

筛选啤酒酵母的标准培养基研究

王德良^{1,2} 孙君社¹ 宋绪磊² 张五九² 冯景章³

1(中国农业大学食品学院,北京,100094)2(中国食品发酵工业研究院酿酒工程部,北京,100027)

3(北京燕京啤酒集团科研中心,北京,101300)

摘 要 通过以大生产麦汁成分的含量作为参考,如氨基酸的种类、含量,各种可发酵性糖的种类、含量,以及通过查阅大量文献资料了解酵母培养所需的一些必需组分,以此为基础,研制标准培养基的配料单,并结合与大生产麦汁做发酵性能测试,测试指标包括降糖速度、风味组分、还原双乙酰等指标,最终确定合理的配方;并验证其发酵性能的稳定与重复性;试验结果表明,配制培养基与大生产麦汁的各项发酵性能与指标接近,而且具有较好的重复与稳定性。可以用于酵母筛选,从而确定筛选优良酵母菌种的客观性。

关键词 标准合成培养基,啤酒酵母,发酵参数

鉴于当前国内啤酒企业筛选优良啤酒酵母时所采用的培养基源自于大生产麦汁,而由于麦汁生产工艺与麦芽质量的差异性导致大生产麦汁成分组成波动较大;由此可能影响筛选优良酵母菌种的真实性,即不能完全确认筛选出来的酵母菌种指标的提高是由于麦汁成分更加合理或所筛选出来酵母性能的确提高所致。

此外对于质量技术控制严谨的啤酒生产企业而言,应当定期在实验室采用一系列标准的程序评价其酵母发酵性能的稳定性;因此要解决以上问题,需要确定一个标准的培养基成分。确保该培养基的组分与大生产麦汁基本一致;与此同时酵母在该培养基的发酵性能应该与大生产麦汁基本一致。

以大生产麦汁中一些成分的含量作为参考,如氨基酸的种类、含量,各种可发酵性糖的种类、含量,以及通过查阅大量文献资料了解酵母培养所需的一些必需组分,并以此为基础,研制标准培养基的配料单,并结合与大生产麦汁做发酵性能测试,最终确定合理的配料单;并验证其发酵性能的稳定与重复性。为了保证配料单中成分的稳定与可靠,本试验研究中所涉及的组分均来自于 sigma 公司生产的药品。

1 材料与方 法

1.1 试 剂

蛋白胨(peptone)、酵母浸粉(yeast extract)、酪蛋白、ZnSO₄、葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽三糖 均来自于 sigma 公司产品。

1.2 菌 种

青岛酵母:中国食品发酵工业研究所菌种保藏中心保藏。

1.3 仪器与设备

安捷伦-6890 气相色谱,SGH-300 高纯氢发生器,SGK-2LB 低噪音空气泵,气相色谱仪 HP-6890 (FID 检测器),顶空进样器 HP-7694,Agilent1100 高效液相色谱仪,安捷伦公司;水浴锅,北京光电设备厂;生化培养箱,珠江医疗设备仪器厂;发酵栓,自制;UV-分光光度计,SHIMADZU;显微镜,日本奥林巴司;血球计数板,上海求精生化仪器厂;SGK-2LB 低噪音空气泵,北京市精华苑技术研究所。

1.4 各种指标的分析

1.4.1 酵母发酵 12 种主要风味物质

采用安捷伦-6890 气相色谱。

气相色谱柱:HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol)。气相色谱条件为膜厚:1.0μm Length:30m Column ID:0.53mm。工作站采用 HP G2070AA 软件。色谱条件为柱温:起始温度为 50℃,以 10℃/min 程序升温至 160℃;进样器温度:100℃ 载气为高纯氮气,采用分流进样,分流比 2:1;柱子采用恒流模式,流速:4 mL/min;检测器温度:300℃;氢气流速:30 mL/min;空气流速:400.0 mL/min;氮气流速:25.0 mL/min。顶空进样条件:温度:样品瓶平衡温度:50℃;定量环:100℃;传输管线:100℃;时间为样品瓶平衡时间:27min;充压时间:0.13min;定量环填充时间:0.13min;定量环平衡时间:0.20min;进样时间:0.5min。

1.4.2 氨基酸、糖类检测

采用 Waters2695 高效液相色谱仪。液相色谱条件为样品前处理:柱前衍生。检测器:DAD,338 nm;

第一作者:博士研究生,工程师。

收稿时间:2004-12-06

色谱柱:200×2.1 mm AA 柱;柱温:40℃;进行梯度洗脱。

糖的测量。仪器:Agilent1100;检测器:RID;流动相:75%的乙腈,流速:1 mL/min;色谱柱:200×2.1 mm 氨基柱;柱温:35℃。

1.4.3 双乙酰

GB4927-2001 检测。

培养条件:恒温 12℃ 发酵栓培养 8 d 后检测发酵液中双乙酰含量。

1.4.4 风味检测

恒温 12℃ 发酵栓培养 8 d 后采用气相色谱检测发酵液中风味物质含量。

1.4.5 降糖速度

恒温 12℃ 发酵栓培养,每天定期摇动,除去 CO₂ 后测量瓶中液体与瓶质量,与前 1 d 的质量相比较,其差值反映每 1 d 降糖的克数。

2 结果与讨论

2.1 配制培养基的组分与大生产麦汁的氨基酸、糖类的组成与含量差异性

通过多次实验的摸索,得到与大生产麦汁组分,包括氨基酸、糖类的组成与含量接近的培养基配方,氨基酸、糖类的组成与含量都是由高效液相色谱仪测定,配方的主要组分含量如表 1 所示,按照 11°P 配制的培养基与大生产麦汁中氨基酸、糖类的组成与含量如表 2 所示。

表 1 配制培养基的组分与含量 g

药品	含量	药品	含量
蛋白胨	0.6	果糖	0.05
酵母浸粉	0.40	蔗糖	0.26
酪蛋白	0.12	麦芽糖	6.20
硫酸锌	0.12	麦芽三糖	1.62
葡萄糖	0.36		

2.1.1 氨基酸组成与含量分析

根据酵母代谢利用氨基酸的特点,在大生产中的酵母繁殖所需要的氮源主要来源于麦汁中的氨基酸与短肽,它们不仅对合成酵母蛋白质是重要的,对酵母细胞内的各种酶也相当重要;比较大生产麦汁与配制培养基中氨基酸的组成与含量,以及在固定配方的情况下,重复检测配制培养基中氨基酸的组成与含量的数据,评价其在固定配方的条件下,各种氨基酸含量的稳定性。

酵母对不同氨基酸的同化作用:酵母对各种氨基酸的同化情况是不同的,而是按照一定的顺序吸收,

根据啤酒酵母对氨基酸的不同同化速率,氨基酸可以分为 4 种类型,分别是同化速率较快,如天冬氨酸等,称之为 A 组;中等同化速率,在 A 组氨基酸利用完后再利用,如缬氨酸等,称之为 B 组;同化速率较低,在 A 组氨基酸利用完后再利用,如丙氨酸等,称之为 C 组;极微同化或不同化,如脯氨酸,称之为 D 组。

表 2 大生产麦汁、配制培养基、重新配制培养基中氨基酸组成与含量 mg/L

组分	种 类		
	大生产麦汁 含量(11°P)	配制培养 基含量	重新配制培 养基含量
丙氨酸	90.12	143.89	113.12
精氨酸	110.21	137.70	138.61
天冬氨酸	56.28	46.62	74.64
半胱氨酸	17.59	0	7.85
谷氨酸	51.64	101.75	71.63
甘氨酸	33.05	61.65	69.36
组氨酸	59.33	40.49	64.06
异亮氨酸	80.94	81.58	85.94
亮氨酸	146.18	180.32	179.61
赖氨酸	96.30	175.68	132.37
甲硫氨酸	36.74	29.82	44.07
苯丙氨酸	115.48	109.53	144.40
脯氨酸	203.72	99.32	108.40
丝氨酸	57.92	53.13	82.71
苏氨酸	61.14	63.44	72.85
酪氨酸	89.58	92.39	88.48
缬氨酸	106.60	105.48	96.30
总氨基酸	1436.60	1527.6	1574.41

如此同时,根据氨基酸的酮酸同类物在酵母代谢中的重要性分为 3 类^[1, 2](表 3)。

表 3 氨基酸的酮酸同类物在酵母代谢中按照其重要性分类

第 1 类	第 2 类	第 3 类
天冬氨酸	异亮氨酸	赖氨酸
天冬酰胺	缬氨酸	精氨酸
谷氨酸	苯丙氨酸	组氨酸
谷氨酰胺	丙氨酸	亮氨酸
苏氨酸	甘氨酸	
丝氨酸	酪氨酸	
脯氨酸		
蛋氨酸		

第 1 类氨基酸在麦汁中的浓度不重要,因为他们的酮酸同系物在发酵开始时来自于氨基酸本身,随后来自于糖类的合成代谢途径,因此第 1 类氨基酸浓度的高低不会影响酵母的氮代谢作用^[3]。

第 2 类氨基酸在麦汁中的浓度是重要的,因为在发酵后期,由于糖类合成此类相应氨基酸的酮酸同系物受到抑制,此类氨基酸的酮酸同系物主要来自麦汁中所含此类氨基酸,麦汁中改变此类氨基酸的浓度,

将大大影响酵母的发酵性能,从而影响发酵指标与啤酒风味^[4,5]。

第3类氨基酸在麦汁的含量比例更为重要,由于此类氨基酸酮酸同系物几乎主要来自于麦汁氨基酸本身,很少来自于糖类的合成,缺乏此类氨基酸将引起酵母氮源代谢作用极大程度的变化,从而严重影响酵母的发酵性能。因此要全面评价培养基指标的适用性,除了控制氨基酸的总含量外,对第2类、第3类氨基酸的含量比例也必须控制^[6,7]。

按照氨基酸的3类分类法,大生产麦汁、配制培养基、重新配制培养基中第3类氨基酸、总氨基酸的含量基本接近,由于该大生产麦汁已经运用于大生产,各项指标,包括酵母降糖速度、还原双乙酰能力、啤酒风味物质均正常,因此配制培养基、重新配制培养基中第3类氨基酸、总氨基酸的含量均属于正常水平;此外配制培养基与重新配制培养基中第3类氨基酸、总氨基酸的含量基本接近,表明在固定配方与组分的条件下,配置培养基的各类主要氨基酸与总氨基酸的含量相对稳定,具有较好的重复性(表4和表5)。

表4 大生产麦汁、配制培养基、重新配制培养基中第3类氨基酸、总氨基酸的含量 mg/L

组分	种类		
	大生产麦汁 含量(11°P)	配制培养 基含量	重新配制培养 基含量
精氨酸	110.21	137.70	138.61
组氨酸	59.33	40.49	64.06
赖氨酸	96.30	175.68	132.37
亮氨酸	146.18	180.32	179.61
缬氨酸	106.60	105.48	96.30
总氨基酸	1436.60	1527.6	1574.4

表5 配制培养基、重新配制培养基中各种可发酵性糖种类与含量 g/100 mL

组 分	种 类		
	大生产麦汁 含量(11°P)	配制培养 基含量	重新配制 培养基含量
果 糖	0.09	0.08	0.07
葡萄糖	0.79	0.34	0.34
蔗 糖	0.18	0.23	0.23
麦芽糖	5.79	6.17	6.17
麦芽三糖	1.16	1.57	1.57
总可发酵糖	8.03	7.97	7.92

2.1.2 糖类组成与含量分析

麦汁中酵母可利用糖类与利用序列如下,葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、麦芽三糖;

麦汁中麦芽四糖以上的寡糖、异麦芽糖、潘糖、和

戊糖均不能被酵母利用^[8],因此在配置标准培养基时,按照酵母可以利用、代谢的糖种类添加。

酵母对葡萄糖与果糖可以渗透进入酵母细胞内直接利用,而蔗糖需要酵母分泌在细胞表面的蔗糖转化酶微葡萄糖与蔗糖后,才能进入酵母细胞内^[9];对于下面发酵的酵母而言,当麦汁中含有过量的葡萄糖时会抑制酵母细胞分泌麦芽糖渗透酶,没有这种酶,酵母不能利用麦芽糖,只有当葡萄糖与果糖浓度降低到一定程度后,酵母细胞才能解除这种抑制作用,葡萄糖的这种抑制作用叫葡萄糖的阻遏效应^[10],在正常麦汁中这种抑制效应并不突出,正常麦汁中葡萄糖与果糖的浓度低于1%时,不会出现葡萄糖的阻遏效应。而如表5所示,麦汁与配制培养基、重新配制培养基中各种可发酵性糖的组成,含量比较接近,而且配制培养基、重新配制培养基中葡萄糖与果糖的浓度低于1%,不会出现葡萄糖的阻遏效应^[11]。

2.2 培养基与大生产麦汁发酵性能对比

用配制的标准培养基与大生产麦汁做了发酵对比实验,分别进行了降糖速度、风味、双乙酰、发酵度的测定。

2.2.1 降糖速度

采用CO₂失重法评价酵母降糖速度,数据见表6与表7。

表6 第1批次配制培养基与大生产麦汁降糖 g

培养基	第1天降糖	前3天降糖	前5天降糖	前7天降糖
标-1	0.9	2.7	5.8	7.1
标-2	1.1	2.8	5.7	7.0
麦汁-1	1.1	2.9	5.6	7.0
麦汁-2	1.3	3.0	5.7	6.9

表7 重复配制培养基与大生产麦汁降糖 g

培养基	前2天降糖	前4天降糖	前6天降糖	前7天降糖
标-1	2.3	6.2	6.9	7.1
标-2	2.3	6.3	6.9	7.2
麦汁-1	2.1	5.8	7.1	7.2
麦汁-2	2.5	6.1	7.0	7.1

注:标-1与标-2是配制培养基的2个平行试验;麦汁-1与麦汁-2是大生产麦汁的2个平行试验。

表6和表7数据表明,第一批次配制培养基和重复配制培养基与大生产麦汁的降糖速度基本接近,而且配制培养基的2个试验平行数据较为稳定。

2.2.2 风味指标

配制培养基与大生产麦汁发酵产生的风味物质含量存在差异(见表8)。

表 8 同一酵母、不同培养基对酵母产生风味成分的影响 mg/L

培养基	乙醛	DMS	甲酸乙酯	乙酸乙酯	乙醇 ¹⁾	乙酸异丁酯	正丙醇	异丁醇	乙酸异戊酯	异戊醇	己酸乙酯
标-1	11.16	0.01	-	11.91	3.73	0.04	11.15	10.77	1.68	69.61	0.04
标-2	10.58	0.01	-	12.35	3.86	0.05	10.55	11.10	1.22	70.63	0.07
麦汁-1	9.77	0.03	-	13.72	3.84	0.04	12.78	10.80	1.27	66.34	0.09
麦汁-2	9.28	0.04	-	13.21	3.88	0.04	12.60	10.04	1.31	65.91	0.07

1)乙醇为质量百分比

各种风味指标分析结果为,乙醛指标:2个配制的标准培养基中乙醛含量均高于大生产麦汁发酵所产生的乙醛含量,增加幅度在1~2 mg/L之间。

DMS指标:在2个配制的标准培养基中DMS整体较低,由于啤酒发酵液中DMS含量高低主要取决于麦芽中DMS的前驱物DMSP含量高低。

甲酸乙酯指标:4个样品中甲酸乙酯均为零。

乙酸乙酯指标:4个配制的标准培养基中乙酸乙酯含量均低于大生产麦汁发酵所产生的乙酸乙酯含量,幅度在1~2 mg/L之间。

乙醇指标:2个配制的标准培养基中乙醇含量与大生产麦汁发酵所产生的乙醇含量比较接近,这表明发酵度比较一致。

乙酸异丁酯指标:4个样品中乙酸异丁酯含量比较接近。

正丙醇指标:与对照相比较,配制的培养基中正丙醇含量较低,2个配制的标准培养基中正丙醇含量均低于大生产麦汁发酵所产生的正丙醇含量,幅度在1~2 mg/L之间。

异丁醇指标:与对照相比较,配制的培养基中异丁醇含量较接近。

乙酸异戊酯指标:与对照相比较,配制的培养基中乙酸异戊酯含量较接近。

异戊醇指标:与对照相比较,配制培养基中异戊醇含量都高于对照,增加幅度在5~6 mg/L之间。

己酸乙酯指标:与对照相比较,配制的培养基中己酸乙酯含量比较接近。

就风味指标而言,与对照-大生产麦汁相比较,经过12℃恒温发酵栓发酵后测定的风味指标中,配制培养基发酵所产生乙醛与异戊醇指标稍微比麦汁发酵产生该两个指标含量高。增幅程度分别在1~2 mg/L之间与5~6 mg/L之间,其他指标相对比较接近。

2.2.3 双乙酰指标

与麦汁相比较,经过恒温12℃培养8 d后检测发酵液中双乙酰含量,检测数据表明,与麦汁相比较,配制培养基中的双乙酰含量比较接近,数据如表9所示。

示。

试验结果表明,在相同的发酵条件下,即经过恒温12℃培养8 d后检测发酵液中12种风味指标、双乙酰,以及每天采用CO₂失重法检测其利用糖的速度,配制培养基与大生产麦汁发酵的结果表明,配制培养基发酵所产生乙醛与异戊醇指标稍微比麦汁发酵产生该2个指标含量高。增幅程度分别在1~2 mg/L之间与5~6 mg/L之间,其他指标相对比较接近。

表 9 同一酵母、不同培养基对酵母还原双乙酰的影响 mg/L

培养基类型	数据	培养基类型	数据
标-1	0.10	麦汁-1	0.11
标-2	0.11	麦汁-2	0.09

表 10 重复配制培养基与大生产麦汁对酵母还原双乙酰的影响 mg/L

培养基类型	数据	培养基类型	数据
标-1	0.10	麦汁-1	0.09
标-2	0.10	麦汁-2	0.09

2.3 配制培养基的各项数据的稳定性试验

在原来配制培养基的配方的基础上重复配制浓度为11°P的培养基,配制的培养基与前次相同的大生产培养基进行测定配制培养基中氨基酸、糖类组分的试验。

相同的发酵条件下,即经过恒温12℃培养8 d后检测发酵液中12种风味指标、双乙酰,以及每天采用CO₂失重法检测其利用糖的速度,验证其稳定性与可靠性。

2.3.1 大生产麦汁与重新配制培养基中氨基酸、糖类含量

从表2、表4、表5中大生产麦汁与重新配制培养基中氨基酸、糖类含量数据表明,在固定配方的条件下,重新配制的培养基中总氨基酸、第3类氨基酸、糖类含量与大生产麦汁、第1批次配制培养基的上述指标接近,表明该配方组分具有较好的重复性。

2.3.1.1 降糖速度比较

表7的数据表明,重复配制培养基与大生产麦汁的前2天降糖、前4天降糖、前6天降糖、前7天降糖

的数据表明,重复配制培养基与大生产麦汁的降糖速度基本接近,而且重新配制培养基的2个试验平行数

据较为稳定。

2.3.1.2 风味指标比较

表 11 重复配制培养基与大生产麦汁发酵风味指标 mg/L

培养基	乙醛	DMS	甲酸乙酯	乙酸乙酯	乙醇 ¹⁾	乙酸异丁酯	正丙醇	异丁醇	乙酸异戊酯	异戊醇	己酸乙酯
标-1	9.92	0.01	0.19	12.66	4.02	0.05	10.62	10.53	1.59	70.17	0.06
标-2	9.45	0.01	0.18	12.42	3.93	0.05	10.28	9.26	1.76	79.58	0.06
对照 1	8.03	0.04	0.11	13.64	3.92	0.07	12.64	9.29	1.58	63.44	0.07
对照 2	8.37	0.04	0.14	13.94	3.96	0.07	13.85	9.65	1.89	67.7	0.07

1)乙醇为质量百分比

与大生产麦汁相比较,经过 12℃ 恒温发酵栓发酵后测定的风味指标中,重新配制培养基发酵产生乙醛与异戊醇指标稍微比麦汁发酵产生两个指标含量高。增幅程度分别在 1~2 mg/L 之间与 5~6 mg/L 之间,其它指标相对比较接近,数据如表 11 所示;而且针对检测的 12 种啤酒风味组分,该批次试验的数据与上一批次试验数据具有较好的重复性和稳定性。

2.3.1.3 双乙酰比较

与大生产麦汁相比较,经过恒温 12℃ 培养 8 d 后检测发酵液中双乙酰含量,检测数据如表 10 所示,与麦汁相比较,重新配制培养基中的双乙酰含量比较接近。

3 结 论

(1) 研究中确定了配制标准培养基所需各种组分及含量。

(2) 通过配制培养基中各种酵母代谢所需主要成分,以及比较发酵性能指标,结果表明配制培养基与大生产麦汁具有相同的发酵性能。

(3) 按照培养基的配方重新配制的培养基,开展重复性发酵实验其结果具有较好的稳定性与重复性。

参 考 文 献

1 Sandra Helena da Cruz. Structural Complexity of the Nitrogen Source and Influence on Yeast Growth and Fermentation[J].

J Inst Brew, 2002, 108(1): 54~61

2 管敦仪著. 啤酒工业手册[M]. 北京: 中国轻工出版社, 1997. 360~364

3 Patterson C A, Ingledew W M. Utilization of Peptides by a Lager Brewing Yeast [J]. J Am Soc Brew Chem, 1999, 57(1): 1~8

4 Erin E Petersen. The Effects of Wort Valine Concentration on the Total Diacetyl Profile and Levels Late in Batch Fermentations with Brewing Yeast *Saccharomyces carlsbergensis* [J]. J Am Soc Brew Chem, 2004, 62(4): 131~139

5 Casey G P, Sall C J. Use of an experimental design program to examine the influence of wort amino acids on vicinal diketones in lager fermentations [J]. Tech Q Master Brew Assoc Am, 1992, 29(4): 111~116

6 Barton S, Slaughter J C. Amino acids and vicinal diketone concentration during fermentation [J]. Tech Q Master Brew Assoc Am, 1992, 29(2): 60~63

7 Pugh T A, Maurer J M, Pringle A T. The impact of wort nitrogen limitation on yeast fermentation performance and diacetyl [J]. Tech Q Master Brew Assoc Am, 1997, 34(3): 185~189

8 Barredo Moguel L H. Comparisons Between a Commercial Wort and a Waxy Sorghum Wort Fermented into Lager Beer, with Emphasis on Yeast Growth and Ethanol Production [J]. J Am Soc Brew Chem, 2001, 59(1): 24~27

9 Dillemans M, Nedervele L Van. An approach to the mode of action of a novel yeast factor increasing yeast brewing performance [J]. J Am Soc Brew Chem, 2001, 59(3): 101~106

10 Takahashi S, Yoshioka K. Effect of wort plato and fermentation temperature on sugar and nitrogen compound uptake and volatile compound formation, [J]. Tech Q Master Brew Assoc Am, 1997, 34(3): 156~163

11 Dan Donnelly J Bergin. Kinetics of sugar metabolism a fluidized bed bioreactor for beer production [J]. Tech Q Master Brew Assoc Am, 1999, 36(2): 183~185

Study on Medium for Selecting Prominent Brewing Yeast

Wang Deliang^{1,2} Sun Junshe¹ Song Xulei² Zhang Wujiu² Feng Jingzhang³

1(College of Food Science, China Agricultural University, Beijing, 100094, China)

2(China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, 100027, China)

3(Beijing Yanjing Brewery Group Corporation Research Center, Beijing, 101300, China)

ABSTRACT A standard synthetical medium for selecting prominent brewing yeast has been made and compared with wort produced in industrial scale. Many important factors have been put into consideration to culture brewing yeast, such as the utilization rate of sugar, the reduction of diacetyl, and the components of fermentative flavor. The results show that there are no significantly different characteristics between the wort and synthetical medium. It will be more effective and accurate to select prominent brewing yeast using our standard synthetic medium.

Key words standard synthetical medium, brewing yeast, fermentative reference