

低双乙酰啤酒酵母的选育

余晓红¹, 王资生¹, 汪志君², 方维明²

(1. 江苏盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003 2. 江苏扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 将 APV 啤酒酵母菌株在不同的双乙酰含量梯度培养基内培养, 挑出抗双乙酰的变异菌株, 经菌种分离、筛选、发酵及双乙酰驯养等步骤选育出一株 7# 菌, 11 °C 低温发酵, 双乙酰峰值 0.36 mg/L, 成品啤酒双乙酰含量 0.06 mg/L, 真正发酵度 66.1 %。

关键词: 微生物; 双乙酰; 啤酒酵母; 选育

中图分类号: TS261.1 ; TS262.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286 (2005)10-0026-03

Breeding of Beer Yeast for Low Diacetyl

YU Xiao-hong¹, WANG Zi-sheng¹, WANG Zhi-jun² and FANG Wei-ming²

(1. Chemistry & Bioengineering Department of Yancheng Technical Institute, Yancheng, Jiangsu 224003; 2. Food Science & Engineering College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: Diacetyl resistant mutant strain was selected through the culture of APV beer yeast strains in gradient culture mediums of different diacetyl content. Then after separation, screening, fermentation, and diacetyl domestication, a strain was finally developed named as 7# strain. Such strain could achieve low temperature fermentation at 11 °C with peak value of diacetyl as 0.36 mg/L. And diacetyl content in product beer was 0.06 mg/L and the actual fermenting degree was 66.1 %. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; diacetyl; beer yeast; breeding

啤酒酵母本身的发酵性能优劣是影响啤酒质量的一个重要因素。性能优良的酵母菌种在整个发酵过程中要求双乙酰峰值低、还原速度快^[1-5]。由于双乙酰是啤酒成熟的标志性指标, 因此在整个发酵过程中严格控制双乙酰的产生量是至关重要的^[6-8]。

本实验对在控制双乙酰含量上存在缺陷的啤酒酵母进行了改良, 选育出低产双乙酰啤酒酵母^[9-11]。将啤酒酵母在不同的双乙酰含量梯度的培养基内培养, 筛选到能够在高浓度双乙酰含量存在下, 能正常进行代谢活动的抗双乙酰的变异酵母菌株, 这些抗双乙酰的变异菌株的双乙酰还原能力强, 能够增加双乙酰还原速度, 使生产的啤酒产品的双乙酰含量较低^[10,12,13]。

1 材料与方法

1.1 原料

发酵用麦汁: 取自中丹啤酒厂 11°P 麦汁, α -AN 为 167 mg/L, pH 为 5.56。

菌种 啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) APV, 由扬州大学食品

科学与工程学院食品科学系提供。

1.2 实验方法

1.2.1 低双乙酰啤酒酵母选育培养基处理

对照平板: 麦汁琼脂培养基, 琼脂添加量 2 %。

双乙酰平板: 双乙酰麦芽汁培养基, 双乙酰添加量分别为 1.5 mg/L, 2.0 mg/L, 2.5 mg/L, 琼脂添加量 2 %。

培养基的灭菌: 于灭菌釜 121 °C 灭菌 15~20 min。

1.2.2 选育低双乙酰啤酒酵母的方法

1.2.2.1 双乙酰的抗性处理

①将保藏菌种 (斜面) 活化后接 1 环于 5 mL 麦汁试管中, 25 °C 下培养 24 h。

②取 1 mL 于 9 mL 麦汁试管中 25 °C 下培养 24 h。

③移放 100 mL 麦汁锥形瓶培养至出芽率 < 3 %。

④取 10 mL 菌液于 2000 r/min 离心, 去上清液, 加入 10 mL 无菌水振荡, 稀释涂布不同含量双乙酰平板。

⑤3 d 后挑出白色菌落, 进行变异菌株确认, 测定细胞大小和凝聚力, 做低温发酵实验。

收稿日期 2005-06-13

作者简介 余晓红 (1976-), 女, 江苏人, 硕士, 讲师, 发表论文数篇。

1.2.2.2 双乙酰间歇驯养

①保藏菌种经活化后扩培至 300 mL 麦汁三角瓶中发酵。

②第 3 天外加双乙酰,继续发酵到第 5 天,酵母泥接种重新发酵。

③重复以上实验,发酵第 5 代后,测双乙酰水平。

④添加的双乙酰浓度从 1.0 mg/L 按每代 0.1 mg/L 的增长量升高到 1.5 mg/L。

1.2.2.3 双乙酰连续驯养

选一株在低温发酵实验中还原较好的菌株进行逐级扩培,酵母泥接种低温发酵至第 3 天时,外观浓度降至 4%~5%,将发酵液倒出,121℃下灭菌 20 min 杀死酵母,冷却后加一定浓度的无菌双乙酰溶液,用恒流泵连续流加入装有酵母和上述发酵液(未灭菌)的层析柱中,发酵液从上端通过导管流出,盛接在一个灭过菌的三角瓶中,连续运行 7 d,每天测定流出液的细胞数,分离筛选出双乙酰还原能力强、发酵旺盛、凝聚力集中的菌株。

2 结果与分析

2.1 双乙酰抗性突变菌株的选育

将离心分离后的酵母泥用无菌水制成酵母悬浮液,取 0.1 mL 分别涂布添加量为 1.5 mg/L, 2.0 mg/L, 2.5 mg/L 的双乙酰平板和对照平板。25℃恒温培养 3 d 后,双乙酰添加量为 1.5 mg/L 和 2.0 mg/L 的平板上只有少量生长菌,1.5 mg/L 的每个平板上约有 42±4 个菌落,2.0 mg/L 的每个平板上约有 28±2 个菌落;添加量为 2.5 mg/L 的平板上无生长菌;对照平板上有大量的菌落出现,约有 280±8 个。因而,1.5 mg/L, 2.0 mg/L, 2.5 mg/L 的双乙酰添加量的致死率分别为 85%, 90%, 100%。

挑取在双乙酰添加量为 1.5 mg/L 和 2.0 mg/L 的平板上生长的白色小菌落于双乙酰添加量为 2.5 mg/L 的平板上划线复证,25℃恒温培养 3 d 后,在 2.5 mg/L 的平板上出现生长菌,为突变菌株,共挑出 40 个白色菌落。将 40 株菌培养到出芽率<5% 时测定细胞大小及凝聚力,挑选较小的细胞和适当凝聚力的菌株进行低温发酵实验。表 1 为其中的 8 株菌的测定结果。选取 3-1-2, 3-1-3, 3-2-2, 3-2-4 共 4 株菌进行低温发酵实验,结果见表 2。

原出发菌种 APV 和经过诱变后的双乙酰抗性菌株 3-1-2 和 3-2-2 经双乙酰 5 代间歇驯养后的发酵情况见表 3。结果表明,经双乙酰喂养间歇驯养后的菌株在发酵 5 d 以后,双乙酰含量要比未经驯养的出发株 APV 的低。

表 1 细胞大小及凝聚力的测定

菌株	指标			
	大小(μm)	长短轴比	体积(μm ³)	凝聚力(%)
3-1-1	5.7×8.1	1:1.42	138	41.3
3-1-2	5.2×7.6	1:1.46	108	48.6
3-1-3	5.3×7.7	1:1.45	113	55.2
3-1-4	6.0×8.2	1:1.37	154	54.3
3-2-1	5.4×8.0	1:1.48	122	51.6
3-2-2	5.5×7.6	1:1.38	120	49.1
3-2-3	5.3×7.5	1:1.42	110	52.7
3-2-4	5.1×7.5	1:1.47	102	51.9
APV	6.4×8.0	1:1.25	171	48.9

表 2 一代酵母低温发酵产双乙酰水平

指标	菌株				
	3-1-2	3-1-3	3-2-2	3-2-4	APV
双乙酰(mg/L)	0.43	0.59	0.47	0.61	0.79
外观浓度(%)	2.50	2.60	2.30	2.40	2.40
外观发酵度(%)	75.5	74.5	77.5	76.5	76.5

表 3 5 代双乙酰喂养间歇驯养后低温发酵结果

指标	菌株			
	APV(原)	APV(驯)	3-1-2	3-2-2
双乙酰(mg/L)	0.64	0.51	0.36	0.42
外观发酵度(%)	74.5	76.8	75.2	73.6

3-1-2 菌株在柱中细胞密度为 5.8×10^7 个/mL,流加发酵液外观浓度为 4.8%,双乙酰含量 2.5 mg/L,流速为 8 mL/h,温度 8℃,连续驯养 7 d 后,从柱中分离筛选出 10 株菌进行低温发酵实验,其中 5 株菌细胞大小、双乙酰含量和凝聚性等指标相对较好,结果见表 4。

表 4 双乙酰连续驯养后分离菌株的低温发酵结果

指标	菌株				
	1 [#]	3 [#]	4 [#]	7 [#]	8 [#]
大小(μm)	5.2×7.6	5.7×7.5	5.4×8.1	5.3×7.3	5.1×7.5
长短轴比	1:1.46	1:1.32	1:1.50	1:1.38	1:1.47
体积(μm ³)	108	128	124	108	102
双乙酰(mg/L)	0.39	0.41	0.38	0.34	0.39
外观发酵度(%)	71.8	69.1	75.0	73.2	72.0
F 值(%)	41.2	43.8	40.9	49.2	51.3

2.2 优选菌株小型放大实验

经过稳定性实验,最后选取 7[#] 菌进行 1200 mL 的放大实验,发酵 14 d 后,双乙酰含量为 0.06 mg/L,峰值为 0.36 mg/L,真正发酵度为 66.1%,啤酒风味基本不变。检测指标见图 1。

最后得到一株大小为 $5.3 \times 7.3 \mu\text{m}$,双乙酰峰值 0.36 mg/L,成品啤酒真正发酵度 66.1%,风味基本不变的较理想菌株。

参考文献:

- [1] 管敦仪.啤酒工业手册(上册)[M].北京:轻工业出版社,1982. 473-503.

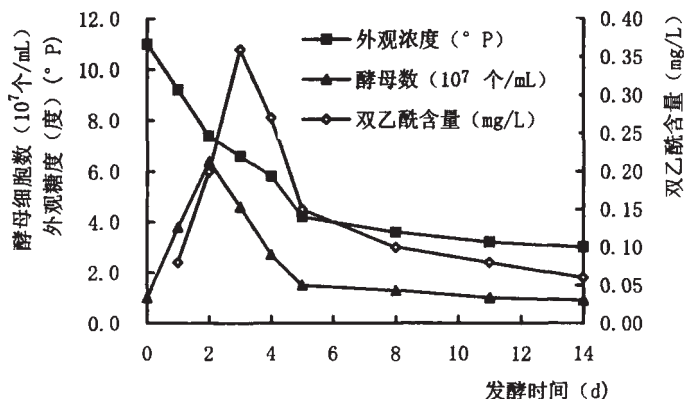


图 1 7# 菌株发酵曲线

- [2] 李绒.啤酒生产过程中双乙酰的控制[J].酿酒科技,2002,(2):66-67.
- [3] 顾国贤.新世纪中国啤酒工业发展展望[J].酿酒科技,2002,(4):28-30.
- [4] Enari,T.M.One hundred years of brewing research[J].Journal of the Institute of Brewing,1995,101(3):89-97.

- [5] 顾国贤.酿造酒工艺学(第二版)[M].北京:轻工业出版社,1996.172-223.
- [6] 杜绿君,袁惠民.啤酒酵母和微生物管理[M].北京:轻工业出版社,1990.109-111.
- [7] 黄祖新.控制啤酒酿造过程中的双乙酰的生物工程技术进展[J].酿酒,1998,126(3):12-14.
- [8] 葛清秀,黄祖新.应用遗传育种技术控制啤酒双乙酰生成量[J].泉州师范学院学报(自然科学),2001,19(2):68-70.
- [9] 管敦仪.啤酒工业手册(中册)[M].北京:轻工业出版社,1982.211-216.
- [10] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:轻工业出版社,1994.544-545.
- [11] 檀耀辉.微生物学(第二版)[M].北京:轻工业出版社,1994.542-546.
- [12] 郑国昌.细胞生物学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1992.204.
- [13] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1993.102-103.

全国重点白酒企业总工程师会议在云南召开

本刊讯 第三届全国重点白酒企业总工程师(技术负责人)会议于2005年9月6日至8日在云南省玉溪市召开。到会代表有47个企业和单位共计57人。本届会议由中国酿酒工业协会主办,云南玉林泉酒业有限公司承办。中国酿酒工业协会理事长王延才、秘书长王琦,云南省技术监督局副局长崔守昌,云南省食品协会会长赵玉堂,玉溪市副市长李家茂、李润福,峨山县委、县政府、县人大、县政协的有关领导出席了会议并讲话。王延才理事长做了题为“树立科学发展观,探索白酒行业发展方向”的专题报告,指出,“十五期间”,白酒行业基本达到了控制总量的目标,年产量保持在400万千升左右,利润和销售收入均有较大幅度增长;要坚持“以人为本”的科学发展观,正确理解总量控制与持续发展的关系,用科学发展观探索



王延才理事长做专题报告



全国白酒重点企业技术负责人会议

白酒的发展方向,依靠科技进步推进白酒发展。

会议收到学术论文20多篇,梁邦昌、徐占成、庄名扬、沈才洪等20多位专家、学者和技术负责人做了大会交流发言。王琦秘书长主持会议讨论,就目前白酒行业的发展方向、存在的问题进行了热烈讨论。代表们畅所欲言,各抒己见,气氛热烈,是近年来的会议所少有。会议论文也有相当的技术深度。

会议期间,代表们参观了玉林泉酒业有限公司,其独特的生产工艺,独树一帜的产品风格和优美的生态环境给代表们留下了美好的印象。 小雨)