

啤酒污染菌酒花抗性基因型的多样性分析

郑飞云^{1,2,3}, 钮成拓^{1,2,3}, 朱林江⁴, 唐栋健^{1,2,3},
李永仙^{1,2,3}, 刘春风^{1,2,3}, 王金晶^{1,2,3}, 李崎^{*1,2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122; 4. 浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 为了评价采用酒花抗性基因 *horA* 和 *horC* 作为分子标记, 快速检测和鉴定具有腐败能力的啤酒污染菌的准确性, 对来自 5 家工厂的 53 株啤酒污染菌基因型和表型进行比较分析, 包括 M13-PCR 指纹、*horA/horC* 的 PCR 扩增、菌株的酒花抗性和啤酒腐败能力。M13-PCR 指纹的聚类分析表明不属于同一菌种的指纹相似性一般小于 70%, 同菌种不同菌株之间的指纹也存在较大差异, 因此 53 株菌株之间存在一定的个体差异。表型的比较分析表明, 酒花抗性或腐败性较强的菌株, *horA/horC* 检测结果一般为阳性, 针对这一类菌株其检测准确性较高。然而, 部分弱酒花抗性或无腐败能力的菌株, *horA/horC* 检测结果也为阳性, 其中无腐败能力的菌株的假阳性检出率达到了 78.6%; 部分弱腐败能力菌株的 *horA/horC* 检测为阴性, 即假阴性率为 28%。2 株具有较强酒花抗性的菌株的 *horA/horC* 检测为阴性, 表明可能存在新的酒花抗性机制。令人感兴趣的是, 通过菌株间的比较分析表明 *horA/horC* 在 *L. plantarum* 中具有较高的保守性。以上研究结果表明, *horA/horC* 作为单一的分子标记, 难以准确地检测和鉴定所有啤酒污染菌的酒花抗性和腐败性。

关键词: 啤酒污染菌; 酒花抗性; PCR 指纹; 细菌快速检测; 遗传标记

中图分类号: TS 261 文章编号: 1673-1689(2019)12-0001-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.001

Evaluation of Genotypic Diversity in Hop Resistance of Beer Spoilage Bacteria

ZHENG Feiyun^{1,2,3}, NIU Chengtuo^{1,2,3}, ZHU Linjiang⁴, TANG Dongjian^{1,2,3},
LI Yongxian^{1,2,3}, LIU Chunfeng^{1,2,3}, WANG Jinjing^{1,2,3}, LI Qi^{*1,2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

收稿日期: 2017-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571942&No.31601558); 国家 863 计划项目(2013AA102106-03); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 江苏省自然科学基金项目(BK20150159); 江苏基础研究资助项目(JUSRP51306A, JUSRP51402A&JUDCF13008); 111 引智计划项目(111-2-06)。

作者简介: 郑飞云(1974—), 男, 硕士, 讲师, 主要从事啤酒污染菌的研究。E-mail: feiyunzh@jiangnan.edu.cn

* 通信作者: 李崎(1971—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事啤酒酿造方面研究。E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn

引用本文: 郑飞云, 钮成拓, 朱林江, 等. 啤酒污染菌酒花抗性基因型的多样性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 1-8.

Abstract: To evaluate the accuracy of genetic markers of *horA* and *horC* genes to rapidly detect the spoilage ability of beer spoilage bacteria, the genotypes and phenotypes of 53 spoilage bacteria strains which were isolated from 5 Chinese breweries were compared in this study. The physiological features studied included M13-PCR fingerprint, *horA* and *horC* genes, beer spoilage ability and hop resistance ability. The clustering analysis of M13-PCR fingerprint indicated that the similarity coefficient was less than 70% between different species and the similarity between strains in the same species also varied greatly. Hence, the genotypes of 53 strains were different from each other. Phenotype analysis showed that almost all strains with strong spoilage ability or hop resistance ability contained *horA* or *horC* genes, which confirmed the good accuracy of these genetic markers. However, some non-spoilage or weak hop-resistant strains also contained *horA* or *horC* genes, leading to a high false positive rate of 78.6%. A few weak spoilage strains did not contain *horA* or *horC* genes, which led to a false negative rate of 28%. Two strong hop-resistant strains did not contain *horA* or *horC* genes and they were supposed to have other mechanism of hop resistance. It is interesting that *horA* and *horC* genes were found to be conserved in *L. plantarum* species. These results indicated that *horA* or *horC* genes are not suitable to be used as genetic markers for rapid detection of the spoilage ability and hop resistance of all beer spoilage bacteria.

Keywords: beer spoilage bacteria, hop resistance, PCR fingerprint, rapid detection of bacteria, genetic marker

近些年,啤酒企业通过生产设备的更新换代,能有效地减少微生物污染事件,但是,微生物污染事件仍难以避免,而且对发酵过程以及终端产品的污染菌进行有效监控依旧是必不可少的^[1]。然而,对这些污染菌的监控一直是啤酒工业的瓶颈问题,目前主要沿用传统的培养基检测方法。然而,传统培养基检测方法存在以下2方面不足^[2]:第一,常用的微生物监控方法是富集培养基的方法,一般需要1周的时间,所以污染菌的检测结果具有严重的滞后性;第二,污染菌种类多样,菌株之间的腐败性能差异很大,啤酒腐败菌是从啤酒生产过程和环境中筛选而来,部分菌株具有较强啤酒腐败能力,而部分菌株能够存活但不能腐败啤酒,其具有转变为强啤酒腐败能力菌株的潜力。因此,用培养基方法难以快速鉴定菌株的腐败性能,若采用传统的植菌实验方法,则需要花费1个月的时间。为了能够更加有效地监控污染菌,针对啤酒腐败菌的分子生物学的特征已有大量的研究,比如特征的酒花抗性基因^[3-4]、具有较强腐败能力的菌株的表面抗原^[5-6]、乳酸脱氢酶的特征电泳特性^[7]、菌株质谱指纹特征^[8]等。

酒花抗性是被研究最多的啤酒污染菌的典型特征。酒花中的苦味物质,是一种弱酸,在酸性的啤

酒环境中,其未解离形式能够自由穿梭许多细菌的细胞壁和细胞膜,消除了胞内外的pH梯度,从而抑制或杀死细菌^[9-10]。然后,少量细菌,通过适应性进化,能够克服酒花苦味物质毒性,在啤酒环境中繁殖,腐败啤酒的风味口感,影响啤酒生产。就现代啤酒酿造工厂而言,这类具有腐败能力的污染菌主要是乳杆菌属(*Lactobacillus* spp.),如典型的短乳杆菌(*L. brevis*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)、布氏乳杆菌(*L. buchneri*)以及林氏乳杆菌(*L. lindneri*)等。此外在这些菌种中,不同的菌株,其腐败能力差异显著。所以,为了更有效地监测腐败啤酒的菌株,有必要对各个菌株的基因型多样性进行比较分析。

目前的研究表明,有些啤酒腐败菌的酒花抗性与ABC(ATP-binding cassette)家族的多药物转运蛋白HorA^[9]和RND(resistance-nodulation-cell division)家族的多药物抗性转运蛋白HorC^[11]。HorA是第1个被证明与酒花抗性相关的蛋白,位于*L. brevis* ABBC45的内源质粒上^[9],用二维电泳图谱分析确定为酒花苦味物质诱导型表达^[12]。另一个与酒花抗性相关的基因是*horC*,也是在内源质粒上,若缺失该基因,则显著降低宿主菌株的酒花抗性,而过量表

达该基因,可提高菌株的酒花抗性^[11,13]。但是,仍缺乏这些基因与酒花抗性相关的直接证据。若将 *horA/horC* 作为跨种基因标记检测啤酒污染菌,结果表明在被研究的大部分腐败菌株中,其 PCR 扩增结果为阳性,不过,也有一些非腐败菌株,其扩增结果为阳性,即 *horA/horC* 的检测具有较高的假阳性率^[14-15]。此外,以上实验菌株的基因型未被研究^[13],其菌株的基因型多样性未知,菌株之间的差异难以判断。所以,*horA/horC* 与多样性的啤酒污染菌菌株的相关性需要进一步研究。本次研究,针对来自 5 家啤酒厂分离的 53 株啤酒污染菌,研究菌株的 PCR 指纹多样性、表型多样性与酒花抗性基因型多样性之间关系,从而为啤酒污染菌有效监控提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

本次研究所使用的啤酒污染菌,为实验室保藏,来自国内长三角地区的多个不同啤酒厂的生产车间、酿造过程以及终端污染的产品。这些菌株经过 16SrDNA 测序鉴定,主要属于乳杆菌属。菌株的培养条件:采用 MRS 培养基或添加了四氢异- α -酸的质量浓度的 MRS 培养基,在 28 °C,进行厌氧培养。厌氧环境:培养皿的培养在厌氧罐中;液体培养在厌氧管或厌氧瓶中。

1.2 PCR 指纹扩增及聚类分析

DNA 提取:将各个菌株活化并接种到 MRS 液体培养基中厌氧培养;3 000 g 离心 5 min 收集细胞;将收集的细胞用于 DNA 提取,采用之前报道的 CTAB 法;提取的 DNA 作为 PCR 扩增的模板。

PCR 指纹扩增:采用指纹扩增的 M13 引物,其序列为:5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'。其扩增的反应体系如下(25 μ L):2.5 μ L 的 10 \times PCR buffer,2 μ L 的 mmol/L dNTP,5 U 的 μ L Taq 聚合酶,4 μ L 的 25 mmol/L M13 引物,2 μ L 的 DNA 模板,13.9 μ L 的双蒸水。PCR 扩增程序如下:94 °C 变性 3 min,42 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 3 min,然后 30 个循环,94 °C,45 s;42 °C,40 s;72 °C,120 s。然后 72 °C 延伸 10 min 后 12 °C 保温。15 μ L 的 PCR 产物用 1.5 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳进行分离,以 GoldView 为染料,通过凝胶成像仪获得 PCR 扩增指纹图谱。

PCR 指纹的聚类分析:PCR 指纹图谱采用 Applied Maths 公司的 GelCompar II 软件处理,选用 Pearson 系数计算指纹的相似性,并用 UPGMA

(Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic averages)方法构建距离树。

1.3 酒花苦味物质抗性分析

首先采用 MRS 培养基活性菌株:将保藏管中的啤酒污染菌接入装有 20 mL MRS 液体培养基的厌氧管中进行活化,接种量为 5 g/dL,30 °C 下厌氧培养 24~48 h;转接活化细胞到新鲜的 20 mL MRS 中,相同条件下厌氧培养 12~24 h,使细胞生长至对数期;通过培养皿背面标记均分涂布区域:将方形梯度平板分为 6 块平行区域;每一块区分平均分为 6 个小格,从低浓度端开始依次将每个小格标记为格子 1#-格子 6#;取 10 μ L 的培养液,均匀滴加到酒花梯度平板的相应位置;用涂布棒在平板的固定区域涂布均匀,并使培养液被吸干;在 28 °C,厌氧罐中,培养 3-5 d;观察细胞生长情况。各个四氢异- α -酸最小抑制浓度(MIC)的计算如以下公式(1)所示。

$$\text{MIC}=(C_{\text{高}}+C_{\text{低}})\times n/6 \quad (1)$$

其中 MIC 为菌株的四氢异- α -酸的最小抑制浓度; $C_{\text{高}}$ 为高质量浓度一端的四氢异- α -酸的质量浓度; $C_{\text{低}}$ 为低质量浓度一端的四氢异- α -酸的质量浓度;6 为每个菌株生长的培养基平板上平均分为 6 格; n 为实验菌株生长的格子数。

1.4 酒花抗性基因 *horA* 和 *horC* 的扩增

以 PCR 指纹扩增中提取的 DNA 为模板,对各个菌株的 *horA* 和 *horC* 进行扩增。*horA* 基因扩增引物为:*horA*-F(5'-ATCCGGCGGTGGCAAATC-3')和 *horA*-R(5'-AATCGCCAATCGTTGGCG-3'),扩增片段的长度为 324 bp。*horC* 基因的扩增引物为:*horC*-F(5'-GTCAACGAAGACAAAGGAGCTCTC-3')和 *horC*-R(5'-GGGCGAACCGTGAACAAATAG-3'),扩增片段的长度为 1 116 bp。

基因 *horA* 和 *horC* 的扩增反应体系均如下(50 μ L):5 μ L 的 10 \times PCR buffer,1 μ L 的 10 mmol/L 的 dNTP,5 μ L 的 25 mmol/L 的 MgCl_2 ,5 U 的 Taq 聚合酶,上下游的 10 mmol/L 的引物各 0.5 μ L,2 μ L 的 DNA 模板,36.5 μ L 双蒸水。PCR 扩增程序如下:94 °C 变性 3 min,然后 30 个循环,94 °C,45 s;61 °C,40 s;72 °C,30 s。然后 72 °C 延伸 5 min 后 12 °C 保温。PCR 产物采用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶分离,并用 GoldView 染料,在凝胶成像仪中显色。

1.5 腐败啤酒能力分析

啤酒污染菌的腐败啤酒能力采用传统植菌实

验,即将活化细胞直接接种到 12 °P 脱气啤酒,其步骤如下:

1) 菌株活化:将保藏管中的啤酒污染菌接入装有 20 mL MRS 液体培养基的厌氧管中进行活化,接种量为体积分数 5%,30 °C 下厌氧培养 24~48 h;转接活化细胞到新鲜的 20 mL MRS 中,相同条件下厌氧培养 3 d,使细胞生长至稳定期。

2) 啤酒培养基制备:对成品啤酒进行巴氏消毒,开盖用灭菌纱布包好静置 2 d 除气;将啤酒分装入已灭菌的厌氧管中,每管 20 mL。

3) 接种活化细胞:将已活化的菌液接入啤酒中,接种量为体积分数 1%,初始细胞浓度约为 10⁶ CFU/mL,25 °C 下培养 1 个月。能使啤酒变浑浊的即为啤酒腐败菌,并取 200 μL 通过 96 孔板测定最终 OD₆₀₀ 值。

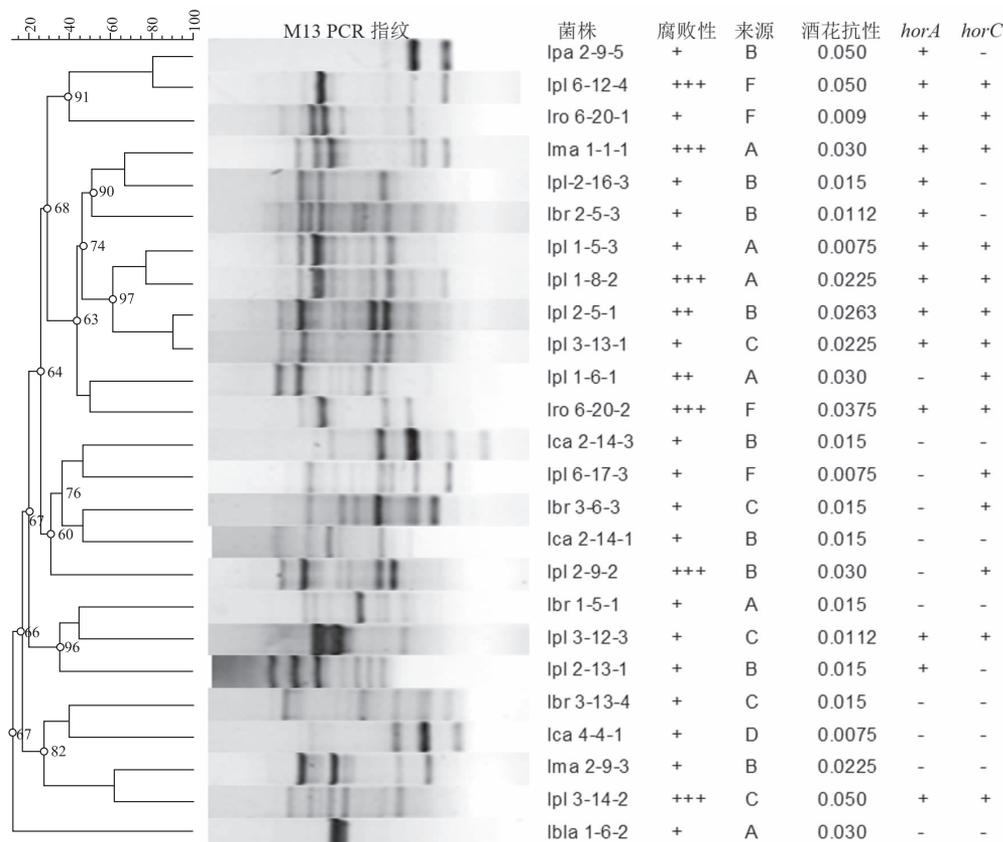
2 结果与讨论

2.1 啤酒污染菌 M13-PCR 指纹的扩增

从实验室保藏的啤酒污染菌资源库中,挑选来

自 5 个啤酒工厂环境或酿造样品中分离的 53 株污染菌。为了分析不同菌株之间的基因型差异,对其进行 M-13 指纹的扩增。M-13 引物是根据细菌基因组中保守的微卫星核心序列,通过 PCR 扩增,得到多种不同长度的 PCR 产物,形成特征性指纹图谱^[16]。M13-PCR 指纹较为复杂,不同类型的指纹,代表不同的菌株,具有菌株专一性的特征;此外该指纹具有良好的重复性,可用于菌种的鉴定^[17-18]。

对 53 株菌株的 M13-PCR 进行聚类分析,结果如图 3 和图 4 所示。这些菌种包括 *L. plantarum* (lpl)、*L. brevis* (lbr)、*L. casei* (lca)、*L. rossiae* (lro)、*L. lactis* (lbla)、*L. paracasei* (lpa) 和 *L. manihotivorans* (lma)。除了 lpa 2-9-5 和 lpl 6-12-4,不同菌种之间,其指纹相似性均小于 70%(图 1 和图 2)。然而同属一种菌,但不同菌株之间指纹相似性差异较大,如来自不同啤酒厂的 lpl 2-5-1 和 lpl 3-13-1,其指纹的相似性达到了 90%;而来自同一家工厂的 lpl 2-5-1 和 lpl 2-13-1 的相似性只有 28%(图 1)。若



菌株名称缩写 lpa:*L. paracasei*;lpl:*L. plantarum*;lro:*L. rossiae*;lbr:*L. brevis*;lca:*L. casei*;lbla:*L. lactis* 和 lma:*L. manihotivorans*。来源:菌株来源的工厂。酒花抗性:菌株四氢异- α -酸 MIC(%)。

图 1 啤酒腐败菌 M13-PCR 聚类分析及其生理特征

Fig. 1 Clustering analysis of M13-PCR results and biochemical properties of spoilage microbes which can grow in beer

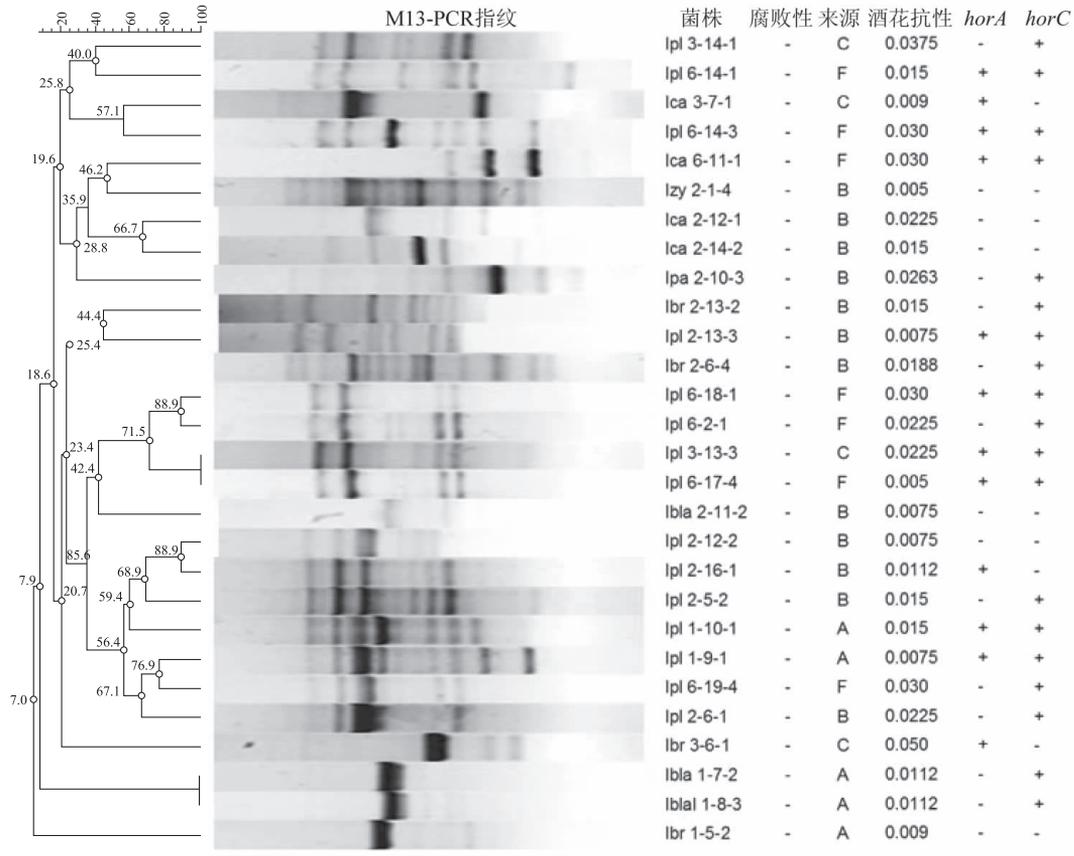


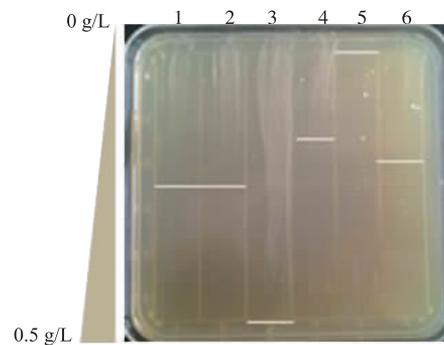
图2 非啤酒腐败菌的 M13-PCR 聚类分析及其生理特征

Fig. 2 Clustering analysis of M13-PCR results and biochemical properties of spoilage microbes which cannot grow in beer

是来自同一家工厂,同时具有非常相似的 M13 指纹,则可初步认为同一株菌株。所以,根据指纹菌类分析,53 株菌的 M13-PCR 指纹相差较大,表明其基因型各不相同,具备一定的多样性。

2.2 酒花苦味物质抗性的分析

为了快速分析各个菌株的酒花抗性能力,采用四氢异- α -酸梯度质量浓度的 MRS 平板,其质量浓度为 0~0.5 g/L 之间变化,如图 3 所示。将新鲜培养的细胞涂布于新鲜制作的梯度平板,经过厌氧培养后,根据生长菌膜的长度,计算各个菌株的四氢异- α -酸最小抑制浓度(MIC)。质量浓度梯度是依赖四氢异- α -酸的扩散形成,其制作过程要求 2 种高低质量浓度的培养基体积均等,同时下层培养基保持固定倾斜角度,平板的干燥和保存时间保持一致性。所有 53 株菌通过梯度平板法分析的四氢异- α -酸 MIC 如图 1 和图 2 所示,各个菌株的 MIC 在 0.05~0.5 g/L 之间不等,能够有效区分不同菌株之间的酒花抗性强弱,即可分为弱(0.05~0.1 g/L)、中(0.11~0.29 g/L)、强(0.3~0.5 g/L)3 种。



6 块区域代表的菌株名称及其四氢异- α -酸的 MIC 分别是: 1-6:*L. plantarum* 2-6-1(0.225 g/L)、*L. casei* 2-12-1(0.225 g/L)、*L. brevis* 3-6-1(0.5 g/L)、*L. brevis* 3-6-3(0.15 g/L)、*L. casei* 3-7-1(0.09 g/L)、*L. brevis* 2-6-4(0.188 g/L)

图3 四氢异- α -酸梯度平板分析菌株的酒花抗性

Fig. 3 Analysis of the hop resistant ability of strains through gradient hop agar plates

2.3 啤酒腐败能力的比较分析

啤酒污染菌的腐败性,是指在啤酒环境中能够生长繁殖,从而对啤酒的生物安全性和啤酒风味口

感构成威胁,是污染菌的一个重要生理表型。其腐败啤酒能力采用传统的植菌实验进行分析,即将新鲜活化的菌株接种到啤酒中,厌氧培养1个月,分析细胞生长情况。由于啤酒环境存在多种胁迫,包括含有酒花苦味物质、低pH的酸性环境、含量较少的营养物质、一定浓度的酒精等,所以细菌在啤酒中生长速率缓慢,且大部分细菌难以生长。针对53株啤酒环境分离的菌株,分析其在12 °P啤酒中的生长情况,结果如表1所示。根据96微孔板测定的OD₆₀₀值,将各个菌株的腐败啤酒性能分为无(-)、弱(+)、中(++)和强(+++)4种。其中,无腐败性的菌株为28株,弱的腐败性的菌株17株,而中和强的腐败性菌株各为2株和6株,所以各个菌株的腐败性存在显著差异。

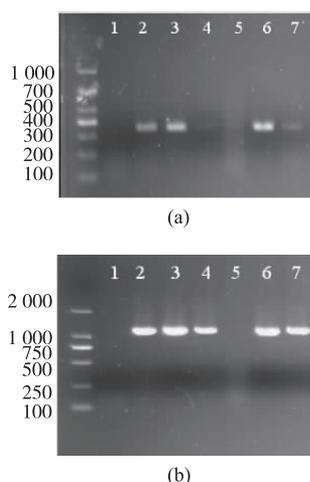
表1 啤酒污染菌的腐败能力统计表

Table 1 Summary of beer spoilage ability of spoilage microbes

腐败能力	吸光度(OD ₆₀₀)	菌株数
-	0~0.020	28
+	0.020~0.040	17
++	0.040~0.060	2
+++	0.060~0.120	6

2.4 酒花抗性基因的扩增

horA 和 *horC* 也已被作为跨种基因标记,检测啤酒腐败菌。对53株啤酒污染菌的PCR扩增检测,



泳道1-7菌株:*L. plantarum* 1-5-2,*L. plantarum* 1-5-3,*L. plantarum* 1-8-2,*L. plantarum* 1-9-1,*L. zymae* 2-1-4,*L. plantarum* 1-10-1,*L. plantarum* 2-5-1

图4 *horA*(A)与*horC*(C)基因扩增

Fig. 4 PCR results of *horA* and *horC*

如图4所示。其中图2(a)为*horA*检测结果,扩增片段长度为324 bp,图2(b)为*horC*的检测结果,片段长度为1116 bp。结果表明*L. plantarum* 1-5-2和*L. zymae* 2-1-4的*horA*和*horC*检测均为阴性,*L. plantarum* 1-8-2的*horA*扩增较弱,但是扩增片段的大小一致。所有53株菌的检测结果总结在图1和图2中。

2.5 啤酒污染菌基因型和表型多样性分析

为了分析啤酒污染菌基因型与表型的相关性,总结并比较分析53株菌的基因型和表型,如图1和图2所示。首先根据腐败啤酒的能力,将菌株分为腐败菌与非腐败菌;其次将菌株的M13-PCR指纹通过GelCompar II软件进行聚类分析;再者,将菌株的来源工厂、腐败啤酒能力、酒花抗性能力、*horA*和*horC*扩增结果等信息进行总结和比较分析。

酒花抗性相关基因与酒花抗性能力、腐败啤酒能力之间关系如表2所示。其中,*horA/horC*扩增阳性,表示*horA*或*horC*扩增为阳性,该PCR检测结果被认为与啤酒腐败菌有密切关系,同时存在一定的假阳性率。本次研究结果表明,在28株腐败菌中,有22株菌的*horA/horC*扩增结果为阳性,其假阳性率高达78.6%,而25株非腐败菌中,有7株腐败能力较弱的菌株,其*horA/horC*扩增结果为阴性,即假阴性率28%。不过,在腐败能力较强的8株菌株中,*horA/horC*扩增均为阳性,即腐败能力较强菌株含有*horA*或*horC*。*horA/horC*与菌株的酒花抗性能力相关分析表明,14株酒花抗性较强的菌株中有13株含有*horA/horC*,表明酒花抗性较强的菌株一般含有*horA*或*horC*。不过,12株酒花抗性较弱的菌株中,有7株菌含有*horA*或*horC*;而酒花抗性为中等强度的27株中,有7株菌不含*horA*和*horC*。所以,*horA/horC*的PCR扩增检测,具有较高的假阳性率和一定的假阴性率,不能充分鉴定菌株的腐败啤酒能力和酒花抗性能力,然而菌株的*horA/horC*基因在胞内的实际表达水平有待进一步研究。此外,有些菌株具有较强酒花抗性,但*horA*和*horC*的扩增均为阴性,如具有腐败能力的*L. lactis* 1-6-2和不具有腐败能力的*L. casei* 2-12-1,这些菌株中可能存在新的酒花抗性机制。

*horA/horC*扩增与菌种的关系进行比较分析,其中菌种选择含有4株及以上数量的菌种,结果如表3所示。本次选择的53株菌,主要是*L. plantarum*,

共 27 株;其次是 *L. casei/paracasei* (9 株)、*L. brevis* (8 株)、*L. lactis* (4 株)。在这些菌种中,*L. plantarum* 的 *horA/horC* 扩增阳性率最高,达到了 96.3%,显著高于其它 3 种菌,即 *horA/horC* 在 *L. plantarum* 具有较高的保守性。

表 2 *horA/horC* 扩增与污染菌的啤酒腐败能力和酒花抗性能力之间的关系

Table 2 Relationship among *horA/horC* genes, beer spoilage ability and hop resistance ability

菌株的腐败性	<i>horA/horC</i> 扩增 (阳性:阴性)	酒花抗性(四氢异- α -酸的 MIC)	<i>horA/horC</i> 扩增 (阳性:阴性)
-	22:6	弱(0.05~0.1g/L)	7:5
+	10:7	中(0.11~0.29g/L)	20:7
++	2:0	强(0.3~0.5g/L)	13:1
+++	6:0		

表 3 *horA/horC* 扩增与污染菌菌种的关系

Table 3 Relationship between *horA/horC* and spoilage bacteria strains

菌株名称	<i>horA/horC</i> 扩增(阳性:阴性)
<i>L. plantarum</i>	26:1
<i>L. brevis</i>	5:3
<i>L. casei/paracasei</i>	4:5
<i>L. lactis</i>	2:2

3 结 语

啤酒污染菌对啤酒的生产安全性和质量稳定

性构成威胁,对其有效监控是必不可少的环节。为了能够快速有效地监测啤酒腐败菌,*horA/horC* 已被作为跨种基因标记,通过 PCR 扩增监测啤酒污染菌。为了分析 *horA/horC* 检测的准确性,本次研究针对来自 5 家啤酒厂的 53 株啤酒污染菌进行基因型和表型的比较分析。通过 M13-PCR 指纹的聚类分析表明,不同菌种的指纹相似性一般小于 70%,同一菌种的不同菌株,其指纹也存在较大差异,表明 53 株啤酒污染菌具有丰富的基因型,个体差异显著。通过植菌实验分析了各个菌株的腐败啤酒能力和通过四氢异- α -酸梯度平板快速分析菌株的酒花抗性,并对 *horA/horC* 进行 PCR 扩增检测。比较各个菌株的基因型和表型表明,腐败能力较强和酒花抗性较强的菌株,*horA/horC* 的检测结果一般为阳性;但很多没有腐败啤酒能力的菌株,也是 *horA/horC* 检测阳性,假阳性率高达 78.%;少量具备弱腐败能力的菌株,其检测为阴性,即假阴性率为 28%;部分较弱酒花抗性菌株的 *horA/horC* 扩增为阳性,不过这些基因的胞内表达水平有待进一步研究;2 株较高酒花抗性菌株的 *horA/horC* 扩增为阴性,可能存在新的酒花抗性机制。此外,通过菌种间的比较分析表明,尽管 *horA/horC* 在 *L. bevis* 中被发现,但却在 *L. plantarum* 中具有较高的保守性。在后续研究中,拟通过进一步 PCR 扩增得到所有菌株 *horA* 和 *horC* 基因全长序列,分析其序列突变及蛋白质构象变化与其酒花苦味物质抗性之间的关系。

参考文献:

[1] ZHU Linjiang, ZHENG Feiyun, LI Qi, et al. Methods review for beer spoilage detection[J]. *Food Science*, 2007, 28(1):360-366. (in Chinese)

[2] SUZUKI K. 125th anniversary review, microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria[J]. *Journal of Institute of Brewing*, 2011, 117(2):131-155.

[3] SAKAMOTO K, MARGOLLES A, VEEN HW, et al. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(18):5371-5375.

[4] SUZUKI K, IJIMA K, SAKAMOTO K, et al. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria[J]. *Journal of Institute of Brewing*, 2006, 112(2):173-191.

[5] YASUI T, YODA K. The group E antigen is masked by the paracrystalline surface layer in *Lactobacillus brevis*[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 84(1):35-40.

[6] MARCH C, MANCLUS J J, ABAD A, et al. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera[J]. *Journal of Immunology and Methods*, 2005, 303(1-2):92-104.

[7] TAKAHASHI N, NAKAKITA Y, SUGIYAMA H, et al. Classification and identification of strains of *Lactobacillus brevis* based

- on electrophoretic characterization of D-lactate dehydrogenase:relationship between D-lactate dehydrogenase and beer-spoilage ability[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 1999, 88(5):500-506.
- [8]KERN C C, VOGEL R F, BEHR J. Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential[J]. **Food Microbiology**, 2014, 40(3):18-24.
- [9]SIMPSON W J. Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis* [J]. **Journal of General Microbiology**, 1993, 139(2):1041-1045.
- [10] ZHU Linjiang, ZHENG Feiyun, LI Qi, et al. The antibacterial activity of hop compound[J]. **Global Aicinfo**, 2007, 2(5):5-8. (in Chinese)
- [11] IJIMA K, SUZUKI K, OZAKI K, et al. horC confers beer-spoilage ability on hop-sensitive *Lactobacillus brevis* ABBC45cc[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 2006, 100(3):1282-1288.
- [12] BEHR J, ISREAL L, GANZLE MG, et al. Proteomic approach for characterization of hop-inducible proteins in *Lactobacillus brevis*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2007, 73(10):3300-3306.
- [13] SUZUKI K, IJIMA K, OZAKI K, et al. Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(9):5089-5097.
- [14] IJIMA K, SUZUKI K, ASANO S, et al. Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer-spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* gene clusters[J]. **Journal of the Institute of Brewing**, 2007, 113(1):96-101.
- [15] HAAKENSEN M, SCHUBERT A, ZIOLA B. Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer-spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer[J]. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, 2008, 66(3):63-70.
- [16] ROSSETTI L, GIRAFFA G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases [J]. **Journal of Microbiology and Methods**, 2005, 63(2):135-144.
- [17] ZHU L, ZHENG F, ZHAO Y, et al. Application of Rep-PCR fingerprint in rapid identification of beer-spoilage bacteria [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2006, 22(6):1013-1020.
- [18] ZHENG Feiyun, ZHU Linjiang, LI Yongxian, et al. Study on application of RAPD fingerprint on rapid identification for beer spoilage[J]. **Food Science**, 2007, 28(11):331-337. (in Chinese)

会 议 消 息

会议名称:2020年第十届生物科学,生物化学和生物信息学国际会议(ICBBB 2020)

会议时间:2020-01-19至2020-01-22

会议地点:日本京都大学

主办单位:ICBBB 2020

会议网址:<http://www.icbbb.org/>

会议简介:(ICBBB 2020)2020年第十届生物科学,生物化学和生物信息学国际会议将于2020年1月19-22日在日本京都大学举行,参会人员将一同庆祝ICBBB会议10周年。

会议亮点:ICBBB将在2020年于日本京都大学迎来10周年庆典

会议文章出版:

1. ICBBB 2017, ICBBB 2018已经出版到ACM国际会议论文集,被Ei Compendex和Scopus等检索。

2. ICBBB 2020录用的文章能发表在国际会议论文集,将被Ei Compendex和Scopus等检索。或发表在期刊IJBBB上。

投稿方式:<http://www.easychair.org/conferences/?conf=icbbb2020>

会议邮箱:icbbb@cbees.org

联系电话:+852-3500-0137(中国香港)/+86-28-86528465(中国大陆)

会议专员:江女士