

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

陈世琼 胡小松* 石维妮 董建成 王 健

(中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘 要 本文对浓缩苹果汁生产过程中的嗜酸耐热菌进行了分离,得到 45 株纯的嗜酸耐热芽孢杆菌。根据脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)嗜酸的特点,用 LB 平板进行筛选,结果表明所有的菌株都嗜酸。用抗热性试验研究了这些菌株产生芽孢的培养时间,结果表明,所有考察的菌株中,33 株与 DSM 3922 的生长周期一致,48 h 内产生芽孢;3 株菌生长速度较快,培养 17 h 就能产生芽孢;还有 3 株菌生长速度较慢,需培养 48 h 后才能产生芽孢。在采用 16S rDNA PCR-RFLP 法对筛选得到的脂环酸芽孢杆菌进行快速鉴定的基础上,选取 7 株可能是新种的未知菌株与 5 株已知的参比菌株的 19 个表型特征进行了试验研究和聚类分析,结果进一步证实了这 7 株菌都是与已知参比菌株不同的菌株。

关键词 脂环酸芽孢杆菌 浓缩苹果汁 分离 表型特征 聚类分析 鉴定

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)06-0816-04

1992 年 Wisotzkey 等^[1]对芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌的 16S rDNA 基因序列进行了分析,根据 *B. acidocaldarius*^[2]、*B. acidoterrestris*和 *B. cycloheptanicus*^[3]的 16S rDNA 基因序列分析的结果,以及这 3 种菌的细胞膜中都含有特殊的 ω -环状脂肪酸^[4-5]的特点,将这 3 种菌从芽孢杆菌属中划分出来,成立一新属,称为脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)。该属后来又有新的种被发现,目前已包括 8 个种:*A. hepersperidum*^[6], *A. herbarius*, *A. acidiphilus*^[7], *A. sendaiensis*^[8], *A. pomorum*, 以及 1 个亚种 *A. acidocaldarius* subsp. *Rütmanii*。并且其特征也有了新的变化,例如后来发现的 *A. pomorum* 细胞膜中不含 ω -环状脂肪酸,所以细胞膜是否含有 ω -环状脂肪酸已不是该属菌的决定性特征。

微生物是使苹果汁发生后浑浊、沉淀和腐败变质的主要因素^[9]。其中在低酸度下仍能长期存活的脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)的控制和快速检测是目前很多苹果汁生产厂家遇到的较为棘手的问题^[10,11]。已有的文献表明,脂环酸芽孢杆菌属的一种——酸土脂环芽孢杆菌(*A. acidoterrestris*)与果汁腐败有关^[12,13]。脂环酸芽孢杆菌在浓缩苹果汁中的存在甚至影响了我国浓缩苹果汁的出口贸易。目前国内在该菌方面的基础和应用研究都比较缺乏。

本文对浓缩苹果汁生产线上的嗜酸耐热菌进行分离纯化,并根据脂环酸芽孢杆菌的特点,用 LB 平板生长试验、抗热性试验对其中的脂环酸芽孢杆菌进行了筛选。在采用 16S rDNA PCR-RFLP 对分离自浓缩苹果汁的嗜酸耐热菌进行快速分类鉴定的基础上[△],对部分最有可能是新种的菌株进行了表型特征的试验,结果进一步证实了这些菌株是与已知

参比菌株不同的菌,代表了新的种群。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)CGMCC 1.2009^T和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)CGMCC 1.943^T购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心;酸土脂环酸芽孢杆菌(*A. acidoterrestris*)DSM 3922^T, *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM 14558^T, 环庚烷脂环酸芽孢杆菌(*A. cycloheptanicus*)DSM 4006^T, *A. hepersperidum* DSM 12489^T, 酸热脂环酸芽孢杆菌(*A. acidocaldarius*)DSM 446^T均购自德国菌种保藏中心。

1.1.2 样品来源和培养基 洗果水、冷凝水、苹果清汁、苹果浓缩汁取自陕西海升果汁股份有限公司浓缩苹果汁生产线。K 氏固体、液体培养基^[8],LB 培养基^[14]。

1.2 脂环酸芽孢杆菌的分离纯化

苹果浓缩汁经稀释后,在 80℃ 恒温水浴中热处理 13min^[15],用溶剂过滤器通过 0.45 μ m 微孔滤膜超滤,滤膜在 K 氏培养基培养平板上培养(45℃,24~120 h),挑可疑单菌落接种在斜面 K 培养基中,45℃,24 h~120 h 培养后,涂片并进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察其形态和纯度,不纯的用平板稀释法进行纯化,分纯后-20℃ 保存。

1.3 嗜酸特性筛选试验

根据脂环酸芽孢杆菌能够生长的 pH 范围为 2.0~6.0 这一嗜酸特点,将镜检已纯的脂环酸芽孢杆菌划线接种于 LB 平板培养基(pH 7.0)45℃ 培养 48h,作进一步筛选。保留不能在 LB 平板长出的菌。

基金项目 国家“十五”科技攻关课题(2001BA501A07)

* 通讯作者。Tel/Fax:86-10-62343553;E-mail:huxiaos@263.net

作者简介 陈世琼(1972-)女,工程师,博士研究生,研究方向为农产品贮藏及加工。E-mail:shiqiongchen@sohu.com

收稿日期 2004-03-11,修回日期 2004-05-24

△陈世琼,陈文峰,赵广华,等. 16S rDNA PCR-RFLP 法初步鉴定分离自浓缩苹果汁生产线的脂环酸芽孢杆菌. 中国食品学报,2004(待发表).

1.4 产生芽孢的培养时间和热抗性试验

根据已知模式菌株 DSM3922 生长达对数末期的培养时间为 32h ,分别取已分离纯化的未知菌株的 17h 培养物、48h 培养物 5mL 于试管中 ,参照浓缩苹果汁加工工艺 ,分别于 I(85℃ 30 min) II(95℃ 20 min) III(100℃ 5 min)等条件下进行热处理 ,取样 ,用平板计数法测定活菌数 ,计算存活率 ,以研究脂环酸芽孢杆菌产生芽孢的培养时间。

1.5 生理生化特性研究

在采用 16S rDNA PCR-RFLP 对 45 株分离自浓缩苹果汁的嗜酸耐热菌进行快速鉴定的基础上^[14] ,并采用北京陆桥公司生产的细菌生化鉴定管 ,对 2-1、S-13-2、S-32、S-32-4、5-4、8-1、S-11-3 共 7 株可能是新种的菌株 ,以及 DSM 3922、DSM 4006、DSM 446、DSM 12489、DSM 14558 等 5 株参比菌株进行了糖、醇发酵的试验 ,考察的糖、醇种类包括以下 19 种 :甘油、阿拉伯糖、松三糖、松二糖、木糖醇、棉子糖、葡萄糖酸盐、肌醇、蔗糖、乳糖、麦芽糖、纤维二糖、水杨苷、七叶苷、苦杏仁苷、甘露糖、鼠李糖、山梨醇、半乳糖 ,操作按公司产品使用说明进行。试验结果转换为数字信号“ 1 (阳性) ”“ 0 (阴性) ” ,并用 MINTS 软件中平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 菌种的分离、纯化和嗜酸特性筛选试验

本试验从浓缩苹果汁中分离嗜酸耐热菌后 ,纯化得到

45 株纯的菌株 ,革兰氏染色后在光学显微镜下观察 ,大多为革兰氏阳性 ,极少数为革兰氏可变 ;大多数产芽孢。菌体均为杆状 ,但长短、粗细、排列状况 ,以及芽孢着生位置有差异 ;在 LB 平板上不生长 ,表明这些菌均嗜酸 ,这是脂环酸芽孢杆菌的特征之一。

2.2 产生芽孢的培养时间

将 26 株菌(包括一株参比菌株 *A. acidoterrstris* DSM 3922^T)的 17h 培养物在 1.4 所述条件下热处理 ,发现菌株 5-2-2-12、5-4、814 经过 100℃ ,5min 热处理后仍有存活 ,原因是这几株菌生长较快 ,17h 已产生芽孢。

将 35 株菌(包括一株参比菌株 *A. acidoterrstris* DSM 3922^T)的 48h 培养物在 1.4 所述条件下热处理 ,发现除 S-11-3、12-1、S-32-2 等 3 株菌外 ,其余 32 株菌均能经受 85℃ ,30min 而存活 ,说明它们在培养培养 48h 后产生了芽孢 ,而 S-11-3、12-1、S-32-2 等 3 株菌在培养 48h 后仍未产生芽孢 ,属生长速度较慢的菌。

综上所述 ,在所有考察的 38 株菌中 ,32 株与 DSM 3922 的生长周期一致 ,48h 内产生芽孢 ,3 株菌生长速度较快 ,培养 17h 就能产生芽孢 ,还有 3 株菌生长速度较慢 ,需培养 48h 后才能产生芽孢。

2.3 表型特征的试验结果

表型特征的试验结果见表 1。

表 1 12 株菌糖、醇发酵的试验结果

Table 1 Characterization of 12 strains of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria

Strains	S-32-4	2-1	S-13-2	S-32	DSM 3922	DSM 4006	DSM 446	5-4	DSM 14558	DSM 12489	8-1	S-11-3
Glycerol	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Meleztose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Turanose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Sucrose	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Lactose	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
Maltose	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Salicin	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Aesculin	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
Galactose	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+

2.4 表型特征试验结果的聚类分析

将试验结果转换为数字信号“ 1 (阳性) ”“ 0 (阴性) ” ,并用 MINTS 软件中平均连锁法(UPGMA)进行聚类分析(图 1)。

根据参比菌株表型特征的聚类分析结果 ,可将 85% 的

相似水平确定为种的相似水平。在此相似水平上 ,12 株菌(包括 7 株未知菌株和 5 株参比菌株)中有未知 3 株聚在一起 ,另外 9 株各占一个分支 ,即 12 株菌分属于 10 个不同的种。由于所有参比菌株均单独占据一个分支 ,所以 7 株未知

菌株都是与参比菌株不同的新种 ;其中 2-1、S-32 和 8-1 聚在一起 ,因此从表型特征上这 3 株菌属于同一个未知的新种。表型特征的试验所用的 7 株未知菌是在 16S rDNA PCR-RFLP 试验结果的基础上选取的最有可能的新种 ,表型特征试验的结果再次证明了这一结论 ,由此看来 ,16S rDNA PCR-RFLP 试验和表型特征试验的结果有较好的一致性。

另一方面 ,16S rDNA PCR-RFLP 试验[△]和表型特征试验的聚类分析结果也存在差异 ,主要表现在这 7 株未知菌中的 3 株菌(2-1、S-32 和 8-1)16S rDNA PCR-RFLP 特征相似性水平比较低 ,但表型特征的相似性水平却比较高 ,产生差异的原因有待进一步研究。

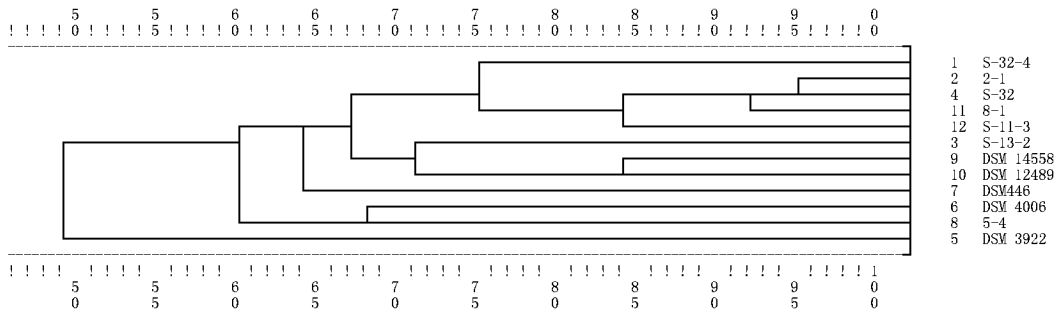


图 1 表型特征聚类分析树状图

Fig.1 Dendrogram of characteristics strains isolated from apple juice concentrating processing

参 考 文 献

[1] Wisotzkey J D. Comparative sequence analyses on the 16S r RNA(r DNA) of *Bacillus acidocaldarius* , *Bacillus acidoterrestris* , and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genes , *Alicyclobacillus* gen. nov. . *Int J Syst Bacteriol* , 1992 , **42** : 263 - 269 .
[2] Darland G , Brock T D. *Bacillus acidocaldarius* sp. Nov. , an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J Gen Microbiol* , 1971 , **67** : 9 - 15 .
[3] Deinhard G , Saar J , Krischke W , et al. *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov. , a new thermoacidophile containing ω-cycloheptane fatty acids. *Syste Appl Microbiol* , 1987 , **10** (1) : 68 - 73 .
[4] De Rosa M. Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. *Chem Comm* , 1971 , **26** : 13 - 34 .
[5] Poralla K , Koenig W A. The occurrence of ω-cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic *Bacillus* . *FEMS Microbiol Lett* , 1983 , **16** (3) : 303 - 306 .
[6] 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. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2000 , **50** : 451 - 457 .
[7] Matsubara H , Goto K , Matsumura T , et al. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov. , a new thermo-acidophilic ω-alicyclic fatty acid-

containing bacterium isolated from acidic beverages. *Int J Syst Evol Microbiology* , 2002 , **52** : 1681 - 1685 .
[8] Tsuruoka N , Isono Y , Shida O , et al. *Alicyclobacillus* sp. nov. , a novel acidophilic , slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai , Japan. *Int J Syst Evol. Microbiology* , 2003 , **53** : 1081 - 1084 .
[9] 张 欣 , 张爱东 , 葛毅强 , 等. 浓缩果汁及其后浑浊现象. *食品科技* , 1997 , **5** : 28 - 30 .
[10] Keiichi G , Kaoru M , Mika A , et al. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov. , a novel thermo-acidophilic , endospore-forming bacterium that does not possess ω- alicyclic fatty acids , and emended description of the genus. *Aalicyclobacillus* . *Int J Syst E M* , 2003 , **53** : 1537 - 1544 .
[11] 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 .
[12] Cerny G , Hennlich W , Poralla K. Spoilage of fruit juice by *Bacillus* : isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Z Lebensm Unters Forsch* , 1984 , **179** : 224 - 227 .
[13] McIntyre S. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *J Food Prot* , 1995 , **58** (3) : 319 - 321 .
[14] DSMZ <http://www.Dsmz.De> .
[15] Walls I , Chuyate R. *Alicyclobacillus*-historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy food and Enviro Sanitation* , 1998 , **18** (8) : 499 - 503 .

Isolation and Identification *Alicyclobacillus* from Concentrated Apple Juice processing

CHEN Shi-Qiong HU Xiao-Song* SHI Wei-Ni DONG Jian-Cheng WANG Jian

(College of Food Science and Nutrition Engineering , China Agriculture University , Beijing 100083 , China)

Abstract : The forty-five strains of bacteria have been isolated from concentrated apple juice . All of them can grow at K agar (pH 4.0) , but can ' t grow at LB palate (pH 7.0) . By using heat resistance test , 38 strains of these bacteria could be classified into 3 groups according to their spore-forming time . 33 strains of them had the same spore-forming time as

DSM 3922 , which could produce spores within 48 h when cultivated at 45℃ ;3 strains of them could grow very fast and produced spores within 17 h ; and 3 strains of them produced spores 48h later. Based on the results of 16S rDNA PCR-RFLP analysis , 7 strains of unknown , probably new species and 5 reference strains were selected for 19 phenotypic characteristics test and the result were analyses by UPGMA. The results of phenotypic characteristics test had good agreement with 16S rDNA PCR-RFLP analyses , that the 7 strains were different from all the 5 reference strains , they are new species of *Alicyclobacillus* .

Key words : *Alicyclobacillus* , Isolation , Phenotypic characteristics , Concentrated Apple Juice

Foundation item : The Tenth of Five-year Plan of Chinese National Science and Techenology Program (2001BA501A07)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-10-62343553 ; E-mail : huxiaos@263.net

Received date 03-11-2004

《微生物学报》第八届编辑委员会名单

主 编	李季伦	院 士	中国农业大学生物学院		
副主编	谭华荣	研究员	中国科学院微生物研究所		
	陆德如	研究员	第二军医大学遗传研究所		
	王敖全	研究员	中国科学院微生物研究所		
	曲音波	教 授	山东大学生命科学学院		
	徐建国	研究员	中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所		
编 委	(按姓名拼音排序 , * 2003 年 7 月增补)				
	蔡永峰	高 工	天津市工业微生物研究所	盛 军	研究员 长春生物制品研究所
	陈永青	教 授	复旦大学生命科学学院	唐 宏	研究员 中国科学院微生物研究所
	程 池	高 工	中国食品发酵工业研究所	田 波	院 士 中国科学院微生物研究所
	东秀珠	研究员	中国科学院微生物研究所	王 平	教 授 华中农业大学生命科技学院
	范云六	院 士	中国农业科学院生物技术所	* 王华明	研究员 Genencor International , USA
	郭 俊	研究员	广东省微生物研究所	谢 红	研究员 山西省生物研究所
	胡福泉	教 授	第三军医大学微生物教研室	杨苏声	教 授 中国农业大学生物学院
	胡远扬	教 授	武汉大学生命科学学院	翟中和	院 士 北京大学生命科学学院
	黄 力	研究员	中国科学院微生物研究所	* 张耀平	教 授 Department of Bacteriology ,
	陆承平	教 授	南京农业大学动物医学院		University of Wisconsin-Madison ,USA
	闵 航	教 授	浙江大学生命科学学院	郑天凌	教 授 厦门大学生命科学学院
	钱世钧	研究员	中国科学院微生物研究所	朱宝泉	研究员 上海医药工业研究院
	邵一鸣	研究员	卫生部艾滋病预防中心	诸葛健	教 授 江南大学生物工程学院

编 辑 : 王晋芳 王 敏