

用改良 MRS 培养基检测啤酒中乳酸菌的方法

张 颖¹, 张 萍²

¹(安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230039)

²(合肥廉泉啤酒酒业有限责任公司, 安徽 合肥 230031)

摘 要: 用补充麦芽糖和清酒的改良 MRS 培养基来检测啤酒中的乳酸菌, 对生成的菌落进行观察和镜检, 并通过 KOH 试验和过氧化氢酶试验进一步证实。

关键词: 乳酸菌; 啤酒; 改良 MRS 培养基

分类号: 939. 97

文献标识码: A

文章编号: 1000- 2162(1999) 04- 0104- 03

细菌是使啤酒腐败变质的主要原因, 其中最有害的是乳酸菌和一些革兰氏阳性菌。目前, 在啤酒中已发现有十多种能使啤酒变质的乳酸菌, 但没有一种现成的培养基能够检测出所有的乳酸菌。笔者设计用补充麦芽糖和清酒的改良 MRS 培养基检测啤酒中的乳酸菌, 可提高阳性检出率, 在啤酒发酵工业中有一定的指导意义。

1 材料和方法

1.1 培养基

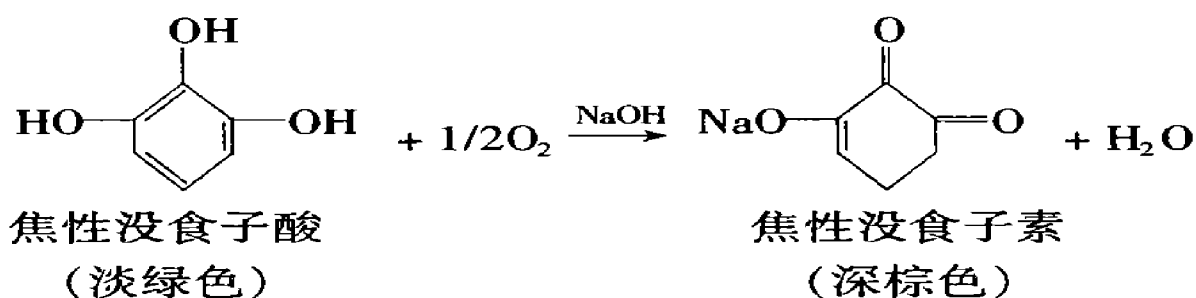
MRS 培养基: 蛋白胨 10. 0g, 牛肉膏 10. 0g, 酵母膏 5. 0g, 葡萄糖 20. 0g, K_2HPO_4 2. 0g, NaOAc 5. 0g, $MgSO_4$ 0. 2g, $MnSO_4$ 0. 05g, 吐温- 80 1. 0g, 柠檬酸三铵 2. 0g, 琼脂 20. 0g, pH 5. 5 ~ 6. 0 加 H_2O 至 1000mL。

改良 MRS 培养基: 麦芽糖 5. 0g, 蛋白胨 10. 0g, 牛肉膏 8. 0g, 酵母膏 4. 0g, 葡萄糖 20. 0g, K_2HPO_4 2. 0g, NaOAc 5. 0g, $MsSO_4$ 0. 2g, $MnSO_4$ 0. 05g, 吐温- 80 1. 0g, 柠檬酸三铵 2. 0g, 琼脂 20. 0g。

苯乙醇 0. 001g, 清酒与水的比例为 1: 1, 终体积为 1000mL, pH 5. 5 左右。

1.2 培养方法

1.2.1 厌氧条件的产生 用碱性焦性没食子酸, 即焦性没食子酸与碱性溶液作用形成碱性没食子酸盐的反应过程中, 能吸收游离态氧, 从而造成低氧或无氧环境。反应如下:



收稿日期: 1998- 12- 06

作者简介: 张 颖(1972-), 女, 安徽合肥人, 讲师, 研究方向: 微生物学。

1.2.2 操作方法

(1) 先将 MRS 和改良 MRS 培养基加热溶解, 冷却至 45℃ 左右, 倒入培养皿。

(2) 取变质啤酒 0.1mL, 作梯度稀释, 每个稀释度作三个重复, 分别取样 0.1mL 涂布于 MRS 和改良 MRS 平板上。

(3) 取培养皿盖, 铺上一薄层无菌脱脂棉, 称取 0.5g 焦性没食子酸, 小心放至皿盖中央, 然后吸取 10% NaOH 5~6mL 于焦性没食子酸上, 立即将已接种的平板覆盖于该皿盖上, 迅速用透明带封住培养皿周围, 最后小心慢慢摇动平皿, 使焦性没食子酸与 NaOH 充分混合。

(4) 倒置于培养箱 25~28℃, 培养 3 天。

1.3 检出方法

1.3.1 观察菌落特征, 并置显微镜下用油镜镜检。

1.3.2 KOH 试验 取一菌耳平板上生长菌落于载玻片上, 加 1~2 滴 5% KOH 溶液, 用接种环将它们混合搅匀短时间内 KOH 试验阳性菌会越搅越稠, 抬起接种环会产生拉丝现象, 而 KOH 试验阴性菌则无拉丝现象。

1.3.3 过氧化氢酶试验 在无菌载玻片上加一滴无菌水, 用接种环挑一环菌至载玻片上的无菌水并混匀, 然后滴一滴 5% H₂O₂ 溶液, 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。

2 结果与讨论

2.1 设计改良 MRS 培养基考虑的几个因素

(1) 以多种形式提供碳源, 在以葡萄糖为主要碳源基础上增加适量麦芽糖, 满足多种乳酸菌生长需要。

(2) B 族维生素可加快乳酸菌的生成, 故选用部分已发酵后的清酒作为溶剂。

(3) 添加微量苯乙醇以抑制酵母菌和革兰氏阴性菌的生长, 以提高培养基对乳酸菌的选择性。

此外, 厌氧式培养可以减慢兼性好氧菌和抑制好氧菌的生长, 相应地强化乳酸菌的生长。

2.2 乳酸菌在改良 MRS 培养基上特征

(1) 改良 MRS 培养基比 MRS 培养基在相同稀释度下生成的乳酸菌菌落数平均高 2~3 倍, 且 MRS 培养基上生成菌落有小部分为非乳酸菌。

(2) 改良 MRS 培养基上生成菌落特征: 乳黄色或浅白色, 圆形、扁平, 边缘不整齐, 有皱折。

(3) 油镜下(16×100) 镜检多为球形, 成对或成四分体, 少数为短杆状, 长杆状。

2.3 KOH 试验

(1) KOH 试验目的是鉴别微生物的革兰氏阳性或阴性。这可能是由于革兰氏阴性细菌的细胞壁在 KOH 溶液中膨胀, 并产生粘性液体, 故可用悬浮液拔丝加以证明。KOH 试验与革兰氏染色结果的对应关系为: KOH 试验阳性菌为革兰氏阴性菌, KOH 试验阴性菌为革兰氏阳性菌。

KOH 试验代替革兰氏染色,可简化实验操作,快速判定微生物的染色特性。但需要说明的是,KOH 试验在啤酒行业是一种纯经验的做法,至今尚无科学解释,在具体实验中,其与革兰氏染色结果是完全吻合的,这是否可推广到所有微生物的革兰氏染色特性的判断还有待进一步证明。

(2) 挑取改良 MRS 培养基上生成菌落做 KOH 试验无拉丝现象,说明生成的菌落为革兰氏阳性菌,做过氧化氢酶试验为阴性。

2.4 小 结

根据以上试验并参考伯杰氏细菌手册第八版判定改良 MRS 培养基上生成菌落为乳酸菌,初步确定可能有 7~9 种,其在检出乳酸菌种类和数量上均明显高于 MRS 培养基。

参考文献:

- [1] 王英凯. 啤酒酵母生产菌种的管理[J]. 中国啤酒通讯, 1992, 4: 12~ 23.
- [2] 管敦仪. 啤酒工业手册[M]. 北京: 轻工业出版社, 1982, 581~ 605.
- [3] 戴仁泽. 啤酒发酵进展[M]. 北京: 轻工业出版社, 1985, 18.
- [4] 莫湘筠. 啤酒酵母的性能和管理[J]. 啤酒工业快报, 1997, 1: 6.
- [5] 杨 颖. 啤酒有害细菌的检查[J]. 中国啤酒通讯, 1997, 1: 12~ 16.

Testing Lactobacillus in Beer with Improved MRS Medium

ZHANG Ying¹, ZHANG Ping²

¹(Department of Biology of Anhui University, Hefei 230039, China)

²(Hefei Lian Quan Beer L. T. d. , Hefei 230031, China)

Abstract Dozens kinds of lactobacillus which may result in bad quality of beer have been discovered. While there is not a report on media which can detect all of them. We discussed the method of testing lactobacillus in beer with the improved MRS medium in the paper.

Key words lactobacillus ; beer; improved MRS medium