

使用路德类酵母生产无醇啤酒

刘 杨¹, 李 红², 杜金华^{1,*}

(1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018; 2. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100027)

摘 要: 研究路德类酵母菌落和细胞形态特征及其利用麦汁中糖的特点, 发现其菌落为奶油色, 半透明, 有光泽, 表面光滑, 湿润, 质软, 中间凸起, 边缘整齐; 细胞为柠檬形, 较大, 两端出芽生殖。路德类酵母发酵 89.9% 的果糖和 91.9% 的葡萄糖, 而对于蔗糖的利用率达到 100%, 但是不发酵麦芽糖和麦芽三糖。将路德类酵母应用于发酵麦汁制得无醇啤酒, 并对其产酒精及风味物质的特点予以研究, 结果发现: 路德类酵母发酵麦汁产酒精量较低, 约只相当于同条件下普通啤酒酵母的 1/6, 当原麦汁浓度低于 8°P 时, 乙醇含量低于 0.5%; 风味物质的种类与普通啤酒基本相同, 但含量相对较低, 而与市售无醇啤酒相比, 酯类含量较少, 高级醇含量没有明显差异, 口感较接近。

关键词: 路德类酵母; 无醇啤酒; 发酵; 糖; 酒精; 风味

Non-alcoholic Beer Production by *Saccharomyces ludwigii*

LIU Yang¹, LI Hong², DU Jin-hua^{1,*}

(1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

Abstract: In this study, the colonies of *Saccharomyces ludwigii* were observed to have a cream-colored, translucent, glossy, humid and smooth surface with middle bulge and regular fringe, and the cells were large and lemon-shaped with budding at both ends. *Saccharomyces ludwigii* could ferment 89.9% fructose and 91.9% glucose and its rate of sucrose utilization was 100%, but it could ferment neither maltose nor maltotriose. *Saccharomyces ludwigii* was used for producing non-alcoholic beer. We determined the main physicochemical indices and main flavor compounds in final the fermentation broth. The results indicated that *Saccharomyces ludwigii* fermented wort produced a lower alcohol content, which was approximately 6 times less than that of common brewer's yeast fermentation under the same conditions. When the original wort concentration was lower than 8°P, the alcohol content of prepared beer was lower than 0.5% (V/V). The main flavor compounds were identical to those in common beers. Compared with the non-alcoholic beer available in markets, the obtained non-alcoholic beer had fewer esters, no obvious difference in high-grade alcohol and similar taste.

Key words: *Saccharomyces ludwigii*; non-alcoholic beer; fermentation; glucose; alcohol; flavor

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0186-05

随着人们对酒精危害认识的加深, 以及消费者对健康的关注越来越多, 无醇啤酒、无醇葡萄酒等无醇饮料渐渐走进人们的生活, 其中无醇啤酒更是受到消费者的青睐^[1]。我国国家标准对于无醇啤酒的规定除了要求酒精体积分数低于 0.5% 外, 还要求啤酒的原麦汁浓度大于等于 3.0°P^[2]。因此按照此定义在不考虑口感的情况下, 若将原麦汁浓度调整为 3.0°P, 采用普通啤酒酵母正常发酵, 发酵度为 65%, 则会产生约体积分数 1.2% 的酒精, 相当于无醇啤酒的 2.4 倍, 不符合国家标准的

要求, 因此, 采用纯粹啤酒酵母正常发酵是不能得到无醇啤酒的。

工业上主要通过两种方法生产无醇啤酒^[3], 一种是在生产高酒精啤酒的基础上, 通过反渗透、透析或蒸发等方法脱醇, 另一种是通过控制发酵减少酒精产生, 可以通过特殊酵母发酵来实现。

路德类酵母是一种特殊的酵母, 利用其发酵麦汁是符合国家标准对于“啤酒经酵母发酵而成”这一定义的要求^[2], 对此也有许多相关的研究报道^[4-6], 不需要进

收稿日期: 2010-11-23

作者简介: 刘杨(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵工程。E-mail: 494916581@163.com

* 通信作者: 杜金华(1963—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与酿酒技术。E-mail: djh@sdau.edu.cn

行安全性评价,使得这类酵母的实际应用技术门槛降低、易于实现工业化的应用。本实验主要研究路德类酵母的菌落与细胞形态,并使用其作为发酵菌种,进行麦汁发酵实验,发酵工艺同普通啤酒发酵(12℃),对路德类酵母的发酵特点予以探讨,并评价其应用于发酵无醇啤酒的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料、培养基与试剂

路德类酵母 CICC 32498 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心。

菌种固体培养基: 5°Bé 麦芽汁 1.0L, 琼脂 15.0g, 自然 pH 值; 液体发酵培养基: 11.5°P 麦汁。

琼脂 美国 Sigma 公司; 邻苯二胺(纯度≥99.0%) 北京市兴津化工厂; 盐酸(36%~38%) 北京化学试剂公司; 硫酸(95%~98%) 北京化工厂; 乙腈(纯度 99.9%) 北京捷特奥科贸有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-2401 分光光度计 日本岛津公司; Waters2695 液相色谱仪 美国 Waters 公司; Agilent 6890N 气相色谱仪 美国安捷伦公司; 5611 SCABA 全自动啤酒分析仪 瑞士 Foss 公司; DL-50 自动滴定仪 上海天美生化仪器设备有限公司; LRH-250A 型生化培养箱 广东省医疗器械厂; OLYMPUS CH20 显微镜 日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 发酵方法

先进行菌种活化,即 10mL 麦汁接入一环菌种,28℃ 培养 24h。500mL 三角瓶装入 300mL 麦汁,将活化培养的菌种倒入三角瓶,在 12℃ 恒温培养,每天早晚摇瓶两次,将沉于瓶底的酵母泥摇起即可(注意不要将发酵栓中的硫酸摇出),称质量一次,至质量损失在 0.2g 以下发酵结束^[7]。为了模拟大生产发酵,考察酵母的发酵性能在放大实验中是否一致、稳定,选用 2000mL 量筒装有 2000mL 麦汁,发酵方法同三角瓶发酵^[8]。

1.3.2 菌落及细胞形态特征

将路德类酵母稀释涂布在麦汁琼脂平板上,观察酵母的菌落特征。将平板上的菌种挑下少许,置于载玻片上,借助显微镜观察菌株的细胞形态^[9]。

1.3.3 指标测定方法

发酵液糖组分分析采用 Waters2695 高效液相色谱仪,参照文献[10]中的方法,并根据实际情况稍作修改。示差折光检测器: Waters 2414; 流动相: 75% 乙腈; 流速: 1.4mL/min; 色谱柱: Waters symmetry-C₁₈ 柱(4.6mm × 150mm, 5 μm); 进样量: 10 μL; 柱温: 35℃。

乙醇、原麦汁浓度、发酵度: 采用 SCABA 全自动啤酒分析仪测定; pH 值、总酸: 采用 DL-50 自动滴定仪测定; 利用气相色谱法^[11]测定双乙酰含量,根据实际情况设定条件; 采用气相色谱法^[12-13]检测啤酒中的风味物质含量。

1.3.4 感官评价

取发酵结束的路德类酵母发酵液,组织专业品评人员以市售无醇啤酒为参照,对发酵液的外观、香气特征、口感及有无明显缺陷予以评价。

2 结果与分析

2.1 路德类酵母菌落及细胞形态特征

2.1.1 菌落特征

用肉眼观察路德类酵母的菌落特征,并与啤酒酵母进行比较,结果见图 1。

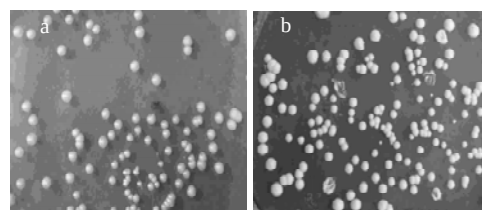


图 1 路德类酵母(a)与啤酒酵母(b)的菌落特征
Fig.1 Colony characteristics of *Saccharomyces ludwigii* (a) and *Saccharomyces cerevisiae* (b)

从图 1 可以看出,路德类酵母菌落为奶油色、半透明、有光泽、表面光滑、湿润、质软、中间凸起、边缘整齐;与之不同的是啤酒酵母菌落为乳白色、不透明、且较大。

2.1.2 细胞形态特征

借助显微镜观察菌株的细胞形态,并与啤酒酵母进行比较,结果见图 2。

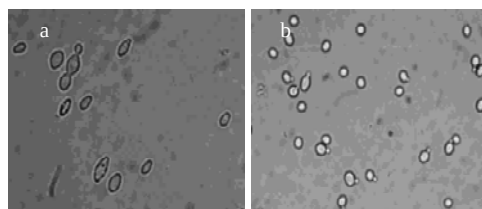


图 2 路德类酵母(a)与啤酒酵母(b)细胞显微照片(10 × 40)
Fig.2 Micrographs of *Saccharomyces ludwigii* (a) and *Saccharomyces cerevisiae* (b) cells

从图 2 可以看出,路德类酵母细胞为柠檬形,较大,两端出芽生殖;啤酒酵母细胞为圆形或卵圆形,较小,单边出芽生殖。

2.2 路德类酵母利用糖的特点

将路德类酵母接种于麦汁进行发酵实验, 发酵结束后, 测定糖组分, 结果见表1、2。在发酵终了的发酵液中未检测出蔗糖, 葡萄糖和果糖也只有少量存在, 而麦芽糖和麦芽三糖与麦汁中含量相近。而与表1中数据相比, 表2中果糖和葡萄糖的利用率有所降低, 但是相差不大, 不到10%, 说明路德类酵母2000mL量筒发酵与三角瓶发酵基本一致, 路德类酵母发酵性能较稳定。

表1 路德类酵母300mL三角瓶发酵对糖的利用

Table 1 Glucose utilization during *Saccharomyces ludwigii* fermentation in 300 mL triangular flask

项目	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	麦芽三糖	总糖
原麦汁中糖质量浓度/(g/L)	1.99	13.13	1.55	60.55	15.11	92.33
发酵液中糖质量浓度/(g/L)	0.20	1.07	—	60.69	14.92	76.88
糖利用率/%	89.9	91.9	100	0.0	1.2	16.7

注: —, 未检出。下同。

表2 路德类酵母2000mL量筒发酵对糖的利用

Table 2 Glucose utilization during *Saccharomyces ludwigii* fermentation in 2000 mL graduated cylinder

项目	果糖	葡萄糖	蔗糖	麦芽糖	麦芽三糖	总糖
麦汁中糖质量浓度/(g/L)	1.76	13.01	1.72	60.70	13.55	90.64
发酵液中糖质量浓度/(g/L)	0.32	2.16	—	61.00	13.60	77.80
糖利用率/%	81.8	83.6	100.0	0.0	0.0	14.2

用消耗糖的质量浓度与发酵初始糖的质量浓度的百分比^[14]表示糖利用率, 发现路德类酵母对蔗糖的利用率达到100%, 果糖和葡萄糖分别为89.9%、91.9%, 麦芽糖和麦芽三糖的利用率几乎为零, 说明路德类酵母具有只发酵部分果糖、葡萄糖和全部的蔗糖, 不发酵麦芽糖和麦芽三糖的特性, 与文献[15]报道的结果一致。

2.3 发酵麦汁的特点

2.3.1 发酵速度

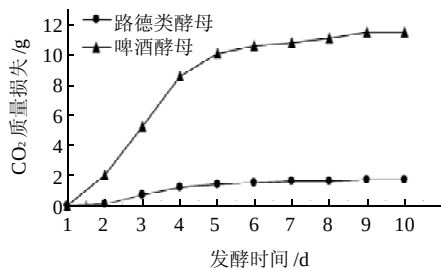


图3 路德类酵母与啤酒酵母发酵每日CO₂质量损失

Fig.3 Daily CO₂ loss during *Saccharomyces ludwigii* and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation

采用三角瓶发酵, 每天定期摇动, 除去CO₂后测得瓶中液体与瓶质量, 与前1d的质量相比较, 其差值反应每天的降糖克数^[9], 以此来表示菌株的发酵速度。从图3可以看出, 路德类酵母的降糖低于2g, 约是啤酒酵母降糖的1/6, 而酒精是糖代谢的副产物, 因此, 路德类酵母发酵产生的酒精比啤酒酵母低得多。因此, 利用其发酵无醇啤酒时, 不需要频繁监控发酵液的发酵度和酒精含量, 使得生产过程简单, 易于操作。降糖规律与啤酒酵母相似: 最大降糖速度发生在第3、4天, 第4天以后, 降糖速度开始变缓, 基本保持不变。

2.3.2 发酵液理化指标

表3 路德类酵母发酵液的主要理化指标(n=4)

Table 3 Major physico-chemical indices of *Saccharomyces ludwigii* fermentation broth in 300 mL triangular flask (n=4)

菌种	原麦汁 浓度/°P	发酵 度/%	乙醇体积 分数/%	pH	总酸/ (mL/100mL)	双乙酰质量浓 度/(mg/L)
路德类酵母	11.74	12.7	0.86	4.57	1.56	0.020
啤酒酵母	11.89	67.7	5.09	4.21	1.94	0.035

由表3可见, 路德类酵母与啤酒酵母发酵液的主要差异表现在: 路德类酵母的发酵度低的多, 只有12.7%, 这与其发酵液中较高的残糖量是相关的。产生0.86%酒精, 约相当于啤酒酵母的1/6。如果将发酵度固定在12%, 要使酒精含量为0.5%以下, 那么原麦汁浓度应该控制在7°P以下, 为了证明这一观点, 利用酿造水将原麦汁浓度调为6、7、8、9°P, 然后接种路德类酵母进行发酵, 发现原麦汁浓度在8°P以下的麦汁经过发酵酒精含量低于0.5%。路德类酵母发酵液pH4.57, 略高于啤酒酵母, 而总酸较低, 这是因为路德类酵母发酵麦汁的能力弱于啤酒酵母, 因此, 发酵过程中产生的酸也较少, 另外, 通过产酸实验也可以发现其产酸能力较低。发酵液口感较柔和, 不会有市售啤酒酸感露头的现象。而路德类酵母还原双乙酰的能力要强于啤酒酵母。

为了接近大生产的发酵情况, 采用2000mL量筒进行实验, 结果见表4。理化指标都在正常范围内, 说明路德类酵母在大生产中的发酵性能与三角瓶发酵基本一致。

表4 路德类酵母2000mL量筒发酵液的主要理化指标

Table 4 Major physico-chemical indices of *Saccharomyces ludwigii* fermentation broth in 2000 mL graduated cylinder

菌种	原麦汁 浓度/°P	发酵 度/%	乙醇体积 分数/%	pH	双乙酰质量 浓度/(μg/L)
路德类酵母	8.11	9.40	0.47	4.59	19.56
啤酒酵母	8.21	67.2	5.12	4.23	40.19

表5 路德类酵母三角瓶发酵液中主要风味物质

Table 5 Major flavor components in *Saccharomyces ludwigii* fermentation broth in 300 mL triangular flask

菌种	乙醛	二甲基硫(DMS)	甲酸乙酯	乙酸乙酯	乙酸异丁酯	正丙醇	异丁醇	乙酸异戊酯	异戊醇	己酸乙酯
路德类酵母	4.97	0.015	0.001	1.85	—	2.74	10.13	0.033	26.23	0.008
啤酒酵母	5.78	0.021	0.137	28.54	0.0545	14.94	10.57	3.60	63.71	0.16

注：—，该物质含量低于仪器的检出限，未检出。下同。

2.4 路德类酵母发酵液微量香味成分的特征

由表5可以看出，路德类酵母发酵液中几乎含有所有普通啤酒中主要的风味物质，但是不含有乙酸异丁酯，而且主要风味物质的含量相对较少，尤其是酯类和正丙醇。但是风味口感没有差异，这一点在后面与市售无醇啤酒比较中也得到了说明。

2.5 与市售无醇啤酒的比较

市售的无醇啤酒大都是原麦汁浓度为10、11°P的普通优质啤酒经过脱醇处理制成的，通过检测分析，脱醇后的啤酒原麦汁浓度大约都在5°P，因此，为了使残糖具有一定的可比性，而且满足国家标准大于等于3.0°P的要求，将路德类酵母发酵11.5°P的麦汁得到的无醇啤酒原麦汁浓度也稀释成5°P，另外，这个浓度条件下的口感是较好的。比较结果分别见表6、7。

表6 路德类酵母发酵的无醇啤酒与市售无醇啤酒的风味物质比较

Table 6 Flavor components of non-alcoholic beer obtained in this study and non-alcoholic beers available in markets

风味物质 质量浓度/ (mg/L)	制备方法			
	样品1 真空蒸馏脱醇法	样品2 低温蒸馏法	样品3 低温反渗透膜过滤脱醇	样品4 路德类酵母发酵
乙醛	3.01	2.38	1.56	2.11
DMS	0.008	0.019	0.012	0.007
甲酸乙酯	—	—	—	—
乙酸乙酯	2.36	6.35	2.84	0.79
乙酸异丁酯	0.010	0.016	0.013	—
正丙醇	1.37	1.92	6.12	1.47
异丁醇	2.50	1.97	10.69	4.31
乙酸异戊酯	0.17	0.82	0.74	0.01
异戊醇	8.64	10.26	61.31	11.16
己酸乙酯	0.066	0.085	0.280	0.003

由表6可看出，不同方法制备的无醇啤酒风味物质有一定差别，主要表现在DMS和高级醇含量差异较大，特别是异戊醇含量相差可达到6倍以上，路德类酵母发酵产生的高级醇在市售无醇啤酒高级醇含量范围内，但是酯类含量要少于市售无醇啤酒。

由表7可见，在残糖方面，果糖、葡萄糖和蔗糖含量没有明显差异，且含量都较低，差异较大的是麦芽糖和麦芽三糖的含量，因为路德类酵母不发酵这两种糖，所以大量存在于啤酒中，而市售无醇啤酒，是

使用完全发酵的啤酒经过脱醇制得的，因此，啤酒中麦芽糖和麦芽三糖含量很少。

表7 路德类酵母发酵的无醇啤酒与市售无醇啤酒中的残糖比较

Table 7 Residual sugars in non-alcoholic beer obtained in this study and non-alcoholic beers available in markets

残糖 质量浓度/ (g/L)	制备方法			
	样品1 真空蒸馏脱醇法	样品2 低温蒸馏法	样品3 低温反渗透膜过滤脱醇	样品4 路德类酵母发酵
果糖	0.38	0.30	—	0.085
葡萄糖	0.61	0.46	0.59	0.46
蔗糖	—	—	—	—
麦芽糖	2.22	2.69	1.12	25.83
麦芽三糖	1.17	4.69	2.44	6.35
总糖	6.38	11.14	4.10	32.72

2.6 感官评价

综合若干品评员的品评，总结出路德类酵母所制无醇啤酒的特点：清亮透明，无浑浊，有类似于菊花香，较温和，原麦汁浓度较高时有甜味，低于8°P以下时甜味消失，并且没有麦汁味，这可能与较少的乙醛含量有关，有文献报道麦汁味是醛类引起的^[16-17]，这一点是优于限制啤酒酵母发酵法的，限制性发酵制得的无醇啤酒具有麦汁味^[16]。但是路德类酵母发酵也存在一些问题：所制备的啤酒没有杀口感，没有泡沫，口感较淡，香气较弱。

3 结 论

路德类酵母具有只发酵果糖、葡萄糖和蔗糖，不发酵麦芽糖和麦芽三糖的特性，这使得发酵后的残糖含量较高，使发酵液具有甜味，这可以通过降低原麦汁浓度或是改变糖化工艺降低麦汁中糖的含量来解决。实验发现：原麦汁浓度在8°P以下时，发酵液中乙醇含量低于0.5%，且没有甜味、没有麦汁味；pH值偏高，在4.5以上；双乙酰含量较低；风味物质种类与普通啤酒中基本相同，但含量相对较少，与市售脱醇法制得的无醇啤酒相比，酯类较少，高级醇含量相当。口感与普通啤酒和市售无醇啤酒相近。

路德类酵母发酵过程中不需要频繁监控发酵液的发酵度和酒精含量，易于控制，发酵工艺简单，不需要额外的设备，成本较低，产品的口感也较好，利用路

德类酵母发酵生产无醇啤酒是可行的,但是在应用过程中还存在一些问题:在改变糖化和发酵工艺减少残糖含量,以及稳定性等方面还需要更多、更深入的研究。

参考文献:

- [1] THIERAUF A, GNANN H, WOHLFARTH A. Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulphate after the consumption of "non-alcoholic" beer[J]. *Forensic Science International*, 2010, 202(1/3): 82-85.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB 4927—2008 啤酒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [3] van IERSEL M F M, MEERSMAN E, SWINKELS W, et al. Continuous production of non-alcohol beer by immobilized yeast at low temperature[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995, 14(6): 495-501.
- [4] NARZISS L, MIEDANER H, KERN E, et al. Technology and composition of non-alcoholic beers[J]. *Brauwelt International*, 1992(4): 396-398; 400-410.
- [5] 刘天明, 王慧, 刘庆军, 等. 产香白地霉发酵无醇绿啤饮料研究[J]. *酿酒科技*, 2007(10): 78-80.
- [6] 徐朝晖. 低醇啤酒与无醇啤酒工艺概述[J]. *酿酒*, 2003, 30(6): 59-60.
- [7] 陈旭, 王德良. 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变选育低产蛋白酶A啤酒酵母的研究[J]. *食品与机械*, 2009, 25(4): 35-37.
- [8] 高萍. 淡爽型啤酒酵母的筛选[J]. *啤酒科技*, 2004(2): 18-20.
- [9] ROMANO P, MARCHESE R, LAURITA C. Biotechnological suitability of *Saccharomyces ludwigii* for fermented beverages[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 1999, 15(4): 451-454.
- [10] 王德良, 孙君杜, 宋绪磊, 等. 筛选啤酒酵母的标准培养基研究[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(3): 78-82.
- [11] 吴勤民. 啤酒中连二酮含量测定方法的比较与分析[J]. *酿酒科技*, 2007(9): 101-103.
- [12] 康黎东. 不同顶空进样技术的特点及在啤酒行业中的应用[J]. *啤酒科技*, 2005(5): 64-66.
- [13] 王云川, 李红, 刘伟成, 等. 采用气相色谱-质谱分析啤酒中的风味物质[J]. *食品与发酵工业*, 2004, 30(11): 90-94.
- [14] 朱均均, 勇强, 陈尚钊. 四株酵母乙醇发酵的初步研究[J]. *生物化学工程*, 2010, 44(2): 9-14.
- [15] 陈日云, 马胜平. 无醇啤酒的制备方法及其酒精含量的测定[J]. *啤酒科技*, 2004(3): 29-31.
- [16] MONTANARI L, MARCONI O, MAYER H, et al. Production of alcohol-free beer[M]//VICTOR R. Beer in health and disease prevention. Waltham: Academic Press, 2009: 61-75.
- [17] PERPÉTE P, COLLIN S. Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception[J]. *Food Chemistry*, 2000, 71(3): 379-385.