

# 苹果浓缩汁中嗜酸耐热菌的分离与鉴定

王峰 李建科\* 郭玉蓉 刘海霞

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院 西安 710062)

**摘要:** 为了解和控制浓缩苹果汁中的嗜酸耐热菌, 采用酸化的凯氏培养基对苹果浓缩汁中的耐热菌进行分离、培养和鉴定, 并与标准菌株 *Aliyclobacillus acidoterrestris* DSM3922 进行了比较分析。结果表明, 分离到的 2 株污染菌均可以在 21°C~55°C 温度范围及 2.4~6.2 的 pH 值范围内生长, 符合脂环酸芽胞杆菌属嗜酸耐热的特点。经与标准菌株的细胞、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, 2 株分离菌与标准菌株 *Aliyclobacillus acidoterrestris* DSM3922 有明显的相似特征。

**关键词:** 苹果浓缩汁, 嗜酸耐热菌, 脂环酸芽胞杆菌, 分离与鉴定

## Isolation and Identification of Thermoacidiphilic Bacteria from Apple Juice Concentrate

WANG Feng LI Jian-Ke\* GUO Yu-Rong LIU Hai-Xia

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

**Abstract:** The thermotolerant bacteria which was isolated from the Apple Juice Concentrate (AJC) was investigated by comparison with the standard strain of *Aliyclobacillus acidoterrestris* DSM3922 using Kirin-medium acidified with malic acid. The results shows the two polluted bacteria isolated from AJC can grow under the temperature of 21°C~55°C and pH of 2.4~6.2, which was corresponded with the characteristics of the thermo-acidiphilic *Aliyclobacillus* spp.. Further more, the cell morphology, colony morphology, cultural characteristics and physiological characteristics tests indicated the two isolated strains of thermotolerant bacteria have obviously similar characteristics with the standard strain of *Aliyclobacillus acidoterrestris* DSM3922.

**Keywords:** Apple Juice Concentrate, Thermotolerant bacteria, *Aliyclobacillus acidoterrestris*, Isolation and identification

酸土环脂芽胞杆菌 (*Aliyclobacillus acidoterrestris*), 俗称为耐热菌、嗜酸耐热菌、耐热耐酸菌等。该菌可以引起巴氏灭菌果汁(如苹果汁、桔汁、芒果汁等)的腐败, 使苹果汁发生后浑浊、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<sup>[1-5]</sup>, 以目前的杀菌方法尚不能消除, 严重影响到我国浓缩苹果汁的国际化发展。因此, 控制和快速检测耐热菌是目前的很多苹果汁生产厂家遇到的较为棘手的问题, 同样是亟待解决的问题<sup>[6,7]</sup>。

目前,国内在浓缩苹果汁中耐热菌方面的基础和应用研究都比较缺乏。因此,在我国开展源于苹果浓缩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。本研究从苹果浓缩汁中进行采样,对污染浓缩苹果汁的嗜酸耐热菌进行分离、筛选、纯化,依据《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[8]</sup>对其进行了初步鉴定,旨在为实现浓缩苹果汁中耐热菌的控制提供必要的数据库。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种和培养基

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

1.1.2 凯氏培养基(K氏培养基): 0.2 g 吐温 80, 0.2 g 葡萄糖, 0.5 g 酵母粉, 1.0 g 蛋白胨, 3.0 g 琼脂粉, 溶于 200 mL 蒸馏水中, 混匀, 备用。调酸时, 混入 0.336 g 苹果酸和 10 mL 蒸馏水。

1.1.3 LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 10 g 酵母粉, 5 g NaCl, 15 g 琼脂, 1 L 蒸馏水, 混匀, 备用。

### 1.2 样品来源

苹果浓缩清汁:pH 值 3.5~4.5, 可溶性固形物含量为  $71^{\circ} \pm 1^{\circ}$  Brix, 由陕西恒兴果汁有限公司提供, 从苹果浓缩汁中分离得到 2 株嗜酸耐热菌, 即分离菌 和分离菌 。

### 1.3 苹果浓缩汁中嗜酸耐热菌的分离

1.3.1 分离及保藏培养基的制备: 嗜酸耐热菌的分离及保藏均采用酸化的凯氏培养基。 $1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 20 min, 冷却至  $50^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ , 混入浓度为 1.68% (W/V) 的苹果酸溶液 10 mL 进行酸化处理, 备用。

1.3.2 嗜酸耐热菌的分离方法: 参照美国库克实验室的方法对嗜酸耐热菌进行分离<sup>[9]</sup>。

### 1.4 嗜酸耐热菌的耐酸耐热特性鉴定

1.4.1 耐酸特性鉴定试验: 将镜检为纯培养的嗜酸耐热菌菌株划线接种于 LB 平板培养基<sup>[4-7]</sup>(pH 7.0),  $45^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 48 h, 保留不能在 LB 平板长出的菌。

1.4.2 耐热特性鉴定试验: 将镜检为纯培养的嗜酸耐热菌菌株制成菌悬液, 进行热休克处理<sup>[9-11]</sup>, 再采用涂布法(用无菌吸管吸取菌悬液 0.1 mL~0.2 mL)接种于 K 氏平板培养基上  $45^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 保留可以生长的菌落。

### 1.5 嗜酸耐热菌菌株细胞形态观察

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, 同时进行微观鉴定。

1.5.1 革兰氏染色: 选取培养 18 h~24 h 内斜面嗜酸耐热菌菌株进行革兰氏染色处理<sup>[8]</sup>, 处理后进行显微镜观察其繁殖体细胞形态。

1.5.2 芽胞染色: 选取培养 1 d~2 d 的斜面嗜酸耐热菌菌株, 进行芽胞染色处理<sup>[8]</sup>, 然后进行显微镜观察其芽胞形态。

### 1.6 菌株培养的生长条件确定

1.6.1 pH 值的确定: 采用苹果酸溶液调整培养基的 pH 值, 测定耐热菌生长的 pH 值范围。配制 pH 分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 的培养基, 将标准耐热菌、分离菌 和分离菌 分别接种于不同 pH 值的培养基上, 培养 2 d~5 d 观察其生长情况<sup>[11]</sup>, 初步确定菌株生长的 pH 值, 再将其精确到 0.1, 将菌接种于微调后的不同 pH 值培养基中, 培养 2 d~5 d 观察各菌的生长情况, 最终确定各菌适宜生长的 pH 值。

1.6.2 生长温度的确定: 液体培养基采用葡萄糖胰蛋白胨培养基(GP)。以苹果酸溶液酸化后分装试管, 分别接入标准耐热菌、分离菌 和分离菌 的菌悬液, 置于  $20^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$ 、 $60^{\circ}\text{C}$  和  $70^{\circ}\text{C}$  不同温度条件下培养 2 d~5 d, 观察培养液的浊度及液面产生的菌膜等生长特征, 最初确定生长温度范围, 再将此温度精确到  $1^{\circ}\text{C}$ , 再将菌置于微调后的不同温度下, 培养 2 d~5 d 观察各菌的生长情况, 确定各菌的适宜生长温度。

### 1.7 嗜酸耐热菌的培养及生理特征

参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[8]</sup>的方法观察其菌落的形态, 参照《微生物学实验技术》<sup>[12]</sup>采用悬滴法对 3 株菌的运动性进行观察。

### 1.8 生理生化反应

接触酶试验、氧化酶试验、明胶液化、淀粉水解、N 源利用试验、V-P 试验、产吲哚、脲酶试验等试验均参照文献<sup>[12]</sup>的方法进行。为了保证耐热菌生长所需要的酸性条件, 一般采用以苹果酸酸化的培养基进行以上生理生化试验。

### 1.9 标准耐热菌、分离菌 I 和分离菌 II 生长曲线的确定

将标准菌和 2 株分离菌接入灭菌的液体培养基中, 于  $41^{\circ}\text{C}$  温度下培养, 每隔 2 h 取样 1 次, 测定菌

体的吸光度值, 观察 24 h 后, 分别建立标准耐热菌、分离菌 和分离菌 在 41°C 温度下的生长曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌种的分离纯化及嗜酸耐热菌检验

通过分离、筛选及纯化, 得到了 2 株嗜酸耐热菌, 即分离菌 和分离菌 。分离获得的这 2 株菌, 经过 80°C 13 min<sup>[9]</sup> 的热处理, 均可以很好的生长, 表明其有很好的耐热性; 在 K 氏培养基上生长良好, 但在 LB 培养基上均不能生长, 这说明其具有嗜酸性。因此可以证明, 本试验分离得到的 2 株菌为嗜酸耐热菌。

### 2.2 苹果浓缩汁中耐热菌的分离及细胞形态的观察

按 1.3 方法分离培养可以得到大量的耐热菌, 这些耐热菌用通常的细菌检测方法难以检出, 在 41°C 条件下常需 2 d~3 d 可形成明显的菌落。从其形态学特征来看, 苹果浓缩汁中的耐热菌并不是一种单一形态的菌, 而是表现为多形态的产芽胞杆菌。标准菌、分离菌 和分离菌 的显微镜形态如图 1 和图 2 所示。由此可知, 标准菌和分离菌 的显微形态十分相似, 为杆状, 而分离菌 为椭圆状。

标准耐热菌、分离菌 和分离菌 的细胞形态观察如表 1 所示, 几株菌均为 G<sup>+</sup> 菌。3 株菌经过悬

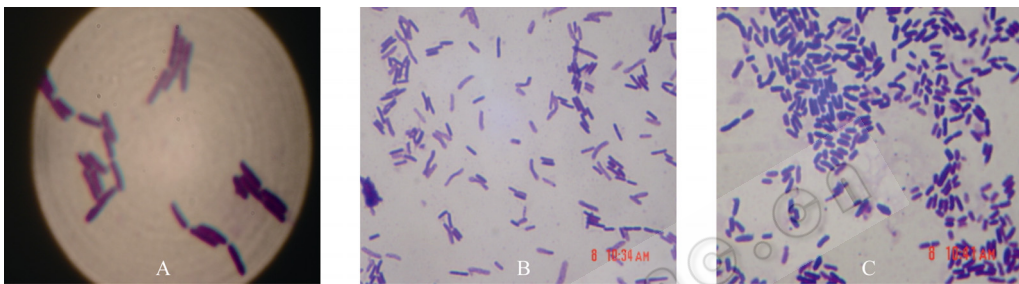


图 1 各菌株繁殖体显微镜形态的观察结果(10×100)

Fig. 1 Micro-morphology of vegetative form (10×100)

注: A: 标准菌; B: 分离菌 I; C: 分离菌 II

Note: A: Standard strain; B: Isolated strain I; C: Isolated strain II

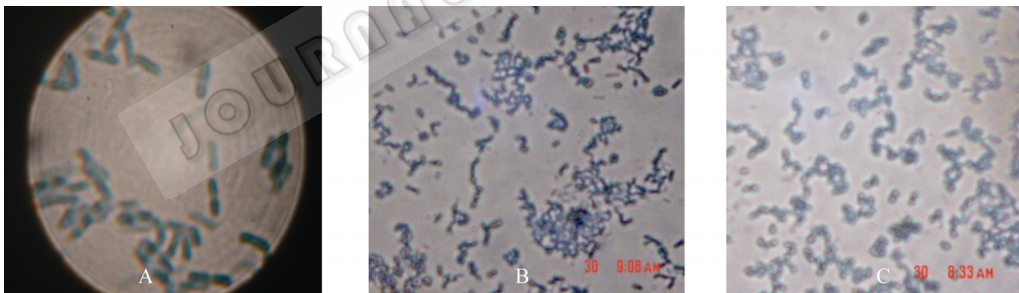


图 2 各菌株芽胞显微镜形态观察结果(10×100)

Fig. 2 Micro-morphology of spore (10×100)

注: A: 标准菌; B: 分离菌 I; C: 分离菌 II

Note: A: Standard strain; B: Isolated strain I; C: Isolated strain II

表 1 各菌株细胞形态的观察结果

Table 1 Results of cellular morphology of of different strains

菌株 Strain	革兰氏染色 Gram strain	细胞形状 Shape	细胞大小/μm (长×宽) Size/μm (Length×Width)	运动性(镜检法) Motility	芽胞生长 Sport formation
标准菌 Standard strain	+	杆状 Rod	(3.9~4.8)×(2.5~2.7)	-	次端生 Subterminal
分离菌 I Isolated strain I	+	杆状 Rod	(3.5~4.3)×(1.9~2.2)	-	次端生 Subterminal
分离菌 II Isolated strain II	+	椭圆状 oval	(2.2~2.6)×(1.0~1.2)	-	次端生 Subterminal

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive result; -: Negative result

滴法<sup>[12]</sup>镜检观察,结果表明,3株菌都不运动。另外,3株菌的芽胞均为次端生。

### 2.3 培养及生理生化反应结果

**2.3.1 菌落形态观察:**标准耐热菌、分离菌和分离菌的菌落形态观察结果见表2。由表2可知,标准菌和分离菌的菌落形态特征十分相似,表面有褶皱,边缘不整齐呈放射状;而分离菌表现出与标准菌和分离菌不同的菌落特征,菌落较大且边缘光滑,突起,粘稠,易挑起且呈拉丝状。

**2.3.2 培养生长条件的确定:**标准菌、分离菌和分离菌培养的生长试验结果见表3。由表3可知,各菌在温度条件在21°C~60°C范围内、pH值在2.4~6.4范围内均能良好生长,且本试验分离得到的分离菌和分离菌两株菌与标准菌的生长条件基本相同。从它们的生长温度和pH值范围可以看出,这些耐热菌不仅可以耐受酸性条件,并且还表现出对酸性条件的嗜好性和依赖性,均符合脂环酸芽胞杆菌特有的耐酸耐热的生长条件特性。

表2 各菌株的菌落形态观察结果

Table 2 Observation results of colony morphology of different strains

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	圆形边缘不整齐呈放射状 Round with irregular margins	3~5	表面有褶皱,易挑起,不透明 Wrinkly surface, easy to pick, opaque
分离菌 I Isolated strain I	乳黄色 Cream yellow	圆形边缘不整齐呈放射状 Round with irregular margins	3~5	表面有轻微褶皱,易挑起,不透明 Wrinkly surface, easy to pick, opaque
分离菌 II Isolated strain II	乳白色 Cream white	圆形 Round	3~6	光滑,湿润有光泽,突起,菌落粘稠,易挑起 Smooth, wet, glossy, plump, sticky and hard to pick

表3 各菌株培养的生长条件分析

Table 3 Results of cultural characteristics

菌株 Strain	生长温度(°C) Growth temperature	生长 pH Growth pH range
标准菌 Standard strain	26~60	2.6~6.4
分离菌 I Isolated strain I	24~55	2.4~6.2
分离菌 II Isolated strain II	21~54	2.7~6.2

**2.3.3 生理生化反应结果分析:**标准菌、分离菌和分离菌的生理生化反应结果如表4所示。

由表4结果表明,分离菌的氧化酶为阳性,而分离菌的淀粉水解为阴性,这两个特征与标准菌株特征不同,其余各项生理生化特性与标准菌相同。由此可见,这两株菌与标准耐热菌株 *Allyclobacillus acidoterrestris* DSM3922 有明显的相似特征。

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	分离菌 Isolated strain
接触酶 Catalase	+	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	+
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: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive result; -: Negative result

## 2.4 各菌株生长曲线结果

标准菌、分离菌 I 及分离菌 II 的生长曲线见图 3。由图 3 可见标准菌和分离菌 I 的生长趋势比较一致, 且均在 6 h 后由调整期进入对数期, 12 h 时进入稳定生长期; 当生长到 20 h 之后菌体浊度缓慢降低, 进入衰亡期, 而分离菌 II 4 h 后就由调整期进入对数期, 18 h 之后菌体浊度显著降低, 进入了衰亡期。

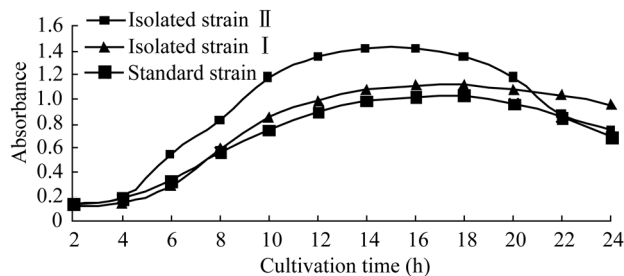


图 3 耐热菌的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of standard and isolated thermo-tolerant bacteria

## 3 结论

1) 在制备 K 氏培养基时涉及到灭菌后调酸问题, 一些文献上报道用 1.25 g 苹果酸再加 10 mL 蒸馏水调酸。在实验过程中发现, 这样调酸后 pH 过低, 不利于耐热菌生长, 经过大量预试验, 我们发现当配制 200 mL 培养基时用 0.336 g 苹果酸再加 10 mL 蒸馏水可以使其 pH 达到  $3.7 \pm 0.1$ , 在这种条件下耐热菌生长良好。

2) 采用酸化的 K 氏培养基可以对苹果浓缩汁中的耐热菌进行有效地分离培养。从标准耐热菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM3922、分离菌 I 和分离菌 II 的形态特征、生长及生理生化特性来看, 分离得到的 2 株耐热菌与标准菌有明显的相似性, 但这些还不足以作为分类的依据, 需进一步鉴定。由于实验中发现分离菌 I 与标准菌特征更为相似, 目前已对分离菌 I 进行了保存, 等待进一步鉴定。

## 参 考 文 献

[1] 李静媛. 果汁中的嗜酸耐热菌. 食品与发酵工业, 2002, 29(3): 84-88.

- [2] 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. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005, pp.18-31.
- [3] 陈 颖. 臭氧对耐酸耐热菌杀灭作用的研究. 食品工业科技, 2004, 25(1): 51-52.
- [4] 岳田利, 胡贻椿, 袁亚宏, 等. 脂环酸芽胞杆菌 (*Alicyclobacillus*) 分离鉴定研究进展. 食品科学, 2008, 29(02): 487-492.
- [5] 陈世琼, 胡小松, 石维妮, 等. 浓缩苹果汁生产过程中脂环酸芽胞杆菌的分离及初步鉴定. 微生物学报, 2004, 44(6): 816-819.
- [6] Yinrong Lu, L Yeap Foo. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, 1997, 59(2): 187-194.
- [7] 高修功, 王 超, 章克昌. 数学统计法快速优化假单胞菌脂肪酶发酵条件. 微生物学通报, 1998, 25(2): 94-97.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.353-384.
- [9] <http://www.kfl.com/atb.html>.
- [10] I Walls, R Chuyate. Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal of AOAC International*, 2000, 83(5): 1115-1120.
- [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. 食品科学, 2003, 24(9): 85-87.
- [12] 程丽娟, 薛宏泉. 微生物学实验技术. 西安: 世界图书出版公司, 2000, pp.221-222.
- [13] Keiichi Goto, Kaoru Mochida, Mika Asahara, et al. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess  $\omega$ -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 2003, 53(5): 1537-1544.
- [14] 姚培鑫, 马小魁. 浓缩苹果汁生产厂中嗜酸耐热菌的跟踪检测. 饮料工业, 2001, 4(3): 42-44.
- [15] Cerny G, Hennlich W, Poralla K, et al. Spoilage of fruit juice by bacilli isolation and characterization of the spoiling microorganisms. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1984, 179(3): 224-227.
- [16] McIntyre S. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* isolated from shelf-stable juices. *J Food Prot*, 1995, 58(3): 319-321.
- [17] Walls I, Chuyate R. *Alicyclobacillus*: historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food and Enviro Sanitation*, 1998, 18(8): 499-503.