

柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌的检测

刘加兰*, 安丰民, 王伟伟, 陈淑春

(山东日照鲁信金禾生化有限公司, 日照 276800)

摘要: **目的** 对柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌进行培养, 研究最佳检测方法。**方法** 通过改变培养基种类、pH 值和热休克方式三个因素, 以菌落数多少进行综合评价, 优选最佳检测方法。**结果** 检测嗜酸耐热菌的最佳条件: 70 °C 热处理 20 min, 室温水冷却, 用滤膜抽滤后接种于 pH 值为 3.5~4.0 的 YSG 培养基上, 置 45 °C 培养 5 d。**结论** 该方法对柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌的检测有较强的实用性。
关键词: 嗜酸耐热菌; 检测方法; 柠檬酸; 柠檬酸盐

Determination of thermo-acidophilic bacteria in citric acid and citrate

LIU Jia-Lan*, AN Feng-Min, WANG Wei-Wei, CHEN Shu-Chun

(RZBC CO., LTD., Rizhao 276800, China)

ABSTRACT: Objective To determine the best method to detect thermo-acidophilic bacteria in citric acid and citrate. **Methods** Three factors (culture medium, pH value and ways of heat shock) were changed, The results were compositive scored according to the number of colonies. **Results** A better method was as follows: the citric acid solution was heated at 70 °C for 20 min, cooled by water of room temperature, filtrated, and then spread on YSG culture medium with a pH value of 3.5~4.0. Sample was incubated at 45 °C for 5 days. **Conclusion** This method was a practical method of detecting thermo-acidophilic bacteria in citric acid and citrate.
KEY WORDS: thermo-acidophilic bacteria; detecting methods; citric acid; citrate

1 引言

我国是柠檬酸及其盐类生产和出口大国, 柠檬酸及其盐类中微生物的检测也越来越受到客户的关注。因为柠檬酸具有较低的 pH 值, 而且加工过程中要经过加热处理, 柠檬酸盐类都是柠檬酸与碱中和反应后的产物, 因此绝大多数的微生物都无法生存, 只有很少的细菌、真菌有可能存活, 嗜酸耐热菌就是这少数细菌中的一类。

一般细菌适宜的生长温度为 20~30 °C, pH 为 6.5~7.5。嗜酸耐热菌可以在 26~55 °C 温度范围 pH2.6~6.0 的条件下生长, 它的孢子具有极强的抗热

性, 在较低的 pH 值时, 工业巴氏杀菌后依然可以存活^[1]。嗜酸耐热菌广泛分布于世界各地, 在多种酸性食品中都有存在^[2]。嗜酸耐热菌的芽孢以休眠的形式存活于浓缩果汁中, 当果汁复水后, 适宜的条件会使芽孢萌发、生长, 从而导致果汁产品香气损失、口感变差、浊度升高、形成沉淀^[3]。柠檬酸及其盐类是食品饮料行业常用的原材料之一, 其嗜酸耐热菌的检测越来越受到关注, 国外有些企业已经把嗜酸耐热菌列为必检指标。

目前, 日本和美国的饮料公司各自制定了果汁中嗜酸耐热菌的检测方法。检测嗜酸耐热菌常用的培养基有 YSG 培养基、BSSA 培养基、PCA 培养基等。

*通讯作者: 刘加兰, 工程师, 主要研究方向为食品安全及食品检测。E-mail: liujl@rzbc.com

*Corresponding author: LIU Jia-Lan, Engineer, RZBC CO., LTD., Rizhao 276800, China. E-mail: liujl@rzbc.com

但对于柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌的检测,国内外均没有相应的检测方法。本实验确定了柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌的最佳检测条件,为柠檬酸行业制订合理、实用的检测方法提供依据。

2 材料与方法

2.1 材 料

2.1.1 实验试剂及用品

BSSA 培养基、PCA 培养基、YSG 培养基 青岛高科园海博生物技术有限公司, 0.5 mol/L 的无菌硫酸、75%的酒精、灭菌蒸馏水、0.45 μm 水系滤膜 日照市蓝天化玻有限公司。

2.1.2 实验仪器

MJPS-150 型恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; YXQG02 型高压灭菌锅, 山东新华安得医疗用品有限公司; HH-6 型恒温水浴锅, 上海精风仪器有限公司; XSP-4C 型显微镜, 上海浦东物理光学仪器厂; 津隆微孔过滤器。

2.2 方 法

2.2.1 样品处理

无菌操作称取柠檬酸及其盐类实验样品 10 g, 在无菌容器中加入 50 mL 灭菌蒸馏水溶解, 再称取实验样品 10 g 在另一相同容器中加入 50 mL 灭菌蒸馏水溶解并且插入温度计控温。

2.2.2 加热除杂菌

将溶解后的样品及对比控温样品置于水浴锅中, 待控温样品溶液升至要求温度时开始计时, 保持实验要求的时间, 取出用室温水降温至 50 ℃。

2.2.3 膜过滤富集

在洁净实验台上安装好过滤装置, 用直径 50 mm, 孔径 0.45 μm 水系滤膜真空抽滤, 然后用与样品液相同体积的灭菌蒸馏水冲洗样品容器和过滤器。

2.2.4 培养及计数

取下滤膜, 附在预先准备好的培养基表面, 保证滤膜与培养基间接触不留气泡。将培养皿反转, 置温度 45 ℃, 湿度 50%~53%培养箱内培养 5 d。5 d 后目测法观察, 记录滤膜上的菌落数。

2.2.5 菌种分离

取柠檬酸或盐类样品 10 g, 按上述方法处理后, 在 YSG 培养基上培养, 培养基上长出明显菌落后, 挑取单菌落, 按常规方法进行纯化, 获得嗜酸耐热菌菌株。分离出的嗜酸耐热菌不是单一的一种菌,

而表现为多形态^[4-7]。分离纯化得到的菌株作为对照菌株。

3 结 果

3.1 不同 pH 值对嗜酸耐热菌检测结果的影响

分别调整 YSG 培养基的 pH 值为 2~2.5, 3.0~3.5, 3.5~4.0, 4.5~5.5, 6.5~7.0, 以相同的方法处理样品, 分别在不同 pH 值的培养基上培养, 结果见表 1。由表 1 可知, pH 值为 3.5~4.0 时, 培养的嗜酸耐热菌菌落数最多。

表 1 不同 pH 值对嗜酸耐热菌检测结果的影响
Table 1 The effects of different pH value on the thermo-acidophilic bacteria test results

pH 值	菌落数(CFU/10 g)	备注
2.0~2.5	0	无可见菌落
3.0~3.5	4	黄白色圆形菌落不透明
3.5~4.0	10	黄白色圆形菌落不透明
4.5~5.5	3	黄白色圆形菌落不透明
6.5~7.0	2	其他杂形菌落

3.2 不同培养基对嗜酸耐热菌检测结果的影响

将按相同方法处理的样品分别在 PCA、BSSA、YSG 培养基上培养, 5 d 后观察结果, 结果见表 2。由表 2 可知, YSG 培养基上的嗜酸耐热菌菌落数最多。

表 2 不同培养基对嗜酸耐热菌检测结果的影响
Table 2 The effects of different culture medium on the thermo-acidophilic bacteria test results

培养基	菌落数(CFU/10 g)	备注
PCA	0	无可见菌落
BSSA	5	黄白色圆形菌落不透明
YSG	8	黄白色圆形菌落不透明

3.3 不同加热条件对嗜酸耐热菌检测结果的影响

按相同的方法分别制备三份样品, 分别以 60 ℃ 20 min, 70 ℃ 20 min, 80 ℃ 15 min 加热处理后, 过滤, 培养, 5 d 后观察结果, 结果见表 3。由表 3 可知, 60 ℃ 20 min 加热条件下, 培养的菌落数虽然最多, 但是有杂菌, 说明 60 ℃ 加热温度太低。所以, 选择 70 ℃ 20 min 的加热条件。

表 3 不同加热条件对嗜酸耐热菌检测结果的影响
Table 3 The effects of different heating conditions on the thermo-acidophilic bacteria test results

加热条件	菌落数(CFU/10 g)	备注
60 ℃ 20 min	10	有杂菌落
70 ℃ 20 min	8	黄白色圆形菌落不透明
80 ℃ 15 min	4	黄白色圆形菌落不透明

3.4 菌落形态

嗜酸耐热菌的菌落是不透明的、奶油(或黄白)色、微凸, 在显微镜下, 中间成杆状, 末端有芽孢^[8-9]。菌落形态见图 1, 镜检图片见图 2。

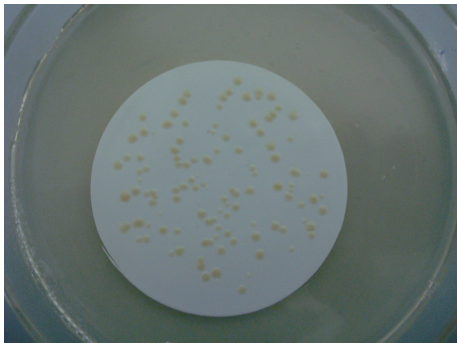


图 1 YSG 培养基上菌落形态
Fig. 1 Colony morphology on the YSG medium



图 2 镜检图片 10×100
Fig. 2 Microscopy images 10×100

4 结 论

本次实验通过改变培养基的 pH 值、培养基的种类及加热条件, 对柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌的培养及检测条件进行了初步研究后发现, 柠檬酸及其盐类样品经 1:5 稀释, 70 ℃ 加热 20 min, 冷却过

滤后接种于 pH 值 3.5~4.0 的 YSG 培养基上, 置 45 ℃ 培养 5 d, 最适合柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌的检测。另外, 检测结果的准确性还与操作有关, 保证培养基及容器灭菌彻底, 是实验成功的关键。

本实验实验材料及试剂易于获得, 实验条件易于控制, 实验可操作性较强, 对柠檬酸及其盐类中嗜酸耐热菌的检测具有较高的实用性。对柠檬酸及其盐类企业产品控制, 是一种即经济又有效的检测方法。本实验的测试样品仅为柠檬酸及其盐类产品, 应用于其他样品的检测时, 检测方法还需进一步实验确认。而且由于实验条件的限制, 无法对培养得到的嗜酸耐热菌做进一步的种属鉴定。

参考文献

[1] 李雅琴. 嗜酸菌及其应用[J]. 微生物学通报, 1998, 25(3): 170-172.
Li YQ. Acidophilic bacteria and its application [J]. Institute Microbiol, 1998, 25(3): 170-172.

[2] Norris PR, Johnson DB. Acidophilic microorganisms. In: Extremophiles: microbial life in extreme environments [M]. New York, John Wiley, 1998, 133.

[3] 许占位, 余清谋, 刘永建. 浓缩果汁生产中嗜酸耐热菌的控制[J]. 饮料工业, 2003, 6(5): 32-34.
Xu ZW, Yu QM, Liu YJ. Control on acidophilic and heat-resistant bacteria in fruit juice concentrate processing [J]. Beverage Ind, 2003, 6(5): 32-34.

[4] 薛晚利, 周玲, 李选社, 等. 浓缩苹果汁中嗜酸耐热菌的分离及检测条件探讨[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2005, 26(2): 199-200.
Xue WL, Zhou L, Li XS, et al. Study on isolation and detection of thermo-acidophilic bacteria in apple juice concentrat[J]. J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci), 2005, 26(2): 199-200.

[5] 张洪勋, 郝春博, 白志辉. 嗜酸菌研究进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(2): 68-72.
Zhang HX, Hao CB, Bai ZH. Advance in acidophil [J]. J Microbiol, 2006, 26(2): 68-72.

[6] 刘玉娥, 高桂华, 陶墨奎, 等. 微菌落法快速定量检测食品中细菌总数[J]. 解放军预防医学杂志, 2007, 25(6): 406-408.
Liu YE, Gao GH, Tao MK, et al. Rapid detection of total bacterial count in food by microcolony technique [J]. J prev Med Chin PLA, 2007, 25(6): 406-408.

[7] 刘飞飞, 周洪波, 符波, 等. 不同能源条件下中度嗜嗜酸细菌多样性分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 381-386.
Liu FF, Zhou HB, Fu B, et al. Bacterial diversity analysis of moderately thermophilic microflora enriched by diferent energy source [J]. Acta Microbiol Sinica, 2007, 47(3): 381-386.

- [8] 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.

Dong XZ, Cai MY. Common bacteria identification manual [M]. Beijing: Science Press, 2001.

- [9] 王峰, 李建科, 郭玉蓉, 等. 苹果浓缩汁中嗜酸耐热菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1755-1759.

Wang F, Li JK, Guo YR, *et al.* Isolation and identification of thermoacidiphilic bacteria from apple juice concentrate [J]. *Ins Microbiol*, 2008, 35(11): 1755-1759.

(责任编辑: 邓伟)

作者简介



刘加兰, 工程师, 主要研究方向为食品安全及食品检测。
E-mail: liujl@rzbc.com

“粮油产品质量安全”专题征稿

小麦、水稻、大豆等粮油产品是我国人民广泛食用的主要农产品, 在人们日常饮食中占据着非常重要的主导地位, 具有无可替代的作用。因此, 粮油产品质量安全关系到每个人的日常生活, 具有十分重要的意义。

鉴于此, 本刊特别策划了“**粮油产品质量安全**”专题, 由中国农业科学院油料作物研究所**李培武**研究员担任专题主编。李培武研究员现任农业部生物毒素检测重点实验室和农业部油料产品质量安全风险评估实验室(武汉)主任, 农业部油料及制品质量监督检验测试中心常务副主任, 兼任农业部农产品质量安全生物毒素专家组组长、食品安全国家标准审评委员会污染物分委员会副主任、中国仪器仪表学会农业仪器应用技术分会副理事长、GCIRC、FAO/WHO 食品添加剂与污染物联合专家委员会委员。长期从事粮油食品质量安全检测研究与风险评估工作。本专题主要围绕粮油产品质量安全, 紧紧围绕**粮油产品质量安全关键安全因子与质量指标检测, 快速检测与设备研制, 食用油保真与掺伪技术, 质量安全风险评估, 粮油食品管理法律法规、监管现状及问题**等或本领域其它有意义的问题进行论述, 计划在**2014年7月**出版。

本刊编辑部及李教授诚邀各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在**2014年6月15日**前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: tougao@chinafoodj.com

《食品安全质量检测学报》编辑部