

一种新的检测啤酒有害菌培养基的优化

袁雪萍¹, 王德良², 宋绪磊²

(1.新疆农业大学,新疆 乌鲁木齐 830052;2.中国食品发酵工业研究院,北京 100027)

摘要: 为研制出更适合国产啤酒有害菌检测的培养基,参考目前国内啤酒行业使用量最大的2种进口培养基 MRS 和 NBB,利用 2 水平正交试验考察牛肉浸粉、酵母浸出物、葡萄糖、吐温-80、麦根浸出物、精氨酸、叶酸等因素对菌落数的影响。主要的影响因素是:牛肉浸粉、酵母浸出物、葡萄糖和叶酸。最优的培养基配方为:牛肉浸粉 8 g/L、酵母浸出物 6 g/L、葡萄糖 18 g/L、叶酸 0.22 g/L。并且通过反复实验,确定此配方为最佳的培养基配方。

关键词: 啤酒有害菌; 培养基; 检测; MRS; NBB

中图分类号:TS262.5;TS261.4;TS261.7;Q93-3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2011)12-0048-03

Optimization of a New Culture Medium for the Detection of Harmful Bacteria in Beer

YUAN Xueping¹, WANG Deliang² and SONG Xulei²

(1. Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052; 2. China National Research Institute of Food Science and Fermentation Industry, Beijing 100027, China)

Abstract: In order to develop culture mediums more suitable for the detection of harmful bacteria in home-made beer, we had referred to two kinds of imported culture mediums including MRS and NBB (most widely used in China nowadays) and carried out two-level orthogonal test to investigate the effects of beef powder, yeast extract, glucose, Tween80, malt rootlet extract, L-arginine and folic acid on bacteria colony number. And we believed that the main influencing factors included beef powder, yeast extract, glucose and folic acid. As a result, the best formula of the culture medium was determined as follows: 8 g/L beef powder, 6 g/L yeast extract, 18g/L glucose, and 0.22 g/L folic acid. Such formula was proved to be the best one through repeated verification experiments.

Key words: harmful bacteria in beer; culture mediums; detection; MRS; NBB

随着国内啤酒生产和消费量的日益增加,啤酒有害菌的检测技术也面临着新的挑战。目前,国内啤酒行业对有害菌的检测多用固体培养基,如 MRS 琼脂培养基和 NBB-A,而这些培养基都依赖进口,其价格较昂贵,这无疑增加了啤酒生产在检测过程中的成本。此外,由于国内外啤酒特点的差异:国外啤酒中酒花含量高,原麦汁浓度较高,能够抑制啤酒有害菌的生长;而国内啤酒趋于淡爽,麦汁浓度较低,对啤酒有害菌的抑制能力较弱。因此,开发适合国内啤酒特点的有害菌检测培养基是有必要的。

严伟杰^[1]等对进口培养基 MRS 和 NBB-A 进行了优化,优化后的培养基比进口培养基更适合检测国产啤酒有害菌,其中针对麦根浸出物、精氨酸^[2]、叶酸^[3]的添加量进行了优化。本研究基于国内啤酒的特点,以营养因子牛

肉浸粉、酵母浸出物、葡萄糖和叶酸添加量作为研究对象,以进口培养基 MRS 和 NBB-A 为参考标准,经过反复的对照和验证,确定了最佳培养基 CNFF-A 配方。实验证明,自行研制出的培养基 CNFF-A 更适合于检测国产啤酒有害菌。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

短乳杆菌、植物乳杆菌、污染酒样,分别由 3 家不同的啤酒厂提供;MRS 培养基,英国 OXOID 公司;NBB-A 培养基,德国 DOHLER 公司北京奥博星;麦根浸出物^[4],中国食品发酵工业研究院提供;葡萄糖、牛肉浸粉,北京奥博星。

1.2 仪器和设备

厌氧罐、厌氧产气袋和厌氧指示片;英国 OXOID 公

收稿日期:2011-08-30

作者简介:袁雪萍(1982-),女,在读硕士。

通讯作者:王德良(1972-),男,博士,高级工程师。

优先数字出版时间:2011-11-11;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20111111.1029.003.html>。

表1 2⁷分析表、菌落数与极差分析

试验号	牛肉浸粉 (g/L)	酵母浸出物 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	吐温-80 (mL/L)	麦根浸出物 (g/L)	精氨酸 (g/L)	叶酸 (g/L)	菌落数 (个/0.1mL)
1	8.00	4.00	20.00	1.00	0.04	0.75	0.22	21
2	8.00	4.00	20.00	1.20	0.06	1.25	0.28	26
3	8.00	6.00	24.00	1.00	0.04	1.25	0.28	19
4	8.00	6.00	24.00	1.20	0.06	0.75	0.22	8
5	12.00	4.00	24.00	1.00	0.06	0.75	0.28	16
6	12.00	4.00	24.00	1.20	0.04	1.25	0.22	10
7	12.00	6.00	20.00	1.00	0.06	1.25	0.22	5
8	12.00	6.00	20.00	1.20	0.04	0.75	0.28	12
K1	18.250	18.250	16.000	15.250	15.500	14.250	11.000	
K2	10.750	11.000	13.250	14.000	13.750	15.000	18.250	
极差	7.750	7.250	2.750	1.250	1.750	0.750	7.250	

司; 高温高压灭菌锅:LDZX-50KBS 立式电热压力蒸汽灭菌锅锥形瓶;pH计:PHS-3C 精密 pH 计; 分析天平:Libror AEL-160; 恒温培养箱:LRH-250 生化培养箱; 无菌操作台:SW-CJ-2FD 型双人单面净化操作台等。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基的配制

MRS、NBB-A 按照英国 OXOID 公司的培养基使用说明配制。CNFF-A 中各成分用分析天平称量,数据精确到小数点后 2 位。各成分按配方精确称量后转移到预先准备的三角瓶中,加入一定体积的蒸馏水,水浴加热使各组溶解均匀,再 121 °C 灭菌 10 min。

1.3.2 菌种的活化、接种和培养

将各菌种分别接入到液体培养基 NBB-B 中活化 24 h,再将活化菌液稀释至 10⁻¹~10⁻⁵,污染酒样同样稀释至 10⁻¹~10⁻⁵,分别吸取 0.1 mL 涂布在平板上,28 °C 厌氧培养 3~4 d。

2 结果与分析

2.1 培养基 CNFF-A 成分的优化

2.1.1 因素水平的确定

考虑到啤酒有害菌对营养物质的需求,初步确定优化的 7 种组分有:牛肉浸粉、酵母浸出物、葡萄糖、吐温-80、麦根浸出物、精氨酸、叶酸。利用 7 因素 2 水平正交试验和极差分析法确定主要的影响因子^[5],结果见表 1。

由极差分析结果可知,表 1 中各因子对菌落数的产生影响的强弱顺序为:牛肉浸粉>酵母浸出物/叶酸>葡萄糖>麦根浸出物>吐温-80>精氨酸。吐温-80 在这里作为表面活性剂,对菌落数的影响较小,用量 1 ml/L。葡萄糖、麦根浸出物、精氨酸各自保持好的水平,麦根浸出物 0.04 g/L、精氨酸 0.75 g/L。通过正交分析法重点考察牛肉浸粉、酵母浸出物、葡萄糖、叶酸。

2.1.2 正交法设计实验

首先用单因素分析法确定这 4 种成分的添加量数

据,结果见表 2。

表2 单因素正交试验表

水平	A:牛肉浸粉 (g/L)	B:酵母浸出物 (g/L)	C:葡萄糖 (g/L)	D:叶酸 (g/L)
1	6	4	16	0.20
2	8	6	20	0.22
3	10	8	24	0.24
4	12	12	28	0.26

设计 L₉(3⁴) 正交试验,确定各因子的添加量,结果见表 3。

表3 L₉(3³) 正交实验设计表

水平	牛肉浸粉 (g/L)	酵母浸出物 (g/L)	葡萄糖 (g/L)	叶酸 (g/L)
1	6	4	18	0.20
2	8	6	20	0.22
3	10	8	22	0.24

2.2 正交实验结果

根据表 2 所设计的单因素实验,得出的菌落数结果见表 4~表 7。

表4 牛肉浸粉添加量对菌落数的影响 (cfu/0.5 mL)

菌液稀释梯度	牛肉浸粉(g/L)				
	4	6	8	10	12
10 ⁻³	*	*	*	*	*
10 ⁻⁴	480	495	520	523	500
10 ⁻⁵	43	39	45	35	44
菌种	1	1	1	1	1

注: * 表示菌落数太多不可数。

表5 酵母浸出物添加量对菌落数的影响 (cfu/0.5 mL)

菌液稀释梯度	酵母浸出物(g/L)				
	2	4	6	8	10
10 ⁻³	*	*	*	*	*
10 ⁻⁴	490	500	520	470	450
10 ⁻⁵	48	57	50	45	47
菌种	1	1	1	1	1

注: * 表示菌落数太多不可数。

表6 葡萄糖添加量对菌落数的影响 (cfu/0.5 mL)

菌液稀释梯度	葡萄糖(g/L)				
	18	20	22	24	26
10 ⁻³	*	*	*	*	*
10 ⁻⁴	480	450	470	480	460
10 ⁻⁵	50	40	37	47	42
菌种	1	1	1	1	1

注: * 表示菌落数太多不可数

表7 叶酸添加量对菌落数的影响 (cfu/0.5 mL)

菌液稀释梯度	叶酸添加量(g/L)				
	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
10 ⁻³	*	*	*	*	*
10 ⁻⁴	476	488	502	514	508
10 ⁻⁵	50	48	52	55	45
菌种	1	1	1	1	1

注: * 表示菌落数太多不可数。

从表4~表7可以看出,不同稀释度的纯菌液接种到不同添加量的牛肉浸粉、酵母浸出物、葡萄糖、叶酸的培养基上,菌落数随添加量的变化发生变化。表4表明,随着牛肉浸粉添加量的增加,菌落数呈现逐步增长的趋势,但综合各个菌液稀释梯度菌落的增长状况,取牛肉浸粉的最佳添加量为8 g/L。表5表明,随着酵母浸出物添加量的增加,菌落数逐步增加,当添加到8 g/L时,菌落数出现逐步下降的趋势,综合菌落数量,决定酵母浸出物最佳添加量为6 g/L。表6显示了葡萄糖添加量与菌落数变化的关系,其表明随着葡萄糖添加量的增加,菌落数出现下降趋势,原因是随葡萄糖浓度增加,渗透压增大,导致细胞壁质壁分离,致使菌体不能正常生长或不能正常代谢而死亡,所以取葡萄糖的添加量为18 g/L。表7表明,随着叶酸添加量的增加,菌落数也逐渐增加,但当叶酸的添加量达到0.30 g/L以上时,菌落呈黄色且菌落大小参差不齐,培养时间延长。

2.3 L₉(3⁴)正交实验结果分析

根据表3所设计的因素水平分析实验结果,利用L₉(3⁴)来分析培养基CNFF-A中重要影响因子牛肉浸粉(A)、酵母浸出物(B)、葡萄糖(C)、叶酸(D)。菌落数见表8。

比较分析表8中的R值,得出培养基CNFF-A中A、B、C、D 4种因子的影响显著顺序为:C(葡萄糖)>A(牛肉浸粉)>D(叶酸)>B(酵母浸出物)。从实验结果来看,葡萄糖和牛肉浸粉对啤酒有害菌的生长起着很关键的作用,叶酸和酵母浸出物在培养基CNFF-A中的作用相当,不可忽视。虽比前3个因子酵母浸出物的作用相对来说弱些,但从表1进行的全因子分析中可以看出,酵母浸出物对促进啤酒有害菌的生长也很重要。通过对比K₁、K₂、K₃得出4个因子的最佳添加水平,最后得出CNFF-A中的最佳组合为A₂B₂C₁D₂。

表8 CNFF-A中生长因子L₉(3⁴)正交试验结果

试验号	因素				菌落数 (cfu/0.5 mL)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	400
2	1	2	2	2	480
3	1	3	3	3	380
4	2	1	2	3	475
5	2	2	3	1	440
6	2	3	1	2	465
7	3	1	3	2	410
8	3	2	1	3	390
9	3	3	2	1	430
K ₁	420.000	428.333	481.333	423.333	
K ₂	460.000	436.667	461.667	451.667	
K ₃	410.000	425.000	410.000	415.000	
R	50.000	11.667	51.667	36.667	

2.4 验证试验

分别用短乳杆菌、植物乳杆菌、污染酒样做稀释梯度接种在MRS、NBB-A、CNFF-A上做对照试验,结果见表9~表11。28℃厌氧培养4 d,同种菌同一稀释度下3种培养基上生长的菌落数对比结果显示,CNFF-A与进口培养基MRS、NBB-A相比,在检出啤酒有害菌个数上同于或优于进口培养基。同一培养条件下CNFF-A上的菌落较进口培养基上的大,这样在实际应用中就可以缩短培养时间;CNFF-A上培养3 d的菌落与进口培养基培养4~5 d的菌落大小相当。

表9 植物乳杆菌在3种培养基上菌落数的对比

菌悬液	(cfu/0.1 mL)		
	MRS	NBB-A	CNFF-A
10 ⁻⁵	多	多	多
10 ⁻⁶	179	146	203
10 ⁻⁷	2	1	3

表10 污染酒样在3种培养基上菌落数的对比

菌悬液	(cfu/0.1 mL)		
	MRS	NBB-A	CNFF-A
10 ⁻³	多	多	多
10 ⁻⁴	243	260	256
10 ⁻⁵	2	2	2

表11 短乳杆菌在3种培养基上菌落数的对比

菌悬液	(cfu/0.1 mL)		
	MRS	NBB-A	CNFF-A
10 ⁻⁵	多	多	多
10 ⁻⁶	251	267	260
10 ⁻⁷	4	5	5

3 结论

3.1 单因素多水平试验和L₉(3⁴)正交试验结果均显示出CNFF-A配方确定的可靠性,通过进一步的验证试验

(下转第53页)

选用了 38 %vol、52 %vol 成品浓香型白酒,分别在 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C 下进行电导率测量,结果见图 3。

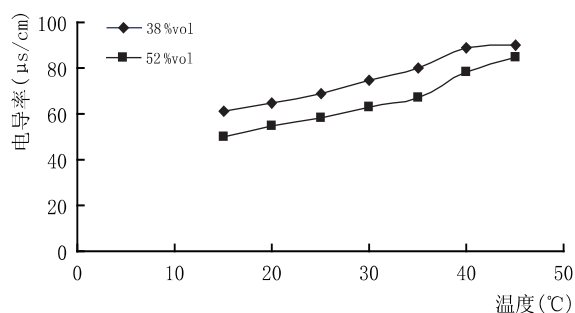


图 3 不同酒度下温度对白酒电导率的影响

从图 3 可知,温度对白酒电导率产生一定的影响。随着温度上升,2 种成品酒的电导率呈现递增趋势。电导率容易受温度的影响,是因为温度升高,使得布朗运动加剧,酒中分子、离子及其固形物运动加快,致使电导率两极板间传导的电流加剧,电导率就会相应增加。

3 讨论

3.1 不同浓度乙醇-水溶液体系的电导率与存放时间密切相关,并呈现先稍微增长,后小幅下降的趋势,最终趋于稳定。原因是配制的白酒,开始金属离子、分子比较活跃,运动加剧,致使电导率增加;另一方面可能是当各种有机分子溶解于水中时,原有的水结构被破坏,水分子需重新以更有序的结构把有机分子包围起来,非极性溶质分子在水溶液中的异常性质是因为水分子以微观的冰山结构紧密地堆积在溶质周围,这一不利的熵变又使得水分子倾向于保持原有结构。正是这些相互对抗、相互制约使得乙醇-水溶液体系需要经过一段时间之后才能达到基本稳定。

3.2 从基酒、新蒸出的酒、成品酒、沉淀酒样的电导率对

(上接第 50 页)

证明了,在检测国产啤酒有害菌时,培养基 CNFF-A 优于进口培养基。

3.2 对于同一菌种在同一稀释度及培养条件下,CNFF-A 在检测啤酒有害菌时,对啤酒有害的乳酸杆菌的检测更具选择性,检测能力强,更适合于对啤酒有害菌的检测,且缩短了检测时间。

3.3 CNFF-A 与进口培养基相比,其生产成本低,大大降低了啤酒生产检验的成本。

参考文献:

[1] 严伟杰,王德良,等.啤酒有害菌检测培养基优化研究[J].酿酒

比来看,存在明显差异。这也表明电导率可以作为衡量白酒质量稳定性的指标,可在企业内部推广应用,可对白酒事故作出异常分析判断。白酒电导率作为一个指标来衡量白酒质量,它不是一个确切的量值,而是控制在一定范围内,对防范白酒出现事故有一定的调控效果。因为白酒电导率与白酒生产工艺一系列流程有一定联系,如基酒含金属离子过高、加浆水质量不合格,包装后白酒电导率就会非常高。

3.3 不同溶液其电导率存在很大差异,这是由溶液的组成、物理化学性质不同而导致的。电导率是表征液体导电能力的参数,其值取决于溶液中所含离子的数目、种类、电价数和移动速率。

3.4 溶液是依靠离子传导电流,因此,溶液导电性的强弱是和溶液里自由离子的数目成正比的。同体积溶液中离子数目越多,导电性越强,导电性可由电导仪直接显示,用电导率可以间接估量液体内离子的多少。白酒的组成比较复杂,除了含有乙醇外,大部分是水,还有芳香烃、酸、脂、醛等成分;无水乙醇也含少量杂质(制酒用水有可能含有某些金属杂质、有机物质等),形成水的组成也较为复杂^[2]。对不同白酒体系的电导率变化规律作了定性分析,在后续研究中有待进一步从白酒溶液内部粒子相互作用等微观机理上对白酒电导率的变化做出更合理的解释。

3.5 对白酒浑浊、沉淀酒样电导率的分析可知,通过间接的方式了解白酒在货架期产生浑浊、沉淀的原因,可以通过一定的处理方法进行前期预防白酒在货架期产生事故。

参考文献:

[1] 罗丽萍.中国白酒的电导率及与品质控制的关系[J].中国酿造,2008,20(197):71-73.

[2] 杨颖,等.氦氛激光对白酒、乙醇电导率的影响[J].内蒙古科技与经济,2001(5):106.

科技,2009(11):58-61.

[2] Rudi F. Vogel, Jorgen Behr. Mechanisms of hop-adaptation in the emergence of beer spoiling *Lactobacillus brevis* [J]. Proceedings of the European Brewery Convention Congress, 2007, 1113-1119.

[3] Jay, Corinne. Nutritive medium for the culture of microorganism [P].United States Patent 5536645, 1996.

[4] 陈洁,王璋.麦芽根的综合利用研究进展[J].食品工业科技,1999,20(5):61-63.

[5] 钟环宇,许建军,等.利用响应面分析法优化 γ -氨基丁酸发酵培养基[J].无锡轻工业大学学报,2004,23(3):19-22.