

浓缩苹果汁生产环境中嗜酸耐热菌 的分离与初步鉴定*

胡贻椿,岳田利,袁亚宏,高振鹏

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为了解和控制我国浓缩苹果汁中的嗜酸耐热菌,对浓缩苹果汁生产过程主要工段和生产车间的空气及用水,进行了采样和分离鉴定,并与标准菌株 *A. acidoterrestris* 和已知分离菌株进行了比较分析。结果表明,共分离得到了 3 株污染浓缩苹果汁的嗜酸耐热菌;在耐热、耐酸性检验中,这 3 株菌均可以较好地生长,符合脂环酸芽孢杆菌属嗜酸耐热的特点。与标准菌株和已知分离菌株细胞、菌落形态观察、生长条件和生理生化反应等方面的比较表明,这 3 株菌与标准菌株有较大的相似性,与标准菌应为同属不同种。

[关键词] 浓缩苹果汁;嗜酸耐热菌;脂环酸芽孢杆菌;生产环境;菌株分离与鉴定

[中图分类号] TS275.5;TS261.1+3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2007)05-0184-05

Isolation and preliminary identification of thermo-acidiphilic bacteria in AJC production environment

HU Yi-chun, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, GAO Zhen-peng

(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To understand and control thermo-acidiphilic bacteria in the AJC, samples from major sections and environments of AJC production were analyzed in comparison with the standard strain *A. acidoterrestris*, the known isolated strain. And three thermo-acidiphilic bacteria which polluted AJC were isolated. Results showed the three selected strains were heat-resistant and acid-endurant, which corresponded with the characteristics of the thermo-acidiphilic Alicyclobacillus spp. The results compared with the standard strain *A. acidoterrestris* and the already known isolated strain in terms of cell morphology, colony morphology, cultural characteristics and physiological characteristics indicated that, the three strains had great similarity with the standard strain, and they should belong to the species of Alicyclobacillus.

Key words: apple juice concentration(AJC); thermo-acidiphilic bacteria; Alicyclobacillus spp.; production environment; isolation and identification for strains

脂环酸芽孢杆菌,俗称为耐热菌、嗜酸耐热菌、耐热耐酸菌等^[1-2]。该属的酸土脂环芽孢杆菌(*A. acidoterrestris*)、酸热脂环芽孢杆菌(*A. acidocaldarius*)等可以引起巴氏灭菌果汁(如苹果汁、桔汁、

芒果汁等等)的腐败,使果汁浊度升高,产生难以接受的气味,乃至在包装物底部形成白色沉淀等质量危害^[3]。以目前的杀菌条件尚难以消除其危害,因而严重影响我国产品的出口创汇,给我国浓缩苹果

* [收稿日期] 2006-10-10

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAK02A24);国家科技部西部项目(2001BA901A19);霍英东基金项目(81065);国家“十五”科技攻关项目(2001BA501A15)

[作者简介] 胡贻椿(1982-),女,湖南岳阳人,在读硕士,主要从事食品生物工程技术研究。

[通讯作者] 岳田利(1966-),男,陕西宝鸡人,教授,博士生导师,主要从事食品生物工程技术及食品安全控制技术研究。

汁的国际化发展带来了严峻的考验。

脂环酸芽孢杆菌属自1992年建立以来,在各国陆续发现了新的菌株^[4-7],到目前为止共有11个种(*A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. cycloheptanicus*, *A. hesperidum*, *A. genomic species 1*, *A. herbarius*, *A. acidiphilus*, *A. genomic species 2*, *A. sendaiensis*, *A. pomorum*, *A. vulcanalis*)和2个亚种(*A. acidocaldarius subsp. Acidocaldarius*, *A. acidocaldarius subsp. Rittmannii*)。截至目前,我国对脂环酸芽孢杆菌属菌种的研究尚不多见。因此在我国开展该属新菌种的开发、鉴定,地域分布特性及源于果汁的新菌株的分离鉴定及其特性研究,对有效控制其危害具有十分重要的现实意义。

本研究从浓缩苹果汁生产过程中可能遭受嗜酸耐热菌污染的主要环节进行采样,包括生产车间空气和车间用水,对其中污染浓缩苹果汁的嗜酸耐热菌进行了分离、筛选、纯化,并对其进行了鉴定及特性研究,旨在为实现浓缩苹果汁中嗜酸耐热菌的彻底控制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种与培养基

1.1.1 标准菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922^T,购自德国菌种保藏中心。

1.1.2 已知分离菌^[8] 由西北农林科技大学食品科学与工程学院发酵动力学实验室保存,分离自陕西恒兴果汁厂生产的浓缩苹果汁,经DNA测序鉴定为 *A. acidoterrestris*。

1.1.3 AAM培养基^[8] 酵母膏2 g/L,葡萄糖2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.4 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, CaCl₂ · 2H₂O 0.5 g/L, KH₂PO₄ 1.2 g/L, MnSO₄ · H₂O 0.5 g/L, 琼脂15 g/L, H₂O 1 L (pH约为5.2)。

1.1.4 LB培养基^[9] 胰蛋白胨10 g/L, 酵母粉10 g/L, NaCl 5 g/L, 琼脂15 g/L, H₂O 1 L。

1.2 样品来源及采集

样品采自浓缩苹果汁生产中最可能被嗜酸耐热菌污染的主要生产工段,采集的样品包括水样和空气样。

1.2.1 水样采集 采集车间生产用水和设备清洗用水各1 000 mL(以实验室自来水作为对照),立即将水样经孔径为0.45 μm的滤膜抽滤,滤膜用无菌镊子取下放入1个预先灭菌的250 mL三角瓶中,盖上无菌棉塞备检^[3]。

1.2.2 空气样品采集 由于车间条件限制,采用自

然沉降法在车间榨汁段、酶解段、浓缩段及包装段进行空气样品的采集^[9]。采样时,将事先配好的AAM平板置于上述各处,缓慢打开皿盖于空气中放置5 min,其中每处设对照1个(不打开皿盖)和重复1个。收集好的空气样品尽快带回实验室分离培养。

1.3 嗜酸耐热菌的分离

1.3.1 水样中嗜酸耐热菌的分离 向装有滤膜的三角瓶中加入40 mL无菌水后反复振摇,然后将其浸入80 ℃水浴中热休克处理13 min,用无菌镊子取出滤膜贴在培养基平板上于45 ℃培养^[3]。

1.3.2 空气中嗜酸耐热菌的分离 将采集的样品于45 ℃培养1~2 d后,挑出疑似菌落进行划线分离。

对水样和空气样分离得到的单菌落进行涂片和简单结晶紫染色,在光学显微镜下观察其形态和纯度,不纯的用划线分离法进行纯化,分离纯化后于-20 ℃保存。

1.4 嗜酸耐热菌的筛选

1.4.1 耐酸性试验 将镜检已纯化的菌株划线接种于LB平板培养基(pH 7.0),于45 ℃培养24 h作进一步筛选。保留不能在LB平板上生长的菌落^[4]。

1.4.2 耐热性试验 将镜检已纯化的菌株接种于10 mL无菌水中制成菌悬液,于80 ℃热休克处理13 min,再采用涂布法接种于AAM平板培养基上45 ℃培养24 h,保留可以生长的菌落^[4,10-11]。

对经过耐热、耐酸性检验的菌株进行细胞形态、菌落形态的初步观察,筛选出与标准菌、分离菌明显不同的菌株进行后续试验,其他菌种纯化后妥善保存。

1.5 细胞形态观察

1.5.1 革兰氏染色^[12] 选取培养24 h内的新鲜菌进行包括初染、媒染、脱色、复染四个步骤的革兰氏染色处理。

1.5.2 芽孢染色 选取培养18~24 h的新鲜菌,参照东秀珠等^[12]的方法进行芽孢染色处理。

1.6 生长条件试验

1.6.1 pH值 用1 mol/L H₂SO₄调节AAM固体培养基的pH分别为2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,将各菌接种于不同pH的培养基上,培养2~7 d观察各菌的生长情况^[8],根据初测的结果大致确定菌种生长的pH,然后对培养基的pH进行微调,精确到0.1,每个酸度重复试验2次。将菌接种于上述不同酸度的培养基中,培养2~7 d,观察各菌的生长情况确定各菌生长的适宜pH。

1.6.2 生长温度 将各菌株接种于AAM固体培养基中,分别于20,30,40,50,60和70 ℃培养2~7

d,根据初测结果调整各菌的生长温度范围,精确到 1℃,将菌接种于培养基中置微调后的不同温度下,培养 2~7 d,观察各菌的生长情况,确定各菌适宜的生长温度。

1.6.3 50 g/L NaCl 生长试验 在每 100 mL AAM 培养基中添加 5 g NaCl,于 121℃ 高压蒸汽灭菌 30 min,倒平板。将各菌接种于平板上 45℃ 培养 1~2 d,观察菌落的生长情况。

1.7 培养及生理特征

参照东秀珠等^[12]的方法进行菌落形态试验;参照程丽娟等^[9]的方法进行厌氧性、运动性试验。

1.8 生化特征测定

接触酶试验、氧化酶试验、明胶液化、V-P 试验、淀粉水解、吲哚试验、N 源利用试验及脲酶试验参照东秀珠等^[12]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离纯化及嗜酸耐热性检验

通过分离、筛选及纯化,得到了 3 株与标准菌、

分离菌不同的嗜酸耐热菌,分别为来源于车间自来水的 H25 及来源于车间空气的 H30 和 H33。分离获得的 3 株菌,经过 80~13 min 的热处理,均可较好地生长,表明其具有耐热性;在 AAM 培养基上生长良好,但在 LB 培养基上均不能生长,证明其具有嗜酸性,由此可知本试验分离得到的 3 株菌均为嗜酸耐热菌。

2.2 细胞形态观察

标准菌、已知分离菌、H25、H30、H33 的显微形态如图 1 所示(均为显微镜放大 40×100 倍的观察结果)。由图 1 可知,标准菌、已知分离菌的显微形态十分相似,均为椭圆形;H25 与标准菌、已知分离菌的形态也较为相似,亦为椭圆形,但 H25 细胞更为饱满;H30 为中杆状;H33 为短杆状。

标准菌、已知分离菌、H25、H30、H33 的细胞形态观察结果如表 1 所示,除 H33 为 G- 或可变外,其他 4 株菌均为 G+ 菌。各菌运动性的镜检法观察结果表明,H30 为运动性,而其他菌不运动。另外,5 株菌的芽孢均为次端生。

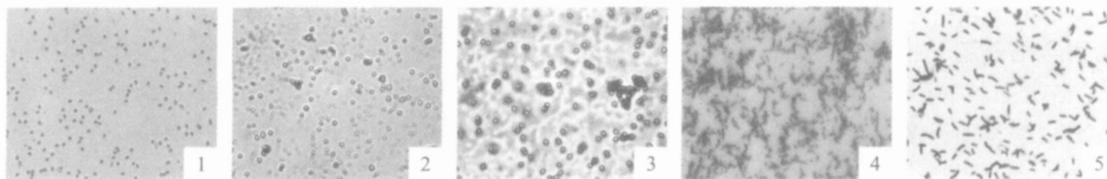


图 1 各菌株显微形态的观察结果

1. 标准菌;2. 已知分离菌;3. H25;4. H30;5. H33

Fig. 1 Results of micro-morphology

1. Standard strain;2. Isolated strain;3. H25;4. H30;5. H33

表 1 各菌株细胞形态的观察结果

Table 1 Results of cellular morphology

菌株 Strain	革兰氏染色 Gram strain	细胞形状 Shape	细胞大小/ μm Size		运动性(镜检法) Motility	芽孢生长 Spore formation
			长 Length	宽 Width		
标准菌 Standard strain	+	椭圆 Oval	3.3~3.5	2.5~2.7	-	次端生 Subterminal
已知分离菌 Isolated strain	+	椭圆 Oval	3.1~3.4	2.1~2.4	-	次端生 Subterminal
H25	+	椭圆 Oval	2.9~3.3	2.2~3.1	-	次端生 Subterminal
H30	+	杆状 Rod	3.8~6.8	1.0~1.2	+	次端生 Subterminal
H33	- / V	杆状 Rod	3.2~3.9	1.1~1.7	-	次端生 Subterminal

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性;“V”表示革兰氏染色结果可变。

Note:“+” means positive result;“-” means negative result;“V” means viable among isolates.

2.3 菌落形态观察

标准菌、已知分离菌、H25、H30、H33 的菌落形

态观察结果(表 2)表明,标准菌和已知分离菌的菌落形态特征十分相似,而 H25、H30、H33 均表现出

与标准菌、已知分离菌明显不同的菌落形态特征。20~24 h 后菌落呈土黄色,同时培养基产生黄绿色色素。
 H25 生长时在划线四周紧贴培养基生长,扁平;H30 菌落较大,突起,黏稠,挑起时呈拉丝状;H33 生长

表 2 各菌株的菌落形态观察结果

Table 2 Results of colony morphology

菌株 Strain	颜色 Color	形状 Shape	大小/mm Diameter	形态描述 Description
标准菌 Standard strain	乳黄色 Cream yellow	圆形边缘不整齐 Round with irregular margins	3~5	表面有褶皱,易挑起,不透明 Wrinkly surface, easy to pick, opaque
已知分离菌 Isolated strain	乳黄色 Cream yellow	圆形边缘不整齐 Round with irregular margins	3~5	表面有少许褶皱,易挑起,不透明 Wrinkly surface, easy to pick, opaque
H25	灰白色 Gray	圆形边缘不整齐 Round with irregular margins	2~3	扁平、干燥无光泽,紧贴着培养基生长 Flat, dry, opaque and growing close to the medium
H30	乳白色 Cream white	圆形 Round	3~6	光滑,湿润有光泽,突起,菌落黏稠,不易挑起 Smooth, wet, glossy, plump, sticky and hard to pick
H33	黄色 Yellow	圆形 Round	0.5~1.0	表面平滑,生长 20 h 后菌落变为土黄色,菌落生长之处培养基有黄绿色色素产生 Flat, pigmented after 20 h-culturing and the medium pigmented with yellow

2.4 生长条件确定

标准菌、已知分离菌、H25、H30、H33 的生长条件试验结果(表 3)表明,各菌在 23~53 ℃、pH 2.9~6.4 的条件下生长良好;本试验分离的 3 株菌

与标准菌、已知分离菌的生长条件差异不大,且符合脂环酸芽孢杆菌特有的嗜酸耐热的生长条件特征。各菌株在添加 50 g/L NaCl 的培养基中均可以很好地生长,即呈阳性。

表 3 各菌株的生长条件分析

Table 3 Results of cultural characteristics

菌株 Strain	生长温度/ Growth temperature	生长 pH 值 Growth pH range	50 g/L NaCl 生长试验 Growth in 50 g/L NaCl
标准菌 Standard strain	26~60	2.6~6.4	+
已知分离菌 Isolated strain	25~60	2.4~6.7	+
H25	22~55	2.7~6.7	+
H30	21~53	2.6~6.7	+
H33	23~55	2.9~6.9	+

注:“+”表示阳性。Note:“+”means positive result.

2.5 生理生化反应分析

化反应结果如表 4 所示。

标准菌、已知分离菌、H25、H30、H33 的生理生

表 4 各菌株生理生化反应分析

Table 4 Results of physiological characteristics

生理生化反应 Physiological characteristics	标准菌 Standard strain	分离菌 Isolated strain	H25	H30	H33
厌氧性 Anaerobic growth	-	-	-	兼性厌氧 Facultative aerobic	-
接触酶 Catalase	+	+	+	W	+
氧化酶 Oxidase	-	-	-	-	W
明胶液化 Liquefaction of gelatin	+	+	+	+	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+	+	+	+	-
吲哚产生 Indole production	-	-	-	-	-
V-P 试验 Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-
N 源利用 Nitrate reduction	+	+	+	-	+
脲酶试验 Urease	+	+	+	+	+

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性;“W”表示弱阳性。

Note:“+”means positive result;“-”means negative result;“W”means weakly positive result.

由表 4 可见,标准菌、已知分离菌、菌株 H25 的各项生理生化反应结果一致。菌株 H30 为兼性厌氧、接触酶弱阳性、N 源利用阴性,除这 3 项指标以外,其他生理生化反应结果与标准菌、已知分离菌一致;菌株 H33 为氧化酶弱阳性、淀粉水解阴性,除这 2 项指标外,其他生理生化反应结果也与标准菌、已知分离菌一致。而这种差异恰恰可能是由于同属中不同菌种的差异造成的。

3 小结与讨论

1) 从浓缩苹果汁生产车间空气和生产用水中成功分离到 H25、H30 和 H33 3 株菌,对这 3 株菌进行的耐热性、耐酸性检验结果表明,其均嗜酸、耐热,符合脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus* spp.) 嗜酸耐热的特点,应属嗜酸耐热菌;将其与标准菌、已知分离菌进行细胞与菌落形态、生长条件、生理生化反应的对比,结果表明这 3 株菌与标准菌、已知分离菌表现出较大的类似性,但同时也存在着一定的差别,故与标准菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922^T 应为同属不同种。对其具体种的划分尚需进一步的研究鉴定。

2) 菌株 H25 分离自车间的自来水, H30、H33 分离自车间的空气,说明浓缩苹果汁中嗜酸耐热菌的来源不仅是苹果原料,而且车间生产用水、车间空气也是嗜酸耐热菌的重要来源,这应当引起生产厂家的重视。

3) 本试验也从果汁生产的各工段中分离得到了一些嗜酸耐热的芽孢杆菌,但是由于这些菌在初步筛选时与标准菌或已知分离菌的细胞形态、菌落形态十分相似,故仅进行了菌种的保存,尚未进行具体

鉴定,这将是下一步工作的重点。

[参考文献]

- [1] 李静媛. 果汁中的嗜酸耐热菌[J]. 食品与发酵工业, 2002, 29(3): 84-88.
- [2] 王宏, 常玉华, 仇农学. PCR 法检测耐热耐酸菌条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(11): 99-101.
- [3] 姚培鑫, 马小魁. 浓缩果汁生产厂中嗜酸耐热菌的跟踪检测[J]. 饮料工业, 2001, 4(3): 42-44.
- [4] 陈世琼, 胡小松, 石维妮, 等. 浓缩苹果汁生产过程中脂环酸芽孢杆菌的分离及初步鉴定[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 816-819.
- [5] Albuquerque L, Rainey F A, Chung A P, et al. *Alicyclobacillus hesperidum* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soils of Sao Miguel in the Azores[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 451-457.
- [6] Goto K, Tanimoto Y, Tamura T, et al. Identification of thermoacidophilic bacteria and a new *Alicyclobacillus* genomic species isolated from acidic environments in Japan[J]. Extremophiles, 2002, 6: 333-340.
- [7] Simbahan J, Drijber R, Blum P. *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54: 1703-1707.
- [8] 蔡福带. 苹果浓缩汁生产中耐热菌的分离鉴定及控制技术研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2005: 18-27, 30-31.
- [9] 程丽娟, 薛宏泉. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 221-222.
- [10] Walls I, Chuyate R. *Alicyclobacillus* -historical perspective and preliminary characterization study[J]. Dairy Food and Environ Sanitation, 1998, 18(8): 499-503.
- [11] 焦中高, 王思新, 段丛梅, 等. 苹果浓缩汁中耐热菌的分离及其生长特性的初步研究[J]. 食品科学, 2003, 24(9): 85-87.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-384.