

保障乳品安全的快速检测技术进展*

郭清泉¹, 廖如燕², 曾 旸³

(1 广东工业大学轻工化工学院 广州 510006; 2 广州市出入境检验检疫局 广州 510623;
3 汕头大学医学院 汕头 515041)

摘要: 乳品的快速检测技术可以保障乳品行业健康快速发展。本文分别论述了乳品相关快速检测技术的研究与应用现状,包括违禁掺杂物、细菌总数、致病菌、抗生素和生物毒素等影响乳品安全的几个因素的检测技术,同时综合分析各种技术的优缺点,并对目前该领域的发展作出展望:综合生物技术、信息技术已经成为快速检测技术的必然趋势。

关键词: 乳品; 快速; 检测技术

中图分类号: R155.5⁺7 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 330.47

The advancement of rapid detection technologies for protecting dairy safety

Guo Qingquan¹, Liao Ruyan², Zeng Yang³

(1 Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;
2 Guangzhou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China;
3 Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract: The rapid detection technologies for dairy safety are adopted to ensure that the dairy industry can develop healthily and rapidly. In this paper, the rapid detection technologies to determine illegal additives, total bacteria, pathogens, antibiotics and biological toxins in milk are reviewed. Both advantages and problems of these rapid detection technologies are discussed, and the prospects of this area are presented: There is a growing tendency for rapid detection technology to combine biotechnology with information technology.

Key words: dairy; rapidness; detection technology

1 引言

乳品因在人民生活健康保障方面的重要作用,已经成为我们重点发展和优先发展的行业。目前我国乳品行业正处于一个高速发展的时期,乳制品的品种和产量日益增加,同时,消费量也快速增长。但随之而来的产品安全问题也越来越突出。原料乳的质量参差不齐,乳品企业生产状况差别巨大,产品在储存、运输、销售中的不同

境况,以及对乳制品质量的检测手段滞后,这些因素都导致我国乳制品的安全性难以得到保障^[1-2]。

为了老百姓能放心的喝到真正健康有营养的牛奶,我们需要在加强民众素质教育、法制教育的同时,相应提高保障乳品安全的快速检测手段,这样才能适应当前乳品行业大批量、实时化、现场化的需要。目前已经有多种快速检测技术出现,并且随着准确度、精密度的提高,检测费用的不断降低,有一些技术已经应用到实际生产和

* 项目基金: 广东省科技计划项目(2008B021400006)

产品监管中。本文根据不同影响乳品安全的因素类型,分别对现有的快速检测技术进行论述。

2 乳中掺杂的快速检测技术

人为向天然牛乳中添加廉价或没有营养价值的物质,或为了掩盖生鲜牛乳真实的质量而加入防腐物质,或是为了提高牛乳品质而加入非食用物质或有毒有害物质等行为,均可称为掺杂使假。例如:为了增加重量而掺水;为了降低乳品的酸度而向乳中加尿素等碱类;为达防腐目的向乳中加入过氧化氢、甲醛、硫氰酸盐等防腐剂;为增加乳汁的稠度向乳中加入米(面)汤、淀粉、糊精或豆浆;为提高乳蛋白含量而加入三聚氰胺或其他含氮物质,如尿素、糖类物质等。所有上述物质对天然乳来讲均属异物,都是为了掩盖乳的真实质量。

对各种掺假牛乳的现有的检测方法基本采用感官和理化方法,存在主观上的不确定性,大多需要复杂的样品处理过程,而且只能对特定掺假物进行检测。目前市场上有多指标乳成分快速检测的仪器,如丹麦 FOSS 公司及美国 Bentley 公司,都是利用傅里叶红外原理,但价格昂贵,一般企业和牧场无法使用。姜潮,韩剑众等^[3]采用低场核磁共振分析仪,结合主成分分析法(PCA)分析处理 Carr-purcell-meiboom-gill(CPMG)序列的检测数据,建立一种能有效分析处理样品弛豫数据的快速方法,对几种常见掺假形式的(掺入水、食盐、尿素、豆浆等)牛乳样品、复原乳以及纯牛乳样品进行了很好的检测和区分。但这一方法检测成本同样高昂,并且不适合现场检测。此外,基于 PLS-模式识别近红外光谱技术可以检测掺杂植物奶油,并建立了掺假植物奶油浓度范围在 0.5%~10% 的定量检测模型^[4]。高效液相色谱法测定三聚氰胺,已经作为国家标准在 2008 年出台^[5]。目前硫氰酸盐的检测方法主要有分光光度法、衍生气相色谱法等,操作繁琐、灵敏度偏低,且需使用有害的显色剂和衍生剂,刘明^[6]采用三氯乙酸、乙腈去除样品中蛋白质,以 C₁₈ 固相萃取小柱净化后,快速测定乳样中的硫氰酸盐含量,方法简便,灵敏度、准确度均能得到满意的结果。王彦娟等人采用酶抑制率法检测

乳品中有机磷类农药,可以在 30 min 内对甲胺磷、久效磷、对硫磷、甲基对硫磷、甲拌磷、氧乐果等高毒农药进行检测,但是还不适用于非有机磷类农药的检测。同时各种基于显色反应的检测试纸,比色法等都可以实现都特定指标掺杂物(尿素、亚硝酸盐、淀粉、糊精、甲醛等的检测^[7-8])。但是,这些技术仅从单一掺杂物角度来实现快速定性或定量或半定量检测,如何实现各种残杂物的综合快速检测,确定乳及乳制品与有掺杂物乳之间的根本鉴别,还需要从乳自身成分出发,做到先验真假,在有需要的情况下再确定假为何物以及其危害。

3 乳中细菌总数快速检测技术

乳中微生物数量会影响产品的质量、货架期及生产流程的安全性。微生物的检测方法有很多种。传统的平皿计数法是应用最广泛的。但该方法耗时长,不能及时检测不易繁殖的细菌。近年来,微生物的快速检测得到了很大的发展,比较成熟的有化学发光法、ATP 生物发光法、固相细胞计数法等。Sharpe 等^[9]第一个利用 ATP 生物发光技术检测牛奶中细菌含量。现在随着处理技术的进步,已经能在 5~10 min 内准确检测出牛奶中细菌数量^[10]。也可以通过 ATP 生物发光法牛乳中的体细胞数(somatic cell count, SCC),体细胞数是衡量牛乳品质与奶牛乳腺健康的重要指标^[11],东北农业大学的王宁,刘宁等人^[12]采用流式细胞仪对原乳的细菌总数进行了测定,并对前处理技术进行了研究,改进了测量的准确度,而且检测成本低。而英国的 MALTHUS 微生物分析仪,测量在适当的培养基中微生物生长而导致的电导率的变化,样品只要为液体,就可以直接注入测试瓶中,而不需要系列的稀释,非常方便^[13]。郭光美,王振川^[14]以抽滤的方式,将待测样品富集在细菌滤膜上,把细菌滤膜固定在玻碳电极上,在磷酸盐缓冲液中进行反应,利用伏安法检测牛乳及乳制品中的细菌总数,从而判断牛乳及乳制品中的细菌污染程度。其结果与常规平板计数比较,差别无显著性。

4 致病菌的快速检测技术

根据现有的调查研究,国内乳品中的致病菌主要为金黄色葡萄球菌、致病大肠杆菌、沙门氏菌、李斯特氏菌、阪歧肠杆菌、蜡样芽胞杆菌等。鉴于金黄色葡萄球菌、致病大肠杆菌、沙门氏菌、李斯特氏菌、阪歧肠杆菌等食源性致病菌严重威胁人类生命安全和健康,国内外学者一直致力于其检测技术的研究。我国现行的选择分离培养、生化试验和血清学等经典方法,全过程需4~6天,耗时长,操作繁琐,不适合食品的快速检测,不能满足及时、快速、正确评价食品微生物安全性的要求。目前,国内外逐渐由原来经典的选择分离培养、生化试验和血清学的方法,发展到如今以免疫和PCR为基础的相关衍生技术为主导的快速检测技术。ELISA试剂盒等免疫检测方法,存在易自凝、依赖进口、样品菌株必须纯化等问题^[15]。而国内外目前正在进行核酸探针、PCR检测技术的研究和相应试剂盒的研制^[16-19],这些分子检测方法的技术瓶颈是检测靶点的匮乏。同时,我国现在还很少有这类检测技术的专利。当前,微生物全基因组测序计划的开展,为食源性致病菌分子生物学快速检测方法建立提供了大量已知的基因组序列,这些信息资源为解决分子检测特异靶点少这一瓶颈问题提供了条件。利用生物信息技术对致病菌及相关菌株的全基因组序列进行比较分析,确定其致病相关基因或致病菌基因组的特异片段,筛选出一批可用于检测食源性病原菌的特异靶点,使高通量检测技术的建立成为可能,而在此领域的研究工作国内刚刚起步。本课题组通过分子生物学技术,构建一段的特殊DNA片段,作为扩增内标(Internal amplification control, IAC)添加到PCR反应体系,用于致病性大肠杆菌的检测,使之在不降低检测灵敏度的前提下,能够指示假阴性,可以避免PCR检测结果的误判,有助于提高检测准确率。而对于PCR测定中,如何快速富集菌数这一制约检测速度的瓶颈问题也有较好的解决方案^[20]。此思路和相关技术可以扩大到乳中其他致病菌的检测。

5 乳中抗生素和毒素的快速检测技术

抗生素作为动物饲养的饲料药物添加剂,在控制动物疾病、促进生长、提高饲料转化率方面发挥着重要的作用。然而,残留在乳中的抗生素会给人体带来许多不良后果,会使正常人被动接受、积累抗生素,造成人体生理紊乱,若一次摄入残留物的量过大,则会出现急性毒性反应^[21]。从乳制品加工的角度来看,抗生素严重影响干酪、黄油、发酵乳的起酵和后期风味的形成,抑制牛奶中细菌的正常增殖,造成验收人员对牛奶质量误判,从而损害企业的经济效益。而牛乳中如果存在黄曲霉毒素和金黄色葡萄球菌肠毒素,也会对人体健康产生严重影响^[22]。

抗生素残留物和微生物毒素的检测主要集中于理化分析法、微生物抑制分析法(MIT)和采用免疫分析法进行的快速筛查分析。国标氯化三苯四氮唑法(TTC)方法利用嗜热链球菌为菌种,作为测定鲜奶中抗生素残留的标准方法早已在国内得到广泛应用。但该方法有其局限性,具有时间长、操作烦琐、不易标准化等缺点。目前,抗生素残留物残留检测正加速朝着简单、快速、准确的方向发展。在国外,免疫学检测技术已经成为食品中农药、兽药残留、微生物毒素和食品安全质量控制的有效快速的检测手段。目前国外已研制出多种免疫试剂盒,用于农兽药残留和微生物毒素的检测,其中许多已商品化,并广泛应用于现场样品和大量样品的快速检测。各种免疫分析技术中,以ECLIPSE法使用最多,已经商业化的产品也多为ECLIPSE50、100试剂盒。金标免疫层析(GLIC)试纸一直在医学上应用较多,目前的发展趋势为制备更加灵敏、快速与可以同时进行多残留和多毒素检测的金标试纸。国内药残检测近几年才有金标层析试纸技术研究和应用,但多数采用多克隆抗体,而采用单克隆抗体的较少。而且目前已有的金标试纸均为单组分测定,一张试纸一次只能测定样品中的一种药物。时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)是近几年来在免疫荧光分析基础上发展建立的一种新型免疫分析技术,具有结合物制备较简单,有效使用期长,无放射性污染,应用范围广等优

点^[23]。同样,一些相关的新技术也应用到微生物毒素的快速检测中。虽然这些方法问世短,但发展却十分迅速,成为目前超微量物质免疫分析颇有发展前途的一类技术,如以 Charm 公司的放射免疫受体检测技术(RRA)可以对内酰胺类、氯霉素类、四环素类、磺胺类、青霉素及碱性磷酸酶等 6 项进行检测,并且已被 FDA 认证,可称得上是抗生素检测功能最全的技术^[24]。

6 结 论

随着人民生活水平的提高,大家越来越关心自己的身体健康,对食品中可能存在的威胁身体健康和生命的隐患都希望及早发现和排除。人们愿意看到新技术、新观念运用到食品安全检测技术当中去,而以往旧的、缓慢的、繁琐的检测过程已经不能满足现实的需要。因此,广大民众对关系到国计民生的乳品安全与质量的监控格外关注,希望用新兴的手段来提高检测效率和灵敏度。

采用现代生物技术、信息技术等高新技术来控制乳品的质量和安全,已经成为一种发展趋势。快速检测技术与传统检测技术,尤其是与微生物培养的传统检测技术相比,具有快速、灵敏、特异性强等优势。因为乳品体系的复杂性,如何降低多组分成分的干扰,提高检测的准确度,也是当前快速检测技术一个重要的发展方向。但仅依靠检测技术的进步,还不能完全保障乳及乳制品的安全性,完全依赖监管和检测技术的进步,会使我们始终处于被动中,应该通过加强立法和法律的执行力度,通过宣传教育提高民众的素质与道德水平等方面多管齐下,这样才能真正保证食品安全。

参 考 文 献

- [1] 花俊枝,朱香荣,晏玲. 中国乳业的健康、可持续发展研究[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(12): 37-40.
HUA J ZH, ZHU X R, YAN L. Striving for realization of healthy and sustainable development of dairy industry of China[J]. China Dairy Industry, 2009, 37(12):37-40.
- [2] 花俊国,朱香荣,晏玲. 乳业危机:机遇与挑战

[J]. 中国乳品工业, 2009, 37(6):38-41.

HUA J G, ZHU X R, YAN L. Dairy industry crisis: opportunity and challenge[J]. China Dairy Industry, 2009, 37(6):38-41.

- [3] 姜潮,韩剑众,范佳利,等. 低场核磁共振结合主成分分析法快速检测掺假牛乳[J]. 农业工程学报, 2010, 26(9):340-343.

JIANG CH, HAN J ZH, FAN J L, et al. Rapid detection of adulterated milk by low field-nuclear magnetic resonance coupled with PCA method [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2010, 26(9):340-343.

- [4] NAUMANN D, FIFALA V, LABISCHINSKI H, et al. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using FTIR and multivariate static analysis[J]. Journal of Molecular Structure, 2001, 174:165-170.

- [5] GB/T 22388-2008, 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法-液相色谱法[S]. 北京:国家质量监督检验检疫总局国家标准化管理委员会, 2008.

GB/T 22388—2008, The determination method of Melamine in milk and milk products[S]. Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, National Standardization Management Committee, 2008.

- [6] 刘明. 离子色谱法快速测定原料乳中硫氰酸盐含量的研究[J]. 安徽工程科技学院学报:自然科学版, 2010, 25(2):47-49.

LIU M. Rapid determination of sodium sulfocyanate in raw material milk by ion chromatography [J]. Journal of Anhui University of Technology and Science: Natural Science, 2010, 25(2):47-49.

- [7] ZHANG Y D, SUSANNE B M, HOLGER S, et al. Disposable biosensor test for organophosphate and carbamate insecticides in milk[J]. Journal of Agriculture Food Chemistry, 2005, 53:5110-5115.

- [8] 孙鹏,王俊,王加启. 牛乳掺假物质及其快速检测方法研究[J]. 中国奶牛, 2009, (9):49-51.

SUN P, WANG J, WANG J Q. The rapid determination methods of milk adulterants[J]. China Dairy Cattle, 2009, (9):49-51.

- [9] SHARPE A N, WOODROWMN, JACKSON A K. Adenosine tri-phosphate(ATP) levels in foods contaminated by bacteria[J]. Journal of Applied Bacteria, 1970, 33:758.

- [10] 李春艳,霍贵成,王德国,等. ATP 生物发光法快

- 速测定生乳中微生物总数的研究[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(7):103-106.
- LI CH Y, HUO G CH, WANG D G, et al. Research on rapid detecting microbial count in raw milk with ATP bioluminescence[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(7):103-106.
- [11] 管勇佳, 富鑫, 陈晓义, 等. ATP生物发光技术快速检测牛乳体细胞数[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(9):49-50.
- GUAN Y J, FU X, CHEN X Y, et al. Rapid detecting somatic cell count in raw milk with ATP bioluminescence technique [J]. China Dairy Industry, 2010, 38(9):49-50.
- [12] 王宁, 刘宁. 流式细胞术快速检测生乳中细菌总数[J]. 食品工业科技, 2007, 28(9):197-200.
- WANG N, LIU N. The flowing cell method to determine the total number of bacteria in raw milk [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(9):197-200.
- [13] SEVENSSON U K. Starter culture characterization by conductance methods swedish dairies' association[J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77(12):3516-3523.
- [14] 郭光美, 王振川. 伏安法快速检测牛乳及乳制品中细菌污染 [J]. 食品科技, 2006, (11):219-221.
- GUO G M, WANG ZH CH. Rapid determination of bacterial contamination in milk and dairy products by voltammetry[J]. Food Science and Technology, 2006, (11):219-221.
- [15] 刘伟, 姜毓君, 吕琦, 等. 原料乳中沙门氏菌的快速过滤富集及 PCR 检测 [J]. 中国乳品工业, 2007, 35(7):42-45.
- LIU W, JIANG Y J, LV Q, et al. Rapid collection of Salmonella in raw milk with filtration method and its PCR detection[J]. China Dairy Industry, 2007, 35(7):42-45.
- [16] RADEMAKER J L W, HOOLWERF J D, WAGENDORP A A, et al. Assessment of microbial population dynamics during yoghurt and hard cheese fermentation and ripening by DNA population fingerprinting[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(5):457-466.
- [17] CHEN H D, FRANKEL G. Enteropathogenic *Escherichia coli*. unravelling pathogenesis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2005, 29(1):83-98.
- [18] 许会会, 谢芳, 雷连成. 牛奶中志贺氏菌 PCR 检测方法的建立 [J]. 食品安全质量检测学报, 2010, 27(2):43-48.
- XU H H, XIE F, LEI L CH. Development of detection method for Shigella in milk by polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2010, 27(2):43-48.
- [19] 张伟钦, 付宇, 周微. Taqman 荧光实时 PCR 快速检测原料乳中 EPEC [J]. 中国乳品工业, 2009, 37(10):53-55.
- ZHANG W Q, FU Y, ZHOU W. Taqman fluorescent quantitative PCR detection of EPEC in raw milk [J]. China Dairy Industry, 2009, 37(10):53-55.
- [20] WOLFFS P F, GLENCROSS K, THIBAudeau R, et al. Direct quantization and detection of salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR [J]. Applied Environmental Microbiology, 2006, 72(6):3896-3900.
- [21] BURNS K. Recall shines spotlight on pet food [J]. American Vet Medicine Association, 2007, 230:1255-1288.
- [22] THOMAS R, KULKARNI G U. A hydrogen-bonded channel structure formed by a complex of uracil and medicine [J]. Beistein Journal of Organic Chemistry, 2007, 3:17-19.
- [23] 褚庆华, 徐超一, 刘岩. 免疫亲和柱-荧光分析法测定鲜乳和乳粉中的黄曲霉毒素 M₁ [J]. 检验检疫科学, 2003, 13(2):41-43.
- CHU Q H, XU CH Y, LIU Y. The method of immunoaffinity column-fluorescence analysis to determine the aflatoxin M₁ [J]. Inspection and Quarantine Science, 2003, 13(2):41-43.
- [24] 郭军, 张和平. 乳及乳制品中抗生素类兽药残留快速检测技术 [J]. 中国乳品工业, 2004, 32(12):30-35.
- GUO J, ZHANG H P. Introduction on rapid milk antibiotic residues test/assay techniques and kits [J]. China Dairy Industry, 2004, 32(12):30-35.

作者简介

郭清泉, 男, 华南理工大学化学工程博士学位, 副教授, 研究方向: 食品安全检测技术。

E-mail: guoqingquan@gdut.edu.cn

Guo Qingquan, male, Ph. D, associate professor, and his research interests is the determination technology of food safety.