

啤酒有害菌检测培养基优化研究

严伟杰¹, 王德良², 曹健¹, 江伟²

(1.河南工业大学, 河南 郑州 450051; 2.中国食品发酵工业研究院, 北京 100027)

摘要: 采用麦根浸出物、精氨酸和叶酸优化改良了 2 种啤酒有害菌检测培养基 MRS 和 NBB。分别采用单因素试验和正交试验, 优化 2 种培养基的组分。确定 MRS 培养基中 3 种营养因子最佳添加量为麦根浸出物 20 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 220 mg/L。NBB 培养基的最佳添加量为麦根浸出物 50 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 140 mg/L。优化的 MRS 培养基形成的菌落明显比对照的大, 具有显著的增菌效果, 观察到优化后的 NBB 培养基变色时间比对照提前了 12 h, 具有显著的增菌效果。

关键词: 培养基; 优化; 啤酒有害菌; MRS; NBB

中图分类号: TS262.5; TS261.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)11-0058-04

Study on the Optimization of Detection Culture Medium of Beer Spoilage Bacteria

YAN Wei-jie¹, WANG De-liang², CAO Jian¹ and JIANG Wei²

(1.He'nan Industrial University, Zhengzhou, He'nan 450051; 2. China Food Fermentation Industry Research Institute, Beijing 100027, China)

Abstract: MRS and NBB, detection culture mediums of beer spoilage bacteria, were optimized by use of malt rootlet extract, arginine and folic acid. The compositions of the two culture mediums were optimized by single factor test and orthogonal experiments respectively. The best addition quantity of three nutritional factors in MRS culture medium was determined as malt rootlet extract 20 mg/L, arginine 0.75 g/L, and folic acid 220 mg/L. Their best addition quantity in NBB culture medium was determined as malt rootlet extract 50 mg/L, arginine 0.75 g/L and folic acid 140 mg/L. The diameter of colonies incubated with the optimized MRS culture media were bigger, and the number of colonies of beer spoilage bacteria increased obviously than before. The allochromism time of the optimized NBB culture medium was approximately 12 h shorter before and the number of beer spoilage bacteria also increased obviously.

Key words: culture medium; optimization; beer spoilage bacteria; MRS; NBB

啤酒厂十分重视对啤酒有害菌的检测, 普遍采用培养基检测技术, 其优点是简单易行, 便于观察和计数, 投资较少, 对仪器设备的要求较少等, 尽管目前国外已有很多的快速检测方法, 例如 ATP 生物发光法、PCR 法、免疫学方法、FISH 技术等^[1-4]的报道, 但由于这些方法在灵敏度及特异性方面的不足或设备及试剂耗材昂贵等原因而未能在啤酒厂广泛推广使用。

目前, 啤酒行业检测啤酒有害菌的培养基, 如 NBB、MRS 等都是依靠进口, 对于我国作为世界上连续 7 年为世界啤酒生产第一的地位不对称, 由于国内啤酒的特点与国外啤酒不一样, 如国外啤酒的苦味值比较高, 而苦味值高能够抑制啤酒有害菌的生长, 同时又由于国内啤酒趋向于淡爽, 且啤酒麦汁浓度较低, 我国当前啤酒原麦汁浓度主要以 7~8 Brix 为主, 而国外原麦汁浓度基本在 11 Brix 以上, 啤酒浓度越高, 意味着酒精度越高, 其对啤酒有害菌的抑制能力越高。由于国内啤酒的特点致使生

产的啤酒有害菌的种类和数量与国外啤酒可能存在一定程度的差异, 因此开发适合国内啤酒特点有害菌培养基是必要的。

基于目前国内啤酒有害菌常用 MRS 和 NBB 2 种培养基, 本研究采用麦根浸出物、精氨酸、叶酸 3 种生长因子来优化组合 NBB 和 MRS 培养基的配方。由于麦芽根营养丰富^[5], 蛋白质含量占麦芽根干重的 30% 左右, 矿物质含量也很高, 而且氨基酸组成非常合乎 FAO 推荐的必需氨基酸模式, 还含有大量的维生素、碱基等物质, 可作为微生物培养剂。Rudi F. Vogel^[6]发现精氨酸和乙偶姻代谢路径的启动可以调节 pH 值梯度差并降低未离解的酒精酸的含量, 增强细菌对酒花的耐受力, 含精氨酸高的啤酒可以作为有效的啤酒有害菌培养基来使用。叶酸是微生物体生长的一种重要的辅酶, 它能够对磺酰胺和甲氧苄氨嘧啶家族(抗菌增效剂)起作用, 有助于细菌的生长^[7]。

收稿日期: 2009-08-26

作者简介: 严伟杰, 男, 在读研究生。

1 材料与amp;方法

1.1 主要材料

某厂污染啤酒, MRS 培养基 (英国 OXOID 公司), NBB-P(德国 DOHLER 公司), 麦根浸出物由中国食品发酵工业研究院提供, 精氨酸和叶酸购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器和设备

厌氧罐, 厌氧产气袋(英国 OXOID 公司), 厌氧指示片 (英国 OXOID 公司), 显微镜 (奥林巴斯 BX41), pH 计, 生化培养箱。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基配制

MRS、NBB 按照英国 OXOID 公司的说明配制。

1.3.2 菌种分离、接种及培养

取某厂受污染的酒样涂布到 MRS 培养基上, 挑取单菌落, 划线分离纯化得到 2 株乳酸杆菌。将污染的酒样稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} , 吸取 0.1 mL 涂布于平板培养基上, 放入厌氧罐中 28 °C 厌氧培养 5 d。

1.3.3 培养基成分的优化

分别采用单因素试验优化麦根浸出物(A)、精氨酸(B)、叶酸(C)为因素水平, 其添加量水平见表 1。

表1 培养基成分优化因素水平设计

水平	A 麦根浸出物加量 (mg/L)	B 精氨酸加量 (g/L)	C 叶酸加量 (mg/L)
1	10	0.50	20
2	20	0.75	60
3	30	1.00	100
4	40	1.25	140
5	50	1.50	180

1.3.4 培养基成分用量的优化

采用正交设计 $L_9(3^4)$ 优化 1.3.3 选出的生长因子麦根浸出物(A)、精氨酸(B)、叶酸(C)的添加量, MRS 和 NBB 的生长因子的最佳添加量因素水平见表 2 和表 3。

表2 优化MRS培养基成分用量 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平设计

水平	A 麦根浸出物加量 (mg/L)	B 精氨酸加量 (g/L)	C 叶酸加量 (mg/L)
1	20	0.50	140
2	30	0.75	180
3	40	1.00	220

1.4 检出方法^[8]

1.4.1 Gram 染色

涂片→固定(火焰)→结晶紫染色(45~60 s)→水洗→革兰氏碘液 1 min→水洗→95%vol 乙醇脱色 30 s→复红 20 s→水洗→待干→镜检

表3 优化NBB培养基成分用量 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平设计

水平	A 麦根浸出物加量 (mg/L)	B 精氨酸加量 (g/L)	C 叶酸加量 (mg/L)
1	20	0.50	60
2	30	0.75	100
3	40	1.00	140

结果:紫色为革兰氏阳性菌,红色为革兰氏阴性菌。

1.4.2 过氧化氢酶试验

取一干净载玻片, 滴 1 滴 3%~5% H_2O_2 溶液, 用接种环刮取一定量的菌体与 H_2O_2 溶液混合均匀, 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, 有气泡为过氧化氢酶阳性。

1.4.3 显微镜观察

取一干净盖玻片, 盖在菌体与蒸馏水的混合液上, 在显微镜下观察(放大倍数应在 400 倍以上)。依据观察到的菌体形态, 结合以上试验结果, 确定啤酒有害菌的种类。

2 结果与分析

2.1 MRS 培养基成分优化

按表 1 设计的因素水平, 对 MRS 培养基进行单因素试验, 厌氧培养 5 d 后菌落计数, 结果见表 4~表 6。

表4 MRS 麦根浸出物对微生物菌的影响结果 (cfu/mL)

项目	麦根浸出物浓度 (mg/L)					
	0	10	20	30	40	50
10^{-3}	多	多	多	多	多	多
10^{-4}	420	330	400	500	430	440
10^{-5}	50	30	20	90	40	40
菌落种类	2	2	2	2	2	2

表5 MRS 精氨酸对微生物菌的影响结果 (cfu/mL)

项目	精氨酸浓度 (g/L)					
	0	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
10^{-3}	多	多	多	多	多	多
10^{-4}	420	360	560	460	470	410
10^{-5}	30	50	100	30	40	20
菌落种类	2	2	2	2	2	2

表6 MRS 叶酸对微生物菌的影响结果 (cfu/mL)

项目	叶酸浓度 (mg/L)					
	0	20	60	100	140	180
10^{-3}	多	多	多	多	多	多
10^{-4}	500	480	540	380	560	600
10^{-5}	60	50	70	40	50	70
菌落种类	2	1	2	2	1	2

3 种生长因子分别优化培养基时, 在第 2 天就可见培养基上开始形成极微小的菌落, 并且菌落成长较快。5 d 后形成的菌落较大, 发现培养基上形成了 2 种不同的菌落, 二者均较大, 圆滑。一种淡黄色, 中央凸起, 不规则

圆形,边缘无色;另一种菌落呈乳白色,凸起,规则圆形。挑取单菌落对它们进行革兰氏染色、过氧化氢酶试验,并利用显微镜观察菌体形态,2种菌均为革兰氏阳性,过氧化氢酶为阴性菌,显微镜下菌落为规则圆形的菌体杆状,短而直,成对时有八字形;不规则圆形菌体杆状,有些菌体有弯曲,可以确定二者均对啤酒产生危害,为乳酸杆菌。

由表 4 可以看出,在添加不同量的麦根浸出物时均产生 2 种菌落,在麦根浸出物的添加量为 30 mg/L 时乳酸杆菌的生长最好、形成的菌落数最多;在添加量为 10 mg/L 时形成的菌落数最少。如表 5 所示,在精氨酸的添加量为 0.75 g/L 时,形成的菌落数最多。

由表 6 可知,叶酸在 20 mg/L 和 140 mg/L 时仅观察到 1 种菌落,而在其他的几个添加量时都观察到了 2 种菌落,并且添加量超过 100 mg/L 时菌落呈黄色,但以添加量为 180 mg/L 时的效果最好,菌落数最多。比较后,确定麦根浸出物 30 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 180 mg/L 为最佳的添加量。

2.2 NBB 培养基成分优化

按表 1 单因素水平设计,对 NBB 培养基进行优化,结果见表 7~表 9。

表 7 NBB 培养基麦根浸出物对微生物菌的影响结果 (cfu/mL)

项目	麦根浸出物浓度 (mg/L)					
	0	10	20	30	40	50
10^{-3}	多	多	多	多	多	多
10^{-4}	480	610	480	640	540	600
10^{-5}	20	10	20	50	40	50
菌落种类	1	1	1	1	1	1

表 8 NBB 精氨酸对微生物菌的影响结果 (cfu/mL)

项目	精氨酸浓度 (g/L)					
	0	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
10^{-3}	多	多	多	多	多	多
10^{-4}	500	560	600	470	440	510
10^{-5}	30	50	60	60	50	10
菌落种类	1	1	1	1	1	1

表 9 NBB 叶酸对微生物菌的影响结果 (cfu/mL)

项目	叶酸浓度 (mg/L)					
	0	20	60	100	140	180
10^{-3}	多	多	多	多	多	多
10^{-4}	540	560	590	660	670	470
10^{-5}	30	30	70	70	40	20
菌落种类	1	1	1	1	1	1

NBB 培养基中含有氯苯酚红,会随着啤酒有害菌产酸而变黄,培养 3 d 时发现培养基开始变黄。由表 7~表 9 可以看出,NBB 仅长出 1 种菌,菌落都相同,菌落较 MRS 5 d 后的结果要小,乳白色,规则圆形,边缘无色,革

兰氏阳性,过氧化氢酶阴性细菌。显微镜下菌体呈短杆状,短而直,大多单个存在,成对时呈典型的八字形,也有特长的杆菌,可以鉴定为乳酸杆菌。

由表 7 可以知道,麦根浸出物试验,未添加和麦根浸出物浓度在 20 mg/L 时形成的菌落数最少,在添加量为 50 mg/L 和 10 mg/L 时形成的菌落数和 30 mg/L 时差别较小,啤酒有害菌在麦根浸出物添加量 30 mg/L 时,形成的菌落数最多,结果最好,这和优化 MRS 的结果一致。由表 8 可以看出,当精氨酸添加量为 1.25 g/L 时形成的菌落数最少,为 0.75 g/L 时形成的菌落数最多,与 MRS 优化结果相同。表 9 表明,叶酸添加量为 100 mg/L 时产生的效果最好,并且出现与 MRS 优化时的结果,当添加量达到 100 mg/L 时菌落开始带有黄色。比较结果后,确定 3 种生长因子的最佳添加量分别为麦根浸出物 30 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 100 mg/L。

2.3 MRS 培养基成分用量优化

按表 2 的因素水平设计,采用正交设计 $L_9(3^4)$ 优化 MRS 培养基中生长因子麦根浸出物(A)、精氨酸(B)、叶酸(C)的用量,菌落计数结果见表 10。

表 10 优化 MRS 培养基中生长因子 $L_9(3^4)$

实验号	正交试验结果			菌落数
	因素			
	A	B	C	
1	1	1	1	1.02×10^3
2	1	2	2	1.70×10^3
3	1	3	3	1.65×10^3
4	2	1	2	8.7×10^2
5	2	2	3	1.41×10^3
6	2	3	1	1.19×10^3
7	3	1	3	1.42×10^3
8	3	2	2	1.51×10^3
9	3	3	1	1.18×10^3
K_1	4.37×10^3	3.31×10^3	3.39×10^3	
K_2	3.47×10^3	4.62×10^3	4.08×10^3	
K_3	4.11×10^3	4.02×10^3	4.48×10^3	
R	900	1310	1090	

比较表 10 中 R 值得出,MRS 培养基中影响结果的显著因素顺序为:B(精氨酸)>C(叶酸)>A(麦根浸出物)。由此说明,精氨酸比叶酸和麦根浸出物更能促进啤酒有害菌的生长,当精氨酸取 2 水平时,效果最好。麦根浸出物和叶酸对啤酒有害菌的生长具有一定的促进作用。麦根浸出物虽然各种营养丰富,但不如精氨酸和叶酸作用大。麦根浸出物的 K_1 最大,所以麦根浸出物的最适浓度为 20 mg/L。同理,精氨酸的最适浓度为 0.75 g/L,叶酸的最适浓度为 220 mg/L。添加到 MRS 中的最佳组合为 $A_1B_2C_3$ 。

2.4 培养基成分用量优化

按表 3 的因素水平设计,采用正交设计 $L_9(3^4)$ 优化 NBB 培养基中生长因子麦根浸出物、精氨酸、叶酸的用量,试验结果见表 11。

表 11 优化 NBB 培养基中生长因子 $L_9(3^4)$

实验号	正交试验结果			菌落数
	因素			
	A	B	C	
1	1	1	1	430
2	1	2	2	500
3	1	3	3	420
4	2	1	2	450
5	2	2	3	550
6	2	3	1	390
7	3	1	3	460
8	3	2	2	430
9	3	3	1	530
K_1	1350	1340	1350	
K_2	1390	1480	1380	
K_3	1420	1340	1430	
R	70	140	80	

根据表 11 可知,对 NBB 培养基影响最显著的因素是精氨酸,这和 MRS 相同,再次证明了精氨酸对啤酒有害菌的生长具有很大的促进作用,对研究啤酒有害菌提供了新的信息。叶酸和麦根浸出物在 NBB 培养基中对啤酒有害菌的影响大致相同,都起到了一定的促进作用。麦根浸出物的 3 水平优于 1 水平和 2 水平,确定其最终浓度为 50 mg/L; 精氨酸的 K_2 最大,确定最终浓度为 0.75 g/L; 同理,叶酸的最终浓度为 140 mg/L,添加到 NBB 培养基中的 3 种营养因子的最佳组合为 $A_3B_2C_3$ 。

2.5 验证试验

根据添加到 MRS 和 NBB 培养基中的 3 种营养因子的最佳组合,分别以各自未添加任何物质的培养基为对照,28 °C 厌氧培养 5 d,菌落总数为指标做验证试验。MRS 培养基: $A_1B_2C_3$ 组合的培养基中形成的菌落数为 1.71×10^3 cfu/mL,而在 MRS 培养基中的菌落数仅为 1.43×10^3 cfu/mL,并且可以明显地观察到优化后的培养基上形成的菌落要大于对照。所以,确定优化 MRS 培养基为 $A_1B_2C_3$,即麦根浸出物 20 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 220 mg/L。NBB 培养基: $A_3B_2C_3$ 组合的培养基中啤酒有害菌的菌落数为 5.9×10^2 cfu/mL,对照培养基中的菌落数仅为 4.3×10^2 cfu/mL,并且优化的培养基在 36 h 就可以观察到培养基的变色现象,而对照需要 48 h,可见优化

后的 NBB 培养基上细菌的生长速度加快,确定 NBB 培养基的优化组合为 $A_3B_2C_3$,即麦根浸出物 50 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 140 mg/L。

3 结论

3.1 在单独添加麦根浸出物、精氨酸和叶酸到 MRS 中时,最佳添加量为麦根浸出物 30 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 180 mg/L。3 种营养因子单独添加到 NBB 中时,最佳添加量为麦根浸出物 30 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 100 mg/L。

3.2 确定 3 种营养因子优化 MRS 培养基最佳配比为:麦根浸出物 20 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 220 mg/L。优化 NBB 培养基的最佳配比为:麦根浸出物 50 mg/L、精氨酸 0.75 g/L、叶酸 140 mg/L。

3.3 MRS 培养基比 NBB 培养基在对啤酒有害乳酸杆菌的检测上更具选择性,检测能力强,更适用于对啤酒有害菌的检测。

3.4 精氨酸对啤酒有害菌尤其是乳酸杆菌有巨大的促进作用,能够增强啤酒有害菌的成长,为进一步研究啤酒有害菌奠定基础。

参考文献:

- [1] Nakakita, Y, Takahashi, T. A strategy for detection of all beer-spoilage bacteria[J]. J. Am. Soc. Brew.Chem, 2002, 60-63.
- [2] 田小群,周世宁.基于 16SrDNA 的 PCR 快速鉴定啤酒腐败菌的研究[J].酿酒,2006,33 (2):51-54.
- [3] March C, Manclu'S J, et al.Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera[J]. J. Immunol Methods, 2005, 303(1):92-104.
- [4] Yasuhara T, Yuuki T, et al. Novel quantitative method for detection of Pectinatus using rRNA targeted fluorescent probes[J]. J.Am.Soc.Brew.Chem, 2001, 59(3): 117-121.
- [5] 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.
- [6] Rudi F. Vogel,Jurgen Behr.Mechanisms of hop-adaptation in the emergence of beer spoiling *Lactobacillus brevis*[J]. Proceedings of the European Brewery Convention Congress,2007,1113-1119.
- [7] Jay, Corinne.Nutritive medium for the culture of microorganism [P].United States Patent 5536645,1996.
- [8] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,1994.

江苏洋河酒厂招股

本刊讯:江苏洋河酒厂股份有限公司发布首次公开发行股票招股意向书。此次洋河股份拟公开发行 4500 万股,占发行后总股本的 10.00%。根据安排,10月20日至10月22日为询价推介日。10月27日为网下申购缴款日和网上发行申购日。公司此次募集资金将用于名优酒酿造技改项目、名优酒陈化老熟和包装技改项目、白酒酿造副产物循环再利用项目和营销网络建设项目。(江源)