

啤酒有害菌检测培养基的比较

叶 青¹ 孙培龙²

1(杭州西湖啤酒朝日(股份)有限公司 杭州 310023) 2(浙江工业大学 杭州 310013)

摘 要 比较了乳酸短杆菌、四联球菌、醋化醋酸杆菌在 NBB、MRS、Raka-Ray、VLB-S7、番茄汁培养基、自配培养基 A 和自配培养基 UBA 上的菌落生量。结果表明,NBB 对乳酸杆菌的检测效果最好,乳酸菌在自制培养基 UBA 上不生长。7 种培养基对四联球菌的检测效果相当。醋酸是绝对好氧菌,在厌氧条件下不生长。

关键词 啤酒,啤酒有害菌,培养基

啤酒有害菌是指其产物能够对啤酒的口味和气味产生损害或者能够通过形成浑浊、沉淀使啤酒外观发生变化的微生物。

原则上企业的检查人员有 2 种方式对生产的卫生状况和啤酒有害菌进行检查。一为感官检查,二为选择培养基检查法。

现在商品化选择性培养基较多,主要有 NBB、UBA、MRS、Raka-Ray、VLB-S₇。众多的培养基给啤酒厂家带来方便的同时也给啤酒厂的选择带来困难。在此背景下,研究比较了目前用于啤酒有害菌检测的选择性培养基对啤酒有害菌检出的效果,为啤酒厂选择合适的培养基提供指导。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要实验药品

氯酚红、酪蛋白胨、酵母浸膏、牛肉膏、吐温 80、磷酸氢二钾、醋酸钠、放线菌酮、葡萄糖、麦芽糖(购自杭州天和微生物试剂有限公司)。

1.1.2 供试菌

乳酸短杆菌、四联球菌、醋化醋酸杆菌(购自中国食品发酵工业研究院菌种保藏中心)、杂菌(生产中检出的各类污染菌,包括好氧菌、厌氧菌、培养酵母、野生酵母、霉菌等)。

1.1.3 培养基

NBB(成品,德国柏林)、MRS(成品,德国 OXIOU)、Raka-Ray(成品,德国 OXIOU)、VLB-S₇(成品,德国 Sartorius)、改良番茄汁培养基(成品,北京陆桥)、A(自配,酪蛋白胨、酵母浸膏、牛肉膏、吐温 80、磷酸氢二钾、醋酸钠、氯酚红、放线菌酮、葡萄糖、麦芽糖和蒸馏水按比例配制而成)、UBA(自配,配方

参见[1]P269)。

1.1.4 主要实验仪器

厌氧培养罐、氧气显示剂、产气袋(日本进口,株式会社杉三元)、隔水式恒温培养箱:GHP-9080,上海益恒实验仪器有限公司。

1.2 菌种活化及稀释

(1)已经菌种按中国食品发酵工业研究院菌种保藏中心提供配方配制固体斜面培养基和液体试管培养基;

(2)以无菌操作将保藏菌种(冻干管)接入相对应的液体培养基中进行活化;

(3)将活化后的菌种接入斜面,培养后作为保藏菌种。另外将剩下的培养液和杂菌液分别进行梯度稀释,为保证有足够量的稀释液供试验用,在稀释至 10^{-3} 时,可将 10 mL 的稀释液直接倒入装有 90 mL 无菌生理盐水的三角瓶中制成 10^{-4} 的稀释液,再用 10 mL 的移液管吸 10 mL 的 10^{-4} 稀释液至装有 90 mL 无菌生理盐水的三角瓶中制成 10^{-5} 的稀释液,依此类推,稀释至 10^{-6} 备用;

(4)准备好无菌培养皿,作上记号,每支菌种每个稀释度每种培养基各准备 2 个培养皿,每种培养基另外作 1 个空白。用 1 mL 的无菌移液管吸 1 mL 的稀释液至相对应的培养皿中,倒入配制好并冷却至 45℃ 的各种培养基,混合均匀。使用 VLB 培养基时,先在预先灭菌后的过滤漏斗中加入约 50 mL 的无菌生理盐水,再加入 1 mL 的样品进行膜过滤;

(5)待培养基凝固后,每支菌种每个稀释度每种培养基各取 2 个经厌氧处理后置 25~28℃ 的生化培养箱中进行厌氧培养;

(6)分别在 5 d 和 8 d(5 d 观察后需再经厌氧处理后培养)时观察厌氧情况下各试验菌种在不同培养基中的生长情况并记录下来。

第一作者:学士,高级工程师。

收稿时间:2004-08-03

2 结果与讨论

2.1 各种培养基对乳酸短杆菌检测效果的比较

乳酸杆菌是啤酒发酵中最常见的污染菌。
从表 1 和表 2 可以看出 , 试验的 7 种啤酒有害菌检测培养基对乳酸短杆菌的检测效果是有差别的。检测效果从好到坏的顺序为 :进口 NBB > 自制培养

基 A 与 VLB 的检测效果相当 > Raka-Ray > MRS > 改良番茄汁 > 自制 UBA。使用自制的啤酒有害菌培养基 UBA 不能检出污染的乳酸短杆菌 , 容易形成假阴性的结果 , 现在国内啤酒厂已很难购买到进口 NBB , 在此种情况可以用自配培养基 A 和 VLB 替代进口 NBB 对污染的乳酸菌的检测。

表 1 各培养基对乳酸杆菌检测效果的比较(培养 2 d)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
培养温度/℃	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28
菌落特征	菌落较大 变色明显	菌落中等 变色不很明显		菌落较小	菌落较小	菌落中等 变色不明显	菌落较大
10 ⁻⁴	多	多	无生长	2.5 × 10 ²	多	多	90
10 ⁻⁵	多	多	无生长	25	多	多	10
10 ⁻⁶	多	多	无生长	5	2.0 × 10 ²	多	1

表 2 各培养基对乳酸杆菌检测效果的比较(培养 8 d)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
培养温度/℃	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28	25 ~ 28
菌落特征	菌落较大 变色明显	菌落中等 变色不很明显		菌落较小	菌落较小	菌落中等 变色不明显	菌落较大
10 ⁻⁴	多	多	无生长	多	多	多	99
10 ⁻⁵	多	多	无生长	75	多	多	18
10 ⁻⁶	多	多	无生长	11	2.0 × 10 ²	多	2

2.2 各种培养基对四联球菌检测效果的比较

四联球菌的污染对啤酒的危害较大 , 生产上对四联球菌的检出比较重要。从表 3 和表 4 可以看 , 试验

的 7 种培养基对四联球菌的检测率相当 , 用进口 NBB 和改良番茄汁检出的四联球菌落较大。

表 3 各种培养基对四联球菌检测效果的比较(培养时间 8 d 培养温度 25 ~ 28℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
菌落特征	菌落较大 变色明显	菌落中等 变色不很明显	菌落较小	菌落较小	菌落较小	菌落中等 变色不明显	菌落较大
10 ⁻⁴	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁵	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁶	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²

表 4 各培养基对四联球菌检测效果的比较(培养时间 8 d 培养温度 25 ~ 28℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
菌落特征	菌落较大 变色明显	菌落中等 变色不很明显	菌落较小	菌落较小	菌落较小	菌落中等 变色不明显	菌落较大
10 ⁻⁴	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁵	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁶	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²

2.3 各种培养基对醋化醋酸杆菌检测效果的比较

醋酸菌能把乙醇氧化成醋酸 , 对酒花不敏感 , 革兰氏阴性、杆状、无芽孢、耐酸耐酒精强。很多文献认

为是醋酸菌兼性好氧菌 , 即在好氧条件和厌氧条件下均能生长的菌。但从表 5、表 6、表 7 和表 8 可以看出醋酸菌应该属于绝对好氧菌 , 在厌氧条件下醋酸菌是

不生长的。

表 5 各种培养基对醋化醋酸杆菌检测效果的比较(培养时间 5 d 培养温度 25 ~ 28℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
10 ⁻⁴	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长
10 ⁻⁵	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长
10 ⁻⁶	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长

表 6 各培养基对醋化醋酸杆菌检测效果的比较(培养时间 8 d 培养温度 25 ~ 28℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
10 ⁻⁴	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长
10 ⁻⁵	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长
10 ⁻⁶	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长	无生长

表 7 各种培养基对醋化醋酸杆菌检测效果的比较(培养时间 2 d 培养温度 36℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	好氧	好氧	好氧	好氧	好氧	好氧	好氧
10 ⁻⁴	多	多	多	多	无生长	多	多
10 ⁻⁵	51	55	2.8 × 10 ²	多	无生长	1.6 × 10 ²	多
10 ⁻⁶	3	4	6	48	无生长	15	79

表 8 各培养基对醋化醋酸杆菌检测效果的比较(培养时间 3 d 培养温度 36℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	好氧	好氧	好氧	好氧	好氧	好氧	好氧
10 ⁻⁴	多	多	多	多	无生长	多	多
10 ⁻⁵	55	多	多	多	无生长	1.6 × 10 ²	多
10 ⁻⁶	6	85	1.0 × 10 ²	1.0 × 10 ²	无生长	17	82

2.4 各种培养基对未知杂菌检测效果的比较

未知杂菌是生产中检出的各类污染菌 ,包括好氧菌、厌氧菌、培养酵母、野生酵母、霉菌等。

从表 9 和表 10 可以看出试验的 7 种培养基 ,对杂各种杂菌的检测率相当 ,但是菌落大小稍有差别 ,以进口 NBB 和改良番茄汁检出的菌落大。

表 9 各种培养基对未知杂菌检测效果的比较(培养时间 5 d 培养温度 25 ~ 28℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
菌落特征	菌落较大 变色明显	菌落中等 变色不很明显	菌落较小	菌落较小	菌落较小	菌落中等 变色不明显	菌落较大
10 ⁻⁴	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁵	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁶	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²

表 10 各培养基对未知杂菌检测效果的比较(培养时间 8 d 培养温度 25 ~ 28℃)

培养基类型	NBB	A	UBA	MRS	Raka – Ray	VLB	改良番茄汁
培养环境	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧	厌氧
菌落特征	菌落较大 变色明显	菌落中等 变色不很明显	菌落较小	菌落较小	菌落较小	菌落中等 变色不明显	菌落较大
10 ⁻⁴	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁵	多	多	多	多	多	多	多
10 ⁻⁶	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²	2.5 × 10 ²

3 结 论

通过对国内啤酒厂常用的啤酒有害菌检测培养基对杂菌检测效果的比较可以得出如下结论：

(1)不同的培养基对不同的污染菌检出的效果不总是一致的。

(2)进口 NBB 对乳酸短杆菌检测效果最好 ,检出率高菌落大 ,自制培养基 A 与 VLB 的检出效果相

当,但菌落较 NBB 上的小,Raka-Ray 的效果要比 MRS 好,改良番茄汁检出率较差,但其上生长的菌落较大,自制 UBA 检测不出。

(3)试验的 7 种培养基对四联球菌的检测效果相当。

(4)醋酸菌是绝对好氧菌,在厌氧条件下,不管哪种培养基都检测不出来。

以上的试验结果,可以为啤酒厂正确选择培养基提供指导。通过试验结果看出,乳酸杆菌在自配培养基 A 和 VLB 上检出率与 NBB 相当,只是菌落稍小一点,因此当啤酒生产企业购买不到进口 NBB 的时候,可以用自配培养基 A 和 VLB 替代进口 NBB 实现对乳酸菌的检测。

参 考 文 献

- 1 顾国贤主编.酿造酒工艺学(第二版)[M].北京:中国轻工业出版社,1996
- 2 杨才祥.啤酒酿造中乳酸菌、足球菌的分离鉴定[J].酿酒

- 1999(1):5~10
- 3 管敦仪.啤酒工业手册(修订版),北京:中国轻工业出版社,1998
- 4 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001
- 5 苏世彦主编.食品微生物检验手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998
- 6 高鼎主编.食品微生物学,北京:中国商业出版社,1996
- 7 杨瑞馥,陶天申主编.细菌名称英解汉译词典[M].北京:军事医学科学出版社,2000
- 8 Kanta Sakamoto, Wil N. Konings. Beer spoilage bacteria and hop resistance[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 89: 105~124
- 9 Jespersen L, Jakobsen M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection[J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 33: 139~155
- 10 Jakobsen M, Lillie A. Rapid methods in microbiological quality control: practical experience with epifluorescent techniques. Inst. Brew., Aust. N. Z. Section, 1984, 223~228

Comparison of Culture Medium for Beer Spoilage Bacteria

Ye Qing¹ Sun Peilong²

¹(Hangzhou Xihu Beer Co., Ltd. Hangzhou, 310023, China)

² Zhejiang University of Technology, Hangzhou, 310013, China)

ABSTRACT Colony growth of *Lactobacillus brev*, *Pediococcus damnosus*, *Acetobacter aceti* on 7 culture media (NBB, MRS, Raka-Ray, VLB-S7, tomato juice agar, self-made culture medium A and self-made UBA) was compared. The results showed that NBB was the best culture medium for *Lactobacillus brev*. *Lactobacillus brev* can not grow on the UBA. There were no significant differences among these 7 culture media for *Pediococcus*. The *Acetobacter aceti* did not grow on these media.

Key words beer, beer spoilage bacteria, culture medium

市场动态

健康和功能推动全球香料市场发展

由于健康和功能的意识在消费者心目中变得更加重要,驱动了全球香料市场的发展。低热量方便食品的出现为调味料的发展也创造了很好的机会。

据英国市场分析家报告,2003年,全球香料市场销售额达到116亿美元(约合86亿欧元),比上年增长3.3%。在西欧,调味料需求增长的同时,东欧、中东、非洲也成为香料迅速增长的地区。在西欧的香料市场中,饮料业占据了30%,乳制品业占据了15%,焙烤食品占据了12%,开胃食品和方便食品占据10%(主要是肉香香料),小食品占据5%。除了西欧这个传统的大市场,在东欧、中东和非洲,特别出众的柠檬香精、有异国风情的番石榴香精、基维果香精使消费者有了除橘子和苹果香精之外的更多选择,这些产品都极受欢迎。报告预测,在这几个地区市场还有很多领域对香料的需求有强势增长,如不断推陈出新的软饮料,功能性食品在东欧有较深根基,目前仍在缓慢增长的罐装食品(对香料的需求较大)等。

报告对世界主要香料生产供应商进行了排名。占据第1位的是瑞士的Givaudan,占2003年全球市场的13.5%;接下来是美国的IFF,占11.7%;Firmenich, Symrise和拥有ICI香料公司的Quest International分别占9.8%、9%和6.1%的份额。