

## 实验技术与方法

## 一种快速检测食醋产气变质菌培养方法的研究及应用

周力,刘芳,赵奎,王兴洁,袁英豪,李建龙,胡凯弟,李琴,刘书亮  
(四川农业大学食品学院,四川雅安 625014)

**摘要:**目的 建立一种快速检测食醋产气变质菌的培养方法。方法 在6种培养基筛选的基础上,选择适宜的培养基进行改良,对改良培养基的特异性、准确性和灵敏度进行考察后确定检测方法,应用本方法筛选针对食醋产气变质菌的热灭菌条件和常用防腐剂的抑菌浓度,并验证食醋产品的检测效果。结果 采用改良MRS培养基(食醋产气变质菌检测培养基)仅能检出由产气变质菌引起的变质食醋样品,对12株食醋其他种类污染菌和致病菌的检测结果均为阴性;以塑料软瓶恒温培养法为对照,采用本法对未知产气变质情况的75个食醋样品进行检测,两种方法检测结果一致,而本法的检测速率是对照的3~5倍;检出限为 $1\text{ CFU} \leq \text{初始菌量(接种量)} < 10\text{ CFU}$ ;样品菌量越大,检测时间越短,检测高污染菌量食醋样品只要1~2 d。方法应用结果表明,75~85 °C维持5~15 min能有效杀灭食醋产气变质菌,常用防腐剂在最大使用限量内不能有效抑制食醋产气变质菌生长,验证食醋产品的检测效果与真实情况一致。结论 食醋产气变质菌检测方法具有快速、特异、准确、灵敏的特点,为生产企业的食醋产气变质菌检测及综合防控提供了依据。

**关键词:**食醋;产气变质菌;快速检测方法;应用

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)06-0680-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.06.007

### A culture-dependent rapid detection method for gas-producing spoilage bacteria in vinegar and its application

ZHOU Li, LIU Fang, ZHAO Kui, WANG Xingjie, YUAN Yinghao, LI Jianlong,  
HU Kaidi, LI Qin, LIU Shuliang

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Sichuan Ya'an 625014, China)

**Abstract: Objective** To establish a culture-dependent rapid detection method for gas-producing spoilage bacteria in vinegar. **Methods** One kind of medium was screened out from six candidate media and modified. Then its specificity, accuracy, and sensitivity were determined, on which a detection method was proposed. This method was subsequently applied to assess heat sterilization conditions and preservative concentrations for vinegar products and to verify the detection effectiveness of vinegar products. **Results** A modified MRS medium that could specifically detect gas-producing spoilage bacteria in vinegar samples was proposed, with which negative results were obtained targeting at other 12 spoilage bacteria isolated from vinegar. The established method was adopted to examine 75 unknown vinegar samples and plastic bottle incubation method was used as control. Consistent results were obtained using both methods, however the detection rate of established method was 3-5 times faster than control, with a detection limit (initial bacterial count) ranging from 1 CFU to 10 CFU. The larger bacterial load is, the shorter detection time would be. And it will take only 1-2 d for high-contamination vinegar samples. Results also showed that sterilization at 75-85 °C for 5-15 min could effectively kill the gas-producing spoilage bacteria that is recalcitrant to common preservatives within their maximum allowable concentrations. The verification was in agreement with the actual situation. **Conclusion** The constructed method features fast, specific, accurate, and sensitive. This study sheds light on detection and comprehensive control of gas-producing spoilage bacteria for vinegar enterprises.

**Key words:** Vinegar; gas producing and metamorphic bacteria; rapid detection methods; application

收稿日期:2023-07-11

基金项目:四川省科技厅项目(2023ZHCG0081)

作者简介:周力 男 硕士研究生 研究方向为食品微生物与发酵 E-mail:zhouli19981122@163.com

通信作者:刘书亮 男 教授 研究方向为食品微生物与发酵、食品质量安全检测控制 E-mail:lsliang999@163.com

食醋是一种全球性食用的酸性调味品,具有抗菌、调节血糖、减肥<sup>[1-2]</sup>、抗疲劳<sup>[3]</sup>等功能特性。食醋主要有粮谷醋和果醋,大部分中国食醋为粮谷醋,且大多数采用固态发酵法酿造<sup>[4]</sup>。食醋固态发酵的工艺复杂且处于开放式的发酵环境,“多菌共酵”使食醋具有特定的风味和营养<sup>[5-6]</sup>。因其发酵环境为开放式,如果食醋在发酵、后工序中卫生状况不好,管理力度不够,容易造成微生物污染<sup>[7-8]</sup>。虽然食醋有“久存不腐”的说法,但是近年来食醋产品也常有变质现象发生<sup>[9]</sup>,在食醋后续工序中尤其是包装环节污染耐酸性微生物也可能引起食醋变质。其中产气是预包装食醋变质的主要现象之一<sup>[10]</sup>,常发生于包装出厂后1~3个月内的食醋产品,该类型变质食醋表现为瓶装或壶装食醋产气、拉丝发黏、醋香弱等特点,严重影响了食醋的体态、口感和营养价值,造成了一定的经济损失。栾春光等<sup>[11]</sup>采用高通量测序技术研究表明引起陈醋涨壶的微生物主要是乳酸杆菌属和芽孢杆菌属,可能还有酵母菌;张怀敏等<sup>[12]</sup>采用多种选择性培养基分离结果显示引起老陈醋产气的细菌主要是芽孢杆菌;李盈颖等<sup>[13]</sup>采用平板分离法表明葡萄球菌属和芽孢杆菌为引起山西陈醋产气变质的菌株;郑宇等<sup>[14]</sup>采用平板分离法表明芽孢杆菌为山西陈醋的主要产气变质菌;曹晋宜等<sup>[15]</sup>采用平板分离法认为乳杆菌属是食醋发黏变质的细菌;牟娟等<sup>[16]</sup>采用16S rRNA高通量测序技术对产气变质食醋样品进行菌群分析,表明乳酸杆菌是主要的产气变质细菌;李敏等<sup>[17]</sup>通过宏基因组测序技术对产气变质食醋样品进行菌群分析,表明菌群中乳酸杆菌属高达45.77%。由于乳酸杆菌耐受高温的能力较弱,通常情况下不能耐受生醋熬制工序的温度<sup>[18]</sup>,所以推测食醋二次污染导致产气变质的可能性较大。本课题组前期针对上述涉及的食醋产气变质菌,采用了菌落总数、大肠菌群、酵母菌、乳酸菌和醋酸菌等常规计数法但不能检出,认为该类菌属于难培养或不可培养微生物,这与文献报道研究结果一致<sup>[13]</sup>。目前,对该类菌引起食醋产气变质的认知有限,一些醋厂模拟该类菌引起食醋产气变质的原理,将食醋装于塑料软瓶中进行恒温培养观察胀瓶现象来判定样品是否受到该类菌的污染,检测结果有效但耗时长。因此,建立针对食醋产气变质菌的快速检测方法显得非常迫切。基于此,本文拟通过培养基筛选和改良,建立一种食醋产气变质菌快速检测的培养方法并测试,旨在为食醋产品检测及其污染源筛查提供方法参考,为保障食醋安全以及提出针对性防控措施提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 实验材料

不同批次产气变质食醋、正常未变质食醋,采集于某食醋厂。具体如下:产气变质食醋编号B1-B5、产气变质食醋①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧、⑨、⑩、ZW3、ZW4、ZW6、ZW9、WQ3、WQ6、WQ25、WQ26、WQ27、WQ28;正常未变质食醋编号A1-A5;三个批次不清楚产气情况的食醋样品,包括ZW组16个、TX组31个、WQ组28个;连续生产2个月共52批次食醋产品样品。

#### 1.1.2 培养基

4°醋液:6°醋液(总酸含量6g/100mL)与蒸馏水按2:1比例混合,115℃灭菌20min,用于食醋污染菌产气验证实验。

食醋产气+产膜菌培养基<sup>[19]</sup>:土豆200.0g,葡萄糖25.0g,酵母膏5.0g,牛肉膏7.5g,硫酸铵1.5g,蒸馏水1000mL,115℃灭菌20min,用于食醋中污染菌检测。

醋酸菌液体培养基、MRS液体培养基、营养肉汤(NA)培养基、酸性肉汤培养基、PYG液体培养基,购于青岛海博生物技术有限公司,按要求进行灭菌。

食醋产气变质菌检测培养基<sup>[20]</sup>:蛋白胨10.0g,牛肉膏10.0g,酵母浸出粉5.0g,葡萄糖20.0g,磷酸氢二钾2.0g,乙酸钠5.0g,硫酸镁0.2g,硫酸锰0.05g,吐温-802.0g,柠檬酸二铵2.0g,复合氨基酸0.5~5g,复合维生素B0.3~3g,核苷酸0.2~1g,复配生长因子1~5g,麸皮浸出液1000mL,pH3.5~3.6,121℃灭菌20min,用于食醋中产气变质菌检测。

#### 1.1.3 实验菌株

本实验选取的12株不同的食醋污染菌和致病菌菌株名称和来源如表1所示。

#### 1.1.4 主要试剂

防腐剂:山梨酸钾、对羟基苯甲酸乙酯、乳酸链球菌素(均为食品级),购于河南尚品食品添加剂有限公司;无菌独立包装微孔滤膜(水系,直径47mm,孔径0.22μm),购于江苏绿盟科学仪器有限公司。

#### 1.1.5 仪器设备

HWS24电热恒温水浴锅,购于上海一恒科学仪器有限公司;LDZX-40AI型立式自动电热压力蒸汽灭菌锅,购于上海三申医疗器械有限公司;SW-CJ-1F超净工作台,购于苏州净化设备有限公司;抽滤设备,购于杭州齐威仪器有限公司。

表1 测试菌株名称与来源  
Table 1 Source and name of test strains

菌株名称	活化培养基, 培养温度, 时间	菌株来源
<i>Salmonella enteritidis</i> CICC21482	NA, 37 °C, 24 h	购于中国工业微生物菌种保藏管理中心
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	NA, 37 °C, 24 h	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	NA, 37 °C, 24 h	
<i>Bacillus subtilis</i> SC-5	NA, 37 °C, 24 h	
<i>Pediococcus acidilactici</i> D15	MRS, 37 °C, 24 h	
<i>Lactococcus lactis</i> 10-2	MRS, 37 °C, 24 h	四川农业大学食品微生物实验室分离保存
<i>Pediococcus pentosaceus</i> WT-1	MRS, 37 °C, 24 h	
<i>Leuconostoc</i> MC-1	MRS, 37 °C, 24 h	
<i>Lactobacillus plantarum</i> DL7X	MRS, 37 °C, 24 h	
<i>Lactobacillus</i> sp. LC-1(食醋污染菌)	MRS, 37 °C, 24 h	
<i>Lactobacillus</i> sp. XC-9(食醋污染菌)	MRS, 37 °C, 24 h	
<i>Acetobacter</i> sp. O15-1(食醋污染菌)	醋酸菌培养基, 37 °C, 24 h	

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 检测培养基筛选

选取营养肉汤培养基(1#)、醋酸菌液体培养基(2#)、MRS液体培养基(3#)、酸性肉汤培养基(4#)、PYG液体培养基(5#)、食醋产气+产膜菌培养基(6#)共6种培养基对产气、拉丝、醋香味弱等现象的产气变质食醋样品(编号B1~B5)、正常未变质醋样(编号A1~A5)进行检测,具体操作方法如下:

取50 mL醋液,在无菌操作台进行抽滤,抽滤后将滤膜分别接种于上述6种液体培养基试管中(内置倒立杜氏小管)。37 °C培养,每隔24 h观察实验现象并记录,45 d后结束实验。

根据实验结果选择适宜的培养基进一步改良,改良后的培养基即为食醋产气变质菌检测培养基。采用该培养基,试管装量5 mL,内置倒立杜氏小管,接种抽滤醋液后的滤膜,37 °C培养,每隔24 h观察实验现象并记录;再以4°醋液塑料软瓶恒温(37 °C)培养作为对照,考察改良的培养基的检测效果。

### 1.2.2 食醋产气变质菌检测培养基的特异性检测

选择12株不同的食醋污染菌和致病菌菌株用相应培养基活化后,接入食醋产气变质菌检测培养基中,置于37 °C培养箱中恒温培养,每天观察产气现象并记录,45 d后结束实验。以此来检测该培养基的特异性。选取的菌株详细信息如表1所示。

### 1.2.3 食醋产气变质菌检测培养基的准确性验证

选择某工厂生产的三批次共75个未知产气变质情况的食醋样品进行检测,以4°无菌醋液的塑料软瓶恒温培养结果作为对照,三批次样品编号分别为ZW1~ZW16、TX1~TX31、WQ1~WQ28,每个样品设2个平行,操作方法同1.2.1,以对照检测培养法结果为标准,本检测培养法结果与之符合率来确定食醋产气变质菌检测培养基的准确性。

### 1.2.4 食醋产气变质菌检测培养基的灵敏度确定

参考绝迹稀释法,将20个已知产气变质的食

醋样品用生理盐水进行10倍梯度稀释,稀释至 $10^{-9}$ ,分别取1 mL稀释液接种于5 mL食醋产气变质菌检测培养基(内置倒立杜氏小管)中,每个稀释度做3个平行,置于37 °C培养箱中恒温培养,每天观察产气现象并记录,45 d后结束实验,记录样品稀释度 $10^{-5}$ ~ $10^{-9}$ 的产气情况及产气时间。根据检测结果与稀释度进行推算,确定不同初始菌量样品的检测时间。

### 1.2.5 食醋产气变质菌检测方法的确定

根据实际检测中对食醋产气变质菌检测的特异性、灵敏性、准确性的需求,通过抽滤富集醋样菌体然后利用食醋产气变质菌检测培养基来确定食醋产气变质菌的检测方法。

### 1.2.6 应用于加热处理对食醋产气变质菌影响的检测

分别取4个已知产气变质的食醋样品2 mL于无菌空试管中,做3次平行实验,按照50 °C处理10、20、30 min,65 °C处理10、30 min,75 °C处理10、30 min,85 °C处理5、10、15、20 min,95 °C处理1、2、3、5、15 min进行不同条件的加热处理,加热后迅速冷却至室温,取1 mL热处理样品接种于5 mL食醋产气变质菌检测培养基试管中(内置倒立杜氏小管),37 °C恒温培养,每天观察产气现象并记录,30 d后结束实验。

### 1.2.7 应用于常用防腐剂对食醋产气变质菌影响的检测

选择山梨酸钾、对羟基苯甲酸乙酯及NISIN 3种可添加于食醋的防腐剂对食醋产气变质菌进行抑菌实验,确定有效防腐剂及其最小抑菌浓度。按照三种防腐剂各自的标准限量<sup>[21]</sup>的0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12倍配制不同浓度的防腐剂并添加到食醋产气变质菌检测培养基中,取4个已知产气变质的食醋样品分别接种1 mL于添加了防腐剂的检测培养基中,37 °C培养,30 d内观察产气现象。

### 1.2.8 应用于食醋产品的检测

某食醋厂发生食醋产品产气变质后,采取了综合防控措施。之后,对连续2个月生产的食醋产品,按每班次随机取样6瓶醋样,3瓶用于塑料软瓶恒温培养,3瓶用于1.2.5确定的方法进行检测。共计52个批次样品,观察产气情况,观察时间3个月。

## 2 结果

### 2.1 检测培养基筛选情况

本实验取富集了菌体沉淀的滤膜接入6种培养基中混匀,于37℃培养,检测结果见表2。由表2可知,6种培养基接种菌体沉淀后均能观察到微生物

生长的情况,除接种的产气变质醋样(B1~B5)出现生长外,接种正常醋样(A1~A5)也出现生长现象,这与课题组前期针对产气变质食醋样品中菌落总数、大肠菌群、酵母菌、乳酸菌和醋酸菌等常规计数法不能检出的结果不一致,其原因可能是:(1)产气变质醋样中微生物在这6种液体培养基中可能生长;(2)50 mL正常醋液通过滤膜富集后可能带有少量微生物能在相应的培养基中进行繁殖出现生长现象。接种产气变质醋样与正常醋样出现不同的生长现象,说明这6种培养基不能专一性检出含有产气变质菌的醋样品,易造成误检,需改良食醋中产气变质菌的检测培养基。

表2 6种培养基对产气食醋和正常食醋样品的检测结果

Table 2 Detection results of six culture media on samples of gas-producing vinegar and normal vinegar

样品编号	培养基					
	营养肉汤(1#)	醋酸菌液体(2#)	MRS液体(3#)	酸性肉汤(4#)	PYG液体(5#)	食醋产气+产膜菌(6#)
A1	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓	+O ↓膜	O ↓膜
A2	+O ↓膜	+O ↓	+O ↓	+O ↓	+O ↓	膜
A3	+O ↓	+	+O ↓	—	+O ↓膜	↓膜
A4	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓	+O ↓膜	O ↓膜
A5	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓	+O ↓	O ↓膜
B1	+O ↓膜	+ ↓膜	+O ↓	+O ↓	+O ↓膜	↓膜
B2	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓	+O ↓膜	O ↓膜
B3	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓	+O ↓膜	↓膜
B4	+O ↓	+O ↓	+O ↓	+O ↓	+O ↓	O ↓
B5	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓膜	+O ↓	+O ↓膜	O ↓膜

注:“+”表示观察到产酸;“O”表示观察到产气;“↓”表示观察到沉淀;“膜”表示观察到产膜;“—”表示未观察到上述现象

根据本课题组前期研究发现,食醋中产气变质菌有能够产生乳酸和乙酸从而增加食醋总酸含量的特性,高通量测序表明食醋中该类产气变质菌主要为乳杆菌属细菌<sup>[16]</sup>,且这类引起食醋产气变质的乳酸杆菌在普通MRS培养基上不生长,而该类产气变质菌能在食醋这种较低pH下生长,因此,调节培养基pH至3.5~3.6至关重要;同时基于其在普通MRS培养基上不生长的问题,考虑强化培养基促生长物质如复合氨基酸、复合维生素B、核苷酸、复配生长因子、酿醋原料麸皮等也是必要的,因此,在MRS培养基的基础上改良了一种检测食醋中产气污染菌的培养基,并将其命名为食醋产气变质菌检测培养基,其具体配方为:蛋白胨10.0g,牛肉膏10.0g,酵母浸出粉5.0g,葡萄糖20.0g,磷酸氢二钾2.0g,乙酸钠5.0g,硫酸镁0.2g,硫酸锰0.05g,吐温-802.0g,柠檬酸二铵2.0g,复合氨基酸2.0g,复合维生素B0.8g,核苷酸0.3g,复配生长因子3.0g,麸皮浸出液1000mL,pH3.5~3.6,121℃灭菌20min。将上述产气变质的食醋(B1~B5)与正常食醋(A1~A5)按照相同的方法处理后接入食醋产气变质菌检测培养基中,置于37℃培养,观察其产气现象,以4℃醋液塑料软瓶恒温培养作为对照。结果

见表3、图2,富集醋样菌体沉淀的滤膜如图1。

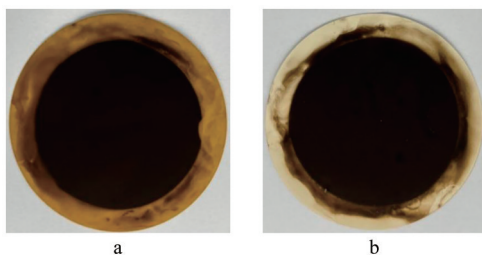
表3 食醋产气变质菌检测培养基对产气食醋和正常食醋样品的检测结果

Table 3 Detection results of detection medium for gas-producing spoilage bacteria of vinegar for gas producing vinegar and normal vinegar samples

样品编号	食醋产气变质菌检测培养基	4℃醋液塑料软瓶恒温培养
A1	—	—
A2	—	—
A3	—	—
A4	—	—
A5	—	—
B1	O ↓	O ↓
B2	O ↓	O ↓
B3	O ↓	O ↓
B4	O ↓	O ↓
B5	O ↓	O ↓

注:“O”表示观察到产气;“↓”表示观察到沉淀;“—”表示未观察到上述现象

由表3和图2可知,正常食醋(A1~A5)接入食醋产气变质菌检测培养基后,没有出现产气现象,而产气变质食醋(B1~B5)接入食醋产气变质菌检测培养基后,均出现产气和沉淀的现象,此检测结果与对照方法检测结果、食醋样品的实际情况完全一致。初步表明食醋产气变质菌检测培养基能够专一性检出食醋中的产气变质菌,该培养基具有低



注:a. 正常食醋富集滤膜;b. 产气变质的食醋富集滤膜

图1 富集菌体沉淀的滤膜

Figure 1 Filter membrane for enriching bacterial precipitation



注:左侧为阴性对照,中间为产气变质食醋检测结果,右侧为正常食醋检测结果

图2 食醋产气变质菌检测培养基检测结果

Figure 2 Test results of culture medium for detecting gas-producing spoilage bacteria of vinegar

pH 以及丰富营养成分包括复合氨基酸、复合维生素、复配生长因子、麸皮浸出液等特点,具有选择性,进而对其特异性、准确性及灵敏度进行测定。

## 2.2 食醋产气变质菌检测培养基的特异性

食醋产气变质菌检测培养基对 12 株不同的食醋污染菌株和致病菌株的检测结果显示,12 株菌检测结果均为阴性,表明食醋中产气变质菌不是常见的致病菌、芽孢杆菌、乳杆菌及醋酸菌等种类,该培养基的特异性好。

## 2.3 食醋产气变质菌检测培养基的准确性

为了验证此培养基的准确性,使用 4° 醋液塑料软瓶恒温培养与食醋产气变质菌检测培养基同时对工厂寄送的 3 批次未知产气变质情况的样品进行检测,3 批次食醋样品的检测结果见表 4。对工厂 3 批次共 75 个样品检测结果显示,两种培养方法均共检测出 32 个产气变质样品,且每批次检测出的变质样品编号完全一致。再对两种方法的检测速率进行比较,食醋产气变质菌检测培养基接入产气变质食醋样品后,经过 2~5 d 的培养即可观察到产气现象,而相同的产气变质食醋样品装入 4° 醋液塑料软瓶经恒温培养后,需要 15~24 d 才能观察到产气现象,结果显示,食醋产气变质菌检测培养

基的检测速率比塑料软瓶恒温培养法快 3~5 倍,表明食醋产气变质菌检测培养基准确性高、而且相对快速。

表4 检测出的产气变质醋样个数与检测时间

Table 4 The number of detected deteriorated samples and the detection time

样品批次/醋样	检测培养方法—阳性个数,检测时间	
	食醋产气变质菌检测培养基培养法	塑料软瓶恒温培养法
ZW组/16个	9个,2~5 d	9个,15~24 d
TX组/31个	0个	0个
WQ组/28个	23个,2~4 d	23个,15~23 d

## 2.4 食醋产气变质菌检测培养基的灵敏度

20 个已知产气变质的食醋样品采用食醋产气变质菌检测培养基的检测结果显示,由于不同样品中的初始菌量不同,所以能够观察到产气的最高稀释度有所不同,以编号①的样品为例,图 3 展示了其不同稀释度的检测结果。根据稀释度之间的 10 倍关系,可以确定每个样品能够观察到产气的最高稀释度的初始菌量 <math>10\text{ CFU/mL}</math>(后续稀释度培养 45 d 均未观察到产气)。结果说明,食醋产气变质菌检测培养基对产气变质食醋中污染菌的检出限为  $1\text{ CFU}\leq\text{初始菌量(接种量)}<10\text{ CFU}</math>。$

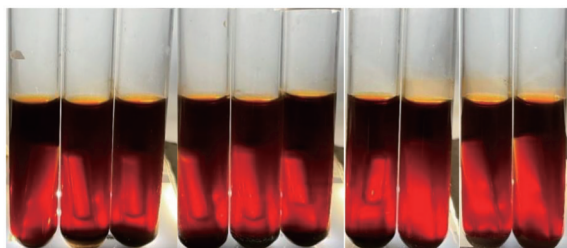
表5 食醋产气变质菌检测培养基的灵敏度检测结果

Table 5 Sensitivity test results of detection medium for gas-producing spoilage bacteria of vinegar

样品编号	稀释度—观察到产气现象的时间/d				
	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
①	15	18	—	—	—
②	12	15	18	—	—
③	14	17	20	—	—
④	13	16	18	—	—
⑤	12	15	17	—	—
⑥	16	19	—	—	—
⑦	11	16	18	—	—
⑧	12	15	19	—	—
⑨	9	14	19	—	—
⑩	14	18	21	—	—
ZW3	13	17	20	—	—
ZW4	11	17	20	—	—
ZW6	13	14	19	—	—
ZW9	11	14	16	18	—
WQ3	13	16	21	—	—
WQ6	15	19	—	—	—
WQ25	11	15	18	21	—
WQ26	14	17	19	—	—
WQ27	13	14	19	22	—
WQ28	13	16	18	20	—

注:“—”为 45 d 内未观察到产气的现象

根据样品稀释度与观察到产气现象的时间之间的关系,可以得出:当样品的初始菌浓度为  $1\sim 10\text{ CFU/mL}$ ,接种量 1 mL 时,观察到产气现象的时间为 18~22 d;当样品的初始菌浓度为  $10\sim 10^2\text{ CFU/mL}$ ,



注:从左到右依次为阴性对照、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 稀释度

图3 产气变质食醋不同系列稀释度检测结果

Figure 3 Test results of different series dilution of gas producing deteriorated vinegar

接种量 1 mL 时,观察到产气现象的时间为 14~17 d;当样品的初始菌浓度为  $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL,接种量 1 mL 时,在 15 d 之内即可观察到产气现象,样品中的菌量越大,观察到样品产气的时间越短,有的样品快则只需 1~2 d 就能观察到产气现象。

## 2.5 食醋产气变质菌检测方法的确定

食醋产气变质菌检测方法选用食醋产气变质菌检测培养基来培养。具体检测方法如下:取待测食醋样品 50 mL,每个样品设置 3 个平行组,将样品在无菌操作台中进行抽滤,然后将富集有菌体沉淀的滤膜直接接种于有 5 mL 食醋产气变质菌检测培养基且内置倒立杜氏小管的试管中,37 °C 培养箱恒温培养,培养过程中每天观察其是否有产气现象,培养 15 d 之内出现产气现象的食醋样品视为不合格样品;培养 22 d 以上未观察到产气现象的食醋样品,表明样品初始菌量  $< 1$  CFU/50 mL,视为合格样品。

## 2.6 检测热处理对食醋中产气变质菌的杀灭效果

研究表明,加热处理对于污染食醋的微生物具有有效的杀灭作用<sup>[22-23]</sup>。本实验用食醋产气变质菌检测方法对食醋产气变质菌热处理后的检测结果如表 6 所示;热处理温度为 50 °C 作用 10、20、30 min 时,对食醋产气变质菌起不到杀菌的作用;65 °C 灭菌 10 min 也未能起到杀菌的作用,随着灭菌时间的增加,采用 65 °C 灭菌 30 min 即可杀灭食醋产气变质菌;而后续更高的热处理温度也均可以杀灭食醋产气变质菌。据报道,高温可能会加快美拉德反应的进程<sup>[24]</sup>以及加快食醋中沉淀的生成<sup>[25]</sup>,所以 95 °C 作用 15 min 后,醋液明显出现了少量沉淀并有苦味和糊味,表明热处理温度过高会对食醋的感官品质有较大影响。在实际应用中,可以选择 75~85 °C 灭菌 5~15 min 的热处理条件,这样既可保证食醋品质又可达到杀菌的要求,还能避免盲目提高热灭菌强度,降低生产成本。利用本方法实现了热灭菌工艺参数的快速优化,为食醋的综合防控提供了依据。

表6 食醋中变质菌热杀菌效果

Table 6 Thermal bactericidal effect of spoiled bacteria in vinegar

热杀菌条件	样品编号(观察到阳性的培养时间)			
	①	②	③	④
对照	0 (3 d)	0 (4 d)	0 (2 d)	0 (2 d)
50 °C 10 min	0 (3 d)	0 (4 d)	0 (3 d)	0 (4 d)
50 °C 20 min	0 (3 d)	0 (4 d)	0 (3 d)	0 (4 d)
50 °C 30 min	0 (3 d)	0 (4 d)	0 (3 d)	0 (4 d)
65 °C 10 min	0 (11 d)	0 (11 d)	0 (3 d)	0 (4 d)
65 °C 30 min	—	—	—	—
75 °C 10 min	—	—	—	—
75 °C 30 min	—	—	—	—
85 °C 5 min	—	—	—	—
85 °C 10 min	—	—	—	—
85 °C 15 min	—	—	—	—
85 °C 20 min	—	—	—	—
95 °C 1 min	—	—	—	—
95 °C 2 min	—	—	—	—
95 °C 3 min	—	—	—	—
95 °C 5 min	—	—	—	—
95 °C 15 min	—	—	—	—

注:“0”表示观察到产气;“—”表示培养时间 30 d 未观察到产气

## 2.7 检测防腐剂对食醋中产气变质菌的抑制效果

根据文献报道<sup>[26-28]</sup>以及 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》<sup>[21]</sup>中的规定,选择食醋中使用较为广泛的 3 种防腐剂添加到检测培养基中进行抑菌实验,通过观察产气情况来判断 3 种防腐剂对食醋产气变质菌的最小抑菌浓度(MIC)。结果如表 7 所示,3 种防腐剂对食醋产气变质菌的 MIC 分别为各自标准限量的 6 倍、8 倍、8 倍,即山梨酸钾 6.00 g/kg、对羟基苯甲酸乙酯 2.00 g/kg、NISIN 1.20 g/kg,而食品添加剂使用标准中 3 种防腐剂的限量标准分别为山梨酸钾 1.00 g/kg、对羟基苯甲酸乙酯 0.25 g/kg、NISIN 0.15 g/kg,所以 3 种防腐剂对食醋产气变质菌的 MIC 均大于各自的最大使用限量标准。建议在实际生产过程中,不能使用上述 3 种防腐剂抑制食醋中产气变质菌的生长,添加防腐剂无效还增加了生产成本。

表7 防腐剂对食醋中污染菌的抑制效果

Table 7 The inhibitory effect of preservatives on contaminated bacteria in vinegar

各自限量标准 倍数/倍	防腐剂名称(观察到阳性的培养时间)		
	山梨酸钾	对羟基苯甲酸乙酯	NISIN
0.25	0 (3~4 d)	0 (3~4 d)	0 (3 d)
0.50	0 (3~4 d)	0 (3~4 d)	0 (3~4 d)
0.75	0 (3~4 d)	0 (4 d)	0 (3~4 d)
1	0 (3~4 d)	0 (4~5 d)	0 (4~5 d)
2	0 (5~6 d)	0 (5~6 d)	0 (5 d)
4	0 (6~7 d)	0 (6~7 d)	0 (6~7 d)
6	—	0 (6~7 d)	0 (6~8 d)
8	—	—	—
10	—	—	—
12	—	—	—

注:“0”表示观察到产气;“—”表示培养时间 30 d 未观察到产气

## 2.8 应用于某食醋厂成品醋样的检测结果

通过对某食醋厂设施设备改造升级,利用前述优化的热灭菌条件用于包装环节后,对连续生产2个月的不同批次成品醋进行检测,52个批次样品全部为阴性,本检测方法和塑料软瓶恒温培养的检测结果一致,且醋厂后续留样存放的食醋也未出现产气样品。说明本检测方法应用效果准确可信,同时表明食醋厂采取的综合措施防控食醋产气变质菌效果显著,保障了食醋卫生安全。

## 3 结论

根据食醋产气变质菌主要是乳杆菌属的特性<sup>[16]</sup>,本文改良了一种食醋产气变质菌检测培养基,该培养基低pH为3.5~3.6、促生长物质丰富,并利用该培养基建立了一种快速检测食醋产气变质菌的培养方法。食醋产气变质菌检测培养基仅能检出产气变质食醋样品,且对12株其他食醋污染菌和致病菌的检测结果均为阴性;以4°醋液塑料软瓶恒温培养法为对照,利用建立的检测方法对工厂未知产气变质情况的75个食醋样品进行检测,两种检测方法的检测结果一致,但本文方法的检测速率是对照方法的3~5倍;本培养方法的检出限为1 CFU≤初始菌量(接种量)<10 CFU。因此,本文针对食醋产气变质菌建立的检测培养方法具有快速、特异、准确、灵敏的特点。

将本方法应用于热处理和防腐剂对食醋产气变质菌的影响实验中,结果显示利用本方法快速优化获得了热灭菌工艺参数,探明了防腐剂对食醋产气变质菌无抑制作用的结论;对连续生产的食醋产品进行监测,结果与4°醋液塑料软瓶恒温培养检测结果一致,被检测醋样全部为阴性,表明该培养方法实际应用效果准确可信,且食醋厂采取的综合措施防控食醋产气变质效果显著,保障了食醋产品的安全。论文研究结果为生产企业的食醋产气变质菌检测及综合防控提供了依据。

## 参考文献

[1] PERUMPULI P A B N, DILRUKSHI D M N. Vinegar: A functional ingredient for human health [J]. International Food Research Journal, 2022, 29(5): 959-974.

[2] HO C W, LAZIM A M, FAZRY S, et al. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review [J]. Food Chemistry, 2017, 221: 1621-1630.

[3] CHO H D, LEE J H, JEONG J H, et al. Production of novel vinegar having antioxidant and anti-fatigue activities from *Salicornia herbacea* L [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(4): 1085-1092.

[4] ZHENG Y, ZHAO C M, LI X W, et al. Kinetics of predominant microorganisms in the multi-microorganism solid-state fermentation of cereal vinegar [J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 159: 113209.

[5] 孙文丽, 孙玲, 邢政, 等. 胀气食醋中污染微生物的分离鉴定及其生理生化特性 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 99-105.

SUN W L, SUN L, XING Z, et al. Separation, identification, physiological and biochemical characteristics of pollution microbes in Swollen vinegar [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(17): 99-105.

[6] LU Z M, WANG Z M, ZHANG X J, et al. Microbial ecology of cereal vinegar fermentation: Insights for driving the ecosystem function [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49: 88-93.

[7] NIE Z Q, ZHENG Y, DU H F, et al. Dynamics and diversity of microbial community succession in traditional fermentation of Shanxi aged vinegar [J]. Food Microbiology, 2015, 47: 62-68.

[8] LI P, LI S, CHENG L L, et al. Analyzing the relation between the microbial diversity of DaQu and the turbidity spoilage of traditional Chinese vinegar [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(13): 6073-6084.

[9] 王兴洁, 刘爱平, 敖晓琳, 等. 中国传统食醋微生物污染及控制措施研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(10): 260-265.

WANG X J, LIU A P, AO X L, et al. Microbial contamination and control measures during traditional Chinese vinegar fermentation [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(10): 260-265.

[10] 郭明焯, 陈蓉, 吴远明, 等. 四川麸醋中沉淀物质组成的初步分析及不同后处理方式对其沉淀物质影响的初步研究 [J]. 中国调味品, 2020, 45(7): 148-152, 157.

GUO M Y, CHEN R, WU Y M, et al. Preliminary analysis of sediments composition in Sichuan bran vinegar and preliminary study on the influence of different post-processing methods on sediments [J]. China Condiment, 2020, 45(7): 148-152, 157.

[11] 栾春光, 郝建秦, 李伦, 等. 高通量测序技术在食醋涨壶微生物鉴定中的应用 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 273-279.

LUAN C G, HAO J Q, LI L, et al. The characterization of the bacteria responsible for causing package swelling in vinegar using high-throughput sequencing technology [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(9): 273-279.

[12] 张怀敏, 段国锋, 李江涌, 等. 导致老陈醋产气微生物的分离和鉴定 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2016, 36(8): 594-598.

ZHANG H M, DUAN G F, LI J Y, et al. Isolation and identification of microorganism which led the vinegar gas-producing [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2016, 36(8): 594-598.

[13] 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.

LI Y Y, GAO W, ZHOU G P. Case analysis of contaminated Shanxi aged vinegar [J]. Food Science, 2016, 37(12): 226-231.

[14] 郑宇, 牛纪伟, 张祥龙, 等. 传统食醋中潜在污染微生物的

- 分离鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 334-339.
- ZHENG Y, NIU J W, ZHANG X L, et al. Separation and identification of potential microbial contaminants in traditional vinegar[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(11): 334-339.
- [15] 曹晋宜, 赵红年, 赵凌雁, 等. 食醋中有害微生物的分离与鉴定[J]. 中国酿造, 2017, 36(2): 115-118.
- CAO J Y, ZHAO H N, ZHAO L Y, et al. Isolation and identification of harmful microorganism from vinegar[J]. *China Brewing*, 2017, 36(2): 115-118.
- [16] 牟娟, 刘芳, 王兴洁, 等. 胀气变质食醋理化指标及细菌多样性分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(20): 278-284.
- MOU J, LIU F, WANG X J, et al. Analysis of physicochemical indexes and bacterial diversity of swollen vinegar[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(20): 278-284.
- [17] 李敏, 李瑶, 赵魁, 等. 食醋酿造过程中条件致腐微生物的分离鉴定及强产气菌群 TYF-LIM-L09 的生长特征[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(5): 95-103.
- LI M, LI Y, ZHAO K, et al. Isolation and identification of high-temperature tolerant spoilage microbes during vinegar brewing and growth characterization of the bacterial consortium TYF-LIM-L09 with a strong gas-producing ability[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(5): 95-103.
- [18] 刘超齐, 王平, 常娟, 等. 益生菌对温度、pH 及抗生素耐受性的研究[J]. 饲料研究, 2016(12): 19-25.
- LIU C Q, WANG P, CHANG J, et al. Study on tolerance of probiotics to temperature, pH and antibiotics[J]. *Feed Research*, 2016(12): 19-25.
- [19] 薛建华, 王福中, 甘学锋, 等. 用于检测食醋中产气、产膜菌的培养基及检测方法: 中国, CN104313112 A[P]. 2015-01-28.
- XUE J H, WANG F Z, GAN X F, et al. Culture medium and detection method for detecting gas producing and membrane producing bacteria in vinegar: China, CN104313112A[P]. 2015-01-28.
- [20] 刘书亮, 刘芳, 王兴洁, 等. 一种用于食醋产气菌检测的培养基及其方法: 中国, CN109371100A[P]. 2019-02-22.
- LIU S L, LIU F, WANG X J, et al. A culture medium and method for detecting gas producing bacteria in vinegar: China, CN109371100A[P]. 2019-02-22.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 食品添加剂使
- 用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, Standard for the use of food additives: GB 2760—2014 [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2014.
- [22] WANG Z M, LU Z M, SHI J S, et al. Exploring flavour-producing core microbiota in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese vinegar[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26818.
- [23] 王建云, 秦伟军, 李圣云, 等. 食醋发粘劣变控制技术研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(6): 117-120.
- WANG J Y, QIN W J, LI S Y, et al. Study on control technology of vinegar about pastiness and deterioration [J]. *China Condiment*, 2016, 41(6): 117-120.
- [24] 高娟, 杜佳馨, 吴限, 等. 羊肚菌酶解液制备美拉德反应肉味调味基料[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 242-250.
- GAO J, DU J X, WU X, et al. Preparation of meaty flavoring base from enzymatic hydrolysate of morel mushroom by maillard reaction[J]. *Food Science*, 2020, 41(24): 242-250.
- [25] 张祥龙. 山西老陈醋沉淀物组成及其形成规律的分析[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- ZHANG X L. Analysis of the composition and formation rule of sediments in Shanxi aged vinegar[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2017.
- [26] 赵爽, 朱亚琴, 刘书亮, 等. 袋装变质食醋产膜菌的分离鉴定及其控制[J]. 食品工业科技, 2014, 35(23): 118-122.
- ZHAO S, ZHU Y Q, LIU S L, et al. Identification and controlling of producing membrane strains isolated from bagged deterioration vinegar[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(23): 118-122.
- [27] 李伟丽, 赵超, 车建途, 等. 腐败醋中微生物的分离鉴定及乳酸链球菌素对其抑制作用[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 174-178.
- LI W L, ZHAO C, CHE J T, et al. Inhibitory effect of nisin on microorganisms isolated and identified from spoiled vinegar[J]. *Food Science*, 2015, 36(1): 174-178.
- [28] 王玉美, 卢红梅. 防止微生物引起食醋返浑的初步研究[J]. 中国调味品, 2016, 41(9): 15-19.
- WANG Y M, LU H M. Study on prevention of vinegar turbidity caused by microorganism[J]. *China Condiment*, 2016, 41(9): 15-19.