

果汁中脂环酸芽孢杆菌识别与控制研究进展

王周利 蔡瑞 岳田利 张江波 袁亚宏 范可奕

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 脂环酸芽孢杆菌具有嗜酸耐热的特性,是果汁工业中关键的质量安全因子。论述了脂环酸芽孢杆菌的发现历史及分类,不同来源脂环酸芽孢杆菌属主要特征及分布,阐述了脂环酸芽孢杆菌对果汁工业的危害及愈创木酚等产物代谢路径,系统分析了脂环酸芽孢杆菌识别与检测研究进展,同时也讨论了果汁加工业中脂环酸芽孢杆菌控制技术方法,为果汁生产加工中脂环酸芽孢杆菌的快速识别与控制提供了理论方法和技术支持,为保障果汁工业的健康、快速发展提供了参考。

关键词: 果汁; 脂环酸芽孢杆菌; 分离鉴定; 识别检测; 控制

中图分类号: TS255.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2016)10-0221-23

Review of Identification and Control Technology of *Alicyclobacillus* spp. in Fruit Juice

Wang Zhouli Cai Rui Yue Tianli Zhang Jiangbo Yuan Yahong Fan Keyi

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *Alicyclobacillus* spp. are non-pathogenic, thermo-acidophilic and spore-forming bacteria. Their spores can not only survive the pasteurization procedure normally applied to fruit juices and beverages, but also germinate and proliferate in acidic products. Since the first case of apple juice spoilage linked to *A. acidoterrestris* in 1984, *Alicyclobacillus* strains have recently received much attention in the pasteurized fruit juice industry. This review was intended to provide an overview on the historical background and general characteristics of the genus *Alicyclobacillus*. Their distribution in soil environments and juice processing facilities were described. The impact of *Alicyclobacillus* on fruit juice/beverage industry would be particularly discussed. The formation pathway of guaiacol was also addressed since the *Alicyclobacillus*-related spoilage was characterized by the formation of a distinct medicinal or antiseptic off-odor attributed to guaiacol, which at a low level can be detected by sensory means in fruit juices. The standardized test methods and alternative detection techniques for *Alicyclobacillus* strains were summarized. In addition, the *Alicyclobacillus* control approaches aimed at different stages of juice processing, mainly in relation to fruit washing, juice sterilization and juice preservation were presented. Finally, possible directions for future research on *Alicyclobacillus* were proposed.

Key words: fruit juice; *Alicyclobacillus* spp.; isolation and identification; detection; control

引言

中国是世界上水果种植面积和产量最大的国

家。近年来,我国苹果、猕猴桃、柑橘、葡萄等大宗水果及具有地方品牌效应的特色小品种水果在种植面积和产量方面均取得了重大突破。以这些原料为核

收稿日期: 2016-07-25 修回日期: 2016-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501499)、港澳台科技合作专项(2015DFT30130)和陕西省社会发展科技攻关项目(2015SF278、2014K13-15)

作者简介: 王周利(1984—),男,讲师,博士,主要从事食品安全检测控制研究,E-mail: wzl1014@nwsuaf.edu.cn

通信作者: 岳田利(1965—),男,教授,博士生导师,主要从事农产品加工与食品安全控制研究,E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

心的水果深加工产业及其出口贸易是水果种植产业健康发展的关键,也是区域性经济快速发展、实现农民增收致富的支柱型产业。同时,随着国际市场激烈的竞争及中国水果加工产品中质量安全问题的突显,中国的水果及其加工产业面临着严峻的挑战^[1]。食源性致病菌、脂环酸芽孢杆菌、展青霉素、高渗酵母、农药残留、重金属、富马酸等质量问题依然是制约中国水果生产加工及出口贸易的瓶颈,脂环酸芽孢杆菌污染引起的质量问题是水果产业健康发展急需解决的重要问题之一^[1-3]。

本文对脂环酸芽孢杆菌的发现历史及分类等信息进行系统总结,阐述脂环酸芽孢杆菌属细菌的主要特征及在水果种植与加工过程的分布状况,讨论脂环酸芽孢杆菌对果汁工业的危害及愈创木酚等代谢产物生成路径,并论述脂环酸芽孢杆菌识别与控制方法的研究进展,以期为保障果汁工业的健康、快速发展提供参考。

1 脂环酸芽孢杆菌简介

脂环酸芽孢杆菌是一类耐酸、耐热、严格需氧、产芽孢、无致病性的杆状细菌^[4]。一般可以生长的pH值范围为2.0~6.0,其最适pH值为3.5~4.5;可以生长的温度范围为20~70℃,最适生长温度为40~60℃。由于这类细菌可以在低pH值及高温条件下存活甚至生长,因此也俗称为“嗜酸耐热菌”^[5]。

1.1 发现历史及分类

在1967年,UCHINO等^[6]于日本东北地区的温泉中分离获得了3株产芽孢的细菌,它们的耐酸耐热性比*Bacillus coagulans*和*B. stearothermophilus*更强,最后根据形态和培养特性将它们暂时归类于*B. coagulans*。1971年,DARLAND等^[7]分别在美国黄石国家公园和夏威夷火山国家公园分离出了相似细菌,且其细胞膜中的主要脂类成分为 ω -环己烷脂肪酸,根据其分类属性,这些细菌被划定为*Bacillus*属的一个新种,并命名为*B. acidocaldarius*。1981年,HIPPCHEN等^[8]在土壤中分离了一株嗜酸耐热菌,经DEINHARD等^[9]详细研究后,确定为另一个新种——*B. acidoterrestris*。1983年,PORALLA等^[10]分离了一株细胞膜中主要成分为 ω -环庚烷脂肪酸的细菌,该细菌被命名为*B. cycloheptanicus*。通过16S rRNA序列的比对,上述3株分离鉴定的*Bacillus*菌与该属的其他菌株有明显的差异,且其明显的特征是它们都含有 ω -环状脂肪酸,因此,在1992年,这3株嗜酸耐热菌被归类为一个新属——脂环酸芽孢杆菌属(*Alicyclobacillus*)^[11]。

在此后的20多年里,学者陆续从土壤、温泉、火山口等自然环境和果蔬食品中分离获得了脂环酸芽孢杆菌属细菌。最初被分类至*Sulfobacillus*属的*S. thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*和*S. disulfidooxidans*等细菌分别被重新归类为*A. tolerans*和*A. disulfidooxidans*^[12]。截止目前,该属共含有23个种、2个亚种和2个基因组种,具体为:*A. acidiphilus*、*A. acidocaldarius*、*A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius*、*A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*、*A. acidoterrestris*、*A. aeris*、*A. cellulosityticus*、*A. consociatus*、*A. contaminans*、*A. cycloheptanicus*、*A. dauci*、*A. disulfidooxidans*、*A. fastidiosus*、*A. ferrooxydans*、*A. herbarius*、*A. hesperidum*、*A. kakegawensis*、*A. macrosporangioides*、*A. pohliae*、*A. pomorum*、*A. sacchari*、*A. sendaiensis*、*A. shizuokensis*、*A. tolerans*、*A. vulcanalis*、*Alicyclobacillus* genomic species 1和*Alicyclobacillus* genomic species 2^[13-14]。基于16S rRNA序列的脂环酸芽孢杆菌属系统发育树如图1所示。

1.2 主要特征

脂环酸芽孢杆菌的特性主要包括3方面:基本的细胞形态特征、细胞膜主要脂类成分(ω -环状脂肪酸)以及芽孢的耐热性。

脂环酸芽孢杆菌的营养体细胞宽度为0.7~1 μm ,长度为3~5 μm ,并伴有端生、次端生或中生芽孢。菌落呈乳白色至褐色,且随着菌龄变化其颜色会逐渐加深,表面光滑不透明,菌落形态为扁平或凸起,菌落大小一般为2~5 mm^[15-17]。除了*A. sendaiensis*为革兰氏阴性菌外,其他种均为革兰氏阳性^[18],但在培养后期这些革兰氏阳性菌又具有了革兰氏阴性菌的特性^[19]。

脂环酸芽孢杆菌属细菌细胞膜中的主要脂类成分为 ω -环状脂肪酸,这是其区别于*Bacillus*属的主要特征。*A. acidocaldarius*、*A. acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius*、*A. acidoterrestris*、*A. hesperidum*、*Alicyclobacillus* genomic species 1、*Alicyclobacillus* genomic species 2、*A. acidocaldarius* subsp. *rittmannii*、*A. acidiphilus*、*A. sendaiensis*、*A. vulcanalis*、*A. tolerans*、*A. disulfidooxidans*、*A. fastidiosus*、*A. sacchari*、*A. consociatus*和*A. dauci*等细菌的细胞膜中主要含有 ω -环己烷脂肪酸;而*A. cycloheptanicus*、*A. herbarius*、*A. kakegawensis*和*A. shizuokensis*等细菌的细胞膜中主要含有 ω -环庚烷脂肪酸^[14,16,18,20]。另外,*A. pomorum*、*A. contaminans*、*A. macrosporangioides*、*A. pohliae*、*A. ferrooxydans*、*A. aeris*和*A. consociatus*等细菌的

细胞膜中不含有 ω -环状脂肪酸,但是根据 16S rRNA 和 DNA 旋转酶 B 亚基的基因序列分析及以此建立的系统发育树表明这些细菌属于脂环酸芽孢杆菌

属,它们的加入表明脂环酸芽孢杆菌属也包括一些细胞膜中不含有 ω -环状脂肪酸的菌株^[21-23]。

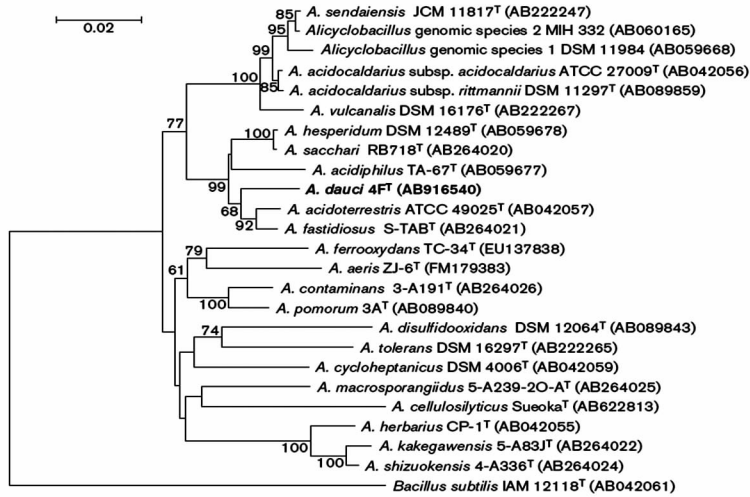


图 1 脂环酸芽孢杆菌属不同菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic distance tree derived from comparison of 16S rRNA gene sequences of different *Alicyclobacillus* species

脂环酸芽孢杆菌的另一个重要特点是所产芽孢具有较强的抗热性^[24-25]。在衡量微生物的抗热性强弱时,最主要的参数是 $D_{90^\circ\text{C}}$ 和 $D_{95^\circ\text{C}}$ 值(D 表示在规定的温度下,杀死 90% 细菌数所需的时间,下标表示杀菌温度)。影响脂环酸芽孢杆菌芽孢抗热性的主要因素如表 1 所示(以 *A. acidoterrestris* 为例)。其中温度的影响最大,随着温度的升高, D 值显著降低^[26-27]。当热处理介质为缓冲液时,pH 值的变化对芽孢的热抗性无显著影响;在果汁或培养基介质中处理时,随着 pH 值的升高其 D 值也明显升

高^[28-29]。可溶性固形物含量与芽孢的 D 值呈正相关,通常表现为其在浓缩果汁中的抗热性比普通果汁中更强^[29]。相对于以上几种外界因素,脂环酸芽孢杆菌属内种的差异也是影响其抗热性的一个重要因素,甚至在相同条件下同种内不同菌株的抗热性也存在一定的差异。一般来说,在同等条件下 *A. acidocaldarius* 抗热性强于 *A. acidoterrestris*^[30]。相对于缓冲液体系,在果汁和饮料介质中脂环酸芽孢杆菌芽孢的抗热性更强。MALDONADO 等^[27]发现在未澄清的浓缩柠檬汁中 *A. acidoterrestris* 芽孢

表 1 影响 *A. acidoterrestris* 芽孢抗热性的主要因素

Tab. 1 Main factors influencing heat resistance of *A. acidoterrestris* spores

因素	处理条件	结果	文献序号
温度	浓缩柠檬清汁(50 °Brix, pH 值 2.28)	$D_{82^\circ\text{C}} = 17.4 \text{ min}, D_{86^\circ\text{C}} = 18.1 \text{ min},$	[27]
	处理温度:82,86,92,95 °C	$D_{92^\circ\text{C}} = 7.6 \text{ min}, D_{95^\circ\text{C}} = 6.2 \text{ min}$	
pH 值	麦芽浸膏汤培养基(5 °Brix, pH 值 2.5 ~ 6.0)	$D_{91^\circ\text{C}} \rightarrow 0$ (pH 值 2.5)	[29]
	处理温度:91 °C	$D_{91^\circ\text{C}} \approx 10 \text{ min}$ (pH 值 6.0)	
可溶性固形物含量	麦芽浸膏汤培养基(5 ~ 60 °Brix, pH 值 2.5)	$D_{91^\circ\text{C}} \rightarrow 0$ (5 °Brix)	[29]
	处理温度:91 °C	$D_{91^\circ\text{C}} \approx 20 \text{ min}$ (60 °Brix)	
菌株	DSM 2498 和 3 株分离菌	$D_{95^\circ\text{C}} = 2.5 \text{ min}$ (菌株 46)	[32]
	橘子汁(9 °Brix, pH 值 3.15)	$D_{95^\circ\text{C}} = 8.7 \text{ min}$ (菌株 70)	
	处理温度:95 °C	$D_{95^\circ\text{C}} = 3.8 \text{ min}$ (菌株 145)	
介质	苹果汁、橘子汁和麦芽浸膏汤培养基(10 °Brix, pH 值 4.0)	$D_{95^\circ\text{C}} = (27.8 \pm 1.70) \text{ min}$ (苹果汁)	[33]
	处理温度:95 °C	$D_{95^\circ\text{C}} = (20.8 \pm 1.27) \text{ min}$ (橘子汁), $D_{95^\circ\text{C}} = 11.1 \pm 2.26$ (麦芽浸膏汤培养基)	
二价阳离子	酵母膏蛋白胨葡萄糖培养基(pH 值 4.0)	$D_{89^\circ\text{C}} \approx 13 \text{ min}$ (CaCl ₂)	[31]
	处理温度:89 °C	$D_{89^\circ\text{C}} \approx 10 \text{ min}$ (其他)	
	二价阳离子(5 mmol/L): CaCl ₂ 、MgCl ₂ 、BaCl ₂ 、MnCl ₂ 和 SrCl ₂		

的抗热性比在澄清的果汁中高。1997年, YAMAZAKI等^[31]研究发现二价金属离子的添加对 *A. acidoterrestis* 芽孢的抗热性无显著影响, 但当同时加入吡啶二羧酸和 Ca^{2+} 时, 其芽孢的 *D* 值则显著升高。

1.3 分布

脂环酸芽孢杆菌主要来源于土壤, 根据其具有嗜酸耐热的性质, 最初该菌类从火山、温泉等高温环境的酸性土壤中分离得到, 比如陈志伟等^[34]从云南、广东的热泉中分离到了 *A. acidocaldarius*。同时, 脂环酸芽孢杆菌也广泛存在于中性和碱性土壤中。HIPPCHEN等^[8]利用嗜酸耐热菌的分离方法从中性土壤中分离出了50株菌, 其中23株均为脂环酸芽孢杆菌。本实验室研究团队也分别从陕西黄土高原地区苹果及猕猴桃种植果园的碱性土壤中分离到了 *A. acidoterrestis*、*A. herbarius* 和 *A. contaminans* 等脂环酸芽孢杆菌^[35-37]。

自1984年在德国发生脂环酸芽孢杆菌污染事件导致大规模苹果汁腐败以来, 大量的研究开始致力于果蔬及其制品中脂环酸芽孢杆菌的分离鉴定, 并重点阐明各类果汁从果园到餐桌全产业链加工中脂环酸芽孢杆菌的分布和污染情况。巴西出口商协会分别从圣保罗州的3个大型橘子加工厂以及工厂附近的橘子农场中取样分析了脂环酸芽孢杆菌的分布。该研究工作开展了2年, 每年取样量为100个, 取样点主要包括: 正常收获的原料果、落果、橘子叶、果园的土壤、喷洒水、进入仓库前后的果实、氯洗前后的果实、氯洗后的洗涤水、浓缩前和巴氏杀菌后的橘子汁以及终产品浓缩橘子汁等。研究结果表明: 在所有土壤样品中都检测到了脂环酸芽孢杆菌, 其菌体浓度为 $10^4 \sim 10^6$ CFU/g, 在原料果及树叶表面也有少量的目标菌, 且干旱季节的污染水平要高于雨季^[38]。陈世琼等^[39]从浓缩苹果汁生产过程中使用的洗果水、冷凝水、苹果清汁、苹果浓缩汁中共分离到45株嗜酸耐热菌。本实验室研究团队也从苹果及猕猴桃全产业链中分离获得了大量脂环酸芽孢杆菌, 其中: 从陕西苹果果园、果库环境中采集了土壤、叶片、空气、苹果, 并以浓缩苹果汁生产车间及生产线的设备用水、冷凝水、原汁、苹果清汁、酶解果汁、预浓缩汁、苹果浓缩汁及其各个工段的空气为样品进行了分析, 在果园、果库以及生产车间的空气、冷凝水和酶解果汁中均分离到了 *A. acidoterrestis*^[37]; ZHANG等^[36]以陕西周至、眉县等猕猴桃主产区及猕猴桃加工企业为核心, 对该地区从果园到成品的猕猴桃全产业链进行了采样分析, 其中嗜酸耐热菌的检出率为19.0%, 具体为猕猴桃产品中得到1株

脂环酸芽孢杆菌, 加工厂中分离获得了16株, 另外68株分离菌株全部来自果园。这些研究及调查结果表明脂环酸芽孢杆菌广泛分布于果蔬产品生产加工全产业链中。

2 脂环酸芽孢杆菌的危害

2.1 对果汁工业的影响

果汁工业中常用的巴氏杀菌条件为 $90 \sim 95^\circ\text{C}$ 持续15 s, 在产品灌装前冷却至 $82 \sim 84^\circ\text{C}$, 最后在 $88 \sim 96^\circ\text{C}$ 下持续约2 min。该工序可以实现对酸性果汁(pH值小于4)中常见的嗜酸或耐酸的细菌, 抗热性低的酵母菌、霉菌和乳酸杆菌的有效控制。然而由于脂环酸芽孢杆菌既嗜酸又耐热的特性, 常规的巴氏杀菌往往不能将其杀灭, 并且低pH值的果汁环境会为其提供很好的生长繁殖条件^[38,40]。在脂环酸芽孢杆菌污染初期, 由于产品的胀包或酸败不明显, 检测中很难发现该菌的污染, 因此果汁生产厂家往往是接到消费者的投诉后才知道腐败的发生, 随之而来的是大量产品的召回以及果汁生产厂家蒙受的严重经济损失^[41]。

众多学者从苹果汁、猕猴桃汁、橘子汁、葡萄汁、柠檬汁、菠萝汁、番茄汁^[15,42-44]、混合果汁、碳酸果汁饮料^[45-46]、果泥、柠檬水、冰红茶, 甚至块状的番茄罐头^[47]等大量食品中发现了脂环酸芽孢杆菌的污染。1998年, 美国食品公司生产协会的一项调查表明: 在当时最近的5年内, 被调查的公司中大部分发生过脂环酸芽孢杆菌污染事件, 其中苹果汁的污染最为严重。2005年, 欧洲果汁协会调查了包括果汁生产、包装和销售在内的68个企业, 其中有45%的调查企业表示在当时最近的3年内出现过脂环酸芽孢杆菌污染及相关问题, 33%的企业表明在这期间发生的脂环酸芽孢杆菌污染事件超过3起, 同时35%的腐败事件使企业蒙受了很大的经济损失^[48]。1996—2009年, 阿根廷开展了一项规模巨大的调查活动, 结果发现: 在来自7个省份, 涉及20多个品种的8556个不同果汁和蔬菜汁样品中, 除橘子和猕猴桃外其余样品中都有脂环酸芽孢杆菌检出, 且在不同类型的样品中检出率为24%~100%^[49]。在2011年, 有研究者检测了美国佛罗里达州果汁生产商的180种热带和亚热带的水果浓缩汁样品, 发现6.1%的样品存在脂环酸芽孢杆菌污染现象^[50]。当然, 截至目前为止, 还没有相关的组织或者机构对国内整个果汁或者饮料工业的脂环酸芽孢杆菌污染状况进行调查, 相关数据未见公开。尽管如此, 现有的大量报道和调查结果表明脂环酸芽孢杆菌已经成为果汁和饮料生产中广泛存在的微生物污染问题。

2.2 恶臭物质的产生

脂环酸芽孢杆菌的代谢产物主要包括愈创木酚和卤代酚两类,其中卤代酚又主要包括 2,6-二溴苯酚和 2,6-二氯苯酚,它们的化学结构式如图 2 所示,在这 3 种不良风味物质中,愈创木酚是最主要也是关注最多的代谢产物;同时,在一些污染果汁中,还检测到了 2,4-二溴苯酚、2,4-二氯苯酚和 2,4,6-三氯苯酚等化学物质^[15-16,51-52]。



图 2 恶臭物质的化学结构式

Fig. 2 Structures of odor compounds

愈创木酚是一种公认的风味化合物,广泛存在于咖啡、大麦芽等烘焙类食品中,可以产生独特的烧焦、烟熏和烧烤风味,但这种物质在果汁中出现时,带来的却是不愉快的“药味”、“防腐剂味”和“火腿味”^[5]。愈创木酚的感官阈值很低,其在水中的阈值是 1 $\mu\text{g/L}$,在 12% 的稀酒精溶液中为 0.03 mg/L ,在干白葡萄酒中为 0.02 mg/L 。1997 年, PETTIPHER 等^[53]报道了橘子汁、苹果汁和非碳酸果汁中愈创木酚的嗅觉阈值大约为 2 $\mu\text{g/L}$;相似地,2000 年,ORR 等^[54]使用最优估计阈值法得出苹果汁中愈创木酚的感官阈值为 2.32 $\mu\text{g/L}$;同时,2006 年,SIEGMUND 等^[55]也报道了在苹果汁中愈创木酚感官检测阈值和识别阈值分别为 0.57 $\mu\text{g/L}$ 和 2 $\mu\text{g/L}$ 。污染脂环酸芽孢杆菌的果汁中愈创木酚的质量浓度范围一般在 10~200 $\mu\text{g/L}$ 之间,这主要与果汁种类、环境条件及菌株类型有关^[15]。显然,在果汁中愈创木酚的污染浓度要远高于其感知阈值,说明果汁中一旦发生脂环酸芽孢杆菌污染,其后果是相当严重的。

卤代酚则产生一种类似苯酚类化合物消毒剂的气味,被描述为“药味”和“消毒水味”。在水介质中 2,6-二溴苯酚和 2,6-二氯苯酚的感官阈值分别是 0.5 ng/L ^[56] 和 6.2 ng/L ^[57],而在果汁中它们的阈值分别为 0.5 ng/L 和 30 ng/L ^[58]。对于脂环酸芽孢杆菌污染的果汁,每升果汁中这 2 种物质的污染浓度可以达到几十纳克(ng/L),该浓度范围虽然不及愈创木酚的污染浓度高,但是仍然比其感官阈值高出很多。

大量学者也对脂环酸芽孢杆菌及其代谢产物的致病性进行了深入研究。2000 年,WALLS 等^[17]将培养的 *A. acidoterrestis* 和 *A. acidocaldarius* 细胞直接注入老鼠的胃中,同时将 *A. acidoterrestis* 污染的

苹果汁直接注入豚鼠的口中,发现脂环酸芽孢杆菌并无致病性。该类微生物所产生的恶臭物质的毒性,笔者通过 SIRI (Safety Information Resources, Inc.) MSDS Index 数据库 (<http://hazard.com/msds/index.php>) 进行了查阅^[5],对脂环酸芽孢杆菌所产恶臭物质的毒理学数据进行了整理,如表 2 (表中测试类型 LD_{50} 、 LD_{50} 、 LC_{50} 分别表示最低致死剂量、半数致死量、半数致死浓度) 所示。我国急性毒性 (LD_{50}) 剂量分级为大鼠口服 0~1 mg/kg 极毒、1~50 mg/kg 剧毒、51~500 mg/kg 中等毒、501~5000 mg/kg 低毒和大于 5000 mg/kg 实际无毒 (GB 15193.3—2014)。根据此毒性物质划分等级,除了 2,4-二溴苯酚为中等毒性外,其他代谢物质均为低等毒性。同时,考虑到对饮料及果汁的日常摄入量,即使喝了污染有脂环酸芽孢杆菌的饮料,对人体的健康也不会产生威胁。

表 2 脂环酸芽孢杆菌所产恶臭物质的急性毒性数据

Tab. 2 Acute toxicity data of chemical substances related to off-flavor produced by *Alicyclobacillus* spp.

化学物质	动物种类	接触途径	测试类型	剂量
愈创木酚	大鼠	皮下注射	LD_{50}	900 mg/kg
	小鼠	静脉注射	LD_{50}	170 mg/kg
	小鼠	吸入	LC_{50}	7 570 mg/m^3
	兔子	皮下注射	LD_{50}	1 250 mg/kg
	兔子	皮肤	LD_{50}	4 600 mg/kg
	豚鼠	皮下注射	LD_{50}	900 mg/kg
	猫	口服	LD_{50}	1 500 mg/kg
	大鼠	口服	LD_{50}	725 mg/kg
2,6-二溴苯酚	大鼠	口服	LD_{50}	$\geq 2\ 000$ mg/kg
2,6-二氯苯酚	大鼠	腹腔注射	LD_{50}	390 mg/kg
	小鼠	口服	LD_{50}	2 120 mg/kg
2,4-二氯苯酚	大鼠	皮下注射	LD_{50}	1 730 mg/kg
	大鼠	腹腔注射	LD_{50}	430 mg/kg
	小鼠	口服	LD_{50}	1 276 mg/kg
	小鼠	腹腔注射	LD_{50}	153 mg/kg
2,4,6-三氯苯酚	大鼠	腹腔注射	LD_{50}	276 mg/kg
	大鼠	口服	LD_{50}	820 mg/kg
2,4-二溴苯酚	小鼠	口服	LD_{50}	282 mg/kg
	大鼠	口服	LD_{50}	50 mg/kg

目前,已知菌株中能产生愈创木酚的菌株有 *A. acidoterrestis*、*A. acidiphilus*、*A. herbarius* 和 *A. hesperidum* subsp. *aigle*, 在这些菌株中,*A. acidoterrestis* 是最主要的愈创木酚产生菌株^[36,42,59-60],许多学者对其产生途径进行了系统的研究。文献中报道可以产生卤代酚的脂环酸芽孢杆菌有 *A. acidoterrestis*、*A. cycloheptanicus* 和 *A. hesperidum*^[61]。目前关于脂环酸芽孢杆菌代谢产生卤代酚的机理研究较少、途径不明晰。最开始

普遍认为果汁中卤代酚的生成可能是由于接触到了含有氯的消毒剂和含有苯酚的水。1999年, FLODIN等^[62]报道了酚类化合物或者酚酸是 *Ulva lactuca* 中溴苯酚生成的一个前体物; 2003年, JENSEN等^[58]从混合果汁中分离到了能产生2,6-二溴苯酚和2,6-二氯苯酚的 *A. acidoterrestis*, 此时人们才对卤代酚的来源有了新的认识。另外, 经过氯处理的水会残留一定的含氯化合物, 如氯气和次氯酸钠等, 而愈创木酚是一类酚类化合物, 当次氯酸钠和酚类化合物在低酸环境下同时存在时, 99.7%的愈创木酚会转化成氯的衍生物^[63], 因此, 愈创木酚的生成也可能促进氯代酚物质的产生。

3 脂环酸芽孢杆菌产物代谢生成途径

3.1 微生物代谢

在果汁、饮料、葡萄酒和奶制品中, 微生物的代谢作用是产生愈创木酚的重要途径之一。除了 *Alicyclobacillus* 属菌株, 目前报道的能够产生愈创木酚的微生物还包括 *B. magaterium*、*B. subtilis*、*Streptomyces setonii* 及其他未鉴定的 *Streptomyces*、*Paecilomyces variotii*、*Rhodotorula rubra*、*Sporotrichum thermophile*、*Pseudomonas acidovorans* 和 *Rahnella aquatilis* 等。这些菌株代谢生成愈创木酚的前体物主要包括香草酸、香草醛和阿魏酸3种酚类物质, 具体的代谢途径如下:

早在1978年, CRAWFORD等^[64]发现来源于土壤的几株 *Bacillus* 和1株 *Streptomyces* 菌可以通过非氧化脱羧反应将香草酸转化为愈创木酚和二氧化碳(图3), 这也是该反应的首次报道。接着, 1999年, CHOW等^[65]研究发现1株分离于土壤样品中的链球菌 *Streptomyces* sp. D7 也可以通过非氧化脱羧反应将香草酸转化为愈创木酚, 并利用双向电泳对其蛋白特性进行了研究, 其中香草酸脱羧酶的编码基因包括3个开放阅读框(Open reading frame, ORF), 分别为 *vdC* B (602 bp)、*vdC* C (1 424 bp) 和 *vdC* D (239 bp)。2000年, JENSEN等^[15]从有烟熏/苯酚气味的腐败巧克力牛奶中分离到了嗜冷菌 *Rahnella aquatilis*, 该菌在超高温瞬时灭菌的巧克力牛奶中低温(4~9℃)培养6d后可以产生50~190 ng/mL的愈创木酚, 但在添加香草醛前后其纯白牛奶中都没有检测到愈创木酚的产生, 因此, 推断在巧克力牛奶中香草酸是愈创木酚产生的前体物而香草醛对其产物代谢影响不大。2003年, ALVAREZ-RODRIGUEZ等^[66]认为软木塞中产生的愈创木酚是导致一些葡萄酒产生不愉快气味的主要原因, 因此对软木橡树皮中的微生物菌群进行了分析, 共分离得到55株不

同的微生物, 其中包括8株酵母、14株丝状真菌或霉菌、13株放线菌和20株非丝状菌, 并对这些菌株的产愈创木酚能力进行了考察, 研究发现: 1株 *B. subtilis* 和3株放线菌(*Streptomyces* sp. A3、*Streptomyces* sp. A5 和 *Streptomyces* sp. A13) 可以利用香草酸产生愈创木酚, 因此细菌对香草酸的降解作用是软木塞中愈创木酚产生的主要原因。2007年, DHAR等^[67]研究发现菌株 *Nocardia* sp. NRRL 5646 也可以通过对香草酸的降解转化产生愈创木酚, 同时对其中的香草酸脱羧酶进行了分离纯化, 系统评价了该酶的基本酶学性质。在所述研究的多种微生物中, 愈创木酚是香草酸代谢的终端产物, 不再被继续利用。另外, 1981年, POMETTO等^[68]研究发现在 *Streptomyces setonii* 75Vi2 菌的作用下香草酸可以脱羧生成愈创木酚, 并通过进一步的脱甲基作用愈创木酚可以转化生成儿茶酚, 最后儿茶酚进一步氧化生成顺-顺式己二烯二酸(图4), 在该代谢途径中, 愈创木酚只是其中的一个中间代谢产物。

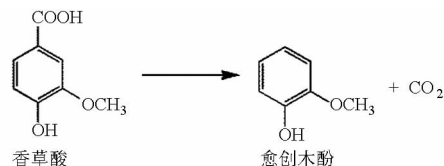


图3 菌株 *B. megaterium* D2d 和 *Streptomyces* 179 中香草酸的代谢途径

Fig. 3 Catabolism of vanillic acid by *B. megaterium* D2d and *Streptomyces* strain 179

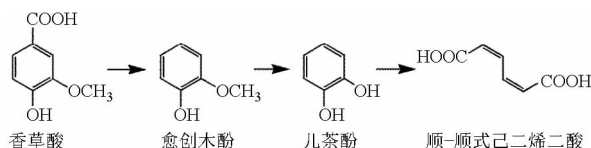


图4 *S. setonii* 75Vi2 中香草酸的代谢途径

Fig. 4 Pathway of vanillic acid catabolism in *S. setonii* 75Vi2

1983年, LEFEBVRE等^[69]对橡木至软木塞整个生产过程中存在的微生物进行了分离, 发现这些菌株主要归类于3个属(*Streptomyces*、*Aspergillus* 和 *Penicillium*), 其中 *Streptomyces* sp. 可以将香草醛转化为愈创木酚, 而香草酸是中间代谢产物^[65](图5)。

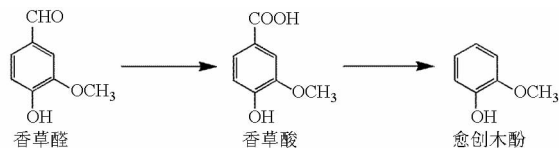


图5 *Streptomyces* sp. 代谢香草醛生成愈创木酚的途径
Fig. 5 Pathways of vanillin metabolism to guaiacol by *Streptomyces* sp.

阿魏酸是木质素主要的降解产物之一, 该化合物能被多种细菌和真菌代谢产生香草酸、香草醛和原儿茶酸等, 这些物质继而被转化成愈创木酚、儿茶

酚和甲氧基对苯二酚等。在有氧条件下 *Rhodotorula rubra* 静息细胞能将阿魏酸转化为香草酸,然后再代谢生成愈创木酚和原儿茶酸;而在氩气存在的环境下,*R. rubra* 可以将阿魏酸转化为3-甲氧基-4-羟基苯乙烯(图6);阿魏酸至香草酸的转化需要 CoA、ATP 和 NAD^+ 的辅助,质谱和 ^{13}C 核磁共振显示 H_2^{18}O 中的氧参与了阿魏酸至香草酸的转化,同时 ^1H - ^{13}C 核磁共振谱证明香草酸转化为愈创木酚的过程中 D_2O 中的氘原子转移至愈创木酚,该结果也说明酮式香草酸互变异构体是该脱羧反应中的一个中间体^[70]。另外,研究发现 *Sporotrichum thermophile* 也可以将阿魏酸转化为愈创木酚,但不同之处是阿魏酸首先进行脱羧反应生成4-乙炔愈创木酚,再经过氧化和脱羧反应生成香草醛和愈创木酚^[71](图7)。在柑橘类产品尤其是橘子汁中,4-乙炔愈创木酚会产生一种“老水果”或“腐烂”的不良风味,大部分微生物将其代谢生成香草醛或香草酸^[16,72-73]。

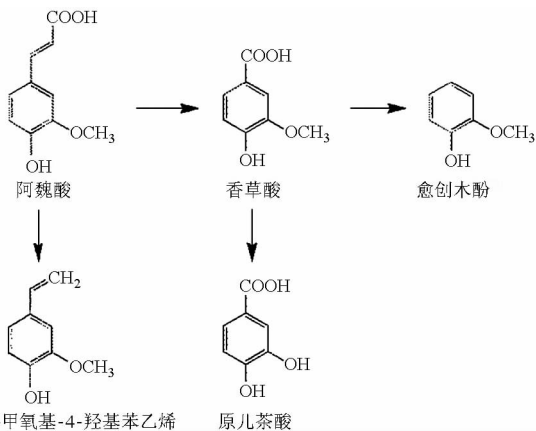


图6 *R. rubra* 代谢阿魏酸至愈创木酚,3-甲氧基-4-羟基苯乙烯和原儿茶酸的途径

Fig. 6 Pathways of ferulic acid metabolism to guaiacol, 3-methoxy-4-hydroxystyrene and protocatechuic acid by *R. rubra*

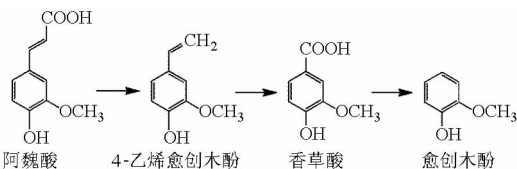


图7 *S. thermophile* 中阿魏酸的代谢途径

Fig. 7 Proposed pathway of ferulic acid metabolism by *S. thermophile*

对以上各代谢途径进行总结,可以得出微生物代谢生成愈创木酚的一般过程,其主要包括3条途径:阿魏酸→香草酸→愈创木酚,阿魏酸→4-乙炔愈创木酚→香草酸→愈创木酚,阿魏酸→4-乙炔愈创木酚→香草醛→香草酸→愈创木酚(图8)。在这3条代谢路径中,香草酸都作为中间产物参与反应,说明香草酸是生成愈创木酚的直接前体物。解析一个

生物代谢途径,除了对代谢产物进行分析外,最关键的是对代谢过程中涉及的酶进行详细系统的研究。通过对酶学性质的研究,可以得出在哪些条件下能够促进或抑制酶促反应的发生以达到代谢调控的目的,而通过分子生物学手段获得酶的相关基因,可以更好地了解酶的作用机理,并可以利用基因工程技术对微生物进行改造,以更有利于或完全阻断某一产物的生成。但截至目前,有关愈创木酚产生过程中相关酶的研究很少,这对有效地利用或控制这些代谢反应是非常不利的。

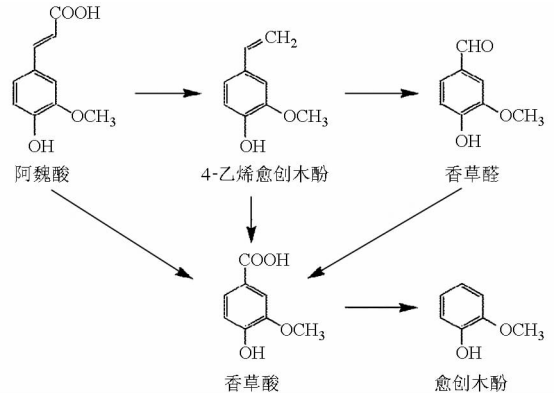
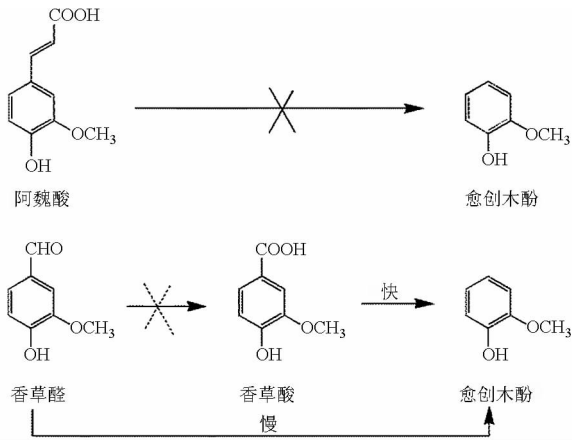
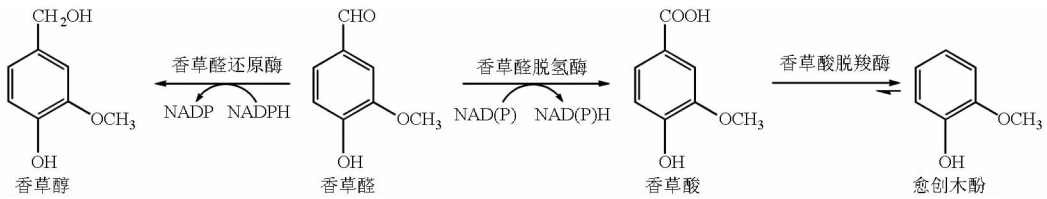


图8 微生物代谢产生愈创木酚的途径

Fig. 8 Microbial production pathways of guaiacol

作为果蔬产品中重要的非致病性微生物,脂环酸芽孢杆菌产生愈创木酚的途径和机理尚不明确,有关报道多是通过对其微生物中愈创木酚产生途径进行分析和推测获得的。2012年,WITTHUHN等^[74]将添加有香草酸、香草醛和阿魏酸的脂环酸芽孢杆菌液体培养基置于密闭容器中,并接种菌株 *A. acidoterrestris* FB2 至终浓度 10^6 CFU/mL,在 45°C 条件下培养7d,每隔24h取样,利用反相高效液相色谱检测样品中愈创木酚的生成及香草醛、香草酸和阿魏酸的消耗。最后发现 *A. acidoterrestris* FB2 只能消耗香草酸和香草醛生成愈创木酚,且香草酸比香草醛生产愈创木酚的速度要快,*A. acidoterrestris* FB2 不能利用阿魏酸产生愈创木酚,其途径如图9所示。当然,生长旺盛的细菌,其底物消耗及产物代谢生成速率过快,不适合代谢过程的研究。

本实验室研究团队以 *A. acidoterrestris* (DSM 3923) 为供试菌种,对脂环酸芽孢杆菌产愈创木酚的前体物进行了筛查,通过生长细胞、静息细胞及细胞破碎等手段并结合 HPLC 和 LC-MS 检测技术对中间代谢产物及相关酶进行了解析。研究结果表明:*A. acidoterrestris* 可以利用香草酸和香草醛产生愈创木酚,但不能代谢儿茶酚、阿魏酸、酪氨酸和苯丙氨酸生成。在 NAD(P)^+ 依赖的香草醛脱氢酶的作用下,*A. acidoterrestris* (DSM 3923) 先将香草醛氧

图9 *A. acidoterrestris* FB2 中愈创木酚的产生途径Fig. 9 Pathway of guaiacol production by *A. acidoterrestris* FB2图10 *A. acidoterrestris* DSM 3923 转化香草酸和香草醛生成愈创木酚的代谢途径Fig. 10 Proposed formation pathway of guaiacol from vanillic acid and vanillin in *A. acidoterrestris* DSM 3923

解进行了系统的研究,并在降解产物中检测到了愈创木酚。1990年,FAIX等^[77]研究发现经高温处理后的木头产生的挥发性物质中含有愈创木酚;2010年,BREBU等^[78]在木质素的热降解产物中也检测到了愈创木酚。1999年,MAYER等^[79]对烘焙咖啡豆中的风味物质进行了分析,共检测到28种化合物,其中愈创木酚的含量在1.67~16.90 mg/kg之间,且随着烘焙温度的升高,愈创木酚的产生量显著提高。同时,在橡木桶的制作过程中需要经过烘烤(分为轻度、中度和重度烘烤)等加工过程,会产生由愈创木酚等物质引起的焙烤类气味,当采用橡木桶酿酒时在热分解的作用下酒会产生愈创木酚,最终在橡木桶陈酿过程中,这些芳香物质会缓慢地释放并融入葡萄酒。

3.3 儿茶酚甲基化作用

在新鲜水果和蔬菜中愈创木酚存在量很少,但它却是西红柿中重要的风味组成成分。2012年,MAGEROY等^[80]研究发现西红柿中愈创木酚的产生是由于儿茶酚的甲基化反应,该过程作用的酶为儿茶酚邻位甲基转移酶(Catechol-O-

化成香草酸,再通过香草酸脱羧酶的非氧化脱羧反应生成愈创木酚,同时还有小部分的香草醛被NADPH依赖的香草醛还原酶转化为香草醇。*A. acidoterrestris* (DSM 3923)中的香草酸脱羧酶是非氧气敏感性的,催化反应不需要辅助因子吡啶核苷酸,并且是可逆的,但脱羧效率要远大于羧化效率,ATP的添加对羧化作用无显著影响^[75]。其代谢途径如图10所示。

3.2 热裂解作用

在烘焙类食品中,木质素在高温条件下可以降解生成阿魏酸和香草醛等酚类物质,这些前体物通过热裂解反应进而生成愈创木酚。1967年,FIDDLER等^[76]通过热失重分析法对阿魏酸的热分

methyltransferase, CTOMT),且需要S-腺苷-L-甲硫氨酸提供甲基,如图11所示。儿茶酚邻位甲基转移酶广泛存在于植物中,同时在微生物中也有报道。1981年,VESER等^[81]利用免疫细胞化学法在真核生物 *Candida tropicalis* 中发现了该酶。2000年,DHAR等^[82]对 *Streptomyces griseus* 中的CTOMT进行了纯化,并对其最适作用pH值和温度、等电点、分子量、动力学参数及催化底物进行了详细的研究,这也是该酶在细菌中的首次报道。

截至目前,脂环酸芽孢杆菌代谢产生愈创木酚的路径基本明确,但是否还有其他的代谢路径,哪些基因参与产物生成调控及具体形成机理还有待进一步探索。

4 脂环酸芽孢杆菌及其代谢产物检测方法

4.1 脂环酸芽孢杆菌常规检测

国际贸易和果汁加工企业对脂环酸芽孢杆菌的检测,大多是采用国际果汁生产商联合会(IFU)和日本果汁协会(JFJA)颁布的平板计数法^[52,83],但不同国家或果汁生产商在检测的培养基种类、培养

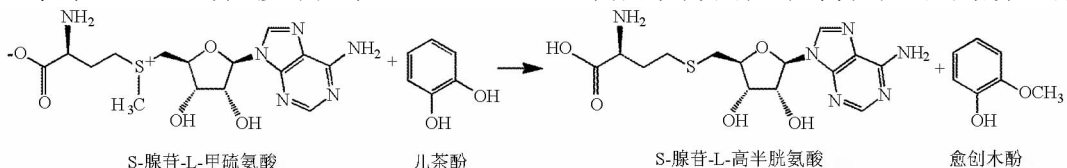


图11 以儿茶酚为底物愈创木酚的合成途径

Fig. 11 Predicted pathway for synthesis of guaiacol from catechol

温度等细节方面又存在一定的差异,图 12(图中,A类:可过滤的样品,如生产用水、清汁、浓缩果汁等;B类:怀疑可能轻度污染(菌落数在 100 CFU/mL 以内)嗜酸耐热菌的,且不能被 0.45 μm 滤膜过滤的样品;C类:怀疑可能重度污染(菌落数 100 CFU/mL 以上)嗜酸耐热菌的,且不能被 0.45 μm 滤膜过滤的样品)是我国陕西海升果业发展股份有限公司对嗜酸耐热菌的检验流程及方法。虽然平板计数法广泛应用于浓缩果汁的生产及出口贸易中,但这种检测方法存在工作量大、耗时长、耗时的缺点,一般需要 3~5 d 才能获得结果,不能满足现代化企业实际生产中实时监测的需求。

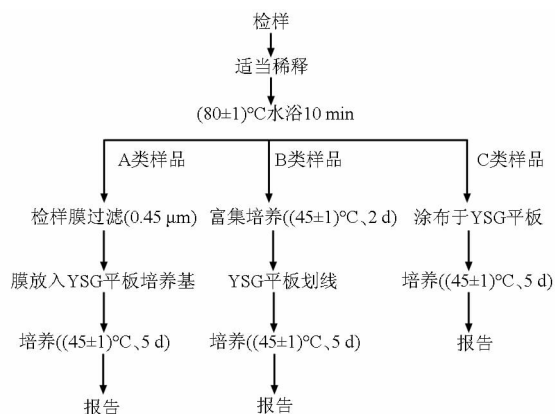


图 12 嗜酸耐热菌检测流程

Fig. 12 Process for detection of thermo-acidophilic bacteria

4.2 脂环酸芽孢杆菌快速检测

脂环酸芽孢杆菌的快速检测一直是果汁生产企业和科研工作者关注和研究的热点。通过多年的不懈努力,众多的科研人员已经建立了多种脂环酸芽孢杆菌快速检测方法,如以酶联免疫吸附检测、聚合酶链式反应为核心的分子生物学检测技术,以红外光谱、近红外光谱和拉曼光谱为核心的振动光谱检测及电子鼻检测等,这些方法的开发为国际贸易和工业化生产中脂环酸芽孢杆菌的检测与控制提供了坚实的理论基础。

(1) 酶联免疫法

酶联免疫检测方法通过抗原与抗体之间的特异性结合反应实现目标物的识别,具有简单、快速、灵敏度高、特异性强等优点,已被广泛地用于食品中有害微生物的检测。本实验室研究团队以灭活的 *A. acidoterrestris* 为抗原,通过对新西兰大白兔的多次免疫,制备获得了特异性的 *Alicyclobacillus* 多克隆抗体,并优化建立苹果汁中 *Alicyclobacillus* 的 ELISA 检测方法,其检测限为 10^5 CFU/mL,用时 6~7 h^[84]。此后,研究团队又将磁性免疫分离与 ELISA、PCR 和 Real-time PCR 相结合,有效缩短了检测时间,并将

检测限降低至 $10 \sim 10^3$ CFU/mL。LI 等^[85-86]建立了一种基于葡萄球菌 A 蛋白的 ELISA 方法,用于检测浓缩苹果汁中的 *A. acidoterrestris*;同时还分别对 Sprague-Dawley 大鼠和日本大耳白兔进行免疫,以此获得的抗体为核心,构建了针对 *A. acidoterrestris* 的双抗体夹心 ELISA 体系,2 种抗体建立的方法其检测限均为 10^5 CFU/mL。2016 年,MAST 等^[87]以 *A. acidoterrestris* 芽孢为抗原对兔子进行免疫,建立了 *A. acidoterrestris* 芽孢的 ELISA 检测方法,其检测灵敏度为 $2.1 \times 10^3 \sim 3.8 \times 10^4$ 芽孢/mL,这种方法具有菌株依赖性。

整体来说,酶联免疫法可用于苹果汁中脂环酸芽孢杆菌的检测,其检测速度快、成本低且结果可靠。但是,针对不同的检测介质和污染菌株,抗原的种类和纯度还有待于进一步研究与提高。此方法与类似于磁性微球等新的分离富集技术的结合,能进一步提高检测效率和精确度。

(2) 基因检测法

细菌的 16S rRNA 存在于染色体基因中,它可以在属和种的水平上区分脂环酸芽孢杆菌。在分子类检测方法中,基于 16S rRNA 序列的脂环酸芽孢杆菌 PCR 快速检测方法研究最多。1996 年,YAMAZAKI 等^[88]以 16S rRNA 的 V2~V4 区间序列为基础,构建了 *A. acidoterrestris* 的反转录 PCR (Reverse transcription-PCR, RT-PCR) 检测体系,其检测限为 10^4 CFU/mL 果汁样品,经过 15 h 培养富集,建立的 RT-PCR 方法检测灵敏度达到 2 CFU/mL。2005 年,CONNOR 等^[89]建立了基于 16S rRNA 序列分析的 Real-time PCR 快速检测方法,其对 *Alicyclobacillus* spp. 的检测灵敏度为 100 CFU/mL,检测时间 5 h。环介导等温扩增技术是一种简便、快速、精确和低价的基因扩增方法,已广泛地用于病原微生物的快速检测,2011 年,CHEN 等^[90]以 16S rRNA 序列为核心,设计了 6 条引物,包括外引物 F3 和 B3、下游内部引物 BIP、上游内部引物 FIP、环引物 LoopF 和 LoopB,实现了 *A. acidoterrestris* 的快速检测,其检测限为 2.25×10^1 CFU/mL,检测需时 2 h。另外,藜烷类物质是脂环酸芽孢杆菌细胞膜的重要组成部分,主要用于维持膜流动性和稳定性,而角鲨烯-藜烷环化酶是该类物质生物合成的关键酶。2004 年,LUO 等^[91]基于 SHC 的编码基因 (*shc*) 建立了苹果汁中 *Alicyclobacillus* spp. 的 Real-time PCR 检测体系,该方法在 3~5 h 内即可实现对样品中浓度小于 10 CFU/mL 的目标菌的检测。

此外,随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析法也是 PCA 分析法的延伸应用,这种方法可在 6 h 内将

A. acidoterrestris 与其他脂环酸芽孢杆菌区分开,且结果与传统生物化学及形态学检测方法一致^[31]。依据基因探针可进入脂环酸芽孢杆菌细胞内并与其 rRNA 结合这一原理,2003 年,THELEN 等^[92] 使用 VIT-*Alicyclobacillus* 检测水果浓缩汁中的脂环酸芽孢杆菌,检测限为 1 CFU/mL。*A. acidoterrestris* 及其他的脂环酸芽孢杆菌可显现不同的颜色,通过荧光显微镜可清晰区分开。

(3) 光谱学分析法

振动光谱技术可以提供微生物细胞中蛋白质、多糖、脂质、核酸及其它生物大分子等多种成分分子振动信息,所得光谱具有高度的特异性,有“指纹图谱”之称,将该技术与多元统计分析方法相结合,可以对微生物进行快速检测^[93-95]。脂环酸芽孢杆菌有别于其它属细菌的一个重要特征是细胞膜中含有 ω -环状脂肪酸,这为使用振动光谱技术检测该菌提供了可能和依据。2005 年,LIN 等^[96] 采集了 8 株 *Alicyclobacillus* spp. 的红外光谱,发现它们的指纹区在 $800 \sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$ 之间,并通过主成分分析实现了脂环酸芽孢杆菌的鉴别。2009 年,GRASSO 等^[97] 使用疏水网格滤膜技术对细菌进行过滤,50℃ 条件下在橙血清琼脂培养基中培养 36 ~ 48 h,收集测试菌株的衰减全反射红外光谱,并采用多变量分析法优化建立了适用于 *Alicyclobacillus* spp. 鉴别分析的光谱模型,验证试验结果表明构建的红外光谱模型对目标菌的识别准确率为 100%。相似地,2015 年,AL-HOLY 等^[98] 将红外光谱与主成分分析、簇类独立软模式法等多元统计分析方法相结合实现了 *Bacillus* 与 *Alicyclobacillus* 属间和属内不同种的区分。同时,本研究团队还考察了近红外光谱及拉曼光谱对脂环酸芽孢杆菌进行检测的可行性,FT-NIR 与线性判别分析相结合建立的 LDA 判别模型可以有效地进行 *Alicyclobacillus* 的种间分类鉴定,准确率为 86.7%;而根据 Raman 光谱建立的 LDA 判别模型对不同株 *Alicyclobacillus* 的鉴别准确率为 85%^[95,99-101]。

尽管近红外光谱分析法检测快速准确,但是这项检测技术仍处于发展阶段,需要建立一个更完善的比对数据库以区分那些还未被分类的脂环酸芽孢杆菌。

(4) 气味指纹图谱检测法

气味指纹图谱检测主要是通过电子鼻模拟人类嗅觉系统实现样品中气体或挥发性成分的定性或定量检测。与一般的化学仪器分析不同,电子鼻给出的不是被测样品中某种或某几种成分的响应值,而是样品的整体嗅觉信息,因此,在食品品质在线监

控、食品溯源、农药检测及有害微生物检测等方面有很好的应用前景^[102-103]。

2010 年,GOBBI 等^[104] 采用配备有金属氧化物半导体传感器阵列的电子鼻系统对人工污染有 *A. acidoterrestris* 和 *A. acidocaldarius* 的桃汁、橘子汁和苹果汁进行检测,结果发现培养 24 h 后,电子鼻可以检测到 *Alicyclobacillus* spp. 的存在,该试验结果也表明将电子鼻技术用于脂环酸芽孢杆菌的检测是可行的。CAGNASSO 等^[105] 对 *A. acidoterrestris* 的电子鼻检测能力做了进一步的评估和确认,得出电子鼻技术对橘子汁和桃汁中目标菌的检测限为 10^3 CFU/mL,而对苹果汁中的目标菌检测限为 10^5 CFU/mL,通过偏最小二乘回归建立的方程可以准确预测样品中 *A. acidoterrestris* 的浓度。CONCINA 等^[106] 报道了电子鼻可以对污染有 *Alicyclobacillus* spp. 的商业调味饮料进行早期诊断,可识别的最低细菌浓度为 10 CFU/mL,且判定准确率接近 100%。2013 年,文献[107]报道,NST3320 型电子鼻可以检测被脂环酸芽孢杆菌污染了不同培养时间、不同温度的果汁样品。2015 年,许灿等^[108] 利用 Fox-4000 型电子鼻检测结合主成分分析可识别被脂环酸芽孢杆菌污染的玉米蜜桃复合果汁饮料,正常样品与被污染样品间的模式判别指数大于 79%,且在以正常饮料样品为基础建立的统计质量控制模型中,异常饮料样品位于置信区间之外,表明该电子鼻可准确区分正常和被脂环酸芽孢杆菌污染的复合果汁样品。本实验室团队研究发现通过电子鼻检测与线性判别分析的结合,可以对 *A. acidoterrestris* 污染的苹果汁进行有效识别,此时菌体的最小浓度为 200 CFU/mL^[109]。

4.3 代谢产物检测

脂环酸芽孢杆菌的代谢产物有愈创木酚、2,6-二氯苯酚和 2,6-二溴苯酚等 3 种,而愈创木酚是其主要的代谢产物,痕量的愈创木酚(2 $\mu\text{g/L}$)即可给果汁带来不愉快的气味,因此对检测方法的灵敏度要求极高。目前,愈创木酚的检测分析方法主要有过氧化物酶法、高效液相色谱法和气质联用法。

(1) 过氧化物酶法

愈创木酚在 H_2O_2 和过氧化物酶的参与下可以转化成褐色的四聚愈创木酚,通过检测反应混合液在 470 nm 下的吸光度变化实现对愈创木酚的快速定性及定量检测^[26]。基于此原理,日本 Kyokuto 制药有限公司已经研制出了商业化的愈创木酚检测试剂盒。这种试剂盒由一些培养基、溶液和一些酶催化反应所需的试剂组成。该试剂盒能识别样品中的愈创木酚及产愈创木酚的脂环酸芽孢杆菌菌体,将

样品的吸光度与愈创木酚的标准吸光度曲线作比较, 可实现对愈创木酚的定量检测^[110]。过氧化物酶法适用于愈创木酚含量较高样品 (mg/L 级别) 的检测, 因此, 在培养基中加入前体物香草酸, 脂环酸芽孢杆菌则可在较短的时间内将香草酸转化生成高浓度的愈创木酚, 该方法常用于脂环酸芽孢杆菌产愈创木酚的能力评价和定性检测。

(2) 色谱分析法

高效液相色谱法和 GC-MS 法是愈创木酚检测中比较常用的方法。2000 年, ORR 等^[54] 利用 SPME-GC-MS 检测被 *A. acidoterrestris* 污染的苹果汁中的愈创木酚。在样品中加入适量 NaCl 以增加挥发性成分的扩散析出, 在 60℃ 萃取 60 min, 最终测得愈创木酚识别阈值为 2.23 μg/L。此外, 还发现这种条件下的 SPME-GC-MS 检测比 BET 法更灵敏。2004 年, ZIERLER 等^[111] 利用顶空固相微萃取法提取果汁中的愈创木酚, 并对萃取头 (DVB/CAR/PDMS 2 cm 和 CAR/PDMS 1 cm)、加盐种类、萃取时间和温度进行了优化, 研究结果表明: 取 0.5 mL 苹果汁加水 4.5 mL 进行稀释, 并加入 2.5 g Na₂SO₄, 在 60℃ 条件下恒温预热 10 min, 采用 DVB/CAR/PDMS 萃取头 (50/30 μm) 60℃ 下萃取 30 min, 最后进行 GC-MS 检测, 其升温程序为 8℃/min, 在此条件下愈创木酚的 LOD 和 LOQ 分别为 0.29 μg/L 和 1.06 μg/L。2005 年, GOCMEN 等^[61] 检测被脂环酸芽孢杆菌污染产生药水味的橙汁, 将样品在 40℃ 静置 15 min 使顶空挥发达到平衡, 用 50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS 固相微萃取头在 40℃ 萃取 30 min; 此外, 还比较了 GC-O 和 GC-MS 检测被脂环酸芽孢杆菌污染的橙汁中的愈创木酚、2,6-DBP 及 2,6-DCP 的效果, 发现上述 2 种检测方法所获得的被测物的峰面积均大于 FID 检测法所获得的对应峰面积, 因此, 认为 GC-O 检测法可实现对复杂基质中被测组分的定性识别。本研究团队建立了 HPLC 对愈创木酚的检测方法, 其最低检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 0.10 mg/L 和 0.35 mg/L^[75]。与过氧化物酶法相比, HPLC 和 GC-MS 法的检测灵敏度更高, 因此更适用于低浓度愈创木酚的检测。

5 脂环酸芽孢杆菌控制方法

在浓缩果汁的出口贸易中, 要求脂环酸芽孢杆菌不得检出, 那么脂环酸芽孢杆菌污染控制显然已成为全世界各果汁生产厂家最迫切的需求。针对果汁生产中脂环酸芽孢杆菌污染环节不同, 所使用的控制方法也应不同, 每一种控制方法的使用都应结合果汁的实际生产过程相结合。浓缩果汁及即饮果汁

生产的一般流程为: 果园中的果实收获→运输→储藏→果汁生产厂接收→清洗→选择→压榨果汁→澄清/过滤→脱色/脱涩→巴氏杀菌→浓缩→批次罐暂存→后巴杀/灌装→浓缩果汁→原料的接收→储存→调配→巴氏杀菌/灌装→(即饮果汁) 保藏和销售^[2,42]。脂环酸芽孢杆菌进入浓缩果汁的第一个途径为粘附有土壤的原料果, 对于即饮果汁则是原始浓缩果汁或配料 (如糖浆), 除了可能的源头污染, 近 20 年各国学者对果汁生产线上脂环酸芽孢杆菌的分离鉴定研究也表明该菌广泛分布在果汁加工环境中。根据这类菌在每个环节的污染存在情况, 欧盟果蔬汁协会 (AIJN) 确定了果汁生产过程中的关键控制点^[112], 如表 3 所示。虽然在果实运输、储藏及果汁生产的每个阶段都有可能污染脂环酸芽孢杆菌, 但目前报道的控制方法主要针对原料果清洗、巴氏杀菌 (新型杀菌技术的开发) 以及果汁终产品防腐 3 个环节。

表 3 果汁加工过程中脂环酸芽孢杆菌的关键控制点

Tab.3 Recommended critical control points for *Alicyclobacillus* spp. at various stages of juice processing

产品	加工阶段	控制点
浓缩果汁	果实收获及运输	落果; 盛放果实的容器、中间的储藏和运输
	接收和处理	表面很脏或粘有很多外来物 (如树叶或草) 的果实
	储藏	储存所用的房屋、温度及技巧
	清洗和分类	水槽; 清洗和喷淋用水
	果汁压榨	榨汁用水; 清洗设备用水
	澄清/过滤	清洗效率和膜的完整度
	脱色或脱涩	所用树脂的清洗效果
	巴氏杀菌	温度、保持时间及程序设置
	浓缩	温度条件
	灌装和储藏	顶部空间的控制; 灌装完快速降温; 储存温度低于 20℃
即饮果汁	浓缩苹果汁原料	储藏温度
	调配	所用配料的质量; 愈创木酚前体物的监控
	储藏	温度条件; 顶空及氧气控制
	巴氏杀菌	温度条件
	灌装	温度条件
	物流储运	温度低于 20℃

5.1 原料果中脂环酸芽孢杆菌的控制

由于脂环酸芽孢杆菌来源于土壤, 果园中的果实很容易粘附携带有脂环酸芽孢杆菌的土壤, 而一旦这些原料果进入车间, 在果汁后续加工过程中很难去除, 因此, 对原料果彻底有效的清洗是防止脂环酸芽孢杆菌污染尤为重要的一步。目前有研究者将一些化学消毒剂用于清洗原料果, 主要包括次氯酸、

二氧化氯、过氧化氢、过氧乙酸等。

(1) 次氯酸

次氯酸是一种强氧化剂,常用作自来水管厂的消毒,同时也是食品工业中使用最广泛的化学消毒剂,可以有效地杀灭果蔬中的食源性致病菌和芽孢杆菌等^[113-114]。2000年,ORR等^[54]研究发现当次氯酸钠质量浓度低于200 mg/L时,对*A. acidoterrestis*芽孢无明显的杀菌作用;当质量浓度增至1 000 mg/L时,可以使悬液中的芽孢数量降低6个数量级,但该质量浓度作用于苹果表面时,芽孢数仅下降了2.4个数量级(处理时间均为10 min)。2009年,PODOLAK等^[115]将接种有*A. acidoterrestis*芽孢的苹果汁涂于不锈钢片上,晾干后在不同温度下用不同质量浓度的次氯酸钠进行杀菌处理,结果表明:随着次氯酸钠质量浓度增加(200~2 000 mg/L),接触时间增长(1~2 min),杀菌作用也逐渐增强;当次氯酸钠质量浓度为2 000 mg/L、温度为90℃条件、处理时间为2 min时对菌体芽孢的去除效果最好,芽孢数降低了2.32个数量级。2013年,DOS ANJOS等^[116]首先评价了*A. acidoterrestis*在生产橘子汁所用设备上的吸附及菌膜的形成,并考察了次氯酸钠对菌膜的杀菌效果,结果表明不锈钢和尼龙表面对细胞的吸附能力要强于聚氯乙烯表面,次氯酸钠对*A. acidoterrestis*芽孢的最小抑制质量浓度(MIC)为3 600 mg/L,当浓度为最小抑制质量浓度的2倍时,处理10 min后不锈钢、尼龙和聚氯乙烯表面的芽孢分别降低了1.74、1.31和1.57个数量级。而2009年,FRIEDRICH等^[117]报道了在所测试的所有浓度与时间的组合中,次氯酸钠对不锈钢、橡胶和木制品表面的脂环酸芽孢杆菌芽孢都没有明显的去除效果。

(2) 二氧化氯

二氧化氯是一种强氧化剂,是国际上公认为安全、无毒的绿色消毒剂,美国食品和药品管理局(FDA)于1998年已经允许液态二氧化氯用于水果和蔬菜表面清洗。2004年,LEE等^[118]考察了液态二氧化氯对水溶液中及苹果表面*A. acidoterrestis*芽孢的杀灭效果,结果表明:80 mg/L和120 mg/L二氧化氯处理5 min时,水溶液中的芽孢已降至检测限以下(小于0.7 lg CFU/mL);当将二氧化氯应用于苹果表面时,120 mg/L质量浓度下处理1 min后,已检测不到芽孢的存在(检测限为2 lg CFU/ml)。但此部分研究存在的问题是:记录的是用于洗涤苹果的杀菌液中的芽孢数量,而实际残留在苹果表面的芽孢并未考虑。2009年,FRIEDRICH等^[117]使用液态二氧化氯对食品接触表面的脂环酸芽孢杆菌芽

孢进行处理,发现质量浓度100 mg/L、处理10 min后,不锈钢和橡胶表面的芽孢分别下降4.5和3.3个数量级,而二氧化氯对木制品表面的芽孢去除效果不显著。本研究团队考察了二氧化氯单独处理或与超声波及振荡联合处理对苹果表面*A. acidoterrestis*芽孢去除作用,结果表明:二氧化氯耦合振荡法去除效果最好,当二氧化氯添加质量浓度为200 mg/L、振荡频率为200 r/min时,处理20 min后可以全部杀灭苹果表面的芽孢^[119]。

(3) 过氧化氢

过氧化氢消毒液无毒无味无残留的特性及高效的杀菌效果,使其在食品行业中尤其是乳品、饮料、果汁、啤酒、饮用水、水产品及果蔬等食品的生产加工过程中有着广泛的应用。1995年,张文福等^[120]考察了不同条件下过氧化氢对细菌芽孢的杀菌效果,以枯草芽孢杆菌黑色变种的芽孢为试验材料,研究了处理时间、浓度、温度、pH值和有机物对过氧化氢杀灭作用的影响,结果表明:10%过氧化氢溶液对该芽孢的D值(D表示在规定的温度下,杀死90%细菌数所需的时间)为12.04 min,n值(浓度系数)为1.13,Q₁₀值(每降低10℃作用时间需增加的倍数)为2.43,且pH值越低杀菌效果越好,而有机物对其杀灭作用无显著影响。2000年,ORR等^[54]分别用不同浓度的过氧化氢处理芽孢悬液和苹果表面的*A. acidoterrestis*芽孢,当过氧化氢质量分数为2%时,可以有效杀灭游离的芽孢,菌落数降低了5个数量级,但2%过氧化氢不能显著地去除苹果表面的芽孢。

(4) 电解水

电解水是含氯化钠等盐类的水经电解后所生成的产物,可分为碱性、中性和酸性电解水,后两者具有消毒和杀菌作用。酸性电解水的pH值一般小于2.7,腐蚀性大,不耐久存,且在制备过程中会有少量氯气污染,因此,在一定程度上限制了其推广应用。中性电解水对皮肤无刺激性,与有机物反应后被还原成为普通水,且其杀菌成分主要为次氯酸,具有安全、无残留、高效、快速和广谱杀菌的特点^[121-122]。2014年,TORLAK^[123]研究发现中性电解液对水溶液中*A. acidoterrestis*芽孢处理1 min后,芽孢数量显著降低,而当作用时间延长至5 min时,芽孢的减少量超过了5个数量级;当作用于苹果表面时,在振荡条件下(50 r/min)处理3 min后,芽孢数下降了4个数量级。

除了以上几种食品中常用的表面消毒剂,亚氯酸、磷酸三钠、季铵盐和过氧乙酸等对脂环酸芽孢杆菌的杀灭研究也有报道。当亚氯酸钠的质量浓度为

1 200 mg/L 时, 处理 10 min 后, 水溶液中游离 *A. acidoterrestris* 芽孢的数量降低了 1.53 个数量级, 而作用于苹果时, 残留于表面的芽孢未明显减少。磷酸三钠对 *A. acidoterrestris* 芽孢无显著杀灭效果, 即使质量分数升高至 12% 时, 水溶液中芽孢数也未明显下降^[54]。2013 年, DOS ANJOS 等^[116] 报道了季铵盐和过氧乙酸对 *A. acidoterrestris* 芽孢的最小抑制质量浓度分别为 500 mg/L 和 2 000 mg/L, 当浓度为最小抑制质量浓度的 2 倍时, 处理 10 min 后季铵盐使不锈钢、尼龙和聚氯乙烯表面的芽孢数量分别降低了 1.83、1.71 和 1.79 个数量级, 而过氧乙酸的杀灭效果分别为 2.03、2.97 和 2.63 个数量级。

截至目前, 在消毒剂对脂环酸芽孢杆菌芽孢杀灭的研究中, 主要集中在各个消毒剂的杀灭效果, 但对其杀灭机理还未见有明确的报道。另外, 普遍存在的一个问题是消毒剂对水溶液中游离芽孢的杀灭效果很好, 而一旦作用于食品或食品接触表面时, 杀灭效率大大降低。这是由于水果表面常吸附有一些带电荷的离子和大分子, 而细菌细胞和芽孢表面也有一定的电荷, 甚至还有一些毛状结构, 当细胞与水果表面接触时, 则会由于疏水作用、范德华力、静电引力等使细胞吸附于表面, 本来杀菌液可以从各个方向对细胞进行破坏, 而现在只能从局部方向进行作用, 从而降低了杀菌效果。为了解决这一问题, 还需要在处理过程中辅以超声波或振荡作用, 使吸附于表面的细胞在外力的作用下更好地进入杀菌液中, 以提高杀菌效果。

5.2 非传统杀菌技术对脂环酸芽孢杆菌的控制

长期以来, 巴氏杀菌是果汁行业最主要的灭菌消毒方法, 在该杀菌条件下果汁中常见的酵母菌、霉菌和乳酸杆菌都可以得以控制, 而由于脂环酸芽孢杆菌芽孢的抗热性, 这类菌则可以存活下来。因此, 大量研究开始致力于开发新型的杀菌技术, 即可有效地杀灭脂环酸芽孢杆菌, 同时又要最大程度地保留果汁的品质和营养, 以替代传统的巴氏杀菌。目前, 用于脂环酸芽孢杆菌的物理杀灭技术主要分为: 超声波、微波、射频、欧姆加热等为代表的非传统加热方法和以辐照灭菌、超高压灭菌等为代表的非热方法。

5.2.1 非传统加热法

(1) 超声波方法

超声波的杀菌机制主要是由其产生的空化作用以及由此引起的局部高温、高压及自由基的产生等一系列后续效应使液体中的微生物细胞受到破坏甚至死亡。2009 年, YUAN 等^[124] 考察了超声波对苹果汁中 *A. acidoterrestris* 营养细胞的杀灭作用, 结果发现随着功率的升高和处理时间的延长, 杀灭效果

也逐渐增强; 在功率 300 W 条件下, 处理 30 min 可杀死 60% 的细胞, 而处理 60 min 后, 致死率超过了 80%; 同时作者还报道了超声波处理对苹果汁的品质无不利影响。2010 年, WANG 等^[125] 研究了超声波在不同功率和处理时间下对苹果汁中脂环酸芽孢杆菌的杀菌效果及杀菌动力学模型, 以相对均方差和决定系数为衡量指标考察了 Weibull 分布函数、Loglogistic 模型、修正的 Gompertz 方程和双相线性模型拟合的效果, 结果表明: 600 W 超声波作用 30 min, 苹果汁中 *A. acidoterrestris* 的数量降低了 4.56 个数量级, 而 Weibull 分布函数和双相线性模型能更好地拟合超声波对 *A. acidiphilus* (DSM 14558) 和 *A. acidoterrestris* (DSM 3922) 这 2 株菌的杀灭曲线。

(2) 微波方法

微波灭菌是热效应和非热效应(主要是破坏细胞膜)联合作用的结果。2010 年, GIULIANI 等^[126] 考察了微波处理对奶油芦笋中 *A. acidoterrestris* 芽孢的杀灭作用及对产品中脂肪成分的氧化作用, 结果发现当功率为 900 W、频率为 2 450 MHz 时, 处理 5 min 可使奶油芦笋中的芽孢浓度下降 2 个数量级, 并且通过杀菌多项式方程的建立得出杀菌效果与微波的功率及作用时间有关; 同时还检测了样品中脂类成分的初级和次级氧化指标, 得出微波处理对脂类成分影响很小, 尤其在低功率的情况下, 这也表明微波不影响奶油芦笋的口感。

(3) 射频技术

射频(radio frequency)是频率范围为 3 kHz ~ 300 MHz 的电磁波, 它能穿透到物料内部, 使物料内部的带电离子在不断颠倒的极化作用下快速振荡迁移和摩擦, 从而将电能转化为热能, 达到加热的目的^[127-128]。射频杀菌主要用于含水率较低的固体食品的杀菌, 但也有应用于果汁产品的报道。虽然射频杀菌还处于实验室研究阶段, 但它作为一种新型的杀菌技术, 有着节能、高效、环保及不与杀菌样品直接接触等优点, 在食品杀菌领域有着很好的应用前景^[129]。2015 年, 张江波^[130] 考察了射频处理对猕猴桃汁中脂环酸芽孢杆菌芽孢的杀灭作用, 结果表明射频处理对芽孢的杀灭效果要显著强于传统加热(水浴), 且与细菌素联合时有明显的复合作用。

(4) 欧姆加热法

欧姆加热是一种接触加热方法。与上述 3 种非接触的电磁波加热方法不同, 欧姆加热通过加热室两端的电极直接让电流通过物料内部, 从而使物料加热。所以, 除具有一般的热效应外, 欧姆加热还可以产生电穿孔效应, 从而使微生物细胞膜破裂, 细胞

内容物流出,最终导致细胞死亡^[131]。耿敬章等^[132-133]研究了不同温度、pH值、电压、处理时间、加热体积和可溶性固形物含量下,欧姆加热对苹果汁中 *A. acidoterrestris* 营养细胞的杀灭效果,结果发现:随着温度、电压、加热体积的增大菌体杀菌率呈现增大趋势;随着 pH 值的降低菌体杀灭率升高;随着可溶性固形物含量的增加先增大后减小,但加热时间长短对杀菌效果无显著影响,最后得出了最优的杀菌条件为温度 70℃、pH 值 3.5、电压 250 V、液面高度 10 cm 和可溶性固形物含量 10 °Brix,在该条件下可以 100% 杀灭苹果汁中的 *A. acidoterrestris*;同时,作者还考察了欧姆加热对苹果汁品质的影响,结果显示苹果汁的各项理化指标(如 pH 值、透光率、色值和浊度等)均无显著性变化。2009 年,UEMURA 等^[134]自行研制了一台高场强交变电流加热系统,并将其用于杀灭橘子汁中的 *A. acidoterrestris* 芽孢,研究结果表明该欧姆加热系统的杀菌效果要强于传统加热,在保温时间段内,其杀菌速度相当于传统加热的 30 倍。相似地,2010 年,BAYSAL 等^[135]应用一台静态欧姆加热系统对橘子汁中的 *A. acidoterrestris* 芽孢进行杀灭处理,在电压梯度 50 V/cm、温度 90℃ 条件下,处理 10 min 后芽孢减少量比传统加热条件下高出 4 个数量级。

5.2.2 非热杀菌技术

(1) 辐照杀菌技术

辐照杀菌是一种高效节能的新型杀菌技术,在食品工业中最常用的是紫外线和 γ 射线,紫外线根据波长的不同,可分为长波、中波和短波紫外线,而其中起灭菌消毒作用的是短波紫外线。2013 年,BAYSAL 等^[136]研究了不同紫外线强度、处理时间下短波紫外线对白葡萄汁和苹果汁中 *A. acidoterrestris* 芽孢的杀灭效果及杀菌动力学模型,并以相对均方差和决定系数为衡量指标考察了 Weibull 分布函数和对数线性模型的拟合效果,结果表明:在紫外强度为 1.31 mW/cm² 时杀菌效果最好,白葡萄汁中芽孢的下降数量为 5.5 个数量级,苹果汁中的芽孢数降低了 2 个数量级,相比于 Weibull 分布函数,对数线性模型能更好地拟合短波紫外线对 *A. acidoterrestris* 芽孢的杀灭曲线。2014 年,LEE 等^[137]研究了 γ 射线对苹果汁和橘子汁中 *A. acidoterrestris* 芽孢的杀灭作用,结果发现随着剂量的增加杀菌效果呈现增强趋势,在 10 kGy 剂量下,芽孢的减少量为 4 个数量级,且辐照处理后果汁的水活度和 pH 值均无显著改变;通过测定样品的亨特色度值发现果汁的颜色受到一定的影响,其中亮度值和黄色度值稍有增加,而红色度值则都呈减小趋势。

(2) 高压控制法

高压控制方法主要包括高压均质和高静水压 2 种。高压均质利用超高压对液体食品的挤压,以及压力释放时产生的强烈剪切和高速撞击等,破坏微生物细胞的结构从而达到杀菌的目的。2007 年,BEVILACQUA 等^[138]采用高压均质处理对培养基中的 *A. acidoterrestris* 进行杀灭,结果显示杀菌效果具有一定的菌株依赖性,这可能是由于不同菌株的分离环境不同,且细胞膜表面的脂肪酸分布不同,导致其对高压均质的抗性不同。该研究团队在后续的另一篇报道中得到了类似的试验结果,并且发现营养细胞较之于芽孢对高压均质处理更敏感;同时,作者还根据储藏试验推断,高压均质不会造成任何亚致死性损伤^[139]。相比于通常的高压均质处理条件(0~200 MPa,0~10 ms)和杀菌效果(0~1 lg CFU/mL),高静水压处理压力更高(大于 200 MPa)、时间更长(大于 10 min),因此杀菌作用也更强(3~5 lg CFU/mL)。2003 年,ALPAS 等^[140]考察了高静水压对培养基、橘子汁、苹果汁和番茄汁中 *A. acidoterrestris* 的杀灭效果,结果显示随着压力的升高及处理时间的增长,活细胞的数量逐渐降低,在压力 350 MPa、温度 50℃ 条件下处理 20 min 后,各测试介质中营养细胞的减少量均超过 4 个数量级。2005 年,BUZRUL 等^[141]研究表明 Weibull 模型可以很好地预测不同压力和温度下高静水压对培养基中 *A. acidoterrestris* 营养细胞的杀菌效果。2012 年,VERCAMMEN 等^[142]考察了不同压力、pH 值和温度下高静水压对缓冲液及番茄汁中 *A. acidoterrestris* 芽孢的萌发和杀灭作用,结果显示在低压、中温和高 pH 值条件下处理 10 min,高静水压主要刺激缓冲液中的芽孢萌发,其中发芽的数量超过 2 个数量级;而在高压、温度 60℃、pH 值 4.2 条件下处理 10 min 后,高静水压对番茄汁中的芽孢表现出明显的杀菌效果,芽孢数量降低了 3.5 个数量级。相似地,2012 年,SILVA 等^[29]在 600 MPa、65℃ 高静水压条件下对橘子汁处理 10 min,样品中 *A. acidoterrestris* 芽孢的数量下降了 2.5 个数量级。2013 年,SOKOŁOWSKA 等^[143]在 200 MPa、50℃ 高静水压条件下对苹果汁中的 *A. acidoterrestris* 芽孢处理 30~45 min,芽孢数减少了 3~4 个数量级。2013 年,HARTYÁNI 等^[107]采用电子鼻技术评价了高静水压处理对果汁品质的影响,结果显示在 28 d 的储藏时间内,果汁的 pH 值、颜色和挥发性物质无显著变化。

(3) 超临界二氧化碳

超临界二氧化碳杀菌技术是一种新型的非热杀菌方法,以廉价无毒的天然抗微生物剂二氧化碳作

为杀菌介质。2009 年,BAE 等^[144]将该技术用于对苹果汁中 *A. acidoterrestris* 芽孢的杀灭,并考察了温度、压力和处理时间对致死效果的影响,结果显示在 65℃、100 bar 处理 40 min 及在 70℃、80 bar 处理 30 min 时均可将芽孢数降至检测限以下,并且超临界二氧化碳处理对苹果汁的品质无任何影响。

非传统杀菌技术研究目前依然处于实验室研究阶段,要想在现代化食品工业中大规模应用,还需要在效果评价及杀菌机理上进一步完善,并开发获得针对不同产品类型的机械设备,所以以非传统杀菌技术取代巴氏杀菌技术并大规模推广应用还需要很长时间,其在理论上需要进一步研究拓展,在机械装备研发方面还需要投入大量的精力。

5.3 天然化学物质或防腐剂对脂环酸芽孢杆菌的控制

5.3.1 天然化学物质

(1) Nisin

Nisin 由 *Lactococcus lactis* supsp. *lactis* 产生,是一种天然、高效、安全的抗菌肽,可以有效地杀灭或抑制引起食品腐败的革兰氏阳性菌。将 Nisin 用于控制脂环酸芽孢杆菌的报道很多,研究内容主要集中在最小抑菌浓度、对细胞抗热性的影响及杀菌动力学模型建立等方面。1999 年,KOMITOPOULOU 等^[145]发现在 80 ~ 95℃ 的作用条件下 Nisin 可使 *A. acidoterrestris* 的 *D* 值减小 40%;在 25℃ 条件下,其对脂环酸芽孢杆菌芽孢最小抑菌浓度为 5 IU/mL。2000 年,YAMAZAKI 等^[146]研究发现当 pH 值为 3.4 时,Nisin 对 *A. acidoterrestris* 营养体细胞和芽孢的最小抑菌浓度分别为 1.56 ~ 50 IU/mL 和 0.78 ~ 12.5 IU/mL;当 pH 值为 4.2 时,Nisin 对其营养体细胞及芽孢的最小抑菌浓度均为 25 ~ 100 IU/mL,从该试验结果可以看出低 pH 值条件下,Nisin 的杀菌效果更好,且芽孢比营养细胞对 Nisin 更敏感;同时,作者还发现在商品化的苹果澄清汁中,当 Nisin 添加量大于 600 IU/mL 时仍无抑菌效果,但在橘子汁和混合果汁饮料中,25 ~ 50 IU/mL 的 Nisin 即可抑制 *A. acidoterrestris* 芽孢的生长,这可能是由于苹果澄清汁中的某些成分与 Nisin 结合反应从而降低了抑菌效果,而未澄清果汁中的多酚类物质与 Nisin 可能有协同杀菌作用。文献^[147]报道了 Baranyi & Roberts 模型和 Logistic 模型分别可以拟合含有 Nisin 的橘子汁及苹果汁中的 *A. acidoterrestris* 再生长曲线,而二阶多项式模型可以用于预测添加有 Nisin 的浓缩橘子汁中 *A. acidoterrestris* 芽孢的抗热性。

(2) 多肽类抑菌素

目前,除了 Nisin 以外,其它种类的多肽类抑菌

素对脂环酸芽孢杆菌的控制也有报道。2002 年,OITA 等^[148]报道了在 5 ~ 10 μg/mL 质量浓度水平下,分离于大麦和小麦胚乳的抗菌肽 α-thionins 和 β-thionins 可以抑制培养基中 *A. acidoterrestris* 的生长;而当添加量为 20 μg/mL 时,小麦来源的 α-thionins 多肽可以抑制橘子汁和水果蔬菜混合汁中该菌的生长,但介质为含有 30% 苹果汁的饮料时,效果较差。细菌素 enterocin AS-48 来源于菌株 *Enterococcus faecalis* A-48-32,当添加质量浓度为 2.5 μg/mL 时,可以使含有脂环酸芽孢杆菌的果汁保存 60 ~ 90 d,保藏时间的长短与果汁种类、温度、接种细胞或芽孢数量有关。2005 年,MINAMIKAWA 等^[149]通过琼脂平板小孔扩散法发现分离于 *Staphylococcus warneri* RB4 的 warnericin RB4 对酸土和酸热脂环酸芽孢杆菌有抑制作用,并指出其在果汁及饮料行业有广阔的应用前景。2008 年,DE CARVALHO 等^[150]考察了来源于 *Streptococcus bovis* HC5 的细菌素 bovicin HC5 对培养基和酸性芒果浆中 *A. acidoterrestris* 的影响,结果显示该抑菌素对营养细胞和芽孢都表现出杀菌作用,且可使菌株在 80 ~ 95℃ 的 *D* 值减小 77% ~ 95%。本研究团队从 *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* CICC 6165 中分离了一种细菌素 bificin C6165,它可以有效杀灭商业橙汁、葡萄汁和桃汁中的 *A. acidoterrestris* 营养细胞和芽孢,在苹果汁中可以显著增加芽孢的热敏感性,但却对芽孢无杀灭效果;bificin C6165 的杀菌机理是作用于细菌细胞膜,形成孔洞结构,致使胞膜通透性增加,细胞内容物泄露,同时还可与胞壁合成前体物 lipid II 结合,阻止胞壁形成,从而导致细胞死亡;直接添加 bificin C6165 会导致果汁色值和透光度的下降,而用海藻酸钠包裹后对果汁品质没有影响^[151-153]。

(3) 溶菌酶和蛋白酶类

溶菌酶是一种天然的抗菌物质,它主要通过破坏微生物的细胞壁,导致内容物流出,继而起到杀菌的作用。2006 年,CONTE 等^[154]将溶菌酶固定于水溶性的聚乙烯醇薄膜上,该活性薄膜对果汁中的 *A. acidoterrestris* 营养细胞和芽孢都有明显的抑制作用。2014 年,BEVILACQUA 等^[155]研究发现溶菌酶对培养基中 *A. acidoterrestris* 营养细胞的最小抑菌质量浓度为 0.1 ~ 6 mg/L,而对于芽孢其最小抑菌质量浓度为 0.1 ~ 3 mg/L;随着溶菌酶添加剂量的增加,杀菌效果也明显增强,在最小抑菌质量浓度下,作用 24 h 后芽孢的数量降低了 1 lg CFU/mL。同时,木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶是来源于木瓜和菠萝的蛋白水解酶,近年来有关这 2 种蛋白质的抗菌

活性也有报道。2016年, DOS ANJOS等^[116]考察了木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶对脂环酸芽孢杆菌的抑菌作用,结果显示木瓜蛋白酶对 *A. acidoterrestis* 的最小抑菌质量浓度为 0.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而菠萝蛋白酶的最小抑菌质量浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 当添加量为最小抑制质量浓度的4倍时, 培养24 h后脂环酸芽孢杆菌的细胞数降低了4个数量级; 通过使用特定的半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 发现这2种酶的抗菌活性与其蛋白水解活性无关, 但它们可能与酰胺酶和酯酶活性有关。

(4) 植物源天然提取物或化合物

精油是提取自植物的油状液体物质, 由几十种甚至几百种芳香有机化合物组成, 而其中的有些成分如百里酚、肉桂醛、丁香酚、香紫苏醇等均具有广谱的抑菌效果, 这些物质的杀菌机制主要包括胞内离子流失、细胞膜通透性增加、膜蛋白减少、细胞质凝结、细胞中脂类和蛋白质结构的破坏等^[156]。目前, 有关精油对脂环酸芽孢杆菌抑制及杀灭的研究主要是由意大利福贾大学农业、食品和环境科学院的 Antonio Bevilacqua 学者报道的。当添加质量浓度为 150~200 mg/L 时, 肉桂醛可以抑制培养基中 *A. acidoterrestis* 芽孢的萌发, 且 pH 值越低抑制效果越好^[157]; 在苹果汁中, 丁香酚的添加可以减少肉桂醛的用量, 80 mg/L 丁香酚、40 mg/L 肉桂醛或 40 mg/L 丁香酚与 20 mg/L 肉桂醛相结合都可以抑制芽孢的萌发^[11]。

与精油类物质类似, 其他一些来源于植物的天然提取物或化合物对脂环酸芽孢杆菌也有一定的抑制作用。由于脂环酸芽孢杆菌在红葡萄汁中不生长, 2002年, OITA等^[148]考察了白藜芦醇、阿魏酸、对羟基苯甲酸、对香豆酸、咖啡酸和儿茶素没食子酸等多酚类物质对 *A. acidoterrestis* 生长的抑制, 结果显示它们的最小抑菌质量浓度在 50~1 000 mg/L 之间, 而这远高于这些物质在红葡萄汁中的含量, 因此作者推断这些多酚类物质对脂环酸芽孢杆菌的抑制作用可能是各类多酚物质协同作用的结果, 并且与红葡萄汁中含有的花青素有关。2004年, TAKAHASHI等^[159]测试了26种桉树提取物对9种微生物的抑制效果, 发现其对 *A. acidoterrestis* 的最小抑菌质量浓度为 7.8~250 mg/L。2008年, BEVILACQUA等^[160]发现低分子量的壳聚糖能提高热处理对 *A. acidoterrestis* 芽孢的杀灭效果, 且最佳添加质量浓度为 1.4 g/L。2009年, DUDA-CHODAK等^[161]考察了15种药草提取物对 *A. acidoterrestis* 生长的影响, 结果显示犬蔷薇的抑制效果最好, 当添加量为 10% 时, 培养 60 h 后, 细胞数减少了 80%, 接

着是荨麻叶、甘草根和当归提取物, 它们的减少值范围为 50%~70%。2013年, RUIZ等^[162]研究了6种胡椒叶提取物对 *A. acidoterrestis* 的抗菌活性, 其中树胡椒叶的氯仿提取物抑菌效果最强; 将该提取物继续分离, 所得二氯甲烷组分的最小抑菌浓度最低。2015年, MOLVA等^[163]研究发现当葡萄籽提取物的添加量为 0.23%、0.45%、0.9%、1.8% 和 3.6% 时, 培养 336 h 后, 苹果汁中 *A. acidoterrestis* 的营养细胞分别减少了 3.14、3.55、3.8、4.1、4.63 lg CFU/mL, 而 0.9% 的葡萄籽提取物即可抑制芽孢的生长。2016年, PISKERNIK等^[164]使用了2种商品化的迷迭香提取物对苹果汁中的脂环酸芽孢杆菌进行控制, 它们对 *A. acidoterrestis* 芽孢的最小抑菌质量浓度分别为 7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 当添加量为最小抑制质量浓度的4倍时, 两者对培养基中的芽孢有很好的抑制作用, 但应用于苹果汁时, 效果明显下降, 这可能是提取物与苹果汁中的某些成分发生了反应。

5.3.2 化学合成防腐剂

在化学合成防腐剂中, 苯甲酸钠和山梨酸钾是果汁及饮料工业中最经常使用的2种物质。2008年, WALKER等^[165]考察了不同浓度的苯甲酸钠和山梨酸钾对苹果汁中 *A. acidoterrestis* 的抑制效果, 结果表明在 30℃ 温度下, 当2种防腐剂的添加量为 0.1 mg/mL 时, 其对 10^1 CFU/mL 的 *A. acidoterrestis* 有很好的抑制作用; 当添加量增加至 0.5 mg/mL 时, 可以抑制的细胞浓度为 10^4 CFU/mL。2013年, KAWASE等^[166]采用超临界技术对苯甲酸进行微粉化, 所得微粒子的大小在 10~200 μm 之间; 当果汁中添加 50 mg/L 处理过的苯甲酸微粒时, 在 45℃ 培养 28 d 后, 其表现出的 *A. acidoterrestis* 芽孢杀灭效果相当于 2 倍浓度的未经处理的苯甲酸钠和苯甲酸颗粒。

6 结论

作为果汁产业中关键的质量安全因子, 脂环酸芽孢杆菌的研究已有 30 多年的历史。随着我国果蔬产品贸易量的增大及世界各国食品安全的广泛关注, 脂环酸芽孢杆菌的研究还需要在以下几个方面进行突破:

(1) 国内对脂环酸芽孢杆菌污染状况主要集中于区域性苹果、猕猴桃等特色农产品及其制品的全产业链分离鉴定, 全国范围内脂环酸芽孢杆菌的污染状况不明确, 还需要有专门的机构或者组织对此展开深入的调查和研究, 以便掌握我国整个果汁产业中脂环酸芽孢杆菌污染状况并对其进行风险评估。

(2) 现已发现的脂环酸芽孢杆菌产物代谢以愈创木酚为主, 对其形成路径有了初步的解析和揭示, 但是具体是哪些基因调控愈创木酚的产生, 其具体地形成机理有待进一步探究。同时, 复杂的果汁体系中是否还有其余的代谢路径, 或者前体物、成分促进愈创木酚的产生, 需要进一步详细考证。

(3) 现阶段针对脂环酸芽孢杆菌的检测方法研究很多, 但现在国际贸易和企业生产中常用的依然

是平板计数法。现有快速检测方法如何在国际贸易和国内生产中得到认可、实现推广应用并发挥应有的作用, 已成为科研工作者思考的关键问题。

(4) 脂环酸芽孢杆菌控制问题依然困扰着果汁加工企业。基于果汁从源头到终产品复杂的全产业链过程体系, 将以科学研究为基础的控制方法与生产实际结合, 切实保障果汁产品的安全及品质, 是现阶段果汁加工过程中新的研究热点与趋势。

参 考 文 献

- 1 王周利. 苹果汁中脂环酸芽孢杆菌免疫磁性分离及快速检测技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
WANG Zhouli. Immunomagnetic separation and rapid detection of *Allicyclobacillus* spp. in apple juice [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2014. (in Chinese)
- 2 王军堂. 浓缩苹果汁生产过程中嗜酸耐热菌的控制技术[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
WANG Juntang. Control technology of *Alicyclobacillus* in the processing of apple juice concentrate production [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2011. (in Chinese)
- 3 袁亚宏, 刘晓珂, 岳田利, 等. 酸土脂环酸芽孢杆菌可溶性全细胞蛋白提取工艺优化[J]. 农业机械学报, 2012, 43(6): 139-146.
YUAN Yahong, LIU Xiaoke, YUE Tianli, et al. Optimization of soluble whole-cell protein extraction from *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(6): 139-146. (in Chinese)
- 4 WANG Z L, CAI R, YUAN Y H, et al. An immunomagnetic separation-real-time PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 175: 30-35.
- 5 YOKOTA A, FUJII T, GOTO K. *Alicyclobacillus*: thermophilic acidophilic bacilli [M]. New York: Springer, 2007.
- 6 UCHINO F, DOI S. Acido-thermophilic bacteria from thermal waters [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1967, 31(7): 817-822.
- 7 DARLAND G, BROCKT T D. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov. an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium [J]. Journal of General Microbiology, 1971, 67(1): 9-15.
- 8 HIPPCHEN B, RÖLL A, PORALLA K. Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli possessing ω -cyclohexane fatty acids and hopanoids [J]. Archives of Microbiology, 1981, 129(1): 53-55.
- 9 DEINHARD G, BLANZ P, PORALLA K, et al. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1987, 10(1): 47-53.
- 10 PORALLA K, KÖNIG W A. The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic bacillus [J]. Fems Microbiology Letters, 1983, 16(2-3): 303-306.
- 11 WISOTZKEY J D, JR J P, FOX G E, et al. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(2): 263-269.
- 12 KARAVAIKO G I, BOGDANOVA T I, TOUROVA T P, et al. Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. *thermotolerans*' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(2): 941-947.
- 13 DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date [EB/OL]. [2016-02-06]. <https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>.
- 14 NAKANO C, TAKAHASHI N, TANAKA N, et al. *Alicyclobacillus dauci* sp. nov. a slightly thermophilic, acidophilic bacterium isolated from a spoiled mixed vegetable and fruit juice product [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(2): 716-722.
- 15 JENSEN N. *Alicyclobacillus* in Australia [J]. Food Australia, 2000, 52(7): 282-285.
- 16 SMIT Y, CAMERON M, VENTER P, et al. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation—a review [J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 331-349.
- 17 WALLS I, CHUYATE R. Spoilage of fruit juice by *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. Food Australia, 2000, 52(7): 286-288.
- 18 TSURUOKA N, ISONO Y, SHIDA O, et al. *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(4): 1081-1084.
- 19 GOTO K, MOCHIDA K, KATO Y, et al. Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *Alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *Alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov.,

- Alicyclobacillus acrosporangiidus* sp. nov., *Alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *Alicyclobacillus shizuokensis* sp. Nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(6): 1276 – 1285.
- 20 GOTO K, MATSUBARA H, MOCHIDA K, et al. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing omega-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(1): 109 – 113.
- 21 GLAESER S P, FALSEN E, MARTIN K, et al. *Alicyclobacillus consociatus* sp. nov., isolated from a human clinical specimen [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(10): 3623 – 3627.
- 22 GOTO K, MOCHIDA K, ASAHARA M, et al. *Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess omega-allylic fatty acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(5): 1537 – 1544.
- 23 GUO X, YOU X Y, LIU L J, et al. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous- and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2415 – 2420.
- 24 GROENEWALD W, GOUWS P A, WITTHUHN R C. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores isolated from a fruit processing plant and grape juice concentrate in South Africa [J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 11(11): 128 – 136.
- 25 LOPEZ M D, GARCIA P, MUNOZ-CUEVAS M, et al. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores under conditions simulating industrial heating processes of tangerine vesicles and its use in time temperature integrators [J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(5): 821 – 827.
- 26 BAHCECI K S, ACAR J. Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 120(3): 266 – 273.
- 27 MALDONADO M C, BELFIORE C, NAVARRO A R. Temperature, soluble solids and pH effect on *Alicyclobacillus acidoterrestis* viability in lemon juice concentrate [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(2): 141 – 144.
- 28 MURAKAMI M, TEDZUKA H, YAMAZAKI K. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores in different buffers and pH [J]. Food Microbiology, 1998, 15(6): 577 – 582.
- 29 SILVA F M, GIBBS P, VIEIRA M C, et al. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes [J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 51(2–3): 95 – 103.
- 30 PALOP A, ALVAREZ I, RASO J, et al. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers, and orange juice [J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(10): 1377 – 1380.
- 31 YAMAZAKI K, KAWAI Y, INOUE N, et al. Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores [J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 25(2): 153 – 156.
- 32 EIROA M N U, JUNQUEIRA V C A, SCHMIDT F L. *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores [J]. Journal of Food Protection, 1999, 62(8): 883 – 886.
- 33 CEVIZ G, TULEK Y, CON A H. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestis* spores in different heating media [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2009, 44(9): 1770 – 1777.
- 34 陈志伟, 姜成英, 刘双江. 云南和广东部分热泉 *Alicyclobacillus* 分布及系统发育 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 50 – 54.
CHEN Zhiwei, JIANG Chengying, LIU Shuangjiang. Survey on and phylogeny of *Alicyclobacillus* species in hot springs of Southern China's Guangdong and Yunnan Provinces [J]. Microbiology, 2004, 31(3): 50 – 54. (in Chinese)
- 35 WANG Y, YUE T, YUAN Y, et al. Isolation and identification of thermo-acidophilic bacteria from orchards in China [J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(2): 390 – 394.
- 36 ZHANG J B, YUE T L, YUAN Y H. *Alicyclobacillus* contamination in the production line of kiwi products in China [J]. Plos One, 2013, 8(7): e67704.
- 37 岳田利, 耿玉丽, 袁亚宏, 等. 陕西省果库中嗜酸耐热菌的分离鉴定 [J]. 农业机械学报, 2013, 44(7): 187 – 193.
YUE Tianli, GENG Yuli, YUAN Yahong, et al. Isolation and identification of *Alicyclobacillus* from Shaanxi apple libraries [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(7): 187 – 193. (in Chinese)
- 38 WISSE C A, PARISH M E. Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments [J]. Dairy Food and Environmental Sanitation, 1998, 18: 504 – 509.
- 39 陈世琼, 胡小松, 石维妮, 等. 浓缩苹果汁生产过程中脂环酸芽孢杆菌的分离及初步鉴定 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 816 – 819.
CHEN Shiqiong, HU Xiaosong, SHI Weini, et al. Isolation and identification *Alicyclobacillus* from concentrated apple juice processing [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 816 – 819. (in Chinese)
- 40 CHANG S S. Guaiacol producing *Alicyclobacillus* spp.: differentiation, detection, and control [D]. Washington: Washington State University, 2008.
- 41 胡贻椿. 浓缩苹果汁生产过程中嗜酸耐热菌的分离鉴定及超声波杀灭作用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
HU Yichun. Isolation, identification and ultrasonic sterilization of thermo-acidiphic bacteria (TAB) in the processing of apple juice concentrate (AJC) production [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)

- 42 MATSUBARA H, GOTO K, MATSUMURA T, et al. *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, omega-acyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(5): 1681 – 1685.
- 43 SPLITTSTOESSER D F, CHUREY J J, LEE C Y. Growth-characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices [J]. *Journal of Food Protection*, 1994, 57(12): 1080 – 1083.
- 44 YAMAZAKI K, TEDUKA H, SHINANO H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(3): 543 – 545.
- 45 GOUWS P A, GIE L, PRETORIUS A, et al. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2005, 40(7): 789 – 792.
- 46 PETTIPHER G L, OSMUNDSON M E. Methods for the detection, enumeration and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. *Food Australia*, 2000, 57(7): 293 – 295.
- 47 WALLS I, CHUYATE R. *Alicyclobacillus*: historical perspective and preliminary characterization study [J]. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 1998, 18(8): 499 – 503.
- 48 HOWARD I. ACB Workshop October 2005—review [C] // European Quality Control System (EQCS) Workshop, 2006.
- 49 OTEIZA J M, ARES G, SANTANA A S, et al. Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. in concentrate fruit juices marketed in Argentina: results of a 14-year survey [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151(2): 229 – 234.
- 50 DANYLUK M D, FRIEDRICH L M, JOUQUAND C, et al. Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 472 – 477.
- 51 CHANG S S, KANG D H. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, 30(2): 55 – 74.
- 52 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.
- 53 PETTIPHER G L, OSMUNDSON M E, MURPHY J M. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1997, 24(3): 185 – 189.
- 54 ORR R V, BEUCHAT L R. Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors [J]. *Journal of Food Protection*, 2000, 63(8): 1117 – 1122.
- 55 SIEGMUND B, POLLINGER-ZIERLER B. Odor thresholds of microbially induced off-flavor compounds in apple juice [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(16): 5984 – 5989.
- 56 WHITFIELD F B, LAST J H, SHAW K J, et al. 2,6-Dibromophenol: the cause of an iodoform-like off-flavour in some Australian crustacea [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1988, 46(1): 29 – 42.
- 57 YOUNG W F, HORTH H, CRANE R, et al. Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants [J]. *Water Research*, 1996, 30(2): 331 – 340.
- 58 JENSEN N, WHITFIELD F B. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36(1): 9 – 14.
- 59 GOTO K, NISHIBORI A, WASADA Y, et al. Identification of thermo-acidophilic bacteria isolated from the soil of several Japanese fruit orchards [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(3): 289 – 294.
- 60 OSOPALE B A, WITTHUHN C R, ALBERTYN J, et al. Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus* species in contaminated commercial fruit juices [J]. *Food Microbiology*, 2016, 56: 21 – 28.
- 61 GOCMEN D, ELSTON A, WILLIAMS T, et al. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 40(3): 172 – 177.
- 62 FLODIN C, WHITFIELD F B. 4-hydroxybenzoic acid: a likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(2): 249 – 255.
- 63 MICHALOWICZ J, DUDA W, STUFKA-OLCZYK J. Transformation of phenol, catechol, guaiacol and syringol exposed to sodium hypochlorite [J]. *Chemosphere*, 2007, 66(4): 657 – 663.
- 64 CRAWFORD R L, OLSON P P. Microbial catabolism of vanillate: decarboxylation to guaiacol [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 36(4): 539 – 543.
- 65 CHOW K T, POPE M K, DAVIES J. Characterization of a vanillic acid non-oxidative decarboxylation gene cluster from *Streptomyces* sp. D7 [J]. *Microbiology*, 1999, 145(9): 2393 – 2403.
- 66 ALVAREZ-RODRIGUEZ M L, BELLOCH C, VILLA M, et al. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2003, 220(1): 49 – 55.
- 67 DHAR A, LEE K S, DHAR K, et al. *Nocardia* sp. vanillic acid decarboxylase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(3): 271 – 277.
- 68 POMETTO III A L, SUTHERLAND J B, CRAWFORD D L. *Streptomyces setonii*: catabolism of vanillic acid via guaiacol and catechol [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1981, 27(6): 636 – 638.

- 69 LEFEBVRE A, RIBOULET J M, BOIDRON J N, et al. The incidence of micro-organisms on cork and their effect on the olfactive alterations of wine[J]. *Sciences des Aliments*, 1983, 3(2): 265–278.
- 70 HUANG Z X, DOSTAL L, ROSAZZA J P N. Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(32): 23954–23958.
- 71 TOPAKAS E, KALOGERIS E, KEKOS D, et al. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2003, 36(6): 561–565.
- 72 KARMAKAR B, VOHRA R M, NANDANWAR H, et al. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 80(3): 195–202.
- 73 RAHOUTI M, SEIGLE-MURANDI F, STEIMAN R, et al. Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(9): 2391–2398.
- 74 WITTHUHN R C, VAN DER MERWE E, VENTER P, et al. Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 157(1): 113–117.
- 75 CAI Rui, YUAN Yahong, WANG Zhouli, et al. Precursors and metabolic pathway for guaiacol production by *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 214: 48–53.
- 76 FIDDLER W, PARKER W E, WASSERMAN A E, et al. Thermal decomposition of ferulic acid[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1967, 15(5): 757–761.
- 77 FAIX O, FORTMANN I, BREMER J, et al. Thermal degradation products of wood[J]. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 1990, 48(7–8): 351–354.
- 78 BREBU M, VASILE C. Thermal degradation of lignin—a review[J]. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2010, 44(9): 353–363.
- 79 MAYER F, CZERNY M, GROSCH W. Influence of provenance and roast degree on the composition of potent odorants in Arabica coffees[J]. *European Food Research and Technology*, 1999, 209(3–4): 242–250.
- 80 MAGEROY M H, TIEMAN D M, FLOYSTAD A, et al. A *Solanum lycopersiculate* catechol-O-methyltransferase involved in synthesis of the flavor molecule guaiacol[J]. *The Plant Journal*, 2012, 69(6): 1043–1051.
- 81 VESER J, MARTIN R, THOMAS H. Immunocytochemical demonstration of catechol-o-methyl-transferase in *Candida tropicalis* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1981, 126(1): 97–101.
- 82 DHAR K, ROSAZZA J P N. Purification and characterization of *Streptomyces griseus* catechol-O-methyltransferase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4877–4882.
- 83 HENCZKA M, DJAS M, Filipek K. Optimisation of a direct plating method for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 92(1): 1–8.
- 84 WANG Z L, YUE T L, YUAN Y H, et al. Development of polyclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus* strains in apple juice[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(11): M643–M649.
- 85 LI J, HUANG R, XIA K, et al. Double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate[J]. *Food Control*, 2014, 40: 172–176.
- 86 LI J, XIA K, YU C. Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Control*, 2013, 30(1): 251–254.
- 87 MAST S, DIETRICH R, DIDIER A, et al. Development of a polyclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in various fruit juices[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(2): 497–504.
- 88 YAMAZAKI K, TEDUKA H, INOUE N, et al. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1996, 23(5): 350–354.
- 89 CONNOR C J, LUO H L, GARDENER B B M, et al. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99(3): 229–235.
- 90 CHEN J, MA X, YUAN Y, et al. Sensitive and rapid detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* using loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(6): 1070–1074.
- 91 LUO H, YOUSEF A E, WANG H H. A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39(4): 376–382.
- 92 THELEN K, SNAIDR J, BEIMFOHR C. Specific rapid detection of *Alicyclobacillus* by fluorescently-labeled gene probes in fruit juices[J]. *Fruit Processing Journal for the Fruit Processing and Juice Producing European and Overseas Industry*, 2003, 13(6): 416–418.
- 93 BEEKES M, LASCH P, NAUMANN D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 123(4): 305–319.
- 94 NAUMANN D. FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research[J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2001, 36(2–3): 239–298.
- 95 王军. 苹果汁中嗜酸耐热菌免疫分离及振动光谱法鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.

- WANG Jun. Immunomagnetic separation of *Alicyclobacillus* species in apple juice and identification by vibrational spectroscopy [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2011. (in Chinese)
- 96 LIN M, AL-HOLY M, CHANG S S, et al. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(3): 369–376.
- 97 GRASSO E M, YOUSEF A E, DE LAMO CASTELLVI S, et al. Rapid detection and differentiation of *Alicyclobacillus* species in fruit juice using hydrophobic grid membranes and attenuated total reflectance infrared microspectroscopy [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(22): 10670–10674.
- 98 AL-HOLY M A, LIN M, ALHAJ O A, et al. Discrimination between *Bacillus* and *Alicyclobacillus* isolates in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(2): M399–M404.
- 99 Wang J, Yue T, Yuan Y, et al. Discrimination of *Alicyclobacillus* strains using nitrocellulose membrane filter and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(2): M137–M142.
- 100 王若男, 岳田利, 袁亚宏, 等. 基于傅里叶变换近红外光谱的脂环酸芽孢杆菌种间分类鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(11): 3073–3077.
- WANG Ruonan, YUE Tianli, YUAN Yahong, et al. Differentiation and identification of *alicyclobacillus* strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(11): 3073–3077. (in Chinese)
- 101 岳田利, 王军, 袁亚宏, 等. 基于 FT-NIR 的微生物快速鉴定方法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(11): 2945–2949.
- YUE Tianli, WANG Jun, YUAN Yahong, et al. Rapid identification of microorganisms based on Fourier transform near infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(11): 2945–2949. (in Chinese)
- 102 WANG H, HU Z, LONG F, et al. Early detection of *Zygosaccharomyces rouxii*-spawned spoilage in apple juice by electronic nose combined with chemometrics[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 217: 68–78.
- 103 王俊, 崔绍庆, 陈新伟, 等. 电子鼻传感技术与应用研究进展[J]. 农业机械学报, 2013, 44(11): 160–167.
- WANG Jun, CUI Shaoqing, CHEN Xinwei, et al. Advanced technology and new application in electronic nose[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(11): 160–167. (in Chinese)
- 104 GOBBI E, FALASCONI M, CONCINA I, et al. Electronic nose and *Alicyclobacillus* spp. spoilage of fruit juices: an emerging diagnostic tool[J]. Food Control, 2010, 21(10): 1374–1382.
- 105 CAGNASSO S, FALASCONI M, PREVIDI M P, et al. Rapid screening of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage of fruit juices by electronic nose: a confirmation study[J]. Journal of Sensors, 2010(2010): 1–9.
- 106 CONCINA I, BORNSEK M, BACCELLIERE S, et al. *Alicyclobacillus* spp. detection in soft drinks by electronic nose[J]. Food Research International, 2010, 43(8): 2108–2114.
- 107 HARTYÁNI P, DALMADI I, KNORR D. Electronic nose investigation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* inoculated apple and orange juice treated by high hydrostatic pressure[J]. Food Control, 2013, 32(1): 262–269.
- 108 许灿, 李二虎, 王鲁峰, 等. 电子鼻检测复合果汁饮料中的脂环酸芽孢杆菌[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 193–200.
- XU Can, LI Erhu, WANG Lufeng, et al. Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage of mixed fruit juice beverage by electronic nose[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(2): 193–200. (in Chinese)
- 109 HUANG X C, GUO C F, YUAN Y H, et al. Detection of medicinal off-flavor in apple juice with artificial sensing system and comparison with test panel evaluation and GC-MS[J]. Food Control, 2015, 51: 270–277.
- 110 NIWA M. Control of hazardous bacteria in acid beverages by using a guaiacol detection kit[J]. Fruit Processing, 2005, 15: 388–392.
- 111 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]. Analytica Chimica Acta, 2004, 520(1–2): 3–11.
- 112 AIJN (European Juice Association). *Alicyclobacillus* best practice guideline[R]. Brussels: European Fruit Juice Association, 2008.
- 113 BEUCHAT L R, PETTIGREW C A, TREMBLAY M E, et al. Lethality of chlorine, chlorine dioxide, and a commercial fruit and vegetable sanitizer to vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(8): 1702–1708.
- 114 阙绍辉, 宋金武, 吴清平, 等. 食品工业常用 4 种消毒剂对单增李斯特菌杀灭效果观察[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(2): 115–117.
- QUE Shaohui, SONG Jinwu, WU Qingping, et al. Observation on germicidal efficacy of four disinfectants used in food industry against *Listeria monocytogenes*[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2014, 31(2): 115–117. (in Chinese)
- 115 PODOLAK R, ELLIOTT P H, TAYLOR B J, et al. Destruction of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice on stainless steel surfaces by chemical disinfectants[J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(3): 510–514.
- 116 DOS ANJOS M M, DA SILVA A A, DE PASCOLI I C, et al. Antibacterial activity of papain and bromelain on *Alicyclobacillus* spp. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 216: 121–126.
- 117 FRIEDRICH L M, GOODRICH-SCHNEIDER R, PARISH M E, et al. Mitigation of *Alicyclobacillus* spp. spores on food contact surfaces with aqueous chlorine dioxide and hypochlorite[J]. Food Microbiology, 2009, 26(8): 936–941.
- 118 LEE S Y, GRAY P M, DOUGHERTY R H, et al. The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in

- aqueous suspension and on apples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 92(2): 121–127.
- 119 CAI Rui, YUAN Yahong, WANG Zhouli, et al. Reduction of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores on apples by chlorine dioxide in combination with ultrasound or shaker[J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(12): 2409–2417.
- 120 张文福,刘育京. 清洗用超声波对细菌杀灭作用的实验研究[J]. 中国消毒学杂志, 1995, 12(1): 6–10.
- ZHANG Wenfu, LIU Yujing. Experimental study on bactericidal efficacy of ultrasonic used for cleaning[J]. Chinese Journal of Disinfection, 1995, 12(1): 6–10. (in Chinese)
- 121 叶章颖,祁凡雨,裴洛伟,等. 微酸性电解水对虾仁的杀菌效果及其动力学[J]. 农业工程学报, 2014, 30(3): 223–230.
- YE Zhangying, QI Fanyu, PEI Luowei, et al. Disinfection effect and kinetics of slightly acidic electrolyzed water for white shrimp[J]. Transactions of the CSAE, 2014, 30(3): 223–230. (in Chinese)
- 122 张后成,朱玉婵,任占冬,等. 中性氧化电解水对卷心菜的杀菌作用与机理[J]. 农业工程学报, 2013, 29(22): 277–283.
- ZHANG Houcheng, ZHU Yuchan, REN Zhandong, et al. Sterilizing effect and mechanism of neutral electrolyzed oxidizing water on cabbage[J]. Transactions of the CSAE, 2013, 29(22): 277–283. (in Chinese)
- 123 TORLAK E. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples by neutral electrolyzed water[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 185: 69–72.
- 124 YUAN Y, HU Y, YUE T, et al. Effect of ultrasonic treatments on thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2009, 33(3): 370–383.
- 125 WANG J, HU X, WANG Z. Kinetics models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM14558^T and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922^T in apple juice by ultrasound[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 139(3): 177–181.
- 126 GIULIANI R, BEVILACQUA A, CORBO M R, et al. Use of microwave processing to reduce the initial contamination by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a cream of asparagus and effect of the treatment on the lipid fraction [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(2): 328–334.
- 127 WANG Y, WANG T D, TANG J, et al. Sterilization of food stuffs using radio frequency heating[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(2): 539–544.
- 128 刘嫣红,杨宝玲,毛志怀. 射频技术在农产品和食品加工中的应用[J]. 农业机械学报, 2010, 41(8): 115–120.
- LIU Yanhong, YANG Baoling, MAO Zhihuai. Radio frequency technology and its application in agro-product and food processing[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(8): 115–120. (in Chinese)
- 129 王云阳. 澳洲坚果射频干燥技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- WANG Yunyang. Study on radio frequency drying protocol of *Macadamia Nuts* [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012. (in Chinese)
- 130 张江波. 猕猴桃全产业链嗜酸耐热菌识别分析及射频控制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- ZHANG Jiangbo. Identification and analysis of *Alicyclobacillus* from the production chain of kiwi fruit and their control by radio frequency [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015. (in Chinese)
- 131 耿敬章,仇农学,丁辉煌. 欧姆加热对嗜酸耐热菌的电穿孔效应[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(3): 79–82.
- GENG Jingzhang, QIU Nongxue, DING Huihuang. Electroporation effect of ohmic heating on *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(3): 79–82. (in Chinese)
- 132 耿敬章. 欧姆加热对苹果汁中嗜酸耐热菌的杀灭作用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.
- GENG Jingzhang. Sterilizing effect of ohmic heating on *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2006. (in Chinese)
- 133 耿敬章,仇农学. 欧姆加热对嗜酸耐热菌的杀灭作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 298–301.
- GENG Jingzhang, QIU Nongxue. Germicidal effects of ohmic heating on *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice [J]. Food Science, 2007, 28(11): 298–301. (in Chinese)
- 134 UEMURA K, KOBAYASHI I, INOUE T. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by high electric field alternating current[J]. Food Science and Technology Research, 2009, 15(3): 211–216.
- 135 BAYSAL A H, ICIER F. Inactivation kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange juice by ohmic heating: effects of voltage gradient and temperature on inactivation[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(2): 299–304.
- 136 BAYSAL A H, MOLVA C, UNLUTURK S. UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(3): 494–498.
- 137 LEE S Y, PARK S H, KANG D H. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple and orange juice concentrates by gamma irradiation[J]. Journal of Food Protection, 2014, 77(2): 339–344.
- 138 BEVILACQUA A, CIBELLI F, CORBO M R, et al. Effects of high-pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a laboratory medium[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 45(4): 382–386.
- 139 BEVILACQUA A, CORBO M R, SINIGAGLIA M. High-pressure homogenisation and benzoate to control *Alicyclobacillus acidoterrestris*: a possible way? [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2012, 47(4): 879–883.
- 140 ALPAS H, ALMA L, BOZOGLU F. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressure[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(6): 619–623.
- 141 BUZRUL S, ALPAS H, BOZOGLU F. Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus*

- acidoterrestris* by high pressure at different temperatures[J]. Food Research International, 2005, 38(2): 151–157.
- 142 VERCAMMEN A, VIVIJS B, LURQUIN I, et al. Germination and inactivation of *Bacillus coagulans* and *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high hydrostatic pressure treatment in buffer and tomato sauce [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 152(3): 162–167.
- 143 SOKOŁOWSKA B, SKAPSKA S, FONBERG-BROCZEK M, et al. Factors influencing the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores exposed to high hydrostatic pressure in apple juice[J]. High Pressure Research, 2013, 33(1): 73–82.
- 144 BAE Y Y, LEE H J, KIM S A, et al. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice by supercritical carbon dioxide[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 136(1): 95–100.
- 145 KOMITOPOULOU E, BOZIARIS I S, DAVIES E A, et al. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin [J]. International Journal of Food Science and Technology, 1999, 34(1): 81–85.
- 146 YAMAZAKI K, MURAKAMI M, KAWAI Y, et al. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks [J]. Food Microbiology, 2000, 17(3): 315–320.
- 147 PENA W E L, DE MASSAGUER P R, ZUNIGA A D G, et al. Modeling the growth limit of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 in apple juice: effect of pH, brix, temperature and nisin concentration [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2011, 35(4): 509–517.
- 148 OITA S, KOHYAMA N. Antibacterial effect of grape polyphenols against thermoacidophilic bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology—Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2002, 49(8): 555–558.
- 149 MINAMIKAWA M, KAWAI Y, INOUE N, et al. Purification and characterization of warnericin RB4, anti-*Alicyclobacillus* bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri* RB4[J]. Current Microbiology, 2005, 51(1): 22–26.
- 150 DE CARVALHO A A T, VANETTI M C D, MANTOVANI H C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(6): 1685–1691.
- 151 PEI J J, YUAN Y H, YUE T L. Primary characterization of bacteriocin paracin C-A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*[J]. Food Control, 2013, 34(1): 168–176.
- 152 PEI J J, YUE T L, YUAN Y H. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by a newly discovered bacteriocin[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(3): 855–863.
- 153 YUE T L, PEI J J, YUAN Y H. Purification and characterization of anti-*Alicyclobacillus* bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(9): 1575–1581.
- 154 CONTE A, SINIGAGLIA M, DEL NOBILE M A. Antimicrobial effectiveness of lysozyme immobilized on polyvinylalcohol-based film against *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(4): 861–865.
- 155 BEVILACQUA A, CIUFFREDA E, SINIGAGLIA M, et al. Effects of lysozyme on *Alicyclobacillus acidoterrestris* under laboratory conditions[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2014, 49(1): 224–229.
- 156 李凤清. 植物精油的抑菌评价及其应用[D]. 南京:南京师范大学, 2014.
- 157 BEVILACQUA A, CORBO M R, SINIGAGLIA M. Combined effects of low pH and cinnamaldehyde on the inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in a laboratory medium[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2008, 32(5): 839–852.
- 158 BEVILACQUA A, CORBO M R, SINIGAGLIA M. Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. Food Control, 2010, 21(2): 172–177.
- 159 TAKAHASHI T, KOKUBO R, SAKAINO M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(1): 60–64.
- 160 BEVILACQUA 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.
- 161 DUDA-CHODAK A, TARKO T, GAJNY J, et al. Effect of different herbs on *Alicyclobacillus acidoterrestris* cultures [J]. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 2009, 12(4): 19–23.
- 162 RUIZ S P, DOS ANJOS M M, CARRARA V S, et al. Evaluation of the antibacterial activity of piperaceae extracts and nisin on *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(11): M1772–M1777.
- 163 MOLVA C, BAYSAL A H. Evaluation of bioactivity of pomegranate fruit extract against *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice[J]. LWT—Food Science and Technology, 2015, 62(2): 989–995.
- 164 PISKERNIK S, KLANCNIK A, DEMSAR L, et al. Control of *Alicyclobacillus* spp. vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts[J]. Food Control, 2016, 60: 205–214.
- 165 WALKER M, PHILLIPS C A. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice[J]. Food Control, 2008, 19(10): 974–981.
- 166 KAWASE K Y F, LUCHESE R H, COELHO G L. Micronized benzoic acid decreases the concentration necessary to preserve acidic beverages against *Alicyclobacillus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(2): 466–474.