

# 低产杂醇油啤酒酵母菌株的选育

肖冬光,韩 涛,李家飏

(天津科技大学生物工程学院,天津 300222)

**摘 要:** 以啤酒酵母 SC-4 为出发菌株,经 UV 诱变育种后获得一株亮氨酸缺陷型菌株 MS-11。与出发菌株相比,该菌株杂醇油生成量下降了 25.47%,其他发酵性能基本保持不变。MS-11 在较高主发酵温度(14℃)下的啤酒发酵实验表明,其杂醇油生成量为 65.35 mg/L,与出发菌株在 9℃发酵条件下的杂醇油生成量 63.24 mg/L 基本相当,而双乙酰的生成量则下降了 15.13%。

**关键词:** 微生物; 啤酒酵母; 杂醇油; 诱变

**中图分类号:** TS261.1;TS261.4 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-9286(2005)04-0031-03

## Breeding of Beer Yeast with Low Yield of Fusel Oil by UV Treatment

XIAO Dong-guang, HAN Tao and LI Jia-biao

(Institute of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

**Abstract:** After the UV treatment to the parent strain of beer yeast SC-4, one strain named MS-11 was selected. Comparing to the parent strain, its yield of total fusel oil was lower by 25.47% and other fermentation characteristics were almost invariable. The fermentation experiment by mutant strain MS-11 under high temperature (14℃) showed that its yield of fusel oil was 65.35 mg/L, which was near to that of the parent strain 63.24 mg/L at 9℃, moreover, the diacetyl content was reduced by 15.13%.

**Key words:** microbe; beer yeast; fusel oil; mutation

杂醇油是啤酒发酵副产物的主要成分。它们来自酮酸,与酵母细胞合成有关,对啤酒风味具有重大影响<sup>[1]</sup>。研究表明,杂醇油既可以通过氨基酸的分解代谢途径生成,也可以通过合成代谢途径由糖代谢生成。近年来,啤酒厂家采用高温酵母在 12℃甚至更高的温度下进行发酵,虽然达到了提高降糖速度、缩短发酵周期、加快双乙酰还原的目的,但啤酒中杂醇油的含量也相应增加。通过诱变育种,选育杂醇油生成量小的菌株,使其在较高温度下的啤酒发酵过程中杂醇油的生成量依然控制在合理的范围内,这样不仅从根本上减少了成品啤酒的杂醇油含量,而且随着主发酵温度的提高,能进一步缩短发酵时间,降低能耗,增加设备周转率,降低生产成本。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种

啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)SC-4,天津科技大学现代酿造研究室保存菌种。

#### 1.2 分析方法

杂醇油的测定:对二甲氨基苯甲醛比色法<sup>[2]</sup>。 $\alpha$ -氨基氮的测定:茚三酮法<sup>[3]</sup>。凝聚性的测定:光密度改良法<sup>[5]</sup>。成品中风味物质的测定:气相色谱法。

#### 1.3 实验方法

##### 1.3.1 酵母种子扩大培养

一级试管培养: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。

二级三角瓶培养:将试管中的酵母液转接入盛有 100 mL 麦汁的 250 mL 三角瓶内,20℃培养 2~3 d。

三级三角瓶培养:每个 500 mL 三角瓶内装 100 mL 麦汁,灭菌,接二级培养液 10 mL,15℃培养 2~3 d。离心收集菌体,菌体用无菌水洗涤离心两次,低温保存备用。

##### 1.3.2 诱变育种

选择合适的诱变剂量对出发菌株进行紫外诱变,诱变处理液涂布在限制培养基上,将生长的单个小菌落对应点接于基本培养基和添加亮氨酸基本培养基(亮氨酸终浓度为 30 mg/L)平板上,28℃培养,挑选亮氨酸缺陷型突变菌株<sup>[4]</sup>。

收稿日期 2005-01-12

作者简介:肖冬光(1956-),男,湖南湘乡人,教授、博士生导师,中国发酵工业协会常务理事。长期从事生物工程方面的教学与科研,在活性干酵母和用现代生物技术改造传统酿酒工业方面有精深研究。

1.3.3 啤酒发酵

麦汁浓度 12°Brix,麦汁中的  $\alpha$ -氨基氮通过添加蔗糖的比例来调节,酵母泥接种量为 0.5 %。

2 结果与分析

2.1 UV 诱变选育低产杂醇油突变菌株

啤酒中异戊醇、异丁醇和活性戊醇是影响啤酒质量的主要高级醇类,由分支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)经分解代谢生成,或经合成代谢途径由糖代谢生成。在合成氨基酸的过程中,形成的  $\alpha$ -酮酸经脱羧、还原形成相应的高级醇。所以,可以通过选育分支链氨基酸营养缺陷型突变菌株,减弱或切断其合成过程中某些酶的作用,从而减少杂醇油合成的前体物质  $\alpha$ -酮酸的积累,以达到降低啤酒中杂醇油形成的目的。以选育亮氨酸缺陷型突变菌株为初筛方法,取诱变后的菌液经中间培养,淘汰野生型后,采用逐个检出法得到 11 株亮氨酸营养缺陷型突变菌株,分别测定这 11 株菌株的杂醇油生成情况,结果有 4 株突变株在啤酒发酵试验中的杂醇油生成量比出发菌株减少了 20 %以上,结果见表 1。

表 1 11 株突变菌株的杂醇油生成情况

| 菌株   | 杂醇油生成量<br>(mg/L) | 与出发菌株比较<br>(%) | 菌株    | 杂醇油生成量<br>(mg/L) | 与出发菌株比较<br>(%) |
|------|------------------|----------------|-------|------------------|----------------|
| SC-4 | 63.41            |                | MS-6  | 63.15            | -0.4           |
| MS-1 | 43.67            | -31.13         | MS-7  | 62.38            | -1.6           |
| MS-2 | 67.80            | +6.9           | MS-8  | 60.58            | -4.46          |
| MS-3 | 60.84            | -4.05          | MS-9  | 48.08            | -24.18         |
| MS-4 | 41.87            | -33.97         | MS-10 | 74.18            | +16.98         |
| MS-5 | 78.79            | +24.25         | MS-11 | 47.26            | -25.47         |

2.2 低产杂醇油突变菌株发酵性能的测定

对这 4 株突变株(MS-1,MS-4,MS-9,MS-11)的基本发酵性能进行测定,包括发酵度、发酵速度、凝聚性、死灭温度及酒精度。发酵条件为:麦汁浓度 12°Brix, $\alpha$ -氨基氮含量 190 mg/L,主发酵温度 9℃,酵母泥接种量为 0.5 %。图 1 为 4 株突变株的发酵速度比较,从结果可以看出,各菌株的发酵速度没有明显差别,主发酵 7 d 后降糖基本结束。

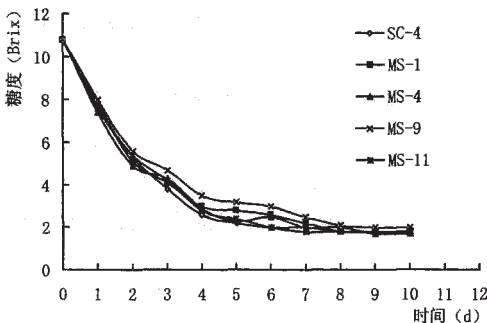


图 1 4 株突变株发酵速度情况

表 2 为 4 株突变株的发酵度、凝聚性、死灭温度及主发酵结束后的酒精度。结果表明,各菌株的发酵度没有太大变化,凝聚性有所下降,其中 MS-4 的凝聚性变化非常大,且其死灭温度也发生了变化。啤酒酵母的凝聚性是酵母主要生理特征之一,凝聚性的强弱受基因控制,不同菌株间差异很大。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。但随着突变株 MS-4 凝聚性的下降,其发酵度及酒精度并没有明显上升,这可能是由于紫外诱变不仅破坏了出发菌株的氨基酸合成,使菌体生长受到限制,而且控制啤酒酵母凝聚性的基因也发生变化。

表 2 发酵度、凝聚性、死灭温度及酒精度

| 菌株    | 真正发酵度<br>(%) | 凝聚性<br>(%) | 死灭温度<br>(℃) | 酒精度<br>(%,v/v) |
|-------|--------------|------------|-------------|----------------|
| SC-4  | 69.49        | 71.50      | 53          | 3.9            |
| MS-1  | 69.15        | 65.15      | 53          | 4.0            |
| MS-4  | 67.80        | 13.68      | 52          | 3.7            |
| MS-9  | 68.98        | 66.88      | 53          | 3.8            |
| MS-11 | 69.58        | 66.89      | 53          | 4.0            |

表 3 为突变株啤酒发酵过程中的双乙酰峰值及主发酵结束后双乙酰、杂醇油的生成情况。结果表明,虽然突变株 MS-1,MS-9 的杂醇油生成量明显下降,但其双乙酰的生成量却大幅上升,这可能是由于亮氨酸缺陷型突变株的分支链氨基酸代谢途径中  $\alpha$ -乙酰乳酸发生积累,而  $\alpha$ -乙酰乳酸也正是双乙酰形成的前体物质。经过发酵试验发现突变株 MS-1,MS-4,MS-9 均不适宜进行啤酒发酵,而突变株 MS-11 与出发菌株 SC-4 相比,其基本发酵性能不变,杂醇油的生成量减少了 20 %以上,经传代试验证明具有较好的遗传稳定性。

表 3 双乙酰、杂醇油的生成情况 (mg/L)

| 菌株    | 双乙酰峰值  | 主发酵 7d 后<br>双乙酰值 | 杂醇油生成量 |
|-------|--------|------------------|--------|
| SC-4  | 0.922  | 0.210            | 59.61  |
| MS-1  | 1.794  | 1.05             | 37.67  |
| MS-9  | >3.000 | >3.000           | 47.11  |
| MS-11 | 0.856  | 0.223            | 39.89  |

2.3 突变株 MS-4 在 14℃ 下的发酵情况

2.3.1 发酵速度

图 2 为出发菌株 SC-4 与 MS-11 在 9℃ 和 14℃ 下的发酵速度比较。从图中可以看出,随着温度的上升,发酵速度明显提高。不论是出发菌株还是突变株,在 14℃ 的发酵条件下,4 d 后降糖都基本结束。而在 9℃ 的发酵条件下,要 6 d 后才能结束。

2.3.2 杂醇油及双乙酰生成情况

调整麦汁浓度 12°Brix, $\alpha$ -氨基氮含量 190 mg/L,酵母泥接种量为 0.5 %。主发酵结束后,进行后发酵,贮酒,

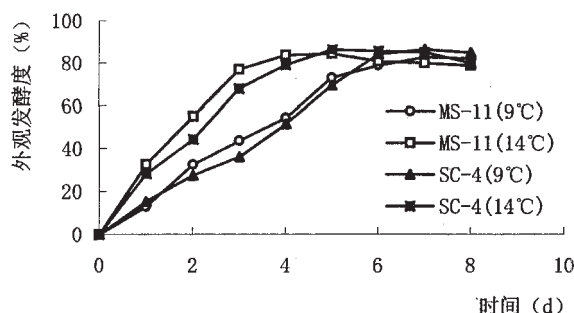


图2 在9℃和14℃下的发酵速度比较

然后测定其杂醇油及双乙酰生成情况,结果见表4。从表中可以看出,随着温度的升高,出发菌株和突变株的杂醇油生成量都有所增加,双乙酰生成量都有所降低。突变菌株 MS-11 在 14℃ 下的杂醇油生成量为 65.35 mg/L,与出发菌株在 9℃ 发酵条件下的杂醇油生成量 63.24 mg/L 基本相当,而双乙酰的生成量则下降了 15.13 %。

表4 不同温度下 SC-4 与 MS-11 杂醇油及双乙酰生成情况

| 菌株    | 温度<br>(°C) | 杂醇油<br>(mg/L) | 双乙酰<br>(mg/L) |
|-------|------------|---------------|---------------|
| SC-4  | 9          | 63.24         | 0.0476        |
| SC-4  | 14         | 90.81         | 0.0356        |
| MS-11 | 9          | 47.40         | 0.0608        |
| MS-11 | 14         | 65.35         | 0.0404        |

## 2.4 啤酒发酵试验

### 2.4.1 成品啤酒风味物质的比较

用气相色谱对出发菌株 SC-2 和突变菌株 MS-11 在 9℃ 和 14℃ 发酵条件下的啤酒样品分别进行风味物质的测定,结果见表5。

表5 菌株 SC-2 和 MS-11 发酵啤酒的风味物质含量比较

| 风味物质  | 菌株 SC-2 |       | 菌株 MS-11 |       |
|-------|---------|-------|----------|-------|
|       | 9 °C    | 14 °C | 9 °C     | 14 °C |
| 正丙醇   | 12.82   | 13.24 | 10.28    | 11.06 |
| 异丁醇   | 16.52   | 18.87 | 12.54    | 14.50 |
| 异戊醇   | 47.28   | 62.41 | 35.10    | 48.37 |
| 乙醛    | 10.30   | 9.05  | 6.25     | 5.58  |
| 乙酸异戊酯 | 3.230   | 3.524 | 2.320    | 2.565 |
| 己酸乙酯  | 0.030   | 0.038 | 0.033    | 0.038 |
| 辛酸乙酯  | 0.100   | 0.120 | 0.100    | 0.100 |
| 乙酸乙酯  | 19.60   | 25.30 | 19.19    | 24.62 |
| 二甲基硫  | 0.076   | 0.080 | 0.072    | 0.079 |

从表5可以看出,与出发菌株 SC-2 相比,菌株 MS-11 产生的异丁醇、异戊醇生成量都有所下降,乙醛、乙酸异戊酯的含量也有较明显的降低,其他风味物质的浓度变化不大。乙醛是啤酒发酵过程中产生的主要醛类,也是啤酒中含量最高的醛类。它是酵母进行乙醇发酵的中间产物,是由丙酮酸脱羧而形成的。啤酒中其他醛类也是相应高级醇类的前体物质。由于突变菌株 MS-

11 发生基因突变,使杂醇油形成的前体物质酮酸的积累减少,这也相应地降低了啤酒中醛类物质的含量。

### 2.4.2 啤酒风味保鲜期的预测

TBA (硫代巴比妥酸)法主要测定的是以二烯醛类(啤酒中风味老化的代表性化合物)为代表的羰基化合物的变化,该值在一定程度上可表征老化物质的含量。啤酒的 TBA 值越高,表明该啤酒中所含的羰基化合物越多,风味稳定性越差,反之,则越强。啤酒在经 60℃ 加热后,其羰基化合物含量的变化与同一啤酒在常温下,经过正常保存期(4 个月)后的含量变化非常相似。通过计算风味保鲜值(RSV)可以预测啤酒的保质期。啤酒的风味保鲜值越大,啤酒保质期就越长。出发菌株和突变菌株发酵啤酒的风味保鲜期预测结果见表6。从表中可以看出,MS-11 菌在 14℃ 主发酵条件下生产的啤酒的 TBA 值比 SC-2 菌在 9℃ 下生产的啤酒降低了 12.08 %,RSV 值提高了 29.63 %,说明菌株 MS-11 生产的啤酒其保质期比出发菌株 SC-2 长,风味稳定性高于出发菌株 SC-2 生产的啤酒。

表6 菌株 SC-2 和 MS-11 发酵的啤酒风味保鲜期预测

| 项目    | SC-2<br>(9°C) | MS-11<br>(9°C) | SC-2<br>(14°C) | MS-11<br>(14°C) |
|-------|---------------|----------------|----------------|-----------------|
| TBA 值 | 29.8          | 27.6           | 28.5           | 26.2            |
| RSV 值 | 4.5238        | 5.6324         | 4.9256         | 5.8642          |

## 3 结论

3.1 通过选育啤酒酵母亮氨酸缺陷型突变菌株,可以达到降低啤酒发酵过程中杂醇油生成量的目的。

3.2 随着主发酵温度的提高,降糖速度加快,同时提高了双乙酰的还原速度,发酵周期缩短。

3.3 选育出的突变菌株 MS-11 在 14℃ 发酵条件下的杂醇油生成量为 65.35 mg/L,双乙酰含量为 0.0404 mg/L,可用于工业生产。

3.4 啤酒发酵实验结果表明,与出发菌株 SC-2 相比,突变菌株 MS-11 产生的异丁醇、异戊醇生成量都有所下降,乙醛、乙酸异戊酯的含量也有较明显的降低,其他风味物质的浓度变化不大。

3.5 MS-11 菌株生产的啤酒的 TBA 值下降,RSV 值增加,说明 MS-11 菌株生产的啤酒其保质期比 SC-2 菌长,风味稳定性高于 SC-2 菌生产的啤酒。

## 参考文献:

- [1] 管敦仪.啤酒工业手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998.
- [2] 黄伟坤,等.食品检验与分析[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [3] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:轻工业出版社,1988.
- [4] 杜连祥,等.工业微生物学实验技术[M].天津:天津科学技术出版社,1992.181,190-192.
- [5] 顾国贤.酿造酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1996.