

啤酒酿造中高级醇控制的研究进展

蔺善喜 赵辉

(黑龙江大学生命科学学院,微生物黑龙江省高校重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 高级醇是啤酒中主要的风味物质,适量的高级醇能赋予啤酒丰满的口感,增加酒体的协调性,高级醇过量则会给啤酒带来异杂味并引起人体某些疾病。对酵母菌种的诱变、原生质体融合与基因工程育种及麦汁和发酵工艺的控制、降低高级醇含量研究情况进行了综述。

关键词: 微生物; 啤酒酵母; 高级醇; 菌种选育; 发酵工艺

中图分类号:Q93-3;TS262.5;TS261.1

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2009)02-0090-03

Research Progress in Higher Alcohol Control in Beer Production

LIN Shan-xi and ZHAO Hui

(Key Lab of Microbiology, College of Life Science of Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080,China)

Abstract: Higher alcohols are the main flavoring substances in beer and adequate quantity of higher alcohols could make beer with full and enjoyable taste and improve the harmony of beer body. However, superfluous higher alcohols content would bring off-flavor in beer and is harmful for people's health. In this paper, the research progress in the mutation of barm strains, protoplast fusion, genetic engineering breeding, and the control of wort and fermentation techniques to reduce the content of higher alcohols was summarized.

Key words: microbe; beer barm; higher alcohol; strain breeding; fermentation techniques

高级醇是指含3个以上碳原子醇类的总称,是酵母代谢的必然产物,是啤酒中主要的风味物质之一,适量的高级醇能赋予啤酒丰满的口味,使酒体更为协调。当高级醇的含量高于100 mg/L时,就会产生异杂味,并使人体有“上头”的感觉。高级醇是在主发酵期间通过Ehrlich途径和糖代谢途径生成的^[1~2],人们对高级醇的研究开始于20世纪初期,近年来的研究主要集中于对菌种的选育和发酵工艺的控制,从而降低啤酒中的高级醇。

1 高级醇的毒性

人们对高级醇毒性的研究起源于19世纪60年代,主要表现在对大脑的麻醉和对细胞膜的溶解两方面,以高级醇为主的脂肪醇的毒性随碳链的增加而增大。摄入过量的高级醇后常会引起头痛及肝病,Murphree等早在1967年就报道威士忌比伏特加更能引起头痛。Gibel等早在1969年就从肝病患者的血清中检测到了大量的杂醇油,还包括醛、酯和大量的高级醇。Peneda等(1994年)^[3]证明了Gibel的研究结果,并认为酒精性肝中毒可能会因为醇和醇之间及醇和醛之间相互反应而增强。McKarns等(1997年)^[4]小鼠体外试验表明,高级醇对肝的毒性是通过溶解细胞膜来实现的,并检测到了肝的完

整性和高级醇的疏水性有关。Strubelt等(1999年)^[5]用甲醇、乙醇、正丙醇、正丁醇和异戊醇灌入小鼠内,检测到的谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶的量与高级醇碳链的长度有很大的关联。Harper(2007年)报告高级醇能引起局部脑损伤以及认知障碍^[6]。

2 酵母菌种的选育

高级醇是由啤酒酵母在主发酵期间产生的,酵母的生理特性对高级醇的含量有很大的影响,因此,对酵母菌种进行改造是控制啤酒中高级醇含量的有效途径。

2.1 酵母菌种的诱变处理

诱变处理在工业生产上是一种有效的育种方法,且简单,易操作,在低产高级醇酵母选育上应用广泛。王鹏银等(2008年)^[7]将低能N⁺离子注入酵母AY-15,诱变出1株亮氨酸缺陷型菌株A713,该菌株异戊醇含量降低39.85%,高级醇总量降低33.62%。方维明等(2005年)^[8]以酵母高级醇和乳酸代谢理论为基础,建立了一套低含量高级醇和高活性乳酸脱氢酶啤酒酵母菌株选育方法。将出发菌株经紫外诱变后,依次通过乳酸、麦芽汁碳酸钙和TTC上层平板筛选,分离获得1株高级醇产量下降28.7%的目标菌株,并且遗传性能稳定。由媛(2006年)^[9]用He-Ne激光辐照诱变啤酒酵母Sac-

收稿日期:2008-09-17

作者简介:蔺善喜(1983-),男,在读硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

通讯作者:赵辉,硕士生导师,主要研究方向:食品生物技术。

charomyces cerevisiae XB05, 筛选出了高级醇产量为 70.6 mg/L 的优良菌株 JY2-2, 比出发菌株下降了 17%, 双乙酰、乙醛含量无变化, 遗传性能稳定。

2.2 原生质体融合选育低高级醇啤酒酵母

原生质体融合技术起源于 20 世纪 60 年代, 近年来在酵母菌种选育中得到了广泛应用。王芬等(2007 年)^[10]对啤酒酵母菌株 NW7-45 与产高级醇少的菌株 JW1-1 的原生质融合进行了研究。菌株 NW7-45 发酵度高, 乙醛产量低, 但高级醇的产生量大, 菌株 JW1-1 高级醇产生量少, 发酵度不高。试验中, 首先对 2 个亲本进行灭活处理, 菌株 NW7-45 采取紫外线灭活, 菌株 JW1-1 进行热灭活, 根据“致死损伤互补”的机理, 双亲灭活的原生质体发生融合, 在再生培养基上生长形成融合新株, 选育出了发酵度为 69.5%, 高级醇含量为 61.88 mg/L 的优良菌株 DR9-2。蔡车国等(2006 年)^[11]通过原生质体融合技术选育出了优良菌株 GR₅, 总高级醇含量为 74.4 mg/L, 远低于高级醇含量要求的下限。Nobuhiko Mukai 等(2001 年)^[12]将赖氨酸营养缺陷型菌株 K-14 与呼吸缺陷型 NCYC1333 融合, 得到了酒精耐受力较高、絮凝性较低、产高级醇适中的优良菌株 F-32。

2.3 基因工程菌的选育

利用基因工程的方法选育产低高级醇量的啤酒酵母开始于 20 世纪 90 年代中后期。Hiroyuki Yoshimoto 等(2001 年)^[13]对 α -丙酮酸脱羧酶基因 *PDC1* 进行了研究, 构建了 *PDC1* 缺失突变株, 结果发现异戊醇浓度下降 31%。Benvenisty 等基于 Ehrlich 代谢理论途径的研究^[1]构建了缺少 2 个编码支链氨基酸的氨基酸转氨酶(*BCAT*)基因 *eca* Δ 39 和 *eca* Δ 40 的菌株。该菌株能够切断或减弱氨基酸转变成 α -酮酸的能力。发酵试验表明, 异丁醇的含量降低, 而对酒精产量没有大影响。袁静(2004 年)^[14]报道, 酵母 *BAP2* 基因是一种氨基酸透性酶的基因, *BAP2* 基因的表达能促进缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的同化率, 运用酵母 *BAP2* 基因的表达对基本氨基酸同化和高级醇产生的影响, 将 *BAP2* 基因整合到菌株 BH-225 中形成菌株 YK015, 结果异戊醇增加, 但异丁醇和活性戊醇不变。因此认为, 可以通过对氨基酸的不同透性酶基因进行修饰来降低高级醇的产量。Barbara Bondoni 等(1999 年)^[15]将 5,5,5-三-F-DL-亮氨酸(L-亮氨酸结构类似物)抗性基因 *LEU4-1* 转化到酵母菌株, 以异戊醇为检测标准, 发现异戊醇的产量比亲本菌株低。Shigetoshi Yoshikawa 等(1995 年)^[16]对三羧酸循环的苹果酸合成酶的反馈抑制进行了研究, 解除了苹果酸合成酶的反馈抑制作用, 结果显示异戊醇的含量是野生型菌株的 3 倍。

3 发酵过程中高级醇的控制

3.1 麦汁控制

麦汁中 α -氨基氮的含量直接影响到高级醇的产

生。韩涛等(2003 年)^[17]报道, 当麦汁中 α -氨基氮总量为 180~200 mg/L 时, 高级醇的生成量最小。周爱国等(2000 年)^[18]对酵母营养盐控制啤酒中高级醇进行了探讨, 发现在使用高辅料啤酒酿造过程中, 麦汁中酵母所需的某些营养盐含量不足, 导致酵母活性降低, 从而造成啤酒中副产物含量增加, 通过限量添加酵母营养盐, 取得了一定的效果。余晓红等(2007 年)^[19]于 11 \cdot P 富硒麦汁中接入啤酒酵母进行常规啤酒发酵。发现 Na₂SeO₃ 浓度为 200 mg/L 的麦芽汁经发酵 14 d 后, 高级醇含量为 63.2 mg/L, 其他理化指标优良, 啤酒风味基本不变。

3.2 发酵工艺的控制

在发酵过程中, 如果发酵温度、充氧量等关键工艺参数控制不当, 同样会造成高级醇含量的增高。N. Moreira 等(2008 年)^[20]对葡萄酒发酵进行了研究, 葡萄酒酵母与啤酒酵母混合发酵高级醇的含量比单纯啤酒酵母发酵要低得多, 且乙酸乙酯等物质的含量比单纯葡萄酒酵母发酵要少得多。Ana González-Marco 等(2008 年)^[21]对葡萄酒发酵容器进行了研究, 指出在橡木桶中发酵高级醇的含量是不锈钢罐中发酵的 4 倍。闫淑芳等(2007 年)^[22]发现, 降低啤酒酵母发酵温度、保持一定的充氧量、加大酵母接种量, 可以降低酵母的增殖率, 可减少高级醇等挥发性风味物质的形成。L.F. Guido 等(2004 年)^[23]对酵母生理条件进行了研究, 发现用对数生长期的菌株进行发酵所产生的高级醇等风味物质比较稳定。Diego Torrea 等(2003 年)^[24]对酵母生长所需的可同化的氮量进行了研究, 表明生长需氮量多的酵母菌株产生的高级醇含量要比需氮量少的菌株要低, 而且能产生更多的酯类芳香化合物。A. K. Brown 等(2003 年)^[25]对啤酒发酵条件进行了模拟研究, 较低的发醇温度、较少的充氧量和高压条件下高级醇的产量比常规发酵要少。E. Valero 等(2002 年)对葡萄酒发酵初期进行了充氧研究, 结果表明, 初期充氧发酵比无氧发酵高级醇要高出 11.8%^[26]。Michiko Kobayashi 等(2007 年)^[27]对酵母发酵能力进行了研究, 发现发酵次数越多的酵母生长率越低, 异戊醇生成量随之增加。D. Šmogrovičová 等(1999 年)^[28]对啤酒发酵温度进行了研究, 发现 5~20 \cdot C 发酵高级醇的产量较少, 而 5~15 \cdot C 发酵风味物质酯等的含量较低, 所以比较适宜的发醇温度为 16~20 \cdot C 之间。P. Hernández-Orte 等(2005 年)^[29]和 P. Hernández-Orte(2006 年)^[30]向啤酒发酵液中补充氮源发酵进行了研究, 当氮源消耗殆尽时补充氮源会使异戊醇含量下降 30%左右。

4 小结

高级醇是啤酒中的重要风味物质, 在啤酒中适量存在, 能使酒体丰满圆润, 香气协调; 但过多高级醇的存在, 也是酒体杂味的来源, 同时危害人体健康。降低啤酒中高级醇的含量是现代啤酒企业所追求的主要理化指标之一, 菌种改良和发酵条件是控制高级醇的主要方法。

参考文献:

- [1] A.Eden. L, Van Nederveelde, M.Drukker.Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeas[J]. Appl.Microbiol.Biotechnol,2001,55(3):296-300.
- [2] Dickenson, Richard J, Harrison,et.al. An investigation of the metabolism of caline to isobutyl alcohol in *Saccharomyces Cerevisiae*[J]. Biol.Chem,1998,273(40):25751-25756.
- [3] Peneda, J., Baptista, A., Lopes, J.M. Interaction of the constituents of alcoholic beverages in the promotion of liver damage[J]. Acta Med, 1994,7(1):51-55.
- [4] McKarns, S.C., Hansch, C., Caldwell, W.S., Morgan, W.T., Moore, S.K.,Doolittle, D.J. Correlation between hydrophobicity of shortchain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. Fundam[J]. Appl. Toxicol,1997,36:62-70.
- [5] Strubelt, O., Deters, M., Pentz, R., Siegers, C.p., Younes,M. The toxic and metabolic effects of 23 aliphatic alcohols in the isolated perfused rat liver[J]. Toxicol. Sci, 1999,49:133-142.
- [6] Harper, C. The neurotoxicity of alcohol[J]. Hum. Exp. Toxicol, 2007,26:51-257.
- [7] 王鹏银,郝欣,郭学武,等. 离子注入诱变选育低产高级醇酿酒酵母菌株[J]. 酿酒科技,2008,(2):17-26.
- [8] 方维明,汪志君,高庆,等. 低含量高级醇啤酒酵母菌株的选育[J]. 南京农业大学学报,2005,28(1):61-65.
- [9] 由媛,王芬,戴玉聪,等. 激光诱变株啤酒酿造酵母 JY2-2 的选育及其中试[J].厦门大学学报(自然科学版),2006,45(5):713-716.
- [10] 王芬,由媛,全丽,等. 双亲灭活的原生质体融合株啤酒酵母 DR9-2 的构建及其特性的研究[J]. 酿酒,2007,34(5):72-75.
- [11] 蔡车国,张秀丽,刘月英,等. 优良啤酒酵母原生质体融合株 GR₅ 的构建及其发酵特性[J].工业微生物,2006,36(1):34-37.
- [12] Nobuhiko Mukai, Chiharu Nishimori, Ikuko Wilson Fujishige, et.al. Beer brewing using a fusant between a Sake yeast and a brewer's yeast[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001,91(5):482-486.
- [13] Hiroyuki Yoshimoto, Tomoyuki Fukushige, Toshihiko Yonezawa,et.al. Pyruvate decarboxylase encoded by the PDC1 gene contributes, at least partially, to the decarboxylation of α -ketoisocaproate for isoamyl alcohol formation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2001,92(1):83-85.
- [14] 袁静. 酵母的 BAP2 基因-控制高级醇的产生[J]. 啤酒科技, 2002,(4):55-60.
- [15] Barbara Bondoni, Duccio Cavalieri, Enrico Casalone,et.al. Tri-fluoroleucine resistance as a dominant molecular marker in transformation of strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from wine[J]. FEMS Microbiology Letters,1999,180(2):229-233.
- [16] Shigetoshi Yoshikawa, Isamu Oguri, Kimio Kondo,et.al. Enhanced formation of isoamyl alcohol in *Zygosaccharomyces rouxii* due to elimination of feedback inhibition of α -isopropylmalate synthase[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 127(1):139-143.
- [17] 韩涛,肖冬光. α -氨基氮对啤酒发酵过程中杂醇油生成的影响[J]. 酿酒,2003,30(6):55-57.
- [18] 周爱国,姚永春,孙文斌. 使用酵母营养盐对啤酒高级醇含量的探讨[J]. 酿酒科技,2000,(6):76.
- [19] 余晓红,王资生,汪志君,等. 富硒麦汁对啤酒酵母代谢副产物的影响[J]. 啤酒科技,2007,(7):19-21.
- [20] N. Moreira, F. Mendes, P. Guedes de Pinho,et.al. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must[J]. International Journal of Food Microbiology, In Press, Corrected Proof, Available online 31 March 2008.
- [21] Ana González-Marco, Nerea Jiménez-Moreno, Carmen Ancín-Azpilicueta. Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stainless steel tanks and oak barrels[J]. Food Chemistry,2008,108(1):213-219.
- [22] 闫淑芳,闫夫. 发酵条件对啤酒中乙醛及高级醇含量的影响[J]. 酿酒科技,2007,(11):68-70.
- [23] L.F. Guido a, P.G. Rodrigues a, J.A. Rodrigues,et.al. The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach[J]. Food Chemistry, 2004,87:187-193.
- [24] Diego Torrea, Pablo Fraile, Teresa Garde,et.al. Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with diferent nitrogen demands[J]. Food Control,2003,14:565-571.
- [25] A. K. Brown, J. R. M. Hammond. Flavour control in small-scale beer fermentations[J]. Trans IchemE,2003,81:40-49.
- [26] E. Valero, L. Moyano, M.C. Millan,et.al. Higher alcohols and esters production by *ccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must[J]. Food Chemistry, 2002,78:57-61.
- [27] Michiko Kobayashi, Hiroshi Shimizu, Suteaki Shioya. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2007,103(5):451-456.
- [28] D.Šmogrovičová, Z. Dömény. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts[J]. Process Biochemistry,1999,34:785-794.
- [29] P. Hernández-Orte, M.J. Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine[J]. Food Chemistry,2005,89:163-174.
- [30] P. Hernández-Orte, M.J. Ibarz, J. Cacho,V. Ferreira. Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation[J]. Food Chemistry,2006,98:300-310.