

选育抗老化啤酒酵母提高啤酒风味稳定性的研究

李 崎^{1,2*} 潘学启³ 顾国贤¹

¹(江南大学生物工程学院酿酒科学系,无锡 214036)

²(江南大学工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214036)

³(青岛啤酒股份有限公司科研中心,青岛 266100)

摘 要 对一株啤酒酵母青②进行紫外线诱变,在蛋氨酸浓度为 15 g/L 的耐性平板上筛选获得一株 A₂₇ 菌株。为使 A₂₇ 菌株的蛋氨酸耐性特征稳定遗传,在 11℃、稀释率为 0.035h⁻¹ 的条件下对 A₂₇ 菌株进行高浓度蛋氨酸(20 g/L)连续驯养,然后分离得到一株 M₄¹ 菌。在锥形瓶中连续发酵 5 代后,与 A₂₇ 菌株相比,M₄¹ 菌株发酵液中 GSH 浓度高 44%,TBA 值低 24%,主醇液 RSV 值高 77%,且遗传稳定性明显提高:连续传代 5 次后,M₄¹ 菌株胞内 GSH 含量基本不变,而 A₂₇ 菌则下降了 22%。在相同的糖化和发酵工艺条件下,对优选株 M₄¹ 和出发株啤酒酵母青②进行 1 m³ 发酵罐中试。与出发株青②相比,两者的总高级醇与酯量几乎不变,常规指标没有显著差别,品尝风味也基本一致。但 M₄¹ 菌株发酵液中 GSH 浓度提高了 30%,TBA 值降低了 19%,成品啤酒的 RSV 值则提高了 92%,表明优选株 M₄¹ 是一株具有抗老化能力的优良啤酒酵母,能够提高啤酒的风味稳定性。

关键词 啤酒酵母,抗老化,蛋氨酸耐性,连续驯养,谷胱甘肽,羰基化合物,啤酒风味稳定性

中图分类号 TQ926 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0912-06

风味稳定性作为啤酒的重要质量指标之一,从 20 世纪 70 年代开始就受到国外学者的关注^[1,2]。近十年来,我国啤酒界也开始注意啤酒风味稳定性对啤酒质量的影响^[3]。啤酒酵母是影响啤酒风味稳定性最重要的因素之一,主要是因为酵母在啤酒发酵过程中会产生许多羰基化合物,而这类物质被认为是啤酒产生老化味的物质或前驱物质,不利于啤酒风味稳定性的保持^[4,5]。啤酒酵母也会产生一些具有抗老化功能的还原性物质,如还原型谷胱甘肽(GSH)和亚硫酸盐等。显然,如能筛选得到低产羰基化合物而高产还原性物质(如 GSH)的抗老化啤酒酵母,对于从根本上提高啤酒的风味稳定性具有重要意义。然而,迄今为止,这方面的研究工作在国内外尚未见报道。

已经发现,用诱变剂处理酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[6]或产脲假丝酵母(*Candida utilis*)^[7]并筛选蛋氨酸或蛋氨酸结构类似物耐性突变株,可使胞内 GSH 积累量大幅度提高。据此,作者对一株青岛啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)青②进行紫外线(UV)诱变,筛选蛋氨酸耐性菌株,

进而利用高浓度蛋氨酸连续驯养,获得了一株羰基化合物产生减少而 GSH 合成能力提高的抗老化啤酒酵母菌株 M₄¹。1 m³ 罐中试发酵结果表明,由改良菌株 M₄¹ 酿制的成品啤酒的风味稳定性明显提高,风味基本保持不变。

1 材料与方 法

1.1 菌种

青岛啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)青②,是前期研究以青岛啤酒酵母 C-03 为出发菌株选育得到的低产双乙酰啤酒酵母^[8]。

1.2 培养基

1.2.1 麦汁培养基:采用青岛啤酒厂生产工艺,辅料比为 24%,酒花添加量为 0.8 g/L^[8]。

1.2.2 DL-蛋氨酸耐性培养基(g/L):葡萄糖 50;蛋白胨 10;酵母膏 10。DL-蛋氨酸无菌过滤后按一定浓度添加。

1.3 实验方法

1.3.1 UV 诱变和蛋氨酸耐性菌株的分离及筛选:

收稿日期:2004-04-15,修回日期:2004-07-18。

基金项目:国家经贸委项目及江苏省“十五”科技攻关项目基金资助(国经贸技[1996]810号, No. BE2002019)。

* 通讯作者。 Tel: 86-510-5805219; Fax: 86-510-5805219; E-mail: liqi@sytu.edu.cn

酵母细胞悬液在 15 W 紫外灯下 30 cm 处照射一定时间后,接入新鲜麦汁培养基中,于暗处 25℃ 中间培养 12 h 后,稀释涂布蛋氨酸耐性平板,25℃ 下培养 3 d,随机挑取耐性平板上的菌落至麦汁斜面培养基上保藏待用。

1.3.2 低温发酵:斜面菌种经扩培后,接种于含有 300 mL 麦汁的锥形瓶中,于 11℃ 低温培养箱中进行主发酵,发酵 5~6 d 后,主发酵结束,测定各项理化指标。

1.3.3 蛋氨酸连续驯养:酵母扩培以后,控制一定细胞密度,倒入 100 mL 无菌层析柱中,从柱底部以一定的稀释率连续泵入蛋氨酸耐性培养基。系统稳定运行 10 d 后,取柱中发酵液分离、筛选。驯养温度根据实验要求定。

1.4 分析方法

1.4.1 发酵液中 GSH 浓度:DTNB-谷胱甘肽还原酶循环法^[9]。

1.4.2 酵母胞内 GSH 含量:酵母细胞用蒸馏水洗涤 2 次后,在浓度为 40% (V/V) 的乙醇溶液中 30℃ 下振荡抽提 2 h,测定上清液 GSH 浓度,除以相应细胞干重得到胞内 GSH 含量。

1.4.3 酵母细胞中 GSH 合成酶系活性:称取 1 g 洗涤后的酵母细胞泥,用 2.5 mL 0.15 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 悬浮,超声波破碎 8 min (冰浴;工作 1 s,停 2 s),4℃、10 000 r/min 下离心 10 min 得到无细胞提取液 (CFE)。将 100 μL 谷氨酸、100 μL 甘氨酸、40 μL 半胱氨酸、60 μL ATP、100 μL 二硫苏糖醇、100 μL KCl、100 μL MgCl₂ (以上物质用 0.15 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 配制,浓度均为 0.1 mol/L)、200 μL 0.15 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 混合后,加入 200 μL CFE,37℃ 反应 15 min 后,95℃ 2 min 灭活。10 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定 GSH 浓度。对照为混合体系中加入灭活的 CFE。上述条件下,每分钟产生 1 μmol GSH 的酶量定义为一个酶活单位。

1.4.4 羰基化合物含量 (TBA 值):用以二烯醛类为代表的羰基化合物浓度来表征啤酒或麦汁中老化物质的含量^[10]。取 5 mL 经 10 000 r/min 离心的麦汁或啤酒样品,加入 2 mL 含 3.3 g/L 硫代巴比妥酸 (TBA) 的 50% 乙酸溶液,充分混合 (空白为 5 mL 离心后麦汁或啤酒样品加 2 mL 蒸馏水),于 60℃ 水浴中加热 60 min,冰浴冷却,530 nm 下比色,以吸光度表示 TBA 值。

1.4.5 啤酒风味保鲜期的预测:取同一批次的 5 瓶啤酒,其中 1 瓶对照样品置于冰箱中保存,另 4 瓶置

于 60℃ 水浴中陈化,每 12 h 取出 1 瓶陈化啤酒放于冰箱中保存。待 4 个样品全部陈化好后,同 1.4.4 操作,以对照为空白,530 nm 下测定不同陈化时间下样品的吸光度,即为 ΔTBA_t 值。风味保鲜程度 (resistance staling value, RSV) 以下式表示^[11]:

$$RSV = \frac{1}{4} \times \left(\frac{12}{\Delta TBA_{12}} + \frac{24}{\Delta TBA_{24}} + \frac{36}{\Delta TBA_{36}} + \frac{48}{\Delta TBA_{48}} \right)$$

不同新鲜啤酒样品的 RSV 值与啤酒的风味保鲜期基本呈线性关系。

1.4.6 双乙酰、细胞大小、麦汁浓度、酒精浓度、总多酚、发酵度等常规参数:见文献[12]。

2 结果与讨论

2.1 UV 诱变

前期研究表明^[8],要在保持啤酒风味基本不变的前提下对啤酒酵母进行改良,UV 诱变较为适宜。通过研究不同诱变剂量、细胞致死率与细胞正突变率之间的关系,作者选择 UV 照射 60 s 的剂量对出发菌株进行诱变,相应的细胞致死率为 85%。

用蛋氨酸耐性作为筛选突变株的依据是:GSH 的生物合成包括两个反应:L-谷氨酸和 L-半胱氨酸在 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶 (GSH I) 的催化下生成 γ-谷氨酰半胱氨酸;后者与甘氨酸在谷胱甘肽合成酶 (GSH II) 的催化下生成 GSH。其中 GSH I 的活性受 GSH 反馈抑制,是 GSH 生物合成的限速步骤。蛋氨酸是 GSH 的结构类似物。选育蛋氨酸耐性菌株,有可能使 GSH I 对 GSH 脱敏,使反馈抑制得以解除,进而提高 GSH 合成能力。

2.2 蛋氨酸耐性菌株的筛选和发酵试验

2.2.1 蛋氨酸耐性浓度的确定:实验发现,当蛋氨酸的添加浓度达到 12 g/L 时,酵母生长受到明显抑制;当浓度达到 15 g/L 时,酵母生长被完全抑制 (详细数据略)。故选择 15 g/L 的蛋氨酸浓度作为耐性浓度进行筛选。

2.2.2 蛋氨酸耐性菌株的筛选:UV 诱变后,在蛋氨酸耐性平板上随机挑选出 180 个菌落,分别进行细胞大小的测定。47.5% 的菌株细胞大小与出发菌株啤酒酵母青②相差不多,25% 的菌株比啤酒酵母青②的个体大一些,而 27.5% 的细胞大小则小于啤酒酵母青②。由于现代啤酒酿造业越来越喜爱选用细胞个体小的啤酒酵母,作者选择个体偏小的 48 株菌进行低温发酵试验。与出发株啤酒酵母青②相比,这 48 株菌中,50% 的菌株 TBA 值降低,54% 的菌株 GSH 产量提高,而 RSV 值有所提高的菌株占 42%。

选取综合性能较好的 6 株菌株复筛,结果见表 1。其中 A₂₇ 菌的综合性能最佳,故用于后续筛选工作。

表 1 复筛菌株的低温发酵结果¹

Table 1 Fermentation results of the strains obtained from the second screen¹

Strain	Parent	A ₂₁	A ₂₃	A ₂₄	A ₂₆	A ₂₇	A ₃₄
TBA value	0.30	0.287	0.285	0.256	0.297	0.257	0.29
GSH concentration/(mg/L)	43.4	45.3	50.2	45.1	45.6	51.9	45.6
Apparent fermentation degree/%	59.8	55.1	54.1	56.9	58.4	56.3	60.1
RSV ²	54.8	55.1	60.8	60.8	61.1	75.0	62.4

¹ Data represent mean value of triplicate samples.

² Unless otherwise specified, RSV was measured after the completion of main fermentation. Due to the presence of oxygen, the RSV measured after the main fermentation was lower than the RSV measured after the final fermentation.

2.3 蛋氨酸的连续驯养

经 UV 诱变处理的细胞回复突变率通常较高。为了使突变株的耐性性状得以稳定,作者采用高浓度蛋氨酸连续驯养的方法来提高突变株的遗传稳定性。由 2.1 节分析可知,只有 GSH I 对 GSH 脱敏的突变株才能在高浓度蛋氨酸培养基中生长,凡是发生回复突变的菌株都不能存活。通过高浓度蛋氨酸连续驯养,有可能富集 GSH 合成性能稳定的突变株。由于突变株都能耐 15 g/L 的蛋氨酸,为增大选择压,连续驯养的蛋氨酸浓度定为 20 g/L。

2.3.1 驯养温度的影响:啤酒酵母的最适生长温度为 25℃,但青岛啤酒一般采用 11℃ 发酵。故作者在稀释率(D)为 0.035 h⁻¹ 的条件下,比较了不同温度对 A₂₇ 菌株连续驯养的影响。驯养 10 d 后,从层析柱中上部的发酵液中各分离出 30 株菌进行低温发酵试验,测定 60 株菌主酵液的 RSV 值、TBA 值和 GSH 含量并进行统计分析,结果示于表 2。可以看出,不同驯养温度对菌株产 GSH 能力影响的差异不显著。但 25℃ 驯养后分离出的菌株,其发酵液的平均 TBA 值高于 11℃ 驯养,平均 RSV 则低于 11℃ 的情况。这可能是因为酵母细胞在 25℃ 下生长代谢

旺盛,羧基化合物或其它老化物质及老化前驱物质的产生能力在 25℃ 连续驯养下得到加强,导致分离得到的菌株发酵液中 TBA 值较高。11℃ 下进行蛋氨酸驯养更为有利,表明只有在接近啤酒生产条件的情况下进行驯养,才能使酵母既具有某些较好的特殊性状,又不会改变其它发酵性能。

表 2 驯养温度对啤酒酵母性能的影响¹

Table 2 Effects of domestication temperature¹

T/℃	11	25
TBA value	0.252 ± 0.082	0.307 ± 0.063
GSH/(mg/L)	55.0 ± 3.8	54.8 ± 4.1
RSV	79.8 ± 2.5	73.2 ± 2.1

¹ Data were expressed as mean ± standard deviation (n = 30)

2.3.2 稀释率对驯养效果的影响:为了考察营养物质流加速率对连续驯养效果的影响,在 11℃ 下研究了稀释率对驯养效果的影响。驯养 10 d 后,从 4 根层析柱中上部的发酵液中各分离出 20 株菌进行低温发酵试验,4 个稀释率下各取 3 株综合指标较好的菌株进行比较,如表 3 所示。

表 3 蛋氨酸连续驯养中稀释率对啤酒酵母的综合影响

Table 3 Effects of dilution rates of continuous methionine domestication

D/(h ⁻¹)	0.035			0.06			0.10			0.14			Control	
Strain	M ₄ ^I	M ₆ ^I	M ₁₃ ^I	M ₂ ^{II}	M ₅ ^{II}	M ₆ ^{II}	M ₃ ^{III}	M ₄ ^{III}	M ₇ ^{III}	M ₂ ^{IV}	M ^{IV}	M ^{IV}	②	A ₂₇
TBA	0.26	0.25	0.25	0.32	0.32	0.34	0.34	0.27	0.27	0.38	0.34	0.37	0.40	0.257
GSH/(mg/L)	62.5	61.5	57.9	66.3	64.7	64.6	59.4	54.9	54.0	62.8	61.1	61.9	43.4	51.9
RSV	85.2	74.4	80.2	69.9	68.6	62.8	61.3	60.4	57.6	66.5	58.9	58.2	54.8	72.0

从表3可知,不同稀释率对柱内细胞产GSH能力没有显著影响。但稀释率越大,从中分离出的菌株的TBA值相对就越高,而RSV值则越低(总体趋势)。这是因为,本研究所采用的连续驯养装置是针对啤酒发酵特点设计的,高径比很大,且进料管较粗,故可近似视为活塞流反应器。该反应器中虽然存在停留时间分布和浓度梯度,但一旦系统进入稳态后,可认为稀释率与柱内细胞的比生长速率近似相等。稀释率增大,意味着细胞的比生长速率增大,代谢加快,结果导致细胞产羰基化合物及其它老化物质的能力加强。鉴于不同稀释率下细胞产GSH

的能力相差不大,作者认为在蛋氨酸连续驯养中仍然以较小的稀释率进行操作为佳。故选择 M_4^1 、 M_6^1 和 M_{13}^1 这3株酵母为较优菌株,进行稳定性试验。

2.4 较优菌株的稳定性试验

啤酒生产一般要求啤酒酵母在5代以内具有较高的稳定性。对蛋氨酸连续驯养后筛选出的3株较优良的酵母菌株及 A_{27} 菌株,在11℃发酵5d,6℃发酵10d的工艺条件下,进行稳定性试验,结果见表4。其中RSV值为成品啤酒测定值,因其中氧含量很低,故该值明显高于表1~3所示的主酵液RSV值。

表4 从连续驯养中分离的三株菌株的稳定性试验

Table 4 Stability test of three strains isolated from continuous domestication

Strain	Final GSH/(mg/L)			Final TBA			RSV of fresh beer		
	1	3	5	1	3	5	1	3	5
A_{27} (control)	52.6	44.3	40.9	0.28	0.31	0.33	158.6	148.1	136.3
M_4^1	58.8	59.1	58.9	0.26	0.24	0.25	244.3	248.8	241.3
M_6^1	50.3	51.4	50.7	0.25	0.32	0.30	244.1	192.9	155.8
M_{13}^1	55.0	55.8	55.1	0.26	0.30	0.30	196.5	177.2	168.0

从表4知,未经蛋氨酸连续驯养的 A_{27} 菌株,连续发酵5代后,发酵液中GSH浓度下降22%;而经过蛋氨酸连续驯养分离得到的 M_4^1 、 M_6^1 和 M_{13}^1 ,接种发酵5代后,发酵液中GSH浓度基本不变。其中 M_4^1 菌株的发酵液TBA值最低,RSV值最高,且遗传稳定性良好,故采用该菌株进行1 m³发酵罐中试。

2.5 M_4^1 菌株抗老化能力提高的酶学依据

2.5.1 诱变及驯养对GSH生物合成酶系的影响:

鉴于GSH合成酶系(GSH I和GSH II)是影响酵母合成GSH的关键因素,因此在主发酵6d后对啤酒酵母青②、 A_{27} 和 M_4^1 三株酵母胞内GSH合成酶系的活性、胞内GSH含量及发酵液中GSH浓度进行了分析(表5)。蛋氨酸耐性菌株 A_{27} 胞内GSH含量虽然比啤酒酵母青②提高1.7倍,但其遗传性状不稳定。经过蛋氨酸连续驯养得到的 M_4^1 菌株,在传代过程中GSH合成酶系活性基本不变,表明该菌株中GSH I对GSH脱敏的性状能够稳定遗传。

2.5.2 优选株 M_4^1 和出发株啤酒酵母青②发酵过程中GSH合成酶系活性及发酵液中GSH浓度的变化:

如图1所示。在发酵过程中,GSH合成酶系的相对活性在发酵第4天达到最大值,而发酵液中的GSH含量则呈现出不断下降的趋势。这可能是由于在发酵过程中,尽管GSH合成酶系的活性不断增加,但

由于老化前驱物质的存在及老化物质的不断产生,GSH被不断消耗,故GSH的净含量呈现不断下降的趋势。在整个发酵过程中,优选株 M_4^1 的GSH合成酶系活性和发酵液中GSH浓度均高于出发菌株啤酒酵母青②。

表5 啤酒酵母青②、 A_{27} 和 M_4^1 菌的GSH合成能力比较

Table 5 Comparison of the GSH biosynthesis of strains ②, A_{27} and M_4^1

Strain	Generation	Specific activity	Intracellular	
		of GSH /(u/g wet cell) ¹	GSH content /(mg/g dry cell)	GSH/(mg/L)
②	1 ^a	198 ± 12	8.3	43.0
	5 ^b	190 ± 15	7.8	44.2
A_{27}	1 ^a	395 ± 21	22.5	53.0
	5 ^b	348 ± 18	17.6	41.5
M_4^1	1 ^a	420 ± 24	23.4	58.0
	5 ^b	414 ± 10	24.8	58.2

¹ Mean ± Stand deviation (n = 3)

2.6 优选菌株 M_4^1 的1 m³发酵罐中试

为了考察优选株 M_4^1 是否适应大生产的要求,

在 1 m³ 发酵罐上对出发株啤酒酵母青②及优选株 M₄ 同时进行中试, 测试 M₄ 菌株在放大试验中的各项发酵性能指标。成品啤酒各项指标见表 6。在糖化及发酵工艺相同的条件下, 与出发菌株啤酒酵母青②相比, 优选株 M₄ 发酵液中 GSH 浓度提高了 30%, TBA 值降低了 19%, 成品啤酒的 RSV 值则提

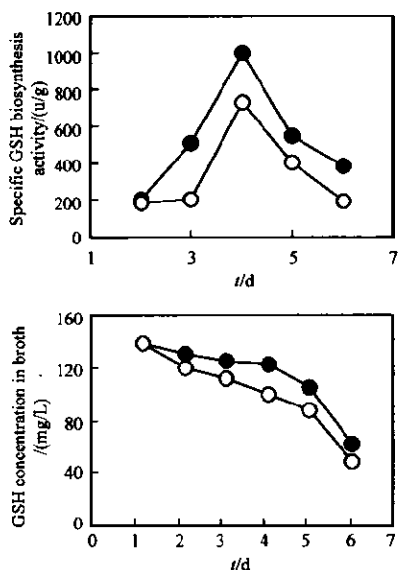


图 1 发酵过程中酵母细胞 GSH 合成酶系相对酶活和 GSH 含量的变化

Fig. 1 Time-course of specific activity of GSH and GSH concentration of strain M₄ (●) and strain ② (○) during fermentation

表 6 1 m³ 发酵罐成品啤酒分析对比结果

Table 6 Analysis of fresh beer brewed by strains ② and M₄ in a 1 m³ fermentor

Parameter	Parent strain ②	Mutant M ₄
Original extract/% (W/W)	11.7	12.0
Ethanol/% (W/W)	3.95	4.15
Fermentation degree/%	65.8	66.7
Color/(E. B. C.)	9.0	8.8
Total polyphenol/(mg/L)	146	149
Diacetyl/(mg/L)	0.08	0.07
TBA value	0.220	0.178
GSH/(mg/L)	45.6	59.1
RSV of fresh beer	125	240

高了 92%, 而常规指标没有显著差别。用 GC/MS 测定啤酒中的高级醇及酯含量, 发现两者总的高级醇酯量几乎不变(数据未给出)。经品尝, 优选株 M₄ 酿制的成品啤酒, 其风味与啤酒酵母青②酵母酿制的啤酒风味基本一致。

试验表明, 经 UV 诱变、蛋氨酸耐性平板筛选和高浓度蛋氨酸连续驯养后获得的 M₄ 菌株是一株遗传性状稳定的优良啤酒酵母。由于该菌株能产生和分泌较多的 GSH, 降低了啤酒中老化前驱物质和老化物质的浓度, 因此提高了啤酒的抗老化能力, 使成品啤酒的风味稳定性得到显著改善。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hashimoto N. *Brewing science*. Bristol: Stonebridge Press, 1981
- [2] Kaneda H. Reducing activity and flavor stability of beer. *Master Brewers Association of the Americas*, 2000, 37:165-171
- [3] Liao W (廖惟), Gu GX (顾国贤), Zhao GA (赵光鳌) et al. A review on beer flavor staling, staling mechanisms and anti-staling. *Brewing (酿酒)*, 1996, 1:1-16
- [4] Lermusieam G. Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. *American Association of Brewing Chemists*, 1999, 57:29-33
- [5] Bamforth CW. Beer quality: oxidation. *Brewers' Guardian*, 2000, 4:31-34
- [6] Kinoshita K, Machida M, Oka S et al. Glutathione manufacture by methionine analog-sensitive yeast mutant. 1986, JP61209583
- [7] Kono G, Harada M, Sugisaki K et al. High glutathione-containing yeast. 1977, JP52125687
- [8] Li Q (李崎), Gu GX (顾国贤), Sun FN (孙芙宁) et al. Breeding of low-diacetyl producing brewers' yeast. *Journal of Wuzi University of Light Industry (无锡轻工大学学报)*, 1997, 16:47-50
- [9] Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and other tissues. *Analysis of Biochemistry*, 1969, 27:502-522
- [10] Kaneda H. Chemical evaluation of beer flavor stability. *Master Brewers Association of the Americas*, 1995, 32:90-94
- [11] Parsons R, Cope R. The assessment and prediction of beer flavor stability. *Proceedings of the congress of the European brewery convention*, Oxford: Information Press, 1983
- [12] Guan DY (管敦义). *Beer Industry Handbook (啤酒工业手册)*. Beijing: China Light Industry Press, 1982

Improvement of Beer Flavor Stability by Screening Anti-staling Brewers' Yeast

LI Qi^{1,2*} PAN Xue-Qi³ GU Guo-Xian¹

¹(Department of Brewing Science, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

²(Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Education Ministry, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

³(Centre of Research and Development, Tsingtao Beer Co. Inc., Tsingdao 266100, China)

Abstract In order to improve the flavor stability of beer, a brewers' yeast mutant, A₂₇, was selected for methionine (15 g/L) resistance after UV mutagenesis. Compared with the parent strain ②, the glutathione concentration in the main fermentation broth of strain A₂₇ increased by 20%, the carbonyl compound content (TBA value) decreased by 14%, and the flavor resistance staling value (RSV value) increased by 37%. To obtain a genetically-stable mutant, the culture of strain A₂₇ was domesticated by continuously feeding a medium supplemented with high concentration of methionine (20 g/L) at a dilution rate of 0.035 h⁻¹ at 11 °C, which lead to the identification of M₄¹. Compared with strain A₂₇, the glutathione content of strain M₄¹ increased by 44%, the TBA value decreased by 24% and the RSV value increased by 77%. To compare the genetic stability, strains M₄¹ and A₂₇ were inoculated into flasks and transferred continuously 5 times. The intracellular glutathione content of strains M₄¹ kept constant while that of strain A₂₇ decreased by 22%. Pilot-scale experiments were carried out in a 1 m³ fermentor, using the same mashing and fermentation conditions. Comparing strain M₄¹ with the original parent strain ②, the concentration of total long-chain alcohol and ester was at a similar level. Furthermore, no significant difference in routine fermentation parameters was found. Most important, flavor test of beer demonstrated that typical Tsingtao beer flavor was kept after the mutagenesis and domestication, while the glutathione content in the finished beer of strain M₄¹ increased by 30%, the TBA value decreased by 19% and the RSV value increased by 92%. All above results demonstrate that strain M₄¹ is an excellent anti-staling brewers' yeast, and therefore has great potential for improvement of the flavor stability of Tsingtao beer.

Key words Brewers' yeast, anti-staling flavor, methionine resistance, continuous domestication, glutathione, carbonyl compound, beer flavor stability

Received: 04-15-2004

This work was supported by Grants from National Economy and Trade Committee (No. [1996]810) and the "Ten-Five" Technologies R&D Program of Jiangsu Province (No. BE2002019).

* Corresponding author. Tel:86-510-5805219; Fax:86-510-5805219; E-mail: liqi@sytu.edu.cn