

啤酒生产中腐败微生物鉴定新技术

孔庆新 张惟广

(西南农业大学食品科学学院,重庆 荣昌 400716)

摘要: 啤酒生产过程中的污染微生物主要有野生酵母、细菌、放线菌和霉菌四大类。新的快速检测技术有聚合酶链式反应(PCR)技术、伏安型生物传感器、自动微生物检测系统(AMS)、改良MRS培养基和三磷酸腺苷(ATP)法等,较传统方法迅速、准确。(小雨)

关键词: 微生物; 腐败微生物; 检测技术

中图分类号: TS262.5; TQ920.1; TS261.17 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286(2003)02-0026-02

New Identification Techniques of Spoilage Microorganism in Beer Brewing

KONG Qing-xin and ZHANG Wei-guang

(Food Science Academy of Southwest Agriculture University, Rongchang, Chongqing 400761, China)

Abstract: The contaminant microorganism in beer brewing included mainly four categories as wild barm, bacteria, actinomyces and mold. The new rapid determination techniques were polyase chain reaction method (PCR), volt-ampere biosensor method, automatic microbe system method (AMS), improvement of MRS culture medium and ATP etc. Compared with conventional determination methods, the operation of new methods was rapider and more accurate results achieved. (Trans. by YUE Yang)

Key words: microorganism; spoilage microorganism; determination techniques

在啤酒生产过程中,有时会发生有害微生物侵入,造成啤酒的混浊、腐败或口味异常。啤酒生产过程中的污染微生物主要有野生酵母、细菌、放线菌、霉菌四大类^[1]。啤酒腐败微生物可使啤酒产生异味,引起混浊和沉淀,粘度提高,压力升高^[2-4]。因此要查询污染事故发生的原因,必须建立起一套系统、完整的监测鉴定手段。

目前,国内传统对啤酒中腐败微生物鉴定的方法和结果判定技术,如镜检、革兰氏染色法、过氧化氢酶试验、成品啤酒中微生物培养试验、气体产生试验、Api试验等,都不同程度地存在试验周期长、准确性不高、自动化程度低等不利因素。而在实际生产中要求高度灵敏性、快速、低劳动强度和部分或全部自动的检测方法。近10年来,随着计算机、光学分子生物学的发展,国外啤酒工业中大量先进检测腐败微生物的方法也得到发展,如PCR检测技术、AMS等。这些方法迅速、准确,可在短期内对污染菌进行检测^[2]。

1 聚合酶链式反应(PCR)技术^[5]

目前,美国、日本、加拿大以及我国的科研工作者都致力于将PCR技术应用于啤酒腐败菌种的鉴定。与传统方法相比,PCR技术最大的特点是快速、准确,通常在几小时(6~10 h)内便可完成对污染菌的鉴定。需要指出的是,PCR技术仅限于那些核酸序列已知的微生物的鉴定,并且在啤酒腐败菌检测中不能得知所提取的DNA是来自于活细胞还是死细胞,在定性鉴定的同时,定量操作的能力还显得不足^[6]。

PCR技术鉴定啤酒腐败菌的原理:PCR即聚合酶链式反应。依据DNA模板的特性,模仿体内复制的过程,在体外以单链为模板,在人工合成的引物和耐热聚合酶存在的条件下经变性、退火、延伸,大量扩增目的DNA序列。然后通过凝胶电泳技术检测DNA片段

的扩增产物^[7,8]。

1.1 使用一套特异引物的PCR技术

日本的研究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。经研究证明,HORA基因与酒花抗性有关。从而推知具有似HORA基因的乳杆菌可能具有使啤酒腐败的特性。东京大学的科研人员根据HORA基因顺序,人工合成两段特异性引物,使用TaqDNA多聚酶,从一系列乳杆菌中提取DNA溶液,加入含特异性引物的反应混合物中,进入热循环,最终的反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测。研究者通过检测微生物中的似HORA基因的存在与否来判断其对啤酒的腐败特性。HORA-PCR技术对腐败菌的检测大约需要6 h,比基于生长现象的传统平板培养方法要快得多^[5,9,10]。

此种PCR技术仅产生一种产物。使用特异性引物的PCR技术可用于快速检测和鉴定啤酒中的腐败菌,且引物的特异性确保了检测结果的准确和灵敏,从而为保证啤酒质量提供了有效的微生物检测途径^[9]。

1.2 RAPD-PCR(随机扩增多态DNA分析多聚酶链反应技术)

利用较短的寡核苷酸引物扩增得到一群长短不一的DNA片段混合物。这些PCR产物经琼脂糖凝胶电泳之后所呈现的带型反映了用扩增模板的DNA分子的总体结构特征。因此能够测定出2个生物体基因组之间的差异。

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。已经成功地对乳杆菌属、片球菌属、明膜串珠菌属中的菌株做出鉴定^[6]。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

收稿日期:2002-10-08

作者简介:孔庆新(1978-),男,山东人,在读研究生,研究方向食品生物技术。

啤酒腐败菌的PCR检测中^[9]。

使用RAPD-PCR技术,所需的DNA提取物少,此方法可在10 h内通过啤酒污染菌独特的指纹图谱来鉴定发酵中的污染菌。对于每一个菌种,每一引物仅能产生唯一的特异性指纹图谱。将被检测样品图谱与标准图谱对照便可得到鉴定结果^[9]。

1.3 Nested-PCR (嵌套多聚酶链反应技术)^[5]

Nested-PCR技术的反应效率提高,特别是对含有高浓酵母细胞的样品检测^[9]。

加拿大Labatt公司的研究者通过实验确定和检测了用于乳酸菌鉴定的Nested-PCR的引物。Nested-PCR技术提高了在高浓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8 h即可完成。

Nested-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^[7,9]。

2 用伏安型生物传感器检测鉴定微生物细胞

1985年T.Matsunaga首次提出了利用生物传感器进行细胞识别。目前,细胞识别生物传感器倍受国内外许多研究人员关注。哈尔滨工程大学的研究人员借鉴和改善前人研究成果^[11],结合现代伏安分析技术的理论和方法,研究了3种微生物细胞的半微分循环伏安响应特征,提出了微生物细胞的峰电位细胞识别法^[11,12]。

所用传感器由一个平面热解石墨电极、铂电极及Ag/AgCl电极的三电极系统组成。将阻留微生物细胞的滤膜紧附在工作电极表面,然后在工作电极与对极间施加一扫描电压,进行半微分循环伏安扫描,记录伏安图谱,依据峰电位识别微生物^[13]。

研究人员对啤酒酵母菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌3种微生物进行了识别研究,发现它们的峰电位各不相同,分别是0.75、0.85和0.69 V (vs Ag/AgCl饱和氯化钾)。因此,可利用峰电位进行啤酒中微生物细胞的识别,方法极为简便快速^[12]。

3 自动微生物检测系统(AMS)

自动微生物检测系统具有鉴定快速、准确、功能广泛等优点,可自动进行数据处理及作出细菌鉴定和报告结果。以常规法与仪器法对细菌的鉴定进行了比较,表明该仪器具有传统常规法所无法比拟的优点。

AMS工作原理:自动微生物检测系统是一种由传统生化反应及微生物检测技术与现代计算机技术相结合,运用最大概率近似值模拟法进行微生物检测的技术。该系统对待检菌的鉴定,首先要求将待检菌制成菌悬液,然后充入细菌检测卡片,经过培养,根据被检卡片各介质的反应情况,由读数器定时测定,并和预定的阈值进行比较、分析,于4~18 h内通过数据终端自动显示并打印结果报告。自动微生物检测系统对各种细菌的鉴定是以细菌的微量生化反应为基础,包括25种以上的生化反应指标,因此基本上与传统的鉴定方法结果一致。AMS已经被一些国家的官方机构所认可,国内亦有不少实验室利用此仪器作为细菌检验的判断依据^[13]。

研究人员对11株已知的标准菌种和15株未分离菌株以AMS法进行鉴定。对未知的菌株进行鉴定,经过与常规法鉴定结果比较,符合率为93.3%;对标准菌种的鉴定,鉴定结果与来源菌完全相符,表明了AMS鉴定结果是准确的。同时,自动微生物检测系统克服了传统细菌鉴定方法的不足,是一种全面快速准确简便的微生物检测技术。在啤酒微生物检测鉴定中有十分重要的应用价值和前景^[13]。

4 改良MRS培养基检测啤酒中乳酸菌

安徽大学的研究人员设计了用补充麦芽糖和清酒的改良MRS培养基检测啤酒中的乳酸菌,可提高阳性检出率。

4.1 改良MRS培养基^[14]

麦芽糖5.0 g,蛋白胨10.0 g,牛肉膏8.0 g,酵母膏4.0 g,葡萄糖20.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, NaOAc 5.0 g, MgSO₄ 0.2 g, MnSO₄ 40.05 g, 吐温-80 1.0 g, 柠檬酸三铵2.0 g, 琼脂20.0 g, 苯乙醇0.001 g。清酒与水的比例为1:1,终体积为1000 ml, pH 5.5左右。

用补充麦芽糖和清酒的改良MRS培养基来检测啤酒中的乳酸菌,对生成的菌落进行观察和镜检,并通过KOH试验和过氧化氢酶试验进一步证实^[15]。

4.2 乳酸菌在改良MRS培养基上的特征^[14]

4.2.1 改良MRS培养基比MRS培养基在相同稀释度下生成的乳酸菌菌落数平均高2~3倍,且MRS培养基上生成菌落有小部分为非乳酸菌。

4.2.2 改良MRS培养基上生成菌落特征:乳黄色或浅白色,圆形、扁平,边缘不整齐,有皱折。

4.2.3 油镜下(16×100)镜检多为球形,成对或成四分体,少数为短杆状、长杆状。

4.3 检出方法^[16]

4.3.1 观察菌落特征,并置于显微镜下用油镜镜检。

4.3.2 KOH试验:取一菌耳平板上生长菌落于载玻片上,加1~2滴5% KOH溶液,用接种环将它们混合搅匀,短时间内KOH试验阳性菌会越搅越稠,抬起接种环会产生拉丝现象,而KOH试验阴性菌则无拉丝现象。

4.3.3 过氧化氢酶试验:在无菌载玻片上加一滴无菌水,用接种环挑一环菌至载玻片上的无菌水上并混匀,然后滴一滴5% H₂O₂溶液,观察产气泡的情况,如无气泡产生,则判断为过氧化氢酶阴性菌。

5 ATP法

任何一种生物细胞在正常条件下都含有相对恒定量的ATP(三磷酸腺苷)。根据这一点,利用ATP分析可对活细胞进行快速计数。从微生物细胞提取出的ATP的量可用特定的生物发光分析仪方便地测出,分析过程中要用到荧光酶系统,这个反应非常有效,几乎每一个ATP分子的反应都能产生一个光子的光,光输出的总量与反应混合物中ATP量成正比,能测出的ATP量可低至10~13 g(100 fg)。ATP法理论上可检出的数量为102~103个细菌和1~10个酵母。但实验上,由于环境的干扰和影响,很难达到这个检验限度。实际应用中,ATP法可检测出102个酵母,检测时间在8 h以内^[1]。

6 结束语

与传统方法相比,上述几种方法对啤酒腐败微生物的检测鉴定更加有效和切实可行。相信随着科学技术的发展,上述的检测鉴定技术会得到进一步完善,并方便地用于生产,同时还会涌现出更加快速、准确的检测鉴定技术。

参考文献:

- [1] 顾国贤,等.啤酒无菌酿造[J].酿酒,2000,(3):49-53.
- [2] 徐岩,张丽苹,等.啤酒酿造中腐败细菌的研究[J].酿酒,2000,(6):68-72.
- [3] 曹程节.啤酒工业的微生物管理[J].食品工业,2000,(4):13-14.

(下转第29页)

是说,给大曲的前期培养做一个准备工作。

培养室地面清洗:培养室地面因连续操作,与曲块及落在地面的谷糠等长期接触,其中不乏飘落的“水毛”孢子,只要在前期培养阶段有适于其生长条件,如高湿度、低温度等,“水毛”就会在曲坯上很快地再次“生根落户”。因此,应在这一污染源上给予净化。在连续的生产和观察中,采取每连续生产半年左右,清洗一次培养室地面的办法。经跟踪测定,这一办法对水毛起到了明显的抑制作用。

制曲生产用具消毒:制曲生产用具包括谷糠、苇杆、席子、簸箕、扫帚等,因它们在制曲过程中,与曲块经常接触,不免携带一些“水毛”孢子,如:苇杆上粘有一片或一块的黑色或灰黑色的菌斑等,所以,在制曲中,一经发现上述明显携带“水毛”孢子的制曲生产用具,应使用漂白粉溶液浸泡或焚毁并远离厂房,防止在生产中这些孢子随空气传播入侵曲坯。

1.2.2 工艺操作的调整

为了提高大曲的质量,普遍采用提高制曲温度的方法,通过改变曲料加工粉碎度比例来增加成形曲坯的水分,使曲室湿度增大,而这正是给“水毛”的生长创造了条件。那么,要防止“水毛”就必须及时排潮或消耗水分,以解决湿度很大的问题。但是排潮要适度,以防止过量排潮而上霉不好,产生干皮。

实践中,我们根据季节不同、气温高低,采取两种防治“水毛”的措施。

1.2.2.1 夏秋两季,延长晾曲时间

夏秋两季气温较高,曲坯在入室后,盖席子之前,加长晾曲时间为10~12 h,使曲室湿度以及曲堆内湿度下降。这样的调整不会使室温很低,又可以及时排潮,也就是说,调整后既可以符合上霉条件,又可以抑制“水毛”的生长。

1.2.2.2 冬春两季,提高室温

冬春两季气温较低,显然加长晾曲时间会使室温很低,上霉时间延长,上下层曲坯之间的窄面会产生“水毛”,并逐渐扩散到曲坯宽面。因此,采用暖气提高室温来消耗水分的方法,收到了很好的效果。

2 “干皮”现象

“干皮”现象主要形成于晾霉期间。

2.1 “干皮”的危害

2.1.1 降低了大曲的利用率。

2.1.2 “干皮”形成后,在中、后期的培养过程中,曲子内部水分和热量的散失很容易受到阻碍,容易脱火,造成鼓肚和裂缝,极大地

影响了大曲的质量。

2.2 防治办法

2.2.1 微生物净化

禁止使用发芽霉变的原料。发芽原料的部分淀粉变为糖,着床的微生物在含糖较高的基质中繁殖快,曲坯升温迅猛,表皮失水快,易形成干皮。所以,禁止使用发芽霉变的原料。

及时清洗压曲机及运曲平板车。压曲机上的锤布、输送带等以及运曲平板车,每次踩曲总粘一些曲料,这些曲料一经酸败,必然产生乳酸菌等一类的杂菌,若不清洗,在下次踩曲时,又粘在曲坯上,在进入培养室后,曲坯起火迅猛,温度难以控制,大量失水,从而形成干皮。因此,在每次踩完曲后,应及时清洗踩曲机及运曲平板车等,以免染菌。

2.2.2 工艺操作的调整

我们在实际操作中,经过连续观察,认为产生干皮的原因有3个:(1)上霉不好;(2)晾霉期间排潮太快;(3)晾霉与潮火之间升温迅猛。

上霉不好常发生在冬春两季,主要原因是气温低、室温低、外界干燥,上霉时间长,曲子表面过度消耗水分,曲坯中的淀粉和少量糖不能溶于水,从而挂衣困难。

针对这一情况,我们采取曲子入房后,即开暖气提高室温,并保持室内湿度,缩短上霉时间,以使曲子上霉良好;或在发现曲子不生衣时,揭席,向曲堆喷洒热水,至曲子表面恰好润湿为止,然后盖好席子,使其发热上霉。

针对本地区春冬两季风大的特点,晾霉期间应时刻注意天气变化,开窗要适度,且一般为单面窗户,避免急速空气对流,以防止培养室和曲子表皮排潮过快,曲表干涸,产生干皮。另外,在揭席晾霉时,不要立即开窗放潮,要维持3 h左右,待室温上升一些,再开窗放潮,进行晾霉。这样做可以减缓曲室的排潮速度,又可以使上霉不好的曲子再度挂衣。

晾霉至潮火之间若曲子品温升得过快过高,则容易使曲子表皮很快干涸或产生裂缝,造成干皮;或者由于温度高,表皮呈暗红色,即生成烤皮或水淹皮,这种现象会严重影响曲子以后的培养。实践中,我们把曲子品温在入房前8 d内控制在38℃以下,经跟踪检测,在成熟后的曲子感官检查中看到,曲子基本没有干皮。

综上所述,在清香型中温大曲的制作过程中,若重视前期培养,细心操作,不出现“水毛”和“干皮”现象,那么,它的中、后期培养也就容易掌握了,曲子质量也就可以稳步提高了。●

(上接第27页)

[4] 左永泉.啤酒生产过程中微生物的污染与防治[J].中国酿造,1997,(3):8-9.

[5] P.C.Turner,A.G.McLennan,A.D.Bates.Molecular Biology[M].2001.

[6] Lude J DiMichele,Michael JJ.J.Am.Soc.Brew.Chem.,1993,51(2):63-67.

[7] Erlich H A et al.PCR Technology principles and Applications for DNA Application[M].New York Stockton.1989.

[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] Tetsuji Yasui,Yomoyuki Okamoto,Kano Hiroshi,Tayachi.Can[J].J.Microbiol.,1997,43:157-163.

[10] Manabu Samin,Yamashita H,Kabokurn H[J].J.Am.Soc.Brew.Chem.,

1997,55(4):177-140.

[11] 谢平会,等.用伏安型生物传感器识别微生物细胞的研究[J].中国卫生检验,2000,(6):261-265.

[12] 谢平会.用于识别和计数微生物细胞的伏安型生物传感器的研究[C].哈尔滨医科大学硕士学位论文,1994.

[13] 张树成,等.无机及分析化学[M].北京:高等教育出版社,1997.

[14] 李丹红,等.自动微生物检测系统(AMS)在食品检测中的应用[J].中国卫生检验,2000,(12):698-699.

[15] 张颖,等.用改良MRS培养基检测啤酒中乳酸菌的方法[J].安徽大学学报,1999,(12):104-106.

[16] 吴红.啤酒的微生物检验技术[J].酿酒,2000,(5):34-38.