

啤酒花及其抗菌机理研究进展

张小军¹, 郝彦玲², 寇晓虹^{1,3}, 罗云波², 田洪涛², 郭兴华⁴

(1.山西农业大学食品学院,山西 太谷 030801; 2.中国农业大学,北京 100083; 3.天津大学农业与生物工程学院,天津 300072; 4.中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘要: 就国内外对酒花的研究、啤酒花的发展及其应用历史、啤酒花的成分、酒花抗菌物质进行了分析和综述。重点对啤酒花的抗菌机理和抗菌特性进行了阐述。通过介绍一些常用和最新检测啤酒腐败菌的方法,论述了酒花抗菌机理对啤酒腐败菌检测的影响意义,展望了啤酒腐败菌检测的发展趋势。

关键词: 啤酒花; 抗性机理; 啤酒腐败菌; 短乳杆菌; 检测

中图分类号: TS262.5; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2007)04-0109-04

Research Advance in Hops and Its Antibacterial Mechanism

ZHANG Xiao-jun¹, HAO Yan-ling², KOU Xiao-hong^{1,3}, LUO Yun-bo², TIAN Hong-tao² and GUO Xing-hua⁴

(1.Food College of Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 030801; 2. China Agricultural University, Beijing 100083; 3.Agriculture & Bioengineering College of Tianjin University, Tianjin 300072; 4.Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: The research advance in hops domestically and abroad, the development of hops and its application history, the compositions of hops and the antibacterial substances of hops were introduced in this paper. The antibacterial mechanism and properties of hops was also elaborated. On the basis of the introduction of some common and the latest detection methods of beer spoilage bacteria, the significance of hops antibacterial mechanism for the detection of beer spoilage bacteria was put forward. Finally, the development trend of beer spoilage bacteria detection was predicted.

Key words: hops; mechanisms of hops resistance; beer spoilage bacteria; lactobacillus brevis; detection

啤酒作为一种非常受欢迎的国际性饮料,已经成为人们日常生活中最普通的饮品。因此,对于啤酒酿造及其质量问题也是国内外学者和从事啤酒行业工作者研究的重点。特别是对啤酒腐败现象研究比较深入。而啤酒花不仅与啤酒特有的质量风味有关,而且还有一定的抗菌性。因此对于啤酒花及其抗菌机理的研究显得尤为重要。一方面,通过了解啤酒花及其对抗菌机理的研究可以提高啤酒的质量风味,增强消费者对啤酒的追求和对饮品的享受;另一方面,通过这些研究可以进一步保证啤酒的质量,减少啤酒腐败,最大限度地减少对消费者的伤害,以及由此引发的经济损失。

1 酒花

1.1 酒花及其历史

酒花,又名啤酒花(Hop Compounds, Humulus lupulus)。它是啤酒产生愉悦苦味的主要物质,所以它是啤酒

酿造必不可少的主要物质之一^[1]。除此之外,人们在使用酒花酿造啤酒的过程中发现,酒花不仅能使啤酒产生特有的味道,而且它还有一个很大的贡献——天然的啤酒防腐剂,因为它能抑制许多啤酒腐败菌,特别是对绝大多数革兰氏阳性菌^[2-5]。

啤酒花的产生已有5000~7000年的历史了。公元前6世纪就有记录,啤酒花在花园中被作为一种装饰品来种植的,9世纪时开始酒花被作为香料使用。12世纪,德国人开始在啤酒酿造中使用酒花,在此之前,人们是用各种不同的果实、草本植物来使啤酒产生苦味的。到14世纪啤酒的出口使得产量大幅度提高,人们对酒花的需求也越来越多。在1516年, Wilhelm IV 通过法律规定酿造啤酒必须使用酒花。从那时起各国都制定了相应的法律法规,酒花也越来越受到人们的重视和欢迎^[1]。

1.2 酒花成分

基金项目: 国家 863 计划项目资助(No.2006AAA108317)。

收稿日期: 2007-01-24

作者简介: 张小军(1980-),男,山西保德人,在读硕士研究生,从事啤酒腐败菌检测的研究。

通讯作者: 罗云波,男,教授,博士生导师。

酒花植物,是藤本植物属大麻家族,有雄雌异株之分,只有雌株才在酿酒工业中使用。这种雌性花叫球果,天然的球果包括金黄色的树脂颗粒、蛇麻素(啤酒苦味素),它们是使啤酒具有苦味和防腐能力最重要的物质。其成分具体如图1。

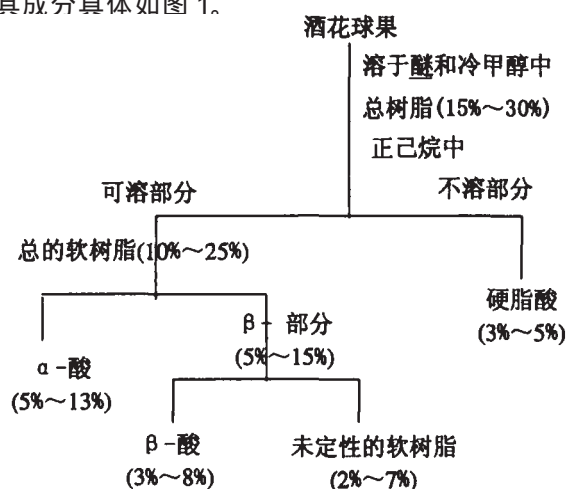


图1 酒花树脂的成分

1.3 啤酒花的抗菌物质

1888年 Hayduck 第一次研究表明,酒花的抗性是取决于啤酒花物质中的软树脂。1922~1944年,英国酿酒学院在 Walker 的带领下进行了长期的研究,这些研究主要集中在 α -酸片段(humulone)和 β -酸片段(humulone),研究表明^[1], β -酸很难转移到啤酒中,因为在酿酒过程中,会转化为异 β -酸,它比 β -酸更易溶于啤酒中,也比 α -酸更苦。因此异 β -酸是啤酒中能抗菌的主要物质。1950年, Rigby 和 Berhune(1952,1953)研究表明, α -酸是由葎草酮、辅葎草酮和加葎草酮组成的化合物,它们的化学结构也已经很清楚了。 β -酸在麦芽汁和啤酒中的溶解度很低,所以 β -酸在啤酒中的含量很低。

2 酒花的抗菌机理

并不是所有能在啤酒中生长的细菌就是啤酒腐败菌,只有那些既能在啤酒中生长又能使啤酒发生一定浊度、粘度、异味等腐败现象的细菌才是啤酒腐败菌。而几乎所有的啤酒腐败菌都属于乳酸菌。由于啤酒的特殊环境,低氧、低 pH、低营养成分和高二氧化碳以及一定量的乙醇和酒花物质,所以,仅有一部分乳酸菌为啤酒腐败菌。啤酒中的腐败菌包括乳杆菌属、片球菌属等^[3-4]。而乳杆菌属中的短乳杆菌,又是最典型的啤酒腐败菌之一,因此,对于短乳杆菌的抗酒花机理研究有非常重要的意义。

2.1 短乳杆菌的抗酒花机理

短乳杆菌是啤酒腐败菌中最严重的腐败菌之一^[7],之所以有这样的腐败能力,与它的抗酒花性是密不可分的。

的。自日本学者从短乳杆菌 ABBC45 的质粒上获得一与酒花抗性有关的基因 horA 以来,国内外许多学者都致力于酒花抗性机理研究,尤其是对短乳杆菌^[8]。

对于酒花的抗性,早在 1950 年就开始研究。目前人们认为酒花抗性有以下几个特点:酒花抑制革兰氏阳性菌,而对革兰氏阴性菌没有作用;酒花抗性与细胞壁的渗透性有关。这些酒花能使短乳杆菌的细胞质膜发生泄漏,结果使糖、氨基酸、蛋白质、呼吸作用、RNA、DNA 的转运受到限制^[1]。

2.1.1 抗菌物质对啤酒污染菌的影响

短乳杆菌中反式异葎草酮能减少亮氨酸的吸收,还引起积累的亮氨酸泄漏,且能消除质子驱动力产生的跨膜 pH 梯度,但对跨膜电势能没有影响。研究表明,未解离的反式异葎草酮作为离子载体催化电中性的未解离的异葎草酮的流入,内部以葎草酮解离物和异葎草酮与二价阳离子的化合物流入,而乳酸菌中又有高浓度的阳离子存在,这就导致了跨膜 pH 梯度的下降^[1]。

2.1.2 短乳杆菌的抗酒花稳定性

短乳杆菌是啤酒中腐败乳酸菌的代表,次级培养能使其抗性减小,在没有酒花的培养基中培养,这种抗性会减弱,但要降到最低,至少需一年。这说明乳酸菌对酒花抗性是稳定的,当然它们对酒花抗性的稳定性也是随菌株的不同而有差异的。如短乳杆菌 BSO310 酒花的抗性不能通过质粒的自我修复或 UV 诱变而改变,而短乳杆菌 ABBC45 则可通过此方法提高其抗性^[1,9]。

2.1.3 酒花抗性菌株和敏感菌株的抗酒花机理

Fernandez 和 Simpson 将乳杆菌和片球菌的酒花抗性菌株和敏感菌株的比较中发现,它们在细胞形态、菌落形态、生长 pH 范围、糖利用类型和代谢产物没有明显的差异。然而,由于酒花通过细胞质膜进入细胞解离,使得它们在跨膜 pH 梯度(pH)和细胞内 ATP 库有很大的不同。酒花抗性细胞和酒花非抗性细胞图见图 2。

酒花物质能充当离子运载体来实现质子和细胞内的阳离子交换,在酒花敏感细胞中,酒花物质(Hop-H)进入细胞中并解离,同时结合细胞内的一些阳离子(如锰离子),从细胞中释放出,结果使跨膜质子梯度(pH)和质子驱动力(pmf)减小,由此而引起的营养缺失而使细胞死亡。而在酒花抗性菌株细胞中酒花物质可通过 horA 从细胞中排出(Sakamoto et al., 2001);也可能通过质子驱动力来运输(Suzuki et al., 2002);H⁺-ATP 酶增加使得从酒花复合物中释放出的质子排出(Sakamoto et al., 2002)。Simpson 和 Fernandez 等研究表明抗酒花菌株中比敏感菌株中有更多的 ATP。另外,啤酒腐败菌细胞中半乳糖磷壁酸和可变的半乳糖苷磷酸甘油酯也增加了酒花进入细胞的屏障^[1]。

2.1.4 抗性菌株抗酒花机制

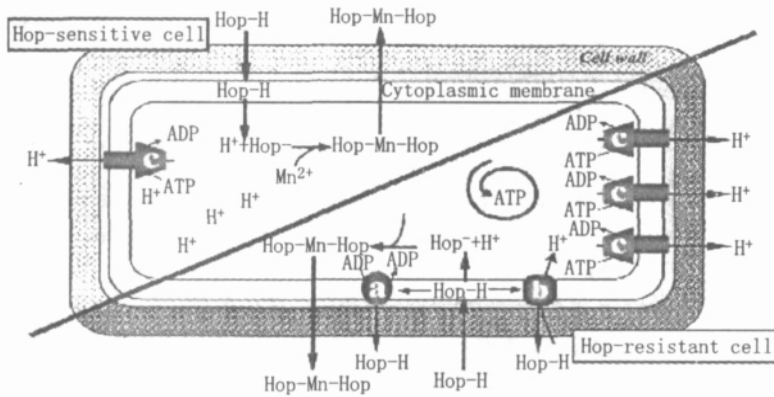


图2 酒花抗性细胞和酒花非抗性细胞示意图^[1]

综上所述,对啤酒腐败菌(酒花抗性菌株)的抗菌机制,可以总结为以下几个方面:

当在相对较低 pH 的啤酒环境中,腐败菌细胞内的 H^+ -ATP 酶活性增加,酒花抗菌物质以 Hop-H 形式进入腐败菌细胞中与细胞内阳离子进行交换后释放出的 H^+ 被从细胞内释放出来。这样抑制了细胞内外的质子跨膜梯度(pH) 的下降,从而保证了细胞的营养物质的运输动力。

腐败菌细胞内的 H^+ -ATP 酶活性增加,ATP 的生成速度加快,从而加快了抗酒花菌株细胞膜上依赖 ATP 的 HorA 进入细胞中的未解离的酒花物质从细胞内释放到细胞外,同时协同作用还有依赖质子泵(PMF) 的运输载体,从而减少酒花对细胞的伤害。

酒花抗性菌株中,阳离子运输载体(HitA) 严格限制二价阳离子特别是 Mn^{2+} 的排出,从而限制了未解离的酒花物质与细胞内 H^+ 进行交换,进而抑制了酒花物质进入细胞内。

啤酒腐败菌细胞中半乳糖磷壁酸和可变的半乳糖苷磷酸甘油酯也增加了酒花进入细胞的屏障。

2.2 抗酒花菌株的抗性特点

Fernandez 和 Simpson 的研究还发现,具有酒花抗性的菌株还有以下几个特点^[9]。

对酶的药物钝化。在短乳杆菌酒花抗性菌株中,它既不转换也不钝化反式异萜草酮。

改变目的物。通过突变和酶修饰来改变细胞目的物来减小目的物与抗体的亲和力。

抑制药物流入。革兰氏阴性细胞抑制亲脂性药物的流入,而革兰氏阳性的分枝细菌的细胞壁也是抑制酒花渗入的一个有效屏障,同样抗酒花乳酸菌中半乳糖苷磷壁酸甘油酯也是影响酒花流入的因素。

迅速排出药物。对酒花抗性菌株的研究发现,它们都有一定的抗药性。在许多细胞质膜中存在抗病性泵。如短乳杆菌 ABBC45 在其环境中含有酒花时,抗药性基因 horA 就会充分的表达,从而将酒花从细胞中

排出^[6]。

3 啤酒中常见的腐败菌及其检测方法

3.1 啤酒中的腐败菌

能引起啤酒腐败的微生物有许多,主要包括一些乳酸菌、醋酸菌、野生酵母。根据这些腐败菌对氧的需求不同分为好氧菌、专性厌氧菌和兼性厌氧菌^[4]。

3.1.1 好氧菌

啤酒中常见的好氧腐败菌有醋酸菌和枯草杆菌。醋酸菌在冷麦芽汁中就能开始繁殖,产生醋酸,但进入发酵后期,随着氧的耗尽而死亡。枯草杆菌孢子虽然具有很强抗热性,加热至 100 还能生存数分钟至数十分钟,但它在啤酒中生长受到极大的抑制。因此,一旦感染枯草杆菌普通的巴氏灭菌和高温瞬时灭菌都很难将它杀灭。

3.1.2 专性厌氧菌

常见的专性厌氧啤酒腐败菌有果胶杆菌和巨型球菌。果胶杆菌能引起混浊,产生丙酸;巨型球菌也能引起沉淀和混浊,给啤酒的感官性和品质造成一定的危害。

3.1.3 兼性厌氧菌

乳酸菌是啤酒中常见的兼性厌氧腐败菌,在啤酒中生产乳酸,增加啤酒酸味,某些种还产生双乙酰,影响啤酒口味。主要有乳酸杆菌、片球菌、明串珠菌、乳酸球菌,乳酸杆菌影响尤为严重。

啤酒中的特殊环境使得绝大多数细菌不能生存,特别是一些革兰氏阴性致病菌。啤酒中产生苦味、清爽的物质——啤酒花又对大多数革兰氏阳性菌有抑制作用,而乳酸菌却例外。另外,随着科学技术的发展,现代大型啤酒发酵设备使得好氧腐败菌已经不是主要的腐败菌。厌氧菌(包括专性和兼性厌氧菌)成为主要的啤酒腐败菌,特别是兼性厌氧菌更为猖獗。因此,乳酸菌是啤酒中最严重的腐败菌。

3.1.4 啤酒中的乳酸菌

几乎所有的啤酒腐败菌都属于乳酸菌,虽然啤酒花对革兰氏阴性菌没有抑制作用,但大多数革兰氏阴性菌不能在啤酒中生长,特别是一些致病菌(如沙门氏菌)。尽管啤酒花对绝大多数革兰氏阳性菌有一定的抑制作用,但有一些乳酸菌(革兰氏阳性菌)却能很好的在啤酒中生长并能使啤酒腐败。特别是乳杆菌属、片球菌属中的一些种尤为严重,短乳杆菌和有害片球菌是它们的代表。它们能引起啤酒酸度升高、产生异味、粘度增加等不良腐败现象。

3.2 检测方法

3.2.1 传统的检测方法

最常用的检测方法是把腐败菌通过选择性培养基

培养进行鉴定,常用的乳酸菌选择性培养基有 MRS、BMRS、NBB、UBA、HLP 等^[1,9]。然后通过一系列的生理生化试验进行鉴定。或通过分类学进行鉴定,再接种到啤酒中检验其腐败能力。这种方法的缺点是耗时长、操作繁琐、检测不准确等。

3.2.2 PCR 检测方法

K.suzuki 等^[7]的研究表明,抗酒花基因 horA 与啤酒腐败菌有很大的关系。所以,通过 PCR 扩增 horA 基因来检测啤酒腐败菌的研究经常出现在相关文献中;也有人用 16srDNA 和 23srDNA 之间的间隔区的特异性来设计引物,通过 PCR 技术来检测啤酒腐败菌。另外,RAPD-PCR 也是用来检测啤酒腐败菌的一种方法;田小群等^[10]通过对啤酒腐败菌和非腐败菌的 16srDNA 序列比对,用腐败菌特有的序列设计引物,从而通过 PCR 技术来检测啤酒腐败菌。

近年来,除了从微生物形态上和生理生化特征方面鉴定外,还用有机酸色谱分析法,抗原抗体法,DNA-DNA 分子杂交等方法来鉴定啤酒中的腐败菌。

PCR 检测啤酒腐败菌是近年来随着分子生物学、免疫学、计算机等的发展而发展起来的一种新型啤酒腐败菌检测技术,它有方便、快捷、准确等优点,所以深受企业和研究者的欢迎。

啤酒腐败菌对啤酒质量的影响不仅给相关企业造成一定的经济损失,也对消费者健康产生一定的危害。而啤酒腐败菌能在啤酒特殊的环境下生长繁殖,与它们对啤酒花的抗性是分不开的。因此,对啤酒花的抗菌机理研究的进一步深入,啤酒腐败菌的检测将会有新的突破。目前,Manabu Sami 等^[8]人已经通过从抗酒花的短乳杆菌 ABBC45 中的质粒中发现 horA 基因对酒花的抗性有很大的相关性,对其中较为保守序列(342bp)进行扩增,检测啤酒腐败菌。该方法已经成功地对啤酒中的短乳杆菌、干酪乳杆菌、胚芽乳杆菌进行了扩增检测^[9]。最近,Koji Suzuki 等^[11]通过扩增 horB、horC 基因来检测啤酒中的短乳杆菌也取得了很好的效果,而且减少了由扩增 horA 检测引起的假阳性。总之,随着人们对抗酒花机理的进一步理解,啤酒腐败菌的检测将向基因水平、分子水平和快速检测发展。因此,PCR 技术将成为啤酒

腐败菌检测不可缺少的手段,特别是一些调控酒花抗性基因的发现更加速了 PCR 技术对啤酒腐败菌的检测发展^[12~14]。

参考文献:

- [1] Kanta Sakamoto,Wil N.konings,Beer spoilage bacteria and hop resistance.International[J]. Journal of Food Microbiology, 2003,89,105- 124.
- [2] 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): 116.
- [3] 闫雪,姚卫容,钱和.国内外食品微生物快速检测技术应用进展[J].食品科学,2005,(6): 26.
- [4] 吴红.啤酒的微生物检验技术[J].酿酒,2000,(5): 34- 38.
- [5] 徐岩,张丽萍,顾国贤.聚合酶链式反应(PCR)技术鉴定啤酒腐败菌的最新进展[J].酿酒科技,2000,(5): 27.
- [6] 郝秋娟,董翠英,李崎.啤酒腐败细菌与酒花抗性[J].酿酒科技,2005,(9): 135.
- [7] K.suzuki,M.koyanagi,H.Yamashita[J]. Journal of Applied Microbiology,2004,96: 946- 953.
- [8] Manabu samin, Yamashita H., Kadokura H[J].J.Am.Soc.Brew., 1997, 55(4): 137- 140.
- [9] L.Jespersen, M.Jakobsen.International[J].Journal of Food Microbiology, 1996 ,(33): 139- 155.
- [10] 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.
- [11] Koji Suzuki, Kazumarulijima, Kazutaka, et al.Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria[J].Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5089- 5097.
- [12] T.Fujii,k.Nakashima ,N.Hayashi.Random amplified polymorphic DNA-PCR based cloning of marker to identify the beer-spoilage strains of *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus coryniformis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98, 1209-1220.
- [13] Tetsuji Yasui, Tomoyuki Okamoto, Hiroshi Tayachi.Can[J].J. Microbiol., 1997, 43: 157- 163.
- [14] Thomas A Tomapkins, Robert Stewart, Louse Savard.J[J].Am. Soc.Brew.Chem., 1993, 29(6): 40- 41.

燕京啤酒 2006 年实现利税 19 亿元

本刊讯:2006 年,燕京啤酒集团完成啤酒总产销量 353 万千升,同比增长 13.33%;实现销售收入 91.30 亿元,同比增长 12.87%;实现利税总额 19.18 亿元,同比增长 13.51%。

2006 年以来,燕京啤酒集团继续推行构建北京、广西、福建、湖北、内蒙古五大强势核心市场区域的战略,以点带面,全面推进。现在,燕京啤酒全国市场占有率超过 11%,其中,北京市场仍占有 85% 以上的份额,广西市场占有率达到 80% 以上,内蒙古市场占有率达到 70% 以上,福建市场占有率达到 50%,湖北市场继续保持了湖北省净增量第一位置。(京)