

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2020.01.005

文章编号:2095-6002(2020)01-0036-07

引用格式:刘丹,杨帆,薛意斌,等.红曲霉 *Monascus sanguineus* X1 处理黄水的培养基优化及酯化液制备[J].食品科学技术学报,2020,38(1):36-42.



LIU Dan, YANG Fan, XUE Yibin, et al. Optimization of culture medium for treatment of yellow water by *Monascus sanguineus* X1 and preparation of esterification liquid[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020,38(1):36-42.

红曲霉 *Monascus sanguineus* X1 处理黄水的培养基优化及酯化液制备

刘丹, 杨帆, 薛意斌, 王旭锋, 张静, 刘欢欢,
李贞景, 陈勉华, 王昌禄*

(天津科技大学 食品工程与生物技术学院/省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

摘要:黄水是白酒酿造的主要副产物之一,富含多种有机质,可用于制备酯化液促进白酒增香,提高其利用率。研究了一株高产酯化酶的红曲霉菌株 *Monascus sanguineus* X1,以酯化酶活力为指标,从碳源、碳氮比、接种量和 pH 值 4 个方面对 X1 菌株的培养基进行单因素实验及正交试验优化;采用酯化酶液处理黄水,制备酯化液,研究了黄水、乙醇、己酸等酯化前体物质添加量对酯化液制备的影响。结果表明,该红曲霉优化发酵培养基组分(以 100 mL 计):大米粉 7.0 g,大豆蛋白胨 2.0 g,NaNO₃ 0.2 g,KH₂PO₄ 0.15 g,MgSO₄·7H₂O 0.1 g,培养基初始 pH 值 5.0,接种量 10%(体积分数)。在此条件下,添加体积分数为 10% 的黄水和体积分数为 4% 的乙醇,酶活力可达 745.80 U/mL。向酯化酶液中加入体积分数为 0.8% 的己酸和体积分数为 20% 的乙醇继续培养 1 d 后,酯化液中己酸乙酯的体积分数可达 0.121%;而向酯化酶液中补加体积分数为 10% 的黄水后,己酸乙酯和乳酸乙酯的体积分数分别可达 0.055% 和 0.032%。该结果旨在为将黄水资源用于白酒增香提供理论参考。

关键词:红曲霉;黄水;酯化液;白酒增香;发酵优化

中图分类号:TS261.1;TS262.3

文献标志码:A

黄水是白酒酿造的酒醅中溶解于水的部分营养物质,浸沉于窖池底部形成的棕黄色黏稠状液体。年产上万吨的白酒企业,每天约有 10 t 黄水产生。黄水中含有丰富的残余淀粉、还原糖和大量的有机酸,其中乙酸、丁酸和乳酸的含量最为丰富^[1],若不经处理直接排放,不仅会污染环境,而且会造成资源浪费。目前,针对黄水的研究和应用,主要有 4 个方面:1)微生物多样性分析及菌种选育^[2];2)风味物质萃取^[3];3)酿酒用大曲的制备^[4];4)利用微生物

产酯化酶的特性处理黄水,制备酯化液及窖泥养护^[5],如唐丽云等^[6]利用黄水酯化液提高浓香型白酒的质量和口感;李河等^[7]利用现代微生物和发酵工程技术,在酯化酶作用下将黄水、酒尾、尾水等酿酒副产物转化为浓香型白酒酯化液;郝晔^[8]以黄水为基质培养产香红曲霉,在不添加其他物质的黄水中发酵产生菌丝体。因此,利用红曲霉制备黄水酯化液,用于白酒增香,具有较大的应用潜力^[9-13]。

目前黄水酯化液制备多以曲为微生物来源,

收稿日期:2018-11-17

基金项目:中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室资助项目(2017JJ004)。

第一作者:刘丹,女,硕士研究生,研究方向为食品发酵技术。

*通信作者:王昌禄,男,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术方面的研究。

且以固态发酵为主要方式,以纯种红曲霉液态发酵处理黄水制备酯化液少见报道,本文利用一株高产酯化酶的红曲霉菌株 X1,以酯化酶活力为指标,对该菌株进行了培养基优化;研究了黄水、乙醇、己酸等酯化前体物质对其液态发酵制备酯化液的影响;优化了产酯化液的相关参数。该结果旨在为红曲霉及其酯化酶在黄水中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

红曲霉(*Monascus sanguineus*) X1 由天津科技大学食品工程与生物技术学院发酵食品与新资源开发研究室保藏。硝酸钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、蛋白胨、葡萄糖等均为分析纯。黄水由天津津酒集团提供。

培养基:麦芽汁培养基^[14]。种子液培养基:大米粉 3 g, NaNO₃ 0.3 g, KH₂PO₄ 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, 自来水 100 mL, pH 自然。发酵培养基:大米粉 5 g, NaNO₃ 0.3 g, KH₂PO₄ 0.15 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, 自来水 100 mL, pH 值为 7.0。以上培养基灭菌条件为 121 ℃, 15 min。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1FD 型超净工作台,上海博讯事业有限公司医疗设备厂;LS-B50L 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海华线医用核子仪器有限公司;KCL2000 型恒温恒湿培养箱,日本 EYELA 东京理化公司;AG22331 型高速离心机,德国 Eppendorf 公司;ZWY-2112D 型恒温培养振荡器,上海支撑分析仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 红曲霉 X1 产酯化酶的发酵培养基优化

1.3.1.1 单因素实验设计

表 1 为不同发酵参数单因素实验条件。以酯化酶活力为指标,选择不同碳源、碳氮比、接种量和初

表 1 不同发酵参数单因素实验条件

Tab. 1 Conditions of single factor test for different fermentation parameters

参数	条件选择
碳源	70 g/L 可溶性淀粉或者大米粉(7.5,3 g)
碳氮比	碳氮比分别为 4.2:1、6.3:1、5.5:1
接种量(体积分数)	8%、10% 和 12%
初始培养基 pH 值	乳酸调节至 4.5、5.0、5.5

始 pH 值,研究其对红曲霉 X1 液态发酵产酯化酶的影响。

1.3.1.2 正交试验设计

依据单因素实验结果,以碳源、碳氮比、接种量、pH 值为影响因素,酯化酶活力为指标,进行正交优化试验(表 2),确定培养基最优组合。

表 2 正交试验设计

Tab. 2 Orthogonal experimental design

水平	因素			
	A 碳源	B 碳氮比	C 接种量/%	D pH
1	大米粉	4.2:1	8	5.5
2	可溶性淀粉	5.5:1	10	5.0
3		6.3:1	12	4.5

1.3.1.3 红曲霉 X1 发酵产酯化酶最适黄水添加量的确定

在单因素实验和正交试验得到的优化条件基础上,进一步研究未灭菌黄水添加量(0、5%、10%、20%(体积分数))对红曲霉菌株 X1 液态发酵产酯化酶的影响,得到菌株 X1 产酯化酶的最适黄水添加量。

1.3.2 酯化液制备中最适底物添加量的确定

发酵培养基优化后,以 3 000 r/min 离心 10 min,收集酶活最高时的发酵上清液,分两组进行实验,一组添加己酸(0、0.05%、0.10%(体积分数))和乙醇(0、0.5%、2.0%、4.0%、6.0%、8.0%、10.0%(体积分数));另一组则补加黄水(0、5%、10%、20%(体积分数)),分别制备酯化液。研究己酸、乙醇添加量和黄水补加量对酯化液制备的影响。

1.3.3 发酵产物测定

乙酸、己酸、乙醇、乙酸乙酯、己酸乙酯和乳酸乙酯的测定采用气相色谱法。以 8 000 r/min 离心发酵液,取上清液,过 0.22 μm 滤膜后进样检测。检测条件:气相色谱仪配备 FID 检测器(450GC,德国布鲁克公司),AT. LZP-930 白酒毛细管专用色谱柱(30 m×0.32 mm×1.0 μm,中国科学院兰州化学物理研究所),进样口温度 200 ℃,检测器温度 200 ℃,柱流速 5.00 mL/min,载气为氦气(纯度 99.99%),载气流速 25 mL/min,氢气 30 mL/min,空气流速 300 mL/min。分流比 10:1,进样量 1 μL。程序升温条件初始温度 60 ℃,保持 5 min,以 5.0 ℃/min 连续升温至 180 ℃并保持 3 min。

1.3.4 酯化酶活力测定

采用 1-萘酚比色法对酯化酶活力进行测定^[15]。酶活力定义:在 37 ℃ 条件下,15 min 水解 1-醋酸萘酯产生 1.0 nmol 1-萘酚所需酶量为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基对红曲霉 X1 产酯化酶的影响

以酯化酶活力为指标,选择不同碳源、碳氮比、接种量和初始 pH 值,研究其对红曲霉 X1 液态发酵

产酯化酶的影响,实验结果如表 3。

2.1.1 碳源对 X1 菌株产酯化酶活力的影响

表 3 中,以大米粉为碳源,发酵液上清液中酯化酶活力为 435.05 U/mL;以可溶性淀粉为碳源时,酯化酶活力仅为 302.35 U/mL,差异明显。二者差异可能是由于其淀粉含量及性状不同导致培养液黏度不同,使 X1 生长条件不同,因而酯化酶活力存在差异。另外,大米粉营养更丰富,原料来源广泛,价格低廉,虽然溶解性相对较差,但从酶活力结果来看,不影响 X1 菌株生长及酯化酶产生。

表 3 碳源、碳氮比、接种量和 pH 值对 X1 菌株液态发酵产酯化酶活力的影响

Tab.3 Effect of carbon source, C/N ratio,inoculation amount and pH on esterifying enzyme activity of X1 strain in liquid fermentation

控制因子	碳源		碳氮比			接种量			pH		
	A *	B *	4. 2: 1	5. 5: 1	6. 3: 1	8%	10%	12%	4. 5	5. 0	5. 5
酶活力/ (U·mL ⁻¹)	302. 35 ± 2. 75	435. 05 ± 3. 03	335. 05 ± 4. 34	446. 89 ± 2. 88	322. 31 ± 3. 70	381. 84 ± 3. 23	435. 05 ± 3. 11	324. 07 ± 2. 67	362. 96 ± 2. 88	404. 25 ± 3. 03	427. 68 ± 2. 76

碳源 A*、B* 分别为可溶性淀粉和大米粉。

2.1.2 碳氮比对 X1 菌株产酯化酶活力的影响

碳氮比对微生物生长及代谢影响较大,若培养基碳源不足,易引起菌体衰老和自溶,而碳源过高,容易发生底物抑制,培养基酸化,不利于菌体生长;若氮源过多,菌体生长过于旺盛,不利于代谢产物积累^[16]。霉菌细胞中碳氮比大约为 10: 1,一般工业发酵培养基碳氮比约为 50: 1,由于酯化酶是一类蛋白酶,在发酵过程中氮源消耗多,因此,通过降低培养基中碳氮比,可提高酯化酶的产量^[17]。本研究中,当培养基中碳氮比为 5. 5: 1 时,红曲霉 X1 发酵液中酯化酶活力最高,为 446. 89 U/mL,说明此碳氮比有利于 X1 菌株酯化酶生产。

2.1.3 接种量对 X1 菌株产酯化酶活力的影响

接种量对微生物生长繁殖代谢尤为重要。在发酵工业中,霉菌的接种量一般为 7% ~ 15% (体积分数)。采用较大接种量,可缩短发酵过程中菌体繁殖达到高峰的时间,加速酯化酶产生,并减少杂菌污染;但接种量过大,易引起菌体竞争,菌种活力不足,导致酯化酶活力下降。本研究中,当红曲霉接种量为 10% 时,发酵液中酯化酶活力为 435. 05 U/mL,适合 X1 菌株生长及酯化酶产生。

2.1.4 初始 pH 值对 X1 菌株产酯化酶活力的影响

利用乳酸控制初始发酵培养基 pH 值为 5. 5 时,发酵液中酯化酶活力为 427. 68 U/mL;pH 值为

5. 0 时,发酵液中酯化酶活力为 404. 25 U/mL,仅比 pH 值 5. 5 的发酵液酶活力低 23. 43 U/mL。因此,pH 值 5. 0 和 pH 值 5. 5 的培养基条件均较适合 X1 菌株生长及酯化酶产生。

2.1.5 X1 菌株产酯化酶发酵培养基正交试验优化结果

在单因素实验基础上,以大米粉为碳源,控制碳氮比 5. 5: 1,接种量 10%,pH 值 5. 0 为条件进行正交试验,试验结果如表 4。由于正交试验得到的优水平和优组合不统一,须对正交结果进一步验证,结果如表 5。2 号试验组(优组合)的结果相对高于 1 号试验组(优水平),即大米粉为碳源,碳氮比为 5. 5: 1,接种量为 10%,pH 值为 5. 0 的培养条件较合适。

由表 5 可知,X1 菌株液态发酵产酯化酶的优化培养基为(含量以 100 mL 计):大米粉 7 g,大豆蛋白胨 2 g,NaNO₃ 0. 2 g,KH₂PO₄ 0. 15 g,MgSO₄·7H₂O 0. 1 g。优化培养条件为:500 mL 三角瓶中装液量 50 mL,初始 pH 值 5. 0,接种量 10%,培养温度 30 ℃,摇床转速 180 r/min,培养时间 4 d。

2.1.6 黄水添加对 X1 菌株液态发酵产酯化酶的影响

黄水中含有少量白酒酿造过程中未利用的淀粉、残糖及氨基酸等物质^[18],可作为红曲霉生长的

营养物,而其中丰富的有机酸,可诱导红曲霉产生酯化酶,从而提高发酵液中酯化酶活力。在此,考察了黄水的添加对红曲霉 X1 发酵产酯化酶的影响,结果如图 1。

表 4 X1 菌株液态发酵产酯化酶正交试验结果

Tab. 4 Results of orthogonal test of esterifying enzyme of X1 strain in liquid fermentation

试验号	因素				酶活力/ (U·mL ⁻¹)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	446.89
2	1	2	2	2	433.78
3	1	3	3	3	246.60
4	1	1	2	3	351.84
5	1	2	3	1	254.07
6	1	3	1	2	322.31
7	2	1	3	2	299.38
8	2	2	1	3	302.35
9	2	3	2	1	296.49
K ₁	2 055.49	1 098.11	1 071.55	997.45	
K ₂	898.22	990.20	1 082.11	1 055.40	
K ₃		865.40	800.05	900.79	
k ₁	342.58	366.04	357.18	332.48	
k ₂	299.41	330.07	360.70	351.82	
k ₃		288.47	266.68	300.26	
极差	43.18	77.57	94.02	51.56	
因素主次顺序	C > B > D > A				
优水平	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	
优组合	A ₁ B ₁ C ₁ D ₁				

表 5 X1 菌株液态发酵产酯化酶正交试验结果验证

Tab. 5 Verification of orthogonal test on liquid fermentation of *Monascus sanguineus* X1 strain

试验号	试验批次				U/mL
	1	2	3	4	
1(优水平)	444.35	437.58	439.21	442.55	
2(优组合)	439.83	452.59	440.20	448.32	

在空白组和实验组中,发酵上清液中酯化酶活力均呈先升高后降低趋势。空白组发酵液中酯化酶活力在第 2 天时比实验组高,为 211.50 U/mL,且增长最快,第 4 天达到酶活力高峰(489.45 U/mL),之后开始下降,在第 6 天时酶活力下降到 392.07 U/mL,为最高时的 80.1%;实验组红曲霉 X1 均存在较长

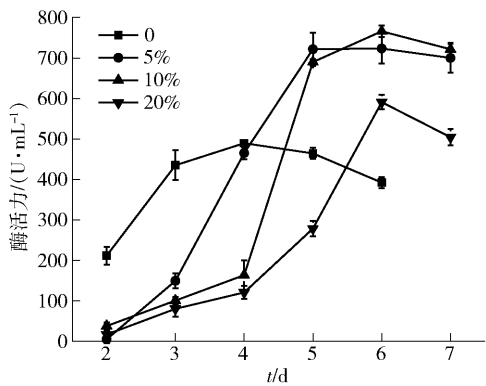


图 1 黄水添加量对酯化酶酶活力的影响

Fig. 1 Effect of yellow water addition in esterifying enzyme activity

的生长适应期,在添加 5%、10%、20% 黄水组,酶活力分别在第 4 天、5 天和 5 天达到最高 (723.38、765.95、590.98 U/mL)。由此可见,添加 5%~20% 黄水可提高酯化酶产量,其中 10% 效果最好;分别添加 30%、40% 黄水时,抑制了红曲霉 X1 的生长,酯化酶活力未检出,这可能是由于过量黄水的添加导致培养基 pH 值较低^[19];空白组,添加 5%、10%、20%、30%、40% 黄水组,其培养基初始 pH 值分别为 5.41、4.60、4.29、4.08、3.98、3.92。pH 值对微生物生长和产酶有一定的影响,从而造成酯化酶活力不同。因此,添加适量黄水能够促进红曲霉 X1 生长过程中产生酯化酶。

2.2 不同酯化底物的添加对酯化液制备的影响

2.2.1 己酸、乙醇的添加对酯化液制备的影响

发酵培养基优化后,以酯化酶活力最高的发酵上清液催化不同体积分数的己酸和乙醇制备酯化液,研究己酸和乙醇的添加对酯化液制备的影响,实验结果如图 2。由图 2 可知,随着己酸添加量的增加,己酸乙酯生成量也随之增加,但己酸利用率却随着己酸含量的增加呈现先增加后降低趋势。在空白组中,己酸乙酯体积分数仅为 0.0048%;当己酸添加量为 0.8% 时,己酸利用率达到最大,为 7.61%,此时己酸乙酯体积分数为 0.029%,较空白组增加了 5 倍。当己酸添加量为 0.8% 时,己酸利用率高,己酸乙酯生成量较大。而当己酸添加量高于 0.8% 时,由于 pH 值降低导致酶活力下降,己酸利用率也随之降低,导致己酸乙酯产量与己酸添加量不成正比。

在己酸最优(0.8%)条件下,随着乙醇添加量的增加,己酸乙酯浓度呈现先增加后降低趋势,当乙

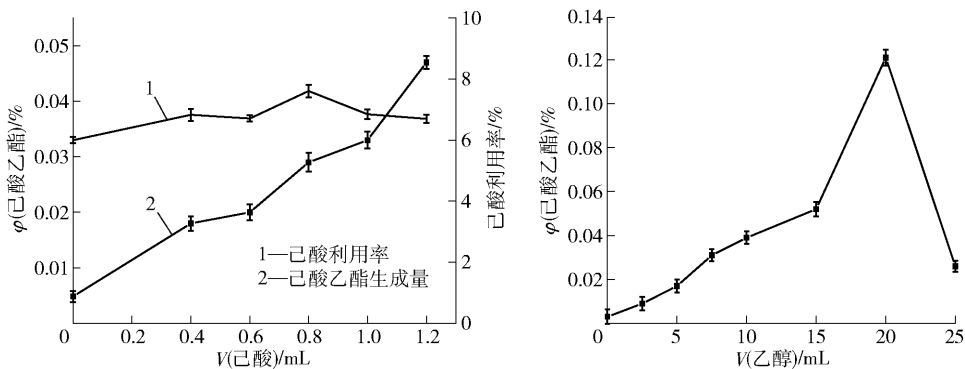


图2 己酸和乙醇添加量对酯化液中己酸乙酯生成量的影响

Fig.2 Effect of hexanoic acid and ethanol addition on production of ethyl caproate in esterification liquid

醇添加量为 20% 时,己酸乙酯体积分数达到 0.121%;当乙醇添加量为 25% 时,己酸乙酯体积分数仅为最高组的 21.5%。这可能是由于酯化反应所需底物乙醇的增加抑制了酯化酶活性,也可能是改变了酯化酶结构降低了酯化速率,导致己酸乙酯生成量减少^[20]。

2.2.2 未灭菌黄水添加量对酯化液制备的影响

在酯化酶活力最高的发酵上清液中补加不同体积分数的黄水制备酯化液,研究黄水添加量对酯化液制备的影响,实验结果如图 3。

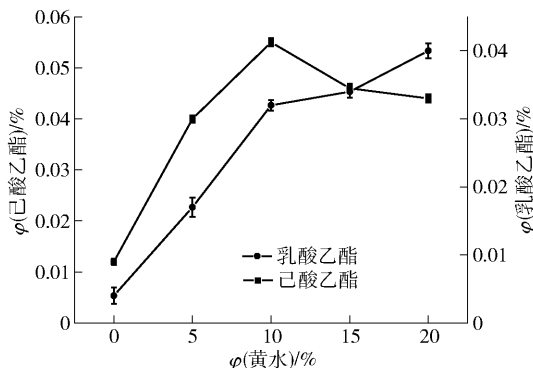


图3 黄水添加量对酯化液中乳酸乙酯、己酸乙酯生成量的影响

Fig.3 Effect of yellow water addition on production of ethyl lactate and ethyl caproate in esterification liquid

由图 3 可知,随着黄水添加量的增加,乳酸乙酯浓度呈递增趋势,己酸乙酯浓度先增加后降低。当黄水添加量为 10% 时,乳酸乙酯体积分数为 0.032%,己酸乙酯体积分数达到 0.055%。随着黄水添加量的增加,乳酸乙酯增幅不明显,而己酸乙酯浓度开始降低,这可能是由于在酯化反应体系中,乳酸和己酸作为竞争性底物,在一定范围内,两者均随着底物浓度增加而呈现增加趋势,超过此范围,两者出现竞争而乳酸更占优势,己酸乙酯的合成便会减

少;也可能是由于在该培养基条件下,合成的酯化酶中乳酸乙酯合成酶活性高于己酸乙酯合成酶活性^[21]。

当在红曲霉 X1 发酵培养基中,加入体积分数为 0.8% 的己酸和体积分数为 20% 的乙醇继续培养 1 d 后,酯化液中己酸乙酯体积分数可达 0.121%;而向酯化酶液中补加体积分数为 10% 黄水后,己酸乙酯和乳酸乙酯体积分数分别可达 0.055% 和 0.032%,总酯体积分数为 0.087%。

3 结 论

研究了红曲霉 *Monascus sanguineus* X1 处理黄水的培养基优化及酯化液制备条件。结果表明:该红曲霉优化发酵培养基组分(以 100 mL 计):大米粉 7.0 g,大豆蛋白胨 2.0 g,NaNO₃ 0.2 g,KH₂PO₄ 0.15 g,MgSO₄·7H₂O 0.1 g,培养基初始 pH 值 5.0,接种量 10% (体积分数)。在此条件下,加入体积分数为 0.8% 的己酸和体积分数为 20% 的乙醇继续培养 1 d 后,酯化液中己酸乙酯体积分数可达 0.121%;而向酯化酶液中补加体积分数为 10% 的黄水后,己酸乙酯和乳酸乙酯的体积分数分别可达到 0.055% 和 0.032%,总酯体积分数为 0.087%。

利用微生物酶法生产酯类物质不仅反应条件温和、能耗低,反应速率和转化率高,而且产品纯度高,香味自然纯正,使白酒风味柔和、香醇自然,可增强其固态感和自然感。浓香型白酒酯化液以酿酒副产物黄水、酒尾、尾水等为原料,加入酶制剂、己酸,人为控制酯化液发酵条件,可以较快地得到高酯生物发酵液。许多酒厂都在积极使用酯化液发酵技术来生产高酯调味酒,提高浓香型白酒的优质品率,增强酒体协调性等,并使酿酒副产物得到综合利用,实现

清洁生产,提高浓香型白酒的质量。

参考文献:

- [1] 郭璟. 白酒发酵副产物黄水的综合利用研究[D]. 西安:西北大学, 2010.
GUO J. Study on comprehensive utilization of wine fermentation byproduct [D]. Xi'an: Northwest University, 2010.
- [2] 潘玲玲, 王媚, 罗明有, 等. 浓香型白酒黄水、窖泥中微生物总 DNA 提取方法比较[J]. 中国酿造, 2016, 35(4):42-46.
PAN L L, WANG M, LUO M Y, et al. Comparison of total microbial DNA extraction methods in yellow water and pit mud in strong-flavor liquor production[J]. China Brewing, 2016, 35(4):42-46.
- [3] 宋柯, 杜岗, 刘念. 白酒发酵副产物丢糟、黄水、底锅中提取香味成分在酒用香料中的应用[J]. 酿酒科技, 2008, 35(6):82-84.
SONG K, DU G, LIU N. Application of flavoring compositions extracted from fermented grains, yellow water and bottom pot water in the production of spices used for liquor-making[J]. Liquor-Making Science and Technology, 2008, 35(6):82-84.
- [4] 简晓平. 黄水丢糟制曲初步研究[J]. 酿酒科技, 2014(11):81-83.
JIAN X P. Preliminary study on the use of yellow water and spent grains to produce Daqu [J]. Liquor-Making Science and Technology, 2014(11):81-83.
- [5] 李河, 张宿义, 杨平, 等. 利用 D-最优混料设计优化浓香型白酒生物发酵液的配方[J]. 中国酿造, 2016, 35(12):72-75.
LI H, ZHANG S Y, YANG P, et al. Optimization of the formula of Luzhou-flavor Baijiu biological fermentation liquid using D-optimal mixture design[J]. China Brewing, 2016, 35(12):72-75.
- [6] 唐丽云, 李国红, 王步利, 等. 利用黄水酯化液提高浓香型白酒质量[J]. 食品与发酵科技, 2013, 49(3):50-51.
TANG L Y, LI G H, WANG B L, et al. Improve the quality of Luzhou-flavor liquor by using yellow water esterified liquid[J]. Food and Fermentation Technology, 2013, 49(3):50-51.
- [7] 李河, 张宿义, 敖宗华, 等. 浓香型白酒酯化液的研究进展[J]. 中国酿造, 2016, 35(8):5-8.
LI H, ZHANG S Y, AO Z H, et al. Research progress of Luzhou-flavor Baijiu esterifying liquid[J]. China Brewing, 2016, 35(8):5-8.
- [8] 郝晔. 红曲霉处理黄水的研究[J]. 酿酒, 2015, 42(5):25-27.
XI Y. Study on the treatment of Monascus yellow [J]. Liquor Making, 2015, 42(5):25-27.
- [9] 胡沂淮, 贾亚伟, 戴源, 等. 酯化红曲的筛选和酯化酶学性质研究[J]. 酿酒科技, 2013(8):23-27.
HU Y H, JIA Y W, DAI Y, et al. Screening of a *Monascus* strain with strong esterifying capability and study of its esterase properties[J]. Liquor-Making Science and Technology, 2013(8):23-27.
- [10] 张家庆. 浓香型白酒窖泥养护与制曲关键技术研究[D]. 武汉:湖北工业大学, 2015.
ZHANG J Q. Study of the key technology on conservation mud pit and production Daqu in Luzhou-flavor liquor [D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2015.
- [11] 刘宾. 霉菌酯化酶作用规律及应用技术研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2008.
LIU B. The action rules and application technology of mold esterifying enzymes [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2008.
- [12] 张立强, 崔瑞迎, 周荣清, 等. 麸皮红曲培养及酯化黄水条件的优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(19):171-176.
ZHANG L Q, CUI R Y, ZHOU R Q, et al. Manufacture of bran qu with *Monascus* and optimization of the conditions of esterifying Huang shui [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(19):171-176.
- [13] CHEN S, ZHAO J S, ZHENG J, et al. Microbial esterification of organic acids in yellow water by *Monascus purpureus* and yeasts: a comparative study [J]. Food Science, 2013, 34(7):1-5.
- [14] 林琳, 王昌禄, 李贞景, 等. *Mok E* 基因过表达对红曲霉 Monacolin K 产量、菌丝及孢子形态的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(8):45-49.
LING L, WANG C L, LI Z J, et al. Effect of overexpression of *Mok E* gene on the yield, hyphae and spore morphology of Monacolin K [J]. Food Science, 2018, 39(8):45-49.
- [15] KAN S, DA S, GONG C, et al. Controlling composition and color characteristics of *Monascus*, pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2015, 120(2):145-154.
- [16] ZHANG X W, WANG J H, CHEN M H, et al. Effect

- of nitrogen sources on production and photostability of *Monascus* pigments in liquid fermentation[J]. *Ieri Procedia*, 2013, 5:344–350.
- [17] 冯兴奎, 邓杰, 谢军, 等. 白酒酿造副产物黄水综合利用现状浅析[J]. *中国酿造*, 2017, 36(2):6–9.
FENG X Y, DENG J, XIE J, et al. Analysis on comprehensive utilization of yellow water by-product of liquor brewing[J]. *China Brewing*, 2017, 36(2):6–9.
- [18] KANG B, ZHANG X, WU Z, et al. Effect of pH and nonionic surfactant on profile of intracellular and extracellular *Monascus*, pigments[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(5/6):759–767.
- [19] PUCHART V, AGGER J W, BERRIN J G, et al. Comparison of fungal carbohydrate esterases of family CE16 on artificial and natural substrates[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 233:228–236.
- [20] 盛杰. 酿酒黄水抑菌特性的研究[D]. 天津:天津科技大学, 2016.
SHENG J. Study on antimicrobial activity of yellow water-wine fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016.
- [21] OHLHOFF C W, KIRBY B M, VAN ZYL L, et al. An unusual feruloyl esterase belonging to family VIII esterases and displaying a broad substrate range[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 118:79–88.

Optimization of Culture Medium for Treatment of Yellow Water by *Monascus sanguineus* X1 and Preparation of Esterification Liquid

LIU Dan, YANG Fan, XUE Yibin, WANG Xufeng, ZHANG Jing, LIU Huanhuan,
LI Zhenjing, CHEN Mianhua, WANG Changlu*

(College of Food Engineering and Biotechnology/State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety,
Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Yellow water, the main by-product of Baijiu brewing, was rich in a variety of organic matter. It can be used to prepare esterification liquid, which can promote the aroma of Baijiu, and improve its utilization. *Monascus sanguineus* X1, a high esterifying enzyme-producing strain, was used to optimize the enzyme activity by single factor and orthogonal experiments from four aspects: carbon source, carbon-nitrogen ratio, inoculation amount and pH. Then, the esterifying solution was prepared by treating the yellow water with an esterifying enzyme solution, and the influence of the addition amount of the esterified precursors such as yellow water, ethanol and caproic acid on the preparation of the esterification liquid was studied. The results showed that the optimum fermentation medium for *Monascus* was (per 100 mL) rice flour 7.0 g, soybean peptone 2.0 g, NaNO_3 0.2 g, KH_2PO_4 0.15 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, initial pH 5.0 and inoculation volume 10% (volume fraction). Under these conditions, adding 10% yellow water by volume and 4% ethanol by volume, the enzyme activity could reach 745.80 U/mL. After adding 0.8% caproic acid and 20% ethanol by volume to the esterifying enzyme solution for 1 day, the volume fraction of ethyl caproate in the esterifying solution could reach 0.121%, while after adding 10% by volume yellow water to the esterifying enzyme solution, the volume fraction of ethyl caproate and ethyl lactate could reach 0.055% and 0.032%, respectively. The results is intended to provided a reference for the study of yellow water resources for Baijiu flavor enhancement.

Keywords: *Monascus sanguineus*; yellow water; esterification liquid; Baijiu aroma enhancement; fermentation optimization