

# 啤酒腐败细菌与酒花抗性

郝秋娟,董翠英,李 崎

(江南大学教育部工业生物技术重点实验室,江苏 无锡 214036)

**摘 要:** 啤酒的腐败细菌有革兰氏阳性菌(乳酸菌、片球菌、*M.kristinae* 等)和革兰氏阴性菌(*Pectinatus*、巨型球菌、*Z.raffinivorans* 等)。啤酒中的酒花具有抑制腐败菌的作用,主要物质为异  $\alpha$ -酸。酒花能对微生物体内的酶起钝化、改变目的底物、抑制药物流入等作用。对啤酒腐败菌的检测方法有聚合酶链式反应(PCR)、伏安型生物传感器检测鉴定微生物细胞、自动微生物检测系统(AMS)、改良 MRS 培养基检测啤酒中乳酸菌和 ATP 法。(孙悟)

**关键词:** 啤酒; 啤酒腐败菌; 酒花; 抗性

**中图分类号:** TS262.5 ;Q93-33 ;TS261.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9286(2005)09-0065-04

## Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance

HAO Qiu-juan, DONG Cui-ying and LI Qi

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

**Abstract:** The beer spoilage bacteria covers Gram-positive bacteria such as *Lactobacillus* and *M.kristinae* etc. and Gram-negative bacteria such as *Pectinatus*, *Macrococci* and *Z.raffinivorans* etc. The hops in beer with its main components as iso- $\alpha$ -acid could inhibit the activity of beer spoilage bacteria. Besides, the hops had the functions of inactivating enzymes in microbial body, changing goal objects, and inhibiting the inflow of medicine etc. The detection methods of beer spoilage bacteria cover polymerase chain reaction (PCR), automatic microbial detection system (AMS) and ATP method etc. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** beer; beer spoilage bacteria; hop; resistance

多年来啤酒一直被认为是一种安全的饮料。由于啤酒中含有酒精、酒花苦味物质、高浓度的二氧化碳、低 pH 值、低溶氧量,并且营养物质也极微量,因而对许多微生物而言,它并不是理想的生长环境。然而,一些微生物仍然能够在其中生长。这些啤酒腐败菌会促进啤酒浑浊,提高啤酒的浊度,并使啤酒变质。

### 1 啤酒腐败细菌

几乎所有的啤酒腐败细菌都属于乳酸菌,但仅有有限的乳酸菌是啤酒腐败菌。这些乳酸菌会使啤酒浑浊、变粘,并产生不愉快的风味。

#### 1.1 革兰氏阳性菌

##### 1.1.1 乳酸菌

乳酸杆菌是乳酸菌中最大的属,包括许多个种。广泛应用于各种发酵过程,包括食品行业,如啤酒、葡萄酒、酸乳酪和腌泡菜等。通常认为乳酸杆菌都能在啤酒中生长,但仅部分乳酸杆菌会使啤酒变质。短乳杆菌专

性异型发酵,其适宜生长的温度是 30℃,pH4~6,对酒花物质有抗性,适宜生长范围较广。它能发酵糊精和淀粉,易使发酵液发酵过度。

林氏乳杆菌与短乳杆菌形态相似。因其 16S rRNA 的基因序列特征,把它作为乳酸杆菌中有亲缘关系的一个种。它对酒花有很强的抗性,适于在 19~23℃ 下生长,但比其他乳酸杆菌更耐热。迄今为止,凡在啤酒中检测到的林氏乳杆菌都能使啤酒变质。

布氏乳杆菌、干酪乳杆菌、弯曲乳杆菌、植物乳杆菌、*Lb.corneiformis* 这几种啤酒腐败菌较上述两种啤酒腐败菌少见。布氏乳杆菌与短乳杆菌很类似,区别在于发酵松三糖的能力,布氏乳杆菌在其生长培养基中需要核黄素。干酪乳杆菌能产生双乙酰,给啤酒带来馊饭味。

有报道称 *Lb.brevisimilis*, *Lb.malefermentans*, *Lb.parabuchneri*, *Lb.collinoides*, *Lb.parabuchner*, *Lb.paracasei* 也是啤酒腐败菌。最近,又新发现了几株乳酸杆菌是啤

收稿日期 2005-03-01

作者简介 郝秋娟(1976-),女,河北赵县人,在读硕士研究生。

酒腐败菌。根据 16S rRNA 基因序列,BS-1 菌与棒状杆菌相近,但它仅能发酵葡萄糖、果糖和甘露糖,新发现的另外两株乳酸菌与其他乳酸杆菌在分类学特征上有显著区别。LA-2 菌株,其 16S rRNA 基因序列 99.5 % 类似于 *Lb.collinoides*,对啤酒的破坏能力很强。LA-6 菌株对啤酒破坏能力较差。

#### 1.1.2 片球菌

片球菌是同型发酵,成对或四联生长。片球菌能使啤酒变粘,产生大量的双乙酰。在啤酒生产全过程中都有发现。在啤酒厂发现的几种片球菌有乳酸片球菌、有害片球菌、糊精片球菌、嗜盐片球菌、意外片球菌、小片球菌和戊糖片球菌,其中有害片球菌是最广泛的啤酒腐败菌。有害片球菌对酒花有抗性,通常在后酵过程和啤酒中发现,在接种酵母中没有发现过;而意外片球菌经常在接种酵母中发现,但在发酵的其他环节很少发现。意外片球菌和糊精片球菌能在 pH 值大于 4.2,乙醇和酒花物质较少的啤酒中生长。

#### 1.1.3 其他革兰氏阳性菌

据报道微球菌中的 *M.kristinae* 也会引起啤酒变质,*M.kristinae* 能在 pH 值大于 4.5,乙醇和酒花物质较少的啤酒中生长。微球菌通常是严格好氧菌,但 *M.kristinae* 也能在厌氧条件下生长,在啤酒中能产生果香味。

### 1.2 革兰氏阴性菌

#### 1.2.1 *Pectinatus*

*Pectinatus* 主要存在于非巴氏杀菌的啤酒中。该属有两个种 *Pectinatus cerevisiophilus* 和 *Pectinatus frisingensis*。*Pectinatus* spp 不产芽孢,运动型杆菌,侧生鞭毛。幼龄细胞运动很快,呈 X 型,老细胞呈蛇形,有许多 G<sup>+</sup> 菌的特征,被认为是革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的中间体。在 15~40 °C, pH 3.5~6,基质中乙醇浓度低于 4.5 % (w/w) 条件下可以生长,最适温度为 32 °C,最适 pH 4.5。生长过程会产生丙酸、乙酸、琥珀酸、乳酸和乙偶姻。*Pectinatus* spp 能发酵乳酸,由于 SMMP 培养基以乳酸作为唯一碳源,因而它用于选择分离 *Pectinatus* spp 和巨型球菌。*Pectinatus* spp 可使啤酒浊度升高,使各种脂肪酸、H<sub>2</sub>S 和甲硫醇混合而产生臭鸡蛋味。

#### 1.2.2 巨型球菌

巨型球菌不产芽孢,不运动,嗜温球菌,单个或成对,偶尔也形成短链。该属包括两个种 *M.elsdeni* 和啤酒巨型球菌。啤酒巨型球菌能在 15~37 °C, pH 值大于 4.1 条件下生长,最适生长温度 28 °C,乙醇浓度 2.8 % (v/v) 时其生长受到抑制,但乙醇浓度达 5.5 % (v/v) 时也能存活。它使啤酒浊度升高,产生一定量的奶油酸和少量的乙酸、异戊酸、戊酸、己酸和乙偶姻,也会产生 H<sub>2</sub>S 使

啤酒发臭。

#### 1.2.3 其他革兰氏阴性菌

运动型发酵单孢菌是兼性厌氧菌,在 pH 值大于 3.4,乙醇浓度低于 10 % (v/v) 条件下可以生长,在爱尔型啤酒中发现过,而在 Lager 啤酒中还没有发现。能产生乙醛和硫化氢。据报道 *Z.raffinivorans* 也是啤酒有害菌,在 pH 值高于 4.6,乙醇浓度低于 5 % (v/v) 条件下也能生长,破坏啤酒的能力类似于 *Pectinatus*。

产乳酸月形单孢菌也是革兰氏阴性菌,这种菌很少有人研究。乙酸菌中的葡糖杆菌和醋杆菌对啤酒业来说是众所周知的。可将乙醇转化为乙酸,导致啤酒有醋味。

*Hafnia protea* (变形杆菌) 和水生拉惹氏菌 (*Enterobacter agglomerans*) 在接种酵母中发现过,而在啤酒中没有发现。它们可延缓发酵过程,被 *H.protea* 污染的酵母发酵后,啤酒会有类似防风草或水果香味,被水生拉惹氏菌污染的麦汁生产的啤酒中双乙酰和二甲基硫含量较高。最近分离出一株新的严格厌氧的 G<sup>-</sup> 菌,杆菌,不生鞭毛,在 pH 值高于 4.3 的啤酒中可以生长,不产丙酸。

### 2 酒花物质的抗菌活力

#### 2.1 酒花中的苦味物质

饮用啤酒时愉快的苦味主要是由酒花产生的。啤酒起源于公元前 3000~5000 年,9 世纪时开始添加酒花为香料,在 15 世纪才确定为啤酒的通用香料。

#### 2.2 酒花中的抗菌物质

酒花的防腐特性是由于其中的软树脂引起的。 $\alpha$ -酸的主要成分是葎草酮、辅葎草酮和加葎草酮。在煮沸过程中, $\alpha$ -酸异构化为异  $\alpha$ -酸,异  $\alpha$ -酸比  $\alpha$ -酸更可溶,更苦。但上述转化过程中转化率较低,仅 30 % 左右。酒花中的  $\beta$ -酸在啤酒中溶解很少,也不发生异构化,不进入啤酒中。因而啤酒中酒花的抑菌物质主要是异  $\alpha$ -酸。

#### 2.3 酒花物质的抗菌机理

$\alpha$ -酸和  $\beta$ -酸抗菌能力大于异  $\alpha$ -酸,但它们溶解差,研究显示能抑制 G<sup>+</sup> 菌,不抑制 G<sup>-</sup> 菌,较低的 pH 值有助于提高它的防腐能力。在 pH 5.5 或在 pH 5.2 的麦汁中,煮沸后的葎草酮的防腐能力比煮沸前小,但与在 pH 4.3 的啤酒中防腐力相同。酒花成分(蛇麻酮,葎草酮,异葎草酮,葎草酸)会引起短乳杆菌细胞质膜的泄漏,从而抑制糖和氨基酸的转运,抑制呼吸作用和蛋白质的合成。酒花物质是弱酸性的,其未解离形式能抑制细菌的生长。

在短乳杆菌中,反式异葎草酮减少亮氨酸的吸收,还引起积累的亮氨酸的泄漏。反式异葎草酮能有效消除质子运动力的跨膜 pH 梯度,但对跨膜电势没有影

响。电势能的研究揭示未解离的反式异萆草酮作为离子载体,催化电中性的未解离的异萆草酮的流入,内部异萆草酮的解离和异萆草酮与二价阳离子的化合物的流出。在乳酸杆菌中阳离子以高浓度存在,这导致了跨膜 pH 梯度的下降。据报道,反式异萆草酮的防腐力受培养基中的阳离子影响。反式异萆草酮的质子载体活力需要以单价阳离子存在,随阳离子浓度变化而变化。但反式异萆草酮只有二价阳离子或三价阳离子存在时,才与  $K^+$  结合。

### 3 乳酸菌的酒花抗性

#### 3.1 乳酸菌酒花抗性的变化

短乳杆菌对酒花的抗性最强,菌种不同对酒花的抗性不同。有人认为乳酸菌对酒花的抗性是在发酵过程中与酒花物质长时间接触通过免疫而获得的。在逐渐提高酒花物质浓度的培养基中连续培养乳酸菌,其酒花抗性会提高 8~20 倍,在不含酒花的培养基中连续培养乳酸杆菌,会减弱其对酒花的抗性,要使乳酸杆菌的酒花抗性降到最小,约需 1 年时间,这说明乳酸杆菌对酒花的抗性是很稳定的。然而从变质啤酒中分离出来的菌株,再次接入啤酒中时,它不会生长,要使其生长,需要在含有低浓度的异萆草酮中预先培养。短乳杆菌对酒花的抗性稳定性在种与种之间是有差异的。如短乳杆菌 BSO310 菌株的酒花抗性不能通过质粒的自我修复或 UV 诱变而改变,这说明该特征很稳定;短乳杆菌 AB-BC45 菌株通过上述方法可提高其酒花抗性,通过复制质粒 pRH45,可提高其酒花抗性,通过不含酒花的培养基次级培养,会减弱其抗性。

#### 3.2 酒花抗性的特点

乳酸菌的菌种对异萆草酮敏感性或抗性,对萆草酮和蛇麻酮也有类似的特征。有人把乳酸杆菌和片球菌的酒花抗性株与敏感株的特征相比较,发现在细胞形态、生长 pH、糖的利用、代谢产物、锰的需求、细胞蛋白的表达和对各种杀菌剂的抗性方面没有明显的关系,但它们的跨膜 pH 梯度和细胞的 ATP 库是有差异的。

#### 3.3 酒花抗性机制

对酶的钝化:在短乳杆菌的酒花抗性菌株中,它既不转化也不钝化反式异萆草酮,改变目的物。细胞通过突变或酶修饰来改变细胞目的物,从而减小目的物与抗体的亲和力,抑制药物流入。革兰氏阴性菌的细胞质膜抑制亲脂性药物进入,而革兰氏阳性分枝细菌的细胞壁也是抑制酒花物质渗入一个很有效的屏障,啤酒腐败乳酸菌中半乳糖苷磷酸甘油酯的存在,也影响酒花物质的渗入,迅速排出药物。在许多细菌的细胞质膜中存在多种抗病性泵,如短乳杆菌 ABBC45,当其生存的

介质中含有酒花时,其多药物抗性泵 HorA 就会被充分地表达。其他机制:在酒花敏感的细胞中,酒花物质携带氢进入细胞,释放氢离子后,与二价阳离子结合并被排除细胞体外,使细胞内 pH 降低,从而降低跨膜的 pH 梯度,减小质子运动力,致使由质子运动力驱使的营养吸收被减弱。在酒花抗性的细胞中,细胞会加速质子的排出速度。

### 4 啤酒腐败菌的检测

#### 4.1 培养基

并非所有的微生物都是啤酒腐败菌,仅有有限的几种是啤酒腐败菌。为了确保啤酒最终产品的质量,需要控制由短乳杆菌、林氏乳杆菌、有害片球菌和 *Pectinatus* spp 的潜在的危害。

欧洲啤酒协会推荐 3 种培养基检测乳酸杆菌和片球菌:添加放线菌酮的 MRS 琼脂培养基、添加放线菌酮的 Raka-Ray 培养基和 VLB S7-S 培养基,其他适宜的培养基还有添加放线菌酮的 UBA,HLP,NBB,WLD,Nakagawa 培养基,SDA 和 MRS (添加了麦芽糖和酵母膏, pH4.7)。这些培养基任何一种都不能检测所有的乳酸杆菌和片球菌,但是这些培养基组合起来会有很好的结果。由欧洲酿酒协会,美国酿酒化学协会和日本酿酒协会推荐的培养基见表 1。

表 1 检测啤酒有害菌的培养基

| 培养基                          | 细菌                  | 推荐单位            |
|------------------------------|---------------------|-----------------|
| MRS                          | LAB                 | EBC, ASBC, BCOJ |
| Raka-Ray                     | LAB, G <sup>-</sup> | EBC, ASBC, BCOJ |
| VLB S7-S                     | LAB                 | EBC, BCOJ       |
| HLP                          | LAB                 | EBC, BCOJ       |
| WLD                          | LAB                 | EBC, BCOJ       |
| Nakagawa                     | LAB                 | EBC, BCOJ       |
| SDA                          | LAB                 | EBC, BCOJ       |
| Concentrated MRS             | G <sup>-</sup>      | EBC, BCOJ       |
| PYF                          | G <sup>-</sup>      | EBC, BCOJ       |
| Thioglycolate Medium         | G <sup>-</sup>      | EBC             |
| LL-Agar                      | G <sup>-</sup>      | EBC, BCOJ       |
| UBA                          | LAB, G <sup>-</sup> | EBC, ASBC, BCOJ |
| NBB                          | LAB, G <sup>-</sup> | EBC, BCOJ       |
| Brewer's Tomato Juice Medium | LAB, G <sup>-</sup> | ASBC            |
| LMDA                         | LAB                 | ASBC            |
| BMB                          | LAB                 | ASBC            |
| SMMP                         | G <sup>-</sup>      | ASBC, BCOJ      |

注: EBC、ASBC、BCOJ: 欧洲酿酒协会、美国酿酒化学协会、日本酿酒协会; LAB: 乳酸菌; G<sup>-</sup>: 革兰氏阴性菌。

#### 4.2 测定方法

除了基本测定方法,如形态观察、革兰氏染色、过氧化氢分析和生化实验(糖类发酵模型,有机酸的色谱分析)外,还有一些专一性的检测鉴定方法,如多克隆、单



克隆抗体的免疫测定、DNA-DNA 杂交、DNA 序列测定和 PCR(聚合酶链反应)技术。

4.2.1 聚合酶链式反应(PCR)

PCR 技术鉴定啤酒腐败菌,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。

4.2.2 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,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。

4.2.3 自动微生物检测系统(AMS)

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,运用最大似然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,并与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。

4.2.4 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。

改良 MRS 培养基:麦芽糖 5.0 g,蛋白陈 10.0 g,牛肉膏 8.0 g,酵母膏 4.0 g,葡萄糖 20.0 g,磷酸二氢钾为 2.0 g,醋酸钠 5.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$  为 0.05 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 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。

4.2.5 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,该反应非常有效,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。

参考文献:

[1] Kanta Sakamoto, Wil N.Konings International[J].Journal of Food Microbiology,2003,89:105-124.  
[2] 顾国贤.酿造酒工艺学[M](第二版).北京:中国轻工业出版社,1996.  
[3] 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,(2):26-28.  
[4] 顾国贤,涂俊铭,李永仙.啤酒无菌酿造[J].酿酒 2000,(3):49-53.

# 2005 年葡萄酒年会召开

本刊讯 2005 年 8 月 7~10 日,由中国食品工业协会主办、宁夏御马葡萄酒有限公司承办的 2005 年中国葡萄酒年会在银川召开。张裕、长城、王朝、威龙、丰收等我国葡萄酒行业骨干企业负责人、专家、国家评委及相关单位领导共计 130 余人参加了会议。

面对经济飞速发展和入世后的新机遇,就如何加强行业自律,维护企业权益,努力促进我国饮料酒工业持续健康发展,更加有效地开展行业服务工作,与会中食协领导进行了分析和阐述,强调要不断完善服务方式,坚持提高业务质量,为促进饮料酒制造业持续健康发展提供更全面、周到、细致的服务。

西北农林科技大学葡萄酒学院院长李华博士就葡萄持续生产模式与葡萄、葡萄酒产业的关系做了专题报告。李华指出,我国葡萄与葡萄酒产业近年发展很快,但在生产模式和指导思想上一直存在一些偏差,必须走持续生产的道路,才能提高产业的核心竞争力。新天酒业营销总经理金炜就我国葡萄酒市场消费的流行趋势等热点问题做了详细分析,他提出,葡萄酒进入家庭才是中国葡萄酒消费真正走向成熟的标志。结合中国葡萄酒 A 级产品认定工作,葡萄酒专家王俊玉对如何在我国更好开展葡萄酒质量分级管理制进行了详细分析与论述。

此外,为充分掌握我国葡萄酒产品质量水平,向政府有关部门提供产品质量动态信息,探索葡萄酒行业信用体系建设的新途径,协会提出建立产品质量档案制,对葡萄酒产品质量进行登记管理。在本次年会上,与会专家、评委对 40 多个葡萄酒产品逐一进行了严格的质量评价,初步建立了葡萄酒产品质量档案。

为今后更好地发挥葡萄酒国家评委的作用,加强葡萄酒国家评委队伍建设,此次会议还对原第三届全国葡萄酒评委进行了登记调查,以提高国家葡萄酒评委活动的有效性。

会议还组织参观了宁夏御马葡萄酒有限公司的葡萄种植基地和葡萄酒生产线。(小小)