

# 酸土脂环酸芽孢杆菌对玉米果汁饮料挥发性成分及色度的影响

许灿, 李二虎, 王鲁峰, 范刚, 徐晓云, 潘思轶

(华中农业大学食品科学技术学院, 环境食品学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 从市售异味玉米果汁饮料中分离、筛选嗜酸耐热菌, 对其进行分子生物学鉴定, 并研究分离菌株对玉米果汁饮料挥发性成分和色度的影响。结果表明, 市售异味玉米果汁饮料中分离筛选出一株嗜酸耐热芽孢杆菌, 该菌最适生长温度为 45~50 °C, 最适 pH 为 3.5~4.0, 16S rDNA 测序鉴定为酸土脂环酸芽孢杆菌。将分离菌株接种于正常样品于 45 °C 培养 30 d, 气相色谱-质谱联用技术 (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS) 分析表明, 正常样品和接种样品挥发性成分的种类相似, 但在关键性气味物质的含量上有显著差异。接种样品中 14 种挥发性物质含量极显著高于正常样品, 其中愈创木酚和邻乙氧基苯酚具有类似草药、消毒水等异味, 且两种物质在接种样品中气味活度分别高达 1696.58 和 398.40, 为酸土脂环酸芽孢杆菌污染该饮料产生的特征性异味物质。色差分析表明接种样品 L 值显著高于正常样品, 表明污染饮料产生异味的同时产品白度增加。

**关键词:** 玉米饮料; 脂环酸芽孢杆菌; 挥发性成分; 色度

文章编号: 1673-9078(2014)6-268-275

## Effect of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on Volatile Compounds and Color of Corn Juice Beverage

XU Can, LI Er-hu, WANG Lu-feng, FAN Gang, XU Xiao-yun, PAN Si-yi

(Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Thermoacidophilic bacterium were selected and screened from commercial maize beverage with smoky, antiseptic or disinfectant like flavor taints. A strain of *Alicyclobacillus* was isolated from spoilage samples with an optimum growth temperature of 45~50 °C and optimum growth pH of 3.5~4.0. The strain was identified as *Alicyclobacillus acidoterrestris* by 16S rDNA sequencing and inoculated to normal samples. Then inoculated samples were cultured at 45 °C for 30 days. Volatile compounds and colorimetric characteristics of the beverage were studied by gas chromatograph-mass spectrometer and colorimeter. Total amount of volatile compounds was similar among normal and inoculated samples but showed variation on key aromas. The concentrations of 14 volatile compounds in inoculated samples were significantly higher than normal samples. Among them, guaiacol and o-ethoxyphenol had an offensive smelling and their odor activity values were 1696.58 and 398.40, respectively. Colorimetric analysis showed that the white intensity increased in inoculated samples and the L value was significantly improved.

**Key words:** maize beverage; *Alicyclobacillus spp.*; volatile compounds; colorimetric characteristics

玉米是重要的粮食、经济和饲料作物, 我国是世界第二大玉米生产国, 2012 至 2013 年我国玉米产量首次超过稻谷, 成为第一大粮食作物<sup>[1]</sup>。玉米具有很高的营养价值, 如护眼<sup>[2]</sup>、预防心脑血管疾病<sup>[3]</sup>、调节血糖等作用<sup>[4]</sup>。玉米饮料的开发使人们从吃谷物转变

收稿日期: 214-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201414); 华中农业大学自主创新基金环境食品学培育专项 (2013PY098) 资助

作者简介: 许灿 (1991-), 男, 主要从事食品微生物研究

通讯作者: 李二虎 (1982-), 男, 博士, 研究方向为食品生物技术

到喝谷物, 这样即保留了玉米中对人体健康有益的营养成分, 又具有其他玉米加工产品无法比拟的优势<sup>[5]</sup>。随着人们对玉米类饮料的了解, 国内玉米类饮料销量也在逐步上升。

脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus spp.*) 又称嗜酸耐热菌, 该菌污染果汁饮料在变质初期并不容易被发现, 产品也不出现明显的涨包或酸败, 但其代谢产物愈创木酚和卤酚等在万亿分之一浓度就会使果汁口感风味变劣<sup>[6-7]</sup>。一些脂环酸芽孢杆菌特别是酸土芽孢杆菌能引起果汁的腐败, 并产生异味和白色沉淀, 由于

其能产生芽孢, 经过传统的巴氏杀菌很难将其完全移除<sup>[8-9]</sup>。截止目前, 脂环酸芽孢杆菌在苹果汁<sup>[10-12]</sup>、橙汁<sup>[13]</sup>、芒果汁<sup>[14]</sup>、番茄汁<sup>[15]</sup>等各类果汁中都有报道, 影响果汁加工产品的风味质量。

近年来, 随着玉米类谷物饮料生产和消费的增加, 新型玉米果汁混合饮料相继出现。湖北某公司开发的玉米果汁饮料投放广州市场后被消费者发现具有类似“草药”异味。实验采用多种培养基从市售异味玉米饮料中筛选分离微生物, 并对其进行分子生物学鉴定。将鉴定菌株接种于正常饮料培养, 采用气相色谱-质谱联用仪 (Gas Chromatograph-Mass Spectrometer, GC-MS) 和色差计研究接种玉米果汁饮料中挥发性物质组分及色度变化。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 市售异味玉米果汁饮料

实验用异味玉米果汁饮料为湖北某公司采用旧工艺生产, 产品投放广州佛山市场三个月后, 公司产品控部专业人员感官鉴定其具有类似药味和腐败异味。产品配料: 纯净水、玉米原浆、白砂糖、果葡糖浆、椰果粒、蜜桃果粒、水蜜桃汁、食盐及食用添加剂; (其中果粒含量2 g/100 mL, 蛋白质1%, 碳水化合物8%, 膳食纤维4%, 维生素C  $3.6 \times 10^{-3}\%$ , pH 3.7。)

### 1.2 分离用培养基

NB培养基 (g/L): 胰蛋白胨5.0、酵母浸膏2.5、葡萄糖1.0、琼脂15.0、蒸馏水1000 mL。用1 mol/L NaOH和1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将pH调至7.2。

LB培养基 (g/L): 胰蛋白胨10.0、酵母粉10.0、NaCl 5.0、琼脂15.0、蒸馏水1000 mL。用1 mol/L NaOH和1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将pH调至7.2。

MRS培养基 (g/L): 蛋白胨10.0、牛肉粉5.0、酵母粉4.0、葡萄糖20.0、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0、三水醋酸钠5.0、柠檬酸三铵2.0、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.05、琼脂粉15.0、吐温80 1.0 mL、蒸馏水1000 mL, 用1 mol/L NaOH和1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将pH调至6.2。

YPD培养基 (g/L): 酵母膏10.0、蛋白胨20.0、葡萄糖20.0、琼脂15.0, 蒸馏水1000 mL。

APDA培养基 (g/L): 马铃薯200、葡萄糖20、琼脂15、蒸馏水1000 mL, 用1 mol/L NaOH和1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将pH调至4.2。

KA培养基 (g/L): 酵母提取物2.5、蛋白胨5.0、葡萄糖1.0、吐温80 1.0、琼脂15.0, 蒸馏水1000 mL。

OSA培养基 (g/L): 蛋白胨10.0、橙汁200、使用

无菌苹果酸 (25%) 调节pH至3.7。

AAM培养基 (g/L): 酵母膏2.0、葡萄糖2.0、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2、MgSO<sub>4</sub> 1.0、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2、CaCl<sub>2</sub> 0.5、MnSO<sub>4</sub> 0.5、琼脂15.0、蒸馏水1000 mL。

YSG培养基 (g/L): 酵母膏2.1、葡萄糖1.0、可溶性淀粉2.0、琼脂15.0, 蒸馏水1000 mL。

BAT培养基 (g/L): CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.20、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0、酵母膏2.0、葡萄糖5.0、痕量盐溶液1 mL、琼脂15.0 g、蒸馏水1000 mL。

(痕量盐溶液 (g/L): CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.66、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.18、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.16、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.15、CoCl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.18、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.10、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.30)

将上述OSA、YSG、BAT、KA、AAM培养基按照配方配置, 加入1 L去离子水, 用硫酸调节pH值至3.7, 115 °C高压灭菌30 min, 冷却至50 °C。

### 1.3 仪器与设备

SW-CJ-1FD超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; HNY-200D恒温培养振荡器, 天津市欧诺仪器仪表有限公司; DSHZ-300A旋转式水浴恒温振荡器, 杭州艾普仪器设备有限公司; DH3600B II电热恒温培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; pHi560 pH计, 美国Beckman Coulter公司; UV-2401PC series, 岛津紫外分光光度计; YXQ-LS-30SLL立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; PTC-200 PCR仪, MJ Research公司; Agilent 7890A型气相色谱仪, Agilent公司; Agilent 5975C质谱仪, Agilent公司; 50/30 μm DVB/CAR/PDMS SPME萃取头, 美国Supelco公司; CR-400色彩色差计, 柯尼卡美能达公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 微生物筛选、分离和培养

在无菌条件下将异味玉米果汁饮料分装在无菌干净的丝口瓶中, 无菌密封。将装有果汁的丝口瓶经过80 °C旋转水浴休克处理30 min, 快速冷却至45~65 °C。

分别配置不同的无菌培养基: NB培养基、LB培养基、MRS培养基、YPD培养基、APDA培养基、OSA培养基、AAM培养基、YSG培养基、BAT培养基。将1 mL样品接种在20 mL固体培养平板之上, 涂布均匀, 在55 °C培养48 h。

48 h后观察分离平板, 对样品中分离到的单菌落进行稀释涂布和复红染色, 光学显微镜下观察菌体形态, 确定形态是否一致。纯化后的菌液100 °C水浴30 min, 将菌液复红染色, 光学显微镜下观察芽孢形态。将分离纯化得到菌液与50%甘油1:1混合, -80 °C保存。

## 1.4.2 菌种特性鉴定

### 1.4.2.1 温度、pH对菌体的影响

将OD<sub>610nm</sub>为0.8的1 mL纯化菌液接种在250 mL等量BAT培养液中, 接种后的培养液放在不同温度和不同pH下培养, 具体培养方法参照文献<sup>[16]</sup>。

### 1.4.2.2 生长曲线绘制

将OD<sub>610nm</sub>为0.8的1 mL纯化菌液接种在1000 mL三瓶相同的BAT培养液中。在45 °C下, 以200 r/min水浴培养, 每2 h记录一次OD<sub>610nm</sub>, 绘制生长曲线。

### 1.4.2.3 16S rDNA菌种鉴定

引物选用来源于*E.coli* 16S rRNA基因序列保守区域的两段引物P1和P6, 由阳达科技公司合成。P1和P6的序列如下: 正向引物P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3'; 反向引物P6: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3'。反应混合物的配制, PCR反应程序, 基因测序等依据他人实验方法完成<sup>[17]</sup>, 测序结果使用NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLASTN 2.2.29在GenBank中同源性搜索, 进行菌种鉴定。

### 1.4.2.4 序列分析及系统发育树的构建

获得的序列与GenBank数据库中已有的细菌16S rDNA序列进行BLAST分析, 获取相似性较高的菌株信息。选取这些相关菌株的16S rDNA序列, 采用CLUSTAL W软件去除缺少和不确定的位点, 用邻接法(Neighbor-joining method)获得分支系统树<sup>[18]</sup>, 并通过自举分析(bootstrap)进行拓扑结构置信度的检测, 自举数据集为1000次, 通过Mega 6软件进行多序列比对分析和系统发育树的构建。

## 1.4.3 玉米果汁风味分析

### 1.4.3.1 正常样品及接种样品制备

正常样品: 新工艺小试生产, 115 °C灭菌30 min; 接种样品: 将鉴定菌株以100 CFU/mL接种于正常样品, 45 °C无氧培养30 d。

### 1.4.3.2 取样萃取方法

分别准确量取5 mL正常样品和接种样品加入10 mL钳口样品瓶中, 加入2.60 g NaCl, 20 μL内标物环己酮(0.946 mg/mL), 使用聚四氟乙烯隔垫密封, 在磁力搅拌器上60 °C加热平衡10 min后, 采用50/30 μm DVB/CAR/PDMS萃取头在60 °C旋转顶空吸附40 min, 插入GC进样口解析5 min进行GC-MS分析。

### 1.4.3.3 色谱条件

采用Agilent 7890型气相色谱仪, 毛细管柱: DB-WAX (30 m×320 μm×0.25 μm)。升温程序: 40 °C保持3 min, 以3 °C/min升至160 °C, 保持2 min, 再以

8 °C/min升至220 °C, 保持3 min, 进样口温度250 °C。质谱条件: 离子源温度230 °C, 四极杆温度150 °C, 离子化方式EI, 电子能量70 eV, 质量扫描范围为30~550 AMU/sec。

定性分析: 应用气相色谱-质谱联用仪进行分析鉴定, 并利用C6-C20正构烷烃的保留时间计算各个色谱峰的保留指数。分析结果运用计算机谱库(NIST05a)进行初步检索及资料分析, 再结合文献的保留指数进行比对并进行人工谱图解析, 确认挥发性物质的各个化学组成。定量分析: 采用内标法进行定量, 内标物为环己酮。

计算公式为:

各挥发性成分的含量(μg/mL)=各组分的峰面积×内标物质量(μg)/[内标物峰面积×样品量(mL)]。

## 1.4.4 色差分析

随机抽取正常样品和接种样品各5瓶, 采用CR-400型色彩色差计进行测定。*Alicyclobacillus*能使澄清果汁形成白色沉淀, 色彩色差计可以用光电测定的方法, 迅速、准确、方便地测出各种试样被测位置的颜色, 并且通过计算机直接换算成L、a、b值<sup>[19]</sup>, 对颜色进行数值化表示, 并可以通过计算得到两点间颜色的差别, 以ΔE表示<sup>[20]</sup>。

$$\text{色差}\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

在果汁中, 使用色彩色差计测定其a、b、L。

## 1.5 数据统计与方法

试验结果以均值±标准误差(Mean±SE)表示, 所有试验均进行3次重复。应用SPSS 11.5统计软件对数据进行方差分析, Origin 8.0软件画图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离纯化及其嗜酸耐热性的检验

选用10种培养基从具有类似“消毒水”、“草药”等不愉快气味的玉米果汁饮料中分离筛选微生物, 其结果见表1。4种培养基上无菌落出现, 6种针对嗜热、嗜酸微生物分离用培养基有一定数量的菌落形成, 其中BAT培养基上菌落数目最多。图1为分离菌株在BAT固体平板上的菌落形态及其显微镜形态照片, 各菌落形态一致, 呈乳酪色, 直径2.0~5.0 mm, 圆形, 表面光滑, 有光泽, 潮湿, 无凸起, 不透明, 易挑取(图1a)。革兰氏染色为阳性, 细胞呈杆状, 长2.1~5.1 μm, 宽0.3~0.8 μm(图1b)。培养24 h后有芽孢形成,



芽孢呈卵圆形，长 1~3 μm，宽 0.5~1 μm (图 1c)。

表 1 异味样品中微生物筛选结果

Table 1 Screening result of thermoacidophilic bacterium from tainted samples

培养基	筛选结果 <sup>a</sup>
NB 培养基	-
LB 培养基	-
MRS 培养基	-
YPD 培养基	-
APDA 培养基	+
KA 培养基	+
OSA 培养基	+
AAM 培养基	++
YSG 培养基	++
BAT 培养基	+++

注：a：每种培养基进行 3 次重复，“+”有菌落生成；“-”无任何菌落。

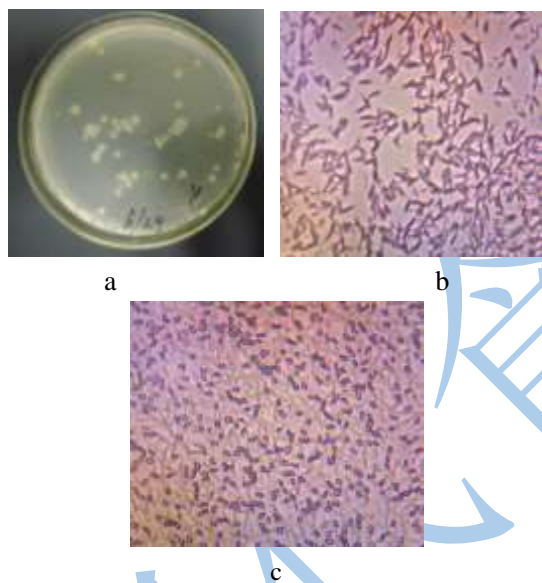


图 1 分离菌株的菌落及其显微镜形态 (10×100)

Fig.1 Colony morphology and microscopic morphology (10×100) of isolated strain

## 2.2 分离菌株的生长温度范围、pH 值范围及其生长曲线

分离菌株 XC-6 经过 80 °C 水浴热休克 30 min，冷却后涂布 BAT 固体培养基，45 °C 下培养 48 h 仍有大量菌落出现，表明该菌具有耐热性。分离菌株在 BAT、APDA、AKA、OSA、AAM、YSG 等酸性培养基平板 (pH 3.7) 上可以生长，在 MRS 平板 (pH 6.2)，PDA 平板 (pH 7.0)，YPD 平板 (pH 7.0) 和 NB (pH 7.2) 等上均不能生长，表明其具有嗜酸性。分离菌株

在 BAT 液体培养基中可生长的温度范围为 30~70 °C，最适为 45~50 °C，生长的 pH 范围为 2.0~5.5，最适为 3.5~4.0 (图 2)。

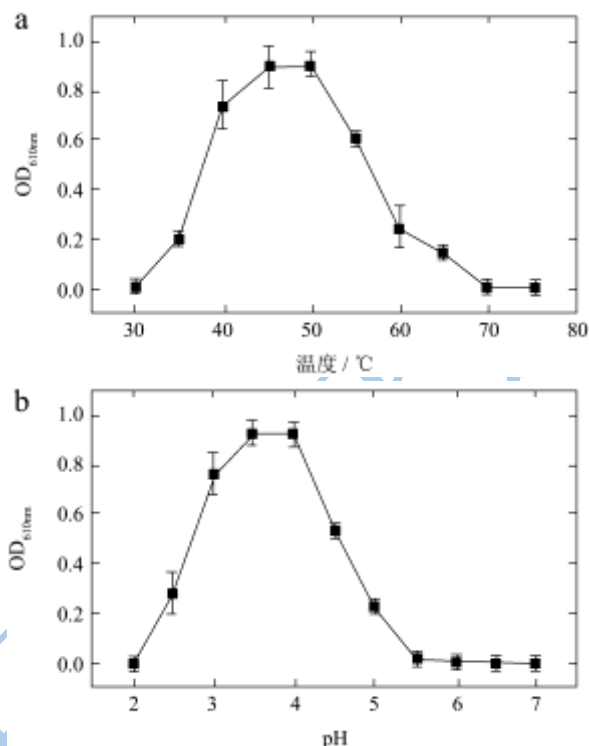


图 2 温度 (a) 及 pH (b) 对分离菌株生长的影响

Fig.2 Effect of temperature (a) and pH (b) on the growth of isolated strain

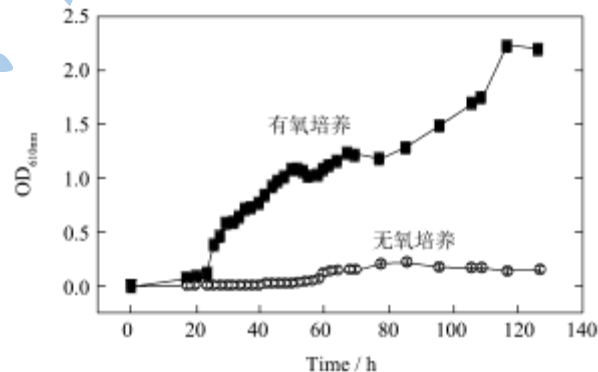


图 3 有氧和无氧培养对分离菌株生长的影响

Fig.3 Effect of oxygen on the growth of isolated strain

无氧条件下，分离菌株在 BAT 液体培养基中生长迟缓，迟滞期达 60 h。有氧条件下，分离菌株生长速率快，在 22 h 以后进入对数生长期，50 h 后趋于稳定，但由于分离菌株代谢产物的积累，使得培养基透光率变小，80 h 后吸光度值继续增加 (图 3)。

## 2.3 分离菌株的 16S rDNA 鉴定及系统发育树构建

提取分离菌株 XC-6 的基因组 DNA，将其 16S

rDNA PCR 扩增产物胶回收、克隆测序, PCR 产物测序大小为 1419 bp。将测序结果在 NCBI 数据库中应用 BLASTN 进行在线比对, 检索结果号为 DH66D99A01R, 发现与该菌株序列通用性最高的绝大多数为酸土脂环芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*), 其中与标准菌株 *Alicyclobacillus acidoterrestris* ATCC 49025 (NCBI 登陆号 NR\_040844.1) 的相似性达 99%。同时将分离菌株 XC-6 16S rDNA 序列提交到 NCBI 数据库中, 登陆号为 KJ158157。依据分离菌株的 BLAST 分析结果, 选择 GenBank 中各相关标准菌株序列构建系统发育树 (图 4), XC-6 与 *Alicyclobacillus acidoterrestris* 距离最近, 进一步证实分离菌株为酸土脂环芽孢杆菌。

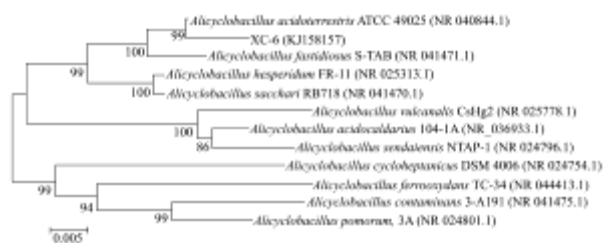


图4 基于脂环酸芽孢杆菌标准菌株16S rDNA序列构建系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA of *Alicyclobacillus* sp

### 2.4 玉米果汁饮料中挥发性成分分析

采用气相色谱-质谱联用技术比较正常样品和接种样品中挥发性成分的种类及含量, 分析污染菌在玉米果汁饮料中代谢生成的特征气味物质, 并为该菌的快速检测奠定基础。图 5、6 分别为正常样品和接种样品的 GC-MS 总离子图谱。正常样品共检测出 43 种挥发性气味物质, 其中醇类 10 种、酯类 10 种、醛类 7 种、酮类 3 种、酚类 3 种及其他类化合物 10 种, 接种样品中共检出 36 种挥发性气味物质, 其中醇类 10 种、酯类 7 种、醛类 6 种、酮类 2 种、酚类 3 种及其他类化合物 8 种 (表 2)。正常样品和接种样品挥发性成分的种类和类别数目差异不大, 但在关键性气味物质的含量上有明显差异。表 3 列出了接种样品中新生成的

及含量比正常样品显著增加的 14 种挥发性物质, 其中 10 种物质包括 2-甲基-3-庚酮、3-甲基-1-丁醇、丙酮醇、庚酸乙酯、己酸烯丙酯、2, 5-二甲基-3-己醇、3-甲硫基丙酸甲酯、松油醇、愈创木酚及苯乙醇为接种样品中新生成挥发性成分, 正常样品中未检出。4 种物质 2, 4-二甲基苯甲醛、邻乙氧基苯酚、己酸及月桂酸在两种样品中均有检出, 但接种样品的含量极显著高于正常样品。气味活度大于 1 的物质有 4 种, 由大到小分别为愈创木酚、邻乙氧基苯酚、月桂酸和庚酸乙酯。其中愈创木酚和邻乙氧基苯酚具有类似药味、烟熏味及消毒水味等异味<sup>[21]</sup>, 为脂环酸芽孢杆菌在玉米果汁饮料中生成的特征性气味物质。

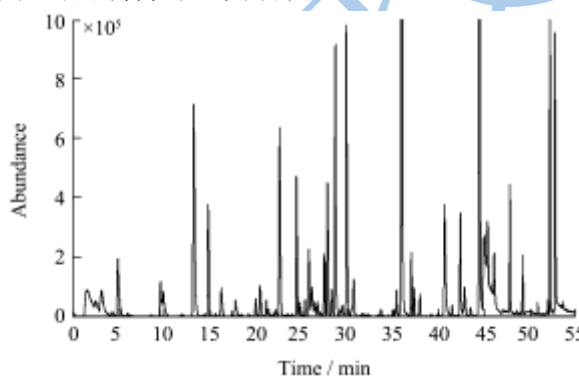


图5 正常玉米果汁挥发性成分总离子图

Fig.5 GC/MS total ion current of volatile compounds of uncontaminated maize juice

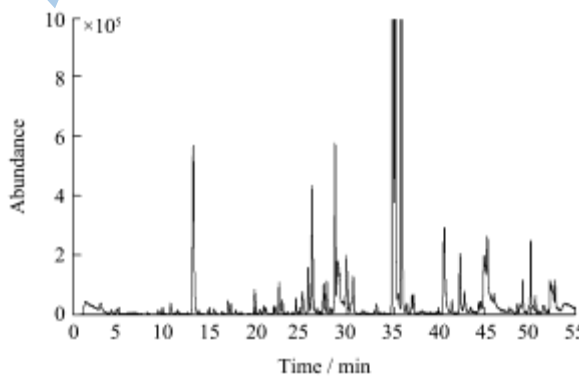


图6 接种玉米果汁挥发性成分总离子图

Fig.6 GC/MS total ion current of volatile compounds of inoculated maize juice

表 2 正常样品和接种样品中挥发性化合物组成

Table 2 Volatile compounds in uncontaminated and inoculated samples

编号	保留时间/min	物质名称	正常样品/( $\mu\text{g/L}$ )	接种样品/( $\mu\text{g/L}$ )
1	3.176	乙醇	1551.82 $\pm$ 25.66 <sup>a</sup>	626.05 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
2	4.944	丁酸乙酯	1210.78 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	120.21 $\pm$ 8.03 <sup>b</sup>
3	6.052	己醛	64.56 $\pm$ 6.32	trace
4	8.219	2-甲基-3-庚酮	trace	46.14 $\pm$ 2.78

转下页

接上页

5	9.444	D-柠檬烯	584.48±309.10 <sup>a</sup>	94.84±66.37 <sup>a</sup>
6	10.792	3-甲基-1-丁醇	trace	186.31±4.06
7	13.87	1-羟基-2-丙酮	trace	186.36±9.26
8	14.477	2,2,6-三甲基环己酮	45.40±2.24	trace
9	14.881	己酸丙酯	1788.34±66.05 <sup>a</sup>	59.80±6.80 <sup>b</sup>
10	15.517	庚酸乙酯	trace	56.30±7.09
11	16.255	2-异丙基-4-甲基噻唑	555.34±17.03	trace
12	17.083	己酸烯丙酯	trace	188.11±27.19
13	17.777	叶醇	182.08±10.88	trace
14	20.498	糠醛	525.45±9.40 <sup>a</sup>	125.06±25.01 <sup>b</sup>
15	20.947	2,5-二甲基-3-己醇	trace	111.24±11.49
16	22.621	苯甲醛	2348.15±9.40 <sup>a</sup>	506.24±13.40 <sup>b</sup>
17	22.978	3-甲硫基丙酸甲酯	trace	113.92±10.33
18	24.473	芳樟醇	880.48±25.67 <sup>a</sup>	92.60±12.35 <sup>b</sup>
19	24.79	5-甲基呋喃醛	194.72±5.01 <sup>a</sup>	31.72±2.31 <sup>b</sup>
20	25.819	2-乙酰基吡啶	675.50±49.32 <sup>a</sup>	549.93±8.68 <sup>a</sup>
21	26.158	1,2-丙二醇	1189.76±119.24 <sup>a</sup>	875.41±63.09 <sup>b</sup>
22	26.245	萜品醇	trace	1127.42±125.76
23	26.769	2-乙酰基吡嗪	157.89±0.02 <sup>a</sup>	61.19±2.74 <sup>b</sup>
24	27.503	2-乙酰基噻唑	528.80±9.44 <sup>a</sup>	317.74±15.05 <sup>b</sup>
25	27.852	薄荷醇	751.17±9.37 <sup>a</sup>	217.06±25.53 <sup>b</sup>
26	28.303	苯甲酸乙酯	434.56±30.92	trace
27	28.718	2-甲基-3-(甲硫基)吡嗪	2818.92±388.89 <sup>a</sup>	2393.37±169.68 <sup>a</sup>
28	29.906	松油醇	1822.51±95.72 <sup>a</sup>	186.23±19.90 <sup>b</sup>
29	30.736	2-甲基-6-(甲硫基)吡嗪	331.10±35.60 <sup>a</sup>	323.53±16.52 <sup>a</sup>
30	33.302	2,4-二甲基苯甲醛	29.81±18.41 <sup>a</sup>	50.59±8.76 <sup>a</sup>
31	35.05	邻乙氧基苯酚	88.02±14.06 <sup>b</sup>	51791.57±3261.02 <sup>a</sup>
32	35.31	愈创木酚	trace	35628.25±1279.46
33	35.62	己酸	120.89±49.79 <sup>b</sup>	597.68±60.51 <sup>a</sup>
34	35.991	苯甲醇	17294.26±703.16 <sup>a</sup>	13460.23±668.46 <sup>b</sup>
35	37.004	丙位辛内酯	1444.64±26.70 <sup>a</sup>	104.00±10.25 <sup>b</sup>
36	37.122	苯乙醇	trace	400.85±34.47
37	44.411	丙位癸内酯	11704.84±564.89 <sup>a</sup>	293.66±60.76 <sup>b</sup>
38	45.348	丁香油酚	542.68±11.49 <sup>a</sup>	536.71±47.98 <sup>a</sup>
39	47.802	丁位癸内酯	47.12±6.38	trace
40	47.805	丙位十一内酯	1861.01±240.52	trace
41	52.174	乙基香兰素	3430.09±266.27 <sup>a</sup>	367.11±20.94 <sup>b</sup>
42	52.331	月桂酸	312.65±30.19 <sup>b</sup>	551.82±47.15 <sup>a</sup>
43	52.734	香兰素	3192.69±246.73 <sup>a</sup>	281.48±12.54 <sup>b</sup>

## 2.5 玉米果汁饮料色差分析

采用色彩色差计对正常样品和接种样品进行色差分析,结果见表4。根据CIE(国际照明委员会)表色系统,L=0表示黑色,L=100表示白色;+a方向红度

增加,-a方向绿度增加;+b方向黄度增加,-b方向蓝度增加。由表4可知,接种样品L值显著高于正常样品,增加了5.46%,表明接种样品白度增加。若以正常样品为对照,接种样品的 $\Delta E$ 值为1.623,在人眼可感觉的范围内。

表3 接种样品中特征气味物质含量及其气味特征

Table 3 Concentration and sensory character of key volatile compounds in inoculated samples

编号	保留时间/min	化合物名称	气味特征	阈值/( $\mu\text{g/L}$ )	气味活度/OAV
1	8.219	2-甲基-3-庚酮	na	58	0.80
2	10.792	3-甲基-1-丁醇	杂醇油、苹果白兰地、辛辣味	250	0.75
3	13.87	丙酮醇	na	na	na
4	15.517	庚酸乙酯	果香、葡萄白兰地	2.2	25.59
5	17.083	己酸烯丙酯	菠萝果香	na	na
6	20.947	2,5-二甲基-3-己醇	na	na	na
7	22.978	3-甲硫基丙酸甲酯	甜味, 洋葱气味	180	0.63
8	26.245	松油醇	柑橘、紫丁香气味	280	4.03
9	33.302	2,4-二甲基苯甲醛	苦杏仁味	na	na
10	35.05	邻乙氧基苯酚	药味, 木桶味	130	398.40
11	35.31	愈创木酚	药味、烟熏味, 消毒水味	21	1696.58
12	35.62	己酸	酸味, 汗味, 腐臭味	3000	0.20
13	37.122	苯乙醇	玫瑰花香, 面包香味	1100	0.36
14	52.331	月桂酸	脂肪气味	1.5	355.74

注: 本研究所列气味特征及阈值查自 Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, Sixth Edition<sup>[22]</sup>; na 表示因无法查到该化合物的气味阈值而未作分析; Trace 表示未检出; 气味活度 (Odour activity value) 为异味样品中特征气味物质含量与阈值的比值。

表4 玉米果汁饮料色差分析

Table 4 Analysis of chromatic aberration of fruit juice

样品	L	a	b
正常	28.586 <sup>b</sup>	-3.011	10.646
接种	30.148 <sup>a</sup>	-3.117	10.218

高于正常样品, 表明酸土脂环酸芽孢杆菌污染玉米果汁饮料产生异味的同时伴随有白色沉淀产生, 导致污染产品白度增加。

参考文献

3 结论

3.1 本研究使用 4 种常规分离培养基和 6 种针对嗜热、嗜酸微生物分离用培养基, 从商业生产异味玉米果汁饮料中分离筛选出一株耐热、嗜酸的芽孢杆菌, 该菌在 4 种常规分离培养基上无菌落出现, 6 种针对性培养基上有一定数量的菌落形成, 其中 BAT 培养基上菌落数目最多。分离菌株在 BAT 液体培养基中最适生长温度为 45~50 °C, 最适 pH 范围为 3.5~4.0, 经 16S rDNA 分析及系统发育树构建鉴定为酸土脂环酸芽孢杆菌。

3.2 经过 GMMS 分析, 正常样品和酸土脂环酸芽孢杆菌接种样品挥发性成分的种类和类别数目差异不大, 但在关键性气味物质的含量上有明显差异。接种样品中 14 种挥发性物质含量显著高于正常样品, 其中愈创木酚、邻乙氧基苯酚、月桂酸和庚酸乙酯含量高于其气味阈值, 结合气味特征和气味活度 (OAV) 分析表明愈创木酚 (药味、烟熏味, 消毒水味) 和邻乙氧基苯酚 (药味, 木桶味) 是导致接种样品出现异味的特征性气味物质。色差分析表明接种样品 L 值显著

[1] 中国社会科学院农村发展研究所, 国家统计局农村社会经济调查司. 中国农村经济形势分析与预测(2012-2013)[M]. 中国, 社会科学文献出版社, 2013  
Rural development institute China Academy of Social Sciences, Department of Rural & Social Economic. Analysis and forecast on china's rural economy (2012-2013) [M]. China, Social Sciences Academic Press (China), 2013

[2] 张中东, 惠国强, 张红梅, 等. 玉米的营养及药用价值研究进展[J]. 玉米科学, 2006, 3: 173-176  
ZHANG Zhong-dong, HUI Guo-qiang, ZHANG Hong-mei, et al. Development of nutrition and value of medicine on maize [J]. Journal of Maize Sciences, 2006, 3: 173-176

[3] Dewanto V, Wu X Z, Liu R H. Processed sweet com has higher antioxidant activity [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(17): 4959-4964

[4] 吕维玲, 胡晋红, 李凤前. 玉米血管紧张素转化酶抑制肽及其降压作用的研究[J]. 药学服务与研究, 2009, 2: 126-129  
LV Wei-ling, HU Jin-hong, LI Feng-qian. Research on the antihypertensive effect of corn angiotensin converting enzyme inhibitory peptides [J]. Pharm Care & Res, 2009, 2:



- 126-129
- [5] 韩晓娜,黄国清,肖军霞.玉米汁加工工艺研究[J].粮油食品科技,2013,3:18-21,76  
HAN Xiao-na, HUANG Guo-qing, XIAO Jun-xia. Research on processing technology of com juice [J]. Science and Technology of Cereals, oils and Foods, 2013, 3: 18-21, 76
- [6] Witthuhn R C, Smit Y, Cameron M, et al. P. Guaiacol production by *Alicyclobacillus* and comparison of two guaiacol detection methods [J]. Food Control, 2013, 30(2): 700-704
- [7] Lima Tribst A A, Sant'Ana A d S, Massaguer P R. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives [J]. Crit Rev Microbiol, 2009, 35(4): 310-339
- [8] Steyn C E, Cameron M, Witthuhn R C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment-a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(1): 1-11
- [9] Spinelli A, Sant'Ana A S, Pacheco-Sanchez C P, Massaguer P R. Influence of the hot-fill water-spray-cooling process after continuous pasteurization on the number of decimal reductions and on *Alicyclobacillus addoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice stored at 35 degrees C [J]. Int. J. Food Microbiol., 2010, 137(2-3): 295-298
- [10] CHEN S Q, HU X S, SHI W N, et al. Isolation and identification *Alicyclobacillus* from concentrated apple juice processing [J]. Weishengwu Xuebao, 2004, 44(6): 816-819
- [11] Zierler B, Siegmund B, Pfannhauser W. Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anal. Chim. Acta., 2004, 520(1-2): 3-11
- [12] 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
- [13] Gocmen D, Ekston A, Williams T, et al. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS [J]. Lett. Appl. Microbiol., 2005, 40(3): 172-177
- [14] Gouws P A, Gie L, Pretorius A, et al. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate [J]. Int. J. Food Sci. Technol., 2005, 40(7): 789-792
- [15] Bevilacqua A, Corbo M R. Characterization of a wild strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*: heat resistance and implications for tomato juice [J]. J. Food Sci., 2011, 76(2): M130-M136
- [16] 袁亚宏,刘晓珂,岳田利,等.一株源于果园 *Alicyclobacillus* 的分离、鉴定及其生物学特性[J].食品科学,2012,17: 129-135  
YUAN Ya-hong, LIU Xiao-ke, YUE Tian-li, et al. Isolation, identification and biological characterization of a strain of *alicyclobacillus* from orchard soil in Shaanxi [J]. Food Science, 2012, 17: 129-135
- [17] Durak M Z, Churey J J, Danyluk M D, Worobo R W. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages [J]. Int. J. Food Microbiol., 2010, 142(3): 286-291
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol. Biol. Evol., 1987, 4(4): 406-425
- [19] 庄沛锐,杨园媛,孙为正,等.卡拉胶/刺槐豆胶对猪肉糜品质的影响研究[J].现代食品科技,2013,5:986-988  
ZHUANG Pei-rui, YANG Yuan-yuan, SUN Wei-zheng, et al. Effect of carrageenan/locust bean gum on the properties of comminuted pork [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 5: 986-988
- [20] 于静静,毕金峰,丁媛媛.不同干燥方式对红枣品质特性的影响[J].现代食品科技,2011,6:610-614,672  
YU Jing-jing, BI Jin-feng, DING Yuan-yuan. Effect of drying treatment methods on the quality properties of red jujube [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 6: 610-614, 672
- [21] Perez-Cacho P R, Danyluk M D, Rouseff R. GC-MS quantification and sensory thresholds of guaiacol in orange juice and its correlation with *Alicyclobacillus* spp. [J]. Food Chem., 2011, 129(1): 45-50
- [22] Burdock G A. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients [M]. six ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009