

用分子生物学手段控制啤酒中乙醛含量的研究

赵丽娟¹, 王德良^{2,3}, 程玉来¹, 周建中⁴, 葛邦国⁴

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 中国农业大学食品学院, 北京 100009; 3. 中国食品发酵工业研究院酿酒工程部, 北京 100027; 4. 新疆农业大学食品学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要: 以 F718, R719 为引物, 以质粒 pFA6a-kanMX4 为模板进行 PCR 扩增, 采用基因转化法获得 1 株乙醇脱氢酶 基因突变型工业酿酒酵母。驯养后的突变株啤酒生产小试表明, 突变株乙醛含量为 5.386 mg/L, 比原菌株乙醛含量 7.932 mg/L 有所降低; 发酵液发酵结束时, 双乙酰含量为 0.058 mg/L, 比原菌株双乙酰含量 0.034 mg/L 有所升高; 突变株发酵度为 63%, 比原菌株 66% 略有降低。(孙悟)

关键词: 分子生物学; 啤酒; 乙醛含量; 啤酒酵母

中图分类号: Q7; TS262.5; TS261.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2006)01-0045-03

Study on the Control of Aldehyde Content in Beer by Molecular Biological Measures

ZHAO Li-juan¹, WANG De-liang^{2,3}, CHENG Yu-lai¹, ZHOU Jian-zhong⁴ and GE Bang-guo⁴

(1. Food Science College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Food Science College of China Agricultural University, Beijing 100009; 3. Wine-making Engineering Department of China Food Fermentation Industry Research Institute, Beijing 100027; 4. Food Science College of Xinjiang Agricultural University, Urumchi 830052, China)

Abstract: With F718 and F719 used as primer and plasmid pFA6a-kanMX4 used as template for PCR amplification, one *S. cerevisiae* strain of alcohol dehydrogenase II gene mutation type was obtained through genetic transformation methods. The application of domesticated mutant strain in beer production suggested that aldehyde content in beer produced by mutant strain was 5.386 mg/L (aldehyde content in beer by original strain was 7.932 mg/L), the content of diacetyl was 0.058 mg/L at the end of liquid fermentation (diacetyl content in beer by original strain was 0.034 mg/L), and the fermenting degree of mutant reached 63% (the fermenting degree of original strain was 66%). (Trans. by YUE Yang)

Key words: molecular biology; beer; aldehyde content; beer yeast

啤酒作为一种大众化的饮品, 它的风味、泡沫及色泽是影响消费的三大重要因素, 而又以风味最为突出^[1]。目前, 影响啤酒风味的一个重要因素双乙酰已经不再那么困扰啤酒生产企业, 而乙醛含量过高却成为我国啤酒行业面临的重要难题。

选育优良的啤酒酵母菌^[2], 对提高啤酒的质量有着重要的意义。国内外关于降低啤酒发酵过程中乙醛含量的研究主要集中于工艺条件、杂菌污染等方面^[3-5], 而采用基因工程技术改良酵母以降低乙醛含量的研究相对较少。

本试验有针对性地破坏酵母乙醇脱氢酶 基因, 以期降低啤酒中乙醛含量。本文通过 PCR 技术获得一段

带有筛选标识和同源区域的目的基因, 通过醋酸锂转化法, 使目的基因与酵母 ADH 基因发生同源重组, 得到一株 ADH 基因突变的工业酿酒酵母。突变菌株通过驯养, 小试发酵生产啤酒, 利用气相色谱测定发酵液中乙醛及其他风味指标含量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒

C-0011 酵母: 中国食品发酵工业研究院菌种保藏中心保藏, 是一株用于酿酒的工业酵母。

pFA6a-kanMX4 质粒: 清华大学陈国强教授馈赠,

收稿日期: 2005-08-19

表1 引物序列表

引物	顺序5' → 3'
F718	ACTGCTCTTGTGTGTTTTATCACTTCTGTTTCTTCTGCGTACGCTGCAGGTCGAC
R719	AAACTTCGAACACTGTCATCTAAAGATGCTATATACTAATATCGATGAATTCGAGCTCG

是一种穿梭质粒,在大肠杆菌中对氨苄青霉素有抗性,在酵母菌中对遗传霉素 G 418 有抗性。

1.1.2 培养基及试剂、仪器

1.1.2.1 培养基

HYLB 培养基:4.3% HYLB,2% (v/v) 三糖葡萄糖溶液,10% (v/v) 0.17 mol/L KH_2PO_4 和 0.72 mol/L K_2HPO_4 磷酸盐缓冲液,用于培养大肠杆菌。

YPD 培养基:1% 酵母提取物,2% 蛋白胨,2% 葡萄糖,用于培养酵母菌。

1.1.2.2 主要试剂及主要仪器

主要试剂:Taq, pfu 酶由上海生工提供,AMP, G 418, NAD 酶由鼎国生物公司提供。

主要仪器:PCR 仪,小型离心机,恒温培养箱,恒温水浴锅,气相色谱仪,分光光度计。

1.1.3 引物

引物由上海生工合成,各引物序列见表 1。

为了敲除乙醇脱氢酶 (ADH) 基因,而设计了一对引物 F718, R719, 此对引物是根据酿酒酵母 ADH 基因和 pFA6a-kanM X4 质粒中 kanM X 基因而设计的,酿酒酵母 ADH 基因的序列可以通过 <http://www.yeastgenome.org/> 网站查询,该引物是用来扩增转入目的基因的一对引物。F718 (R719) 有 41 (40) 个碱基与酵母染色体 ADH 基因相同,用来进行同源重组。而 F718 (R719) 有 18 (19) 个碱基与质粒 pFA6a-kanM X4 中 kanM X 基因相同,用来扩增 kanM X 基因以筛选转化菌株。

1.2 方法

1.2.1 聚合酶链式反应^[6]获得目的片段

1.2.2 醋酸锂转化法^[7]转化酵母 DNA

由含 G 418 的抗性平板筛选突变菌株,在转化后 7~12 d 长出针尖状单菌落。

1.2.3 发酵试验

1.2.3.1 菌种的驯养

将活化好的突变菌株接入到装有 300 mL 麦汁的 500 mL 三角瓶中,12 厌氧发酵,称重直至发酵结束。取 1 勺菌体再重新接入 300 mL 麦汁继续发酵,连续发酵 5 次,将驯养后的菌体稀释涂布抗性平板,挑取较大菌落保存。

1.2.3.2 啤酒生产小试

将驯养后的菌株和原菌株分别接入装有 300 mL 麦

汁的 500 mL 三角瓶中,12 厌氧发酵,跟踪发酵过程,测定各项指标。

1.2.4 综合指标的测定 [GB/T 4928-2001]

1.2.4.1 双乙酰含量的测定

1.2.4.2 发酵度的测定

1.2.4.3 风味指标的测定

利用气相色谱仪采用外标法测定,发酵液要求滤出菌体,再装入顶空瓶进行测定。

风味指标包括:乙醛、DM S、甲酸乙酯、乙酸乙酯、甲醇、乙醇 (v/v)、乙酸异丁酯、正丙醇、异丁醇、乙酸异戊酯、异戊醇、己酸乙酯、辛酸乙酯。

色谱柱与色谱条件:色谱柱 (不锈钢或玻璃):2 m; 固定相:Chromosorb 103, 60-80 目;柱温:200; 气化室和检测器温度:240; 载气 (高纯氮) 流量:40 mL/min; 氢气流量:40 mL/min; 空气流量:500 mL/min。

2 结果与分析

2.1 突变菌株的获得

以 F718, R719 为引物,以质粒 pFA6a-kanM X4 为模板进行 PCR 扩增,得到转化目的片段。采用一步基因转化法获得突变菌株。结果见图 1。

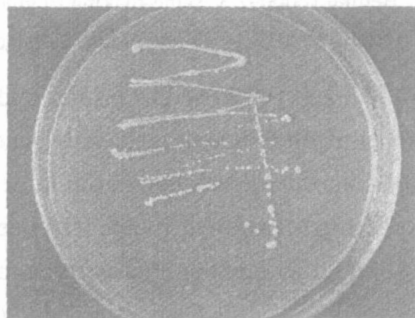


图1 突变菌株生长于抗性平板

2.2 突变株未驯养前发酵液各项指标测定

突变株未驯养前发酵液各项指标的气相色谱测定结果见图 2。

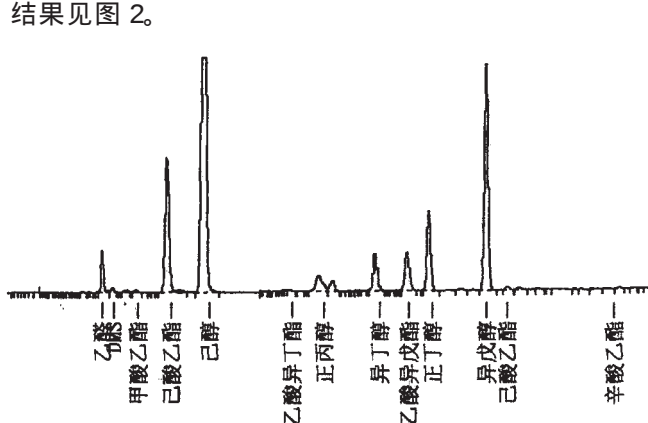


图2 突变株未驯养前发酵液指标测定结果

突变株乙醛含量为 5.386 mg/L, 由于突变株发酵性

能尚未稳定,但比原菌株乙醛含量 7.932 mg/L 已有所降低。

2.3 驯养后的突变株小试发酵液各项指标的测定

2.3.1 跟踪测定发酵液中乙醛指标

连续跟踪 5 d 测定发酵液中乙醛含量,结果见图 3。

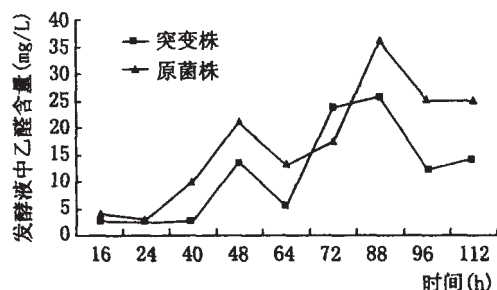


图 3 跟踪突变株与原菌株发酵液中乙醛含量的对比结果

从图 3 可看出,针对单一风味指标乙醛,在整个发酵过程中突变株比原菌株乙醛含量相应降低,说明我们利用基因工程技术实现对啤酒酵母的改良。

2.3.2 发酵结束时各项指标测定(图 4,图 5)

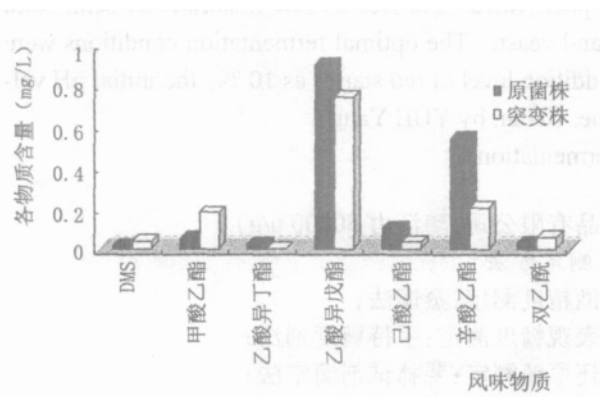


图 4 原菌株与突变株发酵液中风味物质对比结果

从图 4,图 5 可以看出,除了双乙酰、甲酸乙酯、DMS 外,发酵液中其他风味指标也相应降低,而啤酒的好坏是一个综合指标的衡量,小试生产和工业化生产存在着差异,所以此菌株是否适合大众口味,能否用于工

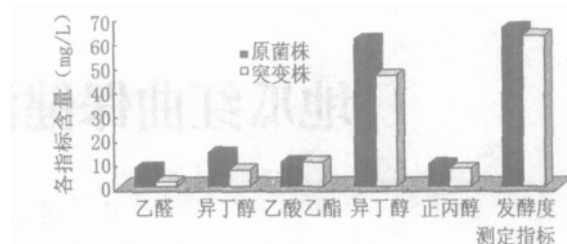


图 5 原菌株与突变株发酵液中各项测定指标对比结果

业化生产还有待于进一步鉴定。

3 结论

3.1 通过基因敲除技术获得了一株 ADH 基因突变的工业酿酒酵母,通过驯化逐渐适应啤酒酿造环境。

3.2 通过连续 5 d 跟踪测定乙醛指标,显示突变株乙醛含量与原菌株比较相应降低。

3.3 驯养后的突变株发酵结束时,双乙酰含量为 0.058 mg/L 与原菌株 0.034 mg/L 相比有所升高。突变株发酵度为 63%,比原菌株 66% 略有降低。突变菌株其他风味指标也相应降低,这是否影响到啤酒的综合指标及口感还有待于专家鉴定。

参考文献:

- [1] 廖惟,顾国贤,等.啤酒风味老化-老化机理及抗老化的研究进展[J].酿酒,1996,112(1):1-15.
- [2] 单连菊,张双玲.浅谈啤酒酵母的研究与发展[J].酿酒,1999,(4):56-57.
- [3] 杨毅,冯景章.啤酒酿造过程中影响乙醛变化因素的研究[J].食品与发酵工业,2002,28(10):25-30.
- [4] Geiger E and Pendl A. Technological factors in the formation of acetaldehyde during fermentation[J]. M BAA Technical Quarterly, 1976, 13(1):51-63.
- [5] 李宏.啤酒中乙醛的研究[D].北京:中国食品发酵工业研究院,2004.
- [6] 奥斯伯 F,布伦特 R,等.颜子颖,王海林译.精编分子生物学实验指南(第三版)[M].北京:科学出版社,2001.
- [7] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W,黄培堂,等译.分子克隆实验指南(第三版)[M].北京:科学出版社,2002.

酒类流通溯源制度 2006 年 1 月 1 日起正式实施

本刊讯:从 2006 年 1 月 1 日起,我国新建立酒类流通溯源制度要求经营者填写“酒类流通随附单”,详细记录酒类商品的流通信息,通过酒类商品自出厂到销售终端全过程流通信息的衔接,主管部门、经营者、消费者可以了解任何一瓶酒的流通过程。

于 2006 年 1 月 1 日正式实施的《酒类流通管理办法》是我国第一部全国统一的酒类市场流通管理规定,旨在保障消费者的饮酒安全,使我国酒类管理走上法制化、规范化的轨道。(陶陶)

上海葡萄酒的消费量首次超过白酒

本刊讯:2005 年上海国际酒饮博览会于 12 月 19 日在光大国际会展中心开幕。据主办方上海市酿酒专业协会透露,今年,上海市酒类食品消费总量将突破 120 万千升,创历史新高;其中,葡萄酒的消费量首次超过了白酒。

上海市场今年的产销增幅达到 15%,全市酒类食品消费总量中,啤酒约为 100 万千升,黄酒 18 万千升,葡萄酒 5 万千升,白酒 4 万千升。就葡萄酒而言,200 多个品牌中,近 150 个品牌来自国外。(江砂)