

啤酒生产中回收酵母泥处理剂的选择试验

路文革¹, 谭杰², 雷剑¹

(1.南昌亚洲啤酒有限公司 江西 南昌 330001; 2.南昌大学食品科学与工程系, 江西 南昌 330029)

摘要: 对啤酒生产过程中回收的酵母泥采用加入过饱和硫酸铵、Nisin、磷酸等处理剂进行处理, 在保证酵母死亡率不高、无毒无害、不影响啤酒口感和有效杀灭细菌的条件下, 选出最佳处理剂及其作用强度、作用时间、处理方式。结果表明: (1) 添加酸化的过饱和硫酸铵能引起酵母大量死亡, 死亡率甚至达10%, 而对厌氧菌没有作用; (2) 加入酸化Nisin, 不影响酵母死亡率, 能杀灭99%的厌氧菌; (3) 单独添加磷酸能杀灭99.9%以上的细菌, 达到实验目的, 最佳工艺条件为pH2.5, 作用时间2 h, 30 min时追加一次磷酸。(孙悟)

关键词: 啤酒生产; 回收酵母泥; 过饱和硫酸铵; Nisin; 磷酸

中图分类号: TS262.5; TS261.4 文献标识码: B 文章编号: 1001-9286(2004)02-0076-04

Percent Test of Yeast Slurry Recovery Treating Compound in Beer Brewing

LU Wen-ge¹, TAN Jie² and LEI Jian¹

(1.Nanchang Asia Beer Co. Ltd., Nanchang, Jiangxi 330001;

2. Food Science & Engineering Department of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330029, China)

Abstract: Supersaturated ammonium sulfate, Nisin, and phosphoric acid etc. were used in the treatment of yeast slurry recovery in beer brewing. Under the preconditions of low mortality of yeast, aseptis, harmless, effective sterilization, and no adverse effects on beer taste, the optimal treating compound and its action intensity, function, treating modes and time were defined. The definitions were as follows: 1. addition of supersaturated ammonium sulfate could result in abiosis of large amount of yeast and the mortality achieved 10%, besides, its addition had no effects on anaerobic bacteria; 2. addition of acidified Nisin had no effects on yeast mortality and could exterminate 99% anaerobic bacteria; 3. addition of single phosphoric acid could achieve experimental objective by killing 99.9% bacteria and the optimal technical conditions included 2.5 pH value, 2 h action time, and supplement of phosphoric acid 30 min after beginning. (Tran. by YUE Yang)

Key words: beer brewing; yeast slurry recovery; supersaturated ammonium sulfate; Nisin; phosphoric acid

在生产中, 我们对主发酵1~3 d的发酵液检测微好氧菌, 曾最高检出过 10^5 个/ml, 而对于回收的酵母泥, 则污染更加严重, 最高检出微好氧菌达 10^4 个细菌/ 10^6 个酵母(酵母泥的浓度一般为 10^9 个酵母/ml), 也就是说发酵液已经污染了的杂菌会通过酵母泥传递到下一批次麦汁中, 这严重影响了产品的质量。此类问题在国内啤酒生产中较为普遍, 如何保证酵母的纯粹化成为啤酒纯种酿造的主要问题。我们参考了大量资料, 考虑对回收的酵母泥进行一定的抑菌处理, 如加入过饱和硫酸铵、Nisin、磷酸等处理剂^[1], 在实验室条件下, 选出最佳处理剂及其作用强度、作用时间、处理方式等, 在尽可能保证酵母死亡率不高、无毒无害、不影响啤酒口感的前提下, 杀灭99.9%以上的细菌。

1 试验目的

经过实验确定对回收后的酵母泥的最佳处理剂及处理方法。

2 试验材料

10¹⁰原浓发酵液中回收的酵母泥。

过饱和硫酸铵, 分析纯, 上海爱建试剂厂; Nisin(产品名称Nis-aplin), 英国丹尼斯公司; 磷酸, 分析纯, 上海光华化学试剂厂; 便携式pH计; 玻璃器皿若干。

3 试验设计与步骤

3.1 过饱和硫酸铵在磷酸的酸化下对酵母泥的处理

过硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 在酸性条件下, 能氧化细菌中蛋白质的活性基团, 起到杀灭细菌的作用^[2]。过硫酸铵杀菌的一般使用浓度是0.75%, 故确定过硫酸铵试验的因素与水平^[3], 详见表1。

表1 过硫酸铵试验的因素和水平

因素	水平		
	1	2	3
A 过硫酸铵(%)	0.3	0.75	1.2
B 5%磷酸(pH)	2.8	3.5	4.2

根据表1, 采用正交表 $L_9(3^4)$ 设计该方案。称取250 g酵母泥, 作用时间2 h, 检测酵母泥处理前后酵母细胞死亡率、微好氧菌的污染程度, 并采用合理的数据处理方法, 确定在实验条件下过饱和硫酸铵处理酵母泥的方法及评估其效用。

3.2 Nisin在磷酸的酸化下对酵母泥的处理

Nisin又名乳酸链球菌素^[4], 是由乳酸菌产生的一种多肽物质, 其作用机理是抑制革兰氏阳性细菌细胞壁重要组成成分胞壁质的合成, 并能在细胞膜上形成通道, 从而引起细胞内物质渗漏而导致细菌死亡。在前期的实验中在清酒内加入15 mg/kg即可抑制细菌,

收稿日期: 2003-10-10

作者简介: 路文革(1967-), 男, 江苏无锡人, 高级工程师, 江南大学在读生物工程学硕士。

而对于回收的酵母泥采用Nisin按0,50 mg/kg,100 mg/kg酵母泥的3个浓度梯度加入,并用稀磷酸调节pH至2.8,3.5,4.2等3个梯度,确定该试验的因素和水平,详见表2。

因素	水 平		
	1	2	3
A Nisin(mg/kg 酵母泥)	0	50	100
B 5%磷酸调酸度 pH	2.8	3.5	4.2

根据表2,采用正交表 $L_9(3^4)$ 设计该方案。称取250 g酵母泥,作用时间2 h,检测酵母泥处理前后酵母细胞死亡率、好氧菌、微好氧菌的污染程度,并采用科学合理的数据处理方式,确定在实验条件下,用Nisin处理酵母泥的方法及评估其效用。

3.3 磷酸单独对酵母泥的处理

不同的微生物最适生长pH不一样,其最低生长pH也不相同。啤酒酵母菌最适生长pH是4.0~5.8,最低生长pH是2.5;嗜酸乳杆菌最低生长pH范围是4.0~4.6,变形黄杆菌最低生长pH是3.9,大肠埃希氏杆菌最低生长pH是4.3。当环境中pH低于微生物生长最低pH时,其活性将受到抑制直至死亡。根据酵母菌与啤酒生产中经常污染的乳酸菌、变形黄杆菌、大肠埃希氏杆菌最低生长pH浓度的差值,故确定该试验的因素和水平,详见表3。

因素	水 平		
	1	2	3
A 作用强度(pH)	2.3	2.5	2.8
B 作用时间(h)	2	3.5	5
C 处理方式	不追加酸	30 min 时追加一次酸至所需作用强度	30 min, 60 min 各追加一次酸至所需作用强度

根据表3,采用正交表 $L_9(3^4)$ 设计该试验方案。称取250 g酵母泥,检测酵母泥酸化处理后酵母细胞死亡率、好氧菌、微好氧菌的污染程度,并采用科学的数据处理方式,综合确定在实验条件下,磷酸酸化酵母泥处理的方法。

4 试验结果、数据处理与分析

4.1 过硫酸铵与磷酸作用于酵母泥的试验结果、数据处理与分析(见表4)

4.1.1 过硫酸铵与磷酸作用于酵母泥的实验结果的极差分析

根据表4所示的方案与结果,对于A过硫酸铵、B磷酸两个因素,分别计算,其结果见表5。

通过表5比较可知,过硫酸铵对酵母泥死亡率的影响较大,而

试验号	A 过硫酸铵	B 5%磷酸	处理后的酵母泥			
			死亡率(%)	死亡率上升值(%)	厌氧菌(个细菌/10 ⁶ 个酵母)	厌氧菌致死率(%)
1	1(0.3%)	1(pH2.8)	4.3	2.8	6.64	99.87
2	2(0.75%)	1(pH2.8)	11.8	10.3	0.359	99.993
3	3(1.2%)	1(pH2.8)	11.7	10.2	0.088	99.998
4	1(0.3%)	2(pH3.5)	3.4	1.8	1807.9	65.4
5	2(0.75%)	2(pH3.5)	4.4	2.8	511.4	90.2
6	3(1.2%)	2(pH3.5)	8.9	7.4	254.2	95.1
7	1(0.3%)	3(pH4.2)	4	2.5	2749.8	47.3
8	2(0.75%)	3(pH4.2)	7.3	5.8	375.4	92.8
9	3(1.2%)	3(pH4.2)	8.6	7.1	1888.88	63.8

表5 过硫酸铵试验极差分析计算

	死亡率上升值		厌氧菌致死率	
	A	B	A	B
K_1	7.1	23.3	212.57	299.86
K_2	18.9	12	282.99	250.7
K_3	24.7	15.4	264	209
k_1	2.4	7.8	70.86	99.99
k_2	6.3	4	94.33	83.57
k_3	8.2	5.1	88	69.67
R	5.8	3.8	23.47	30.32

注 K_i 表示某个因素第 i 个水平全部试验所测得的试验结果之和。
 k_i 表示某个因素第 i 个水平全部试验所测得的试验结果的平均值。
 R 表示某个因素各个水平所得的试验结果的平均值的最大值与最小值之差。

磷酸对酵母泥厌氧菌有较好的抑制作用。

4.1.2 过硫酸铵与磷酸作用于酵母泥试验结果的方差分析(见表6,表7)

表6 过硫酸铵试验方案与结果分析

试验号	A	B	死亡率上升值		致死率 X_2	X_2^2
			X_1	X_1^2		
1	1	1	2.8	7.84	99.87	9974.02
2	2	1	10.3	106.09	99.993	9998.6
3	3	1	10.2	104.04	99.998	9999.6
4	1	2	1.8	3.24	65.4	4277.16
5	2	2	2.8	7.84	90.2	8136.04
6	3	2	7.4	54.76	95.1	9044.01
7	1	3	2.5	6.25	47.3	2237.29
8	2	3	5.8	33.64	92.8	8611.84
9	3	3	7.1	50.41	63.8	4070.44
			$\sum X_1 = 50.7$	$\sum X_1^2 = 374.1$	$\sum X_2 = 754.56$	$\sum X_2^2 = 66349$

表7 过硫酸铵试验结果数据处理

	死亡率上升值		厌氧菌致死率	
	A	B	A	B
K_1	7.1	23.3	212.57	299.86
K_2	18.9	12	282.99	250.7
K_3	24.7	15.4	259	204
k_1^2	50.41	542.89	45186	89916.62
k_2^2	357.21	144	80085.04	62850.49
k_3^2	610.09	237.16	67081	41616
$\sum k_i^2$	1017.71	924.05	192352.04	194383.11

注 K_i 表示某个因素第 i 个水平全部试验所测得的试验结果之和。
 k_i^2 表示某个因素第 i 个水平全部试验所测得的试验结果之和的平方。

4.1.2.1 针对酵母泥死亡率上升值的方差分析

以 n 表示试验总数, a, b 分别表示 A, B 两个因素每个水平的重复试验次数, 那么 $n=9; a=3; b=3^{[5]}$;

平方和: $Q_A = 1/a \sum k_i^2 - 1/n \sum x_i^2 = (1/3)1017.71 - (1/9)$

$50.7^2 = 53.63$, 同理 $Q_B = 22.41$;

平方和总和 $Q = \sum X_i^2 - 1/n (\sum X)^2 = 374.11 - 285.61 = 88.5$; 误差 $Q_e = Q - Q_A - Q_B = 12.46$;

每个因素的自由度为水平数减1, Q 的自由度为 $n-1$, 则方差结果见表8。

从表8中可以看出, F_A 值大于 $F_{0.05}$ 值, 故可以判断过硫酸铵对酵母泥的死亡率在置信度95%的情况下有显著影响, 而 F_B 值小于 $F_{0.10}$ 值, 说明磷酸在实验条件下对酵母泥的死亡率无影响, 与极差分析的结果相一致。

4.1.2.2 针对厌氧菌致死率的方差分析

表8 方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F	临界F值	显著性
A	53.63	2	26.82	8.59	$F_{(2, A, 0.10)} = 4.32$	※※
B	22.41	2	11.21	3.59	$F_{(2, A, 0.05)} = 6.94$	无
误差	12.46	4	3.12		$F_{(2, A, 0.025)} = 10.65$	
总和	88.5	8				

依前计算方法同样可得出： $Q_A=855.04$ ； $Q_B=1532.06$ ；

平方和总和 $Q=3086.69$ ；误差 $Q_e=699.59$ ；

每个因素的自由度为水平数减1，Q的自由度为n-1，则方差结果见表9。

表9 方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	平均平方和	F	临界F值	显著性
A	855.04	2	427.52	2.44	$F_{(2, A, 0.10)} = 4.32$	无
B	1532.06	2	776.03	4.38	$F_{(2, A, 0.05)} = 6.94$	※
误差	699.59	4	174.9		$F_{(2, A, 0.025)} = 10.65$	
总和	3086.69	8				

从表9中可以看出， $F_B > F_{0.10}$ ，表明磷酸对酵母泥中厌氧菌的致死率在置信度90%的情况下有一定影响，而 $F_A < F_{0.10}$ ，说明过硫酸铵对酵母泥中厌氧菌无影响。

综合以上结果可知，在回收的酵母泥中加入过硫酸铵易引起酵母的死亡，对酵母泥中的厌氧菌无任何影响，该试验条件下磷酸不会引起酵母的死亡，且能杀灭厌氧菌，但在进一步的实验中应加大磷酸的用量，以期提高厌氧菌的致死率。

4.2 Nisin在磷酸酸化下对酵母泥的试验结果

Nisin在磷酸酸化条件下对酵母泥的处理试验及处理与硫酸铵和磷酸处理一样。

4.2.1 极差分析

试验结果数据表明，针对酵母泥死亡率上升值， $R_A=2.3$ ， $R_B=1.5$ ，由于两者之间的值太接近，近似认为两者对酵母泥死亡率的影响相同；而对好氧菌致死率， $R_B=23.8$ 大于 R_A ，可知Nisin对酵母泥好氧菌致死率的作用大于磷酸的作用；而对厌氧菌致死率， $R_B=22.4$ 大于 R_A ，可知Nisin对酵母泥中厌氧菌致死率的作用大于磷酸的作用。

4.2.2 水平趋势图分析

4.2.2.1 酵母泥死亡率上升值的水平趋势分析(见图1)

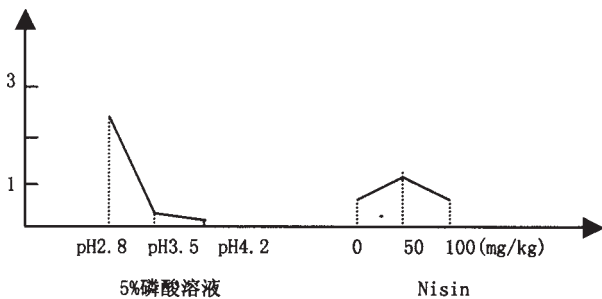


图1 酵母泥死亡率上升值的水平趋势分析图

根据图1所示，因素A出现单调递减的情况，但在pH3.5，pH4.2之间比较接近，且都较低，说明pH2.8对酵母死亡率会有一定的影响，但仍属可接受范围以内；而Nisin其3个水平值之间都比较接近，说明在实验的条件下Nisin对酵母泥死亡率影响不大。

4.2.2.2 酵母泥厌氧菌致死率的水平趋势分析图(见图2)

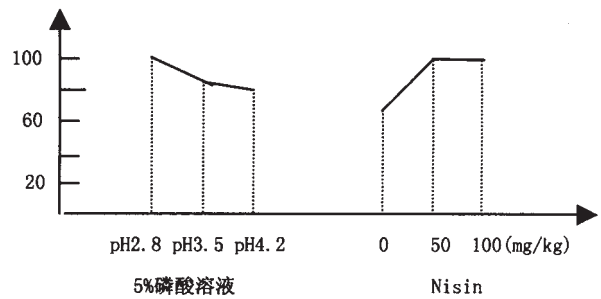


图2 酵母泥厌氧菌致死率的水平趋势分析图

从图2可知，pH2.8时磷酸对酵母泥厌氧菌有较好的抑制作用；而Nisin的50 mg/kg, 100 mg/kg这两个水平同样对酵母泥厌氧菌致死率也能达到99%以上，说明在实验条件下50 mg/kg即能对酵母泥中厌氧菌有显著的影响。通过图2还可知，pH2.8对酵母泥厌氧菌的抑制作用与Nisin 50 mg/kg, 100 mg/kg效果差不多。

通过对数据的比较可知，Nisin对酵母泥中好氧菌的抑制基本与厌氧菌一致。

综合上述可知，Nisin对酵母泥的实验中，Nisin在实验条件下对酵母泥有抑菌作用，但其作用与单独采用磷酸控制pH2.8对酵母泥中细菌的致死率都能达到99%以上，故在下一步实验中单独采用磷酸，并加大磷酸的用量，以期提高对细菌的致死率。

4.3 磷酸单独作用于酵母泥的试验结果与分析

按3.3磷酸对酵母泥的处理实验的因素和水平参数采用 $L_9(3)^4$ 正交实验方案对酵母泥进行试验，并对试验数据进行分析。

4.3.1 磷酸单独作用于酵母泥试验极差分析

试验结果表明，作用强度与作用时间、作用方式相比较，对抑菌、酵母活性更具有显著性影响。

4.3.2 磷酸单独作用于酵母泥试验水平趋势图分析

4.3.2.1 对酵母泥死亡率上升值水平趋势分析(见图3)

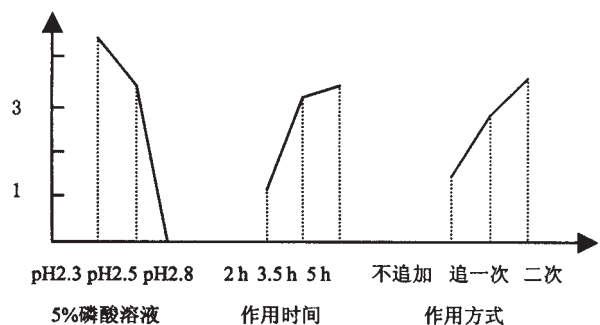


图3 酵母泥死亡率上升值水平趋势分析图

根据图3所示，作用强度的大小对酵母泥死亡率有较大的影响，从可接受程度来看，控制pH2.5虽能引起部分酵母的死亡，但仍是可接受的；从作用时间看，作用3.5 h与作用5 h对酵母泥死亡率的影响接近，故应取2 h为佳；而从追加方式上看，其单调递增，说明随着磷酸的追加，酵母泥死亡率也线性增加，故应取不追加为佳。

4.3.2.2 酵母泥厌氧菌致死率水平趋势分析(见图4)

从图4可知，在磷酸单独对酵母泥的实验中，磷酸对厌氧菌的影响，pH2.3与pH2.5所起的效果差不多，而pH2.8略差，故可选pH2.5；从作用时间来看，作用3.5 h效果最差，作用2 h和5 h效果差不多，故可选2 h为宜；从作用方式来看，以追加一次为最佳。

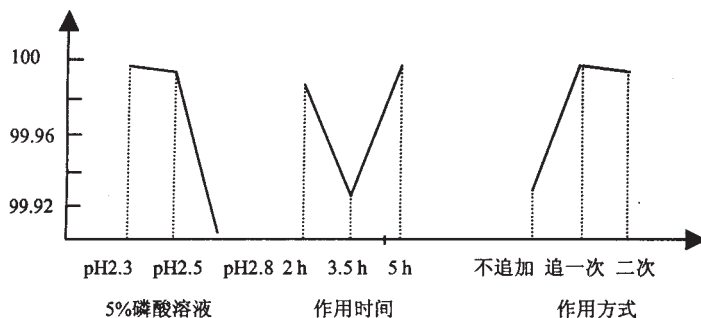


图4 酵母泥厌氧菌致死率水平趋势分析图

通过对数据的比较可知,磷酸对酵母泥中的好氧菌的抑制作用与对厌氧菌的作用基本一致。

通过磷酸单独对酵母泥作用试验结果的分析,根据可操作性原则,确定其最佳工艺是控制pH2.5,作用时间2h,中途追加一次磷酸,虽其对酵母有一定的损害,但对杀灭细菌效果十分明显。

综合上述实验,可得出如下结论:(1)在回收的酵母泥中,添加酸化了的过饱和硫酸铵能引起酵母的大量死亡,死亡率的上升值甚至达到10%,而对厌氧菌没有作用;(2)加入酸化的Nisin,不影响酵母的死亡率,对厌氧菌能大量杀灭,但其效果却与单独添加磷酸的方式差不多,也就是说,在酵母泥中添加50 mg/kg Nisin与单独用磷酸控制pH2.8的结果一致,能杀灭99%的细菌;(3)在酵母泥中单独添加磷酸,控制一定的工艺,如pH2.5,作用时间2h,30 min时追加一次磷酸,能达到我们的实验目的,即在酵母死亡率上升可以接受的情况下,能杀灭99.9%以上的细菌,故在进行大生产的实验时可做进一步的实验。

5 问题与思考

5.1 在处理剂的选择上,首先考虑的是抗生素,在实验室酵母菌种的优化、选育中已成功使用,对细菌抑菌效果甚好,但由于大生产中虽然其用量低且又大量稀释,但仍然担心部分敏感人群的过

敏反应;其次是化学杀菌剂,在啤酒生产中用的比较多的是过氧乙酸、强力胺、过硫酸铵等强氧化剂。根据资料介绍部分生化制品如溶菌酶、Nisin对乳酸杆菌、足球菌等革兰氏阳性细菌能起到抑制作用,以前在清酒中我们曾使用过,效果良好,且对酵母无任何影响,故在实验中采用了Nisin。最后实验证明磷酸能达到我们预定的效果,且所消耗的成本不大,但对酵母还是存在一定的损伤,在今后的实验中应进一步寻找出最佳的处理剂。

5.2 pH对酵母絮凝能力的影响。实验中,缓慢地搅拌加磷酸调pH的过程中,能明显感觉到溶液pH对酵母絮凝能力的影响,其中pH3.8~4.0为酵母凝结能力强弱的分水岭,低于pH3.8时酵母絮凝能力显著降低,有利于更加均匀地分散到麦汁中,促进发酵。

5.3 在数次实验过程中,相同质量的酵母泥达到同样pH所需的磷酸量不一样,其死亡率上升值的波动也较大,除菌率也不一致;不同代数的酵母泥,高代与低代之间,要达到同样的pH,高代所消耗的磷酸量甚至是低代的2倍,这些与酵母的活性存在着直接的关系。在啤酒连续生产中,我们认为如何保证酵母的活性成为整个酵母管理的核心。

5.4 在大生产中,对回收酵母泥进行抑菌处理的条件要求比实验室苛刻,许多问题必须在实验前加以考虑,(1)锥形罐底部压力大于0.25 MPa,酵母在回收时,所承受的压力骤降,酵母易胀裂;(2)在酵母泥中加磷酸如不均匀,则局部pH可低至1.0左右,造成磷酸用量增加,酵母大量死亡,以至影响杀菌效果,如何保证酵母泥加酸均匀度方面确需斟酌。

参考文献:

- [1] 周德庆. 微生物教程[M]. 北京:高等教育出版社,2002.
- [2] 中国化工产品大全[M]. 北京:化学工业出版社,1998.
- [3] 杜绿君,袁惠民. 啤酒酵母和微生物管理[M]. 北京:轻工业出版社,1990.
- [4] 贾士芳,郝庆山. Nisin与啤酒酿造[J]. 啤酒科技,1998,(2):13-14.
- [5] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州:苏州大学出版社,2002.

(上接第80页)

pH值,可以减少多酚物质的溶解量,有利于蛋白质的沉淀。在糖化用水中加适量的甲醛,可使其与麦芽中的酰胺结合生成类似于酰胺树脂的化合物,这种化合物再吸附麦芽汁中的花色苷,沉淀物质便可以除去。控制洗涤麦糟的用水量,使洗出的麦芽汁里的残糖的浓度不低于0.6%~1.5%,可减少麦芽汁中多酚物质的含量。保证麦芽汁的煮沸强度,使热凝固物析出,同时生成大量的类黑精等还原性物质,但煮沸时间不能超过2h,否则将会适得其反。合理控制酒花的使用量,也可以减少麦芽汁中多酚物质的含量。

2.4 在发酵工段,将主发酵期的pH值和发酵温度都控制得较低一些,使沉淀物质析出而除去。在后发酵期,加适量的菠萝酶或者木瓜酶等蛋白质分解酶,使高分子蛋白质分解。

2.5 在贮酒阶段,添加适量的蛋白质分解剂或者蛋白质沉淀剂;防止酒液与空气接触;贮酒后期添加少量抗坏血酸(Vc)或二氧化硫(SO₂)等抗氧化剂。

2.6 酒过滤过程中要尽可能防止酒液吸氧;清酒罐最好用立式的,应以二氧化碳背压;酒液进出罐时,要防止喷射或者涡流现象;输酒系统的接头等处要严密不漏气;输酒的速度要均匀、缓慢,流速不超过1 m/s。酒液在进入过滤机以前,过滤机助滤剂内的空气要用去氧水或者二氧化碳排除,进入灌装机前,其含氧量不超过

0.5 mg/L。

2.7 灌装啤酒时,要尽量避免酒液接触空气,啤酒进入灌装机时的输送过程中要平稳无涡流现象,并以二氧化碳背压,啤酒温度在0℃左右,溶解氧不超过0.5 mg/L。灌装压力不宜高,压盖前,应当以敲击、喷二氧化碳无菌水、滴酒等方法引沫排氧,使压盖后啤酒中的含氧量不高于1 mg/L。

3 总结

综上所述,要使啤酒不产生混浊,增强啤酒的稳定性,必须注意原料的选择,在麦芽的制备、麦芽汁的制备过程中要使蛋白质分解适当和淀粉分解彻底,要尽量使蛋白质与单宁结合生成沉淀而除去。啤酒的发酵、啤酒的过滤和灌装的过程中要尽量避免与空气接触,防止氧化混浊的产生。

参考文献:

- [1] 王喜萍,李长生.影响啤酒稳定性的因素及预防措施[J].酿酒科技,2000,(4):59-60.
- [2] 秦耀宗.啤酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1999.
- [3] 康明官,唐是雯.啤酒酿造[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [4] 大连轻工业学院,无锡轻工业学院,天津轻工业学院.酿造酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1985.