

文章编号: 1001-3806(2005)05-0541-02

He-Ne 激光诱变选育双乙酰生成量低的啤酒酵母

张智维, 王 旭, 刘金平

(陕西科技大学 生命科学与工程学院, 咸阳 712081)

摘要: 为了在发酵过程中减少双乙酰的产生, 防止成品啤酒中双乙酰反弹, 利用激光诱变育种技术, 选育双乙酰生成量低的啤酒酵母, 可解决双乙酰问题。用 He-Ne 激光作为诱变光源, 照射啤酒酵母细胞, 在合适的时间和剂量下, 得到一株优良菌株。用该菌株酿造的啤酒, 其双乙酰值为 0.1253 mg/L, 比原菌株下降了 30%。

关键词: 双乙酰; He-Ne 激光; 激光诱变; 啤酒酵母

中图分类号: TS262.5; Q434.19 **文献标识码:** A

Study on breeding diacetyl-less saccharomyces cereveseae by laser induced mutation

ZHANG Zhi-wei, WANG Xu, LIU Jin-ping

(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xianyang 712081, China)

Abstract: It's an important task to reduce the produce of the diacetyl during the beer's fermentation and prevent the reforming of diacetyl in ended beer. It is an effective method to the question of diacetyl to breed the diacetyl-less saccharomyces cereveseae by using the technology of laser induced mutation. In proper time and dosage, irradiating saccharomyces cereveseae with He-Ne laser as an induced mutation illuminant, can obtain a strain of diacetyl-less saccharomyces cereveseae. When the beer is made with this strain, the amount of diacetyl is 0.1253 mg/L, 30% less than before.

Key words: diacetyl; He-Ne laser; laser induced mutation; saccharomyces cereveseae

引 言

啤酒因营养丰富、酒精含量低、易为人体吸收等特点而越来越受到消费者的青睐。随着人们生活水平的不断提高, 风味问题也逐渐成为消费者关注的焦点。啤酒的风味物质主要由挥发性酯类、醇类、醛类以及含硫化合物组成, 起重要作用的是连二酮, 包括 2, 3-戊二酮和双乙酰。双乙酰与乙醛、硫化氢是啤酒的风味物质, 使啤酒呈现出独特的味道, 对啤酒风味起主要作用的是双乙酰^[1]。它在啤酒发酵过程中产生, 是啤酒酵母代谢的主要副产物, 其含量高低是啤酒成熟与否的重要标志。由于双乙酰的口味阈值很低 (0.02 mg/L ~ 0.10 mg/L), 当它在啤酒中浓度超过 0.15 mg/L 时, 就会产生一种令人不愉快的馊饭味, 严重影响啤酒的风味和质量^[2]。在啤酒生产的传统工艺中, 发酵温度低、周期长, 并不需要考虑太多双乙酰的问题, 但随着新工艺、新技术的飞速发展, 目前不少厂家均采用露天高温发酵, 而且生产周期缩短, 啤酒自身还原能力降低, 双

乙酰问题就显得更为突出。因此, 发酵过程中减少双乙酰的产生从而缩短发酵周期, 防止成品啤酒中双乙酰反弹, 成为啤酒生产工业的重要课题之一。

激光是一种量子流, 可以通过产生光、电、热、压力和电磁效应的综合作用, 直接或间接地影响酵母菌引起细胞 DNA 或 RNA 改变, 导致酶的激活或钝化, 进而引起细胞分裂和细胞代谢活动的改变^[3]。啤酒酵母是啤酒工业的重要生产菌种, 其优劣直接关系到啤酒质量的高低。本研究选用 He-Ne 激光作为诱变光源, 对原始酵母菌株进行处理, 发酵后检测发酵液中双乙酰的含量, 选育出双乙酰生成量低的酵母菌株, 希望能应用于啤酒工业, 为生产实践服务。

1 材料、设备和方法

1.1 材料

材料包括啤酒酵母 1, 由陕西科技大学生命科学与工程学院微生物室提供; 麦芽汁, 由蓝马啤酒厂提供; 0.1% 和 1% 的美蓝染色液; 有机硅消泡剂; 4 mol/L 盐酸; 1% 邻苯二胺; 血球记数板; 移液管、接种针及培养皿等。

1.2 设备

设备有 752 型紫外光栅分光光度计; HJ-1B He-Ne

作者简介: 张智维 (1967-), 女, 硕士, 工程师, 现主要从事生物工程专业微生物发酵工程方面的教学和科研工作。

E-mail: zzw409@sina.com

收稿日期: 2004-05-17; 收到修改稿日期: 2004-09-02

激光器;LS-C50L型立式压力蒸气灭菌锅;YJ型医用无菌操作台;PYX-DHS-50×65型隔水式电热恒温培养箱;带有蒸气套管的双乙酰蒸馏器及XS2-3C生物显微镜。

1.3 方法

(1)用啤酒酵母 1 进行啤酒发酵^[4],将活化好的啤酒酵母 1 接种于麦芽汁中,11℃发酵 7d。

(2)出发菌株啤酒酵母 1 双乙酰含量的测定,按 GB4928-91 测定。

(3)激光照射,采用滤纸片^[5]法。

(4)酵母菌细胞数的测定,用稀释平板法进行记数^[6]。

(5)乙醇含量的测定,用比重法^[7]测定。

(6)诱变后酵母双乙酰含量的测定。

(7)筛选双乙酰生成量低的酵母菌株。

(8)考察酵母菌株的遗传稳定性。

2 结果与讨论

用啤酒酵母 1 发酵的啤酒,双乙酰含量为 0.1793 mg/L,这个值偏高,所以将啤酒酵母 1 确定为激光诱变的出发菌株。激光诱变啤酒酵母,可引起酵母菌以下几方面生物特性的改变。

(1)激光照射后啤酒酵母的乙醇含量变化见表 1。由表 1 可以看出,照射 10min 时,产酒精量最高,以后

Table 1 The change of alcohol content irradiating with He-Ne laser

irradiate time/min	5	10	15	20	30	40	60	80	CK
alcohol content/%	8.8	9.5	8.8	8.5	8.3	7.6	6.4	6.6	8.3
increase/descend	+0.5	+1.2	+0.5	+0.2	+0.0	-0.7	-1.9	-1.7	0.0
change ratio/%	+6.0	+14.5	+6.0	+2.4	+0.0	-8.4	-22.9	-20.5	0.0

缓慢降低,说明激光对酵母菌乙醇代谢有刺激作用。这可能是激光对啤酒酵母细胞内的乙醇脱氢酶的生理活性有直接影响。激光通过对酵母菌细胞内一些生理代谢相关的蛋白质或酶的作用(激活或钝化),从而影响酵母菌细胞的正常生理代谢^[8]。

(2)激光照射对菌落形态的影响,对照组平板上菌落大小均一,记数平板上出现了大小不均一的菌落,明显区别于对照组的菌落特征。这可能是激光照射对酵母菌产生了诱变效果,出现了诱变株。由于激光的照射,酵母菌细胞内先产生了某些自由基(如氢氧自由基、氢自由基等),而这些自由基都不稳定,很容易形成具有氧化效应的过氧类物质,它们可以对酵母菌细胞内 DNA 分子上的碱基结构发生改变,也有可能造成 DNA 分子的断裂,最终导致基因的突变^[9]和诱变株的产生。

(3)激光照射啤酒酵母,酵母的存活率随着时间的增加有所变化。酵母的存活率见图 1。

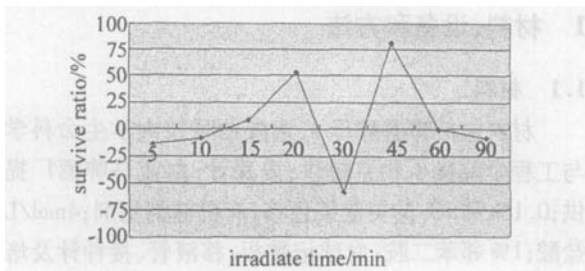


Fig 1 The relation figure between irradiate time and survive ratio

从图 1 可以看出,激光照射对酵母菌的存活率有较大的影响。照射刚开始时,细胞的存活率有所下降,可能是细胞对激光环境不适应造成的。随着时间的延

长,细胞内积累的激光剂量增大,温度增加,达到细胞生长的最适温度,表现在存活率上就是有所增加,到 20min 时,达到 52.8%。20min 后,温度超过最适温度后,细胞开始自溶,自溶物不仅给细胞提供了充足的养分,还可以吸收过量的激光,使温度降低到细胞的最适生长温度,细胞大量繁殖,存活率到在 45min 时达到最高为 80%,以后逐渐降低。细胞存活率的变化并非与激光功率密度和照射剂量成直线关系。一般说来,激光波长和功率密度确定后,细胞增殖有一最佳照射剂量。即对激光种类和功率的选择,是本实验的关键。

通过激光诱变啤酒酵母 1 得到一株双乙酰含量为 0.1253mg/L 的啤酒酵母 2。啤酒酵母 2 比啤酒酵母 1 的双乙酰值下降了 30%。如果再对啤酒酵母 2 继续诱变,双乙酰值可能还会下降。

通过对筛选到的啤酒酵母 2 进行了 7 次啤酒发酵实验,其遗传稳定性还是比较好的。这个结果进一步证明了激光诱变生物细胞后,诱变性状能稳定遗传的特点。

在双乙酰含量的测定过程中,一定要注意温度和蒸馏时间,尽量减少实验误差。

3 结论

激光作为一种新型诱变剂,具有能量密度高、比较集中、单色性和方向性好、诱变当代即可出现遗传性突变^[10]、诱变效果明显、正变率较传统理化因子要高得多等特点,它可诱发染色体畸变,造成 DNA 分子的损伤与改变,从而造成细胞遗传物质结构的改变,因而是

(下转第 557 页)

束近场调制没有明显的变化。在光束近场图像中,由 CSG 光栅引入的调制增加主要是周期性分布的细微条纹,相对于光束本身的调制来说,由光栅带来的调制属于很细微的小量调制,没有明显的增加。在激光器的实际运行过程中,一般可以接受的光束调制增加为百分之几的量级,另外,人们更关心在高功率密度条件下,光路中加入衍射光学元件后光束近场的变化情况,这一物理问题还需要进一步深入研究。

感谢中物院激光聚变研究中心的陈波、刘华,星光 II 运行组的邓武、蒋东镇、徐冰、王方,光学元件检验组的蒋晓东、任寰等同志的大力支持。

参 考 文 献

- [1] BETT T H, SMITH I C. Diffractive beam samplers for large aperture beam diagnostics [J]. SPIE, 1999, 3492: 445~452.
- [2] BRITTE J A. Low efficiency gratings for 3rd harmonic diagnostics application [J]. SPIE, 1997, 2633: 121~128.
- [3] BRITTE J A, HERMAN S M, SUMMERS L J *et al* Manufacture optical performance and laser damage characteristics of diffractive optics for the national ignition facility [J]. SPIE, 1998, 3578: 337~340.
- [4] DIXIT S N, RUSHFORD M C, THOMAS I M *et al* Color separation gratings for diverting the unconverted light away from the NIF targets [J]. SPIE, 1996, 3047: 463~470.
- [5] BARTON I M, BLAIR P, WADDIE A J *et al* Beam-shaping diffractive optical elements for high-power solid-state laser systems [J] SPIE, 1998, 3492: 437~444.
- [6] TOUZET B, FLAMAND J, THEVENON A *et al* Focusing transmission gratings for high energy lasers [J]. SPIE, 1998, 3492: 426~436.
- [7] 柴立群, 杨李茗, 许 乔. 用于 ICF 驱动器的取样光栅的矢量分析与计算 [J]. 强激光与粒子束, 2002, 14(2): 270~274.
- [8] 王成程, 马 驰, 郑万国 *et al* 70mm × 70mm 取样光栅性能测试研究 [J]. 光学与光电技术, 2004, 2(5): 27~30.
- [9] 袁 静, 魏晓峰, 郭永康 *et al* 用于 ICF 驱动器的色分离相位光栅的研究 [J]. 激光技术, 1999, 23(3): 168~172.
- [10] 管敦仪. 啤酒工业手册 (修订版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 373~376.
- [11] 彭智辉, 林炜铁, 冯杰龙. 酶共催化降低啤酒中双乙酰含量的研究设想 [J]. 酿酒科技, 2001, 1: 66~67.
- [12] 胡卫红, 陈有为, 李绍兰 *et al* CO₂ 激光辐照对酿酒酵母的诱变作用 [J]. 微生物学通报, 2000, 27(1): 36~38.
- [13] 杜连祥. 工业微生物实验技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992. 135~136.
- [14] 李俊刚, 方善康. 激光诱变黑曲霉原生质体的研究 [J]. 微生物学通报, 1993, 20(1): 213~215.
- [15] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 64~72.
- [16] 四院合编. 工业发酵分析 [M]. 北京: 轻工业出版社, 1986. 137.
- [17] 胡卫红, 陈 屹, 张云孙 *et al* He-Ne 激光辐照酵母菌的生物效应 [J]. 应用激光, 2001, 21(1): 23~26.
- [18] 鲍淑兰. 激光对酵母菌诱变效应的研究 [J]. 应用激光, 2000, 20(3): 134~144.
- [19] 王立秋, 杨国忠, 陈风德. 激光诱变的生物学效应及其在动植物遗传育种上的应用 [J]. 激光生物学报, 1997, 6(2): 1097~1102.

(上接第 542 页)

一种在微生物遗传育种领域中极有应用前景的新型诱变因子。通过做同工酶谱分析,可以证实。用 He-Ne 激光诱变酵母菌,可以获双乙酰生成量低的啤酒酵母,并且其遗传稳定性较好。He-Ne 激光不仅是酵母菌诱变育种的优良诱变剂,也可以广泛应用于细菌、霉菌、担子菌等微生物育种中,随着对激光诱变机理认识的不断深入,激光诱变会逐渐被科技工作者所使用,会出现更多更好的优良菌种,提高生产效率,使人们的生活得到大力改善。

参 考 文 献