

双乙酰还原性好的酵母菌株的选育

胡鹏刚¹,倪应应¹,张忠阳²

(1.贵州大学化学与化学工程学院,贵州 贵阳 550003;2.贵州神奇啤酒有限公司,贵州 龙里 551200)

摘要: 应用微生物稀释培养法,对生产现场酵母进行了筛选和纯化培养,选出双乙酰还原性能好的酵母菌株。对该菌株进行了相关发酵力分析,并进行发酵成品品尝。最后确定双乙酰还原好的酵母菌株用于生产上,达到理想的效果,从而提高了啤酒风味稳定性。

关键词: 啤酒; 双乙酰; 含量; 选育; 酵母菌株

中图分类号:TS262.5;TS261.4;TS261.1

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2010)07-0024-03

Breeding of Yeast Strains with Good Diacetyl Reducing Capacity for Beer

HU Peng-gang¹, NI Ying-ying¹ and ZHANG Zhong-yang²

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550003;

2.Guizhou Miracle Beer Group Co.Ltd, Longli, Guizhou 551200, China)

Abstract: Yeast strains on the production field were screened and cultured by diluting culture of microorganism to obtain the strain with good diacetyl reducing capacity. The fermenting power of such strain was analyzed and the tasting of product beer fermented by such strain was performed. The results indicated that the use of such strain in beer production could achieve ideal effects and improve beer flavor stability.

Key words: beer; diacetyl; content; breeding; yeast strains

啤酒中的双乙酰指标是啤酒国家标准(GB4927)中的瑕疵点,此指标不合格便视为该产品不合格,所以它是最关键的控制指标。双乙酰主要是酵母发育增殖时,在酵母细胞体内用可发酵性糖经乙酰乳酸合成它所需要的缬氨酸、亮氨酸途径中的副产物,中间产物乙酰乳酸部分排出酵母细胞体外,经氧化脱羧而生成双乙酰,其口味阈值在 0.1~0.15 mg/L 之间^[1]。双乙酰是啤酒中最主要的生青味物质,含量少时,呈奶酪香味,味道有些甜;含量多时,呈馊饭味,它被视为啤酒是否成熟的一项重要指标。优质的啤酒,必须由性能优良的啤酒酵母参与啤酒发酵,在生产上控制双乙酰含量在 0.08 mg/L 以下,方可生产出使消费者满意的啤酒^[2-3]。

酵母质量直接关系到啤酒的质量,所用的酵母活力强,发酵就旺盛,否则发酵缓慢,甚至影响发酵副产物的含量。因此,优良的啤酒酵母应具有以下特点:能有效地从麦汁中摄取和代谢所需要的营养物质;能明显地改进啤酒质量,其代谢产物能赋予啤酒良好的风味;能在发酵结束后,顺利地发酵液中分离出来等特点^[4]。

啤酒酵母与其他的微生物一样,在大生产过程中,会以一定频率发生自发性突变^[5]。本文总结微生物的自发突变与育种这一关系的重要性,结合生产实际,针对欲采

用的工艺回收酵母泥在中试室调整发酵工艺驯化酵母,然后提取满意的酵母泥采用微生物的稀释培养法^[6]对其进行筛选工作。培养获得双乙酰还原能力好的酵母菌株应用于生产,调整发酵工艺,稳定了啤酒的风味稳定性,提高经济效益。

1 材料与方法

1.1 酵母菌株的选育

1.1.1 材料

麦汁、酵母、中试室:国内某啤酒公司生产提供。

培养基:液体培养基 300 mL 3 瓶(共 900 mL);固体麦汁培养基 1000 mL;固体麦汁斜面培养基数支;10 mL 麦汁液体培养基数支。

仪器:试管数支;纸包灭菌平皿数个;无菌吸管数支;酒精灯 1 个;接种针 2 支;恒温培养箱 2 台;水浴锅 1 台。

1.1.2 操作方法

中试酵母驯化:略;稀释平板培养分离法^[5];死灭温度实验:恒温水浴法^[5];发酵力实验:重量法^[5,6];酵母凝聚性实验:本斯值法^[2];各种理化指标测定:见国标 GB4928—2001(《啤酒试验方法》)。

收稿日期:2010-05-24

作者简介:胡鹏刚(1964-),男,副教授、酿造高级工程师,一直从事发酵食品工程和生物物质分离工程的教学和科研工作,发表论文数篇;国家啤酒评委和饮料评委,全国食品行业质量管理先进工作者,贵阳市劳动模范,贵阳市中青年技术带头人。

2 结果与分析

2.1 筛选底物的确定

筛选底物在啤酒厂一般可以是实验室保藏菌种、生产上主酵液或回收用的酵母泥。本实验采用的是回收用的酵母泥,这是由于:①酵母菌种来自生产,又应用于生产,其生理特性上较稳定,适应环境能力强,对保障大生产安全系数大;②可观察到酵母在前几代的发酵情况和品尝酒液的风味口感;③回收用的酵母菌种正处在生命活动旺盛期,生命力强,双乙酰还原低,加之分离前又给予低温处理,使一些不稳定基因的菌株死去,因此一经大生产的驯化选育,可能含有一定比例的正突变细胞,也可能会选到性能优良还原双乙酰好的菌株,即表现出旺盛的生长形势,有利于菌液发酵,有利于还原双乙酰等。本研究取生产线上双乙酰还原指标在 0.08 mg/L 以下的 5# 罐第三代酵母泥作为分离的原始材料,其发酵情况见表 1。

表 1 三代酵母发酵情况

项目	GS-02
主酵时间 (d)	5.0
还原时间 (d)	4
双乙酰峰 (mg/L)	0.28
还原后双乙酰 (mg/L)	0.06
发酵度 (%)	65
酵母的外观形态	椭圆饱满均一

2.2 稀释平板培养分离

2.2.1 菌种的来源及其预处理

在 5# 罐中取一定数量双乙酰还原结束后锥底中部的酵母泥于中试罐中调整工艺,模拟生产现场进行酵母驯化试验,然后取所得到的酵母泥在低温条件下静置处理 2 d,让酵母自行存优汰劣,即作为分离的原始材料。

2.2.2 菌种的稀释筛选

在无菌条件下取一定数量处理过的酵母泥加入到 10 mL 无菌水中,混匀,再从中取 1 mL 加入无菌水中,以 10 倍为梯度稀释,逐次稀释至 10^{-2} ~ 10^{-9} 倍,然后将已稀释成不同倍数的样品吸取 1 mL 分别接入 10^{-2} ~ 10^{-9} 号无菌平皿中,其中 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 倍的各做 2 个平

皿, 10^{-5} 、 10^{-6} 倍的各做 4 个平皿。然后迅速将溶化之固体培养基倒入上述各平皿中,轻轻旋转平皿,使培养基摊平,待培养基凝固后倒置于 25 °C 恒温培养。2~3 d 后,结合镜检挑选 30 个酵母菌单菌落,即中等偏大、健壮、均匀,且丰满、色白,边缘整洁的菌落,接入固体斜面培养基培养备用。

2.2.3 菌种的发酵性能实验

将以上每个菌株进行发酵试验,以降糖速度作为主要指标淘汰 80 % 的菌株,剩下 6 个菌株选入复筛进行菌种发酵性能试验:

①死灭温度实验:先把 10 mL 麦汁(已杀菌)试管恒温至所需温度后,在无菌条件下接菌种于麦汁试管中;每个温度梯度接 2 支试管,1 支对比(温度计插在对比麦汁试管中,温度以试管麦汁为准)。具体方法:将其分成 4 组,分别记好 52 °C、54 °C、56 °C、58 °C,放入恒温水浴中,不同温度下保持 10 min,取出冷却,置于 25 °C 培养,每天观察发酵情况,7 d 后,若某种温度下菌种不再发酵,则该温度为菌种的死灭温度。其结果见表 2。

②第一次发酵力实验:在无菌条件下取菌种接入 10 mL 已杀菌的麦汁液体培养基中于 25 °C 培养 24 h;在无菌条件下将上述液体倒入 150 mL 已杀菌的麦汁培养基中称重,于 25 °C 培养,每天称重 1 次,恒重后,所减掉的量为产生 CO_2 之量;将恒重的 150 mL 发酵液摇匀过滤,取滤液量测其外观浓度,并换算其外观发酵度;取滤液进行蒸馏、称重,测定酒精度、实际浓度、实际发酵度,结果见表 2。

③酵母凝聚性实验:取 5 g 酵母泥于 30 mL 0.05 % 硫酸钙溶液中洗涤,离心,重复洗后称 1.0 g 离心酵母泥于 15 mL 离心管中,加入 10 mL pH4.5 含硫酸钙的醋酸缓冲液,20 °C 保温 20 min,振荡 5 min,再于 20 °C 保温 10 min,测酵母的沉降情况,结果见表 3。

表 3 酵母的沉降情况 (mL)

菌株号	本斯值	菌株号	本斯值
GSL-2	2.45	GSL-12	2.80
GSL-4	2.56	GSL-21	2.70
GSL-5	2.65	GSL-25	2.75

表 2 滤液的发酵力和死灭温度

菌种	发酵力								死灭温度 (°C)
	酒精度 (%vol)	原麦浓度 (% m/m)	外观浓度 (% m/m)	实际发酵度 (%)	外观发酵度 (%)	实际浓度 (% m/m)	$m(\text{CO}_2)$ (g)	发酵时间 (d)	
GSL-2	4.2	11.50	2.102	69	81.2	3.5	10.5	6	58
GSL-4	4.3	11.1	2.102	69.3	80.8	3.37	11.2	6	54
GSL-5	3.9	11.45	2.102	69.9	81.2	3.46	10.5	6	56
GSL-12	4.3	11.2	2.152	68.7	80.6	3.5	11.1	6	54
GSL-21	4.2	10.98	2.102	69	80.1	3.36	11.1	6	54
GSL-25	4.3	11.1	2.356	67.6	78.8	3.6	11.0	6	54

综合分析表 2 和表 3 结果,可知 GSL-12、GSL-21、GSL-25 号 3 株菌种的酒精度、实际发酵度、外观发酵度、CO₂、死灭温度、酵母凝聚性等主要指标最为理想,达到了预期的效果。

④ 第二次发酵力实验:根据以上选出的理想菌株再进行发酵实验。死灭温度和发酵力实验同①和②节。

降糖速度实验:在无菌条件下取菌种接入 10 mL 已杀菌麦汁液体培养基中,于 25 ℃ 培养 24 h;然后全量倒入已盛有 300 mL 灭菌麦汁培养基的三角瓶中,在 6 ℃ 左右的无菌室中发酵,第 6 天用糖度表测量其外观浓度,要求 10 d 内下降至 3.5 Brix 以下。将发酵液过滤取滤液测其比重换算残糖,其结果见表 4。

表 4 发酵液的发酵力和死灭温度

项目	GSL-12	GSL-21	GSL-25
酒精度(% m/m)	5.2	5.3	5.3
原麦浓度(% m/m)	14.52	14.53	14.6
外观浓度(% m/m)	2.840	2.865	2.864
实际发酵度(%)	67.6	69.5	70.5
外观发酵度(%)	80.4	80.4	80.5
实际浓度(% m/m)	4.6	4.5	4.3
(CO ₂)(% m/m)	10.5	11.5	11.5
发酵时间(d)	7	7	7
死灭温度(℃)	54	54	54
降糖速度(%)	2.823	2.837	2.896
降糖时间(d)	13	13	13

综合分析结果:淘汰 GSL-12 号菌株,留下 GSL-21 号(GSL-01)、GSL-25 号(GSL-02)2 株理想菌株。

⑤ 第三次发酵力实验:将上述所选的 GSL-01、GSL-02 菌株,再做发酵、死灭温度、发酵力、降糖速度实验(实验方法同前),最后做口味实验。

口味实验:在无菌条件下将所筛选菌种接入 10 mL 已杀菌的麦汁液体培养基中,于 25 ℃ 培养 24 h,全量倒入盛有 300 mL 已灭菌液体麦汁培养基的三角瓶中,于 25 ℃ 培养 24 h,再全量倒入盛有 2100 mL 已灭菌液体麦汁培养基的 5000 mL 三角瓶中,在 6 ℃ 左右的无菌室中发酵至发酵液形成泡盖后进行口味品尝,其结果见表 5。

综合分析结果表明:酒精度、实际发酵度、外观发酵度、CO₂、死灭温度、降糖速度、口味等主要指标,2 株菌种都很理想。相比较而言,GSLS-01 菌株优于 GSLS-02 菌株,可将 GSLS-01 菌株用于生产,GSLS-02 菌株保存于实验室。

2.2.4 GSLS-01 菌株现场使用情况

经选育的 GSLS-01 菌种用于大罐生产,在原工艺基础上调整发酵工艺为:酵母接种量为 1%;麦汁进罐温度控制在 9~9.5 ℃,麦汁溶解氧含量 8 mg/L 左右,满罐温度 10 ℃,主酵温度 13~13.5 ℃。最后观察使用结果:

表 5 原菌种发酵后结果

项目	GSLS-01	GSLS-02
酒精度(% vol)	4.5	4.4
原麦浓度(% m/m)	11.9	11.9
外观浓度(% m/m)	2.335	2.334
实际发酵度(%)	70.2	70.5
外观发酵度(%)	80.1	80.2
实际浓度(% m/m)	3.5	3.6
(CO ₂)(% m/m)	11.3	11.4
发酵时间(d)	6	6
死灭温度(℃)	54	54
降糖速度(%)	2.858	2.862
降糖时间(d)	12	13
口味情况	纯正、爽口、杀口力 纯正爽口、杀口力 比 GSLS-02 菌株强 较强	

GSLS-01 菌种降糖速度加快,主酵时间 3.0~4.0 d,比原来缩短 2~2.5 d;双乙酰峰值(0.21~0.23 mg/L)低,且还原比原来快,成品酒双乙酰含量在 0.06 mg/L 以下;发酵度为 69%;成品酒口感协调、柔和、纯正、杀口力强。

3 结论

3.1 筛选出的酵母菌株菌落形态:麦汁培养基上菌落为圆形、中间凸起、边缘整洁光滑、呈淡黄又偏向乳白色,有光泽;单细胞形态呈卵圆形、大小均匀,健壮饱满。

3.2 经选育的 GSLS-01 菌种用于生产上,显示其优良的性状:真正发酵度提高到了 69%,降糖速度加快,可缩短主发酵期 2~2.5 d;双乙酰还原能力强;酵母凝聚力比原菌种好;泡沫洁白细腻,持久挂杯,泡持性达 4 min 以上。

3.3 通过筛选,酵母的培养条件比原菌株粗放,且酵母的纯度提高,在发酵生产上用此菌株进行发酵,不但提高和稳定了产品质量,使其成品酒的理化指标均符合国家 GB4927 标准,还缩短发酵周期,提高设备的利用率,从而提高了经济效益。由于酵母的凝聚力的提高减少了过滤负荷,酵母死灭温度的降低提高了成品酒的杀菌效率。

参考文献:

- [1] 周广田.啤酒酿造技术[M].济南:山东大学出版社,2004.
- [2] 管敦仪.啤酒工业手册(上册)[M].北京:中国轻工业出版社,1992.
- [3] 张志强.啤酒酿造技术概要[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [4] 王治权,陈远河,尚水英.啤酒酵母实用技术[M].上海:上海科学普及出版社,1990.
- [5] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1994.
- [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.
- [7] 张志强.啤酒生产中酵母的检查[J].酿酒,1985,(1):11-15.