

# 脂肪酶催陈白酒应用条件对微量成分影响的研究

吴华昌<sup>1</sup>, 由耀辉<sup>1</sup>, 卢中明<sup>2</sup>, 邓 静<sup>1</sup>, 周小龙<sup>1</sup>

(1.四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2.泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州 646000)

**摘 要:** 以脂肪酶 Novozym435 作为催化剂, 探索了应用脂肪酶进行白酒催陈过程不同反应条件对白酒中微量成分的影响。结果表明, Novozym435 对不同酒度白酒均有明显的作用, 常规作用温度及转速对催陈影响不明显, 加酶量对催陈有着较强的影响。

**关键词:** 白酒; 催陈; 脂肪酶; 反应条件

中图分类号: TS262.3; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2011)09-0023-06

## Investigation on the Effects of Different Reaction Conditions for Liquor Aging by Lipase on Liquor Trace Compositions

WU Huachang<sup>1</sup>, YOU Yaohui<sup>1</sup>, LU Zhongming<sup>2</sup>, DENG Jing<sup>1</sup> and ZHOU Xiaolong<sup>1</sup>

(1.Dept. of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000;

2. Luzhou Laojiao Co.Ltd., Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** The effects of different reaction conditions for liquor aging by lipase (Novozym 435 used as catalyst) on liquor trace compositions were investigated. The results showed that Novozym 435 had evident aging effects on liquor of different alcoholicity, conventional temperature and rotation speed had no significant effects on liquor aging, however, the addition level of Novozym 435 had strong effects on liquor aging.

**Key words:** liquor; liquor aging; lipase; reaction conditions

白酒生产过程中, 优质白酒至少需要 3 年以上的贮存期, 一般白酒贮存期也要有 1 年左右, 这使得生产单位不得不增设库房和贮存容器, 从而严重影响了资金的周转, 并使库存损失增多, 导致生产成本大大增加<sup>[1]</sup>。当前, 一些企业及科研院所也在极力研究白酒贮存期各物质的变化机理, 从而谋求缩短贮存期的办法。研究发现, 白酒在贮存过程中, 发生的化学变化主要有氧化、还原、酯化和水解反应等。贮存期间, 各种醛部分氧化为酸, 酸再与醇在一定条件下发生酯化反应生成酯, 一些酯类化合物水解又生成相应的酸和醇, 使酒中的醇、醛、酯、酸等成分达到新的平衡。根据这一机理, 已探索出多种人工催陈的方法, 目前主要采用的方法有热处理法、微波处理法、冷冻法等<sup>[2]</sup>。但事实表明, 凡经催陈技术处理后的白酒都存在“回生”现象, 其味感和香气往往会异于自然陈酿的白酒, 灌瓶包装出厂后, 在流通环节中又重新呈现出燥辣感, 同一批次勾兑调味的产品彼此之间味感质量相差也大, 表现出白酒产品的货架期稳定性差, 以及产品的近似性不高等缺点。在贮存过程中, 白酒进行了氧化、还原、分子氢键缔合及酯、酸、醇的平衡等变化, 从而促进了酒体

的老熟、增香, 使酒体柔和、成分平衡谐调、稳定, 达到提高酒质的目的<sup>[3]</sup>。其中, 酯、酸、醇的平衡是一种热力学平衡关系, 传统的自然贮存方法中, 酯、酸、醇的平衡是一种缓慢的化学过程, 反应时间很长, 这就是白酒需要很长时间贮存的原因。而脂肪酶具有只改变反应的动力学平衡而不改变热力学平衡及催化作用特点, 恰好能够在短时间内促使酒体中酯、酸、醇达到相对的平衡。通过考察不同种类脂肪酶对白酒的作用效果, 成功筛选到一种能在白酒中保持一定活力并且能促使酒体中的酯、酸、醇达到相对平衡的脂肪酶 (Novozym435)。并证明了 Novozym435 添加在酒中引起的物质变化源于酶的催化作用, 而酶本身并未污染酒质, 可应用于白酒催陈中<sup>[4]</sup>。本研究进一步探索了 Novozym435 在不同反应条件下, 对白酒中微量成分的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

脂肪酶 (Novozym435), 无水乙醇 (分析纯), 异戊酯 (色谱纯)。

#### 1.2 仪器与设备

基金项目 泸州老窖科研奖学金 编号: 09ljzk03 研究生创新基金 编号: y2009017。

收稿日期: 2011-06-07

作者简介: 吴华昌, 教授, 研究方向: 发酵工程。

高速离心机(LG10-2.4A,北京医用离心机厂),气相色谱(安捷伦 6890)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 白酒降度处理

用去离子水与原酒混合,以体积比计算酒精度。60 %vol 降度酒的配制:6 体积的 70 %vol 原酒与 1 体积的去离子水混合,静置一段时间,直至新配制的酒澄清无浑浊。

#### 1.3.2 酶催化反应

取 0.2 g Novozym435 加入装有 50 mL 白酒的三角瓶中,封口后,恒温水浴摇床振荡反应,以未添加酶的白酒作为空白。样品分别处理 1~5 h,反应结束后,将样品过滤,离心,取上清液保存。反应过程每隔 1 h 测定样品的成分变化。

### 1.4 分析方法

气相色谱分析条件:色谱柱:白酒专用柱 25 m × 0.32 mm × 0.25 μm;柱温:60 °C 保持 5 min,5 °C/min 程序升温至 140 °C 保持 2 min;进样口温度:150 °C;检测器温度:160 °C;载气:N<sub>2</sub>;柱前压:90 kPa;尾吹:30 mL/min;分流比:1:30;空气:50 kPa;氢气:50 kPa。

## 2 结果与分析

### 2.1 白酒酒度对酶催化反应的影响

分别取 70 %vol、60 %vol、50 %vol 和 40 %vol 的白酒各 50 mL,装入 150 mL 三角瓶中,分别加入 0.20 g Novozym435,封口后,35 °C 下恒温水浴摇床振荡反应,以未添加酶的白酒作为空白。样品分别处理 1~5 h,反应结束后,将反应液过滤,离心,取上清液保存,以备测样。每隔 1 h 通过气相色谱测定样品成分。结果见图1~图8。

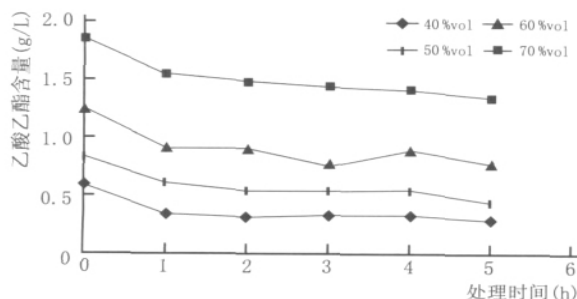


图1 不同酒度白酒中乙酸乙酯变化规律

由图1~图4可知,经 Novozym435 处理后的白酒,酒中乙酸乙酯等四大酯有着明显的变化,证明 Novozym435 能在不同酒度白酒中保持一定活力,并起到催化作用。白酒中四大酯类含量,除去丁酸乙酯外,均呈现下降趋势。反应主要在前 1 h 内完成,后 4 h 酯类的

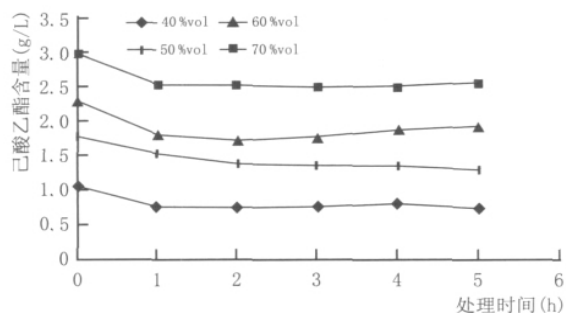


图2 不同酒度白酒中己酸乙酯变化规律

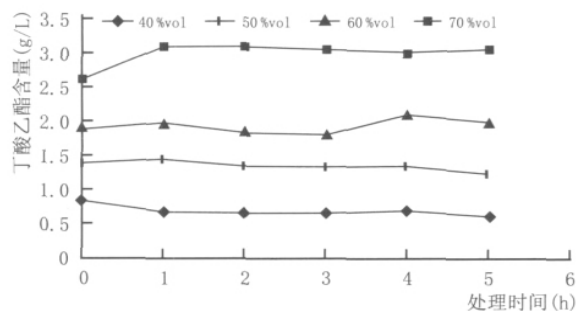


图3 不同酒度白酒中丁酸乙酯变化规律

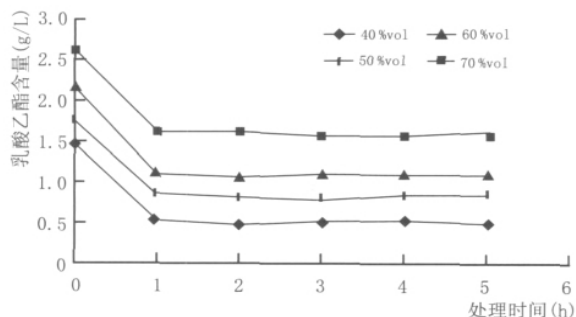


图4 不同酒度白酒中乳酸乙酯变化规律

含量变化不是特别明显。过程中乙酸乙酯和乳酸乙酯下降幅度最大;对于丁酸乙酯来讲,除 70 %vol 样品外,其余 3 种样品中丁酸乙酯基本保持不变。由于采用的酒样的四大酯的含量呈现为己酸乙酯 ≥ 乳酸乙酯 > 乙酸乙酯 ≥ 丁酸乙酯,丁酸乙酯在酶催化反应中变化不太明显。分析原因可能有两点:①低度白酒中丁酸乙酯含量较低,造成酶促反应底物浓度低,加之 Novozym435 对其专一性不强,故而变化不是特别明显;②在低度白酒中(40 %vol, 50 %vol),由于进行过降度处理,丁酸乙酯、丁酸、乙醇等物质已经基本上处于平衡状态,因此,添加酶并不能改变其平衡关系。这同样解释了在高度白酒中(70 %vol)中,未经过降度前,酒样中的丁酸、乙醇过量,反应朝酯化方向进行,故而丁酸乙酯含量上升。

由图5~图8可知,同一白酒的 4 个酒精度梯度中,四大酯变化规律基本一致,乳酸乙酯变化幅度最大,丁酸乙酯基本保持不变。随着酒精度的提高,四大酯的变

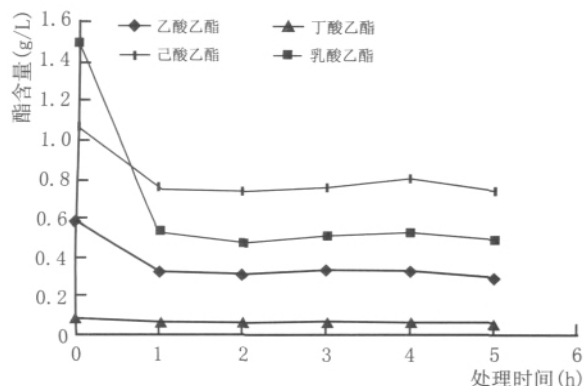


图5 40%vol白酒四大酯变化规律

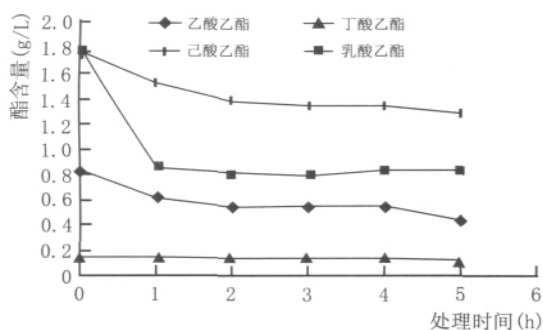


图6 50%vol白酒四大酯变化规律

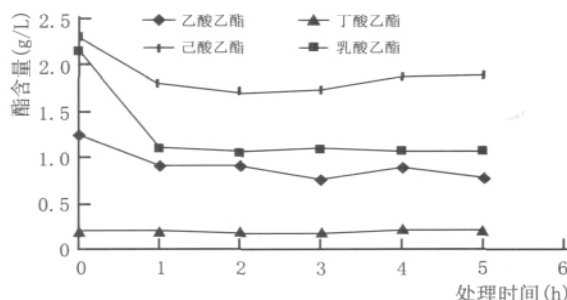


图7 60%vol白酒四大酯变化规律

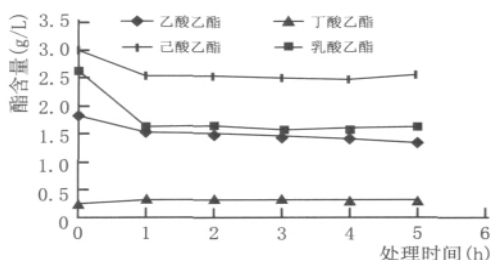


图8 70%vol白酒四大酯变化规律

化幅度降低,变化规律为:酒精度越低,四大酯的含量降低幅度越大;酒精度越高,四大酯含量降低幅度变化较缓。就四大酯在酶促反应过程中的变化而言,其结论与众多科研人员检测白酒贮存过程中四大酯的变化规律大致相同<sup>[5-6]</sup>。

## 2.2 不同反应温度对酶催化反应的影响

取 50 mL 50 %vol 白酒装入 150 mL 三角瓶中,然后

加入 0.20 g Novozym435,封口后,在不同作用温度下恒温水浴摇床振荡反应,以未添加酶的 50 %vol 白酒作为空白。样品分别处理 1~5 h,反应结束后,将反应液过滤,离心,取上清液保存,以备测样。每隔 1 h 进行气相色谱测定样品成分。

### 2.2.1 酶最适温度催化反应结果分析

针对不同作用温度,先考虑采用常规的酶适宜的反应温度作为考察对象,温度选择 30 ℃、35 ℃和 40 ℃。其反应结果见图 9~图 12。

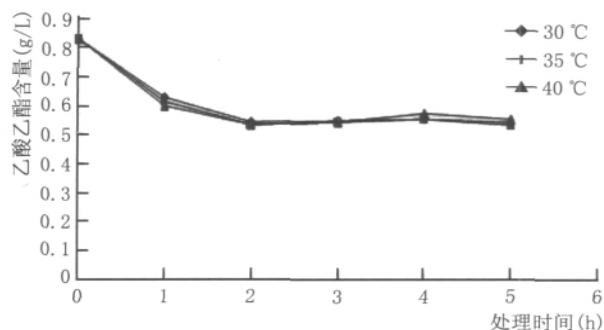


图9 不同反应温度对乙酸乙酯的影响

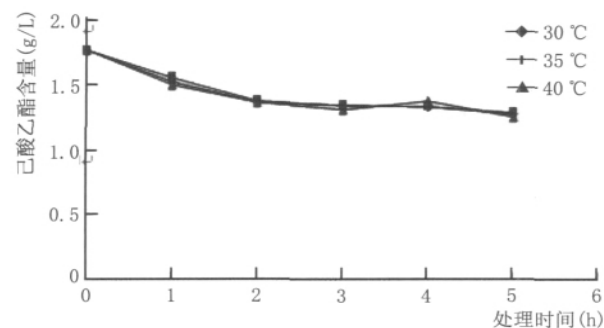


图10 不同反应温度对己酸乙酯的影响

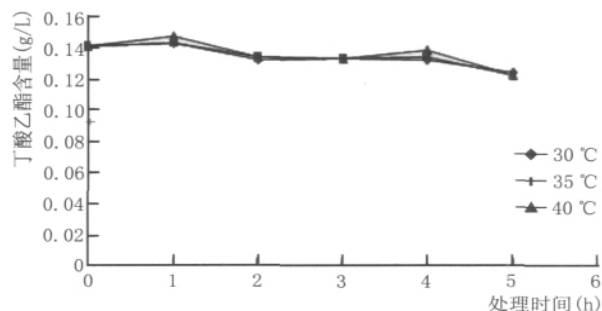


图11 不同反应温度对丁酸乙酯的影响

由图 9~图 12 可知,在 3 种不同的作用温度下,其变化规律曲线处于基本重合状态,应该说四大酯的含量变化规律基本统一,仍旧符合总酯变化在第 1 小时前呈下降的趋势,随后趋于平稳这一规律。采用的 3 种不同作用温度均属于酶的正常反应温度,且接近于常温。可以认为,在常温状态并且温度变化幅度不大的情况下,酶作用温度对酒中四大酯的影响较弱。另一种可能就是,添加的

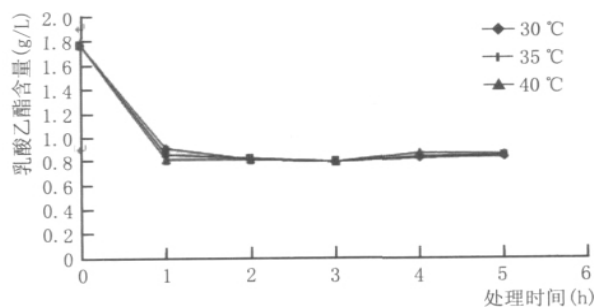


图 12 不同反应温度对乳酸乙酯的影响

酶量处于过量状态下,在催化反应前 1 h 内,已经完成了酯化、水解反应。在理论上讲,假如在不同作用温度下,酒样中酯、酸、醇已经达到相对平衡,那么酯、酸、醇的平衡常数不一致,就是说平衡时不同处理温度下酒样中酯、酸、醇的量应该不相同。但测定数据表明,不同反应温度下酒样中酯、酸、醇达到平衡时的量基本相同。对此的解释笔者认为有 2 个方面:①在 30℃、35℃ 和 40℃ 作用下,平衡常数的变化不明显。②从样品处理到送样检测并非连续的过程,样品处理到样品检测期间有一段较长的时间,因此,不能够单纯地以样品的反应温度作为其最终平衡条件的温度。在样品处理过后,由于催化剂酶的去除,在酒样酯、酸底物含量较低且环境呈弱酸性的条件下,反应进程极为缓慢,对酶处理过后的平衡状态略有影响。造成常温状态下,3 个不同反应温度(30℃、35℃、40℃)下最终平衡终点基本一致的原因应该是①、②的协同作用导致的。

### 2.2.2 非酶最适温度催化结果分析

由于采用酶常规作用温度(30℃、35℃、40℃)进行处理,并未有明显的不同。因此,继续放宽对温度的考察范围。选用 10℃、15℃、20℃、25℃ 作为处理温度,其结果见图 13~图 16。

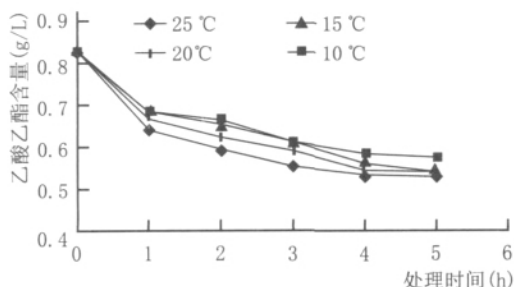


图 13 不同反应温度对乙酸乙酯的影响

由图 13~图 16 可知:在 10℃、15℃、20℃、25℃ 作用时,四大酯的变化与酶常规作用温度处理时比较,总体趋势虽然仍呈下降趋势,但变化幅度明显减弱。随作用温度的降低,四大酯的变化幅度随之减小。乙酸乙酯、己酸乙酯、乳酸乙酯的变化有着较强的规律性,且最终平衡终点也有差异,这与不同处理温度导致平衡终点的改变有

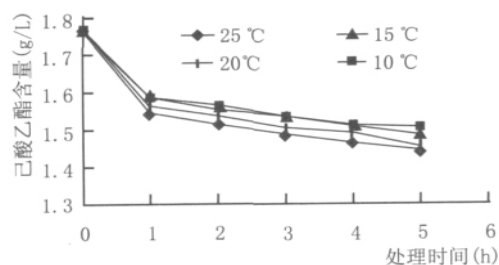


图 14 不同反应温度对己酸乙酯的影响

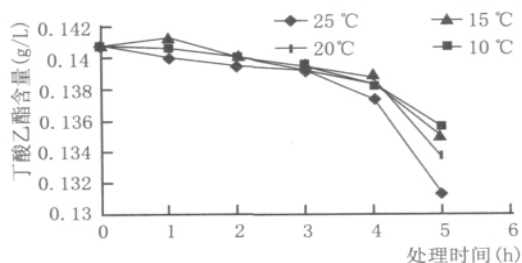


图 15 不同反应温度对丁酸乙酯的影响

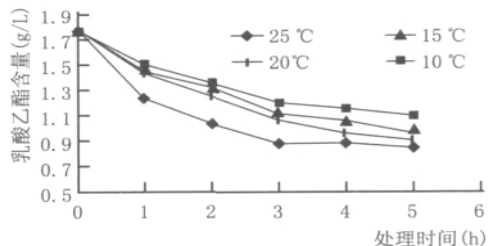


图 16 不同反应温度的乳酸乙酯的影响

一定关系,可认为并非完全是由于反应温度不同决定的,因为 2.2.1 分析结果表明:白酒处理过后,并非直接送样检测,而是间隔较长时间,这段时间内处理后的白酒在环境温度影响下,继续进行缓慢的酯化水解反应,因此,最终送样检测结果应与酶作用后结果略有差异。反观丁酸乙酯的变化规律图像,与其他 3 种酯类有着很大的差异,虽然呈下降趋势,但是乙酸乙酯、己酸乙酯、乳酸乙酯在第 1 小时其含量呈急剧下降,随后呈缓慢下降趋势,到第 4 小时,基本趋于平衡。而丁酸乙酯则不同,前 4 个小时变化较弱,第 5 小时急剧下降,由于作图选择纵坐标数值间隔较小,实际上丁酸乙酯变化幅度与其他 3 种酯类比较仍是最小的。

### 2.3 不同转速对酶催化反应的影响

对于摇床转速的考察,采用 100 r/min、150 r/min 和 200 r/min。取 50 mL 50%vol 白酒装入 150 mL 三角瓶中,再加入 0.20 g Novozym435,封口后,35℃ 下恒温水浴摇床振荡反应,以未添加酶的 50%vol 白酒作为空白。样品分别处理 1~5 h,反应结束后,将反应液过滤,离心,取上清液保存,以备测样。每隔 1 h 进行气相色谱测定样品成分,结果见图 17~图 20。

由图 17~图 20 可知:在不同的转速作用下,四大酯

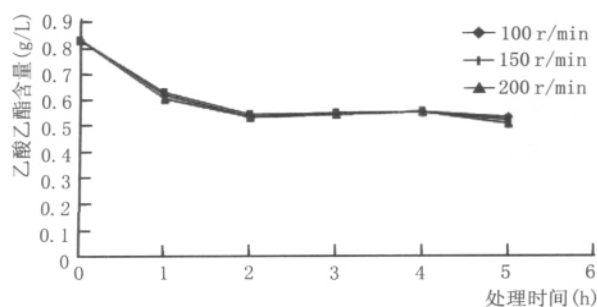


图 17 不同转速对酒中乙酸乙酯的影响

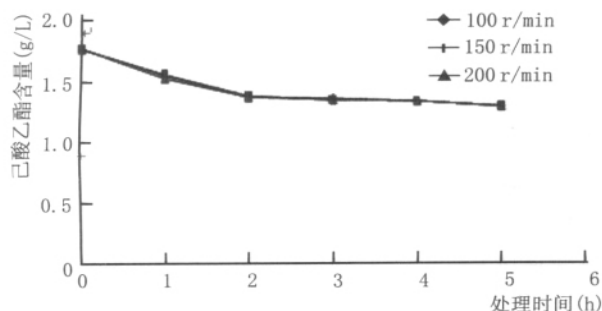


图 18 不同转速对酒中己酸乙酯的影响

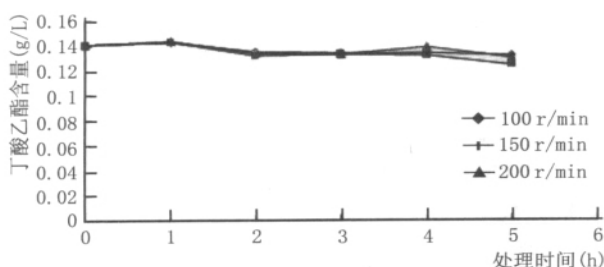


图 19 不同转速对酒中丁酸乙酯的影响

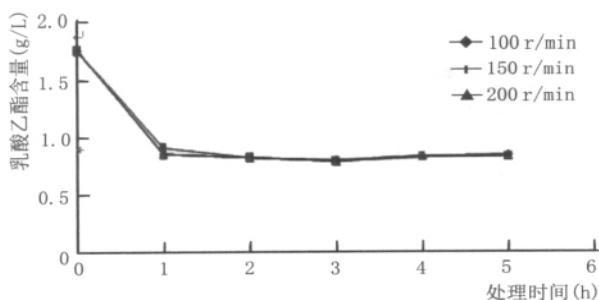


图 20 不同转速对酒中乳酸乙酯的影响

在前 1 h 呈降低趋势,后 4 h 趋于平稳,总体变化并无明显差异。原因有以下两种:①采用的 3 种转速均属于低速,白酒流动性良好,并不存在传滞阻力,白酒能够充分地酶接触反应。②与对酶的最适作用温度的考察中分析的一致,添加酶量处于过量状态,在催化反应前 1 h 内,已经完成了酯化水解反应。综合转速及作用温度的考察,判断反应选择的加酶量应该是过量的,因而继续考察加酶量对催化反应的影响。

#### 2.4 不同加酶量对酶催化反应的影响

通过不同反应温度及转速的考察,初步认定,0.20 g 的加酶量是过量的。因而,采用 0.15 g、0.10 g、0.05 g 加酶量继续进行试验。同时,对比添加 0.20 g 酶处理过后白酒四大酯的变化情况。取 50 mL 50 %vol 白酒装入 150 mL 三角瓶中,再加入一定量的 Novozym435,封口后,置于 35 °C 下恒温水浴摇床振荡反应,以未添加酶的 50 %vol 白酒作为空白。样品分别处理 1~5 h,反应结束后,将反应液过滤,离心,取上清液保存,以备测样。反应过程每隔 1 h 取样进行气相色谱测定样品成分,结果见图 21~图 24。

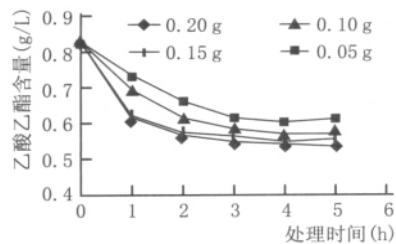


图 21 不同加酶量对乙酸乙酯的影响

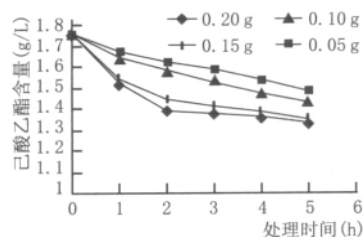


图 22 不同加酶量对己酸乙酯的影响

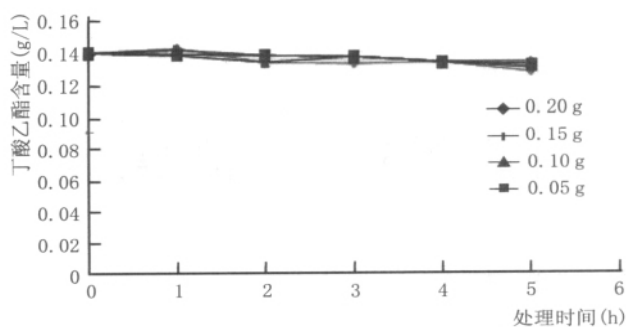


图 23 不同加酶量对丁酸乙酯的影响

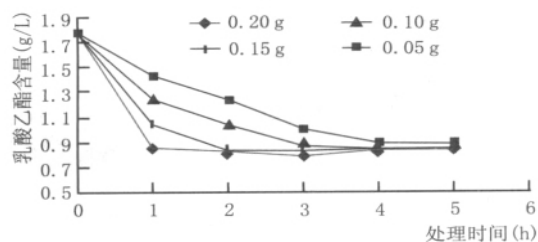


图 24 不同加酶量对乳酸乙酯的影响

由图 21~图 24 可知,改变加酶量对乙酸乙酯、己酸乙酯、乳酸乙酯的影响较为明显,而丁酸乙酯变化依旧不

是特别明显。采用 0.15 g 加酶量时,与添加 0.20 g 酶作用时,四大酯的变化规律基本一致,差异只体现在乳酸乙酯反应前 2 h,变化规律不同。进一步削减加酶量后(0.10 g、0.05 g)发现,酶促反应速率明显放慢,随着加酶量的减少,反应速度越缓慢,并且最终的平衡终点也有所不同。乙酸乙酯、己酸乙酯在低加酶量(0.10 g、0.05 g)时,反应终点与高加酶量(0.20 g、0.15 g)有明显差异,因而推测乙酸乙酯、己酸乙酯低加酶量(0.10 g、0.05 g)作用 5 h 时,尚未达到平衡状态;丁酸乙酯、乳酸乙酯,在低加酶量(0.1 g、0.05 g)作用 5 h 时,平衡终点与高加酶量作用时基本一致。从上述结果中可知,在低加酶量(0.10 g、0.05 g)作用时,四大酯并未能够在短时间内同时达到相对平衡状态,反之,在高加酶量(0.15 g)反应时,与(0.20 g)反应时,差别不大。因此,认定采用 0.15 g 加酶量为最适加酶量。

### 3 结论与展望

#### 3.1 结论

本研究考察了脂肪酶 Novozym435 在不同作用条件下对白酒微量成分的影响。考察因素包括:白酒的酒精度、酶的作用温度、摇床反应的转速及加酶量等。试验结果表明:Novozym435 对不同酒度白酒均有明显的作用,常规作用温度(30℃、35℃、40℃)及转速(100 r/min、150 r/min、200 r/min)对反应影响不明显,其后考察的脂肪酶非最适作用温度(10℃、15℃、20℃、25℃),表明随着酶反应温度的下降,反应速率也随之变小,平衡终点略有差异,但是四大酯仍呈下降趋势。加酶量对反应有着较

强的影响。

#### 3.2 展望

白酒人工催陈在当今依旧是一个尚未完全攻克难题。此次研究仅仅针对酶法催陈白酒的条件进行简单的探讨,尚有许多工作未能进一步研究探索,具体如下:

①酶处理的酒样,尚未经过品酒专家品尝鉴定,仅仅对酒样部分微量成分进行测定,不能够最终确定酶促反应的最佳条件和是否影响酒的口感。今后的研究重点应该侧重于酶处理条件的优化与人工品尝相结合。

②酶法催陈是否对于其他类型的酒同样有效,需要科研人员共同探索研究。

③酶法催陈的成本问题,若采用商品化的固定化酶,成本过于昂贵,并不适用于生产领域,急需科研人员协同努力,寻求一种成本低廉、适宜于白酒的固定化条件的酶,从而降低酶法催陈的成本。

#### 参考文献:

- [1] 孙景庄,薛蕙茹.化学法催陈白酒的研究[J].食品科学,1994(12):9-41.
- [2] 谭力,张文学.浅析白酒的人工老熟[J].酿酒,2008(4):57-60.
- [3] 康明宫.白酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,2001:74-187.
- [4] 吴华昌,由耀辉,卢中明,等.脂肪酶应用于白酒催陈的初探[J].中国酿造,2011,228(3):75-77.
- [5] 杨红文,潘大金.浅谈浓香型白酒陈酿[J].酿酒科技,2008(4):77-78.
- [6] 李家民.浓香型白酒贮存过程中四大酯减少特点的分析[J].酿酒,2009(5):83-84.

## 第四届全国清香类型白酒高峰论坛在包头召开

本刊讯 第四届全国清香类型白酒高峰论坛于 2011 年 8 月 27 日~28 日在内蒙古包头市骆驼酒业隆重召开。来自全国 14 个省市区 51 家白酒企业代表、9 个省市区酿酒协会会长、秘书长、著名白酒专家、高等院校及新闻媒体等 68 个单位 140 余人参加此次论坛。论坛主题:“传承、创新”。论坛由内蒙古酒业协会秘书长张向阳主持,全国政协常委、内蒙古自治区工商联主席田震,包头市委常委、东河区委书记许文生,包头市政府副市长曹文华等领导出席会议。山西杏花村汾酒集团总经理谭忠豹致开幕词,包头市委常委、东河区委书记许文生致欢迎词,包头市政府副市长曹文华和全国政协常委、内蒙古自治区工商联主席田震作了重要讲话。

高峰论坛秘书长、北京酿酒协会会长高景炎做了题为“传承(酿造生态化,确保质量安全)、创新(实施机械化,提升行业水平)”的主题发言,著名白酒专家沈怡方、徐岩、沈正祥等作了专题报告。山西杏花村汾酒集团公司、衡水老白干酿酒集团公司、河南宝丰酒业公司湖北劲牌有限公司、内蒙古骆驼酒业有限公司等 11 家企业代表做主题演讲交流。

会议期间,论坛还组织 19 位国家白酒评委对送交的 39 个中高端白酒样品进行了感官品评,向论坛的高级顾问和专家组成员颁发了证书;与会代表参观了内蒙古骆驼酒业有限公司。论坛通过了会议纪要并交接了论坛旗帜。论坛达成 4 点共识:

①组织清香联盟,传播清香文化,促进清香大回归。

②倡导白酒酿造生态化,进一步提高白酒质量安全性。

③实施清香白酒生产机械化,提升行业整体水平。

④加大科技创新,打造清香类型白酒风格个性化。

本次论坛的特点是不少企业积极研发调味酒,开发了以清香为主的复合香型酒,受到了消费者的欢迎和好评,为清香类型白酒发展提供了新的思路。(小雨)



主席台就座的领导



论坛旗帜交接仪式