

低双乙酰啤酒酵母的选育

李 崎 顾国贤 孙芙宁 王亚菲

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡, 214036)

潘学启

(青岛啤酒股份有限公司, 青岛, 266000)

摘要 以两株青岛啤酒酵母 c-02 和 c-03 为出发菌株, 经紫外线诱变后挑出甲磺隆抗性菌株, 经过实验室菌种分离、筛选、发酵及双乙酰驯养等步骤选育出一株④[#]菌, 12℃麦汁经1000L小罐11℃低温发酵, 双乙酰峰值为0.35mg/L, 主醇结束双乙酰为0.13mg/L, 成品啤酒双乙酰为0.06mg/L, 成品啤酒真正发酵度65.6%, 凝聚性指标F值为48.4%, 啤酒风味基本不变。

关键词 酿造酵母; 甲磺隆; 双乙酰; 驯养

中图分类号 TS261.15

0 前 言

青岛啤酒酵母是我国啤酒厂中应用最为广泛的啤酒酵母, 在长期的生产实践中, 青岛酵母已形成自己独特的生理特性, 能酿制出独特风味的啤酒, 并已为广大消费者接受和喜爱。但青岛酵母也存在着一定的缺陷, 如酵母细胞较大, 发酵液中游离酵母细胞密度不高、细胞凝聚性强、双乙酰峰值高、还原期长等。因此作者对青岛酵母进行了改良研究, 在保持啤酒风味基本不变的前提下, 进一步提高青岛酵母各方面的性能, 其中最主要是降低双乙酰的含量, 降低细胞凝聚性, 加快发酵速度。

对于降低啤酒中双乙酰含量的研究, 国内外文献已有大量报道^[1, 2]。本文中介绍的是利用酵母对广谱除草剂甲磺隆(Sulfometuron methyl)的抗性来筛选低双乙酰青岛啤酒酵母, 并通过双乙酰还原驯养, 提高酵母自身双乙酰还原酶的活性, 以期得到一株啤酒风味不变, 双乙酰降低快的青岛啤酒酵母改良菌。

1 实验材料与方法

1.1 菌种

啤酒酵母 c-02, c-03 无锡轻工大学保藏菌株。

1.2 培养基

1.2.1 发酵培养基 24%大米作辅料的12P麦汁发酵培养基,工艺曲线按青岛啤酒厂实际生产工艺曲线。

1.2.2 WLN 平板 双乙酰峰值培养基。

1.3 实验方法

1.3.1 紫外线诱变 15W 紫外灯25cm 处照射50s

1.3.2 甲磺隆抗性处理

保藏菌种→斜面活化^{1环}→5ml 麦汁试管^{1ml}→9ml 麦汁试管→100ml 麦汁锥形瓶→出芽率<3%→取10ml 菌液于2000r/min 离心,倒去上清液→加入10ml 不同浓度的甲磺隆缓冲液^{振荡30min}→稀释涂布 WLN 平板^{3d}→挑出白色菌落→低温发酵试验。

1.3.3 双乙酰还原驯养

1) 双乙酰还原间歇驯养

保藏菌种→活化→扩培→300ml 麦汁锥形瓶(带发酵栓)发酵→第3天外加双乙酰→继续发酵至第5天→酵母泥接种重新发酵→重复以上实验→发酵第5代后测双乙酰水平→剔除双乙酰不合格菌种,其余继续驯养。

添加的双乙酰浓度从0.5mg/L 依次升高,5代以后添加的双乙酰浓度稍下降后继续梯度提高,本文中双乙酰浓度加到1.7mg/L.

2) 双乙酰连续驯养

选一株在间歇驯养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5%~6%,将发酵液倒出,49kPa 下灭菌15min 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,盛接在一灭过菌的锥形瓶中,连续运行5~7d,每天测定流出液的细胞数、出芽率、双乙酰以及外观。整个连续系统稳定运行一段时间后结束。从柱中悬浮液中或分离筛选,或继续扩培、发酵、驯养。

1.4 分析方法

1) 双乙酰测定,麦汁浸出物、发酵液外观浓度测定^[3]。

2) 细胞大小测定^[4]。

3) 凝聚性测定^[5]。

2 结果与讨论

2.1 紫外线诱变及甲磺隆处理后低产 α -乙酰乳酸酵母菌株的筛选

2.1.1 诱变及抗性平板筛选 经UV 处理50s 的酵母悬浮液,采用200mg/L 甲磺隆处理后涂布 WLN 平板,共挑出80个白色菌落。

2.1.2 细胞大小的测定 将80株菌培养到出芽率<5%时测定细胞大小,挑选较小细胞进行低温发酵试验。表1中列出的是其中的10株菌的测定结果。

2.1.3 低温发酵试验 选取4[#],5[#],6[#],12[#] 进行低温发酵试验。结果见表2。

表1 细胞大小的测定

	c-02	c-03	1	3	4	5	6	8	10	12
大小 (μm)	7.4 $\times 8.5$	6.4 $\times 8.0$	7.1 $\times 8.1$	7.0 $\times 7.8$	6.1 $\times 7.1$	6.2 $\times 7.1$	6.5 $\times 7.5$	6.5 $\times 8.1$	7.8 $\times 9.6$	6.0 $\times 7.1$
长短轴比	1ⅩⅤ. 15	1ⅩⅤ. 25	1ⅩⅤ. 14	1ⅩⅤ. 11	1ⅩⅤ. 16	1ⅩⅤ. 15	1ⅩⅤ. 15	1ⅩⅤ. 25	1ⅩⅤ. 23	1ⅩⅤ. 18
体积(μm^3)	355	214	244	216	161	164	191	223	376	158

表2 一代酵母低温发酵产 α -乙酰乳酸和双乙酰(α + VDK) 水平

	c-02	c-03	4	5	6	12
α + VDK (mg/L)	0.76	0.64	0.41	0.53	0.58	0.48
外观浓度(%)	2.73	2.55	3.10	2.75	3.23	2.48
外观发酵度(%)	76.9	78.4	73.7	76.7	72.6	79.0

注: 表2中列出的 α + VDK 值是 α -乙酰乳酸和双乙酰含量的总和。

2. 2 双乙酰驯养强化 VDK 还原

2. 2. 1 双乙酰间歇驯养 出发菌种 c-03和经过诱变后的甲磺隆抗性菌株4[#] 和12[#] 经双乙酰25代间歇驯养后的发酵情况见表3.

表3 25代双乙酰喂养间歇驯养后低温发酵结果

	c-03(原)	c-03(驯)	4	12
α + VDK (mg/L)	0.60	0.48	0.33	0.38
外观发酵度(%)	75.6	76.2	75.2	72.0

结果表明, 经双乙酰喂养间歇驯养后的菌株在发酵5d 后 α -乙酰乳酸和双乙酰含量要比不经驯养的出发株低得多。

2. 2. 2 双乙酰连续驯养 4[#] 菌株在柱中细胞密度 40×10^6 个/ml, 流加发酵液外观浓度5.3%, VDK 含量2.5mg/L, 流速6ml/h, 温度6 $^{\circ}\text{C}$, $D=0.03\text{h}^{-1}$. 连续驯养7d 后, 从柱中分离筛选出10株菌进行低温发酵试验, 其中5株菌细胞大小, α -乙酰乳酸、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

	1	3	4	5	10
大小(μm)	5.8×6.4	5.1×5.7	6.5×7.3	6.3×6.7	6.4×7.4
长短轴比	1ⅩⅤ. 10	1ⅩⅤ. 12	1ⅩⅤ. 12	1ⅩⅤ. 06	1ⅩⅤ. 16
体积(μm^3)	124	87	181	148	296
α + VDK (mg/L)	0.35	0.32	0.35	0.40	0.41
外观发酵度(%)	75.0	72.0	72.3	68.9	68.9
F 值(%)	43.2	48.4	54.1	51.2	50.0

注ⅩⅤ 值是酵母凝聚性的指标, F 值越大, 反映酵母凝聚性或沉淀性倾向越大。

2. 3 优选菌株放大试验

经过稳定性实验, 最后选取④进行1000L 放大试验, 发酵曲线见图1. 嫩啤酒双乙酰为0.13mg/L, 成品啤酒双乙酰为0.06mg/L, 真正发酵度为65.6%, 啤酒风味基本不变。

3 结 论

1) 啤酒酵母甲磺隆抗性菌株中, 的确存在着低温发酵后产生的双乙酰低于出发菌株的酵母。本实验室大量的实验可以说明, 通过紫外线诱变后筛选甲磺隆抗性突变株来选育低双乙酰啤酒酵母是可行的。

2) 由于甲磺隆抗性菌株中 α -乙酰乳酸合成酶的活性降低, 由此在原来的发酵温度(10 $^{\circ}\text{C}$) 发酵时, 速度较慢。因此, 可把优选株的发酵温度提高到11~12 $^{\circ}\text{C}$ 进行, 以缩短发酵周

期。

3) 利用在发酵中间歇外加双乙酰来促进啤酒酵母对双乙酰的还原, 实验证明此方法简单易行, 并且酵母对双乙酰的还原能力有较明显的提高。但是此方法的缺点是实验时间太长, 在短时间内无明显提高。而连续驯养则可以在短时间内取得较为明显的进步。另外在连续驯养过程中, 挑选悬浮在反应柱上部的细胞进行下一级的驯养, 对降低细胞凝聚性很有效果。最后我们得到一株大小为 $5.1 \times 5.7 \mu\text{m}$, 双乙酰峰值 0.35mg/L (比原来降低50%), 凝聚性 F 值48.4%, 成品啤酒真正发酵度65.6%, 风味基本不变的较理想菌株。

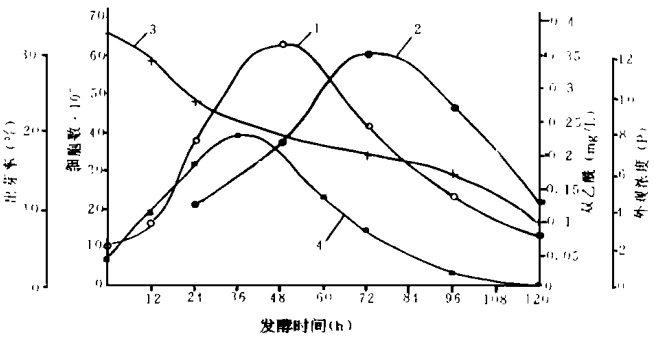


图1 1000L 罐发酵曲线

1 红细胞数 ($\times 10^6$) 2 双乙酰 (mg/L) 3 外观浓度 (P) 4 出芽率 (%)

对降低细胞凝聚性很有效果。最后我们得到一株大小为 $5.1 \times 5.7 \mu\text{m}$, 双乙酰峰值 0.35mg/L (比原来降低50%), 凝聚性 F 值48.4%, 成品啤酒真正发酵度65.6%, 风味基本不变的较理想菌株。

致 谢

本研究工作, 得到青岛啤酒股份有限公司的大力支持和帮助, 在此表示深深的感谢!

参 考 文 献

1 王英凯. 食品与发酵工业, 1992, (1)
2 Glaes Gjermansen et al. J. Basic Microbiol, 1988, (28)
3 管敦仪. 啤酒工业手册(中), 轻工业出版社, 1982
4 四院合编. 微生物学. 轻工业出版社, 1988
5 顾国贤. 啤酒工艺系列实验大纲. 无锡轻工大学讲义

Study on Diacetyl-less Brewer's Yeast

LiQi Gu Guoxian Sun Funing Wang Yafei

(School of Biotechnology, WuXi University of Light Industry, WuXi, 214036)

Pan Xueqi

(Tsingtao Brewing Co., LTD, Qingdao, 266000)

Abstract Two industrial yeasts, c-02 and c-03, were used as the original strains in this research. After UV mutation, the strains resistant to sulfomuturon methyl were achieved. With isolation, selection and domestication, a strain whose targets according with the general demands was obtained. At 11 fermentation with 12 P wort, the peak value of diacetyl was 0.35mg/L , the final value of diacetyl after main fermentation 0.15mg/L , the real maximum fermentation degree of wort 72.7%, and the value of F 48.4%. The beer flavor was found to be generally maintained.

Key-words industry yeast; sulfometuron methyl; diacetyl; domestication