

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.02.007

胡萝卜浓缩汁中耐热菌的分离及特性研究

Screening and characteristics of heat-resistant strain from concentrated carrot juice

刘彩琴¹ 魏兴虎² 王楠¹ 陈蔚青¹LIU Cai-qin¹ WEI Xing-hu² WANG Nan¹ CHEN Wei-qing¹陈虹¹ 吕韵¹ 郑刚¹CHEN Hong¹ LV Yun¹ ZHENG Gang¹

(1. 浙江树人大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310015; 2. 山东金得利食品有限公司, 山东 济宁 272200)

(1. College of Biology and Environment Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou, Zhejiang 310015, China; 2. Shandong Golden Profit Food Co., Ltd., Jining, Shandong 272200, China)

摘要:对胀袋胡萝卜浓缩汁中的耐热菌进行了分离,通过形态观察和 ITS rDNA 基因序列分析方法鉴定耐热菌,通过碳源利用试验考查菌株的部分生理生化特性,通过热和酸碱处理考察菌株的热稳定性和酸碱稳定性,利用超声波破壁技术考察细胞中多糖、还原糖和色素情况。结果表明:胀袋胡萝卜浓缩汁中分离得到一株耐热菌 SR-1,经形态学和分子生物学技术鉴定为肉色掷孢酵母,该菌经 80 °C 热处理 5~30 min,生长良好;经 90 °C 热处理 15 min 仍能生长,处理 20 min 后不能生长;在 pH 6.0~8.0 环境中生长良好,pH 3.0 以下不能生长。超声波破壁后上清液还原糖含量为 6.02~7.86 mg/mL,多糖含量为 32.93~41.78 mg/mL,菌体色素在 414, 539, 634 nm 处有吸收峰。

关键词:胡萝卜;浓缩汁;耐热菌;肉色掷孢酵母;超声波技术

Abstract: The heat-resistant strain was isolated and identified by morphological features and ITS rDNA gene sequence analysis. Some physiological and biochemical characteristics of the strain were examined by carbon source utilization experiment. The thermal stability and acid-base stability of the strain were examined by heat and acid-base treatment. With the ultrasonic technology, the polysaccharides, reducing sugar and pigment in cells were examined. The results indicated that the strain SR-1 belongs to

基金项目:浙江省科技厅公益项目(编号:GN20C200067);浙江树人大学“中青年学术团队”项目;浙江树人大学省属高校基本科研业务费专项资金项目(编号:2020XZ007)

作者简介:刘彩琴(1975—),女,浙江树人大学副教授,博士。

E-mail: sailor603@126.com

收稿日期:2019-06-06

Sporobolomyces carnicolor. It was heat-resistant, and grew stably after heat treatment at 80 °C for 5~30 min, and at 90 °C for 15 min. However, it couldn't grow after treated at 90 °C for 20 min. The strain could grow well at pH 6.0~8.0, but could survive under pH 3.0. Hydrochloric acid with 200, 400, 600 and 800 W ultrasound were used to break the cell wall, the supernatant contained 6.02~7.86 mg/mL of reducing sugar, 32.93~41.78 mg/mL of polysaccharide, and the absorption peaks of mycelium pigments were found at waves of 414, 539 and 634 nm.

Keywords: carrot; concentrated juice; heat-resistant strain; *Sporobolomyces carnicolor*; ultrasonic technology

果汁营养丰富,但 pH 多为 2.4~4.2^[1],其常见污染菌为耐热、耐酸的霉菌、酵母菌和细菌^[2-6]。耐热细菌如酸土环脂芽孢杆菌(*Allyclobacillus acidoterrestris*)常引起巴氏灭菌果汁在常温条件下浊度升高,是浓缩果汁生产中最重要目标控制微生物^[7-8];耐热霉菌如多变拟青霉、尖孢镰刀菌、丝衣霉、篮状菌、新萨托菌和布氏正青霉、正青霉等常引起巴氏杀菌果汁的腐败^[1];鲁氏接合酵母、酿酒酵母、出芽短梗霉等是导致果汁腐败变质的酵母菌^[9-10]。控制微生物污染一直是果汁工业努力解决的难题,不同的原料使加工工艺、果汁的糖度和酸度等不同,耐热微生物种类也不尽相同。

浓缩胡萝卜汁是中国复合果汁饮料和酸奶加工中常用的原料,经 115~120 °C 杀菌处理 30 s,其 pH 为 6.0 左右;为低酸性食品^[11],冷藏条件下极少出现腐败变质现象。试验拟对某企业胀袋胡萝卜浓缩汁中耐热微生物进行分离及特性研究,以期对胡萝卜浓缩汁加工、保藏和利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试 验 材 料

胡萝卜浓缩汁: -18 ℃ 保存, 山东某果汁生产企业。

1.1.2 试 剂

PDA 培养基、各种生化管: 杭州微生物试剂有限公司;

麦芽汁琼脂(MEA)培养基: 北京陆桥技术股份有限公司;

其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪 器 与 设 备

电子分析天平: PL303 型, 梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

恒温水浴锅: HH-S 型, 金坛市江南仪器厂;

酸度计: FE20 型, 梅特勒—托利多仪器有限公司;

高压灭菌锅: GR60DA 型, 致微仪器有限公司;

超净工作台: HJ-VD-650 型, 上海苏净实业有限公司;

生化培养箱: SPX-250B-Z 型, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

摇床: SW-CJ-1C 型, 上海福玛实验设备有限公司;

生物显微镜: YS100 型, 尼康仪器(上海)有限公司;

超声波细胞粉碎机: JY92-2D 型, 宁波新芝生物科技股份有限公司;

紫外分光光度计: UVmini-1240 型, 日本岛津公司。

1.2 方 法

1.2.1 耐 热 菌 的 分 离 及 纯 化

(1) 耐热菌的富集培养: 参照胡贻椿等^[12]的方法并进行修改。吸取 50 mL 无菌样品, 加入 250 mL 无菌三角烧瓶中, 80 ℃ 水浴 13 min, 然后迅速冷却至 45 ℃, 以 150 r/min 摇床培养 2 d。

(2) 分离及纯化: 将培养后的样品用无菌生理盐水分别稀释至 10^{-1} , 10^{-2} , ..., 10^{-8} 。吸取浓度为 10^{-7} , 10^{-8} 梯度的样液 200 μ L, 涂布于 PDA 培养基平板上, 28 ℃ 培养 2~5 d, 挑取典型单菌落, 保藏并备用。

1.2.2 耐 热 菌 的 形 态 及 理 化 特 性

(1) 菌株形态: 纯化后的菌株接种于 MEA 平板上, 28 ℃ 培养 3 d, 观察菌落形态。

(2) 碳源利用情况: 按 *D*-葡萄糖、甘油、*D*-木糖、侧金盏花醇、肌醇、山梨醇、纤维二糖、*D*-乳糖(牛源)、海藻糖、*D*-松三糖、木糖醇、2-酮基-葡萄糖酸盐、*D*-麦芽糖、 α -甲基-*D*-葡萄糖、*D*-棉籽糖、*L*-阿拉伯糖、*D*-半乳糖、*N*-乙酰葡萄糖胺、*D*-蔗糖生化鉴定管的要求接种耐热菌, 考察菌株对碳源的利用情况。

(3) 菌株的耐热性: 菌株经液体培养 72 h 后, 80 ℃ 热

处理 13 min, 稀释, 取适量稀释液于 80, 90 ℃ 水浴锅中分别水浴 5, 10, 15, 20, 25, 30 min。分别涂布于 PDA 培养基上, 于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 2~5 d, 观察生长情况。

(4) 菌株的耐酸特性: 将液体培养 72 h 后, 80 ℃ 热处理 13 min, 稀释, 分别接种于 pH 为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的 PDA 培养基上(1 mol/L 的盐酸或氢氧化钠调节), 于 28 ℃ 恒温培养 2~5 d, 观察生长情况。

1.2.3 耐热菌的鉴定 由中国食品发酵工业研究院中国工业微生物菌种保藏管理中心进行分子鉴定。

1.2.4 超声波功率对耐热菌色素提取效果的影响 参照叶伟庆等^[13]的方法并进行修改。取适量培养 48 h 的发酵液, 5 000 r/min 离心 15 min, 沉淀经蒸馏水清洗 3 次, 得湿菌泥 1 g, 加入 3 mol/L HCl 溶液 10 mL, 于 200, 400, 600, 800 W 下超声 1 h(每超声 5 s 间隔 10 s), 沸水浴 10 min, 再用冰水浴速冷, 5 000 r/min 离心 15 min, 得到上清液和红色沉淀。

(1) 还原糖和多糖含量的测定: 分别采用 DNS 法^[14]和苯酚硫酸法^[14]测定上清液中还原糖和多糖含量。

(2) 吸光度值的测定: 红色沉淀经蒸馏水清洗 3 次后, 加入 10 mL 丙酮溶液浸提 12 h, 离心取红色上清液, 于 400~800 nm 下测定吸光值。

1.3 数 据 处 理

所有试验均为 3 次平行, 数据经 Excel 软件分析; 采用 MEGA 5.0 软件, 邻近连接法分析“SR-1”与相关种的 ITS rDNA 序列系统发育树。

2 结 果 与 分 析

2.1 耐 热 菌 的 形 态 及 理 化 特 性

2.1.1 菌株形态 通过分离、筛选及纯化, 得到 1 株经 85 ℃ 水浴 30 min 后长势良好的粉红色菌株 SR-1。由图 1 可知, SR-1 在 MEA 培养基上呈奶油状, 粉红色, 表面反光, 边缘整齐, 菌落平伏, 不透明。由图 2 可知, SR-1 菌株在显微镜下细胞呈肾形, 芽殖, 大小为 3.0~13.0 μ m \times 3.0~5.0 μ m。综上, 菌株 SR-1 为酵母菌, 与文献^[15-16]中掷孢酵母属特征相近, 孢子形状与王启明等^[17]报道的肾形相似, 初步判定为掷孢酵母。



图 1 SR-1 的菌落形态

Figure 1 The morphology of SR-1 in MEA agar

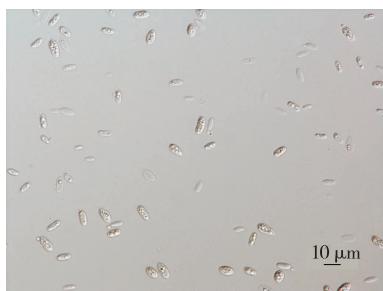


图 2 SR-1 的细胞形态

Figure 2 Cell morphology of SR-1

2.1.2 碳源利用情况 由表 1 可知,菌株 SR-1 可利用单糖如 D-葡萄糖,能利用二糖如海藻糖、D-麦芽糖、D-蔗糖,能利用三糖如 D-松三糖、D-棉籽糖,也能利用山梨醇,但不能利用甘油、D-木糖、侧金盏花醇、肌醇、纤维二糖、D-乳糖(牛源)、木糖醇、2-酮基-葡萄糖酸盐、 α -甲基-D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺,与已报道^[16]的掷孢酵母对碳源的利用情况不一致,与 Yang 等^[18]的肉色掷孢酵母对 D-木糖、纤维二糖和侧金盏花醇利用情况不同。

表 1 菌株 SR-1 对部分碳源的利用情况[†]

Table 1 Utilization of some carbon sources of strain SR-1

碳源	反应特征	碳源	反应特征
D-葡萄糖	+	甘油	-
山梨醇	+	侧金盏花醇	-
D-蔗糖	+	D-木糖	-
海藻糖	+	D-乳糖(牛源)	-
D-麦芽糖	+	肌醇	-
D-棉籽糖	+	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
D-松三糖	+	α -甲基-D-葡萄糖	-
纤维二糖	-	L-阿拉伯糖	-
D-半乳糖	-	N-乙酰葡萄糖胺	-
木糖醇	-		

[†] “+”代表反应阳性;“-”代表反应阴性。

2.1.3 耐热耐酸特性 由表 2 可知,菌株 SR-1 经 80 °C 水浴 5,10,15,20,25,30 min 后均在 PDA 培养基上生长良好;经 90 °C 水浴 5 min 后能较好生长,水浴 10,15 min 后有生长,但长势不良,水浴 20,25,30 min 后不再生长,说明 SR-1 较耐热。由表 3 可知,菌株 SR-1 在 pH 6.0~8.0 下生长良好,在 pH 4.0,5.0 下能生长,但长势不好,在 pH<3.0 时不能生长,表明菌株 SR-1 在 pH 3.0 以下的强酸性环境中不能生长,但在 pH 4.0 以上均能生长,且在中性及偏碱性环境中生长良好,与温洪宇等^[19]的结论相似。

2.2 菌株 SR-1 的 ITS rDNA 序列及分析

提取菌株 SR-1 的 DNA,设计引物并 PCR 扩增,得到

表 2 菌株 SR-1 的耐热特性[†]

Table 2 Heat resistance of the strain SR-1

处理时间/min	80 °C	90 °C
5	+++	++
10	+++	+
15	+++	+
20	+++	-
25	+++	-
30	++	-

[†] “+++”代表生长良好;“++”代表生长较好;“+”代表生长;“-”代表不生长。

表 3 菌株 SR-1 的耐酸特性[†]

Table 3 Acid resistance of the strain SR-1

pH	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
生长情况	-	-	+	++	+++	+++	+++

[†] “+++”代表生长良好;“++”代表生长较好;“+”代表生长;“-”代表不生长。

最终的 ITS rDNA 序列,序列长度为 550 bp。由图 3 可知,SR-1 与掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)中的模式菌株 *Sporobolomyces carnicolor* JCM 3766^T (登录号为 AY069991)聚为一支,置信度为 100%,序列相似性为 100%,表明其亲缘关系最近。故将菌株 SR-1 命名为肉色掷孢酵母(*Sporobolomyces carnicolor*)SR-1。

2.3 超声波功率对菌株 SR-1 色素提取效果的影响

由图 4 可知,菌株 SR-1 上清液还原糖含量为 6.02~7.86 mg/mL,多糖含量为 32.93~41.78 mg/mL。当超声功率为 600 W 时,还原糖含量最高;当超声功率为 400 W 时,多糖含量最高。酵母胞内还原糖主要来源于细胞质中还原性糖类,如葡萄糖、果糖等,适度的超声处理有利于其释放;酵母胞内多糖主要来源于细胞壁中的葡聚糖和甘露聚糖等多糖^[20],适度的破壁处理可使多糖充分释放;与王慧等^[21]研究结果类似。

由图 5 可知,当超声功率为 200,400,600 W 时,菌体的丙酮提取液在 414.0,539.0,634.0 nm 处各有 3 个吸收峰,以 539 nm 处吸收峰值最大;当超声功率为 800 W 时,丙酮提取液在 414 nm 处无吸收峰,在 539,634 nm 处各有一吸收峰,仍以 539 nm 处吸收峰值最大。现有资料^[22]显示, β -胡萝卜素的吸收峰为 430,450,475 nm,圆酵母素的吸收峰为 459,482,515 nm,红酵母红素的吸收峰为 470,492,521 nm,与试验结果不同。

3 结论

试验从产气、胀袋的胡萝卜浓缩汁中分离出一株耐热菌 SR-1,经形态学和 ITS rDNA 基因序列分析为酵母菌属的肉色掷孢酵母,该菌经 80 °C 热处理 5~30 min 和

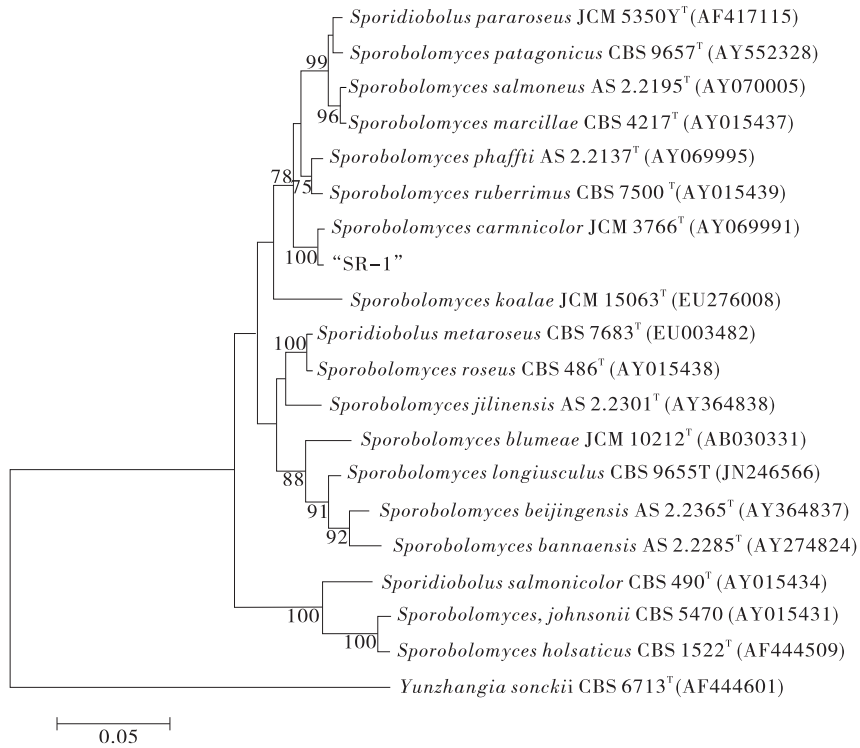


图3 菌株SR-1的ITS rDNA基因序列分析聚类结果

Figure 3 Clustering result of gene sequence of ITS rDNA of the strain SR-1

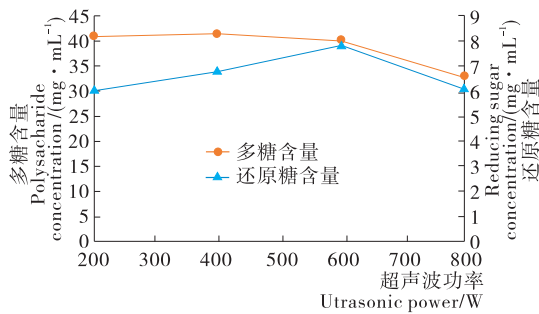


图4 超声功率对菌株SR-1多糖和还原糖含量的影响

Figure 4 Effect of ultrasonic power on polysaccharide and reducing sugar concentration of the strain SR-1

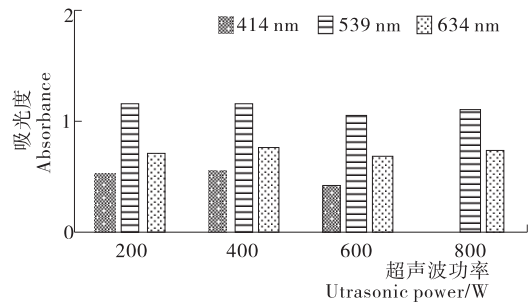


图5 超声功率对菌株SR-1色素提取效果的影响

Figure 5 Effect of ultrasonic power on pigment extraction of the strain SR-1

90 °C 热处理 15 min 以下均可生长,经 90 °C 热处理 20 min后不能生长;在pH 6.0~8.0 环境中生长良好,在 pH 3.0 以下不生长。以盐酸为溶剂辅以超声波破壁技术,有利于菌株还原糖、多糖和色素的溶出,肉色掷孢酵母 SR-1 丙酮提取液吸收峰为 414,539,634 nm。掷孢酵母 SR-1 对碳源的利用情况和色素吸收峰仍需进一步研究。

参考文献

[1] 童迅,高雯,黄庭轩,等.浓缩果汁中耐热霉菌的分析及鉴定[J].食品科学,2016,37(20):198-202.
 [2] 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.

[3] ROJO M C, CRISTIANI M, SZERMAN N, et al. Reduction of *Zygosaccharomyces rouxii* population in concentrated grape juices by thermal pasteurization and hydrostatic high pressure processing[J]. Food and Bioprocess Technology, 2019, 12(5): 781-788.
 [4] CAI Rui, YUAN Ya-hong, WANG Zhou-Li, et al. Reduction of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores on apples by chlorine dioxide in combination with ultrasound or shaker[J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8: 2 409-2 417.

(下转第 118 页)

导致大枣受力不均而产生的破坏;②推杆机构的丝杆运动过快,导致推杆头与大枣接触时大枣被压坏。实际工作中,可以通过单片机来控制定位机构和推杆机构的速度以实现精准去核。

表 1 大枣去核试验结果

Table 1 The test results of Jujube to nuclear

样本数	去核数	顺位率/%	破损率/%	生产时间/s	生产率/s ⁻¹
80	76	97.5	2.50	112	0.85
80	75	96.3	4.00	115	0.79
80	77	98.7	3.75	110	0.83
80	76	97.5	1.25	109	0.72
80	77	98.7	2.50	112	0.74
平均值	76	97.7	2.80	112	0.79

5 结论

试验确定了一种基于单片机控制的大枣去核机的整体设计方案。该大枣去核机结构简单、紧凑、体积精巧、去核质量高,果肉浪费少。实现了大枣去核过程中的自动定位、自动去核、自动出料等。但该机构目前还不能完全应用于工业生产,要实现工业自动化生产自动上料机构等需进一步研究。

参考文献

[1] 文怀兴, 李新博, 史鹏涛, 等. 大枣去核切片集成设备的设计与试验[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 145-148, 156.

(上接第 41 页)

[5] 王楠, 臧汝瑛, 周宏霞. 浓缩苹果汁中微生物染菌的种类及防治研究[J]. 农产品加工, 2018(17): 50-52.

[6] 杨桂馥. 果汁饮料灌装方式的选择[J]. 食品与机械, 1996(3): 7-8.

[7] 黄瑞, 余小林, 胡卓炎, 等. 超声对荔枝汁中 TAB 的杀菌效果研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(3): 214-217, 243.

[8] 黄玉鑫, 冯鑫, 史文鑫, 等. 酸土脂环酸芽孢杆菌危害及其控制研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(12): 347-352.

[9] 徐琼, 王志伟, 陈欣钦, 等. 果汁饮料腐败酵母菌一出芽短梗霉的分离与鉴定[J]. 食品科技, 2016, 41(4): 310-313.

[10] 王虎玄, 刘婷, 马原, 等. 陕西浓缩海红果汁中高渗酵母的分离鉴定[J]. 陕西科技大学学报, 2017, 35(6): 114-119.

[11] ZHOU Lin-yan, WANG Yuan-yuan, HU Xiao-song, et al. Effect of high pressure carbon dioxide on the quality of carrot juice [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10 (3): 321-327.

[12] 胡贻椿, 岳田利, 袁亚宏, 等. 浓缩苹果汁生产环境中嗜酸耐热菌的分离与初步鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(5): 184-188.

[13] 叶伟庆, 吴园园, 高上吉, 等. 4 株海洋红酵母分离鉴定及

[2] 马朝锋, 刘凯, 杨军良, 等. 红枣去核机技术研究进展[J]. 中国农机化学报, 2019, 40(3): 108-116.

[3] 朱克庆, 吕少芳. 大枣去核机主传动机构的设计[J]. 粮食与食品工业, 2009, 16(5): 36-39.

[4] 文怀兴, 周改梅, 俞祖俊. 大枣去核设备的设计及试验分析[J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2015, 33(6): 142-147.

[5] 曹劲草, 黄晓华, 史正元, 等. 红枣去核机及其槽轮机构仿真分析[J]. 食品与机械, 2017, 33(7): 77-80, 84.

[6] 高雪, 袁飞. 基于 STM32 和 PLC 的枕式包装机控制系统的设计[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(3): 19-23.

[7] YOOW J I, AI-REZA, KANG S C. Hair growth promoting effect of zizyphus jujuba Essential oil [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(5): 1 350-1 354.

[8] 郭文波, 郑霞, 郭璟瑜, 等. 真空冷冻干燥红枣粉加工技术研究[J]. 食品工业, 2016, 37(6): 95-99.

[9] 吴捍疆, 张丰收, 张佳琪. 基于 PLC 的蜜柚分拣系统设计[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(4): 28-30.

[10] 关建行, 王玉亮, 袁东阁, 等. 一种使用不完全齿轮机构传动的红枣去核机的设计[J]. 食品工业, 2015, 36(10): 261-263.

[11] GHALY I S, SAID A, ABDEL-WAHHAB M A. Abdel-Wahhab. Zizyphus jujuba and Origanum majorana extracts protect against hydroquinone-induced clastogenicity [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2007, 25(1): 10-19.

[12] 史鹏涛, 文怀兴, 王宁侠, 等. 盘式自动定心大枣去核设备的设计及试验[J]. 农机化研究, 2014, 36(11): 160-163.

[13] 范景峰, 梅二召, 李江艳, 等. 新型液动食用菌装袋机的设计[J]. 包装与食品机械, 2019, 37(5): 46-49.

其代谢产物分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(10): 2 046-2 050.

[14] 薛丹, 黄豆豆, 姚风艳, 等. 中药木瓜中总糖及还原糖的含量测定[J]. 中国医药导报, 2015, 12(12): 121-124, 128.

[15] BARNETT J A. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 胡瑞卿, 译. 山东: 青岛海洋大学出版社, 1991: 7-19.

[16] 李明霞. 掷孢菌科的研究 II: 中国叶表掷孢酵母的初步分类及掷孢酵母属的种类[J]. 真菌学报, 1988, 7(4): 216-220.

[17] 王启明. 中国担子菌酵母的分类与分子系统学研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2004: 8, 34, 138-147.

[18] WANG Pi-han, YANG Shan-hua. New record of *Sporobolomyces carnicolor* from Taiwan[J]. Fungal Science, 2006, 21(1/2): 29-33.

[19] 温洪宇, 史进, 王璐. 发酵醋醅酵母菌的分离、生长特性及分子鉴定[J]. 中国酿造, 2013, 32(2): 48-52.

[20] 李晶晶, 冀国珍, 高爱武, 等. 获得最大酵母多糖提取率的破壁方法研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3): 651-658.

[21] 王慧, 程富胜, 罗永江, 等. 响应面法优化酵母多糖的提取工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(24): 92-96.

[22] 魏娜, 徐琼, 张宁, 等. 掷孢酵母类胡萝卜素的提取与鉴定[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 133-137.