

利用统计方法研究啤酒发酵液中 微生物的分布特点

陈 合,王 磊*

(陕西科技大学生命科学与工程学院,陕西西安 710021)

摘 要:用统计方法研究啤酒发酵液中微生物的分布特点,利用 NA、UBA 培养基检测发酵液前、后液体中的微生物数量,用统计方法对实验数据进行处理,得到如下结论:从总体来看,微生物分布较为均衡,但是发酵罐对微生物的分布影响较大。

关键词:啤酒,统计方法,厌氧菌,好氧菌

Study on distribution of microbe in beer fermented liquid by statistical methods

CHEN He, WANG Lei*

(College of Life Science and Technology, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: Distribution of microbe of beer fermented liquid was studied by statistical methods in this experiment. Microbial colonies were measured before and after fermented using NA, UBA medium, and experimental data was deal with statistical methods. The conclusions were obtained; taking as a whole, micro-organisms were distributed in average, but fermenters had a greater impact on the distribution of micro-organisms of beer fermented liquid.

Key words: beer; statistical methods; anaerobes; aerobic bacteria

中图分类号: TS261.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)10-0140-03

啤酒不仅含有人体需要的多种氨基酸,而且含有多种维生素^[1]。啤酒发酵过程中发酵液中微生物的分布情况是生产者最关心的问题^[2],这是因为微生物污染发酵液与环境、温度和人为因素有关^[2],且变化空间很大,随机性较强,发酵液污染情况直接关系到啤酒品质优劣的缘故。因此论文研究了啤酒发酵过程中微生物的分布特点,意在讨论啤酒发酵液中微生物分布情况以及发酵罐对发酵液中微生物分布情况的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

UBA 培养基(检测厌氧菌)^[3-4] 酵母浸膏 6.1g、蛋白胨 15g、番茄汁 244mL、葡萄糖 16g、K₂HPO₄ 0.31g、KH₂PO₄ 0.31g、MgSO₄ · 7H₂O 0.12g、NaCl 0.006g、FeSO₄ · 7H₂O 0.006g、MnSO₄ · 7H₂O 0.06g、MnSO₄ · H₂O 0.011g(配制 3000mL 的用量)、琼脂粉 10g(固体培养基用 12g)、蒸馏水 750mL,加热至煮沸,搅拌至完全溶解,轻轻搅拌混合,调节 pH6.0 ± 0.1,装于三角瓶中,121℃蒸汽灭菌 20min;NA 培养基(检测好氧菌)^[5] 称取营养琼脂 45g,加入 1000mL 蒸馏

水,加热煮沸溶解,装于三角瓶中,121℃蒸汽灭菌 20min;样品 前发酵液(接种酵母 2d 后的发酵液)、后发酵液(滤酒前 5d 的发酵液)。

无菌操作台,恒温培养箱,高压灭菌器,冰箱等。

1.2 实验方法^[5]

1.2.1 好氧菌的检测 在无菌条件下,用 1mL 无菌吸管,在无菌区域内吸取液体样品 1mL,注入无菌平皿内,然后倾注煮沸冷却到 46℃ 营养琼脂培养基,凝固后,倒置平皿,在 36 ± 1℃ 有氧条件下培养 2d。

1.2.2 厌氧菌的检测 将样品 1mL 加入试管内,注入 46℃ UBA15mL,盖上透气塞(倒入的培养基应接近管塞)在 27 ± 1℃ 无氧条件下培养 3d。(凡含有酵母的样品,都必须在无菌平皿或试管中先加入 1mL 放线菌酮)

1.2.3 实验数据处理 实验数据处理的方法及公式参见文献[6]和文献[7]。

2 结果与讨论

2.1 前发酵液中微生物的分布特点

实验用的前发酵液是冷麦汁接种酵母发酵 2d 的发酵液,分别任意抽取五个发酵罐为实验对象并记为 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅(本文均用这五个发酵罐为研究对象),每个发酵罐平行检测 10 个样品。前发酵液中好氧菌菌落数见表 1。

收稿日期:2008-12-26 * 通讯联系人

作者简介:陈合(1956-),男,教授,研究方向:食品生物技术与工程。

表1 前发酵液中好氧菌落数(cfu/mL)

发酵罐编号		菌落数(cfu/mL)										均值
A ₁	290	230	250	241	290	230	320	273	261	252	264	
A ₂	272	261	242	237	221	246	231	227	245	261	244	
A ₃	272	293	285	301	296	281	307	304	311	321	297	
A ₄	321	347	321	315	327	341	331	321	317	326	327	
A ₅	231	240	241	246	232	237	246	229	227	247	238	

表4 前发酵液中厌氧菌落数(cfu/mL)

发酵罐编号		菌落数(cfu/mL)										均值
A ₁	471	462	437	493	467	462	472	483	492	481	472	
A ₂	511	527	536	523	534	543	515	519	518	537	526	
A ₃	534	535	512	527	523	547	576	525	527	567	537	
A ₄	481	491	472	501	511	497	498	487	491	492	492	
A ₅	427	443	451	436	421	424	423	431	420	424	430	

利用统计方法由表1得出表2。从表2可以看出,前发酵液中好氧菌菌落数的均值为276cfu/mL,其中前发酵液中好氧菌菌落数90%情况都落在275±10cfu/mL区间内,从标准方差来看,好氧菌落分布也基本平衡,没有出现严重性污染情况。

表2 前发酵液好氧菌总体统计处理结果

均值	标准方差	90%置信区间
276	41.43	275±10

将A₁、A₂、A₃、A₄、A₅分成五个不同的区组,利用统计的方法由表1得到表3。

表3 前发酵液好氧菌区组统计处理结果

平方和	自由因子数	均方和	F比
S _A = 30358.43	f _A = 4	MS _A = 7589.61	MS _A /MS _e = 6.85
S _e = 53751.58	f _e = 45	MS _e = 1194.48	-
S _T = 84110.02	f _T = 49	-	-

假设显著差异水平 a = 10% ;
则有 F~F(f_A, f_e)
F_{0.9}(4, 45) = 2.08 (由 F 分布表查得)
F = MS_A/MS_e = 6.85 > F_{0.9}(4, 45) = 2.08

可知五个不同的发酵罐(A₁、A₂、A₃、A₄、A₅) 之间有显著性的差异,这也证实了微生物分布情况受环境的影响较大。

任意取两个发酵罐进行考察它们之间是否有显著性的差异,C 为显著水平临界值:

C = q_{0.9}(r, f_e) × (MS_e/m)^{1/2}

注:r-实验组数,等于5;m-实验组平行样的个数,等于10。

q_{0.9}(5, 45) = 3.57 (由 q 分布表查得)
C = 39

从表1可以看出 A₁、A₂、A₅ 任意两个均值差的绝对值都小于39,说明了 A₁、A₂、A₅ 三个发酵罐之间没有显著性的差异;A₃、A₄ 两个均值差的绝对值小于39,即 A₃、A₄ 两个发酵罐没有显著性的差异;但是 A₁、A₂、A₅ 任意一个发酵罐与 A₃、A₄ 任意一个发酵罐之间都有显著性的差异。

由于发酵液基本上都是在无氧条件下进行发酵的,因此厌氧菌是发酵液中的主体菌群。以同样的方法测得发酵液中的厌氧菌菌落数如表4所示。

由表4得到表5,从表5可以看出,前发酵液中

厌氧微生物的总体上分布情况:均值为492cfu/mL (显然比好氧菌多)、总体分布比较均衡没有出现严重污染现象、厌氧微生物数量90%的情况分布在492±10cfu/mL 区间。

表5 前发酵液厌氧菌总体统计处理结果表

均值	标准方差	90%置信区间
492	41.37	492±10

对前发酵液中厌氧菌分布情况进行比较,五个发酵罐在 a = 10% 的情况下显著性的差异,由表4得表6。

表6 前发酵液厌氧菌区组统计处理结果

平方和	自由因子数	均方和	F比
S _A = 72715.24	f _A = 4	MS _A = 18178.81	MS _A /MS _e = 73.51
S _e = 11127.18	f _e = 45	MS _e = 247.27	-
S _T = 83842.42	f _T = 49	-	-

注:F = MS_A/MS_e = 73.51 >> F_{0.9}(4, 45) = 2.08。

可知对于厌氧菌来讲,五个不同的发酵罐(A₁、A₂、A₃、A₄、A₅) 之间有较大的显著性差异,好氧菌的 F = 6.85 < 厌氧菌的 F = 73.51,说明了厌氧菌更加依赖环境条件,这也可能是 CIP 清洗不彻底导致发酵罐壁或死角中不同程度残留厌氧菌。

任取 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 中两个发酵罐,研究它们之间有无显著性的差异。

C = q_{0.9}(r, f_e) × (MS_e/m)^{1/2} = 17.80

从表4的 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 五个发酵罐厌氧菌的均值可知,它们任意两个之差的绝对值均大于17.8,因此对于厌氧菌来说,五个发酵罐之间均有显著性的差异。

2.2 后发酵液中微生物的分布特点

实验用的后发酵液(滤酒前5d的发酵液) 为实验样品,前发酵液到后发酵液经历了漫长的无氧环境,因此后发酵液中的好氧菌几乎不存在,所以只检测后发酵液中厌氧微生物的分布情况,通过实验得到表7。

由表7得到表8,表8与表5对照,不难发现后发酵液中的厌氧菌菌落数有所下降,且厌氧菌的分布情况更加均衡,90%的厌氧菌分布在343±5cfu/mL 之间。这是因为到后发酵时发酵温度更低、各种微生物已经衰老、发酵液中营养因子较少,导致大量的微生物活性降低的原因。

表7 后发酵液中厌氧菌落数(cfu/mL)

发酵罐编号	菌落数(cfu/mL)										均值
A ₁	347	332	327	336	341	321	327	326	323	320	330
A ₂	351	350	347	341	354	376	361	349	352	361	354
A ₃	352	362	359	367	353	347	369	381	372	365	363
A ₄	341	336	327	330	339	331	343	351	371	396	352
A ₅	321	324	317	320	332	333	309	301	303	312	317

表8 后发酵液厌氧菌总体统计处理结果

均值	标准方差	90%置信区间
343	20.87	343±5

任意取两个发酵罐考察它们之间是否有显著性的差异,通过表7得到表9,如表9所示。

表9 后发酵液厌氧菌区组统计处理结果

平方和	自由因子数	均方和	F比
S _A = 14253.48	f _A = 4	MS _A = 3563.37	MS _A /MS _e = 22.57
S _e = 7101.80	f _e = 45	MS _e = 157.82	-
S _T = 21355.28	f _T = 49	-	-

注: $F = MS_A / MS_e = 22.57 > F_{0.9}(4, 45) = 2.08$ 。

数据表明,五个发酵罐之间的厌氧菌分布情况有明显差异,但是与前发酵时的 $F = 73.51$ 相比,后发酵的 $F = 22.57$ 要小的多,可知经过漫长的发酵周期,各个发酵罐之间差异有所降低,这主要是微生物在后发酵时期活性降低的缘故,任意两个发酵罐考察之间是否有显著性差异:

$$C = q_{0.9}(r, f_e) \times (MS_e/m)^{1/2} = 14.15$$

从表7的 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 五个发酵罐厌氧菌的均值进行对照可知, A₁、A₅ 之间没有显著性差异, A₂、A₃、A₄ 之间没有显著性差异,但 A₁、A₅ 任意一个与 A₂、A₃、A₄ 任意一个发酵罐之间均有显著性差异。

3 结论

3.1 在发酵液中厌氧菌多于好氧菌,发酵前期厌氧菌比好氧菌多出 200cfu/mL 左右,到发酵后期,厌氧菌逐渐减少。发酵前期好氧菌菌落数 90% 落入 275 ± 10cfu/mL 区间内,厌氧菌菌落数 90% 落入 492 ± 10cfu/mL 区间内;发酵后期厌氧菌菌落数 90% 落入

343 ± 5cfu/mL 区间内。可以看出,五个发酵罐中微生物的分布情况比较均衡,没有出现严重的污染情况。

3.2 从区组来看,不论是前发酵液还是后发酵液 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 五个发酵罐对微生物的分布均有显著性的差异,即说明了五个发酵罐的卫生状况、密封情况以及工作人员之间操作水平有较大的差异。任意两个发酵罐进行有无显著性差异实验的结论是:发酵液前期好氧菌的情况, A₁、A₂、A₅ 任意一个发酵罐与 A₃、A₄ 任意一个发酵罐之间都有显著性的差异,厌氧菌的情况, A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 五个发酵罐对厌氧微生物的分布情况均有显著性差异;发酵液后期厌氧菌的情况, A₁、A₅ 之间没有显著性的差异, A₂、A₃、A₄ 之间没有显著性的差异, A₁、A₅ 任意一个与 A₂、A₃、A₄ 任意一个发酵罐之间均有显著性差异。

参考文献

- [1] 俞凌云,王毅,常亮,等.啤酒生产过程微生物的控制途径[J].酿酒科技,2007(12):62-64.
- [2] 张水成,王析,张世卿.食品工厂设备清洗及 CIP 系统[J].食品科技,2006(8):167-170.
- [3] Gallon M, Okay E, Kireci I, et al. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts [J]. Food Chem, 2003, 83: 71-382.
- [4] 陈惠珍, 骆建祥. 纯生啤酒厌氧菌检测技术探讨[J]. 海峡预防医学杂志, 2006(1): 50-51.
- [5] 吴红. 啤酒的微生物检验技术[J]. 酿酒, 2000(5): 34-36.
- [6] 郭诗松, 周纪芳, 陈颖. 实验设计[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 1-64.
- [7] 盛骤, 谢式千, 潘承毅. 概率论与数理统计[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 213-225, 270-282.

(上接第 139 页)

著 ($P < 0.05$) 提高乳化香肠的黏弹性,降低亚硝酸盐残留量,赋予乳化香肠独特的豆香味儿,不过由于瘦肉比例的降低和加水比例的上升,制品的机械强度有一定的下降,红度值显著 ($P < 0.05$) 下降, pH 升高,可能会影响乳化香肠的贮藏和销售,需要加入着色剂和酸度剂进行颜色和 pH 调节有待于进一步讨论。所选不同品种的大豆蛋白之间在主要指标上没有显著性 ($P > 0.05$) 差异。

参考文献

- [1] 张坤生. 法兰克福香肠乳化及工艺技术[J]. 食品科技, 2006(8): 130-133.
- [2] 张福, 杨艳敏. 大豆蛋白在肉制品中的重要作用[J]. 肉类工业, 2005(4): 48-49.
- [3] 刘国信. 大豆蛋白在肉制品加工中的应用[J]. 肉类研究, 2007(9): 28-29.

- [4] 刘志胜, 李里特. 大豆蛋白营养品质和生理功能研究进展[J]. 大豆科学, 2000(3): 25-27.
- [5] 周玲, 彭顺清, 汪学荣, 等. 大豆分离蛋白在肉制品中的应用[J]. 肉类工业, 2004(11): 41-43.
- [6] 孙彩玲, 田纪春, 张永祥. TPA 质构分析模式在食品研究中的应用[J]. 实验科学与技术, 2007(2): 1-4.
- [7] 秦志伟, 怀凤涛, 周秀艳, 等. 东北大豆蛋白质功能特性的研究[J]. 中国农学通报, 2005(5): 127-125.
- [8] Lusas E W, Riaz M N. Soy Protein Products: Processing and use. The Journal of Nutrition, 1995, 125(3): 573-580.
- [9] Lopez de Ojara M C, et al. Functional Properties of Soy Protein Isolates As Affected by heat Treatment During Isoelectric Precipitation [J]. JAOCs, 69(2): 184-187.
- [10] Barman B G, et al. Modification of Physical Properties of Soy Protein Isolate by Acetylation [J]. J Agric Food Chem, 1997, 25(3): 618-641.