

低产硫化氢啤酒酵母菌株的选育

陈叶福,王 艳,丁书美,肖冬光

(天津工业微生物重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘要: 啤酒酵母出发菌株 S-5 经紫外诱变后,以醋酸铅平板初筛,后经在不同硫源平板上培养筛选,再经啤酒发酵复筛,最终获得一株低产硫化氢的啤酒酵母突变株 M 8。结果表明,突变株 M 8 的二氧化硫生成量为 30.4 mg/L,硫化氢生成量为 4.6 μg/L。与出发菌株相比,M 8 硫化氢生成量下降了 78.2%。

关键词: 微生物; 啤酒酵母; 硫化氢; 二氧化硫

中图分类号:TS262.5;TS261.1;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2007)07-0023-03

B reeding of Beer Yeast Strain of Low H₂S Y ield

CHEN Ye-fu,W ANG Yan,D ING Shu-m ei and X IA O Dong-guang

(Tianjin Key Microbe Lab,Bioengineering College of Tianjin University of Science & Technology,Tianjin 300457,China)

Abstract: The mutant strain M 8 of low H₂S yield was produced as follows: starting strain S-5 treated by UV irradiation, then primary screening by lead acetate media plates, and then cultured on different sulfur sources plates and then secondary screening, and finally beer fermentation experiments for screening. The results showed that SO₂ output of mutant M 8 was 30.4 mg/L and H₂S output was 4.6 μg/L. Compared with the mother strain, H₂S output of M 8 reduced by 78.2%.

Key words: microbe; beer yeast; H₂S; SO₂

啤酒的风味稳定性是指啤酒灌装后,酒的风味长期不变的可能性,是啤酒的重要质量指标之一。硫化氢和二氧化硫是影响啤酒风味稳定性的重要物质。硫化氢对啤酒风味具有双重作用,即微量存在时,是构成啤酒风味某些特点的的必要条件,过量则起反作用。当啤酒中含量超过 10 μg/L 就能感到明显的“酵母臭味”。二氧化硫则是啤酒中一个含量较低而又重要的组分,其担当防腐剂、抗氧化剂,降低各种羰基化合物对啤酒风味的影响,且具有风味稳定剂的作用^[1~2]。啤酒发酵产生的硫化氢和二氧化硫主要是在啤酒酵母含硫氨基酸代谢途径中形成的。其中,催化亚硫酸盐到硫离子的酶是亚硫酸盐还原酶^[3]。亚硫酸盐还原酶活性的高低和酶数量的多少直接影响硫化氢和二氧化硫的生成量。

通过诱变育种,选育出能使硫化氢生成量降低、同时二氧化硫产量适当提高的啤酒酵母菌株,以增加啤酒的抗氧化能力,并对啤酒发酵过程中硫化氢的形成机理及亚硫酸盐还原酶的酶活进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 菌种

基金项目:天津市自然科学基金资助(05YFJMJC03000)。

收稿日期:2007-04-18

作者简介:陈叶福(1973-),男,博士,副教授,主要从事酵母遗传改良和生物质生物转化方面的研究。

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)S-5,天津科技大学现代酿造研究室保藏。

1.2 分析方法

硫化氢的测定:亚甲基兰分光光度法^[4]。

啤酒中总二氧化硫的测定:碘量法^[5]。

1.3 实验方法

1.3.1 低产硫化氢啤酒酵母的初筛平板

醋酸铅显色平板:YEPD 固体培养基加 0.05% 醋酸铅。

不同硫源鉴别培养基:葡萄糖 2%,氯化钠 0.01%,磷酸二氢钾 0.15%,氯化镁 0.4%,氯化钙 0.01%,碘化钾 0.01%,磷酸氢二铵 0.1%,维生素母液 0.1%,微量元素母液 0.1%,硫化钠(或亚硫酸钠)5 mg/L,琼脂 2%,pH 5.0~6.0。

1.3.2 诱变育种

采用较低诱变剂量对啤酒酵母 S-5 进行紫外诱变,取诱变后的菌悬液 0.1 mL 涂布于醋酸铅显色平板上,挑出白色或浅棕色菌落。再分别对应点接于以 Na₂S 或 Na₂SO₃ 为唯一硫源的鉴别培养基上,28℃ 培养,挑选在

Na₂S 为唯一硫源的培养基上菌落较大, 同时在以 Na₂SO₃ 为唯一硫源的培养基上菌落较小的菌株。

1.3.3 啤酒发酵

原麦汁浓度 10 Brix, 酵母泥接种量为 0.5%。

2 结果与分析

2.1 醋酸铅显色平板初筛

取细胞浓度适中的菌悬液 0.1 mL 涂布于醋酸铅显色平板上, 28 培养 4 d。待长出菌落后, 选择白色或浅棕色的菌落再次点接于醋酸铅显色平板上, 于 28 培养 4 d, 结果见图 1。并从图 1 中挑出白色或浅棕色菌落, 初步认定为所需突变株, 共挑选突变株 103 株。

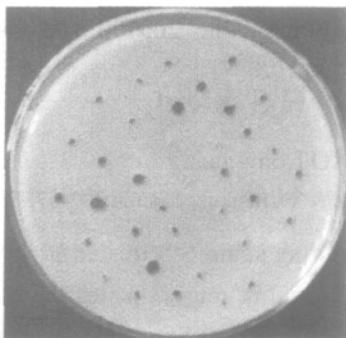
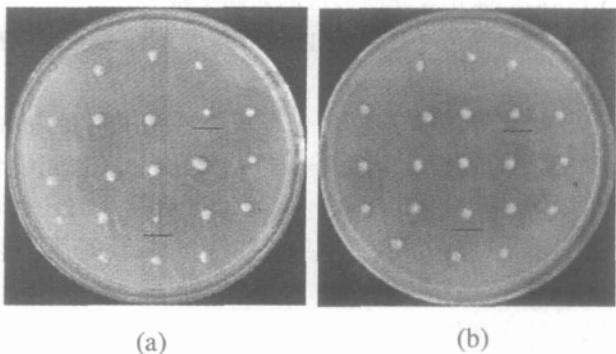


图 1 醋酸铅平板菌落显色情况

2.2 含不同硫源鉴别培养基筛选

将挑选出的 103 株突变株分别对应点接于以 Na₂S 或 Na₂SO₃ 为唯一硫源的鉴别培养基上, 28 培养 5 d, 结果见图 2。并从图 2 中挑选在 Na₂S 为唯一硫源的培养基上菌落较大, 同时在以 Na₂SO₃ 为唯一硫源的培养基上菌落较小的菌株接于斜面上, 培养后待测。共挑选 18 株, 分别标号为 M 1~M 18。



a: 以亚硫酸钠为唯一硫源的平板; b: 以硫化钠为唯一硫源的平板。

图 2 不同硫源平板菌落生长情况

2.3 突变株复筛

2.3.1 二氧化硫生成量测定

对初筛所得的 18 株突变株与诱变前出发菌株 S-5 同时进行发酵实验, 分别测定二氧化硫生成量。发现这

18 株突变株的二氧化硫生成量较出发菌株 S-5 均有较大改变, 其中增加比较多的有 M 8 和 M 15, 其二氧化硫生成量分别增加了 6.08 mg/L 及 6.12 mg/L, 见表 1。

表 1 18 株突变菌株 SO₂ 生成量 (mg/L)

菌株	SO ₂ 含量	SO ₂ 增长量	菌株	SO ₂ 含量	SO ₂ 增长量
S-5	24.32	0	M10	28.96	4.64
M1	22.08	-2.24	M11	27.04	2.72
M2	26.56	2.24	M12	28.32	4.00
M3	26.24	1.92	M13	23.36	0.96
M4	23.68	-0.64	M14	28.16	3.84
M5	28.26	3.94	M15	30.44	6.12
M6	21.57	-2.35	M16	24.03	-0.29
M7	22.08	-2.24	M17	24.96	0.64
M8	30.4	6.08	M18	20.85	-3.47
M9	25.92	1.6			

2.3.2 啤酒发酵过程中硫化氢生成量测定

选择二氧化硫增长量比较高的突变菌株 M5、M8、M10、M12、M14 和 M15 进行突变株发酵过程中硫化氢的测定, 结果见表 2。

表 2 6 株突变菌株 H₂S 生成量 (μg/L)

项目	菌株						
	S-5	M5	M8	M10	M12	M14	M15
H ₂ S 生成量	25.7	20.5	4.6	19.4	7.8	15.2	13.6
H ₂ S 降低量	0	5.2	21.1	6.3	17.9	10.5	12.1

从表 2 可看出, 所选择的 6 株突变株的硫化氢生成量较出发菌株均有所下降, 下降最大的菌株硫化氢产生量为 4.6 μg/L, 还达不到出发菌株的 1/5。最终选出 M8 为低产硫化氢的啤酒酵母突变株, 其二氧化硫生成量提高了 6.08 mg/L, 硫化氢生成量降低了 21.1 μg/L。

2.4 硫化氢产生规律初探

分别测定啤酒酵母出发菌株 S-5 和突变株 M8 发酵过程中硫化氢的生成量, 及其二氧化碳累积失重, 结果见图 3。

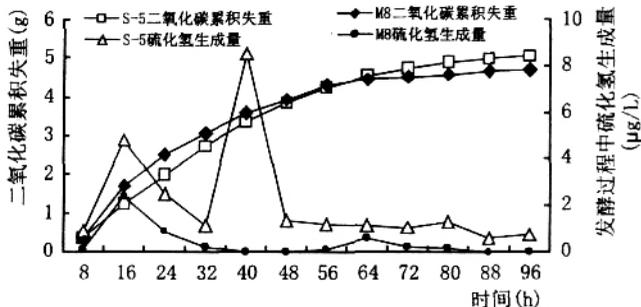


图 3 S-5 与 M8 发酵过程中二氧化碳累积失重及硫化氢产生量的比较

通过比较图 3 中的两株菌代谢硫化氢的形成过程可看出, 不仅突变株 M 8 硫化氢总生成量明显降低, 同时各个对应时间点上硫化氢生成量也比出发菌株 S-

5 下降很多。两株菌都在第 16 h 时出现第一个硫化氢生成量的高峰期。经过第 16 h 的高峰期之后,两株菌硫化氢形成的下降趋势相似,硫化氢生成量逐渐减少。在第 40 h 出发菌株 S-5 硫化氢生成量又出现第二个高峰期,此后慢慢减少,直至不再有硫化氢生成。而突变株 M 8 在这段时间硫化氢生成量却一直为零,在第 40 h 时没有出现第二个高峰期,而在第 64 h 出现一个较小的峰,此后硫化氢生成量又逐渐降低,直至趋于零。

3 讨论

啤酒酵母突变株 M 8 是由于紫外诱变而使亚硫酸盐还原酶受到影响的突变株,因为发酵前期,大部分硫化氢是酵母对蛋氨酸的分解代谢产生的。此时亚硫酸盐还原酶的酶活很低,且受到麦芽汁中蛋氨酸的抑制,酵母经硫代谢形成硫化氢很少。因此,突变株 M 8 在这段时间也有硫化氢的生成,但是比出发菌株少。随着发酵的进行,酵母开始利用硫酸盐作为硫源合成蛋氨酸和半胱氨酸等含硫氨基酸,且蛋氨酸的缺乏减轻了对亚硫酸盐还原酶等的反馈阻遏,硫化氢大量生成。出发菌株 S-5 在这段时间有大量的硫化氢生成,突变株在这段时期硫化氢的生成量很少,特别是没有出现在 40 h 的第二个峰,因此可以推出 40 h 左右的这段时间是亚硫酸盐还原酶活力最高的时期。之后在发酵慢慢进入后期阶段时,亚硫酸盐还原酶酶活不断降低,这段时期所形成的硫化氢主要是通过酵母蛋白质的分解,即酵母老化自溶形成

的。出发菌株和突变株在这段时期都有少量的硫化氢生成,而突变株 M 8 硫化氢生成量比出发菌株 S-5 还要少,可以证明亚硫酸盐还原酶确实受到影响。但是啤酒发酵过程中,亚硫酸盐还原酶究竟是哪些部位发生了变化,这些变化又给啤酒发酵过程中硫化氢的形成规律产生了怎样的影响,这些正在进一步研究过程中。

参考文献:

- [1] Ho-Yone Sohn, Eun-Joo Kum, Gi-seok Kwon et al. Regulation of branched-chain, and sulfur-containing amino acid metabolism by Glutathione during ultradian metabolic oscillation of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *The Journal of Microbiology*. 2005, 43(4): 375-380.
- [2] Jiranek V, Langridge P, Henschke P A. Determination of sulphite reductase activity and its response to assimilable nitrogen status in a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast [J]. *Journal of Applied Bacteriology*. 1996, 81(3): 329-336.
- [3] Thomas D, Surdin-Kerjan Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997, 61(4): 503-532.
- [4] 丁书美,陈叶福,肖冬光.啤酒中硫化氢测定方法的研究[J].酿酒,2006,33(6):94-95.
- [5] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1988.
- [6] 丁书美,陈叶福,肖冬光,等.啤酒中二氧化硫测定方法的研究[A].中国发酵工程学术研究会论文集[C].宁夏,2006.

(上接第 22 页)

20 m³,进气温度为 20 ,离开反应器的温度为 30 。此状态下 CO₂ 气体的比热 C_{CO₂} 为 1.118 J (g·)^[10]。计算 Q₄ 为 409933 J。

将以上数值代入(1)式可得 Q_总 约为 -80 kJ,此热量可使系统温度降低 0.8 左右。考虑到在计算过程中的一些条件可忽略和近似处理,理论的计算同样说明了气载耦合发酵的确显著而有效的控制了气载耦合发酵反应器内的温度,使发酵过程顺利进行。

符号说明:

a——固态发酵淀粉含量,本试验中为 21.7%,相当于麦芽糖含量 21.7% × 1.05 = 22.8% ;

——固态发酵料的比重,本试验中为 0.93 g/cm³;

V——发酵体积,本试验中为 24 L;

r——发酵培养基中的淀粉利用率,计 85% 被利用;

C₁、C₂——分别为 35 水和乙醇的汽化比热;

ρ₁、ρ₂——分别为 35 水和乙醇的比重(20)。

参考文献:

- [1] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1995.

- [2] 储矩,等.现代工业发酵调控学[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [3] Walsh P K, Liu C P, Findley M E, et al. Ethanol separation from water in a two-stage adsorption process [J]. *Bio Tech Bio Eng Symp* 1983, (13): 629.
- [4] M Cheryan, M A M ehaia. Membrane separations in biotechnology [M]. New York: Marcel Dekker, 1986.
- [5] Matsumun M, Mark H. Elimination of ethanol inhibition by penetration [J]. *Bio Tech. Bio Eng*, 1986, (16): 534.
- [6] H M Garcia. Use of *Candida Rugosa Lipuse* immobilized in a spiral wound membrane reactor for the hydrolysis of milk fat [J]. *Enzyme Micro Tech*. 1992, (14): 535-542.
- [7] Udriot H, Ampuere S, Marison I W, et al. Extractive fermentation of ethanol using membrane distillation [J]. *Extractive Bio Tech. Letter*, 1989, (7): 506-509.
- [8] Hwai-shen Liu, Hsien-wen Hsu. Analysis of gas stripping during ethanol fermentation-I. In a continuous stirred tank reactor [J]. *Chemical Engineering Science*, 1990, (5): 1289.
- [9] 梁世中.生物工程设备[M].北京:中国轻工业出版社,2005.
- [10] 王秀道,尹卓容.发酵工厂二氧化碳的回收和应用[M].北京:中国轻工业出版社,1995.