

IFA 在酿酒污染野生酵母 快速检测中的应用

顾国贤 张星元 方刚

(无锡轻工业学院) (淮海工学院)

摘要 用荧光抗体技术进行快速检测,方法简便、灵敏、快速。用三种混合血清可以检测出常见全部污染野生酵母。该技术在工厂中应用结果表明,酿酒种酵母中野生酵母污染现象是存在的,而且随着种酵母使用代数的增加而越趋严重。

关键词 荧光抗体;种酵母;野生酵母

0 前言

啤酒质量的保证除了取决于麦芽质量,啤酒酵母性能、发酵工艺技术外,还取决于酿造过程是否受到微生物污染。微生物污染中较难检测的是野生酵母污染,野生酵母在麦汁或啤酒中繁殖时,会产生乙醛、高级醇、酯及其它代谢产物,会出现令人不快的苦味,异常口味和气味,甚至还会使发酵情况恶化^[1]。尽管野生酵母在酵母总数中只占很小的比例,但对啤酒质量的影响却是很大的。因此各啤酒厂家应经常检查野生酵母污染情况,如果在种酵母接入发酵罐之前就能将污染的野生酵母检测出来,那就可大大减少啤酒酿造过程中野生酵母污染的可能。但因种酵母中污染野生酵母数量少,检测难度大,受到现有的实验技术的限制。

本研究采取的免疫荧光抗体技术在检测酿酒污染野生酵母时具有检测准确、灵敏度高、检测速度快的突出优点^[2,3]。但该技术过去只用于啤酒酵母中污染野生酵母的检测,而国内啤酒厂家几乎均由卡尔斯伯酵母发酵生产啤酒。因此开展卡尔斯伯酵母中污染野生酵母检测研究的意义尤其重大。

1 材料和方法

1.1 供试菌种

菌种编号及菌名见表1。

表 1 供试菌种

菌号	菌名	菌号	菌名
1135	巴斯德酵母	1126	毕赤氏酵母
1081	巴斯德酵母	1123	德巴利酵母
1078	啤酒酵母椭圆变种	1138	德巴利酵母
1075	啤酒酵母椭圆变种	1141	球拟酵母
1087	糖化酵母	1120	热带假丝酵母
1093	威尔酵母	1132	卡尔斯伯酵母
1096	威尔酵母	1001	卡尔斯伯酵母
1084	葡萄酒酵母	1003	卡尔斯伯酵母
1090	发酵性酵母	1006	卡尔斯伯酵母
1114	薛瓦酵母	1009	卡尔斯伯酵母
1117	薛瓦酵母	1012	卡尔斯伯酵母
1102	卵形酵母	1015	卡尔斯伯酵母
1099	斯坦纳酵母	1018	卡尔斯伯酵母
1111	意大利酵母	1021	卡尔斯伯酵母
1045	意大利酵母	1024	卡尔斯伯酵母
1051	意大利酵母	1027	卡尔斯伯酵母
1054	啤酒酵母	1030	卡尔斯伯酵母
1057	啤酒酵母	1033	卡尔斯伯酵母
1063	啤酒酵母	1036	卡尔斯伯酵母
1072	啤酒酵母	1039	卡尔斯伯酵母
1144	异常汉逊酵母	1042	卡尔斯伯酵母

*卡尔斯伯酵母均是国内外啤酒工厂应用的啤酒酵母

其中啤酒酵母 6 株,卡尔斯伯酵母 15 株,酵母属野生酵母 14 株,非酵母属野生酵母 7 株,共有试验菌株 42 株。

这些菌种由本院菌种室及日本北海道大学菌种室提供。

菌种保存于 MYGP 培养基中(葡萄糖 1.0%, 蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.3%, 麦芽汁 0.3%, 琼脂 1.8%, pH5.6%)^[4]。

1.2 试验动物

为青紫蓝家兔,由江苏省血防所动物所饲养。

1.3 抗血清制备

1.3.1 抗原制备 (1) 将酵母菌接入装有 500mlMYGP 培养液的 2L 三角瓶内,在 25℃ 下摇瓶培养 3d;(2) 在无菌条件下用无菌 0.2%NaCl 溶液反复清洗 6 次,并离心制成酵母泥;(3) 将此酵母泥悬浮于 0.3% 甲醛盐水中并调整细胞悬浮液浓度至 10^8 个细胞/ml。

1.3.2 免疫方法 取体重在 3~7kg 的家兔,按下述计划耳缘静脉注射抗原液:第 1d 注射 0.5ml;第 6d 注射 1.0ml;第 11d 注射 1.5ml;第 16d 注射 2.0ml;第 21d 注射 2.0ml。

最后一次注射后过 5d 抽血化验检查抗体效价(细胞免疫凝集试验),如抗体效价未达要求,则在第 27d,第 32d 再注射 2.0ml 抗原液,第 37d 再抽血检测抗体效价,如抗体效价达 1/30 时可放血制取抗血清。

1.4 抗体吸收处理^[6]

对指定菌株的抗血清当用过量的其它菌株进行交叉吸收处理时可以提高抗体特异性。其方法为:(1) 将培养酵母接入装有 500mlMYCP 培养液的 2L 三角瓶内,在 22℃ 下摇瓶培养 3d;(2) 用无菌生理盐水在无菌条件下反复清洗 6 次,并离心分离制成酵母泥;(3) 将此酵母泥悬浮于无菌生理盐水中并调整细胞浓度至 1×10^9 个细胞/ml;(4) 用同体积 PBS 液稀释待吸收的抗血清一次;(5) 离心与待吸收抗血清同体积酵母悬浮液,倾去上清液,留下酵母泥;(6) 将此酵母泥悬浮于稀释过的抗血清中。并在 37℃ 水浴中保温振荡 1h;(7) 在 40℃ 下以 3500r/min 离心 10min,小心倾倒出抗血清;(8) 重复(5)(6)过程,直至达到要求为止;(9) 检查吸收过的抗血清要求。该抗血清对培养酵母呈现阴性反应,而对被检酵母则呈现阳性反应;(10) 将该抗血清作 1:20,1:40,1:80,1:160,1:320 稀释;(11) 备好酵母涂片,并作荧光检查;(12) 以不同稀释度抗血清进行检查,当野生酵母呈阳性反应而培养酵母呈阴性反应时,将该抗血清放于 4℃ 条件下保存,正式检查时再稀释 1 倍使用。

1.5 荧光抗体染色^[7]

(1) 将少量待检酵母泥用 10mlPBS 液振荡冲洗 6 次,再用无菌蒸馏水洗一次,并制成酵母悬浮液;(2) 将此酵母悬浮液调整至浓度为 1.5×10^8 个细胞/ml;(3) 用玻璃刀在载玻片上刻上待检酵母号,并在微火上烘烤 2min,让其自然冷却;(4) 用 0.1ml 无菌移液吸取 0.02ml 酵母悬浮液均匀地涂在载玻片上;(5) 用电吹风将涂片吹干,并用丙酮固定,接着以 PBS 液冲洗 3 次,每次 5min;(6) 以 1/10 稀释度的非免疫马血清稀释诊断血清至所需值,将诊断血清被覆于涂片上,将涂片置于 30℃ 电热恒温箱内反应 0.5h,取出后浸入 PBS 液中 10min,再用 PBS 液反复振荡冲洗 6 次,每次 5min;(7) 接着加工作浓度荧光标记羊抗兔抗体液于涂片上,将涂片置入 30℃ 恒温箱内反应 0.5h,取出后浸入 PBS 中 10min,再用 PBS 液反复振荡冲洗 6 次,每次 5min;(8) 取出涂片,将多余的水珠用吸水纸小心吸去,在涂片上滴加缓冲甘油并封片;(9) 在荧光显微镜下迅速检查。

2 结论与讨论

本研究用 4 种酵母免疫家兔制备了相应的抗血清,见表 2。其中抗巴斯德酵母中污染的酵母属野生酵母有着良好的检测率。

表 2 诊断血清制备

诊断血清	原抗血清	吸收酵母	备注
A	1135	1021	
B	1081	1021	
C	1084	1021	
D	1144	无	抗血清稀释度 1/320

当把经过卡尔斯伯酵母 1021 吸收过的抗巴斯德酵母 1135 血清用来检查卡尔斯伯酵母及污染野生酵母时,得结果见表 3。

结果表明,抗巴斯德酵母 1135 血清经卡尔斯伯酵母 1021 吸收后制备的诊断血清 A 能检出一些常见的酵母属野生酵母,还有一些酵母如薛瓦酵母、斯坦纳酵母则无法检查出来,

部分啤酒酵母椭圆变种及威尔酵母发出荧光,所以无法和酵母属野生酵母鉴别开来。当用这些发荧光的卡尔斯伯酵母吸收抗巴斯德酵母 1135 血清后,该抗血清便无法将卡尔斯伯酵母和野生酵母有效地区别开来。这说明卡尔斯伯酵母中有许多株酵母和一些酵母属野生酵母抗原较接近。

表 3 诊断血清 A 对酵母菌的检查结果

菌号	菌名	诊断血清	荧光强度 (抗血清稀释度 1/80)	菌号	菌名	诊断血清	荧光强度 (抗血清稀释度 1/80)
1135	巴斯德酵母		卅	1063	啤酒酵母		卅
1081	啤酒酵母		+	1001	卡尔斯伯酵母		—
1078	椭圆变种		+	1003	卡尔斯伯酵母		—
1075	椭圆变种		卅	1006	卡尔斯伯酵母		—
1087	糖化酵母	A	卅	1009	卡尔斯伯酵母	A	—
1093	威尔酵母		+	1012	卡尔斯伯酵母		+
1096	威尔酵母		+	1015	卡尔斯伯酵母		—
1084	葡萄酒酵母		+	1081	卡尔斯伯酵母		—
1090	发酵性酵母		+	1021	卡尔斯伯酵母		—
1141	薛瓦酵母		—	1054	卡尔斯伯酵母		+
1117	薛瓦酵母		—	1027	卡尔斯伯酵母		卅
1102	卵形酵母		+	1030	卡尔斯伯酵母		+
1099	斯坦纳酵母		—	1033	卡尔斯伯酵母		—
1111	意大利酵母		卅	1036	卡尔斯伯酵母		—
1045	啤酒酵母		卅	1039	卡尔斯伯酵母		—
1051	啤酒酵母		+	1042	卡尔斯伯酵母		卅
1057	啤酒酵母		+		卡尔斯伯酵母		

用文献[8]中证明对啤酒酵母中污染野生酵母有良好的检测效果的抗啤酒酵母椭圆变种 1081 血清检测卡尔斯伯酵母中污染野生酵母,结果不太理想,一些重要的野生酵母如威尔酵母、发酵性酵母、薛瓦酵母、斯坦纳酵母都无法被检测出来,巴斯德酵母,部分啤酒酵母椭圆变种也仅发出微弱的荧光。

用抗葡萄酒酵母 1084 血清(诊断血清 C)检测要比用抗啤酒酵母椭圆变种 1081 血清(诊断血清 B)检测效果好得多,虽有部分野生酵母如啤酒酵母椭圆变种、意大利酵母未被检测出来,但大多数其它酵母属野生酵母都被检测出来。另外,用该抗血清检测时,无法和野生酵母鉴别开来的卡尔斯伯酵母数也较少(共有 4 株)。将抗巴斯德酵母 1135 血清(诊断血清 A)和抗葡萄酒酵母 1084 血清(诊断血清 C)混合后检测野生酵母时,得结果见表 4。

结果表明用单一抗血清无法检测出来的野生酵母能被这两种混合血清有效地检测出来。当然,用这种混合血清检测时,无法和野生酵母鉴别开来的卡尔斯伯酵母数也增加到 6 株。

表4 诊断血清 A/诊断血清 C 混合检测酵母结果

菌号	菌名	荧光强度		
		诊断血清 A	诊断血清 B	A/C 混合血清
1135	巴斯德酵母	卅	+	卅
1081	啤酒酵母椭圆变种	+	+	卅
1078	啤酒酵母椭圆变种	+	+	卅
1075	啤酒酵母椭圆变种	卅	—	卅
1093	威尔酵母	+	卅	卅
1096	威尔酵母	+	卅	卅
1084	葡萄酒酵母	+	卅	卅
1087	糖化酵母	卅	卅	卅
1090	发酵性酵母	+	卅	卅
1141	薛瓦酵母	—	+	+
1117	薛瓦酵母	—	+	+
1102	卵形酵母	+	卅	卅
1111	意大利酵母	卅	—	卅
1099	斯坦纳酵母	—	卅	卅
1045	啤酒酵母	卅	卅	卅
1051	啤酒酵母	+	卅	卅
1055	啤酒酵母	—	+	+
1057	啤酒酵母	+	卅	卅
1063	啤酒酵母	+	卅	卅
1072	啤酒酵母	—	+	+
1009	卡尔斯伯酵母	—	卅	卅
1012	卡尔斯伯酵母	+	卅	卅
1024	卡尔斯伯酵母	+	+	卅
1027	卡尔斯伯酵母	卅	+	卅
1030	卡尔斯伯酵母	+	—	+
1042	卡尔斯伯酵母	卅	—	卅
1042	卡尔斯伯酵母	—	—	—

因抗巴斯德酵母 1135 血清和抗葡萄酒酵母 1084 血清的混合血清对酵母属野生酵母有较高的检测率,而对非酵母属野生酵母的检测效果不理想。所以本研究把能将非酵母属野生酵母检测出来的抗异常汉逊酵母 1144 血清(诊断血清 B)与上述两种抗血清混合后用来检测卡尔斯伯酵母中污染野生酵母,得结果见表 5。

结果表明,这种混合血清不仅能检测出卡尔斯伯酵母中污染的酵母属野生酵母,而且能有效地将其中污染的非酵母属野生酵母检测出来,不足之处是在 15 株卡尔斯伯酵母中有 7 株酵母用该混合血清检测时不能与污染野生酵母很好地鉴别开来。说明卡尔斯伯酵母抗原成分较复杂,有许多菌株与野生酵母之前存在大量的血清交叉反应,从而限制了该技术在卡尔斯伯酵母中污染野生酵母检测方面的应用范围。尽管如此,通过对模拟样品的检测表明,该技术检测准确、灵敏度高,能检测出百万以上培养酵母中混入的个别野生酵母,检测速度快,仅需 3~4h。因此,与其它技术相比仍有其可取之处。

表 5 诊断血清 A/诊断血清 C/诊断血清 D/混合血清对酵母检查结果

菌号	菌名	荧光强度			
		诊断血清 A	诊断血清 B	诊断血清 D	A/C 混合血清
1144	异常汉逊酵母	—	—	+++	+++
1026	毕赤氏酵母	—	—	+	+
1093	热带假丝酵母	—	—	+	+
1084	德巴利酵母	—	+	+	++
1087	球拟酵母	+	—	++	+++
1090	球拟酵母	+	—	++	+++
1141	胶红酵母	—	—	+	+
1009	卡尔斯伯酵母	—	++	—	++
1012	卡尔斯伯酵母	+	++	—	+++
1021	卡尔斯伯酵母	—	—	+	+
1024	卡尔斯伯酵母	+	+	+	+++
1027	卡尔斯伯酵母	++	+	—	+++
1030	卡尔斯伯酵母	+	—	—	+
1042	卡尔斯伯酵母	++	—	—	++
1001	卡尔斯伯酵母	—	—	—	—
1003	卡尔斯伯酵母	—	—	—	—
		—	—	—	—
		—	—	—	—

本研究中能与野生酵母有效鉴别开的卡尔斯伯酵母包括 1 株目前国内众多啤酒厂使用的卡尔斯伯酵母。通过对从使用该种酵母的某啤酒厂为传统敞口主发酵池，发酵后收集的酵母泥取来的样品——各代种酵母的检查，所得结果见表 6。

表 6 各代种酵母中野生酵母污染情况检查(单位:个/百万)

种酵母代数	污染野生酵母个数	种酵母代数	污染野生酵母个数
第 1 代	1~12	第 3 代	60~80
第 2 代	26~40	第 4 代	270~300

结果表明,该啤酒厂啤酒生产中各代种酵母均不同程度地受到野生酵母的污染,其发展情况如图 1 所示。

目前大罐发酵的啤酒厂种酵母使用代数约为 4~6 代,有的小啤酒厂种酵母使用代数更多,种酵母究竟应该使用多少代?各啤酒厂对此没有合理的分析手段,通常都是根据经验或啤酒口味变化以及是否发生啤酒混浊来决定取舍,这显然过于粗糙和落后。Richards 认为^[6],在一百万种酵母中污染野生酵母数超过 100 个时就不应再用该代种酵母。按此标准,本研究中所检查的该啤酒厂第 4 代酵母中污染野生酵母数已超标。理该舍去不用。其它几代种酵母也不不同程度

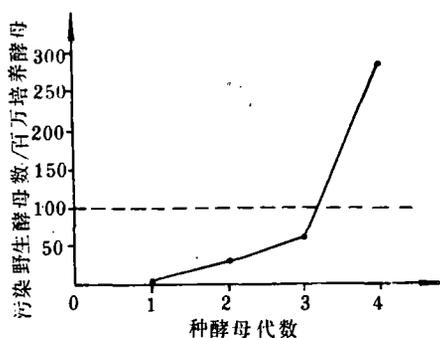


图 1 某啤酒厂生产中各种酵母污染野生酵母发展情况示意图

地受到野生酵母的污染也愈益严重。

参 考 文 献

- 1 王世彦. 酿酒, 1986, 4: 53
- 2 Campbell et al. J Inst Brew, 1966; 72: 556
- 3 Richards et al. J Inst Brew, 1967; 73: 552
- 4 Sandula J et al. Brauwissenschaft, 1964; 17: 130
- 5 Campbell I. J Inst Brew, 1968; 74: 360
- 6 Richards M. Wallerstein Lab Commun, 1970; 33(110): 11
- 7 Summers D F. J Immunol, 1963; 92: 491
- 8 顾国贤等. 啤酒酵母及污染野生酵母免疫分析. 酿酒, 1992; 2

The Application of "Immunofluorescent Antibody" to the Rapid Detection of Brewery Yeast Contamination

Gu Guoxian Zhang Xingyuan

(Wuxi Inst. of Light Ind.)

Fang Gang

(Huaihai Inst. of Technology)

Abstract The cells of brewery yeast contaminations are rendered fluorescent by means of IFA. The fluorescent contaminants are observed microscopically, and an estimate of level of contamination likely to be encountered in the brewery can be obtained rapidly. Wild yeast contaminants so far encountered are detected by three combined sera. The result of the application of this technique to a brewery shows that the condition of brewery yeast contaminants in the breed yeasts is present, and the fourth generation of breed yeasts is so contaminated that it can not be used again.

Key words IFA; Seed Yeast; Wild yeast