

全小麦啤酒酵母菌株的诱变育种及应用研究

袁 仲^{1*} 张百胜¹ 张慎举¹ 马绮云² 陈柯羽²

(¹商丘职业技术学院园林食品加工系, 商丘 476000; ²河南府泉酒业有限公司, 商丘 476100)

摘要 采用10 Kev低能N⁺注入啤酒酵母, 经筛选获得一菌株Lz37, 再用150 MPa超高压处理菌株Lz37, 经双乙酰平板筛选获得一菌株Gy3, 其凝聚性很强, 适合于在小麦汁中发酵啤酒, 其发酵度为66%~68%, 双乙酰含量低于口味阈值, 遗传稳定性良好。将Gy3酵母定为全小麦啤酒生产应用酵母, 命名为商啤3号(SP-03)。“SP-03”啤酒酵母菌株的各项生理及生产性能都较优良, 特别是在全小麦啤酒的酿造中适用性较强, 经过对发酵工艺等的调整, 用其酿制的啤酒口感纯正、淡爽、柔和。

关键词 离子注入; 超高压处理; 诱变育种; 全小麦啤酒; 酵母菌株

小麦啤酒是以优质小麦芽为主要原料, 通过科学方法精心酿制而成的低酒精度饮料酒。由于小麦啤酒色度较淡, 口味清爽、风味纯正独特, 因而受到越来越多消费者的欢迎, 具有广阔的发展前景。目前酿制小麦啤酒的酵母基本上都是采用生产大麦啤酒的酵母。小麦啤酒黏度高, 原有酵母菌种悬浮性强, 发酵结束后酵母悬浮数较大, 对过滤要求较高, 造成生产成本增加, 同时原有酵母菌不能很好地表达小麦啤酒的酯香, 这已成为啤酒行业研究小麦啤酒的一个难题。

诱变育种主要有物理诱变和化学诱变两种方法, 已有的物理和化学诱变因子由于频繁使用, 其诱导新突变的能力下降, 诱变频率降低; 由于它们几乎都有辐射性或毒性, 在很大程度上限制了它们的应用。如果小麦啤酒酵母诱变育种要取得大的突破, 必须寻找新的诱变源。离子束作为一种新的诱变源在微生物上的应用起步较晚, 有些学者分别采用离子注入对啤酒酵母^[1]、酿酒酵母^[2]等的影响及菌种选育^[3]进行了研究。此外, 随着人们认识的不断提高, 超高压已被很多研究者们应用于微生物诱变育种当中, 李党生等^[4]用高压技术对啤酒酵母生长影响进行研究, 通过高压诱变获得突变株, 为利用高压诱变筛选啤酒酵母优良菌种提供了初步依据。王振伟等^[5]运用现代高压生物技术, 选育优良啤酒酵母菌种, 并分析了高压处理对啤酒酵母的生长影响。笔者在已有的诱变经验基础上, 采用离子束和超高压复合处理, 对河南府泉酒业有限公司保存的商啤2号(SP-02)酵母菌进行处理, 以期获得一株优良的全小麦啤酒酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

啤酒酵母菌株商啤2号(SP-02): 由河南府泉酒业有限公司提供。

1.2 培养基

固体培养基: 10°P小麦芽汁, 加2%琼脂。

发酵培养基: 10°P小麦芽汁。

1.3 培养方法

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。

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, 25℃培养2 d。

发酵培养: 每个500 ml三角瓶内装300 ml麦汁, 灭菌, 接三角瓶培养液10 ml, 装上发酵栓, 用4 mol/L的硫酸封口, 12℃低温发酵8 d。

500 L罐发酵: 将筛选得到的菌株用10°P小麦芽汁为培养基, 在500 L罐中进行发酵, 发酵期间每天取样测定发酵度、双乙酰和高级醇等的含量。

1.4 主要测定方法

凝聚性的测定: 采用本斯值法。

发酵速度的测定: 取待试菌种, 接种于麦汁培养基中, 25℃培养1 d; 取200 ml麦汁于玻璃筒中(5 cm×120 cm)接种新培养酵母, 使麦汁酵母数为(1.0×1.5×10⁷个/ml)。控制10℃左右进行发酵。每天2次测定其外观糖度。当外观糖度为3.5°P时, 记下

收稿日期: 2010-11-07

接受日期: 2010-12-02

河南科技进步资助项目

*通讯作者。Tel: 0370-3182051, E-mail: sqzyyz@126.com

发酵天数。

双乙酰测定: 参照GB4927-4928-2001标准。

发酵液中的化学成分测定: 采用GC-8A型气相色谱测定。

1.5 离子注入方法^[6]

把待处理的菌株细胞均匀涂布在平板培养皿上, 用无菌空气风干制成菌膜。采用能量10 Kev, 脉冲剂量 $1 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的 N^+ 束注入啤酒酵母, 每次连续注入5 s, 间隔50 s, 总剂量为0(对照)~ $7 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$, 注入靶室的真空度为 $1 \times 10^3 \text{ Pa}$ 。

1.6 超高压处理方法^[7]

采用900-21L型超高压设备, 其最高压力为900 MPa, 最大容积为2 L, 传压方式为外部加压, 传压介质为蓖麻油, 加压保压卸压均为自动控制。

把待处理的菌种, 经三角瓶液体培养至对数生长期, 用磷酸缓冲液(pH7.00)或 10°P 小麦芽汁稀释至细胞数达到 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml, 分装到高温灭过菌的聚乙烯袋中。按照预定方案选取压力, 保压时间10 min, 进行高静压处理(恒温 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$)。以未进行高压处理的出发菌株作为对照, 经稀释后涂布于固体平板培养基上, 25°C 培养48 h, 观察菌落数。

1.7 菌株筛选方法

将经过离子注入处理或超高压处理后生长良好, 菌落成中等大小、乳白色、表面光滑和边缘整齐, 以及镜检菌体为椭圆近圆形的平板单个菌落移接斜面供复筛。复筛凝聚性好的菌株, 进一步做双乙酰含量、发酵度、酒精度等生产特性分析。

2 结果

2.1 离子注入选育全小麦啤酒酵母菌株

2.1.1 离子注入处理对菌株存活率的影响 由对

照平板和各剂量注入处理后的平板, 在相同条件下培养后进行菌落计数, 绘成存活率曲线(图1)。可以看出, 菌体存活率与注入离子剂量有关, 随着 N^+ 注入剂量的增大, 菌株存活率降低, 当注入剂量超过 $7 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 时, 存活率降为零。存活率在中间有一个上扬的区段。这说明啤酒酵母菌与其它受离子注入的菌体一样也存在初级修复和生物修复机制, 而且在此区段微生物的突变率是最高的, 因此, 初步选定 $2 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 为合适的诱变剂量。

2.1.2 菌株的筛选与发酵性能比较 在离子注入剂量 $2 \times 10^{14} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 条件下诱变, 将生长良好, 菌落成中等大小、乳白色、表面光滑和边缘整齐, 以及镜检菌体为椭圆近圆形的平板单个菌落移接斜面供筛选。初筛共挑取菌株48株。对初筛所得到的菌株用本斯值法测定凝聚性, 经复筛后发现, 有5株菌株具有较好的凝聚性, 凝聚性均比出发菌株强。

双乙酰含量的多少是影响啤酒质量的一个重要指标, 出发菌株在大麦啤酒发酵中双乙酰含量在口味阈值(0.15 mg/L)以下, 挑选生产双乙酰少的酵

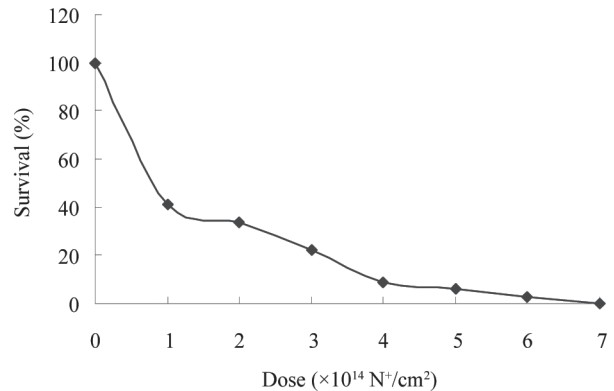


图1 菌株离子注入后存活曲线

Fig.1 Survival curves of strains after ion implantation

表1 不同菌株发酵特性的比较

Table 1 Comparison of different fermentation characteristics

菌株 Strains	发酵度(%) Degree of fermentation(%)	酒精度(%) Alcohol(%)	发酵时间(d) Fermentation time(d)	双乙酰(mg/L) Diacetyl(mg/L)	凝聚性(本斯值/ml) Cohesive(The value of the Sri lanka/ml)
Sp-02	64.9	3.95	4.5	0.185	1.1
Lz1	71.4	4.21	4.0	0.142	1.3
Lz12	63.0	3.78	4.5	0.199	1.4
Lz28	66.1	4.02	3.5	0.146	1.5
Lz31	68.0	4.50	4.0	0.168	1.3
Lz37	66.8	4.04	3.0	0.126	1.3

母是生产优质小麦啤酒的重要条件。将凝聚性较好的5个菌株进行500 ml三角瓶发酵,测定其发酵液中双乙酰含量,发现有3株菌的发酵液双乙酰含量降到了口味阈值以下,但是比出发菌株在大麦啤酒中的双乙酰含量(0.072 mg/L)要高。试验对发酵液双乙酰含量较低的Lz37等5个菌株进行凝聚性、发酵度和酒精度的测定,并与出发菌株商啤2号(SP-02)进行比较(表1)。结果表明Lz1、Lz28、Lz31和Lz37的发酵度和酒精度均略高于出发菌株。

试验发现:采用10 Kev低能N⁺注入啤酒酵母,经筛选获得一株菌Lz37,其凝聚性很强(本斯值1.4/ml),适合于在小麦汁中发酵啤酒,其发酵度为66%~68%,双乙酰含量(0.124 mg/L)低于口味阈值,为了保证后发酵能在较短时间内完成,其双乙酰还原能力还需进一步加强。

2.2 超高压处理诱变选育全小麦啤酒酵母菌株

2.2.1 高静水压处理啤酒酵母Lz37存活率曲线由对照平板和不同压力处理后的平板,在相同条件下培养后进行菌落计数,绘成存活率曲线(图2)。可以看出,菌体存活率与压力有关,随着压力的增大,菌株存活率降低,当压力超过300 MPa时,存活率降为零。据报道,存活率在20%~50%之间,微生物的突变率是最高的,初筛选用双乙酰平板,初步选定150 MPa为合适的诱变压力。

2.2.2 菌株的筛选与发酵性能比较 将150 MPa条件下处理10 min的菌液涂布在双乙酰平板上,培养后将生长良好,乳白色、表面光滑和边缘整齐,以及镜检菌体为椭圆近圆形的单个菌落移接斜面供复筛。共挑取8株菌株,分别命名为Gy1、Gy2、Gy3、Gy4、Gy5、Gy6、Gy7、Gy8。

试验中所用的出发菌株Lz37具有良好的凝聚性,为了了解超高压处理Lz37后所筛选的菌株其凝聚性是否发生突变,用本斯值法测定Gy1、Gy2、Gy3等8株菌株的凝聚性。结果发现诱变得到的

Gy3、Gy7与出发菌株相近,而且酵母沉淀紧密,说明Gy3、Gy7这两个菌株比出发菌株Lz37具有更良好的絮凝性。对发酵液双乙酰含量较低,凝聚性优良的Gy3、Gy7菌株进行发酵度和酒精度的测定,并与出发菌株Lz37进行比较(表2)。结果表明Gy3的性能优于出发菌株和Gy7。

将菌株Gy3和Gy7在固体斜面培养基上连续接种培养8代后,进行发酵性能测定,结果显示传代前后菌株的主要酿造性能基本没有变化。因此,所获得的菌株Gy3和Gy7遗传稳定性较好。进一步试验证明:Gy3酵母菌的发酵度、死灭温度、凝聚性及还原双乙酰速度都比较理想。特别是凝聚性能有很大提高,经过对发酵工艺等的调整,适合于小麦麦芽汁酿造啤酒,其发酵得到的啤酒口味纯正。因此,将Gy3酵母定为啤酒生产应用酵母,命名为商啤3号(SP-03)。

2.3 3株啤酒酵母菌株在全小麦啤酒生产中的应用试验

“SP-02”、“SP-03”、“SP-06”3株啤酒酵母菌株中,除“SP-03”是新诱变选育菌株外,其余是从河南府泉酒业有限责任公司多年搜集、保存的啤酒酵母菌株中挑选出的较优者,而“SP-02”为府泉酒业有限责任公司

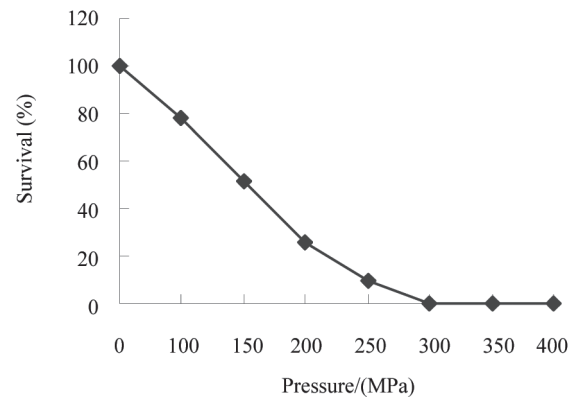


图2 超高压处理后菌株存活曲线

Fig.2 Survival curves of strains after high pressure treatment

表2 3株菌株发酵性能的比较

Table 2 3 strains comparison of fermentation performance

菌株 Strains	发酵度(%) Degree of fermentation(%)	酒精度(%) Alcohol(%)	发酵时间(d) Fermentation time(d)	双乙酰(mg/L) Diacetyl(mg/L)	凝聚性(本斯值/ml) Cohesive(The value of the Sri lanka/ml)
Lz37	66.8	4.02	3.0	0.123	1.3
Gy3	67.2	4.08	3.0	0.093	1.3
Gy7	66.7	3.95	3.5	0.100	1.4

原生产大麦芽啤酒时使用的啤酒酵母菌株,为此,将“SP-02”与“SP-03”、“SP-06”3株啤酒酵母菌株在全小麦芽啤酒的生产中进行对比应用试验。

2.3.1 3株啤酒酵母菌株的锥型罐发酵试验 为了体现小麦啤酒的风格,采用浓醪糖化,料水比控制在1:3.5~4;采用48℃/68℃/72℃的糖化温度;糖化时添加适量的β-葡聚糖酶以降低麦汁粘度,加快过滤的进行;采用双醪一次煮出糖化法。生产试验使用的小麦芽与大米的配比为40:60,由于麦芽用量较低而致使麦汁的pH缓冲能力较差,因而在发酵的第3天,发酵液的pH值已降至4以下。3株啤酒酵母菌株锥型罐发酵理化指标分析结果见表3。

在发酵阶段每天进行跟踪检测酵母细胞数时发现,在酵母细胞凝聚沉淀期间,“SP-02”和“SP-03”啤酒酵母菌株的酵母细胞都能大量结团沉淀,而“SP-06”在酵母凝聚沉淀过程中则不结团,酵母细胞始终呈单个细胞。发酵基本结束回收酵母时,3株啤酒酵母菌株的酵母泥回收情况差别较大(表4)。发酵结束后对3株啤酒酵母菌株的酒液口感风格进行品尝,3株啤酒酵母菌株的酒液口感风格差别较大,根据江南大学顾国贤教授啤酒风味类型分布图,3株啤酒酵母菌株的酒液口感风格分别属于不同的风味类型(表4)。在国外,一些酿造师认为,小麦啤酒特有的

香气来源于高含量的高级醇(120 mg/L~160 mg/L)和酯(20 mg/L~40 mg/L),而酵母菌种、发酵温度、冷麦汁通氧量与高级醇和酯的生成有很大关系。因此,德国、英国常采用上面发酵酵母菌种,较高接种温度(12℃~15℃)和发酵温度(16℃~20℃)。笔者对“SP-03”啤酒酵母菌株,经过发酵工艺等的调整,也能生产出香味突出、口味纯正、泡沫洁白且细腻的小麦啤酒。

“SP-02”啤酒酵母菌株不论是在大麦芽啤酒的酿制中还是在全小麦芽啤酒的生产中,啤酒的口感风格都较一致,刺激感都较强,较有劲,饮后较易上头,但其酿制的啤酒风格与目前流行的淡爽型及淡爽柔和型的啤酒风格有差距;“SP-06”在全小麦芽啤酒的生产中口感较好,纯正、淡爽的口感风格比较适应当前啤酒市场流行的口感风格,不足之处是在全小麦芽啤酒的酿制中凝聚性太差、酵母回收困难而限制了它的应用价值;“SP-03”啤酒酵母菌株在全小麦芽啤酒的酿制中适用性较强,用其酿制的啤酒口感纯正、淡爽、柔和,整体口感风格为目前国内流行的淡爽柔和型。

2.3.2 “SP-03”啤酒酵母菌株的生产稳定性试验 在啤酒大生产中,酵母一般使用至3~4代即行淘汰,笔者对“SP-03”啤酒酵母菌株进行了0~7代全小麦芽

表3 3株啤酒酵母菌株发酵罐发酵终了理化指标分析

Table 3 The physical and chemical indicators of 3 beer yeast strains at the end of the fermentation

罐号(菌株) Tank No. (Strains)	酒精含量(%) Alcohol(%)	实际浓度(% m/m) The actual concentration (% m/m)	原麦汁浓度(°P) Original wort concentration (°P)	真正发酵度(%) The real degree of fermentation(%)	pH值 pH value	总酸(ml/100 ml) Total acid (ml/100 ml)	双乙酰(mg/L) Diacetyl (mg/L)	色度 Color (EBC)
30#(SP-02)	4.37	3.308	10.03	68.2%	3.83	1.70	0.0504	5.0
25#(SP-03)	4.36	3.308	10.01	68.1%	3.85	1.65	0.0432	5.0
4#(SP-06)	4.47	3.232	10.01	69.2%	3.78	1.75	0.0432	5.0

表4 3株啤酒酵母菌株的酒液口感品尝及风格类型

Table 4 Liquor taste and style type of 3 beer yeast strains

罐号(菌株) Tank No. (Strains)	发酵液中悬浮酵母细胞数 Fermentation of yeast cells per milliliter of suspension	酵母泥回收情况 The recall of yeast sludge	口感品尝 Taste	风味类型 Style type
30# (SP-02)	6.7×10 ⁶	More dilute	Taste more pure, cool lighter, stronger irritation	Powerful light cool
25# (SP-03)	2.3×10 ⁶	More thick	Pure taste, light cool, coordinated, soft	Light cool soft-type
4# (SP-06)	16.5×10 ⁶	Dilute	Pure taste, cool light, coordination	Shuang-type light

啤酒的生产应用试验。结果见表5。从综合数据来看,“SP-3”啤酒酵母菌株经0~7代的生产稳定性试验,其生产稳定性较为理想。“SP-03”啤酒酵母菌株进行0~7代全小麦芽啤酒的生产应用试验过程中,起发及降糖速度均较快,酵母泥回收情况均较稠,口感品尝均纯正、淡爽、柔和。

按照优化后的糖化工艺、发酵工艺,采用全小麦芽汁,利用商啤3号2代酵母菌应用于120吨、240吨生产用发酵进行实际扩大实验。试验结果表明:商啤3号在大罐中性能良好,在小麦芽芽汁中繁殖较快,酵母高峰值为 8×10^7 个/ml。过滤前的酵母数为 0.3×10^7 个/ml左右。麦汁极限发酵度为83%~85%,

表5 “SP-03”啤酒酵母菌株0~7代应用情况

Table 5 The application situation of "SP-03" beer yeast strains from 0 to 7 generations			
代数	真正发酵度(%)	双乙酰(mg/L)	酵母死亡率(%)
Generations	The real degree of fermentation(%)	Diacetyl(mg/L)	Yeast mortality(%)
0	68.0	0.0480	1.1
1	68.2	0.0432	1.5
2	68.3	0.0336	1.9
3	68.0	0.0408	2.3
4	67.9	0.0432	2.6
5	68.1	0.0504	2.8
6	68.2	0.0480	2.9
7	68.1	0.0456	2.7

啤酒真正发酵度为66%~68%, ΔE 值为0.5%~1.0%, α -氨基氮同化力为75%。双乙酰峰值为0.3~0.4 mg/L,成品啤酒中双乙酰含量为0.04~0.06 mg/L。

3 讨论

采用10 Kev低能 N^+ 注入啤酒酵母,经筛选获得一株菌Lz37,其凝聚性很强(本斯值1.4/ml),适合于在小麦汁中发酵啤酒,其发酵度为66%~68%,双乙酰含量低于口味阈值。再采用150 MPa超高压处理啤酒酵母株菌Lz37,经双乙酰平板筛选获得一株菌Gy3,其凝聚性很强(本斯值1.3/ml),适合于在小麦汁中发酵啤酒,其发酵度为66%~68%,双乙酰含量(0.04~0.06 mg/L)低于口味阈值,遗传稳定性良好。将Gy3酵母定为啤酒生产应用酵母,命名为商啤3号(SP-03)。

“SP-03”啤酒酵母菌株的各项生理及生产性能都较优良,特别是在全小麦芽啤酒的酿造中适用性较强,用其酿制的啤酒口感纯正、淡爽、柔和;同时“SP-03”在全小麦芽啤酒酿造中的凝聚沉淀及酵母回收情况也比较理想,是实验室试验5支啤酒酵母菌

株及大生产试验3株啤酒酵母菌株中的最优者,因而“SP-03”是一支生理及生产性能优良,适用于全小麦芽啤酒生产的优良啤酒酵母菌株,通过对发酵工艺等的调整,其发酵得到的全小麦啤酒口味纯正、淡爽、柔和。

参考文献(References)

- 1 邓玉清,王 纪,蒋海波,余增亮。 H^+ 、 N^+ 、 Ar^+ 注入对啤酒酵母存活率的影响及SEM和ESR研究。激光生物学报 2001; 10(3): 170-3.
- 2 王鹏银,郝 欣,郭学武,肖冬光。离子注入诱变选育低产高级醇酿酒酵母菌株。酿酒科技 2008; (02): 17-21.
- 3 虞 龙,张 宁。离子注入微生物诱变育种的研究与应用进展。微生物学杂志 2005; 25(2): 80-3.
- 4 李党生,王振伟。高压诱变啤酒酵母研究及其突变株RAPD分析。食品科学 2009; (21): 52.
- 5 王振伟,王 恺。高压诱变啤酒酵母及突变株SDS-PAGE电泳分析。科技资讯 2009; (25): 7.
- 6 袁 仲,陈柯羽。离子注入诱变选育全小麦啤酒酵母菌株。酿酒科技 2009; (11): 55-7.
- 7 刘凤珠,张 辉,穆凯峰。高静压对啤酒酵母诱变效应的研究。酿酒科技 2008; (03): 51-2.

The Application and Mutation Breeding of Whole Wheat Beer Yeast Strains

Zhong Yuan^{1*}, Bai-Sheng Zhang¹, Shen-Ju Zhang¹, Qi-Yun Ma², Ke-Yu Chen²

¹*Department of Landscape and Food Processing Shangqiu Vocational and Technical College, Shangqiu 476000, China;*

²*Henan Fuquan Beer Limited Company, Shangqiu 476100, China)*

Abstract Low energy N⁺ implantation using 10 Kev *Saccharomyces cerevisiae* by screening to obtain a bacteria Lz37, using ultra high pressure 150 MPa strains Lz37, screened by a plate of diacetyl bacteria Gy3, the cohesion was very strong, suitable for use in wheat beer fermented juice, the degree of fermentation was from 68% to 66%, diacetyl content below the taste threshold, genetic stability was good. Gy3 as whole wheat yeast beer yeast was named No.3 commercial beer (SP-03). “SP-03” beer yeast strains of the physiological and production performance were relatively good, especially in the full-malt beer brewed in the applicability of strong, such as through the adjustment of the fermentation process, with its pure taste of beer brewed, cool light, soft.

Key words ion implantation; high pressure processing; mutation breeding; whole wheat beer; yeast strains

Received: November 7, 2010 Accepted: December 2, 2010

This work was supported by the Science and Technology Projects in Henan Province

*Corresponding author. Tel: 86-370-3182051, E-mail: sqzyyz@126.com