

4.3 不同部位软化特性不同,髓部和种子区果肉一直呈下降之势,而果皮下面肉则不同,中

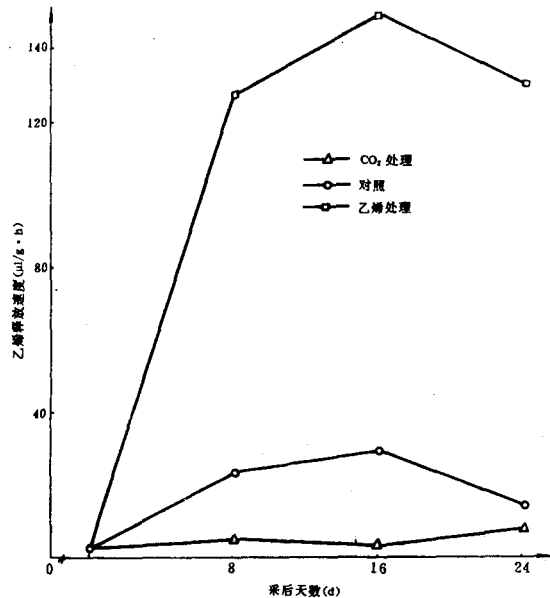


图4 猕猴桃果实乙烯释放的变化

期有所回升。通过观察,我们认为这是由于髓部淀粉分解通过射线细胞运输到果皮下面肉,使其细胞的膨压增大所致。有关淀粉与猕猴桃软化的特性有待深入研究。

4.4 不同部位乙烯浓度不同表明,种子区果肉是果实乙烯释放的主要区域,因此,深入研究其原因和调控技术,对控制果实乙烯释放和软化有意义。

参 考 文 献

- 1 张培正,伏健民,王瑛.猕猴桃果实耐贮性构成因素的灰色关联分析.食品科学,1991,(2):10~12.
- 2 张素梅等.中华猕猴桃贮藏期间呼吸与乙烯释放规律的研究.园艺学报,1985,12(2):95~99.
- 3 Beyer E JR. Effect of silver ion, carbon dioxide, and oxygen on ethylene action and metabolism. plant physiology, 1974, (63):169~173.

生物发光法快速检测食品中活菌总数

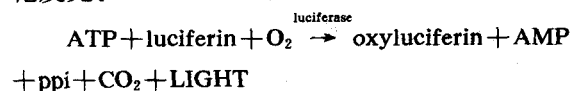
王华全 湖北进出口商品检验局 430022

摘 要 生物发光法检测食品中活菌总数具有快速、简便、灵敏等优点,经与常规的平板计数法比较,结果无明显差异,可作为食品生产过程中快速微生物监测手段。

关键词 生物发光法,细菌,食品

生物发光现象在公元前4世纪即有记载,然而深入研究化学发光机理,并应用于生物学实践之中,国外也仅10余年历史,国内则处于起步阶段。由于发光分析技术具有超灵敏、重复性好、所需设备和试剂简便、方法快速等优点,日益引起更多学者的关注。生物发光法测定活菌总数的基本原理是:ATP是包括细菌在内的活细胞中最普遍的一种代谢物,含量相对稳定,以ATP为能源,萤火虫发光毒酶(firefly luciferase)催化萤火虫发光素(firefly luciferin)氧

化发光。



该反应对ATP呈特异性,当固定发光试剂于饱和量下,发光强度与样品ATP含量呈正比。据此,可得出样品中细菌总数。

近年来,WHO、FAO、等国际组织极力推广以生产(加工)安全规范(good manufacture practice)(简称GMP)和分析危险(有害物)的关键性控制点(HACCP)为内容的产品安全优质

保证措施,它在保证食品安全优质方面的重大作用和效果已被许多国家的实践所证实。为促进我国外贸的发展,国家进出口商品检验局科技委员会提出在八五期间建立我国出口食品安全优质保证体系,并将其列为“八五”攻关项目,该体系的灵魂是建立快速检测方法,用快速检测方法在生产现场监测从原料选购到成品生产直至成品的贮藏、运输整个过程,从而为有效地控制产品质量提供可靠的信息。为此,作者在借鉴国外有关经验的基础上,将生物发光法应用于我国食品中活菌总数的检测获得成功,现将方法及结果报告如下:

材料与方法

1 材料

1.1 仪器:DG 3030 发光光度计(南京产)。

1.2 试剂:

1.2.1 ATP 分析试剂盒,瑞典 Pharmacia 公司提供。该试剂盒包括 5 种试剂:

a. 1243-200 ATP 测试剂

b. 1243-201 ATP 标准品

c. 1243-224 TCA

d. 1243-225 二甲苯酚蓝

e. 1243-227 Tris-乙酸缓冲液

1.2.2 计数琼脂,配方见 GB 4789.28-84

2 方法

2.1 样品准备:生物发光法测定 ATP 极限一般为 1×10^{-13} mol,相当于 1×10^4 左右活菌数。而一般食品中细菌数均低于该值,所以在测试前应进行适当的浓缩。

2.1.1 液体食品:用离心或过滤的方法浓缩,取沉淀制的悬液,或用孔径 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,收集滤膜表面的细菌制成悬液备用。

2.1.2 固体食品、匀质,使其成为混悬液,然后低速离心,取上层悬液,再用高速离心或微孔 ($0.22 \mu\text{m}$) 滤膜过滤的方法浓缩细菌,供备用。

2.2 ATP 的抽提

2.2.1 器具:

2.2.1.1 试管

2.2.1.2 微量吸管或微量加样器

2.2.1.3 机械混合器

2.2.2 试剂:

2.2.2.1 1243-224 TCA

2.2.2.2 1243-225 二甲苯酚蓝

2.2.2.3 1243-227 Tris-乙酸缓冲液

2.2.2.4 4 mM EDTA

2.2.3 抽提过程

2.2.3.1 从 20% (w/v) TCA 原液稀释到所需浓度,稀释后的 TCA 应含 2 mM EDTA。

2.2.3.2 加二甲苯酚蓝到 TCA-EDTA 溶液,最后浓度低于 0.02% (w/v)。

2.2.3.3 准备一系列含有适当容量 (0.1-1.0) ml TCA/二甲苯酚蓝混合液,这些试管在抽提中可放在室温中。

2.2.3.4 用微量吸管吸取上述已制备好的样品悬液加入含混合液的试管。

2.2.3.5 用机械混合器用力混合 1~2 min,检查试管内溶物是否呈红色。

2.2.3.6 在室温下设置 5-10 min。

2.2.3.7 进行 ATP 分析前,稀释的抽提液中 TCA 须低于 0.1%,二甲苯酚蓝低于 0.002%。

2.3 ATP 测定

2.3.1 设备:DG 3030 发光光度计

2.3.2 试剂:

2.3.2.1 1243-200 ATP 测试剂

2.3.2.2 1243-227 0.1 M Tris-乙酸缓冲液,含 2 mM EDTA, pH 7.75。

2.3.3 测定方法

开机预热 10 min,然后按下列顺序将试剂和样品加入测试杯:

ATP 测试剂 200 μl

Tris-乙酸缓冲液 600-800 μl

将已加上述两种试剂的测试杯放入机器内测定其本底值。

待检样品 10-200 μl

立即测定加样后的发光值,从该发光值中减去本底值,即待检样品中 ATP 的发光值,查标准曲线即可求得待检样品中的活菌总数。

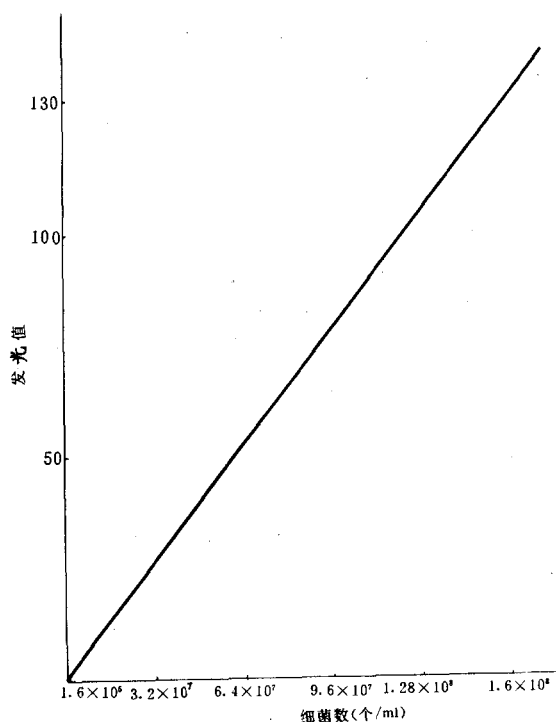
2.4 标准曲线的制备

用 1.6×10^8 个/ml 细菌悬液,分别作 2、5、

10、100、1000倍稀释,将准确稀释后的每个细菌悬液,在 DG 3030型发光光度计上测定其 ATP 发光值,各个细菌悬液的浓度及测定的 ATP 发光值如下:

细菌悬液浓度(个/ml)	ATP 发光值
1.6×10^8	130
8.0×10^7	65
3.2×10^7	34.8
1.6×10^7	16.4
1.6×10^6	3.3
1.6×10^5	1.1

以测定的 ATP 发光值为纵坐标,细菌悬液浓度为横坐标,制备标准曲线如下:



结果与讨论

由于市售饮料一般均无菌或很低,无法测定,特用人工污染菌的方法将非致病菌随机地加入20个市售软包装健力宝饮料中,菌量不等,将这20个市售软包装健力宝饮料作为测定样品,同时用发光法和传统的平板计数法计数活菌总数,平板法用 GB 4789. 2-84方法,发光法用上述方法,结果如下:

1 测验假设:假设两种方法计数差为零,即 $\mu=0$

2 计算样品 t 值:

样品号	发光法	平板法	两法计数差
1	7.04×10^7	9.5×10^6	6.09×10^7
2	7.52×10^7	3.4×10^7	4.12×10^7
3	8.32×10^7	4.3×10^7	4.02×10^7
4	8.5×10^7	7.9×10^7	6×10^6
5	9.92×10^7	6.7×10^7	3.22×10^7
6	8.0×10^7	1.6×10^7	6.4×10^7
7	7.52×10^7	2.1×10^7	5.42×10^7
8	1.06×10^8	6.6×10^7	4×10^7
9	1.1×10^8	3.3×10^7	7.7×10^7
10	1.06×10^8	5.4×10^7	5.2×10^7
11	3.68×10^7	2.4×10^7	1.28×10^7
12	8.0×10^7	7.0×10^7	1×10^7
13	7.44×10^7	1.2×10^8	-4.56×10^7
14	5.76×10^7	1.2×10^8	-6.24×10^7
15	3.2×10^7	4.2×10^7	-1×10^7
16	5.76×10^7	6.5×10^7	-7.4×10^6
17	1.44×10^7	5.0×10^7	-3.56×10^7
18	2.24×10^7	4.5×10^7	-2.26×10^7
19	3.36×10^7	7.2×10^7	-3.84×10^7
20	4.8×10^7	4.1×10^6	-3.62×10^8

合 计 $n=20$ $\bar{x} = -4.675 \times 10^6$

$$S_x = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{1.32 \times 10^8}{4.47} = 2.95 \times 10^7$$

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{S_x} = \frac{4.68 \times 10^6}{2.95 \times 10^7} = 0.16$$

3. 比较:

查表:当 $f=19$ 时,

$$t_{(19)0.05} = 2.09$$

$$\text{样本 } t < t_{(19)0.05}$$

$$P > 0.05$$

结论:两种计数方法的计数结果无显著差别。

以上统计结果表明,发光法与平板计数法

结果无明显差异,发光法测定食品中活菌总数是可行的。

在我们的研究中也注意到,发光法和平板计数法都有一定的计数误差。发光法主要是浓缩误差,样品中菌量越低,误差越大。平板法相反,主要是稀释误差,菌量越高,误差越大。在实验测定中应严格操作,尽量降低误差。

发光法的检测极限为 1×10^{-13} mol,相当于 1×10^4 左右活菌数,我们实验结果与国外资料报告的基本相符。根据中华人民共和国国家食品卫生限量标准,所有食品类细菌总数限量均低于 1×10^4 个/ml。因此,样品中细菌的浓缩是必不可少的步骤。浓缩方法一般有两种,即离心和过滤。这要视样品而选择,对每一种食品都要摸索其浓缩的最适条件:我们的体会是比较清亮,含沉淀物少的饮料用过滤的方法较好;固体食品用离心的方法,或者离心与过滤结合的方法较好,离心时要根据不同的样品选择不同的离心速度。

细菌中 ATP 抽提是否完全直接关系到测定结果的准确性,由于不同类型细菌的细胞壁厚薄不同,使用抽提剂的浓度也应不同,细胞壁厚的要用较高浓度抽提剂,反之,要用较低浓度的抽提剂。根据资料及我们的经验,提出一个参考浓度:

细菌类别	抽提剂(TCA)浓度(w/v)
真菌	2.5-5.0%
细菌	0.2-2.5%

在 ATP 测定中我们发现,CL⁻除 M_g²⁺ 以外

的阳离子对发光有一定的干扰,因此,检测中的稀释剂要用 EDTA 缓冲液,并尽量避免用生理盐水作稀释剂,降低离子对发光反应的干扰。

小 结

利用生物发光的原理快速检测食品中活菌总数,具有灵敏、重复性好、所用试剂简便、方法快速等优点,在1h内可报告结果,比常规的平板计数法节省1天时间,作为出口食品生产中快速微生物监测手段是可行的,对建立我国出口食品安全优质保证体系有现实意义。

参 考 文 献

- 1 孟昭赫主编. 食品卫生检验方法注解,微生物学部分. 人民卫生出版社,1990.
- 2 Philip E. stanley J. Bioluminescence and Chemi-luminescence, 1989, 4: 375~380.
- 3 N. Yu. Filippova. J. Bioluminescence and Chemiluminescence, 1989, 4: 419~422.
- 4 Eric Schram. J. Bioluminescence and Chemiluminescence, 1989, 4: 390~398.
- 5 Stanard C. J In "Analytical Application of Bioluminescence and chemiluminescence" 53. New York; Academic Press, 1984.
- 6 Emmett W et al. In "Bioluminescence and chemiluminescence" (Ed Deleuea M A) 65. New York; Academic Pegg, 1978.
- 7 Arne Lundin and Anders Thore. Applied Microbiology, 1975, 30(5): 713~721.

快速筛选鉴别霉变谷物特效法

摘要 介绍一种快速筛选谷物麦角甾醇的特效定性分析法。麦角甾醇可作为衡量谷物类食品是否霉变的有效标记物,由此可鉴别谷物食品是否霉变。本方法鉴别原理为:首先使谷物食品中麦角甾醇与碘发生碘化反应,生成一种强荧光加合物——碘化麦角甾醇,此物质受紫外线照射即发出特征的淡绿兰色荧光。然后又用化学法处理,进一步确证。