DOI:10.12441/spyswjs.20241115006 [文章编号] 1673-1689(2025)12-0126-09

复配蛋白酶发酵对工业规模生产超高浓酿造啤酒的影响

常宗明 刘广丰 房 莉 张嘉洁 尹 花*

(青岛啤酒股份有限公司,山东 青岛 266237)

摘要:【目的】解决使用高水平糖浆辅料生产的超高浓麦汁含氮量不足、氨基酸组成不合理的技术问题。**【方法】**研究蛋白酶辅助糖化对麦汁蛋白质组成的影响,并对22 °P超高浓啤酒酿造过程的酿酒性能进行综合评估。**【结果】**在糖化蛋白质休止阶段,协同添加中性蛋白酶与风味蛋白酶(质量比为6∶4),可实现麦芽蛋白质的高效定向水解,且麦汁中α-氨基氮质量浓度提高了30%,A类氨基酸、B类氨基酸质量浓度增加了30%以上,可溶性氮、泡沫蛋白质质量浓度增加了10%以上,A、B、C区分含氮物质的质量占比分布更加合理;降糖速率、双乙酰和乙醛还原能力等发酵性能也得到明显改善。**【结论】**使用该复配蛋白酶水解技术制备的22 °P超高浓麦汁支持酵母连续5代重复使用,且回收酵母活力未发生明显变化,满足工业规模的酵母发酵性能要求,同时该技术提高了泡沫质量,增加了啤酒口感的醇厚性和协调性。

关键词:蛋白酶;超高浓酿造;氨基酸;酿酒性能;工业化生产试验

Effects of Compound Protease Fermentation on the Industrial-scale Production of Very High Gravity Brewing Beer

*CHANG Zongming LIU Guangfeng FANG Li ZHANG Jiajie YIN Hua**

(Tsingtao Brewery Co. Ltd., Qingdao 266237, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to address the technical problems of insufficient nitrogen content and an imbalanced amino acid composition in very high gravity wort produced with high-level syrup adjuncts. [**Method**] This study investigated the effect of protease-assisted saccharification on wort protein composition. Then, a comprehensive evaluation was conducted on the brewing performance during 22 °P very high gravity beer production. [**Result**] During the proteolysis stage of saccharification, a synergistic addition of neutral protease and flavourzyme protease at a mass ratio of 6∶4 enabled efficient directed hydrolysis of malt proteins. In the wort, the α-amino nitrogen mass concentration was increased by 30%, while the mass concentrations of A- and B-type amino acids were increased by more than 30%. In addition, the mass concentrations of soluble nitrogen and foam proteins were increased by over 10%, with a more proper distribution of nitrogenous substances among the A, B, and C fractions. The degradation rate of reducing sugar, the reducing capacity of diacetyl and acetaldehyde, and other fermentation performance were also enhanced significantly. [**Conclusion**] The 22 °P very high gravity wort produced using this compound protease hydrolysis strategy supported continuous yeast reuse for five generations without a significant decline in yeast viability, meeting industrial fermentation requirements. Furthermore, beer foam quality was improved while the mellow taste and overall sensory harmony were enhanced.

基金项目:青岛市科技惠民专项项目(22-3-7-cspz-23-nsh)。

通信作者:尹花(1972—),女,博士,工程技术应用研究员,主要从事酿造科学与技术研究。E-mail:yinhua@tsingtao.com.cn

收稿日期:2024-11-15 **修回日期:**2025-01-16

Keywords: protease; very high gravity brewing; amino acid; brewing performance; industrial-scale experiment

高浓酿造技术是高效、低碳、低排放的啤酒酿造技术[1-2]，自20世纪70年代起，该技术在啤酒酿造行业中被广泛研究和应用[3-4]。在啤酒生产中，正常麦汁浓度为10~12 °P，一般高浓麦汁浓度为16~18 °P，浓度>18 °P则称为超高浓麦汁。发酵浓度越高，生产效率、成本控制和减排优势越突出，但随之而来的高渗透压、高酒精环境胁迫和麦汁营养缺乏对酵母活性的影响[5-6]，以及啤酒风味协调性、泡持性、口感下降等酿酒性能问题，始终是研究者致力于解决的研究课题。特别是对于使用高麦芽糖浆提高麦汁浓度的工业化超高浓酿造（麦汁浓度>18 °P），由于糖浆的主要成分是碳水化合物，几乎不含其他营养物质，因此高比例辅料引起的氮源缺乏甚至会导致发酵停滞[7]，进一步增加了技术难度，放大了产品的质量缺陷[8]。

有研究表明，可通过调整麦汁的氮源组分改善酵母生理特性、发酵性能和啤酒产品质量。通过在麦汁中添加氮源补充剂（如氨基酸[9]、大豆肽[10]、小麦面筋水解物[11-12]等）或者在发酵过程中添加蛋白酶以增加α-氨基氮水平等[13-14]，是改善超高浓发酵性能的有效方法。但由于新原料来源、成本等限制，此类研究多局限于实验室规模，尚未达到工业化生产规模。而对于啤酒的实际酿造产业，添加蛋白酶制剂分解麦芽中的蛋白质，成为了更易实现工业化生产的手段。

蛋白酶品种众多，如按照酶作用位点的差异，可分为内切酶、外切酶；根据蛋白酶表现出较高酶活力的pH范围，又可分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶等[15]。蛋白酶制剂的品种和添加量对蛋白质降解效果至关重要[15-17]，如何正确选择酶制剂，实现蛋白质组分的高效水解，也是影响实际应用效果的重要环节。

鉴于蛋白酶在超高浓酿造中的重要作用，作者从市售的蛋白酶制剂中，选择出能适应麦汁糖化时微酸性环境的中性蛋白酶和风味蛋白酶，探究这2种外源蛋白酶制剂辅助糖化对麦汁蛋白质组成的改善效果，验证提高超高浓酿酒性能的可行性，以期为高辅料占比的超高浓酿造工业化应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 酵母菌种与主要原料

Lager酵母菌株 *Saccharomyces pastorianus*：青岛啤酒股份有限公司。大麦芽（加拿大麦芽Copeland、法国麦芽Planet）：盐城海越麦芽有限公司；小麦芽（由软质白皮国产小麦制得）：欧麦（保定）麦芽有限公司；高麦芽糖浆（固形物质量分数75%）：东晓生物科技股份有限公司。

1.1.2 蛋白酶制剂

中性蛋白酶、风味蛋白酶：食品级，诺维信（中国）生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂

乳酸：食品级，河南金丹乳酸科技股份有限公司；石膏：食品级，荆门市磊鑫石膏制品有限公司；17种氨基酸标准品（2.5 mmol/L）、硼酸缓冲液（Buffer 1）、衍生剂粉末2A、衍生剂稀释液2B：分析纯，美国Waters公司；乙腈：UV级，美国Burdick&Jackson公司；体积分数95%乙醇：分析纯，南京化学试剂股份有限公司。

1.2 仪器与设备

1.2.1 主要分析仪器

EBC标准粉碎机：DLFUW 22050型，德国Buhler公司；全自动糖化仪：BGT-8A型，杭州博日科技股份有限公司；pH酸度计：PB-10型，瑞士梅特勒-托利多公司；数显恒温水浴锅：HH-S4型，德国LAUDA公司；啤酒泡沫分析仪：Nibem型，荷兰Haffmans公司；安东帕密度计：DMA 4500型，奥地利安东帕有限公司；紫外-可见分光光度计：Ultrospec 7500型，英国Biochrom公司；气相色谱仪：Clarus 500 GC型，美国铂金埃尔默股份有限公司。

1.2.2 主要生产设备

糖化设备：设计单批麦汁产量50 000 L，吉林轻工集团长春轻工业机械厂；啤酒发酵罐：容量120 000 L，烟台市永生金属结构有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 实验室规模的麦汁制备工艺

麦芽经EBC标准粉碎机粉碎后，分别称取16.0 g加拿大麦芽Copeland麦芽粉、24.0 g法国麦芽Planet麦芽粉和10.0 g小麦芽麦芽粉，添加

300.0 g去离子水，加入全自动糖化仪的糖化杯中，使用乳酸调节pH至5.7，添加蛋白酶制剂，按照48 ℃（40 min）→66 ℃（60 min）→76 ℃（过滤）工艺进行糖化，糖化结束后，加入去离子水定量至500.0 g，自然冷却至室温，用双层定量滤纸过滤后得到麦汁，检测麦汁的α-氨基氮和氨基酸组成。

1.3.2 工业规模的啤酒酿造工艺

1）糖化配方：配方中辅料占总投料量的50%（以质量计），其中麦芽品种及配比为：加拿大麦芽Copeland、法国麦芽Planet、小麦芽质量比为16∶24∶10，与实验室规模的麦芽配比相同。

2）麦汁制备工艺：将麦芽粉和酿造水按照料液比7 100 kg∶28 400 L进行投料，添加乳酸和石膏后，再添加酶制剂，按照1.3.1节的工艺进行蛋白质休止和糖化，以1.0 ℃/min的速率进行升温。糖化结束后，将经过滤槽过滤得到的麦汁煮沸，麦汁煮沸过程中添加麦芽质量0.2%的酒花颗粒，采用3次添加工艺。煮沸时间控制在60 min、煮沸蒸发率6%，在煮沸结束前10 min添加糖浆，经回旋沉淀、冷却，得到22 °P超高浓麦汁，单批麦汁产量为45 000 L。

3）发酵工艺：冷麦汁入发酵罐时全程充氧，控制麦汁溶解氧质量浓度为11~13 mg/L，2批麦汁满罐，第1批麦汁冷却时流加酵母，控制满罐温度为9.5 ℃，自然升温至11.0 ℃后进行主发酵，当糖度降至5.6 °P后升温至13.0 ℃，进行双乙酰还原，当双乙酰质量浓度降至50 μg/L时，降温至−1.0~0 ℃，贮酒7 d后滤酒，贮酒期间定期排放冷凝固物及残留酵母。

4）啤酒过滤及灌装：使用硅藻土过滤机进行过滤，控制浊度≤0.40 EBC，过滤后稀释成8 °P的清酒，控制清酒溶解氧质量浓度≤50 μg/L，再进行灌装、杀菌，制得成品啤酒。

1.4 分析方法

1.4.1 主要分析方法

采用血球计数板计数法测定发酵液中悬浮酵母细胞数量；采用茚三酮比色法测定α-氨基氮质量浓度[18]；采用AQC柱前衍生高效液相色谱法测定氨基酸组分[19]；采用考马斯亮蓝染色法测定泡沫蛋白质质量浓度[20]；按照ASBC方法[21]测定麦汁浓度、可溶性氮质量浓度、含氮物质区分等指标；按照国家标准[22]中的方法测定啤酒中的常规理化指标。

1.4.2 蛋白酶活力测定

采用福林法测定中性蛋白酶活力[23]，酶活力定义为：在40 ℃、pH 7.5条件下，1 min内水解酪蛋白产生1 μg酪氨酸所需的中性蛋白酶量，即为1个酶活力单位，以U/g表示。

采用对硝基苯酚显色法测定风味蛋白酶活力[24]，酶活力定义为：在50 ℃、pH 7.5条件下，1 min内水解2.5 mmol/L *L*-亮氨酸对硝基苯胺产生1 μmol对硝基酚所需的风味蛋白酶量，即为1个酶活力单位，以U/g表示。

1.4.3 酵母活力测定

酵母活力检测的基本原理是酵母活力强弱与酵母降低环境pH的速率强相关，因此将酵母细胞悬浮液pH升高至10.0，以降低酵母细胞悬浮液pH至6.5时，细胞每分钟释放H^+的物质的量来表征酵母活力[25]，单位表示为mmol/min。

1.4.4 啤酒风味物质测定

使用气相色谱仪和顶空进样器Turbo Matrix 40检测双乙酰、乙醛、正丙醇、异丁醇、异戊醇、乙酸乙酯、乙酸异戊酯、辛酸乙酯、己酸乙酯质量浓度[26-27]。顶空进样设置：炉温60 ℃，加热时间40 min，传输线温度110 ℃，取样针温度110 ℃，载气气压172.4 kPa。气相色谱设置：初始温度50 ℃保持3 min，以30 ℃/min升温至180 ℃并保持3 min；载气为氮气，进样口气压为103.4 kPa，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温度250 ℃，进样温度150 ℃。

1.4.5 啤酒感官评价

5位国家级啤酒评酒委员对成品啤酒酒体、成熟度、醇酯协调性、杀口感及可饮性进行多维度的感官评价。每个维度均采用5分制，得分越高表示评价越好。

1.5 数据处理

麦汁的α-氨基氮质量浓度、可溶性氮质量浓度、泡沫蛋白质质量浓度、啤酒常规理化指标、泡持性、酵母活力等指标均设置3个重复，用Excel 2010和SPSS 22.0对数据进行统计分析，$P<0.05$表示差异显著，分析结果表示为平均值±标准差，利用Origin 2018绘图。其他过程指标（如糖度、酵母总数、风味等）通过控制样进行定期检测和校准，以确保生产过程的一致性和最终产品的质量稳定。

2　结果与讨论

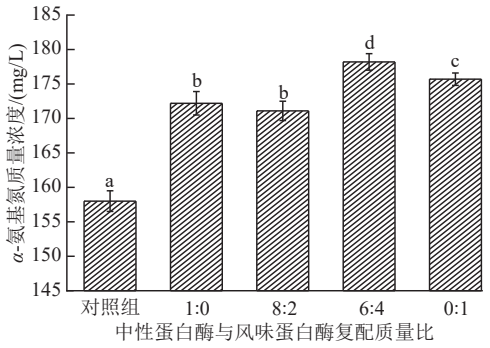
2.1　实验室规模研究

所用的中性蛋白酶由解淀粉芽孢杆菌产生，主要具备内切酶的活性，应用于啤酒糖化，以提高麦汁 α-氨基氮质量浓度；风味蛋白酶由米曲霉发酵产生，同时具备内切酶和外切酶的活性，这2种蛋白酶是应用较为广泛的商业酶[28]。为便于后续实际生产操作，酶制剂添加试验按照酶制剂与原料的质量比进行。由于酶制剂受生产菌株、工艺以及产品规格等的影响，且不同来源酶制剂的酶活力检测方法不一致，为便于研究和推广，对试验所用2种蛋白酶的酶活力进行了检测，中性蛋白酶酶活力为（10 894±120）U/g、风味蛋白酶酶活力为（1 124±56）U/g。

为研究中性蛋白酶与风味蛋白酶复配对 α-氨基氮质量浓度和氨基酸组成的影响，确定合适的复配质量比，控制蛋白酶添加量为200 mg/kg（以麦芽质量计）。由于风味蛋白酶的单价是中性蛋白酶的5倍以上，若进一步增加风味蛋白酶的添加量，将使酶制剂的使用成本显著增加。因此，考虑到酶制剂的成本，复配使用蛋白酶时，风味蛋白酶添加量不得超过总添加量的一半，即中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比分别为8∶2、6∶4，并与全部使用风味蛋白酶或者中性蛋白酶的组别进行比较。

2.1.1　蛋白酶复配使用对麦汁中 α-氨基氮质量浓度的影响

中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比对麦汁 α-氨基氮质量浓度的影响见图1。与对照组（未添加蛋白酶）相比，蛋白酶的添加使麦汁中 α-氨基氮质量浓度显著提高（P<0.05）。当中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比为8∶2、6∶4时，随着风味蛋白酶添加量的增加，α-氨基氮质量浓度呈增长趋势，且两者均能显著提高麦汁 α-氨基氮质量浓度（P<0.05）。当中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比为6∶4时，α-氨基氮质量浓度最高，为（178.20±1.20）mg/L；当中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比为0∶1时，麦汁 α-氨基氮质量浓度降低至（175.71±1.01）mg/L，但降低的幅度比较小。从提高麦汁 α-氨基氮质量浓度和酶制剂添加成本方面进行综合考虑，不宜进一步增加风味蛋白酶的添加量。



不同字母表示不同处理组间差异显著（P<0.05）。

图1　中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比对麦汁 α-氨基氮质量浓度的影响

Fig. 1　Effects of mass ratio of neutral protease to flavourzyme on the mass concentration of α-amino nitrogen in wort

2.1.2　蛋白酶复配使用对氨基酸组成的影响

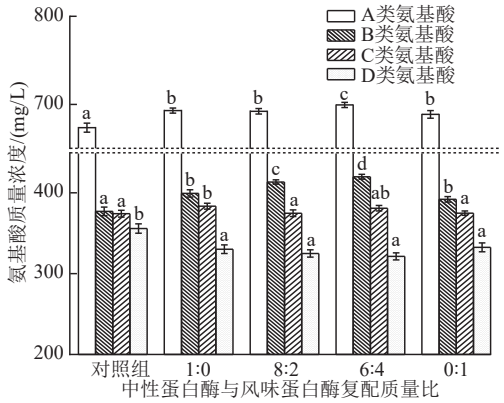
酵母细胞对氨基酸的吸收是按照一定顺序进行的，Jones等[29]根据啤酒发酵过程中酵母细胞对氨基酸的消耗速率的差异将氨基酸分为A类、B类、C类、D类。A类氨基酸（Asp、Asn、Glu、Gln、Ser、Thr、Lys、Arg）能被酵母细胞快速吸收；B类氨基酸（Val、Leu、Ile、His）次之；只有当A类氨基酸基本被完全吸收后，C类氨基酸（Gly、Ala、Phe、Tyr、Trp）和 NH_4^+ 才被缓慢吸收；D类氨基酸（Pro）在发酵过程中基本不被吸收。

由图2可知，中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比对氨基酸组成的影响存在明显差异，特别是A类、B类氨基酸质量浓度，随着风味蛋白酶添加量的增加明显升高。中性蛋白酶与风味蛋白酶复配使用协同改善麦汁氨基酸组成的效果要优于单一蛋白酶，且随着风味蛋白酶添加量的增加，氨基酸组成的改善效果更加明显。相较于对照组，当中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比6∶4时，易被酵母细胞吸收的A类氨基酸质量浓度（699.4 mg/L）和B类氨基酸质量浓度（419.8 mg/L）显著增加（P<0.05），而不易被酵母细胞吸收的C类、D类氨基酸质量浓度无明显变化。综合考虑 α-氨基氮质量浓度和各类氨基酸质量浓度这2个指标，同时兼顾酶制剂添加成本，初步确定中性蛋白酶与风味蛋白酶的最佳复配质量比为6∶4。

2.2　工业规模研究

2.2.1　蛋白酶对麦汁中氮组分的影响

根据实验室规模试验的优化结果，进一步



不同字母表示相同氨基酸类别不同处理组间差异显著（P<0.05）。

图 2　中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比对各类氨基酸质量浓度的影响

Fig. 2　Effects of mass ratio of neutral protease to flavourzyme on the mass concentrations of various amino acids

研究工业化生产条件下，中性蛋白酶与风味蛋白酶复配质量比为 6∶4（试验组 2）时对麦汁氮组分和氨基酸组成的影响，并与啤酒生产过程中通常添加中性蛋白酶（试验组 1）和不添加蛋白酶（对照组）2 种工艺进行对比，结果见表 1。

由表 1 可知，对照组的 22 °P 麦汁，α-氨基氮质量浓度仅为（207.22±1.52）mg/L，泡沫蛋白质质量浓度为（339.23±1.50）mg/L。相较于对照组，试验组 1 中麦汁 α-氨基氮质量浓度增加了约 15%；而试验组 2 中麦汁 α-氨基氮质量浓度增加了约 30%。试验组 1 中麦汁泡沫蛋白质质量浓度仅为（320.30±2.01）mg/L，显著低于试验组 2 的麦汁泡沫蛋白质质量浓度（P<0.05），为（381.71±1.92）mg/L。由于中性蛋白酶主要以内切的方式分解麦芽中的蛋白质和多肽，对蛋白质的分解选择性不强，中性蛋白酶在释放氨基酸的同时，也会分解对泡持性有利的泡沫蛋白质，因此需要控制中性蛋白酶的添加量。相较于对照组，添加蛋白酶后，麦汁中可溶性氮质量浓度提高了约 10%（P<0.05），表明外源蛋白酶的使用可进一步分解麦芽不溶性蛋白质，游离出更多可溶性氮。有研究表明，麦汁中含氮物质的隆丁区分对啤酒泡沫、口感等均有影响，较为适中的各区分含氮物质的质量占比为 A 区分约 15%~18%、B 区分约 20% 和 C 区分约 60%[30]。由表 1 可知，中性蛋白酶与风味蛋白酶复配使用的麦汁中，A、B、C 区分含氮物质的质量占比分布更加合理。

表 1　工业规模研究中添加蛋白酶对麦汁中氮组分的影响

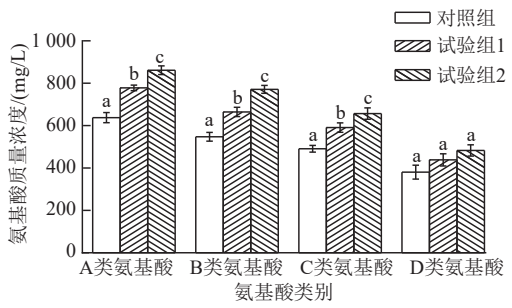
Table 1　Effects of protease on nitrogen components in wort during industrial-scale research

组别	α-氨基氮质量浓度/（mg/L）	泡沫蛋白质质量浓度/（mg/L）	可溶性氮质量浓度/（mg/L）	含氮物质质量占比/%		
				A 区分	B 区分	C 区分
对照组	207.22±1.52^{a}	339.23±1.50^{b}	1154.0±6.5^{a}	14.0	18.0	68.0
试验组 1	238.71±2.50^{b}	320.30±2.01^{a}	1269.2±9.0^{b}	13.6	16.5	69.9
试验组 2	269.30±2.01^{c}	381.71±1.92^{c}	1276.5±10.1^{b}	15.1	18.4	66.5

注：同列不同小写字母代表组间差异显著（P<0.05）。按照隆丁区分法，A 区分为相对分子量>60 000 的含氮物质；B 区分为相对分子质量在 12 000~60 000 之间的含氮物质；C 区分为相对分子量<12 000 的含氮物质。

由图 3 可知，与对照组相比，仅添加中性蛋白酶后，A 类、B 类、C 类、D 类氨基酸质量浓度分别增加了 22.0%、21.4%、20.4% 和 15.2%；而添加复配蛋白酶后，A 类、B 类、C 类、D 类氨基酸的质量浓度分别增加了 35.1%、40.9%、33.8% 和 26.9%。这表明 2 种蛋白酶复配对麦汁氨基酸组成的改善效果优于仅添加中性蛋白酶，与实验室规模的研究结果一致。

综上，蛋白酶处理明显增加了麦汁中 α-氨基氮质量浓度。风味蛋白酶和中性蛋白酶复配使用的协同增效作用明显提高了蛋白质的分解效果，



不同字母表示相同氨基酸类别不同处理组间差异显著（P<0.05）。

图 3　不同蛋白酶配比对各类氨基酸质量浓度的影响

Fig. 3　Effects of different protease ratios on the mass concentrations of amino acids

且α-氨基氮质量浓度增加更多，同时保留了有利于增加啤酒泡持性的高、中相对分子质量的含氮物质，氨基酸组成更合理。

2.2.2　蛋白酶对发酵性能的影响

1）蛋白酶对降糖速率、酵母总数的影响：发酵过程中，降糖速率和酵母总数的变化见图4。麦汁中并非所有的含氮物质都能被酵母利用，只有游离氨基酸、铵离子和部分小分子肽（二肽或三肽）等能被酵母吸收，因此，影响酵母发酵性能的主要是α-氨基氮[27]。从降糖速率结果来看，α-氨基氮质量浓度低的对照组的降糖速率明显低于试验组，而试验组2的降糖速率与试验组1无明显差异。但从酵母总数峰值结果来看，α-氨基氮质量浓度低的对照组要明显低于试验组1和试验组2，特别是试验组2，其麦汁α-氨基氮质量浓度>240 mg/L，且酵母总数峰值已经超到1亿个/mL。从还原期（主发酵结束至降温时期）酵母总数的变化看，α-氨基氮质量浓度低的对照组显著低于试验组。

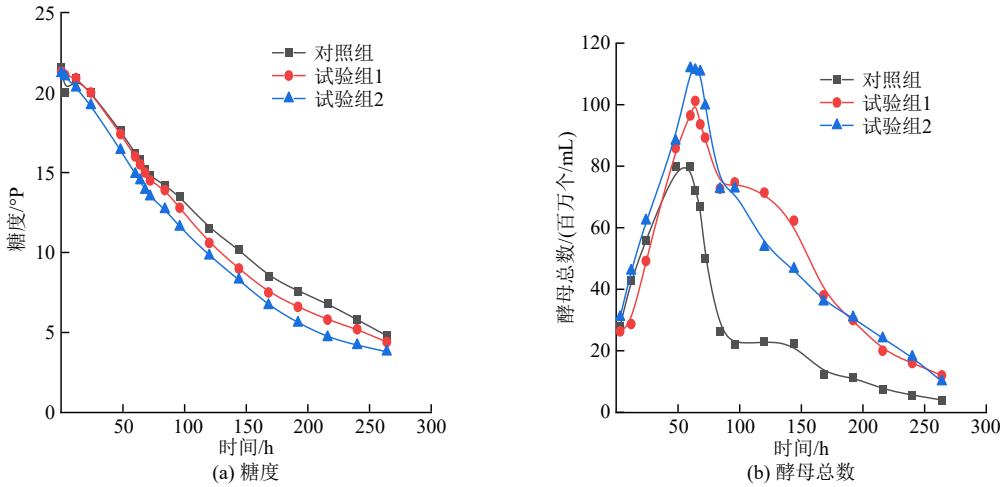


图4　蛋白酶对降糖速率和酵母总数的影响

Fig. 4　Effects of protease on the degradation rate of reducing sugar and the total yeast count

2）蛋白酶对酵母关键指标的影响：高浓酿造过程中，渗透压的增加、乙醇浓度的提高以及营养平衡的改变，均会对高浓酿造酵母的性能产生较大影响，主要表现为酵母活力降低、使用代数降低、凝聚性变差、酵母自溶等[31]。由表2可知，随着麦汁α-氨基氮质量浓度的增加，回收酵母活力以及双乙酰和乙醛质量浓度等成熟度指标得到显著改善（$P<0.05$），α-氨基氮质量浓度较高的试验组2的发酵性能更优。当麦汁α-氨基氮质量浓度达到约270 mg/L时，试验组2的各项指标均达到实际生产的需求。因此，根据试验组2的方案，进行了连续使用酵母的22 °P超高浓酿造的工业规模研究，麦汁α-氨基氮质量浓度均控制在260~270 mg/L，酵母泥连续使用5代，其回收酵母活力>20 mmol H^+/min，活力没有明显降低，可进行工业化连续生产。

综上，蛋白酶复配处理后获得的高α-氨基氮质量浓度且A类、B类氨基酸占比增加的麦汁的发酵性能可满足实际生产需求。根据Casey等[32]和Mccaig[3]等的研究结果，随着发酵麦汁浓度的增加，12、18、20 °P麦汁α-氨基氮的最优质量浓度分别为160、280、350 mg/L。22 °P超高浓酿造的

表2　发酵过程中关键指标的对比

Table 2　Comparison of key indexes in the fermentation process

组别	α-氨基氮吸收质量浓度/（mg/L）	回收酵母活力/（mmol H^+/min）	待滤酒中双乙酰质量浓度/（μg/L）	待滤酒中乙醛质量浓度/（mg/L）
对照组	109.1±4.2^a	15.14±1.73^a	32.33±4.67^c	15.60±1.44^c
试验组1	128.0±7.0^b	17.35±1.24^b	22.02±2.38^b	13.12±0.87^b
试验组2	146.4±5.2^c	22.05±2.39^c	18.04±1.46^a	8.40±0.43^a

注：同列不同小写字母代表组间差异显著（$P<0.05$）。

工业规模试验结果表明，正常发酵的酵母所需的α-氨基氮质量浓度明显低于350 mg/L，说明啤酒酿造中，除了需控制麦汁α-氨基氮质量浓度外，控制合理的麦汁氨基酸组成也是保证酵母发酵性能的关键因素之一[32]。

2.2.3　蛋白酶对啤酒泡持性的影响

成品酒的泡持性对比结果见表3。有研究指出，酵母分泌的蛋白酶A对泡沫蛋白质的降解是造成超高浓啤酒泡持性下降的重要因素[33-34]。由表3可知，试验组啤酒泡持性均显著高于对照组（P<0.05），表明蛋白酶的使用、酵母发酵性能的稳定改善了泡持性不足的问题。由于中性蛋白酶主要是以内切酶为主，对蛋白质的水解选择性不强，在提高α-氨基氮水平的同时，也会分解对泡持性有利的相对分子质量较高的蛋白质[35]，造成试验组1啤酒的泡持性低于试验组2。Evans等[36]研究表明，只有相对分子质量介于10 000~100 000的蛋白质才有利于维持啤酒泡持性，上述结果进一步验证了泡沫蛋白质对泡持性的贡献。

2.2.4　蛋白酶对啤酒风味及口感的影响

3种工艺酿制啤酒的理化指标见表4。从常规指标来看，原麦汁质量分数、色度、浊度、苦味值及二氧化碳质量分数等指标无明显差异，但对照组的发酵度、乙醇体积分数均显著低于试验组，说明不添加蛋白酶会导致氮源的缺乏，进而影响到酵母的产乙醇能力。从啤酒成熟度关键评价指标来看，试验组的双乙酰、乙醛的质量浓度显著低于对照组，且使用复配酶制剂的成熟度指标最优。从啤酒醇酯类风味物质指标来看，试验组中3种醇类风味物质的总质量浓度低于对照组；酯类风味物质中，试验组的乙酸乙酯质量浓度明显高于对照组，而其他3种酯类风味物质质量浓度差异不明显。

表3　8 °P成品啤酒泡持性指标的对比

Table 3　Comparison of foam stability indexes of 8 °P finished beer

组别	泡沫蛋白质质量浓度/（mg/L）	泡持性/s
对照组	101.0±0.8^{a}	172.0±1.0^{a}
试验组1	107.5±0.9^{b}	183.2±3.1^{b}
试验组2	111.0±1.2^{c}	191.4±2.2^{c}

注：同列不同小写字母代表组间差异显著（P<0.05）。

表4　8 °P成品啤酒主要指标对比

Table 4　Comparison of the main indexes of 8 °P finished beer

组别	原麦汁质量分数/%	发酵度/%	乙醇体积分数/%	苦味值/IBU	色度/EBC	浊度/NTU	二氧化碳质量分数/%	双乙酰质量浓度/（μg/L）	乙醛质量浓度/（mg/L）	醇酯类风味物质质量浓度/（mg/L）						
										正丙醇	异丁醇	异戊醇	乙酸乙酯	乙酸异戊酯	己酸乙酯	辛酸乙酯
对照组	8.01±0.03^{a}	64.83±0.25^{a}	3.16±0.10^{a}	9.40±0.52^{a}	3.40±0.32^{a}	0.10±0.05^{a}	0.50±0.05^{a}	11.22±0.05^{b}	5.69±0.25^{c}	4.60	8.15	44.50	13.10	1.19	0.13	0.15
试验组1	8.01±0.02^{a}	67.32±0.32^{b}	3.36±0.05^{b}	9.44±0.50^{a}	3.40±0.23^{a}	0.15±0.05^{a}	0.49±0.05^{a}	7.00±0.09^{a}	4.77±0.30^{b}	4.55	7.27	40.94	15.09	1.27	0.11	0.11
试验组2	8.05±0.03^{a}	68.90±0.28^{c}	3.50±0.05^{c}	9.50±0.54^{a}	3.51±0.35^{a}	0.12±0.03^{a}	0.51±0.06^{a}	6.32±0.05^{a}	3.05±0.28^{a}	3.93	7.55	37.66	15.10	1.11	0.12	0.12

注：同列不同小写字母代表组间差异显著（P<0.05）。

如图5所示，感官评定结果表明，试验组啤酒的整体协调性优于对照组，主要表现在口感（杀口感、酒体、可饮性）和风味（成熟度、醇酯协调性）两大方面。在口感方面，未使用酶制剂处理的啤酒杀口感较弱，酒体明显偏淡，欠缺醇厚性。在风味协调性方面，试验组的成熟度优于对照组，且醇酯风味更协调。这是因为麦汁中的可溶性氮与啤酒的口感相关，可溶性氮水平较低会造成啤酒口味单薄[30]。

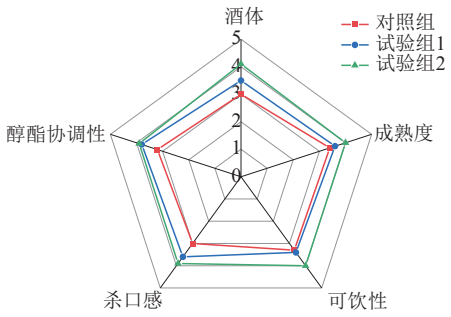


图5　8 °P成品啤酒感官评定结果

Fig. 5　Sensory evaluation results of 8 °P finished beer

3 结论

作者利用酶制剂复配技术，首先在实验室规模下，研究中性蛋白酶和风味蛋白酶对麦汁 α-氨基氮质量浓度及氨基酸组成的影响，确定最佳复配质量比。在此基础上，进行糖浆辅料质量比例50%的工业规模22 °P超高浓酿造试验，对不同氮源水平的酿酒性能进行综合评估。

研究表明，中性蛋白酶复配风味蛋白酶实现了麦芽中蛋白质组分的定向水解，进一步有选择性地释放出大量游离氨基酸，同时保留了泡沫蛋白质，两者的协同作用，使得A类、B类氨基酸质量浓度增加，减少了泡沫蛋白质的降解，改善了麦汁的蛋白质组成。将实验室规模放大到工业规模，结果表明，在较低的麦汁 α-氨基氮质量浓度控制条件下，通过提高麦汁中A类、B类氨基酸的质量比，解决了使用高水平糖浆辅料生产的麦汁氨基酸组成不合理的问题，促进了酵母的增殖，提高了酵母的发酵性能，并且发酵过程中的降糖速率以及双乙酰、乙醛质量浓度等指标得到了明显改善。此外，酵母连续使用5代后，其活力未发生明显变化，同时保留了一定的泡沫蛋白质，保证了超高浓酿造啤酒稀释后的泡沫稳定性和风味协调性，使得酿制啤酒品质能够满足实际需求。本研究为超高浓酿造的工业化应用奠定了基础，对实际生产具有一定的指导作用。

参考文献

[1] CASEY G P，MAGNUS C A，INGLEDEW W M. High-gravity brewing：effects of nutrition on yeast composition，fermentative ability，and alcohol production[J]. Applied and Environmental Microbiology，1984，48(3)：639-646.

[2] PULIGUNDLA P，SMOGROVICOVA D，MOK C，et al. Recent developments in high gravity beer-brewing[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies，2020，64：102399.

[3] MCCAIG R，MCKEE J，PFISTERER E A，et al. Very high gravity brewing：laboratory and pilot plant trials[J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists，1992，50(1)：18-25.

[4] STEWART G G，HILL A E，RUSSELL I. 125th Anniversary review：developments in brewing and distilling yeast strains[J]. Journal of the Institute of Brewing，2013，119(4)：202-220.

[5] WU Z F，WANG J J，NIU C T，et al. Transcriptomic and metabolomic analysis reveals genes related to stress tolerance in high gravity brewing[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology，2022，38(4)：59.

[6] 常宗明，张文铎，尹花，等. 高比例玉米淀粉辅料制备超高浓麦汁技术研究[J]. 中国粮油学报，2021，36(9)：48-53.
CHANG Z M，ZHANG W D，YIN H，et al. Preparation of very high gravity wort with high proportion of corn starch as adjunct[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association，2021，36(9)：48-53.(in Chinese)

[7] LEI H J，ZHAO H F，YU Z M，et al. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2012，166(6)：1562-1574.

[8] PULIGUNDLA P，SMOGROVICOVA D，OBULAM V S R，et al. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation：a research update[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology，2011，38(9)：1133-1144.

[9] YANG H R，ZONG X Y，CUI C，et al. Peptide (Lys-Leu) and amino acids (Lys and Leu) supplementations improve physiological activity and fermentation performance of brewer's yeast during very high-gravity (VHG) wort fermentation[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry，2018，65(4)：630-638.

[10] 万春艳. 大豆活性肽对酵母增殖代谢及啤酒发酵的影响研究[D]. 广州：华南理工大学，2012.

[11] ZHOU Y J，YANG H R，ZONG X Y，et al. Effects of wheat gluten hydrolysates fractionated by different methods on the growth and fermentation performances of brewer's yeast under high gravity fermentation[J]. International Journal of Food Science and Technology，2018，53(3)：812-818.

[12] YANG H R，COLDEA T E，ZENG Y J，et al. Wheat gluten hydrolysates promotes fermentation performance of brewer's yeast in very high gravity worts[J]. Bioresources and Bioprocessing，2021，8(1)：5.

[13] 雷宏杰. 高浓麦汁氮源组成对酵母氨基酸同化及发酵调控影响的研究[D]. 广州：华南理工大学，2014.

[14] WU C Y，WANG C X，GUO J Y，et al. Plant-derived antioxidant dipeptides provide lager yeast with osmotic stress tolerance for very high gravity fermentation[J]. Food Microbiology，2024，117：104396.

[15] 周北雅，郭艳东，薛雅鞠，等. 功能蛋白酶催化及应用进展[J]. 生物加工过程，2023，21(4)：419-438.
ZHOU B Y，GUO Y D，XUE Y J，et al. Advances in the catalysis and application of functional proteases[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering，2023，21(4)：419-438.(in Chinese)

[16] 朱德瑾，戴显谟，龙莹，等. 外加酶糖化法制啤酒的研究[J]. 食品与发酵工业，1991，17(5)：10-17.

ZHU D J，DAI X M，LONG Y，et al. Study on brewing beer with external enzymes[J]. Food and Fermentation Industries，1991，17(5)：10-17.(in Chinese)

[17] 沈畅华，杨娟，张远红，等. 双酶酶解鸽胸肉工艺优化及抗氧化性评价[J]. 食品与机械，2023，39(4)：163-169.
SHEN C H，YANG J，ZHANG Y H，et al. Optimization of response surface methodology and evaluation of antioxidant activity of double-enzyme hydrolyzed pigeon brisket[J]. Food and Machinery，2023，39(4)：163-169.(in Chinese)

[18] 张永国，秦锐兰. 麦汁中α-氨基氮含量的测定方法[J]. 啤酒科技，2008(3)：35-37.
ZHANG Y G，QIN R L. Determination method of α-amino nitrogen content in wort[J]. Beer Science and Technology，2008(3)：35-37.(in Chinese)

[19] 李梅，杨朝霞，解彬，等. AQC柱前衍生高效液相色谱法测定啤酒中的21种游离氨基酸[J]. 色谱，2007，25(6)：939-941.
LI M，YANG C /Z)X，XIE B，et al. Determination of 21 free amino acids in beer by HPLC with AQC pre-column derivatization[J]. Chinese Journal of Chromatography，2007，25(6)：939-941.(in Chinese)

[20] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry，1976，72(1/2)：248-254.

[21] 美国酿造家协会. ASBC分析方法[M]. 李崎，刘春凤，译. 北京：中国轻工业出版社，2012.

[22] 国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会. 啤酒分析方法：GB/T 4928—2008[S]. 北京：中国标准出版社，2009.

[23] 国家市场监督管理总局，国家标准化管理委员会. 酶制剂质量要求 第1部分：蛋白酶制剂：GB/T 23527.1—2023[S]. 北京：中国标准出版社，2024.

[24] 陈雪姣，徐丽，邓晓旭，等. 一种氨肽酶的酶活检测方法：CN119144694A[P]. 2024-12-17.

[25] RODRIGUES P G，BARROS A A，RODRIGUES J A，et al. Yeast quality control in industrial brewing process using vitaltitration，a new method for vitality determination[C]. Dublin：Proceedings of the 29th EBC Congress，2003.

[26] 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.

[27] 尹花. 氨基酸谱对Lager酵母发酵性能与风味的影响及调控机制[D]. 无锡：江南大学，2018.

[28] ZHANG S Y，ZHANG C Y，QIAO Y，et al. Effect of Flavourzyme on proteolysis，antioxidant activity and sensory qualities of Cantonese bacon [J]. Food Chemistry，2017，237：779-785.

[29] JONES M，PIERCE J S. Absorption of amino acids from wort by yeasts[J]. Journal of the Institute of Brewing，1964，70(4)：307-315.

[30] 顾国贤. 酿造酒工艺学[M]. 2版. 北京：中国轻工业出版社，1996.

[31] GUAN Y，XU X，LIU C F，et al. Evaluating the physiology and fermentation performance of the lager yeast during very high gravity brewing with increased temperature [J]. LWT-Food Science and Technology，2023，173：114312.

[32] CASEY G P，MIKE INGLEDEW W M. Ethanol tolerance in yeasts[J]. Critical Reviews in Microbiology，1986，13(3)：219-280.

[33] PRATT-MARSHALL P，BREY S，DE COSTA S，et al. High gravity brewing：an inducer of yeast stress [J]. Brewer's Guardian，2002，131(1)：22-26.

[34] 宋群，刘春凤，李永仙，等. 啤酒发酵过程中影响蛋白酶A分泌的因素[J]. 食品与生物技术学报，2013，32(6)：667-671.
SONG Q，LIU C F，LI Y X，et al. Effect factors of proteinase A secretion in beer fermentation process[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2013，32(6)：667-671.

[35] 徐爱兰，朱林江，李永仙，等. 淀粉液化芽孢杆菌BS5582产蛋白酶对高辅料比麦汁制备工艺的影响[J]. 啤酒科技，2013(10)：16-18，15.
XU A L，ZHU L J，LI Y X，et al. Impact of protease produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 on wort preparation process with high adjunct ratio [J]. Beer Science and Technology，2013(10)：16-18，15.(in Chinese)

[36] EVANS D E，HEJGAARD J. The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4，protein Z7 and LTP1[J]. Journal of the Institute of Brewing，1999，105(3)：159-170.

（责任编辑：张馨文）