

紫外诱变及苯黄隆抗性处理选育低双乙酰啤酒酵母

申玉香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 菌株经紫外线诱变后筛出苯黄隆抗性菌株, 经实验室菌种分离、筛选、发酵及双乙酰驯养等步骤, 筛选育出一株 2[#] 菌株, 发酵双乙酰峰值为 0.36 mg/L, 成品啤酒双乙酰含量为 0.07 mg/L, 真正发酵度为 65.8 %。

关键词: 微生物; 啤酒酵母; 双乙酰; 紫外线诱变; 苯黄隆

中图分类号: TS261.1; TQ920; Q93- 3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001- 9286(2007) 05- 0039- 03

Breeding of Beer Yeast of Low Diacetyl Content by UV Radiation and Tribenuron- methyl(TM) Resistance Treatment

SHEN Yu-xiang¹, WANG Zhi-jun² and FAN Wei-ming².

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

Abstract: Strains with Tribenuron-methyl(TM) resistance were screened among APV strains by UV radiation. Then they underwent a series of processing including the separation of microbial species, screening, fermentation, and diacetyl domestication etc. to produce a No.2 strain. Diacetyl peak value of such strain in the fermentation was 0.36 mg/L, diacetyl content in product beer was 0.07 mg/L, and the real fermenting degree was 65.8 %.(Tran. by YUE Yang)

Key words: microbe; beer yeast; diacetyl; UV radiation; Tribenuron-methyl(TM)

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]。由于双乙酰是影响啤酒质量的关键因素之一, 也是决定啤酒成熟与否的重要指标, 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^[9~12]。

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研究, 进行低产双乙酰啤酒酵母的选育工作^[6~8]。本实验室采用的苯黄隆(Tribenuron-methyl, TM)是除草剂的一种, 属选择性内吸传导型磺酰脲类除草剂, 是侧链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)生物合成抑制剂, 主要抑制生物体内乙酰乳酸酶合成, 不能合成缬氨酸和异亮氨酸, 阻止细胞分裂, 抑制细胞的生长, 从而导致生物的死亡。本实验以 APV 为出发菌株, 通过紫外线诱变后筛选苯黄隆抗性突变株来选育低双乙酰啤酒酵母。通过将啤酒酵母紫外线诱变后, 在含不同的苯黄隆浓度梯度的培养基内培养, 筛选到能够在高浓度苯黄隆含量存在下, 正常进行代谢活动的抗苯黄隆的变

异酵母菌株, 这些抗苯黄隆的变异菌株的双乙酰峰值低, 使生产的啤酒产品的双乙酰含量较低^[7, 11, 13]。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 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。

1.1.2 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的处理条件研究

1.2.1.1 对照平板

麦汁琼脂培养基, 琼脂添加量 2 %。

1.2.1.2 苯黄隆平板

苯黄隆麦芽汁培养基, 苯黄隆添加量为 195 mg/L、200 mg/L、205 mg/L, 琼脂添加量 2 %。

收稿日期: 2007- 01- 23

作者简介 申玉香(1964-), 女, 江苏建湖人, 副教授, 博士, 主要研究方向为啤酒大麦育种与品质生理。

1.2.1.3 培养基的灭菌

于灭菌釜 121℃灭菌 15~20 min。

1.2.2 紫外诱变及苯黄隆抗性处理选育低双乙酰啤酒酵母的方法

1.2.2.1 紫外线诱变

15 W 紫外灯 25 cm 处照射 60 s。

1.2.2.2 苯黄隆抗性处理

①保藏菌种(斜面)活化后接 1 环于 5 mL 麦汁试管中,于 25℃下培养 24 h;②取 1 mL 于 9 mL 麦汁试管中 25℃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,倒去上清液,加入 10 mL 无菌水振荡,紫外线照射 60 s,稀释涂布于含不同浓度的苯黄隆平板上;⑤3 d 后挑出白色菌落,进行低温发酵实验;⑥同时做空白对照实验。

1.2.2.3 双乙酰间歇驯养

①保藏菌种经活化后扩培至 300 mL 麦汁三角瓶发酵;②第 3 天时外加双乙酰,继续发酵到第 5 天,接种酵母泥重新发酵;③重复以上实验,发酵至第 5 代后,测双乙酰水平;④添加的双乙酰浓度从 1.0 mg/L 按 0.1 mg/L 每一代的生长量升高到 1.5 mg/L。

1.2.2.4 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 紫外线诱变及苯黄隆抗性处理后低产双乙酰酵母菌株的选育

经 uv 处理 60 s 的酵母悬浮液,稀释 100 倍后,分别取 0.1 mL 涂布于含 195 mg/L、200 mg/L 和 205 mg/L 的苯黄隆平板和对照平板上。在 25℃条件培养 3 d 后,在 205 mg/L 的苯黄隆平板上无生长菌;在 195 mg/L 和 200 mg/L 的平板上出现少量生长菌,195 mg/L 的每个平板上约有 49±5 个菌落,200 mg/L 的每个平板上约有 32±2 个菌落;对照平板上出现大量生长菌,约有 350±2 个菌落。195 mg/L、200 mg/L 和 205 mg/L 的苯黄隆对酵母菌株致死率分别为 86%、91%和 100%。

分别挑取于上述 195 mg/L、200 mg/L 的苯黄隆平板上生长的白色菌落各 20 个,涂布于含 205 mg/L 苯黄隆的平板上,于 25℃培养 3 d 后,出现白色菌落,共挑出 80 个白色单菌落。将 80 株菌落培养到出芽率<5%

时,测定细胞的大小,挑选较小细胞进行低温发酵试验。

表 1 中列出的是其中 10 株菌的测定结果。选取 205-2、205-9、205-15、205-16 进行低温发酵试验,结果见表 2。

表 1 细胞大小的测定

菌株	指标		
	大小(μm)	长短轴比	体积(μm) ³
APV	6.4×8.0	1:1.25	171
205-1	6.5×7.8	1:1.20	172
205-2	5.3×7.6	1:1.43	111
205-5	5.5×7.6	1:1.38	120
205-9	4.6×7.4	1:1.61	82
205-12	5.3×7.9	1:1.50	116
205-15	5.2×7.6	1:1.46	107
205-16	5.6×7.8	1:1.40	128
205-23	6.5×8.4	1:1.29	185
205-26	5.3×7.3	1:1.38	107
205-29	5.4×8.1	1:1.50	123

表 2 一代酵母低温发酵产双乙酰水平

指标	菌株				
	APV	205-2	205-9	205-15	205-16
双乙酰(mg/L)	0.76	0.48	0.56	0.51	0.64
外观浓度(% w/w)	2.30	2.50	2.40	2.50	2.20
外观发酵度(%)	79.1	77.3	78.2	77.3	80.0

出发菌株 APV 和经过诱变后的苯黄隆抗性菌株 205-2 菌株、205-15 经双乙酰 5 代间歇驯养后的发酵性见表 3。结果表明,经双乙酰喂养间歇驯养后的菌株在发酵 5 d 后双乙酰含量比出发株低。

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)	205-2	205-15
双乙酰(mg/L)	0.72	0.61	0.39	0.43
外观发酵度(%)	78.1	77.9	76.8	77.1

选取 205-2 菌株进行连续驯养,在柱中细胞密度为 6.0×10⁷ 个/mL,流加发酵液的外观浓度为 4.8%,双乙酰含量为 2.5 mg/L,流速 8 mL/h,温度 8℃,经连续驯养 7 d 后,从柱中分离出 10 株菌进行低温发酵试验,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				
	2 [#]	3 [#]	6 [#]	7 [#]	10 [#]
大小(μm)	5.1×7.5	6.5×8.4	5.4×8.1	5.2×7.6	4.8×6.5
长短轴比	1:1.47	1:1.29	1:1.50	1:1.46	1:1.35
体积(μm) ³	102	186	124	108	78
双乙酰(mg/L)	0.38	0.42	0.45	0.48	0.40
外观发酵度(%)	74.9	75.8	76.3	76.1	73.8
F 值(%)	49.5	41.9	43.7	40.8	46.2

2.2 优选菌株放大试验

经过稳定性实验,最后选取 2[#] 菌株进行 1200 mL 小型放大试验,发酵 14 d 后,双乙酰含量为 0.07 mg/L,峰值为 0.36 mg/L,真正发酵度为 65.8 %,啤酒风味基本不变。检测指标见图 1。

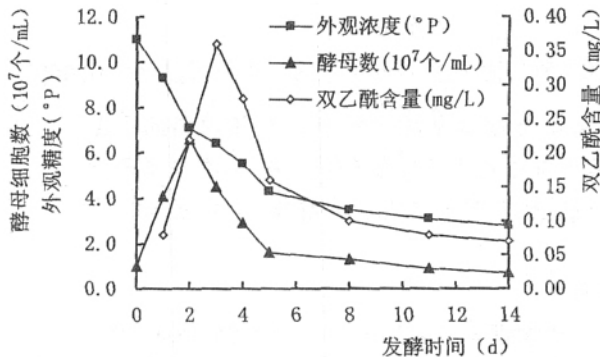


图 1 2[#] 菌株发酵曲线

3 结论

最后筛选得到 1 株大小为 5.1 μm ×7.5 μm , 双乙酰峰值为 0.36 mg/L, 成品啤酒真正发酵度为 65.8 %, 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.

- [2] 李绒.啤酒生产过程中双乙酰的控制[J].酿酒科技,2002,110(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,2002,112(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] 管敦仪.啤酒工业手册(中册)[M].北京:轻工业出版社,1982.211- 216.
- [7] 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.
- [8] 檀耀辉.微生物学(第二版)[M].北京:轻工业出版社,1994.542- 546.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 郑国昌.细胞生物学(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1992.204.
- [12] 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.
- [13] 周德庆.微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,1993.102- 103.

(上接第 38 页)

渐上升,在第二次翻曲前达到高峰,由于小麦本身带来的淀粉酶,开始糖化力较高,随着品温的上升而下降;第二次翻曲后水分减少,霉菌增殖,糖化力又有所回升,最后稳定在 200~300 之间。

大曲中的微生物来自曲母、麦粉、稻草、发酵仓、空气、人体和水。开始时在曲块表面生长的霉菌主要是毛霉类,随着温度上升,霉菌的生长受到抑制,到第二次翻曲时,水分减少,曲霉类尤其是拟青霉、梨头霉及红曲霉代之而起,直至出仓一直存在。细菌在制曲过程中占有绝对优势,在高温阶段分离到的细菌多数是嗜热芽孢杆菌。而酵母在制曲过程中出现较少,进仓前 5 d 及撒仓时偶尔可以分离到白地霉、汉逊酵母、假丝酵母等。

从表 1 中也可看出,细菌是茅台大曲中的主要微生物,数量很大,主要是耐高温(60~65 $^{\circ}\text{C}$)的芽孢杆菌。

霉菌有毛霉、根霉、曲霉、红曲霉和拟青霉等,酵母很少见到。

对选筛出的有代表性的 7 株芽孢杆菌株,逐株制成三角瓶曲,培曲温度为 35~65 $^{\circ}\text{C}$,15 d 后,成品曲都不同程度地带有酱香气。并用乙醚浸提后,挥发乙醚,闻香并与生产曲粉作对照,结果表明,香气相近,纸上层析分析可见到香草醛、阿魏酸及丁香酸的斑点,可以说明这些嗜热芽孢杆菌是茅台酒生产的有益菌株,其代谢产物在高温条件下生成的香味物质和茅台酒的香味有密切关系^[2]。

参考文献:

- [1] 俞子牛.细菌的分类[M].北京:科学出版社,1980.
- [2] 严淳泰.酿造学[M].武汉:华中农业大学出版社,1978.

湖北枝江酒业实现首季开门红

本刊讯:记者从湖北枝江酒业股份有限公司获悉,今年头 3 个月,湖北枝江酒业主要经济指标大幅度超同期、超进度,全面实现首季开门红。

2007 年 1~3 月,湖北枝江酒业集团实现现价工业总产值 8.09 亿元,比去年同期的 4.85 亿元增长 66.9 %,占全年考核目标 19 亿万元的 42.6 %;集团完成营业收入 5.60 亿元,比去年同期的 4.48 亿元增长 25 %,其中,湖北枝江酒业股份有限公司资金回笼 4.23 亿万元,同比增长 29.8 %;集团入库税金 3683 万元,其中,湖北枝江酒业股份有限公司入库税金 3573.8 万元,同比增长 41.4 %;集团实现利润总额 1355 万元,比去年同期的 1073 万元增长 26.3 %。(杨至爱)