

# 一称快速检测酵母菌和乳酸菌的方法—ATP生物发光法

用平板培养法检测包装啤酒中潜在的酸败微生物, 酵母菌需要2~3天, 乳酸菌需要5~7天, 以往的实验表明, 即使微量的乳酸菌存在也能导致包装产品的最终酸败。很久以来, 发酵工业一直在探求快速的微生物培养方法以取代传统的培养方法, 显微镜学和微生物代谢产物检测的研究近来已引起了很大的关注, 现在又发现了一种简单、价廉的无菌检验方法, 此法是依据生物发光的原理, 通过检测ATP和虫荧光素/虫荧光素酶系统反应产生的生物发光物质进行的, 反应如下:

虫荧光素 + 虫荧光素酶 + ATP →

虫荧光素 — 虫荧光素酶 — AMP + PP<sub>i</sub>

虫荧光素 — 虫荧光素酶 — AMP →

氧化型虫荧光素 + 虫荧光素酶 + AMP + CO<sub>2</sub> + 光子

用光度计在562纳米波长下测定所发射出来的光, 当其它反应物过量时, 反应所发射出来的光量和样品中的ATP量成一定比例关系。

ATP分子相当稳定, 它在细胞中的含量变化范围很小, 因此样品中的ATP含量同所存在的细胞量有关。现在已经确定了微生物细胞中ATP的数量, 即1fg(10<sup>-15</sup>g)/细菌细胞, 100fg/酵母菌细胞。

**方法:** 将250ml啤酒经过直径47mm, 0.45μm膜过滤, 膜面朝下, 使其成为含有2ml WL

肉汤(对酵母)或R<sub>0</sub>K<sub>a</sub>—R<sub>01</sub>/肉汤(对细菌)的平皿, WL肉汤好氧培养24小时, R<sub>0</sub>K<sub>a</sub>—R<sub>01</sub>/肉汤厌氧培养72小时, 培养温度均为27°C, 然后加入1ml腺苷三磷酸双磷酸酶, 室温作用1小时, 再将此膜插入膜固着器中, 用移液管加入过量的反应物, 过滤, 用100ml水冲洗, 此膜成为无菌平皿, 加入500μl hibitane(提取液), 提取200μl于试管中, 再同100μl虫荧光素/虫荧光素酶反应, 用生物照度计测定所发射出来的光。

**结果和讨论:** 用生物照度计的结果表示生长与不生长, 根据此实验, 当样品>空白三倍以上时为阳性, 即生长。此法能在1天内检测出酵母菌, 3天内检测出乳酸菌, 比现在所用的标准方法优越, 特别是标准方法培养乳酸菌所需的时间长达7天。各种微生物均可用生物照度计进行检测。

在过去的10年中, 生物发光方法学已经引起越来越多的人的关注, 进展很快, 以前由于反应物缺少及价格昂贵等原因使它的应用受到一定的限制, 现在这些问题大部分已经解决, 仪器相当便宜, 它在发酵工业中的潜在应用是相当广泛的。

陈艺虹 摘译自J. Inst. Brew., 95 (9-10): 317-319, 1989.