

# 啤酒发酵过程中甲醛代谢影响因素初步研究

林小荣<sup>1,2</sup>, 任思洁<sup>2</sup>, 李 未<sup>3</sup>, 刘北斗<sup>3</sup>, 陆 健<sup>1,2,\*</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036 ; 2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214036;  
3. 安徽省滁州市圣力酿酒有限公司, 安徽 滁州 239000)

**摘 要:** 甲醛是啤酒酵母的一种代谢产物, 在啤酒发酵过程中, 甲醛经历了积累和随后的还原两个阶段, 通过引入甲醛峰值和谷值两个概念研究了啤酒生产过程中的一些影响甲醛积累和还原的控制, 结果表明: (1) 过低或过高的麦汁溶氧量均会增加甲醛的积累, 在 12~13mg/L 的麦汁溶氧条件下甲醛积累最小。(2) 低代酵母甲醛积累要少于高代酵母, 并且低代酵母在后期甲醛的还原能力要高于高代酵母, 酵母接种量在  $2 \times 10^7$  个/ml 时甲醛峰值最低。(3) 相对较高的还原温度有利于甲醛还原。(4) 麦汁浓度对甲醛的积累影响较大, 高麦汁浓度条件下的甲醛峰值要比低麦汁浓度高出许多。(5) 啤酒酿造后期延长还原时间并不能显著增加甲醛的还原量。

**关键词:** 啤酒; 甲醛; 影响因素

## Study on Factors Affecting Formaldehyde Metabolism in Beer Brewing

LIN Xiao-rong<sup>1,2</sup>, REN Si-jie<sup>2</sup>, LI Wei<sup>3</sup>, LIU Bei-dou<sup>3</sup>, LU Jian<sup>1,2,\*</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;  
2. School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China;  
3. Anhui Shengli Beer Brewing Co. Ltd., Chuzhou 239000, China)

**Abstract:** Formaldehyde is produced by yeast metabolism. It is accumulated and then reduced during beer brewing. The peak value and valley value of formaldehyde concentration during beer brewing were employed to describe the formaldehyde accumulation and reduction in this paper. Results showed that: (1) Higher peak value was gained when the dissolved oxygen concentration is too high or too low in the wort. The optimal concentration of dissolved oxygen in wort for less formaldehyde accumulation is 12~13mg/L. Lower peak value or valley value is gained by brewing with lower generation yeasts inoculated. (2) The optimal inoculum size for less formaldehyde accumulation is about  $2 \times 10^7$  cell/ml. (3) More formaldehyde is reduced with higher reduction temperature. (4) The original extract concentration in wort affects the formaldehyde metabolism. Higher original extract concentration results more formaldehyde accumulated during beer brewing. (5) It has little effect on the formaldehyde reduction by prolonging the reduction time.

**Key words:** beer; formaldehyde; factors

中图分类号: 0815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0191-05

我国 2004 年啤酒产量已经超过 2900 万 kL, 总产量位居世界第一。啤酒中的甲醛主要来源于外加以及酵母

代谢过程, 甲醛本身是一种毒性物质, 并且在人体中有一定的积累作用<sup>[1]</sup>。出于对食品安全以及提升啤酒质

收稿日期: 2005-11-09

\*通讯作者

作者简介: 林小荣(1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为啤酒非生物稳定性。

马铃薯, 2000, 14(3): 158-161.

[9] 张勇, 池建伟, 温其标, 等. 香蕉酶促褐变的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 45-48.

[10] PIZZOCARO F, et al. Inhibition of apple polyphenol oxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride[J]. J Food Proc and Pres, 1993, 17: 21-30.

[11] 姜绍通, 罗志刚, 郑志, 等. 甘薯加工过程酶促褐变及控制研究[J]. 农业工程学报, 2001, 17(2): 136-139.

[12] 杨剑平. 二氧化硫及亚硫酸盐在食品加工中的应用[J]. 山东罐头科技, 1990(2): 14-18.

[13] 周德庆, 张双灵, 辛胜昌. 亚硫酸盐在食品加工中的作用及其应用[J]. 食品科学, 2004, 25(12): 198-201.

量的考虑,国内绝大部分企业已经停止了在啤酒酿造过程中外加甲醛。国家农业部也制定了《绿色食品啤酒标准》,明确规定了绿色食品啤酒中甲醛含量要 $0.2\text{mg/L}$ 。生产实践中发现,成品啤酒中甲醛残留量的多少不仅与酿造过程中加不加甲醛有关还与酿造过程中的工艺控制因素有关。本文主要研究了啤酒生产过程中影响甲醛代谢的一些因素,目的是为了更好的控制甲醛在成品啤酒中的残留量。

目前有关甲醛代谢的研究表明<sup>[2-5]</sup>甲醛代谢途径主要如下图所示(见图1),当中涉及的酶类主要有甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase,简称MoDH)、甲醛脱氢酶(formaldehyde dehydrogenase,简称FdDH)、甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase,简称FDH),啤酒中的甲醛主要来自于甲醇的氧化脱氢,在甲醛脱氢酶的作用下又继续氧化成甲酸,然后在甲酸脱氢酶作用下继续氧化生成二氧化碳,而同时MoDH的作用是双向的,在甲醛产生以后,其也会将甲醛还原,这一点类似于双乙酰在醇脱氢酶作用下的还原,因此甲醛只是甲醇氧化的一个中间代谢产物,其经历一个先积累后还原的过程。在这过程中与甲醛积累最关键的酶便是FdDH,FdDH的活性与微生物耐受甲醛能力有很大关系,而谷胱甘肽(glutathione,简称GSH)的存在能加大FdDH的作用效果<sup>[6-8]</sup>。

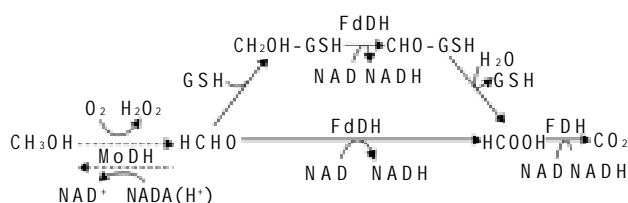


图1 酵母甲醛代谢途径

Fig.1 Metabolism approach of formaldehyde in yeast

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* G-03) 安徽圣力酿酒有限公司。

### 1.2 试剂与设备

4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (4-氨基-3-联氨-5巯基-1,2,4-三氮杂茂,简称AHMT)分析纯 Sigma公司;甲醛、 $\text{KIO}_4$ 、EDTA、KOH,均为分析纯。

721数字式分光光度计 上海;orbisphere 3650型溶氧测定仪 瑞士。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 甲醛含量的测定

参见农业部《绿色食品啤酒》标准,GB/NY/T273-

2002。

#### 1.3.2 50kL大罐发酵工艺

选择优质的麦芽,辅料为大米,用量为35%,糖化麦汁浓度9度,煮沸时间为80min,主酵温度为9(11度麦汁主酵温度为11),接种酵母数为 $1.5 \times 10^7$ 个/ml,当双乙酰降至 $0.1\text{mg/L}$ 以下时,开始降温,在0低温贮藏6~7d,然后倒罐,3d后过滤。

#### 1.3.3 三角瓶发酵实验

##### 1.3.3.1 麦汁溶氧对甲醛形成的影响

取6组500ml三角瓶,灭菌,每组依次加入充氧时间20、40、60、80、100、120min的麦汁300ml,同时记录麦汁的溶氧,每组设三个平行样,接种量为 $1.5 \times 10^7$ 个/ml,进行发酵,每天跟踪检测甲醛含量。

##### 1.3.3.2 不同酵母代数对甲醛形成的影响

取5组500ml三角瓶,加入300ml麦汁,灭菌,依次接入0代到4代酵母接种量为 $1.5 \times 10^7$ 个/ml,进行发酵,每天跟踪检测甲醛含量。

##### 1.3.3.3 还原温度对甲醛还原的影响

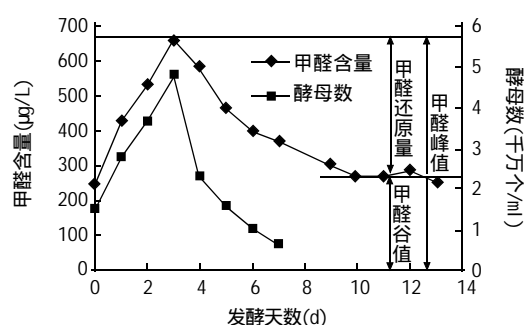
取4组500ml三角瓶,每组6个,加入300ml麦汁,灭菌,接种量为 $1.5 \times 10^7$ 个/ml,进行发酵,3d后(甲醛含量在3d时达到峰值),各组分别置于9、12、14、16进行甲醛的还原过程,跟踪记录甲醛的还原过程。

##### 1.3.3.4 麦汁浓度对甲醛形成和还原的影响

取4组500ml三角瓶,分别加入浓度为7、9、11、14度的麦汁300ml,灭菌,接种量为 $1.5 \times 10^7$ 个/ml,进行发酵,每天跟踪检测甲醛的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲醛峰值与甲醛谷值



曲线为取5批实验平均值后所得。

图2 啤酒大罐发酵过程中甲醛含量的变化情况

Fig.2 The diversity of formaldehyde concentration during beer brewing in vessel

甲醛在啤酒发酵过程中的变化情况如图2所示,在啤酒发酵初期,酵母生长过程中甲醛含量不断升高,达到峰值(称为甲醛峰值),随后甲醛含量不断下降,直到

一稳定值(称为甲醛谷值),并围绕这一值上下波动,而将两者之差称为甲醛还原量。甲醛峰值与谷值两者之间具有很好的相关性(见图3),对成品啤酒中甲醛含量的控制主要就是其生成和还原两个阶段,因此本研究过程中,选取甲醛峰值和谷值这两个指标具体评价甲醛的生成和还原。同时还发现甲醛的产生与酵母生长有很好的相关性,甲醛峰值与酵母峰值在同一天出现。

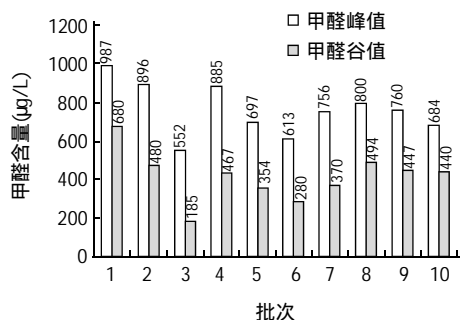


图3 10批啤酒大罐发酵过程的甲醛峰值和谷值

Fig.3 The peak value and galley value gained after continue determination of the formaldehyde concentration of 10 batch beer brewed in vessel

## 2.2 啤酒发酵过程中甲醛代谢影响因素探讨

### 2.2.1 麦汁溶氧对甲醛形成的影响

麦汁溶氧是啤酒生产中非常重要的一个指标,它直接影响着酵母的生长,由于甲醛是酵母代谢的产物,甲醛的产生及积累与酵母生长相关的控制因素肯定有内在的联系。从三角瓶发酵实验可以看出(表1),甲醛峰值随着麦汁溶氧的增加先减小随后增大的趋势,当麦汁溶氧在12~13mg/L时甲醛峰值最低。50kL大罐发酵结果

表1 三角瓶发酵麦汁溶氧对甲醛峰值的影响

Table 1 Effect of dissolved oxygen concentration on the peak value of formaldehyde concentration in beer brewed in flask

麦汁溶氧(mg/L)	7.6	9.2	12.1	13.6	15.2	16.4
甲醛峰值(μg/L)	638	520	440	463	478	583

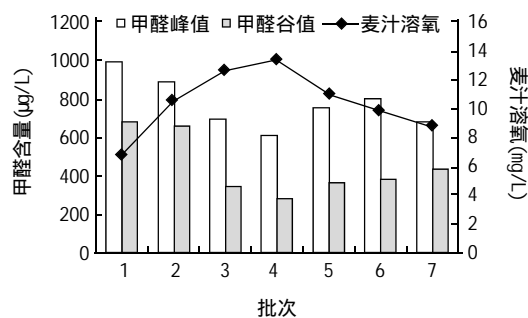


图4 大罐发酵麦汁溶氧对甲醛峰值和谷值的影响

Fig.4 Effect of dissolved oxygen concentration on the peak value and galley value of formaldehyde concentration in beer brewed in vessel

与三角瓶发酵结果类似(图4),当发酵罐中麦汁溶氧相对较高时(13mg/L),甲醛峰值与谷值较低。

甲醛主要由甲醇氧化后形成,然后在FdDH、FDH的作用下逐步氧化为二氧化碳,而FdDH、FDH均以 $NAD^+$ 作为电子受体(图1),如果缺乏 $NAD^+$ 便会影响这两个酶的作用,造成甲醛积累;在低麦汁溶氧条件下,酵母代谢途径主要是糖酵解途径(EMP),EMP途径消耗了大量FdDH、FDH作用所需的 $NAD^+$ 。同时, $NAD^+$ 还原成 $NADH$ 的氧化还原电势很高,在发酵初期,由于环境的氧化还原电势较高, $NAD^+$ 还原成 $NADH$ 就需要消耗更高的能量,而EMP途径产能较低也不利于 $NAD^+$ 的还原,造成甲醛大量积累;而在相对高一些麦汁溶氧条件下酵母生长快,酵母滞缓期短,酵母代谢虽然也是通过EMP途径,但是酵母发酵初期在氧浓度相对较高的条件下可以通过电子传递链产生大量 $NAD^+$ 还原所需的能量,同时补充FdDH、FDH所需的 $NAD^+$ ,甲醛积累相对就较少,同时在相对较高麦汁溶氧条件下,酵母生长迅速,酵母氨基酸合成代谢也相应加快, $NAD^+$ 在-酮酸经转氨酶催化转变成氨基酸时大量产生,也可以补偿EMP所途径消耗的 $NAD^+$ 。但是当麦汁中的溶氧过高时,甲醇氧化也会加强,酵母生长过快,EMP途径严重超载, $NAD^+$ 供应不足,反而不利于甲醛的转化,也会造成甲醛的积累。因此适量的溶氧有助于降低最终成品啤酒甲醛的含量。

### 2.2.2 酵母接种量对甲醛产生的影响

由于甲醛是酵母代谢的产物,因此接种酵母数的多少与增殖倍数的高低会影响甲醛的生成量。从实验情况来看,在大罐发酵时,随着酵母接种数的增加,酵母增殖倍数逐渐减小(图5),而甲醛峰值则符合先降低后升高的趋势,当接种酵母数比较少时,酵母增殖倍数较高,产生的甲醛就多;当继续增大接种酵母数时,酵母增殖倍数减小,产生甲醛的量也相应减少;而当酵母接种数过多时,酵母增殖倍数迅速减小,同时造成发酵开始阶段糖酵解途径超载, $NAD^+$ 供应不足,造成甲

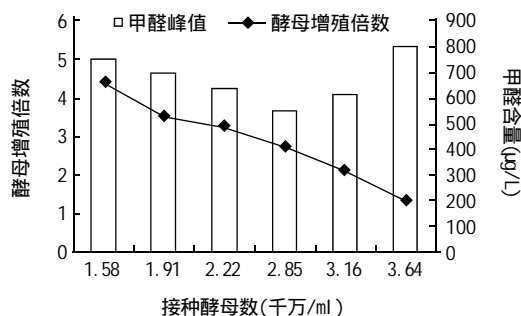


图5 不同酵母接种量条件下的酵母增殖倍数、甲醛峰值

Fig.5 The multiple of yeast generation, peak value of formaldehyde concentration under different inoculum sizes

醛积累。此外甲醛的产生与积累不仅与酵母增殖多少有关,还与酵母增殖过程中甲醛还原的酶系有关,过低的酵母增殖量会造成甲醛降解酶系包括 FdDH、FDH、MoDH 的生成量减少,酶活降低,因此甲醛峰值反而又有所上升。

### 2.2.3 不同酵母代数对甲醛产生的影响

低代酵母活性高,生长迅速,主酵过后在发酵液中悬浮的酵母多,酵母分泌的还原酶也多,因此一系列依赖酵母分泌酶所催化的氧化还原反应的速度会明显高于高代酵母。而甲醛在后期的还原也有赖于酵母分泌的甲醇脱氢酶催化反应的进行。从不同代数酵母产甲醛的情况来看,低代酵母甲醛峰值产生在主酵的第3d至第5d,而高代酵母的甲醛峰值一般在5d以后,并且甲醛峰值要高于低代酵母的(表2、3),而低代酵母的优势更在于甲醛的还原,从跟踪大罐发酵情况来看,0代酵母的甲醛还原量(甲醛峰值-甲醛谷值)平均为343 $\mu\text{g/L}$ ,而4代酵母甲醛还原量平均只有238 $\mu\text{g/L}$ 。这表明低代酵母对甲醛还原的优势。

表2 三角瓶发酵酵母代数对甲醛峰值和谷值的影响

Table 2 Effect of yeast generation on the peak value and galley value of formaldehyde concentration in beer brewed in flask

酵母代数	0	1	2	3	4
甲醛峰值( $\mu\text{g/L}$ )	489	523	530	634	668
甲醛谷值( $\mu\text{g/L}$ )	276	358	412	426	502

表3 大罐跟踪酵母代数对甲醛峰值和谷值的影响

Table 3 Effect of yeast generation on the peak value and galley value of formaldehyde concentration in beer brewed in vessel

批次	1	2	3	4	5	6	7	8
酵母代数	0	0	0	0	4	4	4	4
达到峰值天数(d)	3	3	3	5	5	7	6	5
甲醛峰值( $\mu\text{g/L}$ )	626	552	613	756	987	885	760	684
甲醛谷值( $\mu\text{g/L}$ )	341	185	280	370	680	662	520	500
甲醛还原量( $\mu\text{g/L}$ )	285	367	333	386	307	223	240	184

### 2.2.4 还原温度对甲醛还原的影响

通过改变甲醛还原温度了解其对甲醛还原的影响,如同双乙酰还原一样,由于醇脱氢酶催化反应是一个温度函数,适当提高还原温度可以加速双乙酰的还原,而甲醇脱氢酶也属于醇脱氢酶类,也具备相同的性质,因此适当提高还原温度应有助于甲醛的还原,而实验结果证实了这一点。具体见图6,还原温度的提高有助于甲醛的还原,降低最终发酵液中甲醛的残留量,此实验在三角瓶中完成。

### 2.2.5 麦汁浓度对甲醛产生和还原的影响

从三角瓶发酵结果可以看出,低麦汁浓度条件下,甲醛峰值较低;在低麦汁浓度条件下,甲醛还原也比高

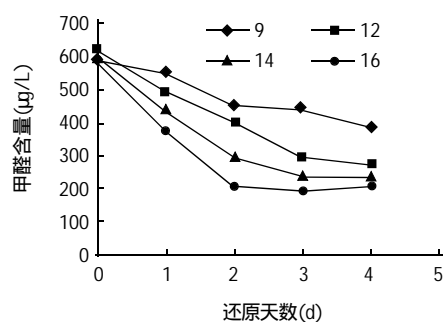


图6 不同温度对甲醛还原的影响

Fig.6 Effect of reduction temperature on the reduction of formaldehyde

麦汁浓度下要彻底,甲醛谷值低。麦汁浓度高带来的最大的问题便是酵母对糖利用的速度加快,EMP途径负担过重,消耗了大量的 $\text{NAD}^+$ ,使甲醛降解有关的酶类不能很好的发挥作用,甲醛大量的积累。从结果上看当麦汁浓度达到14度时,甲醛峰值为1098 $\mu\text{g/L}$ ,而7度麦汁甲醛峰值只有458 $\mu\text{g/L}$ (表4)。此外,进行50千升大罐发酵实验(见表5),也得到了相同的结果,尝试不同代数的酵母(0代和4代)进行发酵,发现在高浓度麦汁条件下,甲醛峰值与谷值普遍高于低麦汁浓度条件。因此,麦汁浓度是影响甲醛形成与还原的一个重要因素。

表4 三角瓶发酵原麦汁浓度对甲醛峰值和谷值的影响

Table 4 Effect of original extract on the peak value and galley value of formaldehyde concentration in beer brewed in flask

麦汁浓度(%)	7	9	11	14
甲醛峰值( $\mu\text{g/L}$ )	458	658	770	1098
甲醛谷值( $\mu\text{g/L}$ )	304	397	537	643

表5 大罐发酵不同原麦汁浓度对甲醛峰值和谷值的影响

Table 5 Effect of original extract on the peak value and galley value of formaldehyde concentration in beer brewed in vessel

批次	1	2	3	4	5	6	7	8
麦汁浓度(%)	9	9	9	9	11	11	11	11
酵母代数	0	0	4	4	0	0	4	4
甲醛峰值( $\mu\text{g/L}$ )	552	630	712	684	756	800	987	855
甲醛谷值( $\mu\text{g/L}$ )	185	280	520	500	370	380	680	662

### 2.2.6 还原时间对甲醛还原的影响

表6 还原时间对甲醛还原的影响

Table 6 Effect of reduction time on formaldehyde reduction

批次	酵母代数	甲醛峰值( $\mu\text{g/L}$ )	甲醛含量( $\mu\text{g/L}$ )					
			还原天数(d)					
			5	10	15	20	25	30
1	0	756	327	267	276	270	268	262
2	0	685	268	247	242	244	253	243
3	4	856	496	459	463	466	470	463
4	4	926	587	523	520	517	512	518

连续跟踪四批大罐啤酒发酵(两批为0代酵母,两批为4代酵母)过程甲醛含量变化情况后发现(表6),甲醛在达到峰值后一般在第6~7d后就能达到甲醛谷值,延长还原时间对甲醛还原基本上没有什么影响。甲醛的还原主要靠酶催化,当双乙酰还原阶段结束后,啤酒进行后酵贮酒,这时候温度在0℃左右,酵母已基本上絮凝沉降,发酵液中悬浮酵母很少,残留的催化甲醛还原的酶也很少,因此延长还原时间并不能明显增加甲醛的还原量。

### 3 结论与讨论

本研究通过在实验室小试以及大生产跟踪,研究了啤酒生产过程中甲醛的代谢情况,并且探讨了影响甲醛代谢的控制因素。甲醛在啤酒中的变化情况是先升高后降低的过程涉及甲醛的产生和还原,在啤酒生产过程中的一些控制因素如麦汁溶氧、接种酵母代数 and 接种酵母数、还原温度、麦汁浓度等均会影响到最终成品啤酒中的甲醛含量。主要结论如下。

3.1 过低或过高的麦汁溶氧量均会加大甲醛的积累,实验发现在12~13mg/L的麦汁溶氧时甲醛积累最小。

3.2 低代酵母甲醛积累要少于高代酵母,并且低代酵母在后期甲醛还原阶段还原能力要高于高代酵母,酵母接种量在 $2 \times 10^7$ 个/ml左右时甲醛峰值最低。

3.3 相对较高的还原温度有利于甲醛的还原。

3.4 麦汁浓度对甲醛的积累影响很大,高麦汁浓度条

件下甲醛峰值要比低麦汁浓度高出许多。

3.5 延长甲醛还原时间并不能增加甲醛的还原量。

### 参考文献:

- [1] GREY M, SCHMIDT M, BRENDDEL M. Overexpression of ADH1 confers hyper-resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Curr Genet, 1999, 40: 437-440.
- [2] SUNGA A J, CREGG J M. The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (FLD1) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*[J]. Gene, 2004, 330: 39-47.
- [3] KORPAN Y I, GONCHAR M V, STARODUB N F, et al. A cell biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive transistors coupled to methylotrophic yeast cell switch genetic regulatory metabolism[J]. J Analytical Biochemistry, 1993, 215: 216-222.
- [4] ELSKENS M T, JASPERS C H, PENNINGCKX M J. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137: 637-44.
- [5] RENA H T, YUAN J Q, BELLGARDT K H. Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 106: 53-68.
- [6] SAKAI Y, MURDANOTO A P, SEMBIRING L, et al. A novel formaldehyde oxidation pathway in methylotrophic yeasts: Methyl formate as a possible intermediate[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 127: 229-234.
- [7] PENNINGCKX M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26: 737-742.
- [8] HASLAM R, RUST S, PALLETT K, et al. Cloning and characterisation of S-formyl glutathione hydrolase from *Arabidopsis thaliana*: a pathway for formaldehyde detoxification[J]. J Plant Physiol Biochem, 2002, 40: 281-288.

## 信息

## 研究多源基因组学的新方法

在2007年1月号的《自然—方法学》上,研究人员报告了一种简化重要生态系统研究方法的新技术。

在多源基因组学的研究中,霰弹测序法一直被用于研究微生物界产生的大量序列片段的研究,但对这些序列片段进行分析则极为困难。科学家们采用许多方法试图对这些序列进行组装和分类,但对复杂样品和短片段来说,这些方法都失败了。Isidore Rigoutsos和同事描述了一种新的序列分类法,可利用340个复杂基因组的信息对来自复杂生态环境中序列片段进行分类的组装,这是以前的方法所做不到的。

## 美发现 Sir2 基因活性与部分动物寿命有关

美国科研人员经研究发现,通过控制饮食来激活 Sir2 基因可以延长部分动物的寿命。

据《洛杉矶时报》报道,美科学家在对实验鼠进行研究时发现,只要将它们摄入的热量减少30%,实验鼠的寿命就可延长三分之一。与此同时,一种名为 Sir2 的基因引起了专家的关注。研究发现,如果提高果蝇和蠕虫体内的 Sir2 基因的活性,果蝇和蠕虫的寿命都可延长30%到50%。科学家对实验鼠的实验也证明了这种观点。

报道说, Sir2 基因可能是延长部分动物寿命的主要因素,而通过控制热量摄入的方法就可使 Sir2 基因发生变化。科学家由此认为,如果能进一步认识 Sir2 基因,就有望更好地解释动物甚至人类衰老的原因。