

红曲霉酯化酶特性及在白酒酿造中的应用研究

镇 达,方尚玲,陈茂彬

(湖北工业大学生物工程学院,湖北 武汉 430068)

摘要: 红曲霉产生的酯化酶在酒的风味物质产生中发挥了重要作用。酯化酶生产和应用技术得到不断改进。在实际生产中由于红曲霉制剂生产和应用方式过于粗放,普遍存在活性不高、效果不稳定等问题。对酯化酶酶学特性的进一步研究及提高工艺控制的科学性至关重要。从酶学特性出发对提高酯化酶产品生产质量和应用技术进行了论述。

关键词: 微生物; 红曲霉; 酯化酶; 白酒

中图分类号:Q93-3;TQ925.7;TS261.3

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2009)01-0062-03

Characteristics of *Monascus* Esterifying Enzyme and Its Application in Liquor-making

ZHEN Da, FANG Shang-ling and CHEN Mao-bin

(College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China)

Abstract: *Monascus* esterifying enzyme plays important roles in the formation of liquor flavor. The production and the application of esterifying enzyme get improved continuously. In practice, there are some problems in the production and the application of *monascus* esterifying enzyme such as low activity and unstable effects etc. Accordingly, further study of the characteristics of *monascus* esterifying enzyme and the improvement of relative technical control are of vital importance. In this paper, the techniques to improve the quality and the application of *monascus* esterifying enzyme were illustrated.

Key words: microbe; *monascus*; esterifying enzyme; liquor

酯化酶又称酯酶,由于在多种传统食品发酵生产及食品风味的强化过程得到广泛关注。在白酒酿造中,酯化酶增香技术常用来合成己酸乙酯为主的香味成分,在生产中用于调整传统生产工艺和调味酒的生产^[1]。实际应用中酯化酶制剂以菌和酶的混合体形式出现,其中菌可以是单一菌或者复合菌组成。在加工生产和应用过程中,由于生产条件和工艺特点,导致制剂生产质量不稳定、应用效果不尽人意。本文从酶学特性出发对提高酯化酶产品生产质量和应用技术的途径予以讨论。

1 酯化酶产生菌及酯化酶

1.1 酯化酶产生菌

产生酯化酶的微生物包括细菌、丝状真菌、酵母等。微生物生长中酯化酶分泌到胞外,水解酯类底物以获取碳源和能源,所以酯化酶属于胞外酶。细菌中的酯酶研究报道在食品领域很少。食品、医药生物技术中常见的酯酶来自红曲霉、根霉和酵母等真核微生物;酯酶在真菌中分布广泛,因此酯酶同工酶可用于真菌的分类鉴

定。国内外真菌酯酶应用很广泛,曲霉、根霉、酵母及酶制剂用于酒类生产,酿制调味品增香;在国外酯酶用于黄油、干酪增香及合成己酸酯、甘油酯等。霉菌酯酶应用广泛的主要原因是因其活性高、生产成本低,固体发酵具有操作简便、能耗低、发酵过程容易控制、不易发生大面积的污染等优点,更重要的是,霉菌在静态的环境中生长得更好,次生代谢物积累的效率更高。

红曲霉种类较多,实际生产中经常应用的仅有紫色红曲霉和烟色红曲霉等^[2]。红曲霉为腐生真菌,最适生长温度为32~35℃,最适pH3.5~5,能耐pH3.5,嗜乳酸,耐10%vol酒精。能合成生长素,无需外源供给。经鉴定可以产生辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、油酸、亚油酸及其乙酯等微量成分,对发酵产物的风味和质量有利^[3]。

1.2 酯酶特性

酯酶(羧酸酯酶 carboxylesterases)与脂肪酶功能相似,都能催化酯键的水解和合成。酯酶与脂肪酶的差异在于底物的作用的碳链长短不同,脂肪酶优先水解长链的酯类,酯酶则是优先水解短链的酯类,二者的差异还

基金项目 湖北工业大学博士科研启动基金资助。

收稿日期:2008-09-27

作者简介 镇达(1968-),男,湖北松滋人,博士,发表论文数篇。

通讯作者 陈茂彬, hgchenmaobin@163.com。

在于所要求的底物的物理状态不同,即底物的水溶性要求不同;酯化酶只作用于具有水溶性的底物。酯酶可以水解有一元醇的有机酸单酯。它同样也可水解甘油酯,但速度要慢得多。酯酶的催化受反应介质、底物和产物的浓度等因素的影响较大,为了加速酯化反应的进程,取得更好的生产效果,需要弄清它的生物特性及在实践中优化应用的条件。

酯化反应适于非极性溶剂介质中进行,因为酯化反应有水生成,反应平衡常数与溶剂介质对水的溶解度有很重要的相关性,因此,控制酶反应体系中的水含量,有利于酯化反应进行。实际生产中水含量总是处于较高水平,这是酯化效率处于低水平的原因。酶的用量、反应温度和 pH 值是影响酯化反应的关键因素。根据酶反应动力学规律,在反应系统中,若过高的用酶量会导致溶液粘度增加,妨碍底物扩散,降低酯化反应的速度,在实际生产中酶制剂过量使成本过高,且存在对底物和产物的吸附,使反应过程复杂化。同时反应中系统酸碱度是变化的,为保证酯酶的最适的催化 pH 值,需要关注酸碱度变化情况。酯酶的最适催化温度一般为 40~50 °C,若催化在室温下进行,则催化时间要延长;反之,选择中温酯酶则有可能降低反应温度,简化操作,提高酯化效率。

所有酶类均存在底物作用范围,酯化酶底物范围影响酶的实际应用价值。对白酒发酵而言,由于底物是以多种短碳链物质和乙醇为主的混合体系,为获得较高的己酸乙酯含量,酯化酶作用的合适底物范围是成功的基础。中科院成都生物所分离的烟色红曲霉 M-101,催化单一酸基质时己酸乙酯合成能力最强,其次为乳酸乙酯,合成乙酸乙酯能力最弱,显示这种菌的酯化酶的底物的偏好性^[4]。目前尚未发现仅酯化己酸的酶,这是由酶的构效关系决定的。任道群等研究了酯化酶动力学,比较大曲与红曲酯化酶特性,在单酸存在下,红曲比大曲具有更高的酯化性能,红曲对己酸酯化力很强而对乳酸的作用几乎为零,显示了红曲酯化酶的独特功能^[5]。需要说明的是,特定微生物酯酶可以是多种酶组成,是不同基因表达的产物,其性质相似或相近,导致了共同的催化效果。

2 红曲霉酯化酶在白酒酿造中的应用及存在问题

2.1 复合酯化酶生态菌剂

复合酯化酶生态菌剂,主要用于提高出酒率和酒的优质率。此复合制剂包括己酸梭菌、酯化红曲霉(或根霉)和耐酸(pH2.5)耐高温酵母等,在白酒企业中得到广泛应用,效果明显。复合菌剂在应用上有多种方式:直接加入粮醅入池发酵可以较好地解决酸度抑制发酵的矛盾,保证在较高酸度(pH1.8)下,使发酵正常,出酒率正常。与中高温大曲配合使用,可以解决出酒率与酒质的矛盾。复合制剂中含根霉,增加了酒的醇甜和香味成分。

复合制剂与大曲配合使用,发酵 45 d,较单独加入大曲,可使出酒率提高 5%。复合制剂强化了大曲中欠缺的己酸菌、酯化酵母、酒精酵母的数量,突出了主体香和酒体协调^[6]。

2.2 酯化酶的应用

酯化酶应用于黄水处理,可降低污水处理成本。黄水含有大量有机质,据测定,黄水 pH 一般为 3.0~3.5, COD 25000~40000 mg/L, BOD₅ 25000~30000 mg/L,远远超过国家允许的废水排放标准^[7]。虽然不同厂家的黄水成分略有差异,都含有残余淀粉、残糖、酒精,以及丁酸、己酸、醋酸及微生物等。采用生物酶酯化技术后,可以实现对酿酒副产物资源的再利用,使黄水中的 COD、BOD 含量在原有基础上下降 80%,并获得一定经济效益^[8]。部分酒厂还没有采用酯酶完全处理黄水,主要是因为黄水酯化处理效果不稳定,经济效益不显著,影响了运用酯化工艺的的积极性。

根据相关文献报道,不同厂家采用黄水、酒尾、窖泥、大曲、酯化酶等复合处理,采用“一锅”法生产,工艺简单,但是也存在过分粗放的问题。对窖泥菌群和酯化酶的作用条件采用了折中的策略,如需要使菌群发酵利用黄水中的有机质生产己酸,则需要提供必要的酸碱环境,但“一锅”法中的产酸环境实际已经达到 pH3~5,对己酸发酵不利;黄水中含有大量乳酸,对己酸菌等微生物生长有抑制作用;一些工艺的己酸乙酯的产量仅达到 100~300 mg/100 mL,这与不同企业黄水、酯化酶等主要原料的性能和组成不同有关,即使对同企业,不同时间采用的黄水和窖泥质量也存在很大差异;另有“两步”法,分别为窖泥菌群、己酸菌和酯化酶提供了温度、pH 值,其己酸乙酯含量比“一锅”法高 150%以上,但是操作较复杂,也存在条件进一步优化问题。

2.3 纯种红曲,与不同对象配合使用,用于提高出酒率和优质率

纯种红曲与不同对象配合使用,可用于提高出酒率和优质率。在通常条件下,大曲中主要微生物菌群和酶类量比关系不稳定,发酵糟内微生物酯酶的活力不高,限制了酯类香味成分含量的提高。按一定比例加入纯种培养的红曲霉,人为控制发酵,使得微生物数量足,功能强,突出己酸乙酯的主体香,使得酒体丰满协调。红曲应用方式灵活多变,对不同应用结果比较显示:将红曲霉与大曲粉、己酸菌液一起入窖发酵,由于与糟粕的接触面大,更有利于发酵中醇、酸酯化反应的进行,大大地提高了产品的质量。

部分酒厂将红曲酯化酶直接入池,取得了明显效果,与高温大曲配合使用,提优率达到 6%。但在使用中,也有部分企业发现应用效果不明显,其可能有几个原因:如酯化酶功能特异性不强,既能酯化己酸为己酸乙酯,也能酯化乳酸为乳酸乙酯,使效果难测;窖内环境

不能提供合适的酯化条件,使效率低下,或者使酯化酶失去活性等^[1]。如何提高酯化酶的特异性和保持在窖内环境中的活性是酿酒业普遍存在的问题。

3 酯化红曲应用制剂的制造技术及问题

酯化红曲是一种复合菌剂,生物酶和活菌体的生态混合体,具有经济价值高、生产加工简单、使用方便等优点,对白酒生产和适应现代社会消费起到积极作用。其生产方式相似于小曲、红曲,但又不完全相同。小曲用米粉或米糠为原料,主要含有根霉、毛霉、酵母等微生物。红曲则用红曲霉和酵母接种,在发酵中起糖化和发酵作用。酯化红曲是高酯化力曲霉为主的复合菌剂,在生产中由于不同菌的生长条件的差异,同时接种培养对不同菌种将产生不同影响。到目前为止,还少见制造工艺的报道。

吴根福等研究了2株曲霉,结果表明两者的产酶条件基本相同,以麸皮为培养基,培养温度30℃、pH5.0时较好,培养60h(霉菌孢子开始形成期)酶活最高,培养72h后孢子大量形成,酯化酶的活力明显降低。但2株菌间有差别,如起始生长速度、对温度的适应性等。菌株的酯化酶活力与其生长情况密切相关,2株菌在pH5.0的培养基中生长最好,以水配制的培养基(pH5.8)中生长次之,它们的酯化酶活力也如此^[9]。酯化酶生产中金属离子的影响也有报道,在麸曲培养中一些离子浓度过高会影响红曲霉的产酶能力,如 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 Cu^{2+} 等。

红曲一般采用麸皮和小米生产。杜礼泉等用烟灰色红曲霉生产麸曲,认为pH对麸曲污染控制很重要,当pH控制在4.3~4.8之间时可以杜绝污染,酯化率达到35%以上,采用黄水调酸要好于乳酸^[10]。李桂英等以纯种红曲霉制曲,以大米及麸皮制备种子,以大米进行扩大培养,培养2周后,低温烘干。制曲时对原料处理、中间补水及温度、通气控制都有较高要求^[11]。钟怀利等报道了红曲霉酶制剂生产质量控制方法,强调了采用低温通风干燥对酶活性的重要性^[12]。

对复合制剂的生产技术细节报道更少。复合制剂中常用的酵母和己酸菌,其生产由于菌的特性差异显著,需要用不同的培养基分别在好氧及厌氧条件下培养,以获得最好的增殖条件。如果采用商品酵母进行配方生产时,则还要考虑复合制剂的贮存条件对不同成分的影响。

白酒酿造中酯化酶的应用研究,已经获得了重要进展和成就,生产中存在的不足也需要予以重视。红曲霉酯化酶制剂应用的方式多种多样,不管是与粮醅的混合发酵,还是制备高酯酯化液,酯化酶的生产 and 发挥功能均需要良好的条件。为加强酯化酶产品的研究开发,促进白酒酿造新技术的应用,需要加强对以下几个方面的研究:

①粗酶的基本特性研究。包括:酯化酶粗酶制剂的热稳定性研究;酯化酶对高浓度己酸、乙醇的稳定性;酯

化酶对不同底物的选择性;还可以从菌株出发,通过菌株选育提高酯化酶对酸碱度、贮存稳定性,以及从各种来源筛选对底物有选择性的菌株。

②在此基础上,需要对红曲霉孢子萌发、生长、产酶条件进行研究。根据现有的研究结果,商品酯化红曲中保留的酶活力水平较低,而且随着贮存时间的延长,酶的失活越严重。相比之下,曲霉孢子的存活力强。武汉佳成生物制品有限公司生产的酯化红曲在孢子活化后使用和直接使用,发酵后酒的优质率水平差异显著^[13],对孢子萌发、菌丝生长和产酶条件的研究对提高酯化红曲的酯化效率是不可忽视的方面。

总之,传统固体发酵中有关机理的研究还需要加强,对起主要作用的酶的特性研究需要深入。在酿酒行业,在分子水平上对酯化酶的研究还非常缺乏,特别是耐高酸、高醇和抗蛋白酶水解机理及育种研究方面^[14]。除了丝状真菌外,酵母和厌氧细菌的酯化酶研究也应该得到重视,酵母具有耐酸耐高浓度乙醇的能力,有利于在窖池的环境中生存和繁殖;细菌的酯化酶活性可能在自然发酵中起到关键作用,但还没有得到重视。如何将现代生物技术运用到传统食品发酵领域,以提高生产效率和经济效益仍具有很大的挑战性。

参考文献:

- [1] 吴衍庸.酯化酶技术与白酒增香[J].酿酒科技,1999,95(5):24-26.
- [2] 施安辉,张文璞,徐恩润,等.酯酶的微生物类群、酯化特性及应用前景[J].山东食品发酵,2001,121(2):17-20.
- [3] 傅金泉.我国红曲业重大技术成就[J].酿酒科技,2006,139(1):90-93.
- [4] 刘光烨,吴衍庸.烟色红曲霉酯酶特性及在中国酒上的应用[J].四川食品与发酵,1998,(4):31-33.
- [5] 任道群,唐玉明,姚万春,等.酯化酶动力学研究[J].酿酒科技,2006,144(6):39-40.
- [6] 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):55-56.
- [7] 罗惠波,左勇.TH-AADY和酯化酶对黄水酯化作用的条件优化[J].四川食品与发酵,2002,113(38):24-26.
- [8] 钟玉叶,宋杰书.白酒酿造的清洁生产[J].酿酒科技,2003,120(6):105-106.
- [9] 吴根福,陈佩华,彭晓国.己酸乙酯酯化酶产生菌的自然选育及其酶学特性初步研究[J].科技通报,1996,12(6):333-337.
- [10] 杜礼泉,唐聪,杨徐才,等.控制杂菌污染提高酯化酶粗酶制剂的质量[J].中国酿造,2003,129(6):41-42.
- [11] 李桂英,袁永俊.红曲霉在浓香型曲酒中的生产与应用[J].酿酒,2005,32(4):22-23.
- [12] 钟怀利.提高酯化酶制作质量及其应用效率的措施[J].酿酒科技,2005,130(4):54-56.
- [13] 崔如生,崔风元,胡继升,等.酯化红曲在江淮流域多粮型大曲酒生产中的应用[J].酿酒科技,2007,(12):54-56.
- [14] 覃拥灵,何海燕,陈桂光,等.裂褶菌(*Schizophyllum commune*)酯酶的分离纯化及酶学性质研究[J].食品研究开发,2007,28(8):29-32.