

贵州省水城县发耳乡当年收老姜，部分作去皮处理，将带皮姜、去皮姜、姜皮分别置于40℃烘箱中干燥，使水分含量降至7%左右，粉碎成20目粗粉备用。

1.2 超临界装置

4L超临界CO₂萃取装置(自行研制)。

1.3 GC-MS仪

HP 5890PLUS GC/5989A MS气质联用色谱仪 美国惠普公司产。

2 方法

2.1 超临界CO₂萃取

取带皮姜、去皮姜、姜皮粉各200g，置于4L超临界CO₂萃取装置，在15MPa、35℃超临界CO₂流体中连续萃取1.5h，姜油得率分别为3.57%、2.87%、4.6%。

2.2 GC-MS分析

GC条件：色谱柱为HP-1弹性石英毛细管柱30m×0.2mm×0.32μm，柱温50~250℃，程序升温70℃(保持5min) 程序升温(2℃/min) 250℃(保持10min) 进样口温

度250℃，柱前压10psi，载气为氦气。

MS条件：EI离子源，离子温度250℃，四极杆温度100℃，接口温度260℃，电子能量70eV，质量扫描范围30~550u，电子倍增电压2500V。

3 结果与讨论

不同部位姜油经GC-MS测定分析，共鉴定出34种化合物，峰面积归一法定量，结果见表1。

由表1结果可知，不同部位姜油化学成分含量存在差异。各姜油中主要成分-姜烯含量差异不大，而姜皮油中姜辣素成分姜烯酚、姜油酮含量明显高于带皮姜油和去皮姜油，表明姜辣素主要分布在姜皮中。

参考文献：

- [1] 张宏志,等.贵州生姜资源的应用研究[J].资源科学,2001,23(5):90-94.
- [2] 陈燕,等.生姜提取物的综合利用与深加工研究[J].食品工业科技,2000,21(4):76-78.

化学诱变选育低双乙酰啤酒酵母菌株的研究

唐晓达, 张秀丽, 魏文铃, 刘月英, 刘进文
(厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

摘要:通过EMS诱变从啤酒酿造生产菌株啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)FB中筛选分离得到一株发酵液中双乙酰含量优于亲株的新菌株FB-E1。以12°Bx麦芽汁为培养基,用内装300ml麦芽汁的500ml三角瓶于12℃下发酵,发酵8d后发酵液中双乙酰含量比亲株降低了42.7%。该菌株的其它发酵性能的测定结果表明其保持了亲株的优良性状,且遗传性状稳定。

关键词:啤酒酵母; 诱变; 双乙酰

Study on Chemical Mutation of Selected Strain of *Saccharomyces Carlsbergensis* FB

TANG Xiao-da, ZHANG Xiu-li, WEI Wen-ling, LIU Yue-ying, LIU Jin-wen
(College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: After mutation with EMS (ethyl methane sulfonate), a *Saccharomyces carlsbergensis* strain FB-E1 was selected from original strain FB, a strain for beer brewage production. The diacetyl content in the fermented liquid during the fermentation was investigated in 500ml flask with 300ml 12°Bx wort at 12℃. After 8d, the diacetyl content in the fermented liquid of FB-E1 was

收稿日期: 2002-12-21

作者简介: 唐晓达, 男, 硕士研究生。

0.0706mg/L, 42.7% lower than that of its original strain A (0.1233mg/L). The results showed that flocculence and fermentation rate of strain FB-E1 were kept just as good as the original strain FB.

Key words: brewer's yeast; mutation; diacetyl

中图分类号: TQ92

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)11-0081-03

双乙酰是啤酒酿造过程中的限速因素,同时对啤酒的风味有很大的影响:当啤酒中双乙酰含量超过风味阈值时,会有一种不愉快的馊饭味。降低生产过程中的双乙酰含量,可加速啤酒成熟,缩短生产周期,提高设备利用率,从而降低成本。酵母菌种是影响酒液中双乙酰含量的重要因素之一,故选育低产双乙酰和双乙酰还原速度快的酵母菌株具有重要的理论和实践意义。

现代生物育种技术在啤酒酵母菌种的改造中已显示出很好的应用前景。郭文洁等人^[1]将枯草芽孢杆菌中的-乙酰乳酸脱羧酶基因通过整合型载体引入到工业啤酒酵母中,得到了一株双乙酰生成量明显降低的优良菌株。周东坡等人^[2]以生产用啤酒酵母作为亲本,通过灭活原生质体融合选育到一株口味独特、发酵度高、遗传性能稳定兼具有多种优良性状的啤酒酵母新菌株。但使用物理、化学的诱变方法,选育啤酒酿造业的优良的啤酒酵母菌种仍不失其实际意义。本文介绍从生产菌株出发,经诱变选育和性能测定获得一株发酵液双乙酰含量较低的优良啤酒酵母新菌株的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)FB作为试验研究的出发菌株,由福建雪津啤酒有限公司提供。

1.1.2 培养基

MM培养基、无氮MM培养基和CM培养基按文献[3]配制;12°Bx麦芽汁(雪津啤酒有限公司提供)作发酵培养基。

1.1.3 发酵条件

500ml三角瓶内装300ml 12°Bx麦芽汁,12 低温发酵。

1.2 方法

1.2.1 诱变 参照文献[3]进行。

1.2.2 初筛 诱变后挑选在MM培养基上生长良好,菌落呈中等大小、乳白色、表面光滑和边缘整齐的菌落移接斜面供复筛。

1.2.3 复筛 供复筛的菌株进行500ml三角瓶低温发酵,测定发酵液中的双乙酰含量并以此作为复筛的标准。同时测定发酵液中双乙酰含量最低的几株酵母的其它性能。

1.2.4 酵母发酵性能的分析

1.2.4.1 双乙酰含量的测定 参照国家标准GB 4928-91进行。

1.2.4.2 酵母凝聚性的测定 按文献[4]进行 采用本斯值法测定。

1.2.4.3 发酵度和酒精度的测定 参照国家标准中规定方法处理发酵液,用啤酒自动分析仪进行分析。

1.2.4.4 发酵速率的测定 采用失重法,用电子分析天平称量,以发酵液的日平均失重表示发酵速率。

1.2.4.5 发酵液中化学成分的测定 采用GC-8A型气相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 初筛

本研究以啤酒酵母FB为出发菌株,菌悬液用终浓度0.15mol/L的EMS处理1h,其致死率77.2%。如“1.4初筛”所述,以菌落和菌体的形态特征为指标,将筛选到的菌株移接斜面供复筛。

2.2 复筛

初筛获得的菌株经500ml三角瓶内装300ml 12°Bx麦芽汁发酵8d后,测定发酵液中的双乙酰含量,选择发酵液中双乙酰含量低的菌株进行二次发酵,将双乙酰含量明显降低的4株菌分别编号为FB-E1、FB-E2、FB-E3和FB-E4。结果见表1。

表1 发酵液中双乙酰含量的比较

菌株	FB	FB-E1	FB-E2	FB-E3	FB-E4
双乙酰含量(mg/L)	0.1233	0.0706	0.0926	0.0776	0.0870
降低率(%)	0	42.7	24.9	37.1	29.4

由表1可见,亲株FB发酵8d后,发酵液中双乙酰含量为0.1233mg/L;而FB-E1的双乙酰含量为0.0706mg/L,比亲株FB降低达42.7%,其它三株与亲株相比降低24.9%~37.1%。

2.3 絮凝性的测定

良好的絮凝性不仅可以减少发酵液的澄清时间,降低酵母分离的能源消耗,还可防止酵母细胞长时间悬浮于发酵液中致使细胞自溶,有损啤酒风味。生产菌株FB具有良好的絮凝性,为了考察经EMS诱变后该菌株的絮凝性是否发生变化,用本斯值法测定了复筛得到的4株菌的絮凝性并与亲株FB作比较。由表2可见,诱变后得到的FB-E1等4株菌的本斯值与出发菌株FB相同或相近,表明这4株菌与出发菌株FB一样具有良好的絮凝性。

表2 不同菌株絮凝性的比较

菌株	FB	FB-E1	FB-E2	FB-E3	FB-E4
本斯值(ml)	3.0	2.8	3.0	2.8	3.2

2.4 发酵度、酒精度和发酵速率的测定

试验对发酵液双乙酰含量较低的FB-E1等4个菌株进行发酵度和酒精度的测定,并与出发菌株FB进行比较。结果(表3)表明,FB-E1和FB-E3的发酵度和酒精度均略高于出发菌株,FB-E2和FB-E4的发酵度和酒精度略低于出发菌株FB。

啤酒酵母菌发酵麦芽汁时释放CO₂,使发酵液失重。因此,根据发酵液的失重速率可大致了解其发酵速率。试验将不同菌株接入一定重量的麦芽汁培养基中,发酵8d,称重并计算其失重速率(发酵速率)。结果(表3)表明,除FB-E4菌株外,其它菌株的发酵速率都比出发菌株FB的快。

表3 不同菌株发酵度、发酵速率和酒精度的比较

菌株	FB	FB-E1	FB-E2	FB-E3	FB-E4
发酵度(%)	64.9	66.8	64.0	66.8	63.0
酒精度(%)	3.95	4.04	3.85	4.04	3.78
发酵速率(g/d)	1.29	1.35	1.30	1.38	1.21

由表3可见,虽然试验中筛选得到的4株菌的发酵度、酒精度和发酵速率与亲株相比有的高、有的低,但是差别不大,都显示出较高的发酵度、酒精度和发酵速率,说明这些菌株均保留了亲株的优良发酵性能。

2.5 发酵液中挥发性化学成分的测定

啤酒中的挥发性物质除了乙醇和双乙酰外,还有一些酯和其它一些醇等,其含量和比例对啤酒的独特风味有着重要的作用。因此,发酵8d后,发酵液用气相色谱测定这些挥发性化学成分并与出发菌株FB进行比较,结果见表4。

表4 发酵液中挥发性化学成分的比较

菌株	含量(μg/L)				
	正丙醇	异丁醇	异戊醇	乙酸乙酯	乙酸异戊酯
FB	11.9	21.2	67.2	18.30	1.59
FB-E1	11.4	18.8	60.2	17.80	1.37
FB-E2	13.5	19.2	67.7	21.90	1.75
FB-E3	10.8	18.3	55.8	16.70	1.34
FB-E4	10.1	17.6	52.9	16.00	1.18

从表4可见,FB-E1等4株菌发酵液中所测定的挥发性物质的含量与亲株FB比较,并没有太大的改变,说明FB-E1等4株菌保持了亲本FB的独特风味。经国家级和省级评酒员的品评,一致认为FB-E1菌株的发酵液口感优于其它3株菌。

2.6 FB-E1的遗传稳定性

FB-E1菌株发酵液中双乙酰含量与亲株FB相比降低了42.7%,而絮凝性、发酵度、酒精度、发酵速率等特性保持了亲株FB的优良性状,故对该菌株的遗传稳定性作进一步的研究。

FB-E1菌株经斜面移接传代20次后,每隔4代的斜面菌种进行三角瓶低温发酵,发酵8d分别测定发酵液中双乙酰含量,结果见表5。

表5 菌株FB-E1的遗传稳定性的测定

菌株	0代	4代	8代	12代	16代	20代
双乙酰含量(mg/L)	0.0706	0.0718	0.0684	0.0710	0.0718	0.0704

由表5可以看出,所测定的菌种啤酒发酵液中双乙酰含量与0代比较无明显变化,可见在连续20代的斜面移接过程中,该菌株具有良好的遗传稳定性。

综上所述,亲株FB经EMS诱变后获得的FB-E1菌株的絮凝性、发酵度等特性保持了亲株的优良性状,同时也保持了亲株的独特风味。而且FB-E1在发酵8d后发酵液中的双乙酰含量比亲本降低了42.7%,且遗传性能稳定,是一株有应用前景的优良菌株。

参考文献:

[1] 郭文洁,何秀萍,铁翠娟,等.枯草芽孢杆菌-乙酰乳酸脱羧酶基因在啤酒酵母工业菌株中的表达[J].微生物学报,2001,41(1):105-108.
 [2] 周东表,平文祥,孙剑秋,等.通过灭活原生质体融合选育啤酒酵母新菌株[J].微生物学报,1999,39(5):454-460.
 [3] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
 [4] 管敦仪.啤酒工业手册(修订版)[M].北京:中国轻工业出版社,1999.