

啤酒酵母诱变育种及其在全小麦啤酒酿造中的应用

袁 仲

(商丘职业技术学院园林食品加工系,河南 商丘 476000)

摘要: 采用 10 keV 低能 N^+ 注入啤酒酵母,经筛选获得菌株 Lz37,再用 150 MPa 超高压处理菌株 Lz37,经双乙酰平板筛选获得菌株 Gy3,其凝聚性很强,遗传稳定性良好,适合于在小麦汁中发酵啤酒。将 Gy3 酵母定为全小麦啤酒生产应用酵母,命名为商啤 3 号(SP-03)。SP-03 啤酒酵母菌株的各项生理及生产性能都较优良,特别是在全小麦啤酒的酿造中适用性较强,经过对发酵工艺等的调整,用其酿制的啤酒口感纯正、清爽、柔和,成品啤酒中双乙酰含量为 0.04~0.06 mg/L,保质期在 180 d 以上。

关键词: 微生物; 啤酒酵母; 诱变育种; 离子注入; 超高压处理; 全小麦啤酒

中图分类号:Q93-3;TS261.1;TS262.5;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2011)06-0058-04

Mutation Breeding of Beer Yeast & Its Application in the Brewing of Whole Wheat Beer

YUAN Zhong

(Department of Landscape and Food Processing, Shqngqiu Vocational and Technical College, Shangqiu, He'nan 476000, China)

Abstract: A beer yeast strain Lz37 was obtained by the implantation of 10 keV low-energy N^+ in beer yeast, then Lz37 strain was treated by 150 MPa ultrahigh pressure, and a strain Gy3 with strong cohesion and good genetic stability was obtained through diacetyl plate screening which was suitable for wheat juice fermentation. The strain Gy3 was designated as the applied yeast for whole wheat beer production (named as SP-03). Compared with other beer yeast strains, SP-03 was better in its physiological properties and production performance. Especially, it was quite suitable for the production of full malt beer. In practice, after the improvement of related fermenting technology, the produced beer fermented by SP-03 had pure and soft taste with its diacetyl content as 0.04~0.06 mg/L and its shelf period above 180 d.

Key words: microbe; beer yeast; mutation breeding; ion implantation; ultrahigh pressure treatment; whole wheat beer

诱变育种有物理诱变和化学诱变两种方法。啤酒酵母诱变育种要取得大的突破,必须寻找新的诱变源。离子束作为一种新的诱变源在微生物上的应用起步较晚,有些学者分别采用离子注入对啤酒酵母^[1]、酿酒酵母^[2]等的影响及菌种选育^[3]进行了研究。超高压也被很多研究者们应用于微生物诱变育种当中,李芝莲^[4]初步验证了高压对啤酒酵母进行诱变育种是可行的;李党生^[5]等用高压技术对啤酒酵母生长影响进行研究,通过高压诱变获得突变株,为利用高压诱变筛选啤酒酵母优良菌种提供了初步依据;王振伟^[6]等运用现代高压生物技术,选育优良啤酒酵母菌种,并分析了高压处理对啤酒酵母的生长影响。笔者在已有的诱变经验基础上,采用离子束和超高压复合处理,对河南府泉酒业有限责任公司保存的商啤 2 号(SP-02)酵母菌进行处理,以期获得 1 株优良的全小麦啤酒酵母菌株,并将诱变得到的啤酒酵母菌株应用于全小麦啤酒的酿造生产中。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

啤酒酵母菌株商啤 2 号(SP-02):由河南府泉酒业有限责任公司提供。

1.2 培养基

固体培养基:10 °P 小麦芽汁,加 2%琼脂。

发酵培养基:10 °P 小麦芽汁。

1.3 培养方法

试管培养:取斜面菌种 1 环,接种于盛有 10 mL 麦汁培养基的试管内,25 °C 培养 2 d。

三角瓶培养:将试管中的酵母液转接入盛有 100 mL 麦汁的 250 mL 三角瓶内,25 °C 培养 2 d。

发酵培养:每个 500 mL 三角瓶内装 300 mL 麦汁,灭菌,接三角瓶培养液 10 mL,装上发酵栓,用 4 mol/L 的硫酸封口,12 °C 低温发酵 8 d。

收稿日期:2011-02-28;修回日期:2011-04-07

作者简介:袁仲(1967-),男,河南商丘人,硕士,副教授,主要从事食品加工与质量控制的教学与科研工作。

500 L 罐发酵:将筛选得到的菌株用 10 °P 小麦芽汁为培养基,在 500 L 罐中进行发酵,发酵期间每天取样测定发酵度、双乙酰和高级醇等的含量。

1.4 主要测定方法

凝聚性的测定:采用本斯值法。

发酵速度的测定:取待试菌种,接种于麦汁培养基中,25 °C 培养 1 d;取 200 mL 麦汁于玻璃筒中(5 cm×120 cm)接种新培养酵母,使麦汁酵母数为(1.0×1.5×10⁷个/mL)。控制在 10 °C 左右进行发酵。每天测定其外观糖度 2 次。当外观糖度为 3.5 °P 时,记下发酵时间。

双乙酰测定:参照 GB4927—4928—2001 标准。

发酵液中的化学成分测定:采用 GC-8A 型气相色谱测定。

1.5 离子注入方法^[7]

把待处理的菌株细胞均匀涂布在平板培养皿上,用无菌空气风干制成菌膜。采用能量 10 keV,脉冲剂量 1×10¹⁴ N⁺/cm² 的 N⁺ 束注入啤酒酵母,每次连续注入 5 s,间隔 50 s,总剂量为 0(对照)~7×10¹⁴ N⁺/cm²,注入靶室的真空度为 1×10³ Pa。

1.6 超高压处理方法^[8]

采用 900-21 L 型超高压设备,其最高压力为 900 MPa,最大容积为 2 L,传压方式为外部加压,传压介质为蓖麻油,加压保压卸压均为自动控制。

把待处理的菌种,经三角瓶液体培养至对数生长期,用磷酸缓冲液(pH7.00)或 10 °P 小麦芽汁稀释至细胞数达到 10⁶~10⁷ 个/mL,分装到高温灭过菌的聚乙烯袋中。按照预定方案选取压力,保压时间 10 min,进行高静压处理(恒温 25±2 °C)。以未进行高压处理的出发菌株作为对照,经稀释后涂布于固体平板培养基上,25 °C 培养 48 h,观察菌落数。

1.7 菌株筛选方法

将经过离子注入处理或超高压处理后生长良好,菌落成中等大小、乳白色、表面光滑和边缘整齐,以及镜检菌体为椭圆近圆形的平板单个菌落移接斜面供复筛。复筛凝聚性好的菌株,进一步作双乙酰含量、发酵度、酒精度等生产特性分析。

2 结果与分析

2.1 啤酒酵母诱变育种试验

2.1.1 离子注入选育全小麦啤酒酵母菌株试验

试验发现:菌体存活率与注入离子剂量有关,随着 N⁺ 注入剂量的增大,菌株存活率降低,当注入剂量超过 7×10¹⁴ N⁺/cm² 时,存活率降为零。初步选定 2×10¹⁴ N⁺/cm² 为合适的诱变剂量。在离子注入剂量 2×10¹⁴ N⁺/cm² 条件

下诱变,将生长良好,菌落成中等大小、乳白色、表面光滑、边缘整齐,以及镜检菌体为椭圆近圆形的平板单个菌落移接斜面供筛选。初筛共挑取菌株 48 株。

对初筛所得到的菌株用本斯值法测定凝聚性,经复筛后发现,有 5 株菌株具有较好的凝聚性,凝聚性均比出发菌株强。将凝聚性较好的 5 个菌株进行 500 mL 三角瓶发酵,测定其发酵液中双乙酰含量,发现有 3 株菌的发酵液双乙酰含量降到了口味阈值以下,但是与出发菌株在大麦啤酒中的双乙酰含量(0.072 mg/L)要高。试验对发酵液双乙酰含量较低的 Lz37 等 5 个菌株进行凝聚性、发酵度和酒精度的测定,并与出发菌株商啤 2 号(SP-02)进行比较(见表 1)。结果表明,Lz1、Lz28、Lz31 和 Lz37 的发酵度和酒精度均略高于出发菌株。

表 1 不同菌株发酵特性的比较

项 目	菌 株					
	SP-02	Lz1	Lz12	Lz28	Lz31	Lz37
发酵度(%)	64.9	71.4	63.0	66.1	68.0	66.8
酒精度(%vol)	3.95	4.205	3.78	4.02	4.50	4.04
发酵时间(d)	4.5	4.0	4.5	3.5	4.0	3.0
双乙酰含量(mg/L)	0.185	0.142	0.199	0.146	0.168	0.126
凝聚性/本斯值(mL)	1.1	1.3	1.4	1.5	1.3	1.3

进一步试验发现:采用 10 keV 低能 N⁺ 注入啤酒酵母,经筛选获得 1 株菌 Lz37,其凝聚性很强(本斯值达 1.4 mL),适合于在小麦汁中发酵啤酒,其发酵度为 66%~68%,双乙酰含量为 0.126 mg/L,为了保证发酵能在较短时间内完成,其双乙酰还原能力还需进一步加强。

2.1.2 超高压处理诱变选育全小麦啤酒酵母菌株试验

试验研究发现:菌体存活率与压力有关,随着压力的增大,菌株存活率降低,当压力超过 300 MPa 时,存活率降为零。将 150 MPa 条件下处理 10 min 的菌液涂布在双乙酰平板上,培养后生长良好,乳白色、表面光滑、边缘整齐,以及镜检菌体为椭圆近圆形的单个菌落移接斜面供复筛。共挑取 8 株菌,分别命名为 Gy1、Gy2、Gy3、Gy4、Gy5、Gy6、Gy7、Gy8。

试验中所用的出发菌株 Lz37 具有良好的凝聚性,为了了解超高压处理 Lz37 后所筛选的菌株其凝聚性是否发生突变,用本斯值法测定 Gy1、Gy2、Gy3 等 8 株菌的凝聚性。结果发现,诱变得到的 Gy3、Gy7 与出发菌株相近,而且酵母沉淀紧密,说明 Gy3、Gy7 这 2 个菌株比出发菌株 Lz37 具有更良好的絮凝性。对发酵液双乙酰含量较低,凝聚性优良的 Gy3、Gy7 菌株进行发酵度和酒精度的测定,并与出发菌株 Lz37 进行比较,结果见表 2。

试验结果表明,Gy3 的性能优于出发菌株 Lz37 和

表2 3株菌株发酵性能的比较

项 目	菌 株		
	Lz37	Gy3	Gy7
发酵度(%)	66.8	67.2	66.7
酒精度(%vol)	4.02	4.08	3.95
发酵时间(d)	3.0	3.0	3.5
双乙酰含量(mg/L)	0.123	0.093	0.100
凝聚性/本斯值(mL)	1.3	1.3	1.4

Gy7。将菌株 Gy3 和 Gy7 在固体斜面培养基上连续接种培养 8 代后,进行发酵性能测定,结果显示,传代前后菌株的主要酿造性能基本没有变化。因此,所获得的菌株 Gy3 和 Gy7 遗传稳定性较好。将 Gy3 和 Gy7 菌株进行 500 L 罐发酵试验,发酵至第 8 天,测定发酵液中双乙酰、酯类和醇类等成分的含量。结果(表 3)表明,菌株 Gy3 的总体指标优于 Gy7。

表3 Gy3 与 Gy7 发酵液中某些成分的测定 (μg/L)

项 目	菌 株	
	Gy3	Gy7
双乙酰含量	81	101
总酯	33.87	28.75
乙酸乙酯	31.77	27.07
乙酸异戊酯	2.1	1.69
高级醇	76.30	88.63
正丙醇	10.74	12.31
异丁醇	13.05	13.36
异戊醇	52.51	62.96
酵母数(个/mL)	0.54×10^7	0.61×10^7

由国家级和省级评酒员对 500 L 发酵罐制得的啤酒进行品评,结果一致认为:Gy3 菌株发酵得到的啤酒口感最佳。进一步试验证明:Gy3 酵母菌的发酵度、死灭温度、凝聚性及还原双乙酰速度都比较理想。特别是凝聚性能有很大提高,经过对发酵工艺等的调整,适合于小麦麦芽汁酿造啤酒,其发酵得到的啤酒口味纯正。因此,将 Gy3 酵母定为啤酒生产应用酵母,命名为商啤 3 号(SP-03)。

2.2 商啤 3 号在全小麦啤酒生产中的应用试验

2.2.1 发酵试验

将 SP-03、SP-02、SP-06 3 株啤酒酵母菌株在全小麦啤酒的生产中进行对比应用试验。SP-03 是新诱变选育菌株,而 SP-02 为河南府泉酒业有限公司原生产大麦芽啤酒时使用的啤酒酵母菌株,SP-06 是从河南府泉酒业有限公司多年搜集、保存的啤酒酵母菌株中挑选出的较优者。

采用浓醪糖化,料水比控制在 1:3.5~4,48℃/68℃/72℃的糖化温度;糖化时添加适量的 β-葡聚糖酶以降低麦汁粘度,加快过滤的进行;采用双醪一次煮出糖化法。生产试验使用的小麦芽与大米的配比为 40:60,由于

麦芽用量较低而致使麦汁的 pH 缓冲能力较差,因而在发酵的第 3 天,发酵液的 pH 值已降至 4 以下。3 株啤酒酵母菌株锥形罐发酵理化指标分析结果见表 4。

表4 3株啤酒酵母菌株发酵罐发酵终了理化指标分析

项 目	罐号(菌株)		
	30#罐 (SP-02)	25#罐 (SP-03)	4#罐 (SP-06)
酒精含量(%vol)	4.37	4.36	4.47
实际浓度(%m/m)	3.308	3.308	3.232
原麦汁浓度(°P)	10.03	10.01	10.01
真正发酵度(%)	68.2	68.1	69.2
pH 值	3.83	3.85	3.78
总酸/(mL/100 mL)	1.70	1.65	1.75
双乙酰(mg/L)	0.0504	0.0432	0.0336
色度(EBC)	5.0	5.0	5.0

发酵结束后对 3 株啤酒酵母菌株的酒液口感风格进行品尝,3 株啤酒酵母菌株的酒液口感风格差别较大,分别属于不同的风味类型(见表 5)。

表5 3株啤酒酵母菌株的酒液口感品尝及风格类型

项目	罐号(菌株)		
	30#罐(SP-02)	25#罐(SP-03)	4#罐(SP-06)
口感品尝	口感较纯正、 较淡爽、刺激 感较强	口感纯正、淡 爽、协调、柔 和	口感纯正、 淡爽、协调
风味类型	淡爽强力型	淡爽柔和型	淡爽型

SP-02 啤酒酵母菌株不论是在大麦芽啤酒的酿制中,还是在全小麦啤酒的生产中,啤酒的口感风格都较一致,刺激感都较强,较有劲,饮后较易上头,但其酿制的啤酒风格与目前流行的淡爽柔和型的啤酒风格有差距;SP-06 在全小麦啤酒的生产中口感较好,纯正、淡爽的口感风格比较适应当前啤酒市场流行的口感风格,不足之处是在全小麦啤酒的酿制中凝聚性太差、酵母回收困难而限制了它的应用价值;SP-03 啤酒酵母菌株在全小麦啤酒的酿制中适用性较强,用其酿制的啤酒口感纯正、淡爽、柔和,整体口感风格为目前国内流行的淡爽柔和型。由国家级和省级评酒员对 3 株啤酒酵母菌株制得的啤酒进行品评,结果一致认为,SP-03 啤酒酵母菌株发酵得到的啤酒口感最佳。

2.2.2 SP-03 啤酒酵母菌株在全小麦啤酒中生产稳定性试验

在啤酒大生产中,酵母一般使用至 3~4 代即淘汰,笔者对 SP-03 啤酒酵母菌株进行了 0~7 代全小麦啤酒的生产应用试验,结果见表 6。从综合数据来看,SP-03 啤酒酵母菌株经 0~7 代的生产稳定性试验,其生产稳定性较为理想。

按照优化后的糖化工艺、发酵工艺,采用全小麦麦芽汁,利用商啤 3 号 2 代酵母菌应用于 120 t、240 t 发酵生

表 6 SP-03 啤酒酵母菌株 0~7 代应用情况

代数	起发及降糖速度	真正发酵度(%)	双乙酰(mg/L)	口感品尝	酵母死亡率(%)	酵母泥回收情况
0	较快	68.0	0.048	纯正、淡爽、柔和	1.1	较稠
1	较快	68.2	0.0432	纯正、淡爽、柔和	1.5	较稠
2	较快	68.3	0.0336	纯正、淡爽、柔和	1.9	较稠
3	较快	68.0	0.0408	纯正、淡爽、柔和	2.3	较稠
4	较快	67.9	0.0432	纯正、淡爽、柔和	2.6	较稠
5	较快	68.1	0.0504	纯正、淡爽、柔和	2.8	较稠
6	较快	68.2	0.048	纯正、淡爽、柔和	2.9	较稠
7	较快	68.1	0.0456	纯正、淡爽、柔和	2.7	较稠

产实际扩大实验。试验结果表明:商啤 3 号在大罐发酵中性能良好,在小麦麦芽汁中繁殖较快,酵母高峰值为 8×10^7 个/mL。过滤前的酵母数为 0.3×10^7 个/mL 左右。麦汁极限发酵度为 83%~85%,啤酒真正发酵度为 66%~68%, ΔE 值为 0.5%~1.0%, α -氨基氮同化力为 75%,双乙酰峰值 0.3~0.4 mg/L,成品啤酒中双乙酰含量为 0.04~0.06 mg/L。

采用 0℃/60℃/0℃的强化试验方法,SP-03 啤酒酵母菌株生产的啤酒进行保质期试验,经 6 次循环后,测定啤酒的浊度为 0.8 EBC,其保质期 ≥ 180 d。

3 结论

3.1 采用 10 keV 低能 N^+ 注入啤酒酵母,经筛选获得 1 株菌 Lz37,再采用 150 MPa 超高压处理啤酒酵母菌株 Lz37,经双乙酰平板筛选获得 1 株菌 Gy3,其凝聚性很强(本斯值 1.3 mL),遗传稳定性良好,适合于在小麦汁中发酵啤酒。将 Gy3 酵母定为啤酒生产应用酵母,命名为商啤 3 号(SP-03)。

3.2 SP-03 与 SP-02、SP-06 3 株啤酒酵母菌株的锥型罐发酵对比试验结果表明,SP-03 啤酒酵母菌株的各项生理及生产性能都较优良,特别是在全小麦啤酒的酿造中适用性较强,SP-03 啤酒酵母菌株发酵得到的全小麦啤酒口感最佳;经过对糖化工艺、发酵工艺等的调整,其发酵得到的全小麦啤酒口味纯正、淡爽、柔和,成品啤酒中双乙酰含量为 0.04~0.06 mg/L,保质期

在 180 d 以上。

参考文献:

- [1] 邓玉清,王纪,蒋海波,等. H^+ 、 N^+ 、 Ar^+ 注入对啤酒酵母存活率的影响及 SEM 和 ESR 研究[J].激光生物学报,2001,10(03):170-173.
- [2] 王鹏银,郝欣,郭学武,等.离子注入诱变选育低产高级醇酿酒酵母菌株[J].酿酒科技,2008(2):17-21.
- [3] 虞龙,张宁.离子注入微生物诱变育种的研究与应用进展[J].微生物学杂志,2005(25):80-83.
- [4] 李芝莲.高压对啤酒酵母理化性质影响及诱变的研究[D].长春:吉林大学,2008:4-60.
- [5] 李党生,王振伟.高压诱变啤酒酵母研究及其突变株 RAPD 分析[J].食品科学,2009(21):052.
- [6] 王振伟,王恺.高压诱变啤酒酵母及突变株 SDS-PAGE 电泳分析[J].科技资讯,2009(25):7.
- [7] 袁仲,陈柯羽.离子注入诱变选育全小麦啤酒酵母菌株[J].酿酒科技,2009(11):55-57.
- [8] 袁仲,张百胜,马绮云,等.超高压处理诱变选育全小麦啤酒酵母菌株及其应用研究[J].中国酿造,2010(12):33-37.

(上接第 57 页)

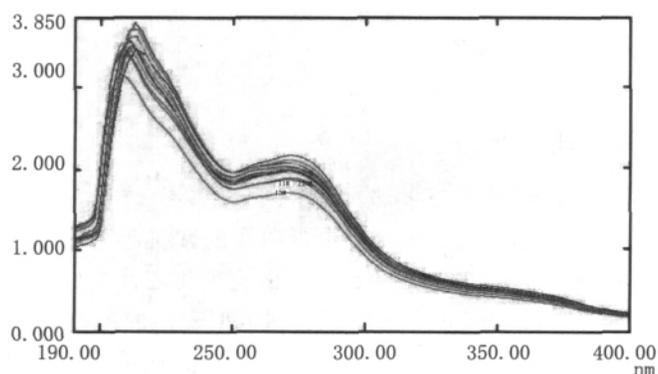


图 2 10 个批次 A 品牌白兰地真酒样和掺兑白兰地紫外吸收图谱

谱法那样能直观地反映^[2]。

判断一批酒样的真假,要进行多次测定;标准酒也要有代表性,尽可能包括不同批次的酒;同时要结合样酒的包装、标签和酒精度等进行综合判断,才能得到准确可靠的结果^[3]。

参考文献:

- [1] 孟庆华,王微波,胡育筑.紫外光谱相似度及其在中药注射液质量控制中的应用[J].中国中药杂志,2007,32(3):206-210.
- [2] 黎洪利,等.紫外指纹图谱在烟用香精质量控制中的应用[J].中国烟草学报,2009(15):4.
- [3] 吴友忠,姚丽.气相色谱法鉴别真假洋酒的研究[J].中国国境卫生检疫杂志,1996,19(4):213-216.