

# 酶制剂对浓香型白酒发酵过程中高级醇生成的影响

罗惠波<sup>1,2</sup>, 苟云凌<sup>1,2</sup>, 饶家权<sup>3</sup>, 邱声强<sup>3</sup>, 范昌明<sup>3</sup>

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000 2 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000

3 四川省绵阳市丰谷酒业有限责任公司, 四川 绵阳 621000)

**摘要:** 文章采用实验室模拟白酒固态发酵的方法, 研究了酵母、糖化酶、蛋白酶和  $\alpha$ -淀粉酶的添加量对高级醇生成量的影响。结果表明, 适量添加糖化酶和干酵母可以降低高级醇产量, 当酵母添加量(于投粮比)为 0.8% 时, 高级醇产量降低了 14.8%; 糖化酶添加量为 750 u/g 时, 高级醇降低了 11.4%; 但是, 添加蛋白酶却反而增加了高级醇的产量, 而添加  $\alpha$ -淀粉酶却对高级醇产量没有明显影响。

**关键词:** 糖化酶; 蛋白酶; 干酵母; 高级醇

**中图分类号:** TS261.4 TS262.3

**文献标识码:** A

## 引言

高级醇是酒精发酵过程中由蛋白质、氨基酸和糖类经一系列生化反应分解而成的副产品, 主要成分是正丙醇、正丁醇、异丁醇、正戊醇、异戊醇、仲丁醇、活性戊醇、己醇、庚醇、 $\beta$ -苯乙醇等<sup>[1]</sup>。高级醇在口味上弊多利少, 除异戊醇微甜外, 其余的醇都是苦的, 有的苦味重而长。酒中含有适量的高级醇, 酒有芳香气味; 过量则带有苦涩怪味, 给酒带来不良影响, 而且容易使饮者上头, 导致大醉<sup>[2]</sup>。在白酒中, 醇和酯是构成酒体风味的主要香气成分, 它们进入人体后对人体的作用是不同的, 酯在血液中则使脑神经舒展, 而高级醇在血液中刺激脑神经, 使之收缩, 并且, 高级醇在人体内的氧化速度较慢, 作用时间较长。当高级醇含量过高时就会造成饮后“上头”<sup>[3]</sup>。所以, 通过控制高级醇含量, 使白酒中醇酯比例协调, 可以有效解决白酒上头的问题, 还能改善白酒的风味品质。

目前, 白酒中高级醇的调控主要是在发酵阶段进行的。孙金旭等认为不同加曲量对酱香型白酒中高级醇的生成存在一定影响, 可以通过控制大曲添加量调控高级醇的生成<sup>[4]</sup>。王立钊等在酱香型白酒固态发酵过程中添加酶制剂, 发现添加适量的糖化酶和蛋白酶可以有效降低高级醇的生成量<sup>[5]</sup>。由于浓香型白酒和酱香型白酒的生产工艺存在很大的差异, 酶制剂对不同白酒中高级醇的影响情况可能不一样。目前, 关于酶制剂对浓

香型白酒中高级醇生成的影响的研究还没有报道。本次研究是在发酵过程中添加不同量的糖化酶、蛋白酶、淀粉酶以及干酵母, 探索各因素对浓香型大曲酒中高级醇生成量的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及仪器

样品: 大曲、母糟、原粮、稻壳, 四川省绵阳市丰谷酒业有限责任公司提供;

试剂:  $\alpha$ -淀粉酶、糖化酶、酸性蛋白酶, 北京奥博星生物技术有限责任公司;

菌种: 酿酒高活性干酵母, 安琪酵母股份有限公司;

仪器: Agilent 6890N-5975B 气相色谱质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; LRH-250 生化培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司。

### 1.2 白酒固态发酵工艺流程

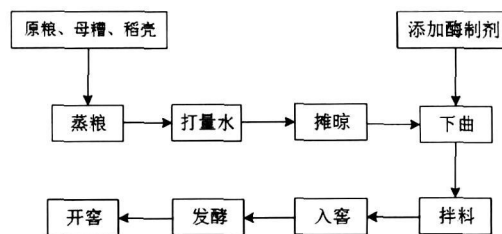


图 1 白酒固态发酵工艺流程图

收稿日期: 2011-01-06

基金项目: 四川省应用基础研究项目(2006J13-006); 泸州老窖科研奖学金项目(09Ljk04)

作者简介: 罗惠波(1969)男, 四川荣县人, 教授, 主要从事白酒生物技术及应用方面的研究。http://www.cnki.net

### 1.3 实验室模拟发酵工艺

高级醇主要是在酵母的主发酵期内生成,即入窖后一个月左右时间内。实验室模拟发酵的温度变化模式是依据浓香型白酒发酵过程中窖内温度变化规律设定的<sup>[6]</sup>。鉴于此,采用的实验室模拟发酵工艺为:使用 1 L 的锥形瓶作为模拟发酵罐,用硅胶塞封口,再蒙上一层保鲜膜,用皮筋套紧,放入生化培养箱发酵 32d 初始温度为 20 ℃,然后以 1.5 ℃/天升至 32 ℃,保持 8d 再以 0.5 ℃/天降至 24 ℃,发酵期结束。

### 1.4 高级醇的测定

#### 1.4.1 高级醇的提取

称取 100 g 出窖糟醅,加 200 mL 水,于 1000 mL 烧瓶中加入加热蒸馏,取前 100 mL 馏出液,使用气相色谱质谱联用仪测定高级醇含量。

#### 1.4.2 色谱条件

气相色谱条件 色谱柱:毛细管柱  $\text{R}\&\text{W} 122 - 7062$

表 1 高级醇标准溶液浓度 (g/L)

高级醇	1 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>	3 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>	6 <sup>#</sup>
正丙醇	0.0000	0.0397	0.0794	0.1192	0.1589	0.1986
正丁醇	0.0000	0.0399	0.0798	0.1197	0.1596	0.1995
异丁醇	0.0000	0.0402	0.0805	0.1207	0.1610	0.2012
异戊醇	0.0000	0.0399	0.0799	0.1199	0.1598	0.1998

内标溶液配制:称取色谱标准品乙酸异戊酯 1.9g~2.0g 置于 100mL 容量瓶中,加入 60% vol 乙醇水溶液定容至刻度。取 100 $\mu$ L 内标溶液加入待测样品中,样品中内标物浓度为 0.1986g/L。

#### 1.4.4 样品检测

取 100 $\mu$ L 2% 乙酸异戊酯溶液,用待测样品定容至 10mL,取 1mL 于色谱进样瓶中,用气质联用仪测定,得到高级醇的含量。

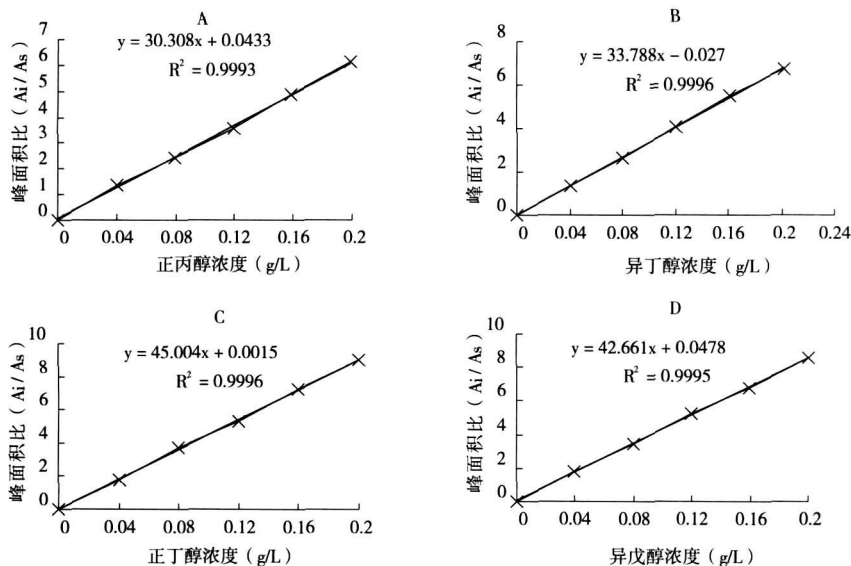


图 2 正丙醇 (A)、异丁醇 (B)、正丁醇 (C)、异戊醇 (D) 标准曲线

### 2.2 不同干酵母添加量对高级醇产量的影响

在添加完大曲后,将刚活化的干酵母加入粮糟中,

60.0 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu$ m; 程序升温:初始温度 55 ℃,以 5 ℃/min 升到 110 ℃,保持 1 min 再以 10 ℃/min 升到 200 ℃;载气:He (99.999%),恒流 0.9 mL/min 进样口:初始温度 230 ℃,分流比 50:1,进样量 1  $\mu$ L。

质谱条件 电离方式 EI 电子能量 70 eV,离子源温度 230 ℃,四级杆温度 150 ℃,接口温度 230 ℃,质量范围 20 amu~ 500 amu 溶剂延迟 3 min。

#### 1.4.3 绘制标准曲线

标准溶液配制:称取色谱标准品正丙醇、正丁醇、异丁醇和异戊醇各 0.190 g~ 0.210 g 置于 1000 mL 容量瓶中,加入 60% vol 乙醇水溶液定容至刻度。再量取此溶液 0.0 mL、2.0 mL、4.0 mL、6.0 mL、8.0 mL、10.0 mL 于 10 mL 容量瓶,用 60% vol 乙醇水溶液定容至刻度,依次标记为 1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>、6<sup>#</sup>,得到系列浓度的混合标样,实际配制浓度见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 四大主要高级醇的标准曲线

将配制好的混合标样加入内标溶液后,吸取 1 mL 于色谱进样瓶中,使用气质联用仪进行测定,得到以面积比  $A_i/A_s$  (高级醇峰面积  $A_i$  和内标物峰面积  $A_s$ ) 为纵坐标,高级醇浓度  $C$  为横坐标的标准曲线,见图 2。

使酵母质量浓度 (%) 分别为 0 0.4 0.8 1.2 1.6 2.0 拌料均匀后,入罐发酵 32 天,发酵完成后测定四大主要

高级醇(正丙醇、正丁醇、异丁醇、异戊醇)的含量,分析干酵母添加量对高级醇生成的影响,结果见图 3图 4。

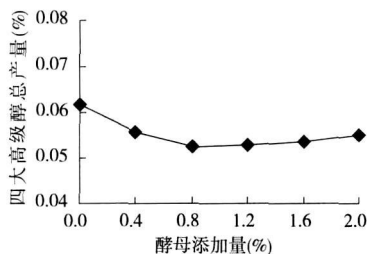


图3 不同酵母添加量对四大高级醇总产量的影响

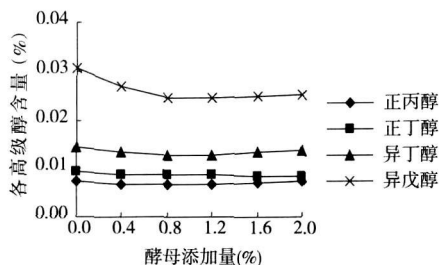


图4 不同酵母添加量对四大高级醇产量的影响

由图 3图 4可知:当干酵母添加量从 0% 增加到 0.8% 时,随着酵母量的增加四大高级醇总量呈下降趋势;当酵母含量为 0.8% 时,高级醇产量最低,相对于不添加酵母时下降比例达到了 14.8%;继续增加酵母量高级醇没有明显变化。其中,异戊醇和异丁醇变化趋势与总量变化基本一致,而正丙醇和正丁醇基本不变。在底物中碳源和氮源等营养物质浓度一定的情况下,酵母数量的最大值是不变的,适当增加酵母接种量,可以减少酵母在发酵过程中的增殖倍数,这就减少了酵母在合成自身蛋白质的过程中产生的高级醇的量。当酵母含量过多时,底物中可发酵糖供给不足,酵母的增殖受到制约,所以,高级醇含量趋于稳定。

### 2.3 不同蛋白酶添加量对高级醇产量的影响

在添加完大曲后,加入不同量的蛋白酶,使蛋白酶浓度 (u/g)分别为 0 5 10 15 20 25 拌料均匀后,入罐发酵 32天,发酵完成后测定四大主要高级醇,分析蛋白酶添加量对高级醇生成的影响,结果见图 5图 6。

由图 5图 6可知:随着蛋白酶添加量逐渐增大,高级醇生成量呈缓慢上升趋势。添加蛋白酶,使物料中的蛋白质加速分解为氨基酸,这就增大了底物中氨基酸的浓度,过量的氨基酸经由伊里氏降解代谢途径,通过脱氨、脱羧生成比该氨基酸分子少一个碳原子的高级醇。其中亮氨酸转化为异戊醇,缬氨酸则转化为异丁醇。

### 2.4 不同糖化酶添加量对高级醇产量的影响

在添加完大曲后,加入不同量的糖化酶,使糖化酶浓度 (u/g)分别为 0 250 500 750 1000 1250 拌料均匀后,入罐发酵 32天,发酵完成后测定四大主要高级醇,分析糖化酶添加量对高级醇生成的影响,结果见图 7图 8。

由图 7图 8可知:当糖化酶添加量从 0u/g 增加到

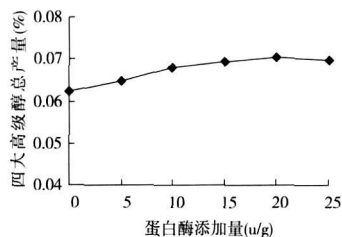


图5 不同蛋白酶添加量对四大高级醇总产量的影响

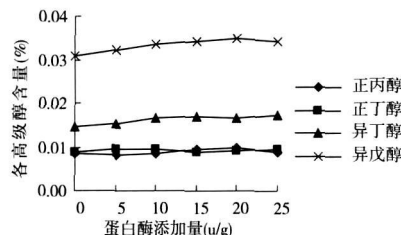


图6 不同蛋白酶添加量对四大高级醇产量的影响

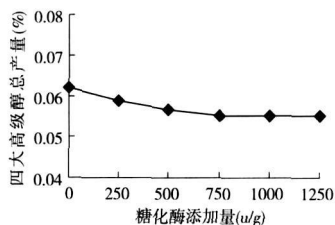


图7 不同糖化酶添加量对四大高级醇总产量的影响

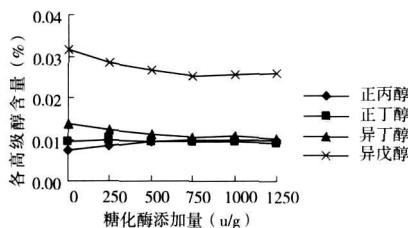


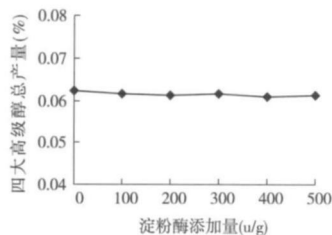
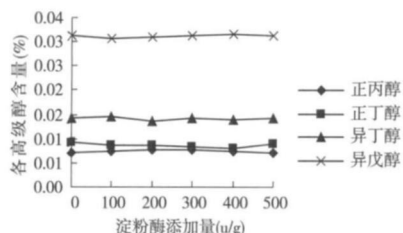
图8 不同糖化酶添加量对四大高级醇产量的影响

750u/g时,高级醇总生成量呈明显下降趋势,高级醇降低幅度达到 11.4%,继续增加糖化酶添加量,高级醇基本保持不变。其中,异戊醇和异丁醇含量随糖化酶的增加而减小,而正丙醇含量则随糖化酶增加而有小幅增加,正丁醇含量却没有明显变化。糖化酶能把淀粉从非还原性末端水解断裂  $\alpha-1,4$  葡萄糖苷键生成葡萄糖,也能缓慢水解断裂  $\alpha-1,6$  葡萄糖苷键生成葡萄糖。添加糖化酶加速了淀粉水解速度,使可被酵母直接利用的葡萄糖浓度增加,酵母会加速对糖分的代谢,而减少了对氨基酸的降解代谢,降低了高级醇的生成量。

### 2.5 不同 $\alpha$ -淀粉酶添加量对高级醇产量的影响

在添加完大曲后,加入不同量的  $\alpha$ -淀粉酶,使  $\alpha$ -淀粉酶浓度 (u/g)分别为 0 100 200 300 400 500 拌料均匀后,入罐发酵 32天,发酵完成后测定四大主要高级醇,分析  $\alpha$ -淀粉酶添加量对高级醇生成的影响,结果见图 9图 10。

由图 9图 10可知: $\alpha$ -淀粉酶的添加对高级醇的生

图 9 不同  $\alpha$ -淀粉酶添加量对四大高级醇总产量的影响图 10 不同  $\alpha$ -淀粉酶添加量对四大高级醇产量的影响

量没有明显的影响。 $\alpha$ -淀粉酶分解直链淀粉时的最终产物以麦芽糖为主,只有少量葡萄糖。而在分解支链淀粉时,除麦芽糖、葡萄糖外,还生成分支部分具有  $\alpha$ -1,6-键的  $\alpha$ -极限糊精。所以, $\alpha$ -淀粉酶的添加,虽然加快了淀粉分解的速度,但可发酵糖的生产速率并没有提高。在大曲糖化力基本一致的条件下,高级醇产量基本不变。

### 3 讨论

白酒中的高级醇主要通过两个途径生成:一是酵母以氨基酸为基质的降解代谢路径,常发生在物料中氨基酸过量时,过多的氨基酸经脱氨、脱羧生成比氨基酸少一个碳原子的高级醇,这是最主要的一条途径;二是酵母以糖为基质的合成代谢路径,常发生在物料中氨基酸过低时,酵母通过糖代谢途径,由酮酸路线合成必需的氨基酸,进而合成自身细胞蛋白,其中间体酮酸在酶的作用下可以生成高级醇<sup>[5]</sup>。在白酒发酵过程中,两个途径是同时存在的,只是在不同的条件下,各自作用的大小不同。比如,本次试验中添加糖化酶虽然促进了合成

代谢途径,却抑制了氨基酸降解代谢路径,后者作用更显著,因此,降低了高级醇的生成。

本试验表明,在浓香型大曲酒发酵过程中,适量添加糖化酶、蛋白酶和干酵母对高级醇的生成量有一定的影响。适量添加糖化酶和干酵母可以降低高级醇产量,当酵母添加量(于投粮比)为 0.8% 时,高级醇产量最低,相对于不添加酵母时下降了 14.8%;糖化酶添加量(于投粮比)为 750 u/g 时,高级醇产量最低,高级醇降低幅度达到 11.4%。但是,添加蛋白酶却反而增加了高级醇的产量,而添加淀粉酶却对高级醇产量没有明显影响。因此,通过向发酵糟醅中添加糖化酶和酵母的方法来控制在高级醇的生成具有一定可行性的。由于该研究采用的是实验室模拟白酒固态发酵,模拟发酵罐体积小,且没有窖泥,与生产上的窖池环境有一定的差距,得到的试验结果与实际生产情况会有一些的差异,不过,各个因素对高级醇生产的影响趋势对实际生产还是有一定的借鉴作用。下一步工作中,我们可以在生产上征用几口窖池,对糖化酶和干酵母两个因素做进一步研究,确定其是否可以降低高级醇的生成量。另外,由于白酒发酵过程相当复杂,添加酶制剂可能对白酒的产率、风味和品质造成一定的影响,这需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 秦含章. 国产白酒的工艺技术和试验方法 [M]. 北京: 学苑出版社, 2000
- [2] 谢方安. 谈白酒香气成分和作用 [J]. 酿酒, 2006, 33 (5): 52-55
- [3] 刘秀强. 啤酒酿造过程中高级醇的控制 [J]. 啤酒科技, 2007 (2): 35-35
- [4] 孙金旭, 王立召, 李长文. 不同加曲量对酱香型白酒中杂油醇影响探讨 [J]. 中国酿造, 2009 (11): 105-108
- [5] 王立钊, 梁惠珍, 马树奎, 等. 影响固态发酵白酒中杂醇油生成因素的研究 [J]. 酿酒科技, 2006 (5): 43-45
- [6] 黄治国, 罗惠波, 程铁轅, 等. 酒醅发酵过程中温度变化曲线的实时检测及其数学模型的建立 [J]. 酿酒科技, 2008 (10): 20-22

## Effect of Enzymes on the Formation of Higher Alcohols in Liquor

LUO Hui-bo<sup>1,2</sup>, GOU Yun-ling<sup>1,2</sup>, RAO Jia-quan<sup>3</sup>, QIU Sheng-qiang<sup>3</sup>, FAN Chang-ming<sup>3</sup>

(1. School of Biotechnology Engineering Sichuan University of Science & Engineering Zigong 643000 China

2. Liquor Making Biotechnology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000 China

3. Sichuan Mianyang Fenggu Industry Co., Ltd., Mianyang 621000 China)

**Abstract** The method of laboratory simulation was used to study solid fermentation of Liquor. Effect of dry yeast, glucoamylase, protease and  $\alpha$ -amylase on the formation of higher alcohols in Liquor was investigated. The results are as follows: adding proper amount of glucoamylase or dry yeast can reduce the formation of higher alcohols. When the yeast addition was 0.8%, higher alcohol production decreased by 14.8%; and glucoamylase dosage of 750 u/g, the higher alcohols decreased by 11.4%; However, the protease increased the production of higher alcohols, while the addition of  $\alpha$ -amylase has no effect on it.

**Key words** glucoamylase, protease, dry yeast, higher alcohols