

流式细胞仪快速检测酸奶中乳酸菌含量

杜耿记^{1*}, 金珠¹, 吴小慧¹, 韩磊¹, 李梅², 王丹慧²

(1. 蒙牛乳业(马鞍山)有限公司, 马鞍山 243000; 2. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 010000)

摘要: **目的** 建立一种使用流式细胞仪检测酸奶中乳酸菌含量的快速检测方法。**方法** 吸取稀释后样品匀液 100 μL 加入 20 mL 试管中, 30 min 内使用流式细胞仪检测。经过光电倍增器过滤和检测, 荧光脉冲的密度和高度被记录下来并被换算为细菌的个数。**结果** 与国标法相比, 仪器检测时间约缩短了 3 d, 试验结果表明流式细胞仪检测结果与国标结果 R 值均在 1 以下。**结论** 流式细胞仪法与国标平皿菌落计数法的结果具有很高的 consistency。采用流式细胞仪对酸奶中的乳酸菌进行快速检测, 培养时间为由 48 h 缩短至 13 min, 大大提高了检测速度, 对于乳制品生产企业来说, 意义重大。

关键词: 酸奶; 流式细胞仪; 乳酸菌; 快速检测

Determination the content of lactic acid bacteria in yoghurt by flow cytometry

DU Geng-Ji^{1*}, JIN Zhu¹, WU Xiao-Hui¹, HAN Lei¹, LI Mei², WANG Dan-Hui²

(1. Mengniu Dairy (Ma'anshan) Co., Ltd., Ma'anshan 243000, China; 2. Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd., Hohhot 010000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for the determination of lactic acid bacteria in yoghurt by flow cytometry. **Methods** The diluted sample of 100 μL was absorbed into 20 mL test tube, and it was test on the flow cytometry within 30 min. The density and height of the fluorescent pulse were recorded and converted to the number of bacteria after the photomultiplier was filtered and detected. **Results** Compared with the national standard method, the detection time of the instrument was shortened by 3 d, and the results of the flow cytometry and the national standard showed that the R values were all below 1. **Conclusion** The results of flow cytometry are consistent with those of the national standard colony count method. Using flow cytometry to detect the lactic acid bacteria in yogurt, can shorten the culture time from 48 h to 13 min, which greatly improves the detection speed. It is of great significance to dairy enterprises.

KEY WORDS: yogurt; flow cytometry; lactic acid bacteria; rapid detection

1 引言

近年来, 乳酸菌的快速检测技术得到了很大的发展, 如 3M 菌片法^[1]、ATP 生物发光法^[2]、流式细胞计数法^[3]、微生物自动检测仪^[4]等。但在实际生产中, 标准平板计数法为最广泛应用的方法。但存在的主要缺点为专业要求高、

滞后性严重, 检测精度差。发酵乳国家标准 GB19302-2010 《食品安全国家标准 发酵乳》^[5]中对乳酸菌的规定微生物的限量为 $\geq 1.0 \times 10^6$ CFU/mL, 其检测方法指定 GB 4789.35-2010 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验》^[6], 采用平板计数法进行检测。如果采用标准平板计数法进行乳酸菌检测, 检测时间太长, 显然是不太

*通讯作者: 杜耿记, 助理工程师, 主要从事乳与乳制品检测与研究。E-mail: 272576231@qq.com

*Corresponding author: DU Geng-Ji, Assistant Engineer, Mengniu Dairy (Ma'anshan) Co., Ltd., Ma'anshan 243000, China. E-mail: 272576231@qq.com

容易实现的^[7]。有的乳品厂先将产品进行检测, 等平板法结果出来后再进行出厂销售, 但酸奶在低温下储存保质期短, 这样做影响产品的新鲜度。也有一些乳品厂生产的产品不等乳酸菌检测结果直接将产品调入市场进行销售, 会将乳酸菌达不到产品包装标识标准以及国家要求限量($\geq 1.0 \times 10^6$ CFU/mL)的产品发往市场^[8]。

流式细胞术最初主要应用于科学研究和临床检验, 在微生物学方面的应用则发展相对较晚。近 20 年来, 国内外专家学者使用 Bactiflow ALS 流式细胞仪在微生物学上做了不少的研究和应用工作, 已经成为高水平病原微生物研究中不可缺少的技术, 可用于微生物基因组及功能基因组学、生理生化、临床微生物学、抗感染免疫学、药理学等领域。实际上, 微生物学, 尤其是细菌学当前面临的一些问题, 特别是需要对大数量细菌进行逐个、快速、多参数精确测量时, 流式细胞术很适合解决此类问题。已发表的论文多数是针对酵母菌和各类细菌的测量与分析。酵母菌的测量在技术上比较简单, 其自身体积大; 在酸奶的生产工程中, Bactiflow ALS 流式细胞仪还被应用于检测其中添加的有益的乳酸菌的数量^[9]。

Bactiflow ALS 流式细胞仪可以高速分析上万个细胞, 并能同时从一个细胞中测得多个参数, 具有速度快、精度高、准确性好的优点, 是当代最先进的细胞定量分析技术之一^[10]。目前现行有效的版本为 GB 4789.35-2010^[6], 采用平板计数法进行检测, 检测时间为 48 h。通过使流式细胞仪来验证方法检测范围线性关系、稳定性、采用与国标法对比结果的准确度来验证快速仪器法检测酸奶乳酸菌含量的应用。用本检测技术有以下应用: 快速准确地计数乳酸菌, 快速及时地控制产品在出库前检测过来结果, 快速及时地控制乳酸菌不合格产品流入市场。主要优势为性能出色、操作简便、分析快速(结果在 13 min 内得出), 能够提前发现产品质量风险。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

Bactiflow ALS 全自动流式细胞仪(法国生物梅里埃有限公司); SW-CJ-2F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); HVE-50 高压灭菌器(日本 HIRAYAMA 株式会社平山制作所); MS3 basic 振荡器(广州仪科实验室技术有限公司)。

Chem Sol B24 试剂、Chem Chrome V23 试剂、CSV 试剂、CS13 试剂、Diluent R+CSR+Isored 试剂、Cleaning 5 试剂、ChemSol S 工作液、Cleaning 3 试剂、Antifoam 试剂(法国生物梅里埃有限公司)。

MRS 培养基(北京陆桥技术股份有限公司), 培养基成分为: 蛋白胨 10.0 g、牛肉粉 5.0 g、酵母粉 4.0 g、葡萄糖 20.0 g、吐温 80 1.0 mL、 $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0 g、醋酸钠 $\cdot 3H_2O$

5.0 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g、琼脂粉 15.0 g、蒸馏水 1000 mL、pH 6.2。

酸奶: 本试验的所有产品为蒙牛品牌酸牛奶, 由蒙牛乳业(马鞍山)有限公司生产。

2.2 试验方法

2.2.1 检测原理

流式细胞仪(flow cytometer)是一种对细胞进行自动分析和分选的装置。它可以快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量, 并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分选出来^[11]。

流式细胞仪主要由流动室及液流驱动系统、激光光源及光束形成系统、光学系统、信号检测与存储、显示分析系统、细胞分选系统 5 个部分组成。而绝大多数细菌内部均存在一种胞内酶, 该酶可特异性水解相应底物。该方法将酶的底物与暂无荧光活性的物质相结合作为染料, 染色时该染料可自由进入细胞内部。染料进入细胞后, 胞内酶可水解酶的底物, 同时也将荧光物质释放生成有活性的荧光物质, 并富集在细胞中。染色后, 流式细胞仪将细胞以单细胞悬液的方式注射进仪器内一条石英液相流动室中形成一条狭窄的分析流。此时, 含有活性荧光物质的待测细胞会单个依次通过激光发射器, 每个细胞形成的荧光信号由灵敏的检测器收集, 经数字处理器分析。最终得出样品中的活的微生物的数量^[12]。通过这样的方法可以检测发酵乳(如酸奶等)中乳酸菌(如嗜热链球菌 *S. thermophilus*、保加利亚乳杆菌 *L. bulgaricus*、干酪乳杆菌 *L. casei*、双歧杆菌属 *Bifidobacteria* spp 等)的计数^[13]。

2.2.2 样品处理

制作样品稀释液: 无菌称取 25 g(或 mL)样品置盛有 225 mL 无菌生理盐水的无菌锥形瓶(瓶内预置适当数量的无菌玻璃珠)中, 充分混匀, 制成体积(或质量比体积)比为 1:10 的样品匀液。

用 1 mL 无菌吸管吸取样品匀液 1 mL, 沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 稀释液的无菌试管中振摇试管并换用 1 支无菌吸管反复吹打使其混合均匀, 制成体积比(V:V)为 1:100 的样品匀液。

另取 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸头, 按上述操作顺序, 做 10 倍递增样品匀液至少稀释 1:10000(V:V)的样品均液, 每递增稀释 1 次, 即换用 1 次 1 mL 灭菌吸管或吸头。

2.2.3 样品检测

(1)GB 4789.35-2010 国标检测方法^[6](以下简称平板法): 根据待检样品活菌总数的估计, 选择 2~3 个连续的适宜稀释度, 每个稀释度吸取 0.1 mL 样品匀液分别置于 2 个 MRS 琼脂平板, 使用 L 形棒进行表面涂布。

吸取 1 mL 样品匀液于无菌平皿内, 每个稀释度做 2 个平皿, 选择 2 个稀释度。同时, 分别吸取 1 mL 稀释液加

入 2 个无菌平皿内作空白实验。

(2) 流式细胞仪器法

Bactiflow ALS 全自动流式细胞仪是使用标记试剂来标记活的微生物。仅有活的微生物可以在细胞内将非荧光底物酶切, 进而释放并累计荧光。染色后, 流式细胞仪将细胞以单细胞悬液的方式注射进仪器内的一条石英液相流动室中, 形成一条狭窄的分析流。此时, 含有活性荧光物质的待测细胞会单个依次通过激光发射器, 每个细胞形成的荧光信号由灵敏的检测器收集, 经数字处理器分析^[14]。

2.2.4 培养及计数

(1) 平板法

(36±1) °C 条件下厌氧培养 (48±2) h 后计数平板上的所有菌落数。可用肉眼观察, 必要时用放大镜或菌落计数器, 记录稀释倍数和相应的菌落数量。菌落计数以菌落形成单位(colony-forming units, CFU)表示。

(2) 流式细胞仪器法

吸取 1:10000 样品匀液 100 μL 加入 20 mL 试管中, 30 min 内上机检测。在样品中加入缓冲液、荧光标记液、去除多余荧光物质溶液组成的培养试剂, 以标记样中的细胞、渗透细菌并沾染 DNA。在培养过程中, 荧光标记液快速渗入所有细胞中, 同时超声波降解器对于干扰粒子进行化学降解、瓦解剩余的细菌菌落并减少背景荧光。

培养完成后, 样品进入仪器分析。在流动细胞区中, 细胞在光源的照射下排列并发出荧光, 荧光信号得到光学系统的收集, 经过光电倍增器过滤和检测, 荧光脉冲的密度和高度被记录下来并被换算为细菌的个数。

3 结果与分析

3.1 线性关系试验

使用流式细胞仪方法, 每个稀释度平行 3 次, 检测结果显示: 测试的 5 种酸奶样品, 乳酸菌数量均达到 GB 19302-2010《食品安全国家标准 发酵乳》^[5]中乳酸菌的限量 10⁶ CFU/mL, 流式细胞仪乳酸菌计数范围在 500~20000 个/0.1 mL 之间。同一样品中不同稀释度检测得到的结果基本一致, 呈现显著的线性关系, 见图 1。

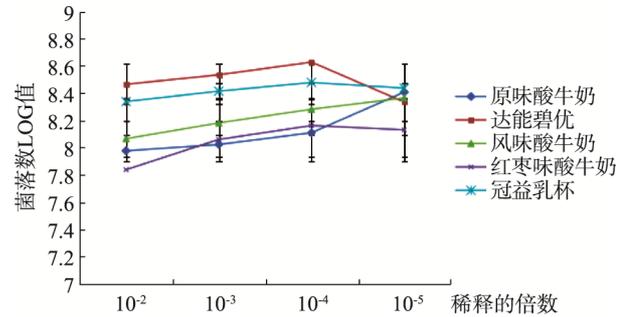


图 1 线性关系图表(n=3)

Fig. 1 Linear relation chart (n=3)

3.2 稳定性试验

对同一稳定样本进行 6 次重复测定, 重复性偏差数据见表 2。实验结果显示: 对同一样本, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)≤10%, 重复性良好, 结果稳定。

3.3 不同方法对比试验

根据 GB19302-2010^[5]《食品安全国家标准 发酵乳》中要求乳酸菌数≥1.0×10⁶ CFU/mL, 综合考虑流式细胞仪乳酸菌计数范围在 500~20000 个/0.1 mL, 选用稀释度为 10⁻⁴ 倍时平均计数结果与 GB 4789.35-2010^[6]传统平板方法进行一致性对比分析。R=参考方法计数结果/流式细胞仪计数结果, 当 R 值在 0.1~10 之间^[15], 两种方法结果具有一致性。检测结果见表 4, 实验结果显示 29 组数据中一个样品低于下控制线, 其他样品均在质量控制范围之内。即有 96% 的样本检测结果准确可靠, 其余 4% 的样本数值略有浮动, 但浮动范围相对较小。

4 结论

用仪器法检测酸奶中的乳酸菌可以同时进行多个样品的处理, 单个样品检测耗时 13 min。多个样品同时检测时, 单个样品的平均检测时间将仅为 5 min 左右, 极大地缩短了检测时间, 能够满足大量样品现场检测的要求。仪器的线性范围宽, 达 500~20000 Count/0.1 mL 之间时呈现显著的线性关系, 能满足不同酸奶样品的乳酸菌测定。

表 1 重复性偏差数据(n=6)
Table 1 Repetitive bias (n=6)

编号	产品名称	计数结果对数值平均值	标准偏差	相对标准偏差
1	优益 C 芦荟味	8.6	0.026	0.3%
2	内蒙古老酸奶	7.1	0.066	0.9%
3	大果粒整颗蓝莓	8.4	0.067	0.8%

表 2 不同方法对比试验数据
Table 2 Comparative test data of different methods

序号	产品批次	产品种类	流式细胞仪结果 (count/mL)	GB 4789.35-2010 国标检测方法(CFU/mL)	R
1	1G20160209T04 16: 35	优益 C 芦荟味	3.78E+08	6.95E+08	0.3
2	4K20160130C02	内蒙古老酸奶	1.2E+07	4.9E+07	0.6
3	1D20160214J02 06: 34	冠益乳桑葚果粒	2.2E+08	8.7E+08	0.6
4	2R20160124D0103:14	消健黄桃果粒	3.0E+08	5.7E+08	0.3
5	2E20160129C03	金爵蓝莓果粒	2.6E+08	6.8E+08	0.4
6	1G20160216M05 20: 35	蒙牛风味酸牛奶	3.8E+08	6.5E+08	0.2
7	2E20160127C04	航空杯冠益乳黄桃果粒	6.5E+08	8.3E+08	0.1
8	1H20160124D0309: 06	紫薯酸牛奶	3.8E+08	6.4E+08	0.2
9	1620160203604 10:12	大果粒整颗蓝莓	2.5E+08	9.4E+08	0.6
10	1G20160209T02 12: 21	优益 C 原味	2.0E+08	8.6E+08	0.6
11	1G20160215S03 18: 39	优益 C 苹果味	1.2E+08	1.4E+09	1.0
12	1D20160214J02 03: 25	冠益乳草莓味	3.0E+08	5.5E+08	0.3
13	1D20160203H07 17: 13	冠益乳黄桃果粒	2.9E+08	4.1E+08	0.1
14	1G20160214E01 03	航空杯原味	3.3E+08	8.7E+08	0.4
15	2E20160129D02	金爵原味	2.7E+08	9.3E+08	0.5
16	1G20160209G02 13: 31	大果粒整颗草莓	2.3E+08	7.0E+08	0.5
17	1G20160203G04 10: 12	大果粒桑葚+椰果	2.6E+08	7.2E+08	0.4
18	2R20160124E0521: 41	消健草莓果粒	3.8E+08	9.8E+08	0.4
19	2R20160124D0103: 14	消健黄桃果粒	3.2E+08	6.8E+08	0.3
20	4K20160128C02	内蒙古老酸奶	9.5E+08	8.0E+08	-0.1
21	1G20160213P07 21: 30	红枣风味酸牛奶	2.6E+08	6.6E+08	0.4
22	1H20160124D0309: 06	紫薯风味酸牛奶	2.1E+08	6.7E+08	0.5
23	1G20160227T0211: 31	优益 C 绿茶味	1.6E+08	5.4E+08	0.5
24	1G20160307T0418: 35	优益 C 芦荟味	9.4E+07	6.4E+08	0.8
25	1G20160309T0205: 39	优益 C 原味	1.1E+08	6.2E+08	0.8
26	1G20160227T0109: 33	优益 C 红茶	1.5E+08	4.6E+08	0.5
27	1G20160303T0100: 38	优益 C 减糖海盐柠檬味	2.8E+08	6.4E+08	0.4
28	1G20160307S0317: 05	优益 C 苹果味	1.2E+08	6.0E+08	0.7
29	4K20160130C02	内蒙古老酸奶	6.8E+07	6.7E+07	0.0

考虑到对比实验是在不同的实验环境下进行的, 而且实验开始的时间有短暂的先后分别, 仪器与平皿菌落计数法的结果依然具有很高的相关性, 并且与国标法相比, 仪器检测的结果更精确、更可靠, 平行样的重复性更好。流式细胞计数法检测单一样品约需 13 min, 连续检测速度更快, 对于乳制品生产企业来说, 意义重大。

通过 Bactiflow ALS 流式细胞仪, 有效提高酸奶中乳

酸菌含量检测时间, 通过实验检测, 建立了准确度高、稳定性强的酸奶中乳酸菌的分析方法, 实现面临大规模样品时, 会影响效率下一步可开发快速培养方法, 从而缩短培养分析时间, 提高检测效率。乳品厂商既能满足产品的新鲜度的需求也能保证发往市场销售的酸奶中含有乳酸菌含量达到国家标准 GB 19302-2010《食品安全国家标准 发酵乳》^[3]中乳酸菌的限量(10^6 CFU/mL)要求。

参考文献

- [1] 徐思琦, 唐丽霞, 帅瑞琦, 等. 食品快速测试片在微生态制剂企业内部质控中的应用[J]. 广东化工, 2012, 39(14): 20-21.
Xu SQ, Tang LX, Shuai RQ, *et al*. The food rapid test film is used in the internal quality control of micro-ecological preparation enterprise [J]. Guangdong Chem Ind, 2012, 39(14): 20-21.
- [2] 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]. 食品工业科技, 2008, 29(7): 233-238
Li CY, Huo GC, Wang DG, *et al*. The ATP bioluminescence method is a rapid measure of the total number of microbes' raw milk [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, 29(7): 233-238
- [3] 孔丽娜, 李祖明, 吴聪明, 等. 生乳微生物快速检测技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(24): 268-271
Kong LN, Li ZM, Wu CM, *et al*. Research progress on rapid detection technique of microorganism in raw milk [J]. Food Res Dev, 2013, 34(24): 268-271.
- [4] 田波, 霍贵成, 籍婷. 乳与乳制品中乳酸菌的检测技术[J]. 中国乳品工业, 2004, 32(2): 27-31.
Tian B, Huo GC, Ji T. Detection of *Lactobacillus* in milk and dairy products [J]. China Dairy Ind, 2004, 32(2): 27-31.
- [5] GB 19302-2010 食品安全国家标准 发酵乳[S].
GB 19302-2010 National food safety standard Fermented milk [S].
- [6] GB 4789.35-2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌测定[S].
GB 4789.35-2010 National food safety standard Food microbiological examination: Lactic acid bacteria [S].
- [7] Ounkomol C, Yamada S, Heinrich V. Single-cell adhesion tests against functionalized microspheres arrayed on AFM cantilevers confirm heterophilic E- and N-cadherin binding [J]. Biophys J, 2010, 99(12): 100-102.
- [8] 余华. 酸奶质量的控制及保鲜[J]. 成都大学学报, 1997, 16(2): 282311.
Yu H. Quality control and preservation of yoghurt [J]. J Chengdu Univ, 1997, 16(2): 282311.
- [9] 张俊峰, 刘道亮, 赵占民, 等. 流式细胞计在微生物快速检测领域的研究进展[J]. 食品工程, 2010, 37(26): 19-22.
Zhang JF, Liu DL, ZHao ZM, *et al*. The progress in the field of rapid microbiological testing was made by flow cytometry [J]. Food Eng, 2010, 37(26): 19-22.
- [10] 刘新星, 霍转转, 云慧, 等. 流式细胞术在细菌快速检测中的应用[J]. 微生物学通报. 2014, 41 (1): 161-168.
Liu XX, Huo ZZ, Yun H, *et al*. The application of flow cytometry in the rapid detection of bacteria [J]. Microbiol Bull, 2014, 41(1): 161-168.
- [11] Jenne CN, Wong CHY, Petri B, *et al*. The use of spinning-disk confocal microscopy for the intravital analysis of platelet dynamics in response to systemic and local inflammation [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25109.
- [12] 赵书涛, 武晓东, 王策, 等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22): 4378-4381.
Zhao ST, Wu XD, Wang C, *et al*. The principle, application and the latest development of flow cytometer [J]. Adv Mod Biomed Sci, 2011, 11(22): 4378-4381.
- [13] 顾瑞霞, 谢继志. 乳酸菌与人体保健[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
Gu SX, Xie JH. Lactic acid bacteria and human health [M]. Beijing: Science Press, 1995.
- [14] 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. Fluid cell surgery quickly detects the total number of bacteria in the milk [J]. Sci Technol Food Ind, 2007, 28(9): 197-200.
- [15] Wang YY, Hammes F, De-Roy K, *et al*. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology [J]. Trend Biotechnol, 2010, 28(8): 416.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



杜耿记, 助理工程师, 主要从事乳与乳制品检测与研究。
E-mail: 2536659271@qq.com