

凝集性酵母融合株 MWF29 的啤酒酿造试验研究

江慧修 张金玲 戈琳 周坚

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

李福成 赵希源 应自荣 丁广学 王学明

(北京市燕京啤酒厂, 北京 101300)

摘要 利用线粒体 DNA 突变标记和电诱导融合技术获得的酵母融合株 MWF29, 经过连续七代 60—120 吨级生产规模的发酵试验表明, 该菌生产性能良好, 具备了两个亲株的优良性状, 发酵力强, 酿酒风味好, 发酵流程中及最终产品的化验指标全部达到了优质酒的要求。发酵后期细胞的凝集性好, 90% 以上的菌体自行凝集下沉到罐底, 不需经过离心便可顺利过滤, 并且减少用于过滤的硅藻土用量。

生产实践证明酵母融合株 MWF29 是一株性能稳定的优良生产菌株。本工作证明应用线粒体 DNA 突变抗性菌进行原生质体融合是工业酵母育种的一种简便有效的手段, 特别是为改良已丧失孢子能力的生产菌株的性状提供了有效途径。

关键词 啤酒酿造酵母, 凝集性酵母融合株 MWF29; 生产试验

在实验室通过对原生产菌株 B₃ 进行改良获得了优良菌株 MWF29^[1], 克服了 B₃ 在发酵终了时酵母菌体凝集不好的缺点。菌株 MWF29 的凝集性大大提高, 发酵终了时, 90% 以上的菌体沉降到发酵罐底, 便于过滤, 节约用于过滤的硅藻土, 提高经济效益, 减少环境污染。

1990 年下半年, 将该凝集性酵母融合株 MWF29 在北京燕京啤酒厂做了连续七代啤酒酿造生产试验, 检查融合株从亲本得到的优势是否能在生产中稳定地遗传。酿酒规模 0—1 代为 60 吨罐, 2—6 代为 120 吨罐, 现总结如下。

材料与方 法

1. 菌种: MWF29 系非凝集性酿酒酵母 *Saccharomyces carlsbergensis* B₃ 和凝集性酿酒酵母 *S. carlsbergensis* A₃₃ 的融合株^[1]。

2. 分析方法: 除本斯值法^[2]外本文所列的分析数据由厂方化验室依文献^[3]和啤酒分析手册^[4]进行。

3. 菌种扩大培养流程: 麦芽汁斜面 28°C , 3 天 \rightarrow 10ml 麦芽汁液体 25°C , 1 天 \rightarrow 100 ml 麦芽汁液体 22°C , 1 天 \rightarrow 1000ml 麦芽汁液

体 20°C , 1 天 \rightarrow 10L 卡氏罐 18°C , 2 天 \rightarrow 2 吨罐 15°C , 3 天 \rightarrow 10 吨罐 12°C , 2 天 \rightarrow 60 吨罐发酵罐(零代) \rightarrow 进入 12°C 正常发酵。

4. 发酵

(1) 麦芽汁: 分四批进入发酵罐, 每批约 32 吨。入罐温度: $6-8^{\circ}\text{C}$ 。浓度: 因生产安排的需要, 第 1 代酵母发酵采用 12°Bx 麦芽汁, 其它各代均采用 11°Bx 麦芽汁。

(2) 酵母接种量: 约 1.5×10^7 个/ml。

(3) 酵母接种方法: 0—6 代连续使用, 不做洗涤处理, 故 1—6 代以酵母泥接种, 酵母泥未做任何处理。

(4) 发酵温度: 1 代酵母用 10°C , 其它各代均用 12°C 。

(5) 双乙酰还原: 于 12°C 的温度及 $0.12-0.14\text{MPa}$ 的压力下进行。

(6) 贮酒: 0— 1°C 保温一周左右。

5. 滤酒: 发酵液用硅藻土过滤, 滤酒的浊度要求小于 $0.25-0.35\text{EBC}$ 浊度单位。

本工作得到徐浩教授的关怀与帮助, 特此致谢。

结 果

1. 融合株 MWF29 的生产性能

(1) 麦芽汁进发酵罐的各参数控制见表1。麦芽汁分四批从不同的糖化锅进入发酵罐。温度逐步上升,通氧时间一致。

表1 麦芽进罐情况

糖化号	麦汁数量 (t)	温度(°C)	通氧时间 (min)	进罐时间
928	32.7	6	10	9:20—10:30
929	31.5	7	10	13:10—14:00
930	32.6	8	10	17:00—18:00
931	18.0	9	10	20:00—21:45

(2) 酵母接种:以三代酵母泥为种子,取500升直接进罐,满罐后计数,酵母细胞浓度为 1.3×10^7 个/ml。

(3) 发酵工艺:发酵过程中,通过对发酵温度、麦芽汁糖度、压力、双乙酰的变化以及对其中某些因子的控制,可以看到接种酵母一天后,自然升温至发酵温度12°C,维持5—6天至双乙酰还原到要求值,迅速降温。糖降速度很快,不到3天便降到3.7°Bx,然后升压以还原双乙酰,于接种的第七天,双乙酰降到0.08ppm,继续降温,然后保持在0—1°C使之成熟(图1)。

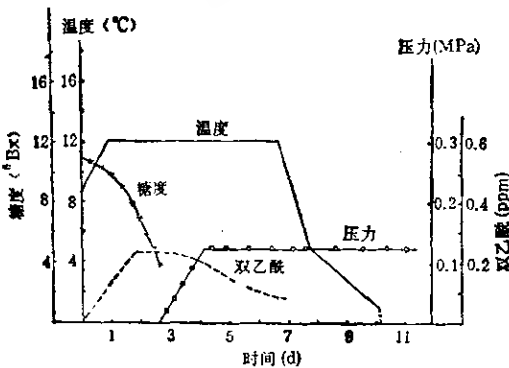


图1 MWF29 菌株的发酵工艺曲线

(4) 啤酒过滤:发酵完毕,立即直接进行过滤,参数值见表2。

(5) 麦芽汁的极限发酵度及其与成品啤酒发酵度的比较:根据表3所列四批麦芽汁的

表2 过滤

流量 (t/h)	20--28
硅藻土用量 (kg/t)	0.96—1.3
滴酒浊度 (EBC)	0.25—0.35

发酵度等数据,计算出大罐混合麦芽汁的极限发酵度是66.05%,而啤酒的发酵度是65.7%,二者仅相差0.35%,表明此菌的发酵力很强。

表3 成品啤酒发酵度与麦芽极限发酵度比较

糖化号	麦汁浓度 (%)	极限发酵液真浓 (%)	麦汁数量 (l)	极限发酵度 (%)
928	11.027	3.705	32700	66.4
929	11.100	3.719	32500	66.5
930	11.027	3.760	32600	65.9
931	10.980	3.876	18000	64.7

2. MWF29 菌株发酵速度和双乙酰还原能力:从连续七罐啤酒发酵生产的情况考察MWF29 酵母的发酵速度和对双乙酰的还原能力,由于工厂生产安排的需要,第一代是用12°Bx 麦芽汁,其它的采用11°Bx,因此第一代数据无比较意义未纳入。

表4 发酵过程中降糖和双乙酰还原情况

酵母代数	糖降至3.8°Bx 所用日数	高峰降糖率 (°Bx/d)	双乙酰降到0.10ppm (d)	发酵周期 (d)
0	2.5	3.0	6	16
2	3.8	3.2	7	17
3	3.0	3.9	3	14
4	2.8	3.0	6	16
5	2.2	3.3	8	17
6	2.8	3.1	7	17
$\bar{x} \pm SD$	2.82 ± 0.60	3.12 ± 0.13	6.8 ± 0.84	16.6 ± 0.55

从表4可见,MWF29 发酵中降糖速度和双乙酰还原速度都很快,一般在发酵第二天糖降到3.8°Bx,第6—7天双乙酰降到0.10ppm以下,高峰降糖率为3.1°Bx左右。

3. MWF29 菌株在大罐发酵中的增殖和凝集性能

(1) 发酵液中酵母数量变化:以第四代酵母为例:在接种后1—6天的细胞数目分别为13,36,59,31,15,9.5 $\times 10^6$ 个/ml,滤酒前降到

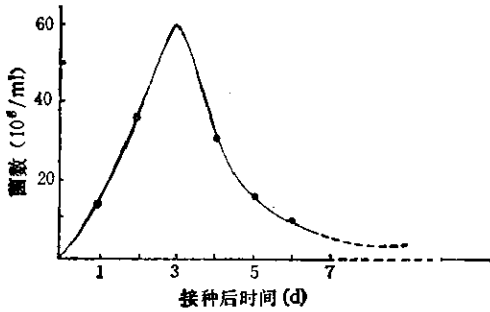


图2 第4代酵母大罐发酵生长曲线图

4×10^6 个/ml,其生长曲线见图2。

(2) 酵母菌体的凝集性测定:从测定发酵末期菌体凝集的本斯值,细胞的自然沉降率,以及最后滤酒中硅藻土用量三方面来衡量该菌株的凝集性能。各代酵母的本斯值都在1.2ml以上,沉降率大于90%(见表5),凝集性能很好,因此不需经过离心。直接进行过滤的硅藻土用量也比较低,可比原来节约0.2—0.4kg/t酒。

4. 成品酒的理化指标分析:从6罐数据看,

表5 0—6代酵母的凝集性能

酵母代数	本斯值(ml)	细胞自身沉降率(%)	过滤硅藻土用量(kg/t)
0	1.2	95.2	混滤
1	1.5	91.3	1.07
2	1.5	94.9	0.8
3	1.4	95.3	0.94
4	1.4	93.2	1.02
5	1.3	93.5	0.99
6	1.4	93.2	1.05

真正发酵度在64.60—68.54%之间,双乙酰为0.04—0.07ppm,泡沫性能很好,持泡时间普遍在4分钟以上,CO₂量大部分在0.5(% w/w)以上。

关于啤酒的口味,经专家品尝认为:酒液清亮透明有光泽,色泽淡黄漂亮,起泡性好,泡沫洁白细腻,挂杯持久,酒花香气尚明显,口味纯正、爽口,CO₂气足、杀口性好,有醇厚感,微有酵母味(见表6)。

表6 0—6代发酵成品酒理化指标

酵母代数	0	1	2	3	4	5	6
持泡性	4'19"	4'39"	4'26"	4'12"	4'6"	4'16"	5'4"
泡沫高度(cm)	6.5	8.0	9.0	8.05	7.5	8.0	8.0
外浓(%)	1.795	1.948	1.846	2.636	2.152	1.923	1.897
真浓(%)	3.624	3.851	3.548	4.228	3.800	3.548	3.573
原麦汁浓度(%)	10.90	12.24	11.15	11.03	11.07	10.89	10.95
外观发酵度(%)	83.53	84.08	83.44	76.10	80.60	82.24	82.68
真正发酵度(%)	66.75	68.54	68.18	61.17	65.70	67.27	67.37
双乙酰(ppm)	0.06	0.04	0.07	0.12	0.07	0.04	0.05
CO ₂ (% w/w)	0.44	0.54	0.51	0.45	0.54	0.57	0.59
酒精(w%)	3.730	4.375	3.905	3.490	3.730	3.610	3.785
pH	4.50	4.41	4.24	4.17	4.25	4.42	4.32
总酸(ml)	2.03	2.34	1.97	1.99	2.56	1.78	2.13
色度(EBC)	7.25	7.25	7.25	7.25	7.50	7.25	7.25

综上所述,经过在啤酒厂0—6代大罐发酵生产的一系列数据证明,酵母融合株MWF29是一株发酵力强,生产周期短,凝聚性能好,酵母容易回收处理,产品双乙酰含量低,外观好,口味纯正,性能稳定的优良生产菌株。说明用线粒体DNA突变标记和融合的方法^[5],是改进已丧失孢子能力的酵母生产菌株性状的有效途径之一。

参 考 文 献

1. 江慧修等:微生物学报(待发表)。
2. Helm E et al.: Wallerstein Laboratory Communications, 16: 315, 1953.
3. 中华人民共和国轻工业部部颁标准(QB936—84),1984。
4. 管敦仪等:啤酒工业手册(中),轻工业出版社,北京,213—215,1982。
5. Halfmann H J et al.: Arch. Microbiol., 134: 1—4, 1983.