

山西老陈醋样品的污染微生物分析

李盈颖, 高 雯, 周帼萍*

(武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 为了解某批老陈醋产气变质的原因, 采用橙血清和乳酸菌培养基分离和计数污染菌, 显微形态观察结合 16S rRNA 序列分析鉴定其主要污染菌为葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.), 再采用葡萄球菌属特异性 *dnaJ* 引物进行扩增, 测序和序列分析将污染菌鉴定到头状葡萄球菌头状亚种 (*Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*); 当使用醋酸菌培养基对老陈醋中沉淀进行分离时又发现少量芽孢杆菌, 经芽孢杆菌属特异性 *rpoB* 引物鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。因此, 导致该批次老陈醋产气变质的细菌主要是头状葡萄球菌头状亚种, 少量解淀粉芽孢杆菌也存活于老陈醋中, 但基本处于休眠态。电子舌检测显示: 它们的存在和繁殖不仅导致产气, 而且使醋的各种滋味变得平淡。

关键词: 山西老陈醋; 头状葡萄球菌头状亚种; 产气; 解淀粉芽孢杆菌

Case Analysis of Contaminated Shanxi Aged Vinegar

LI Yingying, GAO Wen, ZHOU Guoping*

(School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: This study aimed to figure out why one batch of Shanxi aged vinegar was deteriorated with gas production. Firstly, we isolated and counted strains from the samples by culture on orange serum agar (OSA) and de man rogosa sharpe (MRS) agar. Secondly, *Staphylococcus* sp. was confirmed to be the main spoilage bacterium by 16S rRNA sequence analysis. Then, *dnaJ* sequence analysis was carried out to show that *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis* was responsible for the deterioration. On the other hand, a small number of bacillus cells were detected from the sediments by acetic bacterial medium and identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by *rpoB* sequence analysis. The main pollutant in this batch of aged vinegar was *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis* while some *B. amyloliquefaciens* were present but dormant in the sediments. The electronic tongue showed that those bacteria not only produced gas but also made the vinegar taste pale.

Key words: Shanxi aged vinegar; *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*; aerogenesis; *Bacillus amyloliquefaciens*

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612041

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 12-0226-06

引文格式:

李盈颖, 高雯, 周帼萍. 山西老陈醋样品的污染微生物分析[J]. 食品科学, 2016, 37(12): 226-231. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612041. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yingying, GAO Wen, ZHOU Guoping. Case analysis of contaminated Shanxi aged vinegar[J]. Food Science, 2016, 37(12): 226-231. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201612041. <http://www.spkx.net.cn>

中国古谚语就有: “开门七件事柴米油盐酱醋茶”, 说明醋是百姓日常生活中7样必需品之一, 而且据研究^[1-2]表明醋还具有抗菌杀菌、增强免疫力、预防骨质疏松等功效。食醋在我国的历史悠久, 深受百姓喜爱, 已成为我国具有历史传承和特色的发酵制品。由于以山西老陈醋为代表的发酵醋酸度高, 能显著抑制肠杆菌等常见食源性致病菌的生长繁殖, 不仅自身被认为安全性

高, 而且常常加入各类菜肴尤其是凉拌菜中起“天然防腐剂”的功效。2010年山西省制定了新的质量标准, “老陈醋”的总酸由原来的4.5 °T提高到了6 °T以上; 拒绝添加任何防腐剂; 取消了保质期; 增加了“总黄酮”和“川芎嗪”2个功能性指标; 控制盐分^[3]。所以目前市售山西老陈醋都未加任何防腐剂, 这对企业的卫生和安全提出了很高的要求。虽然历史经验说明老陈醋的

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 武汉轻工大学大学生科研项目 (xsky2015005)

作者简介: 李盈颖 (1993—), 女, 本科生, 研究方向为生物制药。E-mail: 756547103@qq.com

*通信作者: 周帼萍 (1971—), 女, 教授, 博士, 研究方向为微生物与食品安全。E-mail: wjczgp@163.com

安全性高,有久放不坏越陈越香的特点,但是必须注意传统的发酵制品受天时地利、人工操作的影响很大,仅依赖高酸度其安全性并非绝对能得到保障^[4]。

2015年6月某厂发现供应商提供的老陈醋产气现象明显,但依照国标方法菌落总数和霉菌酵母数均未发现异常,送检分析,试图了解能在如此高酸度的醋中生长产气的微生物,以及异常食醋样品污染的主要原因及污染来源^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

送检涨袋变质老陈醋样品和超市购买同一企业生产的保质期内正常醋样品。平板计数琼脂(plate count agar, PCA)、马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、虎红培养基和伊红美蓝(eosin-methylene blue, EMB)培养基、麦芽浸粉肉汤(malt extract broth, MEB)培养基 北京陆桥公司;乳酸细菌(de man rogosa sharpe, MRS)培养基、橙血清琼脂(orange serum agar, OSA)培养基 英国Oxoid公司;YSG培养基、LB培养基、碳酸钙琼脂培养基及醋酸菌基础发酵培养基均为自制;VITEK 2 COMPACT鉴定所需试剂和卡 法国梅里埃公司;Premix Taq、DL2000 DNA Marker、核酸染料Goldview 日本TaKaRa公司;琼脂糖西班牙Biowest公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物合成和产物测序均由苏州金唯智科技有限公司完成。

1.2 仪器与设备

VITEK 2 COMPACT全自动细菌鉴定和药敏分析仪 法国梅里埃公司;CMBR全自动生长曲线分析系统 芬兰Bioscreen公司;T100 Thermal Cycler PCR仪 美国Bio-Rad公司;DYY-6C型电泳仪 北京市六一仪器厂;凝胶成像系统 英国Syngene公司;YS100 80i正置荧光相差显微镜 日本Nikon公司;PHS-25酸度计 上海仪电科学仪器股份有限公司;SunRise酶标仪 澳大利亚Tecan公司;TS-5000Z电子舌、DBMS数据库管理系统、APACHE2网络服务器 日本Insent公司。

1.3 方法

1.3.1 样品中微生物的检测、计数、染色观察

醋样振荡均匀吸取部分做梯度稀释,分别在PCA/EMB/PDA/MRS/OSA/YSG/MEB 7种平板上分别进行涂布和涂布,前5种培养基于30℃培养3d;YSG培养基于45℃培养3~5d;MEB培养基于28℃培养5~7d。另外,醋样静置5d后,底部出现少许沉淀,用无菌吸管轻吸沉淀,直接单染色观察,并将沉淀移至醋酸菌基础发酵培养基中,120 r/min、30℃振荡富集培养2~3d后,

分别取0.2 mL和1 mL的发酵液于碳酸钙分离培养基中进行涂布和涂布,30℃培养4~5d后观察。对微生物及其菌落的计数参照GB 4789.2—2010《食品微生物学检验:菌落总数测定》和GB 4789.15—2010《食品微生物学检验:霉菌和酵母计数》的方法执行^[6-7]。对长出的菌落划线分离纯化,观察单菌落并单染色观察显微形态。

1.3.2 菌裂解液的制备

待测菌株在平板划线分离纯化,30℃ 24 h培养,挑单菌落,加入装有50 μL无菌去离子水的PCR管中,振荡混匀,94℃ 10 min裂解,12 000 r/min离心5 min,上清液转入微量离心管,制成菌裂解液,4℃保存。

1.3.3 分离株的16S rDNA、rpoB和dnaJ序列分析

表1 PCR所用引物
Table 1 Primers used for PCR

基因	引物	序列	产物长度/bp	参考文献
16S rDNA	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	830	[8]
	804R	5'-CTACC AGGGT ATCTA ATCC-3'		
rpoB	1206F	5'-ATCGAAACGCCTGAAGGTCAAACAT-3'	1 400	[9]
	3202R	5'-ACACCCTTGTACCGTGACGACC-3'		
dnaJ	SA- (F)	5'-GCCAAAAGAGACTATTATGA-3'	920	[10]
	SA- (R)	5'-ATTGYTTACCGTGTGTGACC-3'		

表2 PCR反应体系和条件
Table 2 PCR systems and conditions

基因	反应体系	PCR条件
16S rDNA		94℃ 10 min; (94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 90 s) × 35; 72℃ 7 min
rpoB	2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 引物各2 μL, DNA模板5 μL, 加水至50 μL	95℃ 3 min; (95℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 1.5 min) × 35; 72℃ 5 min
dnaJ		94℃ 3 min; (94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 60 s) × 5; (94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 60 s) × 30; 72℃ 3 min

PCR引物、体系和条件参见表1、2,产物用1%琼脂糖凝胶电泳分离,Goldview染色,凝胶成像分析仪观察PCR扩增结果,产物送苏州金唯智公司测序。序列比对:在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>进行BLASTN比对。

1.3.4 生化测试和鉴定

挑取OSA培养基上36℃培养24 h的少量菌苔,用VITEK 2 COMPACT全自动细菌鉴定和药敏分析仪进行生理生化测试。

1.3.5 产气和耐酸测定

主要污染菌的产气实验:将LB液体培养基调pH值至4.0用杜氏小管法进行主要污染菌的产气实验,实验组接种主要污染菌,对照组不接种,共同放置于30℃条件下恒温培养1~2 d,观察产气结果。菌Q1经过活化后接入LB液体培养基,pH值设置在3.0~4.2之间,以灭菌后实际测量其pH值为准,设置空白对照,体积分数10%种子液接种,采用CMBR全自动生长曲线分析系统从0~72 h监控不同pH值条件下菌体的生长曲线。

1.3.6 电子舌测试

产气的变质醋样和市售同一企业正常产品未做任何处理,直接倒入电子舌专用杯子后,静置3 min,常温检测,采用了酸味、鲜味、咸味、涩味和苦味5种传感器,每个样品重复测定3次。

2 结果与分析

2.1 老陈醋样品初步分析

2.1.1 现象观察与初步检测

企业提供出厂检测总酸度不小于6 °T,肉眼观察异常样品有明显的胀袋,检测pH值为3.5;企业根据国标做细菌总数和霉菌酵母数,结果均未检出。考虑到传统酿造醋的营养成分复杂,酸度高,可能的污染菌是耐酸微生物,而常规培养基PCA和PDA可能并不适合其生长,所以选用了pH值为弱酸性且营养丰富的MRS培养基和酸性果汁污染菌分离时常用的OSA培养基,嗜酸耐热菌分离的YSG (pH值调整到4.5~5.0)培养基,适合营养要求苛刻的酵母及部分霉菌分离的MEB培养基和肠杆菌EMB培养基,同时进行原液和 10^{-2} 梯度稀释液进行涂布和浇混。YSG/EMB/MEB培养基上没有菌落,MRS上 10^{-2} 梯度稀释不论浇混还是涂布都出现大量菌落,数量多不可计,但是原液不论浇混还是涂布都没有菌落出现。OSA培养基上却只有原液涂布时长出大量菌落。所有的菌落形态、大小、质地、色泽均一,应为同一种细菌。该细菌在OSA培养基上30 °C 2 d长出0.2~0.5 mm的细小菌落,白色不透明,周围圆而整齐;MRS培养基上的菌落直径较大,0.5 mm左右,其他特征与OSA培养基上菌落相同。挑取OSA和MRS培养基上单菌落进行革兰氏染色,结果为革兰氏阳性菌,初步判断为葡萄球菌,如图1所示。

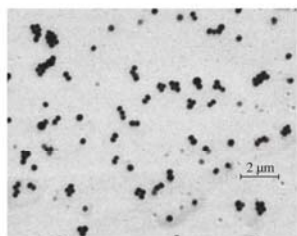


图1 分离株Q1的显微图片

Fig. 1 Photomicrograph of isolate Q1

如图2所示,污染菌使得醋液的酸度和咸度略有下降,苦味和鲜回味大幅降低,苦回味和涩回味减少,鲜味和涩味变化不大,总之污染菌使老陈醋的滋味变得平淡。

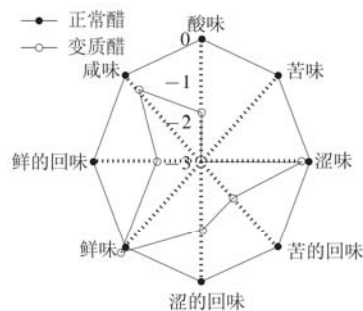
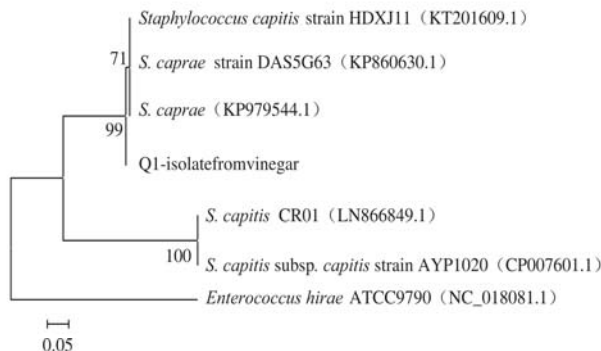


图2 正常醋和变质醋的味觉雷达图

Fig. 2 Radar chart of normal spoiled vinegar

2.1.2 初步测序

提取Q1的DNA做16S rDNA测序,序列比对结果为*Staphylococcus* sp.,最大相似度为100%,与*S. caprae*和*S. capitis*最为接近。因为16S rDNA序列的高度保守性,一般认为16S rDNA序列分析只能准确鉴定到属,不能准确鉴定到种。而一方面葡萄球菌在自然界中分布很广,健康禽类的皮肤、羽毛、眼睑、黏膜、肠道等都有葡萄球菌存在,另一方面金黄色葡萄球菌因为产耐热毒素是最常见的食源性致病菌之一,且葡萄球菌还是最常见的化脓性细菌,是医院交叉感染的重要来源^[11],因此为评估其安全性,需要对该菌准确鉴定到种。



显示分离株Q1属于葡萄球菌属;自展值为1 000,表示经过1 000次数值分析,图下标尺表示每20个碱基序列中有一个碱基替换,图4、7同。

图3 MEGA 6.06用邻近法基于16S rDNA基因序列构建的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree inferred by neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences

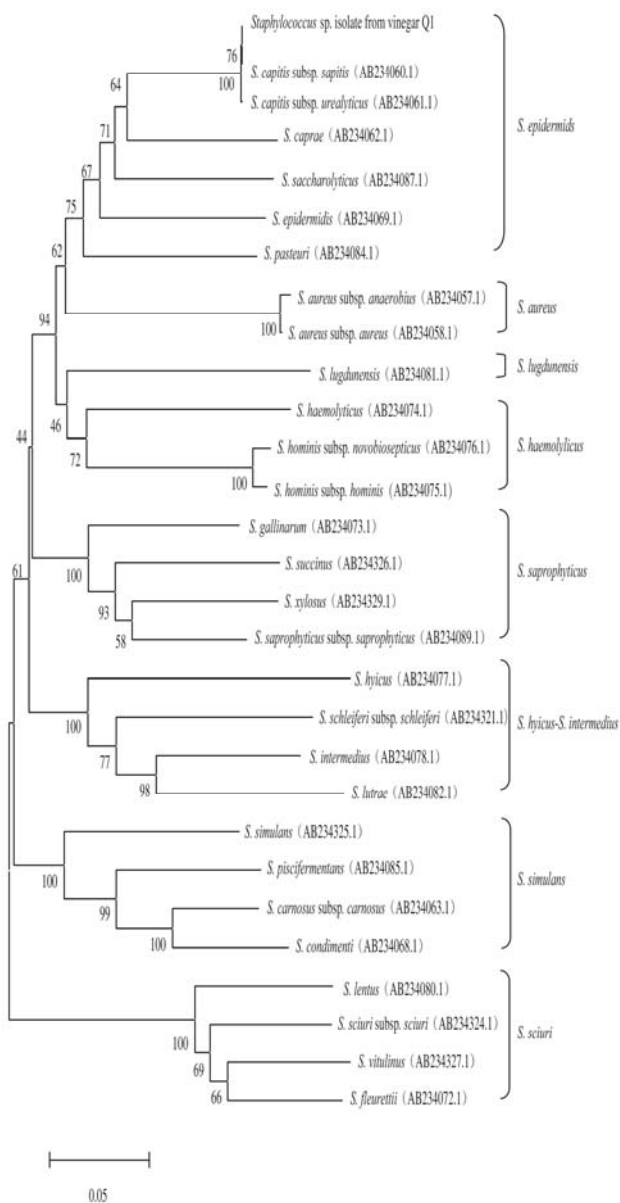
2.1.3 产气实验结果

将该葡萄球菌接种到LB液体培养基(pH 4.0)和超市中购回的同一企业同类产品,30 °C 3 d观察Q1在两者中生产和产气情况:LB液体培养基空白对照无混浊无产气现象,接种组中培养液混浊且杜氏小导管中可以收集到约占1/3体积的气体;但是在醋样中空白对照组中也产气,产气量略低于接种的醋样,因醋样颜色很深,看不出是否混浊。

2.2 对老陈醋样品污染菌的进一步分析

2.2.1 初步分离出的菌株(葡萄球菌)种的确定

葡萄球菌属目前共有40多个种,为准确分析鉴定,采用*dnaJ*序列分析的方法对分离出的葡萄球菌进行分析^[10],发现初步分离出的菌株与头状葡萄球菌头状亚种(*Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*)的最大相似度为100%,说明该菌所属的种为头状葡萄球菌头状亚种,属于葡萄球菌属中表皮葡萄球菌群,不同于食源性致病菌金黄色葡萄球菌群和有害的溶血性葡萄球菌群。基于*dnaJ*序列分析法构建的进化树如图4所示。



显示分离株Q1属于头状葡萄球菌头状亚种。

图4 MEGA 6.06用邻近法基于*dnaJ*基因序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred by neighbor-joining method based on *dnaJ* gene sequences

2.2.2 生化测试和鉴定结果

因为Q1从显微观察和16S rDNA序列分析可以判断为葡萄球菌,所以选用VITEK 2 COMPACT GP鉴定卡。生化测试结果为精氨酸双水解酶1+, 焦谷氨酸芳胺酶+, L-乳酸盐产碱+, 杆菌肽耐受+, 6.5% NaCl生长+, D-甘露醇+, O/129耐受+, 精氨酸双水解酶2+, 奥普托欣耐受+, 其余34项为阴性。鉴定结果96%可能性为头状葡萄球菌*Staphylococcus capitis*。鉴定结果和*dnaJ*序列分析结果一致。

2.2.3 主要污染菌Q1在pH 3.52~4.12的生长曲线

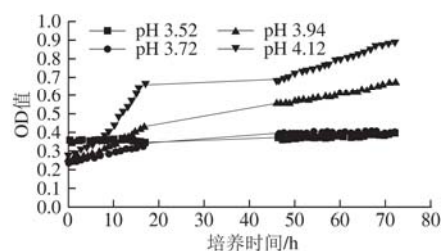


图5 Q1在不同pH 3.52~4.12之间的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of Q1 at pH 3.52~4.12

绘制分离株Q1从pH 2.97~4.12的生长曲线。由图5可知,通过CMBR全自动生长曲线分析系统72 h培养过程中每1 h的监测,空白对照OD值始终为零,显示系统内无杂菌污染,生长曲线数据很清楚地显示了Q1在pH 4.12和pH 3.94条件下有显著生长,在pH 3.72也有明显的增长,OD值从0.242(0 h)上升到最高值0.403(67 h)。pH 3.52时OD值也从0.36缓慢上升到了0.39, pH值继续降低则OD值变化不明显(pH 3.34、3.09、2.97时的生长曲线未显示在图5中)。这充分地说明了该菌株能够耐受pH 4.0甚至更低的酸性环境。

2.2.4 醋的沉淀中杆菌的分离和鉴定

考虑是否有其他微生物存在而因为培养基或条件不合适而未被分离出来的可能,将异常醋液样品静置数天后,用无菌移液管吸取底部沉淀,高速离心后,用无菌水清洗1~2次结晶紫单染色显微镜下观察底部沉淀微生物发现既有球菌也有杆菌,球菌较为分散一般呈双球菌形态,符合葡萄球菌在液体培养基中往往分散成双球或短链状的特性,而不是像在固体培养时聚集成串状。此外有不少杆菌,包括一些芽孢杆菌,如图6所示。

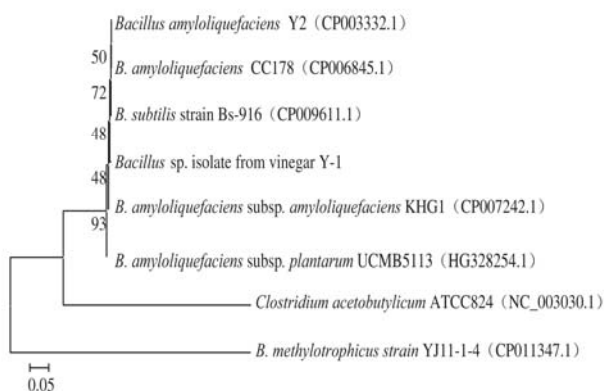


图6 醋沉淀物中菌体形态的显微图

Fig. 6 Photomicrograph of bacterial cells from sediments in vinegar

对沉淀中的杆菌进行分离实验,取异常样品8 mL进行离心后取全部沉淀物至100 mL的基础发酵培养基内,120 r/min、30 ℃恒温振荡培养2~3 d后,分别取0.2 mL和1 mL的发酵液于碳酸钙分离培养基中进行涂布和浇混,30 ℃恒温培养4~5 d后观察,并对长成的细菌进行单染色、显微镜下观察细菌形态是典型的芽孢杆菌。芽孢位于细胞中部,芽孢囊不膨大,可初步判断为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

利用芽孢杆菌类专用的*rpoB*引物扩增后,序列分析发现与解淀粉芽孢杆菌解淀粉亚种(*B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* strain)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)和解淀粉芽孢杆菌植生亚种(*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*)的最大相似度为99%,其中和解淀粉芽孢杆菌植生亚种最为接近,如图7所示。



显示分离株Y-1属于解淀粉芽孢杆菌。

图7 MEGA 6.06用邻近法基于*rpoB*基因序列构建的系统进化树。

Fig. 7 Phylogenetic tree inferred by neighbor-joining method based on *rpoB* gene sequences

3 讨论

葡萄球菌属和芽孢杆菌属都是很复杂的属,以葡萄球菌属为例,其下至少有40个种,16S rDNA序列由于非常保守(在葡萄球菌属内平均相似度97.4%)所以一般认为仅适合定属,但是某些种的葡萄球菌在医学上是非常重要的病原菌之一需要准确鉴定到种甚至是亚种,所以发展出*dnaJ*(平均相似度77.6%)、*rpoB*(平均相似度86%)、*hsp60*(平均相似度82%)、*sodA*(平均相似度81.5%)序列分析来鉴定其下各个种^[10]。本实验采用*dnaJ*序列比对鉴定葡萄球菌,用*rpoB*序列比对鉴定芽孢杆菌,从结果来看*dnaJ*的辨析度非常高,可以准确到亚种,而*rpoB*的辨析度在芽孢杆菌属内各种之间还略显不足。*dnaJ*序列分析的鉴定结果和VITEK 2 COMPACT生化鉴定结果基本一致。

在产气变质的山西老陈醋中发现了2种污染菌:头状葡萄球菌和解淀粉芽孢杆菌,但是头状葡萄球菌是在醋液中分离的,其含菌量达到 10^5 CFU/mL;而解淀粉芽孢杆菌在醋液中未检出,仅在醋底部沉淀中分离到的,在醋中含菌量不大于1 CFU/mL。所以头状葡萄球菌才是本次老陈醋产期变质的主要污染菌。有研究^[12-14]分析了醋底沉淀中细菌多数是芽孢杆菌和未自溶的死菌菌体,这和本实验的结果一致。

葡萄球菌在多种食品中都有检出,在某些发酵食品中(发酵香肠/奶酪)起到有益的作用,甚至可作为发酵剂,例如:木糖葡萄球菌(*S. xylosus*)和*S. carnosus*。在山西恒顺老陈醋发酵醋醅的研究^[15-17]中解淀粉芽孢杆菌在发酵前期一直是优势菌,而表皮葡萄球菌也一直有检出,两者都被认为是产酸菌之一;对山西老陈醋的另一个研究^[18-19]也发现大曲中就有葡萄球菌和芽孢杆菌,而且在酒精发酵过程中占优势地位;而镇江香醋醋醅中也发现葡萄球菌是产酸菌之一^[20-21]。但是另一方面,以金黄色葡萄球菌为代表的产肠毒素的葡萄球菌引起的葡萄球菌食物中毒是最常见的食物中毒类型之一。葡萄球菌对环境适应能力强,能在7~48 ℃、pH 4~10范围生长,尤其耐盐(10%~15%),具有多种复杂抗性,产生生物膜,其耐热力也是相当强。本实验发现的葡萄球菌Q1能在pH 4.0的酸性LB培养液中快速生长,而且推测还能在pH 3.5(酸度 ≥ 6.0 °T)的山西老陈醋中缓慢生长产气。由于老陈醋的特殊环境(高酸、高盐)该菌也发生了特化,在一般的常规培养基上不生长,只能在MRS和OSA上生长,而且受到稀释度和涂布、浇混方式的影响。

老陈醋中分离株Q1和Y1似乎都有在陈醋中长期生长发生适应性特化的特点,比如:对醋液检测时它们在常规的PCA/LB/MEA培养基上一直没有被分离出来,却在乳酸菌常用培养基MRS/OSA/醋酸菌培养基这些特殊培养基中大量生长,这不同于典型的葡萄球菌和芽孢杆菌生长特性,但是Q1和Y1经过2~3次转接传代后就能在PCA/LB上正常生长。葡萄球菌Q1能在pH 4.0的酸性LB培养液中快速生长产气,生长曲线测试也说明了该菌确实能够在pH 3.5~4.0增殖,据此证实该菌能在pH 3.5(酸度 ≥ 6.0)的山西老陈醋中生长产气。

我国传统酱油、醋、白酒、酱等产品的发酵工艺的传承历史永久,风味独特,深受百姓喜爱。其发酵过程是开放式的,天然接种发酵,整个过程中有多种微生物参与,受时间、地点和人为操作影响大,非常复杂^[22-23],至今都没有完全研究清楚。比如前述镇江香醋和恒顺山西陈醋发酵醋醅中都发现有葡萄球菌,但是天津独流老醋醋醅的主要微生物中却没有葡萄球菌^[24]。又如本实验中的葡萄球菌就很难判断是不是醋醅中的发酵菌,是否为后来污染菌,来源及源头防治均不清楚。文

献[10]可以看出:头状葡萄球菌是触媒阴性(catalase-test negative strain, CNS)的葡萄球菌,一般认为触媒阳性的葡萄球菌具有毒力,而CNS一般无病原性,不会导致食物中毒。头状葡萄球菌是人类体表正常菌群的一个组成部分,头皮、面部、颈部和耳部常检出。其污染途径是否是人工翻醅等工序导致的污染有关还有待证实。

醋的高酸度可以抑制绝大多数细菌的生长,加上作为有着上千年安全食用的历史,使很多人相信致病菌在醋中不能生长,其安全性很高^[25],而老陈醋甚至不会变质。有很多用醋抑制金黄色葡萄球菌的实验效果好,但是也有研究表明金黄色葡萄球菌能够快速产生/启动耐酸保护机制^[26],必须认识到微生物的复杂性,其种类繁多,而且即使是同一类细菌的不同菌株之间差异很大,加上突变速度快,对环境适应力强^[27]。另一方面,近10多年来我国酿醋工业发生很大变化,工艺技术和设备不断更新,发酵周期缩短,产量大幅增加,与传统工艺有所背离。在食品中依赖单一的抑菌因子来防腐,其风险较高,比如:虽然绝大多数细菌偏爱中性微碱环境,但依然有嗜酸耐热菌(脂环酸芽孢杆菌)能在pH 3.8的果汁中生长,甚至能耐受pH 2.0的强酸环境。本实验中酸度大于6.0 °T,符合山西老陈醋标准的产品受到特殊耐酸葡萄球菌污染,发生产气变质现象值得关注。

参考文献:

- [1] 徐根娣,冷云伟.食醋的功能性[J].江苏调味副食品,2008,26(1): 27-29. DOI:10.3969/j.issn.1006-8481.2009.01.008.
- [2] 刘珂.浅谈我国食醋的功能及发展趋势[J].中国调味品,2010,35(6): 32-34; 39. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2010.06.004.
- [3] 吉翔.山西发布“老陈醋”质量标准方案 拒绝任何防腐剂[EB/OL]. (2010-12-27) [2015-10-05]. http://www.guancha.cn/life/2014_09_30_272465.shtml.
- [4] 颜景宗,颜丹.传统山西老陈醋的酿造工艺[J].江苏调味副食品,2003,20(6): 13-16. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2004.07.003.
- [5] 马净丽,钱锋.解决食醋胀桶问题的探讨[J].中国酿造,2010,29(9): 123-127. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2010.09.038.
- [6] 卫生部. GB 4789.2—2010 食品微生物学检验:菌落总数测定[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [7] 卫生部. GB 4789.15—2010 食品卫生微生物学检验:食品微生物学检验霉菌和酵母计数[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [8] ALM E W, OERTHER D B, LARSEN N, et al. The oligonucleotide probe database[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(10): 3557-3559.
- [9] KI J, ZHANG W, QIAN P. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification[J]. Journal Microbiol Methods, 2009, 77(1): 48-57. DOI:10.1016/j.mimet.2009.01.003.
- [10] SHAH M M, IIHARA H, NODA M, et al. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(1): 25-30. DOI:10.1099/ijs.0.64205-0.
- [11] MONTANARI C, SERRAZANETTI D I, FELIS G, et al. New insights in thermal resistance of staphylococcal strains belonging to the species *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2015, 50: 605-612. DOI:10.1016/j.foodcont.2014.09.039.
- [12] 高璟,刘有智,焦纬洲,等.食醋生物性浑浊与非生物性浑浊的研究[J].中国调味品,2009,34(4): 25-26. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2009.04.002.
- [13] 崔云.食醋返浑机理的研究[D].贵阳:贵州大学,2009.
- [14] 贾莉,郝林.老陈醋浑浊沉淀问题的研究[J].中国调味品,2003,28(6): 19-21. DOI:10.3969/j.issn.1000-9973.2003.06.006.
- [15] 弓晓艳,吕利华,武振宇,等.山西老陈醋产酸功能菌研究[J].食品工业科技,2010,31(2): 170-173. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2010.02.055.
- [16] 吕艳歌,马海乐,李云亮,等.山西老陈醋产酸的分离鉴定及系统学分析[J].中国食品学报,2013,13(12): 163-171.
- [17] 弓晓艳.老陈醋酿造过程中微生物群落结构与功能研究[D].太原:山西大学,2010.
- [18] 武晋海,郝林,白瑞华.山西老陈醋大曲微生物生态分布[J].山西农业大学学报(自然科学版),2004,24(3): 279-282. DOI:10.3969/j.issn.1671-8151.2004.03.025.
- [19] NIE Zhiqiang, ZHENG Yu, DU Hongfu, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar[J]. Food Microbiology, 2015, 47: 62-68. DOI:10.1016/j.fm.2014.11.006.
- [20] 朱其瀚.镇江香醋发酵过程中微生物分离及其产酸特性[D].无锡:江南大学,2008. DOI:10.7666/d.y1398627.
- [21] XU W, HUANG Z Y, ZHANG X J, et al. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar[J]. Food Microbiology, 2011, 28: 1175-1181. DOI:10.1016/j.fm.2011.03.011.
- [22] 严蕊,王晓云.山西老陈醋传统酿造工艺写实记录[J].食品工程,2015(2): 55-59. DOI:10.3969/j.issn.1673-6044.2015.02.017.
- [23] 郑淑芳,曹文杰,刘晓刚,等. GB/T 19777—2013 地理标志产品:山西老陈醋[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [24] NIE Zhiqiang, ZHENG Yu, WANG Min, et al. Exploring microbial succession and diversity during solid-state fermentation of Tianjin duliu mature vinegar[J]. Bioresource Technology, 2013, 148(8): 325-333. DOI:10.1016/j.biortech.2013.08.152.
- [25] 方钧权.关于食醋中致病菌检验的商榷[J].中国调味品,1992,17(2): 21-22.
- [26] KUDA T, YAZAKI T, TAKAHASHI H, et al. Effect of dried and vinegar flavored squid products on acid resistance of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2013, 30(2): 569-574. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.09.011.
- [27] 王韵阳,张超英,闫志勇,等.大蒜食醋复方溶液对金黄色葡萄球菌杀灭效果的研究[J].中国消毒学志,2011,28(3): 289-290; 294. DOI:1001-7658(2011)03-0289-03.