

分光光度计法快速检测果汁中嗜热耐酸菌

叶建芳, 李文俊, 赵文超, 莫小晶, 贾彩凤*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200241)

摘要: 酸土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)是果汁污染的主要嗜酸耐热菌。它可以将香草酸或者香兰素转化为愈创木酚, 后者在过氧化物酶的作用下产生红褐色产物, 从而可以快速检测该菌。根据这个原理, 设计实验探究该颜色反应的最优培养条件以及实际体系中检测该菌的可行性。结果表明: 在静止培养情况下, 在BAM培养基中添加100 μg/kg的香草酸最有利于愈创木酚的产生; 不同浓度的嗜热耐酸菌芽孢液在上述条件下培养, 随着浓度的降低产生高浓度愈创木酚时间依次延迟, 最低浓度为3个/mL的芽孢培养21h后, 愈创木酚含量用分光光度计测定的光密度值OD₄₇₀为1.0以上, 为肉眼可见的红褐色; 模拟实际体系下的培养也出现了颜色反应, 证明该方法确实可以实现果汁中嗜热耐酸菌的快速、简便、高灵敏度的检测。

关键词: 果汁; 嗜热耐酸菌; 愈创木酚; 分光光度计; 颜色反应

A Rapid Spectrometric Method for Detecting *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Fruit Juice

YE Jian-fang, LI Wen-jun, ZHAO Wen-chao, MO Xiao-jing, JIA Cai-feng*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: In the presence of *Alicyclobacillus acidoterrestris*, vanillic acid and vanillin can be converted into guaiacol, which can be further converted into a reddish-brown product by peroxidase. Based on this color reaction, a method was developed to spectrometrically detect the presence of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in real systems. In static culture, BAM medium with the addition of 100 μg/kg vanillic acid was the most favorable for guaiacol formation. The peak value of guaiacol concentration was delayed along with the decrease of bacteria concentration. A visible color was formed in medium and its OD₄₇₀ could reach up to 1.0 or even more after 21 hours of culture at the initial spore density of 3 spores/mL. And the same result also was obtained in an apple juice system. Thus, this method can allow rapid, simple and sensitive detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juice.

Key words: juice; *Alicyclobacillus acidoterrestris*; guaiacol; spectrophotometer; color reaction

中图分类号: Q935

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)14-0241-04

酸土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*, Aa)是果汁污染的主要嗜酸耐热菌^[1], 国际贸易严格要求每10mL浓缩果汁中该菌的含量不超过1个^[2]。Aa超标是浓缩果汁生产中最为严重的质量问题之一, 是近年来浓缩果汁生产厂家比较棘手的问题。该菌在常温下能代谢产生一种不愉快风味的化合物——2,6-二溴苯酚, 在万亿分之一的浓度就会使果汁口感风味变差, 甚至使其浊度升高乃至在包装物底部形成白色沉淀的危害^[3]。

传统的Aa检测方法耗时很长, 一般需要4~5d才能出检测报告^[4], 检测结果的滞后性使之无法及时指导

生产。用分子生物学的方法进行检测^[5-6], 所需要的成本较高, 对操作者的要求严格, 且结果的重复性不佳, 因此作为日常果汁检测, 限制了其在小型果汁厂家的应用。生产中迫切需要一种快速、准确的Aa检测方法。

愈创木酚, 化学名称为邻甲氧基苯酚, 是一种略带清香的物质。愈创木酚在过氧化物酶的催化下可与过氧化氢反应, 生成四愈创酞, 该物质为红褐色。Aa能够代谢产生愈创木酚^[7-9], 果汁中愈创木酚的存在可作为定性检测Aa的依据^[9-12]。本研究通过优化培养基加快菌的生长, 寻求最佳的产生愈创木酚的培养条件, 并利用其颜色反应来检测Aa的存在。

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 上海市大学生创新活动计划项目(KY2009-12S)

作者简介: 叶建芳(1990—), 女, 本科生, 研究方向为微生物学。E-mail: wzaybh@yahoo.com

* 通信作者: 贾彩凤(1979—), 女, 工程师, 博士研究生, 研究方向为微生物学。E-mail: cfjia@bio.ecnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

嗜热耐酸菌 DSM2498 德国菌种保藏中心; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)德国 Sigma 公司; 果汁: 汇源 100% 不含防腐剂水果汁(A)、自制新鲜水果汁(B); 402、BAM、AAM、YSG、K 氏 5 种^[12]培养基; 其他试剂均为国产分析纯。

GNP-9160 隔水式恒温培养箱、DK-S24 电热恒温水浴锅 上海精密实验设备有限公司; DL-CJ-2ND 超净工作台 北京市东联哈尔仪器制造有限公司; T6 新悦-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; YXQ-LS-75SII 高压蒸汽灭菌锅 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; TDL80-2B 台式离心机 上海安亭科学仪器厂; MDF-U32V 低温冰箱 日本三洋电气有限公司。

1.2 方法

1.2.1 芽孢的制备和计数

将菌种接种在 402 斜面上 45℃ 培养 1 周, 用 5mL 无菌水洗下芽孢, 3500r/min 离心 10min, 弃上清液。用无菌水复溶, 重复 4 次, 后用 5mL 无菌水复溶, 4℃ 保存备用。计数采用平板计数法, 将上述制备的菌液于 80℃ 水浴锅中加热 10min, 稀释的菌液涂平板, 45℃ 培养 4d 后计数。

1.2.2 颜色反应

参考文献[9]设计实验的反应体系为: 1mL 邻苯二甲酸氢钾缓冲体系 + 0.3mL 辣根过氧化物酶(HRP) + 50μL 3% H₂O₂ + 2mL 菌上清液。

1.2.3 最佳培养条件的选择

取上述芽孢原液 0.1mL 接入 100mL AAM 液体培养基中, 在水浴锅中 80℃ 加热 10min, 再加入 1mL 100mg/mL 香草酸^[8], 45℃ 静止或 100r/min 振荡培养。每隔 3h 取样, 测定菌液的比浊度 OD₄₂₀。将菌液 5000r/min 离心 5min 后取上清, 测定 OD₄₇₀ 的光密度值用于计算愈创木酚的含量。

1.2.4 香草酸和香兰素对愈创木酚产生的影响

同 1.2.3 节方法, 向 AAM 培养基中加入香草酸或香兰素, 45℃ 静止或 100r/min 振荡培养。不同时间取样测定菌液的比浊度 OD₄₂₀, 并取上清测定愈创木酚的含量。

1.2.5 产生愈创木酚最优培养基的选择

同 1.2.3 节方法, 把芽孢原液接入 402、BAM、YSG、K 氏、AAM 5 种培养基中, 再加入香草酸或香兰素, 45℃ 培养。每隔 3h 取样测定菌液的比浊度 OD₄₂₀。并取上清测定愈创木酚的含量。

1.2.6 不同浓度初始菌液培养结果

在 BAM 培养基中添加 100μg/kg 的香草酸, 不同初始浓度的嗜热耐酸菌芽孢液(3×10^3 、 3×10^2 、 3×10^1 、 3×10^0 个/mL)在 45℃ 恒温箱静止培养。每隔 3h 取样, 测定菌液的比浊度 OD₄₂₀, 并取上清液测定愈创木酚的含量。

1.2.7 果汁中嗜热耐酸菌培养及测定

培养体系: 灭菌的 BAM 培养基(内含香草酸), 每份 1.8mL 装入 7mL 无菌 EP 管中。

待检样品制备: 将嗜热耐酸菌菌液分别用 A 和 B 果汁梯度稀释, 使芽孢的终浓度为 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 个/mL, 同时用相应果汁做空白对照, 在水浴锅中 80℃ 加热 10min; 预培养: 培养体系中加入制备的待检样品 0.2mL, 45℃ 静止培养 24h; 检测: 培养液中加入 50μL H₂O₂ 溶液, 1mL 邻苯二甲酸氢钾缓冲体系, 0.3mL HRP, 10min 后观察显色, 并用相机拍照。

2 结果与分析

2.1 转速对愈创木酚产生的影响

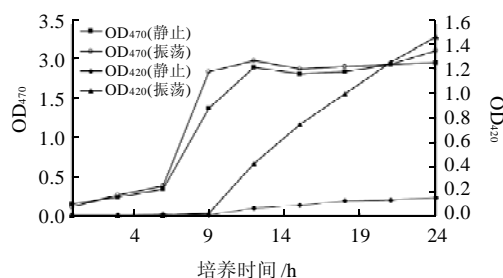
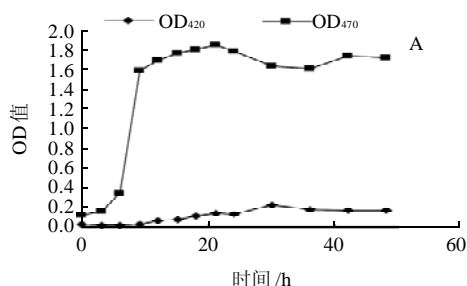


图1 振荡与静止培养(AAM培养基)培养结果

Fig.1 Effect of stationary culture and shaking culture on guaiacol production

如图 1 所示, 在进行培养时, 振荡培养明显快于静止培养时菌的生长速度, 但是两种条件下产生愈创木酚含量相差不大, 且静止培养较符合实际应用体系, 所以以下采用该培养条件。

2.2 香草酸和香兰素对愈创木酚产生的影响



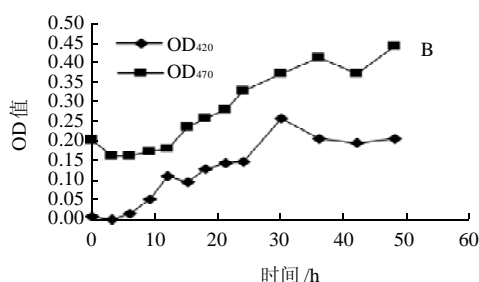


图2 添加香草酸(A)和香兰素(B)对 BAM 培养基培养结果
Fig.2 Effect of vanillic addition acid vanillin addition on guaiacol production

如图2所示,添加香草酸的培养基比添加了香兰素的培养基产生的愈创木酚的量更多且速度更快,所以在以后的实验中采用香草酸为添加剂。

2.3 不同种类培养基对愈创木酚产生的影响

K 氏培养液不利于酸土菌的生长,无法得到 OD 值;另4种培养基培养结果如图3所示:YSG 培养基菌生长缓慢,且斜率较小;402 培养基的静止期长;AAM 培养液菌的静止期较短(9h),但菌液的最高 OD₄₂₀ 值不高,仅为 1.7 左右;BAM 培养基培养静止期短,愈创木酚产生的指数期提前,且在 12h 愈创木酚产生量最大达到 OD₄₇₀ 2.0,更适合做该菌检测的培养基。综合 5 种培养基的培养效果,选定 BAM 培养基为最优培养基。

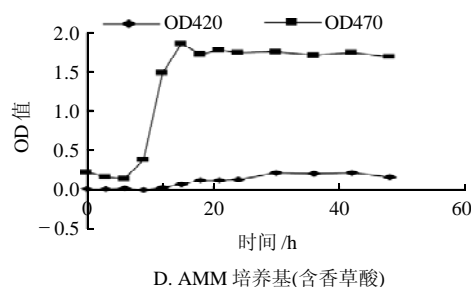
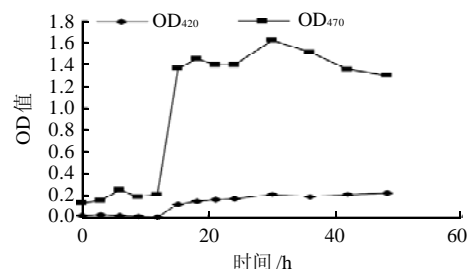


图3 4种培养基对愈创木酚的影响
Fig.3 Effect of different culture media on guaiacol production

2.4 不同浓度初始菌液培养结果

不同浓度的嗜热耐酸菌芽孢液(3×10^3 、 3×10^2 、 3×10^1 、 3×10^0 个/mL)在上述条件下培养,随着浓度的降低产生愈创木酚的时间依次延迟,最低浓度为 3×10^0 个/mL 的芽孢液经培养 21h 后得到的培养液,愈创木酚的含量用分光光度计测定的光密度值 OD₄₇₀ 为 1.0 以上(图4),为肉眼可见的红褐色。

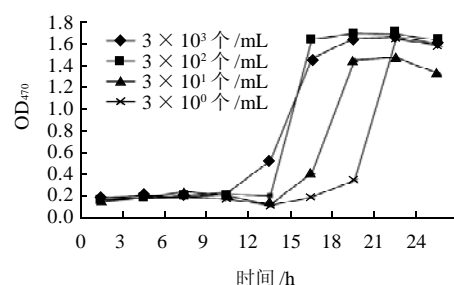


图4 不同浓度初始菌液培养结果图
Fig.4 Effect of initial cell suspension density on guaiacol production

2.5 模拟试剂盒的检测结果

以图5、6为试剂盒简单模型和部分实验结果(以苹果汁为例),左侧颜色最浅的为空白对照,从左到右分别是 3×10^3 、 3×10^2 、 3×10^1 、 3×10^0 个/mL 菌液的检测结果。可以看到,所有的待检样品检测都呈现肉眼可见的红褐色,证明该检测方案确实可行。

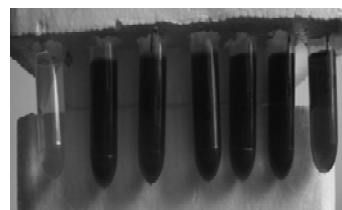


图5 待检市售 100% 不含防腐剂苹果汁样品检测结果
Fig.5 Detection results of commercial 100% apple juice sample without preservatives

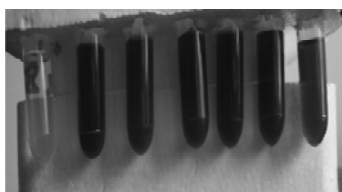


图6 待检自制新鲜苹果汁样品检测结果
Fig.6 Detection results of home-made apple juice sample

3 讨论

3.1 设计最佳颜色反应体系

按设计的颜色反应体系(1mL缓冲体系+0.3mL HRP+50 μ L 3% H_2O_2 + 2mL 愈创木酚溶液)进行实验, 得到了最佳的反应 pH 值和反应时间, 同时愈创木酚标准曲线的制作证明了愈创木酚含量与吸光度之间确实存在着正相关的相关关系, 为以后研究吸光度与菌液浓度之间的关系提供依据。

3.2 培养条件的优化

以添加香草酸的 BAM 培养基并在静止条件下优化培养, 在 24h 内, 3×10^0 个/mL 的最小浓度嗜热耐酸菌的愈创木酚产量也达到了 OD 最大值, 由此, 与传统的平板培养法相比, 上述研究结果显示, 用颜色反应监测嗜热耐酸菌, 把检测该菌的时间缩短到了 24h 之内, 具有极大的可行性, 能够很大程度的提高工厂的实际生产效益。

3.3 实际检测体系的应用

依据设计出的检测体系, 经过实验验证, 确实可以达到检测出样品中嗜热耐酸菌的目的, 为以后的定量检测提供了参考, 也证明了该方法在实际应用中的可行性。

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] 许占位, 余清谋, 刘永建. 浓缩果汁生产中嗜热耐酸菌的控制[J]. 饮料工业, 2003, 6(5): 32-34.
- [3] 姚培新, 马小魁. 浓缩果汁生产厂中嗜热耐酸菌的跟踪检测[J]. 饮料工业, 2001, 4(3): 42-45.
- [4] MURRAY M B, GURTLE J B, RYU J H, et al. Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 115(1): 59-69.
- [5] 常玉华. 果浓缩汁中耐热菌的 PCR 法快速检测研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2003.
- [6] CONNORA C J, LUO Hongliang, MCSPADDEN G B B, et al. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16SrRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(3): 229-235.
- [7] 杨康, 岳田利, 袁亚宏, 等. 利用顶空 SPME-GC-MS 联用技术检测苹果汁中嗜酸耐热菌代谢产物的研究[J]. 农产品加工: 学刊, 2007(3): 8-17.
- [8] BAHCECI K S, GOKMEN V, ACAR J. Formation of guaiacol from vanillin by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice: a model study[J]. Eur Food Res Technol, 2005, 220(2): 196-199.
- [9] BAHCECI K S, ACAR J. Determination of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by using HPLC and spectrophotometric methods, and mathematical modeling of guaiacol production[J]. Eur Food Res Technol, 2007, 225(5/6): 873-878.
- [10] AL-QADIRI H M, LIN Mengshi, CAVINATO A G. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(1): 73-80.
- [11] 周金燕, 张发群, 舒远才. 愈创木酚法测定锰过氧化物酶活力[J]. 纤维素科学与技术, 1993, 1(1): 34-37.
- [12] BEVILACQU A, SINIGAGLIA M, CORBO M R. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: New methods for inhibiting spore germination[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 125(2): 103-110.