

# 抗老化啤酒酵母的选育

李 崎 顾国贤 柏竹安 章克昌

(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科研中心,青岛, 266100)

**摘要** 以无锡轻工大学生物工程学院保藏的一株啤酒酵母为出发菌株,经紫外线诱变及蛋氨酸连续驯养后,选育得到一株抗老化性能较为优良的菌株 M<sub>4</sub>。在 1 m<sup>3</sup> 发酵罐中的中试结果表明,与出发菌株相比,其羰基化合物(TBA)含量降低 19.1%,谷胱甘肽(GSH)含量增加 29.6%。在不改变其它生产条件的情况下,啤酒风味稳定性提高 92%,工业应用前景良好。

**关键词** 啤酒酵母;诱变;蛋氨酸;谷胱甘肽;风味稳定性

**分类号** TS261.15

## 0 前 言

啤酒风味稳定性是啤酒的重要质量指标之一,国外从 20 世纪 70 年代起开始此课题研究,Hashimoto<sup>[1]</sup>和 Stewart<sup>[2]</sup>报道了啤酒中风味物质的种类、含量及其对老化风味的影响。我国啤酒科研人员也已对啤酒生产中原料及工艺对啤酒老化与抗老化的影响进行了研究<sup>[3-5]</sup>。啤酒酵母在其代谢过程中会产生一些老化的前驱物质(如羰基化合物)和抗老化的还原性物质(如谷胱甘肽),因此,选育低产羰基化合物(TBA)而高产谷胱甘肽(GSH)的抗老化啤酒酵母具有重要意义。目前,对抗老化啤酒酵母的选育国内外尚无报道。作者利用紫外线(UV)诱变,蛋氨酸抗性平板<sup>[6,7]</sup>分离,对选出的<sup>②</sup>A<sub>27</sub>菌株进行蛋氨酸连续驯养,蛋氨酸和 1,2,4-三氮唑抗性平板分离,最终获得一株 GSH 分泌多、抗老化能力强、各项指标合格的优良啤酒酵母菌株 M<sub>4</sub>。在 1 m<sup>3</sup> 罐的中试结果表明,在不改变其它生产条件的情况下,与出发菌株相比,M<sub>4</sub> 菌株羰基化合物含量可降低 19.1%,谷胱甘肽含量增加 29.6%,啤酒风味稳定性提高 92%,工业应用前景广阔。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

啤酒酵母(*Saccharomyces carlbergensis*)青<sup>②</sup>,无锡轻工大学生物工程学院酿酒工程研究室保藏菌株

收稿日期: 1998-02-17

第一作者: 李崎,女,1971年 2月生,博士研究生

## 1.2 培养基

1.2.1 发酵培养基 24% 大米为辅料的 12°P 麦汁发酵培养基, 按青岛啤酒厂实际生产工艺曲线制备。

1.2.2 蛋氨酸抗性培养基 酵母基础培养基, 蛋氨酸浓度根据实验要求确定。

1.2.3 蛋氨酸连续驯养培养基 组成 (g/dL): 葡萄糖 5, 蛋白胨 1, 酵母膏 1, 蛋氨酸 2; pH5.0。

## 1.3 实验方法

1.3.1 紫外线诱变 15 W 紫外灯 25 cm 处照射

1.3.2 蛋氨酸抗性菌株的筛选 诱变后的菌种经中间培养后, 涂布于 1 g/dL 和 1.5 g/dL 的蛋氨酸抗性平板

1.3.3 蛋氨酸连续驯养 实验装置如图 1 所示 酵母扩培后取 100 ml 菌悬液加入层析柱中, 连续流加含有蛋氨酸的合成培养基, 系统在 1 ℃ 下稳定运行 5~6 d 结束

1.3.4 1, 2, 4-三氮唑抗性菌株的筛选 蛋氨酸连续驯养后的发酵液涂布 0.8% 的 1, 2, 4-三氮唑抗性平板。

## 1.4 分析方法

- 1) 发酵液中谷胱甘肽含量, 见文献 [8]。
- 2) 羰基化合物含量用硫代巴比妥酸值 (TBA) 表示, 见文献 [9]。
- 3) 啤酒风味保鲜期预测值 (RSV), 见文献 [9]。

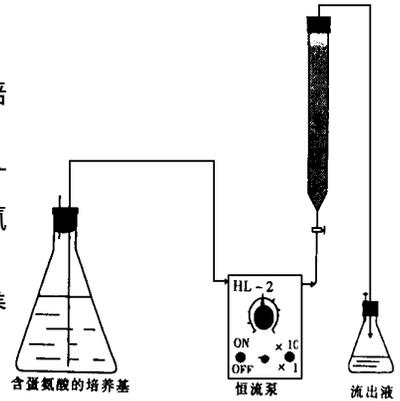


图 1 连续驯养装置

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外线诱变及蛋氨酸抗性菌株的筛选

2.1.1 诱变 测试了不同 UV 诱变时间对致死率的影响, 发现 UV 诱变 60 s 效果较好, 此时酵母细胞的致死率为 85.3%。

2.1.2 抗性株的筛选 诱变后的菌株经中间培养后, 涂布于 1 g/dL 和 1.5 g/dL 的蛋氨酸抗性平板 未经诱变的对照菌株在 1 g/dL 的蛋氨酸平板上能生长, 但菌落很小; 而在 1.5 g/dL 的蛋氨酸平板上根本不长 诱变后的菌株在两个质量浓度的平板上均能生长, 但在 1.5 g/dL 的蛋氨酸平板上的菌落比 1 g/dL 蛋氨酸平板上的菌落小得多。从 1.5 g/dL 蛋氨酸平板上挑出 50 株菌测定细胞大小, 选择细胞个体较小的菌株共 24 株进行低温发酵试验。

2.1.3 细胞大小的测定及低温发酵试验 根据细胞大小及低温发酵试验的综合结果, 选择其中各项指标较理想的 6 株菌进行复筛 表 1 是复筛菌株第三代低温发酵试验结果 表 1 中的数据是 3 组发酵的平均值。表中的 RSV 值 (风味保鲜预测值) 是主酵结束时的测定值, 由于有较多的氧气存在, 因此所测定的 RSV 值比后酵结束后的测定值偏低

表 1 复筛菌株的大小及低温发酵结果

	麦汁	对照株	A21	A23	A24	A26	A27	A34
细胞大小 $\mu\text{m}$	/	6.3 × 6.6	6.2 × 6.2	6.2 × 6.3	6.0 × 6.1	7.3 × 7.3	5.8 × 5.8	6.7 × 7.1
TBA 值	0.187	0.30	0.287	0.285	0.256	0.297	0.257	0.298
GSH 质量浓度 / (mg/L)	170.3	133.4	175.3	160.2	145.1	155.6	144.9	145.6
外观发酵度 %	/	59.8	55.1	54.1	56.9	58.4	56.3	60.1
RSV 值	/	54.78	54.1	60.78	60.80	61.09	75.0	52.37

## 2.2 蛋氨酸连续驯养后的结果

层析柱中细胞密度为  $10 \times 10^6$  个 /mL, 温度  $11^\circ\text{C}$ ,  $D = 0.035 \text{ h}^{-1}$ , 合成培养基中蛋氨酸的质量浓度为  $2 \text{ g/dL}$ , 系统达到稳态后连续运行 6 d 结束, 取菌液涂布蛋氨酸和 1, 2, 4-三氮唑抗性平板, 挑出 45 株菌进行低温发酵性能试验, 其中 6 株菌的发酵结果如表 2 所示。

表 2 蛋氨酸连续驯养后菌株的低温发酵结果

	C <sub>2</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>15</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>11</sub>	M <sub>13</sub>	对照株	麦汁
TBA 值	0.205	0.212	0.243	0.207	0.230	0.240	0.250	0.282
GSH 质量浓度 / (mg/L)	170.3	181.8	185.7	194.4	196.4	176.6	152.3	168.2
VDK 值 / (mg/L)*	0.413	0.361	0.310	0.309	0.339	0.321	0.350	
外观发酵度 %	65.2	71.6	76.9	71.4	64.2	69.0	73.7	
RSV 值**	72.0	75.1	65.9	85.0	73.4	67.32	50.13	
极限发酵度 %	65.9	64.3	68.4	71.8	62.5	67.3	63.3	

注: 1) 表 2 中数据为两组发酵的平均值, 表中 C 代表从 1, 2, 4-三氮唑抗性平板上筛选到的菌株, 而 M 则表示从蛋氨酸抗性平板上挑选的菌株。

2) VDK 值为双乙酰与其前驱物质  $\alpha$ -乙酰乳酸的总和。 3) RSV 值为主酵结束后的测定值。

由表 2 可知, 蛋氨酸连续驯养后筛选到的 1, 2, 4-三氮唑和蛋氨酸抗性菌株, 它们的羧基化合物水平均低于对照菌株, 而谷胱甘肽的含量则高于对照株, 风味保鲜预测值 (RSV) 较对照株有明显提高, 其中 C<sub>6</sub> 菌和 M<sub>4</sub> 菌的 RSV 值提高最多, 分别为 49.8% 和 69.6%。

## 2.3 菌株稳定性的测试及优选株的确定

对 C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>11</sub> 进行稳定性试验, 结果见表 3。

表 3 菌株的稳定性试验

	对照株	C <sub>2</sub>	C <sub>6</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>11</sub>
后酵液 GSH 质量浓度 / (mg/L)*	48.6	53.3	62.7	60.8	58.0
后酵液 TBA 值*	0.28	0.234	0.255	0.20	0.264
啤酒 RSV 值*	158.6	244.1	195.4	264.3	196.5
后酵液 GSH 质量浓度 / (mg/L)**	50.3	51.4	58.9	60.1	53.8
后酵液 TBA 值**	0.36	0.32	0.315	0.28	0.32
啤酒 RSV 值**	148.1	192.9	183.2	228.8	177.2
后酵液 GSH 质量浓度 / (mg/L)***	44.9	49.0	55.2	57.9	55.1
后酵液 TBA 值***	0.33	0.30	0.33	0.25	0.295
啤酒 RSV 值***	126.3	155.8	193.1	201.3	168.0

注: 1) \* 为第一代发酵结果; 2) \*\* 为第二代发酵结果; 3) \*\*\* 为第三代发酵结果。

表中为  $11.5^\circ\text{C}$  发酵 5 d,  $6^\circ\text{C}$  后酵 10 d 后的测定值。RSV 值为成品啤酒测定值, 由于样品中氧含量很低, 故明显高于主酵液测定值。从表 3 可知, M<sub>4</sub> 菌株的发酵性能最好, 稳定性亦佳。经过 3 代酵母发酵, 啤酒保鲜期平均提高 60%。故在相同的工艺条件下, 利用 M<sub>4</sub> 菌株进行发酵, 能在实验室规模将啤酒的风味保鲜期提高 60%。

## 2.4 优选株的放大试验

采用相同的原料及糖化、发酵工艺, 在  $1 \text{ m}^3$  罐中比较了优选酵母和对照菌株的各项发酵性能指标。成品啤酒的分析结果见表 4。

表 4  $1 \text{ m}^3$  罐成品啤酒分析对比

	对照菌株	优选菌株 M <sub>4</sub>	与对照株相比
发酵度 %	65.8	66.7	
色度 (EBC)	9.0	8.8	
总多酚 / (mg/L)	146	149	
VDK 值 / (mg/L)	0.08	0.07	
TBA (A530)	0.220	0.178	降低 19.1%
GSH 质量浓度 / (mg/L)	115.6	149.8	提高 29.6%
RSV	125	240	提高 92%

### 3 结 论

1) 酵母的代谢产物对啤酒的风味稳定性起重要作用。酵母经紫外线诱变后再经过蛋氨酸连续驯养,能提高其分泌 GSH 的能力,从而达到改善啤酒风味稳定性的目的。

2) 在不改变啤酒生产其它条件的前提下,利用本研究选育得到的优选株 M<sub>4</sub>,可在 1 m<sup>3</sup> 发酵罐放大试验中,将啤酒风味保鲜期提高 92%,啤酒风味有所改善。

3) 以紫外诱变作为菌种选育的手段,其回复突变率较高,还应注意菌种长期的稳定性。

#### 参 考 文 献

- 1 Hashimoto N. Flavor Stability of Packaged Beers. In Ed by Pollock J R A. Brewing Science. Bristol Stonebridge Press, 1981. 347~ 405
- 2 Stewart G G, Russell I. Centenary Review—One Hundred Years of Yeast Research and Development in the Brewing Industry. J Inst Brew, 1986, 92 537~ 558
- 3 廖惟. 啤酒风味老化和抗老化——原料、糖化过程对风味老化的影响. [硕士学位论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1996.
- 4 廖惟. 啤酒生产过程中氧化还原酶系的研究. 食品与发酵工业, 1997, 23(4): 1~ 4
- 5 王海明. 辅料、氧化还原酶、糖化过程、抗氧化剂对风味老化的影响. [硕士学位论文]. 无锡: 无锡轻工大学, 1997.
- 6 日野忠行, 原田茂吉, 前川博和等. グルタチオン高含有酵母の製造方法. 日本, 公开特许公报, 昭 60-156397, 1985-08-16
- 7 渡边惠市郎, 加藤典昭, 吉田典江等. グルタチオンの菌体内蓄法. 日本, 公开特许公报, 平 1-148181, 1989-06-09
- 8 张承圭. 生物化学仪器分析及技术. 北京: 高等教育出版社, 1990. 96
- 9 Parsons R, Cope R. The Assessment and Predication of Beer Flavor Stability. Oxford Information Press, 1983. 279

## Breeding of Anti-Staling Brewing Yeast

Li Qi Gu Guoxian Bai Zhuan Zhang Kechang

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

Pan Xueqi

(Tsingtao Brewing Co., L. T. D., Qingdao, 266100)

**Abstract** A brewing yeast strain was used as the original strain. A mutant strain M<sub>4</sub> with excellent anti-staling ability was achieved after UV mutation and continuous domestication of methionine. Compared with the original strain, the content of carbonyl compound decreased by 19. 7% while the glutathione content increased by 29. 6% in the finish beer fermented by M<sub>4</sub> in 1 m<sup>3</sup> fermentor, and the beer flavor stability was improved by 92% without changing any other process conditions.

**Key words** brewing yeast; mutation; methionine; glutathione; flavor stability

(责任编辑: 秦和平)