

# 生物技术在控制啤酒中双乙酰含量方面的应用

刘玉梅, 汤 坚

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214000)

**摘 要:** 双乙酰是啤酒中的重要风味物质,其含量是控制啤酒质量的一个重要指标。近年来许多生物技术广泛应用于啤酒生产,发酵过程中加入  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶,可降低双乙酰的峰值和在酒液中的含量,缩短发酵时间。最适 pH 为 6,最适温度为 35~40 °C。磁性固定化 ALDC 的应用可简单方便地与酒液分离,不影响啤酒风味,从而实现生产的连续化、自动化,缩短生产周期,大大降低生产成本。LLS 催代酶的应用可促进双乙酰的还原、减少  $\alpha$ -乙酰乳酸含量,防止双乙酰反弹。构建酵母工程菌株和选育低双乙酰产生的酵母菌,可构建低乙酰乳酸合成酶,催化丙酮酸和活性乙醛在胞内过量合成双乙酰的前体物质乙酰乳酸,从而降低双乙酰含量。(孙悟)

**关键词:** 啤酒; 双乙酰;  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶(ALDC); LLS 催代酶

中图分类号:TS262.5;TS261.4;Q814 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)01-0061-04

## Application of Biotechnology in the Control of Diacetyl Content in Beer

LIU Yu-mei and TANG Jian

(Food College of Jiang'nan University, Wuxi, Jiangsu 214000, China)

**Abstract:** Diacetyl, as an important flavoring substance in beer, its content was an important index to control beer quality. In recent years, lots of biotech were widely used in beer production. Addition of  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase (ALDC) during fermentation could reduce peak value and the content of diacetyl in beer and shorten fermentation time. The optimal use conditions were under pH value as 6 and temperature at 35~40 °C. Magnetic immobilized ALDC application could easily realize separation of beer and ALDC with no adverse effects on beer taste, which realized consecutive and automated production and shorten production cycle and greatly reduce production cost. The application of LLS catalase could advance deoxidization of diacetyl, reduce  $\alpha$ -aceto-lactic acid content, and prevent diacetyl content rebound. To reduce diacetyl content, enzyme engineering strains were developed and yeast producing low diacetyl were selected for breeding, then aceto-lactic acid compound enzyme was produced to catalyze pyruvic acid and active aldehyde to develop diacetyl forebody—aceto-lactic acid. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** beer; diacetyl;  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase (ALDC); LLS catalase

在啤酒生产中,双乙酰的形成与消除对促进啤酒成熟和缩短发酵周期起着非常重要的作用。双乙酰是啤酒中的重要风味物质,但含量过高会影响啤酒的品质。双乙酰的口味界限值很低,仅为 0.1~0.15 mg/L,超过此阈值会给啤酒带来不愉快的馊饭味,一般成品啤酒的双乙酰含量应控制在 0.1 mg/L 以下。在啤酒生产中,双乙酰的来源非常复杂。双乙酰可被酵母细胞中的酶还原为乙偶姻和 2,3-丁二醇,这两种物质对啤酒的风味几乎没有影响。在啤酒和葡萄酒的生产过程中,作为缬氨酸合

成中间产物的  $\alpha$ -乙酰乳酸能从酵母中渗出,在细胞外非酶氧化脱羧产生双乙酰。 $\alpha$ -乙酰乳酸的非酶氧化脱羧比双乙酰被还原的速度慢得多(后者约为前者速度的 10 倍),是啤酒的熟化过程中的时间限制因素。如果在啤酒的熟化阶段  $\alpha$ -乙酰乳酸不能充分除去,在随后的包装、杀菌过程中就会有较多的双乙酰形成,影响啤酒的风味。因此,在生产过程中如何控制啤酒中的双乙酰含量,加速双乙酰的还原速度,就成了啤酒工业中一个至关重要的技术环节。

收稿日期:2004-04-21; 修回日期:2004-11-12

作者简介:刘玉梅(1965-),女,高工,博士在读,主要从事天然植物资源及食品科学方向的研究。

表1 部分具有ALDC活性的菌种及其特性

菌种来源	SDS-PAGE测定分子量	PI值	最适pH	适用pH范围	最适反应温度(°C)	酶的半衰期	抑制酶活的因素	文献来源
产气肠杆菌 IFO13534	30 kDa		6.5~7	5.5~8.0	35~45	12h/45 °C	Sn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	[2]
短芽孢杆菌 ATCC11031	35 kDa	7.0~7.6	5~7	5~7	40	11d/10 °C	Zn <sup>2+</sup> , 络合物	[3]
乙酰短杆菌	31 kDa	4.4	6	5~8	40, 60 以上失活		Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , 络合物	[3]
地衣芽孢杆菌 AS10106	32 kDa	4.2	6	5~7	30~50 对热敏感	>11d/10 °C	Cu <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> 络合物	[4]
枯草芽孢杆菌 BD-5	31 kDa				40			[3, 5]
双乙酰乳酸链球菌 FD-64-D	31 kDa	4.7	6	5~7	40		Sn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , 络合物	[6]
干酪乳杆菌 DSM254	31 kDa	4.7		5~6	40		Zn <sup>2+</sup> , 络合物	[7]

控制啤酒中双乙酰含量的办法很多,传统上一般采用优化酿造工艺、接种优良酵母、加大酵母的接种量、适量使用抗氧化剂等措施。近年来,随着生物活性酶的不断研制和酶制剂工业的不断发展,采用酶法来控制啤酒中双乙酰含量已广泛应用于啤酒生产,并已显示出了其极大的优越性。

## 1 α-乙酰乳酸脱羧酶在啤酒工业中的应用

### 1.1 α-乙酰乳酸脱羧酶的作用机理

近年来,α-乙酰乳酸脱羧酶(ALDC)已广泛地应用于啤酒生产中,其使用可以缩短啤酒的熟化期。

在发酵过程中加入α-乙酰乳酸脱羧酶,主要是利用α-乙酰乳酸脱羧酶的支路代谢途径,可以使绝大多数α-乙酰乳酸直接氧化脱羧形成乙偶姻(3-羟基-2-丁酮),省却了形成双乙酰在进一步降解的中间步骤,从而在发酵过程中大大降低了双乙酰的峰值和在酒液中的含量,缩短了发酵时间<sup>[1]</sup>。其作用机理见图1。

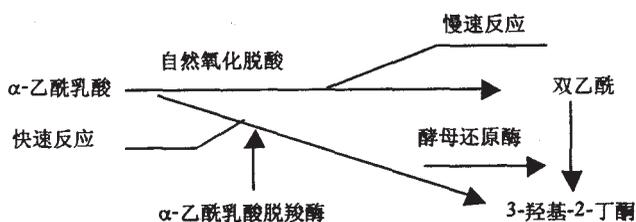


图1 α-乙酰乳酸脱羧酶的作用机理

### 1.2 α-乙酰乳酸脱羧酶产生菌及其特性

1952年,Juni等人首次报道了从产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)分离到α-乙酰乳酸脱羧酶,1970年,Loken等人纯化了ALDC,而到1982年,丹麦的Carlsberg实验室的Godtfredsen首次利用从产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)1033菌珠中提纯的ALDC进行加速啤酒成熟的研究。由于ALDC在啤酒生产中的应用前景,引起了不少研究人员的关注,对ALDC的微生物来

源进行了大量的研究。结果发现,许多菌种都具有ALDC的活性。目前已证明有ALDC活性进行过提纯和加速啤酒成熟试验的菌种还有:地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、短芽孢杆菌、乙酰芽孢杆菌、双乙酰乳酸链球菌、干酪乳杆菌、醋化醋杆菌等。具有ALDC活性的菌种及其特性见表1。

### 1.3 α-乙酰乳酸脱羧酶制剂在啤酒中的应用

丹麦诺和诺德(Novo)公司开发用于啤酒发酵的ALDC制剂Maturax™是由重组枯草芽孢杆菌中提取的短芽孢杆菌ALDC制剂<sup>[3]</sup>。产品呈棕色液体,活性1500ADU/g [1ADU(1ALDC单位)是在标准条件下(30 °C,pH 6.0,反应时间20 min)催化α-乙酰乳酸的脱羧作用,每分钟产生1 μmol乙偶姻的酶量]。据产品说明书介绍,该制剂符合联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO),以及农业联合经济委员会(JECFA)和食品化学药典(FCC)的食品级酶制剂标准。产品中活细菌数少于5×10<sup>4</sup>个/g,霉菌数少于1×10<sup>2</sup>个/g。在5 °C贮存可保持酶活性6个月以上。在啤酒正常发酵的pH范围内是稳定的。最适pH为6,在pH为4时可达最高活力的20%。最适活性温度35~40 °C,在正常发酵温度下是稳定的。凌建华等人也对我国国产的ALDC制剂与该进口产品在啤酒发酵过程中进行了对比试验<sup>[1]</sup>。结果发现,国产制剂完全可以取代进口制剂,用其生产的啤酒感官和理化指标都达到部颁标准,而且酶制剂的价格远远低于进口,可降低生产成本。国产与进口酶制剂的使用效果比较,实验数据见表2。

表2 使用国产与进口酶制剂的双乙酰含量比较 (mg/L)

酶制剂	发酵时间(d)				
	1	2	3	4	5
进口酶	0.05	0.104	0.13	0.074	0.056
国产酶	0.06	0.10	0.13	0.08	0.06

### 1.4 采用固定化ALDC的方法

将 ALDC 应用于啤酒发酵,虽可缩短生产周期,但同时带来以下缺点:(1)ALDC 属蛋白质,在啤酒中易形成沉淀,且影响风味,(2)ALDC 不能反复使用,酶的使用率较低。(3)啤酒发酵液中有酶的残留,提纯困难。邱广亮、钱斯日古楞采用乳化复合技术制备出磁性淀粉复合微球,以此为载体通过物理吸附法、交联法、共价结合法固定化 ALDC,制备出磁性固定化 ALDC,并将其应用于啤酒发酵,证明降低双乙酰效果良好<sup>[8-9]</sup>。磁性固定化 ALDC 可稳定分散于发酵液中,施以外部磁场,可简单方便地与酒液分离,不影响啤酒风味,从而实现生产的连续化、自动化,缩短生产周期,大大降低生产成本。3 种酶的固定化方法及其活性比较如下。

1.4.1 物理吸附法:经纯化和预处理的磁性淀粉微球,加入 3 mL ALDC,6℃振荡 10 h,然后置冰箱过夜,混合液在磁场中被分离,然后分别用重蒸水和缓冲溶液洗涤,直到蛋白酶被洗出,缓冲液定容备用。

1.4.2 戊二醛交联法:称取纯化的磁性微粒,加入 97.5 mg 的 ALDC,6℃振荡 18 h,滴加戊二醛(1%)至最终浓度为 0.05%,6℃下振荡 10 h,混合液在磁场中被分离,用蒸馏水充分洗涤,直到无酶蛋白被洗出,加缓冲液定容后备用。

1.4.3 溴化氰共价结合法:称取经纯化的磁性微粒,分散于 100 mL 无离子水中,加 1 g 溴化氰于上述悬液中,逐滴加入 20% NaOH,保持反应系统 pH=11.0,并保持反应温度 25℃左右,当全部溴化氰溶解时,反应混合物倾入含冰砂芯玻璃漏斗中,用冰冷的水和冰冷的偶联缓冲液快速洗涤磁性微球。在上述活化的磁性微球中加入 5 mL 酶液,6℃条件下,振摇过夜。混合液在磁场中被分离,用蒸馏水充分洗涤,直到无酶蛋白被洗出,定容后备用。

经对上述 3 种固定化方法进行比较后发现,戊二醛交联法固定化酶的效果最好。ALDC 的总活力为 1660 u/g,蛋白载量为 123.17 mg/g,比活力为 16.48 u/mg,活性回收率为 14.92%。它的催化最适温度为 30℃,最适 pH 为 5,连续 10 次催化底物后其活力仍保持 77.2%,且其半衰期为 216 d。而且 ALDC 被固定化后其酶的热稳定性和储藏性能都比自由酶高,大大地提高了操作稳定性。自由酶和固定化酶的 pH 稳定性见图 2,表 3。

## 2 LLS 催代酶的作用原理及其在啤酒中的应用

LLS 催代酶是由青岛海洋大学李兰生首次发现并应用于啤酒生产中<sup>[10-11]</sup>。海水提取物催代酶的诞生为啤酒生产中解决酵母活性问题、促进双乙酰的还原、减少 α-乙酰乳酸含量、防止双乙酰反弹等方面具有重要意义。

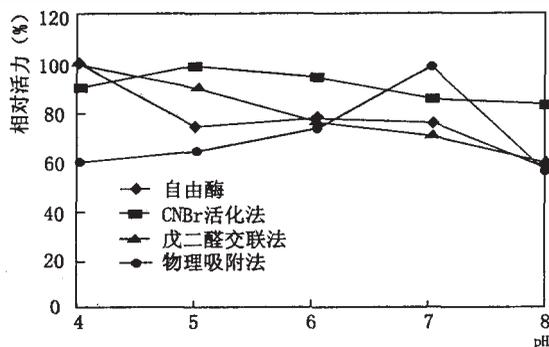


图 2 自由酶和固定化酶的 pH 稳定性曲线

表 3 固定化酶的操作稳定性 (%)

固定化酶使用次数	CNBr 活化法 (%)	戊二醛交联法 (%)	物理吸附法 (%)
1	100	100	100
2	95.9	90.9	95.3
3	93.8	90.5	94.6
4	92.8	90.1	91.5
5	91.1	86.6	90.8
6	90.2	85.8	89.0
7	86.9	83.4	80.7
8	86.0	83.2	75.6
9	81.5	82.0	67.8
10	76.0	77.2	61.7

催代酶是含有[-C=C-]、[-O-]、[-COOH]、[-NH<sub>2</sub>]等活性基团的高分子物质,它的功能主要是加快 α-乙酰乳酸转化成双乙酰的非酶氧化速度,加速形成双乙酰这一步反应,使双乙酰尽快生成,同时还可以激活酵母活性,然后再通过快速的酶促反应提高双乙酰的还原速度,使其快速还原成醇,最终达到降低双乙酰含量、缩短啤酒生产周期的目的,并避免了包装后双乙酰的回升。而且催代酶是一种来自海洋的天然环保型添加剂,使用安全,具有较好的应用前景。

## 3 构建酵母工程菌株和选育低双乙酰产生的酵母菌

利用 α-乙酰乳酸脱羧酶虽然可以降低啤酒发酵中双乙酰的含量,但同时也会造成啤酒酵母的钝化、酵母的回收困难等问题。随着分子生物学研究的深入和基因工程的发展,目前国内外已有大量的研究人员对选育和基因重组酵母工程菌株进行了探索和研究,并取得了显著的成就。由于酵母本身不产生 α-乙酰乳酸脱羧酶,将 α-乙酰乳酸脱羧酶基因导入酵母中并使其表达,用基因工程的手段修饰异亮氨酸-缬氨酸合成途径中相关的基因来构建低乙酰乳酸合成酶,催化丙酮酸和活性乙醛在胞内过量合成双乙酰的前体物质乙酰乳酸,从而降低双乙酰含量,是控制双乙酰产生的另一途径。

日本的 Sone 等<sup>[3]</sup>将产气肠杆菌的 α-乙酰乳酸脱羧酶基因导入啤酒酵母中,芬兰的 Suihko 等(1990 年)和 Blomqvist(1991 年)等构建了含土生克雷伯氏菌或产气肠杆菌 ALDC 基因的重组啤酒酵母菌株<sup>[3]</sup>。50 L 规模的

发酵实验证明,重组酵母比对照菌株产生的双乙酰总量明显降低。发酵速度、酵母生长、絮凝沉降等性状都和对照基本相同。啤酒的总发酵时间由通常的5周缩短为2周。

Cesey 和 Masschelein 等对乙酰羟基合成酶和同分异构还原酶的基因进行了研究<sup>[7]</sup>,并设计了利用重组DNA技术,将乙酰羟酸同分异构还原酶基因(ILV5)在酵母染色体中整合取代乙酰羟酸合成酶基因(ILV2),从而降低合成酶基因拷贝数的同时,提高了同分异构还原酶基因的拷贝数的方案(见图3)。经过这种方法改造的啤酒酵母中乙酰羟酸合成酶的产量降低,而同分异构还原酶的含量大幅度提高,从而其产生双乙酰的能力也大幅度降低,达到缩短啤酒后酵期的目的。但是,必须注意的是在酵母染色体上必须保留至少一个合成酶的基因,否则会造成酵母本身异亮氨酸和缬氨酸合成的缺陷,影响酵母的生长,对发酵造成不良后果。

我国科学工作者也进行了ALDC基因在啤酒酵母

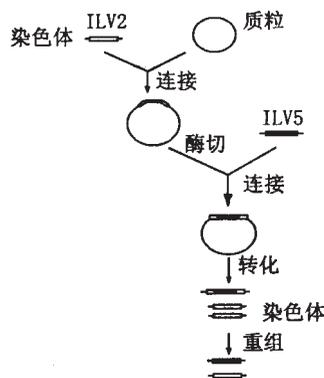


图3 遗传工程选育低双乙酰产生酵母

中表达的研究。广西大学生物技术中心应用先进的基因工程技术,“创造”出高产 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的菌株,并改善了该酶的性能,使之完全适应啤酒发酵的低温、低pH条件<sup>[12]</sup>。尤其可贵的是,在信号肽NP470的作用下,大肠杆菌产生的 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶源源不断地分泌出细胞外,成为具有极佳稳定性的胞外酶,大大延长了该

(上接第60页)

的乙醛含量、二氧化硫含量和多酚含量分别增加1 mg/L时,啤酒的RSV将分别增加-17.848,11.233和2.717。因此,减少啤酒的乙醛含量、增加啤酒的二氧化硫和多酚含量有利于提高啤酒的风味保鲜期(RSV)。从回归方程的方差分析表可知该方程的显著性为 $\alpha=0.125$ ,考虑到生化反应误差大,也可以认为该方程具有显著性。

#### 4 小结

4.1 啤酒的乙醛含量与啤酒的TBA值之间有明显的正相关性;

4.2 啤酒的初始TBA值和啤酒的RSV之间有明显的

酶的保存期。

基因重组技术目前尚未实现工业化,一个很重要的原因是用引入来源于细菌的 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因的酵母工程菌生产出的啤酒是否安全,是否能被消费者接受,还需长时间的实践证明。相信随着研究工作的不断深入,生物技术的不断发展和完善,生物技术在啤酒酿造这个具有悠久发展历史的产业中定会发挥越来越重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 凌建华,吴建宇. 国产 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒生产中的应用[J]. 江苏调味副食品,2001,(68):14-15.
- [2] 尹东,曾庆华,卢大宁,等. 产气肠杆菌 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆和表达及影响重组酶活性的因素[J]. 生物工程学报,1999,(4):501-506.
- [3] 陈乃用.  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶加速啤酒成熟的研究进展及应用[J]. 工业微生物,2001,(3):54-57.
- [4] 郑华军,鲍晓明,候爱华,等. 地衣芽孢杆菌 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的纯化及酶学性质[J]. 山东大学学报(理学版),2002,(2):180-184.
- [5] 郭文洁,何秀萍,铁翠娟,等. 枯草芽孢杆菌 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因在啤酒酵母工业菌株中的表达[J]. 微生物学报,2001,(2):105-108.
- [6] 何秀萍,怀文辉,郭文洁,等. 不同微生物的 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的生理生化特性的研究[J]. 微生物学通报,2001,(2):18-21.
- [7] 秦玉静,高东,刘巍峰. 啤酒生产中双乙酰形成的分子遗传学及其控制[J]. 工业微生物,1999,(2):38-42.
- [8] 邱广亮,邱广明,李咏兰,等. 磁性淀粉微球固定化 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶及应用[J]. 广州化工,2000,(4):24-27.
- [9] 钱斯日古楞,王红英, $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的3种固定化方法的比较[J]. 大连轻工业学院学报,2002,(4):259-261.
- [10] 李兰生,赵斌,孙明波,等. LLS催代酶在啤酒前酵过程中降低双乙酰研究[J]. 酿酒,1999,(4):100-103.
- [11] 王家林,李兰生,孟凡青,等. LLS催代酶在啤酒生产中的应用研究[J]. 酿酒,2001,(2):88-89.
- [12] 黄日波,蒙健宗,陈才建. 高表达基因工程 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的研制和应用[J]. 广西食品工业科技,13(4):17-18.

负相关性;

4.3 成品酒的乙醛与啤酒RSV之间有负相关性,而二氧化硫和多酚与RSV之间有正相关性。

#### 参考文献:

- [1] 管敦仪. 啤酒工业手册(中册)[M]. 北京:中国轻工业出版社,1986.
- [2] GB/T 5009.34-1996,食品中亚硫酸盐的测定方法[S].
- [3] Fabienne Remize, Emilie Andrieu, Sylvie Dequin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 3151-3159.
- [4] Charlie Bamforth, Beer flavor: sulphur substances[J]. Brewers' Guardian, 2001,(10):20-23.