

酒酒球菌计数方法研究

李 华, 黄 科, 罗 华

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以酒酒球菌为试验材料, 分别用平板计数法、浊度计法、分光光度计法进行计数, 所得的细胞数分别与对应的 NTU 值、OD 值建立回归方程, 方程分别为 $y=(0.0913+3.0075x) \times 10^7$; $y=(73.561x-4.8994) \times 10^7$ 。结果显示, 两个方程均有极显著的直线回归关系 ($P<0.01$), 但前者的回归系数大于后者。因此, 在酒酒球菌计数时最好用浊度计法代替平板计数法。

关键词: 微生物; 酒酒球菌; 平板计数法; 浊度计法; 分光光度计法

中图分类号: Q93- 3; TS261.1; O657.3 文献标识码: B 文章编号: 1001- 9286(2007) 03- 0030- 02

Study on Counting Method of *Oenococcus oeni*

LI Hua, HUANG Ke and LUO Hua

(College of Enology, Northwest A&F University, Yangling, Shanxi 712100, China)

Abstract: *Oenococcus oeni* was used as experimental material to count its number with three methods of colony counting method, nephelometer method and spectrophotometer method respectively. The tested numbers were used to establish regression equations respectively with their corresponding turbidity values and OD values, they were $y=(0.0913+3.0075x) \times 10^7$, $y=(73.561x-4.8994) \times 10^7$. The results showed that the odds of linear regression relationship of the two equations were greatly remarkable ($p<0.01$), and the former was better. Thereby, the method of nephelometer could replace colony counting method, and it would become the best way to count the number of *Oenococcus oeni*.

Key words: microbe; *Oenococcus oeni*; colony counting method; nephelometer method; spectrophotometer method

酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*) 是优良的葡萄酒乳酸菌, 是在葡萄酒中进行苹果酸- 乳酸发酵的启动者。在批量生产酒酒球菌制品的过程中, 常常需要测定活细胞的含量, 常用的方法有平板计数法、血球板计数法、菌落计数仪法、分光光度法 (OD 值法) 等^[1-4]。平板计数是一个经典的方法, 此法准确可靠, 但需预先制作专用的琼脂平板培养基, 计数时需经稀释、恒温培养、菌落计数等过程, 一般需要 6~8 d 才能完成, 且整个过程要求无菌操作, 非常繁琐、耗时; 血球板计数法虽然比较快速, 但是误差比较大; 菌落计数仪法是平板计数法的改进, 只是将肉眼的计数改成仪器计数, 而其他繁琐的步骤仍然不能省略; 分光光度法简便易行, 但是否适合在 ATB 培养基上生长的酒酒球菌的计数还有待于进一步检验; 而浊度计法还未见有人报道。

如果将酒酒球菌批量化生产, 随时都需要对生产中的各个指标加以在线监控, 尤其是活细胞的含量, 才能确保生产的顺利进行及产品的质量。因此, 有必要探索一种快捷、简便的活菌计数法。本试验对平板计数法、浊

度计法和 OD 值检测法 3 种实验方法进行相关性的探讨, 找出其直线回归关系, 以达到用浊度计法或者 OD 值法替代平板计数法、提高计数效率的目的。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 酒酒球菌 (*Oenococcus oeni* SD- 2a), 西北农林科技大学葡萄酒学院选育。

1.1.2 ATB 培养基 葡萄糖 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、酵母浸出物 5 g/L、硫酸镁 0.2 g/L、硫酸锰 0.05 g/L、L- 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L、番茄汁 250 mL/L, 用盐酸溶液或者氢氧化钠溶液将 pH 值调至 4.8 (固体培养基加 18 g/L 的琼脂)。

1.1.3 试剂 无菌水、75 % Vol 酒精溶液、0.1 mol/L NaOH 溶液、0.1 mol/L HCl 溶液。

1.1.4 仪器 UV- 1700 紫外可见分光光度计 (日本岛津制作所)、HACH 2100 型实验室浊度计 (美国 HACH 公司)、索福- RC5C- PLUS 冷冻离心机 (美国科峻仪器公

基金项目: 科学技术部科技型中小企业技术创新基金 O3C26226100292)。

收稿日期: 2007- 01- 17

作者简介: 李华 (1959-), 男, 重庆梁平人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事葡萄与葡萄酒研究工作, 出版论著多部, 发表论文多篇。

司)、HS型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、MJ-250B型霉菌培养箱(上海跃进医用光学仪器厂)、超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 离心菌悬液 转速为 7000 r/min、5000 r/min 和 3000 r/min, 每档转速的离心时间为 3 个水平: 即 4 min、6 min、8min。

1.2.2 平板计数法 取 1 mL 未处理的菌悬液或离心后的上清液于 9 mL 无菌水中, 如此作 10 倍递增稀释若干次, 吸取 100 μ L 涂布平板, 25 μ L 厌氧培养 5~7 d。

1.2.3 浊度计法 取未接种的 ATB 液体培养基、未处理的菌悬液及离心后的上清液若干, 超声波脱气 5 min, 再测其浊度。

1.2.4 分光光度计法 取未接种的 ATB 液体培养基、未处理的菌悬液及离心后的上清液若干, 于 600 nm 处测其 OD 值。

2 结果与分析

2.1 菌悬液活细胞数对应的浊度、OD 值 见表 1)

表 1 菌悬液活细胞密度及对应的 NTU 值、OD 值

项目	细胞数 a	NTU 值	OD 值
未处理	180	1960.5	2.223
处理 1	86	852.05	1.409
处理 2	52	498.05	1.036
处理 3	27	258.05	0.642
处理 4	15	101.45	0.245
处理 5	10	60.55	0.098
处理 6	8	46.35	0.06
处理 7	0.6	6.8	0.034
处理 8	0.3	3.52	0.027
处理 9	0.1	2.25	0.017

注: a 表示菌悬液活细胞数的单位是 10^7 cfu/mL。

由表 1 可以看出, 菌悬液的浊度和 OD 值随着细胞数的降低而降低。

2.2 回归关系的检验

2.2.1 相关系数检验法 对以上数据进行回归分析, 经检验后, 发现菌体密度和浊度、OD 值之间存在极显著的直线回归关系, 结果分别见表 2、表 3。

由表 2 可知, $r > r_{0.01}$, 说明菌体密度与 NTU 值之间存在极其显著的直线回归关系。将 $a = 0.0913$, $b = 3.0075$

表 2 菌体密度和 NTU 值回归分析的相关系数检验

相关系数	回归	离回归	总变异
SS	29168.0485	81.5115	29249.56
df	1	8	9
r	0.9986**		
$r_{0.05}$	0.632		
$r_{0.01}$	0.765		

注: **表示回归关系具有极显著性, 下同。

表 3 菌体密度与 OD 值回归分析的相关系数检验

相关系数	回归	离回归	总变异
SS	27783.1362	1466.4238	29249.56
df	1	8	9
r	0.9746**		
$r_{0.05}$	0.632		
$r_{0.01}$	0.765		

代入方程 $y = (a+bx) \times 10^7$, 得到菌体密度与 NTU 值的直线回归方程: $y = (0.0913+3.0075x) \times 10^7$ 。

由表 3 可知, $r > r_{0.01}$, 说明菌体密度与 OD 值之间存在极其显著的直线回归关系。将 $a = 4.8994$, $b = 73.561$ 代入方程 $y = (a+bx) \times 10^7$, 得到菌体密度与 OD 值的直线回归方程: $y = (73.561x - 4.8994) \times 10^7$ 。

3 结论

菌体密度与其对应的 NTU 值、菌体密度与 OD 值之间都存在着极显著的直线回归关系 ($P < 0.01$)。前者的相关性优于后者 ($0.9986 > 0.9746$), 因此, 实验中测定酒球菌菌体密度时最好用浊度计法代替平板计数法, 将所测的浊度值代入方程 $y = (0.0913+3.0075x) \times 10^7$ 即可求出菌体密度。

参考文献:

- [1] 周德庆. 微生物学教程(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.150-152.
- [2] 张春晖, 李华. 葡萄酒微生物学[M]. 西安: 陕西人民出版社, 2003.250-261.
- [3] 王世平, 高霞, 句立言. ProtoCOL 菌落计数仪在食品监测中的应用[J]. 中国卫生工程学, 2005, 1(3): 44.
- [4] Michael Putman, Robert Burton and Moon H. Nahm. Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit[J]. Journal of Immunological Methods, 2005, 302(7): 99-102.

- [4] 阚振荣, 张元亮, 李彦芹, 等. 植物细胞与基因工程研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003.
- [5] 陈霞, 陈廷登. - 乙酰乳酸脱羧酶在啤酒酿造中的应用[J]. 浙江工业大学学报, 1995, 23(1): 90-93.
- [6] 杨晓东, 孙文斌, 闵志伟, 等. 同产 - 乙酰乳酸脱羧酶的应用研究[J]. 酿酒, 2001, 28(1): 50-51.
- [7] 彭智辉, 林炜铁, 冯杰龙. 酶共催化降解啤酒中双乙酰含量的研究设想[J]. 酿酒科技, 2001, (1): 66-67.
- [8] Baker SA. Topics in Enzyme and Fermentation[J]. 1982, 4(4): 68-77.

(上接第 29 页)

参考文献:

- [1] 郑华军, 鲍晓明, 侯爱华, 等 6 人. 地衣芽孢杆菌 - 乙酰乳酸脱羧酶的纯化及酶学性质[J]. 山东大学学报, 2002, 37(2): 180-181.
- [2] 吴天祥, 杨海龙, 章克学. 应用包埋 - 乙酰乳酸脱羧酶改进啤酒发酵及控制的模型研究[J]. 酿酒, 2002, 29(1): 47-49.
- [3] 黄祖新. 控制啤酒酿造过程的双乙酰的生物工程进展[J]. 酿酒, 1998, (3): 12-14.