

# PCR 技术在酿酒中的应用

袁 丽<sup>1</sup>,高瑞昌<sup>2</sup>

(1.河北农业大学食品科技学院,河北 保定 071001;2.中国海洋大学生命与技术学部,山东 青岛 266003)

**摘要:** PCR 技术即利用聚合酶链反应,进行 DNA 片段的体外扩增,可用于发酵过程的特定菌的检验和鉴定,该方法快速、准确。PCR 技术有特异引物 PCR 技术、RAPD-PCR 技术和 Nested-PCR 几种。PCR 技术在酿酒中可用于啤酒中的腐败菌的鉴定、对葡萄酒中苹果酸-乳酸发酵(MLF)的检测和控制以及对葡萄酒中生物胺的检测。(孙悟)

**关键词:** PCR 技术; 应用; 啤酒; 葡萄酒

中图分类号:Q93-33; TS262.5; TS262.6; TS261.4 文献标识码:B 文章编号:1001-9286(2004)06-0070-02

## Application of PCR Techniques in Brewing

YUAN Li<sup>1</sup> and GAO Rui-chang<sup>2</sup>

(1.Food Science & Technology College of Hebei Agriculture University, Baoding, Hebei 071001, China;2.Life and Technique Dept. of China Ocean University, Qingdao, Shandong 266003, China)

**Abstract:** PCR techniques referred to the utilization of polymerase chain reaction to realize DNA segments spread in vitro. PCR techniques could be applied in the inspection and identification of specific bacteria during fermentation and the techniques have the characteristics of quickspeed and high accuracy. PCR techniques have several types including specific primer PCR technique, PAPPD-PCR technique and Nested-PCR technique. In brewing, the techniques could be used in the identification of putrefying bacteria in beer, the determination and control of MLF (malic acid-lactic acid fermentation) in grape wine, and the detecting of biogenic amine in grape wine. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** PCR techniques; application; beer; grape wine

聚合酶链反应又称 PCR 技术,是近几年发展起来的一种快速的特定 DNA 片段的体外扩增法,一般与电泳连用。PCR 技术可以用来对发酵中的某些特定菌进行检验和鉴定,与传统方法相比,它的最大特点是快速、准确。由于 PCR 产物在每个环节中都呈指数增长,而 PCR 的灵敏性决定于目的核酸的扩增,所以任何可以影响扩增因素的微小变化都将极大地影响 PCR 产物的量,造成常见的假阳性反应。本文对 PCR 技术的几种常见类型及在酿酒工业中的应用做了简要论述。

### 1 PCR 技术的几种常见类型

#### 1.1 使用一套特异引物的 PCR 技术

该 PCR 技术是在特定酶的作用下,提取相应的 DNA,加入到含特定引物的反应混合物中,进入热循环,终产物再经琼脂凝胶电泳进行检测。使用特异引物的 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性和灵敏度。从而为保证啤酒的质量提供了有效的微生物检测方法。

#### 1.2 RAPD-PCR 技术

RAPD-PCR 技术是利用较短的寡聚核苷酸引物扩增得到长短不一的 DNA 片段混合物。这些 PCR 产物经琼脂凝胶电泳之后所呈现的带型反映了扩增模板的 DNA 分子的总体特征。因此能够测定出 2 个生物体(不论是 2 个不同的物种还是同一物种的 2 个不同个体)基因组之间的差异。两个物种个体之间的亲缘越近,其相应的 PCR 扩增带型就越相似,反之则差异越悬殊。

使用 RAPD-PCR 技术,所需的 DNA 提取物少。实验证明,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,每一个引物仅能产生唯一的特异性指纹图谱,因为每一种菌都具有专一的特征图谱。将被检测样品的图谱与标准特征图谱对照便可得到鉴定结果。加拿大的 Labatt 公司的研究人员运用此技术可实现鉴别啤酒腐败菌的种和亚种。

#### 1.3 Nested-PCR

Nested-PCR 也称嵌套多聚酶链反应。研究发现,在发酵环境中酵母细胞,尤其是酵母细胞 $>3 \times 10^4$ 时,会对 PCR 产生干扰<sup>[1]</sup>。虽然采用对样品稀释会减少这种干扰,但同样也会降低检测水平,Nested-PCR 可以较好地解决这一矛盾。Nested-PCR 需要 2 套引物,第 1 套用于产生 PCR 扩增的 DNA 片段,此片段中含有第 2 轮 PCR 引物的结合位点;扩增靶 DNA。由于第 1 轮反应之后增加了靶 DNA 模板的数量,使第 2 轮 PCR 反应效率明显提高;此外,由于第 1 轮扩增产物比原 DNA 小,因而在第 2 轮反应中更易变性,也使得反应速度加快。因此,Nested-PCR 的反应速率会提高,特别是对含有高浓度酵母细胞的样品检测。

### 2 PCR 技术在酿酒中的应用

#### 2.1 PCR 技术在啤酒中的应用

到目前为止,PCR 技术在啤酒工业中的应用主要集中在运用 PCR 技术对啤酒中的腐败菌进行鉴定。乳酸菌是引起啤酒腐败最常见的微生物<sup>[2-3]</sup>。它对啤酒的危害最大,主要在啤酒发酵的中后期造成污染。乳酸菌种类很多,生物学分类上将它归为 4 大类,共 23 个属,包括乳杆菌属(*Lactobacillus*),链球菌属(*Streptococcus*)等,其中 *Lactobacillus spp.*和 *pediococcus spp.*是最主要的啤酒污染乳酸菌。大多数的乳酸菌属革兰氏阳性兼型厌氧菌,在有氧无氧条件下

收稿日期:2004-01-23; 修回日期:2004-07-15

作者简介:袁丽(1978-),女,山东人,硕士,助教,发表论文数篇。

均能生长,且适合在酸性环境下生长。它们对啤酒花有一定的抗性,结果会引起啤酒酸度下降,风味变差,严重的还会影响啤酒酵母的生长,使啤酒发酵无法正常进行<sup>[4-5]</sup>。大多数啤酒厂均采用传统的乳酸菌检测方法,通常需要4~7d,非常不利于啤酒生产中微生物的监控。

16s rRNA是原核生物体小亚单位上的一个RNA分子,分子量为 $0.6 \times 10^6$ D,由1500多个核苷酸组成<sup>[6]</sup>。16s rRNA的一级结构非常保守,而决定其一级结构的16s rRNA基因(16s rDNA)序列也非常保守。随着16s rRNA基因库的建立,可以发现同属或同种的微生物,16s rRNA序列之间保持很高的同源性。这种同源性物种间的亲缘关系有着密切的对应关系。现代微生物学中,利用16s rRNA序列来鉴定细菌的种类正在被成功的运用<sup>[7-11]</sup>。郑云飞等<sup>[12]</sup>根据16s rRNA的同源性分析了啤酒污染乳酸菌之间的亲缘关系,并在16s rRNA上找到了一对针对啤酒污染菌-乳酸菌的引物:BP-1和BP-2。研究证明,该引物与啤酒污染菌有较高的同源性,而与啤酒中其他的污染菌的同源性较差,实现了对啤酒污染乳酸菌的快速检测和鉴定。

## 2.2 PCR技术在葡萄酒中的应用

### 2.2.1 PCR技术对葡萄酒中苹果酸-乳酸发酵(MLF)的检测和控制

在葡萄酒的苹果酸-乳酸发酵(MLF)中,起主要作用的细菌是*Leuconostoc Oenos*(明串珠菌),所以对明串珠菌的快速检测和鉴定是控制葡萄酒中MLF的关键。PCR技术可实现快速直接的检验葡萄酒中明串珠菌。这是因为在明串珠菌的RNA中有一段-995bp的片段,该片段是明串珠菌RNA的特征片段,与之相对应的由两个引物用来延伸这一DNA片段,并进行特异性反应,以此来鉴定明串珠菌,其最大检出量为 $10^3$ cfu/ml,能有效地控制MLF中细菌的生长。

### 2.2.2 PCR技术对葡萄酒中生物胺的检测

生物胺,如组胺,是血管收缩剂,能刺激胃液流入胃中,并涉及各种变态反应。当生物胺浓度过高时,会引起人体不愉快的生理学反应。多种食物和饮料含有生物胺。乳酸菌能使氨基酸脱羧生成生物胺。因为葡萄酒的酿制包含MLF过程,所以生物胺的生成成为必然。Aline Lonvaud Funel证明了用PCR技术或DNA探针技术对生物胺进行检测的可行性<sup>[14]</sup>。Coton<sup>[15]</sup>等对葡萄酒中产组胺的乳酸菌出现的频率进行了研究,他们用PCR技术对来自法国S.W.的代表118种葡萄酒的250个完成MLF的酒样进行了检测。结果证明,约有49%的葡萄酒中含有组胺生成菌,并证明hdcA(HDC,组氨酸脱羧酶)基因的存在与否,HDC的活性和最终组胺的含量三者之间有密切的关系:在无hdcA基因存在情况下,HDC失活且无组胺酸生成;在有hdcA基因存在的情况下,HDC有活性且无组胺酸的生成;所有具有HDC活性的细菌都为*Leuconostoc Oenos*,并且其HDC活性在贮酒阶段依然存在。他们还发现,葡萄酒中组氨酸含量是变化的,一般在0.213~10.58mg/L之间,影响其含量的主要因素是组氨酸的含量;含有组胺的葡萄酒也含有其他生物胺如鸟胺和酪胺等<sup>[14]</sup>;不含组胺的葡萄酒只含有痕量的其他胺。因此可用PCR技术对组胺生成菌*L.oenis*进行早期检查,当然最有效的方法用一种无组胺生成的发酵剂来代替*L.oenis*<sup>[14]</sup>。

另外,在西班牙Alguacrl,M等用PCR技术对收获的葡萄和酿造厂中的收购车间和压榨车间中的*Dekkera spp.*进行了检测,有75%的酵母在各个不同的工序中被检出。

## 3 PCR技术的改进

为了提高检测的灵敏度,芬兰技术中心的实验者使用膜过滤技术来收集细胞,再使用NaOH-SDS处理,以除去啤酒中的PCR抑制因子。此方法所检测的*P.frisingensis*和*M.cerevisiae*的最低限

度分别为 $5 \times 10^6$ 和 $5 \times 10^4$ cfu/L<sup>[15]</sup>。为进一步提高检测的灵敏度,实验者又采用了菌体富集方法。使用一种更有效的快速生长培养基EC-MRS液体培养基对污染样品进行培养,即预富集。然后用PCR技术进行检测,所用时间小于8h,使腐败菌的最低检出量限度均小于100cfu/L<sup>[16]</sup>。我国的研究者也开始关注这一领域的研究。无锡轻工学院与青岛啤酒股份有限公司合作研究已进入工业化阶段,其主要是采用PCR技术对青岛啤酒生产过程中的微生物进行检测<sup>[17]</sup>。

总之,PCR技术作为一种微生物的快速鉴定分析的新的快捷方法,倍受国内外科研工作者的关注。它具有快速、准确等特点的同时,也存在一定的缺陷: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提取的DNA是来自死细胞还是活细胞,在定性鉴定的同时,定量操作的能力还显得不足。随着研究的深入,相信在不久的将来,PCR技术在酿酒工业中将得到更为广泛的应用。

## 参考文献:

- [1] Robert J Stewart, et al. Rapid Detection of Lactic Acid Bacteria in Fermenter Samples Using a Nested Polymerase Chain Reaction[J]. Brew. Chem. 1996,(2): 78-84.
- [2] 顾国贤. 酿造酒工艺学(第二版)[M].北京:中国轻工业出版社,1996.
- [3] Jacqueline L, et al. Simpson[J]. Journal of Bacteriology.1994, 635-638.
- [4] Manabu Sami, H, et al. Studies on the citric acid fermentation in lactic starter cultures with special interest in  $\alpha$ -aceto-lactic acid[J]. Brew. Chem. 1977,(4): 137-140.
- [5] Manabu Sami, H, et al. Of Fermentation And Bioengineering[J].Brew. Chem.,1997,(1):1-6.
- [6] 翟中和. 细胞生物学[M].北京:高等教育出版社,1996.
- [7] Keiichi Goto. Reclassification of *Brevibacillus Brevis*[J]. Appl. Microbiol. 2000: 1-8.
- [8] Yu-Li Song, et al. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR[J]. FEMS Microbiology Letters. 2000: 167-173.
- [9] J. Walter,G.W. Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers[J]. Applied And Environmental Microbiology,2000,(1): 297-303.
- [10] Wataru Funahashi, et al. Two Novel Beer-Spoilage *Lactobacillus* Species Isolated from Breweries[J]. Brew Chem. 1998,(2): 64-69.
- [11] Yasukazu Nakakita,et al. Isolation of Novel Beer-Spoilage Bacteria from the Brewery Environment[J].Brew Chem. 1998,(3): 114-117.
- [12] 郑云飞. 啤酒污染乳酸菌PCR引物的设计[J]. 酿酒,2002,(3):44-47.
- [13] Bartowsy, E. J, et al. Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenoccus Oeni* (formerly *Leuconostoc Oenos*) in grape juice and wine samples[J].Australian Journal of Grape and Wine Research 1999,(2): 39-44.
- [14] Coton, E, et al. Histamine producing lactic acid bacteria in wines: early detection frequency and distribution[J]. American Journal of Enology and Viticulture 1998,(2): 199-203.
- [15] Satokari R, et al. Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization [J].International Journal of Food Microbiology, 1998,(2): 119-127.
- [16] Rikka Juvonen,et al. Detection of Spoilage Bacteria in Beer by Polymerase Chain Reaction[J].Brew. Chem. 1999,(3):99-103.
- [17] 徐岩,等.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.