

离子注入诱变选育全小麦啤酒酵母菌株

袁 仲 陈柯羽

(商丘职业技术学院,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 1 株菌 Lz37,其凝聚性强(本斯值 1.4 mL),适合于用小麦汁发酵生产啤酒,其发酵度为 66%~68%,双乙酰含量(0.124 mg/L)低于口味阈值。

关键词: 微生物; 离子注入; 诱变; 全小麦啤酒; 酵母菌株

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(2009)11-0055-03

Mutagenic Breeding of Whole-wheat Beer Barm Strains by Ion Implantation

YUAN Zhong and CHEN Ke-yu

(Shangqiu Occupational Techniques College, Shangqiu, He'nan 476000, China)

Abstract: A barm strain Lz37 with strong cohesiveness (Sri Lankan Value=1.4 mL) was screened from beer barm by ion implantation of 10 Kev low-energy N^+ . This strain was suitable for wheat juice fermentation with its fermenting degree between 66%~68%. The content of diacetyl in the produced beer (0.124 mg/L) was lower than beer taste threshold. (Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; ion implantation; mutation; whole-wheat beer; barm strains

离子束作为一种生物品种改良的新技术是受太空育种等辐射育种的启发,由中国科学院等离子体物理研究所于 1986 年开创的,经过近 20 年的发展,这方面的研究无论在理论上还是实际应用上都取得了一定的进展,已在诱变育种、植物转基因、生命起源和进化以及环境辐射与人类健康等方面取得了一些重要的阶段性研究成果,其中在微生物诱变育种的研究中,利用离子注入进行微生物菌种改良已在生产实践中得到广泛的应用。

离子束诱变育种与传统的辐射法及化学诱变剂相比,具有损伤轻、突变率高、突变谱广、遗传稳定、易于获得理想新品(菌)种等特点,对品(菌)种的选育是较理想的方法。笔者采用 10 Kev 低能 N^+ 注入啤酒酵母菌株商啤 2 号(SP-02),通过分离筛选得到 1 株发酵度、酒精度、凝聚性等特性保持亲株 Lz37 的优良性状的啤酒酵母菌株。

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 Brix 小麦芽汁,加 2%琼脂。

发酵培养基:10 Brix 小麦芽汁。

1.3 培养方法

试管培养:取斜面菌种一环,接种于盛有 10 mL 麦

汁培养基的试管内,25℃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℃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℃低温发酵 8 d。

500 L 罐发酵:将筛选得到的菌株用 10 Brix 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 测定方法

凝聚性的测定:采用本斯值法。

发酵速度测定:取待试菌种,接种于麦汁培养基中,于 25℃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 $(1.0 \times 1.5 \times 10^7)$ 个/mL。控制在 10℃左右进行发酵。每天 2 次测定其外观糖度。当外观糖度为 3.5 Brix 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的测定:采用 GC-8A 型气相色谱测定。

1.5 离子注入方法

把待处理的菌株细胞均匀地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 $1 \times 10^{14} N^+ / cm^2$ 的 N^+ 束注入啤酒酵母,每次连续注入 5 s,

收稿日期:2009-07-27

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。

间隔 50 s, 总剂量为 0(对照)~ $7 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$, 注入靶室的真空度为 $1 \times 10^3 \text{ Pa}$ 。

1.6 存活率曲线的测定

测定各剂量处理后酵母的存活率, 绘制成存活率-剂量曲线。

1.7 菌株筛选方法

将经过离子注入处理后生长良好, 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, 进一步做双乙酰含量、发酵度、酒精度等生产特性分析。

2 结果与分析

2.1 离子注入对存活率的影响

由对照平板和各剂量注入处理后的平板, 在相同条件下培养后进行菌落计数绘制存活率曲线, 结果见图 1。

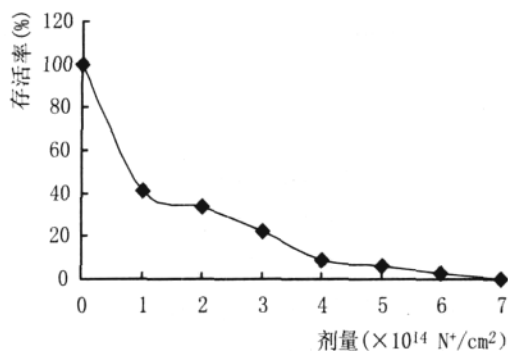


图 1 菌株离子注入后的存活曲线

由图 1 可知, 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 $7 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时, 存活率降为零。存活率在中间有一个上扬的区段。这说明啤酒酵母菌与其他受离子注入的菌体一样也存在初级修复和生物修复机制。而且在此区段微生物的突变率是最高的。因此, 初步选定 $2 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 为合适的诱变剂量。

2.2 初筛

在离子注入剂量 $2 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 条件下诱变, 将生长良好, 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。共挑取菌株 48 株。

2.3 复筛

小麦啤酒黏度高, 酵母悬浮性强, 适用于大麦啤酒的酵母在普通啤酒中凝聚性很好, 成熟啤酒中酵母数较低, 但在小麦啤酒中数量较高, 造成小麦啤酒过滤困难。表 1 为出发菌株发酵后未过滤的成熟啤酒的分析指标。

凝聚作用对于小麦啤酒发酵非常重要, 本斯试验是被普遍采用的评价凝聚性的方法。以凝聚性为指标。对初

表 1 成熟啤酒分析指标

项目	小麦啤酒	普通啤酒
酵母数 (个/mL)	3×10^7	0.7×10^7
黏度 ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)	1.78	1.5~1.6

筛所得到的菌株用本斯值法测定凝聚性。经复筛后发现, 有 8 株菌具有较好的凝聚性, 凝聚性均比出发菌株强。表 2 列出其中凝聚性较好的菌株。

表 2 菌株凝聚性测定

项目	菌株								
	Sp-02	Lz1	Lz12	Lz20	Lz28	Lz31	Lz37	Lz42	Lz46
凝聚性(本斯值 mL)	1.1	1.3	1.4	1.2	1.5	1.3	1.3	1.2	1.2

2.4 双乙酰测定

小麦芽汁中 $\alpha\text{-N}$ 含量低, 造成酵母营养缺乏, 酵母早衰, 降糖慢, 还原性差, 双乙酰含量高, 又由于小麦啤酒的高分子氮以及冷凝固物的含量较多, $\alpha\text{-葡聚糖}$ 、 $\beta\text{-葡聚糖}$ 含量亦多, 发酵后, 酵母表面吸附了较多的冷凝固物, 活性较差, 影响发酵度和双乙酰还原。表 3 为小麦麦芽汁主要质量指标。

表 3 小麦麦芽汁主要质量指标

指标	总可溶性氮 (mg/L)	$\alpha\text{-氨基氮}$ (mg/L)	凝固性氮 (mg/100mL)	黏度 (cp)
范围	1000~1200	200~240	<2.5	1.8~1.9

双乙酰含量的多少是影响啤酒质量的一个重要指标, 出发菌株在大麦啤酒发酵中双乙酰含量在口味阈值 (0.15 mg/L) 以下, 挑选产生双乙酰含量少的酵母是生产优质小麦啤酒的重要条件。将凝聚性较好的 8 株菌株进行 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, 但是比出发菌株在大麦啤酒发酵中的双乙酰含量 (0.072 mg/L) 要高, 结果见表 4。

表 4 发酵液中双乙酰含量的比较 (mg/L)

菌株	双乙酰含量	菌株	双乙酰含量
Sp-02	0.185	Lz31	0.168
Lz1	0.142	Lz37	0.126
Lz12	0.199	Lz42	0.206
Lz20	0.264	Lz46	0.264
Lz28	0.146		

2.5 发酵度、酒精度和发酵速度的测定

发酵度是啤酒成熟的一个重要理化指标。啤酒发酵度的高低, 对啤酒的口感和保存期有重要的影响。凝聚性弱的酵母, 从酒液中分离晚, 沉淀慢, 酒液中细胞密度高, 发酵度高, 回收酵母量少, 滤酒困难; 凝聚性强的酵母, 从酒液中分离早, 沉淀快, 酒液中细胞密度低, 发酵度较低,

滤酒容易。因此,发酵度和凝聚性是一对矛盾。

试验对发酵液双乙酰含量较低的 Lz37 等 5 株菌的发酵度和酒精度进行测定,并与出发菌株商啤 2 号(SP-02)进行比较,结果见表 5。表 5 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 5 不同菌株发酵度、发酵时间和酒精度的比较

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(%)	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

2.6 500 L 罐发酵

由上述各种指标为依据,选择凝聚性较高、发酵液双乙酰含量低、发酵速度较快的 Lz28 和 Lz37 菌株进行 500 L 罐发酵,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,结果见表 6。

由表 6 可知,菌株 Lz37 发酵液的双乙酰含量和高级醇总含量略低于 Lz28,而酯类的总量略高于 Lz28。其中,Lz37 发酵液中双乙酰含量(0.124 mg/L)低于口味阈值。

由河南府泉酒业有限责任公司的专家对 500 L 罐发

表 6 Lz28 与 Lz37 发酵液中某些成分的测定 (μg/L)

成分	Lz28	Lz37
双乙酰含量	147	124
总酯	24.97	25.77
乙酸乙酯	22.7	23.7
乙酸异戊酯	2.27	2.07
高级醇	71.4	70.9
正丙醇 L	9.7	8.1
异丁醇	14.2	13.2
异戊醇	47.5	49.6
酵母数(个/mL)	0.58×10^7	0.62×10^7

酵制得的啤酒进行品评,结果一致认为,Lz37 菌株发酵得到的啤酒口感最佳,如果能将双乙酰值进一步降低,风味会更好。

3 结论

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 1.4 mL),适合于在小麦汁中发酵生产啤酒,其发酵度为 66%~68%,双乙酰含量(0.124 mg/L)低于口味阈值,为了保证后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。●

(上接第 54 页)



图 3 明胶液化情况

2.5 耐乙醇试验和耐酸试验

按试验 1.2.5 和 1.2.6 方案进行试验,结果见表 4。

由表 4 结果可知,该菌株可以耐受 5%~7%浓度的乙醇,在较广泛的 pH 条件下生长代谢,且在中性环境下生长代谢最好。

3 结论

3.1 该菌株经初步鉴定为枯草芽孢杆菌,经革兰氏染色

表 4 耐乙醇试验和耐酸试验

项目	生长代谢情况	项目	生长代谢情况
1%vol 乙醇	生长旺盛,产红色素较多	pH3.8	菌膜很少,几乎不产红色素
3%vol 乙醇	生长旺盛,产红色素	pH4.6	生长一般,有较少红色素产生
5%vol 乙醇	生长一般,产红色素较少	pH5.5	生长较旺盛,产红色素
7%vol 乙醇	生长状况差,几乎不产红色素	pH6.8	菌膜粘着,产红色素
9%vol 乙醇	几乎不生长,不产红色素	pH7.3	生长旺盛,红色光亮

确定为阳性菌,短杆状,好氧,生长温度为 20~45℃,最适生长代谢温度 30~35℃,最适生长代谢 pH6.8~7.3,能耐受 pH3.8,耐受 5%vol~7%vol 乙醇,在 10%的纯淀粉培养基上生长,能水解明胶。

3.2 该菌株具有分泌淀粉酶和蛋白酶活性,可能在大曲生产过程中积累淀粉酶和蛋白酶,对酿酒生产可能有重要作用。

3.3 该菌株具有分泌红色素的特殊能力。今后将对该菌株产红色素的性能及红色素的成分进行进一步鉴定。

参考文献:

- [1] 沈怡方.白酒生产技术全书[M].北京:中国轻工业出版社,1998.45-52.
- [2] 沈萍,等.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2003.103-108.
- [3] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,2001.82-86.
- [4] M.T.马迪根,J.M.马丁可,等.Brock Biology of Microorganisms[M].北京:科学出版社,2000.567-574.
- [5] R.E.布坎南,N.E.吉本斯,等.伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)[M].北京:科学出版社,1984.
- [6] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.