

啤酒发酵过程中影响蛋白酶 A 分泌的因素

宋 群^{1,2}, 刘春风^{1,2}, 李永仙^{1,2}, 王金晶^{1,2}, 李 崎^{*1,2}

(1. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 纯生啤酒中残存的蛋白酶 A 严重影响泡沫稳定性, 制约了纯生啤酒的质量提升。为了探索啤酒发酵过程中影响蛋白酶 A 分泌的因素, 作者分别考察了菌种、酵母生理状态、酵母代数、麦汁浓度、发酵时间等对蛋白酶 A 分泌的影响。结果发现, 蛋白酶 A 分泌量高的菌株, 处于稳定期之后的酵母、较高的酵母代数、较高的原麦汁浓度和在发酵阶段末期都会导致发酵液中蛋白酶 A 活性偏高。建议在实际生产中, 采用蛋白酶 A 分泌量少的菌种、调整酵母生理状态、使用小于 3 代的酵母、采用 18°P 以下的麦汁发酵和尽早结束发酵都会对降低蛋白酶 A 的分泌量起到积极作用。

关键词: 蛋白酶 A; 分泌; 菌种; 酵母代数; 高浓酿造

中图分类号: Q 55 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)06—0667—05

Effect Factors of Proteinase A Secretion in Beer Fermentation Process

SONG Qun^{1,2}, LIU Chun-feng^{1,2}, LI Yong-xian^{1,2}, WANG Jin-jing^{1,2}, LI Qi^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The remnant proteinase A in draft beer seriously affects its foam stability, which restricts the improving of draft beer quality. In order to explore the effect factors of proteinase A secretion in beer fermentation process, this paper examined the impact of the strain, physiological state of yeast, yeast generation, wort concentration and fermentation stage on the secretion of proteinase A. It was found that strain with high proteinase A secretion, yeast after stable phase, high yeast generation, high original wort concentration, late fermentation stage would result in high proteinase A activity in fermentation broth. Therefore, in the actual production, the introduction of few proteinase A secretion strains, adjusting the physiological state of yeast, using yeast less than 3 generations, fermenting with less than 18°P wort, ending the fermentation as soon as possible would play an active role in reducing the secretion of proteinase A.

Keywords: proteinase A, secretion, strain, yeast generation, high concentration brewing

收稿日期: 2012-07-24

基金项目: 国家 863 计划项目 (2012AA021303); 教育部新世纪人才支持计划项目 (NCET-10-0453); 国家创新基金项目 (09C26213203751); 江苏省创新基金项目 (BC2009291); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)。

* 通信作者: 李 崎 (1971—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事啤酒酿造科学与微生物方面的研究。

E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

纯生啤酒摒弃了传统的热杀菌工艺,因此避免了加热对啤酒风味和营养造成的破坏,由于其良好的口感和较高的营养价值,越来越受到市场的欢迎。但是,目前国内生产的纯生啤酒泡沫稳定性普遍较差,严重影响了纯生啤酒的质量,成为制约纯生啤酒发展的重要因素^[1-4]。研究证实,在啤酒酿造过程中,酵母分泌的蛋白酶 A 是影响啤酒泡沫稳定性的关键因素^[5-9]。研究发现,当酵母自溶时蛋白酶 A 会被释放到胞外;同时,在营养物缺乏等恶劣环境下,酵母蛋白酶分泌因子失效,蛋白酶 A 通过缺省途径运输到胞外^[6,10]。由于纯生啤酒未经过加热处理,在货架期内,被分泌到胞外的蛋白酶 A 会不断降解啤酒中的泡沫活性蛋白,从而对纯生啤酒的泡沫稳定性造成严重影响。随着“纯生热”的不断升温,如何降低酵母分泌的蛋白酶 A 对啤酒泡沫产生的负面影响引起越来越多研究者的关注。Slaughter^[12]等认为无显著抑制剂存在时,发酵期间蛋白酶 A 活力下降,Omrod^[12]、Muldbjerg 发现在冷贮期蛋白酶 A 分泌较多。Kondo^[14]发现三倍体和多倍体酵母菌株比单倍体和二倍体酵母菌株的蛋白酶 A 分泌量多;酵母细胞内 pH 不同,蛋白酶 A 分泌量也不同,pH 越高,蛋白酶 A 分泌量越低;酵母贮存时间越长,贮存温度越高,后酵过程中酵母活力越低,蛋白酶 A 分泌量越多;在低氮条件下,蛋白酶 A 的分泌量多于氮源充足时的分泌量。

作者从菌种、酵母生理状态、酵母代数、麦汁浓度、发酵过程等方面研究了在发酵过程中影响蛋白酶 A 分泌的因素。结果发现,蛋白酶 A 分泌量高的菌株,处于稳定期之后的酵母、较高的酵母代数、较高的原麦汁浓度和在发酵阶段末期都会导致发酵液中蛋白酶 A 活性偏高,在实际生产中可根据以上结论做出相应调整,从而减少蛋白酶 A 分泌,提高纯生啤酒泡沫稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酵母菌株:G-03(F25)、D-4、C-03、青②(F15)、Q-05A、J-1 为作者所在实验室保藏;干酪素、三氯乙酸、甘氨酸、NaOH、HCl 等均为分析纯,上海国药集团化学试剂公司。

荧光分光光度计(650-60):日本 HITACHI 公司;单光束紫外/可见分光光度计(UV1102):上海天

美科学仪器有限公司;精密 pH 计(FE20):梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母扩培及啤酒发酵 从斜面上挑取一环酵母细胞接种到装有 10 mL 麦汁的试管中,25 °C 培养 36 h。取 1 mL 上述发酵液接种到装有 9 mL 麦汁的试管中,25 °C 培养 36 h。将试管中的 10 mL 发酵液全部转移到装有 70 mL 的 250 mL 三角瓶中,28 °C、150 r/m,摇瓶培养 24 h。将三角瓶在 4 °C 下放置 12 h,使酵母泥沉降。将酵母泥接种到装有 300 mL 麦汁的 500 mL 三角瓶中,装上发酵栓,11 °C 发酵 6 d。

1.2.2 主要试剂的配制

1)酪蛋白溶液(0.1%):0.25 g 酪蛋白用 60 mL、6 mol/L HCl 加热、超声溶解,加 Gly-HCl 缓冲液,使其终浓度为 0.1 mol/L,用饱和 NaOH 溶液调节至 pH 3,用蒸馏水定容到 250 mL,中速滤纸过滤。

2)TCA 溶液(2.5 mol/L):称取 408.48 g 三氯乙酸溶于蒸馏水,定容至 1 L,过滤。

1.2.3 蛋白酶 A 酶活测定方法 将发酵液离心,取上清液即为粗酶液。在 10 mL 小试管中加入 0.1 mL 粗酶液,再加入 0.1%酪蛋白溶液 1 mL,混匀,40 °C 反应 20 min,加入 2 mL、2.5 mol/L TCA,加蒸馏水将体系体积补齐到 5 mL,混匀,室温缔合 20 min。空白为在酶液中先加 2 mL、2.5 mol/L 的 TCA 中止反应 20 min 后,再加入酪蛋白溶液。设定荧光分光光度计的发射光和激发光波长均为 468 nm,狭缝均为 2 nm,分别测定反应体系的共振散射光强度 $I_{468 \text{ 反应}}$ 和空白体系的共振散射光强度 $I_{468 \text{ 空白}}$ 。蛋白酶 A 活性用光强差表示: $\Delta I_{468} = I_{468 \text{ 空白}} - I_{468 \text{ 反应}}$ 。

2 结果与讨论

2.1 菌种对蛋白酶 A 分泌的影响

首先考察了不同酵母菌种对啤酒酿造过程中蛋白酶 A 分泌的影响。分别使用实验室保藏的 6 株生产用菌株在 1.2.1 实验条件下进行发酵,测定发酵液中蛋白酶 A 的活性,结果见图 1。

如图 1 所示,酵母菌株 D-4 和 Q-05A 的发酵液中检测不到蛋白酶 A 活性,酵母青②(F15)和 J-1 的发酵液中蛋白酶 A 活性略低,其 ΔI_{468} 分别为 42 和 20,而酵母 G-03(F25)和 C-03 的发酵液中可以检测到较高的蛋白酶 A 活性,其 ΔI_{468} 分别为 108 和

100。因此,不同酵母菌种蛋白酶A的分泌量不同,最终使得发酵液中蛋白酶A的活性有很大差异。酵母菌种是蛋白酶A产生的唯一来源,菌种的差异必然会带来蛋白酶A分泌量的差异。因此,在实际生产中选择蛋白酶A分泌量低的菌株进行发酵,会对降低发酵液及成品啤酒中蛋白酶A活性起到积极作用。

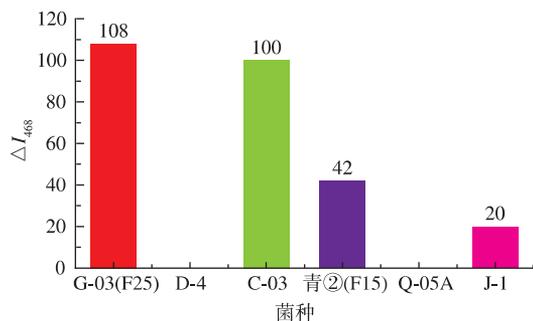


图1 不同菌种发酵啤酒时发酵液中蛋白酶A活性

Fig. 1 Proteinase A activity of different strain's fermentation broths

2.2 酵母生理状态对蛋白酶A分泌的影响

为了考察酵母生理状态对蛋白酶A分泌的影响,实验选用酵母菌株G-03(F25)为研究对象,测定了其细胞浓度曲线和死亡率曲线,见图2。在得到的曲线上选取7个时期,时期1:延迟期(2h)、时期2:对数生长期初期(6h)、时期3:对数生长期末期(14h)、时期4:稳定期初期(18h)、时期5:稳定期中期(28h)、时期6:稳定期末期(38h)、时期7:衰亡期(48h)。分别测定处于这7个时期的酵母分泌的蛋白酶A活性,见图3。

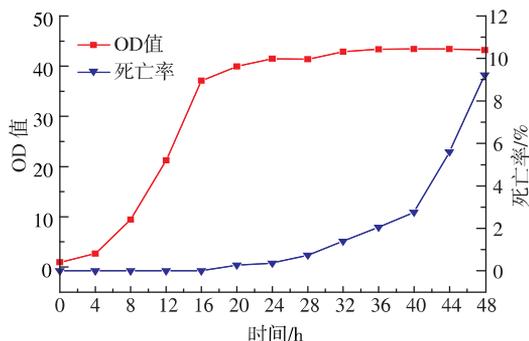


图2 菌株G-03(F25)细胞浓度及死亡率曲线

Fig. 2 Cell concentration and the mortality curves of G-03(F25)

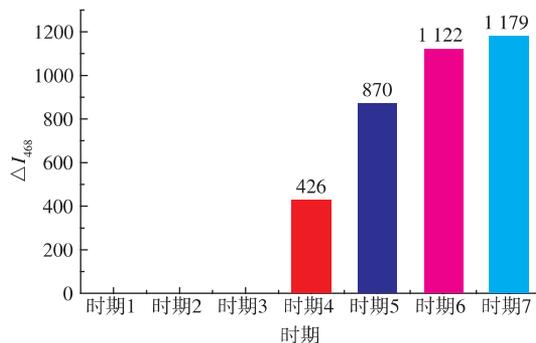


图3 不同生理状态酵母分泌的蛋白酶A活性

Fig. 3 Activity of proteinase A secreted by yeast of different physiological state

由图2和图3可以看出,不同生理状态下酵母产生的蛋白酶A活性不同。处于延迟期和对数生长期的酵母不产生蛋白酶A,而从稳定期开始可以检测到蛋白酶A活性(ΔI₄₆₈=426),并且随着发酵时间的延长,蛋白酶A活性逐渐增强,至衰亡期时蛋白酶A活性高达1179,为稳定期初期时蛋白酶A活性的2.7倍。因此,生产中接种稳定期以前的酵母进行发酵将会有效降低发酵液中蛋白酶A活性。

2.3 酵母代数对蛋白酶A分泌的影响

在实际的啤酒生产中,啤酒酵母通常会使用3~5代,为了考察不同传代次数酵母分泌蛋白酶A的情况,在实验室下中参照1.2.1实验条件跟踪测定了同一酵母菌株G-03(F25)的0~5代发酵液中蛋白酶A的活性,结果见图4。

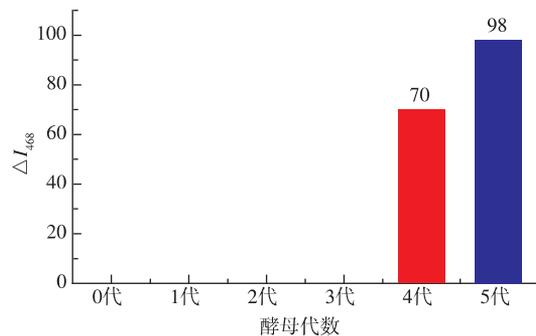


图4 同种酵母不同代数发酵液的蛋白酶A活性

Fig. 4 Proteinase A activity of different generation yeast's fermentation broths

从图4中可以看出,不同代数酵母的发酵液蛋白酶A活性不同,0~3代酵母的发酵液检测不到蛋白酶A活性,而4代、5代酵母的发酵液可以检测到蛋白酶A活性,其ΔI₄₆₈分别为70和98。因此,酵母

代数的增加将会导致蛋白酶 A 分泌量的增加。在生产中,使用较小代数的酵母,尤其是三代以内的酵母进行啤酒发酵可以降低蛋白酶 A 的分泌量。

2.4 原麦汁浓度对蛋白酶 A 分泌的影响

传统啤酒酿造采用 12 °P 麦汁发酵,但为了提高啤酒产量和设备利用率,目前,啤酒厂多使用高浓酿造技术。高浓酿造技术即采用高浓度麦汁糖化和发酵,啤酒成熟后,再用无菌水稀释成不同浓度的啤酒。为了考察高浓酿造对蛋白酶 A 分泌的影响,在实验室条件下测定了使用不同浓度麦汁发酵时的蛋白酶 A 活性,并将结果折算成 12 °P 麦汁的数值,见图 5。

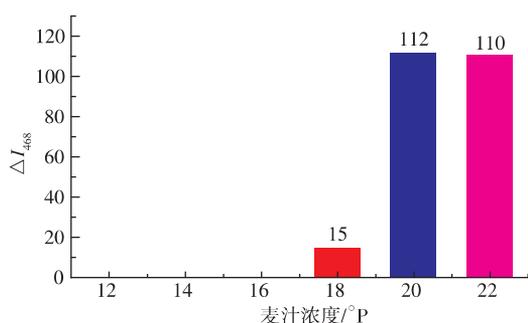


图 5 不同浓度麦汁发酵时的蛋白酶 A 活性

Fig. 5 Proteinase A activity of different concentration worts' fermentation broths

如图 5 所示,使用 12、14、16 °P 的麦汁发酵时,发酵液无蛋白酶 A 活性,当麦汁浓度为 18 °P 时,在发酵液中可以检测到蛋白酶 A 活性,ΔI₄₆₈=15,当麦汁浓度为 20 °P 时,ΔI₄₆₈=112,当麦汁浓度为 22 °P 时,ΔI₄₆₈=110。因此,发酵时的麦汁浓度会对蛋白酶 A 的分泌产生影响,高浓度的麦汁,会迫使酵母分泌更多的蛋白酶 A。在实际生产中,采用 18 °P 以下的麦汁进行发酵,可以减少酵母蛋白酶 A 的分泌量。

2.5 发酵过程中蛋白酶 A 分泌情况

为了考察在实际的发酵过程中蛋白酶 A 的分泌情况,实验中跟踪了 1 000 L 大罐啤酒发酵过程中蛋白酶 A 的活性变化,结果见图 6。

参考文献:

- [1] 王肇悦,何秀萍,刘楠,等. 纯生啤酒泡沫稳定性的影响因素及改善策略[J]. 食品与发酵工业,2006,32(3):63-66. WANG Zhao-yue, HE Xiu-ping, LIU Nan, et al. The affection factors of foam stability of unpasteurized beer and strategy for foam improvement[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(3):63-66. (in Chinese)
- [2] 叶俊华,顾国贤,陆健. 啤酒及其泡沫中蛋白质组分的比较分析[J]. 食品与生物技术学报,2003,22(6):46-49. YE Jun-hua, GU Guo-xian, LU Jian. Comparative analysis on the protein components in beer and beer foam [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2003, 22(6):46-49. (in Chinese)

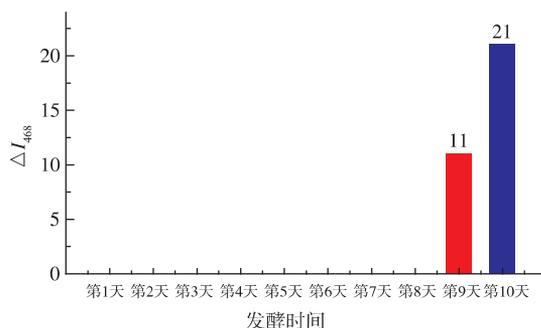


图 6 啤酒发酵过程中蛋白酶 A 活性

Fig. 6 Proteinase A activity in beer fermentation process

从图 6 可以看出,在发酵的前 8 天发酵液中没有蛋白酶 A 活性,在发酵的第 9 天、第 10 天可以检测到蛋白酶 A 活性,ΔI₄₆₈ 分别为 11 和 21。可以看出,酵母在啤酒发酵初期基本不分泌蛋白酶 A,在发酵末期逐渐开始分泌蛋白酶 A。在发酵初期,酵母的营养物充足,生存条件优越,蛋白酶 A 的产生量较低,但是,随着营养物的消耗,酒精浓度上升,二氧化碳浓度上升等条件的变化,酵母的生存环境逐渐恶劣,导致了酵母分泌的蛋白酶 A 增加。因此,啤酒酿造过程中尽早结束发酵可以降低发酵液蛋白酶 A 活性。

3 结 语

在啤酒发酵过程中有较多因素会影响酵母蛋白酶 A 的分泌。菌种的不同会导致发酵液中蛋白酶 A 的活性有很大差异,因此,在实际生产中应选择蛋白酶 A 分泌量低的菌株进行发酵。处于稳定期以后的酵母分泌的蛋白酶 A 量显著增加,生产上可以选择处于此阶段之前的酵母进行生产。较高的酵母代数,会使发酵液中蛋白酶 A 活性偏高,在生产中,应使用三代以内的酵母进行啤酒发酵。原麦汁浓度增加,会迫使酵母分泌更多的蛋白酶 A,在实际生产中,可以采用 18 °P 以下的麦汁进行发酵。在啤酒发酵过程中,酵母在发酵初期不分泌蛋白酶 A,在发酵末期分泌量逐渐增加,因此,啤酒酿造过程中尽早结束发酵可以有效降低发酵液中蛋白酶 A 活性。

- [3] 余俊红,樊伟,单连菊,等. 蛋白酶A与啤酒蛋白的相互作用[J]. 啤酒科技,2008,4:20-24.
YU Jun-hong,FAN Wei,SHAN Lian-ju,et al. Interaction between proteinase A and protein in beer [J]. **Journal of Beer Sci & Tech**,2008,4:20-24.(in Chinese)
- [4] 王德良,何春燕,李建飞,等. 蛋白酶A与纯生啤酒泡沫稳定性的关系研究[J]. 啤酒科技,2008,12:44-48.
WANG De-liang,HE Chun-yan,LI Jian-fei,et al. Studies on the relationship of proteinase A and foam stability in unpasteurized beer[J]. **Journal of Beer Sci & Tech**,2008,12:44-48.(in chinese)
- [5] Cooper D J,Stewart G G,Bryce J H. Yeast proteolytic activity during high and low gravity wort fermentations and its effect on head retention[J]. **Journal of The Institute of Brewing**,2000,106:197-201.
- [6] Dreyer T,Biedermann K,Ottesen M. Yeast proteinase in beer[J]. **Carlsberg Research Communications**,1983,48(3):249-253.
- [7] Yokoi S,Shigyo T,Tamaki T. A fluorometric assay for proteinase A in beer and its application for the investigation of enzymatic effects on foam stability[J]. **Journal of The Institute of Brewing**,1996,102:33-37.
- [8] Parr C L,Keates R A B,Bryksa B C,et al. The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A [J]. **Yeast**,2007,24:467-480.
- [9] 王肇悦,何国庆,刘中山,等. 纯生啤酒存放过程中泡沫稳定性与酵母蛋白酶A以及蛋白含量与组成变化的研究[J]. 中国食品学报,2006,6(4):96-100.
WANG Zhao-yue,HE Guo-qing,LIU Zhong-shan,et al. Studies on the changes of foam stability, yeast proteinase A and protein content and composition in unpasteurized beer during the storage [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2006,6(4):96-100.(in chinese)
- [10] Maddox I S,Hough J S. Proteolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Journal of Biochemistry**,1970,117:843-852.
- [11] Slaughter J C,Nomura T. Activity of the vacuolar proteases of yeast and the significance of the cytosolic protease inhibitors during the post-fermentation decline phase[J]. **Journal of The Institute of Brewing**,1992,98(4):335-338.
- [12] Omrod I H L,Lalor E F,Sharpe F R. The release of yeast proteolytic enzymes into beer [J]. **Journal of The Institute of Brewing**,1991,97:441-443.
- [13] Kondo H,Yomo H,Furukubo S,et al. Advanced method for measuring proteinase A in beer and application to brewing[J]. **Journal of the Institute of Brewing**,1999,105(5):293-300.

科技信息

美国FDA发布预防控制和农产品安全规则指南

美国食品药品监督管理局(FDA)已发布两份指南文件,澄清该局目前正在考虑的预防控制和农产品安全规则提案。预防控制提案将对食品生产、包装和保存现行良好生产规范(CGMPs)的相关法规进行修改,促进其现代化,要求生产、加工、包装和保存美国销售食品的国内外企业制定书面计划,明确潜在食品安全危害,并实施基于风险的预防控制,减轻可能发生的危害。这类类似于已针对果汁和海产品采用的危害分析和关键控制点体系。农产品安全提案将在国内外农场针对水果和蔬菜的种植、收割、包装和保存,实施可行的基于科学和风险的安全标准。FDA针对预防控制的指南文件包括了常见问题和答复,主要涉及规则范围、定义、豁免、危害分析、基于风险的预防控制。

FDA指出,除某些例外,新预防控制规则将适用于根据目前食品企业注册法规须向FDA注册的企业。针对故意造成的危害问题(包括恐怖活动),FDA暂时认为传统HACCP或其它食品安全体系未涉及的故意造成的危害,可能需要采取不同的控制,因此将制定单独法规予以解决。FDA指出,提案将促进目前CGMPs的现代化,(i)全面实施用语的现代化和更新;(ii)删除某些含有建议的条款,包括保存冷冻、冰冻和加热食品的特定温度;(iii)澄清CGMP中某些防止污染的条款,要求防止食品交叉污染以及防止过敏原污染;(iv)使防止食品和食品接触材料污染的条款也包括防止食品包装材料污染。农产品安全指南文件解答了一系列普遍性问题,涉及豁免、要求改动、要求的替代方法、农业用水、土壤改良剂和记录。FDA指出,该拟议规则将制定农场农产品安全种植、收割、包装和保存的最低科学标准。为此,规则将就下列主要领域制定新标准:工人培训、健康和卫生;农业用水;动物源性生物土壤改良剂;养殖和野生动物;设备、工具和建筑物;芽苗。该拟议规则涵盖了多数未加工处理状态的水果和蔬菜;但不适用于极少生食、个人或农场消费农产品以及用于商业加工的产品(如罐头)。

[信息来源]厦门WTO工作站. 美国食品药品监督管理局发布预防控制和农产品安全规则指南[EB/OL]. (2013-5-17). http://www.xmciq.gov.cn/zfxgk/xgkml/mybl/sp/201305/t20130517_99352.htm.