

# 多菌种酯化酶的优化及在浓香型酒中的应用

**摘要:**以紫红曲霉、葡萄牙棒孢酵母、己酸菌为实验对象复配一种多菌种酯化酶,利用正交试验设计,选出酯化力最高的配比方案:紫红曲霉菌种60%,葡萄牙棒孢酵母20%,己酸菌菌种20%。以此配比制作的麸曲与大曲按比例投入到浓香型白酒的生产中,考察不同曲用量比例的实验窖池,对其出酒率、原酒的理化指标和感官质量进行综合分析,得到最优的曲用量比例:大曲21.5%、复合酯化酶菌种麸曲1.5%。

**关键词:**酯化酶;紫红曲霉;葡萄牙棒孢酵母;己酸菌;正交实验;浓香型白酒

青岛琅琊台集团股份有限公司 徐宗喜 赵咏伟 晁进福 徐广祥 辛跃强 柳邦向 陈崇君

白酒是我国传统的蒸馏酒,拥有数千年的酿造历史,也是中华文明的重要组成部分。在感官上,国外蒸馏酒以醇香为主,中国白酒则是以酯香为主,其中,浓香型白酒的主体呈香物质是己酸乙酯,其含量及与其他乙酯的量比关系决定了浓香型白酒的品质和风格<sup>[1]</sup>。经过长期的生产实践和研究表明,浓香型白酒中己酸乙酯和乳酸乙酯比例控制在1:(0.5-0.8)<sup>[2]</sup>,能使主体香突出,香味协调,酒体典型性强。然而目前,浓香型白酒企业多存在原酒中己酸乙酯含量不足、乳酸乙酯含量偏高的现象,严重影响了白酒的品质。因此,增己降乳成为提高浓香型白酒品质的重要课题。

目前,增己降乳的研究比较多,主要技术措施有<sup>[3-5]</sup>:己酸菌与其他菌种混合培养、回酒发酵、双轮底发酵、酯化酶增香技术、复合酯化酶生态菌剂的应用等。其中,紫红曲霉、葡萄牙棒孢酵母以及己酸菌对提升浓香型白酒中的己酸乙酯含量具有非常积极的作用,并且混合菌剂中的微生物相互作用可以激发更高的生物活性和酯化能力。所以,本文以紫红曲霉、葡萄牙棒孢酵母、己酸菌为研究对象,通过正交实验找到三种菌种最佳复配比例,制作一种高酯化力的复合菌剂,并应用到浓香型白酒的生产中,以期提高原酒的出酒率和品质。

## 1. 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌种与大曲

紫红曲霉、葡萄牙棒孢酵母、己酸菌、大曲。

#### 1.1.2 主要试剂

葡萄糖、蔗糖、蛋白胨、琼脂粉、乙酸钠、硝酸钠、硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、氯化钾、硫酸亚铁、碳酸钙、氢氧化钠、盐酸、酚酞试剂、乙醇、乳酸、酵母浸粉、酵母膏。

#### 1.1.3 培养基

YPD培养基:葡萄糖2%,蛋白胨2%,酵母浸粉1%,自然pH;

表1

水平	因素		
	A: 紫红曲霉菌种比例	B: 葡萄牙棒孢酵母菌种比例	C: 己酸菌菌种比例
1	40%	10%	10%
2	50%	20%	20%
3	60%	30%	30%

图1 工艺流程



乙酸钠培养基:乙酸钠0.5%、酵母膏0.1%、硫酸镁0.02%、磷酸氢二钾0.04%、硫酸铵0.05%、碳酸钙1%、乙醇2%(培养基灭菌后再添加)、pH6.5、琼脂粉1.5%~2%;

查氏培养基:蔗糖3%、硝酸钠0.3%、磷酸氢二钾0.1%、氯化钾0.05%、硫酸镁0.05%、硫酸亚铁0.001%、pH7.2-7.4、琼脂粉1.5%。

### 1.2 主要仪器与设备

灭菌锅、超净工作台、恒温震荡摇床、恒温培养箱、ISO-9001电子分析天平、CJPF-J30酒精计、Agilent7890B气相色谱仪、电热鼓风干燥箱。

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 菌种活化

1.3.1.1 葡萄牙棒孢酵母菌种活化  
将葡萄牙棒孢酵母冻干粉接种至10mL YPD液体培养基中,200r/min 30℃培养12h后,涂布平板,30℃培养48h后,再挑取单个菌落进行液体培养,镜检,选择细胞个体均匀的单菌落进行活化培养。

##### 1.3.1.2 己酸菌菌种活化

取甘油管保藏己酸菌1支,接种至20mL试管培养基中,35℃厌氧培养6天,在乙酸钠固体培养基中涂平板,37℃培养7d后,挑取单个菌落进行液体培养。将活化好的己酸菌以10%的接种量依次接种至100mL液体培养基、1L液体培养基、3L液体培养基、20L卡氏罐中,35℃厌氧各培养6天。

##### 1.3.1.3 紫红曲霉菌种活化

取斜面保藏的紫红曲霉,接种至10mL查氏液体培养基中,32℃培养48h,在固体培养基中涂平板,32℃培养5d后,挑取单个菌落进行液体培养,镜检,选择菌落大小均匀的单菌落依次接种至10mL、100mL液体培养基中进行活化培养。

### 1.3.2 复合酯化酶菌种的优化

利用正交实验设计,将紫红曲霉、葡萄牙棒孢酵母、己酸菌三种菌种按不同比例接种到麦麸培养基中,制作成多菌种酯化酶麸曲,以酯化力大小作为评价指标,获得最优配比。

#### 1.3.2.1 正交实验设计

确定紫红曲霉菌种比例(A)、葡萄

表2

曲用量(%)	方案				
	1	2	3	4	5
大曲	23.0	22.5	22.0	21.5	21.0
麸曲	0	0.5	1.0	1.5	2.0

表3

评测项目	方案1	方案2	方案3	方案4	方案5
出酒率	35.65	35.78	36.05	36.16	36.27
乙酸	0.90	0.86	0.82	0.88	0.95
丁酸	0.07	0.06	0.07	0.04	0.01
己酸	0.18	0.26	0.28	0.32	0.25
乙酸乙酯	1.80	1.90	1.95	2.03	2.35
丁酸乙酯	0.26	0.26	0.20	0.18	0.18
己酸乙酯	1.65	1.93	2.00	2.10	1.91
乳酸乙酯	1.95	1.89	1.76	1.63	1.70
总酸	1.12	1.18	1.23	1.34	1.36
总酯	4.96	5.31	6.10	6.45	6.75
感官评价得分	90.55	91.25	92.05	93.05	90.85
感官评价	酒香较纯正,主体香不突出,酒体较淡薄较净,余味较长。	酒香纯正,主体香较突出,酒体较醇厚较净,余味较长。	窖香较浓郁,主体香突出,酒体醇厚协调,醇甜爽净,余味较长。	窖香浓郁,主体香突出,酒体醇厚协调,绵甜柔净,余味悠长。	主体香不突出,酒体较淡薄,醇甜柔净,余味较长。

萄棒孢酵母菌种比例(B)、己酸菌菌种比例(C),按L<sub>9</sub>(3)<sup>3</sup>表进行三因素三水平正交试验设计,正交试验设计的因素水平见表1。

1.3.2.2 多菌种酯化酶麸曲制作工艺见图1

#### 1.3.2.3 酯化力的测定方法

称取5g干曲的曲量,加入100mL含3%己酸、5%vol乙醇的酯化体系中,30℃酯化100h,加水50mL蒸馏,接馏出液100mL,最后用气相色谱检测反应体系中形成的己酸乙酯含量。酯化力定义为每100mL馏出液中含己酸乙酯毫克数。数值最大者即为实验中的最佳菌种配比方案,以此菌种配比方案制作的麸曲继续后续大生产应用实验。

### 1.3.3 复合酯化酶菌种麸曲与大曲在浓香型白酒生产中的配比的优化

利用前期实验中酯化力最高的菌种配比方案制得的麸曲与大曲,按不同比例投入酒醅入池发酵,其他酿造条件保持一致。配比方案见表2。

## 2. 结果与分析

### 2.1 正交试验结果与分析

按L<sub>9</sub>(3)<sup>3</sup>设计的正交试验结果与分析可知:(1)对酯化力影响的因素依次为A>C>B,说明紫红曲霉在复合菌系中是优势菌种,其酯化力最强以及

其比例大小对复合菌种的酯化力影响最大;(2)最优组合是A3B2C2,即本实验的多菌种酯化酶的最优配比为紫红曲霉菌种60%,葡萄牙棒孢酵母菌种20%,己酸菌菌种20%。

### 2.2 实验窖池原酒的主要理化指标、出酒率及感官评价结果分析

统计三轮实验窖池的出酒率、理化指标、感官品评结果见表3。

由表3可知:(1)与方案一(对照组)相比,实验组的原酒主要风味成分随着复合酯化酶菌种麸曲使用比例的提高而提高。不过,当麸曲使用量超过2%时,己酸乙酯含量有所下降,并且乙酸乙酯的含量过高,原因可能是复合菌种对乳酸菌具有抑制作用并对乙酸乙酯的合成也具有积极作用;(2)感官评价得分大小顺序为方案4>方案3>方案2>方案5>方案1,即原酒品质随着复合酯化酶菌种麸曲使用比例的提高而提高,但当麸曲使用量超过2%时,酒质会下降。所以,结合出酒率和感官评价得分可知,最优曲用量配比为大曲21.5%和麸曲1.5%。

## 3. 结论

通过优化酯化酶功能菌种的配比,能够有效提升复合菌种的生物活性和酯化力。

浓香型白酒的生产过程是多菌种相互作用且开放式的复杂发酵体系,数量难以控制,量比关系不固定等缺陷使得酒质不稳定。而多菌种酯化酶由于是人为控制合成的生态菌剂,主要功能微生物数量足、功能强、量比关系稳定,能够弥补生产中的不足,突出了己酸乙酯的主体香,使得酒体丰满协调,提高了原酒的质量。

多菌种酯化酶在浓香型白酒生产中的使用量并非越多越好,本实验中发现,其使用量超过2%时,原酒中的乙酸乙酯含量过高,导致主体香不突出,酒体淡薄,酒质下降。

## 参考文献:

- [1]沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,2009.
- [2]何培新,胡晓龙,郑燕,等.中国浓香型白酒“增己降乳”研究与应用进展[J].轻工学报,2018,33(4):1-12.
- [3]李俊辉,刘英杰,隋丽娜,等.浓香型白酒增加己酸乙酯降低乳酸乙酯的研究进展[J].中国酿造,2019,38(1):1-4.
- [4]吴衍庸.酯化酶技术与白酒增香[J].酿酒科技,1999,95(5):24-26.
- [5]信春晖,胥伟宏.复合酯化酶生态菌剂在浓香型大曲酒中的应用[J].酿酒科技,2002,114(6):55-57.