

# 釀酒

啤酒釀造酵母及污染微生物

---

啤酒酵母增刊

# 啤酒酿造酵母及污染微生物

诸葛健 编著



1986年·哈尔滨

# 啤酒酿造酵母及污染微生物

## 第一章 微生物的一般知识

一 微生物的一般特性	(1)
二 几种微生物的简单介绍	(1)
三 微生物的营养	(3)
四 环境因素对微生物的影响	(5)
五 灭菌与消毒	(6)

## 第二章 啤酒酵母菌

一 啤酒酵母的性状	(10)
二 啤酒酵母的营养	(13)
三 啤酒酵母的代谢作用	(16)
四 啤酒酵母的繁殖方法	(18)
五 啤酒酵母的存活力	(18)
六 啤酒酵母的生长率	(20)
1. 温度对生长率的影响	(20)
2. 在啤酒发酵中酵母的生长	(20)
3. 在瓶装啤酒中酵母的生长	(21)
4. 酵母的致死温度	(21)
七 凝絮性	(22)
1. 凝絮性的机制	(22)
2. 凝絮性作用的控制	(23)
3. 凝絮性作用在啤酒和酒精工业上的应用	(25)
4. 凝絮性作用的分类和量度	(26)
八 啤酒酿造酵母中的各种酵母	(27)
1. 种内变种	(27)
2. 啤酒酿造酵母的突变	(27)
3. 啤酒酿造酵母变株的检出	(27)
4. 野生酵母	(28)
九 啤酒酵母的杂交育种	(28)
1. 单倍体——双倍体的生活史	(28)
2. 杂交酵母的获得	(29)
3. 啤酒酿造酵母的杂交	(30)

### 第三章 啤酒酵母的扩大培养

一	国内啤酒厂使用的酵母	(31)
二	啤酒酵母的扩大培养	(32)
	1. 供制造啤酒的酵母的选择标准	(32)
	2. 供制造啤酒的酵母的扩大培养	(33)
	3. 酵母的简易扩大培养	(35)
	4. 酵母的回收和洗涤	(37)
	5. 简易扩大培养的技术条件	(40)
	6. 扩大培养应注意的事项	(40)
三	啤酒酵母的质量鉴定	(41)
	1. 啤酒酵母生产特性的鉴定	(42)
	2. 啤酒酵母的鉴定方法	(47)
	3. 啤酒工厂野生酵母的鉴别	(49)

### 第四章 啤酒酿造中的野生酵母和细菌病害

一	啤酒的野生酵母病害	(50)
	1. 引起啤酒病害的野生酵母存在的普遍性及其特征	(50)
	2. 野生酵母检出方法	(51)
二	啤酒的细菌病害	(54)
	1. 啤酒病害细菌的特征	(57)
	2. 啤酒病害细菌的检出与鉴定	(60)
三	霉菌病害	(63)
四	啤酒厂微生物感染的预防 and 消灭	(66)

### 附：实验部分

一	显微镜的使用及维护	(69)
	实验一 酵母菌外形及细胞结构的观察	(70)
	实验二 酵母菌大小的测量	(71)
二	培养基及其制备	(71)
	实验三 无菌器皿的准备	(71)
	实验四 培养基的制备	(72)
三	啤酒酵母扩大培养及几种性能的测定	(73)
	实验五 无菌室、无菌箱的灭菌	(73)
	实验六 接种操作及酵母扩大培养	(73)
	实验七 酵母细胞计数及出芽率测定	(75)
	实验八 酵母发酵力的测定	(75)
	实验九 酵母凝聚力的测定	(76)
	实验十 死灭温度试验和死亡率的测定	(76)

# 第一章 微生物的一般知识

## 一 微生物的一般特性

### 1. 微生物在自然界中分布广、种类多

土壤、水、空气、动植物及人体中都存在着微生物，特别是土壤，具备了微生物生活所需的营养物质、水份和温度，是微生物最集中的地方，其数量最大，种类最多。

目前已发现细菌一千多种，真菌几万种，放线菌五百多种。

### 2. 微生物繁殖速度快

微生物具有极高的繁殖速度，如酵母菌在10℃、9.2小时或20℃、3.5小时，就能成倍繁殖。产生丙酮和丁醇的梭状芽孢杆菌，在适宜的条件下，二十分钟即可成倍繁殖。

### 3. 微生物易于人工培养

在营养成份、培养条件合适的情况下，可以培养出我们所需要的菌种。

微生物在液体培养基上比在固体培养基上生长更快。啤酒酵母的扩大培养，就是在液体培养基中进行的。

### 4. 微生物较易发生变异

在环境剧烈变化时，微生物大多数个体细胞，易于死亡而被淘汰，个别个体细胞变异而适应新的环境。利用这一特性，人们可以有目的地控制一定条件，进行人工育种和定向变异。

## 二 几种微生物的简单介绍

### 1. 酵母菌

酵母意即“发酵之母”。是人们描写发酵现象时，放出二氧化碳形成泡沫，像沸腾那样而得出的名字。酵母菌是工业上应用较早的一类微生物，如酿酒、酒精、面包等的生产。近年来，它又应用于酶制剂、石油脱蜡及糖化饲料发酵等方面。因为酵母细胞含有丰富的营养和多种酶，所以又是医药、食品工业的重要原料。如酵母片、辅酶甲、细胞色素丙等。

酵母菌一般在含糖汁较多之处多，宜于偏酸性条件下生长。在葡萄、苹果等果实和花叶上，往往存在酵母菌。

酵母菌是不能运动的单细胞低等植物。其个体细胞形态有球形、卵圆形、椭圆形、腊肠形。酵母细胞大小通常为 $2.5 \sim 10 \times 5 \sim 21$ 微米（1微米=千分之一毫米）。每一种酵母菌的形状，随培养基成份的改变及菌龄不同而有所差别。

微生物在固体培养基上形成肉眼可见的菌群，称为菌落。酵母菌落一般表面光滑、湿润、粘稠，呈乳白色、乳黄色，少数呈红色。有时酵母菌因培养时间长，菌落呈皱缩

状。

酵母菌能利用糖类、醛类、烃类、有机酸、盐类、甘油以及低浓度酒精为碳素养料，不能直接利用多糖，如淀粉、纤维素等。多数酵母不能利用硝酸盐和尿素。铵盐及某些氨基酸是良好的氮素养料。

酵母菌能进行发酵作用。在缺氧情况下，将糖变成酒精、二氧化碳和水；但在有氧情况下发酵最始产物是二氧化碳和水。

## 2. 细菌

细菌是一类比酵母菌更小的微生物，有的细菌即使借助普通显微镜也看不到。它在自然界种类繁多。它的利用范围正在日益扩大，在食品、纺织、医药、农药、化肥、化学、石油等工业生产上，起着越来越大的作用。但也有不少细菌是人和动植物的致病菌。

细菌的菌落形态、大小、色泽、透明度、粘稠度、表面光滑情况、湿润情况以及边缘是否整齐等，随细菌的种类不同而异。

细菌是单细胞低等植物。其细胞有球状、杆状及螺旋状等。通常细菌细胞只有1~4微米，要用1000倍的显微镜才能看得到。

细菌以裂殖的方式进行繁殖，即一个分裂成两个、两个分裂成四个地不断繁殖。

球菌依分裂后细胞排列不同，又可分为单球菌、双球菌、链球菌、四联球菌、八联球菌和葡萄球菌。

杆菌细胞形态也是多种多样的，有呈短杆、鼓棒状、梭状、纺锤状、园柱形、椭圆形的；有的有芽孢，有的无芽孢；有好气性的，有嫌气性的，有的介于两者之间。

螺旋菌以细胞弯曲程度又分为弧状菌、螺旋菌、螺旋体。

细菌由细胞壁、细胞质膜、细胞质、细胞核构成，有的细菌有荚膜、鞭毛、芽孢。

细菌细胞一般在100℃沸水内，10分钟就死亡；而芽孢在湿热加压的情况下，则要到120℃以上，15分钟才能杀死。

啤酒生产中几种有的害细菌见附录二。

## 3. 霉菌

这类微生物人们习惯称为“霉”，可以叫霉菌。它是工农业生产上极为重要的一类微生物，在农业、医药、化学、纺织、食品和皮革等方面已广泛应用。

土壤中有大量霉菌存在，空气中也常有霉菌的孢子飞扬，它对啤酒和麦芽制造，都是有害的。

霉菌菌落形态是绒毛状或疏松的棉花状，孢子具有各种颜色。

霉菌的菌体是由许多菌丝组成的菌丝体。单个菌丝是由不分横隔的单细胞或有横隔的多细胞组成园筒状的结构。霉菌菌丝宽度与酵母菌差不多，细胞结构也相似，它们都属于低等植物中的真菌。

霉菌菌丝分成两类，一类伸入培养基内，称营养菌丝，一类伸入空气中，称气生菌丝。气生菌丝的一部分，可产生各种孢子进行繁殖。其繁殖有有性和无性两种方式。

霉菌生长的第一阶段，是菌丝遍布营养物上。第二阶段形成孢子，借助空气流到处飞扬。因此，麦芽制造过程中，往往由于发芽温度过高而长霉，给啤酒带来不愉快

的气味。因为啤酒中缺乏氧气，霉菌不能在其中生长。在潮湿的墙壁、器具、酒桶、渗漏啤酒残渍上，或在暴露于空气中的酵母上，都可能有霉菌菌丝存在，这标志着严重的杂菌感染。

啤酒厂常见的霉菌有青霉、酒花毛霉、黑根霉、黄曲霉、黑曲霉、灰绿曲霉等。

#### 4. 放线菌

放线菌一般在土壤中分布较多，是抗菌素生产的主要菌。迄今已知的抗菌素中，约有三分之二是放线菌产生的。

放线菌在碱性土壤中较多，在啤酒生产中很少见到。

### 三 微生物的营养

一般微生物的菌体构造都很简单，既不象高等动物具有消化器官，也无特殊的摄取食物的构造，全部由菌体表面的扩散作用摄取营养。由于微生物的种类不同，生长、发酵过程中，所需的营养种类和数量亦不相同。但各类微生物对营养的吸收和利用以及组成细胞内有机物的方式，却有很多相似之处。

#### 1. 微生物的基本营养

因为微生物合成细胞所需要的元素和组成代谢产物的元素，皆需从外界获得，只要分析了微生物细胞的化学组成和代谢产物的化学组成，才能知道微生物在生长代谢中，需要什么物质。

微生物细胞中的主要物质含量如下表：

化学组成成分		细 菌	酵 母 菌	霉 菌
水份		80~85%	75~80%	70~80%
干 物 质	蛋 白 质	80%	40~60%	20~40
	碳 水 化 合 物	4%	25%	20%
	脂 肪	5~7%	4%	8~40%
	灰 份	10%	7~10%	7%

#### (一) 水份

由上表可见，水份在微生物细胞中含量很大。微生物的营养物质必须溶于水，才能通过细胞表面而被吸收，其代谢产物也只有溶于水，才能排出体外。因此，水除了微生物细胞的组成外，还是一系列生化反应的介质。因此说微生物离开了水，生命活动也就停止。

#### (二) 碳水化合物

碳水化合物是构成菌体成分的重要成份之一，也是产生各种代谢产物和细胞贮藏物质的主要原料。碳水化合物主要是指淀粉质原料和糖类原料，还有纤维素、有机酸、醇类等。酵母菌利用的碳源主要是单糖（葡萄糖，果糖）和双糖（麦芽糖，蔗糖），少数

酵母能利用麦芽三糖和棉子糖。麦芽汁中含有丰富的麦芽糖，是啤酒酵母良好的碳源。

### (三) 氮源

氮是构成微生物细胞蛋白质和核酸的主要元素，而蛋白质和核酸是微生物原生质的主要成份，也是微生物能源之一。

氮源分有机氮源和无机氮源，微生物的种类不同，对氮源的要求也不同。酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、豆饼粉、花生粉等都是有机氮源，而氯化铵、硝酸铵、硫酸铵等则为无机氮源。麦芽汁中含有易被啤酒酵母可同化的氮源，如氨基酸等；因此以麦芽汁培养酵母，不需另加其它氮源。

### (四) 无机盐

无机盐类是微生物生命活动不可缺少的物质。主要功能是构成菌体和酶的组成成份，调节培养基的渗透压、pH值、氧化还原电位和酶的作用等。微生物对无机盐的利用，种类很多，但量均较少，其中又分主要元素和微量元素。主要元素有磷、硫、镁、钾、钠、钙等，麦芽汁中含有较丰富的无机盐类，因此啤酒酵母以麦芽汁作培养基时，不需要外加无机盐。

### (五) 生长素

有些微生物在水份、碳水化合物、氮源、无机盐均不缺少的情况下，仍然不能生长或生长不好，但如加入少量麦芽汁或酵母浸出液等就生长很好。这是因为上述物质中，含有微生物本身所不能合成的特殊营养物质，一般称生长素或生长因素，如某些氨基酸、维生素，组成核酸的嘌呤、嘧啶碱等。大多数生长素是辅酶的组成成份，没有这些生长素，酶就不能作用。麦芽汁中含有丰富的生长素，因此培养啤酒酵母时，用麦芽汁作培养基同样无需外加生长素。

## 2. 培养基的种类和选择

培养基有自然培养基、合成培养基及半合成培养基三种。按培养基的外观形状，可分为固体培养基、液体培养基及半固体培养基；按用途可分为基础培养基、选择培养基、增殖培养基和鉴定培养基。

培养基选择可根据以下几个原则：

### (一) 从微生物的种类来选择培养基的成分

不同类型的微生物，所需要的培养基成份不同。酵母菌和霉菌都是真菌，所用的培养基成份较一致，一般实验室里用的自然培养基有麦芽汁、米曲汁等。而细菌一般在氮源较丰富的条件下生长良好，因此实验室常用牛肉膏、蛋白胨添加部分盐类配成的培养基。

另外，各种微生物生长的最适氢离子浓度 (pH) 不同。酵母和霉菌在偏酸性下生长较好，大多数细菌宜在中性或偏碱性下生长。

### (二) 生产上培养基的选择

用实验室所用的培养基进行大规模的生产，往往是不可能的，如实验室培菌采用葡萄糖作碳源，生产上则不可能以大量的葡萄糖作为原料，往往以淀粉的水解液来代替。生产上的培养基选择的标准是来源广、成本低，并应考虑节粮代粮。

### (三) 液体培养基与固体培养基的选择



液体培养基便于微生物对营养的吸收和利用，生产上进行种子繁殖和发酵，一般都采用液体培养基。

有时为了分离和保藏菌种，观察菌落特征及鉴定微生物，在液体培养基中加一定量的凝固剂，便成为固体培养基。

常用的凝固剂有琼脂和明胶两种。琼脂是由海藻提取的多糖物质，微生物不能利用它作为营养物质，其溶解点为 $100^{\circ}\text{C}$ ，凝固点为 $40^{\circ}\text{C}$ ，室温下成为固体。一般使用量为 $1.5\sim 2\%$ 。

另外，在实际工作中，还可以从生产实践和科学实验的不同角度，选择不同的培养基。

## 四 环境因素对微生物的影响

微生物和其他生物一样，不能离开所处的环境而生存。外界环境一旦有所改变，常常影响微生物的生命活动或抑制其生长与繁殖，甚至可以杀灭。

影响微生物生长发育的外界环境，总的可以分为物理因素、化学因素、生物因素三大类型。

### 1. 物理因素对微生物的影响

#### (一) 温度对微生物的影响

温度不仅决定微生物生长是否旺盛，并且还决定其能否生长。每一种微生物的生命活动，都在一定温度范围内，超出这个范围，往往生命活动就中断。通常把微生物的温度范围分为三个等级，即最低温度、最适温度和最高温度。酵母菌的最适温度为 $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。

高温与低温，对微生物的影响是很不同的。高温能使微生物致死。在10分钟使微生物死亡的最低温度，称微生物的热死点，通常称死灭温度。酵母菌的热死点为 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ ，啤酒酵母的死灭温度是 $48^{\circ}\text{C}\sim 52^{\circ}\text{C}$ 。

微生物的热死点不是固定不变的，它受细胞中水分含量、培养基的成份和酸碱度(pH)、细胞年令、有无芽孢及细胞数等因子影响，而有所变动。

低温下微生物虽然可能死亡，但大多情况下，只是暂时停止活动。

#### (二) 光线对微生物的影响

一般微生物生长均不需要光线，直射的日光可杀死大多数微生物。日光的杀菌效果，主要是由于日光中所含的紫外线的作用。

紫外线和 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 射线都有抑菌和杀菌的作用。因而，人们常用紫外线及上述射线进行微生物的人工诱变和育种工作。

#### (三) 干燥和压力的影响

微生物细胞的水份被干燥后，就不能生长和繁殖，工业上用真空冷冻干燥法长期保存菌种，就是这个道理。

压力一般对微生物影响不大，但特高的压力下，也能造成微生物的死亡。

#### (四) 电流和声波的影响

一般电流对微生物影响不大，只有超短波电流，能杀死微生物，高频振荡杀菌正在研究中。

声波一般对微生物影响也不大，只有超声波才能影响微生物的发育，直至死亡。超声波杀菌和育种工作已有报导。

### (五) 通风、搅拌对微生物的影响

通风不但可以供给微生物生长所需氧气，而且还可使妨碍微生物生长的挥发性代谢产物除去，同时通风还能影响微生物的代谢产物。液体培养时，通风又起搅拌的作用。

搅拌及振荡，均可促进微生物的繁殖，为现代微生物学的深层培养所必需的操作。但长时间的强烈搅拌，则会使微生物细胞受到破坏。

## 2. 化学因素对微生物的影响

### (一) 氢离子浓度 (pH值) 的影响

培养基中的氢离子浓度，对微生物的生命活动、营养物质的吸收以及微生物细胞中的酶的作用等，都有很大的影响。不同的微生物的最适pH值都不相同 (见下表)。

微生物名称	最低pH	最适pH	最高pH
酵母菌	2.7	4.50~5.0	8~9
细菌	4	6.5~7.5	10
霉菌	1.5	4~6	11
放线菌	5	7~8	10

所以在制备培养基时，必须调整pH值。同时利用pH值，可以控制我们所不需要的微生物生长。

pH值的不变，可以改变微生物的代谢产物。如当pH值高于8.0时，酵母菌发酵的产物将是醋酸和甘油。

### (二) 化学药品对微生物的影响

化学药品对微生物的影响，主要决定于这些物质在溶液中的浓度。在浓度低时，某些化学物质能够促进微生物的生长繁殖，如有些培养基中添加氯化钠作营养盐；但当到一定浓度时，则往往抑制微生物生长，甚至能起杀菌作用，如生理盐水 (1%氯化钠)，可作消毒用。

但很多化学药品对微生物有毒性，能杀死微生物。如石炭酸、甲醛、升汞、漂白粉、酒精、碘、龙胆紫等，工业上和医疗卫生上，常用这些药品作消毒剂。

## 五 灭菌与消毒

灭菌是用加热或过滤的方法，或其他物理的、化学的方法，杀死或者除去环境中的一切微生物，包括它们的孢子。只杀死病原菌的方法或作用叫消毒。一般消毒剂常用的浓度，不能杀死芽孢。灭菌和消毒要根据不同对象，采用不同的方法。

### 1. 加热灭菌法

各种微生物都由蛋白质组成，加热灭菌可以使蛋白质凝固，从而达到杀死微生物的

目的。

### (一) 干热灭菌法

此法可以直接利用火焰把微生物烧死，灭菌既彻底又迅速，但使用范围有限。常用于接种环、载玻片、试管口等的灭菌。

不能用火焰灭菌的物品，则利用热空气灭菌，把要灭菌的物品放在烘箱中，逐步升温加热到 $140\sim 160^{\circ}\text{C}$ ，维持 $2\sim 3$ 小时，即可达到灭菌的目的。因为一般微生物菌体在 $100^{\circ}\text{C}$ 下干热 $1\sim 2$ 小时即被杀死，芽孢在 $140^{\circ}\text{C}$ ，干热 $2\sim 3$ 小时亦可被杀死。实际工作中常采用 $145^{\circ}\text{C}$ ，维持 $2\sim 3$ 小时。但杀菌温度不能过高，以防棉塞焦化。

### (二) 湿热灭菌法

培养基和一些不宜干热灭菌的物品，采用湿热灭菌。在相同温度下，湿热灭菌效果高，这是因为蒸汽穿透力强的缘故。另外，各种微生物都是蛋白质组成的，蛋白质含水量越大，加热时越容易凝固，这是湿热灭菌效果高的另一个原因。

#### (1) 加压蒸汽灭菌法

加压蒸汽灭菌，是生产上常用的一种灭菌法。其杀菌效果好，使用较为普遍。

高压灭菌的主要原理是：以提高压力的办法，来提高水的沸点，在高温高压的条件下，短时间可将微生物杀死。水的沸点与大气压力有关，当大气压力低时，水的沸点也就低，如青藏高原大气压力低，水温不到 $100^{\circ}\text{C}$ 就沸腾了；反之，当大气压大于一个绝对大气压时，则水温应到 $100^{\circ}\text{C}$ 以上才能沸腾。例如气压达到 $1$ 公斤/厘米<sup>2</sup>时，水温 $121^{\circ}\text{C}$ 才能沸腾。

实验室常采用 $0.5\sim 1$ 公斤/厘米<sup>2</sup> 30分钟灭菌。啤酒酵母的培养基含丰富的糖类，高高温压往往使营养成分破坏，一般采 $0.5$ 公斤/厘米<sup>2</sup> ( $112^{\circ}\text{C}$ ) 恒温30分钟。

高压灭菌锅是一种能够耐压并可密闭的金属锅，有手提式、立式、卧式等不同的形式。其热源可用蒸汽、煤气、电热，也可用直接火加热。构造完善的高压灭菌锅，设有压力表、安全阀、水位表、排气排水门等。

灭菌操作与注意事项：

① 加水：加入的水最好用煮开的热开水，这样可以减少水垢在锅底内的积存。加水量以水位表上的横线为准；

② 将需灭菌的物品装入锅内，灭菌时，装有培养基的器皿之棉塞等，都先用牛皮纸或硫酸纸包好，写个标签，这样可以防止棉塞被冷凝水浸湿；

③ 需灭菌的物品放好后，关闭锅盖，并打开排气阀门；

④ 点燃热源。如果是用蒸汽，则应慢慢打开蒸汽进口，不要让蒸汽猛地冲入锅内；

⑤ 排冷气。水沸腾后，灭菌锅内逐渐充满蒸汽并将冷空气排除。冷空气必须排尽，否则压力表上所指示的压力并不代表真正的压力。如果灭菌锅上装有温度计，当温度升至 $100^{\circ}\text{C}$ 时，即证明锅内冷空气已排尽，若没有温度计，则待排气口有大量热蒸汽冲出时，便可关闭排气阀门。

⑥ 灭菌30分钟。如压力逐渐上升至 $0.5$ 公斤/厘米<sup>2</sup> (温度 $112^{\circ}\text{C}$ ) 或 $1$ 公斤/厘米<sup>2</sup> (温度 $121^{\circ}\text{C}$ ) 维持30分钟。要经常注意压力，使压力保持恒定。灭菌时间满足后，关闭热源；

⑦ 待压力表降至“0”时，打开排气阀。应注意不能过早打开排气阀，以免降压太快，而不能同时降温，造成培养基沸腾起来，使棉塞沾污，甚至冲出容器之外；

⑧ 打开灭菌锅，取出已灭菌的材料；

⑨ 放出余水。但不得重新关闭锅盖。

### (2) 间歇常压灭菌

此法是利用常压三次蒸煮而达到灭菌效果的方法。培养基不适于用高压灭菌法时常用此法。有的工厂无高压灭菌器，也可采用间歇常压灭菌法。这种方法不适用于缓冲液、生理盐水等的灭菌。

将欲灭菌的物品，放入笼屉或锅中，蒸或煮沸1小时，以杀死营养细胞。然后放入37℃恒温箱培养24小时，使细菌芽孢萌发成营养体，再进行灭菌，如此连续三次。

### (3) 低温消毒法

有些食品不能耐高温，需要采用低温消毒的方法。低温消毒，是将物质放在60℃保持30分钟，将微生物营养细胞杀死，此法称巴斯德杀菌法。瓶装啤酒的杀菌就是这个方法。为了保证酒液达到60℃，所以一般采用62℃杀菌。

湿热灭菌除上述三种外，最常见的煮沸，也是一种湿热灭菌。

## 2. 过滤灭菌法

细菌细胞有一定大小，可以用一些比细菌细胞直径小的多孔物质来过滤细菌。如啤酒厂洗酵母的水，就是经砂滤棒滤过的水，称为无菌水；喷淋冷却室和酵母添加槽中通入的空气，也是用过滤法灭菌的，称无菌空气。

## 3. 紫外线灭菌法

微生物的营养细胞吸收紫外线后，蛋白质和核酸发生变化，以致引起死亡。细菌的芽孢经一定时间的照射，也可以致死。紫外线具有很强的杀菌作用，波长在2000~3000埃，均有杀菌作用。常用的紫外灯波长为2527埃。

紫外线不能透过玻璃，所以紫外灯管是用特制的石英玻璃制成的。

紫外线灭菌，常用于无菌室、缓冲室的空气杀菌。紫外线穿透能力差，所以它常与化学药剂配合使用。

## 4. 化学药剂消毒法

有些化学药品，对微生物有很强的杀伤作用。根据药剂浓度的不同，可以起抑制或杀死微生物的作用，最常用的有以下几种：

(一) 氧化剂 微生物细胞内容物可被氧化剂氧化，从而使微生物生长受到抑制或被杀死。

① 高锰酸钾：是一种常用的消毒剂，0.1%高锰酸钾可用作水果、饮具、皮肤的消毒。

② 卤族元素：氯气或其他卤族元素，对微生物毒性很强。百万分之一的氯气是自来水的清洁剂。其他卤素如碘与碘化钾，常用作皮肤的消毒剂。

③ 双氧水：一定浓度的过氧化氢，用于伤口消毒及防止厌氧菌的感染。

④ 漂白粉：0.5~1%漂白粉，可用于地面、墙壁以及发酵罐和管路的杀菌。

(二) 硫磺熏蒸法 将硫磺粉沾在毛线或纸上，直接点着火燃烧，此时硫磺以雾状散布于空气中。硫磺粉燃烧产生二氧化硫，二氧化硫与水作用，则生成亚硫酸，当亚硫酸附着在菌体细胞后，夺取细菌细胞中的氧，形成硫酸，微生物细胞脱氧后，则造成死亡。

后酵室、后酵罐的灭菌，常用硫磺熏蒸法。硫磺粉的用量为2~3克/米<sup>3</sup>。

二氧化硫有毒性，燃烧时人要离开。

(三) 有机化合物 有些有机化学药剂使蛋白质凝固变性，因此可以用于灭菌。

① 酒精：它能使微生物的蛋白质脱水变性，破坏细胞。杀菌用酒精浓度为70~75%。浓度太高，会使细胞表面迅速凝固，形成一层薄保护膜，妨碍酒精继续进入细胞内部，从而降低了杀菌效果。浓度太低达不到杀菌效果。

一般做手术或器具表面消毒，常用酒精。在进入无菌室操作前，手部与器具必须用酒精杀菌，保证无菌操作安全进行。

② 石炭酸(苯酚)：能使微生物蛋白质发生变性或沉淀。50%的石炭酸水溶液，能杀死细菌的营养体，而芽孢致死时间应长一些。常用于培菌室桌子、地面和玻璃器皿的表面擦拭消毒。一般器皿在石炭酸中浸泡24小时，即可灭菌。

③ 皂酚：又称来苏尔。效果比石炭酸大3~4倍，用途与石炭酸同。

④ 甲醛液：36~40%甲醛水溶液叫福尔马林。它能使蛋白质变性，有很强的杀菌作用。10%的福尔马林是常用的防腐剂，生产和科研上常用来熏蒸消毒接种室。其方法是以火加热甲醛使其挥发。还可以在装有甲醛的容器中，加入少量高锰酸钾(甲醛重量的1%以上)，使之放出雾状气体。但熏蒸后，应停留24小时以后再行。甲醛用量为10毫升/米<sup>3</sup>。

如果甲醛味太大，可以洒少量氨水中和。甲醛与氨生成一种复杂结构，叫做环六亚甲基四胺(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>N<sub>4</sub>。

另外，5%甲醛可以用做无菌箱和保温箱的杀菌剂。2%甲醛常用于输酒管道杀菌。

⑤ 季胺盐(新洁尔灭)：它是一种表面活性剂，既有杀菌作用，又有去垢洁净作用。把5%的原液稀释成0.25%溶液，常用于皮肤及器具的消毒。

(上接第76页)

(3) 方法

取0.1%美兰1滴，置于清洁的载玻片中央，再取发酵液少许与美兰混合，加一盖玻片，再用高倍镜观察细胞着色情况。活的不着色，死的变兰色。并计算死细胞占总细胞的百分率：

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死细胞数}}{\text{总细胞数}}$$

化实验室培养的酵母，死亡率一般在1~3%，车间大生产回收的酵母，死亡率不得超过5%，超过这个数值则说明酵母已衰老，应予以淘汰。

## 第二章 啤酒酵母菌

### 一 啤酒酵母的性状

#### 1. 啤酒酵母的形态

啤酒酵母是一种极微小的单细胞植物，一般呈圆形、卵圆形或椭圆形，细胞的大小为  $3 \sim 7 \times 5 \sim 10$  微米，人工培养的啤酒酵母平均直径为  $4 \sim 6$  微米。

啤酒酵母在麦汁固体培养基上呈乳白色的菌落，不透明，但有光泽，表面光滑、湿润，边缘比较整齐，随着培养时间的延长，菌落光泽逐渐变暗。啤酒酵母在麦汁液体培养基中，在发酵过程，液体表面产生气泡和泡沫，由于菌体悬浮在培养基中而呈混浊状态。发酵后期，有的酵母细胞悬浮在培养基的液面，形成一厚层，多为上面啤酒酵母；有的沉积于器底，多为下面啤酒酵母。

#### 2. 啤酒酵母的结构

啤酒酵母细胞在显微镜下观察，具有细胞壁、细胞膜、细胞质、液泡、颗粒和线粒体等。它的结构如图 2—1。

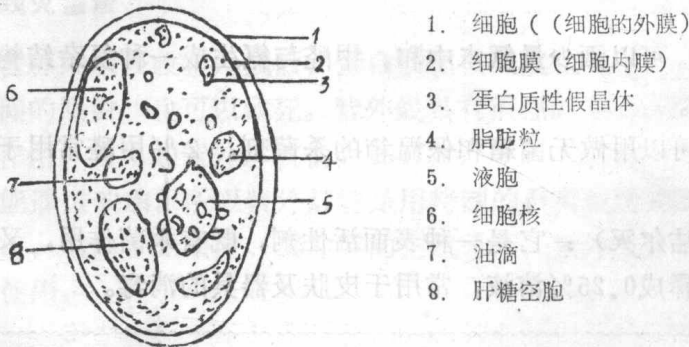


图 2—1 啤酒酵母的结构

#### (一) 细胞壁

啤酒酵母的细胞壁在年幼时并不太明显，甚至于看不出来，细胞衰老时，细胞壁逐渐增厚。在现场常利用细胞壁的厚薄鉴定酵母的性质，细胞壁薄的是强壮酵母，厚的是衰老酵母。细胞壁的主要成分是纤维素和多糖物质。

#### (二) 细胞膜

在细胞壁的里面有一层细胞膜，厚度只有150纳米，主要用来摄取周围环境的养分，并将细胞的代谢产物排出体外，细胞膜具有半渗透性，使细胞营养和发酵必需的物质——糖、无机盐、低分子氧化合物等，都能通过细胞膜进入细胞内，并使代谢产物——酒精、 $\text{CO}_2$ 、酸、酯等排出细胞外，但对高分子蛋白质不具有渗透作用。死细胞的细胞

膜染料可以渗入，利用美兰检查死细胞呈兰色，就是这种特性。

啤酒酵母凝集的形成与细胞膜的组成有关。

### (三) 细胞核

啤酒酵母细胞内容物的主要成分是原生质，原生质中最主要成分是细胞核，大小约0.5~1.5微米，不易看到，染色后可以观察到。细胞核外有核膜，内含有核仁和染色体。在幼细胞中核呈圆形，是很小的质点，存在于细胞膜的中心。老细胞由于液泡的增大，核被挤到一边，呈肾形。

细胞核内含有脱氧核糖核酸，是酵母遗传变异的主要物质基础，在酵母繁殖和遗传上起着非常重要的作用。当酵母出芽时，细胞核就移向顶端，而后分裂，移向新细胞。

在用显微镜检查时，可以看到原生质，它是灰白色细粒状和半流动的物质组成的，这些物质可能是清蛋白类物质和盐类溶液均匀混合而成。

### (四) 液泡

液泡也有称为空泡的，大多数卵圆形啤酒酵母只有一个液泡。幼细胞的液泡不太明显，在酵母细胞衰老或缺乏营养时，液泡逐渐扩大。液泡是贮藏食物的处所。在镜检时，由于澄清透明，而称为空泡。用染色的办法可以区分细胞核和空泡，细胞核可被染色，而空泡则不能染色。

### (五) 颗粒

啤酒酵母细胞中的颗粒是贮藏营养物质和细胞的代谢产物的，包括异染色颗粒、肝糖和脂肪粒等。

异染色颗粒中含有较多的核糖和核酸化合物，主要为核糖核酸。当幼细胞生活力强时，消耗多，不易积累，含异染色颗粒较少，但老细胞中积累较多。

肝糖也是酵母的贮藏物质，在繁殖旺盛时的幼细胞中很明显，一般酵母培养48小时，含量可达到高峰，大都存在于液泡周围，可用碘化钾染成棕色。

脂肪颗粒分散于细胞中，大小不等。当酵母形成子囊孢子时，细胞内含脂肪颗粒最多，可作为子囊孢子的营养物质。脂肪颗粒可用苏丹溶液染成红色，加热则又复原，含量多在10~30%之间，发酵时供给充足的氧气和糖类，则随发酵时间而增加；发酵温度提高时，含量也会增加。在酵母贮藏期间，温度高时比低时消耗的多，在贮藏期间将发生自溶，肝糖的消耗为0~30%。

酵母细胞中尚含有酵母胶3~9%，其含量则随肝糖的减少而增加，酵母自溶时，酵母胶可渗入发酵醪中，增加泡沫的持久性。

酵母中的颗粒主要存在于酵母细胞的原生质中。

### (六) 细胞质

细胞质也可称为原生质。细胞质充满于细胞内，它是由蛋白质类物质、类脂化合物和各种有机物的复合体所构成。因此，它的分子量较大，大多悬浮在水中，呈胶体状态。在活细胞的细胞质中水分占75~85%，干物质占15~25%，这些物质随培养时间的长短而变化。当酵母细胞发育时，细胞质的变化很大，幼细胞的细胞质浓缩而均匀；衰老的细胞细胞质中出现了许多颗粒和液泡。

### (七) 线粒体

线粒体的直径为0.2微米，一般是看不到的，形状随培养条件而改变。在氧气充分

时，线粒体均匀分布在细胞质内；在厌氧条件下，线粒体粘附成厚囊，分布在细胞周围。线粒体内含有大量的酶，它们在线粒体制备、积累和分配细胞能量方面起着重大作用。

### 3. 啤酒酵母的成分

啤酒酵母细胞的化学成分是由碳、氧、氮和各种矿物质所组成，其中90~97%为有机物质，3~10%为无机成分。但由于酵母种类、培养基的不同，发酵时间、温度和酸度的差异，以及酵母生理状态的变化，因而酵母的成分很不一致。它的成分如表2-1。

表 2-1

成 分	100克无水酵母中的含量 (%)
蛋白质	45~55
碳水化合物	25~35
脂 肪	2~10
灰 分	4~8

组成酵母细胞绝大多数是有机物，组成细胞的细胞壁、细胞质、细胞核等。有机物中的蛋白质是组成酵母细胞质的基本物质，在细胞中蛋白质和其它物质结合在一起，成为结合蛋白质，如：与核酸结合成核蛋白，与脂肪结合成脂蛋白，核蛋白以颗粒状态分散在细胞质内，在蛋白质合成方面起重要作用，约占细胞蛋白质的 $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ ，细胞核内则较少。脂蛋白是组成细胞膜、线粒体的基本成分。

啤酒酵母中主要有机物含量如表 2-2。

表 2-2

成 分	100克无水酵母中的含量 (%)
蛋白质	32~75
核 酸	6~8
碳水化合物	27~63
脂 肪	2~15

啤酒酵母的灰分，主要是无机盐类，是各种金属元素盐类，含量极微又称为微量元素，占灰分的百分数如表 2-3。

表 2-3

金属的氧化物	占灰分的%
五氧化二磷 ( $P_2O_5$ )	51.09
氧化钾 ( $K_2O$ )	38.66
氧化钠 ( $Na_2O$ )	1.82
氧化镁 ( $MgO$ )	4.16
氧化钙 ( $CaO$ )	1.69
氧化铁 ( $FeO$ )	0.06
二氧化硅 ( $SiO_2$ )	1.60
三氧化硫 ( $SO_3$ )	0.57



啤酒酵母细胞中尚含有较多的维生素，主要是水溶性的B族维生素，可作为B族维生素的来源。B族维生素是各种酶活性的组成部分，对啤酒酵母的生理活动非常重要。

啤酒酵母细胞中所产生的维生素，以结合状态或游离状态分离于体外。各种维生素含量如表2—4。

表2—4

维 生 素 名 称	含 量 (微克/克)
胆 碱	4850
胆 醇	2700~5000
硫 胺 素 (B <sub>1</sub> )	50~360
核 黄 素 (B <sub>2</sub> )	36~42
泛 酸 (B <sub>3</sub> )	40~200
菸 酰 胺 (B <sub>5</sub> )	25~100
吡 哆 素 (B <sub>6</sub> )	25~100
叶 酸 (B <sub>11</sub> )	19~30
对氨基苯甲酸	9~102
生 物 素	0.8~1.1

#### 4. 啤酒酵母中的酶

酶对于一切生命活动具有巨大的意义，它最基本的特征是对生物和它周围环境间的新陈代谢。生物的新陈代谢表现为：由外界摄取本身所需要的物质，同时把这些物质改变成本身所需要的物质，而后组成本身，本身又排泄出一些物质于体外。因此，新陈代谢是活动的基础。

啤酒酵母细胞中的酶，是促进细胞内的各种化学变化、生活作用和发酵作用的物质。它存在于细胞质中，只起催化作用，而不参与化学由应。

酶是酵母细胞产生的有机体，具有蛋白质本性和特殊催化能力，酶是强有力的催化剂。

啤酒酵母中的酶活动表现在细胞内的称为内酶；由细胞中分泌到周围培养基中，并能在细胞外发挥作用，称为外酶。

啤酒酵母中酶的种类很多，它们的性质和作用如表2—5。

## 二 啤酒酵母的营养

啤酒酵母细胞的生命活动需要适当的营养、适宜的温度和充足的空气等条件。营养物质包括水分、碳水化合物、氮素化合物、矿质化合物和生长素等。

### 1. 水

水是啤酒酵母生长必需的物质，如细胞吸收营养物质、排泄代谢废物和细胞体内各种生化反应都需要通过水的协助才能实现。水是细胞质的结构成分，并直接参加代谢作