

麦汁关键氨基酸对 Lager 酵母发酵性能的影响

尹花^{1,2,3,4,5}, 贺扬^{4,5}, 董建军^{3,4,5}, 陆健^{*1,2,3}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 4. 啤酒生物发酵工程国家重点实验室, 山东 青岛 266100; 5. 青岛啤酒股份有限公司, 山东 青岛 266100)

摘要: 为探究麦汁中氨基酸在啤酒酿造中的作用, 研究了麦汁中 4 种关键氨基酸(谷氨酸、脯氨酸、缬氨酸和赖氨酸)对酵母发酵性能的影响。以工业 Lager 酵母(*Saccharomyces pastorianus* TT-1)为研究对象, 通过关键氨基酸添加的发酵实验, 在合成培养基中对关键氨基酸在酵母增殖及风味物质代谢中的作用进行了分析, 并进一步在工业生产麦汁中对其作用进行了验证。结果表明, 谷氨酸和脯氨酸抑制酵母增殖; 赖氨酸会促进酵母的增殖; 缬氨酸会促进高级醇的生成。

关键词: 麦汁; 氨基酸; Lager 酵母; 发酵性能

中图分类号: TS 262.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)09—0987—07

Influence of the Key Amino Acids in Wort on Fermentation Performance of Lager Yeast

YIN Hua^{1,2,3,4,5}, HE Yang^{4,5}, DONG Jianjun^{3,4,5}, LU Jian^{*1,2,3}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. State Key Laboratory of Biological Fermentation Engineering of Beer, Qingdao 266100, China; 5. Tsingtao Brewery Co. LTD, Qingdao 266100, China)

Abstract: To explore the role of amino acid in beer brewing, the impact of 4 key wort amino acids (glutamate, proline, valine and lysine) on yeast fermentation performance were studied. Lager brewing yeast (*Saccharomyces pastorianus* TT-1) was studied with synthetic medium through fermentation experiment of amino acid addition. The effect of key wort amino acids on lager yeast growth and synthesis of flavour substance was further verified with brewing wort. The results showed that glutamate and proline were identified as important determinants for their negative roles in yeast proliferation and lysine can facilitate yeast growth on the other hand. The most significant effect on

收稿日期: 2016-03-15

基金项目: 高等学校学科创新引智计划项目(111计划)(111-2-06); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介: 尹花(1972—), 女, 山东青岛人, 发酵工程博士研究生, 研究员, 主要从事风味物质图谱及调控技术、啤酒酿造与生物发酵技术等方面的研究。E-mail: yinhua@tsingtao.com.cn

* 通信作者: 陆健(1968—), 男, 江苏太仓人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酿酒微生物与酶技术、新型生物制剂方面的研究。E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

引用本文: 尹花, 贺扬, 董建军, 等. 麦汁关键氨基酸对 Lager 酵母发酵性能的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(09): 987-993.

higher alcohol production was exercised by the content of valine.

Keywords: brewing wort, amino acid, Lager yeast, fermentation performance

作为一种低酒精度的发酵饮品,啤酒的风味是产品质量的重要生命线。啤酒中的风味物质主要包括醇类、酯类、有机酸类、酮类、醛类、呋喃类(麦芽香)、吡嗪类(麦芽香)、烯类(酒花香)、氨基酸类等,它们之间微妙的平衡关系,共同形成了啤酒的风味特征。风味物质主要来自于以下几个途径:一是原料本身的风味成分,例如麦芽和酒花带来的麦香和酒花香;二是酵母经过发酵产生的风味成分;三是加工过程中产生的以及后来贮存过程中新生成的风味物质^[1]。其中,酵母代谢产生的物质是风味的重要组成部分,酵母利用麦汁中的营养物质产生乙醇和二氧化碳,同时产生代谢产物如高级醇、酯类、双乙酰、乙醛等。这些代谢副产物的种类和含量对啤酒质量起着关键作用,某些物质含量过多或过少,会造成啤酒口味缺陷,影响整体风味质量^[2-5]。

如何提高产品风味特色调控能力,实现多品类产品的差异化和同品类产品的一致性,成为制约规模化啤酒行业提升核心竞争力、产业升级的关键共性难题。啤酒风味调控的研究虽然经历了从粗放的传统经验式调整到发酵工艺与产品风味的关联研究,风味调控能力得到了极大提升,但由于工业化 Lager 酵母关键风味物质代谢机制等基础研究的缺乏,尚不能实现精准调控。

大麦是啤酒的主要原料,通过制麦和糖化将大分子物质水解成酵母可以吸收利用的碳、氮源及其他营养组分,其含量和组成直接影响酵母的生理状态、发酵过程的酿造性能,乃至最终产品风味的一致性。目前,随着生产过程其他环节工艺控制水平的越来越高,全球原料采购带来的质量波动成为制约风味一致性控制的关键。现有的配方技术已经实现了碳、氮水平及比例的合理控制,但酵母的发酵性能和啤酒风味仍存在波动,究其本质是碳、氮源组分,尤其是参与啤酒风味代谢的麦汁氨基酸谱不一致导致。麦汁中含有除了半胱氨酸之外的 19 种基本氨基酸。在发酵过程中,氨基酸为酵母细胞的生长提供氮源,氨基酸的碳骨架参与酵母细胞中其他氨基酸、蛋白质及酶的生物合成,以及啤酒风味物质的形成^[6-9]。

前期已经通过人为配制不同氨基酸组成的合成培养基在相同条件下进行发酵实验,研究了培养基中影响酵母发酵性能及醇酯风味形成的 4 种关键氨基酸:谷氨酸(Glu)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)和赖氨酸(Lys)^[10]。作者在前期研究的基础上,结合工业生产麦汁的现状,通过关键氨基酸添加的发酵实验,研究关键氨基酸对酵母生长、风味物质代谢的影响。明确麦汁中影响 Lager 酵母发酵性能的关键氨基酸及其作用,为深入研究啤酒风味一致性提供技术保障,也为大麦品种及原料配方(种类和比例)的替换提供技术支持,同时为麦芽质量控制、配方技术和育种提供新的研究方向和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酵母菌株 Lager 酵母菌株 *Saccharomyces pasorianus* TT-1;青岛啤酒厂。

1.1.2 主要试剂 酵母培养基(YPD)、酵母无氮源基础(YNB)、20 种氨基酸及 K_2HPO_4 :北京索莱宝科技有限公司;麦芽三糖、麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、乳酸:国药集团化学试剂有限公司;17AA 氨基酸水解标样(2.5 mmol/L)、硼酸缓冲液、衍生剂粉末 2A、衍生剂稀释液 2B:美国 Waters 公司;色氨酸、三水乙酸钠、三乙胺:瑞士 Fluka 公司;乙腈(UV 级):美国 Burdick&Jackson 公司;95%乙醇:南京试剂股份有限公司;双乙酰、戊二酮、乙醛和醇酯标准样:德国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 EBC 管发酵实验

1)生产厂取回收酵母,转移至 50 mL 灭菌离心管后 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液及表面酵母层。

2)称取 1.1 g 酵母(2×10^7 个)装入灭菌离心管中,分别取培养基混合均匀。

3)将离心管中酵母加入含有 220 mL 麦汁(或培养基)的 Scott 瓶中,混匀,加入 1 滴消泡剂。

4)Scott 瓶充氧,左右摇晃 20 次,放气,重复 2 次。

5) Scott 瓶中培养基及酵母转入 EBC 管,开始发酵(12 ℃)。

6) 10 d 后发酵结束进行相应理化指标的分析。

1.2.2 关键氨基酸添加的发酵实验

1) 合成培养基的关键氨基酸添加发酵实验:根据工业生产 13 °P 麦汁的糖谱及氨基酸谱,进行合成培养基的配制,见表 1,并用 20% 乳酸调至 pH 5.4。在合成培养基的基础上增加或减少 4 种关键氨基酸,并在相同条件下进行 EBC 管发酵验证实验。

表 1 合成培养基的配制

Table 1 Formulation of synthetic medium

名称	终质量浓度/(mg/L)
麦芽三糖	16×10 ³
麦芽糖	68×10 ³
蔗糖	4×10 ³
葡萄糖	16.5×10 ³
果糖	2×10 ³
无氨基酸酵母氮源(YNB)	6.7×10 ³
磷酸氢二钾(K ₂ HPO ₄)	1.3×10 ³
天冬氨酸	65
丝氨酸+天冬酰胺	158
谷氨酸	64
甘氨酸	39
组氨酸+谷氨酰胺	81
精氨酸	166
苏氨酸	77
丙氨酸	120
脯氨酸	383
酪氨酸	136
缬氨酸	125
甲硫氨酸	33
赖氨酸	93
异亮氨酸	73
亮氨酸	162
苯丙氨酸	132
色氨酸	44

Glu 调整:从 64 mg/L 增加到 138 mg/L;Pro 调整:从 383 mg/L 增加到 417 mg/L;Lys 调整:从 93 mg/L 降低到 71 mg/L;Val 调整:从 125 mg/L 降低到 110 mg/L。

2) 工业生产麦汁的关键氨基酸添加发酵实验:在工业生厂麦汁的基础上进行关键氨基酸的添加(30 mg/L Glu、50 mg/L Pro、25 mg/L Val 和 20 mg/L

Lys),并在相同条件下进行 EBC 管发酵验证实验。

1.2.3 酵母细胞数检测 发酵过程中悬浮酵母细胞数的测定采用 Countstar® 自动细胞计数仪进行。

1.2.4 麦汁氨基酸组分检测 采用 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯(AQC)对氨基酸进行柱前衍生,通过梯度洗脱,紫外和荧光双检测器串联检测^[11]。

1.2.5 啤酒风味物质检测 使用气相色谱仪 Clarus 500 GC 及顶空进样器 TurboMatrix 40 对双乙酰、乙醛、醇酯风味物质(正丙醇、异丁醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异戊酯、辛酸乙酯、己酸乙酯)进行检测^[12]。顶空进样设置:炉温 60 ℃,加热时间 40 min,传输线温度 110 ℃,取样针 110 ℃,载气 25 psi。气相色谱设置:起始温度 50 ℃,保持 3 min;以 30 ℃/min 程序升温至 180 ℃,保持 3 min;载气为氮气,流设为 15 psi,氢气流量 45 mL/min,空气流量 450 mL/min。检测器设置:氢火焰离子化检测器(FID)温度 250 ℃;进样温度 150 ℃。

基于反相高效液相色谱,采用乙腈和 0.01% 三氟乙酸的水溶液作为流动相,梯度洗脱,在 Atlantis C18 色谱柱上,210 nm 紫外检测,定量检测啤酒中芳香醇(酪醇、β-苯乙醇和色醇)的含量^[13]。

1.2.6 数据分析 每个发酵实验结果均为 3 个生物学重复的平均值,采用 IBM SPSS Statistics 22 软件中单因素 ANOVA 方法进行数据分析。

2 结果与讨论

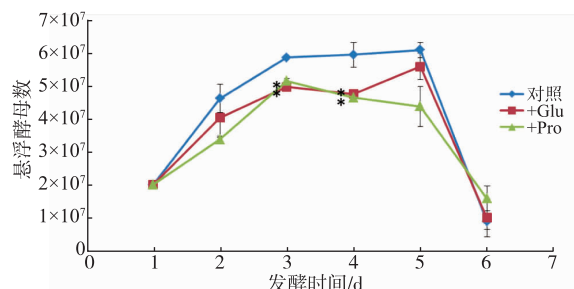
2.1 合成培养基中关键氨基酸添加/减少的发酵实验

通过在合成培养基中增加谷氨酸和脯氨酸的质量浓度,各氨基酸的终质量浓度符合工厂麦汁的含量。并检测谷氨酸和脯氨酸增加对酵母增殖及醇酯风味物质生成的影响。

结果表明,提高谷氨酸和脯氨酸的质量浓度均会抑制发酵过程中酵母的增殖,见图 1,显著降低发酵过程的峰值酵母数;此外,二者的质量浓度还会抑制发酵过程中芳香醇的生成,与脯氨酸相比,谷氨酸的抑制作用更加显著($p<0.05$);但增加这两种氨基酸的质量浓度对于醇酯的生成无显著影响,见图 2。

通过在合成培养基中降低缬氨酸和赖氨酸的质量浓度,并检测缬氨酸和赖氨酸降低对酵母增殖

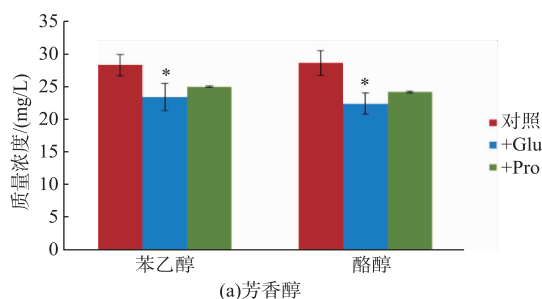
及醇酯风味物质生成的影响。



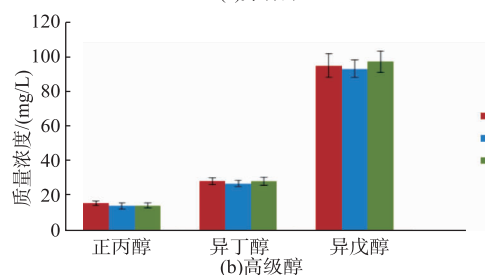
*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

图1 提高谷氨酸和脯氨酸质量浓度对酵母增殖的影响

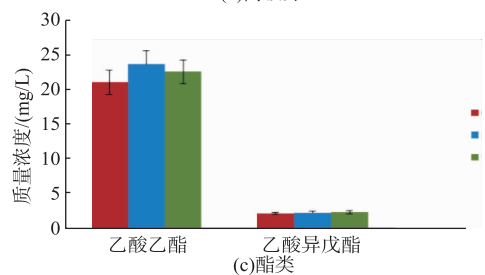
Fig. 1 Influence of glutamate acid and proline addition on yeast growth



(a)芳香醇



(b)高级醇



(c)酯类

*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

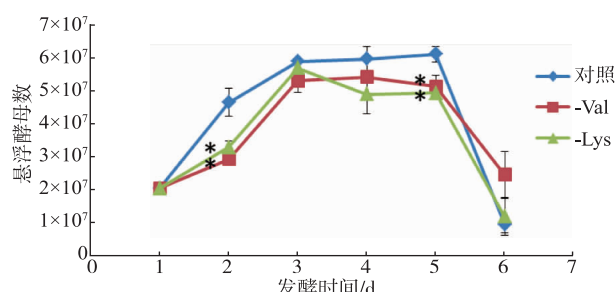
图2 提高谷氨酸和脯氨酸质量浓度对醇酯风味物质生成的影响

Fig. 2 Influence of glutamate acid and proline addition on flavor generation

结果表明,降低缬氨酸和赖氨酸的质量浓度均会抑制发酵过程中酵母的增殖,见图3。降低赖氨酸质量浓度会显著促进 β -苯乙醇的生成并抑制酪醇的生成($p < 0.05$),但对高级醇及酯类的生成无显著影响。降低缬氨酸质量浓度,会显著抑制高级醇及

芳香醇的生成($p < 0.05$),对酯类生成无显著影响,见图4。

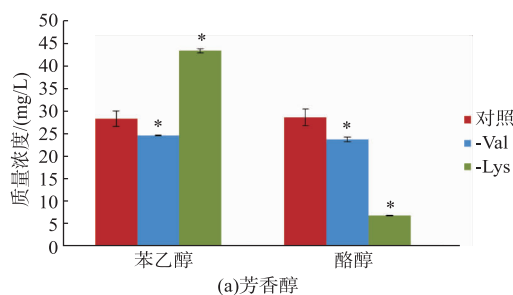
从关键氨基酸添加/减少的发酵实验结果可以看出,谷氨酸/脯氨酸与缬氨酸/赖氨酸对发酵过程中酵母增殖的影响有所不同。推测谷氨酸/脯氨酸可能通过抑制酵母对麦汁氨基酸的吸收从而抑制酵母增殖,而缬氨酸/赖氨酸作为酵母的偏好性氮源营养物质,促进了酵母的增殖^[10,14]。图4中关键氨基酸中除了缬氨酸对高级醇生成的正调控作用外,其余氨基酸质量浓度的波动对高级醇及酯类风味物质的生成均无显著影响。缬氨酸对高级醇生成的促进作用与缬氨酸直接参与 Ehrlich 途径并形成高级醇有关^[15]。研究表明,苯丙氨酸和酪氨酸分别参与了 β -苯乙醇和酪醇的代谢^[16],而关于谷氨酸、缬氨酸和赖氨酸对芳香醇生成的影响却未见报道。分析原因可能与酵母对这3种关键氨基酸及苯丙氨酸/酪氨酸吸收的竞争抑制作用有关。



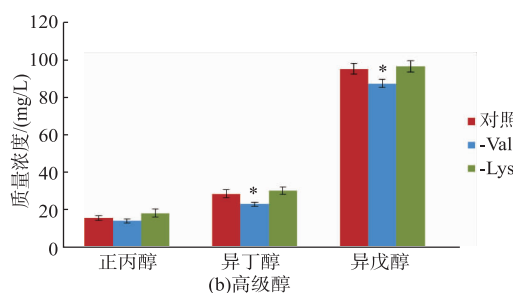
*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

图3 降低缬氨酸和赖氨酸质量浓度对酵母增殖的影响

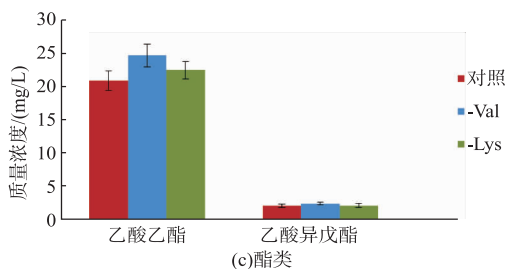
Fig. 3 Influence of valine and lysine reduction on yeast growth



(a)芳香醇



(b)高级醇



*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

图4 降低缬氨酸和赖氨酸质量浓度对醇酯风味物质生成的影响

Fig. 4 Influence of valine and lysine reduction on flavor generation

2.2 工业生产麦汁的关键氨基酸添加发酵实验

为研究关键氨基酸质量浓度过高时,是否会对酵母的发酵性能及风味物质的生成产生影响,取工业生产麦汁(营养充足),分别添加4种关键氨基酸,进行EBC管发酵实验。麦汁的氨基酸谱情况见表2。

表2 工业生产麦汁氨基酸谱

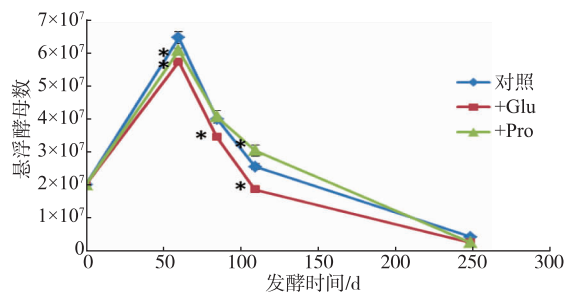
Table 2 Amino acids profile of the brewery wort

氨基酸	质量浓度/mg/L)
Asp	57
Ser+Asn	157
Glu	88
Gly	42
His+Gln	18
Arg	150
Thr	80
Ala	139
Pro	411
Tyr	137
Val	125
Met	38
Lys	102
Ile	74
Leu	177
Phe	134
Trp	51

通过在工业生产麦汁中增加谷氨酸和脯氨酸的质量浓度,并检测谷氨酸和脯氨酸过量对酵母增殖及醇酯风味物质生成的影响。

结果表明,添加谷氨酸和脯氨酸会显著抑制酵母增殖(见图5),导致峰值酵母数降低。但两者对发

酵后期悬浮酵母数的影响不同:谷氨酸会促进发酵后期酵母的沉降,而脯氨酸会抑制发酵后期酵母的沉降($p < 0.05$)。除添加谷氨酸对 β -苯乙醇的显著抑制作用外($p < 0.05$),这两种氨基酸对醇酯类风味物质的生成无显著影响,见图6。该结果与上述利用合成培养基进行的关键氨基酸调整的发酵实验结果一致。

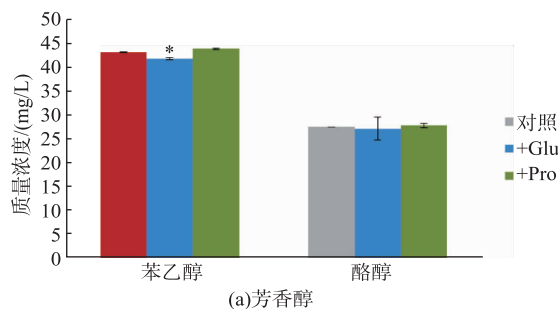


*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

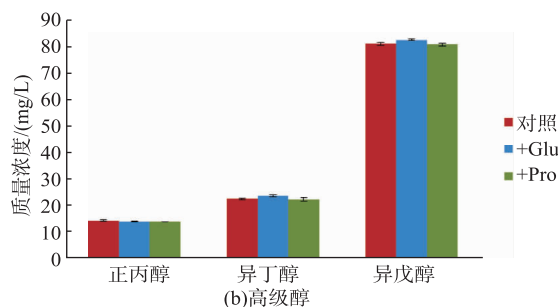
图5 麦汁添加谷氨酸和脯氨酸对酵母增殖的影响

Fig. 5 Influence of glutamate acid and proline addition in wort on yeast growth

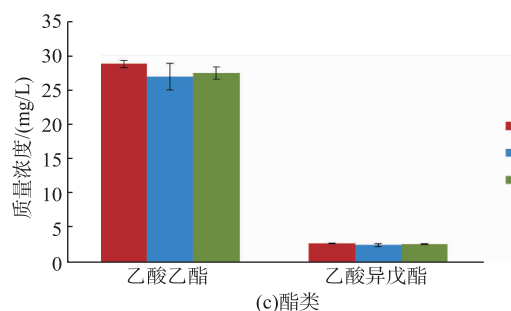
在工业生产麦汁中增加赖氨酸和缬氨酸的质量浓度,并检测赖氨酸和缬氨酸过量对酵母增殖及醇酯风味物质生成的影响。结果表明,在工业生产麦汁中添加赖氨酸对酵母增殖有显著促进作用,而缬氨酸的作用不明显,见图7。添加缬氨酸显著促进异丁醇的生成;酪醇的生成受到赖氨酸的抑制($p < 0.05$);这两种氨基酸对酯类风味物质的生成无显著影响,见图8。



(a) 芳香醇



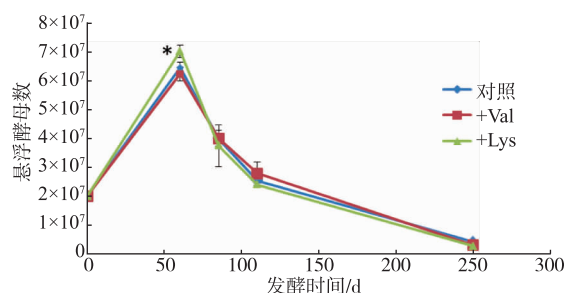
(b) 高级醇



*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

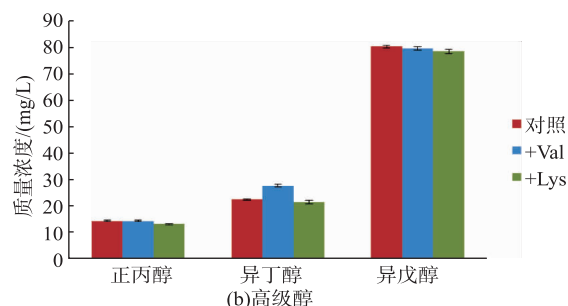
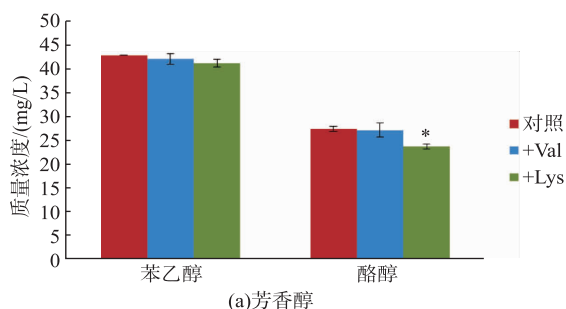
图 6 麦汁添加谷氨酸和脯氨酸对醇酯风味物质生成的影响
Fig. 6 Influence of glutamate acid and proline addition in wort on flavor generation

关键氨基酸在工业生产麦汁中质量浓度的波动对酵母增殖及醇酯风味物质生成的影响与上述利用合成培养基进行的关键氨基酸质量浓度调整的发酵实验结果基本一致。但在工业生产麦汁中添加缬氨酸对酵母增殖无显著影响,且其对芳香醇生成的抑制作用也不显著,推测这可能与工业生产麦汁的营养成分的复杂性有关。



*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

图 7 麦汁添加缬氨酸和赖氨酸对酵母增殖的影响
Fig. 7 Influence of valine and lysine addition in wort on yeast growth



*: 相对于对照实验的差异显著性 $p < 0.05$

图 8 麦汁添加缬氨酸和赖氨酸对醇酯风味物质生成的影响
Fig. 8 Influence of valine and lysine addition in wort on flavor generation

3 结 语

麦汁营养成分(主要包括碳源和氮源)直接影响酵母的生理状态、发酵性能及风味物质代谢。现有的啤酒酿造技术已经实现了碳源的合理控制,但酵母的发酵性能、啤酒风味特征的典型性和一致性仍难以达到精准控制,究其本质是参与风味物质代谢的氮源尤其是氨基酸质量浓度与比例的差异性导致。

麦汁关键氨基酸对于工厂麦汁氮源组分的控制非常重要。通过关键氨基酸添加实验确定了关键氨基酸对酵母生长、风味代谢的作用:其中谷氨酸和脯氨酸抑制酵母增殖;缬氨酸会促进高级醇的生成;赖氨酸会促进酵母的增殖。对麦汁中关键氨基酸在 Lager 酵母发酵过程中的作用机制的明晰,能够为 Lager 啤酒酿造的氮源优化提供理论依据和方法指导。

参考文献:

- [1] KOBAYASHI M, SHIMIZU H, SHIOYA S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2008, 106(4): 317-323.
- [2] LILLY M, BAUER F F, STYGER G, et al. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates[J]. **FEMS Yeast Research**, 2006, 6(5): 726-743.
- [3] VERSTREPEN K J, DERDELINCKX G, DUFOUR J P, et al. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2003, 96(2): 110-118.
- [4] UGLIANO M, HENSCHKE P A. Wine Chemistry and Biochemistry[M]. New York: Springer, 2009: 313-392.
- [5] LIU S Q, PILONE G J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in wine making with emphasis on microbiological implications[J]. **International Journal of Food Science & Technology**, 2000, 35(1): 49-61.
- [6] LEKKAS C, STEWART G, HILL A, et al. The importance of free amino nitrogen in wort and beer[J]. **Technical Quarterly—Master Brewers Association of the Americas**, 2005, 42(2): 113-116.
- [7] JONES A M, INGLEDEW W. Fuel alcohol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation[J]. **Process Biochemistry**, 1994, 29(6): 483-488.
- [8] PICKERELL A. The influence of free alpha-amino nitrogen in sorghum beer fermentation[J]. **Journal of the Institute of Brewing**, 1986, 92(6): 568-571.
- [9] PUGH T A, MAURER J M, PRINGLE A T. Impact of wort nitrogen limitation on yeast fermentation performance and diacetyl[J]. **Technical Quarterly—Master Brewers Association of the Americas**, 1997, 34(3): 185-189.
- [10] YIN H, HE Y, DENG Y, et al. Application of Plackett-Burman experimental design for investigating the effect of wort amino acids on flavour-active compounds production during lager yeast fermentation[J]. **Journal of the Institute of Brewing**, 2017, 123(3): 300-311.
- [11] HOU Songmei, SUN Jing, HE Hongbo, et al. Simultaneous determination of amino acids in soil by reversed phase high performance liquid chromatography by using 6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as a precolumn derivatization reagent[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2006, 34(10): 1395-1400. (in Chinese)
- [12] SAISON D, DE SCHUTTER D P, DELVAUX F, et al. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry[J]. **Journal of Chromatography A**, 2008, 1190(1-2): 342-349.
- [13] LI M, YANG Z, HAO J, et al. Determination of tyrosol, 2-phenethyl alcohol, and tryptophol in beer by high-performance liquid chromatography[J]. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 2008, 66(4): 245-249.
- [14] HONGJIE L, HUIPIN L, FEN M, et al. Effects of Lys and His supplementations on the regulation of nitrogen metabolism in lager yeast[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(20): 8913-8921.
- [15] HAZELWOOD L A, DARAN J M, VAN MARIS A J, et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008, 74(8): 2259-2266.
- [16] DU Shan, WANG Xuehua, YANG Zhengmao, et al. Study on metabolic pathways of β -phenyl ethanol bioconversion and regulation[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2014, 40(1): 168-173. (in Chinese)