

文章编号:1673-1689(2005)05-0051-04

啤酒酵母发酵产有机酸的初步研究

孙付保^{1,2}, 赵长新¹, 任洪艳^{1,2}, 王世崇^{1,3}

(1. 大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 中国科学院过程工程研究所 生物化工国家重点实验室, 北京 100080; 3. 大连华润啤酒有限公司, 辽宁 大连 116033)

摘要: 利用高效液相色谱技术, 对通风发酵过程中的啤酒酵母细胞的胞外、胞内 6 种有机酸含量的动态变化进行了定性定量跟踪检测. 研究结果表明, 通风培养的酿酒酵母代谢产酸时, 细胞胞外、胞内有机酸的动态变化存在差异性, 胞外有机酸含量远大于胞内含量; 酵母细胞对有机酸代谢存在着精确保守性和经济效能性, 在发酵后期阶段(>84 h), 大部分有机酸含量逐步降低; 发酵终点时, 胞外、胞内乳酸、苹果酸含量较高.

关键词: 啤酒酵母; 发酵; 有机酸; 动态变化

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Preliminary Study on Organic Acid Produced by Beer Yeast

SUN Fu-bao^{1,2}, ZHAO Chang-xin¹, REN Hong-yan^{1,2}, WANG Shi-cong^{1,3}

(1. College of Bio & Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China; 2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 3. Dalian Huarun Beer Co. Ltd, Dalian 116033, China)

Abstract: Dynamic changes of organic acids in and out of cell of beer yeast under aerobic fermentation were determined in quality and quantity by HPLC technology. The results showed that, when beer yeast metabolizing organic acids in aeration condition, dynamic changes of each organic acid in and out of cell appeared conspicuous and attractive, and that the content of organic acids in the nutrient environment was much more than that in the inner cell. In the later stage nearly all the organic acids decreased, and in the end of fermentation, malic acid and lactic acid were both high in and out of the cell. The precise conservation and economical efficiency probably existed for yeast to metabolize organic acid.

Key words: beer yeast; fermentation; organic acid; dynamic change

由于有机酸本身所具有的酸味和特殊气味, 使得它对酒的风味影响的重要性仅次于酯类. 虽然酸类物质并不构成啤酒的香味, 但它是主要呈味物质. 啤酒酵母发酵所产的主要非挥发性风味有机酸

为乳酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、琥珀酸和酒石酸等, 它们之间的种类和含量随菌种及工艺不同而改变, 因而许多学者^[1,2]对微生物尤其是酵母菌的发酵菌种、机理、工艺等进行了研究. 胞内代谢物水平的信

收稿日期: 2004-11-02; 修回日期: 2004-12-29.

基金项目: 辽宁省教育厅高校科研基金项目(2020701093)资助课题.

作者简介: 孙付保(1975-), 男, 河南南阳人, 生物工程博士研究生.

息是描述细胞代谢控制的依据^[4].测定不同时间发酵液中柠檬酸、乳酸等有机酸,对于了解酿酒发酵过程的变化,进而对于从代谢工程的角度实现酵母生理代谢网络的功利化修饰、啤酒酵母生理代谢网络途径的优化或阻遏以及改变代谢流来优化工艺条件及操作参数等具有重要的理论及实践指导意义.鉴于此,作者尝试从啤酒酵母生长代谢的 6 种主要风味有机酸为研究平台,以探讨它们的动态走势和变化规律.

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 菌种 啤酒酵母由大连华润啤酒厂提供.

1.1.2 主要的培养基 蔗糖 100 g,蛋白胨 10 g, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 492 mg, Na_2HPO_4 895.4 mg, KH_2PO_4 13.610 g, CaCl_2 277.4 mg,加去离子水 1 000 mL.

1.1.3 仪器设备 超高速冷冻离心机(B-22M): Thermo IEC; 台式微波炉(National-NN-K580MFS):上海松下微波炉有限公司制造;0.22 μm 针筒式水膜过滤器,大连依利特公司制造;高效液相色谱仪(Jasco, Japan); $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ 柱(Jasco, Japan);10 $\mu\text{m} \times \varphi 3.9\text{ mm} \times 300\text{ mm}$;预分离柱: C_{18} 填料, Sep-Pak C_{18} (S-P 柱, 国产);流动相:0.01 mol/L KH_2PO_3 水溶液, pH 2.65 (磷酸调节).用 0.45 μm 孔径的合成纤维素酯滤膜进行真空超滤,超声波脱气 20 min.

1.1.4 有机酸标准溶液 标准有机酸溶液采用超纯水配制,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后备用.标准有机酸:酒石酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、乙酸和乳酸(色谱纯或分析纯);超纯水:娃哈哈纯净水经 0.45 μm 孔径的合成纤维素酯滤膜进行真空超滤.

1.2 实验方法

1.2.1 菌体培养 取新鲜酵母泥样品在 4 000 r/min 离心 5 min,然后用 6 $^\circ\text{C}$ 无菌去离子水反复洗涤 3 次后,沉淀酵母泥在无菌条件下接种,接种体积分数 0.6%.在恒温(20 ± 0.5) $^\circ\text{C}$,转速(210 ± 5) r/min 下摇床通风培养,每 12 h 取样检测.

1.2.2 pH 值的测定 先测量样液温度,然后直接用 PHS-3C 型精密 pH 计在该温度档进行测定.

1.2.3 还原糖的测定 培养基配比时葡萄糖含量较高,定期测还原糖时稀释 100 倍用二硝基苯酚(DNS)法进行测定^[4].

1.2.4 发酵液预处理 取 20 mL 发酵液,快速于 5 $^\circ\text{C}$,18 000 r/min 超高速冷冻离心 10 min.上清液

留样以测酵母细胞胞外有机酸备用,酵母沉淀物用去离子水反复洗涤离心 3 次后,10 mL 水转入 50 mL 小三角瓶中进行微波破壁.

1.2.5 酵母细胞的微波破壁 把处理过的待破壁样品放入微波炉中,破壁采用 20 s $\times$ 4 间歇式进行.间隔时间以小三角瓶降温到室温为宜.破壁完毕后用去离子水恢复定容到与原发酵液等体积.然后充分搅拌后静置 30 min,以使胞内物充分溶出,胞液溶解均匀.破碎液再超高速离心(18 000 r/min)10 min 后,上清液存样以便进行有机酸的 HPLC 定性定量分析^[5].

1.2.6 高效液相色谱法(HPLC)对有机酸的测定 色谱条件:流速为 0.7 mL/min;监测器波长:215 nm;柱压:100 kPa;柱温:室温;灵敏度:0.04;进样量:20 μL /次.

经上述 18 000 r/min 离心 10 min 后的发酵液,用一次性无菌注射器(2 mL)配合 0.22 μm 的针筒式水膜过滤器直接进样检测^[6].

2 结果与分析

2.1 通风培养时发酵液中的 pH 值和糖质量浓度变化

通风培养过程中,pH 值和糖含量的变化见表 1.

表 1 通风培养时 pH 值和糖质量浓度变化
Tab.1 Change of pH and sugar content in aeration

培养时间/h	pH 值	糖质量浓度/(mg/mL)
0	6.0	100.0
12	5.1	97.1
24	4.5	54.3
36	4.3	36.4
48	4.2	18.2
61	4.2	2.4
72	4.3	0.9

2.2 通风培养时酵母细胞胞外 6 种有机酸代谢的动态变化

在整个通风发酵过程中,用 HPLC 法对酒石酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、乙酸和乳酸等 6 种有机酸质量浓度变化进行 8 次的定性定量跟踪监测.6 种有机酸的动态变化见图 1 和表 2.由图 1 和表 2 可以看出,在通风培养条件下,有机酸代谢产生了阶段性动态变化.乳酸几乎自始至终质量浓度最高,发酵结束时仍为 3.2 mg/mL;乙酸一直含量比

较少,到发酵结束时几乎检测不到,这表明通风溶氧效果不错,酵母进行了正常的有氧代谢.而柠檬酸和琥珀酸的动态变化比较大,表明酵母对二者的代谢比较活跃,细胞在分泌柠檬酸和琥珀酸时存在经济效能性和精确保守性.结合孙付保等^[7]以及赵长新等人^[8]研究的啤酒酵母发酵过程离子含量动态变化结果,离子与啤酒酵母的生理代谢具有相关性,有机酸动态变化很可能是离子代谢的综合性响应结果.发酵终点时,乳酸质量浓度最高,苹果酸次之,其次为酒石酸、琥珀酸.其中柠檬酸到发酵终点时几乎检测不出.

表 2 通风培养时其中的 2 种有机酸的质量浓度
Tab.2 Concentration change of two organic acids in aeration

培养时间/h	乳酸质量浓度/(mg/mL)	乙酸质量浓度/(mg/mL)
12	5.8	0.7
24	5.2	0.9
36	6.8	0.8
48	7.4	0.7
60	8.3	—
72	7.9	—
84	1.1	—
96	3.2	—

注:“—”均表示未检出.

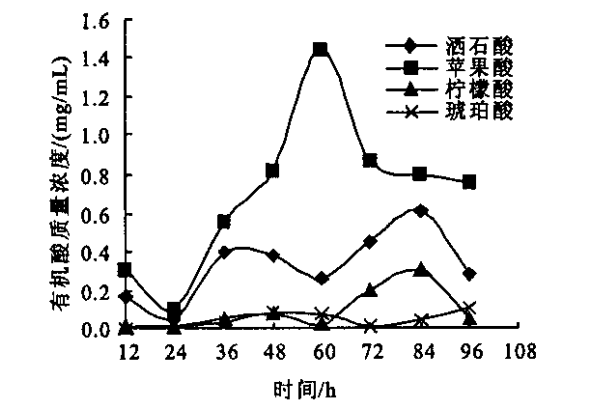


图 1 培养基中 4 种有机酸的动态变化
Fig.1 Dynamic change of four organic acids in nutrient environment

2.3 酵母细胞胞内 6 种有机酸代谢

通风发酵培养过程中,酵母胞内有机酸含量变化见图 2.图 2 表明:酒石酸、苹果酸、乳酸和乙酸有着非常相似的动态走势,表明酵母细胞内 4 种有机酸的代谢机理基本上是相同的;在发酵的最后阶段,4 种有机酸质量浓度都表现出不同程度的下降趋势;酒石酸质量浓度下降最多;在发酵终点时,乳酸和苹果酸质量浓度最高.

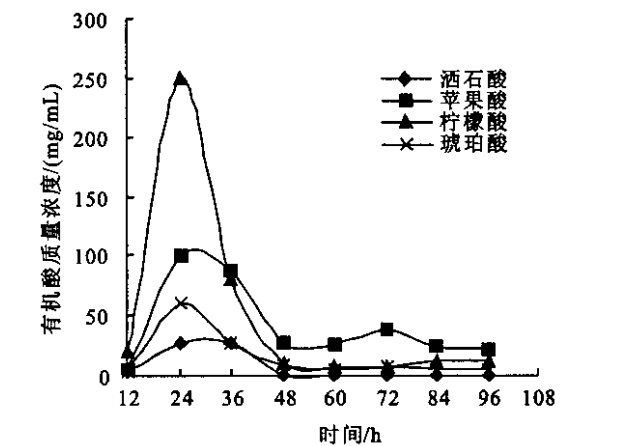


图 2 酵母细胞胞内 4 种有机酸质量浓度的变化
Fig.2 Concentration change of four organic acids in inner cell

在整个通风发酵的过程中,酵母细胞内柠檬酸和琥珀酸质量浓度变化见表 3.表 3 表明,胞内柠檬酸和琥珀酸质量浓度很低,几乎不存在,偶尔存在但很快被代谢.表明在酵母细胞内,柠檬酸和琥珀酸代谢变化迅速,这 2 种有机酸的代谢有着严格的准确性和经济性.

表 3 胞内柠檬酸和琥珀酸质量浓度变化
Tab.3 Concentration change of citric acid and amber acid in inner cell

培养时间/h	柠檬酸质量浓度/($\times 10^{-3}$ mg/mL)	琥珀酸质量浓度/($\times 10^{-3}$ mg/mL)
12	82.0	—
24	—	—
36	—	—
48	9.1	—
60	5.1	—
72	3.4	—
84	—	—
96	—	—

注:“—”表示未检出.

3 讨 论

在好氧培养条件下,有机酸在胞内有着非常相似的动态变化趋势,推断这几种有机酸可能有着非常亲缘性的代谢途径和生理机制.但胞外有机酸动态变化有显著的差异性,这种胞内外有机酸的不同走势很可能与有机酸跨膜运输能力的差异性有关.

从有机酸代谢的终点看,乳酸质量浓度最高,其次是苹果酸,它们大量积累的原因可能是:在胞内 TCA 循环途径中它们下游受阻或上游酶活高,

而且它们作为碳底物利用效能差,不像柠檬酸、琥珀酸、乙酸等被优先再循环利用;而琥珀酸、酒石酸和柠檬酸似乎是酵母优先利用效能最高的有机酸,它代谢变化迅速,酵母代谢的多个阶段几乎检测不出这些有机酸.可见,酵母细胞对这些有机酸的代谢已达到很精确、很经济的程度.

从胞内外的研究结果来看,酵母代谢时同一阶段检测到的胞内、胞外有机酸含量差别很大,除了破壁及提取方法的局限性致使有机酸有一定损失外,酵母细胞为了维持胞内环境代谢流的稳定性,很可能把产生的有机酸大量分泌到胞外,致使胞外有机酸含量高于胞内含量.

通风发酵后期阶段,酵母细胞日趋衰老凋亡,以及胞内 pH 值,渗透压,电化学梯度等因素的改变,导致大量有机酸作为经济性碳底物重新摄入胞内,从而引起后期阶段有机酸含量逐步降低,尤其是柠檬酸、乙酸、琥珀酸等表现得最为明显.

总之,啤酒酵母对某种有机酸的积累,造成不

同生理阶段、不同种类有机酸含量差异的原因十分复杂,不仅与代谢途径的相关酶系和代谢网络有关,还与有机酸跨膜运输和发酵后期阶段有机酸的分解有关.

4 结 论

1) 通风培养的酿酒酵母代谢产酸时,细胞胞外、胞内有机酸的动态变化存在差异性.

2) 酵母细胞对有机酸代谢存在着精确保守性、经济效能性,以柠檬酸作为碳底物表现最为明显;在发酵后期阶段大部分有机酸质量浓度逐步降低;发酵终点时,胞外以乳酸质量浓度最高,苹果酸次之,而胞内则以苹果酸质量浓度最高,其次是乳酸.

3) 胞外有机酸质量浓度远大于胞内有机酸质量浓度.

参考文献:

[1] 赵玉平,王春霞,杜连祥,等. 酵母菌发酵降低山楂汁有机酸含量的研究[J]. 食品工业科技,2003,10(24):71—73.
[2] 金海如,诸葛健. 不同发酵条件下产首油假丝酵母有机酸代谢的研究[J]. 微生物学报,2001,6(41):704—708.
[3] Stephanopoulos G. Metabolic engineering [J]. *Biotechnol Bioeng*,1998,58:119—120.
[4] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社,1980. 22.
[5] 刘传斌,王威,白凤武,等. 高山红景天愈伤组织中红景天甙的微波破细胞提取[J]. 过程工程学报,2001,3(1):324—327.
[6] 毕丽君,顾振宇. 固相萃取—反相 HPLC 分析色酒中有机酸[J]. 理化检验——化学分册,2000,4(36):163—165.
[7] 孙付保,任洪艳,窦少华,等. 离子与啤酒酵母生理代谢相关性的初步研究[J]. 中国酿造,2004,8(137):12—15.
[8] 赵长新,孙付保,窦少华,等. 啤酒酵母发酵过程中钠、钾、镁、钙等离子含量变化的检测[J]. 分析测试学报,2004,3(23):103—105.

(责任编辑:李春丽)

参考文献:

[1] 张平远. 美国研究用加工罗非鱼的废弃物作禽畜饲料之蛋白源[J]. 水产科技情报,2003,30(3):142—142.
[2] Aquerreta Y. Use of exogenous enzymes to elaborate the Roman fish sauce garum[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,2002,82(1): 107—112.
[3] Funatsu Y. A comparison of volatile compounds in fish sauces prepared from silver carp by use of soy sauce Koji and lactic acid bacteria with those in Chinese commercial fish sauces[J]. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*,2002,49(2):106—118.
[4] 张雪花,齐凤兰,陈舜胜,等. 鲢鱼露发酵工艺的研究[J]. 食品与发酵工业,2000,27(1):37—41.
[5] 王叔淳. 食品卫生检验技术手册[M]. 北京:化学工业出版社,1994. 131—136.
[6] 上海市酿造科学研究所. 发酵调味品生产技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998. 78—88.
[7] 沈子林、宋延. 关于酿造酱油食醋与复合调味料感官品评标准探讨[M]. 中国调味品,1997,218:27—29.
[8] 黎景丽,文一彪. 对鱼露生产工艺、呈味及其保健作用的探讨[M]. 中国酿造,2000,(3):24—27.
[9] Owen R Fennema. 食品化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2003. 301.

(责任编辑:李春丽)