

PCR 技术检测啤酒中腐败菌的研究进展

张小军¹, 寇晓虹^{1,2}, 郝彦玲³, 罗云波³

(1.山西农业大学食品学院, 山西 太谷 030801; 2.天津大学农业与生物工程学院, 天津 300100; 3.中国农业大学, 北京 100080)

摘要: 对传统方法和 PCR 技术检测啤酒中腐败菌的原理进行了分析和比较, 对传统检测方法更有优势的 PCR 检测技术进行了综述。综合分析了目前国内外 PCR 技术检测的最新研究, 重点讨论了标志性基因(抗酒花基因)和引物设计在 PCR 检测技术中应用, 并对 PCR 技术检测啤酒中腐败菌的应用前景进行了分析。

关键词: 分析检测; 啤酒腐败菌; PCR 技术; 乳酸菌; 短乳杆菌

中图分类号: TS262.5; TS261.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001- 9286(2006)11- 0094- 03

Research Progress in the Determination of Beer Spoilage Bacteria by PCR

ZHANG Xiao-jun¹, KOU Xiao-hong^{1,2}, HAO Yan-lin³ and LUO Yun-bo³

(1. Food College of Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 030801; 2. Agriculture & Bioengineering College of Tianjin University, Tianjin 300100; 3. Chinese Agriculture University, Beijing 100080, China)

Abstract: Both PCR and traditional methods could be used in the determination of beer spoilage bacteria. Their determination mechanism were analyzed and compared. It was concluded that PCR is more advanced than traditional methods. In this paper, PCR was illustrated and the latest research progress in PCR domestically and abroad especially the use of hop-resistant gene and primer design in PCR determination was also discussed. Besides, the application foreground of PCR in the determination of beer spoilage bacteria was analyzed.

Key words: analysis and determination; beer spoilage bacteria; PCR; lactobacillus; L.brevis

啤酒作为一种国际性饮料,几百年来一直被认为是一种安全的饮料,因为它的特殊生产环境很大程度上限制了许多微生物在啤酒中的生长,如高 CO₂、低氧、低 pH、营养成分少,而且还有一定量的乙醇和产生苦味的酒花物质。特别是啤酒花能对绝大多数革兰氏阳性菌有抑制作用。因此控制抗酒花物质的革兰氏阳性菌也就成为控制啤酒腐败菌的关键。这些抗酒花的革兰氏阳性菌大多数是一些乳酸菌。目前,对这些腐败菌的检测主要还是通过从啤酒中分离出腐败菌在平板上厌氧培养,然后通过观察和一些生理生化试验来判定这些腐败菌。这种方法最大的缺点是耗时长,5~7 d 才可以看到结果,不能及时反馈啤酒中微生物污染情况,对实际生产具有很大的滞后性。PCR 技术从分子、基因水平极大地提高了检测效率,具有方便、快捷、省时等优点^[1~5]。目前,美国、日本、加拿大和我国的科研工作者都致力于将 PCR 技术应用于啤酒腐败菌的鉴定和检测。

1 传统检测方法的原理和缺点

1.1 传统检测方法的原理

目前,啤酒腐败菌的检测,特别是啤酒生产企业,大

多数在人工制作培养基上培养。其原理是根据不同腐败菌生长所需的营养成分、最适温度、最适 pH,在其适宜的温度下培养,然后根据不同菌落、细胞特征及一些生理生化特征的鉴定来确定腐败菌的类型。理论上只要在啤酒中有一个腐败菌的细胞,就能在适宜的温度、培养基上大量生长繁殖。然后通过菌落形态、细胞形态、革兰氏染色、过氧化氢酶阳性以及一系列生理生化实验来鉴定这些腐败菌。

1.2 传统检测方法的缺点

尽管目前许多企业仍然在用传统方法检测啤酒中的腐败菌,但传统检测方法有以下几方面的不足。

1.2.1 检测所需要时间长:一般的腐败菌检测至少需要 2~5 d,甚至 7 d 以上。检验结果出来时往往产品已经进入市场,具有严重的滞后性。

1.2.2 操作繁琐,自动化程度不高:传统的检测方法往往需要花费大量的人力。适合不同腐败菌生长的培养基以及不同腐败菌适宜生长的 pH、温度等都需要花费一定的人力和时间,观察菌落特征、细胞特征、革兰氏染色以及生理生化鉴定等步骤较繁琐。而且,研究表明^[6],没有一种培养基适合所有的啤酒腐败菌生长。

基金项目:山西农业大学博士基金资助。

收稿日期:2006-06-07

作者简介:张小军(1980-),男,山西保德人,在读硕士研究生。

通讯作者:寇晓虹(1970-),女,天津市天津大学农业与生物工程学院, E-mail:kouxiaohong@126.com。

1.2.3 检测结果不够准确: 啤酒腐败菌包括一些乳酸菌、醋酸菌和野生酵母等, 特别是一部分乳酸菌具有酒花抗性, 它们是最重要的啤酒腐败菌。几乎所有的乳酸菌都能在啤酒中生长, 但只有一部分乳酸菌才能使啤酒腐败变质。所以用传统的检测方法不能真正准确地检测出啤酒的腐败菌。

2 PCR 技术检测啤酒腐败菌的原理和特点

PCR 技术是由 Kleppe 等人在 1971 年首先提出的。它是通过对人工耗时长或难以培养的微生物的 DNA 或 RNA 片段的扩增来对啤酒中的腐败菌的检测的。首先通过高温变性、低温退火、适温延伸完成对目的基因的扩增阶段, 然后将 PCR 产物通过琼脂凝胶电泳分析。整个过程可在 1 h 内完成^[1]。而且从理论上讲, 只要啤酒中含有一分子的腐败菌的 DNA 或 RNA 片段, 即可在短时间内通过 PCR 技术大量扩增并检测到。所以, PCR 检测技术在啤酒腐败菌的检测中显示出其他方法无法比拟的优点——快速、便捷、准确。

根据 PCR 扩增使用的引物不同。用 PCR 技术检测啤酒中腐败菌的方法大体可归为 3 种类型: 使用特异性引物的 PCR 检测方法; 使用任意引物的 PCR 检测方法; 使用嵌套式引物的 PCR 检测方法^[1]。

3 用特异性引物的 PCR 检测方法

3.1 根据抗酒花基因 horA 设计特异性引物

尽管啤酒中的许多成分对微生物造成很大的抑制作用, 但一些微生物(主要是一些乳酸菌)却仍然能在啤酒中生长繁殖, 并使啤酒产生浑浊、沉淀、异味和双乙酰等腐败现象^[4]。有趣的是这些对革兰氏阳性菌有抑制作用的酒花物质(主要是异- α 酸)对这些乳酸菌却无济于事。因此, 许多学者都致力于抗酒花机理和基因的研究。日本的学者从抗酒花菌株短乳杆菌 ABBC45 的质粒上鉴定得到抗酒花基因 horA, 后经研究发现能引起啤酒腐败的乳杆菌均含有似 horA 的基因^[1]。1997 年, Manabu Sami 等^[7]还发现啤酒腐败菌中这些含有抗酒花基因的质粒拷贝数与酒花抗性大小的增减性是一致的, 这说明 horA 基因与酒花抗性有关。东京大学、加利福尼亚大学的研究者通过设计特异性引物对一系列乳杆菌的 horA 基因扩增进行检测, 已成功地从啤酒中对乳杆菌、干酪乳杆菌、胚芽乳杆菌进行了检测, 且准确性高, 整个 horA-PCR 检测过程大约需 6 h, 比传统的平板培养方法要快得多^[1, 2, 7, 8]。

3.2 根据其他一些与酒花抗性有关的基因设计引物

K.suzuki 等^[7]对啤酒腐败菌的研究发现, 在对完全丧失腐败能力的短乳杆菌 ABBC45^{cc} (是经过短乳杆菌 ABBC45^c 次级培养获得的) 分析发现, 质粒 PRH45 在短乳杆菌 ABBC45^{cc} 中丢失, 随后通过对质粒 PRH45 上的不同区域的片段进行切除, 结果发现啤酒腐败菌缺少 ORF5 的比率相当高, 所以通过对 OFRF5 的序列设计引物来进行 PCR 技术检测啤酒腐败菌也取得了一定效果。最近 Koji Suzuki 和 T.Fujii^[9]通过大量的实验研究

表明, 一些含有 horA 基因的乳杆菌也并不具有腐败能力, 而且他们发现丢失 horA 基因的 L.brevisABBC45- L.brevisABBC45^c 仍然有一定的腐败能力。因此, 他们认为抗酒花机制是由多重基因控制决定的。Koji Suzuki 对 51 株啤酒腐败菌研究, 还发现有两个基因 horB 和 horC 与酒花抗性有关。研究发现通过对 horB/horC 基因的扩增能检出其中的 49 株腐败菌, 且无假阳性的检出。因此, 他们认为 PCR 技术检测通过结合 horA、horB/horC 基因能大大提高啤酒中腐败菌的检测, 同时可避免由 horA 引起的假阳性现象^[1, 2, 7, 9]。

3.3 根据分类鉴定法设计特异性引物

啤酒中腐败菌主要是乳酸菌, 其中主要包括短乳杆菌、有害片球菌、林氏乳杆菌等, 短乳杆菌、有害片球菌是啤酒很有名的腐败菌, 而林氏乳杆菌是到目前为止发现的所有菌株都是啤酒腐败菌^[10]。因此, 有人用分类鉴定的核糖体 RNA 上的基因序列来检测啤酒中的这些腐败菌。加拿大 Labatt 公司的研究人员在啤酒腐败菌的乳酸菌的检测中使用 5S 和 16SrRNA 基因进行 PCR 扩增, 用于菌种的特性鉴定。已成功地对乳杆菌、片球菌、明膜串珠菌属中的菌株做出鉴定。日本的研究者为了提高 PCR 分析的灵敏度和特异性, 根据 16SrRNA 和 23SrRNA 之间的间隔区的特异性序列来设计引物, 用于啤酒腐败菌的 PCR 检测。这种方法比较快捷、方便, 但有时难以将种内一些腐败菌和非腐败菌区分开^[1, 11]。

3.4 利用任意引物的 PCR 检测方法 RAPD-PCR

RAPD-PCR 是使用较短的寡核苷酸引物扩增一群长度不等的 DNA 片段混合物, 这些产物经琼脂糖凝胶电泳呈现出的带型, 反映了用于扩增模板的 DNA 分子的总体结构特征, 所以能够测出 2 个生物体(包括同一物种的不同个体)基因之间的差异。亲缘关系越近的种, PCR 扩增带型就越相似, 反之差异悬殊^[12]。

使用 RAPD-PCR 技术, 所需 DNA 提取物少, 在 10 h 内能检测出啤酒污染的结果, 每一种引物能产生唯一的特异性指纹图谱, 将其对照便得到鉴定结果, 加拿大 LABATT 公司的研究人员运用此技术鉴别啤酒腐败细菌的种和亚种^[1, 12]。

3.5 利用嵌套式引物的 PCR 检测方法 Nest-PCR

Nest-PCR 是利用第一轮 PCR 产物作为第二轮 PCR 扩增的起始原料, 除使用第一轮的一对特异性引物外, 还加一对结合位点处在前 2 个引物之间的新引物。

啤酒中含有大量的酵母, 因此用 PCR 技术检测啤酒中腐败菌时, 酵母会对其形成一定的干扰。使用普通的 PCR 检测腐败菌时, 酵母细胞的存在如果大于 3×10^4 时, 就会干扰细菌的鉴定。如果对样品进行稀释来降低酵母的干扰, 但同样也会降低检测水平。而使用 Nest-PCR 检测腐败菌时, 由于第一轮反应之后增加了靶模板数量, 使第二轮反应的效率明显提高; 由于第一轮反应产物比第一轮反应的模板 DNA 小, 所以在第二轮反应过程 DNA 变性时间缩短, 也使得反应速度加快^[1]。

加拿大 Labatt 公司的研究者通过实验确定和检测用于乳酸菌鉴定的 Nest-PCR 的引物, 实验结果表明,

当酵母和细菌细胞之比为 $1.6 \times 10^4:1$ 时, 凝胶电泳清晰可见^[2]。因此, Nest-PCR 技术提高了在高浓度酵母细胞存在下检测乳酸菌的灵敏性, 使用此技术可鉴定一定浓度的酵母发酵液中含有的微量污染菌, 且仅需要 8 h 即可完成。

Nest-PCR 技术使在发酵结束和酵母回收前 24 h 内完成对污染菌的检测分析成为可能, 从而确保了啤酒生产中微生物的控制。

因此, Nest-PCR 技术检测啤酒腐败菌能提高检测效率, 特别是对含有高浓度酵母细胞的样品的检测。

4 PCR 技术检测啤酒腐败菌的发展趋向

随着分子生物学、光学、免疫学、微生物学、计算机技术的快速发展, 应用 PCR 技术检测啤酒腐败菌也越来越趋向于同其他技术紧密结合应用。

4.1 取样

在取样阶段, 研究者发现, 啤酒中高浓度物质的存在对 PCR 的灵敏度也有一定的影响。当利用膜过滤啤酒富集乳酸菌用于检测时, 实际灵敏度也随过滤啤酒体积增加而降低。而不同啤酒的抑制因子也有所不同。日本学者通过在特异性引物的 PCR 实验 (L.lindner) 中发现使用水样检出限 (63 cfu) 比啤酒的检出限 (9 cfu) 明显低, 这说明啤酒中存在一些抑制因子^[1]。

Di Michele 和 LeWis 进行了大量的实验发现, 用纤维素酯膜过滤, 在丙酮酸中溶解, 积累于膜上的 PCR 抑制因子并没有除去; 采用聚碳酸酯膜, 用十六烷基三甲基溴化铵溶液提取, 仅适用一些含菌量高的样品; 用聚碳酸酯膜过滤, 将膜溶于四氯化碳-异戊醇, 再转入 Eppendorf 管中加水、离心沉淀、取上清液、再加水离心沉淀处理后灵敏度大大提高。日本的学者也用了类似的方法提高了检测限度^[1,2]。

4.2 引物使用

在使用引物方面, 目前尽管研究者已经发现从 *L. brevis* ABBC45 的大小为 15.1 kb 的质粒 pRH45 上分离得到的 *horA* 基因与细菌的抗酒花作用有很大的关系。但也有一些实验表明, 丢失含有 *horA* 基因的质粒 pRH45 的 *L. brevis* ABBC45^c 仍然有一定的抗酒花性, 这说明抗酒花还可能存在其他基因控制^[9]。特别是在对抗酒花菌株质粒 ORF 上的一些核苷酸序列的研究表明^[11] (ORF5 研究比较深入) 其也与抗酒性有很大关系。因此, PCR 技术检测啤酒中腐败菌的设计引物要从单一的特异性引物向多种特异性引物发展。

4.3 其他方面

PCR 技术和其他学科联系越来越紧密, 如酶联免疫 PCR (PCR-ELISA) 法检测, 以及计算机技术的发展使得 PCR 检测技术的自动化程度越来越高, 抗酒花机理的研究进一步清晰, 标志性基因更有代表性, 使得检测效率也越来越高^[13,14]。

用传统的方法来检测啤酒中的腐败菌存在许多问题。因为啤酒腐败菌毕竟是一种弱势菌, 分离困难, 特别是在其污染程度极低的情况下, 且腐败菌活力较低, 传统培养方法就很难检测到。另外, 用选择性培养基分离

腐败菌要抑制啤酒中大量生长的酵母, 常在培养基中加入有毒的放线菌酮, 这样会对人体和环境造成一定的危害。现代啤酒工业的发展, 好氧污染菌已经不是问题了, 主要的腐败菌是兼性厌氧和厌氧菌, 厌氧菌的培养更加增加了培养工作的繁琐。特别是在污染菌细胞数目极其少的情况下, 用传统的检测方法就很难检测到。随着一些如膜过滤等快速集菌方法的发展, PCR 模板获得的方法 (常规法, 冻融法, 煮沸法) 的方便, 使得 PCR 技术对啤酒腐败菌检测, 能在更短的时间内得到更低的检出限。田小群等人的研究表明, PCR 技术对啤酒中的短乳杆菌的最低检出限可达到 3 个细胞^[5]。

当然 PCR 技术检测啤酒腐败菌还存在一些问题, 由于啤酒酿造过程中不同的环境使得各阶段腐败菌的种类和数量有所不同, 所以目前常用 DNA 序列的 PCR 技术检测并不能知道检测到的 DNA 片段是来自活细胞还是死细胞; 而且绝大多数是 PCR 技术局限于对那些核苷酸序列清楚的微生物的检测; 在定性检测的同时定量检测还显得有点不足。我们相信在不久的将来啤酒腐败菌的定量检测也会实现。

参考文献:

- [1] 徐岩, 张丽萍, 顾国贤. 聚合酶链式反应 (PCR) 技术鉴定啤酒腐败菌的最新进展 [J]. 食品与发酵工业, 2001, (5): 71-74.
- [2] 孔庆新, 张惟广. 啤酒生产中腐败微生物鉴定新技术 [J]. 酿酒科技, 2003, 116(2): 26-27.
- [3] 闫雪, 姚卫容, 钱和. 国内外食品微生物快速检测技术应用进展 [J]. 食品科学, 2005, 26(6): 269-271.
- [4] 吴红. 啤酒的微生物检验技术 [J]. 酿酒, 2000, (5): 34-38.
- [5] 田小群, 周世宁. 聚合酶链式反应快速鉴定啤酒有害菌研究 [J]. 微生物学通报, 2006, 3(1).
- [6] L. Jespersen, M. Jakobsen [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, (33): 139-155.
- [7] Manabu samin, Yamashita H., Kadokura H. [J]. J. Am. Soc. Brew., 1997, 55(4): 137-140.
- [8] 李平兰. PCR 技术及其在食品微生物检测中的应用 [J]. 食品科学, 1997, (7): 3-5.
- [9] Koji Suzuki, Kazumaru Iijima, Kazutaka, et al. Isolation of a Hop-Sensitive Variant of *Lactobacillus Lindneri* and Identification of Genetic Markers for Beer Spoilage Ability of Lactic Acid Bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5089-5097.
- [10] Kanta Sakamoto, Wil N. Konings, Beer Spoilage bacteria and Hop Resistance [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89, 105-124.
- [11] K. Suzuki, M. Koyanagi, H. Yamashita [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96: 946-953.
- [12] T. Fujii, K. Nakashima, N. Hayashi. Random Amplified Polymorphic DNA-PCR Based Cloning of Marker to Identify the Beer-spoilage Strains of *Lactobacillus Brevis*, *Pediococcus Damnosus*, *Lactobacillus Collinoides* and *Lactobacillus Coryniformis* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98, 1209-1220.
- [13] Tetsuji Yasui, Tomoyuki Okamoto, Hiroshi Tayachi. Can [J]. J. Microbiol., 1997, 43: 157-163.
- [14] Thomas A Tompkins, Robert Stewart, Louise Savard. [J]. J. Am. Soc. Brew. Chem., 1993, 29(6): 40-41.