

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00810102.7

[43] 公开日 2002 年 9 月 4 日

[11] 公开号 CN 1367843A

[22] 申请日 2000.5.31 [21] 申请号 00810102.7

[30] 优先权

[32] 1999.5.31 [33] PT [31] 102306

[86] 国际申请 PCT/PT00/00005 2000.5.31

[87] 国际公布 W000/73495 英 2000.12.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.9

[71] 申请人 农业高等专科学校

地址 葡萄牙里斯本

共同申请人 STABVIDA 生物科学调查与服务股份有限公司

[72] 发明人 V·B·洛雷罗 M·贡萨尔维斯

N·罗德里格斯

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 吴磊

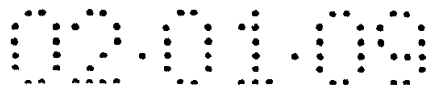
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 适于检测德克氏酵母属和酒香酵母属的培养基

[57] 摘要

本发明提供一种适于属于德克氏酵母属和酒香酵母属的酵母的检测和计数的普通的培养基,以及采用所述培养基的适于所述酵母的检测和计数方法。按照本发明,该方法包括加入碱性酵母培养基,非发酵的能源,尤其是乙醇,p-香豆酸,作为芳香化合物促进底物,专门由所述的酵母属产生,酸-碱指示剂,尤其是溴甲酚绿,酵母生长抑制剂抗生素,尤其是放线菌酮,以及细菌生长抑制抗生素,尤其是氯霉素和/或土霉素。当德克氏酵母属和酒香酵母属酵母在所述培养基中培养时,生长的菌落显示特征的颜色,归因于pH的下降,培养基的颜色按照可再现的模式改变,并且产生特征的酚样香味,在培养一些天之后通过嗅觉易检测,这些使它们的检测和计数成为可能。本发明可用于食品和饮料工业中属于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测和计数,允许其包含于酵母鉴定法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权利要求书

1. 一种适于食品和饮料污染物德克氏酵母属和酒香酵母属酵母计数的鉴别培养基，其特征在于它包括一种培养基，乙醇，p-香豆酸，一种变色点位于酸性范围的酸-碱指示剂，一种适于一些酵母种的抑制剂抗生素，以及选择性地细菌生长抑制剂和琼脂。

2. 按照权利要求1的培养基，其特征在于乙醇含量为32至96g/L，优选48g/L。

3. 按照权利要求1的培养基，其特征在于p-香豆酸含量为0.05至1.0g/L，优选0.1g/L。

4. 按照权利要求1的培养基，其特征在于培养基是“Yeast Nitrogen Base”，含量为5至10g/L，优选6.7g/L。

5. 按照权利要求1的培养基，其特征在于适于一些酵母种的抑制剂抗生素是放线菌酮，含量为0.004至0.1g/L，优选0.01g/L。

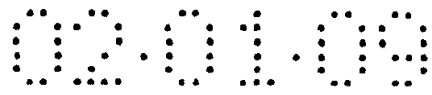
6. 按照权利要求1的培养基，其特征在于pH指示剂是溴甲酚绿，含量大约为0.022g/L。

7. 按照权利要求6的培养基，其特征在于以强酸调节这种培养基的pH至4.8和6.0之间，优选5.4。

8. 按照权利要求1的培养基，其特征在于它另外含有细菌生长抑制剂，优选氯霉素和/或土霉素，含量大约为0.1g/L，以检测含有混合种群的酵母和细菌的食品和饮料内的德克氏酵母属和酒香酵母属酵母。

9. 按照任何一项前述权利要求的培养基，其特征在于它含有除了琼脂之外的所有成分，以检测和鉴别含有混合种群的酵母、细菌尤其丝状真菌的食品和饮料中的德克氏酵母属和酒香酵母属酵母。

10. 一种适于食品和饮料污染物德克氏酵母属和酒香酵母属酵母计数的鉴别培养基，其特征在于它具有以下成分：5至10g/L，优选6.7g/L的“Yeast Nitrogen Base”；0.004至0.1g/L，优选0.01g/L的放线菌酮；0.05至1.0g/L，优选0.1g/L的p-香豆酸；0.022g/L的溴甲酚绿，或另一种具有相同变色点的酸-碱指示剂；32至96g/L，优选48g/L的乙醇；0.1g/L的氯霉素和/或0.1g/L的土霉素，和20g/L的琼脂，以强酸调节培养基的pH至4.8和6.0之间，优选5.4。



11. 按照前述权利要求的一种适于食品和饮料污染物德克氏酵母属和酒香酵母属酵母计数的鉴别培养基,其特征在于除了琼脂在高压灭菌器中灭菌之外,所有成分经滤过灭菌;先前经滤过灭菌的培养基所有的其它成分在无菌条件下向这种溶液的加入在琼脂冷却之后,其固化之前;并且分配这种培养基至陪替氏培养皿以便其固化。

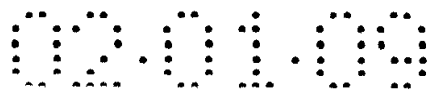
12. 一种适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测和/或鉴定的方法,其特征在于通过采用适于食品和饮料污染物德克氏酵母属和酒香酵母属酵母计数的鉴别培养基,该培养基包括培养基,非发酵能源,p-香豆酸,一种变色点位于酸性范围的酸-碱指示剂,一种适于一些酵母种的抑制剂抗生素,以及选择性地细菌生长抑制剂和琼脂。

13. 按照权利要求 12 的一种适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测和/或鉴定的方法,其特征在于酸-碱指示剂是溴甲酚绿,并且在以含有德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的样品接种所述的培养基之后,在充分适于所述酵母生长的条件下培养 5 至 12 天,根据德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的特征,培养基颜色由蓝色至黄色的变化,和乳状染色菌落的生长和酚样香气,检测它们的存在,以及需要时计数所述的酵母属是可行的。

14. 按照权利要求 12 和 13 的一种适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测和/或鉴定的方法,其特征在于它应用于食品和饮料产品样品中的德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测和计数。

15. 按照权利要求 1 至 11 的培养基加其它酵母鉴定试验包含于酵母鉴定法的用途。

16. 按照权利要求 1 至 11 的培养基在工业,尤其在食品和饮料工业质量和工艺控制中的用途。



说明书

适于检测德克氏酵母属和酒香酵母属的培养基

发明目的

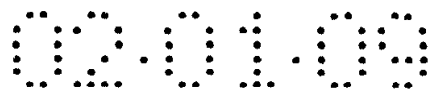
本发明涉及到一种培养基，在其制剂中含有乙醇和 p-香豆酸，它适于食品和饮料污染物德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的鉴别检测和计数。采用所述的适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母鉴别检测的方法也是本发明的目的。所述培养基在酵母鉴定法(gallery)中的用途还是本发明的一项目的。

本发明的目的在于提供食品和饮料工业一种培养基和使用所述培养基的方法，通过这种培养基和其中生长的菌落的颜色变化，以及特征的酚样香味的产生，能够分离、鉴别地检测和计数德克氏酵母属和酒香酵母属酵母。

背景技术

目前在许多不同的聚集处(例如，饮料、食品、自然底物)的酵母微生物区系的研究和鉴定一般包括首先菌株分离阶段和在普通酵母培养基的纯化阶段，接着是其次的鉴定阶段，它采用经典的分类学方法或分子生物学基础的技术。德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的缓慢生长令其在常规使用的培养基中的分离极其困难，由于这些酵母已经被与它们共存的更快生长的酵母掩盖(overtake)。这样的事实令它们的检测和计数，以及它们以后在食品和饮料中的鉴定更困难，这种鉴定一般通过采用极慢的、工作深入的和专业技能要求高的经典技术或者通过采用包括昂贵的反应物、在市场上并不经常迅速获得的分子探针或引物和熟练操作者的分子生物学技术完成。

毫无疑问地确信这些酵母包含于酒-"horse sweat"-尤其是在栎树桶陈化的那些之中的严重感觉缺陷的产品内是可能的。(Chatonnet 等人, 1992, J. Sc. Food Agric., 60, 165-178)。其后，它们在酒中的检测和计数是必需的，随之出现发展适于那样的检测和计数的快速方法的需要。本领域参考书目公开了适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母检测和计数



的方法，它基于这些种的放线菌酮耐药性和它们的酸化能力(Chatonnet 等人, 1992, J. Sc. Food Agric., 60, 165-178; Fugelsang, K. 等人, 1993. Ed. Barry H. Gump. ACS Symposium series 536, American Chemical Society, 华盛顿. Cap. 7, 110-119; Alguacil, M. 等人, 1998. Aliment. Equipos Tecnol, 10, 81-85). 然而, 这些已公开的培养基并不完全令人满意, 由于它们没有充分的防止快速生长菌种生长的选择性, 而且不是完全鉴别的。

因此, 对于适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的简易和快速鉴定的培养基和方法存在真正的和实际的需要, 即提供食品和饮料工业一种适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的快速分离、鉴别的检测和计数方法。

发明介绍

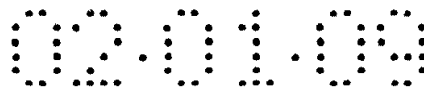
令人惊奇地发现采用含有乙醇和 p-香豆酸的培养基适于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母生长, 与其它酵母相比, 在培养 5 至 12 天之后, 这些酵母以特征的和唯一形式产生 4-乙苯酚和乙酸。此外, 通常与德克氏酵母属和酒香酵母属酵母共存、更快生长从而妨碍它们的检测的其它种的酵母, 被选择性地抑制。

按照本发明, 研发一种培养基, 它对于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母是部分选择性地和完全鉴别的, 它基于通过其特征性香味的 4-乙苯酚检测, 和借助于适当的酸-碱颜色变化的醋酸检测, 乙苯酚和醋酸由在含乙醇和 p-香豆酸的培养基中生长的那些酵母产生。

因此, 本发明涉及到适于食品和饮料污染物德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的鉴别检测和计数的培养基。所述的培养基包括培养基, 作为非发酵能源和抑制其它酵母种的乙醇, 作为由所述酵母种产生的芳香化合物促进底物的 p-香豆酸, 变色点位于酸性范围的酸-碱指示剂(特别是溴甲酚绿), 抑制几个种酵母生长的抗生素(特别是放线菌酮), 以及琼脂, 当这种培养基以固体形式使用时。

在一项实施方案中, 按照本发明的培养基中培养基是“Yeast Nitrogen Base”(酵母氮基)并且酸-碱指示剂是溴甲酚绿。

在另一项实施方案中, 按照本发明的培养基进一步含有细菌生长抑制剂, 特别是氯霉素和/或土霉素, 它对于包括种群的混合细菌之内德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测是特别地有效的。



本发明目的培养基，当其为液体形式时，通过灭菌过滤制备，接着分散至足够的试管中。预计培养基是固体形式时，琼脂溶于软化水中，接着在高压灭菌器中灭菌；灭菌之后冷却至大约 50℃，无菌条件下加入以前已经滤过灭菌过的其它的成分。在灭菌之前对两种培养基进行 pH 调节，pH 值取决于使用的酸-碱指示剂。匀化混合物，并倾入陪替氏培养皿，固化之后培养基备用。

本发明也涉及到德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测和计数方法，采用部分选择性和完全鉴别的培养基，特征如上。

按照本发明的方法允许以一种使用按照本发明的培养基的简便方法，检测和计数德克氏酵母属和酒香酵母属酵母。

按照本发明，通过与分析样品直接接触使用培养基，如果有意于污染物酵母的计算，采用充分的稀释物。如此接种的培养基接着在充分适于酵母生长的温度下，在充分适于生长清楚可见菌落(固体培养基情形下)或者溶液混浊(液体培养基情形下)的时间期间内培养，通常为 5 至 10 天。陪替氏培养皿内德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测通过直接观测乳状染色的菌落，通过按照使用类型的酸-碱指示剂的培养基颜色的变化，以及通过存在特征性的酚样香味完成。如果延长培养时间，菌落获得更深的染色。液体培养基内的检测通过培养基颜色的变化和酚样香味的存在完成。

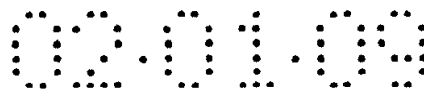
此外，任何微生物学实验室制备培养基，它是方便、迅速和易重现的方法，无需采用新技术。一旦制成培养基，其由任何食品和饮料工业或质量控制实验室的使用是迅速的，由于它除了负责常规微生物学分析者之外并不需要专门的操作者。

因此，本发明目的之一在于提供食品工业一种方法，它通过特征的菌落产生、培养基颜色变化和酚样香味的产生，可分离、鉴别检测和计数德克氏酵母属和酒香酵母属酵母，从而避免在它们分离之后所述的酵母鉴定的不便，如上所述，采用按照本发明的培养基和方法实现目的。

因此，按照本发明的培养基的用途允许：

a) 食品和饮料工业中归因于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的污染物的检测和鉴定，在生产工艺的每一步，从原料至完成和贮藏的产品。

b) 定义临界检测点，以便建立适合于食品和饮料工业内每一种临界



检测点的检测标准。

进一步地，按照本发明的培养基适用于包含于酵母鉴定法 (galeries)。

本发明优选的实施方案

在优选的实施方案中，本发明涉及到适用于德克氏酵母属和酒香酵母属酵母鉴别检测和计数的培养基，它包括作为营养基的“Yeast Nitrogen Base”，作为非发酵能源的乙醇，作为芳香化合物(4-乙苯酚)促进底物的 p-香豆酸，作为变色点位于酸性范围的酸-碱指示剂的溴甲酚绿，抑制几个种酵母生长的抗生素(放线菌酮)，以及细菌生长抑制剂抗生素。

在本发明的这种实施方案中，在培养基接种含有德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的样品之后，它可以是先前分离的这些酵母的样品，或者酵母和/或酵母和细菌的混合样品，并且在有益于这些酵母属生长的条件下接种，在大约 5 至 12 天之后，通过培养基颜色由蓝至黄的变化，乳状染色的菌落和特征的酚样香味的产生，鉴定是可行的。

通过下列实施例进一步举例说明本发明，它们仅仅意于例证本发明，决不限制本发明范围。

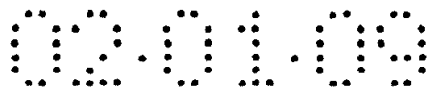
实施例

实施例 1:

按照本发明的培养基的制备

本发明目的培养基，可采用下列配方制备 (g/L): Yeast Nitrogen Base (6.7)，作为营养基；乙醇 (48)，作为非发酵能源和作为一些酵母的抑制剂；p-香豆酸 (0.1)，作为产生酚样香味底物；溴甲酚绿 (0.222)，预先溶于 NaOH，作为酸-碱指示剂；放线菌酮 (0.01)，作为一些酵母种的抑制剂抗生素；氯霉素 (0.1) 和/或土霉素 (0.1)，作为细菌抑制剂抗生素；以及琼脂 (20)，作为胶凝剂。这种培养基如下灭菌：琼脂溶于 70% 的总共所需的水中，pH 以强酸调节至 5.4，所得的溶液在高压灭菌器中于 120°C 灭菌 20 分钟。其它的成分溶于剩余的软化水中，以强酸调节 pH 至 5.4，所得的溶液通过经 0.22 μ m 孔径的薄膜过滤灭菌。接着以上两种溶液一起混合，当琼脂溶液达到 50°C 时。然后匀化培养基并分散入陪替氏培养皿，它在接种前固化。

实施例 2:



本发明目的培养基在酒中德克氏酵母属和酒香酵母属酵母的检测中的用途

在本实施例中，采用实施例 1 的培养基分析怀疑已经变质了的两种酒。每种酒的 20 ml 样品在无菌条件下经 0.22 μ m 孔径的醋酸纤维素薄膜过滤。每个薄膜置于含有本发明培养基的陪替氏培养皿表面上并在 25 $^{\circ}$ C 接种。3 天之后，在一个皿内观察到菌落，伴随着培养基颜色由蓝至黄的变化；当打开该皿时，未察觉酚样香味的存在。3 天之后，在另一皿中未发现菌落。9 天之后，已观察到菌落的皿保持同样的特征。在另一皿中可以观察到小的乳状染色的菌落，由蓝至黄的培养基颜色变化和特征的酚样香味。采用经典的鉴定方法，确认未显示酚样香味的皿中生长的菌落不属于德克氏酵母属和酒香酵母属，而显示酚样香味的皿中的那些属于这些属。

实施例 3

本发明目的培养基在怀疑存在丝状真菌的酒中酵母计数的用途

这种情形下，当可屏蔽陪替氏培养皿表面的霉菌生长或抑制酵母菌落的产量时，采用最可信的数量计数技术，采用含液体培养基的试管。因此，在此培养基配方中不采用琼脂，该培养基经过滤彻底灭菌。在这种情况下，当存在培养基混浊、由蓝至黄的颜色改变，和存在酚样香味时，发现存在德克氏酵母属和酒香酵母属酵母；因此，认为所有显示这些特征的试管是阳性，所有其它的是阴性。

尽管基于其优选的实施方案介绍本发明，在附加的权利要求的精神和范围内可能的变动和修正对于本领域的任何熟练技术人员是明显的。