

文章编号: 1000-8551(2005)04-282-04

ATP 发光技术测定辐照前脱水蔬菜和调味品的含菌量

冯 敏 高 岳 吕海燕 杨书华 万定珍 王泽港
罗时石 马 飞 葛才林

(扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室, 江苏 扬州 225009)

摘 要:用 ATP 发光技术测定脱水蔬菜和调味品的初始含菌量, 发现脱水蔬菜和调味品中细菌 ATP 的生物发光强度与其初始含菌量之间显著相关, 从样品的制备到获得 ATP 发光强度结果的检测过程仅需 1~2h。该技术可用于辐照灭菌前的微生物检测。

关键词:脱水蔬菜; 调味品; 初始含菌量; ATP 生物发光; 快速检测

THE RAPID BIOLUMINESCENCE ASSAY METHOD FOR CONTENT OF BACTERIA IN DEHYDRATED VEGETABLE AND CONDIMENT BEFORE RADIATION

FENG Min GAO Yue LU Hai-yan YANG Shu-hua WAN Ding-zhen
WANG Ze-gang LUO SHI-shi* MA Fei GE Cai-lin

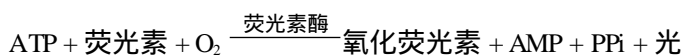
(Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou, 225009)

Abstract: The microbial colony-forming unit (cfu) in dehydrated vegetable and condiment was determined by using ATP bioluminescence method. The result showed that bioluminescence of ATP was correlative to the microbial cfu obviously. The detecting time was within 1~2h. This method could be applied to determine micro load of products before irradiation sterilization.

Key words: dehydrated vegetable; condiment; initialization cfu of bacteria; ATP bioluminescence; rapid assay

脱水蔬菜和调味品在加工、储运过程中易被微生物污染, 造成含菌量超标, 使产品的销售受到了一定的限制。辐射灭菌技术已广泛地应用于脱水蔬菜和调味品的灭菌处理。辐照前样品的初始含菌量是制定辐照工艺的重要依据之一, 但常规的细菌检测方法需要 24h 以上, 所以多凭经验确定产品的辐照剂量, 以致造成过量照射浪费能量, 或灭菌不彻底。因而实践中希望有一种快速、方便的细菌检测方法, 这已成为辐照灭菌行业迫切需要解决的问题。

荧光素-荧光素酶测定法是快速检测微生物的方法之一, 其理论基础在于 ATP 是包括细菌在内的活细胞中最普遍的一种能量代谢物, 生物体内含量相对稳定。以 ATP 为能源, 荧光素酶催化荧光素氧化发光:



该方法可在几分钟^[2]内快速地得出含菌量, 已成功地应用于病员尿液、肉制品、饮料和酒类中细菌的快速检测。这一技术在辐照灭菌方面的应用尚未见报导, 本文对 ATP 发光分析技术在脱水蔬菜和调味品初始带菌量的检测方面的应用进行了初步研究。

收稿日期: 2004-09-07

作者简介: 冯 敏(1980-), 女, 江苏射阳人, 硕士研究生, 从事食品辐照保鲜、灭菌研究。Email: fengmin8156@163.com。罗时石为通讯作者, Email: luoss@yzcn.net

1 材料和方法

1.1 供试材料 脱水香葱粉、胡椒粉和辣椒粉,由江苏省兴化市新益食品厂提供。荧光素酶、荧光素、ATP 标样等试剂购自中科院上海植物生理所。

1.2 提取回收率:

回收率按内标法^[3],采用下式进行计算:

$$\text{提取回收率}(\%) = \frac{\text{加 ATP 标样的样品 } RLU_{\max} - \text{CK 的 } RLU_{\max}}{\text{ATP 标样的 } RLU_{\max}} \times 100\%$$

1.3 提取液颜色的影响

配制浓度分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 的柠檬黄溶液,取 9 支无菌试管,每管内加入脱水香葱粉 1g,1 号管作对照,不加柠檬黄溶液,2~9 号管分别加入浓度由小到大的柠檬黄溶液各 1ml,经提取、发光测量等过程,测试 ATP 的发光强度。

1.4 细菌 ATP 的检测

检测按以下步骤进行:样品的制备;样品的稀释、匀浆;非细菌 ATP 的清除;细菌 ATP 的提取;ATP 的生物化学发光测定。具体如下:

1.4.1 样品的制备 将每种供试材料分成两份,其中一份进行高压灭菌处理,一份不灭菌,并将两份材料按一定比例混合,配置一组含菌量不同的样品,分别进行细菌菌落总数检测和细菌 ATP 生物发光测定。

1.4.2 菌落总数的检验 按照食品卫生微生物学检验标准(GB4789.2-1994)进行。

1.4.3 非细菌 ATP 的清除 称取配置好的样品 0.5g,脱水香葱按 1:20(m/v)、调味品按 1:10(m/v)的比例加入 Tris-EDTA(20mmol/L Tris + 2mmol/L EDTA, pH7.75)充分混匀、匀浆,加入等体积的 0.2% Triton X-100 和 0.15% Apyrase 混合液,在室温下放置 10min。

1.4.4 细菌 ATP 的提取 将清除非细菌 ATP 的匀浆液在沸水浴煮沸 90s,立即冷却后离心 3min,取上清液作 ATP 待测液。

1.4.5 ATP 的生物化学发光测定 用 SHGD 生物化学发光仪(上海检测仪器厂生产)测量发光强度。测定条件为:温度 25℃、测定时间 10s,测量值取 10s 内的积分值(即相对发光单位 RLU)。测量步骤如下:加入 200μl ATP 待测液于发光管内;注入 800μl 荧光素-荧光素酶混合液,立即测其发光值(RLU_{max})。

由于光线的照射能使测量值出现短暂偏高的现象,因此,测量管在放入测量室后均暗适应 15min 再进行测量。

2 结果与分析

2.1 非细菌 ATP 的清除及对发光强度的影响

在应用 ATP 生物发光检测含菌量时,来自于细菌以外的 ATP(主要是产品中所含动、植物体细胞游离出的 ATP)有可能产生干扰,使测量结果偏高,因此有必要消除这部分 ATP 对发光强度测量的影响。我们对 3 种供试材料都进行了试验,结果 3 种材料中非细菌 ATP 的发光强度都远小于细菌 ATP 的发光强度,它们对总体发光强度的影响都小于 0.9%,从简化测量过程的角度考虑,在进行上述 3 种样品初始含菌量的检测时,可省略清除非细菌 ATP 这一步骤。

2.2 细菌 ATP 的适宜提取时间与提取回收率

本试验采用 Tris-EDTA 加热提取细菌 ATP 的方法,提取的时间过长则有可能使 ATP 产生分解,而提取的时间过短,则有可能对 ATP 提取不完全,为了掌握适宜的提取时间,我们以脱水香葱粉为材料,进行了提取时间对发光强度影响的试验,结果如图 1。从图中可以看出,提取时间在 90s 时发光强度最大,故确定提取时间为 90s。

提取回收率也是影响试验结果的关键因素,我们用内标法对该法的提取回收率进行了测试。结果列于表 1,3 种材料的回收率都大于 95%,从而证实了用此法提取 ATP 的可行性。

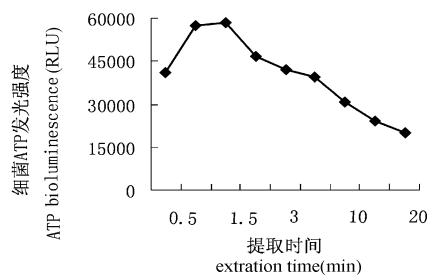


图 1 提取时间与 ATP 发光强度的关系

Fig. 1 Relation between extration time and ATP bioluminescence

表 1 样品 ATP 提取回收率的测定试验

Table 1 Test on reclaim rate of ATP

样品名称 sample	处理发光强度 RLU of treatment	对照发光强度 RLU of CK	回收率 reclaim rate (%)
脱水香葱粉 dehydrated shallot powder	11198	10649 ±672	95.1
辣椒粉 capsicum powder	11198	10906 ±295	97.4
胡椒粉 pepper	11198	11418 ±392	102

2.3 提取液的颜色对发光强度的影响

由于供试材料本身具有颜色,细菌 ATP 的提取液会带有或深或浅的颜色。为分析颜色对发光强度的影响,我们取 9 份含菌量一致的脱水香葱粉进行试验。在脱水香葱粉的含菌量相同的情况下,若不加柠檬黄溶液,各份材料测得的细菌 ATP 的发光强度应该相同。在材料中加入柠檬黄溶液后,再经提取,得到的测量结果与不加柠檬黄溶液的结果发生了偏差,且色素的含量越高,偏差就越大(图 2)。究其原因,生物发光仪对 ATP 的测量,是检测样品中的 ATP 在荧光素-荧光素酶的作用下所发出的荧光强度,细菌 ATP 提取液的颜色越深,光子的淬灭就越严重,对发光强度的影响就越大,因此在进行 ATP 生物发光测定时必须考虑颜色对测量效果的影响。

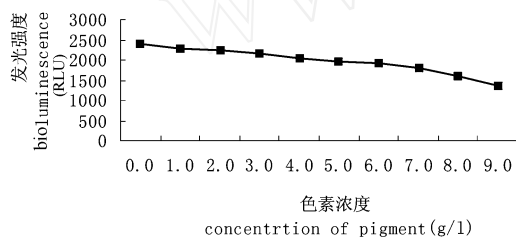


图 2 样品提取液颜色对发光强度的影响

Fig. 2 Effects of liquor color on bioluminescence

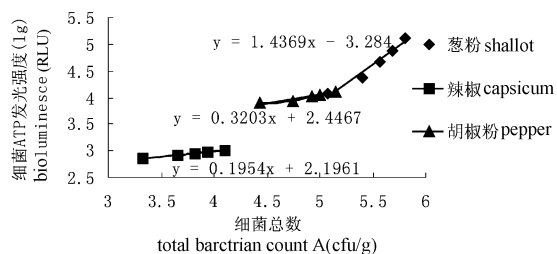


图 3 细菌总数与细菌 ATP 发光强度的关系

Fig. 3 The relation between bioluminesce degree and total bacterial count

2.4 ATP 的发光强度与样品含菌量的相关性分析

以细菌菌落总数的对数值为横坐标、细菌 ATP 发光强度的对数值为纵坐标作图,得到的 3 条回归方程分别是: $Y_{\text{葱粉}} = 1.4369x - 3.284$, $Y_{\text{胡椒粉}} = 0.3203x + 2.4467$, $Y_{\text{辣椒粉}} = 0.1954x + 2.1961$ 。经统计分析,在 $\alpha = 3$ 时, $r_{0.05} = 0.87$ 、 $r_{0.01} = 0.96$,而 3 种供试材料的 r 值分别为 $r_{\text{葱粉}} = 0.98$ 、 $r_{\text{胡椒粉}} = 0.98$ 、 $r_{\text{辣椒粉}} = 0.99$,它们都大于 $r_{0.01}$,说明 3 种供试材料的细菌 ATP 的发光强度与细菌菌落总数都呈极显著的相关,即 ATP 生物发光测试技术与常规的细菌培养方法有很好的相关性。图 3 中 3 条曲线的斜率有所不同,主要是由于样品溶液带有的颜色不同。

3 小结与讨论

结果表明:在不需添置任何复杂设备的情况下,从待测样品的制备到细菌 ATP 的提取,直至 ATP 发光强度的检测,整个过程可在 1 ~ 2h 内完成,具有快速、简便的特点,可以满足一般辐照加工企业材料初始含菌量快速检测的要求。且细菌 ATP 发光强度与供试材料的初始含菌量达到极显著的正相关,说明 ATP 生物发光测试技术与常规的细菌培养方法有很好的相关性。但在测试过程中应考虑到细菌 ATP 提取液的颜色对测试结果的影响。

参考文献：

[1] 舒伯华,孙丹麦,等. 肉类食品细菌污染生物发光快速分析技术研究. 中国公共卫生,2003,19(4):483~484

[2] 食品卫生微生物学检验:菌落总数测定. 中华人民共和国国家标准,GB4789.2-94

[3] 李立人. 植物和微生物中ATP的提取及测定方法评述. 植物生理学通讯,1986(4)5~11

[4] 吴怀春,高兰兴等. 全血ATP快速测定法. 解放军预防医学杂志,1994,12(5):364~366

[5] 胡天喜. 发光分析与医学. 华东师范大学出版社,1990:133~147

2006 年农学类核心期刊联合征订启事

刊 名	第一主办单位	邮发代号	刊期	定价(元)	年价(元)	E-mail	电话
北京林业大学学报	北京林业大学	82-304	双月	10	60	bldxeb@bjfu.edu.cn	62337673
大豆科学	黑龙江省农业科学院	14-95	季刊	10	40	dadoux@sina.com	0451-86668735
分子植物育种	海南省生物工程协会	84-23	双月	40	240	mpb@hitar.org	0898-88831073
核农学报	中国原子能农学会	自发	双月	10	60	hnxbs109@263.net	62815961
激光生物学报	中国遗传学会	42-149	双月	10	60	jgsweb@hunnu.edu.cn	0731-8872208
昆虫学报	中国科学院动物研究所	2-153	双月	25	150	kcxbs@ioz.ac.cn	82872092
昆虫知识	中国科学院动物研究所	2-151	双月	25	150	entom@ioz.ac.cn	82672247
麦类作物学报	西北农林科技大学	52-66	双月	10	60	mlzweb@pub.xaonline.com	029-87082642
棉花学报	中国农学会	36-63	双月	10	60	Jcotton@vip.371.net	0372-2525361
农业生物技术学报	中国农业生物技术学会	2-367	双月	20	120	nsjxb@cau.edu.cn	62733684
水生生物学报	中国科学院水生所	82-329	双月	30	180	acta@ihb.ac.cn	027-68780701
微生物学报	中国科学院微生物所	2-504	双月	30	180	actamicro@sun.im.ac.cn	62630422
微生物学通报	中国科学院微生物所	2-817	双月	32	192	xuj@sun.im.ac.cn	62630421
畜牧兽医学报	中国畜牧兽医学学会	82-453	月刊	20	240	xmsyxb@263.net	62815987
遗传	中国遗传学会	2-810	月刊	30	360	yczz@genetics.ac.cn	64889348
遗传学报	中国遗传学会	2-819	月刊	40	480	ycxb@genetics.ac.cn	64889354
植物学通报	中国科学院植物所	2-967	双月	24	144	Cbb@ibcas.ac.cn	62595403
中国棉花	中国农业科学院棉花所	3624	月刊	3	36	Jcotton@vip.371.net	0372-2525361
中国农业科学	中国农业科学院	2-138	月刊	39.50	474	zgnykx@mail.caas.net.cn	68919808
中国农业科学英文版	中国农业科学院	2-851	月刊	20	240	zgnykx@mail.caas.net.cn	68975146
中国生态农业学报	中国科学院遗传发育所	82-973	季刊	14.6	58.4	editor@ms.sjziam.ac.cn	0311-85818007
中国生物防治	中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所	2-507	季刊	10	40	zhangxl@cjac.org.cn	68919774
中国水产科学	中国水产科学研究院	18-250	双月	20	120	jfshok@publica.bj.cninfo.net	68673921
作物学报	中国作物学会	82-336	月刊	30	360	xbzw@chinajournal.net.cn	68918548