

红曲菌与酿酒酵母组合发酵对米酒挥发性风味组分生成的影响

尤文强^{1,2}, 严茨银^{1,2}, 杨梓翊^{1,2}, 孙金沅⁴, 张雯^{1,2}, 韩金志^{1,2}, 艾连中³,
孙宝国⁴, 倪莉^{1,2}, 吕旭聪^{1,2*}

¹福州大学先进制造学院 食品营养与健康研究中心 福建晋江 362200

²福州大学生物科学与工程学院 食品科学技术研究所 福州 350108

³上海理工大学健康科学与工程学院 上海食品微生物工程技术研究中心 上海 200093

⁴北京食品营养与人类健康高精尖创新中心 北京工商大学 北京 100048)

摘要 红曲酒是以糯米为原料,以红曲作为发酵剂酿造而成的。其中红曲菌和酿酒酵母是酿造体系中的核心微生物。本文以糯米为发酵基质,选用紫色红曲菌、红色红曲菌和高粱红曲菌分别与酿酒酵母菌进行组合发酵,研究不同组合和发酵模式(同步发酵和顺序发酵)对挥发性组分生成的影响。基于顶空固相微萃取-气质联用法,从发酵的米酒中共鉴定出 89 种挥发性风味化合物。热图分析发现:红曲菌与酿酒酵母组合发酵明显比红曲菌纯菌发酵产生更多的挥发性物质,顺序发酵明显比同步发酵产生更多的挥发性风味物质,尤其是紫色红曲菌、红色红曲菌与酿酒酵母组合的顺序发酵。对不同红曲菌与酿酒酵母组合发酵的挥发性风味组分进行主成分分析,紫色红曲菌和红色红曲菌与酿酒酵母在顺序发酵模式下会产生更多的挥发性风味组分且其风味组成较为接近。挥发性风味组分含量差异分析表明,异丁醇、1-庚醇、(3Z)-3-壬烯-1-醇、2-十四醇、(Z)-5-辛烯-1-醇、癸醛、辛酸乙酯、癸酸乙酯、9-癸烯酸乙酯、苯乙酸乙酯、乙酸苯乙酯、1,2-二甲氧基-4-乙烯基苯等是红曲菌与酿酒酵母组合发酵产物中的特征挥发性风味物质。本研究结果可为红曲酒工业化生产中风味品质的提升与质量控制提供一定的参考数据。

关键词 红曲菌; 酿酒酵母; 组合发酵; 红曲酒; 挥发性物质

文章编号 1009-7848(2024)03-0287-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.029

中国黄酒是世界上最古老的酿造酒之一,距今已有近 5 000 年历史^[1]。传统黄酒是以糯米为原料,经酒曲糖化、酒化酿造而成的米酒^[2-3]。糯米因富含支链淀粉(约 98%)^[4],故被认为酿造高品质米酒的最佳基质。“曲乃酒之魂”,酒曲是决定酒品质量的重要因素,主要由“菌系、霉系和物系”共同构成,其中菌系主要以酵母菌、丝状真菌和细菌为主。在酒醪中,发酵基质经菌群发酵产生的初级代谢产物、次级代谢产物、菌体溶解物以及基质残留物,是赋予米酒不同风味的物质基础^[5]。此外,米酒酿造过程兼具生物与化学转变过程,包括液化、糖化、酒精发酵、酯化反应、氧化-还原反应等,其中,酒曲中微生物菌群的代谢活动是驱动以上转化的主要动力。

红曲酒是中国黄酒的典型代表之一,醇香浓

郁、酒体饱满、风味独特。红曲菌在酿酒领域的应用历史悠久^[6],具有丰富的酶系,包括蛋白酶、淀粉酶、酯化酶等,在发酵过程中发挥液化、糖化和酯化作用,并可产酸、产醇等,从而广泛提升酒体风味^[7]。如:郑翠银^[8]研究发现红曲发酵能够赋予红曲米酒红艳、香甜、味醇等特点,并增加醇厚口感,促使酒体更加丰满。钟明叶等^[9]也发现红曲菌能显著提高黄酒中酸类、酯类、酮类等风味物质的含量。说明红曲菌是红曲酒酿造体系中挥发性风味组分生成的主要核心功能微生物之一。

传统米酒酿造工艺大多采用边糖化、边发酵,同步发酵方式,这种方式可显著提升发酵效率并降低能耗^[10]。在同步发酵过程中,糯米经糊化、淀粉酶液化、糖化可转化为小分子可发酵糖,然后同步经酿酒酵母菌酒精发酵,从而显著缩短发酵时间^[11]。顺序发酵方式则主要是将糯米先经过糖化,再进行酒精发酵。研究表明,采用顺序发酵模式可产生更多具有果香味和芳香味物质^[12]。然而,在顺序发酵模式下,因初始葡萄糖浓度过高产生高渗

收稿日期: 2023-03-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072204)

第一作者: 尤文强,男,硕士生

通信作者: 吕旭聪 E-mail: xucong1154@163.com

透压,可能会抑制酵母菌的生长繁殖和代谢活动,限制米酒的发酵速率^[13]。两种发酵模式均各有利弊,需结合具体生产过程择优而用。目前,我国传统米酒的研究主要集中在优势菌种分离筛选和发酵工艺改良等方面^[14],而对于核心酿造功能微生物的产香特性研究较少,以及发酵过程中酿造微生物之间的相互作用及其对红曲酒挥发性风味形成的影响亦欠缺深入分析。

本文以糯米为发酵基质,选择3种酿造红曲菌(紫色红曲菌、红色红曲菌和高粱红曲菌),采用同步发酵和顺序发酵两种方法,采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用(HS-SPME-GC-MS)技术探究3种红曲菌与酿酒酵母组合发酵对红曲酒挥发性风味组分生成的影响。本文可为红曲酒在工业化酿造过程中风味定向改进与品质改善提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株和化学 品

本研究所用的红色红曲菌(*Monascus ruber*)、紫色红曲菌(*Monascus purpureus*)、高粱红曲菌(*Monascus kaoliang*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是课题组前期从福建古田红曲中分离、纯化、鉴定获得的,现保藏于福州大学食品科学技术研究所。本研究所用的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖(YPD)培养基购自青岛海博生物技术有限公司;2-辛醇(优级纯)购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

固相微萃取头(50 μm DVB/CAR/PDMS)、57330-U 顶空固相微萃取手柄,美国 Supelco 公司;7890-B/5977A 气相色谱-质谱联用仪、7890A 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;ZD-2 电位滴定仪,上海仪电科学仪器股份有限公司;UV-2000 紫外-可见分光光度计,日本 HITACHI 公司;YXOSG41280 型立式高压蒸汽灭菌锅,上海医用核子仪器厂;SHP-150 生化培养箱,上海精宏实验设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 红曲菌孢子悬液的制备 从4℃冰箱取出红曲菌菌种,无菌条件下挑取菌丝接种于PDA培养基(试管斜面);28℃恒温静置培养5d,挑取新生菌丝转接于PDA培养基(茄形瓶斜面)进行活化和扩大培养;28℃恒温培养3d后,加入无菌生理盐水,充分洗脱孢子,制备孢子菌悬液;经血球板计数法计算孢子浓度,备用。

1.3.2 酵母细胞悬浮液的制备 从4℃冰箱取出菌种,接种于YPD培养基(试管斜面),28℃恒温培养2d;将活化菌落转接于YPD液体培养基,置于旋转式摇瓶柜30℃,200 r/min培养1d,离心获得菌体,以无菌生理盐水重悬获得菌悬液,通过血球板计数法计算菌悬液浓度,备用。

1.3.3 红曲酒酿造工艺 如图1所示,30g的圆糯米置于250 mL锥形瓶,加入蒸馏水60 mL,室温下浸泡8 h,121℃条件下灭菌20 min。3种红曲菌均采用两种不同发酵模式,共设3个组别,分别为空白组、同步发酵组和顺序发酵组。空白组为不同红曲菌纯种发酵,以 10^6 CFU/g(以孢子计)分别

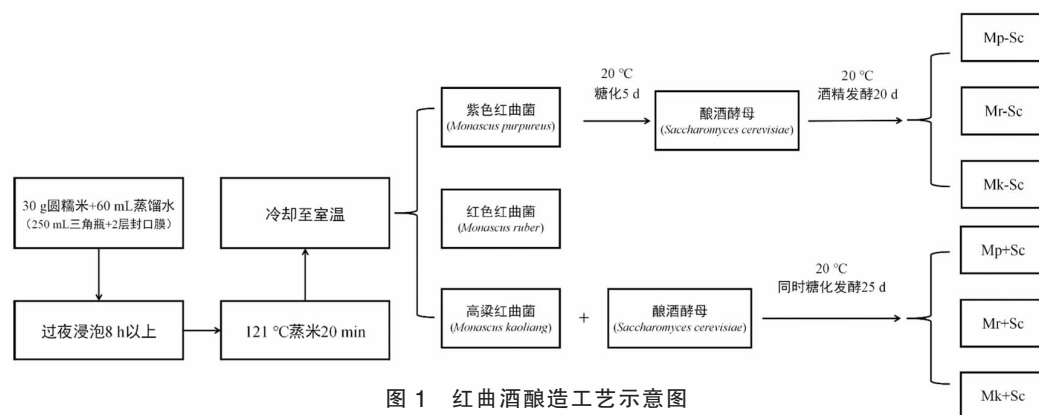


图1 红曲酒酿造工艺示意图

Fig.1 Schematic diagram of Hongqu rice wine brewing process

将紫色红曲菌、红色红曲菌和高粱红曲菌的孢子悬液接种于糯米培养基,20℃发酵25 d;在同步发酵组,同步以 10^6 CFU/g接种酵母菌悬液;在顺序发酵组,接种红曲菌的孢子悬液,20℃下发酵5 d后,接入酵母菌悬液,继续发酵20 d。待发酵结束,酒醪经过滤收集酒液样品,置于-20℃下保存待用,每个发酵组均设置3个试验平行。其中,紫色红曲菌、红色红曲菌和高粱红曲菌的空白组、同步发酵组和顺序发酵组分别命名为Mp、Mr、Mk;Mp+Sc、Mr+Sc、Mk+Sc;Mp-Sc、Mr-Sc、Mk-Sc。

1.3.4 酒样理化指标的检测 按照GB/T 13662-2018《黄酒》^[15]对酒样中的总酸含量进行检测;酒精含量采用气相色谱仪进行检测^[16];还原糖采用3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定^[17]。

1.3.5 挥发性风味组分的检测 萃取头预处理:将萃取头插入气相色谱仪的进样口(250℃)中老化1 h。样品处理:量取6 mL稀释10倍的酒样于装有转子的顶空瓶中,并添加2.0 g NaCl和10 μ L 2-辛醇(10 mg/L),密封,将其放于60℃水浴锅中预热10 min,插入老化的萃取头,萃取吸附45 min。将萃取头从顶空瓶中取出,迅速插入气相色谱仪进样口,250℃解吸5 min后将萃取头拔出,机子进行自动检测分析。GC条件:高纯度氦气作为载气,流速1 mL/min;HP-INNOWAX色谱柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m),不分流进样;进样口温度:250℃;程序升温:起始温度40℃,保持5 min,以5℃/min升至120℃,然后以10℃/min升

至240℃,保留5 min;后运行温度240℃,后运行时间5 min。MS条件:接口温度280℃;连接杆温度150℃;EI电离源,电子能量70 eV,离子源温度230℃,质量扫描范围 m/z 为35~450;ACQ方式Scan,所测结果均采用2-辛醇内标法进行半定量分析。

1.3.6 统计学分析 3个平行试验组数据结果均以平均值 \pm 标准差值表示;利用GraphPad Prism 8软件绘制柱状图用以表示不同组间基本理化指标的数值;利用R语言绘制热图,将不同酒样中的挥发性组分相对丰度直观地展现出来;利用SIMCA 14.1软件对不同发酵模式下的酒样进行主成分分析(PCA),显示出不同组间挥发性风味组分的差异性;利用R语言绘制两组间挥发性风味组分的差异倍数图,筛选得出不同种类红曲菌在不同发酵模式下的特征挥发性风味物质。

2 结果与分析

2.1 基本理化分析

酒精度、还原糖、总酸等基本理化参数可用于评价不同发酵策略对红曲米酒品质的影响。由图2a可见,空白组中还原糖含量普遍大于40 g/L;其中,Mr组还原糖含量达到最高水平54.99 g/L。然而,在同步发酵模式下,酒醪中的还原糖残余量均小于20 g/L;同时,在顺序发酵模式,酒醪中还原糖残余量亦小于20 g/L,这表明两种发酵模式对酒醪中还原糖含量变化未产生较大的影响。

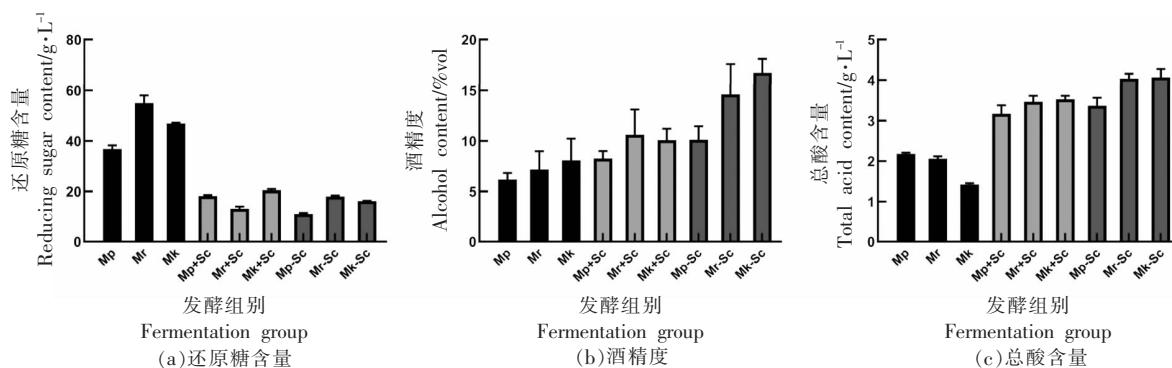


图2 红曲酒的基本理化指标

Fig.2 Basic physical and chemical indicators of Hongqu rice wine

如图2b所示,同时发酵模式下Mr+Sc组中的乙醇含量(10.62%vol)最高,然后依次是Mk+Sc组

(10.09%vol)、Mp+Sc组(8.26%vol);而在顺序发酵模式下,Mk-Sc组中的乙醇含量最高,为16.72%

vol, 其次是 Mr-Sc 组 (14.60%vol) 和 Mp-Sc 组 (10.12%vol), 这表明红曲菌与酿酒酵母共发酵过程中, 顺序发酵模式下产生的乙醇含量明显高于同步发酵模式, 可能是红曲菌和酿酒酵母同步发酵时, 两种菌存在竞争关系, 并且当乙醇积累可抑制红曲菌的生长代谢或淀粉酶活性^[18], 从而依次阻碍糖化与酒化的进行。在顺序发酵模式下, 酿酒酵母介入后在短期内可与红曲菌持续进行共生长, 并可充分利用红曲菌前期经糖化作用产生的还原糖, 进行生长繁殖并且将其充分转化为乙醇^[19]。此外, 3种红曲菌纯种发酵组中酒精度均大于 5%, 表明红曲菌发酵可产生少量乙醇^[20-21]。

如图 2c 所示, 空白组中总酸浓度均小于 2.5 g/L; 其中, Mp 组 (2.18 g/L) > Mr 组 (2.06 g/L) > Mk 组 (1.42 g/L)。同时, 在联合发酵时, 总酸含量则均大于 3 g/L, 且 Mk+Sc 组和 Mk-Sc 组的总酸含量较高。总酸的积累可能与酿酒酵母有关, 有学者经宏基因组功能注释发现酵母属具有乳酸、乙酸生成代谢的完整酶系^[22]。表明, 红曲菌与酿酒酵母在发酵过程中表现出竞争与协作并存的动态互作关系。

2.2 挥发性风味物质分析

由不同发酵组酒醪中总计鉴定出 89 种挥发性风味物质, 主要包括 29 种酯类、5 种酸类、25 种醇类、8 种醛类、8 种酮类、5 种酚类和 9 种其它化合物。由图 3a 所示, 红曲菌纯种发酵产生的挥发性风味物质数量较少, 其中, Mr 组有 58 种, Mk 组有 66 种, Mp 组有 60 种, 仅在部分酯类和羟基类化合物上表现出特异性, 如糠醛 [C33]、2-辛酮 [C69]、苯甲醛 [C35]、4-甲基苯基 (2E)-2-己烯酸酯 [C44]、苯甲酸甲酯 [C46] 等; 其中, 糠醛和苯甲醛可赋予酒体甜味和杏仁味。同时, 1-丁醇 [C7]、亚油酸乙酯 [C66]、古巴烯 [C88] 等仅在 Mk 组中检出; Mp 组中特有香气成分为硬脂酸乙酯 [C63] 等, 与之前报道中发酵红曲酒的主要风味成分相一致^[23]。然而, 在同步发酵模式中产生的挥发性风味物质主要以酸类、酚类物质和少量酯类为主, 包括: 正癸酸 [C5]、己酸 [C2]、辛酸 [C3] 和 4-乙基苯酚 [C79] 等; 其中, 辛酸可赋予酒体桃子味、草莓味等多种果味, 并且能抑制芳香酯的水解, 对维持香气平衡起到了关键作用^[24]。而油酸乙酯 (鲜花香) 仅在 Mr+

Sc 组中被检出。同时, 在顺序发酵模式中, Mr-Sc 组和 Mp-Sc 组在挥发性风味物质组成上具有相似性, 均以醇类、酯类、酚类等物质含量较为突出, 如: α -松油醇、1-己醇、琥珀酸异戊酯乙酯、香茅醇、1-辛烯-3-醇、愈创木酚、苯酚、癸酸乙酯和丁酸丁酯等。而在 Mr-Sc 组中 1-戊醇 [C9]、3,5-二甲基苯甲醛 [C37]、2-壬醇 [C18]、2-壬酮 [C70]、2-庚醇 [C10]、2-庚酮 [C68] 和庚酸乙酯 [C42] 等含量较高; 黄玲玲等 [25] 在以红曲菌液态酒曲酿造的黄酒中也发现其特有香气成分包括 2-庚醇、2-壬醇等; 另一方面, 在 Mp-Sc 组中壬酸乙酯 [C45]、月桂酸乙酯 [C54]、胡莫柳酯 [C64]、肉豆蔻酸乙酯 [C58] 和十六烷 [C82] 等含量较为丰富。

对不同酒样中挥发性成分含量进行主成分分析 (PCA), 得到主成分分析图和对应的载荷图 (图 3b 和 3c); 其中, Mr 组、Mp 组和 Mk 组分布在 PCA 双标图的第二象限, 在 PC1 和 PC2 上均无明显差异, 表明酿酒酵母除了能将糖类物质转化为酒精外, 对挥发性风味物质的形成也起到了至关重要的作用。由图 3c 可见与红曲菌纯种发酵组密切相关的挥发性风味物质主要是硬脂酸乙酯 [C63]、2,3-二甲基苯酚 [C78]、亚油酸乙酯 [C66]、辛醛 [C31]、苯甲酸乙酯 [C49] 等。此外, 同步发酵模式主要分布在 Y 轴的两侧, 主要包括: 2-茨醇 [C24]、油酸乙酯 [C65]、4-乙基苯酚 [C79] 等; Mr-Sc 组和 Mp-Sc 组分布在第一象限, 两者在 PC1 和 PC2 的方向上距离较近, 表明挥发性风味物质组成差异较小, 主要以庚酸乙酯 [C42]、苯胺 [C85]、异丁醇 [C6]、月桂酸乙酯 [C54] 等为主; Mk-Sc 组分布则在 X 轴下侧, 与 PC2 负相关, 主要包括: 3-甲基-1-戊醇 [C11]、2-庚醇 [C10]、 α -伊兰油烯 [C83]、3-乙氧基-1-丙醇 [C13]、3,5-二叔丁基邻苯二酚 [C80] 等。以上研究结果表明, 红曲菌与酿酒酵母在不同组合发酵模式下所产生的挥发性风味组分组成差别明显, 表明不同红曲菌与酿酒酵母组合发酵对红曲酒中挥发性物质的生成具有一定影响。

2.3 不同发酵模式对挥发性风味物质生成的影响

为了进一步探究红曲菌与酿酒酵母在不同发酵模式下对红曲米酒中挥发性风味物质生成的影响, 用 R 语言绘制差异倍数图 (以 \log_2 为底) 对同

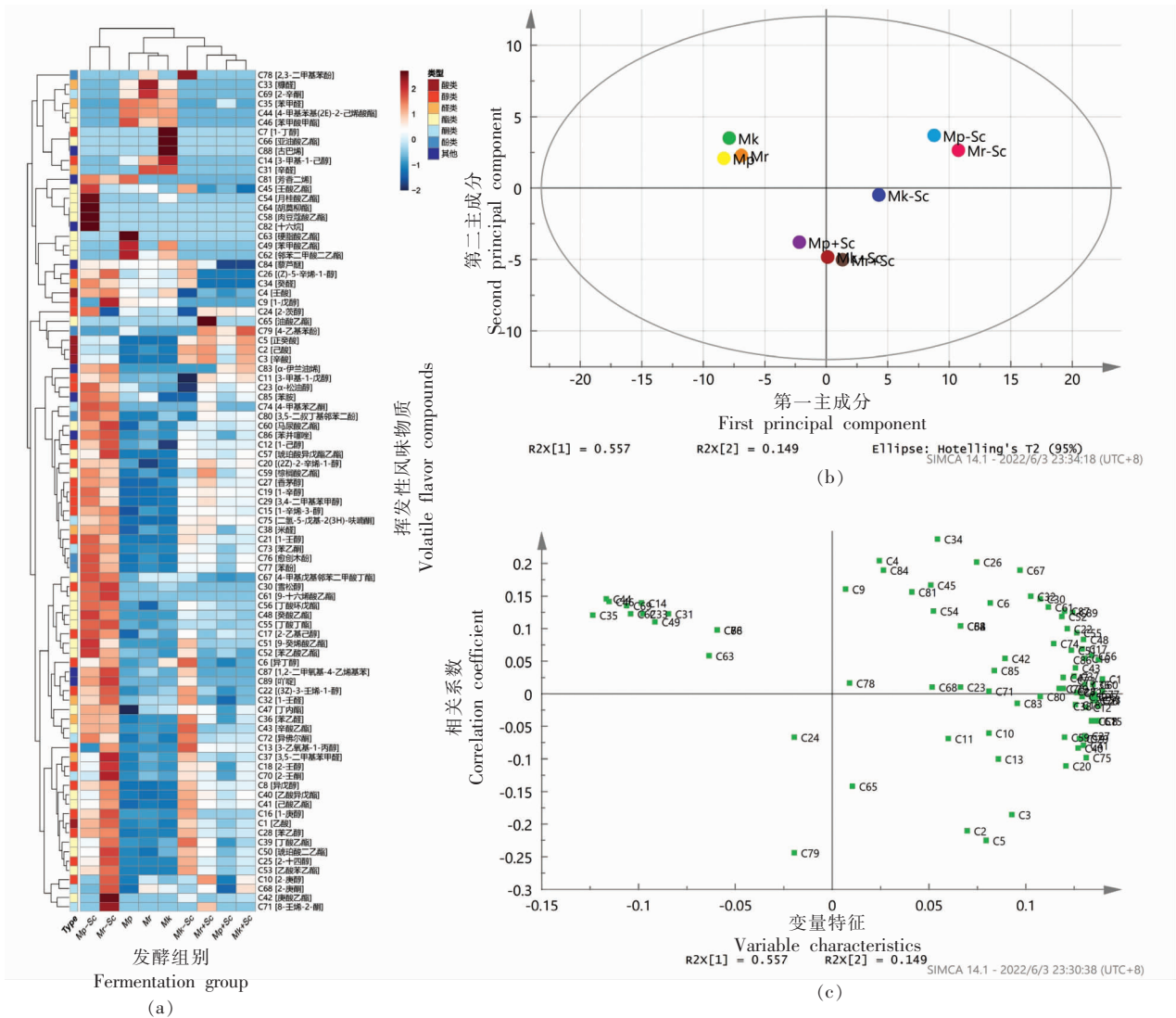


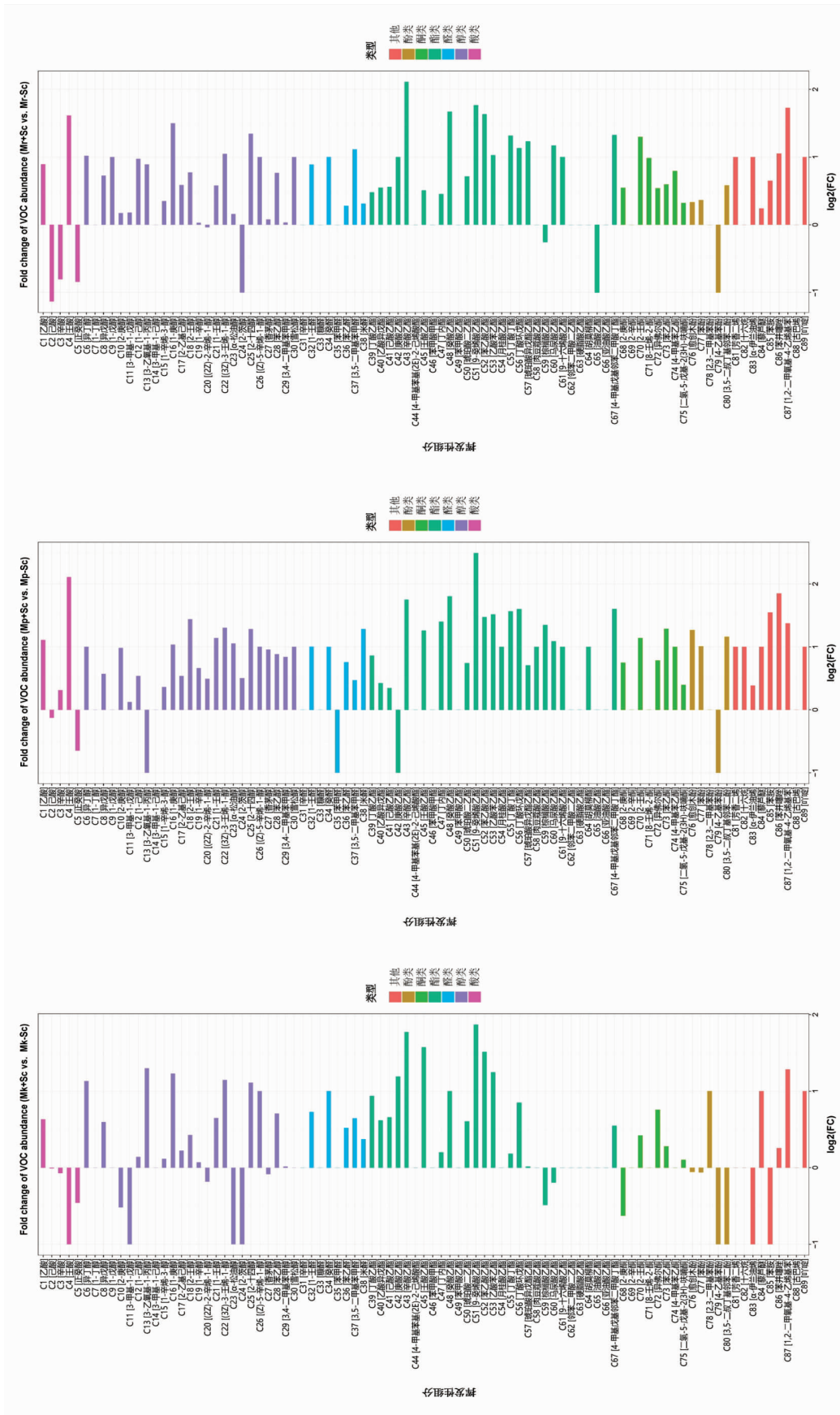
图 3 红曲米酒的挥发性风味物质的热图(a)、主成分分析得分图(b)和载荷图(c)

Fig.3 Heatmap (a) and principal component analysis (b) score diagram, (c) loading diagram of volatile flavor compounds in Hongqu rice wine

一株红曲菌的两种发酵模式的差异挥发性风味物质进行对比筛选(图 4),其中,差异倍数 ≥ 2 被认为是组间有显著差异的关键挥发性风味物质。

如图 4a 所示,高粱红曲菌在两种发酵策略下产生的挥发性组分的含量明显不一样。Mk+Sc 组中突出的挥发性物质为壬酸、3-甲基-1-戊醇、 α -松油醇、2-茨醇、4-乙基苯酚、3,5-二叔丁基邻苯二酚、 α -伊兰油烯和苯胺。其中,4-乙基苯酚能为酒的风味贡献辛香和烟气味^[26]。在顺序发酵模式中,特征风味组分主要包括异丁醇、3-乙氧基-1-丙醇、1-庚醇、(3Z)-3-壬烯-1-醇、2-十四醇、(Z)

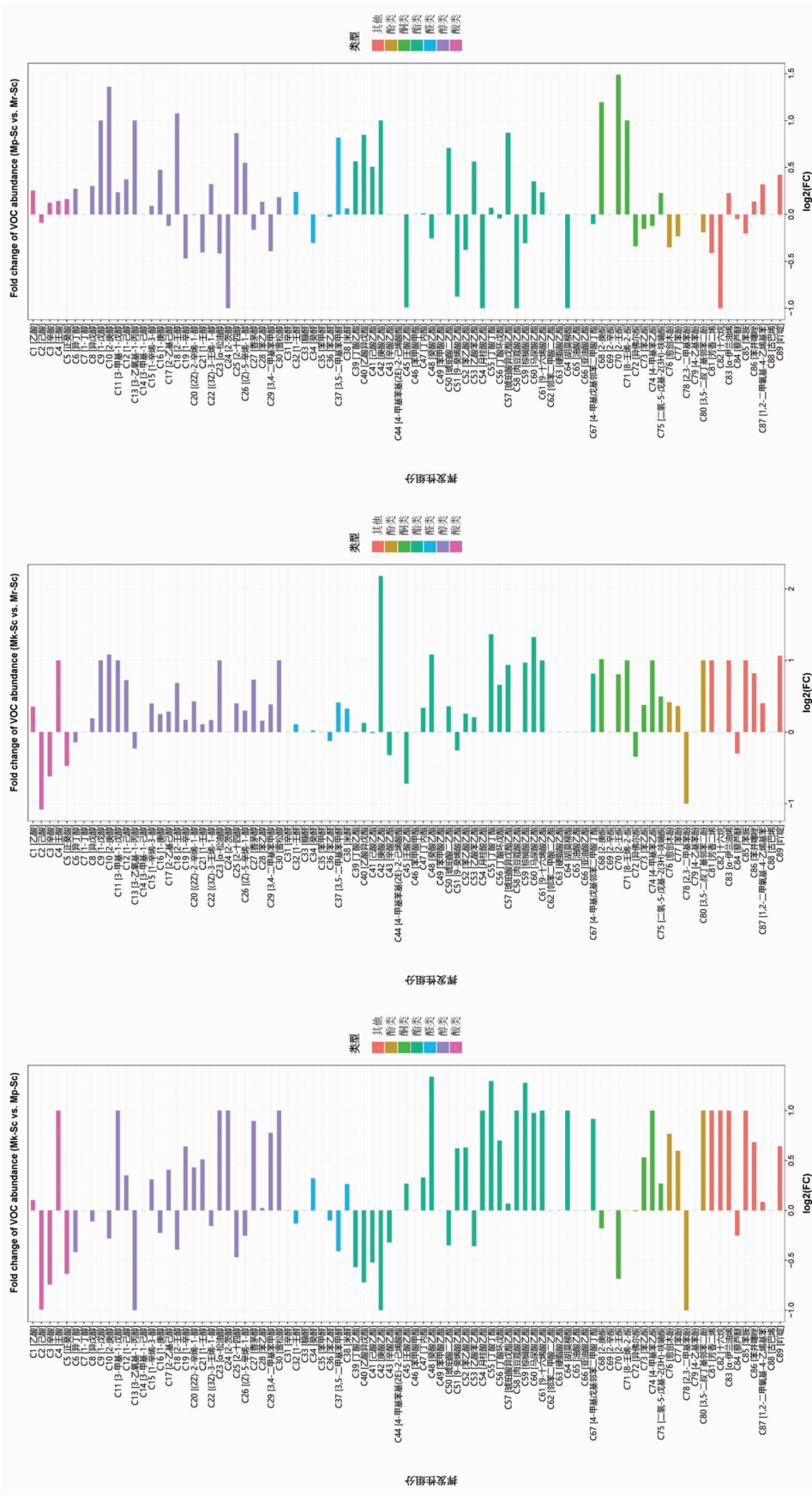
-5-辛烯-1-醇、庚酸乙酯、辛酸乙酯、壬酸乙酯、癸酸乙酯、9-癸烯酸乙酯、苯乙酸乙酯、乙酸苯乙酯等。有研究表明,庚酸乙酯、辛酸乙酯、壬酸乙酯、癸酸乙酯等中链脂肪酸乙酯可增强果香和花香气味,并促进酒体延续性和饱满度等感官属性的形成^[27-28]。如图 4b 所示,在紫色红曲菌与酿酒酵母组合发酵产物中,3-乙氧基-1-丙醇、苯甲醛、庚酸乙酯、4-乙基苯酚为 Mp+Sc 组中的特征挥发性风味物质;而在 Mp-Sc 组呈现出更多的特征挥发性风味组分。其中,乙酸、壬酸等酸类可为酒体提供酸涩味和油脂酸败气味^[29];异丁醇、1-庚醇、壬醇、 α -



(a)高粱红曲菌+酿酒酵母 vs. 高粱红曲菌-酿酒酵母 (b)紫色红曲菌+酿酒酵母 vs. 紫色红曲菌-酿酒酵母 (c)红色红曲菌+酿酒酵母 vs. 红色红曲菌-酿酒酵母

图4 不同红曲菌与酿酒酵母在不同发酵模式下发酵产生的挥发性风味组分的丰度差异倍数图

Fig.4 Fold change diagram of relative abundance difference of volatile flavor compounds of Monascus under different fermentation modes



(a)高粱红曲菌-酿酒酵母 vs. 紫色红曲菌-酿酒酵母 (b)高粱红曲菌-酿酒酵母 vs. 红色红曲菌-酿酒酵母 (c)紫色红曲菌-酿酒酵母 vs. 红色红曲菌-酿酒酵母

图 5 不同红曲菌与酿酒酵母在顺序发酵模式下挥发性风味物质产量的差异倍数图

Fig.5 Fold change diagram of relative abundance differences of volatile flavor compounds of different *Monascus* in sequential fermentation mode

松油醇、雪松醇等醇类可为酒体带来醇厚感;酯类物质包括辛酸乙酯、壬酸乙酯、丁内酯、9-癸烯酸乙酯、乙酸苯乙酯、月桂酸乙酯、丁酸丁酯、肉豆蔻酸乙酯、棕榈酸乙酯等,其中以乙酯肉豆蔻酸乙酯和棕榈酸乙酯等长链脂肪酸可为酒体带来醚或蜡的脂香^[27];醛类主要包括1-壬醛、癸醛、米醛等;酮类物质包括2-壬酮、苯乙酮、4-甲基苯乙酮等;酚类物质包括愈创木酚、苯酚等,其中苯酚能带给酒类饮料药气味、烟熏味^[30]。此外,红色红曲菌与酿酒酵母的顺序发酵模式产物中也检测出更多差异特征风味物质(图4c),主要包括壬酸、异丁醇、1-戊醇、1-庚醇、(3*Z*)-3-壬烯-1-醇、(Z)-5-辛烯-1-醇、雪松醇、癸醛、3,5-二甲基苯甲醛、庚酸乙酯、辛酸乙酯、癸酸乙酯、9-癸烯酸乙酯、苯乙酸乙酯、乙酸苯乙酯、丁酸丁酯、丁酸环戊酯、琥珀酸异戊酯乙酯、马尿酸乙酯、2-壬酮、芳香二烯、 α -伊兰油烯等。

综合比较分析结果,3种红曲菌与酿酒酵母均在顺序发酵模式中产生更多的特征挥发性风味物质,特别是中链脂肪酸乙酯和高级醇等与酵母菌代谢有关的次级代谢物^[31-32],可能是由于同步发酵中原料未充分还原成可发酵碳水化合物,缺少合成风味前体物的碳骨架,导致风味代谢产物大量减少^[33]。同时,3种红曲菌在顺序发酵模式中中共有的挥发性风味物质主要包括:异丁醇、1-庚醇、(3*Z*)-3-壬烯-1-醇、2-十四醇、(Z)-5-辛烯-1-醇、癸醛、辛酸乙酯、癸酸乙酯、9-癸烯酸乙酯、苯乙酸乙酯、乙酸苯乙酯、1,2-二甲氧基-4-乙炔基苯等。

2.4 不同红曲菌与酿酒酵母在顺序发酵模式下挥发性风味组分对比分析

由图5a可见,Mp-Sc组中除酸类外,其余化合物均比Mk-Sc组更丰富。Mk-Sc组特征风味物质主要包括3-乙氧基-1-丙醇、庚酸乙酯、2,3-二甲基苯酚等;而Mp-Sc组特征风味主要包括3-甲基-1-戊醇、 α -松油醇、2-茨醇、雪松醇、癸酸乙酯、月桂酸乙酯、丁酸丁酯、肉豆蔻酸乙酯、棕榈酸乙酯、胡莫柳酯等。其次是Mk-Sc组与Mr-Sc组进行比较(图5b),Mr-Sc组呈现出更为丰富的挥发性风味组分,包括:壬酸、1-戊醇、2-庚醇、3-甲

基-1-戊醇、 α -松油醇、雪松醇、庚酸乙酯、癸酸乙酯、丁酸丁酯、马尿酸乙酯、2-庚酮、8-壬烯-2-酮、芳香二烯等,而Mk-Sc组则以己酸、2,3-二甲基苯酚为主。结果表明,高粱红曲菌与酿酒酵母共培养产生挥发性风味物质的能力不如紫色红曲菌或红色红曲菌,特别是对米酒风味能产生独特影响的酯类和醇类物质的产生。福建古田红曲作为负有盛名的米酒酿造酒曲,其中红曲菌属主要包括红色红曲菌、紫色红曲菌等^[34]。另外,紫色红曲菌被Liu等^[35]鉴定为古田红曲米酒的核心功能微生物,促进了其复杂挥发性风味特征的形成。

同时,将Mr-Sc组和Mp-Sc组进行对比(图5c),酸类、酚类和醛类等代谢物两组差异不大。Mr-Sc组中的醇类物质主要包括1-戊醇、2-庚醇、3-乙氧基-1-丙醇、2-壬醇等,而Mp-Sc组主要是2-茨醇等;Mp-Sc组中的酯类物质主要包括了壬酸乙酯、月桂酸乙酯、肉豆蔻酸乙酯、胡莫柳酯等,而Mr-Sc组则为庚酸乙酯等。另外,红色红曲菌可促进酮类物质生成,Mr-Sc组中特征酮类物质包括了2-庚酮、2-壬酮、8-壬烯-2-酮;其中,2-庚酮具有类似梨的水果香味,2-壬酮带有花、油脂和药草似香气^[36],因此可赋予酿造米酒怡人的花果香。

3 结论

红曲酒醇香浓郁、酒体丰满、余味鲜长、风格优雅、独树一帜。红曲菌是决定红曲酒香气和风味形成具的关键因素之一。本文以糯米为发酵基质,选用紫色红曲菌、红色红曲菌和高粱红曲菌分别与酿酒酵母菌进行组合发酵,研究不同组合和发酵模式(同步发酵和顺序发酵)对挥发性组分生成的影响。研究结果发现,红曲菌与酿酒酵母组合发酵明显比红曲菌纯菌发酵产生更多的挥发性物质,顺序发酵明显比同步发酵产生更多的挥发性风味物质,紫色红曲菌和红色红曲菌与酿酒酵母在顺序发酵模式下会产生更多的挥发性风味组分且其风味组成较为接近。本研究可为红曲酒工业化生产中风味品质的提升与质量控制提供一定的参考数据。

参 考 文 献

- [1] WU Z Z, XU E, LONG J, et al. Measurement of fermentation parameters of Chinese rice wine using Raman spectroscopy combined with linear and non-linear regression methods[J]. Food Control, 2015, 56: 95-102.
- [2] CAI H Y, ZHANG T, ZHANG Q, et al. Microbial diversity and chemical analysis of the starters used in traditional Chinese sweet rice wine[J]. Food Microbiol, 2018, 73: 319-326.
- [3] 乔世玉, 王洪琳, 杨宏, 等. 贵州不同地区发酵糯米酒风味对比分析[J]. 酿酒科技, 2021(10): 17-23, 35.
- QIAO S Y, WANG H L, YANG H, et al. Comparative analysis of flavor of fermented glutinous rice wine from different regions of Guizhou[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2021(10): 17-23, 35.
- [4] PACHUAU L, DUTTA R S, ROY P K, et al. Physicochemical and disintegrant properties of glutinous rice starch of Mizoram, India[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 1298-1304.
- [5] HONG X T, CHEN J, LIU L, et al. Metagenomic sequencing reveals the relationship between microbiota composition and quality of Chinese Rice Wine[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26621.
- [6] 傅金泉. 古代红曲及红曲酒史料[J]. 酿酒科技, 2008(3): 108-110, 112.
- FU J Q. Red starter in ancient times & red starter liquor history[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2008(3): 108-110, 112.
- [7] 牛津桥, 周洁, 石桐, 等. 红曲小米酒的风味物质分析[J]. 酿酒科技, 2016(11): 92-94.
- NIU J Q, ZHOU J, SHI T, et al. Flavoring components in monascus millet wine[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2016(11): 92-94.
- [8] 郑翠银. 红曲黄酒特征风味的分析与表征[D]. 福州: 福州大学, 2013.
- ZHENG C Y. Analysis and identification of characteristic flavor compounds in Hongqu glutinous rice wine[D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2013.
- [9] 钟明叶, 刘学彬, 王久明, 等. 红曲对黄酒挥发性风味物质的影响[J]. 酿酒科技, 2020(3): 105-111.
- ZHONG M Y, LIU X B, WANG J M, et al. Effects of *Monascus* on volatile flavoring substances in Huangjiu[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2020(3): 105-111.
- [10] PEIXUAN W, JIAN M, XIANGYONG M, et al. Changes in flavour characteristics and bacterial diversity during the traditional fermentation of Chinese rice wines from Shaoxing region[J]. Food Control, 2014, 44: 58-63.
- [11] XU E, WU Z Z, LONG J, et al. Impact of high-shear extrusion combined with enzymatic hydrolysis on rice properties and chinese rice wine fermentation[J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(3): 589-604.
- [12] LEE P R, CHONG I S M, YU B, et al. Effects of sequentially inoculated *Williopsis saturnus* and *Saccharomyces cerevisiae* on volatile profiles of papaya wine[J]. Food Research International, 2012, 45(1): 177-183.
- [13] SNOEK T, VERSTREPEN K J, VOORDECKERS K. How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations?[J]. Current Genetics, 2016, 62(3): 475-480.
- [14] 车逸心, 刘雯娟, 徐瑞欣, 等. 紫红曲霉与酿酒酵母共发酵对红曲甜米酒风味的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4): 118-124.
- CHE Y X, LIU W X, XU R X, et al. Influence of *Monascus purpureus* and *Saccharomyces cerevisiae* Co-fermentation on the flavor of sweet red yeast rice wine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(4): 118-124.
- [15] 国家市场监督管理总局. 黄酒: GB/T 13662-2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018: 1-22.
- State Administration for Market Regulation. Huangjiu: GB/T 13662-2018[S]. Beijing: Standard Press of China, 2018: 1-22.
- [16] 张房宇. 酒类分析专用柱气相色谱仪校准用标准物质的选择[J]. 化学分析计量, 2022, 31(1): 1-4.
- ZHANG F Y. Selection of reference material for the calibration of gas chromatography using a polyethylene glycol capillary column for liquor analysis[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2022, 31(1): 1-4.
- [17] 苏骏敏, 沈昌莹, 张树权. 食品中糖的检测方法研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(6): 43-47.
- SU J M, SHEN C Y, ZHANG S Q. Research

- progress on the detection methods of sugar content in food[J]. *Modern Food*, 2022, 28(6): 43–47.
- [18] LIU A Q, YANG X, GUO Q Y, et al. Microbial communities and flavor compounds during the fermentation of traditional Hong Qu glutinous rice wine [J]. *Foods*, 2022, 11(8): 1097.
- [19] ZHANG X, WANG P, XU D D, et al. Aroma patterns of Beijing rice vinegar and their potential biomarker for traditional Chinese cereal vinegars[J]. *Food Research International*, 2019, 128: 398–410.
- [20] 程伟, 潘天全, 张杰, 等. 一株紫色红曲霉菌的筛选鉴定及其应用性能分析[J]. *酿酒*, 2021, 48(1): 67–75.
- CHENG W, PAN T Q, ZHANG J, et al. Screening and identification of a strain of *Monascus purpureus* and its application performance analysis [J]. *Liquor Making*, 2021, 48(1): 67–75.
- [21] AJDARI Z, EBRAHIMPOUR A, MANAN M A, 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(12): 487329.
- [22] 陈青柳. 绍兴机械化黄酒风味形成途径和功能微生物的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- CHEN Q L. Study on the flavor formation and functional microorganism of Shaoxing mechanized Huangjiu [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [23] 况嘉铀. 红曲霉菌液态发酵产风味物质及成分分析 [D]. 武汉: 湖北工业大学, 2021.
- KUANG J Y. Study and analysis of flavor substances in monascus submerged fermentation [D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2021.
- [24] 李凯, 商佳胤, 黄建全, 等. 应用顶空固相微萃取-气相色谱质谱技术分析不同商业酿酒酵母对玫瑰香葡萄酒香气成分的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(10): 212–219.
- LI K, SHANG J Y, HUANG J Q, et al. Using HS-SPME-GC-MS to analyze the influence of different commercial *Saccharomyces cerevisiae* on aroma components in muscat hamburg wine [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(10): 212–219.
- [25] 黄玲玲, 程凯森, 张美芳, 等. 黑曲霉和红曲霉酿造黄酒理化成分及挥发性物质的比较分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(15): 4896–4904.
- HUANG L L, CHENG K S, ZHANG M F, et al. Comparative analysis of physicochemical components and volatile components in rice wines brewed by *Aspergillus niger* and *Monascus purpureus*[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(15): 4896–4904.
- [26] CABONI P, SARAIS G, CABRAS M, et al. Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-fluorescence [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(18): 7288–7293.
- [27] YANG Y J, AI L Z, MU Z Y, et al. Flavor compounds with high odor activity values (OAV >1) dominate the aroma of aged Chinese rice wine (Huangjiu) by molecular association[J]. *Food Chemistry*, 2022, 383: 132370.
- [28] YANG Y J, XIA Y J, WANG G Q, et al. Comparison of oenological property, volatile profile, and sensory characteristic of Chinese rice wine fermented by different starters during brewing[J]. *International Journal of Food Properties*, 2018, 20: S3195 – S3211.
- [29] 郭志君, 杨磊, 骆红霞, 等. 苹果酸-乳酸发酵对刺梨酒香气的影响[J]. *食品与机械*, 2022, 38(3): 197–204, 233.
- GUO Z J, YANG L, LUO H X, et al. Effect of malolactic fermentation on volatile compounds of rosa *Roxburghii* Tratt wine[J]. *Food and Machinery*, 2022, 38(3): 197–204, 233.
- [30] 范文来, 徐岩. 白酒 79 个风味化合物嗅觉阈值测定 [J]. *酿酒*, 2011, 38(4): 80–84.
- FAN W L, XU Y. Determination of odor thresholds of volatile aroma compounds in Baijiu by A forced-choice ascending concentration series method of limits[J]. *Liquor Making*, 2011, 38(4): 80–84.
- [31] GARDE-CERDAN T, ANCIN-AZPILICUETA C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(3): 501–510.
- [32] ZHONG X F, WANG A L, ZHANG Y B, et al. Reducing higher alcohols by nitrogen compensation during fermentation of Chinese rice wine [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2020, 29(6): 805–816.
- [33] STYGER G, JACOBSON D, PRIOR B A, et al. Genetic analysis of the metabolic pathways responsi-

- ble for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(10): 4429–4442.
- [34] PARK K H, LIU Z, PARK C S, et al. Microbiota associated with the starter cultures and brewing process of traditional Hong Qu glutinous rice wine[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25 (3): 649–658.
- [35] LIU Z B, WANG Z Y, SUN J Y, et al. The dynamics of volatile compounds and their correlation with the microbial succession during the traditional solid-state fermentation of Gutian Hong Qu glutinous rice wine[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103347.
- [36] 马琳娜, 邱树毅, 王啸. 不同黄酒酒曲的酿造微生物与风味物质之间的关系[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(3): 81–89.
- MA L N, QIU S Y, WANG X. Relationship between brewing microorganisms and flavor compounds in different rice wine Jiuqu[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2021, 57(3): 81–89.

Effects of Combinations of *Monascus* and *Saccharomyces cerevisiae* on the Formation of Volatile Flavor Components of Rice Wine

You Wenqiang^{1,2}, Yan Yingyin^{1,2}, Yang Ziyi^{1,2}, Sun Jinyuan⁴, Zhang Wen^{1,2}, Han Jinzhi^{1,2}, Ai Lianzhong³, Sun Baoguo⁴, Ni Li^{1,2}, Lü Xucong^{1,2*}

¹Food Nutrition and Health Research Center, College of Advanced Manufacturing, Fuzhou University, Junjiang 362200, Fujian

²Institute of Food Science and Technology, College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108

³College of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai Engineering Research Center for Food Microbiology, Shanghai 200093

⁴Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract Hongqu rice wine was brewed with glutinous rice as raw material and Hongqu as starter. *Monascus* and *Saccharomyces cerevisiae* were the core microorganisms in the brewing system. In this paper, using glutinous rice as the fermentation substrate, *Monascus purpureus*, *Monascus ruber* and *Monascus kaoliang* were combined with *S. cerevisiae* to study the effects of different combinations and fermentation modes (simultaneous fermentation and sequential fermentation) on the production of volatile components. A total of 89 volatile flavor compounds were identified from fermented rice wine based on headspace solid phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry (HS–SPME–GC–MS). Heat map analysis showed that the combined fermentation of *Monascus* and *S. cerevisiae* produced more aroma substances than the pure fermentation of *Monascus*, and the sequential fermentation produced more aroma substances than the simultaneous fermentation, especially the sequential fermentation of *M. purpureus*, *M. ruber* and *S. cerevisiae*. According to the principal component analysis of volatile flavor components of different *Monascus* and *S. cerevisiae* combined fermentation, *M. purpureus* and *M. ruber* and *S. cerevisiae* will produce more volatile flavor components under the sequential fermentation mode, and their flavor compositions were close to each other. Through the analysis of the content difference of volatile flavor components, isobutanol, 1–heptanol, (3Z)–3–nonene–1–ol, 2–tetradecanol, (Z)–5–octene–1–ol, decanal, ethyl caproate, ethyl decanoate, 9–decenoate, ethyl phenylacetate, ethyl acetate, 1,2–dimethoxy–4–vinyl benzene, acridine were the characteristic volatile flavor substances in the combined fermentation products of *Monascus* and *S. cerevisiae*. The results of this study could provide a theoretical basis for the improvement of flavor quality and quality control in the industrial production of Hongqu rice wine.

Keywords *Monascus*; *Saccharomyces cerevisiae*; combined fermentation; Hongqu rice wine; volatile flavor substance