

# 双歧啤酒生产工艺的实验室研究

李代昆, 张德纯\*, 穆小萍, 邱建

(重庆医科大学 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室, 重庆医科大学病原生物学教研室, 重庆 400016)

**摘 要:** 采用增湿法粉碎澳大利亚麦芽, 麦皮破而不碎, 麦粉较细, 干法粉碎大米成细粉; 选用双醪浸出糖化法进行麦汁制备、过滤、添加酒花和麦汁煮沸, 麦汁呈黄色、澄清, 可发酵糖和 $\alpha$ -氨基氮的含量符合发酵要求; 利用双歧杆菌(厌氧)和酿酒酵母(需氧)共同发酵啤酒, 消毒灭菌和低温离心后进行灌装; 通过几项重要指标的检测, 进行评判啤酒的质量和性能。啤酒呈淡黄色、透明, 有明显的酒花香味, 爽而不淡、柔和适口; 各项检测指标都达到啤酒质量标准, 尤其是总酸度和低聚还原糖的含量显著增高。

**关键词:** 功能性啤酒; 生产工艺; 双歧杆菌

## Experimental Study on Technology Used for Brewing Bifidobeer

LI Dai-kun, ZHANG De-chun\*, MU Xiao-ping, QIU Jian

(Province-Ministry Key Laboratory of Clinic Laboratory Medicine, Ministry of Education, Faculty of Pathogenic Biology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

**Abstract:** To study the technology used for brewing bifidobeer fermented by *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae*, Australian malt is sprinkled and milled. Wort is prepared by lixiviated saccharification, filtered, hops added, boiled and co-fermented by *Bifidobacterium bifidum* and *Saccharomyces cerevisiae*, and followed by antisepsis and centrifugation. The quality of beer is evaluated by several important performances. Malt and rice are smashed well. Wort is very good, in which fermentable sugar and  $\alpha$ -amido nitrogen are moderate. Quality performances of bifidobeer are up to the criterion with not only improved flavor and health function, but also simplified preparation of functional oligosaccharide and enhanced development of industrial fermented food products. However the technology used for brewing bifidobeer needs to be improved for large-scale production and market sale.

**Key words** functional beer; brewing technology; *Bifidobacterium*

中图分类号: TS262.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0132-04

功能性食品是指对人体具有增强机体防御功能, 调节生理节律, 预防疾病和促进健康等有关生理调节功能的加工食品。啤酒富含营养物质, 如维生素、有机酸、氨基酸、蛋白质和酯类物质等, 适量饮用可以起到保健功效, 促进消化吸收, 改善血液循环, 增强体质。所以啤酒很适合作为功能性食品的基质, 向啤酒中添加各种不同的功能因子, 就可得到不同类型的功能性啤酒。功能性低聚糖不被人体直接消化吸收, 能促进肠道有益菌群双歧杆菌的增殖, 具有改善肠道菌群的保健作用。功能性低聚糖一般在啤酒酿造的麦汁煮沸之后任意阶段添加, 啤酒酵母不能发酵利用功能性低聚糖, 故而以原体的形式存留于酒液中, 这些不发酵性糖改善了啤酒的口味, 尤其赋予啤酒生理功能<sup>[1]</sup>。

本研究通过生物法来增加啤酒中的功能性低聚糖, 即利用双歧杆菌与酿酒酵母共同发酵麦汁, 双歧杆菌在发酵过程中不仅合成分泌功能性低聚糖, 还产生其他功能性因子, 如乳酸和乙酸。按照如此的酿造工艺生产的功能性低聚糖啤酒, 集双歧杆菌和酿酒酵母的生理功效于一身, 称之为双歧啤酒, 不仅赋予了啤酒本身特有的风味, 还体现了双歧杆菌的强大生态效应; 既酿制了质优的功能性啤酒, 又节省了功能性低聚糖的人工制备。因此, 双歧啤酒是一种物美价廉的功能性啤酒, 值得进一步的研制和开发。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

收稿日期: 2006-06-09

\*通讯作者

基金项目: 重庆医科大学创新基金(重医大科[2005]8号)

作者简介: 李代昆(1975-), 男, 硕士研究生, 研究方向为正常菌群及其开发应用。

澳洲麦芽、市售大米、颗粒酒花。

## 1.2 菌种

两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*, 86321) 本实验室保存, 经数百代的耐氧驯化, 对氧有一定的耐受性, 通过中科院微生物研究所鉴定; 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*, CICC1700) 中国食品发酵工业研究所微生物菌种保藏中心。

## 1.3 培养基

BL 培养基 胰胨 6.00g, 植胨 3.00g, 多胨 8.00g, 葡萄糖 10.00g, 酵母膏 5.00g, 牛肉膏 3.50g, 可溶性淀粉 0.50g, 吡福多素 0.1ml, 吐温-80 1.0ml, L-半胱氨酸 0.50g, 维生素 K<sub>1</sub> 0.1ml, 氯化血红素 0.005g, 蒸馏水 1000ml, 调 pH7.2, 115℃×20min 消毒灭菌; YPD 培养基 蛋白胨 2.00g, 葡萄糖 2.00g, 酵母膏 1.00g, 蒸馏水 100ml, 调节 pH7.2, 115℃×20min 消毒灭菌。

## 1.4 试剂

费林溶液 A 液: 3.47g 硫酸铜。B 液: 17.30g 酒石酸钾钠, 5.00g 氢氧化钠。分别溶解于水中, 定容至 50ml; 亚甲基蓝指示液 称量 0.10g 亚甲基蓝, 溶解于水中, 定容至 10ml; 葡萄糖标准溶液 称量干燥过的葡萄糖 1.00g, 溶解于水中, 定容至 100ml; 氨基氮显色剂 称量 10.00g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、6.00g 磷酸二氢钾、0.50g 茚三酮、0.30g 果糖, 溶解于水中, 定容至 100ml; 甘氨酸标准溶液 称量 0.110g 甘氨酸, 溶解于水中, 定容至 100ml, 该溶液中  $\alpha$ -氨基氮含量为 200mg/L。

## 1.5 仪器

粉碎机、电子天平、恒温水浴箱、超净工作台、紫外分光光度计、细菌培养箱、厌氧菌培养系统、低温离心机、光学显微镜、Shimadzu LC-2010 高效液相色谱仪、Agilent 1100 型高效液相色谱仪、Spectra-10 Varian 原子吸收分光光度计。

## 1.6 方法<sup>[2-3]</sup>

### 1.6.1 粉碎原料

#### 1.6.1.1 麦芽增湿粉碎

向麦芽喷淋 60℃ 的水雾, 使麦芽整粒水分增加 1.5%, 喷洒的水雾与麦芽充分混合, 增湿时间 2min。

#### 1.6.1.2 大米干粉碎

水分越低, 粉碎越细, 效果越好; 大米粉不宜长时间存放, 防止发热结块。

### 1.6.2 制备麦汁

#### 1.6.2.1 米粉糊化

于 45℃ 下料, 料液比为 1:5; 70℃ 添加耐高温  $\alpha$ -淀粉酶液, 直至碘液反应完全; 煮沸 10min, 上清液即为稀薄的大米醪液。

#### 1.6.2.2 麦粉糖化

于 35℃ 下料, 料液比为 1:4; 50℃ 恒温 60min, 充分分解蛋白质; 升温至 65℃, 以 1:2 的比例添加冷却至 65℃ 的大米醪液, 恒温至碘液反应完全; 80℃ 时终止。

#### 1.6.2.3 麦汁过滤

收集麦汁上清液和沉淀洗涤液, 过滤两次(纱布+滤纸)。

#### 1.6.2.4 麦汁煮沸

酒花添加量为麦汁的 0.2%, 分四批添加, 煮沸时添加 10%, 防止麦汁起沫, 第二、三批于煮沸 30、60min 时各添加 20%, 第四批于煮沸 90min 时添加 50%, 10min 后终止煮沸, 于无菌超净工作台上冷却。

### 1.6.3 发酵啤酒

#### 1.6.3.1 发酵菌种复苏

双歧杆菌接种于 BL 培养基, 厌氧, 37℃×48h; 酿酒酵母接种于 YPD 培养基, 需氧, 30℃×48h。

#### 1.6.3.2 接种发酵菌

低温离心(3000r/min×10 min)收集酿酒酵母, 接种于麦汁中, 菌量  $2.0 \times 10^7/\text{ml}$  为宜; 30℃ 培养 24h, 接种双歧杆菌, 菌量为  $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ 。

#### 1.6.3.3 主发酵

放置在 10℃ 环境中, 于麦汁相对厌氧的条件下, 酿酒酵母和双歧杆菌开始进行厌氧发酵 10d, 糖被酵解, 产生乙醇和二氧化碳, 并释放能量。

#### 1.6.3.4 嫩啤酒检验

麦汁经主发酵后的发酵液, 叫嫩啤酒。主发酵完毕后, 通过检验澄清情况、品尝、菌量计数, 评定发酵过程。

#### 1.6.3.5 后发酵

将嫩啤酒转移至无菌输液瓶, 放置于 4℃ 冰箱 30d。

#### 1.6.3.6 除菌澄清

将啤酒进行巴氏消毒灭菌和低温(4℃)离心(4000r/min×20min)。

### 1.6.4 检测指标

检测相对密度、实际浓度、酒精度、原麦汁浓度、发酵度、总酸度、泡沫性能、低聚还原糖、氨基酸、维生素和微量元素等多项重要啤酒性能指标。

## 2 结果与分析

### 2.1 原料粉碎

麦芽粉碎后麦皮破而不碎, 麦粉(胚乳部分)较细; 大米粉碎成细粉, 粉碎度都满足麦汁制备要求。

### 2.2 制备麦汁

大米粉和麦芽粉通过糊化和糖化后, 滤除麦麸等杂

质,添加酒花进行煮沸,获得黄色、澄清的成熟麦汁。

### 2.2.1 糖含量

表1 麦汁的还原糖

Table 1 Reductive sugar concentration of wort

葡萄糖标准液浓度 (g/100ml)	葡萄糖标准液体积 (ml)	麦汁体积 (ml)	还原糖含量 (mg/L)
1.00	24.20	2.60	9.31

### 2.2.2 $\alpha$ -氨基氮含量

表2 麦汁的 $\alpha$ -氨基氮

Table 2  $\alpha$ -amino-nitrogen concentration of wort

氨基氮标准液浓度 (mg/L)	氨基氮标准液 吸光度	麦汁吸光度	$\alpha$ -氨基氮含量 (mg/L)
200	0.358	0.314	175

## 2.3 主发酵

### 2.3.1 起泡期

发酵1d左右,在麦汁表面逐渐出现更多的泡沫,由四周逐渐涌向中间,洁白细腻。此时,从锥形瓶外壁可以看到无数二氧化碳气泡上涌。

### 2.3.2 高泡期

发酵3d后,泡沫增高,形成卷曲状隆起,并因酒花树脂和蛋白质-单宁复合物开始析出而逐渐变为棕黄色。

### 2.3.3 落泡期

发酵5d后,发酵力逐渐减弱,二氧化碳气泡减少,泡沫回缩。

### 2.3.4 泡盖形成期

发酵8d后,泡沫继续回缩,形成一层褐色苦味的泡盖。

## 2.4 嫩啤酒检验

### 2.4.1 澄清情况

嫩啤酒内菌种、蛋白质迅速沉淀,发酵液较为澄清,富有光泽。

### 2.4.2 嫩啤酒品尝

麦芽和酒花的香味,无突出的酵母味和其它杂味,口味不淡薄,轻微的二氧化碳刺激感,无过苦的口味。

### 2.4.3 菌量计数

#### 2.4.3.1 总菌数

酿酒酵母为 $1.5 \times 10^7$ /ml;双歧杆菌为 $1.2 \times 10^7$ /ml。

#### 2.4.3.2 活菌数

酿酒酵母为 $1.1 \times 10^7$ /ml;双歧杆菌为 $8.5 \times 10^6$ /ml。

## 2.5 除菌澄清

经过消毒灭菌和低温离心,啤酒呈淡黄色、透明,有明显的酒花香味,爽而不淡、柔和适口。

## 2.6 指标检测

### 2.6.1 一般指标

表3 啤酒的一般指标

Table 3 General indexes of beers

	普通啤酒	双歧发酵液	酵母发酵液	双歧啤酒
相对密度(g/cm <sup>3</sup> )	1.0033	1.0038	1.0035	1.0037
实际浓度(g/100g)	3.30	4.18	3.47	3.62
酒精度(g/100g)	3.79	—	4.09	3.91
原麦浓度(%)	10.30	—	10.99	10.83
发酵度(%)	67.6	—	68.4	66.6
泡沫性能(V/V)	优	—	良	良

注:“—”表示该几项只适用于啤酒指标,不适用于双歧发酵液。

### 2.6.2 氨基酸含量

表4 啤酒的氨基酸(mg/L)

Table 4 Amino acid content of beers(mg/L)

	普通啤酒	双歧发酵液	酵母发酵液	双歧啤酒
甘氨酸(Gly)	11.8	29.8	9.8	7.1
组氨酸(His)	13.1	34.8	10.9	8.4
丙氨酸(Ala)	48.8	97.1	57.1	48.5
异亮氨酸(Ile)	3.6	42.5	7.7	5.6
亮氨酸(Leu)	13.1	90.0	17.1	14.6
赖氨酸(Lys)	7.1	19.76	15.6	12.1

### 2.6.3 维生素含量

结果见表5。

表5 啤酒的维生素(mg/L)

Table 5 Vitamin concentration of beers (mg/L)

	普通啤酒	双歧发酵液	酵母发酵液	双歧啤酒
VB <sub>1</sub>	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
VB <sub>2</sub>	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
VB <sub>6</sub>	<0.015	<0.015	<0.015	<0.015

### 2.6.4 微量元素含量

结果见表6。

表6 啤酒的微量元素(mg/L)

Table 6 Microelement concentration of beers (mg/L)

	普通啤酒	双歧发酵液	酵母发酵液	双歧啤酒
Ca	4.42	3.57	4.36	5.68
Fe	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Zn	0.46	0.47	0.096	0.40
Cu	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 2.6.5 酸度和还原糖

结果见表7。

表7 啤酒的酸度和还原糖(g/100ml)

Table 7 Acid and reductive sugar concentration of beers(g/100ml)

	普通啤酒	双歧发酵液	酵母发酵液	双歧啤酒
乙酸	0.11	0.24	0.14	0.26
乳酸	0.14	0.32	0.19	0.34
还原糖	3.31	4.20	3.51	3.98

### 3 讨论

#### 3.1 原料选择及粉碎<sup>[4-5]</sup>

啤酒工业的原辅材料是指参与啤酒酿造过程和形成最终产品的所有物料的总称,包括酿造用水、麦芽、酒花、发酵菌种和辅料(大米),以及添加剂和加工助剂。这些材料的选择与使用,不仅影响整个啤酒加工过程,而且影响最终啤酒产品的质量。原料粉碎对糖化的生化变化起着重要作用,粉碎后可增加原料与水的接触面积,原料中的可溶性物质容易浸出,有利于酶的游离和反应,可使不溶性物质继续溶解。原料粉碎是否合理,关系到麦汁组成,特别是可发酵性糖含量,在粉碎过程中要经常检查辊距使粉碎度达到要求,根据麦芽的溶解质量和水分灵活掌握轴辊间的距离。

#### 3.2 麦汁制备及煮沸<sup>[6-8]</sup>

利用麦芽所含的各种水解酶,在适宜的条件(温度、pH值、时间)下,将麦芽和辅料中的不溶性高分子物质(淀粉、蛋白质、半纤维素及其中间分解产物等)逐步分解为可溶性低分子物质,这个分解过程,称为糖化。由此制备的浸出物溶液就是麦汁。糖化是一个生化变化过程,在此过程中,应提供一切可能的技术条件来发挥麦芽中各种酶的最大作用。这些酶的最适作用条件并不完全一致,要运用其综合性的有利条件,使制成的麦汁在质和量上都达到要求。麦汁煮沸过程是麦汁定型阶段,最重要的变化就是蛋白质物质的分离。麦汁煮沸时蛋白质的凝聚过程分三个阶段:蛋白质变性、胶体化学物理反应和凝聚,而影响蛋白凝聚的因素主要有:煮沸强度、煮沸时间、pH值等。

#### 3.3 啤酒发酵及冷藏<sup>[9-11]</sup>

啤酒发酵是一项非常复杂的生物化学变化过程,在酿酒酵母所含酶系的作用下,其主要代谢产物是酒精和二氧化碳,还有一系列发酵副产物,如醇类、醛类、酯类、酮类和硫化氢等。这些发酵产物决定啤酒的风味、泡沫、色泽和稳定性等各项理化性能,使啤酒具有其独特的典型性。发酵菌种是啤酒生产必不可少的微生物,菌种性能的优劣,生长繁殖的好坏,直接影响啤酒的质量和风味。发酵温度是啤酒酿造过程中发酵菌种参与生化反应的重要外界因素,掌握妥贴与否,直接关系啤酒发酵物质的变化,决定啤酒成品的成败,在拟定生产工艺时,把温度的控制作为首选技术参数来考虑。深度冷藏处理技术是一种不用任何添加剂而使啤酒品质显著提高的新型技术,对嫩啤酒进行有限度的低温处理,并进一步去除冷混浊物,保证啤酒品质的长期稳定和纯正爽口,外观更清亮、非生物稳定性更好,泡沫更洁白、细腻、持久,口味更柔和、爽净。

#### 3.4 啤酒指标及检测

根据啤酒各项指标的检测结果分析,相对密度、实际浓度、酒精度、原麦汁浓度、发酵度和泡沫性能都完全达到啤酒质量标准。维生素(VB<sub>1</sub>、VB<sub>2</sub>、VB<sub>6</sub>和烟酰胺)的含量比较低且容易被破坏,因实验设备的限制而未能测出,双歧杆菌可合成分泌多种维生素,采用更为灵敏的方法则可以发现其差异。钙含量的相关性很好,双歧啤酒中的含量最高,有显著性差异;锌含量的相关性不错,酿酒酵母发酵液中的含量很低,很可能是测量偏差;铁和铜未能测出,可能是本身含量不高且在发酵过程中被代谢消耗。异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸的含量显著高于普通啤酒。双歧杆菌发酵液和双歧啤酒的总酸都高于酿酒酵母发酵液和普通啤酒,高出的酸就是双歧杆菌产生的乳酸和乙酸,有利于人体健康。双歧杆菌在发酵麦汁过程中,可以合成分泌低聚异麦芽糖等双歧因子,由于其测定要求太高,故通过检测低聚还原糖间接反映,结果证明双歧啤酒中双歧因子含量较高。

### 4 结论

初步研究出双歧啤酒的实验室生产工艺,集双歧杆菌和酿酒酵母生理功效于一身的双歧啤酒不仅改善传统啤酒风味,而且有益于人体健康;既节省了功能性因子的人工制备,又可推动发酵食品工业的进步和发展。进一步改进和完善双歧啤酒的生产工艺,为双歧啤酒的工业化生产和市场营销奠定良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] 于丽萍. 功能性啤酒的开发进展[J]. 杭州食品科技, 2004(3): 32-34.
- [2] 管敦义. 啤酒工业手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [3] 黄伟坤. 食品检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [4] 徐斌. 啤酒工业的原辅材料与啤酒酿造质量[J]. 啤酒科技, 2004(10): 7-16.
- [5] SHEN D. Productive experimental study on extruded rice adjunct for brewing beer[R]. 2004 CIGR International Conference, 2004(1): 1-9.
- [6] 苏华, 陆茂林. 简述啤酒质量与麦汁制备[J]. 山东食品发酵, 2004(4): 37-42.
- [7] LEKKAS C, STEWART A, HILL B. The importance of free amino nitrogen in wort and beer[J]. Technical Quarterly, 2005(2): 113-116.
- [8] 董中华. 优化麦汁煮沸过程控制的探讨[J]. 啤酒科技, 2005(5): 50-51.
- [9] PETERSEN E, MARGARITIS A, ROBERT J. The effects of wort concentration on batch fermentations with brewing yeast *Saccharomyces carlsbergensis*[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2004(4): 131-139.
- [10] 任永新. 浅谈影响啤酒发酵度的工艺途径[J]. 山东食品发酵, 2004(3): 16-10.
- [11] VESELP P, DUNCE D, LUSK L. The impact of fermentation temperature on yeast[J]. Technical Quarterly, 2004(3): 282-292.