

发·酵·新·技·术·丛·书

啤酒发酵进展

戴仁泽 编著

pijiüpijiüpijiüpijiüpijiü

轻工业出版社

83.6231

312

2.1

发 酵 新 技 术 丛 书

啤 酒 发 酵 进 展

戴仁泽 编著

31228 / 05

轻 工 业 出 版 社

内 容 简 介

本书概要地介绍了国外啤酒发酵的进展情况。重点说明啤酒发酵新工艺、新设备的特点，同时阐述了采用新工艺、新设备的有关理论。比较详细地说明了影响啤酒风味的物质的形成机理。本书内容丰富，材料较新，反映了国外七十年代啤酒工业的动态。

本书可供从事啤酒工业的技术人员、科研设计人员及技术人员阅读。也可供大专院校有关专业师生参考。

发酵新技术丛书

啤酒发酵进展

戴仁泽 编著

轻工业出版社出版

(北京阜成路 3 号)

轻工业出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

787×1092 毫米 1/32 印张: $6\frac{25}{32}$ 字数: 150 千字

1985年 5 月 第一版第一次印刷

印数: 1—14,000 定价: 1.45元

统一书号: 15042·1899

前 言

啤酒是一种饮料酒，同时也是一种营养食品。世界各国对啤酒的需要量很大，而且出现一种不断地增长的趋势。为了满足日益增长的需要，古老的传统的生产方式已被近代的先进的技术所取代。

近年来，由于啤酒发酵方面的基础理论被逐步探明，啤酒发酵技术取得了长足的进展。

啤酒发酵中最本质的问题是啤酒酵母的生理代谢。啤酒生产的质量和产量都和酵母的特性有密切的关系。分子生物学及分子遗传学的进展促使啤酒酵母的研究已经深入到基因分析的水平。国外正在探索采用诱变、杂交等方法获取新的优良的酵母菌种。虽然仍有些问题尚待解决，但前景是有希望的。

随着啤酒发酵工艺的大型化、连续化，对微生物的检验方法提出了新的要求。出现了一些新的快速而准确的检验方法。

由于较为深入地掌握了啤酒发酵机理，发酵工艺条件被刷新，啤酒发酵的时间大为缩短。大型锥形罐的出现，使啤酒厂能够建百万吨的规模。塔式发酵设备的问世，塔式连续发酵工艺的应用，使生化工程新增了活塞式流动发酵方面的内容。影响啤酒色香味的组成成分的阈值及其在发酵时的生化合成途径的研究日益被重视，并取得了显著的成果。更值得

注意的是已经开拓了新的研究领域——发酵动力学方面的研究。而固定化酵母的连续发酵则又是一个新的动向。

本书概要地介绍了七十年代国外啤酒发酵方面的进展情况。由于啤酒发酵的内容涉及很广，因之不可能包罗万象，主要侧重点在于引进新的工艺及新的理论，供从事啤酒工业及其他酿酒工业的科技工作者参考。

目 录

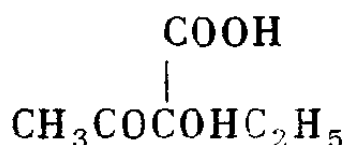
第一章 关于双乙酰的综述	(1)
第一节 双乙酰(包括戊二酮)的形成与消除 ...	(3)
第二节 酿造条件与啤酒中双乙酰 含量的关系	(13)
第三节 α -乙酰乳酸转化为双乙酰 的动力学	(18)
第二章 啤酒发酵微生物研究的进展	(29)
第一节 酵母遗传学在啤酒发酵中的应用	(29)
第二节 抗双乙酰菌株(diacetyl resistance) 及缬氨酸营养缺陷型等菌株的诱 变选育	(34)
第三节 啤酒酵母的杂交	(45)
第四节 快速检出污染微生物的方法	(52)
第五节 检验啤酒酵母的染色技术	(54)
第三章 啤酒发酵工艺的进展	(61)
第一节 连续发酵	(61)
第二节 高浓度麦汁发酵	(74)
第三节 单罐发酵	(84)
第四章 啤酒发酵设备的进展	(92)
第一节 锥形罐 (Conical Vessels).....	(92)
第二节 大型发酵罐的设计原则	(102)
第三节 联合罐的设计	(111)

第四节	大型发酵罐的清洗设备系统	(114)
第五章	影响啤酒风味的物质	(118)
第一节	高级醇的形成机理	(118)
第二节	啤酒中酯类的形成	(132)
第三节	啤酒中羰基化合物的形成	(149)
第四节	啤酒中的含硫化合物	(157)
第六章	酵母酶模式与发酵条件	(168)
第一节	发酵温度和酵母的酶模式	(168)
第二节	麦汁中氧含量和酵母的酶模式	(190)
附 录		(209)

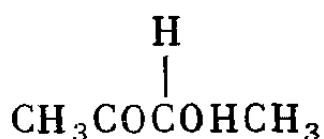
第一章 关于双乙酰的综述

啤酒的组成极为复杂，通过对其中微量组分的测定，估计在百种以上。影响啤酒成熟的物质主要是连二酮类（包括双乙酰及2,3戊二酮），醛类（乙醛，丙酮醛），挥发性含硫化合物，高级醇，酯等。而啤酒中双乙酰的含量是品评啤酒是否成熟的主要依据。最近十余年来对双乙酰的形成与消除进行了极为广泛深入的研究。下面是和这方面有关的化合物：

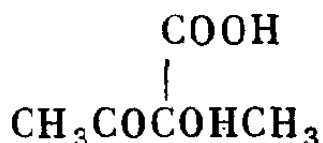
(1) α -乙酰羟基丁酸 (α -acetohydroxybutyric acid)：



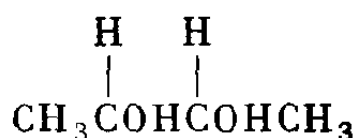
(2) 3-羟基丁酮 (acetoin)：



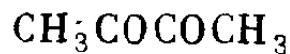
(3) α -乙酰乳酸 (α -acetolactic acid)：



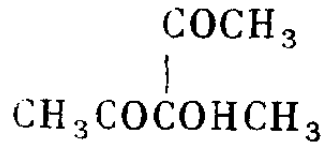
(4) 丁二醇 (butanediol)：



(5) 双乙酰 (diacetyl)：



(6) 双乙酰甲基甲醇 (diacetyl methyl carbinol);



(7) 乙二醛 (metylylyoxal);



(8) 2,3-戊二酮 (2,3-pentanedion);

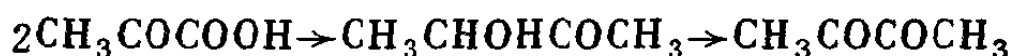


双乙酰和戊二酮的气味是相同的，具有一种所谓“双乙酰味”。当啤酒中双乙酰含量达到其阈值时就能辨别出一种酸的烧焦的麦芽味，当其含量超过阈值时就能辨别出典型的“双乙酰味”（稍似馊饭气味）。双乙酰及戊二酮的阈值因啤酒的种类而不同，底面发酵啤酒中的阈值低于上面发酵啤酒。在具有浓郁的酒花及麦芽香气的啤酒中，双乙酰及戊二酮的气味是容易被忽视的。一般说，在底面发酵啤酒中双乙酰的阈值是0.1~0.2ppm，而在上面发酵啤酒或烈性黑啤酒（Stout）中，其阈值是0.1或0.4ppm。戊二酮的阈值较高，大约是双乙酰的十倍，在1ppm左右。有人认为：在底面发酵啤酒中双乙酰的气味是缺点，而在上面发酵啤酒中则被认为是需要的。一般外销啤酒中双乙酰的浓度低于0.2ppm（甚至更低），而戊二酮的浓度是0.01~0.08ppm。美国的研究报告中指出：啤酒中双乙酰和戊二酮结合在一起的含量约为0.33ppm。

第一节 双乙酰（包括戊二酮） 的形成与消除

一、双乙酰及戊二酮的生物合成途径

在许多的报告中曾指出，双乙酰由酵母经中间产物3-羟基丁酮而形成，其途径为：

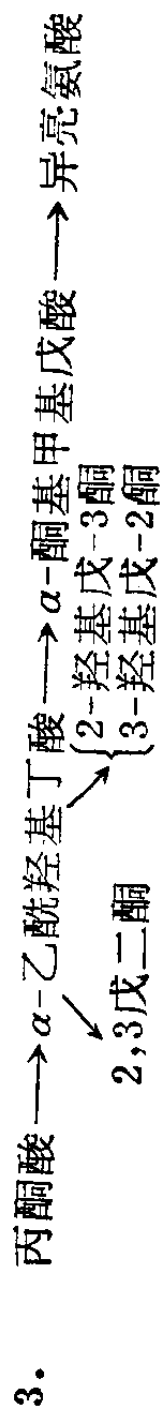
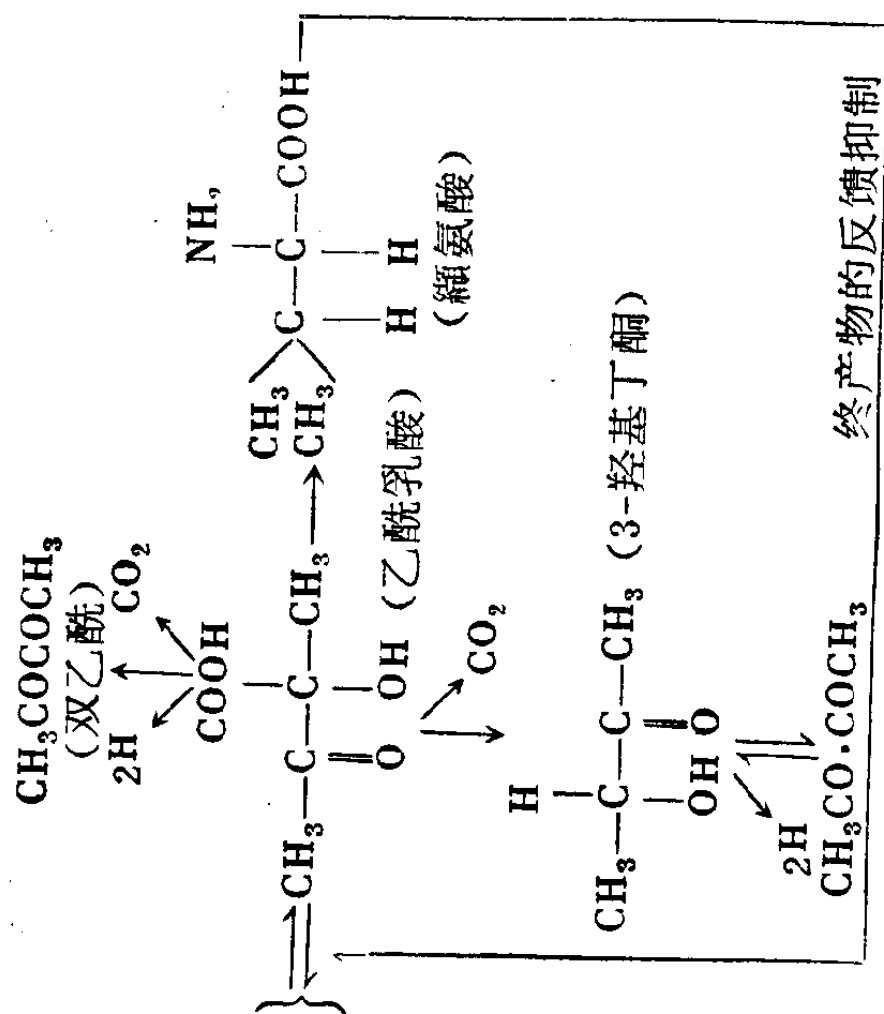
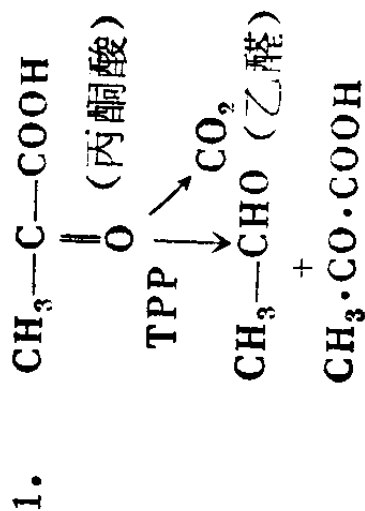


丙酮酸

3-羟基丁酮

双乙酰

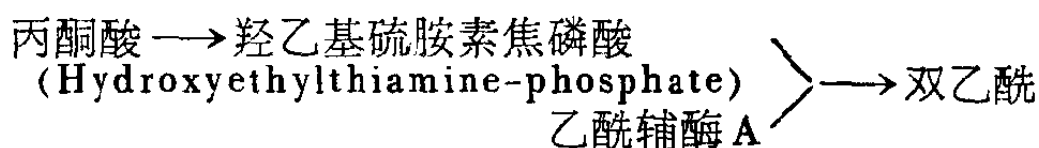
此假说曾被接受，因为（1）用化学氧化法很易使3-羟基丁酮变成双乙酰；（2）在酵母中形成3-羟基丁酮及 α -乙酰乳酸（直至双乙酰）的酶及辅酶是相同的。但当时不了解酵母怎样把3-羟基丁酮变成双乙酰，后来又发现双乙酰和3-羟基丁酮是单独地形成的。经进一步的研究才确定双乙酰的形成途径（包括戊二酮）如下：



由此看来，双乙酰是由乙酰乳酸形成的。双乙酰是由乙酰乳酸经氧代（酮基）异戊酸这一中间产物生物合成缬氨酸、亮氨酸、泛酸时的副产物。 α -乙酰乳酸转化为双乙酰的过程是非酶催化作用，在酵母细胞外形成。在酵母细胞中不含或含极少的双乙酰，因为对酵母来讲双乙酰是比石炭酸毒性更大的毒物，能强烈地抑制酵母的代谢作用并滞缓其细胞的繁殖。用酵母变异菌株做实验，由于此菌株已不具备乙酰羟酸合成，故不能生成乙酰乳酸，而实验结果在发酵液中未检出双乙酰，这说明乙酰乳酸是双乙酰形成的必经代谢途径。同样，戊二酮一般是由乙酰羟基丁酸形成的，乙酰羟基丁酸是异亮氨酸生物合成过程中的中间产物，其所需的酶有些和缬氨酸生物合成过程中的酶基本一致。缺乏乙酰羟酸合成酶的变异菌株及不能生成 α -氧代丁酸的菌株都不能生成乙酰羟基丁酸或戊二酮。缬氨酸由于反馈抑制乙酰乳酸的生物合成，也间接抑制了双乙酰的形成。同样，异亮氨酸对戊二酮的形成也起到一种反馈抑制作用。

缬氨酸与异亮氨酸的生物合成作用不但在酵母中有，而且在大麦或其他谷物上的微生物中也有，故在未煮沸的麦汁中也能发现连二酮或乙酰羟基酸类的存在。

某些研究者认为在酵母中还存在其他的双乙酰生物合成途径。丘恩格及科林斯（Chuang 及 Collin's）提出的模式为：



霍尔泽（Holzer）等的研究认为 2 分子的乙醛在辅羧酶（Co-Carboxylase）（硫胺素焦磷酸 $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_4\text{P}_2\text{SCl}$ ）

的存在下，由于聚醛酶（醛连接酶 Carboligase）的缩合作用形成了3-羟基丁酮，再由3-羟基丁酮的一部分氧化生成双乙酰。

在发酵过程中的任一特定时刻，发酵液中的双乙酰浓度都是取决于当时双乙酰的生成量与消除量的平衡。一度由酵母酶系形成的 α -乙酰乳酸衍生的双乙酰，可因活性酵母的还原作用变成3-羟基丁酮而减少。所以有生成速度与还原速度的平衡问题。经常遇到在发酵初期存在较高浓度的双乙酰，而在发酵末期降至较低浓度的情况。因之啤酒发酵中双乙酰含量取决于下述因素的结合情况：

（1）乙酰羟酸类的形成情况。

（2）从乙酰羟酸类形成连二酮（即戊二酮与双乙酰）的情况。

（3）双乙酰（包括戊二酮）的消除情况。

因此必须把这三种情况逐一加以说明。

二、乙酰羟酸类（Acetohydroxy acid）的形成

采用离子交换的方法可将乙酰羟酸类与连二酮等其他化合物分开，并在其转变为连二酮后，用气液色谱法测定。乙酰乳酸及乙酰羟基丁酸的形成都需乙酰羟酸合成酶，不具备这种酶的变异菌株同时失去形成这两种酸的能力。

酵母中具有乙酰羟酸合成酶在其生长的停止阶段有被破坏的可能，但在啤酒中生长不太旺盛的酵母能生成乙酰羟酸类。酵母中的这种酶的合成可以被抑制，但机理是复杂的，且需同时存在高浓度的某些氨基酸。

缬氨酸对乙酰乳酸的形成具有一种特殊的抑制效应。当 α -氧代(酮基)异戊酸存在时,用细胞抽出物进行生化反应时,加缬氨酸并不能完全抑制酵母细胞抽出物中的乙酰羟酸合成酶。但缬氨酸强烈地抑制用苯处理后,成为可渗透细胞的乙酰乳酸形成作用。然而麦汁中缬氨酸的含量是很低的,不足以影响乙酰乳酸的形成。

缬氨酸不能完全抑制3-羟基丁酮的形成,这也说明3-羟基丁酮并不专由乙酰乳酸形成。同样,异亮氨酸抑制乙酰羟基丁酸,但却促进双乙酰的形成。

苏氨酸是 α -氧代丁酸的来源,能促进乙酰羟基丁酸的形成。抑制了苏氨酸脱氨酶,能减少作为形成乙酰羟基丁酸的 α -氧代丁酸的利用率。

丙酮酸是形成乙酰乳酸的唯一基质,又是形成乙酰羟基丁酸的一种基质。发酵条件如有利于过量地产生丙酮酸,则伴之而使乙酰羟酸的产率增加。这些条件包括具有较充分的可发酵性糖,采用面包酵母,搅拌发酵,较高的发酵温度及较大的接种量。丙酮酸存在于各种酵母的代谢途径中,当酵母的代谢最旺盛的时候,也是乙酰羟酸类形成最多的时候。因之乙酰羟酸类的形成与发酵的激烈程度有关,当然其形成量也取决于酵母量。泛酸似乎与双乙酰的形成关系不大。发酵时往往由于氧的存在而使啤酒中双乙酰的含量增加,但这并不是由于生成乙酰乳酸需要氧。反之,乙酰乳酸的形成并不需氧。氧的影响部分在于增加酵母的生长,部分在于从存在的乙酰乳酸形成较多的双乙酰。如图1-1所示,乙酰羟酸类是从活性乙醛形成,但活性乙醛也是乙醛、乙酰辅酶A及3-羟基丁酮的前体。如果条件适合于形成乙醛、乙酰辅酶A及3-羟基丁酮,则相应地要减少乙酰羟酸类的生成量。实

际上，如加入乙醛就导致生成较多的3-羟基丁酮及较少的乙酰羟酸类。在一定的发酵条件下，不同酵母形成不同量的乙酰乳酸。

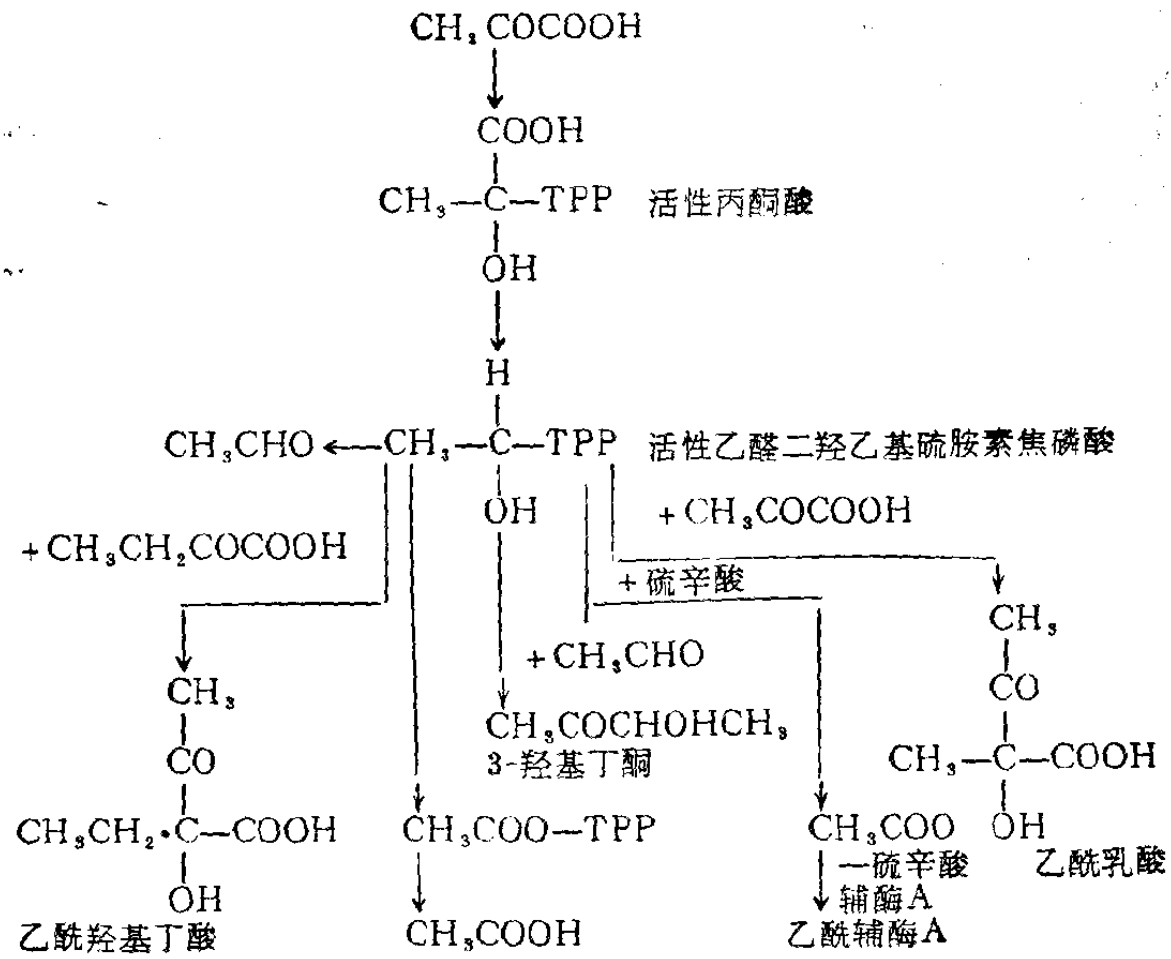


图 1-1 由丙酮酸生成乙酰羟酸及其他化合物的情况

三、乙酰羟酸类的分解

乙酰乳酸能自发地分解为双乙酰，这是在分析双乙酰含量时引起误差的原因。但乙酰乳酸也能裂解为其他化合物而不形成双乙酰，此时发酵液中的双乙酰含量就相对地要少些。乙酰乳酸的分解有两条主要的途径，而乙酰羟基丁酸的裂解反应与乙酰乳酸的裂解反应相似。

素。在发酵时要在pH降至5以下才开始较多地形成双乙酰。

乙酰乳酸的另一条代谢途径是裂解成3-羟基丁酮，这一反应不包含氧化作用。某些测定双乙酰的分析方法是将样品酸化并加热，以便使乙酰乳酸转化成为3-羟基丁酮，但发现也会形成一些双乙酰，因为这还取决于溶液的性质。将乙酰乳酸置于磷酸缓冲液中，90%以上转化成为3-羟基丁酮，而不到10%转化为双乙酰。灭过菌的啤酒或麦汁中的乙酰乳酸可以有50%转化为双乙酰。在低温时进行酸处理，则3-羟基丁酮的形成量减少而双乙酰的形成量增加。在加热至60℃时，可因加热的速率的不同而使双乙酰的形成量有一个较大的差别。能在溶液中截留 Fe^{+++} 等的螯合剂的存在，会导致乙酰乳酸较多地转化为3-羟基丁酮，较少地转化为双乙酰。乙酰乳酸也能分解为其他产物，在某些情况下，可分解为醋酸、乳酸及蚁酸。蚁酸可能是由乙酰乳酸经其他裂解产物间接形成的。乙酰乳酸的分解能由界面所催化，活性炭能导致部分乙酰乳酸分解，或许在某种程度上是由于钻入材料中的空气所起的作用。

四、乙酰羟酸类的代谢消除

在啤酒发酵时产生的乙酰羟酸类是啤酒中双乙酰及戊二酮的来源，因之这类酸被酵母除去的速率是很重要的。酵母的抽出物及酵母，尤其是面包酵母能催化乙酰乳酸生成 CO_2 ，但酵母或其抽出物被加热后就失去了这种活性。在活体酵母细胞中能使乙酰乳酸形成 α -氧代异戊酸。酵母不能加速(催化)乙酰乳酸的自发降解(Spontaneous break down)，也未从酵母中获得能加速这一反应的酶。外加的乙酰羟酸并不能