

一株啤酒污染菌的分离鉴定及快速检测方法^{*}

田小群, 周世宁

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 在成品瓶装啤酒中分离得到 1 株有害的污染菌。经表型性状分析、生理生化反应、G+C 含量测定以及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为 *Lactobacillus acetotolerans*。建立了 1 种新的快速鉴定啤酒有害菌的 PCR 方法, 这种方法基于抗酒花基因 *hpaA* 的部分序列。用传统的检测方法检测有害菌需要 8~10 d, 而用新的 PCR 方法仅需 24~32 h。

关键词: 啤酒有害菌; 快速鉴定; PCR; *Lactobacillus acetotolerans*

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 04-0070-05

在啤酒酿造过程中, 微生物的污染是一件十分令人头疼的事。污染了微生物的啤酒会产生一系列品质上的破坏, 如失光、异味、变酸、形成混浊和沉淀等。对啤酒品质造成危害的微生物就是啤酒有害菌。啤酒有害菌包括野生酵母、乳酸菌等, 其中以乳酸菌最为常见, 危害也最大^[1-3]。

啤酒厂对啤酒乳酸菌的检出目前采用平板法, 即将液体样品经膜过滤, 将可能存在的有害菌截留在膜上, 再将膜平置于琼脂培养基平板上, 在一定条件下培养, 待长出肉眼可见的菌落, 进行观察确认。这一过程一般需要 5~7 d, 耗时长, 耗材量大, 检测成本高。同时由于检测时间长, 常常造成检测结果对生产线反馈的迟滞, 导致成品积压, 引起浪费。因此, 寻找一种快速检验啤酒有害菌的方法是十分必要的。

聚合酶链式反应 (PCR) 具有灵敏度好、检测速度快、特异性强的突出优点, 因而自它诞生之日起, 就被研究者们成功地应用于各个研究领域^[4]。PCR 用于啤酒有害菌的快速鉴定, 在国外有较为深广的研究与应用, 而目前国内在这方面的研究报道罕见^[5-8]。在本研究中, 我们分离到一株啤酒有害菌 105F。通过传统方法以及 16S rDNA 分析对其进行鉴定。*hpaA* 基因是存在于大多数乳酸杆菌中的质粒 DNA 片段, 其产物具有抵抗酒花物质异律草酮对细胞生长的抑制的作用, 由于乳酸菌是一类兼性厌氧细菌, 因此能够在啤酒中无氧或微氧环境中生长而成为污染菌^[1]。本文对菌株 105F 进行了 *hpaA* 基因的检验, 发现该菌株具有该基因。我

们以该菌株 *hpaA* 为 PCR 扩增的目的基因, 检测时间从 10 d 缩短到 32 h。此种方法对于含有 *hpaA* 抗酒花基因的污染菌都可以快速检出。在如此短的时间内检测出啤酒中存在的污染菌目前在国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 105F 从一支被污染的成品瓶装啤酒中分离得到。

1.1.2 培养基 MRS 为英国 OXOID 产品, NBB 为德国德乐公司产品。按照产品说明书进行配制, 固体培养基另加 $w=1.5\%$ 琼脂。

1.1.3 主要仪器设备 厌氧培养箱 (forma 公司), 高速离心机 (北京医用离心机厂 LG16-W), PCR 仪 (PTC-100 型, 美国制造), 凝胶电泳成像系统 (MJ RESEARCH NT)

1.1.4 其它 细菌 DNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒为上海华舜生物工程有限公司出品。

1.2 方法

1.2.1 生理生化反应试验 采用法国梅里埃公司 API50CHL 生化反应试剂条。

1.2.2 乳酸旋光性分析 参见文献 [10]。

1.2.3 G+C% 含量测定 参见文献 [11]。

1.2.4 DNA 和质粒的提取 DNA 的提取: 参见试剂盒说明书。质粒的提取: ①试剂盒法按照试剂盒说明书; ②煮沸法: 取 1 mL 菌悬液, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用无菌双蒸水洗涤 1 次, 离

* 收稿日期: 2005-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370030)

作者简介: 田小群 (1964 年生), 女, 高级工程师, 博士; 通讯联系人: 周世宁; E-mail: ls90@zsu.edu.cn

心弃上清，加 30 μ L TE 缓冲液，100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 目的片段扩增 16S rDNA 片段扩增：在总反应体积为 25 μ L 的 PCR 反应体系中，加入引物 16（+）和引物 16（-）各 0.5 μ mol 10 $\times$ buffer（-MgCl₂）2.5 μ L，MgCl₂ 2.5 μ mol，dNTP 100 μ mol，Taq 酶 0.4 U，模板 DNA 4 μ L，引物序列为：16（+）：5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'，16（-）：5'-CTGAGCCAGGATCAAACTCTC-3'。PCR 扩增条件：94 $^{\circ}$ C 变性 4 min，然后 94 $^{\circ}$ C 1 min，52 $^{\circ}$ C 40 s，72 $^{\circ}$ C 1.5 min，35 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

horA 部分序列扩增：根据文献 [9] 合成上游引物 350 bp，扩增反应体系体积 25 μ L，首轮循环 94 $^{\circ}$ C 1 min，序列为 5'-ATCCGCGCGTGCGCAAATCA-3'，下游引物 1bHC-2 序列为 5'-AATCGCCAAATCGTTGGCG-3'，用此对引物扩增得到 horA 基因片段预计大小变性 3 min，接着以 98 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 30 s 进行 25 个循环。

1.2.6 PCR 扩增产物的电泳 在每 100 mL 的 w=1% 低熔点琼脂糖加入 5 μ L 的低毒染色剂 GoldView，制胶，点样，电泳。结束后将凝胶置于凝胶成像系统中观察分析。

1.2.7 16S rDNA 序列分析 扩增产物经纯化后直接作为序列测定的模板，于 377 型 DNA 自动测序仪进行直接 PCR 测序。将所获得的序列输入 GenBank，以 blast 程序对数据库中的所有序列进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 105F 的种属鉴定

通过对菌株 105F 进行革兰氏染色反应、过氧化氢酶反应、乳酸旋光性分析、生理生化反应、G+C 含量测定和 16S rDNA 序列分析等项目的检测和试验，发现其特性（见表 1）与文献 [1] 所描述的菌株一致。对 16S rDNA 扩增产物进行测序，测序长度为 767 个碱基对，在 GeneBank 中进行序列排比（BLAST），结果与 *Lactobacillus acetotolerans*（LBARR16S gi 175003）的一致率达到 98%，（G+C）% 含量也与文献 [12] 中描述的 *Lactobacillus acetotolerans* 菌株非常接近。因此可判定菌株 105F 为 *Lactobacillus acetotolerans*。

2.2 菌株 105F 抗酒花基因 horA 的检验

为了检验 105F 的 horA 基因，我们以质粒提取物为模板，进行 horA 基因部分序列的扩增，扩增产物经 w=1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳，得到与预

表 1 菌株 105F 的特性
Tab. 1 The characteristics of strain 105F

项目	结果	项目	结果
阿拉伯糖	-	柳醇	+
木糖	-	苦杏仁甙	-
鼠李糖	-	葡萄糖酸盐	-
山梨醇	-	革兰氏染色	+
核糖	-	过氧化氢酶反应	-
葡萄糖	+	氧化酶	-
甘露糖	+	硝酸盐还原	-
果糖	+	产生 H ₂ S	-
半乳糖	-	明胶水解	-
蔗糖	-	精氨酸产氨	-
麦芽糖	+	石蕊牛奶	-
纤维二糖	-	从葡萄糖产气	-
乳糖	-	15 $^{\circ}$ C 生长	-
海藻糖	+	45 $^{\circ}$ C 生长	-
蜜二糖	-	pH 7.0	-
棉子糖	-	pH 3.3	+
松三糖	-	乳酸旋光性	DL
淀粉	-	耐乙酸浓度 (w/v) 4	-
甘露醇	-	厌氧生长	+
山梨醇	-	(G+C)% (mol%)	36.5
七叶灵	W		

期相同的大小为 340 bp 的片段，表明有 horA 基因存在（图 1）。对扩增的片段进行测序，结果如下：GTTTTTATGAACCTAACGAGGGCAGCATCACGATTG GCAATACCAATATTACTGATATTCAACTTGCCGATT GGCGCCAGCAAATCGGCCTGGTCGGCCAAGACGC TGCGATCATGTCTGGAACGATTGCTTCAATTTAAC CTATGGTTTGCCGGGGCATTTTTCGGATGAACAGCT TTGGCATGTCTTGAAAATGGCTTACGCAACGCAATT GTTCAGAAGATGCCTCGGGGCTTGCA CACGGAAG TGGGTGAGCGTGAGTCAAGGTATCTGGGGGCCAA CGCCAAAGAAATGGAAA。将此序列与 GenBank 中的已知序列进行排比（BLAST），证实其与 *Lactobacillus paraaciloides*（AB178589 gi 57864210）的 horA 基因部分序列之间存在 100% 的同源性；与 *Lactobacillus lindneri*（AB167898 gi 56709947）和 *Lactobacillus brevis*（AB167897 gi 56709945）的 horA 基因部分序列之间存在 99% 的同源性。

2.3 检验 horA 基因的 PCR 灵敏度试验

确定了 105F 含有 horA 基因之后，当样品中检测到 horA 基因，则可证实有 105F 或其它有害菌的存在，那么关键问题在于样品中含有多少个细胞，能够被 PCR 检测出 horA 基因，亦即 PCR 检测有害

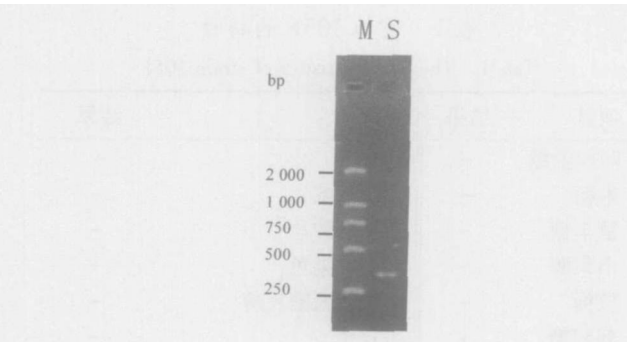


图 1 PCR 产物 $w=1\%$ 低熔点琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.1 $w=1\%$ gel electrophoresis analysis of PCR products
S 为 105F *horA* 基因部分序列片段

菌的灵敏度是多少。以菌株 105F 为例，将菌体用 5mL MRS 活化培养 5 d 离心（5 000 r/min×5 min），收集菌体，用无菌水洗涤 1 次，沉淀的菌体用 5 mL 无菌水重悬，作 10 倍递减稀释处理，得到稀释倍数依次为 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} 的菌悬液，各稀释度菌悬液相应的细胞数（CFU）如表 2 所示。每个稀释度取 1 mL，离心收集菌体，以煮沸法提取质粒，进行 PCR 扩增，结果见表 2

表 2 不同细胞浓度对 *horA* 基因检出的影响
Tab.2 The effects of cell concentration on *horA* detection

编号	1	2	3	4	5	6	7
稀释度	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
细胞浓度 (CFU/mL)	3.1×10^6	8×10^5	2.7×10^4	5.6×10^3	185	3	0
检出 <i>horA</i> 基因	+	+	+	+	+	+	-

从表 2 可见，对于菌株 105F，PCR 检测的灵敏度达到 3 CFU/mL。由于 105F 菌株的细胞排列为单个、成双和成束，而成束的细胞可高达 10 个，因此推测 PCR 检测的灵敏度可达 3~30 个细胞。

2.4 菌株 105F 在不同培养基下的生长状况
为了提高灵敏度需要对样品中的菌体细胞进行

增殖培养，以下是增殖培养的条件试验结果。将菌株 105F 接种于 MRS 琼脂平板、NBB 琼脂平板、MRS 肉汤和 NBB 肉汤培养基中，30℃ 培养 10 d 如表 3 所示，105F 菌株在固体培养基平板上生长极其缓慢，在液体培养基中生长良好，而 MRS 肉汤比 NBB 肉汤更有利于促进菌体增殖。

表 3 菌株 105F 在不同培养基的生长状况
Tab.3 Growth status of strain 105F on different culture medium

培养基	培养时间 /d									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MRS 固	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
NBB 固	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MRS 液 (A 600)	0.20	0.21	0.46	0.84	1.27	1.39				
NBB 液 (A 600)	0.05	0.13	0.18	0.49	0.96	1.05				

2.5 不同温度对菌株 105F 生长的影响
将经活化的 105F 菌按 1 mL 量接种于含 15 mL MRS 液体试管中，分别放置于 20、25、30、35℃ 温度下培养，每 8 h 取样，以 MRS 培养基作为空白对照，于 600 nm 处测光密度值。结果见图 2。从图中结果可以看出，在 35℃ 时菌株的生长最快。

2.6 不同 pH 值对菌株 105F 生长的影响
将经活化的 105F 菌按 1 mL 量分别接种于含 15 mL 不同 pH 的 MRS 液体试管中，放置于 35℃ 温度下培养，每 8 h 取样，以 MRS 培养基作为空

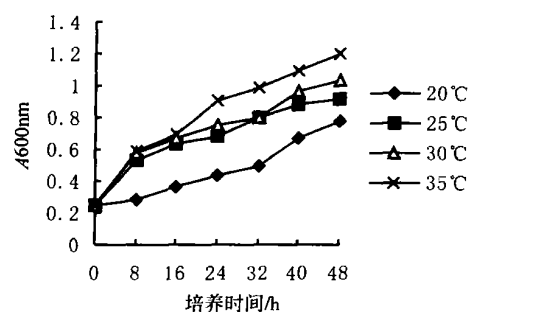


图 2 温度对 105F 生长的影响
Fig.2 Influence of temperature on the growth of strain 105F

白对照，于 600 nm 处测光密度值。结果见图 3。从图中结果可以看出，在 pH5 时菌株的生长最快。

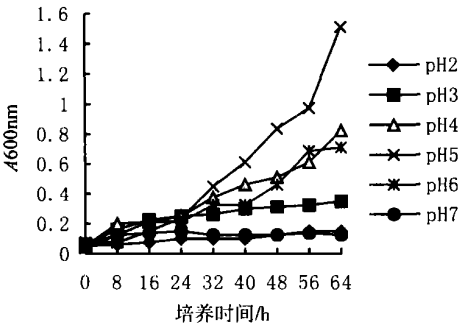


图 3 pH 值对 105F 生长的影响

Fig 3 Influence of pH on the groth of strain 105F

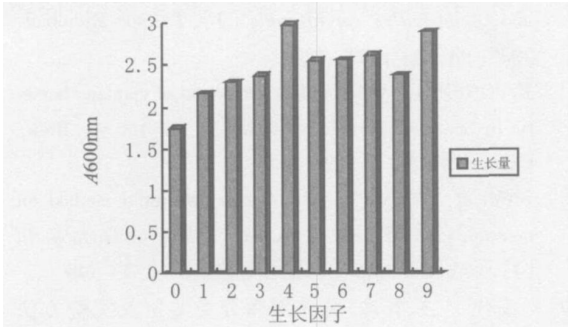


图 4 生长因子对 105F 生长的影响

Fig.4 Influence of growth factor on the groth of strain 105F

0 未加生长因子的 MRS 1 140 mg/LD-泛酸;
2 160 mg/L 菸酸胺; 3 160 mg/L 烟酸; 4 180
mg/L 叶酸男; 5 180 mg/LVB12 6 180mg/L 生
物素; 7 100 mg/LVB6 8 180 mg/LVB1 9 60
mg/L 核黄素

2.7 生长因子对 105F 菌株生长的影响

将生长因子 D-泛酸、菸酸胺、烟酸、叶酸、VB12、生物素、VB6、VB1、核黄素以各种浓度添加到 MRS 液体培养基中，以 1% 的接种量将经活化的 105F 菌悬液接入，35℃ 培养 5 d 测定 A_{600nm}。从图 4 结果可知：140 mg/LD-泛酸、160 mg/L 菸酸胺、160 mg/L 烟酸、180 mg/L 叶酸、180 mg/L VB₁₂、180 mg/L 生物素、100 mg/L VB₆、180 mg/LVB1、60 mg/L 核黄素对菌株 105F 的生长有明显的促进作用。

2.8 啤酒有害菌的快速鉴定

用 PCR 方法对 105F 菌株进行检测，由于存在着检测的灵敏度问题，必须对样品中的菌体细胞进行增殖培养。将 105F 菌悬液用 MRS 肉汤（添加 180 mg/L 叶酸）稀释到 1~10 CFU/mL 的细胞浓度悬液，将该菌液 35℃ 培养 48 h 从 12 h 开始，每 6 h 取 1 mL 以煮沸法提取质粒，作 *horA* 基因扩

增，将扩增产物进行电泳，对 *horA* 部分基因片段进行检查，结果如表 4 所示。当细胞初始浓度为 1 CFU/mL 时，仅需增殖 18 h 即可检测出 *horA* 基因片段。

表 4 105F 增殖过程 *horA* 基因片段检测

Tab. 4 *horA* detection of 105F during multiplication

培养时间 /h	细胞浓度 / (CFU·mL ⁻¹)	<i>horA</i> 部分片段
0	1	-
12	3	-
18	3	+
24	8	+

3 讨论

据文献报道^[9]，啤酒污染有害菌主要有 *Lactobacillus brevis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Megasphaera cerevisiae*、*Pantoea agglomerans*、*ctinatus erevisiophilus*、*Zymophilus affinosivoriens*，而由 *Lactobacillus acetotolerans* 引起的啤酒腐败目前尚未见报道。传统平板培养的方法检测有害菌，需时 5~7 d。一般常见的污染菌都可在此期间内长出菌落以供判别，而 *Lactobacillus acetotolerans* 在 MRS 平板上生长极其缓慢，在规定的检测时间内无法长成肉眼可见的菌落，往往在 8~10 d 甚至更长的时间才能够长出菌落。因而容易造成实验者对结果的误判，得出假阴性的结论。引入 PCR 检测方法，能够大大加快检测速度。只需将样品短时间富集培养，达到 PCR 检测所需的灵敏度。研究表明：PCR 检测 *Lactobacillus acetotolerans* 菌株 105F 的灵敏度达到 3 个 CFU/mL，由于 105F 菌株的细胞排列为单个、成双和成束，而成束的细胞可高达 10 个，因此推测 PCR 检测的灵敏度可达 3~30 个细胞。这里需对表 4 的结果做出解释：即为什么在培养 12、18 h 后才有 3 CFU/mL，而同样 3 CFU/mL，12 h 时却检不出？分析其原因：①在 12、18 h 才有 3 个 CFU，可能与最初细胞的状态有关，如可能受伤或处于休眠状态，因而延迟期较长；②12 h 和 18 h 的 3 个 CFU 是不同的，前者真正的细胞数一定小于后者的细胞数，所以 18 h 检出而 12 h 检不出是正常的。当细胞初始浓度为 1 CFU/mL，经过用改良了的 MRS 液体（内加 180 mg/L 叶酸）对菌体进行细胞富集培养，增殖所需要的时间为 18~24 h。加上样品制备、质粒提取、基因扩增及电泳观察所需的时间 8 h，检测有害菌株 105F 总需时 26~32 h，比传统平板培养法缩短 6~8 d，大大提

高了检测效率。

在本文的前言部分已经提及乳酸菌是引起啤酒腐败的主要有害菌群,且大多数啤酒有害乳酸菌都含有抗酒花基因 *horA*^[1]。因此 *horA* 基因啤酒有害乳酸菌所特异的。在啤酒成品实际检测中,只要检测到 *horA* 基因阳性,就可以证明啤酒中污染了乳酸菌,因此 PCR 快速检测菌株 105F 的实验方法对检测其它乳酸菌同样适用。

通过本研究,我们建立了一个简单快速准确的啤酒有害乳酸菌定性检测方法。虽然 PCR 检测只能定性不能定量,但对于成品啤酒有害乳酸菌的检测来讲,只要求定性而无须定量。因为啤酒成品中一旦检出有害菌即为不合格产品。因此此方法适用于啤酒厂成品酒的有害乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* 的快速检验,对其他啤酒有害乳酸菌也可按相似的程序检测。

参考文献:

- [1] SAKAMOTO K, KONINGS N. Beer spoilage bacteria and hop resistance [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003 89: 105 - 124.
- [2] MAHONY A, SULLIVAN F, WALSH Y, et al. Characterization of antimicrobial producing lactic acid bacteria from malted barley [J]. J. Inst Brew, 2000 106: 403 - 410.
- [3] DEIRDRE B, ELKE K, AIMUDENA M, et al. The influence of lactic bacteria on the quality of malt [J]. J. Inst Brew, 2005 111: 42 - 50.
- [4] BURTSCHER G, WUERTZ S. Evaluation of the use and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic

- bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003 69(8): 4618 - 4627.
- [5] 徐岩, 张丽苹, 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]. 食品与发酵工业, 2001 27(5): 71 - 74.
- [6] SATOKARI R, JUVONEN R, MALLISON K, 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 45: 119 - 127.
- [7] FUJII T, NAKASHIMA K, HAYASHI N. Random amplified polymorphic DNA - PCR based cloning of markers to identify the beer - spoilage strains of *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus coryniformis* [J]. J. Appl Microbiol, 2005 98(5): 1209 - 1220.
- [8] JUVONEN R, SATOKARI R. Detection of spoilage bacteria in beer by polymerase chain [J]. J. Am Soc Brew Chem, 1999 57(3): 99 - 103.
- [9] SAMIR, YAMASHITA H. A new and rapid method for determination of beer - spoilage ability of *Lactobacilli* [J]. J. Am Soc Brew Chem, 1997 55(4): 137 - 140.
- [10] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 143 - 145.
- [11] 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: 281 - 283.
- [12] ETSUZO, ENTAN J, HROSHIMASA J, KEN, CHIRO, SUZUKI. *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth [J]. International Journal of Bacteriology, 1986(10): 544 - 549.

Isolation, Identification and Rapid Detection of a Beer Spoilage Bacterium

TIAN Xiao-qun, ZHOU Shining

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract A new beer spoilage bacterium was isolated in a bottle of product beer. It was identified as *Lactobacillus acetotolerans* by type description, biochemical test, G+C% determination and 16S rDNA sequence analysis. A new method for rapid detecting beer spoilage *Lactobacillus* by PCR was developed. This method was based on the sequence of a hop-resistance gene *horA*. The time for the beer spoilage *Lactobacillus acetotolerans* detection was only 24 ~ 32 h by the PCR method.

Key words beer spoilage; rapid detection; PCR; *Lactobacillus acetotolerans*