

# 聚合酶链式反应快速鉴定啤酒有害菌研究

田小群<sup>1,2</sup> 周世宁<sup>1</sup>

(中山大学生命科学院 广州 510275)<sup>1</sup> (广州珠江啤酒股份有限公司 广州 510308)<sup>2</sup>

**摘要:** 建立了 PCR 快速鉴定啤酒有害菌的新方法。用基于抗酒花基因 *horA* 部分序列的特异引物对啤酒污染乳酸菌进行 PCR 检测, 灵敏度可达到 3 个细胞 (CFU), 样品的预培养需 12 ~ 16h。啤酒有害菌检测所需时间从传统的 5d 减少到 24h。

**关键词:** 啤酒有害菌, PCR, 快速鉴定, 灵敏度

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0059-04

## Detection of Spoilage Bacteria in Beer by Polymerase Chain

TIAN Xiao-Qun<sup>1,2</sup> ZHOU Shi-Ning<sup>1</sup>

(College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275)<sup>1</sup>

(Zhujiang Beer Group Company, Guangzhou 510308)<sup>2</sup>

**Abstract:** A new method for rapid detecting beer-spoilage by PCR was developed. This method is based on the sequence of a hop-resistance gene *horA*, which a pair of specific primers were designed based on the partial sequence of it. Using the primers, beer-spoilage *Lactobacillus* species were detected by PCR. The sensitivity was reached to 3CFU. The pre-enrichment of samples was needed only 12 ~ 16 h. The duration for beer-spoilage determination by PCR (24h) was markedly shorter than by conventional method (5 ~ 7d).

**Key words:** Beer spoilage, PCR, Rapid detection, Sensitivity

将 PCR 技术应用于啤酒有害菌的检测和控制, 在国外有较为深入的研究, 然而在国内, 相关的研究却十分稀少<sup>[1-4]</sup>。啤酒有害菌是一类对啤酒品质造成危害的厌氧菌, 目前常用的检测方法是厌氧平板培养法, 即待长出菌落后用肉眼直观检测。这种方法最大的缺陷是费时, 5 ~ 7d 才可看到结果, 不能够及时反馈微生物的污染状况。乳酸菌是造成啤酒腐败的最常见微生物, 对啤酒的危害很大<sup>[5-7]</sup>。啤酒污染乳酸菌含有抗酒花基因 *horA*, 这是乳酸菌能够在啤酒中污染繁殖的重要原因。本文将 PCR 原理应用于啤酒有害菌的检测, 利用 *horA* 基因扩增的专门引物<sup>[8]</sup>, 建立了啤酒有害菌的快速检测方法, 使检测时间缩短到 1d 以内。

## 1 材料与方法

### 1.1 微生物菌株

短乳酸杆菌 C57: 从一瓶严重污染的啤酒中分离到一株细菌菌株, 经梅里埃乳酸菌鉴定试剂盒 API50CHL 的生理生化试验和菌株 16S rDNA 序列分析, 鉴定为短乳酸杆菌 (*Lactobacillus brevis*)。

### 1.2 培养基

MRS 为英国 OXOID 产品, NBB 为德国德乐公司产品。

通讯作者 Tel: 020-84206636-612, E-mail: txqhrx@tom.com

收稿日期: 2005-04-10, 修回日期: 2005-05-26

### 1.3 菌株的培养

将菌株接种于 20mL MRS 或 NBB 培养基中，28℃ 厌氧培养至光密度  $OD_{660}$  值达到 0.6~0.8。

### 1.4 细胞计数

高浓度细胞计数：采用血球计数器。

低浓度细胞计数：采用膜过滤培养。将 1mL 菌悬液通过 0.45 $\mu$ m 孔径的滤膜，将截留了有害菌细胞的膜放置于 NBB 琼脂平板上，28℃ 厌氧培养，待长出菌落时计数。

### 1.5 质粒的提取

提取方法有常规法、冻融法和煮沸法，见文献 [9]。直接法免去水煮步骤，其余同煮沸法。

### 1.6 DNA 的 PCR 扩增

根据文献 [8] 合成上游引物 LbHC-1 序列为 5'-ATCCGGCGGTGGCAAATCA-3'，下游引物 LbHC-2 序列为 5'-AATCGCCAATCGTTGGCG-3'，用此对引物扩增得到 *horA* 基因片段预计大小 350bp。扩增反应体系体积 25 $\mu$ L，首轮循环 94℃ 变性 3min，接着以 98℃ 30s，55℃ 1min，72℃ 30s 进行 25 个循环。

### 1.7 PCR 扩增产物的电泳

1% 低熔点琼脂糖加入 5 $\mu$ L/100mL 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。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 检测的灵敏度

为了验证 PCR 检测的最小细胞量，将经活化培养的 C57 菌株进行 10 倍梯度稀释，制成不同细胞浓度的菌悬液，并测细胞数。将这些不同细胞浓度的菌悬液分别用常规法、冻融法、煮沸法、直接法收集质粒，扩增 *horA* 基因片段，并进行电泳。从图 1 可以看出，直接法不能够检测出 C57 菌株，其它 3 种方法可以检出，且检出的最小细胞数为 3 个细胞。

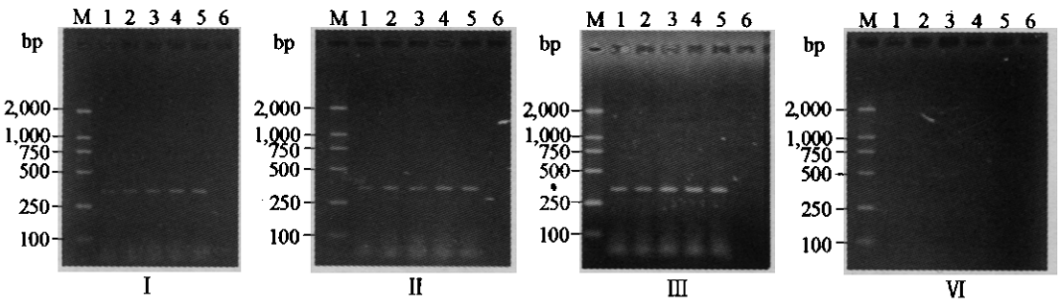


图 1 不同质粒提取方法对 PCR 检测灵敏度的影响

I 常规法，II 煮沸法，III 冻融法，IV 直接法，编号 1~6 分别代表检测样品所含的细胞数量，依次为：

$3.1 \times 10^5$ ， $2.6 \times 10^3$ ，280，45，3，0 个 (CFU)

### 2.2 不同种类的培养基对 C57 的增菌效果

啤酒的污染经常是由于仅存的 1 个有害菌细胞的不断繁殖造成的。由于 PCR 检测存在灵敏度的问题，因此，如何使细菌在最短的时间内繁殖到可以检测的数量水平是

至关重要的。本研究尝试以不同的培养基对 C57 菌株进行增菌。这些培养基是: MRS, NBB 以及浓缩两倍的 MRS 和 NBB (2MRS 和 2NBB)。将活化培养的 C57 菌株接入上述 4 种培养基中, 初始细胞浓度为 1 个/mL, 28℃ 培养 20h, 生长状况见图 2。从图中所示可知, 增菌效果从好到差的次序为: MRS > NBB > 2MRS > 2NBB。

### 2.3 温度对 C57 生长的影响

为了达到快速增菌的效果, 尝试不同培养温度对 C57 菌株生长的影响。将经活化的 C57 菌株按 1mL 量接种于含 15mL MRS 液体试管中, 分别放置于 20℃, 25℃, 30℃, 和 37℃ 温度下培养, 每 4h 取样 1mL + 2mL 蒸馏水, 同时取干净 MRS 培养基 1mL + 2mL 蒸馏水作为空白对照, 于 420nm 处测光密度值。结果见图 3。从图中结果可以看出, 在 30℃ 时菌株的生长最快。

### 2.4 生产线瓶装啤酒有害菌检验

为了验证 PCR 检测技术的准确性, 在生产线上装酒机出口取 24 支开机生啤, 同时用 PCR 方法和传统的平板培养方法检测有害菌。将每瓶生啤 (640mL) 经 0.45μm 滤膜过滤, 使可能存在的有害菌截留在膜上, 然后将膜等分为二, 一半放置于 NBB 平板上, 30℃ 厌氧培养 7d 后, 观察长出的菌落; 另一半放置于 5mL MRS 液体中, 以同样条件培养 16h, 之后离心收集菌体, 做 PCR 检测。结果显示: 有 21 支酒样以传统方法检测为阴性, 以 PCR 方法检测同样为阴性; 有 2 支酒样以传统方法检测为阳性, 以 PCR 方法检测同样为阳性; 有 1 支酒样以传统方法检测为阴性, 以 PCR 方法检测则为阳性。两种方法检测结果的一致率达到 95.8%。

## 3 讨论

用直接法直接将菌体进行 PCR 不能检测出有害菌, 但用常规法、冻融法和煮沸法则可以将菌体中的质粒提取出来, 从而检测出有害菌, 且灵敏度可以达到 3 个细胞。常规法使用的酚、氯仿等有机溶剂对环境造成污染, 冻融法需时长, 故用煮沸法提取质粒较为适用。

当啤酒样品中仅含 1 个或微量的有害菌细胞, 需要对其进行增菌, 以达到 PCR 检测的灵敏度。研究表明, 用 MRS 液体培养基, 于 30℃ 厌氧培养 16h 即可达到很好的效果, 大大超过 PCR 检测灵敏度所需要的细菌数。

用 PCR 方法和传统的平板培养方法检测生产线开机生啤的有害菌, 两种方法的一致率达 95.8%, 有一例结果不一致。我们分析这一特例, 由于有害菌细胞在生产罐装激冷条件下有所损伤, 因此在平板培养条件下生长及其缓慢, 不能形成肉眼可见的菌落, 而在 MRS 液体培养条件下, 损伤的菌体自我修复能力易于恢复, 因此逐步增

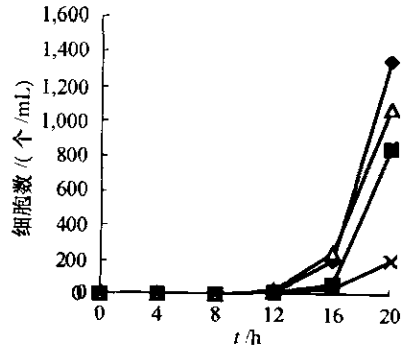


图2 不同种类培养基的增菌效果

● MRS, ■ 2MRS, △ NBB, × 2NBB

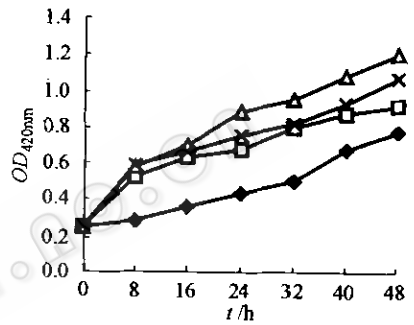


图3 温度对 C57 生长的影响

● 20℃, ■ 25℃, △ 30℃, × 37℃

殖, 或者样品中的细胞数不经增殖原本就已经达到了 PCR 检测的灵敏度。因此, 用 PCR 方法检测啤酒有害菌比传统方法更为精确。

传统的平板培养方法需要 5 ~ 7d, 用 PCR 方法分两个步骤: 第一个步骤是增菌, 第二个步骤是 PCR 操作, 前者需时 12 ~ 16h, 后者需时 6 ~ 8h, 本研究用 PCR 方法检测啤酒有害菌可使检测时间缩短到 24h 以内。大大提高了检测效率。

PCR 方法可以对所检测微生物起到定性的作用, 但不能够定量。因此, 当需要对所检有害菌进行定量时, 仍需借助传统的平板培养方法。根据企业标准, 成品啤酒不得含有 1 个有害菌, 因此一旦检出有害菌, 就视为不合格产品。因此, 对于不需要定量检测有害菌的成品啤酒, PCR 检测方法是适用的。

### 参 考 文 献

- [1] 徐 岩, 张丽苹, 顾国贤. 食品与发酵工业, 2001, 27 (5): 71 ~ 74.
- [2] Satokari R, Riikka R, Mallison K, *et al.* Journal of Food Microbiology, 1998, 45: 119 ~ 127.
- [3] Yamauchi H, Yamamoto H, Shibano Y, *et al.* J Am Soc Brew Chem, 1998, 56 (2): 58 ~ 63.
- [4] Juvonen R, Satokari R. J Am Soc Brew Chem, 1999, 57 (3): 99 ~ 103.
- [5] Sakamoto K, Konings N. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89: 105 ~ 124.
- [6] Jespersen L, Jakobsen M. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33: 139 ~ 155.
- [7] Funahashi V, Suzuki K, Ohtake Y, *et al.* J Am Soc Brew Chem, 1998, 56 (2): 64 ~ 69.
- [8] Sami M H. Yamashita. J Am Soc Brew Chem, 1997, 55 (4): 137 ~ 140.
- [9] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1995. 107.