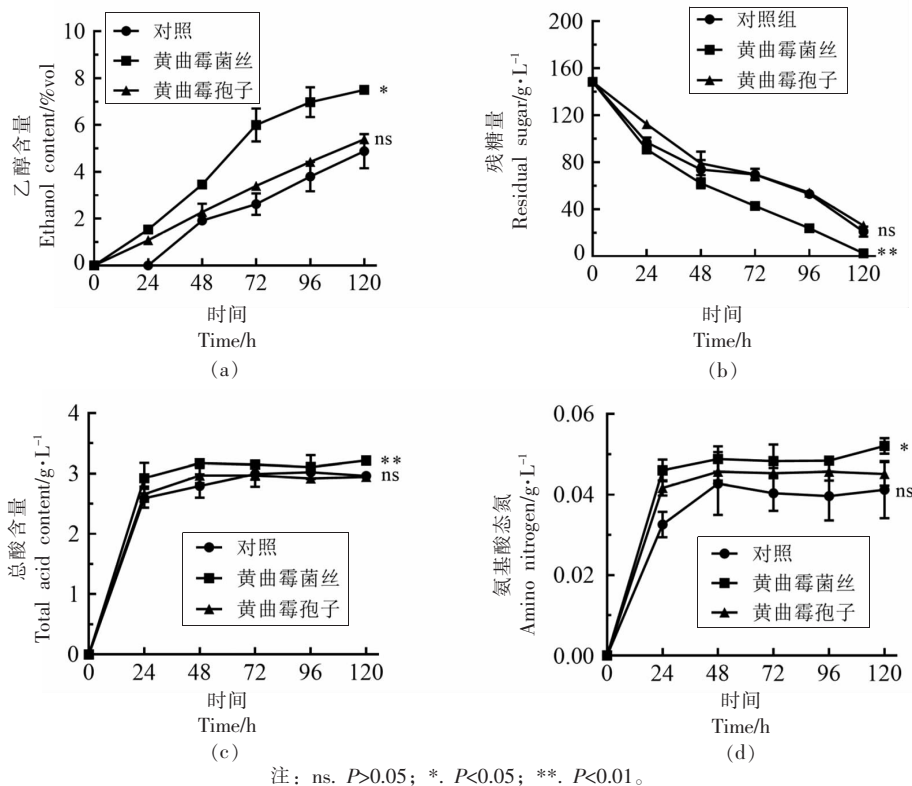
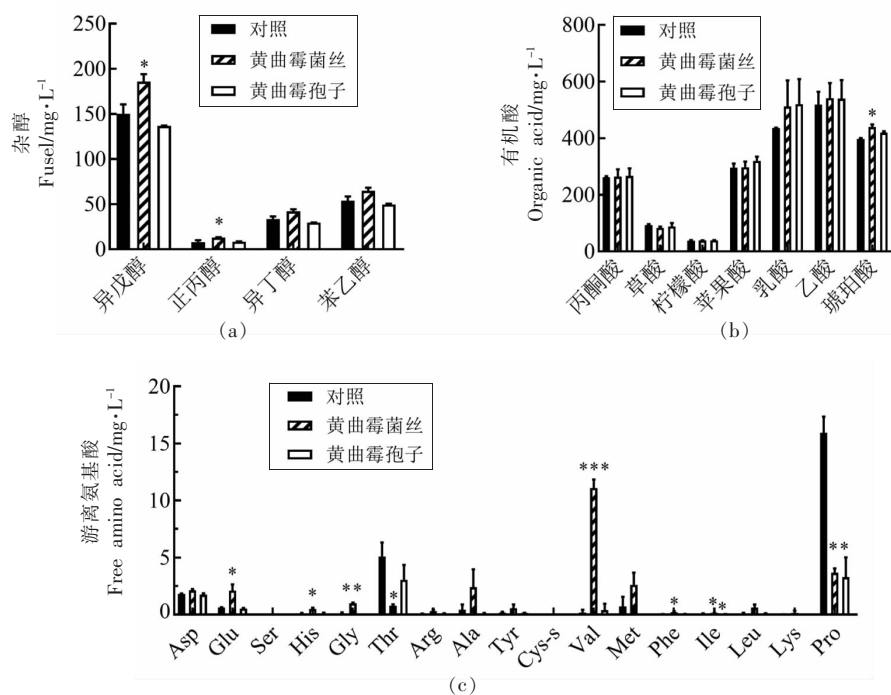


图5 添加不同形态黄曲霉黄酒的理化指标变化

Fig.5 The changes of physicalchemical indexes of rice wine with different *A. flavus* forms

2.3.2 对于黄酒风味物质的影响 研究菌丝自溶对于黄酒中挥发性风味物质的影响,添加黄曲霉菌丝体的样品中,4种杂醇的总量为 305.66 mg/L(图 6a),比对照组高 60.13 mg/L。黄曲霉孢子样品中杂醇总量为 224.24 mg/L,比对照低 21.30 mg/L。有机酸的组成和含量无显著差异(图 6b),主要为

乳酸、乙酸和琥珀酸。氨基酸组成和含量存在显著差异(图 6c),菌丝样品中游离氨基酸的种类和含量显著高于对照组,而孢子样品中游离氨基酸组成无显著差异,添加黄曲霉菌丝体对相关风味物质(杂醇和游离氨基酸)有显著影响,此与熟麦曲对黄酒发酵的影响结果一致。



注: *. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

图 6 添加不同形态黄曲霉黄酒中风味物质

Fig.6 The changes of flavor compounds of rice wine with different *A. flavus* forms

3 结论

本研究分析黄曲霉在黄酒发酵中的作用机理。通过不同比例熟麦曲发酵黄酒发现,熟麦曲可促进黄酒发酵,增加酒中含氮物质含量,改变风味,结合前期研究可知,这与熟麦曲中酶类物质有关。通过黄曲霉菌丝自溶试验验证菌丝体自溶可为发酵体系提供一定的蛋白质、核苷酸、糖等生物分子物质,进一步通过黄曲霉孢子与菌丝在黄酒模拟液中与酿酒酵母 HJ 共酵,验证菌丝自溶对黄酒酿造过程中酵母的生长、氮源水平以及风味物质均有显著影响。由此可知,熟麦曲不仅可通过提供酶类物质影响黄酒发酵,同时菌丝自溶也可通过提供生物大分子物质影响黄酒发酵。

本研究基于熟麦曲对黄酒发酵影响机理的解析,详细揭示了熟麦曲通过酶以及黄曲霉菌丝自溶对发酵体系产生的影响,对熟麦曲发酵过程中的作用以及作用机理有了更加深入的了解,研究成果可为今后熟麦曲的应用以及指导生产起到积极的作用。

参 考 文 献

- [1] TSAO G, OUYANG P, JIAN C. Biotechnology in China II [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 1-264.
 - [2] MO X, XU Y, FAN W. Characterization of aroma compounds in Chinese rice wine Qu by solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(4): 2462-2469.
 - [3] CHEN S, XU Y. Effect of 'wheat Qu' on the fermentation processes and volatile flavour - active compounds of Chinese rice wine (Huangjiu)[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2013, 119 (1/2): 71-77.
 - [4] 张晶, 刘双平, 周志磊, 等. 麦曲添加量对黄酒酿造及其风味的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 62-67.
- ZHANG J, LIU S P, ZHOU Z L, et al. Effect of addition of wheat qu on brewing and flavor of Huangjiu[J]. Food & Machinery, 2020, 36(4): 62-67.

- [5] YU P, DU J, CAO C, et al. Development of a novel multi-strain wheat Qu with high enzyme activities for Huangjiu fermentation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(11): 4808–4817.
- [6] LIU S, HU J, XU Y, et al. Combined use of single molecule real-time DNA sequencing technology and culture-dependent methods to analyze the functional microorganisms in inoculated raw wheat Qu[J]. Food Research International, 2020, 132: 109062.
- [7] LIU S, CHEN Q, ZOU H, et al. A metagenomic analysis of the relationship between microorganisms and flavor development in Shaoxing mechanized Huangjiu fermentation mash[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 303: 9–18.
- [8] GIRI A, OSAKO K, OKAMOTO A, et al. Antioxidative properties of aqueous and aroma extracts of squid miso prepared with *Aspergillus oryzae*-inoculated koji[J]. Food Research International, 2011, 44(1): 317–325.
- [9] SHEN F, YANG D, YING Y, et al. Discrimination between Shaoxing wines and other Chinese rice wines by near-infrared spectroscopy and chemometrics[J]. Food and Bioprocess Technology, 2010, 5(2): 786–795.
- [10] YU H, ZHOU Y, FU X, et al. Discrimination between Chinese rice wines of different geographical origins by NIRS and AAS[J]. European Food Research and Technology, 2006, 225(3/4): 313–320.
- [11] XU N, LIU Y, HU Y, et al. Autolysis of *Aspergillus oryzae* mycelium and effect on volatile flavor compounds of soy sauce[J]. Journal of Food Science, 2016, 81(8): C1883–C1890.
- [12] IDING K, H BÜNTEMEYER, GUDERMANN F, et al. An automatic system for the assessment of complex medium additives under cultivation conditions[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2001, 73(6): 442–448.
- [13] 王小壮. 黄酒酿造中黄酒酵母与黄曲霉的定量分析及相互作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
WANG X Z. Quantitative analysis and interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus flavus*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2021.
- [14] CHEN S, XU Y. The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 116(2): 190–196.
- [15] ELIZABETH C, MIROSLAV S, HO N W Y, et al. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Yeast Research, 2010, 10(4): 385–393.
- [16] TANGULER H, ERTEN H. Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature[J]. Food & Bioprocesses Processing, 2008, 86(4): 317–321.
- [17] GONG M, ZHOU Z L, YU Y J, et al. Investigation of the 5-hydroxymethylfurfural and furfural content of Chinese traditional fermented vinegars from different regions and its correlation with the saccharide and amino acid content [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 124: 109175.
- [18] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准 黄酒: GB/T 13662–2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1–22.
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of China. The People's Republic of China national standard Huangjiu: GB/T 13662–2018[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018: 1–22.
- [19] GONG M, ZHOU Z L, JIN J S, et al. Effects of soaking on physicochemical properties of four kinds of rice used in Huangjiu brewing[J]. Journal of Cereal Science, 2020, 91: 102855.
- [20] ZHOU Z L, JIAN D Z, GONG M, et al. Characterization of the key aroma compounds in aged Zhenjiang aromatic vinegar by gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry, quantitative measurements, aroma recombination and omission experiments[J]. Food Research International, 2020, 136: 109434.
- [21] SHOU H Z, LING Z Y, YANG X, et al. Relationship between metabolites of wheat Qu microorganisms and flavor of rice wine[J]. China Brewing, 2007(8): 55–57, 67.
- [22] WANG J, WANG Q. Analysis and preventive measure of fermentation broth deterioration of rice wine[J]. China Brewing, 2005(8): 36–39.
- [23] PERES R G, MORAES E P, MICKE G A, et al. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection[J]. Food Control, 2009, 20(6): 548–552.

- [24] YANG Y, XIA Y, WANG G et al. Effects of boiling, ultra-high temperature and high hydrostatic pressure on free amino acids, flavor characteristics and sensory profiles in Chinese rice wine[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 407–416.
- [25] LIU S, MA D, LI Z, et al. Assimilable nitrogen reduces the higher alcohols content of Huangjiu[J]. Food Control, 2021, 121(Suppl 5): 107660.
- [26] 陈亮亮. 黄酒麦曲制曲工艺的优化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
CHEN L L. Study on optimization of wheat Qu-making process of Chinese rice wine wheat Qu[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013.
- [27] EMILLANI E, DE DAVIE I U. Induced autolysis of *Aspergillus oryzae* (*A. niger* group): iv. carbohydrates[J]. Applied Microbiology, 1962, 10(6): 504–512.
- [28] LEI H, ZHAO H, YU Z, et al. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(6): 1562–1574.
- [29] PIDDOCKE M P, KREISZ S, HELDT-HANSEN H P, et al. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(3): 453–464.

Studies on Mechanism of Cooked Wheat Qu Promoting Huangjiu Fermentation

Liu Shuangping^{1,2}, Liu Caixia², Wang Xiaozhuang¹, Zhou Zhilei^{1,2}, Mao Jian^{1,2,3*}

(¹School of Food Science and Technology, National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²Jiangnan University (Shaoxing) Industrial Technology Research Institute, Shaoxing 312000, Zhejiang

³Zhejiang Guyuelongshan Shaoxing Wine Co. Ltd., National Engineering Research Center of Huangjiu, Shaoxing 312000, Zhejiang)

Abstract Cooked wheat qu is a kind of wheat qu that pure culture of *Aspergillus flavus*, which is widely used in modern Huangjiu production. To explore the mechanism of cooked wheat qu in Huangjiu fermentation, the influence of cooked wheat qu on Huangjiu brewing was analyzed by controlling the proportion of it. Further, the autolysis characteristics of *Aspergillus flavus* mycelia (autolysis) was studied, and the influence of mycelia autolysis on Huangjiu was analyzed by co-culture experiment of *Aspergillus flavus* mycelia (autolysis) and spores (not autolysis) with yeast. The results showed that, with the increase of the proportion of cooked wheat qu added, the *S. cerevisiae* biomass in the fermentation system significantly increased by 37.61% to 135.90%, and the alcohol content, ammonia nitrogen, amino acid and organic acid significantly increased by 15.87%, 70.00%, 28.46% and 92.41% respectively. Furthermore, the study on the autolysis of *Aspergillus flavus* mycelium found that the autolysis of mycelium can provide amino acids, sugars, nucleotides and other biomolecules substances for the fermentation system, effectively increase the *S. cerevisiae* biomass in the fermentation system by 1.32 times, and significantly affect the content of ethanol, ammonia nitrogen, fusel and amino acids. Above all, on the one hand, cooked wheat qu can promoting Huangjiu fermentation by making use of its rich enzyme substances to promote the decomposition of raw materials; on the other hand, a large number of mycelium in cooked wheat qu has autolysis in the fermentation process, which provide nitrogen sources for the fermentation mash and affects the general parameters and flavor compound formation.

Keywords Huangjiu brewing; *Aspergillus flavus*; autolysis; nitrogen source